

氏 名	黒崎史朗
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 519 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 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 ベクターによる呼吸器細胞への最適な遺伝子導入法の確立
論文審査委員	(委員長) 教授 西野 宏 (委員) 教授 高橋 将文 准教授 大嶺 謙

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

嚢胞性肺線維症や特発性肺線維症などの難治性慢性呼吸器疾患の治療は、薬物を用いた対症療法や感染症などによる増悪予防に限られ、予後は不良である。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おり、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する *CFTR* 遺伝子の異常が、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分かっている。このような分子機構の理解に伴い、これらの病態を引き起こす細胞機能を修復し、病勢を改善させるものとして遺伝子治療による根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。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 やパーキンソン病、先天性黒内障の臨床試験が行われ、有効性が認められている。一方、呼吸器疾患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、気道上皮での遺伝子発現は一過性かつ低いレベルで、治療効果は認められなかった。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あげられる。第一に、広く用いられてきた AAV2 型は呼吸器細胞に適していない可能性があった。また、これまでの治療ベクターのプロモーター活性は非常に弱いものであった。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、下気道や肺への遺伝子導入が不十分であった可能性が高い。そこで、私は 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研究を行った。

### 2 研究方法

呼吸器細胞に適した血清型を探索するために、代表的な AAV の血清型 1 型から 9 型のベクターを作製した。これらのベクターにはマーカー遺伝子 (*LacZ*) を搭載し、呼吸器系由来細胞株の 5 種類の細胞 (気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺線維芽細胞、肺胞マクロファージ、正常ヒト気管支上皮細胞) に遺伝子導入してその発現を比較した。

次に、プロモーターの違いによる遺伝子導入効果を比較するために、CMV プロモーターまたは

CAG プロモーターを AAV ベクターに搭載し、それぞれを用いて上記 5 種類の細胞株に遺伝子導入を行った。

以上の細胞株でのスクリーニングから有望と思われた血清型とプロモーターの組み合わせを用いて、様々な投与経路（静脈内投与、鼻腔内投与、気管内投与）でマウス（C57BL/6J、オス、8-12 週）に遺伝子導入を行った。肺での発現を視覚的に評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子を搭載した AAV ベクターを作製し、生体イメージング装置で測定し、経時的推移も評価した。細胞株を用いた *in vitro* 実験の結果が *in vivo* にも外挿できるか、マウスについても様々な AAV ベクターを用いて検討を行った。

マウスでの遺伝子発現をさらに評価するために、遺伝子導入を行ったマウスの肺と肝臓を摘出し、蛋白質と核酸（DNA、RNA）を抽出した。蛋白質からルシフェラーゼ活性を測定し、核酸は PCR 法により各臓器内でのウイルスコピー数や mRNA を定量化した。

分子生物学／生化学的な解析に加え、hrGFP 遺伝子を搭載した AAV ベクターをマウスに投与し、肺での遺伝子発現を組織学的に評価した。さらに、分化抗原に対する免疫染色を用いて遺伝子導入された細胞を明らかにした。

### 3 研究成果

細胞株およびマウス実験の結果から、呼吸器細胞に最適な血清型は AAV6 型であることが判明した。プロモーターについては、CMV より CAG の方が強い発現が得られることが明らかになった。投与経路の比較では、静脈内投与や鼻腔内投与では肺での発現は殆ど認めず、気管内投与での発現が最も強く、最適であると分かった。

AAV6-CAG ベクターをマウスに気管内投与すると、肺での遺伝子発現は少なくとも 12 ヶ月間、比較的高く保たれていた。

摘出した臓器の評価でも、AAV6-CAG ベクターの気管内投与が最も優れていることが明らかになった。一方で、肝臓への漏れはなく、標的選択性の高い投与が可能だった。

組織学的検討により、遺伝子導入された細胞の多くは間葉系細胞の周皮細胞であることが分かり、次いで気管支上皮細胞が多く、肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージへの遺伝子導入は僅かであることが分かった。

### 4 考察

AAV6 型による優れた肺への遺伝子導入のメカニズムについては、いまだ不明な部分が多い。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細胞に感染すると言われている。これらのシアル酸は気道上皮細胞の管腔側に多く存在しており、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは基底膜側に多く存在している。すなわち、これらのレセプター分子が気道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。

遺伝子発現はプロモーター活性の強さによっても影響される。CAG プロモーターは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、今回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、パッケージできる遺伝子サイズに限られる AAV ベクターには使用しづらい問題点はあるが、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* 遺伝子のように大きいサイズの遺伝子を短くした cDNA を合成する方法が試みられ、細胞株でも動物においても有効な機能を示した研究が報告されている。

投与方法による遺伝子導入効果の違いには、気道上皮細胞の極性の問題も関係している。本研究で AAV6 型が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背景には、AAV6 型が管腔側からの遺伝子導入に適しているためかもしれない。

AAV ベクターが肺のどの細胞に遺伝子導入をしているかについても興味深い問題であり、これまでに組織学的に検討された報告は殆どない。検討されたものでも、主に評価されてきたのは気道上皮細胞のみである。本研究では hrGFP と免疫染色を行うことで気管支上皮細胞と末梢の肺細胞について検討を行い、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、hrGFP と  $\alpha$ -SMA 陽性の共局在は肺胞管入口部には認められず、肺胞中隔に認められたことから周皮細胞と考えられた。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か、上皮間の密結合の間を通過しているかの可能性が考えられる。さらに、周皮細胞は筋線維芽細胞の前駆細胞とも考えられており、筋線維芽細胞は肺線維症の発症に重要な因子となっていることから、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。

## 5 結論

AAV6-CAG ベクターは細胞株およびマウスにおいて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。そして、気管内投与では、気管支上皮細胞や周皮細胞が標的細胞となり、嚢胞性肺線維症や特発性肺線維症といった難治性呼吸器疾患に対する遺伝子治療への貢献が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

嚢胞性肺線維症と特発性肺線維症は難治な慢性呼吸器疾患である。有効な治療方法がなく、対症的治療を選択せざるをえない。そのため患者の生活の質は著しく低下する。近年これらの疾患の関連遺伝子が同定された。このことは根治的な遺伝子治療の開発が可能となったことを示す。しかしながら今までに行われてきた遺伝子治療の成績は残念ながら悪かった。従来の方法では呼吸器細胞へ十分な遺伝子導入がされていないことがその原因と黒崎氏は考えた。Adeno-associated virus (AAV) を用いて呼吸器細胞へ効率よく遺伝子導入可能な方法の研究を始めた。

まず黒崎氏は AAV の血清型に注目した。従来使用されてきた AAV2 型より AAV6 型を用いた方が良いことを明らかにした。続いてプロモーターの比較を行った。cytomegalovirus(CMV)プロモーターと CAG プロモーター (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もの) を比較した結果、CAG プロモーターの遺伝子導入効率が高いことがわかった。以上をまとめると CAG プロモーターを持つ AAV6 型を用いることが良いことがわかった。次に投与経路について検討した。静脈内投与、鼻腔内投与、気管内投与を検討すると気管内投与が最も効率よ

く遺伝子導入ができた。また気管内投与では約1年間にわたり発現が持続することを明らかにした。黒崎氏は AAV6 型により遺伝子導入がされる肺組織を蛍光免疫組織染色の手法を用いて検討し、hrGFP(+) $\alpha$ -SMA(+)細胞に主に遺伝子導入がされることを初めて明らかにした。hrGFP(+) $\alpha$ -SMA(+)細胞は周皮細胞であることを考察した。以上の結果を $\beta$ ガラクトシダーゼ活性、発光強度、ルシフェラーゼ発光による生体イメージング、ゲノムコピー数、mRNA 定量、ルシフェラーゼ測定、蛍光免疫染色の多くの手法を用いて、客観的に提示された。

よくまとめられた論文であったが、以下の点の改定をお願いし、最終論文では改定された。1：蛍光免疫染色の図をさらに分かりやすくすること。2：AAV6 型の静脈内投与により肝臓に強い遺伝子発現が認められた。しかしルシフェラーゼ量が低かった。今回の研究テーマとは直接関係合いがないが、他の研究者の一助になる可能性がある点を考えると、全ての結果を真摯に検討した方が良く、考察を求めた。3：遺伝子導入がされる細胞を周皮細胞と考察したが、その根拠をさらに細く論じた方がより良い。

論文審査は合格である。難治な疾患に対する遺伝子治療の門戸を開けた研究業績は博士に値する。多種多様な手法を用いて客観的に検討した結果は信頼するに当たる結果である。また実際の診療に直結するトランスレーショナルリサーチとして価値ある研究結果である。

## 最終試験の結果の要旨

黒崎氏は落ち着いた態度で、研究成果を発表した。研究の動機、方法、結果の考察についてわかりやすく発表した。黒崎氏は難治な嚢胞性肺線維症と特発性肺線維症の慢性呼吸器疾患に対する画期的な遺伝子治療の門戸を開く有意義な研究を行った。現在までに行われてきた遺伝子治療の成績は悪いものであった。その問題点を指摘し改善を行い、CAG プロモーターを持つ AAV6 型の気管内投与が最も遺伝子効率が高く約1年の発現を認めたことが示された。AAV6 型により遺伝子導入がされる肺組織の細胞は周皮細胞であることを初めて示した。今後の臨床試験に結びつく優れたトランスレーショナルリサーチと思われた。

研究発表後の質問にも適切に回答がされた。1：嚢胞性肺線維症と特発性肺線維症の疫学及び臨床像について適格に回答された。2：AAV6 型が他の AAV のサブタイプと比較し肺組織に遺伝子導入が高い理由についての的確に考えが述べられた。3：静脈内投与の場合、生体イメージングにおける肝臓での発現を強く認めた一方肝臓組織のルシフェラーゼ量が低い理由について、審査委員と討論がされた。回答は適正な範囲ではあったが、判断の根拠について詳細な説明の必要性が指摘された。4：蛍光免疫組織染色の写真の色調について確認の質問があり、的確に回答され、学位論文ではわかりやすい体裁にすることとなった。本結果により遺伝子導入がされる細胞を周皮細胞と考察したが、その根拠について質問がされた。回答は適切と思われたが、その根拠をさらに細く論じた方がより良いと考えられ指導を受けた。5：AAV6 は気管内再投与可能である点を最後に考察された。その理由につき質問がされた。回答は適切と思われたが、中和抗体につきさらなる説明が必要ではないかとの判断となり指導を受けた。

黒崎氏は、呼吸器難病に対する画期的な遺伝子治療の基礎を構築した。その結果は比較的近い将来に遺伝子治療の実臨床に直結するものである。多種多彩な研究手法を用いて注意深く検証を行い、導き出された結果はわかりやすく説得力のあるものであった。発表内容に対する質問にも

的確に返答され、真摯な態度は人間性も良いものと判断された。研究動機、研究方法、研究姿勢、発表態度全てにおいて医学博士に値するものと審査委員全員一致して判断した。