

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16069

研究課題名（和文）骨指向性の高いアデノ随伴ウイルス改変カプシドを用いた新規遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a bone-targeted gene therapy using an engineered adeno-associated virus capsid

研究代表者

澤本 一樹（Sawamoto, Kazuki）

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80608696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨系統疾患に対する有効で安全性の高い治療法の開発が喫緊の課題である。代表者は、アデノ随伴ウイルスのカプシド蛋白に骨ターゲティングシグナルである酸性オリゴペプチドを修飾した複数のウイルスベクターを創出した。しかしながら、*in vitro*実験およびマウス*in vivo*実験において改変型ウイルスベクターの骨指向性の増大については確認することができなかった。また、その他臓器へのウイルスベクターの導入効率については低下していることが示唆された。骨ターゲティングシグナルの修飾部位については今後より詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、難病や希少遺伝性疾患に対するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の開発が注目を集めている。一回の投与で目的遺伝子の持続的な発現が可能であるため従来の治療法の欠点を補うことができると考えられている。しかしながら骨組織を標的にした場合には、ベクターの骨への送達を向上させることが不可欠である。本課題では、骨ターゲティングシグナルとして酸性アミノ酸オリゴペプチドを用いて、カプシド改変型ベクターの構築に取り組んだ。しかしながら、骨指向性を有したベクターの確立には至らなかった。今回の研究結果は、今後カプシド改変型のベクターを構築する際に有益な情報になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The development of effective and safe gene therapies for skeletal dysplasia is an important issue. In this study, we have created several adeno-associated virus (AAV) vectors in which the capsid protein of its virus is modified with a bone targeting signal, an acidic oligopeptide (an eight-residue stretch of L-aspartic acids: D8). However, *in vivo* experiments showed that insertion of D8 into AAV8 capsid protein did not increase the delivery of the vectors into bone and cartilage. The efficiency of transduction of the capsid-modified virus vectors into the liver was also decreased. In addition, hydroxyapatite assay showed that the capsid modification did not enhance the affinity of the AAV vectors to the bone matrix. For these results mentioned above, further optimization of the modification site in AAV8 capsid is needed.

研究分野：臨床薬学

キーワード：遺伝子治療 アデノ随伴ウイルス 骨ターゲティング カプシドタンパク 骨系統疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患に対する有効な治療法の開発が社会的に求められている。骨系統疾患の中の一疾患群である低ホスファターゼ症やムコ多糖症では酵素補充療法 (ERT) が行われるが、骨に対する効果は限定的である (Sawamoto et al. *Curr Osteoporos Rep.* 2020)。酵素半減期が短いことによる定期的な投与が必要なことや高額な薬価等が問題点となっている。近年、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療が注目を集めている。一回の投与で目的遺伝子の持続的な発現が可能であるため、従来の治療法の欠点を解決できると期待されている。代表者は、ウイルスベクターの骨指向性を高めることで、骨組織に対してより効果的な遺伝子治療を開発できるのではないかと考えた。酸性アミノ酸 (アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)) のオリゴペプチドは骨の主要成分であるヒドロキシアパタイト (HA) に高い親和性を示すことから、それらアミノ酸を修飾した薬剤の骨指向性が増大することが知られている (Ishizaki et al. *J Bone Miner Metab.* 2009)。これまでに AAV2 のカプシドタンパクに D8 を修飾したウイルスベクターでは骨指向性を有することが報告されている (Alméciga-Díaz et al. *Pediatr Res.* 2018) が、修飾部位の最適化や組織導入効率の変化等、未だ明らかになっていない点が多い。本研究課題では、臨床的により汎用性が高い AAV8 型 (AAV8) に着目した。

2. 研究の目的

本研究課題では、AAV8 ベクターのカプシド構造を改変することにより、骨指向性を高めた新規のウイルスベクターを創出することを目的とした。1. 骨ターゲティングシグナルを付加した複数のカプシド改変型ベクターの作製、2. 各 AAV ベクターの骨指向性の評価、について取り組んだ。

3. 研究の方法

1. AAV パッケージングプラスミドの構築

AAV カプシドタンパクを発現するパッケージングプラスミド pAAV2/8 (Addgene Plasmid#112864) に 8 つのアスパラギン酸 (D8) の塩基配列を挿入した。表 1 に示すプライマーを用いて PCR (PrimeSTAR Max, Takara) を行うことで、AAV 8 cap 配列の T138 もしくは N590 の直後に 5' -GATGATGATGATGATGATGACGAC-3' の配列を組み込んだ。Cap 配列全長を DNA シーケンサで読み取り、正しく挿入されていることを確認した。

2. AAV ベクターの産生・精製

1. で作製した各 pAAV2/8 と pAAV-CAG-EGFP (Addgene Plasmid#37825) および pAdDeltaF6 (Addgene Plasmid#112867) を 10 cm デッシュ 40 枚分の HEK293T 細胞に、遺伝子導入試薬である PEI MAX を用いてトリプルトランスフェクションを行った。その後、培養細胞および上清を回収した。細胞からは凍結融解を繰り返すことで、また上清からは PEG 沈殿により AAV ウイルスをそれぞれ回収した。続いて、OptiPrep 多用途密度勾配遠心分離媒体 (Iodixanol 溶液) を用いた超遠心分離法により AAV ウイルスベクターの精製を行った。非改変型ベクター (AAV8-EGFP) および 3 つのカプシド改変型ベクター (AAV8(D8/T138)-EGFP、AAV8(D8/N590)-EGFP、AAV8(D8/T138/N590)-EGFP) を作製した。実験で使用するまで各 AAV ベクターは -80 で凍結保存した。

3. In vivo 投与実験

5 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに各 AAV ベクターを 5.0E12 GC/kg の用量で尾静脈より全身投与した。2 週間後に、骨 (大腿骨および脛骨) 肝臓およびその他の臓器を採取した。実験で使用するまで各組織は -80 で凍結保存および 4% パラホルムアルデヒド溶液で保存した。凍結組織からは、ゲノム DNA および Total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 実験に用いた。また、固定した

表 1. プライマー配列

AAV8(D8/T138)

Fw: 5'- ATGATGATGATGATGACGACGCTCCTGGAAGAAGAGACC -3'
Rv: 5'- CATCATCATCATCATCCGTCTTAGCGCCTTCTCAAC -3'

AAV8(D8/N590)

Fw: 5'- ATGATGATGATGATGACGACACGGCTCCTCAAATTGGAAC -3'
Rv: 5'- CATCATCATCATCATCGTTTTGCTGCTGCAAGTTATCTGCC -3'

組織からパラフィン切片を作製し、GFP の免疫組織染色を行った。

4. HA 結合実験

過去の報告 (Alméciga-Díaz et al. *Pediatr Res.* 2018) を参考にして行った。一定量の各 AAV ウイルスベクターを HA ビーズと混和し、37 °C、300 rpm で 1 時間反応させた。その後、上清中のウイルスベクターをリアルタイム PCR により定量した。

4. 研究成果

上記の方法を用いて作製した各 AAV ベクターのゲノムコピー (GC) 量は、AAV8-EGFP (非改変型、コントロールベクター): 1.8×10^{12} GC、AAV8(D8/T138)-EGFP: 3.5×10^{12} GC、AAV8(D8/N590)-EGFP: 6.9×10^{12} GC、AAV8(D8/T138/N590)-EGFP: 3.3×10^8 GC となった。AAV8(D8/T138/N590)-EGFP については、他の AAV ベクターと比較してウイルス量はおよそ 5,000 ~ 20,000 分の 1 以下となった。これらのことから、AAV8 カプシドの cap 配列 T138 および N590 への D8 の同時挿入は、カプシド会合を阻害することが示唆された。よって以降の実験については、残り 3 つの AAV8 ベクターを用いることとした。

続いて、作製した 3 つの AAV8 ベクターをマウスに全身投与し、各ウイルスベクターの骨指向性およびその他の臓器への分布の評価を行った。まずは、GFP 蛍光からベクターの組織導入効率を評価した。AAV8-EGFP (非改変型、コントロールベクター) 投与群では、マウス大腿骨・脛骨の海綿骨および骨幹端にわずかな蛍光を認めた。また骨髄細胞および皮質骨においても弱い蛍光を認めた。しかしながら、成長板および関節軟骨においては GFP 蛍光を確認できなかった。一方で、AAV8(D8/T138)-EGFP および AAV8(D8/N590)-EGFP 投与群においては、大腿骨および脛骨のいずれの部位においても GFP 蛍光は確認できなかった (図 1A)。また、マウス肝臓においては AAV8-EGFP (非改変型、コントロールベクター) 投与群では強い GFP 蛍光が確認できたが、AAV8(D8/T138)-EGFP および AAV8(D8/N590)-EGFP の改変型ベクター投与群においては、骨組織と同様に GFP 蛍光は著しく減弱していた (図 1B)。次に、マウス肝臓から抽出した RNA およびゲノム DNA を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、AAV8(D8/T138)-EGFP および AAV8(D8/N590)-EGFP 投与群においては、対照群 (AAV8-EGFP) と比較して EGFP の mRNA 発現量および AAV ゲノム量は著しく減少していた。よって、カプシド改変型 AAV8 ベクター (AAV8(D8/T138)-EGFP および AAV8(D8/N590)-EGFP) の骨組織への送達改善は確認できなかった。また、これらの改変型ベクターにおいては肝細胞への導入効率が低下していることも示唆された。

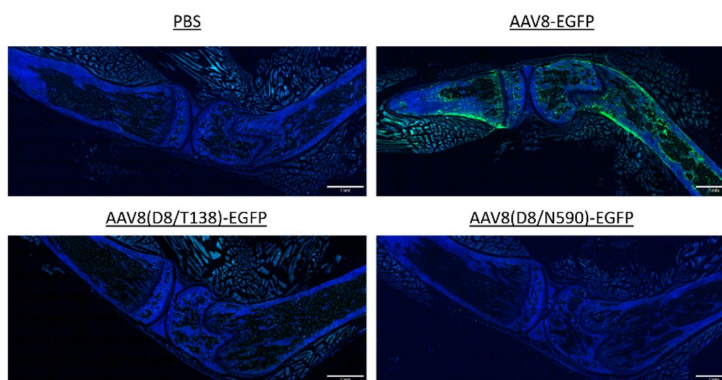
続いて、ヒドロキシアパタイト結合実験により、今回作製した 3 つの AAV8 ベクターの骨指向性について *in vitro* の系で評価を行った。しかしながら、改変型ベクター (AAV8(D8/T138)-EGFP および AAV8(D8/N590)-EGFP) 群では、対照群 (非改変型ベクター AAV8-EGFP) と比較して結合率に変化は見られなかった。

以上より本研究課題において、AAV8 カプシドの異なるサイトに骨ターゲティングシグナルである D8 配列を挿入することにより、新規のカプシド改変型 AAV8 ベクターを創出した。しかしながら、今回作製したいずれのカプシド改変型 AAV8 ベクターについても *in vitro* および *in vivo* の系において骨指向性の改善を確認することは出来なかった。これまでに、AAV2 についてはカプシドの cap 配列 T138 への D8 の挿入により骨指向性が上昇することが既に報告されている (Alméciga-Díaz et al. *Pediatr Res.* 2018)。今後は、AAV8 カプシドにおける骨ターゲティングシグナルの挿入サイトをより精査することで骨指向性 AAV8 ベクターの開発が望まれる。

図 1.

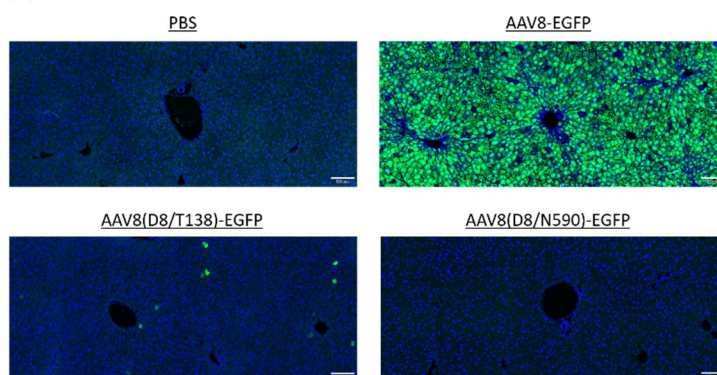
(A) 骨 (脛骨/大腿骨)

(Scale bar: 1 mm)



(B) 肝臓

(Scale bar: 100 μm)



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
---------	---------