

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390284

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)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00326828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経疾患に対する新規治療蛋白質補充療法の開発に向け、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターやその産生細胞を用いた脳組織への新規薬物送達システム基盤技術開発を推進した。従来のベクター精製における密度勾配超遠心操作はGMP生産やSOP管理の観点で不利であったが、イオン交換やゲル濾過クロマトグラフィーを応用し、超遠心操作の省略に成功した。純度の高いベクターを応用することで、脳組織への遺伝子導入や脳神経疾患の治療実験において、安全に効果的な遺伝子導入が可能であった。また、ベクター産生型腫瘍標的細胞の開発に向け、体性幹細胞へのベクターコンポーネント導入条件を確認した。

研究成果の概要(英文)：To realize novel protein supplementation therapy for neuronal diseases, we developed an efficient AAV vector production system and vector-producing tumor-targeting cells. By using effective ion-exchange adsorbers, improved GMP production protocol for highly purified vector particles was developed. In addition to the dual ion-exchange procedures, gel filtration chromatography realized ultracentrifugation-free vector purification. As an application for the AAV-mediated protein supplementation therapy, successful transduction of the various disease models was demonstrated. Furthermore, vector-producing tumor-directed stem cells were developed to amplify therapeutic genes.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経疾患 遺伝子治療 AAVベクター

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫、難治性てんかん、および脳血管障害などの脳神経疾患に対する治療成績をさらに改善させるため、脳組織に治療蛋白質を効果的に送達し持続的に作用させる新規治療タンパク質補充療法の開発が急務である。このため、アデノ随伴ウイルス(AAV)やその産生細胞を用いた、安全で持続的なタンパク質補充療法の有効性が期待される。

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。申請者は従来、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 T. *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 T. *et al.*, *Mol. Ther.* 13: 738-746, 2006; 特願 2005-505834、PCT/JP2004/005166)を開発した。さらに、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 T. *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)。

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(特許成立 2013)。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 T. *et al.*, *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008、Uchibori R. *et al.*, *J Gene Med* 11: 373-81, 2009)。

2. 研究の目的

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。新規治療タンパク質送達システムの基盤技術として、高純度ベクター作製システムの開発、および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した。

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

(1) 高規格 AAV ベクター製造法の開発:

大規模製造に適したプロトコルを検証し効率化を推進した。293EB 細胞への導入効率の改善と SOP 作業手順の安定を目的として、Linear PEI を用いたベクター産生至適条件を検討した。また、SOP の支障となる塩化セシウム超遠心を省略した高規格精製に向け、陰陽イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせ、精製効果を検証した。

(2) 脳神経疾患における新規遺伝子導入法とタンパク質補充療法:

脳組織への外来遺伝子導入法として、マイクロバブル併用超音波照射を応用し、関心領域あるいは広範囲脳組織への導入条件を検証した。マーマセット静脈内にエバンスブルー色素とマイクロバブルをボラス投与し、同時に 2W、1MHz の超音波を 2 ないし 10 分間、頭皮上から内側側頭葉や頭頂葉を標的として照射した。還流固定後、各々の組織中の色素量をホルムアミド抽出にて吸光度で評価した。

(3) ベクター産生型標的細胞による *in situ* 遺伝子治療:

MSC や歯髄由来幹細胞について拡大培養を行い、脳神経疾患への応用を念頭に調製条件の検討と移植試験を行った。炎症を伴う脳血管障害の疾患モデルとして、MCA 閉塞 SD ラットを作成し、TTC 染色にて梗塞体積の評価を行った。また、MSC や歯髄由来幹細胞を応用したベクター産生型細胞を構築するための条件検討を行った。ルシフェラーゼ発現ベクターのコンポーネントを MSC に導入し、培養

細胞の系でベクター産生および遺伝子発現量を評価した。ベクターのコンポーネントの比率、高い産生量を維持する至適条件を検討した。

4. 研究成果

[現在までの達成度]

(1) 高規格 AAV ベクター製造法の開発 :

従来の精製法における密度勾配超遠心操作は GMP 生産において不利な操作段階であったが、イオン交換やゲル濾過クロマトグラフィーを応用し、密度勾配超遠心操作を省略可能なウイルス精製プロトコルの作成と再現に成功した。低濃度の Mes-HEPES バッファーにて AAV1 をイオン交換膜に吸着させると、ゲル濾過処理標本の SDS-PAGE 法での純度は 90% 以上であり、電子顕微鏡による粒子観察においても中空粒子の混入は 10% 以下であった (Tomono T. *et al.*, ASGCT, 2015)。

(2) 脳神経疾患における新規遺伝子導入法とタンパク質補充療法 :

高純度ベクターを用いて脳組織への遺伝子導入試験を行い、良好な遺伝子発現が確認された。この結果、1,8 および 9 型 AAV ベクターが霊長類脳組織の神経細胞への遺伝子導入に有用であることが確認された (Masamizu Y. *et al.*, Neuro Report, 2010; Masamizu Y. *et al.*, Neuroscience, 2011 ほか)。従来のげっ歯類を用いた研究報告ではアストロサイトへの導入には 9 型が有利であったが、霊長類ではアストロサイトへの導入が認められなかった。さらに興味深いことに、9 型 AAV ベクターが脳梁軸索への遺伝子導入に効果的であることが明らかとなった (Okada H. *et al.*, Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2013)。また、脳組織への新規遺伝子送達方法としてマイクロバブル併用超音波照射の効果をもマウスで検証した。超音波を照射した内側側頭葉においてエバンスブルーの血管外漏出が確認され、2W、1MHz の 2 分間照射にて十分な BBB 透過性亢進効果が得られると考えられた (Okada H. *et al.*, ASGCT, 2015)。げっ歯類の網膜細胞においてもチロシン変異 AAV2 による効果的な遺伝子導入を確認し、網膜虚血モデルにおいて BDNF 発現による神経保護効果を証明した (五十嵐ほか, 日本網膜硝子体学会, 2014)。

(3) ベクター産生型標的細胞による *in situ* 遺伝子治療 :

従来評価を進めてきた MSC に加え、増殖能力や抗炎症作用が高い歯髄由来幹細胞についても、脳神経疾患への応用の可能性を検討した。歯髄由来幹細胞は神経堤由来のものも含まれるため、神経栄養因子の分泌など、脳神経疾患の治療において有利な細胞プラットフォームと考えられた。ラット一過性脳虚血モデルにおいて歯髄幹細胞移植を行った結果、脳梗塞と虚血再灌流障害に対する脳保護効果が認められた (仁藤ほか, 日本脳

卒中学会, 2015)。またベクター産生型腫瘍標的細胞に関しても、MSC に加え歯髄由来幹細胞についても、ベクターコンポーネントの導入条件が検証できた。

[今後の研究の推進方策]

今回開発した密度勾配超遠心操作を省略可能なウイルス精製プロトコルを応用し、より大規模での試験製造を実施することで、GMP 製造に向けた課題を検証する。また、カプシドに親和性の高いアプタマーの網羅的スクリーニングを行い、アフィニティー精製に活用可能な担体の開発を進める。純度の高いベクターを応用することで、脳組織への遺伝子導入や脳神経疾患の治療実験において、安全に長期的効果が期待できる。また、MSC に加え増殖能力や抗炎症作用が高い歯髄由来幹細胞についても、ベクターコンポーネントの導入とベクター産生条件を検証することで、今後も引き続き癌や炎症性疾患の治療実験を推進する。

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 8 件)

1. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, Motoshima M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun*, 24;456(4):913-8, 2015
2. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, and Matsuzaki M. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. *Nat Commun*, 5, Article number 5551, 2014
3. Masamizu Y, Tanaka YR, Tanaka YH, Hira R, Ohkubo F, Kitamura K, Isomura Y, Okada T, Matsuzaki M; Two distinct layer-specific dynamics of cortical ensembles during learning of a motor task. *Nat Neurosci*, 17(7):987-94, 2014
4. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Yukihiro Baba, Sumiko Watanabe, Shin'ichi Takeda, and Takashi Okada; Robust long-term transduction of common marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2:e95, 2013

5. Takahashi M1, Chiyo T, Okada T, Hohjoh H; Specific inhibition of tumor cells by oncogenic EGFR specific silencing by RNA interference. PLoS One, 8(8):e73214, 2013
6. Baba Y, Satoh S, Otsu M, Sasaki E, Okada T, Watanabe S.: In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explant culture. Biochimie, 2012 Dec;94(12):2716-22
7. Masamizu Y, Okada T, Kawasaki K, Ishibashi H, Yuasa S, Takeda S, Hasegawa I, Nakahara K.: Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. Neuroscience, 193:249-258, 2011
8. Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K. Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. Neuro Report, 21:447-51, 2010.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Chiyo T, Shimada T, Onodera M, Okada T. Efficient Scalable Purification of rAAV1 Using Ion-Exchange and Gel-Filtration Chromatography To Avoid Ultracentrifugation Procedure. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 15, 2015
2. Okada H, Ishibashi H, Masuda C, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Endo-Takahashi Y, Kato K, Negishi Y, Takeda S, Okada T. Blood-Brain Interface Opening By Ultrasound in Adult Common Marmoset To Induce Brain Pathology With rAAV. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 14, 2015
3. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M. Single-neuron operant conditioning by two-photon imaging induces bidirectional modulations in cortical microcircuit. 9th FENS Forum of Neuroscience. Milan, Italy July 5-9 2014
4. Nishie T, Enoki T, Kitagawa M, Mineno J, Okada T, Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y. Examination on large scale production of AAV vectors for clinical use. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 8, 2014
5. Sakamoto S, Nishie T, Takakura H, Enoki T, Mineno J, Okada T, Yamagata T, Mizukami H, Ozawa K, Muramatsu S. Good manufacturing practice (GMP) compatible method for adeno-associated virus type 2 vector production and purification. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 7, 2014
6. Tomono T, Hirai Y., Shimada T., Onodera M., Okada T. Production and purification of AAV1 and AAV9 vectors without using ultracentrifugation. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, August 6-8, 2014
7. Yamazaki Y., Hironaka K, Miyake N., Hirai Y., Miyake K., Okada T., Shimada T. Long-term enzyme supplementation into the CSF to treat metachromatic leukodystrophy by intraventricular injection of AAV1 vector. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) August 6-8, October 18-22, 2014
8. Igarashi T, Miyake K., Kobayashi M, Takahashi K., Miyake N., Iijima O., Nakamoto K., Hirai Y, Shimada T, Okada T, Takahashi H. Tyrosine-mutated AAV2 mediated BDNF rescued inner retina in rat retinal ischemic injury model. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) August 6-8, 2014
9. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Okada T, Shimada T.: Trans-BBB gene therapy for metachromatic leukodystrophy using self-complementary type 9 AAV vector. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, August 6-8, 2014
10. 仁藤智香子、中島壯崇 1、上田雅之、稲葉俊東、斎藤萌子、西山康弘、須田智、中村有希、今川究、立花克彦、岡田尚巳、木村和美
ラット一過性脳虚血モデルにおける歯髄幹細胞移植による脳保護効果の検討 (Human dental pulp stem cells protect rat brain after transient focal ischemia) 第 40 回日本脳卒中学会総会 2015 年 3 月 26-29 日 広島

11. 五十嵐勉、三宅弘一、小林舞香、高橋和久、三宅紀子、飯島脩、中元兼二、平井幸彦、島田隆、岡田尚巳、高橋浩. BDNF を発現するチロシン変異 AAV2 を用いた網膜虚血モデルにおける神経保護効果. 日本網膜硝子体学会 大阪 2014 年 11 月 28-30,大阪
12. Kawano Y, Ota N, Dodo K, Nishie T, Okada T, Muramatsu S, Enoki T, Kitagawa M, Mineno J. Investigation of transduction technology using AAV vectors and AAV empty particles. 第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 横浜
13. 平 理一郎、大久保 文貴、正水 芳人、大倉 正道、中井 淳一、岡田 尚巳、松崎 政紀
光子イメージングを用いた単一細胞オペラント条件付けによる局所回路の報酬タイミング依存的活動変化. 第 37 回 日本神経科学会 9/12/2014 横浜
14. 正水 芳人、田中 R 康裕、田中 H 康代、平 理一郎、大久保 文貴、喜多村 和郎、磯村 宜和、岡田 尚巳、松崎 政紀 運動課題学習中の一次運動野第 2/3 および第 5a 層での集団および個々の細胞における神経活動変化. 第 37 回 日本神経科学会. 2014 年 9 月 11 日 横浜
15. 平理一郎、大久保文貴、正水芳人、大倉正道、中井淳一、岡田尚巳、松崎政紀 2 光子カルシウムイメージングを用いた単一オペラント条件付けにおける自発神経活動の報酬依存的な活動変化. 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 16-18 日 鹿児島

〔総説〕(計 1 件)

伴野太郎、岡田浩典、岡田尚巳：遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作成法. Pharma Medica, 33 巻 4 号, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

名称：薬剤取り込み増強剤 (AAV の細胞内取り込み増強成分に関する特許)
 発明者：岡田尚巳、千代智子、武田伸一
 権利者：国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許
 番号：2012-078035
 出願年月日：2012 年 3 月 29 日
 国内外の別：国内

名称：薬剤取り込み増強剤 (AAV の細胞内取

り込み増強成分に関する特許)

発明者：岡田尚巳、千代智子、武田伸一
 権利者：国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許
 番号：PCT/JP2013/059470
 出願年月日：2013 年 3 月 29 日
 国内外の別：国外

名称：薬剤送達粒子及びその製造方法
 発明者：岡田尚巳、武田伸一、喜納裕美
 権利者：国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許
 番号：2011-092252
 出願年月日：2011 年 4 月 18 日
 内外の別：国内

名称：薬剤送達粒子及びその製造方法
 発明者：岡田尚巳、武田伸一、喜納裕美
 権利者：国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許
 番号：PCT/JP2012/060229
 出願年月日：2012 年 4 月 16 日
 国内外の別：国外

取得状況 (計 1 件)

名称：ベクター産生型腫瘍標的細胞
 発明者：岡田尚巳、小澤敬也
 権利者：自治医科大学
 種類：特許
 番号：5283219
 出願年月日：2006 年 4 月 20 日
 取得年月日：2013 年 6 月 7 日
 国内外の別：国内

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 尚巳 (OKADA, Takashi)
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00326828

(2) 研究分担者

喜納 裕美 (KINOH, Hiromi)
 日本医科大学・大学院医学研究科・研究生
 研究者番号：60532728

岡田 浩典 (OKADA, Hironori)
 日本医科大学・大学院医学研究科・研究生
 研究者番号：80416271