

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18193

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルスの中和抗体回避能と活性を向上させる三元系複合体の開発

研究課題名（英文）Development of a ternary complex that improves neutralizing antibody evasion and activity of adeno-associated viruses.

研究代表者

本田 雄士（Honda, Yuto）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：90907742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アデノ随伴ウイルス（AAV）は、侵襲性が低く搭載遺伝子の長期発現が可能であることから、難治性疾患治療薬として認可され注目されている。しかし、成人の大半はその中和抗体を持っているため患者が限定されること、大量投与による肝毒性が問題になっており、利用が制限されている。本研究では、AAVにタンニン酸（TA）、ポロン酸導入高分子を組み合わせた自己会合型AAV三元系複合体を開発し、動物実験で中和抗体回避と肝毒性低減を達成した。さらに、目的の組織への移行性を向上させるために、標的指向性分子を搭載したAAV三元系複合体を構築したところ、遺伝子導入量が向上することが細胞実験によって実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AAVは侵襲性が低く搭載遺伝子の長期発現が可能であることから、難治性疾患治療薬として認可されている一方、その中和抗体の問題によって、頻回投与が出来ない上に、患者が限定されていた。さらに、大量投与による肝毒性が問題になっており、臨床試験がストップする事例が報告されていた。本研究課題はナノテクノロジーを用いて、これらの問題を克服することに成功しており、AAVを用いた遺伝子治療を促進できる可能性を秘めており、学術的意義や社会的意義を十分備えていると言える。

研究成果の概要（英文）：Adeno-associated virus (AAV) is attracting attention as a drug approved for the treatment of intractable diseases due to its low invasiveness and ability to express onboard genes for long periods of time. However, the majority of adults have neutralizing antibodies against AAV, which limits the number of patients, and high doses of AAV frequently leads hepatotoxicity. In this study, I developed a self-assembling AAV ternary complex comprising AAV, tannic acid (TA) and boronic acid-conjugated polymers to achieve the evasion from neutralizing antibody and reduced hepatotoxicity in in vivo experiments. In addition, to improve the tissue selectively, I have constructed tissue targeting molecules-installed AAV ternary complexes, and cell experiments demonstrated that the increased gene transfection and receptor-targeting ability.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：生体材料学、薬物送達学

キーワード：アデノ随伴ウイルス 自己組織化 薬物送達システム ポロン酸エステル ポリフェノール 中和抗体 肝毒性 ナノ複合体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターは様々な治療遺伝子を搭載できる上、表面に存在するカプシド構造によって、細胞内および核移行を効率的に行えることから、遺伝子治療およびがん治療など様々な難病の治療ツールとして注目されている(図 1a)。特に、アデノ随伴ウイルス(AAV)やアデノウイルスは、長期遺伝子発現できることから、遺伝性疾患の治療薬として認可されるなど高い有効性を示している。しかしながら、成人の多くがウイルスベクターの中和抗体を保有しており、投与できる患者が制限されてしまっている。実際に、現在日本で唯一承認されている AAV 遺伝子治療薬ゾルゲンスマは、中和抗体によって投与対象が小児に限られている。中和抗体を克服する方法として、AAV 抗体吸着ビーズ酵素を用いて血中の中和抗体を除去する方法が報告されている(*Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020, 16, & *Nat. Med.* 2020, 26)。しかしながら、これらの方法は、身体への負担が大きい上に、ウイルスベクターの他の課題である大量投与による肝毒性を克服することが出来ない。この肝毒性は、ウイルスベクターが生体内で異物として認識され、肝臓に大量に集積してしまうため生じる。

これらの問題を解決するため、高分子型薬物送達キャリアの利用が検討されている。古くから検討されている送達技術として、ポリエチレングリコール(PEG)修飾が挙げられる(*Biotechnol. Bioeng.* 2005, 92)。これは、ウイルス表面に PEG を化学修飾することでシェルとして機能して、中和抗体との相互作用を抑制する上に、そのステルス機能によって異物認識および肝臓への集積を抑制するものである(図 1b)。しかし、高分子の PEG を効率的に巨大分子であるウイルスの表面に化学修飾することは困難であり、期待するほどのシェル機能が得られていない。さらに、PEG を化学修飾することでカプシドの構造が変性してしまい、ウイルスの機能(細胞標的、核移行など)失活が問題視されている。そのため、化学修飾に頼らない高分子型送達キャリアが開発されているが、煩雑な調製および低い安定性などから全身投与において有用な結果が得られていない (*Biomater. Sci.*, 2020, 8, 6113 & *ACS Nano* 2020, 14)。

2. 研究の目的

上記の問いを解決するために、申請者が独自開発してきたポリフェノールの一つであるタンニン酸 (TA)とポロン酸導入高分子を組み合わせた自己会合型三元系複合体の利用を考案した。TA は水素結合と疎水性相互作用を介してタンパク質やウイルスと相互作用をすることから、バイオメディカルでの利用が期待されている(*Nat. Biomed.* 2018, 2, 304-317)。しかしながら、TA は細胞壁や生体成分とも相互作用してしまうことから、その動態制御が困難であった。その点、申請者は TA の水酸基とエステルを形成するポロン酸導入高分子を水中で混合することで、世界で初めてコアシェル型タンパク質搭載三元系複合体を形成できることを見出した(*Biomacro.* 21(9)3826–3835 (2020))。この三元系複合体は、生体内でも高い安定性を示す上に、高分子がシェルとして機能することで、異物認識および生体成分との相互作用を抑制し、長期血中滞留性と肝臓への集積抑制効果を示した。それに加えて、Enhanced permeation and retention (EPR)効果によって疾病箇所(腫瘍)への高い集積も示した(図 2a)。この複合体に酵素を内包したところ、生理的環境では高分子と TA がシェルとして働き酵素活性が抑制するが、細胞内ではポロン酸導入高分子と TA が細胞内環境に反応して外れて、酵素単体と同等の活性を示すことを見出された (図 2b, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 13, 46, 54850–54859)。また、この複合体は内包した生体分子を分解酵素など外部因子による分解から保護することが可能であることを見出されている (図 2c)。このような機能から、三元系複合体はウイルスの課題(中和抗体、肝毒性)を克服できる可能性を秘めている上に、様々な生体分子を内包できる汎用性を備えていることから、ウイルス送達システムへの展開を着想した。

3. 研究の方法

本研究では開発するウイルスベクター送達システムについて、下記の性能を明らかにする。この際、ウイルスベクターとしてアデノ随伴ウイルス9型(AAV)を用いて各評価を行う。

複合体の形成：AAV を内包した三元系複合体が水中で形成可能であることを、粒子径測定によって評価する。

メカニズム解明：本三元系複合体の懸念事項として、TA や高分子がウイルス表面のカプシド構造を覆うことで、AAV の機能が損なわれることが挙げられる。そこで、Luc 遺伝子を搭載した AAV 三元系複合体を用いて細胞への遺伝子導入効率評価を行い、カプシドの機能について評価する。また RT-qPCR 法によって、AAV 複合体の細胞内取込量を測定し、AAV の細胞内取り込みメカニズムを評価する。

中和抗体回避能力の解明：細胞実験にて AAV 中和抗体を AAV 三元系複合体と共培養することで、中和抗体回避能を評価する。また、動物実験では中和抗体保有モデルマウスを作製し、そのマウスに対する有効性を評価する。

AAV 三元系複合体の肝毒性：三元系複合体にすることで体内動態を改善するかを評価するため、AAV 三元系複合体を投与後、各臓器および血中における AAV 量を RT-qPCR 法によって測定する。その際、回収した血液を用いて肝毒性の評価を行う。

標的指向性分子導入：臓器への選択性を向上させる環状ペプチド(がん細胞標的)および糖鎖(肝実質細胞標的)を複合体表面に導入し、評価を実施する。この際、ペプチド導入数が結合力を決めるのに重要なファクターになるため、最適な導入密度を算出する。

4. 研究成果

複合体の形成： ボロン酸導入高分子は開環アニオン重合と側鎖脱保護、側鎖修飾によって合成した。詳しい合成方法は既報に記した(ACS Appl. Mater. Interfaces, 13, 46, 54850–54859)。その後、AAV9 と TA, ボロン酸導入高分子を混合することで複合体の形成を実施した。その複合体形成は DLS でのサイズ測定および電子顕微鏡によって観察を行ったところ、約 60nm の球状の複合体形成が確認された。次に、この複合体の pH 応答性を評価したところ、細胞内エンドソーム pH である 5.5 で AAV9 がリリースされることが確認された。

メカニズム解明： 次に、この AAV9 複合体の遺伝子導入効率を評価するため、ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293) を AAV9 サンプルとインキュベートさせた後に、RT-qPCR によって細胞内取り込み、遺伝子導入を Luc 発光によって評価した(図 1)。その結果、複合体化することで細胞内取り込みが減少することが確認された。これは表面がポリマーで覆われたことで、AAV9 のスパイクの細胞認識能が阻害されたことが理由だと考えられる。一方で、遺伝子導入料に関しては、複合体化することで AAV 単体より上昇する傾向が示された。また、取り込み量で遺伝子導入量を規格化し AAV1 粒子あたりの遺伝子導入効率を算出したところ、AAV9 複合体の遺伝子導入効率は AAV9 単体の 4 倍になった。この理由として、ボロン酸導入高分子が AAV9 の細胞質移行性およびプロテアソームによる分解を防いだことが理由として上げられる。

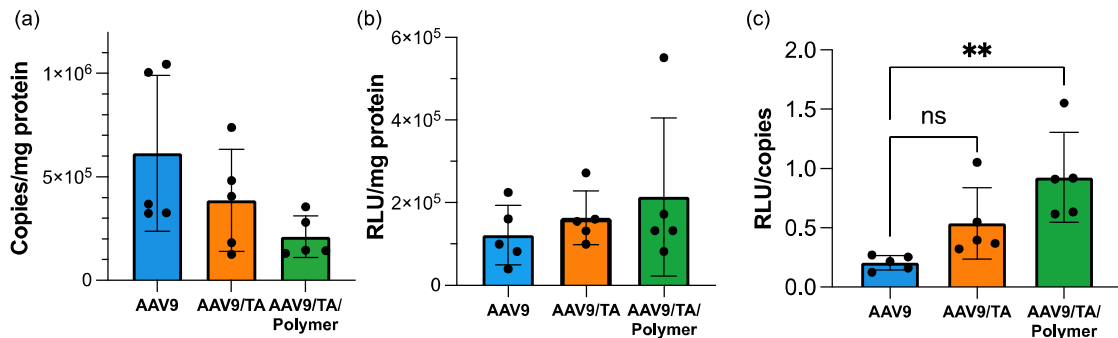


図 1. 細胞実験. AAV サンプルの(a)細胞内取り込み、(b)遺伝子導入、(c)AAV1 粒子あたりの遺伝子導入効率

中和抗体回避能力の解明： HEK293 と AAV9 サンプルをインキュベートする際に同時に AAV9 抗体を加え、インキュベートを行った後に、遺伝子導入を Luc 発光によって評価した(図 2)。その結果、AAV9 と AAV9/TA は AAV9 抗体によって遺伝子導入量が低下した一方、AAV9 三元系複合体は遺伝子導入量の低下が見られなかった。これは、ボロン酸導入高分子がシェルとして機能し、AAV9 抗体による AAV9 の認識を防いだことが理由として挙げられる。一方、AAV4 抗体をインキュベートした際には、AAV9 と AAV9/TA も遺伝子導入の低下が見られなかったことから、非特異的な吸着でないことが示された。

次に、動物実験における中和抗体回避能を検討した。最初に、AAV9 中和抗体をマウスに全身投与してから 10 分後に AAV9 サンプルを投与し、遺伝子導入量を評価した。その結果、AAV9 と AAV9/TA は AAV9 中和抗体存在下で遺伝子導入の顕著な低下が見られた。一方、AAV9 三元系複合体はその遺伝子導入の低下が大幅に抑制された。同様の傾向は、デジタル PCR によるゲノム数測定でも見られた。これより、この AAV 複合体は生体内においても中和抗体回避能を有することが示された。

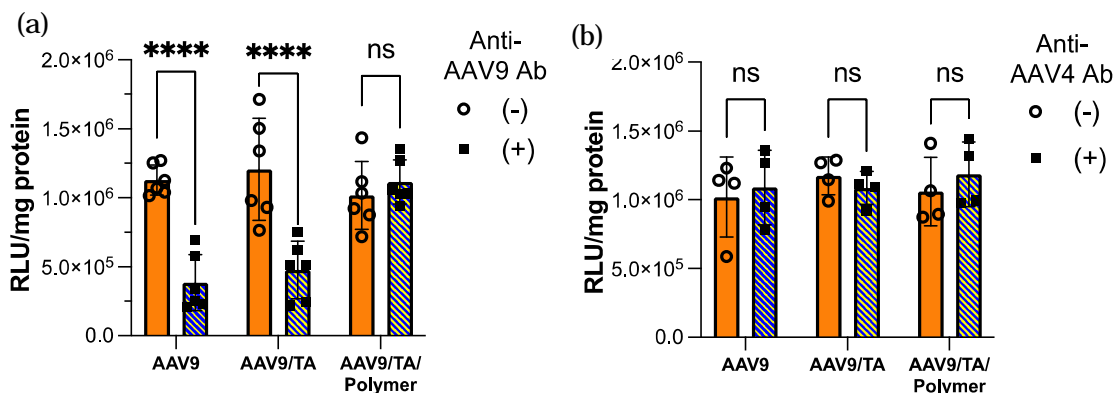


図 2. 細胞実験での中和抗体回避能評価.(a)AAV9 抗体と(b)AAV4 抗体を加えたときの AAV サンプルの遺伝子導入効率

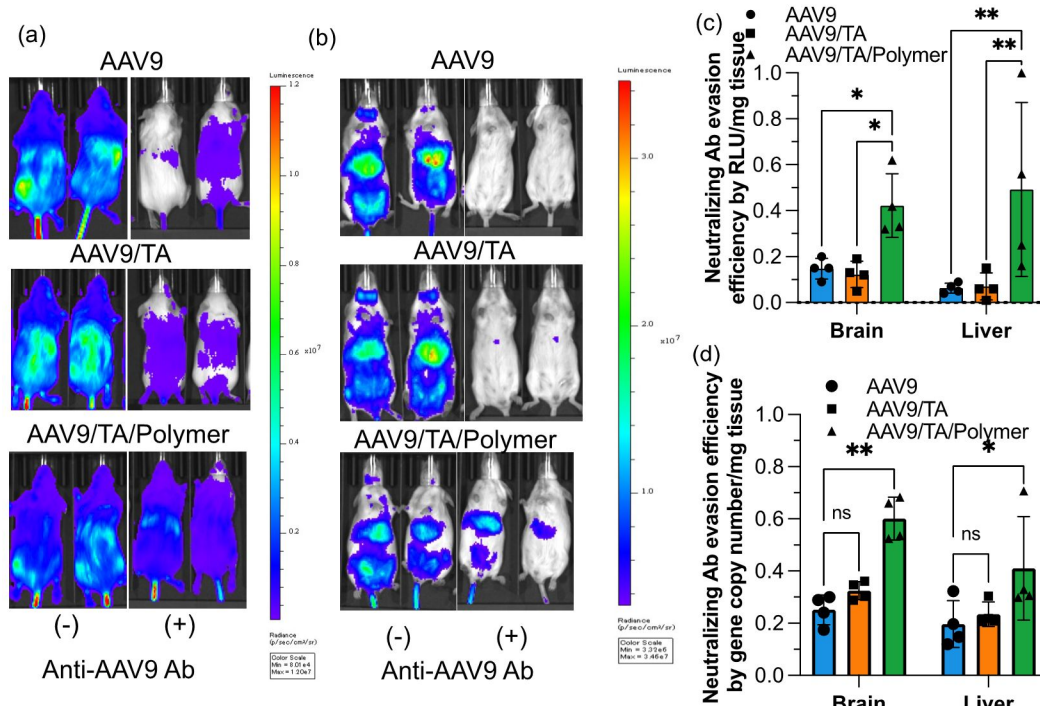


図 3. 動物実験での中和抗体回避能評価。(a)背中側と(b)腹部側の In vivo imaging system 撮影画像. (c)Luc 発光強度と(d)ゲノム数測定で評価した脳と肝臓での遺伝子導入効率

AAV9 三元系複合体の生体内動態および肝毒性：AAV9 の高用量投与は、肝毒性および腎毒性を示すことが知られている。そこで、AAV9 サンプルを高用量でした際の肝毒性に関して評価した(図 4)。AAV9 と AAV9/TA を投与したマウスの血液では肝毒性マーカーである GPT の増加が 14 日目以降に見られた。一方、AAV9 を三元系複合体化することでその毒性が抑制された。これは、ポリマーで覆うことで肝臓からの異物認識が抑制され、肝臓への集積性が抑制されたことが理由だと考えられる。このように、この複合体に搭載することで、中和抗体回避に加えて肝毒性という AAV 製剤の問題点を解決できる可能性が示された。

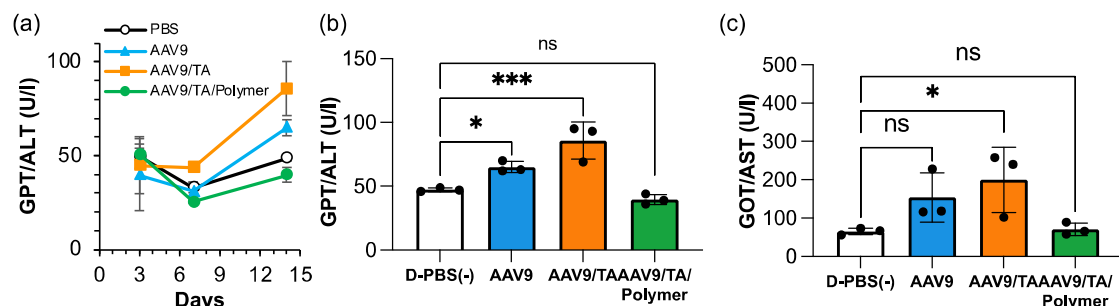


図 4. 毒性評価.AAV9 サンプルを投与した後の(a) GPT 値の経時変化と(b) 14 日目の値. (c) 14 日目の GOT 値.

標的指向性分子導入：AAV9 三元系複合体の機能をより向上するために、この複合体に標的指向性分子の導入を実施した。標的指向性分子である環状ペプチド(cRGD)と N-アセチルガラクトサミン(GalNac)は、ボロン酸導入高分子の PEG 末端にアリル基を修飾し、チオ-エングリック反応で導入した。その後、の AAV9 三元系複合体と同様の方法で複合体を調製したところ、約 80nm の AAV9 三元系複合体形成が確認された。この複合体をそれぞれの受容体が発現している細胞(cRGD: U87MG 細胞、GalNac: HepG2 細胞)とインキュベートしたところ、標的指向性分子未修飾の三元系複合体と比較して、遺伝子導入率が向上した(図 5)。

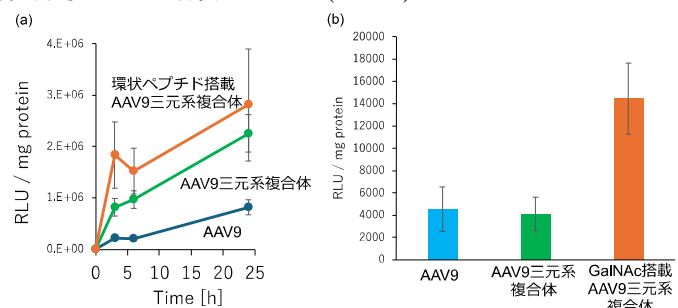


図 5. 標的指向性分子搭載 AAV9 三元系複合体の遺伝子導入効率. (a)cRGD 搭載 AAV9 三元系複合体、(b)GalNac 搭載 AAV9 三元系複合体.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Yuto, Onodera Sayaka, Takemoto Hiroyasu, Harun Noor Faizah Che, Nomoto Takahiro, Matsui Makoto, Tomoda Keishiro, Sun Yudi, Miura Yutaka, Nishiyama Nobuhiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Thermo-Responsive Polymer-siRNA Conjugates Enabling Artificial Control of Gene Silencing around Body Temperature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 157 ~ 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-022-03414-8	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田雄士、松尾拓海、野本 貴大、西山 伸宏
2. 発表標題 超分子複合体を基盤とした全身投与可能なCas9-sgRNP RNP送達システムの開発
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 "松平望、本田雄士、長尾周平、喜納宏明、野本貴大、三浦裕、西山伸宏
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルス (AAV)の腫瘍選択性を向上させる環状ペプチドリガンド導入三元系 複合体の開発 を向上させる環状ペプチド搭載三元系複合体の開発
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田雄士、Yao Xiao、喜納宏明、西山 伸宏
2. 発表標題 抗体耐性を中和するポリマーコーティングと組み合わせたアデノ随伴ウイルス(AAV)送達 システムの開発
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松平望、本田雄士、長尾周平、喜納宏明、野本貴大、三浦裕、西山伸宏
2. 発表標題 腫瘍標的機能を備えた環状ペプチド搭載アデノ随伴ウイルス(AAV)三元系複合体の開発
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 "Yuto Honda
2. 発表標題 Self-Assembling Nanocomplexes Based on Tannic Acid and Phenylboronic Acid Conjugated-Polymers for Efficient Biomolecule Delivery.
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田雄士、長尾 周平、松平 望、喜納 宏昭、野本 貴大、三浦 裕、西山 伸宏
2. 発表標題 フェニルボロン酸導入高分子とポリフェノール分子を基盤としたアデノ随伴ウイルス(AAV)送達システムによる脳選択的な遺伝子発現
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松平望、本田雄士、長尾周平、喜納宏明、野本貴大、三浦裕、西山伸宏
2. 発表標題 腫瘍におけるアデノ随伴ウイルス(AAV) の遺伝子発現選択性 を向上させる環状ペプチド搭載三元系複合体の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田雄士、長尾 周平、喜納 宏昭、松平 望、Liu Xueying、野本 貴大、Dirisala Anjaneyulu、三浦 裕、片岡 一則、西山 伸宏
2. 発表標題 集束超音波と高分子複合体を組み合わせた脳選択的AAV送達システムの構築、
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松平望、本田 雄士、長尾 周平、喜納 宏昭、野本 貴大、Liu Xueying、Dirisala Anjaneyulu、三浦 裕、片岡一則、西山伸宏
2. 発表標題 、腫瘍細胞標的機能を備えた全身投与型アデノ随伴ウイルス(AAV)三元系複合体の開発、
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Anudari Batbayar、Anudari Batbayar、大橋遼太郎、本田雄士、野本貴大、三浦裕、西山伸宏
2. 発表標題 Developing of Ovalbumin-Loaded Ternary Complexes Utilizing Tannic Acid and Phenylboronic Acid Conjugated Polymers for Cancer Immunotherapy、
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 医薬、キット及びシステム	発明者 本田雄士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-079741	出願年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------