

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09828

研究課題名(和文) 新規人工染色体ベクターを用いた血友病に対する細胞補充療法の開発

研究課題名(英文) Development of cell replacement therapy for hemophilia using a novel artificial chromosome vector

研究代表者

黒崎 創 (KUROSAKI, Hajime)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70464295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに遺伝子搭載サイズに制限なく、自律複製する極小染色体である人工染色体(AC)ベクターの利点を生かし、血友病Aの細胞補充療法のための第8因子(F<sub>8</sub>:Factor VIII)発現ベクターの構築、及び移植細胞としてがん化の危険性がない安全なiPS細胞の作製を行ってきた。本研究目的は血友病モデルマウスの自己細胞からF<sub>8</sub>発現血管内皮細胞を作製し移植することであり、今年度はゲノム補正した幹細胞操作による自己細胞移植による補充療法を検証した。取得してきたクローンを用いて、F<sub>8</sub>-ACを保持するiPSの血管内皮前駆細胞及び肝芽細胞へ分化誘導方法の確立と移植後のモデルマウス改善を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血友病は単一の遺伝子異常による遺伝性疾患であり、製剤として第8因子を補充する対処療法しかない。遺伝子・細胞補充治療法は、血友病だけでなく筋ジストロフィーのような治療法確立を急務とする疾患にも応用されることが期待されている。また本研究から得られた細胞については第8因子を製剤化する、物質生産のホストとして高いポテンシャルを秘めており、同じく酵素補充療法をターゲットとするような遺伝性疾患にも大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Human and mouse artificial chromosome (HAC and MAC, respectively) vectors have some unique characteristics compared with conventional gene therapy vectors, carrying large transgenes without a size limitation, existing independently from the host genome in cells, which avoids insertional mutagenesis, and showing persistent expression of transgenes. Induced pluripotent stem (iPS) cells have a great potential for gene therapy because they can be derived from an individual's own tissues. Upon reintroduction, they contribute to the specialized functions of various tissues. Based on these features, we transferred a stable factor VIII expression cassette using a MAC to iPS cells derived from hemophilia A model. These iPS cells gave rise to the three germ layers in teratomas. Moreover, we successfully restored hemostasis in hemophilia model chimeric mice and detected an FVIII antigen in the plasma of these mice. This study has demonstrated a therapeutic effect in this mouse model.

研究分野：再生医学

キーワード：血友病 第8因子 血栓・止血

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血友病は X 連鎖劣性遺伝の出血疾患で、凝固第 Ⅷ 因子 (血友病 A) または第 Ⅸ 因子 (血友病 B) の遺伝子異常により発症する。治療は補充療法で、血液製剤に代わり安全性の高いリコンビナント製剤が主流となってきたが、Ⅷ 因子は国内では依然 血漿由来製剤が使用されている。また、海外から輸入のリコンビナント Ⅷ 因子製剤は高価かつ供給不安定である。

製剤の長期投与による苦痛の軽減や医療費削減のための将来的な選択肢に遺伝子治療法がある。こうした遺伝子治療用のベクターとして従来から用いられてきたのは、主にウイルスベクターであるが、第 Ⅷ 因子や von Willebrand factor (VWF) などの凝固因子の遺伝子サイズは巨大であり、ベクターへの搭載が困難である。また、投与の繰り返しによるウイルス殻に対する抗体の出現やホスト染色体への挿入による癌化の懸念などが払拭できない。

HAC ベクターの遺伝子治療への有効性を検討するため、血友病 A をターゲットとした HAC ベクターと iPS 細胞による遺伝子治療のための基盤研究をマウスモデルを用いて実施した。マウスにおいては、HAC ベクターの安定性が良くないことが明らかになってきたので、本検討でもマウスにおいて安定である MAC ベクターを用いて以下の研究を実施した。細胞あたりの発現量を高め、以下の 2 つの方法で拒絶反応や癌化の危険性が少ない安全な遺伝子治療用の MAC ベクターを構築し、自己 iPS 細胞を用いたモデルマウスによる遺伝子治療効果を検証した。

人工染色体は、遺伝子搭載サイズに制限がなく安定に自律複製する極小染色体である。したがって、人工染色体を用いた遺伝子治療法は、従来のウイルスを用いた方法とは異なり、がん化の懸念が無く、また、長期間の高発現維持が期待できる。

細胞移植療法では、ES (embryonic stem) 細胞が用いられてきたが、山中伸弥教授 (京都大学再生医科学研究所) により開発された iPS (induced pluripotent stem) 細胞は、ES 細胞に比べて倫理的問題や拒絶反応の問題がなく、患者専用のオーダーメイド医療を行える理想的な細胞である。

### 2. 研究の目的

(1) 血友病治療のための従来品よりも格段に優れた遺伝子組換え型 (リコンビナント) 製剤および新規の遺伝子治療法を開発し、患者の肉体的負担の軽減と医療費削減を目指す。

(2) 遺伝子搭載サイズに制限が無い人工染色体ベクターを用いることで、凝固因子やその安定化因子、あるいは翻訳後修飾酵素などの発現ユニットを同時にタンデムに多コピー搭載することを可能にし、発現効率と安定性を飛躍的に改善する。

(3) 血友病モデルマウス由来細胞などを iPS 化して人工染色体ベクターを導入後、分化誘導して移植する最少自己移植細胞による遺伝子治療法を開発する。

(4) 血液凝固因子は、iPS 細胞から分化させた巨核球や血小板のなかで特異的に発現させるように工夫する。これにより、出血部位に局限した凝固因子の放出を可能とし、補充療法で問題となっているインヒビター産生を抑制し、また、インヒビター存在下においても有効な遺伝子治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 発現には動物細胞に強力に働く CAG プロモーターを用い、凝固第 Ⅷ 因子遺伝子を多コピー化によりさらに発現を高める。この第 Ⅷ 因子のマルチコピー発現ユニットの CAG プロモータードライコンストラクトを CHO 細胞保持の人工染色体に搭載した。発現ユニットの両端はトリ グロピン HS4 インスレータで挟んだ。第 Ⅷ 因子発現ユニットは 1 ~ 16 コピーを挿入した。

(2) 遺伝子搭載サイズに制限が無い人工染色体ベクターを用いることで、凝固因子やその安定化因子、あるいは翻訳後修飾酵素などの発現ユニットを同時にタンデムに多コピー搭載することを可能にし、発現効率と安定性を飛躍的に改善する。第 Ⅷ 因子を搭載した人工染色体が宿主染色体とは独立に保持されていることを、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH) による核型解析で確認した。また長期培養し安定性を確認する。

(3) 初期化用ベクターである、iHAC ベクターにより iPS 細胞を作製する。得られた細胞に微小核融合法によりさらに治療用ベクターである、第 Ⅷ 因子発現ベクターに移入し、FISH により、人工染色体が独立して存在していることを確認した後に、in vitro において肝芽細胞、血管内皮細胞へ分化誘導させる。またこの治療細胞を用いてキメラマウスを作製し、人工染色体ベクターに搭載の GFP (緑色蛍光タンパク) 遺伝子の発現を指標に各種臓器での人工染色体の安定な保持を確認した。

### 4. 研究成果

(1) どのような細胞にも Ⅷ 因子を発現させるために CAG プロモーターを選択し、その下流

に 因子遺伝子を配置した発現カセットを構築した。第 因子発現カセットは 1 ~ 16 コピーを挿入した。第 因子発現カセットをタンデムに 16 コピーまで搭載した人工染色体ベクターを CHO 細胞内で構築した。CHO 細胞に導入したところ、第 因子がコピー数依存的に発現することが確認された。

(2) 初期化用ベクターである、iHAC ベクターにより iPS 細胞を作製した。iHAC ベクター上に搭載されている GFP を発現している細胞の中から GFP が消失した、自然に iHAC ベクターが脱落した細胞を FACS により分取しクローンを取得した。取得したクローンについて染色体解析及びテラトーマ形成を観察した。染色体核型解析より iHAC ベクターの脱落が認められ、また染色体異数性もない 40 本の染色体核型であることがわかった。テラトーマ形成能と三胚葉への分化も観察され、以前までの報告のように本来の染色体ゲノムに傷をつけない iPS 細胞であり、血友病治療モデル確立のために有用であることが示唆された。

(3) 第 因子遺伝子をもつ人工染色体を、ここで得られた iHAC フリー-miPS 細胞へ微小核細胞融合法により導入した。クローン取得後、染色体解析と未分化マーカー、F<sup>-</sup> 発現を調べた。FISH 解析により F<sup>-</sup>-MAC が 40 本のマウス染色体から独立して維持されていることがわかった。未分化マーカーについては京大山中研から分与された 20D17K (4 因子のレトロウィルスベクターにより作製された) に比べ遜色のない発現と F<sup>-</sup> の発現も見られ、MMCT 導入によって F<sup>-</sup>-MAC が機能していることがわかった。

(4) *in vitro* において肝芽細胞、血管内皮細胞へ分化誘導させ、第 F<sup>-</sup> 因子発現を確認した。

(5) 得られてきた血友病モデルマウス由来の iHAC free iPS 細胞の性能をさらに評価するため、F<sup>-</sup> 欠損モデルマウスの胚ヘインジェクションを行い、キメラマウスの作製と解析を行った。止血実験を行ったところ、iPS をインジェクションした低キメラマウスにおいても止血効果があったことから、F<sup>-</sup>-MAC は機能していることがわかり *in vivo* における治療効果を確認することができた。また、人工染色体ベクターに搭載の GFP (緑色蛍光タンパク) 遺伝子の発現を指標に各種臓器での人工染色体の安定な保持を確認した。

キメラマウスを作製できたクローンについて *in vitro* における分化誘導と移植生着の条件検討を行っており、モデルマウスへの移植により血友病治療できることがわかっている。このことから、人工染色体を用いた幹細胞作製技術(iHAC ベクター)と治療細胞作製技術(F<sup>-</sup>-MAC ベクター)の両方について有用性が示された。キメラマウスを作製できたクローンについて *in vitro* における分化誘導と移植生着の条件検討を行っており、モデルマウスへの移植により血友病を長期に治療できることを最終ゴールとしている。以上のことから、治療効果期間、手法などの今後の検討課題はあるが、有用な血友病治療用ベクター開発の可能性を示すことができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, Takafumi Nakamura
2 . 発表標題 Novel Approach for Systemic Cancer Therapy with Oncolytic Vaccinia Virus through Evading the Host Immune Response
3 . 学会等名 ASGCT 21th Annual Meeting, Chicago, IL, 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kosuke Horita, Hajime Kurosaki, Motomu Nakatake, Nozomi Kuwano, Kenta Ishii, Hiromichi Kohno, Mai Itoh, Hiroaki Itamochi, Tetsuro Oishi, Tasuku Harada and Takafumi Nakamura
2 . 発表標題 Predictive biomarkers for cancer virotherapy with oncolytic vaccinia virus
3 . 学会等名 The 24rd Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 2018
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hajime Kurosaki, Tomotaka Okamura, Mai Itoh, Motomu Nakatake, Nozomi Kuwano, Kosuke Horita, Kenta Ishii, Hiromichi Kohno, Yasuhiro Yasutomi, and Takafumi Nakamura
2 . 発表標題 Preclinical toxicological evaluation in cynomolgus monkey with tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus purified through manufacturing process
3 . 学会等名 The 24rd Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 2018
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki and Takafumi Nakamura
2 . 発表標題 Novel approach for systemic cancer therapy with oncolytic vaccinia virus through evading the host immune response
3 . 学会等名 The 24rd Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 2018
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, Kosuke Horita, Nozomi Kuwano, Kenta Ishii, Miyuki Nomura, Teruhisa Sakamoto, Tomotaka Okamura, Yasuhiro Yasutomi, Takafumi Nakamura
2. 発表標題 Preclinical Study of Tumor-Targeted and Armed Oncolytic Vaccinia Virus for Systemic Cancer Virotherapy
3. 学会等名 ASGCT 20th Annual Meeting, May 10 - 13, 2017, Washington, DC (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motomu Nakatake, Hajime Kurosaki, Kosuke Horita, Kenta Ishii, Nozomi kuwano, Kosei Hasegawa, Keiichi Fujiwara, Miyuki Nomura and Takafumi Nakamura
2. 発表標題 Preclinical study for tumor-targeted and armed oncolytic vaccinia virus for systemic cancer virotherapy
3. 学会等名 The 22st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考