

Extracellular Vesicle-Encapsulated AAVs for Therapeutic Gene Delivery to the Heart —EV-AAV による遺伝子治療は心臓への移行性を向上させる—

Li X, Salvia SL, et al. *Circulation*. 2023; 148(5): 405-425.

背景

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、心臓作用性、長期発現、安全性から心臓遺伝子導入の最良のツールの一つとして浮上してきた。しかしながら、臨床利用を成功させるための重要な課題は、既存の中和抗体 (NAbs) である。中和抗体は遊離の AAV に結合し、効率的な遺伝子導入を妨げ、治療効果を低下させたり、無効にしたりする。ここでは、AAV 産生細胞から自然に分泌される細胞外小胞カプセル化 AAV (EV-AAV) が、より多くの遺伝子を送達し、より高い中和抗体耐性を提供する優れた心臓遺伝子導入ベクターであることを説明する。

方法

高度に精製された EV-AAV を単離するために、2 段階の密度勾配超遠心法を開発した。in vitro および in vivo の両方で、EV-AAV の遺伝子導入および治療効果を中和抗体の存在下で等力価の遊離 AAV と比較した。さらに、生化学的手法、フローサイトメトリー、免疫蛍光イメージングを組み合わせ、ヒト左心室への取り込み、および in vitro ではヒト人工多能性幹細胞心筋細胞、in vivo ではマウスモデルにおける EV-AAV の取り込みメカニズムを調査した。

結果

AAV の血清型 6 と 9、およびいくつかのレポーター構築物を用いて、EV-AAV は中和抗体存在下の AAV よりも有意に大量の遺伝子を in vitro ではヒト左心室の心筋細胞およびヒト人工多能性幹細胞に、in vivo ではマウス心臓に送達することを証明した。EV-AAV9-筋小胞体カルシウム ATP アーゼ 2a の心筋内投与は、AAV9-筋小胞体カルシウム ATP アーゼ 2a 投与と比較して、梗塞心臓の駆出率および分画短縮を有意に改善した。これらのデータは、EV-AAV9 ベクターによる中和抗体回避と治療効果を検証した。in vitro のヒト人工多能性幹細胞由来細胞および in vivo のマウス心臓を用いたトラフィッキング研究では、同等の細胞取り込みであっても、非心筋細胞と比較して心筋細胞では EV-AAV6/9 送達遺伝子の発現が有意に高いことが示された。細胞サブフラクション解析と pH 感受性色素を用いて、EV-AAV が心筋細胞の酸性エンドソームコンパートメントに内在化され、AAV を放出し酸性化して核内に取り込まれることを発見した。

結論

5つの異なる in vitro および in vivo モデル系を用いて、中和抗体の存在下において、遊離 AAV と比較して EV-AAV ベクターの効力および治療効果が有意に高いことを示した。これらの結果は、EV-AAV ベクターが心不全を治療するための遺伝子デリバリーツールとしての可能性を立証するものである。

コメント

アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターは、非病原性ウイルスに由来し、非分裂細胞に効率良く遺伝子導入でき、そのような標的細胞では遺伝子発現が長期間持続することから、遺伝子治療用ベクターとして期待されている。一方で、患者における既存の AAV 中和抗体の有病率の高さは、AAV による遺伝子治療の効率を妨げ、遺伝子治療試験に登録できる患者数を制限している。本研究により EV-AAV がその問題解決の一助になる可能性が示唆された。

ファブリー病の遺伝子治療として、Plasmid cDNA や mRNA、Adenovirus、Lentivirus、AAV を用いる方法が研究されている。中でも AAV を用いた方法が最も研究が進んでおり、現在第3相試験が進行中である。今後、ファブリー病において AAV による治療が行えるようになった場合には、EV-AAV を用いた治療が特に心亜型において最も有効である可能性がある。一方で、ファブリー病は全身性の疾患であり、他の臓器への移行性も重要である。AAV を産生する HEK293T 細胞から分泌される大小の EV は、マウスの網膜、内耳、肝臓、神経系 28 に無傷の AAV34 を運び、送達することができることが知られている。そのことから、神経に対しても効果が認められる可能性がある。

EV-AAV の長期的な効率、安全性、投与量、生体内分布などまだ不明な点も多い。今後の研究の進展にも注視していきたい。

千葉大学医学部附属病院循環器内科 廣瀬雅教