

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20609

研究課題名（和文）強力な局所遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of strong local gene therapy method

研究代表者

栗田 昌和（Kurita, Masakazu）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20424111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,600,000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）カプシド、デリバリー方法に独自の改変、工夫を加えることによって、強力な局所的遺伝子治療法の確立にむけた基礎的技術の開発を目指した。動物モデルの確立、免疫調整による局所的遺伝子導入への効果の検討、新規AAV開発のプラットフォームの確立から研究を開始し、皮膚潰瘍面および表皮組織それぞれに対して最適化された新規AAVカプシドの開発、局所特異性向上のための新規キャリアの開発を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果では、向後も広く応用可能な新規AAV開発プラットフォームが確立された。皮膚潰瘍面の間葉系細胞、表皮組織に対して最適化された新規AAVカプシドは、既存のAAVを上回る遺伝子導入効率を有し、新規治療開発、および直接的に治療応用に用いる可能性がある。また、開発を進めた新規キャリアも遺伝子治療の潜在的なリスクを減らしうるものであり、強力な局所遺伝子治療開発を進めるための礎となる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a basic technology for a potent localized gene therapy method by original modifications and innovations to adeno-associated virus vector (AAV) capsid and delivery methods. Starting from establishing new animal models, examining the effects of immune modulation on local gene delivery, and establishing a platform for the development of new AAVs, we proceeded to develop new AAV capsids optimized for skin ulcer mesenchymal cells and epidermal tissue, and new carriers to improve local specificity.

研究分野：形成外科学

キーワード：遺伝子導入 アデノ随伴ウイルスベクター 皮膚潰瘍 皮膚 ポリエチレングリコール ドラッグデリバリー 治療開発

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

安全性の高さ、生体表現型に及ぼす影響の強さ、などの点から、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた遺伝子治療についての臨床研究が欧米、中国を中心に急速な広がりを見せている。AAV は個体に直接アプローチする遺伝子治療ベクターとして非常に優れた特質を有し、内科的疾患を中心に、強力な治療効果を実証されつつある。対して申請者は、皮膚潰瘍に存在する間葉系細胞から上皮細胞への細胞系譜の転換を介して、潰瘍面から直接的に上皮化、創傷の閉鎖をはかる皮膚潰瘍治療法の開発 (Kurita et al. *Nature* 2018;561:243-47 および文献) をはじめとした新しい治療的介入方法の開発を進めてきた。

2. 研究の目的

臨床応用に向けて、AAV には多くの利点がある一方で、積載可能な遺伝子長制限が強いこと、ターゲットとしない臓器におけるオフターゲット効果による合併症などの可能性があること、染色体外ベクターとして知られる一方でゲノムへの導入配列の挿入の可能性があると、などの制約もあった。

対して本研究では、AAV カプシド、デリバリー方法に独自の改変、工夫を加えることによって、強力な局所的遺伝子治療法の確立にむけた基礎的技術の開発を目指した。神経筋、末梢感覚器、皮膚軟部組織など、身体末梢局所に病態の集中する疾患に対する強力な治療的介入法を確立し、生体機能および感覚に関する外科学分野における応用の礎を築くことによって、諸外国に比して大きく遅れている本邦の遺伝子治療研究の進展を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

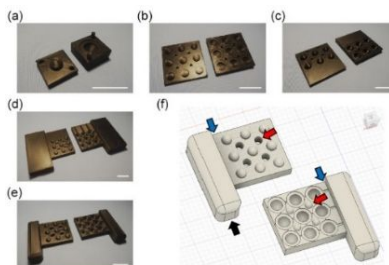
- 1) 本研究の将来的な応用目的である皮膚潰瘍病変動物モデルを作成することを目的として、ハット型シリコンチャンバーを作成するための鋳型を最適化した。
- 2) AAV 作用の局所特異性向上を目的として、AAV2 を用いた遺伝子導入における免疫グロブリンキャンセリング作用を調べた。
- 4) 相対的に長鎖配列に対して高いパッケージング効率を有するカプシドの開発を進めるために、新規 AAV カプシドバリエーションライブラリを作成した。
- 5) 皮膚軟部組織に対して高い特異性を有する新規 AAV カプシドを開発するため、AAVDJ をバックボーンとするウイルスカプシドライブラリプラスミド作成法の最適化を進めた。
- 6) 作成した AAV ライブラリを用いた定方向進化法により、マウス皮膚潰瘍面の細胞に高い遺伝子導入効率をもつ新規 AAV カプシドを開発した。
- 7) 既知の AAV バリエーションを異なったバックボーン AAV に移行するハイブリッド AAV カプシド作成アプローチで、ケラチノサイト、表皮組織に対して高い組織特異性を有する AAV カプシドを開発した。
- 8) 皮膚潰瘍面浅層に対する遺伝子導入効率特異性向上を目的として、テトラポリエチレングリコール (tetra-PEG) キャリアを用いた新規 DDS の開発を進めた。溶解性の異なる PEG キャリアとして PEG ハイドロゲル、PEG スポンジ、PEG スライム、それぞれを担体としてマウス背部の皮膚潰瘍面に遺伝子導入を行い局所特異性について検討を進めた。

4. 研究成果

1) 潰瘍モデル用シリコンチャンバーのための鋳型の最適化

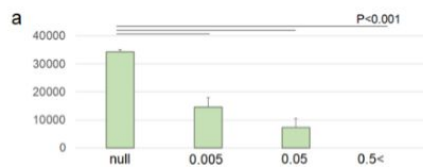
皮膚潰瘍モデルとして高い有用性をもちながら、一般的に入手の困難であったハット型シリコンチャンバーを汎用性の高い手法で容易に作成するための鋳型デザインを開発し、商用 3D プリントサービスで用いることが可能な 2 種類のサイズのチャンバーデザインファイルを含めて論文報告した。

(図, 3D プリント鋳型の最適化過程、文献 より引用)



2) AAV2 に対するヒト免疫グロブリンのキャンセリング作用

AAV による遺伝子導入効果の局所特異性向上のため、免疫グロブリン投与によるキャンセリング作用を調べた。第一段階として、GFP を発現する自然界由来の代表的な AAV である AAV2 を容易し、293FT 細胞を検体として免疫グロブリンを作用させたところ、濃度依存性に AAV2 の遺伝子導入作用をキャンセルすることが可能であった。本知見に基づいて今後、生体内でのキャンセリング作用について検討を進めていく (図、加藤、未発表データ)。

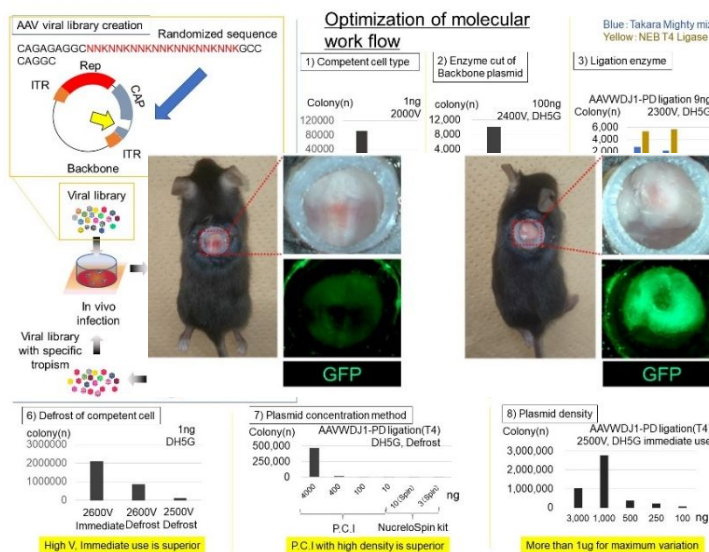


3) 長鎖配列用ウイルスライブラリ作成

既存の AAV カプシドについて、同一の Gene of interest を搭載した AAV を作成する際に、AAV カプシドの種類によってパッケージング効率に大きな隔たり、特異性を認めることを確認した。相対的に長鎖配列に対して高いパッケージング効率を有するカプシドの開発を進めるために、新規 AAV カプシドバリエーションライブラリを作成した。

4) AAVDJ ウイルスカプシドライブラリの作成法の最適化

皮膚軟部組織に対して高い特異性を有する新規 AAV カプシドを開発するため、文献的報告を基本として、21 塩基の trimer oligo を heparin-binding region に挿入する AAVDJ ライブラリプラスミドのクローニング法最適化を進めた。大腸菌株、バックボーンプラスミドの制限酵素処理方法、プラスミド溶解液、ライゲーション産物の抽出法、プラスミド濃縮法、濃度、などについて検討を行い、可及的に最適な方法を明らかにした。(図、Motoi KATO、CiRA 国際シンポジウム 2019、文献より引用)

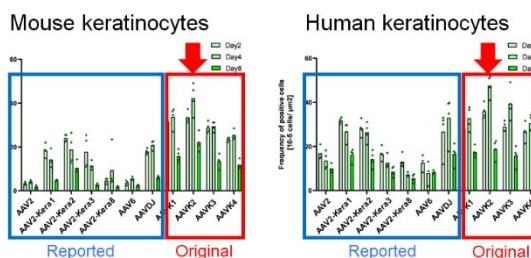


5) 皮膚潰瘍面の細胞に最適化された AAVDJ バリエーションカプシドの開発 (定方向進化法)

同法により作成したプラスミドを用いて AAVDJ バリエーションライブラリを作成し、マウス皮膚潰瘍面に対して定方向進化法を応用することによって、マウス皮膚潰瘍面の細胞に高い遺伝子導入効率を有する新規 AAV カプシドを開発した。(図、未発表、改変前(左)改変後(右)の AAVDJ による皮膚潰瘍面に対する GFP 遺伝子導入効率の差)

6) ケラチノサイト-表皮組織へ最適化された AAVDJ バリエーションの開発 (ハイブリッド法)

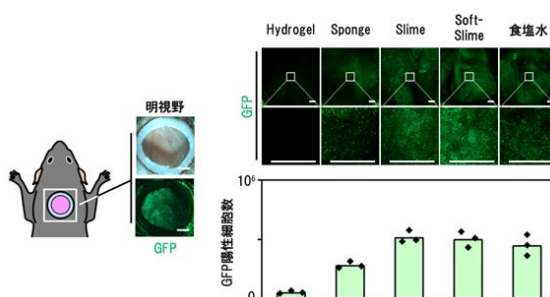
文献的に報告を認めた AAV の Heparin-binding region のペプチドバリエーションを、AAVDJ にクローニングしたハイブリッド AAVDJ バリエーションについて、マウスケラチノサイト、ヒトケラチノサイトにおける遺伝子導入効率の検討を行い、ハイブリッドカプシドが既存のカプシドよりも優れた遺伝子導入効率を有することを確認した。



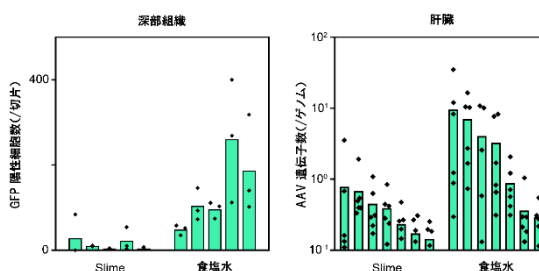
(図、Shen Qi、第 31 回日本形成外科学会基礎学術集会 2022 より)

7) AAV による遺伝子発現の部位特異性を向上させるためのキャリアの開発

皮膚潰瘍面浅層に対する遺伝子導入効率特異性向上を目的として、テトラポリエチレングリコール (tetra-PEG) キャリアを用いた新規 DDS 候補として、溶解性の異なる 3 種類の PEG キャリア PEG ハイドロゲル、PEG スポンジ、PEG スライム、を用意し、これを担体として GFPNLS を発現する AAV をマウス背部皮膚潰瘍面に投与したところ、スライムにおいては相対的に高い遺伝子発現効率が保たれていた。



皮膚浅層、深層における遺伝子発現を組織学的・定量的に調べたところ、スライムをキャリアとした場合には、深部組織における非特異的な遺伝子発現が減少していた。代表的な遠隔臓器である肝臓における AAV 遺伝子数をリアルタイム PCR を用いて定量したところ、肝臓におけるオフターゲットな AAV も減少していた。



これらによって、PEG スライムを担体とした遺伝子導入法が、遺伝子発現の局所特異性の向上に有用であることが明らかになった (図、文献 より改変引用)。

また、本研究でもちいた担体の材料となる tetra-PEG の皮下領域における代謝について解析を行い、tetra-PEG が分子量によって異なった代謝を受けることを明らかとした (文献)。

文献

栗田昌和*, 加藤基, 岡崎睦 細胞リプログラミングによる潰瘍面からの新規上皮化 高齢化社会における皮膚潰瘍治療のブレークスルーをめざして 医学のあゆみ 2020 年 274 巻 11 号 Page1071-1074.

Du Z, Shen Q, Mito D, Kato M, Okazaki M, Kurita M*. Optimized 3D-printed template design for production of silicone skin chambers. *J Dermatol Sci.* 2022;105(1):55-57.

Moriwaki Y, Shen Qi, Okada H, Du Z, Suga S, Kato M, Numahata T, Li K, Kanayama K, Okazaki M, Hirabayashi Y, Belmonte JCI, Hojo H, Kurita M*. In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin with hair *bioRxiv* 2023.03.05.531138; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.03.05.531138>

Kato M, Ishikawa S, Shen Q, Du Z, Katashima T, Naito M, Numahata T, Okazaki M, Sakai T*, Kurita M*. In situ-formable, dynamic crosslinked poly(ethylene glycol) carrier for localized adeno-associated virus infection and reduced off-target effects. *Commun Biol.* 2023;6(1):508.

Ishikawa S*, Kato M, Si J, Chenyu L, Kimura K, Katashima T, Naito M, Kurita M*, Sakai T*. Molecular Weight-Dependent Diffusion, Biodistribution, and Clearance Behavior of Tetra-Armed Poly(ethylene glycol) Subcutaneously Injected into the Back of Mice. *ACS Macro Lett.* 2023;12(4):510-517.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 栗田昌和、加藤基、岡崎睦	4. 巻 274
2. 論文標題 細胞リプログラミングによる潰瘍面からの新規上皮化 高齢化社会における皮膚潰瘍治療のブレークスルーを目指して	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1071-1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Du Z, Shen Q, Mito D, Kato M, Okazaki M, Kurita M.	4. 巻 105
2. 論文標題 Optimized 3D-printed template design for production of silicone skin chambers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.11.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato M, Ishikawa S, Shen Q, Du Z, Katashima T, Naito M, Numahata T, Okazaki M, Sakai T, Kurita M.	4. 巻 6
2. 論文標題 In situ-formable, dynamic crosslinked poly(ethylene glycol) carrier for localized adeno-associated virus infection and reduced off-target effects.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04851-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa S, Kato M, Si J, Chenyu L, Kimura K, Katashima T, Naito M, Kurita M, Sakai T	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular Weight-Dependent Diffusion, Biodistribution, and Clearance Behavior of Tetra-Armed Poly(ethylene glycol) Subcutaneously Injected into the Back of Mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 510-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmacrolett.3c00044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 森脇 裕太, 栗田 昌和, 岡崎 睦	4. 巻 284
2. 論文標題 生体内ダイレクトリプログラミングによる皮膚再生	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 879-883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Moriwaki Y, Kurita M, Hongo H, Okazaki M.	4. 巻 9
2. 論文標題 In Vitro Comparative Cytotoxicity Assessment of Sclerosants Used for Venous Malformations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plastic Reconstructive Surgery Global Open.	6. 最初と最後の頁 e3814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000003814.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤基、石川昇平、沼畑岳央、Shen Qi、Du Zening、片島拓弥、酒井崇匡、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 ポリエチレングリコールを担体とした、潰瘍面浅層への限局的なアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 新潟大学皮膚科特別セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による欠損組織再生法の開発
3. 学会等名 ムーンショット目標7キックオフシンポジウム「健康不安なく100歳まで」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和,
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗田昌和、加藤基、岡崎睦
2. 発表標題 組織胎児化による皮膚再生法の開発
3. 学会等名 第19回再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李可心、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 重層扁平上皮形成能を有する細胞への新規リプログラミング因子の同定
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田昌和、加藤基、沼畑岳央、岡崎睦
2. 発表標題 創傷治癒の促進を目的とした遺伝子治療法の開発
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 局所的な組織胎児化による皮膚潰瘍治療法の開発
3. 学会等名 美と健康のフロンティアサイエンスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 令和3年度 AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発交流会プレナリーセッション（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤基、石川昇平、片島拓弥、酒井崇匡、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 皮下投与された高分子化合物の分子量依存的な生体内分布解析
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shen Q, Du Z, 森脇裕太、栗田昌和、岡崎睦、鈴木啓一郎
2. 発表標題 表皮組織に最適化された新規AAVカプシドの開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森脇裕太、栗田昌和、岡崎睦
2. 発表標題 ヒト免疫組織化学染色によるマウス皮下組織内ヒト細胞検出法の最適化
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masakazu KURITA
2. 発表標題 In vivo reprogramming of wound-resident cells toward developing skin cells generates skin with skin appendages
3. 学会等名 ISID2023 Tokyo Satellite Symposium: International Symposium on Skin Stem Cell Dynamics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗田昌和
2. 発表標題 組織胎児化による複合的組織再生法の開発
3. 学会等名 第15回岡山創傷治癒研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 皮膚付属器誘導能を有する細胞、及びその製造方法	発明者 栗田昌和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/15867	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 皮膚付属器誘導能を有する細胞、及びその製造方法	発明者 栗田昌和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-085915	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルスベクターおよび付属器をもった皮膚組織を誘導する方法	発明者 栗田昌和、加藤基、 沈琪、平林祐介、菅 翔吾	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、米国出願番号：63/415320	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 0次放出スライム材料	発明者 片島拓弥、酒井崇 匡、栗田昌和、石川 昇平、鎌田宏幸、増	権利者 東京大学 ジェ リクル株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-169353	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
研究分担者	金山 幸司 (Kanayama Koji) (40612601)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	岡崎 睦 (Okazaki Mutsumi) (50311618)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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