

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 20（2008）年 4 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

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

## I. 総合研究報告

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

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。1、8型 AAV ベクターを昆虫細胞で作製する方法を確立するため、1、8型キャプシド発現組換えバキュロウイルスを作製し、それぞれ細胞あたり  $3 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  個の1、8型 AAV ベクターを産生することができた。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。その際、高血圧症や高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病から、肺動脈性肺高血圧症などの難病にいたるまで幅広い疾患に対応できる治療システムの開発を検討した。高血圧症性臓器障害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、肺高血圧症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（MCT-PAH）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。その結果、炎症抑制と高血圧および肺動脈リモデリングの改善に伴い、脳卒中、心不全、肺高血圧症の発症および進行予防効果と延命効果が認められた。また、血清脂質と血圧の調節機構における IL-10 の作用機序を解析し、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ことを明らかにした。さらに、プロスタサイクリン合成酵素（PGIS）発現 AAV1 ベクターを肺高血圧症モデルラットに筋注し、特記すべき副作用が生じないことを確認した。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、遺伝子治療の実用化には、その実態解明と対策が急務である。このため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し、導入遺伝子の発現との関連を検討した。遺伝子導入前の中和抗体に関する検討では、検出感度の向上に向けた取り組みを行なうと共に、中和抗体と遺伝子導入の効果に関する検討を行い、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、カニクイザルのコロニーにおいては8型及び9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。一方、導入遺伝子産物に対する免疫反応については、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、5型を用いた場合に非常に高い効率が見出された。また、免疫抑制剤により導入遺伝子産物に対する免疫反応は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。多分化能を有する間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）への AAVS1 特異的遺伝子導入法を確立するため、ヒト骨髄ストローマ細胞由来の KM-102 細胞もしくは、MSC より樹立された UEET1 細胞の AAVS1 領域に遺伝子を導入する方法を確立した。AAVS1 特異的外来 DNA の組込みに伴う影響を解析し、MSC の形質への影響が

ないことが判明した。尚、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。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 機能解析を培養細胞で行った。またこの領域および他種の 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 24 週間にわたり継続して増強された。AAVS1 insulator 搭載の効果が最大であり、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、血管の慢性炎症が病態進展に

おいて重要視されている高血圧性臓器障害と肺高血圧症に対し、抗炎症性サイトカイン IL-10 を持続的に体内発現させる方法の有効性について、疾患モデル動物を用いて検討した。また、我々の研究で明らかにされてきた IL-10 の血清コレステロール低下作用と血圧降下作用について、その作用機構を解析した。さらに、AAV1 ベクター筋注法の副作用について、プロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) 発現ベクターを用いて検討した。本研究の結果は、血管疾患に対する遺伝子治療法の改良のみならず、慢性炎症が強く病態に影響すると考えられるメタボリック症候群や動脈硬化症における、新たな分子標的療法の開発にも役立つものと考えられる。

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遺伝子導入に伴う免疫反応が無視できないことが明らかになってきており、この現象の解明とその制御が重要になりつつある。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の効果との関連を検討した。また、臨床応用の可能性が高い 8 型、9 型のベクターに対する中和抗体の陽性率をサルにおいて検討した。さらに、免疫反応を抑えつつ効果が期待で

きる条件を探索するために、抗原提示細胞に対する遺伝子導入効率に関して比較検討を行うとともに、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。特に、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、培養細胞を用いた AAVS1 insulator の機能解析を行った。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 insulator 搭載 AAV ベクターを作成し、生体内での活性を調べた。AAVS1 insulator の機能解明とともに実用的には insulator 搭載により AAV ベクターからの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) : 293 細胞で AAV ベクターを作製する場合と同様、2 型 ITR (inverted terminal repeat) で挟んだレポーター遺伝子 (GFP もしくは分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP)) を 1 ないし 8 型 AAV キャプシドにパッケージするため、2 型 Rep 発現バキュロウイルス、そして 1、8 型キャプシド蛋白質 VP を発現する組換えバキュロウイルスを構築し、それらを同時に培養昆虫細胞 Sf9 に感染させ 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 AAV ベクターの作製の際、AAV キャプシド蛋白質 VP1、VP2、VP3 は VP1 の開始コドン ATG を ACG コドンに改変することにより一つの 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た。VP1 の発現量を変えるため 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 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 GFP ベクターは 293 細胞に感染させ、蛍光顕微鏡で観察し、発現レベルを検討した。SEAP ベクターは同様に 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 および PGIS 発現 AAV1 ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験と IL-10 の作用機序の解析 (小澤) :

(a) 脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP) : 遺伝的要因に基づく高血圧自然発症ラットのモデルであり、血圧、神経症状、脳血管・腎における組織所見、サイトカインの発現変化を解析し、IL-10 による脳卒中予防効果と延命効果を評価した。

(b) ダール食塩感受性ラット : 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と心不全のモデルとして用いた。血圧および心エコー上の心肥大や心収縮能について、経時的に評価した。さらに、心・腎における組織所見とサイトカインの発現変化を解析し、IL-10 による心不全予防効果と延命効果を評価した。IL-10 による降圧作用の機序解明のために、尿中 NO 濃度を測定し、L-NAME 慢性投与による阻害実験を行った。

(c) MCT-PAH ラット : 肺動脈性肺高血圧症の最も一般的なモデルである。肺動脈圧測定や肺動脈の組織学的検討により、IL-10 および PGIS の体内発現による進行予防効果と延命効果を評価した。さらに、PGIS 発現 AAV1 ベクターの筋注による、肝・腎・血球系への

影響を調べた。

(d) IL-10 の脂質制御機構：ヒト培養肝細胞株 (HepG2) を用いて、脂質関連遺伝子に対する IL-10 の作用を、DNA チップ解析で網羅的に解析した。

(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、9 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) 中和抗体に関する検討：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。特に霊長類医学研究センターにおける SPF 化と中和抗体陽性率との関連について検討した。更に遺伝子導入実験に用いたサルの導入前サンプルにおける中和抗体の力価を測定し、遺伝子導入実験における効果との関連を検討した。(c) 抗原提示細胞に対する遺伝子導入・発現効率に関しては、マーカー遺伝子を搭載した各血清型のベクターを作製し、同一条件下で遺伝子導入を行って血清型による違いを比較検討した。また、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。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発 (小澤)：ヒト骨髄ストローマ細胞由来の KM-102 細胞には Rep 発現プラスミドと GFP とブラストサイジン S 耐性遺伝子 (bsr) を ITR ではさんだプラスミドをリポフェクション法により導入した。また、MSC をヒトパピローウイルス 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) には、Rep 発現プラスミドと、血液凝固第 IX 因子と bsr 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

現は GFP の場合は蛍光顕微鏡での観察で、第 IX 因子の場合は培養上清の第 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 アレルが破壊されると考えられるが、その影響を調べるため MBS mRNA の定量をリアルタイム RT-PCR 法にて行った。その他、樹立株の増殖能、サイトカイン産生量を親株と比較した。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 3 株は、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 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) 培養細胞を用いた AAVS1 insulator の機能解析： $\lambda$ ファージ DNA を陰性対照、ニワトリ  $\beta$  グロビン 5' HS4 のコア配列 (cHS4) を陽性対照とする enhancer blocking assay を 293 細胞で行った。またウミシイタケルシフェラーゼのコード配列の一部 (stuffer) を陰性対照、cHS4 を陽性対照とする barrier 活性の実験を HeLa 細胞で行った。

(ii) AAV ベクターへの insulator の搭載：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 (stuffer、AAVS1 insulator、cHS4、ウニアルルスルファターゼ insulator (ArsI)) を挿入し、AAV2 型のベクターを作成した。マウス大腿四頭筋への接種を行い、4・12・24 週間後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(iii) AAVS1 insulator 搭載による遺伝子発

現増強機構の解析:まず 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。次に、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。一方、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を行った。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:

(a) 1、8型AAVベクターが培養昆虫細胞Sf9あたりそれぞれ $3 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 個のAAVベクターを産生することができた。293細胞での作製法と同様に、2型AAVベクターゲノムを効率良く1、8型AAVキャプシドを組み込ませることが、昆虫細胞でも可能であることが分かった。

(b) 2型AAVベクターにはVP1の開始コドンにACGに改変したものをを用いて2型キャプシドを発現させていたが、1、8型とも293細胞で作製したものと比べてベクター粒子内のVP1量が少なかった。VP1はAAVが細胞に感染後、エンドゾーム内から細胞質内に放出される際に、エンドゾーム膜を破る作用がある。したがって、ウイルス粒子のVP1の分子数が少

ないと、AAVベクターはエンドゾーム内に留まったままとなり導入遺伝子の発現が得られない。そこでVP1の開始コドンに他の非ATGコドンに変換しVP1の発現量を解析したところ、1型ではGTGが、8型ではCTGがベクター粒子内のVP1量が最も増加することが分かった。VP1の発現量に応じてGFPもしくはSEAPの発現量が増加し、293細胞で作製したものと遜色ない発現レベルが得られた。

(ii) 心血管病変に対する IL-10 および PGIS 発現 AAV1 ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験と IL-10 の作用機序の解析:

(a) 脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP): 血中 IL-10 濃度の上昇に伴い、高血圧が抑えられ、脳卒中および腎不全の進行が予防され、生存率が改善した。組織所見では、脳および腎血管周囲のマクロファージ浸潤と、炎症性転写因子 NF- $\kappa$ B の発現が抑制されていた。

(b) ダール食塩感受性ラット: IL-10 群で、高血圧が抑えられ、心肥大・心収縮障害と心筋線維化が抑制されていた。血中 TNF- $\alpha$  濃度が低下し、心筋 TGF- $\beta_1$  発現が減少していたことから、IL-10 による心筋リモデリング抑制の機序として、炎症制御機構の関与が示唆された。心不全マーカーである ANP の発現低下、心・肺重量の低下を認め、うっ血性心不全の進行が抑制された。さらに、腎機能改善効果と延命効果を認めた。IL-10 群では、尿中 NO 濃度が増加し、IL-10 の降圧作用が L-NAME 投与により阻害されたことから、作用機序における NO の関与が示唆された。

(c) MCT-PAH ラット: IL-10 群および PGIS 群において、肺動脈圧が低下し、肺動脈壁肥厚度が改善し、延命効果が認められた。IL-10 群では、血管周囲のマクロファージ浸潤と血管壁の増殖反応 (PCNA 免疫染色と培養肺動脈平滑筋細胞を用いた実験) が抑制され、肺組織液の IL-6 と TGF- $\beta_1$  濃度が低下していた。また、PGIS 発現ベクターの筋注により、血清中の肝逸脱酵素 (AST、ALT) やクレアチニン濃度および血球数に変化はなかった。

(d) IL-10 の脂質制御機構: DNA チップ解析



では、IL-10 添加により、ヒト肝細胞における HMG-CoA 合成酵素遺伝子の発現は抑制され、PPAR 結合蛋白質の発現は亢進していた。(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。中和抗体と遺伝子導入の効果については、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。(c) 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、5 型由来のベクターを用いた場合に顕著な遺伝子導入・発現が起こるが、1 型ないし 8 型を用いた場合には極めて低いことを見出した。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込み法の開発.

### (a) KM-102 での AAVS1 特異的組込み：

KM-102 を用いた実験では、ブラストサイジン S 耐性クローンが 30 個得られ、3 個のクローンでサザンブロット解析より GFP 遺伝子の AAVS1 特異的組込みが認められた。しかもこれら 3 クローンでは AAVS1 領域にのみ GFP 遺伝子が組み込まれており他の部位には組み込まれていないと考えられた。挿入部位の同定を AAVS1 特異的プライマーと GFP 発現カセット特異的プライマーを用いて行い、3 クローン中 2 クローンで AAVS1 領域と GFP 遺伝子との結合配列が検出され、AAVS1 領域に組み込まれていることを確認できた。MBS85 mRNA の定量に関して、AAVS1 領域に組み込まれた 3 クローンすべてで野生型と比べて約 50% に mRNA 量が低下していた。一方、GFP 遺伝子が AAVS1 以外に組み込まれているクローンでは MBS85 mRNA の低下は認められなかった。KM-102 は IL-1 刺激により G-CSF を産生するが、AAVS1 に GFP 遺伝子が組み込まれたクローンでは IL-1 に対する反応性は親株と変わりなかった。また、クローンの増殖スピード、形態等も親株と変わりがなかった。(b) UEET1 での AAVS1 特異的遺伝子導入：

ブラストサイジン S 耐性クローン 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。UEET1 は IL-6 (約 1800 pg/ml)、VEGF (約 2400 pg/ml) を産生するが、AAVS1 に組み込まれたクローンでは IL-6 は 2-25 pg/ml、VEGF は 180-800 pg/ml であった。サイトカインの分泌低下は AAVS1 領域以外に組み込まれたク

ローンでも同様に認められた。

(c) 第IX因子発現 MSC クローンの移植実験ならびに遺伝子発現持続期間に関する *in vitro* での検討：

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) 培養細胞を用いた AAVS1 insulator の機能解析：

293 細胞を用いた enhancer blocking assay では AAVS1 insulator 中の 2 カ所のよく似た配列が重要であり、これらには AP2 が結合するという結果を得た。そこで HeLa 細胞において AP2 結合配列が barrier 活性に必要なかどうかを調べたが、変異導入の有無で有意差を認めなかった。

(ii) AAV ベクターの接種量を  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  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。いずれの接種量においても 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・12・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。

(iii) 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。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、8 型 AAV ベクターはそれぞれ骨格筋、肝臓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。骨格筋、肝臓とも大型臓器であるため、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法で作製するには多大の労力が必要である。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方法による 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。本研究で 1、8 型 AAV ベクターの作製系を確立できたことは今後 AAV ベクターを大型動物、ヒトでの投与の必要なベクターを供給できるシステムが整ったという意味において極めて意義深い。

1、8 型 AAV ベクターの作製にあたって 293 細胞由来の AAV ベクターと同程度の potency を持たせるため、2 型 AAV ベクター作製時に用いていた VP1 の開始コドン ACG を 1 型では GTG に、8 型では CTG に置き換えることにより VP1 の発現量が増し、最終的に AAV ベクター一粒子内に組み込まれる VP1 が増え、293 細胞で作製したものと同程度の感染性を保持

した AAV ベクターとすることができた。非 ATG コドンからの翻訳開始効率は開始コドンそのもの以外に周辺の RNA 配列、2 次構造等が複雑に絡み合っていると推察される。そのために、各血清型で最適な非 ATG コドンに違いが生じたと考えられる。

(ii) 心血管病変に対する IL-10 および PGIS 発現 AAV1 ベクターを用いた遺伝子治療モデル実験と IL-10 の作用機序の解析：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および肺動脈圧降下作用という、新しい知見が得られた。IL-10 の体内発現による炎症制御で、様々な疾患モデルの血管病変を予防できたことから、本研究の知見は、種々の血管疾患の治療開発に役立つものと考えられる。また、高血圧症のみならず、脂質・糖代謝異常においても慢性炎症の関与が注目されていることから、IL-10 の作用機序の解明により、メタボリック症候群などの生活習慣病における新規の分子標的探索につながる可能性もある。実際、今回の DNA チップ解析の結果では、IL-10 が PPAR など糖・脂質代謝に重要な転写因子に有益に作用する可能性が示唆されている。IL-10 の作用を更に詳細に解析することにより、代謝異常における慢性炎症の役割が、より深く解明されることが期待される。一方、我々の検討では、AAV1 ベクター筋注法により、主要臓器における特記すべき副作用は生じなかった。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 の免疫系などに対する副作用や腫瘍形成における役割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。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。

霊長類医学科学研究センターにおけるカ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。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、この個体の肝臓にはベクター由来の遺伝子は微量しか見出されず、検出感度以下の中和抗体の存在が強く示唆される。9 型に対する中和抗体の検出感度は 8 型に比べてまだ 4 倍程度低く、今後更に改良を行う必要がある。

樹状細胞に対する遺伝子導入効果に関しては、5 型とそれ以外を用いた場合とで大きな開きがあり、この違いが何故起こるのかに関しても大きな興味を持たれる。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、これらのベクターを用いて応用開発を進めることを後押しする成果といえる。なお、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最適化も検討が必要と考えられる。

2) 部位特異的遺伝子組込み法の開発：AAV の部位特異的組込み機構を利用し MSC の AAVS1 領域 (19q13.4) への遺伝子挿入を試みた。ヒト骨髄ストローマ細胞由来の KM-102

細胞とヒト MSC 由来の UEET1 株に Rep 発現プラスミドと、前者では GFP/bsr 遺伝子、後者ではヒト血液凝固第 IX 因子/bsr 遺伝子を ITR の間に配したプラスミドをコトランスフェクションし、プラストサイジン S 存在下で培養し耐性クローンを得た。サザンブロット法、PCR 法で解析したところ、KM-102 では 30 クローン中 3 クローンに、UEET1 では 44 クローン中 4 クローンで AAVS1 領域に遺伝子が組み込まれていた。特異的組込み効率を更に上げることが望まれる。

AAVS1 領域にコードされている MBS85 遺伝子は外来遺伝子の組込みにより破壊されると考えられるが、予想通り AAVS1 への特異的組込みが起こっているクローンでは MBS85 mRNA が親株に比べて減少していた。MBS85 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している蛋白質である。細胞の機能には必須の蛋白質であると考えられるが、ヘテロノックアウトマウスの様に 1 アレル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。事実、AAVS1 に遺伝子が組み込まれた KM-102 でも UEET1 でも、増殖能は親株と同程度であり、特に UEET1 由来の株では親株と同様に、数ヶ月の培養後増殖を停止したことから、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。しかしながら、MBS85 の 1 アレル破壊に伴う影響の有無に関しては注意深く観察が必要であろう。

ヒト第 IX 因子を恒常的に発現する UEET1 クローンのマウスへの移植実験では、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思われる。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でき、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である。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ると期待され、実用化に向けた研究開発を強力に推進する価値があると思われる。

3) AAVS1 の insulator 機能に関する解析とその応用: 培養細胞を用いた機能解析においては複数の実験系において重要な配列が必ずしも一致せず、生体内での意義付けも困難な状況であった。一方、遺伝子治療への insulator の活用はレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターといったゲノム組込型ウイルスベクターにおいて行われているが、非ゲノム組込型ウイルスベクターに insulator を搭載して非分裂細胞へ長期間に亘り遺伝子導入する研究は行われていない。そこで臨床試験と同様の AAV ベクターを骨格筋に投与する系で、insulator の効果を調べた。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、AAVS1 insulator の効果が最大であった。発現増強機構の解析の第一歩として、残存ベクター DNA の量および染色体との関係 (組込みの確率) は insulator の影響を受けないことが分かり、転写の効率が上昇していると考えられた。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。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 293 細胞で作製したものとほぼ同等の 1、8 型 AAV ベクターを作製する手法を開発した。
- ・ 脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP)、ダール食塩感受性ラット、モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットを用い、IL-10 発現 AAV ベクター筋注法による遺伝子治療モデル実験を行った。慢性炎症の制御に伴い、病態改善効果と延命効果が認められた。また、AAV1 ベクター筋注法により、特記すべき副作用は生じなかった。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ 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。また、導入遺伝子産物に対する免疫反応を制御しう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への確立に向けて、KM-102、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。しかし、そのような 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。今後は、外来性 insulator を付加すること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。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。

## 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., Sheykholslami, 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 FKHL1 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, 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.
- 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) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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 promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J.* 20: E769-E779, 2006.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.
- 34) Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.
- 35) Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.
- 36) Liu, Y., Okada, T., Sheykhholeslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.
- 37) Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.
- 38) Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-70, 2005
- 39) Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T. Antibody-dependent enhancement of adeno-associated virus infection of human monocytic cell lines. *Virology* (in press)
- 40) 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.
- 41) 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

- 1) 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

- 2) 岡田尚巳、小澤敬也：ベクター産生  
型間葉系幹細胞.

特願 2006-116504

平成 18 年 4 月 20 日出願

- 3) 岡田尚巳、小澤敬也：ウイルス中空  
粒子の迅速除去および精製方法.

特願 2005-314476

平成 17 年 10 月 28 日出願

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Urabe, M., Obara, Y., Ito, T., Mizukami, H., Kume, A., and <u>Ozawa, K.</u>	Targeted insertion of transgene into a specific site on chromosome 19 by using adeno-associated virus integration machinery.	Bertolotti, R. and <u>Ozawa, K.</u>	Progress in Gene Therapy, Vol. 3, Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy.	World Scientific Publishing Co.	Singapore	2008	19-46
Okada, T., and <u>Ozawa, K.</u>	Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy.	Ochiai, T., Shimada, H., and Tagawa, M.	Gene Therapy 2007, 21 <sup>st</sup> Century's Center of Excellence Program of Japanese Ministry of Education and Science	Medical Review Co.	Tokyo	2007	106-111

## 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
Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats	J. Gene Med.		in press	2008
Takei, Y., Saga, Y., <u>Mizukami, H.</u> , Takayama, T., Ohwada, M., <u>Ozawa, K.</u> , and Suzuki, M.	Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice.	Mol. Cancer Ther.	7	704-711	2008
Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea.	Mol. Ther.	16	474-480	2008

<u>Ozawa, K.</u> , Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., <u>Mizukami, H.</u> , and Kume, A.	Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs).	J. Autoimmun.	30	121-127	2008
Okada, T. and <u>Ozawa, K.</u>	Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy.	Front. Biosci.	13	1887-1891	2008
Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats.	Circ. Res.	101	734-741	2007
Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Adeno-associated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats.	Hypertension	50	531-536	2007
Uchida, M., Kirito, K., Endo, H., <u>Ozawa, K.</u> , and Komatsu, N.	Activation of FKHL1 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	315-324	2007
Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., <u>Ozawa, K.</u> , Kobayashi, E., and Morita, T.	Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsiptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems.	Urology	70	1230-1236	2007
Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., <u>Ozawa, K.</u> , 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