

表 題 AAV ベクターによる呼吸器細胞への最適な遺伝子導入法の確立

論文の区分 博士課程

著 者 名 黒崎 史朗

担当指導教員氏名 萩原 弘一 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系  
循環器・呼吸器疾患学  
呼吸器内科学

2017年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. はじめに	1
2. 実験方法と材料	4
2.1 AAV ベクタープラスミドの作製	4
2.2 組み換え AAV ベクターの作製	5
2.3 細胞培養	6
2.4 呼吸器系由来細胞株に対する血清型別 AAV ベクターの 遺伝子導入効果のスクリーニング	7
2.5 ルシフェラーゼ発現 AAV ベクターによる細胞株への遺伝子導入と発現	8
2.6 呼吸器系由来細胞株に対するプロモーター別 AAV ベクターの 遺伝子導入効果の比較	8
2.7 動物実験	9
2.8 生体イメージング	10
2.9 組織中の AAV ベクターの分布と遺伝子発現の測定	10
2.10 組織学的検討	12
2.11 統計学的分析	14
3. 結果	15
3.1 呼吸器系由来細胞株に最適な AAV 血清型のスクリーニング	15
3.2 呼吸器系由来細胞株に対するプロモーターの効果	18
3.3 投与経路についての評価	20
3.4 マウスの肺に対する血清型別 AAV ベクターの遺伝子導入効果	21
3.5 マウスの肺に対するプロモーターの影響	24
3.6 肺組織および肝臓組織での AAV ベクターの生体分布	26
3.7 肺組織および肝臓組織の mRNA 発現解析	28
3.8 肺組織および肝臓組織のルシフェラーゼ量の測定	29
3.9 遺伝子導入された肺組織の評価	32
4. 考察	37
5. 終わりに	41
6. 引用文献	42
7. 謝辞	51

## 1. はじめに

嚢胞性肺線維症や特発性肺線維症などの慢性呼吸器疾患は、進行性で有効な治療法がない。現在これらの疾患に対する治療は、薬物を用いた対症療法や感染症などによる増悪の予防に限られている。予後は不良であり、嚢胞性肺線維症の平均生存期間は 39.3 年で [1]、特発性肺線維症は診断後の平均生存期間が 3 年から 5 年と言われている [2]。一方で、これらの疾患については関連遺伝子の同定など機構解明が進んでいる。嚢胞性肺線維症では ATP 依存性クロライドイオンチャンネル分子をコードしている *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子の異常が[3]、特発性肺線維症では粘液タンパク質をコードする *MUC5B* 遺伝子の発現調節領域の関与が知られている[4]。このような背景を踏まえ、遺伝子治療はこれらの病態を引き起こす細胞機能を修復し、病勢を改善する根治療法として、遺伝子治療法の開発への期待が高まっている。そこで、私は呼吸器細胞に治療遺伝子を導入するために、非病原性ウイルス由来で安全性が高く、長期に渡って遺伝子発現ができ、広範な組織特異性をもつアデノ随伴性ウイルス (AAV) ベクターに注目した[5, 6]。これまでに、AAV ベクターを用いた遺伝子治療の応用では、血友病 B[7]やパーキンソン病[8, 9]、先天性黒内障[10, 11]の臨床試験が行われ、有効性が認められている。一方、呼吸器領域では嚢胞性肺線維症に対して多くの臨床試験が行われてきたが、気道上

皮において一過性かつ低レベルの遺伝子発現が確認されたのみで、治療効果は認められなかった [12-14]。その理由として、これまでの嚢胞性肺線維症に対する遺伝子治療研究におけるいくつかの問題点が指摘されている。第一に、広く用いられてきた血清型すなわち AAV2 型では呼吸器系の細胞に対する遺伝子導入効率が低い可能性があった。また、これまでに用いられた治療ベクターのプロモーター活性が非常に弱く、遺伝子が導入されたとしてもその発現が十分でなかったと考えられる。さらにベクターの投与がネブライザーによるものであったため、下気道や肺へ十分到達していなかった可能性が高い。

その後 AAV については多くの血清型が報告され、血清型によって組織特異性が異なることが知られている。たとえば、脳への遺伝子導入では AAV2 型が[8, 9]、肝臓に対しては AAV8 型[7]が優れている。呼吸器細胞については、従来広く用いられてきた AAV2 型よりも AAV1 型、AAV5 型、AAV6 型、AAV9 型が優れているという報告もあるが、詳細には検討されていない[15-18]。呼吸器細胞におけるプロモーター活性については、cytomegalovirus (CMV) プロモーター[19]、Rous sarcoma virus プロモーター[20]、CMV エンハンサーにニワトリの  $\beta$  アクチンプロモーターを組み合わせた CAG プロモーター[15, 21]などが強い活性を有し、これらの使用によって導入遺伝子の発現が高まるとも報告されている。投与経路については、呼吸器上皮細胞における極性とベクターの相性についても

考慮に入れなければならないことがわかってきた。すなわち、管腔側（apical）と側基底膜側（basolateral）からの遺伝子導入で効果が異なるため[22-24]、ベクターによって投与経路を使い分けることも検討する必要がある。

そこで本研究では、AAV ベクターによる呼吸器細胞への遺伝子導入に関与する因子を解明し、細胞株およびマウスを用いて最適な遺伝子導入法を確立することを目的として実験を行った。

## 2. 実験材料と方法

### 2.1 AAV ベクタープラスミドの作製

動物を用いた実験に入る前の *in vitro* スクリーニングのために、大腸菌由来の  $\beta$  ガラクトシダーゼを発現する *LacZ* 遺伝子を搭載したプラスミドを構築した (図 1)。プロモーター活性を比較するためには、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Luc*) を搭載したプラスミドを作製した。pGL3-Control Vector プラスミド (Promega, Madison, WI, USA) から *Luc* 遺伝子断片を切り出し、pAAV-MCS プラスミド (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) のマルチクローニングサイトに挿入し、これを pCMV-Luc とした。これと比較するため、pCMV-Luc の CMV プロモーターを pCAGGS[25]由来の CAG プロモーターに置き換えて pCAG-Luc を作製した (図 1)。組織学的検討を行う実験に用いるためには、ヒト化ウミシイタケ由来の緑色蛍光タンパク質 (hrGFP) 遺伝子を搭載したプラスミドを構築した。pAAV-hrGFP プラスミド (Agilent Technologies) の CMV プロモーターを CAG プロモーターに置き換えて pCAG-hrGFP を作製した (図 1)。

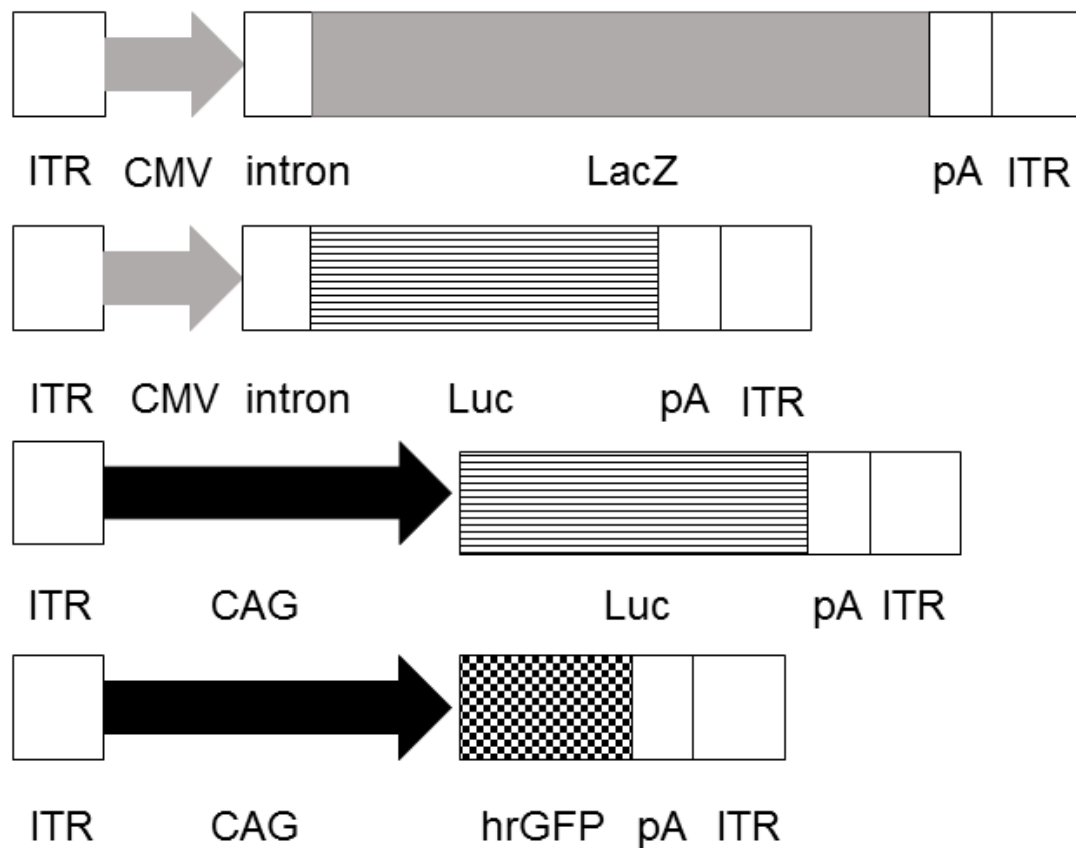


図1 各プラスミドベクターの構造図

ITR: inverted terminal repeat、CMV: cytomegalovirus promoter、

pA: polyadenylation sequence、Luc: firefly luciferase、

CAG: chicken  $\beta$ -actin promoter with the CMV immediate-early enhancer、

hrGFP: humanized *Renilla reniformis* green fluorescent protein

## 2.2 組み換え AAV ベクターの作製

組換え AAV ベクターの作製は小倉らの方法[26]によった。2.1 で作製したベク

タープラスミドとウイルスタンパク質 (Rep, Cap) をコードするパッケージングプラスミド、アデノウイルス由来の E2A、E4、VA を含むヘルパープラスミド (pHelper; Agilent Technologies) をリン酸カルシウム共沈法でヒト胎児腎細胞 293 (HEK293; Agilent Technologies) にトランスフェクションした。72 時間培養後、HEK293 細胞を回収して 4 回凍結・融解を繰り返すことにより組み換え AAV ベクターを含む粗抽出液を得た。これを 2 度の塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、AAV ベクターのウイルス力価は Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて測定した。作製した組み換え AAV ベクターは AAV-CMV-LacZ (1 型から 9 型までの血清型[27-32])、AAV-CAG-Luc (1 型、2 型、6 型、9 型)、AAV-CMV-Luc (6 型)、AAV-CAG-hrGFP (6 型) である。

## 2.3 細胞培養

ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B)、マウス肺胞上皮細胞 (MLE12)、マウス肺胞マクロファージ (MH-S)、ヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5) は American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) より購入した。正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) は Lonza (Walkersville, MD, USA) より購入した。BEAS-2B および NHBE は無血清の気管支上皮細胞培地 (BEGM; Lonza) に BEGM 添加因子セット (Lonza) を加えて培養した。MLE12 は 10% の非働化牛胎仔血清 (FBS;



Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 及び 1% のペニシリン/ストレプトマイシン (Pen Strep; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies) 培地で培養した。MH-S は 10% の FBS、1% の Pen Strep に 0.05 mM 2-mercaptoethanol を加えた RPMI1640 培地 (Life Technologies) で培養した。MRC-5 は 10% の FBS、1% の Pen Strep を加えた Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; ATCC) 培地で培養した。HEK293 は 10% の FBS、1% の Pen Strep を加えた DMEM/F-12 medium (Life Technologies) 培地で培養を行った。全ての細胞は 37°C、5% 二酸化炭素下で培養を行った。

#### 2.4 呼吸器系由来細胞株に対する血清型別 AAV ベクターの遺伝子導入効果のスクリーニング

BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE をそれぞれ 96 穴プレートに 1 穴あたり  $2 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$  個ずつ撒き、24 時間後に *LacZ* 遺伝子を搭載した AAV1 型から AAV9 型までの 9 種類の AAV ベクター (AAV1-9-CMV-LacZ) をそれぞれ 1 細胞あたり  $3 \times 10^5$  viral genome (vg) ずつ感染させた (ただし、MH-S は 1 細胞あたり  $1 \times 10^6$  vg にして感染させた)。72 時間後に (MH-S は 48 時間後)、 $\beta$ -Gal Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定した。総蛋白は Protein

Assay CBB Solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて Bradford 法にて測定し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を蛋白質質量で補正した。さらに、72 時間後の細胞量を Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、 $10^4$ 個細胞あたりの  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性量を求めた。本実験は 3 回繰り返し、同様の結果を確認した。

## 2.5 ルシフェラーゼ発現 AAV ベクターによる細胞株への遺伝子導入と発現

HEK293 と BEAS-2B をそれぞれ 96 穴プレートに 1 穴あたり  $2 \times 10^4$  個ずつ撒き、24 時間後に AAV-CAG-Luc (1 型、2 型、6 型、9 型) をそれぞれ 1 細胞あたり  $3 \times 10^5$  vg ずつ感染させた。48 時間後に発光強度を Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) で測定した。本実験は 3 回繰り返し、同様の結果を確認した。

## 2.6 呼吸器系由来細胞株におけるプロモーターの発現効率の比較

呼吸器系由来細胞株に対するプロモーター別 AAV ベクターの遺伝子発現効率を比較するため、5 種類の細胞 (BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE) をそれぞれ 96 穴プレートに 1 穴あたり  $2 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$  個ずつ撒き、24 時間後に AAV6-CAG-Luc と AAV6-CMV-Luc をそれぞれ  $3 \times 10^5$  vg ずつ

つ感染させた（ただし、MH-S は 1 細胞あたり  $1 \times 10^6$  vg にして感染させた）。48 時間後に発光強度を上述と同様に測定した。2.4 と同様に、総蛋白を Bradford 法にて測定し、発光強度を蛋白質量で補正した。本実験を 3 回繰り返し、結果の信頼性を確認した。

## 2.7 動物実験

8～12 週齢の C57BL/6J マウス（Japan SLC, Shizuoka, Japan）を実験に供した。動物実験は全て自治医科大学動物実験ガイドラインに従って施行した。投与経路による AAV ベクターの遺伝子導入効率を比較するため、AAV6-CAG-Luc をマウスにそれぞれ静脈内投与（1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg/150 $\mu$ L）、鼻腔内投与（1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg/50 $\mu$ L）、気管内投与（1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg/50 $\mu$ L）で行った。マウスにおける血清型やプロモーターの違いによる AAV ベクターの遺伝子導入効果を評価するため、AAV-CAG-Luc（1 型、2 型、6 型、9 型）、AAV-CMV-Luc（6 型）を気管内投与（1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg/50 $\mu$ L）で行った。対照となるマウスは AAV ベクターの代わりに HN バッファー（50 mmol l<sup>-1</sup> 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4, 150 mmol l<sup>-1</sup> NaCl）を投与した。

## 2.8 生体イメージング

マウスの腹腔内に 100mg/mL D-ルシフェリン溶液 (Ieda Chemical, Tokyo, Japan) をマウス 1 個体あたり 75 mg/kg の量で投与し、生体イメージング装置 (IVIS100; Xenogen, Hopkinton, MA, USA) でルシフェラーゼ由来の発光を測定した。胸部の発光量を解析ソフト Living Image software (Xenogen, Alameda, CA, USA) で計測した。

## 2.9 組織中の AAV ベクターの分布と遺伝子発現の測定

マウスに AAV-CAG-Luc (1 型、2 型、6 型、9 型) および AAV6-CMV-Luc の投与を行い、2 ヶ月後に屠殺して肺と肝臓を摘出し、組織中の導入遺伝子のコピー数と遺伝子発現 (mRNA, ルシフェラーゼ活性) を測定した。DNA は NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて抽出し、Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて quantitative PCR (qPCR) 法によりルシフェラーゼ遺伝子 (*Luc*) のコピー数を測定し、マウスゲノムハプロイドあたり 1 コピー存在する mouse ribosomal protein large P1 (*Rplp1*) 遺伝子で補正した。qPCR は抽出した DNA 300 ng をテンプレートとして QuantiTectSYBRGreen PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて測定した。使用した *Luc* プライマー配列およびマウス *Rplp1* プライマーの配列を以下に示す。

*Luc* forward: 5'- GAAAAAGTTGCGCGGAGGAG-3'

*Luc* reverse: 5'- CCGCCCTTCTTGGCCTTTAT-3'

*Rplp1* forward: 5'- TACGATTTCACACCAGCCTTG-3'

*Rplp1* reverse: 5'- CTCATTCTCAAGCCATGGACCGT-3'

mRNA の測定は、全 RNA を RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

これを鋳型として逆転写酵素 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser;

Takara Bio) を用いて相補的 DNA (cDNA) を作製した。定量的 qPCR は SYBR

Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus; Takara Bio) と Thermal Cycler Dice Real Time

System II (Takara Bio) を用いて説明書に沿って行った。目的の mRNA は *Luc* で

あり、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) の発現量を内在

性コントロールとして使用した。*Luc* の発現量はマウス *GAPDH* の発現量で補正

した蛍光シグナル値との比で算出した。使用した *Luc* およびマウス *GAPDH* のプ

ライマー配列を以下に示す。

*Luc* forward: 5'- CTATGAAGAGATACGCCCTG-3'

*Luc* reverse:- 5'- TTCGAAGTACTCAGCGTAAG-3'

*GAPDH* forward: 5'- GTTCCAGTATGACTCCACTC-3'

*GAPDH* reverse: 5'- CCTCACCCCATTTGATGTTA-3'

ルシフェラーゼ活性は PicaGene Luminescence Kit (Toyo Ink, Tokyo, Japan) を用いて測定した。摘出した臓器の 100mg を 300-500 $\mu$ L の滅菌水で破碎し、10,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離を行い、上清を抽出した。上清と同量の溶解バッファー (Toyo Ink) を入れ、時々ボルテックスを行いながら、15 分間室温で反応させた。その後、混合溶液から 96 穴プレートに 1 穴あたり 100 $\mu$ L を一対ずつ入れた。発光基質 (Toyo Ink) を 100 $\mu$ L 入れ、Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) で発光強度を測定した。ルシフェラーゼ発現量を求めるために、同時にスタンダード酵素 (Toyo Ink) を 10 pg、100 pg、1 ng、10 ng の 4 点を測定し、検量線を引いて測定した。なお、本酵素量は上清の総蛋白を Bradford 法にて測定し、蛋白質量で補正した。

## 2.10 組織学的検討

AAV ベクターの肺への遺伝子導入を組織学的に評価するため、AAV6-CAG-hrGFP をマウスの気管内に投与した (1 個体あたり  $1 \times 10^{11}$  vg/50  $\mu$ L)。AAV6-CAG-hrGFP の気管内投与を行った 1 ヶ月後に屠殺して肺を摘出した。肺

組織は気管より 4% パラホルムアルデヒド溶液 1mL を注入し、翌日まで 4°C で固定した。その後、氷晶を防止する目的で 30% sucrose in 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.4) に置換し、同様に翌日まで 4°C の条件で静置した。そして、凍結組織切片作製用包埋剤 (Tissue-Tek O.C.T Compound; Sakura Finetek, Tokyo, Japan) で肺を包埋し、クライオスタットで厚さ 10μm の凍結切片を作製した。

肺細胞の評価は気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、間葉系細胞について行った。気管支上皮細胞の hrGFP シグナルは蛍光顕微鏡 (BX63; Olympus, Tokyo, Japan) で直接観察を行った。肺胞上皮細胞の免疫組織化学染色 (免疫染色) はマウスモノクローナル抗体の抗サイトケラチン抗体 (AE1/AE3, ab27988; Abcam, Cambridge, MA, USA) を一次抗体に、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (M.O.M. Immunodetection Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を二次抗体に用いて Rhodamine Avidin D (Vector Laboratories) で蛍光染色を行った。肺胞マクロファージの免疫染色はラットモノクローナル抗体である抗 F4/80 抗体 (ab6640; Abcam) を一次抗体に、Alexa Fluor 568 標識抗ラットヤギポリクローナル抗体 (ab175710; Abcam) を二次抗体として行った。間葉系細胞の免疫染色はウサギポリクローナル抗体である抗  $\alpha$ -平滑筋 ( $\alpha$ -SMA) 抗体 (ab5694; Abcam) を一次抗体に、Alexa Fluor 568 標識抗ウサギヤギポリクローナル抗体 (ab175471; Abcam) を二次抗体として行った。核は核染色用試薬 4',6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI) を含む封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories) で封入した。それぞれの免疫染色について、一次抗体を用いない二次抗体のみを使用した陰性対照では非特異的シグナルは認められなかった。これらの免疫染色の観察も蛍光顕微鏡 (BX63; Olympus) で観察を行った。結果は 1 個体あたり 3 切片を無作為に抽出した複数視野で観察し、200 倍の倍率で数えた。その後、形態学的に評価するために Hematoxyline-Eosin (HE) 染色し、脱水・透徹・封入を行い、光学顕微鏡 (BX63; Olympus) で観察した。

## 2.11 統計学的分析

データ解析は StatMate V (ATMS, Tokyo, Japan) と SPSS (IBM Japan, Tokyo, Japan) を用いて行い、平均値 $\pm$ 標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で記した。独立 2 群間の比較には Welch の  $t$  検定を用い、多群間比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、事後比較には Tukey または Games-Howell 法を用いた。 $P$  値が 0.05 未満を有意差ありと判断した。



### 3. 結果

#### 3.1 呼吸器系由来細胞株に最適な AAV 血清型のスクリーニング

AAV には様々な血清型があり、血清型によって組織特異性が異なることが知られているが、気道や肺に最適な血清型は明らかにされてはいなかった。そこで、呼吸器細胞に適した血清型を探索するために、 $\beta$  ガラクトシダーゼをコードする *LacZ* を搭載した代表的な AAV の血清型 1 型から 9 型のベクター (AAV1-9-CMV-LacZ) を呼吸器系由来細胞株の 5 種類の細胞 (BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE) に遺伝子導入した。図 2 に示す通り、全ての呼吸器系由来細胞株において 6 型の遺伝子導入効率が最も高く、他の血清型による発現は低かった。また、細胞あたりの発現量に換算しても同様に AAV6 型の遺伝子導入が最も優れていた (図 3)。

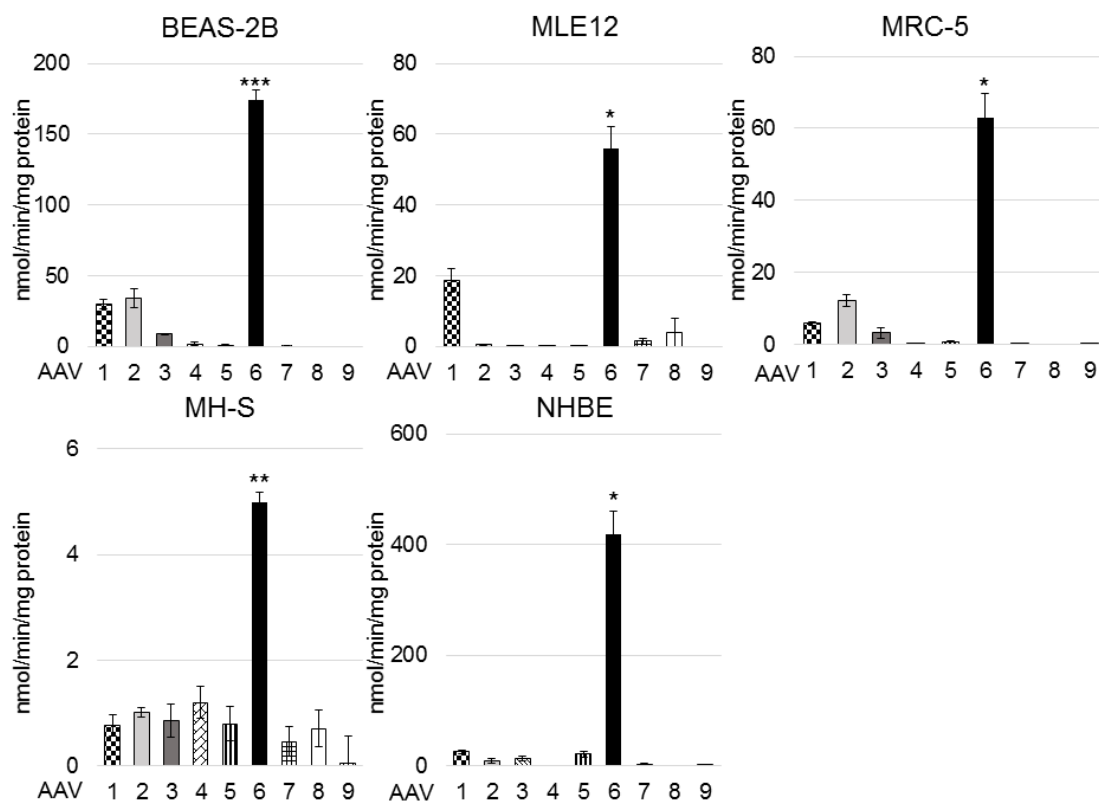


図2 呼吸器系由来細胞株に対する血清型別 AAV ベクターの遺伝子導入効果

AAV1-9-CMV-LacZ を BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE にそれぞれ感染させ（1 細胞あたり  $3 \times 10^5$  vg、MH-S は  $1 \times 10^6$  vg）、72 時間後（MH-S は 48 時間後）の  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性量（各  $n=4$ ）を測定した。結果は平均値  $\pm$  標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示し、 $P < 0.01$  は\*\*、 $P < 0.001$  は\*\*\*で示した。

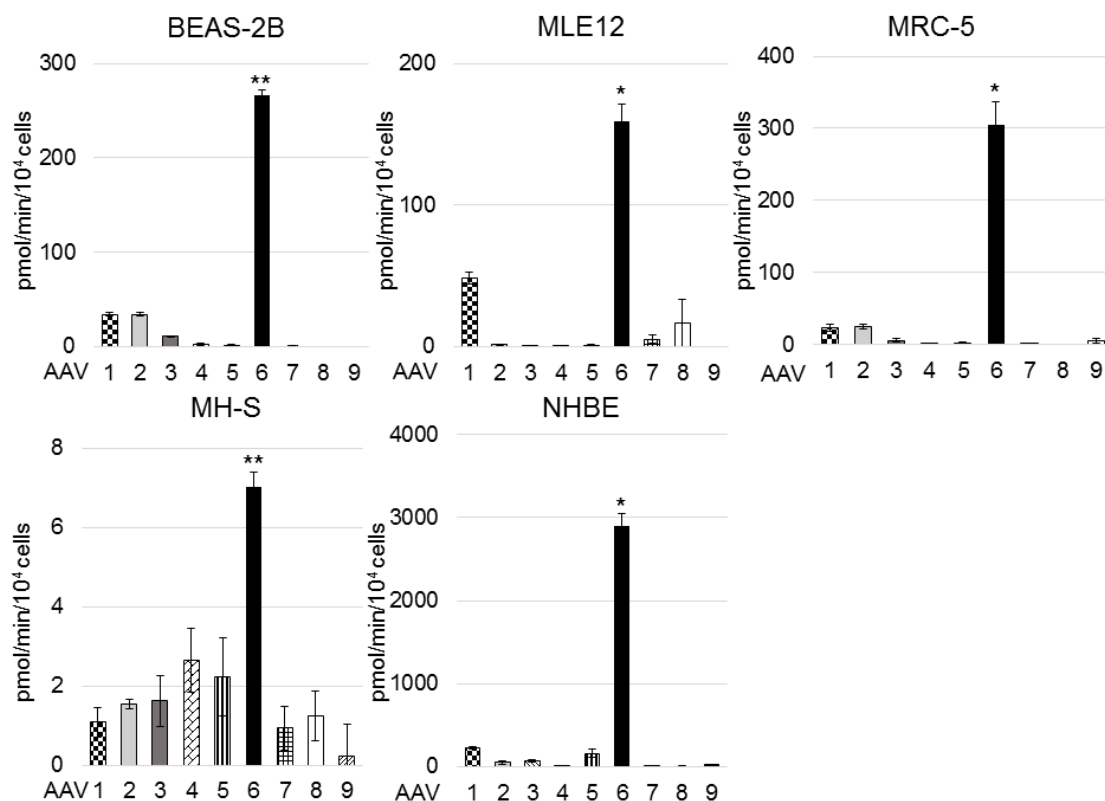


図3 呼吸器系由来細胞株に対する血清型別 AAV ベクターの遺伝子導入効果を細胞数で補正したもの

AAV1-9-CMV-LacZ を BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE にそれぞれ感染させ（1 細胞あたり  $3 \times 10^5$  vg、MH-S は  $1 \times 10^6$  vg）、72 時間後（MH-S は 48 時間後）の  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性量を測定した。一方で 72 時間後（MH-S は 48 時間後）の細胞数をカウントし、 $10^4$  細胞あたりの  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性量を示した（n=4）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示し、 $P < 0.01$  は\*\*で示した。

### 3.2 呼吸器系由来細胞株に対するプロモーターの効果

次いで、呼吸器系由来細胞株についてプロモーターによる影響を比較した。

3.1 の結果から、呼吸器系由来細胞株には AAV6 型が優れていることが分かったため、CMV プロモーターと CAG プロモーターを有する AAV6 型のベクターをそれぞれ作製し（AAV6-CMV-Luc と AAV6-CAG-Luc）、3.1 と同様に 5 種類の細胞株（BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE）にそれぞれ感染させた。5 種類の細胞株全てで CAG プロモーターが CMV プロモーターよりも遺伝子発現を強く認めることが分かった（図 4）。

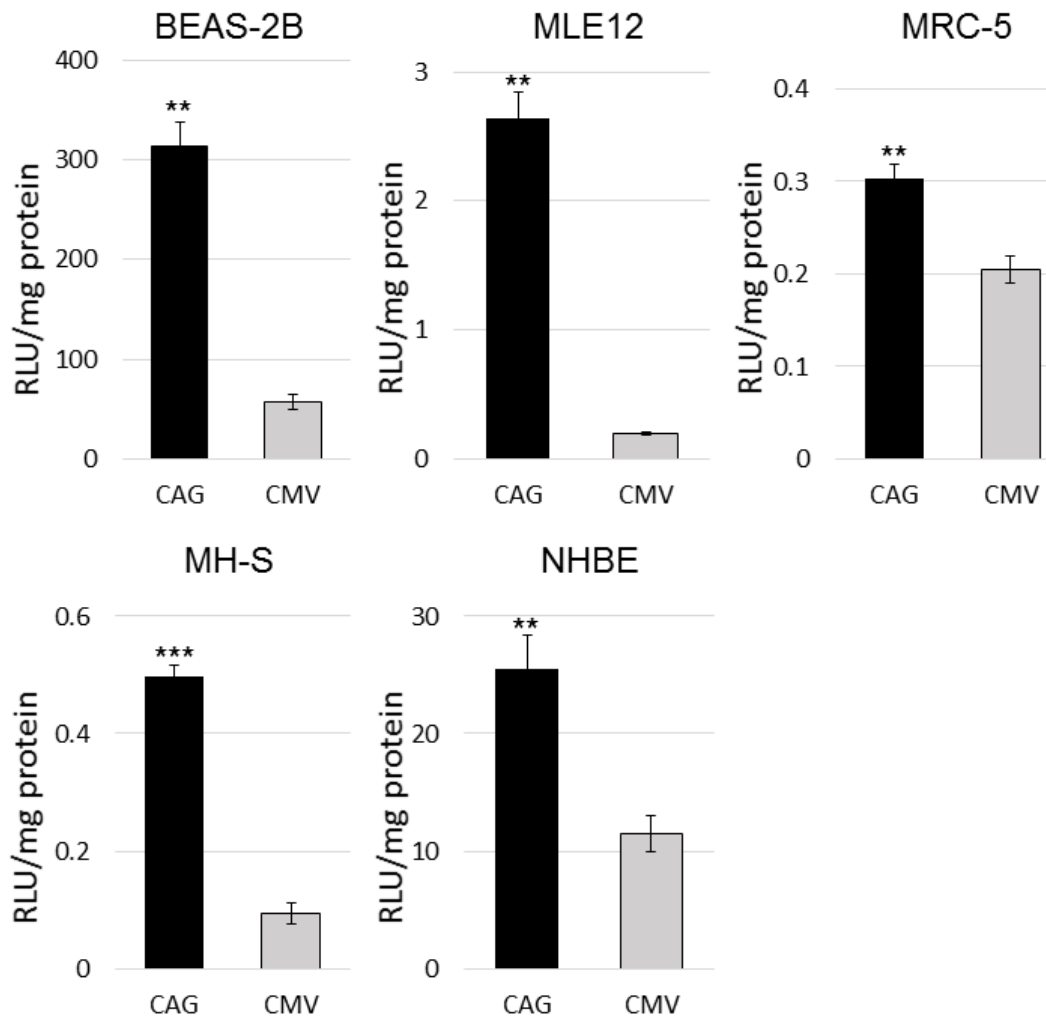


図4 呼吸器系由来細胞株に対する CMV プロモーターと CAG プロモーターの比較

AAV6-CMV-Luc または AAV-CAG-Luc を BEAS-2B、MLE12、MRC-5、MH-S、NHBE にそれぞれ感染させ（1 細胞あたり  $3 \times 10^5$  vg、MH-S は  $1 \times 10^6$  vg）、48 時間後の発光強度を測定し、蛋白質質量で補正した（ $n=4$ ）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。 $P < 0.01$  であるものを\*\*で示し、 $P < 0.001$  は\*\*\*で示した。

3.1 および 3.2 の結果から、次のマウスを用いた実験では AAV6 型および CAG プロモーターを有する AAV ベクターを用いて行った。

### 3.3 投与経路についての評価

投与経路の違いによる肺への遺伝子導入効果を評価するため、AAV6-CAG-Luc をマウスに静脈内投与、鼻腔内投与、気管内投与を行って比較した。遺伝子発現を定量的に評価するために生体イメージング装置（IVIS 100）を使用した。

AAV6-CAG-Luc の投与 1 ヶ月後には遺伝子発現を明瞭に確認することができた

（図 5）。静脈内投与では肝臓に発現が限局し、鼻腔内投与では鼻腔に発現が限局しており、肺での発現は殆ど認められなかった。一方で、気管内投与で行った場合は、肺に高い遺伝子発現を認め、気管内投与が肺への遺伝子導入に最適な投与経路であると分かった。

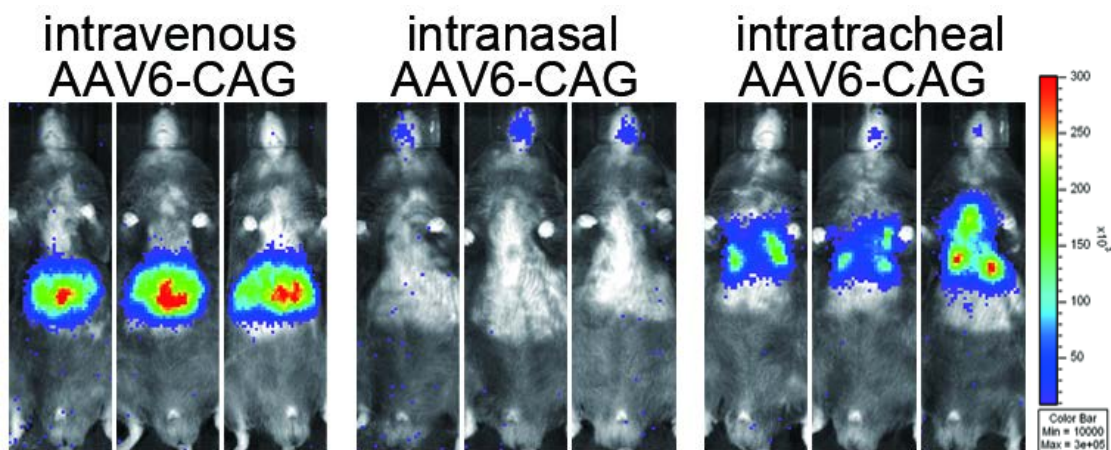


図5 投与経路による比較

AAV6-CAG-Luc をマウスに 3 つの投与経路で投与して 1 ヶ月後に生体イメージング装置で評価を行った（1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）。測定は各  $n=4-6$  で図はその一部を示す。

### 3.4 マウスの肺に対する血清型別 AAV ベクターの遺伝子導入効果

3.3 より AAV6 型を用いた場合は肺への遺伝子導入に気管内投与が最適であると分かったが、これまでに広く用いられてきた AAV2 型と肺への遺伝子導入に適していると報告されてきた AAV1 型および AAV9 型についても気管内投与を行って検討した。AAV1, 2, 9-CAG-Luc を作製し、マウスに投与する前に HEK293、BEAS-2B に遺伝子導入を行って発現を行う AAV ベクターであることを確認した（図 6）。AAV9 型のベクターは細胞株では弱い発現しか認めなかったが、AAV1 型および AAV2 型のベクターは発現を確認できた。

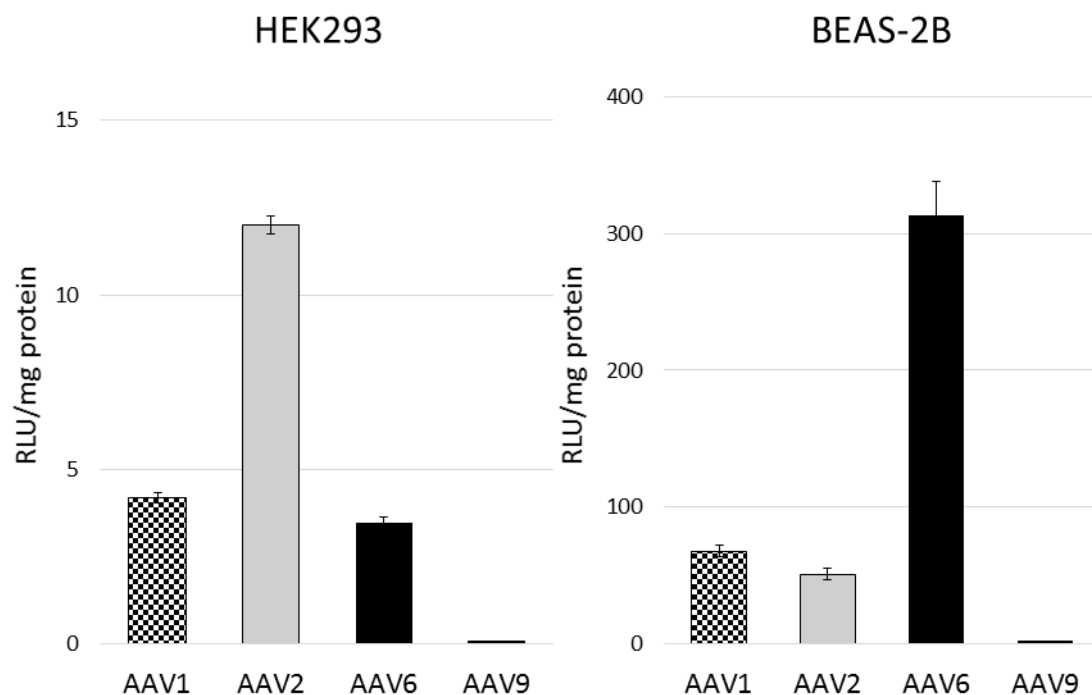


図 6 血清型別 AAV ベクターの細胞株での遺伝子発現

AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc を HEK293 または BEAS-2B にそれぞれ感染させ、48 時間後の発光強度を測定し、蛋白質量で補正した (n=4)。結果は平均値±標準誤差 (SEM) で示した。

これらのベクター (AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc) をマウスの気管内に投与した。マウスでの遺伝子発現は生体イメージングで評価した (図 7a)。AAV1 型は肺でわずかに発現を認めたが、AAV2 型では発現を認めなかった。AAV9 型は肝臓で中程度の発現を認めたが、肺では弱い発現しか認めなかった。また、生体イメージング装置および解析ソフトで胸部の発光強度を測定し、経時的に評価した (図 7b)。発光強度のピークは AAV ベクターの投与 1 ヶ月後から 2 ヶ月後であり、



以降は徐々に低下していった。AAV6 型では少なくとも 6 ヶ月間は比較的高い遺伝子発現が保たれ、マウスにおける血清型の比較においても AAV6 型が肺での遺伝子導入に最も優れていることが分かった。

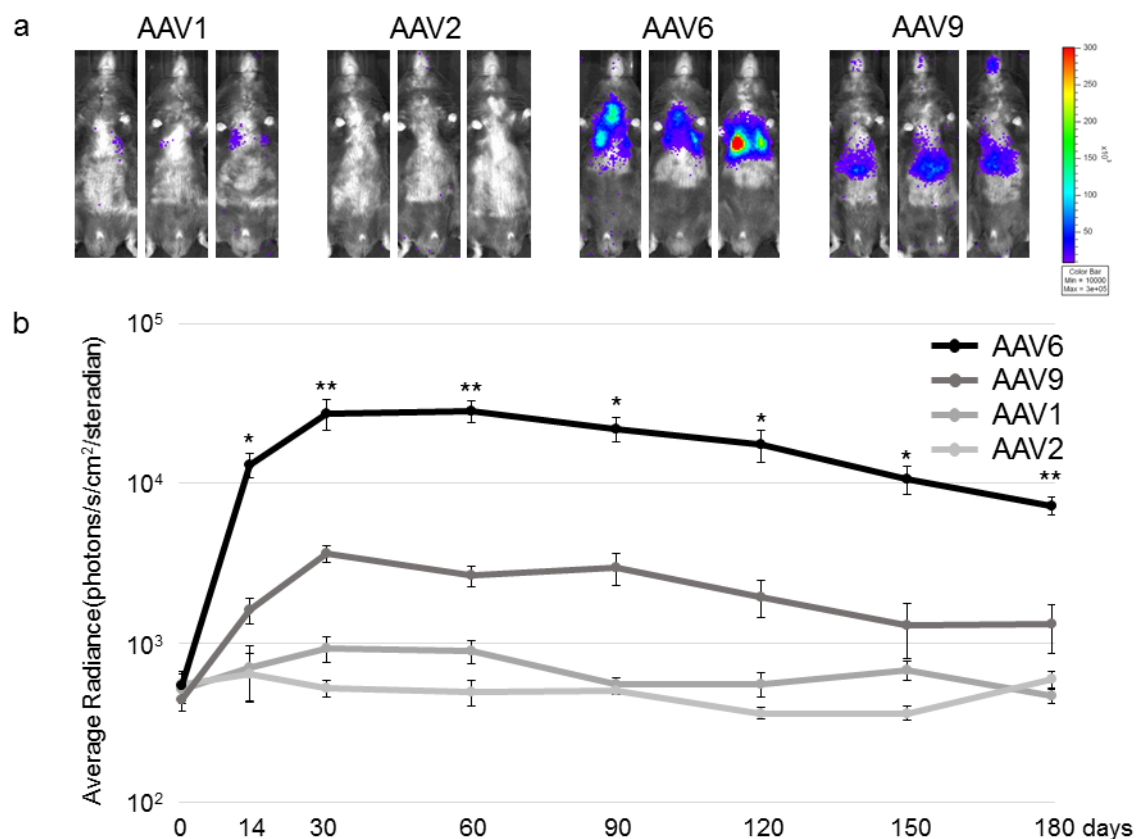


図7 血清型別 AAV ベクターによるマウスでの遺伝子発現

AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc をマウスの気管内に投与した（それぞれ 1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）。

(a) AAV ベクターの投与 1 ヶ月後に生体イメージング装置で評価し、図はその一部を示す。

(b) 胸部での発光強度を定量化し、経時的に表した（AAV1, 2, 9-CAG-Luc: 各

n=4、AAV6-CAG-Luc: n = 6)。結果は平均値±標準誤差 (SEM) で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示し、 $P < 0.01$  は\*\*で示した。

### 3.5 マウスの肺に対するプロモーターの影響

マウスの肺についても遺伝子発現がプロモーターによる影響を受けるか評価するため、AAV6-CMV-Luc を作製し、マウスに気管内投与して AAV6-CAG-Luc を投与したマウスと比較した。生体イメージング装置で評価したところ、細胞株の実験結果と同様に CAG プロモーターの方が CMV プロモーターより強い遺伝子発現を認めた (図 8a)。生体イメージング装置および解析ソフトで胸部の発光強度を定量し経時的に評価したところ、CAG プロモーターは 12 ヶ月に渡って CMV プロモーターより高い発現を保ち、統計学的にも優位差が確認された。CAG プロモーターの発現は頑健で、12 ヶ月後でもベースラインよりも 6.7 倍高い発現を認めていた。一方、CMV プロモーターは 8 ヶ月後にはベースラインに戻っていた (図 8b)

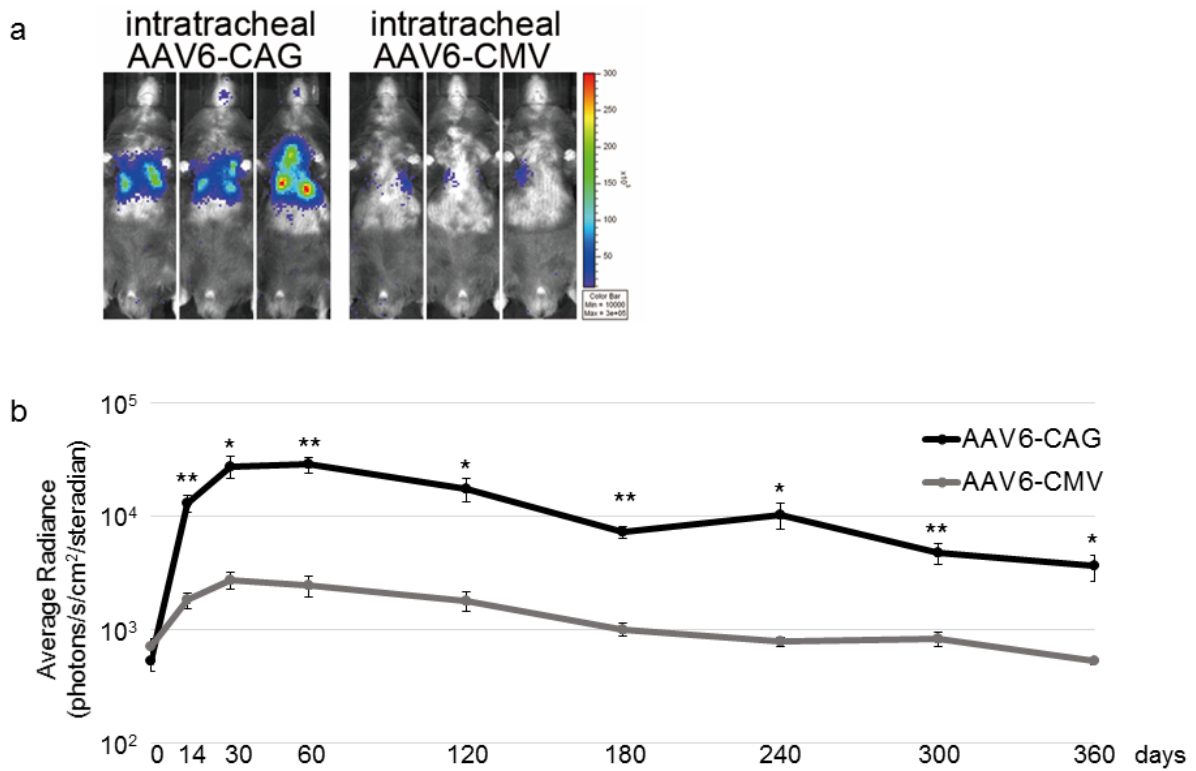


図8 マウスの肺に対する CMV プロモーターと CAG プロモーターの比較

マウスに AAV6-CAG（または CMV）-Luc を気管内投与で行った（それぞれ 1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）。

(a) AAV ベクターの投与 1 ヶ月後に生体イメージング装置で評価し、図はその一部を示す。

(b) 胸部での発光強度を定量化し、経時的に表した（AAV6-CAG-Luc: n=6、AAV6-CMV-Luc: n = 6）。結果は平均値±標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示し、 $P < 0.01$  は\*\*で示した。

### 3.6 肺組織および肝臓組織での AAV ベクターの生体分布

マウスに投与した AAV ベクターの生体分布について調べるために、遺伝子発現のピークにあたる投与 2 ヶ月後に肺と肝臓を摘出した。肺組織と肝臓組織から DNA を抽出し、qPCR で導入遺伝子のコピー数を求めた。肺組織における導入遺伝子のコピー数は、気管内投与した様々な AAV ベクター (AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc) で比較すると、AAV6 型は AAV1 型、AAV2 型、AAV9 型と比較して最も多く認めた (図 9a)。また、AAV6 型ではプロモーターによる差はなかった (図 9a)。投与経路で比較すると、静脈内投与と鼻腔内投与では肺組織中の導入遺伝子のコピー数は非常に少なく、これらの投与経路では肺に到達する AAV ベクターの量は少ないことを示唆した (図 9b)。なお、肝臓での導入遺伝子のコピー数は血清型によっても、投与経路によるもので評価しても、検出されなかった (データ省略)。

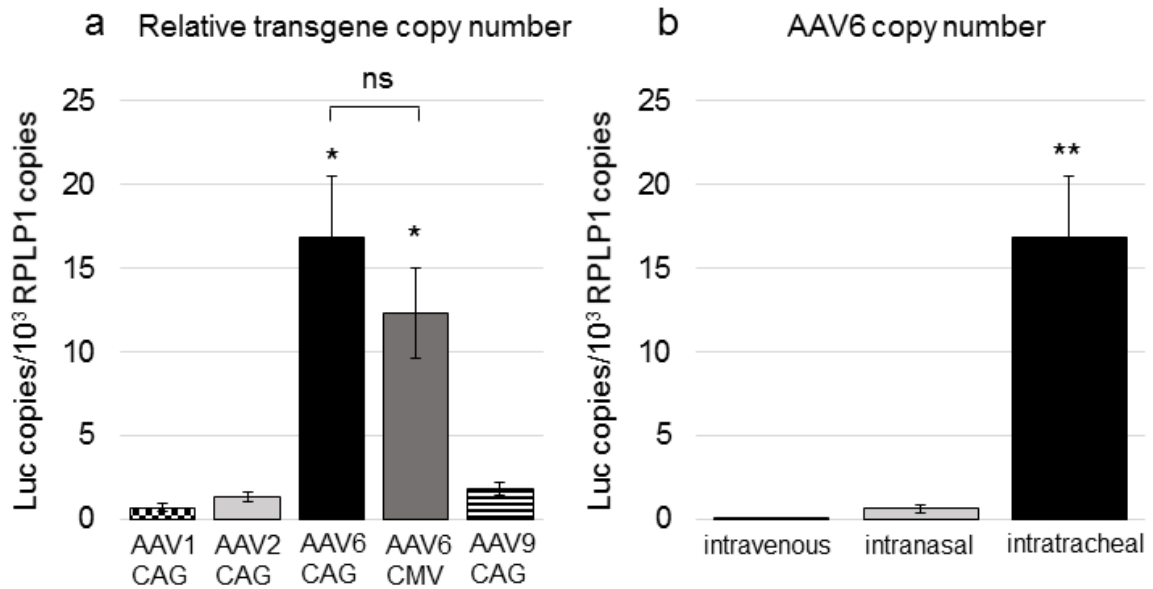


図9 マウス肺組織中の導入遺伝子のコピー数

(a) マウスに AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc の気管内投与を行い（それぞれ1個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）、投与2ヶ月後に肺組織を摘出し、DNAを抽出した。ゲノムDNA 300ngあたりの *Luc* 遺伝子のコピー数を qPCR 法にて測定し、マウス *Rplp1* 遺伝子で補正した。（AAV1, 2, 9-CAG-Luc: 各  $n = 4$ 、AAV6-CAG-Luc:  $n = 7$ 、AAV6-CMV-Luc:  $n = 7$ ）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示した。ns は統計学的に有意差がないことを示した。

(b) マウスに AAV6-CAG-Luc を静脈内投与、鼻腔内投与、気管内投与を行い（それぞれ1個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）、投与2ヶ月後に肺組織を摘出し、DNAを抽出した。ゲノムDNA 300ngあたりの *Luc* 遺伝子のコピー数を qPCR 法にて測定し、マウス *Rplp1* 遺伝子で補正した。（intravenous:  $n = 4$ 、intranasal:  $n = 4$ 、intratracheal:

n = 7)。結果は平均値±標準誤差 (SEM) で示した。P < 0.01 であるものを\*\*で示した。

### 3.7 肺組織および肝臓組織の mRNA 発現解析

肺組織および肝臓組織から RNA を抽出して、mRNA の発現解析を行った。気管内投与を行った様々な AAV ベクター (AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc) について肺組織での発現を比較すると、AAV6-CAG-Luc が最も強かった (図 10)。プロモーターの比較では、CAG プロモーター (AAV6-CAG-Luc) は CMV プロモーター (AAV6-CMV-Luc) の 7 倍強い遺伝子発現を認めた (図 10)。3.6 の結果ではプロモーターの違いによって遺伝子導入効率自体に違いはなかった (導入遺伝子のコピー数に差はなかった) ことから、CAG プロモーターは肺組織で強い転写能力をもつことが示された。また、静脈内投与や鼻腔内投与後の導入遺伝子のコピー数が非常に少なかったことから予想されたように、肺組織中で導入遺伝子の mRNA は検出されなかった (データ省略)。なお、肝臓では、どの血清型をどの経路で投与した場合でも、導入遺伝子の mRNA は検出されなかった (データ省略)。

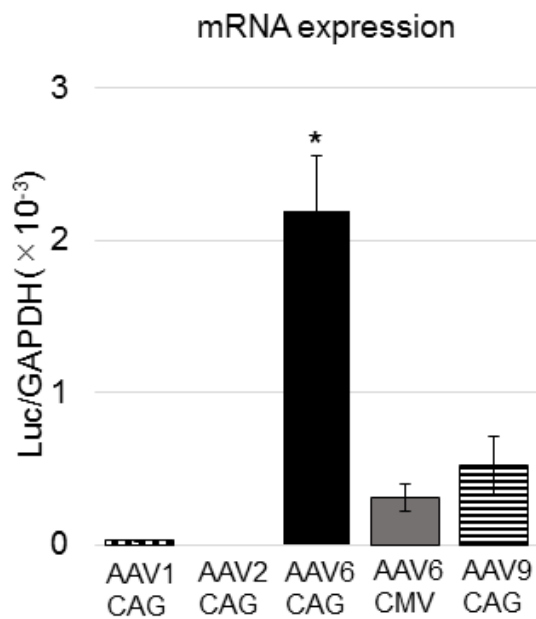


図 10 マウス肺組織中の mRNA 発現量

マウスに AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc の気管内投与を行い（それぞれ 1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）、投与 2 ヶ月後に肺組織を摘出し、全 RNA を抽出した。mRNA 発現量は Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法にて Luc の mRNA 発現量を求めた。GAPDH mRNA を内在性コントロールに使用し、 $\Delta\Delta C_t$  法で計測した（AAV1, 2, 9-CAG-Luc: 各  $n=4$ 、AAV6-CAG-Luc:  $n=7$ 、AAV6-CMV-Luc:  $n=7$ ）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.05$  であるものを\*で示した。

### 3.8 肺組織および肝臓組織のルシフェラーゼ発現量の測定

肺組織および肝臓組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。肺組織では、気

管内投与した様々な AAV ベクター（AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc）で比較すると、mRNA の解析結果に一致して AAV6-CAG-Luc が最も多い酵素量を示した（図 11a）。プロモーターで比較すると、CAG プロモーター（AAV6-CAG-Luc）は CMV プロモーター（AAV6-CMV-Luc）の 14.4 倍多い酵素量を示した（図 11a）。静脈内投与や鼻腔内投与による肺組織中の酵素活性は mRNA 解析の結果と同様に検出されなかった（データ省略）。肝臓組織のルシフェラーゼの発現については AAV6-CAG-Luc の静脈内投与と AAV9-CAG-Luc の気管内投与の場合にて非常に弱い酵素活性を認めたが、他の条件では検出されなかった（図 11b）。ルシフェラーゼ発現については、生体イメージングによる遺伝子発現（図 5、図 7）は酵素活性を反映しているのに対し、図 11 は酵素蛋白量を表している。そのため、両者の間に必ずしも比例関係が成り立つとは限らない。さらに、肝臓では全体の蛋白量が多いため、補正によりルシフェラーゼ発現量が過小評価されている可能性もある。この点も含め、AAV6-CAG-Luc の静脈内投与と AAV9-CAG-Luc の気管内投与後の体内動態については今後の検討課題である。



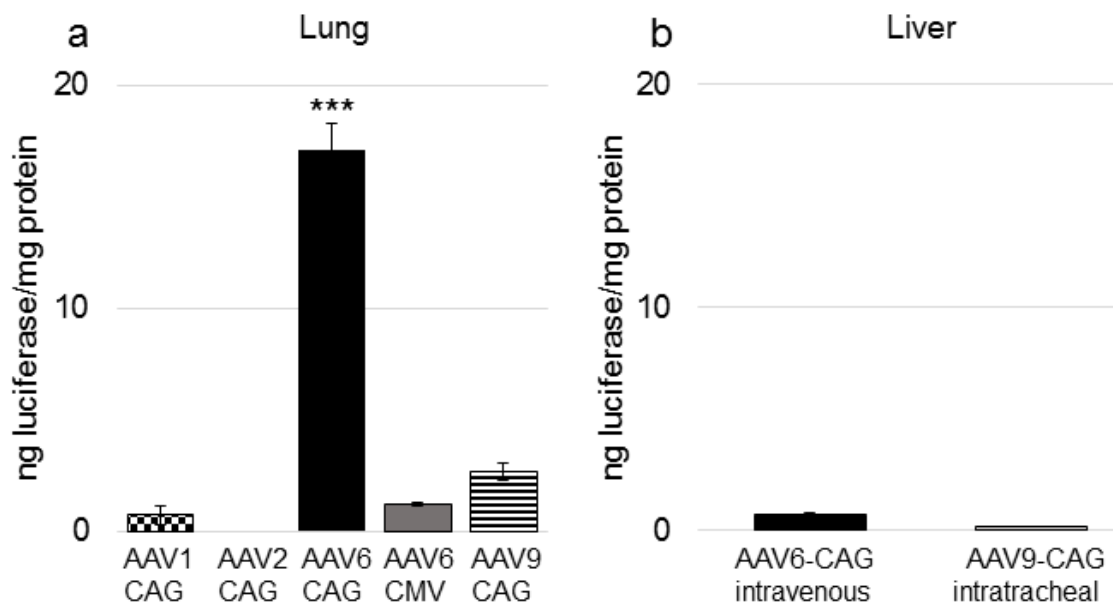


図 11 マウス肺組織および肝臓組織のルシフェラーゼ発現量

(a) マウスに AAV1, 2, 6, 9-CAG-Luc および AAV6-CMV-Luc の気管内投与を行い（それぞれ 1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）、投与 2 ヶ月後に肺組織を摘出し、ルシフェラーゼ発現量を測定し、蛋白質量で補正した（AAV1, 2, 9-CAG-Luc: 各  $n=4$ 、AAV6-CAG-Luc:  $n=7$ 、AAV6-CMV-Luc:  $n=7$ ）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。 $P < 0.001$  を\*\*\*で示した。

(b) マウスに AAV6-CAG-Luc の静脈内投与、AAV9-CAG-Luc の気管内投与を行ったもので（それぞれ 1 個体あたり  $1 \times 10^9$  vg）、投与 2 ヶ月後の肝臓組織のルシフェラーゼ発現量を示す（AAV6-CAG-Luc:  $n=4$ 、AAV9-CAG-Luc:  $n=4$ ）。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。

### 3.9 遺伝子導入された肺組織の評価

上記の結果から、肺への遺伝子導入には AAV6-CAG ベクターの気管内投与が最適であることが明らかになった。そこで、AAV6-CAG ベクターが肺のどの細胞に遺伝子導入しているかを評価するため、AAV6-CAG-hrGFP をマウスに気管内投与で遺伝子導入を行った。AAV ベクターの投与 1 ヶ月後に屠殺して肺の凍結切片を作製し、免疫染色などを行って蛍光顕微鏡で評価した（図 12a-d）。肺全体で評価すると、遺伝子導入された細胞は 14.5% あった（図 12e）。蛍光顕微鏡で直接 hrGFP シグナルを観察すると、気管支上皮細胞の hrGFP 陽性割合は 12.8% であった（図 12a, f）。サイトケラチン、F4/80、 $\alpha$ -SMA の抗体を用いて免疫染色を行うと、サイトケラチン陽性の肺胞上皮細胞に hrGFP シグナルを伴う割合は 6.3%（図 12b, f）、F4/80 陽性マクロファージに hrGFP シグナルを伴う割合は 1.5%（図 12c, f）と非常に少なく、これに対し、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞に hrGFP シグナルを伴う割合は 67.3%（図 12d, f）と非常に高かった。HE 染色による形態学的評価を行ったところ、炎症所見はなく、hrGFP 陽性の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は肺胞中隔の毛細血管周囲に殆ど存在し（図 13）、AAV6-CAG ベクターは周皮細胞を主に遺伝子導入することが明らかになった。

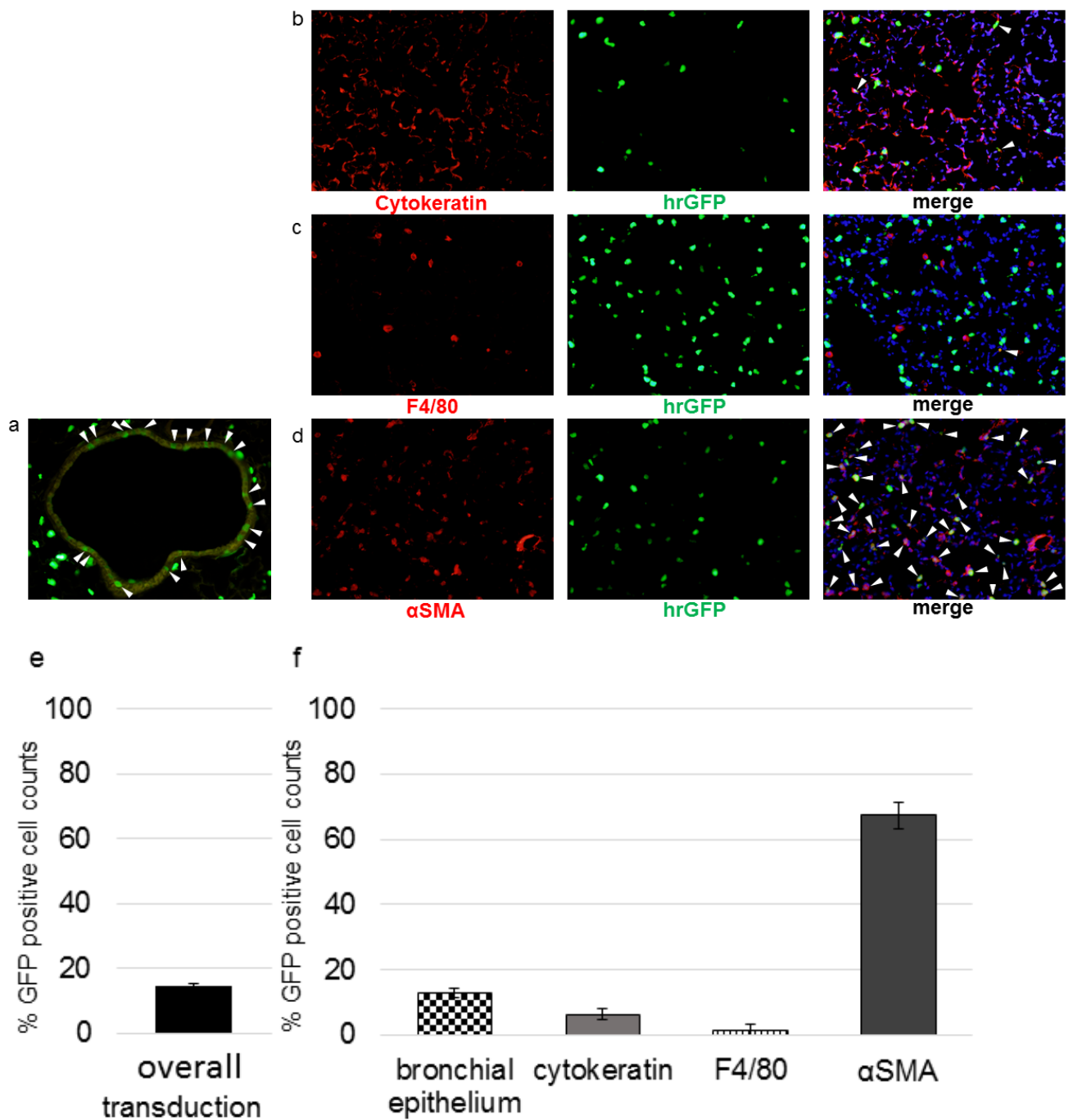


図 12 AAV ベクターにより遺伝子導入された肺組織の評価

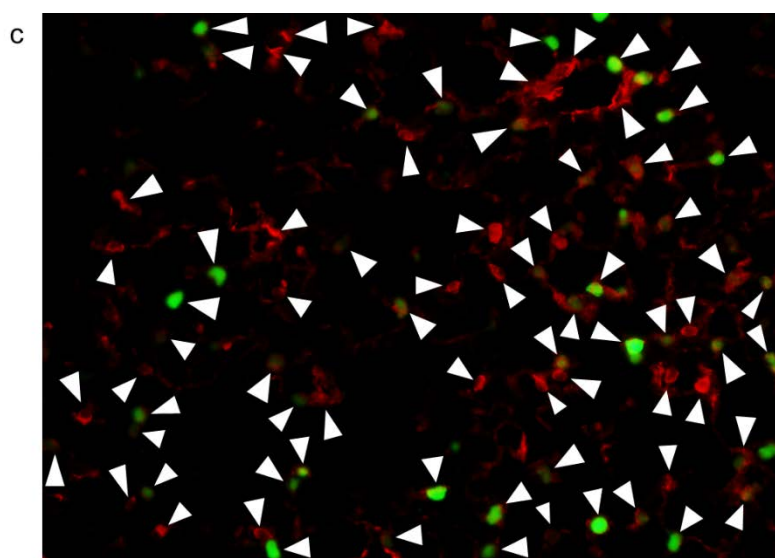
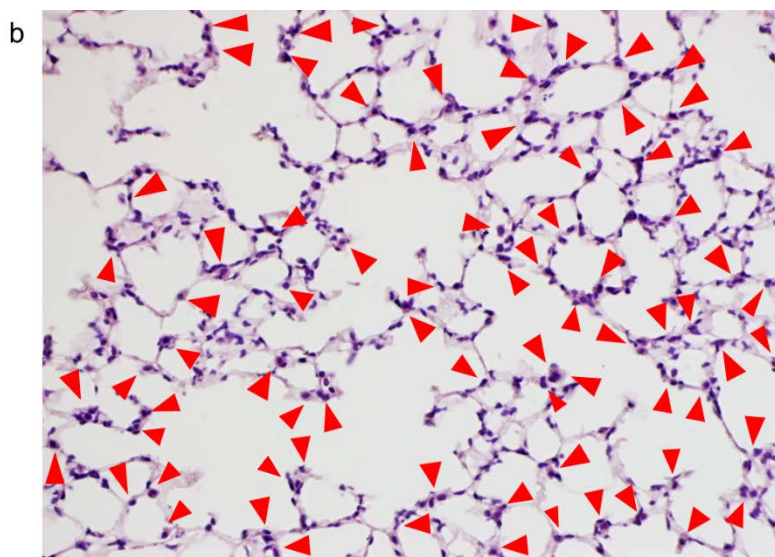
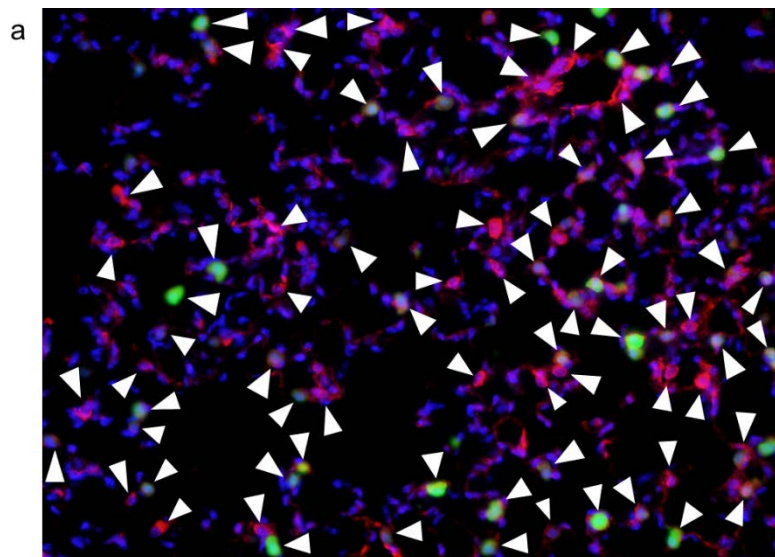
マウスに AAV6-CAG-hrGFP の気管内投与を行い（1 個体あたり  $1 \times 10^{11}$  vg）、投与 1 ヶ月後に肺の凍結切片を作製した（n=4）。1 個体あたり 3 切片を評価し、図はその一部を示す。

(a) 気管支上皮細胞を蛍光顕微鏡で直接観察した。

(b-d) 免疫染色を行った。(b) 抗サイトケラチン抗体、(c) 抗 F4/80 抗体、(d) 抗  $\alpha$ -SMA 抗体。

矢尻は遺伝子導入された細胞を示す。

(e) 肺組織全体の hrGFP 陽性細胞の割合を示す。(f) 気管支上皮細胞および各免疫染色陽性細胞に対する hrGFP 陽性細胞の割合を定量した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。



### 図 13 $\alpha$ -SMA 陽性細胞の評価

マウスに AAV6-CAG-hrGFP の気管内投与を行い（1 個体あたり  $1 \times 10^{11}$  vg）、投与 1 ヶ月後に肺の凍結切片を作製し（ $n = 4$ ）、抗  $\alpha$ -SMA 抗体による免疫染色ならびに HE 染色を行った。図は同一切片のもので、代表的な組織像を示す。

（a, c）蛍光顕微鏡での観察像。

（b）HE 染色を行い、光学顕微鏡で観察を行った。

矢尻は  $\alpha$ -SMA 陽性細胞を示す。

#### 4. 考察

私は、本研究において AAV ベクターによる呼吸器細胞への最適な遺伝子導入法を確立した。呼吸器細胞への遺伝子導入に最も期待できる AAV ベクターは AAV6 と CAG プロモーターの組み合わせであり、投与方法としては気管内投与法が呼吸器細胞への遺伝子導入に最も優れていた。さらに、AAV6-CAG ベクターの気管内投与はマウスの肺で長期にかつ高い発現を維持し、組織学的には周皮細胞を主に遺伝子導入することが明らかになった。

これまでも、呼吸器細胞への遺伝子導入は AAV1 型、AAV5 型、AAV6 型、AAV9 型が効果的であると言われてきた[15-18]。私は呼吸器細胞の遺伝子導入に最も有効な血清型を探索するために、呼吸器系由来細胞株やマウス実験により代表的な AAV の血清型を用いて評価した。呼吸器系由来細胞株を用いた実験では、AAV6 型の遺伝子導入効果が最も優れていた。マウスを用いた実験でも、*Luc* 遺伝子を搭載した数種類の AAV ベクターをマウスに気管内投与して生体イメージングで評価したところ、AAV6 型が肺の遺伝子導入に最も優れていた。AAV6 型が肺への遺伝子導入において優れている機序については、明らかにされていない部分が多い。AAV6 型は細胞表面の N 結合型糖鎖である  $\alpha$ -2, 3 結合または  $\alpha$ -2, 6 結合シアル酸、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンを経由して遺伝子導入の際に利用されているとされている[33, 34]。これらのシアル酸は呼吸器上皮細胞の管腔

側 (apical) に多く存在し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンも側基底膜側 (basolateral) に多く存在する。このように、レセプター分子が呼吸器上皮細胞に多く発現しているため、AAV6 型は呼吸器細胞に親和性が高いと推測される。また、遺伝子導入後の発現はプロモーター活性の強さに影響される[15, 19-21]。CAG プロモーターは動物実験で長期の遺伝子発現を導く強い活性をもつプロモーターの一つであるが[15]、本研究のマウス肺においても長期かつ強い遺伝子発現を認めた。CAG プロモーターは比較的サイズが大きく (約 1.7kb)、パッケージできる遺伝子サイズが限られる AAV ベクター (～4.5kb) には使用しづらいという問題点はあるが、機能ドメインを残して治療用遺伝子を切り詰めるなど、工夫の余地はある。例えば、*CFTR* のようにサイズの大きな遺伝子を短くした cDNA を合成する方法が試みられ、細胞株でも[35]動物においても有効な機能を示した研究もある[36, 37]。

実際の臨床応用を考えた時、少ない副作用で十分な効果を発揮することが望まれ、標的臓器に特異的な投与を行うことが重要である。マウスに対する気管内投与の侵襲性は比較的高いという議論もあるが[38]、気管支鏡は実臨床においてしばしば用いられる検査手技であり、容易かつ確実に気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞にベクターを投与することができる。また、投与方法を検討する上では、細胞極性についても考慮しなければならない。同じ AAV ベクターでも管腔



側 (apical) から投与されるのと、側基底膜側 (basolateral) から投与されるのでは遺伝子導入効果が異なる。嚢胞性肺線維症の臨床試験で使用された AAV2 型は気道上皮細胞の側基底膜側 (basolateral) からの遺伝子導入に優れてはいるが [23]、ネブライザーを用いて管腔側から投与された場合の効果については疑問がある。一方、AAV6 型は管腔側 (apical) からの遺伝子導入に優れている [24] と報告されており、これを裏付けるように、本研究でも、AAV6 型は気管内投与によって気道上皮細胞に優れた遺伝子導入を示した。細胞極性と AAV 血清型の特異的な関係を考慮して、今後も適切な投与方法を検討する必要がある。

さらに、AAV6 型は再投与が可能であるという点で有利と考えられる。AAV2 型の再投与は成功していないが [14]、AAV5 型や AAV6 型では *in vivo* で遺伝子発現が再発現しており [39, 40]、初回投与後の発現低下にも対応できる可能性があり期待される。

最後に、AAV ベクターが肺のどの細胞に遺伝子導入を行っているか、殆ど組織学的に検討された例がなく、検討されたものでも主に評価されてきたのは気管支上皮細胞だった [21, 24]。本研究では、蛍光蛋白マーカー (hrGFP) と免疫染色を併用することで気管支上皮細胞と末梢の肺細胞について詳細に検討し、気管支上皮細胞だけでなく、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞に多く遺伝子導入されていることを明らかにした。成熟マウスの肺では、 $\alpha$ -SMA は血管や気管支の平滑筋細胞だけ

でなく、alveolar ring cell と呼ばれる肺胞の平滑筋細胞（肺胞筋線維芽細胞とも呼ばれる[41]）と周皮細胞にも発現している。Alveolar ring cell は肺胞管の入口部に多く存在し、周皮細胞は肺胞中隔の毛細血管周囲に存在している。今回のマウス肺の検討では、炎症所見はなく、hrGFP と  $\alpha$ SMA 陽性の共局在は肺胞管入口部ではなく肺胞中隔の毛細血管周囲に認めたことから、AAV6 により遺伝子導入された肺実質の細胞は主に周皮細胞と考えられた。周皮細胞は毛細血管や血管に接するある種の間葉系細胞由来の壁細胞で[42]、微小な血流を変化させることで肺実質の形態や機能を維持している[43]。AAV6 型が周皮細胞へ遺伝子導入する機序については今後の検討事項であるが、肺胞上皮細胞内を通過している（transcellular transport）、または上皮間の密結合の間を通過している（paracellular transport）などの可能性が考えられる[44, 45]。興味深いことに、周皮細胞は筋線維芽細胞の前駆細胞とも考えられている[46]。筋線維芽細胞は持続活性化と増殖によって過剰な線維性細胞外基質を産生することから、肺線維症の発症に重要な因子となっている[46]。従って、周皮細胞への遺伝子導入は肺線維症などの治療標的になるとも考えられる。

以上、本研究結果から AAV6-CAG ベクターは *in vitro*（細胞株）でも *in vivo*（マウス）でも呼吸器細胞に優れた遺伝子導入を図ることが明らかになった。これを気管内投与すると、気管支上皮細胞や周皮細胞が標的となるため、嚢胞性肺

線維症や特発性肺線維症など難治性肺疾患に対して大きな治療効果を発揮できると期待される。

## 5. 終わりに

本研究により、AAV ベクターによる呼吸器細胞への最適な遺伝子導入法を確立できた。特に、マウス肺で長期に渡って遺伝子発現を確認できたこと、そして、AAV6-CAG ベクターの気管内投与は気管支上皮細胞だけでなく、多くの周皮細胞に遺伝子導入されることを明らかにしたことは今後の呼吸器の遺伝子治療に大いに貢献できるものと考えられる。

今後は、今回確立した手法を用いて、疾患モデル動物に治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを投与して、有効な治療を示すか検討していきたいと考えている。AAV6-CAG ベクターは周皮細胞を主に遺伝子導入し、この周皮細胞は筋線維芽細胞の前駆細胞と考えられていることから、現在肺線維症モデルに対する治療実験を計画している。AAV6-CAG ベクターを利用した治療戦略が難治性呼吸器疾患への遺伝子治療の発展につながることを期待している。

## 6. 引用文献

- 1.Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2014 Annual Data Report; 2015 [Bethesda, Maryland]
2. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**: 199-203, 1998.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* **245**: 1066-1073, 1989.
- 4.Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, Fingerlin TE, Zhang W, Gudmundsson G, Groshong SD, Evans CM, Garantziotis S, Adler KB, Dickey BF, du Bois RM, Yang IV, Herron A, Kervitsky D, Talbert JL, Markin C, Park J, Crews AL, Slifer SH, Auerbach S, Roy MG, Lin J, Hennessy CE, Schwarz MI, Schwartz DA. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* **364**: 1503-1512, 2011.
5. Mueller C, Flotte TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* **15**: 858–863, 2008.

6. Asokan A, Schaffer DV, Samulski RJ. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther* .**20**: 699-708, 2012.
7. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen YM, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CY, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, Davidoff AM. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. **371**: 1994-2004, 2014.
8. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*. **18**: 1731-1735, 2010.
9. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, During MJ, Kaplitt MG, Feigin A. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomized trial. *Lancet Neurol*. **10**: 309-319, 2011.

10. Ashtari M, Cyckowski LL, Monroe JF, Marshall KA, Chung DC, Auricchio A, Simonelli F, Leroy BP, Maguire AM, Shindler KS, Bennett J. The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. *J Clin Invest.* **121**: 2160-2168, 2011.
11. Testa F, Maguire AM, Rossi S, Pierce EA, Melillo P, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Acerra C, Wright JF, Wellman J, High KA, Auricchio A, Bennett J, Simonelli F. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology.* **120**: 1283-1291, 2013.
12. Aitken ML, Moss RB, Waltz DA, Dovey ME, Tonelli MR, McNamara SC, Gibson RL, Ramsey BW, Carter BJ, Reynolds TC. A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther.* **12**: 1907-1916, 2001.
13. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest.* **125**: 509-521, 2004.

14. Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, Zeitlin PL, Clancy JP, Spencer LT, Pilewski J, Waltz DA, Dorkin HL, Ferkol T, Pian M, Ramsey B, Carter BJ, Martin DB, Heald AE. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther.* **18**: 726–732, 2007.
15. Virella-Lowell I, Zusman B, Foust K, Loiler S, Conlon T, Song S, Chesnut KA, Ferkol T, Flotte TR. Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med.* **7**: 842-850, 2005.
16. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* **78**: 6381-6388, 2004.
17. Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol.* **75**: 6615-6624, 2001.
18. Flotte TR, Fischer AC, Goetzmann J, Mueller C, Cebotaru L, Yan Z, Wang L, Wilson JM, Guggino WB, Engelhardt JF. Dual reporter comparative indexing of rAAV pseudotyped vectors in chimpanzee airway. *Mol Ther.* **18**: 594-600, 2010.
19. Song S, Morgan M, Ellis T, Poirier A, Chesnut K, Wang J, Brantly M, Muzyczka N, Byrne BJ, Atkinson M, Flotte TR. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin

from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 14384-14388, 1998.

20. Sirninger J, Muller C, Braag S, Tang Q, Yue H, Detrisac C, Ferkol T, Guggino WB, Flotte TR. Functional characterization of a recombinant adeno-associated virus 5-pseudotyped cystic fibrosis transmembrane conductance regulator vector. *Hum Gene Ther*. **15**: 832-841, 2004.

21. Halbert CL, Lam SL, Miller AD. High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther*. **18**: 344-354, 2007.

22. Yan Z, Lei-Butters DC, Liu X, Zhang Y, Zhang L, Luo M, Zak R, Engelhardt JF. Unique biologic properties of recombinant AAV1 transduction in polarized human airway epithelia. *J Biol Chem*. **281**: 29684-29692, 2006.

23. Duan D, Yue Y, Yan Z, McCray PB Jr, Engelhardt JF. Polarity influences the efficiency of recombinant adenoassociated virus infection in differentiated airway epithelia. *Hum Gene Ther*. **9**: 2761-2776, 1998.

24. Limberis MP, Vandenberghe LH, Zhang L, Pickles RJ, Wilson JM. Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther*. **17**: 294-301, 2009.



25. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. **108**: 193-199, 1991.
26. Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K. *et al.* Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther*. **19**: 476-482, 2012.
27. Mochizuki S, Mizukami H, Kume A, Muramatsu S, Takeuchi K, Matsushita T, Okada T, Kobayashi E, Hoshika A, Ozawa K. Adeno-associated virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther Mol Biol*. **8**: 9-18, 2004.
28. Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, Brown KE. Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology*. **221**: 208-217, 1996.
29. Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol*. **71**: 6823-6833, 1997.
30. Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol*. **73**: 1309-1319, 1999.

31. Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol.* **72**: 309-319, 1998.
32. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 11854-11859, 2002.
33. Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol.* **80**: 9093-9103, 2006.
34. Ng R, Govindasamy L, Gurda BL, McKenna R, Kozyreva OG, Samulski RJ, Parent KN, Baker TS, Agbandje-McKenna M. Structural characterization of the dual glycan binding adeno-associated virus serotype 6. *J Virol.* **84**: 12945-12957, 2010.
35. Ostedgaard LS, Rokhlina T, Karp PH, Lashmit P, Afione S, Schmidt M, Zabner J, Stinski MF, Chiorini JA, Welsh MJ. A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 2952-2957, 2005.
36. Fischer AC, Smith CI, Cebotaru L, Zhang X, Askin FB, Wright J, Guggino SE, Adams RJ, Flotte T, Guggino WB. Expression of a truncated cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator with an AAV5-pseudotyped vector in primates.

*Mol Ther.* **15**: 756-763, 2007.

37. Mueller C, Torrez D, Braag S, Martino A, Clarke T, Campbell-Thompson M, Flotte TR. Partial correction of the CFTR-dependent ABPA mouse model with recombinant adeno-associated virus gene transfer of truncated CFTR gene. *J Gene Med.* **10**: 51-60, 2008.

38. Liqun Wang R, McLaughlin T, Cossette T, Tang Q, Foust K, Campbell-Thompson M, Martino A, Cruz P, Loiler S, Mueller C, Flotte TR. Recombinant AAV serotype and capsid mutant comparison for pulmonary gene transfer of alpha-1-antitrypsin using invasive and noninvasive delivery. *Mol Ther.* **17**: 81-87, 2009.

39. Vidović D, Gijsbers R, Quiles Jimenez A, Dooley J, Van den Haute C, Van derPerren A, Liston A, Baekelandt V, Debyser Z, Carlon MS. Noninvasive Imaging Reveals Stable Transgene Expression in Mouse Airways After Delivery of a Nonintegrating Recombinant Adeno-Associated Viral Vector. *Hum Gene Ther.* **27**: 60-71, 2016.

40. Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, Russell DW, Miller AD. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol.* **74**: 1524-1532, 2000.

41. 妹尾春樹, 佐藤充, 今井克幸. 肝臓星細胞と肺胞中隔細胞. 呼吸. **16**: 604-615, 1997.
42. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. **21**: 193-215, 2011.
43. Dickie R, Wang YT, Butler JP, Schulz H, Tsuda A. Distribution and quantity of contractile tissue in postnatal development of rat alveolar interstitium. *Anat Rec (Hoboken)*. **291**: 83-93, 2008.
44. Di Pasquale G, Chiorini JA. AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol Ther*. **13**: 506-516, 2006.
45. Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev*. **19**: 3-36, 1996.
46. Hung C, Linn G, Chow YH, Kobayashi A, Mittelsteadt K, Altemeier WA, Gharib SA, Schnapp LM, Duffield JS. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **188**: 820-830, 2013.
47. Hutchison N, Fligny C, Duffield JS. Resident mesenchymal cells and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. **1832**: 962-971, 2013.

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、自治医科大学免疫遺伝子細胞治療学（タカラバイオ）講座の内堀亮介講師、臨床研究支援センターの久米晃啓教授、前呼吸器内科教授の杉山幸比古先生には多大なるご指導ご鞭撻を頂き、心より感謝いたします。

また、本研究は自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部ならびに内科学講座呼吸器内科学講座で遂行させて頂き、皆様からたくさんのご支援、ご協力を頂きました。厚くお礼申し上げます。