

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791106

研究課題名(和文)自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによる胎児フェニルケトン尿症マウスの治療戦略

研究課題名(英文)Therapeutic strategy of phenylketonuria fetal model mouse using self-complementary adeno-associated virus vector

研究代表者

八木 洋也(YAGI, HIROYA)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70625623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠フェニルケトン尿症(PKU)モデルマウスに治療遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを投与し子宮内の免疫寛容なPKUモデルマウス胎仔へ感染・発現させることでさらに少ないベクター量で長期にわたり遺伝子を導入・発現させることを目的とした。最も感染しやすいAAVベクターの血清型を調べるためmGFPをレポーター遺伝子としたAAVベクターの2,5,6型を作製し、胎盤上皮細胞への感染性を調べた。HPIEpC細胞を用い各種のAAVベクターを1細胞当たり10<sup>6</sup>vector particleで感染させたが、どの血清型も発現は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：It was intended to be introduced and expressed gene long-term immune tolerance a small amount vector by infecting an AAV vector treating Phenylketonuria into fetuses in utero. To examine the most susceptible serotype of the AAV vector, 2, 5, 6 type AAV were made and examined the infectivity of the placental epithelium. Although HPIEpC cells were used and infected with various AAV vectors per cell 10<sup>6</sup>vector particle, expression was not observed any serotype.

研究分野：産科学

キーワード：AAVベクター 胎児遺伝子治療

### 1. 研究開始当初の背景

フェニルケトン尿症 (PKU) は先天性代謝疾患の1つであり、フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の欠損により発症する常染色体劣性の遺伝子疾患である。PKU は PAH 欠損により高フェニルアラニン血症 (高 Phe 血症) となり、認知障害や精神発達遅延などの中枢神経障害を引き起こす。可能な限り早期からの治療が重要であり、新生児マススクリーニングによる早期診断が行われている。しかし唯一の治療法は厳格な食事療法 (低フェニルアラニン食) の継続であり、そのコンプライアンスは低く、新たな治療法が切望されている。そこで近年、PKU に対する遺伝子治療の前臨床試験が行われている (Phang B et al: Gene Ther, 1994; Mochizuki et al: Gene Ther, 2004. )。

しかし雌マウスで治療効果が持続しないことや、大量のウイルスベクター量が必要など問題点もあった。そこで私たちは自己相補型アデノ随伴ウイルス (scAAV) ベクターに注目した。scAAV ベクターは既に 2 本鎖の状態では細胞の核内に取り込まれるため、1 本鎖 DNA である従来の AAV ベクターよりも導入効率が高い。しかし組み込める遺伝子長が従来の AAV ベクターの 5Kb から 2.5Kb と短縮し、従来の CAG プロモーターだとパッケージングできないことが問題であった。そこで 0.6kb の肝臓特異的プロモーター (LP1 プロモーター) を採用することでこの問題点を克服し、さらに AAV8 型を用いて肝臓での発現効率を上げることで今までよりも少ないベクター量で長期にわたり治療効果を持続させることが出来た (Yagi H, et al: J Gene Med, 2011)。

PKU では、PAH 遺伝子の欠損による高フェニルアラニン血症により中枢神経障害を引き起こすため、出来るだけ早期からの治療が神経学的予後に有効である。そのためには免疫寛容で、治療に必要なウイルス量が少なく済む胎児期に治療が出来れば理想的である。アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルスに属する非病原性のウイルスで経胎盤感染が認められており、Lipps らは母体が AAV に感染した児において、腎および肺より AAV が検出されることを明らかにした (Lipps BV et al: Intervirology, 1980)。

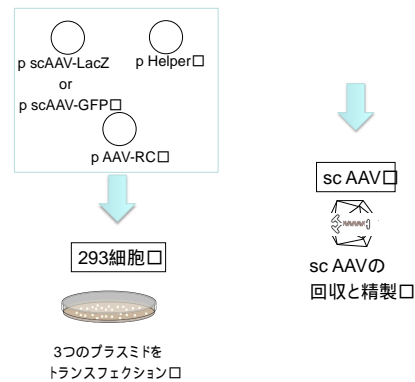
### 2. 研究の目的

このことより PKU モデルマウスを妊娠しているマウスに肝臓特異的なプロモーター及び血清型を使用した scAAV ベクターを注入し経胎盤的に PKU モデルマウス胎児に感染、発現させることで、より安定で長期間にわたる発現させることができるかを明らかにしたいと考えている。妊娠マウスに投与するベクターの投与方法 (経動脈的、経静脈的、経胎盤的など) や投与部位、投与量を比較・検討し、出生後の PKU マウスにおけるベクターの治療効果判定と効果持続期間、及びベクター

の生体内分布を解析する計画である。また投与した母体への scAAV ベクターの生殖細胞への影響およびベクターの生体内分布の解析も必要である。

### 3. 研究の方法

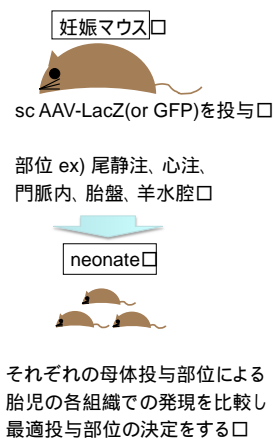
(1) AAV ベクターの作製: AAV ベクターの血清型である 2 型、5 型、6 型のベクターを作製する。作製方法は 3 プラスミドトランスフェクション法を用いる。



(2) 胎盤上皮細胞への感染性: in vitro で胎盤への最も感染しやすい血清型を調べるため、胎盤上皮細胞を培養し各血清型の感染性に関して調べる。

(3) 最適な投与ルートの決定

最も感染性の高かったベクターを用いて、経胎盤的に感染させるため、妊娠マウスを用いて経動脈的、経静脈的、経胎盤的、羊水腔に投与し、それぞれの胎児への発現を比較し最適投与部位を決定する。



(4) PKU 妊娠マウスへの投与

最適なベクターと最適な投与方法で治療遺伝子であるフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) を搭載した AAV ベクターを PKU 妊娠マウスに投与する。産まれた後の胎子の血中フェニルアラニン濃度の測定および AAV ベクターの生態分布で効果を確認する。



#### 4. 研究成果

##### (1) AAV ベクターの作製

この研究は自治医科大学遺伝子治療研究部で行っていた実験の延長であり、当該施設でこれらの実験を行うためには実験施設の準備から必要であった。今の筑波大学産婦人科の実験室を P2 実験室にするために安全キャビネットを購入し、遺伝子組換え実験施設設置承認を行った。それが承認された後に遺伝子組換え実験計画書承認申請を行わなければならない、全ての承認が得られるまで1年以上を要してしまった。AAV ベクターは 2 型、5 型、6 型と作製した。プロモーターは CMV でレポーター遺伝子は GFP とし、作製した AAV ベクターは 293 細胞に感染させ感染性を確認した。

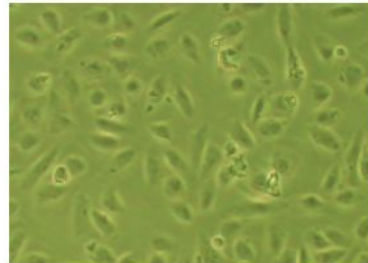
##### (2) 胎盤上皮細胞への感染性

胎盤上皮細胞は HPIEpC 細胞を用いて実験した。1.0\*10<sup>6</sup> vector particle/cell となるように AAV ベクターの濃度を調整し、96 well に培養した HPIEpC 細胞へ感染させた。感染させてから3日後に蛍光顕微鏡にて GFP 発現の確認を行った。結果として全ての血清型において胎盤上皮細胞への GFP の発現は確認されなかった。原因としては HPIEpC 細胞自体が AAV ベクターに感染しづらく感染させるベクター数が少なかった可能性が考えられる。293細胞であれば1細胞当たり 10<sup>6</sup>v.p. で十分に感染させることができるが HPIEpC 細胞は細胞分裂のスピードも遅く、さらに多くのベクターが必要であると考えられた。胎盤上皮細胞と AAV ベクターの感染性に関する論文は報告されていない。

(3), (4) に関しては研究期間の間に実験を遂行することができなかった。

今後の方針としては、AAV ベクターの作製方法をもう一度見直し、さらに大量のベクターを作製する必要がある。場合によっては(2)

は行わずに、各種の血清型を用いて直接(3)の実験を行う必要があるかもしれない。AAV はパルボウイルスに属する非病原性のウイルスで経胎盤感染することが知られているが、胎盤上皮細胞への感染と胎児への経胎盤感染の間の因果関係については調べた範囲ではよくわかっていない。



胎盤上皮細胞

(3) に関する今後の方針として、AAV ベクター 2, 5, 6 型を動物に投与するために、塩化セシウムを用いた超遠心法による精製の作業が必要となる。精製した AAV ベクターを血清型別に、母体の経静脈的、経動脈的、経胎盤的そして羊水腔内に投与し最適な投与方法と最適な血清型を検討する予定である。

(4) に関しては、ホモのメス PKU マウスは妊娠しづらいためヘテロのメス PKU マウスとホモのオス PKU マウスを mating させる。妊娠したメス PKU マウスに(3)で決定した血清型と投与方法を用いて、治療遺伝子であるフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)を組み込んだ AAV ベクターを作製し、それを投与する予定である。

今後、研究期間が終了しても研究結果が出るよう実験を遂行し、学会発表、そして論文化し発表できるよう実験を進めていきたい。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

八木 洋也、肝臓を標的とした遺伝子治療によるフェニルケトン尿症マウスの脳内アミンの改善—maternal PKU のさらなる予防に向けて—、第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、2012年4月14日、兵庫

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）  
取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織  
(1)研究代表者  
八木 洋也（HIROYA YAGI）  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70625623