

平成23年 6月 7日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390383

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルスベクターを応用した脳神経疾患に対する細胞遺伝子療法

研究課題名（英文）AAV vector-mediated cell and gene therapy for neuronal diseases

研究代表者

岡田 尚巳（OKADA TAKASHI）

独）国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：00326828

研究成果の概要（和文）：

脳神経疾患に対する治療蛋白質の長期補充療法を実現するため、(1)新規 AAV ベクター作製システムおよび(2)ベクター産生型細胞の移植による治療遺伝子増幅システムの開発を計画した。ウイルス粒子と中空粒子の等電点が異なることを予測し、強イオン交換膜を応用して、高規格なウイルス粒子の精製方法を検討した。密度勾配遠心による粗精製操作に加え、強イオン交換膜による陽イオン交換と陰イオン交換を組み合わせることで、中空粒子の回収および除去効率を格段に高め、極めて純度の高いベクターを調製する技術を開発し、研究室における標準的なベクター作製システムとして実用化を達成した。この応用として、ベクター系による蛋白質補充療法を考案し、脳卒中モデルである SHR-SP において炎症制御療法の効果を実証した。さらに、ベクター系を応用した細胞遺伝子治療として、間葉系幹細胞の悪性神経膠芽腫への集積性を証明し、病巣標的化ベクター産生細胞を開発した。実際に、このベクター産生細胞を用いて動物モデルの腫瘍組織内における遺伝子増幅と治療効果の増強作用を証明した。

研究成果の概要（英文）：

To realize novel protein supplementation therapy for neuronal diseases, we have developed systems for AAV vector production and vector-producing cells. By using effective ion-exchange adsorbers, improved purification of vector particles was investigated. In addition to the step-gradient ultracentrifugation procedure, dual ion-exchange procedures enhanced removal of the empty capsids to realize highly-purified vector production at hand. As an application for the AAV-mediated protein supplementation therapy, therapeutic effects of anti-inflammatory treatment on the mice stroke model were successfully demonstrated. Furthermore, vector-producing mesenchymal stem cells to target glioma were developed to target seat of disease with improved anti-tumor effects *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：AAV ベクター、遺伝子治療、神経疾患

1. 研究開始当初の背景

脳神経疾患に対する新規の集学的治療法の開発において、遺伝子導入技術を応用した再生医療や遺伝子治療の実用化が期待されているが、その実用化には、より導入効率の優れたベクター系および周囲の環境に応じた病態特異的な遺伝子発現システムの開発が必要である。これまでにアデノウイルスなどに由来する遺伝子導入ベクターが広く検討されているが、長期間の遺伝子発現は困難であり、炎症による脱髄も指摘されている。脳腫瘍に対しては、ベクター産生細胞を腫瘍組織内に移植する遺伝子治療法が 1992 年に NIH の R. M. Blaese 博士らにより開発され欧米で臨床試験が検討されたが、移植細胞がマウス由来のもので拒絶されやすく、実用化には至っていない。

近年、長期間遺伝子発現が持続し炎症反応も低いアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが注目されているが、ベクター調製技術や遺伝子導入法の改良が必要である。申請者は、ガス交換システムを用いた大規模培養系を開発し、従来の作業効率を大きく改善した (Okada *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 16: 1212-1218, 2005)。また、強イオン交換膜を利用した精製法 (特願 2005-314476)、およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 HDACi による発現増強法 (Okada *et al.*, *Mol. Ther.* 13: 738-746, 2006 ; 特願 2005-505834、PCT/JP2004/005166) を開発した。今後国内で増加が見込まれる AAV を利用した臨床試験

に対応するため、さらに効率を改善した作製システムや、Good manufacturing practice (GMP) 準拠品質のベクター調製系の開発が急務である。

また、腫瘍を標的に治療遺伝子やベクターを運ぶ細胞として、腫瘍や炎症組織への集積性を有する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell) あるいは Multipotent mesenchymal stromal cell (MSC) が有用と考えられる。MSC は HLA が一致しなくても使用可能で倫理的な障壁が低く、移植時の副作用である移植片対宿主病 (Graft versus host disease: GVHD) など炎症反応に対する臨床試験が実施されている (Le Blanc, *et al.*, *The Lancet*; 2004; 363, 9419)。ところが、遺伝子修飾 MSC は不安定であり、長期間本来の性質を維持することや、生体内で長期間治療蛋白質を発現させることは困難である。そこで、ベクター産生型 MSC を構築し、これを腫瘍に集積させた後にベクターを産生させ、腫瘍細胞自身に長期安定に治療蛋白質を産生させるシステムを考案した。

2. 研究の目的

脳神経疾患に対する新規治療法の開発に向け、優れた遺伝子発現システムの開発が期待されている。AAV ベクターは非病原性 AAV に由来し、頭蓋内での炎症も起こしにくく、我々はその有効性と安全性を検証してきた。臨床試験に向け、大規模のベクターを高い精製効率で調製する技術の開発が急務である。

本研究では、効率よく高純度の AAV ベクターを調整する手法を開発することを目的とした。また、腫瘍や炎症組織への集積性を有する間葉系幹細胞に着目し、生体の標的組織内でベクターを産生させ、これを利用し長期安定に治療蛋白質を産生させるシステムの有効性を検証した。

3. 研究の方法

悪性神経膠芽腫および動脈硬化症に対する治療蛋白質の長期補充療法を実現するため、(1)新規 AAV ベクター作製システムおよび(2)ベクター産生型細胞の移植による治療遺伝子増幅システムの開発を実施した。

新規 AAV ベクター作製システムとして、新規強イオン交換膜を利用した精製方法を検討し、ベクター中に含まれる中空粒子の除去効率を検討した。蛋白質補充療法への応用として、脳卒中モデルである SHR-SP ラットや、肺高血圧症ラットにおいて、IL-10 発現 AAV ベクターを用いた炎症制御療法の効果を検証した。

また、ベクター産生型細胞を用いた新規治療技術として、間葉系幹細胞の悪性神経膠芽腫への集積性を応用し、病巣標的化ベクター産生細胞を開発した。このベクター産生細胞を用いて、マウス担癌モデルの腫瘍組織内における遺伝子増幅と治療効果を検討した。

4. 研究成果

新規強イオン交換膜を利用し、ベクター中に含まれる中空粒子の除去効率を格段に高め、極めて純度の高いベクターを調製する技術を開発し (Okada *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009)、研究室における標準的なベクター作製システムとして実用化を達成した。得られた高純度ベクターを用いて IL-10 発現ベクターによる炎症制御治療実験を行なった結果、脳卒中モデルである SHR-SP ラットや、肺高血圧症ラットにおいて、著明な治療効果が得られた (Nomoto T. *et al.*, Gene Ther, 16:383-91, 2009、Ito T. *et al.*, Circ Res, 101: 734-741 2007 ほか)。ベクター系を応用した細胞治療に関しては、間葉系幹細胞の悪性神経膠芽腫への集積性を証明し、病巣標的化ベクター産生細胞を開発した。実際に、このベクター産生細胞を用いて動物モデルの腫瘍組織内における遺伝子増幅と治療効果の増強作用を証明した (Okada *et al.*, Front

Biosci 13: 1887-1891, 2008、Uchibori *et al.*, J Gene Med 11: 373-81, 2009)。

引き続き、悪性神経膠腫、難治性てんかん、および脳血管障害に対する治療成績をさらに改善させるため、外科的治療の際に持続的遺伝子導入法を併用する新規治療蛋白質補充療法の開発が強く期待される。AAV やその産生細胞を治療に用いると、安全で持続的な蛋白質補充療法の実現が可能となる。今後、その基盤技術として、(1)独自の高純度ベクター作製システムの開発、および(2)ベクター産生型幹細胞の移植による治療遺伝子増幅システムの開発を引き続き推進する。また、これらの技術の応用として、悪性神経膠芽腫の再発予防、難治性てんかんの治療、および、クモ膜下出血後の脳血管れん縮の予防に関し、モデル動物を用いた治療実験を行い、臨床応用に向けた課題の抽出と有効性・安全性の評価を推進する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S., Ozawa, K. Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes. Hum Gene Ther, 20:1013-1021, 2009. 査読有
2. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K. I., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y. and Ozawa, K. Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Gene Ther, 16:383-91, 2009. 査読有
3. Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M.,

Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K. & Ozawa, K. : Interleukin-10 Expression Mediated by an Adeno-Associated Virus Vector Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. Circ Res, 101: 734-741 2007. 査読有

〔学会発表〕(計43件)

1. 岡田尚巳: Scalable purification of AAV1 and AAV8 vectors using dual ion-exchange adsorptive membranes, 日本遺伝子治療学会第1回遺伝子治療研究奨励賞 受賞講演 第16回日本遺伝子治療学会学術集会、平成22年7月1日、宇都宮、栃木県総合文化センター
2. 岡田尚巳: ベクター産生型骨髄間質細胞を利用した遺伝子治療、日本薬学会第130年会 平成22年3月30日、岡山、岡山コンベンションセンター
3. 岡田尚巳, 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 武田伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学会第54回大会、平成21年9月24日、東京、グランドプリンスホテル高輪
4. 岡田尚巳: Development of AAV vector production system and therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy, 熊本大学グローバルCOEリエゾンラボ研究会 平成21年11月11日、熊本、熊本大学
5. 岡田尚巳: 生活習慣病・神経筋疾患に対する細胞遺伝子治療の開発、第12回小児分子内分泌研究会 平成20年7月5日、小樽、ヒルトン小樽

〔図書〕(計3件)

1. Okada T, Takeda S: Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. In, A Guide to Human Gene Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ. (in press)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

1. 名称: 組換えアデノウイルス迅速構築システム
発明者: 岡田尚巳
権利者: ヒューマンサイエンス振興財団
種類: 特許
番号: 特願 2008-330838
出願年月日: 平成20年12月25日出願
国内外の別: 日本

○取得状況 (計2件)

1. 名称: 遺伝子導入効率増強剤および商業的パッケージ
発明者: 岡田尚巳、小澤敬也
権利者: 岡田尚巳、(株)ジェネシスヘルスケア
種類: 特許
番号: 特許第4588634号
成立年月日: 平成22年9月17日
国内外の別: 日本
2. 名称: Gene Introduction Efficiency Enhancer
発明者: 岡田尚巳、小澤敬也
権利者: 岡田尚巳、(株)ジェネシスヘルスケア
種類: 特許
U.S. Application #: 10/554,246
成立年月日: (手続中)
国内外の別: アメリカ合衆国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 尚巳 (OKADA TAKASHI)
独) 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長
研究者番号: 00326828