129　AAVベクター感染時における肝薬物代謝能の評価	根来　亮介

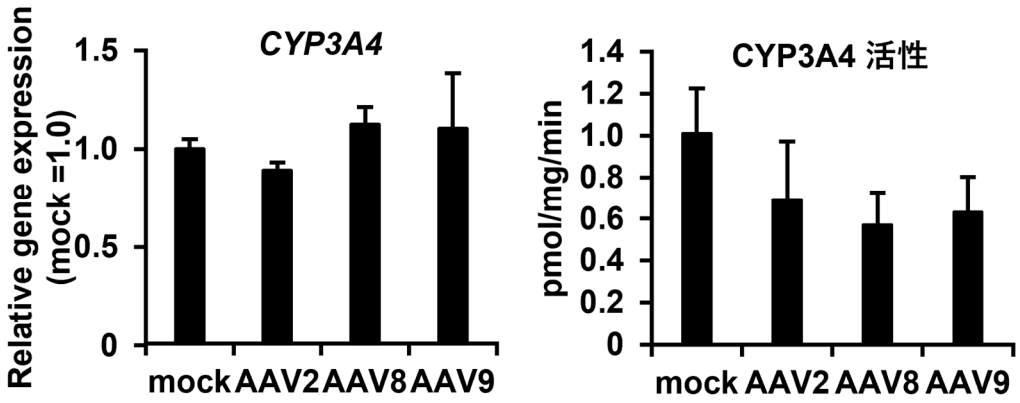
【目的】アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは末梢静脈からの投与でも効率的に遺伝子を導入できるため、様々な臓器を標的とした遺伝子治療用ベクターとして有望視されている一方、肝臓に集積することも知られている。そのため、肝障害マーカーなどを指標に安全性試験を行っている。AAV ベクターは、非病原性であると言われているものの、AAV ベクターを投与された患者によっては、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）が顕著に増加すること、肝炎状態において肝臓のシトクロム P450（CYP）の発現量が減少することが報告されている。しかしながら、AAV ベクター感染時における肝薬物代謝能の評価は行われていない。本研究では、AAV ベクター感染時における肝細胞の薬物代謝酵素発現量および活性が変動するのか評価する。

【方法】CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、P450 オキシドレダクターゼ（POR）、UDP グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1 を高発現したゲノム編集 HepG2 細胞に、各 Green Fluorescent Protein（GFP）発現 AAV ベクターを 1.0×10^5 vg/cell で感染させた。AAV ベクター感染 4 日後、リアルタイム PCR、薬物代謝実験を実施した。

【結果】AAV ベクター感染後の肝細胞マーカー発現量を解析した。肝細胞マーカーである *α-フェトプロテイン（AFP）*、*アルブミン（ALB）* 発現量は、mock 群と 2、8、9 型 AAV ベクター感染群の間で顕著な変化はなかった。次に、インターフェロンシグナル応答について評価するために、*interferon stimulated gene（ISG）15*、*ISG56*、*ミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）*遺伝子発現量を解析した。ゲノム編集 HepG2 細胞における *ISG15*、*ISG56*、*MxA* 発現量は、2、8、9 型 AAV ベクター感染による変化はなかった。

次に、AAV ベクター感染後のゲノム編集 HepG2 細胞における薬物代謝酵素発現量および活性について評価した。臨床で使用されている医薬品代謝に大きな役割を果たす CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量および活性を評価することとした。まずは、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量を解析した。2、8、9 型 AAV ベクター感染による CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な変化はなかった。CYP1A2、2C9、2C19、2D6、UGTs 活性においては、遺伝子発現量の結果と一致して、2、8、9 型 AAV ベクター感染による活性の変化はなかった。一方で、CYP3A4 活性は、2、8、9 型 AAV ベクター感染により、低下傾向を示した。以上の結果より、ゲノム編集 HepG2 細胞において 2、8、9 型 AAV ベクター感染により、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な影響は与えないものの、CYP3A4 活性を阻害する可能性が示唆された。

ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の CYP3A4 発現量および活性



129. AAV ベクター感染時における肝薬物代謝能の評価

根来　亮介

立命館大学 薬学部 分子薬物動態学研究室

Key words : AAV ベクター，肝細胞，薬物代謝，CYP3A4

緒　言

遺伝子治療は、従来の低分子化合物由来の医薬品では治療が難しい遺伝性疾患などの完治を目指した革新的な治療法である。遺伝子治療を実施するにあたり、遺伝子導入ベクターとして、ウイルスベクターが汎用されている。特に、末梢静脈より全身投与可能で、非病原性であるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた遺伝子治療が大きな注目を集めている。AAV ベクターは、血清型（セロタイプ）により、組織指向性や遺伝子導入効率が大きく異なる。中でも、8 および 9 型 AAV ベクターは末梢静脈からの投与でも効率的に遺伝子導入できることから、様々な臓器を標的とした遺伝子治療用ベクターとして有望視されている。様々な臓器に効率的に目的遺伝子を発現できる 8 および 9 型 AAV ベクターは、治療用遺伝子発現の観点ではメリットであるが、予期せぬ副作用を発現するデメリットにもなりかねない。8 および 9 型含むほぼ全てのセロタイプの AAV ベクターは、肝臓に集積するため肝臓の安全性評価は特に重要である。そのため、全身投与した AAV ベクターの安全性を評価するために、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）や乳酸脱水素酵素（LDH）などの肝障害マーカーを指標に評価している。AAV ベクターは、非病原性であると言われているものの、AAV ベクターを投与された患者によっては、ALT が顕著に増加することが報告されている［1］。さらに、AAV ベクターを全身投与されたカニクイザルは、肝臓においてインターフェロン（IFN）シグナルが活性化することが知られている［2］。加えて、肝炎状態において肝臓のシトクロム P450 の発現量が減少することも報告されている。肝臓は、薬物代謝に最重要な臓器であるにも関わらず AAV ベクター投与時の肝薬物代謝能の評価はほとんどされていない。そのため、生活習慣病などの患者が遺伝子治療を実施した場合、服用中の低分子化合物由来の医薬品を減量あるいは増量する必要があるのか不明である。

当研究グループはこれまでに、ゲノム編集技術を用いて、シトクロム P450（CYP）1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、P450 オキシドレダクターゼ（POR）、UDP グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1 を高発現したゲノム編集 HepG2 細胞を作製することに成功しており、薬物代謝実験に使用できることを示している［3］。

そこで、本研究では、ゲノム編集 HepG2 細胞に、8 および 9 型などの AAV ベクターを感染させ、AAV ベクター感染時（遺伝子治療時）に、薬物代謝酵素の活性が変動するのか評価した。

方　法

1. AAV ベクター感染実験および薬物代謝実験

ゲノム編集 HepG2 細胞に、各 Green Fluorescent Protein（GFP）発現 AAV ベクターを 1.0×10^{5} vg/cell で感染させた。AAV ベクター感染 4 日後、リアルタイム PCR、薬物代謝実験を実施した。薬物代謝実験は、10 μM フェナセチン（CYP1A2 基質）、10 μM ジクロフェナク（CYP2C9 基質）、50 μM (S)-メフェニトイン（CYP2C19 基質）、1 μM ブフラロール（CYP2D6 基質）、10 μM ミダゾラム（CYP3A4 基質）、10 μM 7-ヒドロキシクマリン（UGTs 基質）を作用させ、4 時間後の培養上清を LC/MS により代謝物を定量することで評価した。

結果および考察

1. ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の抗ウイルス応答

ゲノム編集 HepG2 細胞に AAV ベクターが感染するのか評価するために、AAV ベクター搭載遺伝子の *GFP* 発現量を解析した。2、8、9 型 AAV ベクター感染により、*GFP* 発現量は上昇した（図 1）。AAV ベクターの *in vitro* 感染効率は、8、9 型 AAV ベクターに比べ、2 型 AAV ベクターの方が優れていることが報告されており、既報の結果と一致する［4］。AAV ベクター感染後の肝細胞マーカー発現量を解析した。肝細胞マーカーである *α-フェトプロテイン（AFP）*、*アルブミン（ALB）* 発現量は、moc 群と 2、8、9 型 AAV ベクター感染群の間で顕著な変化はなかった（図 1）。次に、インターフェロンシグナル応答について評価するために、*interferon stimulated gene（ISG）15*、*ISG56*、*ミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）* 遺伝子発現量を解析した。ゲノム編集 HepG2 細胞における *ISG15*、*ISG56*、*MxA* 発現量は、2、8、9 型 AAV ベクター感染による変化はなかった（図 1）。以上の結果より、ゲノム編集 HepG2 細胞における 2、8、9 型 AAV ベクター感染により、肝細胞マーカー、インターフェロンシグナル応答に顕著な変化を与えないことが示唆された。今後は遺伝子発現量だけではなく培養上清のアルブミン、炎症性サイトカインなどのタンパク質発現量を解析する必要があるだろう。

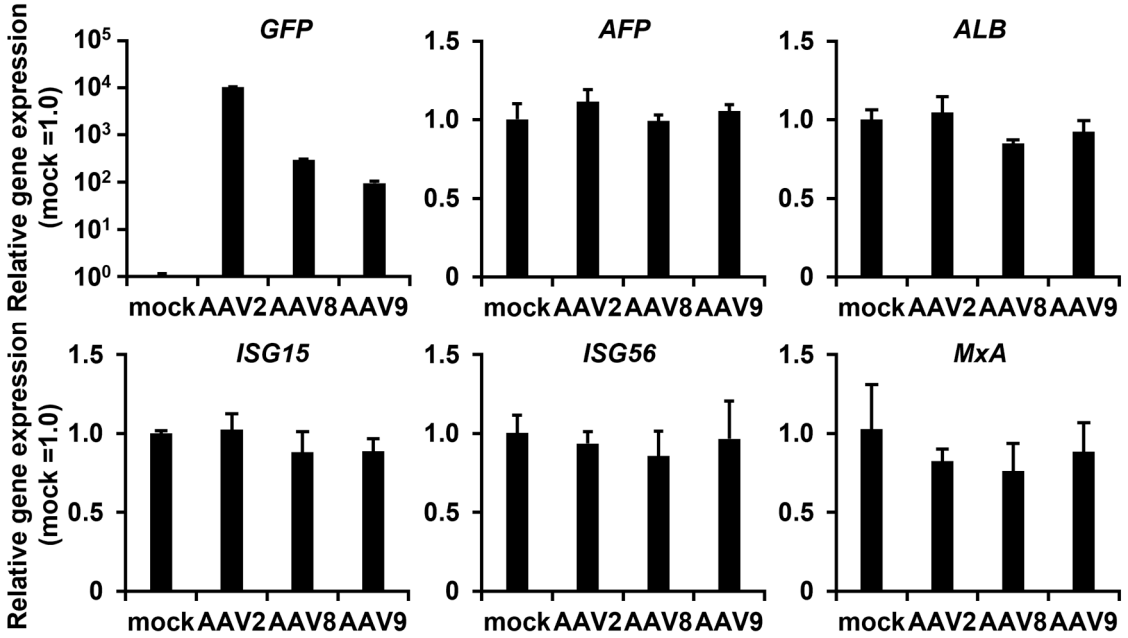


図 1. ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の抗ウイルス応答
1.0×10^5 vg/cell 2、8、9 型 AAV ベクター感染 4 日後の、ゲノム編集 HepG2 細胞における GFP、肝細胞マーカー、抗ウイルス応答の遺伝子発現量。mock における発現量を 1.0 とした。

2. ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の抗ウイルス応答

AAV ベクター感染後のゲノム編集 HepG2 細胞における薬物代謝酵素発現量および活性について評価した。臨床で使用されている医薬品代謝に大きな役割を果たす CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量および活性を評価することとした。まずは、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量を解析した。2、8、9 型 AAV ベクター感染による CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な変化はなかった（図 2）。CYP1A2、2C9、2C19、2D6、UGTs 活性においては、遺伝子発現量の結果と一致して、2、8、9 型 AAV ベクター感染による活性の変化はなかった（図 3）。一方で、CYP3A4 活性は、2、8、9 型 AAV ベクター感染により、低下傾向を示した（図 3）。以上の結果より、ゲノム編集 HepG2 細胞において 2、8、9 型 AAV ベ

クター感染により、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な影響は与えないものの、CYP3A4 活性を阻害する可能性が示唆された。今後は、AAV ベクターによる CYP3A4 を阻害する期間やメカニズムの検証が必要である。

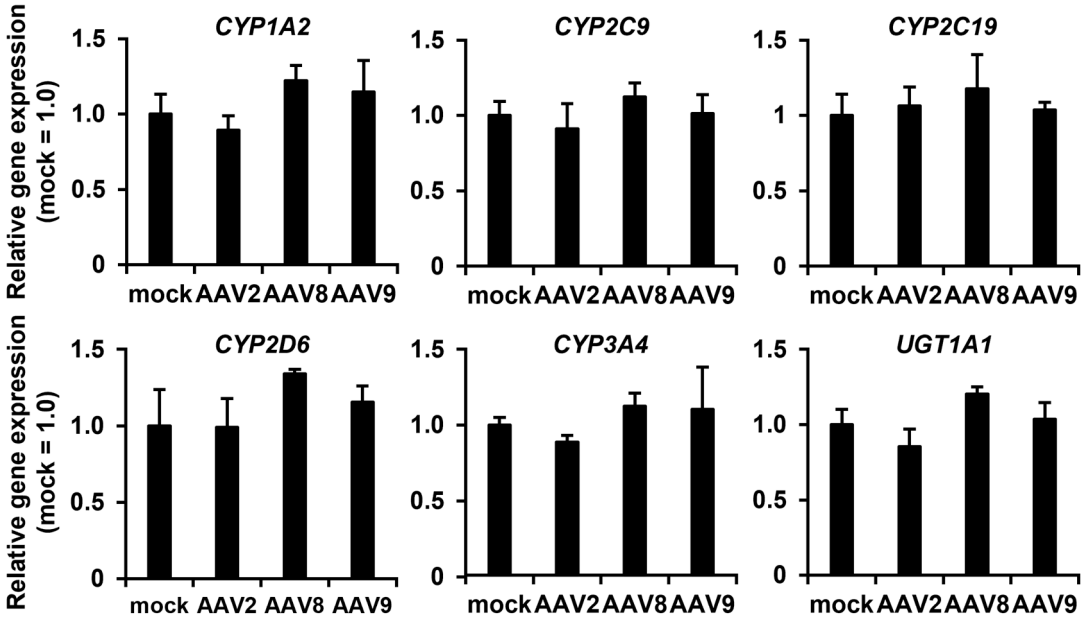


図 2. ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の薬物代謝酵素発現量
1.0×10^5 vg/cell 2、8、9 型 AAV ベクター感染 4 日後の、ゲノム編集 HepG2 細胞における薬物代謝酵素の遺伝子発現量。mock における発現量を 1.0 とした。

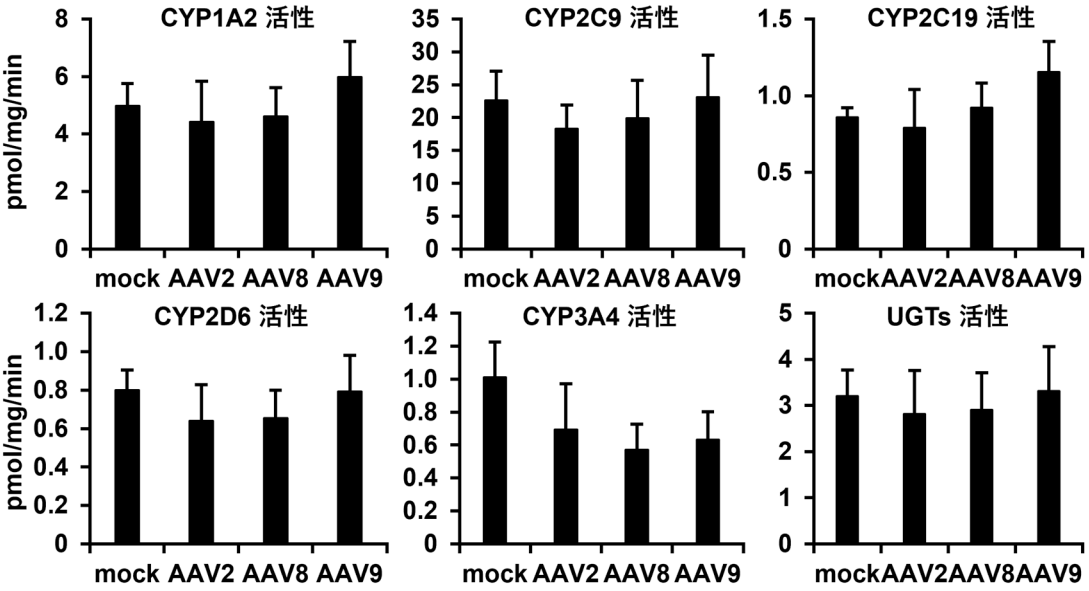


図 3. ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の薬物代謝酵素活性
1.0×10^5 vg/cell 2、8、9 型 AAV ベクター感染 4 日後の、ゲノム編集 HepG2 細胞における薬物代謝酵素の活性。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、京都大学 iPS 細胞研究所の高山和雄先生、立命館大学分子薬物動態学研究室の皆様に、多大なご協力を頂きました。また、本研究助成を賜りました公益財団法人上原生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1） Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med. 2011 Dec 22;365(25):2357-65. doi: 10.1056/NEJMoa1108046. Epub 2011 Dec 10. PMID: 22149959; PMCID: PMC3265081.

2） Wang L, Warzecha CC, Kistner A, Chichester JA, Bell P, Buza EL, He Z, Pampena MB, Couthouis J, Sethi S, McKeever K, Betts MR, Kakkis E, Wilson JM, Wadsworth S, Sullivan BA. Prednisolone reduces the interferon response to AAV in cynomolgus macaques and may increase liver gene expression. Mol Ther Methods Clin Dev. 2022 Jan 19;24:292-305. doi: 10.1016/j.omtm.2022.01.007. PMID: 35211641; PMCID: PMC8841522.

3） Negoro R, Tasaka M, Deguchi S, Takayama K, Fujita T. Generation of HepG2 Cells with High Expression of Multiple Drug-Metabolizing Enzymes for Drug Discovery Research Using a PITCh System. Cells. 2022 May 18;11(10):1677. doi: 10.3390/cells11101677. PMID: 35626714; PMCID: PMC9140068.

4） Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ 3rd, Porteus MH. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. Virol J. 2013 Mar 6;10:74. doi: 10.1186/1743-422X-10-74. PMID: 23497173; PMCID: PMC3607841.