

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 20（2008）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 -----	10
水上 浩明	
2. AAVS1 の insulator 機能の解析とその応用 -----	13
竹内 隆正	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	21
-----------------------	----

## I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

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 19 年度は、更に 1 型 AAV ベクター粒子中の VP1 量の増加を試み、前年度に明らかにした TTG コドンより GTG コドンの方がより AAV の粒子中の VP1 量が多くなることが判明した。VP1 量の増加に伴い、AAV ベクターの感染性（遺伝子導入効率）が増加した。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 19 年度は、肺動脈性肺高血圧のモデルとして、モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットを用い、AAV1 ベクター筋注法による IL-10 およびプロスタサイクリン合成酵素（PGIS）の持続的な体内発現を行った。その結果、肺動脈リモデリング抑制効果と延命効果が認められた。その他、血清脂質と血圧の調節機構における IL-10 の作用機序として、脂質に関しては肝細胞の HMG-CoA 合成酵素遺伝子発現抑制が、降圧に関しては血管の NO 発現亢進が関与する可能性が示唆された。遺伝子治療の臨床開発では、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、遺伝子治療実用化には、その実態解明と対策が急務である。平成 19 年度は、中和抗体と遺伝子導入の効果に関する前臨床研究を行い、低力価の中和抗体でも遺伝子導入効果を著しく阻害させることを見出した。また、導入遺伝子産物に対する免疫反応に関しては、免疫抑制剤により抑制可能であるものの、骨格筋を標的とする場合には肝臓の場合に比べてより長期にわたり免疫抑制が必要と考えられる結果を得た。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 19 年度も、間葉系幹細胞（MSC）への応用実験を引き続き行った。前年度までに得られた血液凝固第 IX 因子遺伝子を AAVS1 領域へ組み込ませた MSC クローンを NOD/SCID マウスの皮下に移植し血液中の第 IX 因子を経時的にモニターしたが、血中濃度は実用レベルに到達せず、MSC 移植法などの改善が必要と考えられた。また、*in vitro* で遺伝子発現の持続期間を調べたところ、AAVS1 領域以外へ組み込まれた場合と、発現持続期間に有意差を認めなかった。詳細に解析したところ、AAVS1 領域の insulator が破壊されており、また導入遺伝子のプロモーター領域の早期のメチル化も観察され、遺伝子発現の早期サイレンシングの原因と考えられた。今後はその対策として、外来性 insulator の導入遺伝子への追加などを検討する計画である。しかしながらこの技術は、将来的には造血幹細胞や ES 細胞、iPS 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ものと期待される。3）AAVS1 内部の insulator 配列を AAV ベクターに応用する研究を継続した。平成 19 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 24 週間にわたり継続して増強された。また遺伝子発現増強に必要な領域は 200bp 弱に絞り込まれた。

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、難病である肺動脈性肺高血圧症の成因として、動脈壁の慢性炎症が注目されていることから、抗炎症性サイトカインの持続発現により病態進展を予防する方法について検討した。また、以前より IL-10 による動脈硬化症と高血圧性臓器障害の進行予防効果について報告してきたが、今回はそのメカニズムについて解析した。本研究の知見が、遺伝子治療のみならず、種々の血管疾患における分子標的療法の開発に応用されることが期待される。

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。そこでこれまで改良してきた各血清型の AAV ベクターに対する中和抗体の検出系を用いて、遺伝子導入実験の効果との関連を検討した。また、導入遺伝子産物に対する免疫反応を制御するために有効な免疫抑制剤の使用法に関しても検討した。

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 19 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、造血幹細胞や ES (embryonic stem) 細胞、iPS 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 19 年度は AAVS1 insulator 配列を AAV ベクターに搭載する実験を継続した。insulator 搭載により遺伝子発現の安定化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) : 前年度と同様、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、SEAP 発現 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。2 型キャプシド発現バキュロウイルスでは AAV キャプシ

ド蛋白質の一つである VP1 の開始コドン  
を 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 の構成比率を野生型 AAV  
の組成である 1:1:10 に近づけるようにし  
ている。1 型 AAV ベクター粒子での VP1 量  
を高めるため、VP1 の開始コドンを ACG 以  
外の非 ATG コドン、ATT、TTG、GTG、CTG  
に変換し VP1 量を最適化することを試み  
た。精製ベクター粒子の銀染色法もしくは  
ウエスタン法で VP1 量を VP2、VP3 と比較  
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 AAV ベクターを  
用いた遺伝子治療モデル実験 (小澤) : モ  
ノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットを  
用い、AAV1 ベクター筋注法による IL-10  
およびプロスタサイクリン合成酵素  
(PGIS) の体内発現を行った。組織所見や  
サイトカイン発現を解析し、病態改善効果  
と延命効果を評価した。また、ダール食塩  
感受性ラットに IL-10 ベクターを筋注後、  
尿中 NO 濃度を測定し、L-NAME による阻害  
実験により IL-10 の降圧作用における NO  
の影響を評価した。さらに、DNA チップを  
用いて、肝細胞の脂質関連遺伝子に対する  
IL-10 の作用を網羅的に解析した。

(iii) 免疫反応に関する解析 (水上) :

(a) 中和抗体と遺伝子導入の効果 : これま  
でに改良を行った各血清型の AAV ベク  
ターキャプシドに対する中和抗体の測定法  
を用いて、実験に用いたサルでの遺伝子導入  
前サンプルにおける中和抗体の力価を再  
測定し、遺伝子導入実験における効果との  
関連を検討した。

(b) 免疫抑制に関する検討 : 導入遺伝子産  
物に対する免疫反応を抑制するために効果  
的な免疫抑制法につき検討した。また、  
標的組織による違いについても検討を行  
った。

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 UEET1 (国立成育医療センター研  
究所の梅澤博士より提供) の AAVS1 領域にヒ  
ト血液凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ  
MSC クローンを 3 株樹立した。それぞれ  
 $5 \times 10^6$  個の細胞を NOD/SCID マウスの皮下  
に移植し経時的に血中ヒト第 IX 因子量を  
モニターした。また、in vitro で培養し  
た時のヒト第 IX 因子の発現持続期間を検  
討した。ヒト第 IX 因子遺伝子の組込み部位  
については、PCR 法で増幅した後、塩基配  
列を決定した。さらに、導入遺伝子のプロ  
モーター領域における CpG 配列のメチル  
化の程度を調べた。

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

(i) insulator 搭載 AAV ベクターからの遺  
伝子発現を調べるため、ヒト EF1 $\alpha$  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  
ス大腿四頭筋への接種を行い、24 週間後  
まで観察した。

(ii) insulator 搭載により AAV ベクター  
ゲノムの遺伝子導入細胞内での状態が変  
化するかどうかを調べた。real-time PCR  
により残存ベクター DNA 量を測定した。ま  
た PlasmidSafe exonuclease を用いて直鎖  
状 DNA (染色体) を消化することにより環  
状 DNA (染色体外) の割合を求めた。

(iii) AAVS1 insulator 搭載による遺伝子  
発現増強機構を解明するために、AAVS1  
insulator の挿入方向・部位を変化させた  
AAV ベクターを用いた実験も行った。また  
AAVS1 insulator の各種断片を挿入した  
AAV ベクターを用いた実験も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するべ

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：VP1の開始コドン種々の非ATGコドンに改変したVP発現バキュロウイルスを用いてSEAP-AAVベクターを作製し、ベクター粒子のキャプシド蛋白質VP1、VP2、VP3の比率を詳細に比較したところ、前年度に同定したTTGコドンよりGTGコドンの方が1型AAVベクター粒子のVP1コピー数が多くなることが分かった。また、VP1量の多いAAVベクターほど、SEAPの発現量が高かった。

(ii) 心血管病変に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験：モノクローリン誘発性肺高血圧症ラットに、IL-10 およびPGIS 発現 AAV1 ベクターを筋注した。IL-10 群では、肺動脈圧低下作用に加え、肺動脈壁肥厚およびマクロファージ浸潤の抑制と、肺組織における IL-6 や TGF- $\beta_1$  の発現低下および hemeoxygenase-1 の発現亢進を認めた。IL-10 は、IL-6 や TGF- $\beta_1$  による培養肺動脈平滑筋細胞の増殖亢進を抑えた。以上より、IL-10 の炎症制御による肺動脈リモデリング抑制機構が推察された。また、PGIS 群においても、病態改善効果と延命効果が生じ、特記すべき副作用は認められなかった。また、ダール食塩感受性ラットにおいて、IL-10 の体内発現により尿中 NO 濃度が増加し、その降圧作用は L-NAME 投与により阻害された。DNA チップ解析では、IL-10 により、ヒト肝細

胞における HMG-CoA 合成酵素遺伝子の発現が抑制された。

(iii) 免疫反応に関する解析：

(a) 中和抗体と遺伝子導入の効果：これまで8型のベクターを用いて肝臓への遺伝子導入を行った3頭のサルにおいてはいずれも効果不十分であったが、これらのサル血清を改良法によって再度測定したところ、いずれも弱陽性であることが判明した。また、改良法で陰性であった個体に遺伝子導入を行ったところ、非常に高い効果が認められた。一方、9型のベクターを用いて同様の実験を行ったところ、中和抗体陰性個体2頭のうち1頭で著効が得られた。

(b) 免疫抑制に関する検討：導入遺伝子産物に対する免疫反応が問題となる変異型サル第IX因子遺伝子を搭載したベクターをサルに接種する実験系を用いて、免疫抑制剤に関する検討を行ったところ、骨格筋・肝臓のいずれにおいても導入遺伝子産物に対する免疫反応を抑える使用法を確立することができた。また、骨格筋を標的とする場合には肝臓の場合に比してより長く（半年以上）免疫抑制が必要であると考えられる結果を得た。

2) 部位特異的遺伝子組み込み法の開発：MSC由来の細胞株UEET1のAAVS1領域に血液凝固第IX因子が組み込まれ、クローン化できた3株をNOD/SCIDマウスの皮下に $5 \times 10^6$ 個移植した。移植2週間後に血中第IX因子濃度がピークに達したが、正常血中濃度の1%以下であった。in vitro培養系では、ヒト第IX因子の発現は一ヶ月程度で低下し、AAVS1領域以外に組み込まれた細胞株と比べて有意差を認めなかった。遺伝子組み込み部位の塩基配列を調べたところ、AAVS1領域のinsulator領域が遺伝子組み込みにより破壊されていることが判明した。また、導入遺伝子のプロモーター領域のメチル化が早期に生じていることがエピジェネティクス解析により示された。

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

(i) 4・12・24 週間後の 3 時点でのルシフェラーゼ活性はほぼ安定しており、insulator 搭載による発現増強が長期間持続することが分かった。

(ii) 残存ベクター-DNA 量および環状 DNA (染色体外) の割合はいずれも各種 insulator 搭載により有意な変化を認めなかった。

(iii) AAVS1 insulator の向きを反対にしても、挿入部位を変更してもルシフェラーゼ活性に有意な変化はなかった。AAVS1 insulator の上流側 1/4 を削除してもルシフェラーゼ活性に影響はなかったが、上流側 3/4 を削除すると顕著にルシフェラーゼ活性が低下した。逆に中央部 200bp 弱のみでも全長とほぼ同じ発現増強効果を認めた。

#### 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: 1 型 AAV ベクターは骨格筋での導入遺伝子の発現が他の血清型 AAV ベクターを凌駕しており、遺伝性疾患における欠損蛋白質の補充療法として利用することが模索されている。大型動物、ヒトで必要とされる量を通常の 293 細胞でのプラスミドトランスフェクションで作製するには多大の労力が必要とされる。バキュロウイルスを用い昆虫細胞で AAV ベクターを作製する方法はスケールアップが容易であることから、大量の AAV ベクター産生に向いている。実際、我々が開発、改良したバキュロウイルス法による 1 型ベクターでヒトを対象とした臨床研究が北米で開始されている。本年度の研究で、1 型 AAV ベクターの発現量を少しでも高めることができれば生体に投与するベクターをより少量にすることができ、有用性は高い。

(ii) 心血管病変に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験: 本研究により、AAV ベクター筋注法が、肺高血圧症モデルに対し安全かつ有効な方法であることが示唆された。また、IL-10 による炎症制御が肺動脈リモデリング予防に有効であったことから、本研究で得られた知見は、種々の血管疾患の治療開発と病態解明に役立つ可能性がある。近年、メタボリック症候群における慢性炎症の役割が注目されているが、脂質および血圧調節における IL-10 の役割が解明されることにより、生活習慣病における新たな分子標的療法の開発につながるかもしれない。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 の免疫系などに対する副作用を検討する必要がある。

(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。これまで 8 型のベクターを用いた肝臓への遺伝子導入法では、マウスにおいては著効が得られるもののサルでは不十分であったことから、種差を含め様々な可能性を想定していたが、低力価の中和抗体による影響であったものと考えられる。なお、9 型を用いた際に中和抗体陰性でも効果不十分な個体が見られたが、この個体の肝臓からはベクター由来の遺伝子は微量に見出されるのみであり、検出感度以下の中和抗体の存在が示唆される。9 型における検出系は 8 型に比べてまだ 4 倍程度感度が低く、今後更に改良を行う必要がある。

一般に導入遺伝子産物に対する免疫反応は制御が困難であるが、既に市販されている免疫抑制剤を用いることで防止可能であることをサルにおいて示すことができた。遺伝子導入産物の全身への供給を目的とする場合には免疫抑制剤を必要とす



る場合がしばしばあるものと思われ、今後臨床研究を準備するに当たりこの点の検討も引き続き必要と考えられる。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発: 前年度に樹立した AAVS1 領域にヒト第IX血液凝固因子遺伝子が組み込まれた MSC クローンをマウスに移植し、血中第IX因子を継続的にモニターしたが、血中濃度は実用化には不十分なレベルであった。導入遺伝子のサイレンシング等の他、MSC 移植法の問題が低値の原因と考えられた。培養実験でも、遺伝子発現が一ヶ月程度しか持続しないことが観察されたが、これは AAVS1 領域の insulator が遺伝子組込みにより破壊され、プロモーター領域のメチル化によるサイレンシングが生じていることが示唆された。今後は、外来性 insulator を導入遺伝子に付加することが必要になると考えられる。このように、技術的な問題点が残されているが、AAV のゲノム組込み機構を利用した遺伝子組込み法は、外来 DNA を比較的簡単に高頻度でゲノムの特定部位 (AAVS1 領域) に特異的に組み込ませることが可能であり、遺伝子導入に伴う挿入変異を契機とした細胞癌化を防ぐ革新的技術で、遺伝子操作の安全性の観点から極めて重要なテクノロジーになることが期待される。将来的には、造血幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞など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: 前年度に引き続き AAVS1 insulator 配列を AAV ベクターに搭載する実験を行った。マウス骨格筋での遺伝子発現の増強は長期間にわたり安定していた。またこの系を用いることで AAVS1 insulator 内で遺伝子発現増強に寄与する部分を絞り込むことができた。AAVS1 insulator に関する基礎的な研究を進める一方、効率のよい転写システムの一部として活用することで遺伝子治療の有効性・安全性に貢献できる。

## 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 ベクターの改良を試み、VP1 の開始コドン を GTG に改変するとベクター粒子中の VP1 含量が増し、結果として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。

- ・ 肺高血圧ラットを用い、AAV1 ベクター筋注法による IL-10 および PGIS の持続的な体内発現を行った。その結果、肺動脈リモデリング抑制効果と延命効果が認められた。また、血清脂質や血圧の調節機構における IL-10 の作用機序について検討した。

- ・ 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、中和抗体は弱陽性であっても遺伝子導入効果を著しく阻害することが判明した。導入遺伝子産物に対する免疫反応を制御する免疫抑制剤を見出した。

- ・ MSC への部位特異的遺伝子導入法の応用として、AAVS1 領域に血液第IX凝固因子遺伝子が組み込まれた MSC クローンをマウスに移植し血中第IX因子の量を測定したが有効血中濃度には達せず、MSC 移植法などの改善が必要と考えられた。また、AAVS1 領域の insulator が遺伝子組込みにより破壊される結果、メチル化によるサイレンシングが起き、遺伝子発現が長期持続しないことが判明した。この問題を解決するには、今後は外来性 insulator の併用が必要と考えられた。

- ・ 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増強され、その効果は 24 週間にわたって安定であった。遺伝子発現増強に必要な領域は 200bp 弱に絞り込まれた。

## 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) Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., and Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J. Gene Med.* (in press)
- 2) Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H., Takayama, T., Ohwada, M., Ozawa, K., and Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. *Mol. Cancer Ther.* 7(3): 704-711, 2008.
- 3) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholsami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16(3): 474-480, 2008.
- 4) Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., and Kume, A.: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* 30(3): 121-127, 2008.
- 5) Okada, T. and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 13: 1887-1891, 2008.
- 6) Urabe, M., Obara, Y., Ito, T., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Targeted insertion of transgene into a specific site on chromosome 19 by using adeno-associated virus integration machinery. In, *Progress in Gene Therapy, Vol. 3, Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy.* (ed. by Bertolotti, R. and Ozawa, K.), World Scientific Publishing Co., pp.19-46, 2008.
- 7) Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., and Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ. Res.* 101: 734-741, 2007.
- 8) Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., and Ozawa, K.: Adeno-associated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-536, 2007.
- 9) Uchida, M., Kirito, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Activation of FKHRL1 plays an important role in protecting erythroid cells from erythropoietin deprivation-induced apoptosis in a human erythropoietin-dependent leukemia cell line, UT-7/EPO. *Int. J. Hematol.* 86(4): 315-324, 2007.
- 10) Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kobayashi, E., and Morita, T.: Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems. *Urology* 70(6): 1230-1236, 2007.
- 11) Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: E2F-6 suppresses growth-associated apoptosis of human hematopoietic progenitor cells by counteracting proapoptotic activity of E2F-1. *Stem Cells* 25: 2439-2447, 2007.
- 12) Miyoshi, T., Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Nakamura, M., Hanafusa, T.,

- Komatsu, N., and Ozawa, K.: Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib. *Exp. Hematol.* 35: 1358-1365, 2007.
- 13) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Transforming activity of purinergic receptor P2Y<sub>2</sub>, G protein coupled, revealed by retroviral expression screening. *Leuk. Lymphoma.* 48: 978-986, 2007.
- 14) Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K., and Xiao, S.: Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp. Mol. Med.* 39: 170-175, 2007.
- 15) Oh, I., Ozaki, K., Miyazato, A., Sato, K., Meguro, A., Muroi, K., Nagai, T., Mano, H., and Ozawa, K.: Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA microarray analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytotherapy* 9: 80-90, 2007.
- 16) Oh, I., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tatara, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K.: Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 956-962, 2007.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, K.Q., 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.
- 20) 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.
- 21) Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228-234, 2007.
- 22) Ito, T., Ozawa, K., and Shimada, K.: Current drug targets and future therapy of pulmonary arterial hypertension. *Curr. Med. Chem.* 14: 719-733, 2007.
- 23) Okada, T., and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. In, *Gene Therapy 2007*, 21<sup>st</sup> Century's Center of Excellence Program of Japanese Ministry of Education and Science (ed. by, Ochiai, T., Shimada, H., and Tagawa, M.), Medical Review Co., pp.106-111, 2007.
- 24) Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T. Antibody-dependent enhancement of adeno-associated virus infection of human monocytic cell lines. *Virology* (in press)
- 25) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y.,

Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T. Tissue distribution of cynomolgus adeno-associated viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in naturally infected monkeys. Arch. Virol. 153: 375-380, 2008.

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。

## II. 分担研究報告

## 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・改良した。また、カニクイザルにおける遺伝子導入の効果と8型のベクターに対する中和抗体との関係を比較検討し、陰性の個体のみにおいて有意の効果が認められ、弱陽性の個体では著しく阻害されるとする結果を得た。これより中和抗体はたとえ低力価であっても存在すれば遺伝子導入効率を著しく低下させることが示唆された。さらには、導入遺伝子産物に対する免疫反応の抑制に関して検討を行い、検討したサル全例において制御可能である免疫抑制剤の使用法を見出すと共に、標的組織によって免疫抑制剤の必要な期間が異なることを示唆する所見を得た。

### 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、中和抗体の力価と遺伝子導入に与える影響の関連には不明な点が多いことから、この点の検討を行った。さらには導入遺伝子産物に対する免疫応答が問題になる実験系では遺伝子導入に際して免疫抑制が必要と考えられることから、免疫抑制に関しても検討を行った。

### 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型及び9型のAAVに対する中和抗体検出法に関して、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：検出のため1アミノ酸変異を有するサル型凝固第IX因子の遺伝子を用い、骨格筋にはCMVプロモーター、肝臓にはhAATプロモーターを用いてベクターを構築した。各々の臓器を標的として遺伝子導入を行い、その効果並びに免疫反応に関して解析を行った。この実験系では導入遺伝子産物に対する免疫反応が予想されるため、長期的な発現のためには免疫抑制の併用が必須と考えられ、この点に関しても検討を加えた。

#### （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で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、8型・9型に関しては検出感度が不十分な原因はこれらのベクターが効率よく感染する細胞が見いだされていないことにあると考えられることから、肝臓及び肺由来の細胞を中心に幅広い細胞に関して感染効率の検討を行った。しかしながらこれまで使用してきているHuh-7ないし293細胞を上回るものはなく、結局これらの細胞にアデノウイルスを共感染させることが現時点では最良であるとの結論を得た。

2. 遺伝子導入実験：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（3頭）においては低い効果が観察されたのみであった。これらの3頭に関して改良法により中和抗体を測定した結果、いずれも弱陽性（ $\times 1 \sim \times 4$ ）と考えられる結果を得た。そこで改良法によっても中和抗体陰性の個体を用いて同様に遺伝子導入を行った結果、治療域に達する効果が観察された。9型を用いた実験では中和抗体陰性の個体2頭の内1頭では十分な効果が認められたが、1頭では不十分であった。また、免疫抑制法としてはタクロリムス（0.06 mg/kg）とエンドキサン（2 mg/kg）の併用が効果的であった。遺伝子導入後半年で免疫抑制を中止したところ、肝臓を標的とした場合にはその後も効果は持続したが、骨格筋に遺伝子導入を行った場合には効果の減弱が認められ、より長期にわたる投与が必要であった。

### 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ようである。8型に関しては中和抗体陰性の個体において高い効果が認められていることから現在の検出感度でも有用である可能性がある。一方、9型に対する中和抗体検出法では、8型の場合に比べても更に4倍程度のベクターを使用する必要があり、それだけ感度は低いものと思われる。このため更に感受性の高い細胞を見いだすべく検討が必要である。また、骨格筋に対する遺伝子導入においてはこれまでの検討でも導入遺伝子産物に対する免疫反応が起きやすく対応に苦慮してきたが、既に使用されている免疫抑制剤によって制御可能であることは朗報である。今後はできるだけ免疫反応を起こさないような遺伝子導入の方法についても検討が必要と考えられる。

### 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するとともに、ベクターキャプシドに対する中和抗体はたとえ低力価であっても遺伝子導入を著しく阻害することが判明した。また、導入遺伝子産物に対する免疫反応を臨床応用可能な薬剤を用いて抑制できることを示した。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）

Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. **J Gene Med** *in press*.

Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, SI., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura,

K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. **Mol Ther** *in press*.

Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circ Res** 101: 734-41, 2007.

Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. **Hypertension** 50: 531-6, 2007.

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.

H. 知的財産権の出願・取得状況  
該当なし



厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

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 24 週間にわたり継続して増強された。insulator 搭載により組織中の残存ベクター-DNA 量が増加することはなく、また染色体外(環状)DNA の割合に変化が起こっているわけでもなかった。一方遺伝子発現増強に必要な領域は 200bp 弱に絞り込まれた。

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。

本年度は前年度に引き続き AAVS1 insulator 搭載 AAV ベクターの transgene 発現増強に関する実験を行った。

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. insulator 搭載 AAV ベクターからの遺伝子発現

前年度と同様にヒト EF1 $\alpha$  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 で挟んだベクターゲノムを基本構造として、ITR とプロモーターの間に対照(ウミ

シタケルシフェラーゼのコード配列の一部(stuffer))、AAVS1 insulator、ニワトリ  $\beta$  グロビン 5'HS4 のコア配列(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。

Balb/c マウス雌 4 週齢の大腿に、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  ゲノムコピーの AAV ベクターを筋注した。4・12・24 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。

プロモーターを HCMV IE エンハンサー/プロモーターに置換した insulator 搭載 AAV ベクターを作成し、 $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種 4 週間後のマウス大腿四頭筋でのルシフェラーゼ発現を調べた。

2. insulator 搭載 AAV ベクターゲノムの遺伝子導入細胞内での状態

$1 \times 10^{10}$  ゲノムコピーの AAV ベクターを Balb/c マウスの大腿に筋注し 4 週間後に全 DNA を回収した。

real-time PCR により残存ベクター-DNA 量を測定した。また PlasmidSafe exonuclease を用い

て直鎖状 DNA (染色体) を消化することにより環状 DNA (染色体外) の割合を求めた。そのためにまずマウス筋芽細胞である C2C12 細胞のゲノム DNA、トランスフェクションによりルシフェラーゼ遺伝子を染色体上に保持するように改変された C2C12 細胞のゲノム DNA、ルシフェラーゼ発現プラスミドの三者を混合することにより、全体の DNA 量およびルシフェラーゼ遺伝子のコピー数を一定に保ったまま、染色体外/染色体上のルシフェラーゼ遺伝子の比率を変化させた標準試料群を作成した。これらを PlasmidSafe exonuclease で処理したところ、染色体外ルシフェラーゼ遺伝子の割合と処理前後のルシフェラーゼ遺伝子コピー数の比は良好な相関を示し標準曲線が得られた。実際の試料に関しては PlasmidSafe exonuclease 処理前後のルシフェラーゼ遺伝子コピー数の比を求め、標準曲線から染色体外ルシフェラーゼ遺伝子の割合を算出した。

### 3. AAVS1 insulator 搭載による遺伝子発現増強の機構解明

i) AAVS1 insulator の向きを反対にした AAV ベクターおよび AAVS1 insulator 挿入部位をポリ A 付加シグナルと ITR の間にした AAV ベクターを作成し、マウス大腿四頭筋でのルシフェラーゼ発現を調べた。

ii) AAVS1 insulator の各種断片を挿入した AAV ベクターを作成し、マウス大腿四頭筋でのルシフェラーゼ発現を調べた。

いずれも  $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種 4 週間後に測定した。

(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. insulator 搭載 AAV ベクターからの遺伝子発現

前年度は  $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種 4 週間後での効果のみを見ていたので、まず接種量を  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  ゲノムコピーに変化させて 4 週間後のルシフェラーゼ発現を調べた。 $1 \times 10^9$  以上の接種量において stuffer 挿入 AAV ベクターと比較して、AAVS1 insulator 搭載で約 1000 倍、cHS4 搭載で約 100 倍、ArsI 搭載で 10 倍弱の発現増強を認め、 $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種で実験を行うことの妥当性が示された。

次に  $1 \times 10^9$  ゲノムコピー接種後 12 および 24 週間後のルシフェラーゼ活性を測定した。 $4 \cdot 12 \cdot 24$  週間後の 3 時点での値はほぼ安定しており、insulator 搭載による発現増強が長期間持続することが分かった。

また骨格筋において高発現する HCMV IE エンハンサー/プロモーターにいずれの insulator を付加してもルシフェラーゼ活性に有意な変化はなかった。一方で AAVS1 insulator とヒト EF1  $\alpha$  プロモーターの組み合わせは HCMV IE エンハンサー/プロモーターに匹敵する転写活性があることが分かった。

### 2. insulator 搭載 AAV ベクターゲノムの遺伝子導入細胞内での状態

接種後 4~24 週間の間にルシフェラーゼ活性の大きな変化を認めなかったことから、 $1 \times 10^{10}$  ゲノムコピー接種後 4 週間の筋肉から回収した DNA を用いて実験を行った。

real-time PCR による定量では stuffer、AAVS1 insulator、cHS4、ArsI 搭載 AAV ベクターの残存量はそれぞれ  $0.75 \pm 0.22$ 、 $1.11 \pm 0.93$ 、 $2.79 \pm 2.62$ 、 $0.87 \pm 0.55$  コピー/マウスゲノムであり、insulator 搭載の有無で有意差を認めなかった。

次に insulator 搭載が AAV ベクターの染色体への組込み頻度に影響を及ぼすかどうかを調べた。PlasmidSafe exonuclease を用いて直鎖状 DNA (染色体に組込まれたベクター DNA) を消化することにより環状 DNA (染色体外) と区別することができる。残存 DNA 中、環状のもの割合は stuffer、AAVS1 insulator、cHS4、ArsI 搭載 AAV ベクターでそれぞれ  $44.5 \pm 15$ 、 $50.8 \pm 11.3$ 、 $50.1 \pm 11.3$ 、 $33.4 \pm 10.8\%$  と算出され、insulator 搭載の有無で有意差を認めなかった。

### 3. AAVS1 insulator 搭載による遺伝子発現増強の機構解明

- i) AAVS1 insulator の向きを反対にしても、挿入部位を変更してもルシフェラーゼ活性に有意な変化はなかった。
- ii) AAVS1 insulator を上流側 1/4 を削除してもルシフェラーゼ活性に影響はなかったが、上流側 3/4 を削除すると顕著にルシフェラーゼ活性が低下した。逆に中央部 200bp 弱のみでも全長とほぼ同じ発現増強を認めた。

### D. 考察

本年度の研究ではまずベクター投与量・観察期間を変化させても insulator 搭載による発現増強が一貫して認められることを確認した。その上で発現増強が(二本鎖 DNA への変換効率も含めた)残存ベクター DNA 量あるいは環状 DNA の割合によっては説明できないことが分かった。従って発現増強は主として染色体外環状ベクターゲノムからの転写亢進によるものと考えられる。ヒストン修飾などのエピジェネティックな機構が関与しているかどうかは今後の研究課題である。

また極めて高い転写活性を持つ HCMV IE エンハンサー／プロモーターからの発現をさら

に増強することはいずれの insulator でもできなかったが、強力なエンハンサーはヒストンのアセチル化を必要とせずに転写を活性化するという報告があり、insulator 結合蛋白質によるヒストン修飾がベクターゲノムからの転写亢進に関与しているという仮説と矛盾しない。

AAVS1 insulator に注目すると、この領域は *PPP1R12C* 遺伝子上流(転写開始点から 1kb 以内)に存在するため、cryptic なプロモーターとしての活性が考えられる。しかし発現増強が AAVS1 insulator の方向および挿入部位に依存しないことからこの機構の寄与は小さい。またこの結果は AAV ベクターが染色体外で環状化し、それらが head-to-tail の連結体を形成したものが遺伝子発現の主体となっていることと一致する。

AAVS1 insulator による発現増強には何らかの蛋白質が関わっていると考えられ、AAVS1 insulator 内部にその結合配列が存在するはずである。発現増強効果を指標に絞り込まれた AAVS1 insulator の中央部 200bp 弱にはヒト・チンパンジー・サル・イヌ・ラット・マウスのゲノム間で保存された配列があり、この部分に結合する蛋白質により発現増強がもたらされている可能性が高い。面白いことに種間の保存という意味では下流側 1/4 の部分の方が高度であったが、この部分は AAV ベクターからの発現増強に寄与しなかった。この領域はゲノム上では *PPP1R12C* 遺伝子の転写に深く関わるものの、単離した場合には顕著な発現増強活性を示さないのかもしれない。もう一つの可能性として、下流側 1/4 に barrier 活性を担う配列があり中央部の配列は *PPP1R12C* 遺伝子以外の遺伝子に対する enhancer として機能していることも考えられる。

今後は発現増強機構の解明の一方で、短く転写活性の高い発現カセットの要素としての活

用が実用的には役立つ。最終的には小動物の疾患モデルにおける有効性の検討が遺伝子治療への応用の鍵となる。

## E. 結論

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増強され、その効果は 24 週間にわたって安定であった。insulator 搭載により組織中の残存ベクターDNA 量が増加することはなく、また染色体への組込みの促進が起こっているわけでもなかった。一方遺伝子発現増強に必要な領域は 200bp 弱に絞り込まれた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Sata, T., Kanda, T.: Tissue Distribution of Cynomolgus Adeno-associated Viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in Naturally Infected Monkeys. Arch. Virol., 153, 375-380, 2008

2. Mori, S., Takeuchi, T., Kanda, T.: Antibody-Dependent Enhancement of Adeno-Associated Virus Infection of Human Monocytic Cell lines. Virology, in press

### 2. 学会発表

1. 内野 繭代、竹内 隆正、森 清一郎、神田 忠仁: インスレーターあるいは MAR を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) の開発. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)、2007 年 12 月

## 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。