

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591248

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルスベクターに対する中和抗体測定法の改良と血友病遺伝子治療への展開

研究課題名（英文）Improvement of neutralizing antibody assay against AAV vectors and application to hemophilia gene therapy

研究代表者

水上浩明（MIZUKAMI HIROAKI）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20311938

研究成果の概要（和文）：AAVベクターに対する中和抗体測定法に改良を加え、検出感度を大幅に改善させた。特に8型、9型では細胞あたり1000ゲノムコピーで感染が成立しており、世界的に広く用いられている方法に比べて一桁少ない量で検討が可能であった。本法で陰性と判定したサル9頭に対して8型ベクターを静脈内投与したところ、全例で凝固第IX因子の発現を認め、本測定法の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Significant improvement in neutralizing antibody assay against AAV vectors was achieved. In the cases of AAV8 and 9, the cells were successfully transduced at 1000 genome copies per cell, which is ten times lower than that reported earlier. Moreover, all of the 9 monkeys screened by this method showed transgene expression after IV injection of AAV8 vectors, suggesting the utility of this assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、ウイルス、バイオテクノロジー、免疫学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

AAVベクターは有用性が高く、特に8型由来のベクターは静脈内投与によって肝臓への遺伝子導入が可能である特徴がある。このため臨床応用に向けた取り組みが進められている。治療に際して中和抗体が存在すれば血中への投与による効果は著しく減弱することから、測定は重要である。しかしながら8型などの血清型由来のベクターが効率よく感染する細胞は知られておらず、その結果検出感度が不十分であることが問題とされていた。この点を改

良するため本研究を企画した。

2. 研究の目的

8型などの血清型由来のベクターが効率よく感染する細胞を見出すことで中和抗体検出法の感度を向上させ、より低力価のサンプルに対しても検出を可能にすることを目指す。

3. 研究の方法

様々な細胞を入手して8型などの血清型由来のベクターを感染させた。更には様々な

物質を培養液中に添加して、感染の増強効果を検討し、関係する条件を最適化した。その結果得られた条件を元にして測定系を確立した。

4. 研究成果

AAVベクターキャプシドに対する中和抗体の検出法の感度を向上させるためには少ないベクター量で感染を成立させることが有益と考えられることから、感染の増強法につき検討した。その結果、感染に際して様々な糖類を培地に添加させることで感染効率の増強が認められることを見出した。また、用いるレポーター遺伝子と検出系の感度を最大にするべく、ルシフェラーゼ遺伝子などに関して検討を行ったところ、 β -ガラクトシダーゼをONPGアッセイで検出する系が最も鋭敏であり、しかも結果の安定性及び再現性に優れていることが判明した。以上により、中和抗体検出系に関してはおおむね最適化が終了し、これまでの報告を大きく凌駕する感度の検査法を確立したと考えられた。過去の検査法で陰性と考えられた血清に関しても改良法で陽性となる例が散見されることから、本検査法は低力価陽性の個体を見出す上で有用と考えられる。爾後は実際の血清サンプルを対象にした測定を行った。医薬基盤研・霊長類研究センターにおけるカニクイザル血清試料を用いて測定した結果、大部分(76.8%及び69.5%)のサルが8及び9型に対して中和抗体陽性であった。このため、AAVベクターの血管内投与に基づく前臨床研究に際しては、用いるサルの選別が重要と考えられる。今後はヒトにおける中和抗体陽性率に関して、健常人並びに血友病などの患者を対象として陽性率の検討を行う予定である。

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 10 件)

1. Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther*, 19:476-82, 2012. 査読有
2. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci.*, 102:2272-7, 2011. 査読有
3. Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H., Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M., Ozawa, K., Kume, A.: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. *Neuroreport*, 23:

30-4, 2012. 査読有

4. Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., Kume, A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 13:114-22, 2011. 査読有
5. Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Kawakami, T., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K., Nakano, I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-5, 2010. 査読有
6. Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B., Caton, T., Chiorini, J., Chtarto, A., Clark, K.R., Conlon, T., Darmon, C., Doria, M., Douar, A.M., Flotte, T.R., Francis, J., Francois, A., Giacca, M., Korn, M., Korytov, I., Leon, X., Leuchs, B., Lux, G., Melas, C., Mizukami, H., Moullier, P., Muller, M., Ozawa, K., Philipsberg, T., Poulard, K., Raupp, C., Riviere, C., Roosendaal, S., Samulski, R.J., Soltys, S., Surosky, R., Tenenbaum, L., Thomas, D.L., van Montfort, B., Veres, G., Wright, J.F., Xu, Y., Zeleniaia, O., Zentilin, L., Snyder, R.O.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1723-85, 2010. 査読有
7. Ishiwata, A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Yasumoto, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Shima, M., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Mutant Macaque Factor IX T262A: A Tool for Hemophilia B Gene Therapy Studies in Macaques. *Thromb Res.* 125:533-7, 2010. 査読有
8. Ishiwata, A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med.* 11:1020-9, 2009. 査読有
9. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med.* 11:373-81, 2009. 査読有
10. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Machida, S., Fujiwara, H., Ozawa, K., Suzuki, M.: Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol.* 35:725-9, 2009. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Mizukami H. et al. Consistent Factor IX Expression in NAb-negative Macaques following IV Administration of AAV8 Vector. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋 2011.10.14.
2. Mizukami H. et al. Optimization of efficacy in AAV-mediated siRNA expression Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Tomonori Tsukahara, Akihiro Kume, Keiya Ozawa. 19th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Brighton, UK 2010. 10.23.
3. Mizukami H. et al. Relationship between neutralizing antibody and factor IX expression in non-human primates following IV administration of AAV8 vectors. American Society of Gene and Cell Therapy's 14th Annual Meeting, Seattle, USA 2011.5.21.
4. Mizukami H. et al. Robust and Sustained Factor IX Expression by IV Administration of AAV8-based Vectors in Macaques American Society of Gene and Cell Therapy's 13th Annual Meeting, Washington, DC, USA 2010.5.27.
5. Mizukami H. Immune responses in AAV-mediated gene transfer. 第 16 回日本遺伝子治療学会、宇都宮 2010.7.3.
6. Mizukami H. et al. Improved assay system for NAb against AAV vectors and prevalence in non-human primates 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜 2010. 9.24.
7. Mizukami H. et al. Unswerving Factor IX Expression in NAb-negative Macaques following IV Administration of AAV8 Vector 18th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Milan, Italy 2010. 10.23.
8. Mizukami H. et al.: Neutralizing antibody affects liver-mediated factor IX expression in non-human primates by AAV vectors. American Society of Gene and Cell Therapy's 13th Annual Meeting, San Diego, USA 2009.5.30.
9. Mizukami H. et al.: Robust and sustained factor IX expression following IV injection of AAV8-based vectors in macaques. 第 71 回日本血液学会学術集会、京都 2009.10.23.
10. Mizukami H. et al.: Relationship between neutralizing antibody and liver-mediated factor IX expression in non-human primates using AAV vectors. 17th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany 2009.11. 22.

〔図書〕(計 5 件)

1. Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A. Ozawa, K.: Gene Therapy for Diabetic Retinopathy in Animal Models and Humans. In, **The Open Diabetes Journal – Novel rat model of diabetes,**

SDT rat and SDT fatty rat. (ed. By Kahehashi, A.), 4: 119-122, 2011.

2. 水上 浩明: 血友病の遺伝子治療 血液フロンティア 2012年2月号 医薬ジャーナル社

3. 水上 浩明: 網膜疾患に対する遺伝子治療の現状と展望 2011年4月16日号 医歯薬出版

4. 水上 浩明: 筋疾患に対する遺伝子治療 生体の科学 2011年 Mar-Apr 医学書院

5. 水上 浩明: 遺伝子導入とベクター BIO Clinica 2011年4月号 北隆館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 浩明 (MIZUKAMI HIROAKI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20311938

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし