

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19298

研究課題名(和文)「ヘアピンペプチド提示法」によるアデノ随伴ウイルスの改変と感染トロピズムの拡張

研究課題名(英文) Re-engineering of AAV particle by "peptide insertion" method

研究代表者

高木 淳一 (Takagi, Junichi)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90212000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子治療のベクターとして期待されるアデノ随伴ウイルス(AAV)のキャプシド蛋白質にヘアピンペプチドを埋め込むことにより、AAVの遺伝子導入効率増大とトロピズムの拡張を目指した。まずAAV2キャプシド上でペプチド挿入を許容する部位を2カ所同定し、これらに特定の受容体に対する親和性を有する環状ペプチドの内部配列を埋め込んだ変異型ウイルスを作成した。さらにこの受容体を安定発現する細胞を用い、デザインした変異型AAV2が通常の細胞への感染能を失うと同時に、ペプチドと同じ受容体指向性を獲得することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患をゲノムレベルで「治療」してしまう夢の技術であるが、様々な課題のためにまだ実現に至っていない。アデノ随伴ウイルス(AAV)は遺伝子治療における最も有望なベクターだが、そのトロピズム(細胞指向性)を随意にコントロールすることが出来ていない。本研究によって、AAVのキャプシドに標的結合能をもつヘアピンペプチドを提示させることによって、特定の受容体を発現する細胞だけに感染し遺伝子発現を誘導できることを示した。つまり、筋肉、肝臓、網膜、などの臓器だけに目的の遺伝子を届ける道が開けたと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at changing the cellular tropism of adeno-associated virus (AAV), one of the most promising vector for gene therapy. Although AAV can infect many cell types, the infection efficiency is not high enough to warrant its broad application in gene therapy. The broad tropism can also be a problem where gene delivery needs to be restricted to a specific organ/tissue. In order to achieve greater control of AAV's cellular infectivity, we chose "peptide grafting" method to grant AAV capsid to bind to a specific receptor and infect limited type of cells for gene delivery. We first sought for loop positions that allow peptide insertion, and identified 2 candidate sites. Then an artificial peptide sequence derived from a macrocyclic peptide known to bind to Plexin B1 was inserted in these positions. We confirmed that the modified virus was able to infect cells expressing Plexin B1 but not the parent cells, indicating the general applicability of this approach.

研究分野：構造生物学

キーワード：アデノ随伴ウイルス 環状ペプチド ターゲティング 遺伝子治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患をゲノムレベルで「治療」してしまう夢の技術として、1990年に初めてアデノシンデアミナーゼ欠損症患者に対して実施されたが、ウイルスベクターへの過剰免疫や、ウイルス挿入によるがん化など多くの問題が明らかになり、現時点ではその研究開発は規模の面でも対象疾患の面でも限定的となっている。その中でもアデノ随伴ウイルス (adenovirus-associated virus、以下 AAV と略す) はそれ自体では複製能を持たないため理論上病原性がなく、現在の遺伝子治療において主流と位置づけられているベクターである。AAV はキャプシドウイルスで、VP3 と呼ばれるキャプシド蛋白質を介して細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) へ結合することが感染の第 1 ステップである。このため、HSPG を持つ広範な細胞に対して遺伝子を導入できるが、逆に特定の細胞や組織をターゲットできない。しかもその遺伝子導入効率は極めて低く、大量に投与しなければならないため、一回の投与で抗体ができてしまい、二度目の投与が出来なくなる。つまり、遺伝子治療を広い範囲で実現するには、(i) AAV ベクターのトロピズム (細胞指向性) を随意にコントロールし、(ii) 少量のベクターで遺伝子導入ができるように感染効率を飛躍的に高める、という 2 つを達成する必要がある。これまでもキャプシド表面にインテグリン結合配列 (RGD 配列) を提示するなどしてこれらを解決しようとする試みはあったが、キャプシドの立体構造を十分に考慮したものでは無く、有効な改変ウイルスのデザインにはまだ誰も成功していない。

代表者が数年前に独自に開発したアフィニティーペプチドタグシステム「PA タグ」は、現在市販もされ、広く利用されるようになっている。さらに我々は、X 線結晶構造解析によって PA タグがその抗体 NZ-1 に認識される際にヘアピンターン構造を取っていることを発見し、これをヒントに、12 残基のタグペプチドを目的蛋白質のループ上に提示する「ヘアピンペプチド提示法」を考案した。短いタグペプチドを蛋白質の構造ドメイン中に自在に挿入・提示できることは、目的蛋白質の末端が利用できない (埋もれていたり活性部位が近いなど) 場合に有用である。そこで代表者は、内部配列しか外側に露出しておらず、しかもごく一部のループ構造以外には改変が困難なウイルスキャプシド蛋白質にこれを応用することを思いついた。すなわち、PA タグや同様にヘアピンターンを形成しやすいペプチドを AAV のキャプシドに埋め込み、細胞側の特定の分子に認識させるようにすれば、HSPG 経由では決して得られない細胞指向性や、野生型を遙かに超える遺伝子導入効率をもつ人工改変 AAV を開発できるのではないかと考えたのである (図 1)。

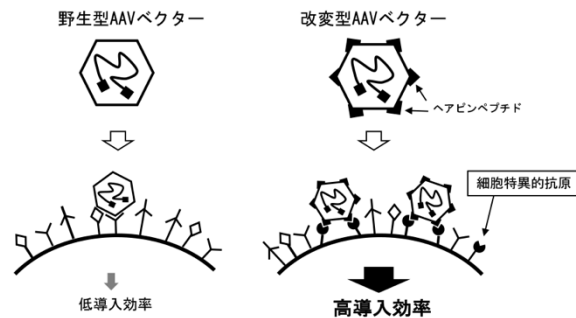


図 1 AAV 改変の概念

2. 研究の目的

上記のような状況の中、代表者がこれまで培ってきた構造生物学的知識とそれを利用した蛋白質工学の技術、応募者が独自に開発して市販されているアフィニティーペプチドタグシステム「PA タグ」、そして同タグシステムの「ヘアピンペプチド提示法」という最新の応用技術を組み合わせることで、AAV ベクターの持つ上記の欠点を克服する技術開発を行うことを計画した。具体的には、(1) PA タグを用いて機能的認識ペプチドを AAV の VP3 蛋白質のループに提示できる方法の開発、(2) そのループ提示型改変 AAV ベクターを用いた遺伝子導入活性の評価と最適化、(3) 第 2 の AAV 受容体 (AAVR) の認識部位の解明、(4) 特異的受容体ターゲットペプチドを用いたトロピズム拡張の証明、の 4 つの項目を行う。本研究は、これまで世界中で多くの研究者が試みながらも果たせなかった「遺伝子治療を真に実現するためのベクターの本質的改良」のために、全くの門外漢であった代表者が自らの開発した技術と構造生物学的視点で取り組むものであり、成功した場合の医学的波及効果の大きさはもとより、それを通して得られる AAV キャプシド構築原理についての新知見という点でも「挑戦的研究」に極めてふさわしいものである。

3. 研究の方法

(1) PA タグを利用した、AAV キャプシドへのペプチド挿入デザインの評価と最適化

代表者はすでに、AAV の VP3 キャプシド結晶構造 (図 2) をもとに、内部配列のうちキャプシド表面に突出したループを構成する領域を複数同定し、このうち 2 か所について PA タグ配列を挿入した AAV ベクターを作製した。そしてそれらが細胞内で野生型同様に正しく粒子としてパッケージングされることを、リアルタイム PCR で確認した。このこ

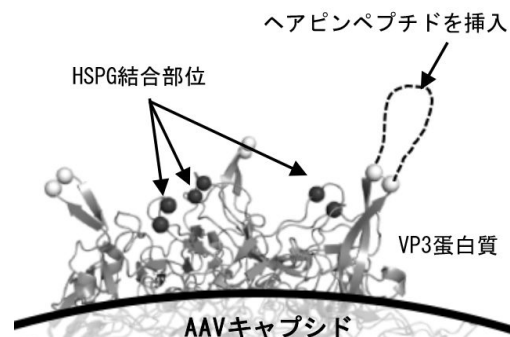


図 2 VP3 蛋白質の立体構造 (部分) とペプチド挿入部位

とは、人工配列の挿入がキャプシドの構造や内部への一本鎖 DNA の組み込みにまったく影響しないことを示している。この方法を用い、残りのループ領域や上記領域への挿入配列の最適化（挿入位置、リンカー長など）を行う。PA タグ挿入を許容したサイトにはそれ以外の配列の挿入も可能である可能性が高い。

(2) ペプチド挿入型 AAV ベクターによる細胞感染の評価

まず Proof of concept 実験として、細胞表面に PA タグ結合性の人工受容体を発現させた細胞への PA タグ挿入型 AAV の感染を評価する。一方、後者の変異体については野生型と同じ HSPG 経由の感染能を保持したまま新たなエピトープを提示できたことを意味するので、これは遺伝子導入効率をブーストするエンジニアリングに最適である。前述の人工受容体発現細胞をもちい、添加する AAV ベクターの量を変化させて感染実験をおこない、野生型の 100 分の 1 以下のタイター量で感染成立するような変異体の取得を目指す。

(3) AAV 感染成立に必要な第 2 の相互作用部位の解明

HSPG に加えて第 2 の受容体として最近報告された AAVR (K1AA0319L) に結合する VP3 上の領域を同定する。これは、改変型 AAV 粒子と、AAVR の細胞外領域との直接の相互作用を評価することで行う。

(4) PA タグ以外のターゲティング用ヘアピンターンペプチドを用いたトロピズムの拡張

応募者が最近報告した、セマフォリン受容体(プレキシン B1)結合性の環状ペプチドを AAV キャプシド上に提示し、この改変ベクターがプレキシン B1 発現細胞(樹立済み)に対して特異的かつ高効率で遺伝子導入をできるかどうかを、前項と同様な方法で評価する。

4. 研究成果

研究期間内に得られた成果を、年度ごとに述べる。

平成 30 年度

項目 1 (PA タグを利用した、AAV キャプシドへのペプチド挿入デザインの評価と最適化) では、AAV の VP3 キャプシド結晶構造をもとに、内部配列のうちキャプシド表面に突出したループを構成する領域を 4 カ所同定し、ここに PA タグ配列を挿入した AAV ベクターを AAVpro Helper Free System (タカラバイオ) を用いて作製した。それらが細胞内で野生型同様に正しく粒子としてパッケージングされることを、リアルタイム PCR で確認した。項目 2 (ペプチド挿入型 AAV ベクターによる細胞感染の評価) では、発現カセットに GFP 遺伝子を組み込んだ pAAV-EGFP を自作し、これを pRC プラスミドとともにもちいて改変型 AAV 粒子を調製した。HEK 細胞に感染させ、GFP の発現をモニターしたところ、4 つの挿入変異体ごとに粒子形成能に与える影響がことなることがわかった(図 3)。また、野生型の pRC プラスミドと共発現することでキメラウイルスを作製したところ、100% 変異型では粒子形成ができない場合もウイルスが得られることがわかった。項目 3 (AAV 感染成立に必要な第 2 の相互作用部位の解明) においては、AAV 受容体である AAVR (K1AA0319L) の組み換え可溶性タンパク質を作製し、精製タンパク質を得た。また、AAV2

由来の VP3 キャプシドタンパク質を抗原としたモノクローナル抗体を作製し、ネイティブのウイルスを高親和性で認識する抗体を 9 クローン樹立した。項目 4 (PA タグ以外のターゲティング用ヘアピンターンペプチドへの応用) では、AAV キャプシド上に PA ペプチド以外の配列、具体的には MAP タグペプチドおよびヒトプレキシン B1 結合性ペプチド mP6-9 を挿入した変異ウイルスを構築した。項目 1 については実験系の構築を終了し、変異ウイルスとその遺伝子導入試験に必要なすべてのベクターをそろえ、また、4 カ所の挿入候補部位の同定に成功したので本年度で終了とした。

PA tag 挿入サイト	なし(WT)	S1	S2	S3	S4
タイター (qPCR)	100% ($\sim 1 \times 10^8$ vg/ μ l)	~100%	~100%	~20%	~3%
遺伝子導入能 (GFP)					

図 3 PA タグ挿入キャプシドの粒子形成能と遺伝子 (GFP) 導入能

平成 31 / 令和元年度

項目 2 (ペプチド挿入型 AAV ベクターによる細胞感染の評価) において、発現カセットに GFP の代わりにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pAAV-luc を自作し、これを pRC プラスミドとともにもちいて改変型 AAV 粒子を調製した。HEK 細胞に感染させ、ルシフェラーゼの活性を測定することで遺伝子導入能の定量系を構築した。また、GFP に代えてより明るく発現が安定な AcGFP を搭載した AAV も作製し、遺伝子導入量を FACS によって定量する系も構築した(図 4)。項目 3 (AAV 感染成立に必要な

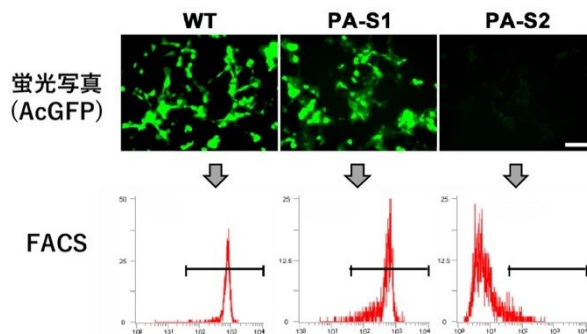


図 4 AcGFP 発現の FACS による定量解析

第2の相互作用部位の解明)では、前年度までに AAV2 由来の VP3 キャプシドタンパク質を抗原としたモノクローナル抗体を9クローン樹立し、その認識特異性をしらべた結果、残念ながらどの抗体もネイティブな AAV 粒子に対する反応性が極めて低いことがわかった。しかしながら、PA タグ挿入型 AAV の感染実験を通して、4カ所の挿入候補部位のうち、必須なのは S2 だけであり、他の3カ所は受容体への結合に必須ではないことがわかった。項目4 (PA タグ以外のターゲティング用ヘアピンターンペプチドへの応用)においては、AAV キャプシド上にヒトプレキシシン B1 結合性ペプチド mP6-9 を挿入した変異ウイルスを構築し、プレキシシン B1 発現細胞への感染実験を行った結果、予想通りプレキシシン B1 の発現に完全に依存する遺伝子導入が起こることを確認した(図5)。これにより、本研究課題の最大目標である、「標的指向性の付与」が可能であることを実例をもって示すことができた。

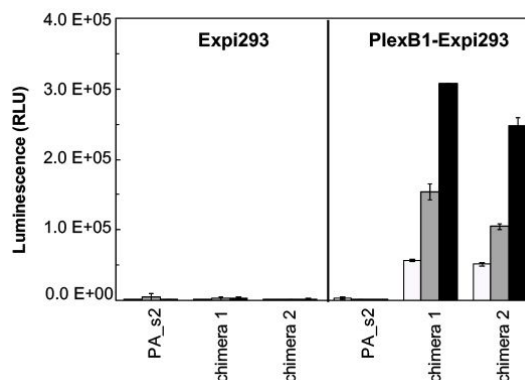


図5 ペプチド挿入型キメラウイルスの遺伝子導入能粒子を形成するVP3の約10%にPlexin B1結合性ペプチドm6A9を挿入したキメラウイルス(chimera 1はs1に、chimera 2はs2に挿入)を、標的受容体であるPlexB1を安定発現するExpi293細胞と、その親株に感染させ、ルシフェラーゼレポーター

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Bashiruddin Nasir K., Matsunaga Yukiko, Nagano Masanobu, Takagi Junichi, Suga Hiroaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Facile Synthesis of Dimeric Thioether-Macrocyclic Peptides with Antibody-like Affinity against Plexin-B1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1847 ~ 1851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K	4. 巻 15
2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0285-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirai Hidenori, Matoba Kyoko, Mihara Emiko, Arimori Takao, Takagi Junichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Crystal structure of a mammalian Wnt-frizzled complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 372 ~ 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0216-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otero-Ramirez Manuel E., Matoba Kyoko, Mihara Emiko, Passioura Toby, Takagi Junichi, Suga Hiroaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Macrocyclic peptides that inhibit Wnt signalling via interaction with Wnt3a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1039/d0cb00016g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 7件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Junichi Takagi
2. 発表標題 Use of small and stable antibody scaffold Fv-clasp to facilitate structural studies of drug-target molecules
3. 学会等名 The 10th annual PEGS Europe "Protein&Antibody Engineering Summit" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木淳一
2. 発表標題 Crystal structure of human Wnt3 reveals its signaling mechanism on cell surface
3. 学会等名 Seminar at Universita Cattolica del Sacro Cuore (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木淳一
2. 発表標題 LassoGraft Technologyによる新規バイオ医薬品モダリティの創成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会シンポジウム「日本発新バイオ医薬品イノベーションを目指す最先端創薬」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木淳一
2. 発表標題 理学研究者が行うタンパク質工学～アカデミアが目指すべき技術開発とは？
3. 学会等名 2019年度生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木淳一
2. 発表標題 LassoGraft Technology による新規バイオ医薬品モダリティの創成
3. 学会等名 第5回蛋白質工学研究会ワークショップ『産業展開と構造生物学』（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新たな結合特異性を抗体に付与する超汎用法	発明者 菅裕明、高木淳一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-144345	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----