

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591134  
 研究課題名（和文） アデノ随伴ウイルスベクターの組織特異性と血友病遺伝子治療における有用性の検討  
 研究課題名（英文） Tissue specificity and utility of AAV vectors in hemophilia gene therapy  
 研究代表者  
 水上 浩明(MIZUKAMI HIROAKI)  
 自治医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：20311938

研究成果の概要： 様々な血清型に由来する AAV ベクターの組織特異性に関する検討を行った結果、骨格筋に対しては1型のベクターに CMV プロモーターを用いた場合が、肝臓には8型のベクターに hAAT プロモーターを用いるのが最も有効との結論を得た。また、in vivo のベクター投与において問題となる中和抗体検出系に関して検出方法・反応方法などの関連条件を検討することで、検出感度を著明に改善させることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：遺伝子治療、AAV ベクター、組織特異性、免疫応答、トランスジェニックマウス、中和抗体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) AAV ベクターによる遺伝子導入においては個体レベルでの効率が不十分であることが長く問題とされてきたが、近年各種血清型由来のベクターを使用するなどの進歩によりこの点での問題は改善され、治療効果が期待されるようになった。しかしながら一方で免疫反応の重要性に対する認識が高まり、遺伝子導入と免疫反応に関して解析が必要な状況を迎えていた。

(2) 様々な血清型由来の AAV ベクターが使用されるようになってきてはいるものの、それぞれの組織特異性に関してはまだ知見が不

充分であることから、骨格筋・肝臓・脂肪などを標的とした際に有効であるベクター構築に関して探索が必要であるとともに、組織特異性の分子基盤を検討することは重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 遺伝子導入の効果を最大とするベクター構築に関して探索を行うと共に、その様な条件における免疫反応に関して解析することで、真に治療効果の挙がるベクターを構築する基盤とする。

(2) 免疫反応、特に治療前におけるキャプシド

に対する中和抗体の状況と遺伝子導入の効果の関係を明らかにする。

(3)様々な血清型由来の AAV ベクターの組織特異性に関して検討する。特に感染に関連する分子に関して遺伝子改変を受けた動物個体を用いて感染における当該分子の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)様々な構築のベクターを作製し、動物の各標的組織に注入してその効果と免疫反応を検討した。

(2)AAV ベクターに対する中和抗体の検出感度改善に向けた取り組みとして、検出系に用いる細胞、感染の条件、検出方法などに関してそれぞれ最適化を行った。

(3)AAV のレセプター分子に関する遺伝子改変マウスについて探索し、このような動物にベクターを注入した際の感染効率につき野生型動物と比較検討した。

### 4. 研究成果

(1)骨格筋・肝臓・脂肪組織のそれぞれを標的としたベクター構築を行い、効果及び免疫反応を比較検討した結果、骨格筋に対しては1型のベクターに CMV プロモーターを用いた場合が最も良く、肝臓に対しては8型のベクターに hAAT プロモーターを用いるのが最も有効であった。脂肪組織における発現レベルは骨格筋・肝臓に匹敵するには至っておらず、実用化に向けてはより一層の取り組みが必要と考えられた。なお、C57BL/6 マウスでは、標的組織による免疫応答の違いは明らかでなかった。

(2)一方、免疫反応に関しては、in vivo の投与では投与前の中和抗体に関する検討が重要と考えられることから、検出系の感度を向上させるための取り組みを行っている。これまでのところ、検出方法・反応方法などに関する条件を最適化することで、検出感度を大幅に改善させることができた。しかしながら8型、9型などでは未だ充分とはいえないレベルであり、一層の改善が望まれる状況である。これは主に効率よく感染する細胞が見つからないことに由来することから、このような細胞株の探索をはじめとする様々な取り組みを行っている。検出感度の改善が一段落したところで、サル及びヒト血清における中和抗体陽性率の測定を行い、AAV ベクターの有用性に関する検討を進める予定である。

(3)AAV のレセプター分子に関する遺伝子改変マウスに関しては、5型のレセプターとして知られる PDGF レセプターに関して、当該分子のトランスジェニックマウスを開発した徳島大学グループとの間で共同研究を行った。その結果、トランスジェニックマウスにおける感染効率の向上は明らかではなく、

骨格筋にベクターを投与した際には感染経路のうちレセプター以降のステップが律速段階になっていることが示唆された。

### 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 10 件)

1. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., 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 [査読有]** 16: 383-91, 2009.
2. Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H., Takayama, T., Ohwada, M., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. **Mol Cancer Ther [査読有]** 7: 704-11, 2008.
3. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. **J Gene Med [査読有]** 10: 368-74, 2008.
4. Suzumura, K., Hirano, T., Son, G., Imuro, Y., Mizukami, H., Ozawa, K., Fujimoto, J.: Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice. **Hepatology Int [査読有]** 2: 80-88, 2008.
5. Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. **Mol Ther [査読有]** 16: 474-80, 2008.
6. 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 [査読有]** 101: 734-41, 2007.
7. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume,

A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. **Hypertension [査読有]** 50: 531-6, 2007.

8. Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. **Int J Mol Med [査読有]** 19: 75-9, 2007.

9. Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. **Int J Cancer [査読有]** 120: 278-84, 2007.

10. Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, K.Q., Ozawa, K., Ushijima, H.: Tendon healing *in vitro*: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. **Plast Reconstr Surg [査読有]** 119: 227-34, 2007.

〔学会発表〕(計 25 件、口演のみ)

1 水上浩明、小澤敬也：「遺伝子治療の現状と課題」第 28 回 医療情報学連合大会、オーガナイズドセッション「ゲノムインフォマティクス」横浜、2008 年 11 月 23 日

2 Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: Therapeutic efficacy of AAV vectors encoding sflt-4 against endometrial cancer model with lymph node metastasis. The 67<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, October 28, 2008. (EW11-2, Abstract p495)

3 Uchibori R, Ito T, Mizuguchi H, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Role of inflammatory cytokines in tumor tropism of mesenchymal stromal cells. The 67<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, October 27, 2008. (O-369, Abstract p300)

4 Mizukami H, Urabe M, Kume A, Ozawa K: Inhibitory actions of very low titer neutralizing antibody against AAV8 capsid upon transgene expression in monkey. The 67<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, October 26, 2008. (O-162, Abstract p91)

5 水上浩明、八木洋也、卜部匡司、久米晃啓、小澤敬也：AAV に対する中和抗体の遺伝子導入に及ぼす影響—カニクイザルにおける検討 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡

山、2008 年 10 月 26 日 (抄録集 p229)

6 Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Ono F, Yagi H, Urabe M, Ito T, Kume A, Terao K, Yasutomi Y, Sakata Y, Ozawa K.: Inhibitory actions of very low titer neutralizing antibody against AAV8 capsid upon liver-mediated factor IX expression in non-human primates. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 14, 2008. (Abstract #65)

7 Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Ito T, Ozawa, K.: Full reconstitution of *in vivo* oxidative activity for phenylalanine in self-complementary AAV vector-treated phenylketonuria mice. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 14, 2008. (Abstract #70)

8 Takahashi, T., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Establishment of a lymph node metastasis model with endometrial cancer and therapeutic efficacy of AAV vectors encoding sflt-4. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 14, 2008. (Abstract #74)

9 Mizukami, H.: “Immune responses in gene therapy using adeno-associated vectors” Educational seminar IV “AAV vectors” The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 13, 2008.

10 Obara Y, Urabe M, Ito T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K.: Unexpected silencing of transgene integrated at AAVS1 locus using AAV machinery. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 13, 2008. (Abstract #11)

11 Ito T, Nakata M, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Yada T, Shimada K, Ozawa K.: AAV vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates the metabolic syndrome in Zucker fatty rats. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 13, 2008. (Abstract #32)

12 Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I.: Aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer for parkinson’s disease: preliminary results of an open-label safety study. The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo June 12, 2008. (Abstract #4)

13 菊池裕二、久米晃啓、卜部匡司、水上浩明、鈴木隆浩、尾崎勝俊、小澤敬也：間葉系幹細胞と造血幹細胞の相互作用の分子メカニズム 第 6 回幹細胞シンポジウム、東京、2008 年 5 月 16 日-17 日

14 水上浩明、小澤敬也：「AAV ベクターを用いた遺伝子治療の現状と展望」自治医科大学 21 世紀 COE プログラム 第 5 回合同シンポジ

- ウム 自治医科大学 2008年2月2日
- 15 水上浩明:「カニクイザルを用いた AAV ベクターの有効性評価」 第3回霊長類医学フォーラム、つくば、2007年12月6日
- 16 石渡彰、三室淳、柏倉裕志、大森司、諏合輝子、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：肝臓特異的に FVIII を高発現する AAV8 ベクターを用いた血友病 A マウスへの FVIII 遺伝子導入. 第30回日本血栓止血学会総会、志摩、2007年11月15日-17日 (抄録集 p462)
- 17 石渡彰、三室淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森司、諏合輝子、窓岩清治、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一：血友病 B 遺伝子治療の非ヒト霊長類モデルにおける基礎的検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2007年10月11日-13日 (抄録集 p190)
- 18 Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., Ozawa, K.: Sustained expression of prostacyclin synthase by an intramuscular injection of an AAV vector attenuates obesity in Zucker fatty rats. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (Abstract #092)
- 19 Kume, A., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Okada T., Ozawa, K.: Efficient and stable liver transduction by a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (J Gene Med 10:443-444, 2008)
- 20 Mizukami, H., Ishiwata, A., Ono, F., Takano, J., Fujimoto, K., Mimuro, J., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K.: Prevalence of neutralizing antibody against AAV serotypes 1, 8 and 9 in cynomolgus monkey colonies. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (J Gene Med 10:453, 2008)
- 21 Mizukami, H., Muramatsu, S., Ono, F., Mimuro, J., Sakata, Y., Urabe, M., Kume, A., Terao K., Nakano, I., Ozawa, K.: Safety of intracranial AAV vector injection in cynomolgus monkeys. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (J Gene Med 10:454, 2008)
- 22 Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses peritoneal dissemination and extends survival in mice. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, October 3-5, 2007. (Proceedings of the 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, p245)
- 23 Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Tumor tracking and therapeutic gene amplification by using retroviral vector-producing Mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer gene therapy. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (J Gene Med 10:478-479, 2008)
- 24 Urabe, M., Mizukami, H., Bakker, A., Kume, A., Hermens, W., Ozawa, K.: Production of more potent type 1 adeno-associated virus vectors in insect cells. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Nagoya, June 28-30, 2007. (Abstract #010)
- 25 Mizukami, H.: "AAV-mediated gene transfer: current status and future perspectives" The department of Microbiology, Molecular Genetics and Immunology Seminar Series, The University of Kansas Medical Center, Kansas City (USA), May 29, 2007.

#### 6. 研究組織

##### 研究代表者

水上 浩明 (MIZUKAMI HIROAKI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20311938