

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390285
 研究課題名（和文） ヒト化モデルマウスを用いた次世代遺伝子治療法の開発：
 遺伝子修復による自己細胞再生
 研究課題名（英文） Development of a new gene therapy with humanized mouse model：
 Autologous B cell regeneration with gene repair
 研究代表者
 原 寿郎（HARA TOSHIRO）
 九州大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：40150445

研究成果の概要（和文）：

BTK 遺伝子の exon6～exon19 領域、隣接遺伝子である *TIMM8A* の全遺伝子および GFP-Hyg 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV.BTK ベクターを作製した。同ベクターを男性 pre-B ALL 由来細胞株である Nalm6 に感染させ、Hyg 耐性株を得た。PCR 法により Screening を行い、Southern blotting により相同組換えを証明した。また正常男性ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に本ベクターを感染させ、ベクターゲノムの Integration を証明した。

研究成果の概要（英文）：

We have made a HD-Ad.AAV.BTK vector containing *BTK* exon6～exon19, *TIMM8A* and GFP-Hyg. After treatment of a male pre-B ALL cell line, Nalm6, with the vector, Hyg-resistant clones were obtained. Recombination of *BTK* gene was demonstrated in the clones by Southern blotting. In addition, vector genome was integrated to CD34-positive cells from male cord blood.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1) 遺伝子治療、(2) 原発性免疫不全症候群、(3) 伴性劣性無ガンマグロブリン血症、(4) アデノ AAV ハイブリッドベクター、(5) NOD/SCID/ c 完全欠失マウス、(6) B 細胞分化障害

1. 研究開始当初の背景

伴性劣性無ガンマグロブリン血症(XLA)は、X染色体に存在するBruton Tyrosin Kinase(BTK)遺伝子の変異により、B細胞系の分化障害を来す原発性免疫不全症候群である。対症療法としてガンマグロブリン補充療

法が行われているが、生涯にわたる補充は膨大な治療費を費やし、患者自身の生活の質の低下をもたらしている。これまで様々な原発性免疫不全症候群に対して遺伝子治療が試みられたが、成功例はごくわずかであり、導入

遺伝子による発がんが大きな問題となった。そこで従来の遺伝子導入による治療法に代わって、変異遺伝子を修復する次世代の治療法の開発が望まれている。また、マウスを用いた移植実験により、XLAには造血幹細胞(HSC)の一部で変異遺伝子を修復でき、かつそれが増殖優位性を獲得できれば、B細胞の分化障害を回復できる可能性が示されている。

2. 研究の目的

XLA患者細胞を用いて変異遺伝子を修復する次世代の遺伝子治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

アデノ AAV ハイブリッドベクター(HD-Ad.AAV. ベクター)は、HSC に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組換えによる目的遺伝子座領域での組込み(ターゲティング)による修復をおこす AAV ベクターの両者の長所を備えている。我々は BTK 遺伝子のクローニングを行い、GFP と Hyg 耐性遺伝子をマーカーとした HD-Ad. AAV. BTK ベクターを作製した。同ベクターを用いて遺伝子修復を行う。

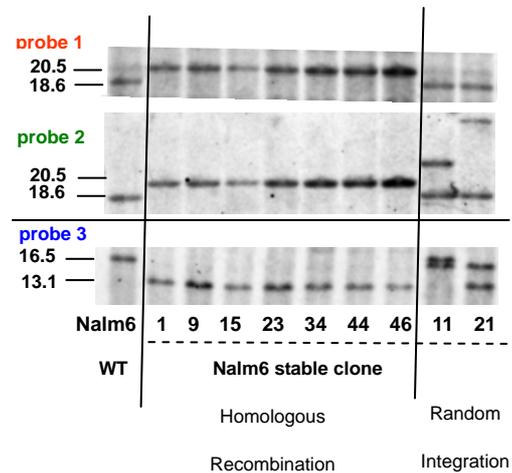
4. 研究成果

伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、X 染色体に存在する Bruton's Tyrosin Kinase (BTK) 遺伝子の変異により B 細胞系の分化障害を来す原発性免疫不全症である。本疾患では、造血幹細胞の一部で変異遺伝子を修復し、かつそれが増殖優位性を獲得できれば、分化障害を回復できる可能性がある。これまでレトロウイルスベクターを用いた原発性免疫不全症に対する遺伝子治療は多く報告されているが、Random integration による発癌が特に問題となっている。ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクター (HD-Ad.AAV ベクター) は、造血幹細胞に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組換えによる目的遺伝子座領域でのターゲティングに

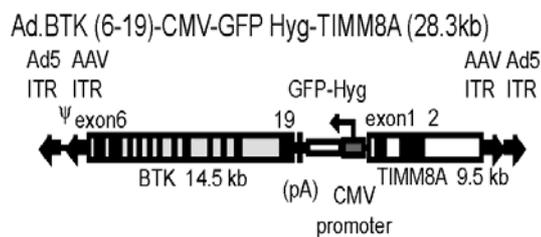
よる修復をおこす AAV ベクターの両者の長所を備えている。我々は BTK 遺伝子を搭載した Ad.AAV.BTK ベクターを作製し本ベクターによる BTK 遺伝子修復研究を行った。

3. 研究の方法

BTK 遺伝子の exon6 ~ exon19 領域、隣接遺



伝子である TIMM8A の全遺伝子および GFP-Hyg 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV.BTK ベクターを作製した(図1)。

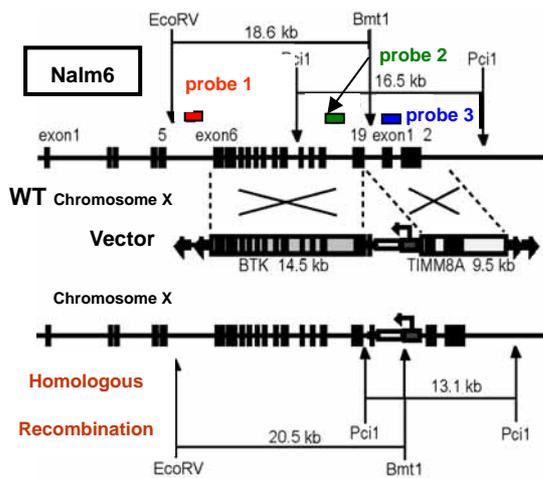


【図1】HD-AAV.BTK ベクターの構造

同ベクターを男性 pre-B ALL 由来細胞株である Nalm6 に MOI4000 で感染させ、Single cell cloning により Hyg 耐性株を得た。同株で PCR および Southern blotting により相同組換えおよび蛋白発現の解析を行った。また、正常ヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法により分離し、同ベクターを感染させ colony assay 法により Hyg 耐性 colony を得て解析した。

4. 研究成果

MOI4000 で感染させた Nalm6 から、61 株



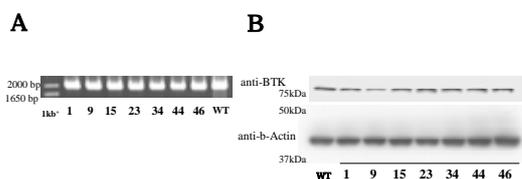
(6.3×10^{-3}) の Hyg 耐性株を得た。PCR 法により Screening を行い、Southern blotting により 7 株 (7.3×10^{-4}) で相同組換えを証明した (図 2)。

図 2a.Southern blotting 概略

ヒト X 染色体長腕上の *BTK* 遺伝子座領域およびその近傍の模式図。Southern blotting での *BTK* の exon6-19 領域の検出は、Bmt1 と EcoR で切断し、Probe 1 及び 2 を用いた。*TIMM8A* 領域の検出は Pci1 で切断し、Probe 3 を用いた。

図 2b.Southern blotting 結果

b.左のレーンから Nalm6 野生型 (WT) PCR で Homologous recombination の候補となったサンプル (# 1、9、15、23、34、44、46) Random integration の候補となったサンプル (# 11、21)。



BTK 翻訳領域の mRNA は野生(WT)株と同等であった(図 3A)。接合部の Sequence を行い、ウイルスベクター由来のゲノム配列が挿入されていないこと、また翻訳領域の cDNA 解析で exon skip や splicing error がいないことを確認した。Western blotting により相同

組換え株で WT 株と同等の *BTK* 蛋白発現を証明した (図 3B)。

【図 3】Nalm6 細胞での相同組み換えによる *BTK* 遺伝子・蛋白発現解析

A. 相同組み換えによる *BTK* 遺伝子の Targeting が確認されたサンプルの、*BTK* 遺伝子翻訳領域の RT-PCR。左のレーンから 1 kb⁺ マーカー、Homologous recombination が確認されたサンプル (# 1、9、15、23、34、44、46) 野生型 (WT)。

B. *BTK* 蛋白の Western blotting。左のレーンから野生型 (WT) 相同組換えと確認されたサンプル。上段が抗 *BTK* 抗体 (77 kDa) 下段が抗 β -actin 抗体 (42 kDa)。

正常男性ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に本ベクターを感染させ、Colony assay を行い、Hygromycin 耐性 GFP 陽性のコロニーを確認し、PCR によりベクターゲノムの Integration を証明した。

5 . 主な発表論文等 (雑誌論文) (計 3 件)

Tabrizi SJ, Nihiro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T and Akashi K: T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naïve and IgM⁺ Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *J Immunol*: 1490-1499, 2009

Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H: Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in

hyper-IgE syndrome. J Exp Med.

2009 ;206:1291-301

Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD:FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. J Biol Chem.

2009 ;284:8548-56

〔学会発表〕(計 5 件)

Hara T The 5th ASPR 2009.5.22-23, Hangzhou, China, Rapid diagnostic system of primary immunodeficiency diseases in Japan.

土居岳彦、高田英俊、金兼弘和、宮脇利男、

原 寿郎: ヒト化マウスにおけるヒト B 細胞解析と新規 XLA マウスモデル確率への応用

第 112 回日本小児科学会 2009 年 4 月 17 - 19 日 奈良

石村匡崇、落合正行、山元裕之、古和温子、土居岳彦、高田英俊、大賀正一、楠原浩一、中津可道、續輝久、相澤絵美、三谷幸之介、

原 寿郎: ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを用いた相同組換えによる BTK 遺伝子修復研究. 第 37 回日本臨床免疫学会 2009 年 11 月 13 - 15 日東京

石村匡崇、落合正行、山本裕之、古和温子、土居岳彦、高田英俊、大賀正一、楠原浩一、中津可道、續輝久、相澤絵美、三谷幸之介、

原 寿郎: ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを用いた相同組換えによる BTK 遺伝子修復研究. 第 51 回日本小児血液学会・第 25 回日本小児がん学会

2009 年 11 月 27 ~ 30 日 東京

Ishimura M, Doi T, Takada H, Ohga S, Hara T: BTK gene repair by homologous recombination using helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid

vector. 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月

2 - 4 日大阪

〔図書〕(計 1 件)

原 寿郎 免疫疾患 標準小児科学 第 7 版 医学書院 (分担) 2010, 印刷中

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原 寿郎 (HARA TOSHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 40150445

(2) 研究分担者

楠原 浩一 (KUSUHARA KOUICHI)

九州大学医学研究院・准教授
研究者番号: 20243941

高田 英俊 (TAKADA HIDETOSHI)

九州大学病院・准教授
研究者番号: 70294931

井原 健二 (IHARA KENJI)

九州大学病院・講師
研究者番号: 80294932

中津 可道 (NAKATSU YOSHIMICHI)

九州大学医学研究院・准教授
研究者番号: 00207820

(3) 連携研究者

(0)