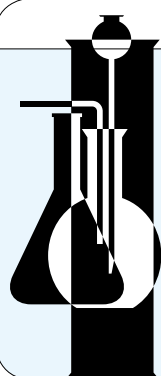


実験講座



脳を標的とする AAV ベクターの最新動向

平井 宏和

Key words : AAV, 細胞種特異的プロモーター, 血液脳関門, カプシド, 霊長類

アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus ; AAV) ベクターは、生命科学研究や難病の遺伝子治療に不可欠なものとなりつつある。10 年ほど前まではユビキタスなプロモーターを搭載し、非特異的に遺伝子発現する AAV を直接組織に注入していたが、近年、様々な標的細胞種に特異的に遺伝子発現する AAV や、静脈内投与で血液脳関門を効率的に透過する AAV が開発され、応用範囲が爆発的に広がっている。本稿では、脳を標的とした AAV ベクター遺伝子導入技術の最近の進歩を紹介する。

I. AAV で使える細胞種特異的プロモーター

AAV ベクターは表面のカプシドと内部のウイルスゲノムで構成されている (図 1A)。カプシドが細胞膜の受容体に結合して細胞内に侵入し、ゲノム部分が核に運ばれたのち、搭載しているプロモーターによって遺伝子を発現する。標的細胞種だけで働くプロモーターを使うと、細胞種特異的な遺伝子発現が可能となる。AAV ゲノムの両端には、複製の起点となる ITR (inverted terminal repeat) がある (図 1B)。カプシドにパッケージングされるために両 ITR 間は 5 kb 以下の制限があるが、遺伝子改変マウスに使われている細胞種特異的プロモーターの多くは、細胞種特異性を出す

ために長いゲノム領域が使われており、AAV ゲノムに搭載できないことが多く、プロモーター活性も弱い。AAV で用いるには、できるだけ短く、プロモーター活性が強く、かつ細胞種特異性を維持しているプロモーター領域を同定することが必要である。筆者らが開発したものを中心に表にまとめた。

1. プルキンエ細胞特異的 L7-6 プロモーター

L7 (PCP2) タンパク質は、小脳プルキンエ細胞と網膜の双極細胞に特異的に発現する。L7 には 4 つのスプライスバリエントが存在するが、マウスの小脳特異的 L7 バリエント (form B) のエクソン 1 内 ATG の上流 844 bp (L7-6 と命名) がプルキンエ細胞特異的プロモーターとして働くことを同定した¹⁾。マウス由来の配列であるが、マーマセトでもプルキンエ細胞特異的に働く。

2. 汎ニューロン特異的プロモーター

Neuron-specific enolase (NSE) プロモーター (1.2 kb)²⁾, synapsin I with a minimal CMV sequence (SynI-minCMV) プロモーター (1.2 kb)³⁾, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMK II) プロモーター (1.3 kb) はニューロン特異的 (興奮性と抑制性の両方) に働く^{4,5)}。プロモーター活性は NSE プロモーターが最も高く、残り 2 つは同程度である。大脳皮質において CaMK II プロモーター (1.3 kb) は興奮性と抑制性ニューロンの

Latest progress of brain-targeting AAV vectors

Hirai Hirokazu : 群馬大学未来先端研究機構ウイルスベクター開発研究センター, 群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 (〒 371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22)

0370-9531/04/¥500/論文/JCOPY

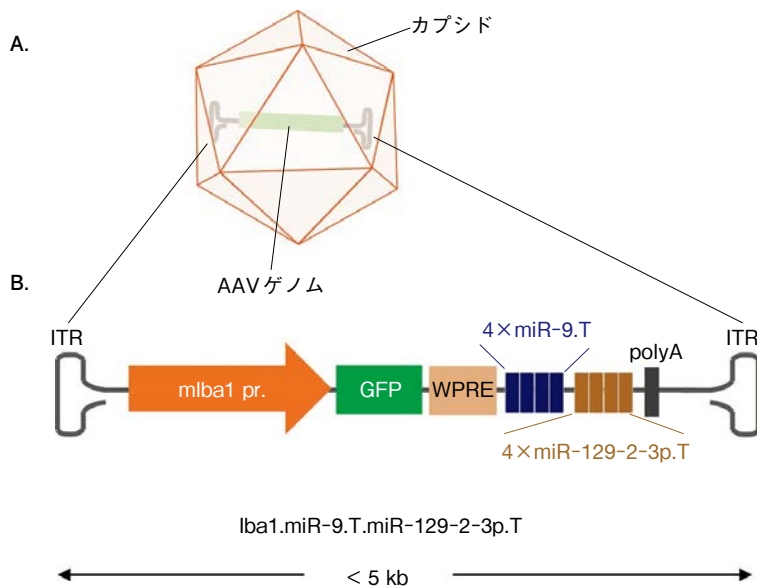


図 1 ミクログリア標的 AAV ベクター

A. AAV ベクターはカプシドとウイルスゲノムから成る。

B. AAV ゲノムの構造。両端の末端逆位配列 (inverted terminal repeat : ITR) の間に、マウス Iba1 プロモーター (mIba1 pr.), 緑色蛍光タンパク質 (GFP), woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE), 4つの microRNA-9 ターゲット配列 (4x miR-9.T), 4つの miR-129-2-3p ターゲット配列 (4x miR-129-2-3p.T), SV40 polyA (polyA) が存在する。パッケージングのため、両端の ITR を含めて 5 kb 以下の制限がある。

どちらにも偏りなく働くが、NSE プロモーターと SynI-minCMV プロモーターは抑制性ニューロン優位である⁴⁾。

3. 興奮性ニューロン特異的プロモーター

ウイルスベクターに搭載して使用する場合、CaMK II プロモーター (1.3 kb) が興奮性と抑制性ニューロンのどちらにも偏りなく働くのに対し、CaMK II プロモーター (0.4 kb) は興奮性ニューロン特異的に働く⁵⁾。加えて3分の1以下のサイズでありながら、プロモーター活性も 1.3 kb のものと同程度である⁶⁾。

4. 抑制性ニューロン特異的プロモーター

Distalless homeobox (Dlx) エンハンサー (+ minimal promoter) は、前脳の抑制性ニューロン特異的に働く⁷⁾。また、GABA 合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD) 65 をコードする *Gad2* 遺伝子のエクソン 1 内最初の ATG 上流 2.5 kb が、全脳の抑制性ニューロン特異的に働く⁸⁾。両者共プロモーター活性が弱いことが問題であったが、最近、筆者らはプロモーター活性が有意に強く、わずか 0.4 kb のサイズの抑制性

ニューロン特異的プロモーターを見いだしている (論文準備中)。

5. アストロサイト特異的プロモーター

ヒト *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) 遺伝子上流 2.2 kb の *gfa2* プロモーターは、アストロサイト特異的トランスジェニックマウス作出に広く用いられている。*gfa2* プロモーターを短鎖化した *gfaABC1D* プロモーター (681 bp) は、アストロサイト特異的に働く⁹⁾。マーマセットの GFAP 遺伝子転写開始点の上流 0.3 kb (あるいは 0.6 kb) の *gfa2* プロモーターは、マーマセットのアストロサイト特異的に働く¹⁰⁾。マウスの視床においては、1.3 kb のヒト *ALDH1L1* プロモーターがアストロサイト特異的に働くことが報告されている¹¹⁾。

6. ミクログリア特異的プロモーター

マウスのミクログリア/マクロファージ特異的 *ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (*Iba1*) 遺伝子のスタートコドンから上流 1.7 kb の領域 (mIba1 プロモーター) にそれぞれ 4 回繰り返す microRNA (miR) -9 と miR-129-2-3p の相補的

表 AAV ベクターで利用できる細胞種特異的プロモーター / エンハンサー

標的細胞種	プロモーター/ エンハンサー	サイズ (kb)	由来	コメント	文献
ブルキンエ細胞	L7-6	0.8	マウス	Addgene : pAAV/L7-6-GFP-WPRE (Plasmid #126462)	1
汎ニューロン	rNSE	1.2	ラット	1.8 kb のサイズでプロモーター活性が強いもの もある 抑制性優位の発現	2
	rSynImCMV	1.2	ラット	抑制性優位の発現	3
	mCaMK II	1.3	マウス	興奮性、抑制性どちらにも偏りなく発現	4, 5
興奮性ニューロン	mCaMK II	0.4	マウス	1.3 kb の mCaMK II プロモーターとプロモ ーター活性は同程度	5
抑制性ニューロン	mGAD65	2.5	マウス	脳全体でプロモーター活性がある Addgene : pAAV mGAD65 (delE1) GFP WPRE SV40pA (Plasmid #177316)	8
	Dlx (+ minPro)	0.7	マウス	前脳のみで働く	7
アストロサイト	gfaABC1D	0.7	ヒト	マウス、マーマセットで特異的に働く。ラット ではニューロンにリークあり	9
	gfa2	0.3 0.6	マウス マーマセット	Addgene : pAAV-hGfap-R-CaMPl.07-WPRE- SV40 (Plasmid #164140)	10
	ALDH1L1	1.3	ヒト	マウスの視床で有用。それ以外ではニューロン でも働く可能性あり	11
ミクログリア	Ibal (+ miR.T.)	2.5	マウス	線条体、小脳で特異性が高い。大脳皮質では ニューロンへの発現もみられる Addgene : pAAV/mIbal.GFP.WPRE.miR-9. T.miR-129-2-3p.T.SV40pA (Plasmid #190163)	12
オリゴデンドロ サイト	MBP	1.3	マウス	生後 90, 10, 0 日のマウス線条体で特異性がそ れぞれ 75%, 96%, 25%	13
	MAG	2.2, 1.5, 0.3	ヒト	成熟マウスの線条体における 2.2 kb と 1.5 kb のプロモーターの特異性は 95% 以上, 0.3 kb で も 90% 以上。2.2 kb のプロモーターは新生マウ スでも 80%	14

配列を付加した AAV (図 1B : Ibal-miR9.T, miR-129-2-3p.T) は、脳内においてミクログリア特異的に働く¹²⁾。mIbal プロモーターだけでもある程度ミクログリア選択性はあるが、ニューロンでもプロモーター活性がみられる(特に大脳皮質)。miR-9 と miR-129-2-3p はニューロンで発現しているが、ミクログリアでは発現がみられない。これら miR の相補的配列を導入遺伝子下流に付加すると、転写された mRNA がニューロンでは内在性 miR と結合して分解されるが、ミクログリアでは(内在性 miR がいないため)分解されない。これにより、ニューロンでの遺伝子発現が強力に抑えられる。しかし、AAV 投与後 3 週間経過すると、線条体、小脳ではミクログリア特異的発現が

維持されるものの、大脳皮質ではニューロンでも発現し始める(ミクログリア発現特異性は 4% と激減する)。筆者らはこの点を改善し、長期にわたってミクログリア特異的発現を維持する AAV の開発を行っており、成果が得られつつある。

7. オリゴデンドロサイト特異的プロモーター

AAV を用いた実験で、1.3 kb のマウス myelin basic protein (MBP) プロモーターが成熟マウス白質のオリゴデンドロサイト選択的に働くことが報告されている¹³⁾。ただし、生後 0 日の新生マウスに使用した場合、オリゴデンドロサイト特異性は 25% しかなく、大部分 (56%) はアストロサイトであった¹⁴⁾。ヒト myelin-associated glycoprotein (MAG) プロモーターは MBP プロモーターより

優れており、2.2 kb と 1.5 kb の MAG プロモーターを搭載した GFP 発現 AAV を成熟マウス線条体に注入し 3 週間後に観察すると、95% 以上がオリゴデンドロサイトであった¹⁴⁾。0.3 kb に短鎖化しても GFP 発現細胞の 90% 以上がオリゴデンドロサイトであった。2.2 kb の MAG プロモーターの特異性は新生マウス線条体においても維持されており、GFP 発現細胞のおよそ 80% がオリゴデンドロサイトであった。

II. AAV 血清型と細胞種指向性

細胞種特異のプロモーターと並んで、AAV を用いた細胞種特異的遺伝子発現に重要なのはカプシドである。例えば、アストロサイト特異的に遺伝子発現させたい場合にニューロンへの指向性が高いカプシドを使うと、ニューロンに多くの AAV 粒子がトラップされ、アストロサイト特異のプロモーターを使っているにもかかわらずニューロンに発現がリークしてしまう。効率的な細胞種特異的遺伝子発現には、カプシドとプロモーターの組み合わせが重要である。

AAV2 はニューロン、AAV5 はグリア細胞、AAV9、AAV8 はニューロンとグリア細胞に指向性がある。ただし、AAV の細胞種指向性は血清型以外に脳部位、脳組織の状態（組織損傷や炎症など）、AAV の作製条件（使用するパッケージング細胞の種類、付着細胞か浮遊細胞か、血清の有無、培養日数など）、投与経路（脳実質投与、脳室内投与、経静脈投与など）により影響を受ける。

III. 血液脳関門透過型 AAV カプシド

1. AAV-PHP.B

静脈内投与した場合、AAV は他のウイルスベクターと比較して血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) 透過性が高い。特に AAV9 は血流滞在時間が長く、その結果 BBB 透過効率が高い。しかし、マウスに高用量の AAV9 を静注しても脳内で遺伝子発現する細胞はわずかである。2016 年、カリフォルニア工科大学の Viviana Gradi-naru らのグループから大きなブレイクスルーが報告された。AAV9 カプシドにランダムな 7 つのアミノ酸配列を挿入した変異体ライブラリーを

C57BL/6 マウスを使ってスクリーニングし、極めて効率的に BBB を透過する変異体、AAV-PHP.B が見つかった¹⁵⁾。筆者らは、論文をみてすぐに AAV-PHP.B が非ヒト霊長類（コモンマーモセット）の BBB も透過するのか調べたが、AAV9 と変わらなかった¹⁶⁾。しかも、マウスの系統によって通るもの（C57BL/6 など）と通らないもの（BALB/c など）があることも見いだした¹⁷⁾。その後の研究で、AAV-PHP.B の受容体は脳微小血管内皮細胞の管腔側の細胞膜に発現する Ly6A であること、BALB/c マウスの Ly6A には変異があること、ヒトを含む霊長類は Ly6A を発現していないことが報告された¹⁸⁾。

2. AAV-PHP.eB, AAV-PHP.S

AAV-PHP.B と同じスクリーニング法（CREATE 法）を用いて、AAV9 由来の 2 つのバリエーション、AAV-PHP.eB、AAV-PHP.S が得られた¹⁹⁾。AAV-PHP.eB は PHP.B より効率的にマウスの BBB を透過し、PHP.B よりニューロン指向性が強い。AAV-PHP.S は後根神経節、心臓神経節や腸管神経叢など、末梢ニューロンに指向性がある。

3. AAV-F

PHP.B の報告から 3 年後の 2019 年、AAV9 変異体バリエーションライブラリーから CREATE 法とは異なるスクリーニング法を用いて、マウスの BBB を効率的に透過する AAV-F が得られた²⁰⁾。AAV-F は C57BL/6 マウスに加えて、PHP.B が働かない BALB/c マウスでも高い BBB 透過性を示した。また、PHP.B、PHP.eB がニューロンに指向性があるのに対し、AAV-F はニューロンにもアストロサイトにも偏りなく感染する。

4. AAV2 由来 BBB 透過型カプシド変異体、BRIN

BBB 透過型カプシドバリエーションはすべて AAV9 由来であったが、筆者らは 2023 年に AAV2 由来 BBB 透過型変異体、BRIN を報告した²¹⁾。静脈内投与された野生型 AAV2 は脳微小血管内皮細胞に感染したのちは脳側へ透過せず、内皮細胞の核へ運ばれて遺伝子発現する。AAV2 カプシド変異体、BR1 は脳血管内皮細胞に効率的に感染するが、やはり通り抜けずに脳血管内皮

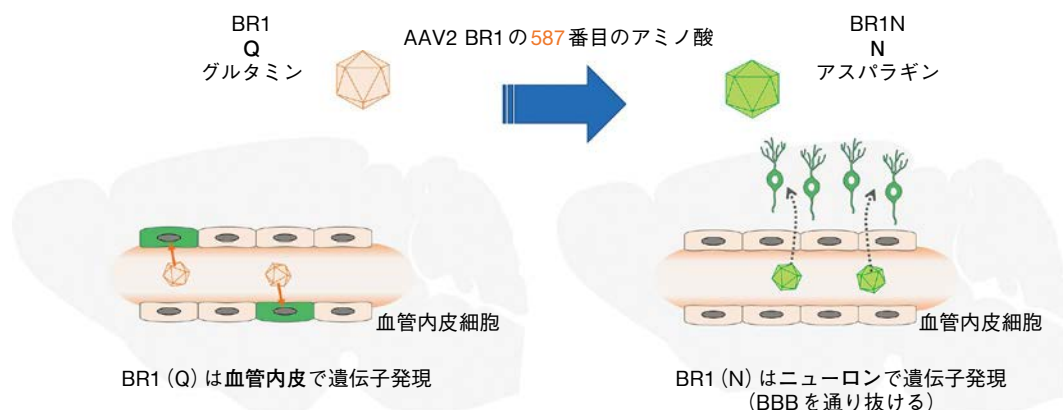


図2 AAV2カプシド変異体BR1NはBBBを通り抜ける

AAV2カプシド変異体BR1は血管内皮細胞に感染したのち、核に運ばれて遺伝子発現する(左)。BR1の587番目のグルタミンをアスパラギンに置換したBR1Nは血管内皮細胞を通り抜けて、脳内ニューロンで遺伝子発現する(右)。

細胞で遺伝子発現する(図2左)。BR1NはBR1カプシドの587番目のグルタミン(Q)をアスパラギン(N)に置換したAAV2由来の変異体で、BR1NカプシドでパッケージングしたAAV粒子を静脈内投与すると効率的にBBBを透過し、ニューロンに遺伝子発現する(図2右)。

AAV9以外の血清型カプシドからBBB透過型変異体が得られたことは、ヒトへの遺伝子治療を考えた場合、大きな意味がある。経静脈投与を行う場合に問題となるのは中和抗体である。AAV9に対する中和抗体を持つ患者に、AAV9変異体を経静脈的に投与しても全く効果が得られない。しかし、その患者がAAV2に対する中和抗体を持っていないければ、AAV2変異体を使うことができる。

5. 非ヒト霊長類の血液脳関門透過型 AAV カプシド

マーモセットやマカクザルのBBBを透過するAAV9由来カプシドバリエーションの報告が相次いでいる。Viviana Gradinaruのグループは、マーモセットのBBBを効率的に透過するAAV.CAP-B10およびAAV.CAP-B22を報告した²²⁾。また、Fengfeng BeiらのグループもマーモセットとマカクザルのBBBを効率的に透過するAAV9由来カプシドバリエーション、AAV.CPP.16とAAV.CPP.21を報告した²³⁾。筆者らは、これらのAAVバリエーションが本当にマーモセットのBBBを効率的に透過するのか、AAV.CAP-B10とAAV.CPP.16を用いて検証した。その結果、オリジナルのAAV9と比較して、確かにBBB透過効率は上がっていることは確認できたが、その程度は小さかった。マウスにおけるAAV9とPHP.Bの差が圧倒的であるのに対し、AAV.CAP-B10、AAV.CPP.16の両方とも、統計をとって初めてわかる程度であり、現状では非ヒト霊長類のBBB透過型AAV変異体はまだまだ開発途上であると言える。

的に透過するのか、AAV.CAP-B10とAAV.CPP.16を用いて検証した。その結果、オリジナルのAAV9と比較して、確かにBBB透過効率は上がっていることは確認できたが、その程度は小さかった。マウスにおけるAAV9とPHP.Bの差が圧倒的であるのに対し、AAV.CAP-B10、AAV.CPP.16の両方とも、統計をとって初めてわかる程度であり、現状では非ヒト霊長類のBBB透過型AAV変異体はまだまだ開発途上であると言える。

おわりに

2019年に承認された脊髄性筋萎縮症の点滴治療薬、オナセムノゲン アベパルボベクは、ユビキタスなプロモーター制御下で正常な原因遺伝子を発現するAAV9ベクターである。新生児の未熟なBBBを透過して脳内で遺伝子発現する。近年、成人のBBBを透過し、細胞種特異的に遺伝子発現するAAVの開発が、欧米を中心に精力的に進められている。アルツハイマー病や難治性てんかんなど、成人の様々な脳の難病に対して使われる日も近いと思われる。

●文 献

- 1) Nitta K, Matsuzaki Y, Konno A, Hirai H : *Mol Ther Methods Clin Dev.* 6 : 159-170, 2017
- 2) Shinohara Y, Ohtani T, Konno A, Hirai H :

- Cerebellum*. **16** : 913-922, 2017
- 3) Matsuzaki Y, Oue M, Hirai H : *J Neurosci Methods*. **223** : 133-143, 2014
 - 4) Radhiyanti PT, Konno A, Matsuzaki Y, Hirai H : *Neurosci Lett*. **756** : 135956, 2021
 - 5) Scheyltjens I, Laramée ME, Van den Haute C et al : *J Comp Neurol*. **523** : 2019-2042, 2015
 - 6) Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S et al : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101** : 18206-18211, 2004
 - 7) Dimidschstein J, Chen Q, Tremblay R et al : *Nat Neurosci*. **19** : 1743-1749, 2016
 - 8) Hoshino C, Konno A, Hosoi N et al : *Mol Brain*. **14** : 33, 2021
 - 9) Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M : *Glia*. **56** : 481-493, 2008
 - 10) Shinohara Y, Konno A, Takahashi N et al : *PLoS One*. **11** : e0162023, 2016
 - 11) Koh W, Park YM, Lee SE, Lee CJ : *Exp Neurobiol*. **26** : 350-361, 2017
 - 12) Okada Y, Hosoi N, Matsuzaki Y et al : *Commun Biol*. **5** : 1224, 2022
 - 13) Chen H, McCarty DM, Bruce AT, Suzuki K : *J Neurosci Res*. **55** : 504-513, 1999
 - 14) von Jonquieres G, Fröhlich D, Klugmann CB et al : *Front Mol Neurosci*. **9** : 13, 2016
 - 15) Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP et al : *Nat Biotechnol*. **34** : 204-209, 2016
 - 16) Matsuzaki Y, Konno A, Mochizuki R et al : *Neurosci Lett*. **665** : 182-188, 2018
 - 17) Matsuzaki Y, Tanaka M, Hakoda S et al : *Mol Ther*. **27** : 700-704, 2019
 - 18) Hordeaux J, Yuan Y, Clark PM et al : *Mol Ther*. **27** : 912-921, 2019
 - 19) Chan KY, Jang MJ, Yoo BB et al : *Nat Neurosci*. **20** : 1172-1179, 2017
 - 20) Hanlon KS, Meltzer JC, Buzhdygan T et al : *Mol Ther Methods Clin Dev*. **15** : 320-332, 2019
 - 21) Kawabata H, Konno A, Matsuzaki Y, Hirai H : *Mol Ther Methods Clin Dev*. **29** : 81-92, 2023
 - 22) Goertsen D, Flytzanis NC, Goeden N et al : *Nat Neurosci*. **25** : 106-115, 2022
 - 23) Yao Y, Wang J, Liu Y et al : *Nat Biomed Eng*. **6** : 1257-1271, 2022