

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21592242

研究課題名（和文） 35 型アデノウイルスベクターによる遺伝子治療の開発とその遺伝子発現制御

研究課題名（英文） The Establishment of Gene Therapy with and Gene Expression Regulation of Adenoviral Vector Serotype 35

研究代表者 森 圭介（MORI KEISUKE）
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：90251090

研究成果の概要（和文）：アデノウイルスベクター(Ad)は癌化のリスクがないため安全性が高く、また、導入効率が良いことから、FDA で認可された遺伝子治療の大半を占めている。この一方、免疫原性が高く遺伝子発現期間が短いなどの欠点もあることからその改良が検討されている。この目的から、Ad 血清型 5, 28, 35 の HI loop に RGD motif 挿入したもの(Ad+)としないもの(Ad-)を作成し、これらの新しいウイルスベクターの眼内での発現の特性を検討してきた。その結果、従来型の Ad5 に比べ、Ad35 の改変ベクターでは、網膜色素上皮細胞だけでなく、視細胞にも導入されること、遺伝子発現期間も 6 ヶ月までに及ぶことが明らかとなった。これらの事実は、アデノウイルスベクターの欠点を克服するものであり、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症などの、Life span での発現は帰って不利になる疾病に対する遺伝子導入には極めて有効な方法である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Adenoviral vectors (Ad) have several attractive properties, including high transduction efficiency, transduction of a wide spectrum of dividing and non-dividing cells and absence of random integration into the host genome. Two phase I clinical trials using adenoviral vector have successfully been conducted in 2005 and 2006, one in a pediatric population, and the other in an elderly population. However, since Ad serotype 5 is highly prevalent in the human population, many individuals have been exposed to Ad5 and subsequently, have generated a dose-dependent neutralizing antibody response. This antibody response to Ad5 is thought by many to contribute to a shorter duration of transgene expression, which is considered to be a disadvantage of adenoviral vector therapy. In this study we provided the evidence that Ad35 and Ad28 delivered subretinally gave prolonged gene expression as compared to conventional Ad5. These facts indicate the basis for the development of therapeutic protein agents that are applicable to the pathogenesis and treatment of ocular diseases such as age-related macular degeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は欧米の失明原因の第一位を占めており、本邦でも生活習慣の欧米化に伴い急増し、現在失明原因の第四位に位置する疾患である。AMD では脈絡膜新生血管を介して黄斑部網膜が破壊され、非可逆性の重度の視力低下に至る。糖尿病網膜症 (DMR) は糖尿病患者の増加に伴い増加している疾患で、多くの治療法が開発された現在でも本邦における失明原因の第二位に位置する疾患である。DMR での視力低下は、主に眼内血管新生と黄斑浮腫による網膜の非可逆性の破壊により起こる。双方とも、眼内血管新生を介する病理変化で失明に陥る疾患で、眼内血管新生病と総称されるが、その重篤性や罹患患者の多さから、眼内血管新生を征することは眼底疾患を征することと評されている。実際、眼内血管新生は 1990 年代より世界中の眼科・視覚領域の研究者の中心的トピックスのひとつとなっており、また、これら多くの研究者の研鑽により抗 VEGF 療法やレーザー治療の一種である光線力学療法 (PDT) などの新しい治療法が開発され、現在多くの患者に福音を与えつつある。

代表者らは、まだ PDT が腫瘍の治療のみ研究されていた 1990 年代前半に、PDT を用いた脈絡膜新生血管の治療に対する基礎研究、特に日本オリジナルの光感受性物質として当時研究開発中であった、NPe6 (現在の商品名 レザフィリン) について様々な手法を用い、その有効性を検討した (Mori K, et al. *Ophthalmology* 1999; *Retina* 2001)。その過程で、これら眼内血管新生病に対し、非侵襲的な方法で血管新生を分子レベルで制御することが次のステップとして重要であると認識し、1999 年より血管新生に対する遺伝子治療のための基礎実験を開始した。具体的には、抗腫

瘍血管新生作用をもつ *endostatin* 遺伝子を組み込んだ adenoviral vector を脈絡膜新生血管モデルのマウスに静脈投与し、*endostatin* が腫瘍新生血管だけでなく、眼内血管新生にも有効であることを証明した (Mori K, et al. *Am J Pathol* 2001)。また、pigment epithelium-derived factor (PEDF) を発現させる adenoviral vector および adeno-associated viral vector を眼内注入し、抗血管新生作用のあることを動物モデルで証明した (Mori K, et al. *J Cell Physiol* 2001)。その他、VEGF receptor である *flt-1*, *vasostatin* 及び *angiostatin* などの血管新生抑制因子についても同様に検討した (Mori K, et al. *IOVS* 2002)。これらのデータのうち、PEDF を発現する adenoviral vector が FDA に認められ、Phase IB trial まで完了した。さらに代表者らは、PEDF 発現 adenoviral vector の臨床応用を進展させるため、既存の抗血管新生療法であるレーザー光凝固や PDT と組み合わせた場合、遺伝子がどのように導入されるか検討した。その結果、

(1) 遺伝子は光凝固部と PDT 照射部に選択的に発現させることができる。

(2) 選択的に導入された遺伝子の発現期間は従来の 4-5 倍に延びる。

(3) 選択的遺伝子導入は、vector を一万倍希釈しても十分効果がある、などの結果を得た。

これらのレーザー治療と抗 VEGF 療法の組み合わせは実際に臨床で行われており、この組み合わせを検討することは臨床的に妥当と言える。このことから、抗 VEGF 療法として adenoviral vector を用いた場合、治療したい場所に遺伝子を選択的に導入可能となる、「laser-targeted gene delivery」という概念を提唱した (Anzai K, et al. *IOVS* 2005)。

2. 研究の目的

上述の臨床治験に用いられた adenoviral vector は serotype 5 (Ad5) のもので、組織毒性が比較的強いこと、遺伝子治療としては遺伝子の発現期間が1ヶ月程度と短いことなどが、欠点として指摘されている。これらのことから、我々は Ad5 の代わりに serotype 35 の adenoviral vector (Ad35) に着目した。Ad35 は Ad5 に比べ炎症を惹起することが少ないとされている。また、Ad5 の場合、血漿中に中和抗体を持つ人が 45%以上と多いが、Ad35 ではほとんどの人に中和抗体が見られないとされている。そのため、Ad35 に対する Host の免疫反応は、Ad5 に比べ弱いことが考えられ、このことから、遺伝子発現期間の延長が期待される。また、ウイルスの knob portion に cyclic RGD を付けることで、 $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin のレセプターに特異的に結合するようになる。この $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin は新生血管の成長に欠かせない物質であり、このレセプターに親和性を持つということは、新生血管組織に選択的に取り込まれる可能性が考えられる。これに加え、研究協力者の Wei 博士らは、CMV promoter を用いた場合、例えば投与後長時間が経過して、最初の蛋白産生が停止したとしても、白血病の治療薬として既に臨床で使用されている all trans retinoic acid (ATRA) を内服するだけで、再度蛋白の発現効果が得られることを発見した (McVey D, et al. Mol Ther 2008, in press)。以上の技術を応用することで、1) 炎症反応が少ない、2) 発現期間が延長する、3) $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin のレセプターの発現している新生血管組織に選択的に取り込まれる、4) ATRA 内服により自由に治療蛋白を眼内局所に発現することができる、など、5 型 adenoviral vector の欠点を克服した、新しい遺伝子治療体系を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

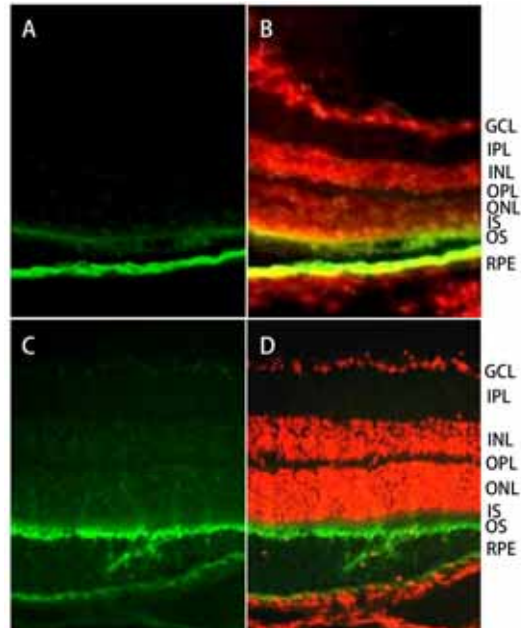
生後 6-8 週齢の C57BL/6 の硝子体腔と網膜下にベクターを注入する。硝子体腔には 1×10^9 vp/eye の濃度で、網膜下には 1×10^8 vp/eye の濃度で注入する。これらの濃度は、Ad5 の一連の実験の濃度を適応させている。ベクターは marker gene として、GFP 遺伝子を組み込んである、Ad5, Ad5 (HI-RGD), Ad35, Ad35 (HI-RGD), Ad28 を用いる。Promoter は、4), 5) 項で検討する反復発現のため、CMV promoter とする。注入後、1, 7, 28, 60, 90, 120, 180 日後に眼球摘出し、凍結切片で導入細胞とその程度を同定する。

同様な血清型と Genetic backbone を持つベクターに Luciferase 遺伝子を導入し、どのくらいの期間で発現が見られるか、投与後 1, 7, 14, 28, 90, 180 日に眼球摘出し、Luciferase の発現量を定量化する。

4. 研究成果

(1) 眼内における GFP 発現の局在

週齢 6-8 週の C57/BL6 マウスに、硝子体注入では 10^9 particles/ eye で、網膜下注入では 10^8 particles/ eye の量のベクターを投与した。硝子体注入では、Ad5-GFP, Ad5+GFP,



Ad35+GFP or Ad28-GFP それぞれの血清型で、角膜内皮細胞、線維柱帯細胞、虹彩上皮細胞に GFP の発現が見られた。Ad35-GFP では、線維柱帯細胞のみに GFP の遺伝子導入が観察された。すべての血清型で網膜への導入は見られなかった。また、すべての血清型の AdNull では GFP の発現は見られなかった。

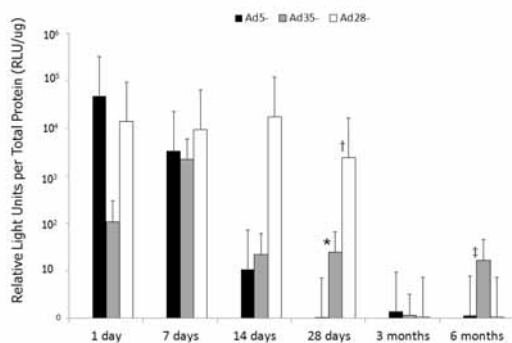
網膜下注入においては、Ad5-GFP では網膜色素上皮細胞 (RPE) への導入が強くみられ、また、視細胞への発現もあった。これに対し、Ad5+GFP においても RPE、視細胞双方に遺伝子導入が見られたが、視細胞への導入が優位にみられた(下図 A, B: Ad5-GFP, C, D: Ad5+GFP)。Ad35-GFP と Ad35+GFP に関しては、双方とも RPE および視細胞の同等に遺伝子導入された。Ad28-GFP は色素上皮細胞のみに導入された。また、すべての血清型の AdNull では GFP の発現は見られなかった。

(2) Luciferase Assay

週齢 6-8 週の C57/BL6 マウスに、硝子体注入では 10^9 particles/ eye で、網膜下注入では 10^8 particles/ eye の量のベクターを投与した。投与眼は注入後 1, 7, 14, 28, 90, 180 日で眼球摘出され、網膜下注入に関しては、二度の Run で Luciferase 活性は繰り返し測定された。一回目の Run では 83 眼、二回目では 64 眼について測定した。測定値を Normalize するため、全タンパク量を Bradford 法にて測定し、二度の測定間の差異を補正した。硝子

体注入における濃度にくらべ、網膜下注入の濃度は 1/10 であったが、その Luciferase 発現量は、同じ血清型間で比較すると、10-1000 倍に増加していた。

Ad5-Luc の発現量は投与後直後からスパイク状に増加し、すべてのベクターの中で投与後 7 日まで最も強かったが、その後は急激に減少した。これに比べ、Ad35-Luc は最も長期間発現は残存し、投与後 180 日でも一定レベルあった。Ad28-Luc は一ヶ月間は発現量が高い値で維持されていたが、その後は急激に減少し、3 ヶ月以降は発現は見られなかった。Ad5-Luc にくらべ、Ad35-Luc の発現は 28 日と 180 日で有意に高く(順に、 $p=0.0127, 0.033$)、Ad28-Luc は 28 日で有意に



高かった ($p=0.0127$, 下図)。

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 4 件)

1. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, Kueyama K, Okazaki Y, Inoue S, Awata T, Katayama S, Yoneya S. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 査読有, 2011;118:93-100.
2. Kabasawa S, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Inoue S, Awata T, Katayama S, Yoneya S. Associations of cigarette smoking but not of serum fatty acids with age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 査読有, 2011;118:1082-1088.
3. Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, Hosono N, Aoi T, Yasuda M, Oshima Y, Yoshida S, Enaida H, Tsuchihashi T, Mori K, Honda S, Negi A, Arakawa A, Kadonosono K, Kiyohara Y, Kamatani N,

Nakamura Y, Ishibashi T, Kubo M. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nat Genet* 査読有, 2011;43:1001-4.

4. Yamashiro K, Mori K, Nakata I, Tsuchihashi T, Horie-Inoue K, Nakanishi H, Tsujikawa A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Inoue S, Awata T, Yoneya S, Yoshimura N. Association of Elastin Gene Polymorphism to Age-related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 査読有, 2011;52:8780-4.

[学会発表](計 7 件)

1. 森圭介. 加齢黄斑変性に対する新しい考え方. AMD 学術講演会 in Saitama. 2012.3.18. 浦和ロイヤルパインズホテル. 浦和.
2. 森圭介. 加齢黄斑変性に対する新しい考え方. 第 6 回神奈川黄斑研究会. 2011 年 9 月 24 日、ホテルキャメロット ジャパン、横浜.
3. 森圭介. 加齢黄斑変性に対する新しい考え方. 第二回鹿児島 AMD 研究会. 2011 年 7 月 23 日、鹿児島サンロイヤルホテル、鹿児島.
4. Mori K. Genetics of diabetic retinopathy: Genes, expression and potential for gene therapy. Symposium, Genetic Epidemiology of Eye Disease. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011. Sydney, Australia, 03/22/2011.
5. 上山数弘、森圭介、尾股秀和、M. Hamilton、L. L. Wei、米谷新. アデノウイルスベクターの硝子体および網膜下注入後の遺伝子導入効率と眼内局在の比較. 第 114 回日本眼科学会総会. 名古屋国際会議場. 2010.4.17
6. Mori K. Distinguished Invited Lecture. Antiangiogenic protein delivery mediated by viral vectors. In BIT's Annual International Congress of Antibodies. March 24-26, 2010. Beijing, China.
7. K. Ueyama, K. Mori, M.M. Hamilton, H. Omata, P.L. Gehlbach, L.L. Wei, S. Yoneya. Comparison of Transduction Efficiency and Intraocular Localization of Reporter Genes After Intravitreal and Subretinal Injection of the Adenovirus

Vectors of Serotypes 5, 28, and 35 With
Fiber Modifications. Association for
Research in Vision and Ophthalmology
2010. 2010.5.6. Fort Lauderdale, FL, USA.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森 圭介 (MORI KEISUKE)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90251090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし