

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08379

研究課題名(和文) 遺伝子治療による新規次世代リウマチ治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel gene therapy for rheumatoid arthritis

研究代表者

中西 徹 (Nakanishi, Tohru)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：30243463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗体投与で関節リウマチ治療効果が認められた抗CD81マウスIgG抗体を産生するハイブリドーマから抗体のH鎖とL鎖遺伝子のクローニングを行い、V領域をマウス、C領域をラットとするキメラ抗体遺伝子の作製に成功した。このキメラ抗体遺伝子からは分子量約15万のキメラ抗体が生産され、これがCD81に結合することを確認した。このキメラ抗体遺伝子を遺伝子治療用ベクターに搭載し、これをリウマチモデルラットの関節内に投与して遺伝子治療実験を行った。まずGFP遺伝子搭載ベクターを投与すると滑膜周辺にGFP遺伝子が効率よく導入された。次に抗CD81キメラ抗体遺伝子搭載ベクターを投与して、現在治療効果を検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究は関節リウマチの治療を遺伝子治療で行う初めての試みである。我々は既に、siRNAや抗体治療実験によって、CD81分子が関節リウマチの治療標的になりうることを示しているが、今回、この治療用抗体遺伝子をクローニングして遺伝子治療用ベクターに搭載し、関節内にこのベクターを導入し、持続的に抗体を関節で生産させることで、従来の抗体投与治療のように、何回も侵襲を受け、しかも高価な抗体費用を負担することなく、一回の遺伝子投与だけで、完全な治療効果を得ることができるといふ、全く新しいタイプの関節リウマチ治療薬の実用化を目指した。まずリウマチモデルラットを用いた遺伝子治療実験を行って成果を挙げている。

研究成果の概要(英文)：We have established mouse hybridoma clones which produce anti-CD81 monoclonal antibodies effective for treatment of rheumatoid arthritis. The genes encoding this anti-CD81 antibody (H+L) chains were cloned from mouse hybridoma cells and the chimeric genes containing mouse V region derived from this cloned gene and rat C region were constructed. The chimeric gene was introduced into CHO cells and chimeric antibodies were produced in the medium of cultured CHO cells. These chimeric antibodies also bound to CD81 protein. Then these chimeric genes were cloned into vectors for gene therapy. At first, control vector containing one GFP gene was introduced into the joints of CIA rats. Control vectors were effectively introduced into synovial tissue of the joints. Then chimeric genes have been introduced into the joints of CIA rats for treatment of rheumatoid arthritis.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：関節リウマチ CD81 テトラスパニン 遺伝子治療 キメラ抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラスター分化抗原 CD81 は TAPA-1 と呼ばれ、22-26kDa の III 型膜貫通蛋白 (4 回膜貫通型分子テトラスパニンファミリー) の一つである。造血系、神経外胚葉系、間葉系に発現し、細胞増殖やシグナル伝達に関係すると考えられている。

我々は、以前より、リウマチ性疾患の原因因子や診断マーカーの探索研究を進めてきたが、ヒト型高密度 DNA チップを用いた変形性関節症 (OA) 滑膜細胞と関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の遺伝子発現比較において、RA で発現亢進する遺伝子群の中に CD81 を見出した。そこで、ヒト滑膜由来滑膜肉腫細胞株である SW982 を用いて、CD81 の刺激に対するこの細胞の応答を、ヒト全ゲノム型 DNA チップを用いて解析したところ、RA において滑膜細胞の異常増殖を引き起こす原因遺伝子シノビオリン遺伝子 (Amano et al. *Genes Dev.* 2436, 2006) の発現が誘導されることがわかった。

我々はこのシノビオリンの発現を促進する可能性のある細胞膜上因子として初めて CD81 を同定した。作用機序の解明を進めたところ、これはシノビオリンプロモーター上の EBS-1 (Ets 結合) 部位に依存した応答であり、さらに、TNF- α の刺激によって上昇するシノビオリンの発現を CD81siRNA がキャンセルすることから、CD81 はこのシノビオリン発現誘導に直接関与していることが示唆された。また、CD81siRNA は滑膜細胞からの TNF 産生も阻止することから、CD81 は、RA における炎症発症や細胞異常増殖などの病態に total として大きく関与していることがわかった (Hanada, Nakanishi et al. *J Hard Tissue Biol* 22, 195, 2013)。

そこで、リウマチモデル動物において、この分子の発現を siRNA で抑制するとリウマチ症状が大きく改善されるという画期的発見に至った。CD81 を標的とする RA 治療薬は対症療法に終始しているので、CD81 の阻害はリウマチ性疾患の新たな根絶的治療薬の開発につながる可能性があると考えられた。そこで、抗 CD81 モノクローナル抗体を樹立し、これをモデル動物の腹腔あるいは関節に投与して抗体治療実験を行い一定の治療成果を得ることができた。しかし、このデータを基に抗体治療薬開発を進める場合、試験用にヒト型抗体を頻回投与するためその開発コストは高く、また競合他社との比較検討が必要なことや生産における不安定性も大きいという背景が当時あった。

2. 研究の目的

そこで、この問題を解決して少しでも早く治療薬を患者のもとへ届けるため、近年見直されている遺伝子治療法の検討を行うこととした。この CD81 を標的とする新規次世代リウマチ遺伝子治療薬開発においては、安全かつ細胞内で抗体分子を長期持続的に生産可能な特別なステルスベクターを用いることが大きなポイントであった。

高齢化社会を迎えつつある現在の日本において、生活習慣病の予防は健康増進と医療費削減の上での大きな課題であり、この中でもリウマチ性疾患のような運動器疾患の根絶的治療は、対象患者の activity を高め、生き甲斐をもたらすと共に、社会の活性化や可労働人口の増大をうながす。しかしながらリウマチ性疾患の診断、治療においては、根絶的治療につながる効果的な分子標的が未だ見いだされていない。

このような状況下、CD81 の抑制がリウマチの根本的治療につながる可能性があることを示した我々の一連の研究は大きな反響をよんでいてリウマチ患者の期待も大きい。この研究において、我々は治療薬開発をリードする立場にあった。治療のためのモノクローナル抗体も既に開発し、今回、上に述べたように、産業総合技術研究所との共同研究によって、その独自技術である特殊なベクター技術、即ち 4 ヶ月以上の長期発現と siRNA による人為的なベクター除去をも可能にしたステルスベクターを利用して、新しい遺伝子治療薬を開発することとなった。治療用抗 CD81 モノクローナル抗体遺伝子を治療用ベクターに搭載し、このベクターを関節に導入して滑膜で発現させて、持続的に分子標的治療を実施するという、かつてない独創的な試みを行う。これが成功すれば、抗体医薬品の頻回静脈投与による侵襲やそれに伴う高額な医療費の負担といった現在の抗体治療の問題点が一掃され、画期的なリウマチ治療法開発の第一歩が築かれることになる。

3. 研究の方法

・持続発現可能なステルスセンダイウイルスベクター-SeVdp の関節内導入実験

産業技術総合研究所で開発された、長期発現持続可能でベクター自体を人為的に除去可能なステルスベクター-SeVdp にマーカー遺伝子 (EGFP や Keima-Red など) を搭載して、これをコラーゲン誘導関節炎 (CIA) ラットの関節内に導入する。導入後、マーカー遺伝子の発

現を指標に導入部位や導入効率、持続性等を判定する。

・治療用抗 CD81 マウスモノクローナル抗体遺伝子のクローニングとラット遺伝子とのキメラ体作製

既に抗体治療実験に用い成果をあげている抗 CD81 マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、この抗体遺伝子の H 鎖と L 鎖遺伝子をクローニングする。さらに、ラット C 領域を別途クローニングあるいは合成しておき、マウスの C 領域と組換えることでマウスラットのキメラ抗体遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を発現ベクターに搭載し、これを動物細胞に導入して実際に発現させることで、キメラ抗体タンパク質が培養上清に生産されていることを確認する。さらに ELISA により、この抗体がマウスの抗体と同様に CD81 への結合能を有していることを確認する。

・ステルスセンダイウイルスベクター-SeVdp を用いた遺伝子治療実験

ステルスベクター-SeVdp に、上で作製したキメラ抗体遺伝子の H 鎖と L 鎖をタンデムに挿入して抗体発現用ステルスベクターを作製する。これを CIA ラットの関節内に導入して、治療用抗体として持続的に抗体分子を発現させて、CD81 を分子標的とした関節リウマチの遺伝子治療実験を行う。抗体の発現部位や発現量について、治療実験後の組織や関節液を採取してウェスタンブロットや RT-PCR により解析する。さらにこのベクターの、関節からの流出がないかどうか、治療動物から、血清や臓器のサンプルを採取して上記同様に解析する。

4. 研究成果

遺伝子治療に向けて、既にラットのリウマチ治療モデル実験で治療効果が認められているマウス IgG 抗体のラットキメラ化を進めて効果の再確認を行うと共に、この抗体の遺伝子クローニングを行うことで遺伝子治療法の開発を進めるために、マウス IgG 抗体産生性ハイブリドーマから、この抗体の H 鎖と L 鎖遺伝子のクローニングを試みた。

PCR と 5' LACE を組み合わせた遺伝子クローニングを行い、得られたクローンの塩基配列決定を行った。その結果、H 鎖と L 鎖に相当すると思われる遺伝子のクローニングに成功したが、この遺伝子の他にも短い複数のクローンが得られた。これらについてはミエローマから抗体としては産生されていないものの発現されている抗体遺伝子が存在し、それらを単離したものと考えられた。

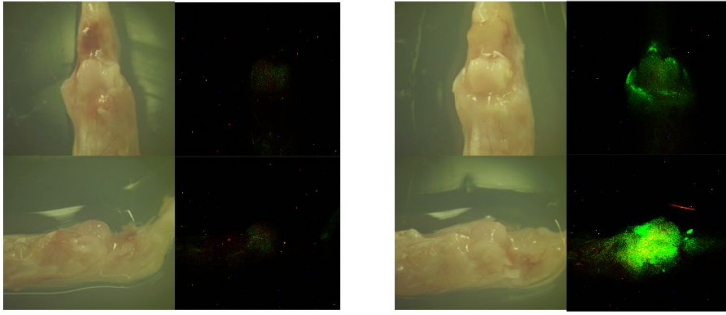
次に、クローニングした H 鎖と L 鎖の遺伝子について、この C 領域をラット IgG 遺伝子の C 領域と置き換える抗体のキメラ化に取り組んだ。ラット IgG 抗体 H 鎖と L 鎖の C 領域の遺伝子クローニングを同様に行い、これらの遺伝子をマウス IgG 遺伝子と組換えて、H 鎖、L 鎖それぞれで V 領域をマウス、C 領域をラット IgG 遺伝子とするキメラ抗体遺伝子の作製に成功した。

これら H 鎖と L 鎖のキメラ抗体遺伝子を CHO 細胞に導入すると、細胞の培養上清に分子量約 15 万のこのキメラ抗体が生産されることを Western blot によって確認した。さらにこのキメラ抗体が CD81 への結合性を有することを確認するため、CD81 LEL 抗原を固定化した ELISA を行った。その結果、CHO 細胞で生産されたこのキメラ抗体が CD81 に対して結合性を有していることがわかった。これらの結果から、今回作製したキメラ抗体遺伝子を治療用遺伝子として使用することが可能と判断された。

そこで、リウマチモデルラットを用いて、その関節内に抗 CD81 抗体遺伝子 (H 鎖と L 鎖) を搭載した治療用ベクターを注入する遺伝子治療実験を進めた。これらキメラ抗体遺伝子 H 鎖と L 鎖を、遺伝子治療用ベクターに並べて搭載し、このベクターを細胞に導入して、同様にキメラ抗体タンパク質が生産されることと、生産された抗体が CD81 に対する結合能を有することを確認した。そこで、実際にこの遺伝子治療用ベクターをリウマチモデルラットの関節内に投与して、リウマチ治療実験を行うこととした。最初に最適投与容量について確認するため緩衝液をラット関節に注入して容量を決定した。次に、GFP 遺伝子を遺伝子治療用ベクターに搭載したコントロールベクターを作製して、これを、リウマチモデルラットの関節内に投与して、滑膜周辺の遺伝子導入部位やその発現量、さらに発現持続期間等について検討を行った (次頁図)。それらの結果を基に、現在、抗 CD81 キメラ抗体遺伝子搭載遺伝子治療ベクターを、実際にリウマチモデルラットの関節内に投与して、関節リウマチ治療効果を解析中である。

PBS

GFP



SD ラット 8w の右足首関節に 10 μ l の GFP 搭載コントロールベクターを注入して 2 日後の結果。左は PBS のみ注入、右は GFP 搭載コントロールベクターを注入。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsutomu Yamasaki, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Toshikazu Kubo and Tooru Nakanishi	4. 巻 28
2. 論文標題 Construction of an Expression Vector Containing Mouse-Rat Chimeric Genes Encoding a Therapeutic Antibody against CD81	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biol	6. 最初と最後の頁 239-244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mihara K, Kohno S, Hatanaka S, Yamasaki T, Nishida K and Nakanishi T	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of specific protein markers of rheumatoid arthritis in synovial fluid and serum.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biol	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山崎 勤、中西 徹	4. 巻 5
2. 論文標題 関節リウマチの診断法について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 就実大学薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山崎 勤、中西 徹	4. 巻 7
2. 論文標題 関節リウマチにおける生物学的製剤	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 就実大学薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 10-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizoshiri N, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Hayashi D, Kishida T, Arai Y, Nakanishi T, Kubo T	4. 巻 on line
2. 論文標題 The tetraspanin CD81 mediates the growth and metastasis of human osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Oncol	6. 最初と最後の頁 s13402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yamasaki T, Nakanishi T
2. 発表標題 Application of tetraspanin CD81 siRNA for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 ASEAN-JAPAN Genome Medicine Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakanishi T
2. 発表標題 Development of tetraspanin CD81 as a clinical target of rheumatoid arthritis and breast cancer
3. 学会等名 Internationak Conference on Precision Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎勤、新井祐志、中川周士、久保俊一、中西 徹
2. 発表標題 新規関節リウマチ抗体薬開発のためのキメラ抗体作製
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西 徹、山崎 勤、新井祐志、中川周士、久保俊一
2. 発表標題 テトラスパニンCD81を標的とした新規次世代リウマチ治療薬の開発
3. 学会等名 硬組織再生生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎勤、中川周士、新井祐志、久保俊一、中西 徹
2. 発表標題 新規関節リウマチ治療薬のターゲットCD81に対する抗体薬の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamasaki T, Nakanishi T
2. 発表標題 Application of tetraspanin CD81 siRNA for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 Franco-Japanese Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakanishi T
2. 発表標題 Application of genome editing in medical treatment
3. 学会等名 Franco-Japanese Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西 徹、山崎 勤、新井祐志、中川周士、中島利博、久保俊一
2. 発表標題 関節炎におけるテトラスパニンCD81の機能解析
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西 徹、山崎 勤
2. 発表標題 新しい分指標的型リウマチ抗体治療薬の開発
3. 学会等名 KMSメディカルアーク
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 根岸和雄、中西 徹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 廣川書店	5. 総ページ数 266
3. 書名 遺伝子工学-基礎から医療まで-	

〔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
研究 分担 者	新井 祐志 (Arai Yuji) (50347449)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長塚 仁 (Nagatsuka Hitoshi) (70237535)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	山崎 勤 (Yamasaki Tsutomu) (80596148)	就実大学・薬学部・助教 (35307)	