◆診断・治療・技術講座◆

AAV ベクターを用いた遺伝子導入法

水上 浩明*

Gene transfer techniques using AAV vectors

Hiroaki MIZUKAMI*

Key words: AAV vector, serotypes, self-complementary AAV, hemophilia, clinical trial

水上浩明

1986年 防衛医科大学校卒 防衛庁（当時）
関連施設にて研修・勤務・研究
1993年 米国 NIH (NHLBI/Hematology Branch)
留学（～95年）
1998年 自治医科大学遺伝子治療研究部助手
2004年 同講師 主に AAV ベクターを用いた
遺伝子導入法に関して、基礎から
応用までを目指して検討を行っている

はじめに

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは非病原性ウイルスに由来し、広範な組織特異性、低い免疫原性など遺伝子導入に好都合な性質を備えていることから理想に近いベクターシステムと考えられている。近年世界中で活発な研究が行われており、ヒトに対する臨床研究も数多く実施されている。最近では様々な血清型由来のベクターや二本鎖ゲノムを持つベクターなどの開発も進んでいる。本稿では AAV ベクターの特徴と血友病遺伝子治療への応用を目指した臨床研究の現状を述べるとともに、ベクターの作製・精製法やその使用に関する技術的な情報に関しても紹介することとする。

1. AAV の基本的な性質

1) ウイルス学的性質

既知のウイルスでは最小クラスである直径約 26nm の正二十面体構造のキャプシドからなり、エンベロープを持たない。ウイルス学的に

はパルボウイルス科に分類され、アデノウイルスとは無関係である。単独で増殖することはできず、複製にはアデノウイルスなどの共感染が必要である。AAV のゲノムは一本鎖 DNA であり全長が約 4.7 kb で、5' 側の約半分はウイルスの複製に関与する Rep 蛋白質を、3' 側の約半分は構造蛋白質 Cap をコードしている（図 1）。ゲノムの両端に Inverted Terminal Repeat (ITR) と呼ばれる特有のヘアピン構造を有しており、この領域はベクターにも必要である。

ヒトに対する AAV の病原性は知られていない。AAV に対する抗体は健康成人の過半数に見出されており、主に幼児期に陽性化する¹⁾。

2) ベクターとしての特徴

AAV ベクターの特徴を表 1 に示した。優れている点として安全性の他に幅広い臓器・組織に導入可能であること、導入遺伝子産物に対する免疫反応が起こりにくく長期にわたる発現が期待できること、ウイルス粒子が安定で精製・濃縮等の操作に耐えること、等が挙げられる。一方短所としてはウイルスゲノム自体のサイズが小さいため組込める遺伝子のサイズに制約が

*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 [〒 329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1]
Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University [3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan]
Tel: 0285-58-7402 Fax: 0285-44-8675 e-mail: miz@jichi.ac.jp

図1 AAV ベクターの構造

表1 AAV ベクターの性質

長所	<ul style="list-style-type: none"> ・非病原性ウイルス由来で安全性が高い ・導入遺伝子が長期にわたり発現される ・広範な細胞に遺伝子導入が可能 ・ベクター粒子が物理化学的に安定
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・導入遺伝子の大きさの制約 ・成人の過半数が中和抗体を有する ・ベクター作製が煩雑

表2 AAV ベクターを用いた臨床研究の概要

	疾患	導入遺伝子
中枢神経	白質ジストロフィー	Aspartoacylase
	アルツハイマー病	NGF
	パーキンソン病	GAD, AADC
	リポフスチン症	CLN2
	側頭葉てんかん	NPY
筋肉	筋ジストロフィー症	Sarcoglycan
	心筋症	SERCA2a
呼吸器	嚢胞性線維症	CFTR
	α -1 アンチトリプシン欠乏症	hAAT
代謝疾患 その他	血友病B	Factor IX
	前立腺癌	GM-CSF
	慢性関節リウマチ	soluble TNFR

(Wiley 社及び OBA 資料より作成)

あること（合計約 5 kb まで）、投与時に中和抗体により不活化される可能性があること、などがある。

2. AAV ベクターの有用性

上記のような特徴を生かして様々な応用が期待されている。標的組織としては中枢神経系、骨格筋・心筋、呼吸器、肝臓などが主なものであり、90 年代半ば頃から臨床応用が始まった。現在までに行われている臨床研究を表 2 に示す。現時点では進行中のものも多く、有効とする結論が出ているものは少ないが、中には第 II 相・第 III 相試験の段階に至っているものもある。

1) 中枢神経系における効果

中枢神経系疾患は AAV ベクターによる遺伝子治療が最も活発に行われている領域であり、臨床研究に至ったプロトコールも多い。原理的に有利な点として、i) 一度の注入で非常に長期（年余）にわたる効果の持続が期待できる、ii) 脳実質内への注入においては治療に伴う免疫反応などが生じにくい、iii) 少量のベクターで効果が期待できる、などが挙げられる。

我々の経験でも、パーキンソン病に対してドーパミン合成酵素をコードするベクターを線条体に注入し機能回復を図る治療法は非常に有効で²⁾、2007 年より臨床研究の段階となった。他に中枢性尿崩症³⁾、アルツハイマー病⁴⁾、糖尿病性網膜症⁵⁾などに関しても動物個体レベルで

表 3 AAV の血清型

	発見	ベクター化	2 型との相同性	由来	レセプター	主な標的組織
1 型	1965	1999	中等度	サル	Sialic Acid	骨格筋
2 型	1966	1982	—	ヒト	HSPG, Integrin $\alpha v \beta 5$ FGFr, c-Met	神経
3 型	1966	1996	高い	ヒト	不明	神経
4 型	1966	1997	低い	サル	Sialic Acid	脳室上衣
5 型	1984	1999	低い	ヒト	PDGF Receptor	気道上皮・網膜・神経
6 型	1998	1999	中等度	1 型 + 2 型	Sialic Acid	≡ AAV-1
7 型	2002	2002	中等度	サル	不明	骨格筋
8 型	2002	2002	中等度	サル	Laminin Receptor	肝臓
9 型	2004	2004	中等度	ヒト	不明	気道・肝臓・骨格筋・心筋
10 型	2004	2004	中等度	サル	不明	不明
11 型	2004	2004	低い	サル	不明	不明

の治療効果が確認できている。

2) その他の標的組織における効果

先天性酵素欠損症などに対して全身的な酵素の補充を目指した治療法が数多く行われており、主に骨格筋又は肝臓を標的組織としている。このような疾患の代表は血友病と考えられることから、まとめて後述する。

3. 最近のトピックス

1) AAV の血清型について

最初に発見された AAV が 1 型と名付けられたものの、サル由来と考えられたため標準型とはみなされず、代わって 2 型が主に研究の対象とされた。90 年代後半になってから 2 型以外の血清型をベクターとして用いる検討がなされるようになり、既知の血清型の全てにおいて全塩基配列の決定とベクター化に向けた検討がなされた。その結果、2 型を用いた場合に比べて高い効果が得られたとする成果が多数得られている。各血清型に由来するベクターの特徴を表 3 に示した。いずれもほぼ同じ長さ（約 4.7 kb）のウイルスゲノムを有している。血清

型の定義はもともと宿主における免疫応答の違いに基づくものであるが、ベクターとして考える際にはむしろキャプシド構造に由来する組織特異性の違いに注目することが多い。

更に最近になって、サル及びヒトの組織 DNA から AAV に共通する配列が見出され、その結果 7～9 型という血清型が提唱された⁶⁾⁷⁾。これらを含めた全ての血清型の有用性に関してまとめると、骨格筋を標的とした場合には 1 型を、また肝臓に対しては 8 型を用いることで最大の効果が認められる事がほぼコンセンサスとなっている。一方、このような臓器・組織特異性の基盤となるレセプターに関しても様々な知見が得られている。2 型に関しては細胞表面のヘパラン硫酸に結合すること、インテグリン $\alpha_v \beta_5$, FGF レセプター、より最近では c-Met (HGF レセプター)⁸⁾などの細胞表面分子が感染に関与していることが報告されている。他の血清型についても近年少しずつ報告がなされており、5 型に関しては PDGF レセプターが、またいくつかの型についてシアル酸やラミニンレセプターが感染に必要であると報告されている⁹⁾¹⁰⁾。しかしながら感染経路に関する全体像

表4 血友病遺伝子治療に関する臨床研究

病型	ベクター	標的組織	Sponsor	開始年	症例数
A	プラスミド	繊維芽細胞	TKT	1998	6
A	レトロウイルス	肝臓	Chiron	1999	13
A	アデノウイルス	肝臓	Genstar	2001	?
B	AAV (2型)	骨格筋	Avigen	1999	8
B	AAV (2型)	肝臓	Avigen	2001	8
B	AAV (8型)	肝臓	?	2008 ?	—

(Wiley 社及び OBA 資料より作成)

の解明にはまだまだ遠い状況にある。

2型以外の血清型由来のベクターを用いることによって、遺伝子治療の効果が著明に改善することがしばしば見られるようになった。自験例でもフェニールケトン尿症のモデルマウスに対する遺伝子治療実験において、肝臓を標的とした際に2型のAAVベクターでは全く反応が見られなかったのに、5型のベクターでは顕著な効果が安定して認められた¹¹⁾。更には、より強力と考えられる8型のベクターを用いた検討では、同等の効果がより少量のベクターで得られることを確認している。

2) 二本鎖 (self-complementary) AAV ベクター

先述のように AAV ベクターはもともと一本鎖 DNA であるため、宿主細胞内で発現される際には二本鎖 DNA となっている必要がある。このステップの効率は低く、感染の過程における律速段階になっているものと考えられる。従って、この効率を上げることで、より早期から、より高い効果が得られる可能性がある。このような目的で予め二本鎖にしたベクターが考案された¹²⁾。実際に投与後早期から高い発現が得られており、有望な技術と考えられる。搭載可能な遺伝子長が半分になることから比較的短い遺伝子・プロモーターを用いる場合に限定されるものの、血友病 B には応用可能であり、画期的な新技術として注目される。

4. 血友病に対する遺伝子治療 臨床研究の展開

これまでに認可された血友病遺伝子治療の臨床研究を表4に示す。血友病 A に対する様々な臨床研究はいずれも効果不十分のため終了している。AAV ベクターを用いる場合には、遺伝子サイズが小さくベクター開発が容易な血友病 B の研究が先行している。標的組織としては骨格筋及び肝臓が考えられ、いずれについても動物実験 (イヌ) の良好な結果に続いて2型のベクターを用いた臨床研究が行われた。この臨床研究は全例で安全に遂行されたものの、骨格筋を標的とした方法ではベクター投与量を増やしても十分な効果を得ることができず¹³⁾、一方肝臓を標的とした投与方法では、治療域に達する効果が認められたものの、長期的な効果は得られなかった¹⁴⁾。この原因としては様々な考察がなされているが、2型のキャプシドに対する免疫反応の影響などにつき検討が行われている¹⁵⁾。また、最近8型の二本鎖 AAV ベクターを用いたサルにおける研究に顕著な進展が見られ¹⁶⁾、同じ方法で臨床研究を行うことが承認された (<http://www4.od.nih.gov/oba/rac/meeting.html>, Dec. 4, 2007)。この方法は静脈内投与で良いことから侵襲が少なく、しかもベクターの投与量が少なく済むと見込まれており、今後の展開が注目される。

図2 AAV ベクターの作製法

5. AAV ベクターの作製法

最も広く用いられているのはリン酸カルシウム法に基づき 293 細胞へのトランスフェクションを行う方法である。ベクター作製に必要なプラスミドは①ベクター配列を持ったプラスミド② AAV の配列 (rep/cap) を有するプラスミド③アデノウイルスのヘルパー機能に相当する遺伝子を搭載したプラスミド、の 3 種類であり、これらのプラスミド並びに細胞は STRATAGENE 社から市販されている (AAV helper-free system)。トランスフェクションの 2~3 日後に細胞を回収し、凍結融解などで破壊して、ベクター粒子を放出させる。この溶液を塩化セシウムによる超遠心法などに従って分離し、ベクターを精製した後、透析によって塩化セシウムを取り除く。定量法としてはドットプロット法又はリアルタイム PCR 法が広く用いられている。以上の流れを図 2 に示した。精製に際してイオン交換カラムなどを用いることも色々と検討されている。ベクターの作製・精製法に関しても多くのアプローチがなされて

おり¹⁷⁾、現在もなお発展段階であるが、今後臨床研究が広がっていくにつれて、質・量ともに臨床研究に対応可能な作製系に集約されていくものと思われる。

6. AAV ベクター使用上の注意点

AAV ベクター自体は安定した試薬と考えられ、使用上の注意は少ない。バイオセーフティーの観点からも通常 P1 扱いとなり、取り扱いが容易である。標準的なベクター使用量は *in vitro* の実験で細胞あたり 1×10^4 ゲノムコピー以上、マウスでは一匹あたり 1×10^9 以上を用いることが多い。なお、どの領域でも多少は問題となることではあるが、*in vivo* の効果を推定するために役立つ *in vitro* の実験系が少ない事に留意が必要である。特に比較的新しい血清型に関しては効率よく感染する細胞が見出されておらず、効果の予測のみならず中和抗体などの検討を行う際にも良い実験系が組みにくい傾向があり、今後の改良が望まれる。

おわりに

既に多くの疾患に対して臨床研究・前臨床の段階に至っていることから、今後はこれらの進捗状況に期待が持たれる。これまで効果が不十分であった治療法においても、新規血清型由来のベクターや、可能であれば二本鎖としたベクターを用いることで大きな改善が見込まれる。一方で、これまで殆ど問題にならなかった免疫反応に関しても顕在化する場合が見られるようになり、今後免疫反応の解析及び制御が新たな課題となってくるものと思われる。

謝辞：各血清型由来のベクター作製システムは各々の開発者から直接供与を受けたものであり、供与頂いた方々に感謝致します。また、自験例の成果は主に自治医科大学分子病態研究センター遺伝子治療研究部において行われたものであり、関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Blacklow NR, Hoggan MD, Sereno MS, Brandt CD, Kim HW, Parrott RH, Chanock RM : A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* **94** : 359-366, 1971.
- Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K : Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Expert Opin Biol Ther* **5** : 663-671, 2005.
- Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, Ozawa K : Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine-vasopressin in Brattleboro rats. *Mol Ther* **8** : 895-902, 2003.
- Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC : Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* **24** : 991-998, 2004.
- Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K : Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* **19** : 75-79, 2007.
- 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 U S A* **99** : 11854-11859, 2002.
- 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.
- Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H : Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **79** : 609-614, 2005.
- 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.
- Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA : The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* **80** : 9831-9836, 2006.
- Mochizuki S, Mizukami H, Ogura T, Kure S, Ichinohe A, Kojima K, Matsubara Y, Kobayahi E, Okada T, Hoshika A, Ozawa K, Kume A : Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther* **11** : 1081-1086, 2004.
- McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ : Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8** : 1248-1254, 2001.
- Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B : AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101** : 2963-2972, 2003.
- Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA : Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12** : 342-347, 2006.
- Mingozzi F, High KA : Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* **7** : 316-324, 2007.
- Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Cochrane M, Gray E, Tuddenham EG, Davidoff AM : Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* **109** : 1414-1421, 2007.
- Merten OW, Geny-Fiamma C, Douar AM : Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* **12** Suppl 1 : S51-61, 2005.