

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

アデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した
遺伝子治療法の開発研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 19（2007）年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

アデノ随伴ウイルス (AAV) を利用した 遺伝子治療法の開発研究 -----	1
小澤 敬也	

II. 分担研究報告

1. AAV ベクターによる遺伝子導入に伴う免疫反応 の解析とその制御 -----	8
水上 浩明	
2. AAVS1 の insulator 機能の解析とその応用 -----	11
竹内 隆正	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	15
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	17
-----------------------	----

アデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した遺伝子治療法の開発研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 非病原性のアデノ随伴ウイルス（AAV）を利用した遺伝子導入法の開発が、安全性の観点から注目されており、以下の3つのプロジェクトを実施した。1）新規 AAV ベクター作製法（バキュロウイルスを利用する方法）の実用化開発を行った。平成 18 年度は、1 型 AAV ベクター粒子中の VP1 量を増やすことによりその効力を高めるため、VP1 の開始コドンを変更し、VP1 量を増やすことができた。その結果、AAV ベクターの発現効率を高めることができた。また、非分裂細胞への高効率遺伝子導入・長期遺伝子発現といった AAV ベクターの特徴を活かした遺伝子治療法の開発を推進した。平成 18 年度は、高血圧性臓器障害を伴う細動脈硬化症のモデルとして、脳卒中易発症高血圧ラット（SHR-SP）やダール食塩感受性ラットを用い、AAV1 ベクター筋注法による IL-10 の持続的な体内発現を行った。神経症状・心機能・血圧・腎機能を経時的に解析し、炎症制御と高血圧の改善に伴う脳硬塞や心不全の発症予防効果を確認した。その結果、いずれの疾患モデルにおいても生存期間の有意の延長を認めた。また、AAV ベクターの場合でも、遺伝子導入に伴う免疫反応が問題となっており、遺伝子治療の実用化には、その実態解明と対策が急務である。平成 18 年度は、特に中和抗体に関する検討に重点を置き、検出感度の向上に取り組むと共に、カニクイザルのコロニーにおいては 8 型に対する抗体陽性率が高いものの、SPF 化したコロニーでは低いことを見出した。2）AAV のユニークな特徴を利用した第 19 番染色体部位（AAVS1）特異的遺伝子組込み法の応用開発を推進した。平成 18 年度も引き続き間葉系幹細胞（MSC）への応用実験を行った。この技術は、将来的には、ES 細胞や造血幹細胞への応用も可能であり、遺伝子導入に伴う細胞癌化を防ぐ革新的技術となる。3）AAVS1 内部の insulator 配列の解析を進めるとともにウイルスベクターに応用する研究を行った。平成 18 年度の研究では、AAVS1 insulator 配列を AAV ベクターに搭載することにより、マウス骨格筋での遺伝子発現が著しく増強された。この系は AAVS1 insulator の詳細な解析にも有用である。一方で、AAVS1 insulator 搭載 SIN レンチウイルスベクターを作成し、ゲノムに組み込まれた状態での barrier 活性についても検討中である。

分担研究者

水上 浩明
自治医科大学医学部
講師

竹内 隆正
国立感染症研究所
研究員

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究で有効性が確認されたものはまだ僅かであるが、遺伝子操作テクノロジーを駆使することにより、既存の方法とは全く異なる新しい角度からの治療法が可能となることから、その開発に大きな期待が寄せられている。また、遺伝子治療用ウイルスベクターの副作用が問題になってきていることから、非病原性ウイルスの AAV を利用した方法の開発が、安全性の

観点から益々注目されている。本研究では、以下の3つのプロジェクトを実施した。

1) 実用性の高い新規 AAV ベクター作製法 (バキュロウイルスを利用する方法) の開発を推進すると共に、筋細胞や神経細胞などの非分裂細胞への高効率遺伝子導入・長期遺伝子発現といった AAV ベクターの特徴を活かした遺伝子治療法の開発を推進した。具体的には、動脈硬化症の成因の一つとして動脈壁における慢性炎症反応が重要であることに着目し、抗炎症性サイトカインの体内持続発現による動脈硬化の進展防止とその機序の解明を目指した実験を行った。生活習慣病の制御は社会的にも大きな課題となっているが、本研究により、遺伝子治療法の開発にとどまらず、その他の分子標的治療法の開発にも役立つ知見が得られるものと期待される。

AAV ベクターによる遺伝子導入法は有用性が高く様々な応用が期待されているものの、研究の進展につれて免疫反応の重要性が示されつつある。そこで各血清型の AAV ベクターに対する中和抗体の検出系をより鋭敏に改良し、より低力価の抗体を検出可能にすることで遺伝子導入実験をより確実に遂行することを目的とした。また、サル由来と考えられる 8 型のベクターに対する中和抗体の陽性率を検討した。

2) AAV の二つのコンポーネント (ITR 配列と Rep 蛋白質) を利用した第 19 番染色体部位 (AAVS1) 特異的遺伝子組込み法の応用開発研究を推進した。平成 18 年度は、引き続き再生医療分野で最近脚光を浴びている MSC (mesenchymal stem cell) への応用に向けた基礎実験を行った。本法は遺伝子導入細胞の癌化を未然に防ぐ上で重要な技術であり、将来的には、ES (embryonic stem) 細胞や造血幹細胞への応用も可能な革新的テクノロジーに発展する可能性がある。

3) 野生型 AAV ゲノムが組み込まれる AAVS1 の一部が insulator として機能することを見出しており、平成 18 年度は AAVS1 insulator 配列をウイルスベクターに搭載する実験を開始した。insulator 搭載により長期に亘る遺伝子発現と安全性向上に繋

がることが期待される。

B. 研究方法

1) AAV ベクターの開発と応用.

(i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発 (小澤): 1 型 AAV キャプシドを発現する組換えバキュロウイルス、分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルス、および 2 型 Rep 発現バキュロウイルスを同時に培養昆虫細胞 Sf9 に感染させ 1 型 SEAP AAV ベクターを作製した。ベクターは塩化セシウム密度勾配超遠心の後、陰イオン交換カラムクロマトグラフ法にて精製した。バキュロウイルス作製系ではウイルスキャプシド VP1、VP2、VP3 は VP1 の開始コドンに ACG コドンに改変することにより VP1、VP2、VP3 を一つの mRNA から合成でき、且つ VP1:VP2:VP3 の構成比率を 1:1:10 に近づけるようにしている。VP1 の発現量を変えるため VP1 の開始コドンに ACG 以外の非 ATG コドン、ATT、TTG、GTG、CTG に変換し VP1 の発現量に差がないか精製ベクター粒子のウエスタン法で解析した。また作製した SEAP ベクターを 293 細胞に感染させ、培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を測定した。

(ii) 心血管病変に対する IL-10 発現 AAV ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験 (小澤): 高塩分食に代表される日本型生活習慣による細動脈硬化のモデルとして、脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP) やダール食塩感受性ラットを用い、AAV1 ベクター筋注法による IL-10 の持続的な体内発現を行った。諸臓器における炎症所見やサイトカインの発現変化を解析し、炎症制御による病態改善効果を評価した。また、神経症状、腎臓や心臓のリモデリング、血圧・心機能・腎機能等を経時的に解析し、高血圧症に伴う脳卒中や心不全の予防効果と延命効果を確認した。

(iii) 免疫反応に関する解析 (水上):

(a) 免疫反応の解析系: 各血清型の AAV ベクターキャプシドに対する抗体の測定法として ELISA 法及び中和抗体の検出法を確立し、関連する諸条件を最適化した。特に 8 型 AAV に対する中和抗体の検出法に関して、検出感度の向上にむけた改良を行った。

(b) 中和抗体の検討: サルにおける 1・8・9

型などの中和抗体陽性率を検討した。また、霊長類医科学研究センターにおける SPF 化の進捗状況とこれらの血清型に対する中和抗体陽性率との関連についても検討した。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発 (小澤) : MSC をヒトパピローマウイルス 16 型の E6、E7、及びヒト telomerase reverse transcriptase (hTERT) で寿命を延ばした細胞株 UET1 (国立成育医療センター研究所の梅澤博士より提供) に Rep 発現プラスミドと、血液凝固第 IX 因子とブラストサイジン S 耐性遺伝子発現カセットを ITR で挟んだプラスミドをリポフェクションにて導入した。ブラストサイジン S の存在下で単一細胞クローンを複数個拾い、AAVS1 に組み込まれているか PCR 法もしくはサザン法で解析した。導入遺伝子の発現を確認するため培養上清の第 IX 因子活性を測定した。AAVS1 領域は細胞骨格を形成するアクチンフィラメントのアセンブリに関係する myosin binding subunit 85 (MBS85) 遺伝子上にある。外来遺伝子が挿入されることにより MBS85 の 1 アリアルが破壊されるが、その影響を調べるため mRNA の定量をリアルタイム RT-PCR 法にて行った。また樹立株の増殖能を親株と比較した。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析とその応用 (竹内)。

(i) AP2 結合配列と barrier 活性との関連を調べるため AcGFP 発現カセットと G418 耐性カセットを試験配列で挟んだ構造の DNA を作成し、HeLa にトランスフェクション後 G418 耐性クローンを選別した。これらのクローンを G418 非存在下で継代し、AcGFP の発現レベルをフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡により経時的に観察した。

(ii) insulator をゲノム組込型ウイルスベクターに応用する実験として、SIN レンチウイルスベクターを用いた。第三世代のレンチウイルスベクターを基本骨格とし、3' -LTR の U3 領域欠損部に試験配列を挿入した。hrGFP 発現カセットおよびブラストサイジン S 耐性カセットが試験配列に挟まれる格好になり、ブラストサイジン S 耐性細胞における hrGFP 発現を調べた。またゲノム上の特定の部位に組込まれた transgene と周辺ゲノムの相互作用に対する insulator の影響を調

べる実験として、positive selection 用のブラストサイジン S 耐性カセットと negative selection 用の HSV-1 チミジンキナーゼ発現カセットが 2 種類の変異 loxP で挟まれた構造の SIN レンチウイルスベクターを作成した。

(iii) 非分裂細胞へ長期間に亘り遺伝子導入できる非ゲノム組込型ウイルスベクターへ insulator を応用する実験として、AAV ベクターを用いた。ヒト EF1 α プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現カセットを ITR で挟んだ基本構造のベクターゲノムを作成した。ITR とプロモーターの間に試験配列を挿入し、AAV2 型のベクターを作成し、マウス培養筋芽細胞 C2C12 への接種およびマウス大腿四頭筋への接種を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウスを用いた動物実験に関しては自治医大および国立感染症研究所で実施するが、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定あるいは国立感染症研究所動物実験実施規程に沿って行った。

C. 研究結果

1) AAV ベクターの開発と応用。

(i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発 : AAV ベクター粒子のウエスタン解析から、VP1 の開始コドンに TTG にしたものが他のものに比べて VP1 の量が有意に多かった。これら SEAP-AAV ベクターを 293 細胞に感染させ培養上清の SEAP 活性を測定したところ、TTG に改変したものが他のものに比べ約 1.5 倍活性が高かった。

(ii) 心血管病変に対する IL-10 発現 AAV ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験 : SHR-SP では、血中 IL-10 濃度の上昇に伴って脳や腎臓における炎症や動脈硬化所見が改善され、高血圧が抑えられ、その結果、脳卒中および腎不全の進行が予防可能であっ

た。ダール食塩感受性ラットにおいても、AAV1-IL-10 単回投与後、血中 IL-10 濃度はコントロール群と比較して上昇し、炎症性サイトカインの一つである血中 TNF- α 濃度が有意に低下した。それに伴って、高血圧が抑えられ、心エコー上、心肥大・心収縮能障害が抑制され、さらに心筋でのマクロファージ浸潤、線維化、TGF- β 発現が減少し、心筋リモデリング抑制効果を認めた。また、心不全マーカーである ANP の発現低下、臓器重量の低下を認め、うっ血性心不全の進行が抑制された。その他、腎機能改善効果を認めた。いずれの疾患モデルラットでも、高血圧性臓器障害が予防された結果、生存率が有意に延長した。

(iii)免疫反応に関する解析：

(a) 各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、従来用いていた X-Gal 染色法に比べて更に鋭敏な検出法である比色法の採用やアデノウイルスの共感染による AAV 感染効率の向上をはじめとした実験条件の最適化を行い、結果として 8 型に対しては検出感度を 30 倍程度高めることができた。

(b) 中和抗体の検討：検出感度の向上に伴い、中和抗体の陽性率は高まった。霊長類医科学研究センターにおけるカニクイザルのコロニーで検討した結果、8 型及び 9 型において 6/10 及び 4/10 の個体が陽性であった。一方、SPF 化を行ったコロニーではそれぞれ 1/10 であった。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発：得られたクローン 44 個中 4 個のクローンで PCR 解析、サザンブロット解析により第 IX 因子の AAVS1 特異的組込みが認められた。またこれらクローンの培養上清には第 IX 因子が約 15 ng/ml 分泌されていることが分かった。MBS85 の mRNA 量は、親株に比べ各クローンで 75-25%に減少していたが、これらのクローンは数ヶ月に亘って培養可能で、その後親株と同様分裂を停止した。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析とその応用 (竹内)。

(i) AAVS1 insulator に AP2 が結合できなくなる置換変異を導入しても AcGFP の発現維

持に差がなく、AP2 結合配列は HeLa における barrier 活性とは無関係であると考えられた。

(ii) SIN レンチウイルスベクターの作成効率は insulator 搭載により若干低下した。作成した SIN レンチウイルスベクターは HeLa S3 に接種し、ブラストサイジン S 耐性クローンの樹立およびブラストサイジン S 耐性集団の継代を行っている。ゲノム上の特定部位での insulator 効果検証用の SIN レンチウイルスベクターは改良中である。

(iii) AAV ベクターの作成効率には insulator 搭載に伴う大きな変化はなかった。C2C12 への接種では stuffer を挿入した AAV ベクターと比較して AAVS1 insulator 搭載 AAV ベクターでは 2~3 倍の発現増強が認められた。これは未分化状態と分化状態で同様に認められた。マウス骨格筋への接種では stuffer を挿入した AAV ベクターと比較して AAVS1 insulator 搭載 AAV ベクターでは 1000 倍程度の発現増強が認められた。この差は $p < 0.05$ で有意であった。

D. 考察

1) AAV ベクターの開発と応用。

(i) バキュロウイルスを用いた AAV ベクター作製法の開発：キャプシド構成蛋白質の一つである VP1 を欠損した AAV ベクターは細胞に吸着、侵入は可能であるがほとんど導入遺伝子を発現することが出来ない。VP1 は AAV の感染性を発揮させるために重要な分子であるが、その詳細な機能は明らかにされていない。今回 VP1 の機能の一端を明らかにするとともに AAV ベクターの効力増強を狙い、VP1 の開始コドンに他の非 ATG コドンに改変しウイルス粒子中の VP1 含量を増加させることを試みた。構築したものの中で開始コドンを TTG にした場合、ベクター粒子中の VP1 量を増加させることに成功した。更に VP1 含量が増加したベクターは少量のものに比べて遺伝子の発現が培養細胞において増強していることが確認された。以上のことは AAV ベクターの利用において有用な知見と考えられる。今後は *in vivo* での発現に差がないか解析を加える予定である。

(ii) 心血管病変に対する IL-10 発現 AAV ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験:本研究において、IL-10 による濃度依存性の血圧上昇抑制作用という、新しい知見が得られた。近年、高血圧の病態における慢性炎症の役割が注目されている。高血圧そのものが炎症性疾患であり、IL-10 の抗炎症作用が降圧に働いた可能性がある。今回の IL-10 の降圧作用は、炎症と高血圧との関係を更に深めるものであり、今後の高血圧の病態解明に繋がるものと期待される。さらに、IL-10 の作用機序に関する解析結果から、血管拡張因子を介した作用機序も関与していることが示唆された。今後、有効性と安全性を両立した治療システムの開発に向け、IL-10 の作用機構をさらに詳細に解析することに加え、Th1/Th2 バランスの変化や副作用の評価を各種モデルにて検証することが必要である。

(iii) 免疫反応に関する解析:近年動物実験又は臨床研究において AAV ベクターを用いた遺伝子導入法においても免疫反応の重要性を示唆する報告が散見されるようになり、治療法の有効性を確保するためにもこの点の検討と制御が肝要と考えられる。特にベクターに対する中和抗体価に関しては、これまで考えられていた以上に *in vivo* 投与法の効果に影響を及ぼしている可能性があり、更に検討が必要である。

霊長類医科学研究センターにおけるカニクイザルのコロニーで検討した結果では、検出法の改良により中和抗体の陽性率が高まった。また、SPF 化の直接の対象ではない AAV に関しても陽性率が低下していることが示された。このようなことから SPF 化したコロニーは AAV を用いた検討に好適であることが示唆された。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発:前年度は SV40 の T 抗原でトランスフォームした骨髄ストローマ由来の KM-102 細胞株の AAVS1 領域への GFP 遺伝子を導入することを試みたが、本年度は更に臨床応用をめざし、より本来の MSC に近い細胞株 UEET1 の AAVS1 領域に血液凝固第 IX 因子遺伝子を組込ませることができた。外来遺伝子の AAVS1 領域への組込みに伴い予想された通り MBS85 mRNA 量の減少が認められたが、1 アリールのみの

破壊では細胞の増殖その他には影響を及ぼさないと考えられる。また増殖能は親株と似通っており数ヶ月の培養後に増殖を停止したことは、少なくとも *in vitro* 培養系では癌化等は起こしていないと考えられた。MSC に *ex vivo* で遺伝子を導入し、AAVS1 領域にのみ組み込まれた安全性の高いクローンを選別し増殖させ、再び生体に戻す方法が考えられる。本研究の知見は、MSC を利用した再生医療に遺伝子操作を加える際に、安全性の観点から優れており将来的には ES 細胞や造血幹細胞への応用も可能である。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析とその応用:本年度の研究では AAVS1 insulator 配列をウイルスベクターに搭載する実験を開始した。ゲノム組込型ウイルスベクターへの応用として、insulator 搭載 SIN レンチウイルスベクターを作成した。一方、非分裂細胞へ長期間に亘り遺伝子導入できる非ゲノム組込型ウイルスベクターへの応用として、AAV ベクターに AAVS1 insulator を搭載すると、マウス骨格筋での遺伝子発現が著しく増強された。これは治療効果に必要な遺伝子発現レベルへの到達、あるいは十分な発現レベルが得られている場合にはベクター投与量の削減を可能とし、遺伝子治療の有効性・安全性に直結する成果である。また筋肉内で AAVS1 insulator に結合する蛋白質を同定することで基礎的な機能解析の進展も期待できる。

E. 結論

- ・ 組換えバキュロウイルス、昆虫細胞を用いて作製される 1 型 AAV ベクターの効力を増加させることを試みた。VP1 の開始コドンで TTG に改変するとベクター粒子中の VP1 含量が増し、ベクター遺伝子の発現がそれに伴って増加することが分かった。

- ・ 脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP) やダール食塩感受性ラットを用い、IL-10 発現 AAV ベクター筋注法による遺伝子治療を行ったところ、炎症制御と高血圧の改善に伴う脳硬塞や心不全の発症予防効果を確認した。

- ・ AAV ベクターを用いた遺伝子導入と免疫反応に関して解析系を改良し、感度を向上させた。また、8・9 型などがカニクイザルコ

ロニーにおいて浸透していることを示した。

・ MSC への部位特異的遺伝子導入法への確立に向けて、UEET1 株で AAV の AAVS1 特異的組込み機構を利用することにより第IX因子遺伝子を部位特異的に組み込ませることができた。

・ AAVS1 insulator を AAV ベクターに搭載することにより、マウス骨格筋での遺伝子発現が著しく増強された。この系は AAVS1 insulator の解析にも有用である。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. **Int. J. Mol. Med.** 19: 75-9, 2007.

2) Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. **Int. J. Cancer** 120: 278-84, 2007.

3) Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, KQ., Ozawa, K., Ushijima, H. : Tendon healing *in vitro*: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. **Plast. Reconstr. Surg.** 119: 227-34, 2007.

4) Nakata, M., Okada, T., Ozawa, K., and Yada, T.: Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 353: 1046-1051, 2007.

5) Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa, K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. **J. Virol.** 80: 11899-910, 2006.

6) Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer by using adeno-associated virus vectors. **Hum. Gene Ther.** 17: 921-8, 2006.

7) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. **J. Gene Med.** 8: 990-7, 2006.

8) Zhang, Y., Wang, C., Mizukami, H., Itoh, H., Kusama, M., Ozawa, K., Jinbu, Y.: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 25: 417-23, 2006.

9) Madoiwa, S., Someya, T., Hironaka, M., Kobayashi, H., Ohmori, T., Mimuro, J., Sugiyama, Y., Morita, T., Nishimura, Y., Tarumoto, T., Ozawa, K., Saito, K., and Sakata, Y.: Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. **Thromb. Res.** 119: 229-240, 2007.

10) Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. **Mol. Ther.** 13: 823-8, 2006.

11) Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka,

- H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. **Thromb. Res.** 118: 627-35, 2006.
- 12) Ohmori, T., Mimuro, J., Takano, K., Madoiwa, S., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Niimura, M., Mitomo, K., Tabata, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Iba α promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. **FASEB J.** 20: E769-E779, 2006.
- 13) Machida, Y., Okada, T., Kurosawa, M., Oyama, F., Ozawa, K., and Nukina, N.: rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 343: 190-197, 2006.
- 14) Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. **Mol. Ther.** 13: 738-46, 2006.
- 15) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T., Kanda, T.: Biodistribution of intravenously administered AAV-2, 10, and 11 vectors in cynomolgus monkeys. **Jpn. J. Infect. Dis.** 59: 285-293, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 発明の名称：

1. 特許

Urabe, M., Ozawa, K., Kotin, R.M., Haast, S.J.P., Hermens, W.T.J.M.C.: Improved AAV vectors produced in insect cells. P6004974PCT1-AP 平成 18 年 10 月 16 日出願

AAVベクターによる遺伝子導入に伴う免疫反応の解析とその制御

分担研究者：水上浩明 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 講師

研究要旨 遺伝子導入に関連した免疫反応の評価に向けて様々なアッセイ系を確立・改良し、導入遺伝子の発現との関連を検討した。また、改良した方法を用いてカニクイザルコロニーにおける中和抗体陽性率を検討した。更には、免疫反応の鍵を握ると考えられる樹状細胞への遺伝子導入効率に関して AAV の血清型による比較検討を行い、マウスの場合と同様にヒト由来の樹状細胞においても 5 型を用いた場合に非常に高い効率が得られることを見出した。

A. 研究目的

AAV ベクターによる遺伝子導入法は有用性が高く様々な応用が期待されているものの、研究の進展につれて免疫反応の重要性が示されつつある。そこで各血清型の AAV ベクターに対する中和抗体の検出系をより鋭敏に改良し、より低力価の抗体を検出可能にすることで遺伝子導入実験をより確実に遂行する事を目的とした。また、導入遺伝子産物に対する免疫反応に関連すると考えられる抗原提示細胞に対する遺伝子導入効率に関しても、ヒト由来の細胞を用いて比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 免疫反応の解析系：各血清型の AAV ベクターキャプシドに対する抗体の測定法として ELISA 法及び中和抗体の検出法を確立し、関連する諸条件を最適化した。特に 8 型の AAV に対する中和抗体の検出法に関して、検出感度の向上にむけた改良を行った。

2. 遺伝子導入実験：様々なマーカー蛋

白質並びにヒト型凝固第 IX 因子に対する免疫反応の検出系を作製し、遺伝子導入を行った動物の血清を用いて解析を行った。

3. 中和抗体の検討：サルにおける 1・8・9 型などの中和抗体陽性率を検討した。また、霊長類医科学研究センターにおける SPF 化の進捗状況とこれらの血清型に対する中和抗体陽性率との関連についても検討した。

4. 抗原提示細胞に関する検討：抗原提示細胞に対する遺伝子導入・発現効率に関しては、ヒト由来の細胞を用い、マーカー遺伝子を搭載した各血清型のベクターを同一条件下で感染させて血清型による違いを比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配

慮など)を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 免疫反応の解析系：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、従来用いていたX-Gal染色法に比べて更に鋭敏な検出法である比色法の採用やアデノウイルスの共感染によるAAV感染効率の向上をはじめとした実験条件の最適化を行い結果として8型に対しては検出感度を10〜30倍程度高めることができた。

2. 遺伝子導入実験：ELISA法による抗体測定・中和抗体の力価測定法などを確立した。凝固第IX因子遺伝子を搭載した8型のベクターを門脈内投与した結果では、マウスにおいては非常に高い効果が得られたが、カニクイザル(2頭)においては低い効果が観察されたのみであった。

3. 中和抗体の検討：検出感度の向上に伴い、中和抗体の陽性率は高まった。霊長類医科学研究センターにおけるカニクイザルのコロニーで検討した結果、8型及び9型において6/10及び4/10の個体が陽性であった。一方、SPF化を行ったコロニーではそれぞれ1/10であった。

4. 抗原提示細胞への遺伝子導入・発現効率に関して、AAVベクターの血清型による違いを検討し、マウス樹状細胞のみならずヒト由来の樹状細胞でも5型由来のベクターを用いた場合に顕著な遺伝子導入・発現が起こることを見出した。

D. 考察

近年動物実験又は臨床研究において

AAVベクターを用いた遺伝子導入法においても免疫反応の重要性を示唆する報告が散見されるようになり、治療法の有効性を確保するためにもこの点の検討と制御が肝要と考えられる。特にベクターに対する中和抗体価に関しては、これまで考えられていた以上に *in vivo* 投与法の効果に影響を及ぼしている可能性があり、更に検討が必要である。今回我々が経験した8型のベクター注入による検討でも、当初懸念した種特異性などではなく、低力価の中和抗体の存在による影響であることが示唆された。

霊長類医科学研究センターにおけるカニクイザルのコロニーで検討した結果では、検出法の改良により中和抗体の陽性率が高まった。また、SPF化の直接の対象ではないAAVに関して陽性率が低下していることが示された。このようなことからSPF化したコロニーはAAVを用いた検討に好適であることが示唆された。

樹状細胞に対する遺伝子導入効果に関しては、昨年度のマウス骨髄由来の樹状細胞を用いた検討で5型とそれ以外を用いた場合とで大きな開きがあることが判明した。今回ヒト由来の樹状細胞を用いても、同様の所見が得られた。いずれにしても現段階で有用性が期待されている1型、8型などの血清型では強い免疫反応が起こり難いことが示唆されることから、安心して応用開発を進めることにつながる成果といえる。

E. 結論

AAVベクターを用いた遺伝子導入と免疫反応に関して解析系を確立した。また、8・9型などがカニクイザルコロニーにおいて浸透していることが示唆された。樹状細胞に対する遺伝子導入効率に関して、用いるベクターの血清型によって大きな違いがあることを見出した。今後このような成果を応用することで遺伝子導入に伴う免疫反応の解析や制御につなが

り、より有効な遺伝子治療法の樹立に向けて有用な情報となることが期待される。

G. 研究発表 (原著論文)

Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. **Int J Mol Med** 19: 75-9, 2007.

Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. **Int J Cancer** 120: 278-84, 2007.

Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, KQ., Ozawa, K., Ushijima, H. : Tendon healing *in vitro*: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. **Plast Reconstr Surg** 119: 227-34, 2007.

Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. **J Virol** 80: 11899-910, 2006.

Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer by using adeno-associated virus vectors. **Hum Gene Ther** 17: 921-8, 2006.

Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H.,

Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. **J Gene Med** 8: 990-7, 2006.

Zhang, Y., Wang, C., Mizukami, H., Itoh, H., Kusama, M., Ozawa, K., Jinbu, Y.: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. **J Exp Clin Cancer Res** 25: 417-23, 2006.

Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. **Mol Ther** 13: 823-8, 2006.

Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. **Thromb Res** 118: 627-35, 2006.

Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. **Mol Ther** 13: 738-46, 2006.

H. 知的財産権の出願・取得状況 該当なし

AAVS1 の insulator 機能の解析とその応用

分担研究者 竹内 隆正 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第一室 研究員

研究要旨 野生型 AAV の特異的組込み領域である AAVS1 内の insulator 機能領域および他種の insulator を AAV ベクターに搭載することにより、マウス骨格筋での遺伝子発現が増強された。その中で AAVS1 insulator の効果が最大であった。この系は AAVS1 insulator の解析にも有用である。一方で AAVS1 insulator 搭載 SIN レンチウイルスベクターを作成し、ゲノムに組込まれた状態での barrier 活性についても検討中である。

A. 研究目的

野生型 AAV はヒト 19 番染色体長腕の AAVS1 という領域に部位特異的に組込まれることが知られており、それに必要な配列も明らかになっている。ウイルスの生活環から見た AAVS1 への組込みの意義は未詳であるが、必要に応じてウイルスのゲノム複製や粒子形成が起こるためには、ヒトゲノム上で不活化されにくい領域であると推測され、実際に AAVS1 が insulator として機能することを見出した。

本年度は AAVS1 insulator の機能解析として AP2 結合配列の barrier 活性に関する意義を調べる一方、ウイルスベクターへの応用として SIN レンチウイルスベクターおよび AAV ベクターに AAVS1 insulator を搭載した場合の transgene 発現を調べる実験を開始した。

本研究は遺伝子治療の有効性・安全性に直結するものである。

B. 研究方法

1. AP2 結合配列の barrier 活性との関連

前年度の研究で同定された AP2 結合配列が barrier 活性に必要なかどうかを調べた。AAVS1 insulator (*Sma* I 断片) 内の 2 カ所の AP2 結合配列に AP2 が結合しなくなるような変異を導入した変異 AAVS1 insulator を作成した。AcGFP 発現カセットと G418 耐性カセットを試験配列 (陰性対照 (ウミシイタケルシフェラーゼのコード配列の一部 (stuffer))、陽性対照 (ニワトリ β グロビン 5'HS4 のコア配列 (cHS4))、AAVS1 insulator、変異 AAVS1 insulator) で挟んだ構造の DNA を作成し、HeLa にトランスフェクション後 G418 耐性クローンを選別した。これらのクローンを G418 非存在下で継代し、AcGFP の発現レベルをフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡により経時的に観察した。

2. SIN レンチウイルスベクターへの AAVS1 insulator の搭載

insulator をゲノム組込型ウイルスベクターに応用する実験として、SIN レンチウイルスベクターを用いた。第三世代のレンチウイルスベクター

を基本骨格とし、3'-LTR の U3 領域欠損部に試験配列 (1.と同じ) を挿入した。逆転写の過程で試験配列が 5'-LTR にコピーされるため、hrGFP 発現カセットおよびブラストサイジン S 耐性カセットが試験配列に挟まれる格好になり、ブラストサイジン S 耐性細胞における hrGFP 発現を調べた。

一方、ゲノム上の特定の部位に組込まれた transgene と周辺ゲノムの相互作用に対する insulator の影響を調べる実験として、positive selection 用のブラストサイジン S 耐性カセットと negative selection 用の HSV-1 チミジンキナーゼ発現カセットが 2 種類の変異 loxP で挟まれた構造の SIN レンチウイルスベクターを作成した。

3. AAV ベクターへの AAVS1 insulator の搭載

非分裂細胞へ長期間に亘り遺伝子導入できる非ゲノム組込型ウイルスベクターへ insulator を応用する実験として、AAV ベクターを用いた。ヒト EF1 α プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ発現カセットを ITR で挟んだ基本構造のベクターゲノムを作成した。ITR とプロモーターの間に試験配列 (stuffer、AAVS1 insulator、cHS4、ウニアリルスルファターゼ insulator (ArsI)) を挿入し、AAV2 型のベクターを作成した。

マウス培養筋芽細胞 C2C12 への接種およびマウス大腿四頭筋への接種を行った。C2C12 は通常の培養状態 (未分化状態) およびコンフルエント後 2%ウマ血清を含む培地で 10 日間培養した分化状態のものを用い、接種 3 日後に細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。マウスは Balb/c 雌 4 週齢を用い、 1×10^9 ゲノムコピーの AAV ベクターを大腿に筋注した。4 週間後に大腿全体を離断し、細胞溶解液中でホモジナイズして、遠心上清中のルシフェ

ラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いる実験は国立感染症研究所動物実験実施規程を遵守して行っている。

C. 研究結果

1. AP2 結合配列の barrier 活性との関連

G418 非存在下での継代を開始して 8 週間以内に AcGFP 発現レベル (蛍光強度) が低下したクローンと低下しなかったクローンの数を調べると、陰性対照では 4:1、陽性対照では 1:7、AAVS1 insulator では 2:6、変異 AAVS1 insulator では 2:6 であった。陽性対照と陰性対照間では $p < 0.05$ の有意差を認めた。AAVS1 insulator と変異 AAVS1 insulator 間では差がなく、AP2 結合配列は HeLa における barrier 活性とは無関係であると考えられた。

2. SIN レンチウイルスベクターへの AAVS1 insulator の搭載

SIN レンチウイルスベクターの作成効率は insulator 搭載により若干低下した。作成した SIN レンチウイルスベクターは HeLa S3 に接種し、ブラストサイジン S 耐性クローンの樹立およびブラストサイジン S 耐性集団の継代を行っている。

ゲノム上の特定部位での insulator 効果検証用の SIN レンチウイルスベクターでは力価 (ブラストサイジン S 耐性細胞出現頻度) が極めて低く、またこれらの細胞がガンシクロビル感受性を示さない問題に直面した。現在 IRES を使用する構造にベクターを改変中である。

3. AAV ベクターへの AAVS1 insulator の搭載

AAV ベクターの作成効率には、insulator 搭載に伴う大きな変化はなかった。C2C12 への接種では stuffer を挿入した AAV ベクターと比較

して AAVS1 insulator および cHS4 搭載 AAV ベクターでは 2~3 倍の発現増強が認められた。これは未分化状態と分化状態で同様に認められた。一方 ArsI 搭載 AAV ベクターでは発現が減弱していた。

マウス骨格筋への接種では stuffer を挿入した AAV ベクターと比較して AAVS1 insulator 搭載 AAV ベクターでは 1000 倍程度、cHS4 搭載 AAV ベクターでは 100 倍程度、ArsI 搭載 AAV ベクターでは 10 倍程度の発現増強が認められた。これらはいずれも stuffer 挿入 AAV ベクターと比較して $p < 0.05$ で有意であった。

D. 考察

元来 insulator は染色体上での機能を見る実験によって定義されてきた。それに対して、筋肉内で AAV ベクターゲノムはほとんど染色体外にエピソームとして存在すると考えられており、insulator 搭載 AAV ベクターの実験では基本的に染色体から切り離された状態での機能を見ているものと考えられる。遺伝子の転写は転写因子結合配列のみならずクロマチンおよびより高次の構造によって制御されており、染色体上では周辺からの影響が避けられないのに対して、エピソームでは insulator 結合蛋白質群の作用が純粋な形で見えていると考えられる。

ヒトゲノム上での AAVS1 insulator の位置は、筋肉特異的な *TNNI3* 遺伝子・*TNNT1* 遺伝子と恒常的に発現する *PPP1R12C* 遺伝子との間であり、骨格筋細胞において活発に転写される領域に含まれる。従って少なくとも骨格筋における遺伝子発現を抑制するような作用があるとは考えにくく、むしろ遺伝子発現を促進する作用があっても不思議ではない。その作用を担っているのは結合蛋白質であるのだから、骨格筋の核抽出物から AAVS1 insulator 結合蛋白質を同

定することが重要である。培養細胞よりも生体において顕著な効果を認めたことは、in vitro での不完全な分化と生体内での最終分化との違いを示しているのかもしれない。また各種 insulator に結合する蛋白質は異なると考えられ、それらの骨格筋における多寡が増強効果の大小に反映されているのかもしれない。

一方で、insulator 搭載により、染色体への組込みとエピソームとの割合、エピソーム内での単量体と連結体との割合など、ベクターゲノムの存在様式が影響されている可能性もあり、検討が必要である。

本実験の発展としてはベクター投与量・観察期間を変化させる実験を行いデータを確定させた上で、他臓器への接種や他の血清型の AAV ベクターでの検討が考えられる。治療用遺伝子の発現を著しく増強できる技術は、治療効果に必要な遺伝子発現レベルへの到達、あるいは十分な発現レベルが得られている場合にはベクター投与量の削減を可能とし、遺伝子治療の有効性・安全性に直結するものである。

E. 結論

AAVS1 insulator および他種の insulator を AAV ベクターに搭載することにより、マウス骨格筋での遺伝子発現が増強された。その中で AAVS1 insulator の効果が最大であった。この系は AAVS1 insulator の解析にも有用である。

AAVS1 insulator 搭載 SIN レンチウイルスベクターを作成し、ゲノムに組込まれた状態での barrier 活性についても検討中である。

AP2 結合領域は barrier 活性には無関係であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1.論文発表

1. Mori,S., Takeuchi,T., Enomoto,Y., Kondo,K., Sato,K., Ono,F., Iwata,N., Sata,T., Kanda,T.:
Biodistribution of Intravenously Administered
AAV-2, 10, and 11 Vectors in Cynomolgus
Monkeys. Jpn. J. Infect. Dis. 59: 285-293, 2006.

2.学会発表

なし。

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ideno, J., <u>Mizukami, H.</u> , Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and <u>Ozawa, K.</u>	Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model.	Int. J. Mol. Med.	19	75-9	2007
Takei, Y., <u>Mizukami, H.</u> , Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., <u>Ozawa, K.</u>	Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector.	Int. J. Cancer	120	278-84	2007
Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., <u>Mizukami, H.</u> , Xin, KQ., <u>Ozawa, K.</u> , Ushijima, H.	Tendon healing <i>in vitro</i> : adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not.	Plast. Reconstr. Surg.	119	227-34	2007
Xin, KQ., <u>Mizukami, H.</u> , Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., <u>Ozawa, K.</u> , and Okuda, K.	The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC.	J. Virol.	80	11899-910	2006
<u>Mizukami, H.</u> , Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., <u>Ozawa, K.</u>	Adipose tissue as a novel target for <i>in vivo</i> gene transfer by using adeno-associated virus vectors.	Hum. Gene Ther.	17	921-8	2006
Ogura, T., <u>Mizukami, H.</u> , Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., <u>Ozawa, K.</u>	Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer.	J. Gene Med.	8	990-7	2006

Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Okuda, K., <u>Ozawa, K.</u>	Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression.	Mol. Ther.	13	823-8	2006
Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., <u>Mizukami, H.</u> , Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., <u>Ozawa, K.</u> , Sakata, Y.	Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene.	Thromb. Res.	118	627-35	2006
Ohmori, T., Mimuro, J., Takano, K., Madoiwa, S., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Niimura, M., Mitomo, K., Tabata, T., Hasegawa, M., <u>Ozawa, K.</u> , and Sakata, Y.	Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Iba promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy.	FASEB J.	20	E769-E779	2006
Machida, Y., Okada, T., Kurosawa, M., Oyama, F., <u>Ozawa, K.</u> , and Nukina, N.	rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	343	190-197	2006
Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Kobayashi, E., and <u>Ozawa, K.</u>	A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells.	Mol. Ther.	13	738-46	2006
Mori, S., <u>Takeuchi, T.</u> , Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Sata, T., Kanda, T.	Biodistribution of Intravenously Administered AAV-2, 10, and 11 Vectors in Cynomolgus Monkeys.	Jpn. J. Infect. Dis.	59	285-293	2006

研究成果の刊行物・別刷

Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble *flt-1* gene transfer in a spontaneously diabetic rat model

JUNICHI IDENO^{1,2}, HIROAKI MIZUKAMI¹, AKIHIRO KAKEHASHI³, YUKA SAITO³,
TAKASHI OKADA¹, MASASHI URABE¹, AKIHIRO KUME¹, MASATOSHI KUROKI⁴,
MASANOBU KAWAKAMI⁴, SHUN ISHIBASHI² and KEIYA OZAWA¹

¹Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, ²Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, Jichi Medical University, Tochigi, Japan; ³Department of Ophthalmology, ⁴Department of Comprehensive Medicine I, Omiya Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan

Received August 11, 2006; Accepted October 2, 2006

Abstract. The number of patients suffering from diabetes mellitus is constantly rising worldwide, and diabetic retinopathy (DR) has become the most frequent cause of postnatal blindness. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to play a central role during DR development. Thus, inhibiting the effects of VEGF may hamper the disease progression, and gene transfer of the soluble VEGF receptor *sflt-1* is an attractive approach for this purpose. However, the lack of suitable animal models hindered the evaluation of this strategy. Recently, the spontaneously diabetic non-obese Torii (SDT) rat was established and is considered as one of the ideal models for human DR. In this study, we evaluated the efficacy of gene therapy in SDT rats by using adeno-associated viral vectors (AAV-*sflt-1*) injected into the subretinal space. Thirty weeks later, the progression of DR was assessed by fluorescein angiography using three parameters; the presence of an avascular area, extensive hyperfluorescein and arterial narrowing. These changes were significantly less evident in the 'treated' eyes than in the control. No adverse effects were observed throughout the study. These results indicate that local *sflt-1* gene transfer inhibits DR progression in SDT rats and offers powerful therapeutic potential for the management of human DR.

Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is one of the major complications of diabetes mellitus (DM), and the most frequent cause of postnatal blindness (1,2). The number of patients suffering

from DM is steadily increasing worldwide (3), and the prevention of DR has become a matter of great importance. Unfortunately, the number of patients who are losing their vision due to DR is increasing despite the technological advancements, especially laser photocoagulation and vitreous surgery. Therefore, the development of a novel therapeutic approach to prevent DR progression has a vital significance.

Proliferative diabetic retinopathy (PDR) is an advanced form of DR characterized by neovascularization, vitreous hemorrhage and tractional retinal detachment. Although a number of biochemical changes, including increased polyol pathway activity (4,5), activation of protein kinase C (6-8) and accumulation of advanced glycation end-products (9,10) were reported in the development of PDR, vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent endothelial cell-specific mitogen, plays a critical role in the angiogenesis of PDR (11-13). The actions of VEGF are mediated by the fms-like receptors, Flt-1 and Flk-1/KDR, which are expressed on vascular endothelial cells, and result in endothelial cell proliferation, migration, and increased vasopermeability with tyrosine kinase activity (14-17). Expression of VEGF is upregulated by hypoxia, and increased vitreous VEGF levels were observed in patients with PDR (12,18,19). Moreover, overexpression of VEGF by photo-receptors in transgenic mice promoted retinal neovascularization (20), whereas antagonists for VEGF suppressed neovascularization in the retina and iris (13,21,22). A soluble form of the VEGF receptor Flt-1 (sFlt-1) is the only known endogenous specific inhibitor for VEGF, and has drawn considerable attention for its potential clinical application in the inhibition of angiogenesis (23-28). It lacks the immuno-globulin-like domain, the transmembrane spanning region and the intracellular tyrosine-kinase domain. The anti-angiogenic activity of sFlt-1 results from the inhibition of VEGF by two mechanisms; the sequestration of VEGF and the formation of inactive heterodimers with membrane spanning isoforms of the VEGF receptors Flt-1 and KDR (26,29). Studies have shown that the administration of viral vectors encoding *sflt-1* inhibited retinal neovascularization in animal models (30,31). However, the actual merits of sFlt-1 in clinically relevant DR models have not been evaluated.

Correspondence to: Dr Hiroaki Mizukami, Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan
E-mail: miz@jichi.ac.jp

Key words: diabetic retinopathy, gene therapy, *sflt-1*, spontaneously diabetic non-obese Torii rat, adeno-associated viral vector