

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) AAV 中空粒子を活用した核酸医薬の DDS
(英語) Oligonucleotide delivery system by using AAV empty capsids

研究開発実施期間: 2018年9月1日~2020年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 岡田 尚巳
(英語) Dr. Takashi Okada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 東京大学医科学研究所 遺伝子・細胞治療センター 分子遺伝医学分野・教授
(英語) Division of Molecular and Medical Genetics, Center for Gene and Cell Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

研究開発の成果

核酸医薬には、安定性と体内滞留性、送達の組織特異性の高いドラッグデリバリーシステム (DDS) を構築することが、喫緊の課題である。本研究ではデュシェンヌ型筋ジストロフィーを対象に、研究開発代表者の岡田が保有するシーズ技術である、組織指向性の高い変異型 AAV (アデノ随伴ウイルス) 由来中空粒子への核酸導入方法を活用して、人工核酸を AAV 中空粒子に封入した新規製剤の開発を進めることを目的とした。

研究開発成果として、

1. AAV 中空粒子に DMD 治療用核酸を封入する技術の確立および解析

1-1) 中空粒子に治療用核酸を封入する技術を確立するために、これまで検討してきたプラスミドだけでなく、核酸単独で機能を持たない任意の核酸配列 (pCR-Blunt-3' MCS) を持ったオリゴヌクレオチドに配列 X を付加したものを合成した。この配列を用いて AAV 中空粒子に封入されることをスモールスケールで確認した。これによってプラスミドの形を取る必要はなく、オリゴヌクレオチドであっても配列 X 付加により中空粒子に封入されることを確認出来た。

1-2) DMD の治療薬候補は人工核酸であることから、まずマーカー遺伝子に対するアンチセンスオ

リゴヌクレオチド(ASO)を人工核酸で合成し、所定の配列 X を付加した上で AAV 中空粒子へのパッケージングを行い、その封入を確認した。用いる人工核酸の濃度について 3 段階、配列 X を付加する場所 (5' 側および 3' 側) についても検討し、定量的 PCR で封入を確認した。この結果、人工核酸の濃度依存的に取り込み効率は上昇し、また配列 X の位置によって封入効率が異なることが明らかになった。

2. DMD 治療用核酸封入 AAV 中空粒子の大量精製技術の確立

1-1 で用いた pCR-Blunt-3' MCS + 配列 X を用いて、核酸封入 AAV 中空粒子の大量製造および精製を、協力企業 A 社において行った。用いた細胞はハイパーフラスコ 3 枚 (5.8×10^8 cells) で、これにより核酸封入 AAV 中空粒子の精製は GMP 対応が可能であることが示唆された。

3. DMD 治療用核酸封入 AAV 中空粒子によるエクソン・スキップ効率の測定

疾患モデルに対し治療薬候補となる機能性核酸配列を決定した。この配列を人工核酸で合成し、配列 X を付加した。配列 X を付加してもその機能性は維持されることを *in vitro* で確認した。AAV 中空粒子に対してパッケージングを行い、封入後の中空粒子量を測定した。DMD モデルマウスおよび野生型マウスより初代培養の細胞を単離精製し、これを用いて治療効果を検討した。

4. DMD 疾患モデルに対し DMD 治療用核酸封入 AAV 中空粒子の *in vivo* での機能確認

成果 1 において人工核酸を AAV 中空粒子に封入し qPCR を用いて力価を計測した結果、コントロールとして作製した AAV ベクターと比して *in vivo* での全身投与実験に用いるには不十分であった。このため、*in vitro* 系に立ち返りこれらの人工核酸封入 AAV 中空粒子の精製条件の検討を行った。また、より動物に近い検討系として DMD 病態モデルから初代培養細胞を単離・維持し、封入済 AAV 中空粒子を投与、DMD 治療効果を検討した。さらに、成果 1 において検討した人工核酸よりも大量に入手可能な人工核酸の形態を提案し、これらを用いて中空粒子への封入および治療効果を検討した。

本研究の意義

最終製品によって実現しようとする目的は、DMD を対象に組織指向性の高い AAV (アデノ随伴ウイルス) 由来中空粒子への核酸導入方法を活用して、人工核酸を AAV 中空粒子に封入した新規 DMD 製剤の開発を進めることである。ウイルス様粒子 (VLP) を DDS として利用する近似の他技術として以下が挙げられる。

AAV の中空粒子を DDS として用いるという報告は、論文中に言及 (Samulski *et al.*, J. Virology, 2003) はされているが、実用化はされてこなかった。また、AAV のキャプシド部分のタンパク質 (Cap) に、核酸を結合するための配列を導入し、キャプシドに直接オリゴヌクレオチドを結合させるといった報告 (Katrekar D. *et al.*, Sci. Rep., 2018) があるが、オリゴヌクレオチドが外の環境に直接晒されているため、RNase または DNase の分解を受けやすく、製剤化の際には品質管理が困難であると思われる

他ウイルスの VLP を DDS として利用するものとして、ノダウイルス VLP の DDS 利用がある。非常に単純な構造のウイルスであるが、ノダウイルス遺伝子由来以外の遺伝子導入には成功していない。また、直接最終製品と競合するものではないが、中空粒子に対しプラスミドを導入した系をワクチンとして使用検討した場合の競合技術として AAV を用いたインフルエンザワクチンがある。これは以下の 2 つの論文で報告されている (Lin J. *et al.*, J Virol (2009) 83:12378-50,

Shipo I, Vaccine (2011) 29:1690-9)が、いずれも AAV ベクターを用いていることから、中空粒子を用いた本技術の方が生産法、精製法の点で有利である。また、ベクター由来の transgene は AAV ベクターでは非分裂細胞に感染した場合非常に長期にわたって存在することから、新規のワクチンを作製するときには想定されるすべての変異に対応した universal なものである必要がある。一方で、本技術を用いて DNA ワクチンとした場合、中空粒子に封入された DNA から発現する transgene はベクター由来の場合よりも発現が一過性になると想定される。また、封入する DNA は PCR 産物としても製造可能であるので、パンデミックの場合にも迅速に対応可能であると思われる。

さらに、同じくインフルエンザウイルスのワクチンとして SV40 の VP1, VLP を免疫賦活化剤として使用している研究では、アジュバントを用いることなく CTL 活性があることまで報告されている。しかし、VP1 を作製する際にバキュロウイルスを用いた系を用いている。また、本技術と同様に dsDNA の導入も検討されているが、dsDNA を VLP に導入しようとした場合、ミニクロマチン構造を取らせないと導入可能な遺伝子サイズは total で 2kb までと大幅に制限されるようである。我々が用いている AAV 中空粒子への核酸導入では特別な構造体を取らない核酸も導入可能であることが今回の事業で明らかになった。

いずれの場合も、本技術の優位性として

1. 本研究にて得られた結果から、Xeno-free での大量生産、ならびに精製系が GMP 対応可能
2. ベクターではなく中空粒子を用い、AAV の ITR 配列を含有しない
3. Sf9 の培養系を用いないことから、ラブドウイルスのコンタミネーションを考慮する必要がない
4. ライセンスを考慮する必要のない新規血清型を用いることが可能である
等を挙げることができる。

DMD is an X-linked, severe muscle wasting disease caused by mutations or deletions in the DMD gene, encoding an essential component of the cytoskeleton of the muscle fiber. The condition affects between 1 in 3,500 and 1 in 5,000 newborn boys, causing premature death by respiratory and heart failure.

Currently the development of the “exon skipping treatment” using morpholino nucleic acid is very promising. A considerable amount of attention has been focused on the oligonucleotide-based exon-skipping therapy to restore dystrophin expression in the affected muscle tissues of Duchenne muscular dystrophy patients with promising data obtained from a series of world-wide clinical trials.

However, treatments using morpholino nucleic acids don't have tissue-specificity so it is still necessary to improve the effect in the skeletal and cardiac muscle. It also has poor retention in blood requiring frequent administration about once or twice per week; furthermore, the morpholino oligonucleotide itself is very expensive.

Recently we solved various problems in the encapsulation of nucleic acids in these AAV-EP vectors, by introducing sequence X, it is possible to introduce plasmids or oligonucleotides without impairing the infectivity of the AAV-EPs (PCT/JP2018/002687).

We consider feasible to use this method to deliver oligonucleotides with an antisense

sequence that induce exon skipping by introducing them into AAV-EPs. Depending on their serotype AAV vectors have different tissue tropism and we have cloned and identified a new AAV capsids that has specific tropism for the myocardium, skeletal muscle and the nervous system (PCT/JP2018/002680). By the application of this method we consider possible to introduce the exon-skip producing oligonucleotides with antisense sequences into the non-viral carrier AAV-EP for their administration.

With this research we consider feasible the development of a non-viral DMD therapeutic agent for DMD with a dramatically enhanced muscular affinity and blood retention. This is a promising delivery tool not only for DMD but we expect it to be also useful for other diseases and even applications in other fields such as vaccines, antibody medical treatment, gene therapy, etc. It is also a promising delivery tool for DNA vaccines and it can be expected to have a very large demand. Thus, its market value in the medical field can be assumed to become extremely important.

III 事後評価総合所見

課題リーダーらが有する AAV 中空粒子に核酸を封入する基本技術や AAV 中空粒子の製造に関する基本技術を利用して、核酸医薬の DDS 実用化を目指すものであり、対象疾患を DMD に定め、治療への展開を目指すところに新しさがあります。AAV 中空粒子の調製法や核酸のパッケージング条件は整いつつあり、封入された AAV 中空粒子の大量精製技術の進展および、パッケージ核酸として人工核酸の機能検証が進んでいることは評価されました。

一方で、期中で所属機関の異動があったために研究が十分に進展しなかったとはいえ、当初計画にあった mdx マウスにおける DMD 治療用核酸封入 AAV 中空粒子の局所投与での機能評価がなされなかったのは残念です。当該アカデミアとセットアップ企業とのパートナーシップは長きにわたって維持されており、安定した産学連携が築かれていますので、さらなる今後の研究開発の進捗に期待します。