

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591028  
 研究課題名（和文） 新たな遺伝子治療のコンセプトを用いたアミロイドポリニューロパチーの治療研究  
 研究課題名（英文） Therapeutic study of amyloid polyneuropathy by new concept of gene therapy

研究代表者  
 中村 政明（NAKAMURA MASAOKI）  
 国立水俣病総合研究センター・臨床部・室長  
 研究者番号：50399672

## 研究成果の概要：

家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）に対する治療として、これまで我々は、single stranded oligonucleotides（SSOs）による原因遺伝子である異型トランスサイレチン（TTR）の遺伝子変換に成功した。そこで、本研究では FAP の遺伝子治療の実用化に向けて、更に変換効率を上げるため、SSOs を細胞内で発現させる SSOs 発現ベクターによる遺伝子変換システムを確立した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2, 800, 000	0	2, 800, 000
平成 20 年度	800, 000	0	800, 000
年度			
年度			
年度			
総計	3, 600, 000	0	3, 600, 000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳神経疾患、核酸、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）は成人発症の常染色体優性遺伝を呈する神経難病である。血中の異型トランスサイレチン（TTR）のほとんどが肝臓から産生されることから、近年、肝移植が行われるようになったが、様々な施設の追跡調査の結果、肝臓の異型 TTR 遺伝子を移植により正常化すると、全身症状が手術の時点以上には進行しなくなることが明らかとなった。しかし肝移植は、1. 術中術後管理に生命の危険性を伴う、2. 多額

の医療費を伴う、3. 異型 TTR 遺伝子を持つ FAP 未発症者には施行することが出来ない、4. 網膜、脈絡叢から産生される異型 TTR は制御できず、眼や髄膜に沈着するアミロイドは阻止できない、などのいくつかの大きな問題点がある。従って、こうした問題を解決するために、新たな治療法の開発が不可欠である。これまで我々は TTR 遺伝子を変換するように設計した single- stranded oligonucleotides（SSOs）を合成し、アテロコラーゲンに包埋した後に HepG2 細胞およびトランスジェニック

クマウス (Met30 タイプ) に投与して TTR の遺伝子変換を試みたところ、遺伝子変換が認められることが明らかになった。しかし、トランスジェニックマウス (ATTR V30M タイプ) を用いた in vivo の実験系では遺伝子変換率の改善はあまりみられず、SSOs そのものを投与する方法では in vivo での改善は困難 (in vivo で改善を得るには大量のオリゴヌクレオチドが必要で、トランスフェクションによる副作用が生じやすいため) と考えられた。

## 2. 研究の目的

FAP の遺伝子治療の実用化に向けて、更に変換効率を上げるため、SSOs を細胞内で発現させるように設計した single-stranded DNA expression vector の開発を行う。本ベクターは、Chen Yらにより DNA エンザイムを細胞内に発現させるために開発されたもので、70~80%標的遺伝子の発現の抑制が確認されたため、この方法で細胞内に SSOs を発現させることが期待される。しかも、本法では SSOs よりも安価に大量に合成することが可能であり、SSOs に比べて少ない量で遺伝子変換が起こることが予想されるため、この治療戦略は極めて有望と考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) Single-stranded DNA expression vector の開発 :

Single-stranded DNA expression vector は、①RT: reverse transcriptase、②TS: reverse transcription termination sequence、③PBS: RT primer binding sequence、④ ssDNA: single-stranded DNA (アンチセンス、DNA エンザイムなど)、⑤IRES: mRNA 内部のリボソーム結合サイト、⑥TE: terminator sequence から構成され、Chen Yらによって提唱された。我々は、彼らのベクターより高い RT 活性を得るために、RT cDNA を組み込む際の Kozak sequence の使用と完全長の RT の導入および④の部分に SSOs の導入を行った (図 1 参照)。

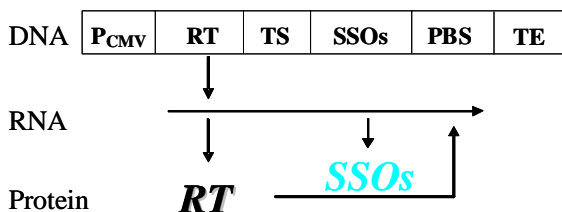


図 1 : Single-stranded DNA expression vector の全体像と SSOs 発現のメカニズム

正常ヒト TTR 遺伝子を有する HepG2 細胞を

ヒト ATTR V30M および正常マウス TTR 遺伝子に変換するように設計した SSOs の配列は以下のとおりである。

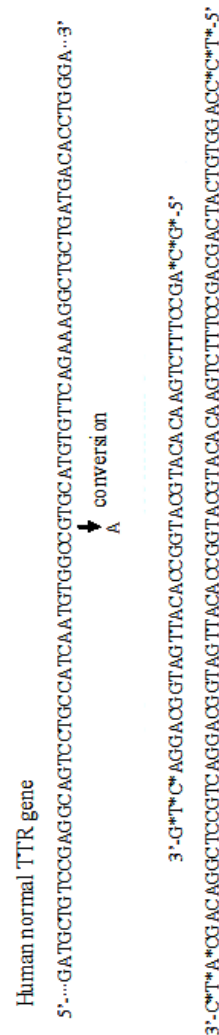


図 2 : 設計した SSOs の配列

(2) 遺伝子変換に最適な single-stranded DNA expression vector およびトランスフェクションの検討 :

遺伝子変換を起こすように作成した種々の長さ (50bp, 74bp) の SSOs を発現する single-stranded DNA expression vector を様々なトランスフェクション方法を用いて、FAP の遺伝子治療の標的細胞である肝細胞株である HepG2 細胞にトランスフェクションした。

トランスフェクション法 :

- 1) カチオン性脂質 : Lipofectamine 2000
- 2) TransIT-LT1 Transfection Reagents
- 3) ポリアミン系 : GeneJuice Transfection Reagent
- 4) エレクトロポレーション法 : 遺伝子導入

システム Nucleofector

- 5) 炭酸アパタイトナノ粒子：アパキャリー 1
- 6) 5) + 遺伝子導入助剤

(3) 遺伝子導入効率の評価：

遺伝子導入効果を確認するために、蛍光色素 GFP を発現する pmaxGFP ベクターを上記のトランスフェクション法を用いて HepG2 細胞に導入した。導入 2 日後に蛍光顕微鏡下で観察した。

(4) 遺伝子導入効果の検討：

Single-stranded DNA expression vector の投与 3 日後に細胞を回収し、RNA を抽出し、遺伝子変換率を算定し、遺伝子変換に最適な方法を決定した。

遺伝子変換率は、正常 TTR と ATTR V30M を認識するプローブ（正常 TTR 認識プローブ：VIC-CAATGTGGCCGTGCAT；ATTR V30M 認識プローブ：FAM-AATGTGGCCATGCAT）とエクソン 2 を増幅するプライマー（CTCTGATGGTCAAAGT TCTAGATGCT と GTGTCATCAGCAGCCTTTCTG）を用いて、リアルタイム RT-PCR を行った。

変換率を求まるために、正常 TTR：ATTR V30M=9:1, 49:1, 249:1, 1249:1 の混合した DNA を用いてリアルタイム PCR を行い、標準曲線（縦軸：ATTR V30M の割合；横軸：Ct (ATTR V30M)-Ct (正常 TTR)）を作成した（図 2）。

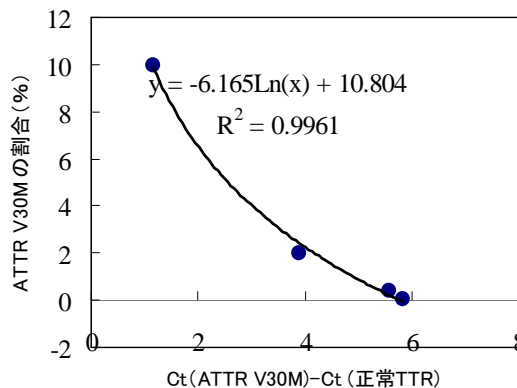


図 2：遺伝子変換率を求めるための標準曲線

single-stranded DNA expression vector による遺伝子変換率は、この標準曲線を用いて行った。

#### 4. 研究成果

肝移植は、FAP の進行を停止させる有効な治療法であるが、肝移植は前述のごとく多くの問題を抱えている。従って、肝移植に代わる FAP 患者の肝臓における異型 TTR の産生を

抑制する新たな治療法の開発が望まれる。新しい治療法の一つとして、SSOs を用いて遺伝子を修復したり、アンチセンスやリボザイムによる遺伝子の発現を抑制したりすることで、FAP 患者の肝臓における異型 TTR の産生を抑制する遺伝子治療が考えられる。しかし、アンチセンス法、リボザイム法は、TTR 遺伝子発現レベルでの治療法であるため、TTR が極めて血中半減期の短い蛋白であることを考えると実際の治療戦略としては無理がある。これに対して SSOs を用いた遺伝子修復は、DNA レベルでの遺伝子修復のため、一度組み換えが起こると、その効果は半永久的に続くと考えられる。従って、我々は、SSOs を用いた遺伝子修復法が、FAP の最も理想的な遺伝子治療法と考えた。

これまで我々は TTR 遺伝子を変換するように設計した SSOs による遺伝子変換に成功したが、in vivo で改善を得るには大量のオリゴヌクレオチドが必要で、トランスフェクションによる副作用が生じやすいため、SSOs オリゴ自体を使うのではなく、SSOs を細胞内で発現させる single-stranded DNA expression vector を作成した。

遺伝子変換率を向上させるためには高い遺伝子導入効率を得られるトランスフェクション法が不可欠である。そこで、HepG2 細胞に対する 6 種類のトランスフェクション法の遺伝子導入効率と細胞生存率を比較したところ、アパキャリー 1 を使用した系が最も優れていた（図 3）。

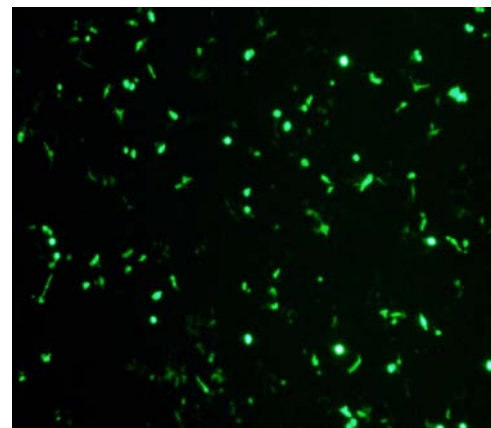


図 3：アパキャリー 1 による遺伝子導入

そこで、アパキャリー 1 およびアパキャリー 1 + 遺伝子導入助剤を用いて、50 bp と 74 bp の SSOs を発現する single-stranded DNA expression vector を HepG2 細胞に導入した。アパキャリー 1 単独で導入を行った系では遺伝子変換はほとんど得られなかったが、アパキャリー 1 と遺伝子導入助剤を用いた系では、50bp の SSOs を発現させたもので 0.61%、74bp の SSOs を発現させたもので 1.47%の遺

伝子変換が認められた。念のために、他のトランスフェクションで導入を行ったが、遺伝子変換はほとんど得られなかった。

以上より、今後課題は多いものの、本法によるFAPの遺伝子治療の可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Ueda M, Ando Y, Hakamata Y, Nakamura M, et al. (15 名): A transgenic rat with the human ATTR V30M: a novel tool for analyses of ATTR metabolisms. Biochem Biophys Res Commun. 352:299-304, 2007.

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 政明 (NAKAMURA MASAOKI)

国立水俣病総合研究センター・臨床部・室長

研究者番号：50399672

### (2) 研究分担者

安東 由喜雄 (Ando Yukio)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：20253742

### (3) 連携研究者

無し。