

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16526

研究課題名(和文) AAVベクターの感染阻害機序の解明と新規中和抗体除去法の開発

研究課題名(英文) Establishing of new AAV vector system against neutral antibody

研究代表者

平本 貴史 (Hiramoto, Takafumi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00725062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)の細胞表面を修飾することにより生体内における免疫応答を回避する仕組みの構築を行なった。まず、VP2タンパク質遺伝子を標的として修飾を行なったが、先行研究の報告とは異なり、産生量の著しい減少が見られた。また、抗AAV抗体に対する反応性を解析すると、高力価の抗体では反応性を消失し、これが細胞表面の修飾数が少ないことに起因することが分かった。そこで異なるアプローチでAAVベクター表面を修飾することにした。修飾AAVベクターは、表面に修飾したタンパク質を発現しており、また感染効率、そして産生量ともに未修飾群と変わらないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AAVベクター自身にヒトに対して病原性がなく、宿主ゲノムに挿入されずエピゾーム中にて遺伝子を発現するため、安全な遺伝子治療用ベクターとして多くの臨床試験が行われている。しかし、増殖細胞では遺伝子発現が徐々に失われることや既感染に伴う抗AAV中和抗体存在下では感染性を消失することが問題となる。本研究によって開発したAAVベクター表面修飾法は、これまで困難であったAAVベクターの修飾を可能とし、血清型によらず標的臓器への感染性を上昇させるだけでなく、中和抗体存在下でも感染する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a new adeno-associated virus (AAV) vector, which when surface modified, was able to escape the immune system in vivo. At first, we modified the viral protein 2 (VP2) in the AAV vector plasmid as done in previous studies (Warrington, KH., et al. J. Virol. 2004). Although we observed the tagged protein on the vector's surface, both the vector's dose and infectious ability decreased significantly in the presence of high doses of anti-AAV antibodies because of its limited surface modification. Therefore, by targeting the vector's surface protein, we developed a newly modified AAV vector. This new vector expressed the ligands against the receptor, which is expressed in liver tissue. We found that the vector's dose and infectious ability against the HEK293 cells were the same as those seen with the conventional AAV vector.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：AAVベクター 修飾法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な難治性疾患の次世代治療法として遺伝子治療が再注目されている。中でも、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは病原性もなく、分裂期・非分裂期の細胞へ高効率に生体の標的細胞へ遺伝子導入が可能のため、遺伝子治療用ベクターとして注目されている。実際に欧米において AAV ベクターを用いた多くの臨床試験が開始されており、最も期待の高いベクターである。現在所属している自治医科大学医学部病態生化学部門では、AAV ベクターを用いた血友病に対する遺伝子治療やゲノム編集技術を開発し、臨床応用を目指している。また、申請者も、AAV ベクターを用いたゲノム編集により免疫不全症マウスの治療に成功した (*Mol. Ther.*, 2018)。しかし、AAV ベクターを多くの疾患に対して効果的に用い、かつ適応患者を広げるためには、AAV ベクターに対する免疫反応を制御する手法を開発する必要がある。特に既感染に伴う抗 AAV 中和抗体が存在すると AAV ベクターが感染しないため、AAV ベクターを用いた遺伝子治療の適応とならない。抗 AAV 中和抗体保有率は全体の 4 割、特に中高齢者に多いため、実際に AAV ベクターの治療の恩恵をうけるのは一部の集団である。また、AAV ベクターは、投与後に抗 AAV 中和抗体が発現するために、再投与ができない。AAV ベクターは染色体に組み込まれず搭載遺伝子を発現するため、細胞分裂に伴い徐々に遺伝子発現が低下する。そのため治療効果が減弱した時に再投与ができないことは、AAV ベクターによる遺伝子治療において大きな弱点となる。現在、抗 AAV 中和抗体陽性患者における液性免疫回避について研究室レベルで、エンブリーカプシドカプシドの投与 (Mingozzi, F. et al. *Sci. Transl. Med.* 2013) 異なる血清型の使用 (Stone, D. et al. *Mol. Ther.*, 2010) 系門脈アプローチ (Mimuro, J. et al. *Mol. Ther.*, 2013) が報告されている。また、血漿交換療法によって中和抗体を除去する試みがなされているが (Montei lhet, V. et al. *Mol. Ther.* 2011) 数回の血漿交換後も中和抗体の残存が検出されることから、臨床利用は困難である。

### 2. 研究の目的

本研究は AAV ベクターによる遺伝子治療の適応拡大および治療効果減衰後のベクター再投与方法の開発を目指し、AAV のウイルス表面を修飾することによる抗 AAV 中和抗体の新規除去法、そして中和抗体存在下での感染の可能性を検討する。具体的に、1) カプシドタンパク質を標的としたウイルス修飾法の検討、2) 修飾したタンパク質と結合可能なカラムを用いた体外での抗 AAV 抗体除去法を開発する。同時に感染細胞が再感染を防ぐメカニズムとして、受容体の局在変化 (internalization) が予測されるため、3) AAV ベクター感染後の AAV 受容体の局在を解析を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の手順で行った。

#### (1) VP2 カプシドタンパク質を標的とした修飾 AAV ベクターの開発

先行論文 (Warrington, KH., et al. *J. Virol.* 2004) を参考にして、カプシドタンパク質の一つである、VP2 遺伝子の N 末端、あるいはループ途中に FLAG タグ遺伝子を挿入した。次に野生型、及び改変した VP2 タンパク質を用いて血清型 8 型 AAV ベクターを作成した。作成した AAV ベクターの産生量、及び力価を搭載遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を指標にして比較検討を行った。

#### (2) エキソソーム AAV ベクターの性質の検討

産生細胞として、AAVpro293 細胞 (タカラバイオ株式会社より購入) 及び HEK293 細胞を用いてエキソソームに内包された AAV ベクター (exoAAV ベクター) を回収した。具体的には、それぞれの産生細胞に 3 つのプラスミドを遺伝子導入し、経時的に細胞培養上清を回収した。回収した培養上清を複数回の遠心 (300g x 5 分 2,000g x 20 分 20,000g x 1 時間 100,000g x 1.5 時間) し、exoAAV ベクターを回収した。回収した exoAAV ベクターを定量 PCR 法によって力価を測定するとともに、ヒト肝臓細胞株 (Huh7 細胞) への遺伝子導入効率を通常の AAV ベクターと比較した。

#### (3) エキソソーム表面膜発現タンパク質を標的とした AAV ベクターの修飾

肝臓組織において特異的高発現しているアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGR) の抗原を、エキソソーム表面膜タンパク質の細胞外領域に挿入したプラスミドを構築した。構築したプラスミドを産生細胞 (AAVpro293 細胞) に遺伝子導入し、恒常的に抗原をエキソソーム表面膜タンパク質を介して発現する産生細胞株を樹立した。同様に ASGR を恒常発現する 293 細胞 (ASGR-293 細胞) を樹立した。樹立した産生細胞株より AAV ベクターを産生し、定量 PCR 法によって力価を測定した。産生した AAV ベクターを 293 細胞、ASGR-293 細胞に感染させ、感染量をルシフェラーゼ活性を指標にして測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) VP2 カプシドタンパク質を標的とした修飾 AAV ベクターの開発

先行論文として、AAV ベクターを構成する VP2 カプシドタンパク質遺伝子に修飾遺伝子を挿入させることにより、AAV ベクター表面を表面修飾する方法が報告されている (Warrington, KH., *et al. J. Virol.* 2004)。そこで、VP2 カプシドタンパク質の N 末端、及び細胞外領域に FLAG タグ遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。そして改変 VP2 カプシドタンパク質プラスミド、及び VP1 遺伝子、VP3 遺伝子、そしてルシフェラーゼを搭載した AAV 骨格プラスミドを産生細胞 (AAVpro293 細胞) に同時に遺伝子導入し、修飾 AAV ベクターを産生させた。産生した修飾 AAV ベクターの FLAG 発現を Western Blot 法によって確認できたが、N 末端修飾、細胞外領域修飾ともに産生量が著しく低下した。また、産生した修飾 AAV ベクターを 293 細胞に感染させたところ、未修飾群と比較して著しい感染効率の低下が確認できた。これらの結果より、AAV ベクターのカプシドの修飾による修飾 AAV ベクターは困難であることがわかった。

また、修飾 AAV ベクターを抗 FLAG 抗体を結合したビーズによって、AAV をビーズ表面に付着させ (AAV 結合ビーズ) この AAV 結合ビーズによって抗 AAV 中和抗体の除去を中和抗体量を変えて試みたが、高力価の中和抗体はほとんど除くことができなかった。Western Blot 法の結果を鑑みると、VP2 カプシドタンパク質の改変による修飾法は AAV ベクター表面にほとんど FLAG タグを発現できないことが示唆された。

##### (2) エキソソーム AAV ベクターの性質の検討

そこで別のアプローチとして、AAV ベクターを何らかの分子でコーティングしたのち、コーティングした分子表面を修飾する方法を考えた。しかし、AAV ベクター表面を修飾した報告はなく、我々の検討においても AAV ベクター表面修飾の結果、AAV ベクターの感染性を消失することがわかった。2012 年に Maguire, CA.らによって細胞外小胞であるエキソソームに内包された AAV ベクター、exoAAV ベクターが報告された (Maguire, CA. *et al. Mol. Ther.* 2012)。そこで、エキソソーム表面を修飾することによる AAV ベクター修飾法を考えた。

まず、exoAAV ベクターの感染性と抗 AAV 中和抗体に対する反応性を解析した。293 細胞、及び産生細胞に遺伝子導入を行い、経時的に回収した細胞培養上清より exoAAV ベクターを回収し、これらの exoAAV ベクターはエキソソームのマーカーである CD9 を発現していた。次に exoAAV ベクターの Huh7 細胞に対する感染効率を検討すると、早期に回収した exoAAV ベクターほど感染効率が高く、産生開始後 2 日目に回収した exoAAV ベクターは、従来の AAV ベクターと比較して 2 倍近い感染効率を示した (図 1A)。また、exoAAV ベクターの回収法として、invitrogen 社のキットを使用する方法と複数回の遠心を行う方法が報告されているが、我々の検討ではキットの使用と遠心法に感染効率、及び産生量の違いはほとんど見られなかった。また、抗 AAV 中和抗体存在下、exoAAV ベクターの Huh7 細胞に対する感染性を解析すると、高い力価の中和抗体存在下でも exoAAV ベクターは感染性を示すことがわかった (図 1B)。また、様々な血清型の exoAAV ベクターを作成したが、全てにおいて既存の AAV ベクターより感染性の上昇が見られた。

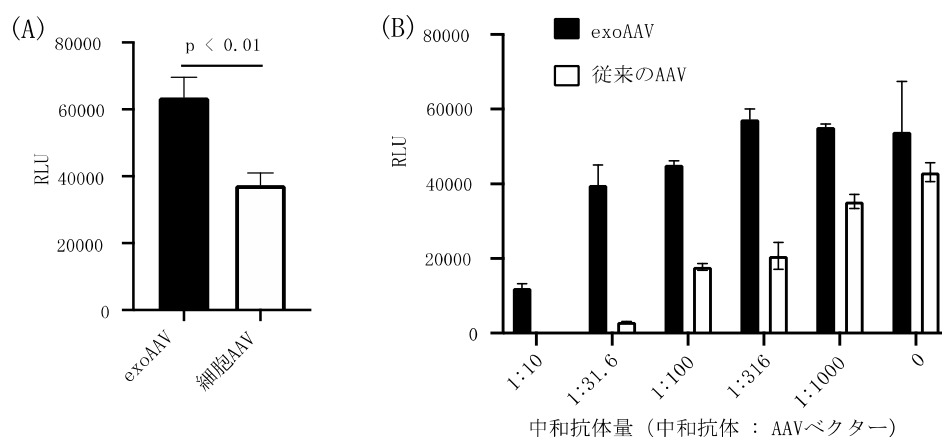


図 1. exoAAVベクターのHuh7細胞に対する感染性の検討

##### (3) エキソソーム表面膜発現タンパク質を標的とした AAV ベクターの修飾

上記(2)の結果を受けて、exoAAV ベクター表面膜タンパク質を標的とした修飾法を考えた。膜タンパク質の細胞外領域に ASGR 抗原を挿入したプラスミドを産生細胞に遺伝子導入して得られた細胞株は、細胞表面に抗原を発現していることを FACS 法によって確認した。本細胞株より産生した exoAAV ベクターの産生量は、未修飾の exoAAV ベクターとほとんど変わらず、また修飾 exoAAV ベクターにおける ASGR に対する抗原発現を Western Blot 法で確認できた。これら修飾 exoAAV ベクターを 293 細胞、及び ASGR-293 細胞に遺伝子導入すると、293 細胞ではほとんど感染効率に変化がないのに対し、ASGR-293 細胞に対する感染効率は 2 倍以上上昇していることが

わかった(図2)。本結果を受けて今後、中和抗体に対する感受性、及び in vivo での感染性について検討を行う予定である。

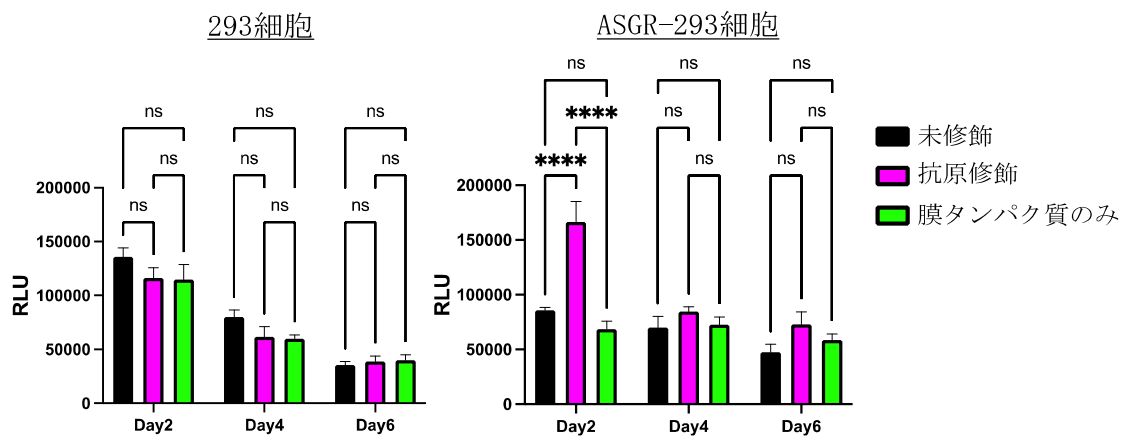


図2. 修飾exoAAVベクターの感染性の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------