

氏 名	綿 野 亮 太
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 608 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	AAV ベクターを用いた遺伝子治療法における免疫反応の影響の解析とその制御
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 山 田 俊 幸 (委 員) 教 授 花 園 豊 講 師 長 嶋 茂 雄

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

現在、世界的に Adeno-associated virus (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療の研究が行われている。AAV ベクターは、非病原性ウイルス由来で安全性が高く、広範な細胞に遺伝子導入が可能で導入遺伝子が長期にわたり発現するといった利点があり、遺伝子治療に適している。肝臓を標的とした AAV ベクターを使用した遺伝子治療においては、複数の単一遺伝子変異疾患において臨床症状の改善が認められ、治療選択肢の一つとなりつつある。例えば、血友病では、肝臓を標的としてキャプシドを改変した AAV ベクターにヒト凝固因子遺伝子を搭載し、末梢静脈より導入することで高い治療効果と安全性が確認された。しかしながら、AAV キャプシドに対する中和抗体 (NAb) の存在は遺伝子導入の効果を阻害または著しく減退させることが知られ、解決策が望まれている。現在行われている多くの臨床試験では、NAb 陽性患者は除外されており、AAV ベクターを用いた遺伝子治療を受けられる対象者は NAb 陰性者に限られている。また、NAb 回避法も様々な方法が提案されているが、現実臨床応用が可能な方法は確立していない。本研究では、肝臓を標的として AAV ベクターを用いた遺伝子治療の前臨床試験における非げっ歯類の実験動物として、マイクロミニピッグの有用性を確認する。また、異なる NAb 力価をもつマイクロミニピッグに AAV ベクターを投与し、遺伝子発現と NAb 力価の関係を確認し、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値を選定する。加えて、新たな NAb 回避法を提案し、NAb 測定法の測定感度を向上させ、NAb 陽性患者への遺伝子治療適応拡大を目的とする。

### 2 研究方法

遺伝子導入を行う候補個体血清の事前スクリーニングにより、各 NAb 力価の個体を選定する。目的の NAb 力価を持つ個体に対して AAV8-Luc ベクターを末梢静脈投与する。その際、肝特異性を高めるため、human  $\alpha$ 1-antitrypsin (hAAT) プロモーターおよび hepatic control region (HCR) エンハンサー (HCRhAAT) を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に搭載した AAV8 ベクターを使用する。個体の臓器ごとに定量的 PCR 法、または IVIS を用いた導入遺伝子発現の確認を行い、遺伝子発現と NAb 力価の関係を確認し、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値を選定する。マイクロミニピッグの有用性の評価として、AAV8 キャプシドに対する NAb 陽性率や、ブタ血清中の

抗 AAV8 抗体 (IgG) 量を ELISA で試験し、NAb 力価との関係を分析する。新たな NAb 回避法としてリポソーム化 AAV ベクターの可能性を検討する。市販のリポソーム化試薬を AAV2 ベクターに加え、ヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞、ヒト肝癌細胞由来 Huh7 細胞、HepG2 細胞を用いて、リポソーム化 AAV ベクターの導入遺伝子発現や NAb 存在下での遺伝子発現の影響を確認する。新たな NAb 測定法の検討においては、細胞の代わりに AAV 結合性基質を用いることや、NAb 検出の際に PCR 法で検出する方法を検討する。

### 3 研究成果

1 頭のマイクロミニピッグにおいて  $1.0 \times 10^{13}$  vg/kg の AAV8 ベクターを末梢静脈投与した際、肝臓での強い遺伝子発現を確認した。NAb 力価の異なる 4 頭のマイクロミニピッグにおいて  $2.0 \times 10^{12}$  vg/kg の AAV8 ベクターを末梢静脈投与した際、NAb 陰性個体と NAb (14 x) の個体では肝臓での遺伝子の発現が見られたが、NAb (56 x) 陽性の個体では遺伝子発現が見られなかった。これらの個体の肝臓のベクターゲノムコピー数と遺伝子発現との間には相関関係が見られた。同じ施設で飼育された 48 頭のブタから血液を採取し、その NAb 力価を分析した結果、陽性率は全体で 62.5%であった。NAb 陰性および低力価 (14 x) 陽性個体の割合は、それぞれ 37.5%および 27.1%であり、本研究で導入遺伝子発現を確認した NAb 力価をもつ個体の割合が高かった。ブタ血清中の抗 AAV8 抗体 (IgG) 量と NAb 力価との間に相関性は示されなかった。AAV2 ベクターにリポソーム調製試薬を加えることにより、2V6.11 細胞においては有意に導入遺伝子発現が上昇したが、Huh7 細胞、HepG2 細胞において有意差は見られなかった。またリポソーム試薬を加えることによる NAb の影響の回避は 2V6.11 細胞、Huh7 細胞、HepG2 細胞とどの細胞を用いた場合でも見られなかった。

### 4 考察

肝臓を標的とした遺伝子治療動物モデルとしては、これまでマウス、イヌ、サルが用いられてきた。今回、遺伝子治療の前臨床試験における非げっ歯類の実験動物として、マイクロミニピッグにおける末梢静脈からの AAV8-LUC ベクターの導入により肝臓での遺伝子発現を確認した。この結果より、マイクロミニピッグは AAV ベクターを用いた肝臓を標的とした遺伝子治療実験におけるモデル動物となる可能性を示している。また、NAb 力価の異なる複数のマイクロミニピッグにおける導入遺伝子発現を確認した。実験結果より標準的なベクター用量 ( $2.0 \times 10^{12}$  vg/kg) では、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値は、最小陽性 (14x) 付近にあることが考えられる。他の動物種では NAb 弱陽性では遺伝子の発現がほとんど見られないため、マイクロミニピッグは他の動物種より遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値がわずかに高い可能性がある。また、マイクロミニピッグは NAb 弱陽性でも遺伝子発現が見られることから、マイクロミニピッグは肝臓を標的とする遺伝子治療における低力価 NAb の影響を評価するのに適したモデル動物である可能性がある。本研究で導入遺伝子発現を確認した NAb 力価をもつ個体の割合が高かったことも、利点としてあげられる。本研究結果から、ヒトにおいて NAb 陽性患者にベクターを投与する場合、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値より低い NAb 力価であれば、治療可能となり、これまで遺伝子治療対象から除外されていた NAb 陽性患者の中から投与可能な対象が広がる可能性があることを示した。AAV リポソーム化の検討において、AAV ベクターにリポソーム化試薬を加えて導入遺

伝子発現の確認を行ったが、NAb の影響を回避するには至らなかった。本研究の方法では完全に AAV ベクターをリポソーム化できていない可能性が高く、より最適なリポソーム化の方法を検討する必要があると考える。

## 5 結論

AAV8 ベクターの静脈内投与によりマイクロミニピッグの肝臓を標的とした遺伝子発現を確認し、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値レベルを示した。本研究結果から、ヒトにおいて NAb 陽性患者にベクターを投与する場合、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値より低い NAb 力価であれば、治療可能となり、これまで遺伝子治療対象から除外されていた NAb 陽性患者の中から投与可能な対象が広がる可能性があることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

Adeno-associated virus (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療において、遺伝子導入を妨げる因子に AAV に対する中和抗体 (NAb) の存在がある。実際、ヒトでは 3-4 割に NAb が陽性で、陽性または力価の高い患者は遺伝子治療の対象外となることが問題視されている。本研究では、この問題の解決を最終目的に見据え、いくつかの関連する検討が行われた。

まず、NAb の作用の閾値力価を明らかにするために不可欠である NAb 陽性動物を使用した前臨床試験において、実験動物としてヒトに近く実用的なマイクロミニピッグが応用できるか検討した。肝臓を標的とした遺伝子治療を想定し、高用量 ( $1.0 \times 10^{13}$  vg / kg) の AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターをマイクロミニピッグに静脈内注射した結果、肝特異的な遺伝子発現が IVIS により確認され、また、肝組織においては高いベクターゲノムコピー数が示された。次いで、標準用量 ( $2.0 \times 10^{12}$  vg / kg) の AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターを NAb 力価の異なる 4 頭の動物に投与した結果、NAb 陰性および最小陽性 (14x) 動物の肝臓で遺伝子発現が観察されたが、高力価 (56x) 動物では遺伝子発現は観察されなかった。肝臓のベクターゲノムコピー数と遺伝子発現との間には相関関係が見られた。以上のことは、本目的において、マイクロミニピッグが実験動物として応用可能なこと、NAb 陽性であっても低力価であれば遺伝子導入が成功する可能性を示した意義深いものである。

次に、NAb 作用回避の一策として AAV2 ベクターのリポソーム化の検討を行った。*in vitro* の感染実験では細胞への導入が確認されたが、NAb 存在下では十分な導入は観察されなかった。

また、NAb 力価を類推するための簡便な検査法として、Binding ELISA は不適切であることを示し、新たな抗体測定法を議論した。

提出された論文は、その大部分をなすマイクロミニピッグの応用については既に Gene Therapy にアクセプトされており、遺伝子治療という臨床面にもインパクトがあるもので、学位に十分値する内容であると評価された。ただし、軽微な修正として、1) マイクロミニピッグ肝臓におけるルシフェラーゼ発現の IVIS システムによる観察の限界を明示すること、2) 図表の表現や、結果の記載をわかり易くすること、が指示された。

## 最終試験の結果の要旨

提出された学位論文は、今後の遺伝子治療診療に有用な情報となる可能性がある。既に英文誌にアクセプトされている。プレゼンテーションも適切に行われ、審査委員の質問にも的確に回答した。以上、綿野氏は学位に値する学識を備えているものと判断され、審査委員の全員一致で合格と判定した。