The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	高い安全性を有する改良型アデノウイルスベクターによる新生児および胎児遺伝子治療法の開発に関する研究
Author(s)	飯塚, 俊輔
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72308
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　飯塚俊輔　　）	
論文題名	高い安全性を有する改良型アデノウイルスベクターによる新生児および胎児遺伝子治療法の開発に関する研究

論文内容の要旨

【背景・目的】

生まれつき遺伝子に変異を有することにより疾患を発症する先天性遺伝子疾患の多くは、現行の対症療法では十分な治療効果が得られないことから、革新的な治療法の開発が求められている。一方、正常な遺伝子を患者の細胞に導入・発現させることで治療を行う遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患に対する革新的な治療法として期待されている。特に近年は、症状が進行する前より治療を行うことを目的として、胎児期・新生児期より遺伝子治療を行う試みに注目が置かれている。例えば、ノバルティス社が開発を手掛ける脊髄性筋萎縮症に対する新生児遺伝子治療薬は、生後1～8か月の患者を対象とした臨床試験において高い治療効果を示し、本邦において先駆け審査制度の対象に指定されている。新生児・胎児遺伝子治療に用いる遺伝子導入ベクターとしては、成体への遺伝子治療と同様、様々な遺伝子導入ベクターが用いられている。しかしながら、増殖期にある細胞が豊富な新生児・胎児では、一部のベクターで挿入変異による腫瘍様組織の形成が懸念されている。そこで本研究では、遺伝子毒性が極めて低く、また、高効率な遺伝子導入が可能なアデノウイルス（Ad）ベクターを用いて、新生児および胎児への安全かつ治療効果の高い遺伝子治療法を開発することを目的とした。

【結果・考察】

急激な発達の過程にある新生児の体において、遺伝子治療薬の効果・副作用は、成体とは異なる可能性が考えられる。従って新生児に適した遺伝子治療薬を開発するためには、遺伝子導入ベクターの新生児における基本的な遺伝子導入特性の解明が求められる。そこで、Adベクターの新生児マウスにおける基本的な遺伝子導入特性の解明を目的として、ルシフェラーゼ遺伝子を搭載した従来型Adベクターを、生後2日の新生児マウスに静脈内投与し、遺伝子導入特性を検討した。その結果、Adベクターは新生児マウスにおいて、肝臓特異的にルシフェラーゼ遺伝子を高発現させることが可能であり、肝臓にて発現する遺伝子の変異に起因する疾患に対して有用であることが示唆された。しかしながら、肝臓におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現量は徐々に低下し、Adベクター投与28日後には検出限界以下の値となった。成体マウスを用いた過去の検討より、Adベクターは遺伝子導入細胞において、ベクターゲノム上にコードされたAd遺伝子がわずかに発現してしまい、細胞毒性が誘導されることが報告されている。新生児マウスにおいても同様の原因により、導入遺伝子の発現が低下したものと考えられた。

そこで、Adベクターゲノム上のAd遺伝子の発現を抑制することで、長期にわたる遺伝子発現ならびに治療効果が得られることを期待し、当研究室で独自に開発した改良型Adベクター（Ad-E4-122aT）を新生児遺伝子治療薬に用いることを着想した。Ad-E4-122aTでは、肝臓特異的に高発現しているmicroRNAであるmiR-122aの標的配列が、Ad遺伝子の一つであるE4遺伝子（E4遺伝子産物は、他のウイルス遺伝子の発現を誘導する）の下流に挿入されている。従って、肝細胞において、miR-122aによりE4遺伝子の発現が抑制されることで、ほぼ全てのAd遺伝子の発現が抑制されるよう設計されている。Ad-E4-122aTを新生児マウスに投与したところ、従来型Adベクター投与群と比較して、肝臓におけるAd遺伝子の発現は1/10以下に抑制されており、肝障害性が軽減されていた。さらに、マウス分泌型アルカリホスファターゼ（mSEAP）遺伝子を搭載したAd-E4-122aTを新生児マウスに投与したところ、150日間にわたってmSEAPを高発現させることが可能であり、安全かつ長期的な遺伝子治療効果が得られることが示唆された。

そこで次に、Ad-E4-122aTの新生児マウスにおける遺伝子治療効果を評価するため、肝臓にて発現する血液凝固第9因子（FIX）遺伝子の変異により血液凝固反応に異常が生じる、血友病Bに対する遺伝子治療を試みた。FIX遺伝子を搭載したAd-E4-122aTを血友病Bモデル新生児マウスに投与したところ、治療域である正常値の1%以上の血中FIX濃度を200日以上にわたり維持することに成功した。また、マウスの止血能を評価したところ、野生型マウスと同レベルまで回復していた。以上の結果より、血友病B新生児に対して、Ad-E4-122aTを用いることで、高い遺伝子治療効果を得られることが示唆された。

また血友病患者は、胎生期にはすでに血液凝固反応に異常が見られるため、出生時に産道で外圧がかかることで頭蓋内出血を引き起こし、後に障害を負うことが報告されている。そのため、胎生期の血友病患者に対する有効な治療法の開発が求められる。しかしながら、現行の胎児遺伝子治療では、母体内の胎児に直接ベクターを注入する

手法が用いられおり、極めて侵襲性が高い。そこで、低侵襲的な手法で血友病胎児を治療可能な新規胎児遺伝子治療法の開発を試みた。母体血液と胎児血液との間で物質交換を行う胎盤では、幾重もの細胞層により構築される「血液胎盤関門」によって、タンパク質の移動は制限されている。一方で、免疫グロブリンG（IgG）は、重鎖内のFc領域が胎児型Fcレセプターと結合することで、トランスサイトーシスにより母体血液から胎児血液へと移行する。そこで、IgGのFc領域をFIXに融合することで、FIXに胎盤透過性を付与することが可能になると考えた。さらには、母体血中からFc融合FIX（FIXFc）を胎児側へと送達することで、低侵襲的に血友病B胎児の治療が可能になると着想した。そこでまず、FIXFc発現Ad-E4-122aTを妊娠13日の血友病Bモデルマウスに静脈内投与後、生後0日の新生児マウスより血液を回収し、FIX量を測定した。その結果、Fc領域を融合していないFIX遺伝子を発現するAd-E4-122aT投与群では、新生児マウス血中からFIXは検出されなかった。その一方で、FIXFcを発現するAd-E4-122aT投与群では、新生児マウスにおいて、治療域の血中FIX濃度が検出され、FIXを母体血中から胎児血中へと移行させることに成功した。さらに、新生児マウスの尾を切断し、24時間後の生存率を評価した。その結果、PBSを投与した母親マウスより誕生した新生児マウスでは、アッセイを行った5匹のうち生存が確認されたのは1匹のみであったのに対し、FIXFc発現Ad-E4-122aT投与群では、アッセイを行った3匹すべての生存が確認された。以上の結果により、Fc融合FIXを発現するAd-E4-122aTを妊娠マウスへと投与することで、血友病B胎児の血液凝固能を大幅に改善することに成功した。

以上、本研究では、高い安全性を有するAd-E4-122aTを用いて、新生児に適した新規遺伝子治療薬の開発に成功した。さらに、治療遺伝子に改良を施すことで、低侵襲的な新規血友病胎児遺伝子治療法の開発に成功した。

様式7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　飯塚　俊輔　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	水口　裕之
	副 査　教 授	近藤　昌夫
	副 査　教 授	中川　晋作

論文審査の結果の要旨

生まれつき遺伝子に変異を有することにより疾患を発症する先天性遺伝子疾患の多くは、現行の対症療法では十分な治療効果が得られないことから、革新的な治療法の開発が求められている。一方、正常な遺伝子を患者の細胞に導入・発現させることで治療を行う遺伝子治療を、新生児期・胎児期より行うことが可能となれば、障害の発症を未然に防ぐことが可能であり、疾患の根本治療につながると期待がされている。しかしながら、増殖期にある細胞が豊富な新生児・胎児では、一部のウイルスベクターで挿入変異による腫瘍様組織の形成が懸念されている。そこで本論文では、遺伝子毒性が極めて低く、また、高効率な遺伝子導入が可能なアデノウイルス（Ad）ベクターを用いて、新生児・胎児への安全かつ治療効果の高い遺伝子治療法を開発することを目的とした。

まず、新生児に適した新規遺伝子治療薬の開発に向けて、Adベクターの新生仔マウスにおける基本導入特性を評価した。その結果、Adベクターは新生仔マウスにおいても肝臓特異的に高効率な遺伝子導入が可能であるものの、レポーター遺伝子の発現は徐々に低下し、長期的な遺伝子治療効果は望めないことが明らかとなった。この原因として、ベクターゲノム上にコードされているAd遺伝子の発現により誘導される組織障害が考えられた。そこで、Ad遺伝子の下流にmiRNAの標的配列を組み込むことにより、Ad遺伝子の発現を低減させた改良型Adベクター（Ad-E4-122aT）を新生仔マウスに用いた。その結果、肝臓におけるAd遺伝子の発現は大幅に抑制され、レポーター遺伝子を約150日間高発現させることに成功した。さらに、重篤な血液凝固異常症である血友病A、および血友病Bモデルマウスを用いて遺伝子治療効果を評価したところ、マウスの血液凝固能を正常レベルにまで回復させることに成功した。

また血友病患者は、胎生期にはすでに血液凝固反応に異常が見られるため、出生時に頭蓋内で出血し、重篤な中枢神経障害を負うことが知られている。しかしながら、母体内の胎児に直接ウイルスベクターを注入する現行の胎児遺伝子治療法は、非常に侵襲性が高く、血友病患者への適応は困難と考えられる。そこで、血友病Bの治療遺伝子である血液凝固第9因子（FIX）遺伝子に免疫グロブリンGのFc領域を融合することにより、FIXに胎盤透過性を付与することを試みた。すなわち、経胎盤的にFIXを胎児へと送達することにより、胎児を傷つけることなく治療が可能になると期待される。そこで、妊娠13日目の血友病Bモデルマウスへ Fc融合型FIX発現Adベクターを投与したところ、生後間もない血友病Bモデル新生仔マウス血中において、FIXが検出されることを見出した。さらにこの時、マウスの止血能が大幅に改善されることを明らかとした。

新生児・胎児に対する遺伝子治療では、遺伝子治療薬・遺伝子治療法の安全性確保が極めて重要である。本論文は、改良型Adベクター、ならびにFc融合型FIX遺伝子を用いることで、現行の治療法が抱える課題を克服した画期的な治療法を提案するものであった。上記で得られた知見は、先天性遺伝子疾患治療薬の開発において極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。