

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890130

研究課題名（和文） ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病細胞補充療法の開発

研究課題名（英文） Human FVIII expression using a HAC vector toward stem cell-mediated gene therapy for hemophilia A

研究代表者

黒崎 創 (KUROSAKI HAJIME)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70464295

研究成果の概要（和文）：FVIII発現ユニットマルチコピーを搭載した HAC ベクターを自己 iPS 細胞に導入し、分化させ皮下移植するという最少数自己移植細胞による血友病補充療法モデルの確立することを目的としている。FVIII欠損マウス由来、血友病患者由来の線維芽細胞から iPS を作製し、それに FVIIIマルチコピーを搭載させた HAC ベクターを導入する。本研究が目指す治療モデル確立により健全組織の損失を回避すること、HAC ベクターを用いることで細胞当たりの産生の飛躍的な向上及びごく少数の移植細胞で因子を補充することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We sought to elucidate the potential usefulness of a human artificial chromosome (HAC) vector carrying the human FVIII cDNA for gene therapy of Hemophilia A. We have demonstrated the production and secretion of FVIII using the HAC vector carrying multi copies of FVIII in the hemophiliac mouse derived stem cell. This develops promising gene therapies for hemophilia A.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：再生医科学

科研ひの分科・細目：医歯薬学・血液内科学

キーワード：染色体、血友病、iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

HAC は細胞中で単一コピーの自律的な極小染色体として振る舞うベクターであり、染色体であるが故遺伝子導入サイズに制限がなく、ホストゲノムを破壊せず、Cre-LoxP 反応を利用しカセット方式で巨大遺伝子を容易に搭載できる。またベクターと名のつくとおりにあらゆる細胞に移入可能である。このような HAC ベクターの利点を生かし、持続的改善と患者の経済的・肉体的負担の大幅軽減をもたらす血友病治療法をマウスで検証することがきっかけとなりスタートした。それはいかえると Factor VIII 発現ユニット多コピーを HAC に搭載し、自己間葉系幹細胞及び皮膚線維芽細胞に導入、皮下移植するという最少自己移植細胞による補充療法である。具体的には Factor VIII の cDNA を多数タンデムに HAC ベクター上に搭載し、ヒト間葉系幹細胞あるいは患者由来 iPS 細胞に導入し高効率発現システムを構築する。まずモデル系としてこれをマウス皮下に移植し、発現を定量化し、最少数の移植細胞による長期補充療法を検証する。さらにクラニアルウインドウ法にてリアルタイムで細胞生着のプロセス、細胞動態、Factor VIII の分泌動態を長期にわたり解析し、安全性・機能性を評価する。遺伝子導入した幹細胞を臓器に定着させる上での問題は、前処置として健常組織を切除・除去する必要があることである。我々が提案する方法は自己細胞（間葉系幹細胞や iPS 細胞）皮下移植であり、高効率発現系であるため、最少数の細胞を移植するだけで十分かつ持続的な補充効果が期待でき、健常組織を傷つけることを回避できる。我々の提案は患者にとって極めて非侵襲的かつ安全であり、経済的・肉体的負担を大幅に軽減できる新しい遺伝子治療法の確立を目指したモデル系である。

## 2. 研究の目的

血友病では組換え製剤の長期投与による苦痛や経済的負担の軽減のために遺伝子治療の有用性が指摘されてきた。そのためにウイルスベクターが Factor VIII, IX 遺伝子の導入に用いられてきたが、これらの因子は遺伝子サイズが大きく、全長 cDNA の搭載が困難であること、ホストゲノムへの挿入が避けられずがん化の懸念が払拭できないこと、投与の繰り返しによる中和抗体出現の問題があった。本研究では遺伝子導入サイズに上限がなく、ホストゲノムを破壊せず（がん化の懸念がない）安定に長期間保持される HAC ベクターの利点を生かし、Factor VIII の発現ユニットを多数搭載した HAC を構築し、安定で安全な高効率発現系を作ること、従来ベクターが抱える問題を克服する。遺伝子導入する細胞と

して、従来は自己血液幹細胞や肝幹細胞が主に用いられてきた。これらは万一副作用が発生した際に簡単には除去できないという欠点がある。一番大きな問題として導入幹細胞を生着させるためには、前処置として患者の健常細胞／組織を除去、切除することが必要となる。本研究では調製が容易な間葉系幹細胞に構築した HAC を導入し、さらにこれを皮下移植し定着させることで健常組織を損なうことを回避する。さらに将来的には患者由来 iPS 細胞に HAC を導入し肝細胞へ分化誘導後、肝細胞での発現確認すること、線維芽細胞へ分化誘導後は皮下移植することが考えられる。HAC を使うことで細胞当たりの産生の飛躍的向上が実現でき、ごく少数の移植細胞で因子を補充できること、不要の際には外科的に除去することができることも利点として挙げられる。本研究が目指す「HAC を搭載した極少数の自己細胞の移植による補充療法」は、肉体的にも経済的にも患者への負担が少ない治療法の確立という社会的要請にも十分応えることができるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1. Factor VIII を高発現する機能性 HAC の構築と発現解析と長期間培養による発現安定性

Factor VIII 発現ユニットを効率よく産生できるようにタンデムに 1, 2, 4, 8, 16 コピーつないだ HAC を構築する。プロモーターとしては間葉系幹細胞と肝細胞とで実績のある CAG プロモーターを用い、それぞれのユニットの発現を確保するためユニット間にインスレーター配列を置く。これらを CHO 細胞で構築し Factor VIII を安定に産生できるかどうかを選択薬剤不含培地で長期培養後、細胞培地上清を用いて発現レベルを調べる。

### 2. モデルマウスへ移植と発現の確認、治療効果の確認を行う

移植した細胞数と発現量の関連を明らかにし、目標値として設定している正常値の 2-4%（日常生活で出血のリスクを激減できるとされる値）を産生するために必要な条件を明らかにする。

### 3. 機能性 HAC のヒト間葉系幹細胞及び Factor VIII 欠損マウス由来 ntES 細胞への移入

CHO 細胞から微小核融合法でヒト間葉系幹細胞と Factor VIII 欠損モデルマウス由来 ntES 細胞に構築 HAC を移入し HAC 保持細胞を取得する。FISH 解析で HAC が一コピーの独立した極小染色体として保持されていることを確認する。培養上清をもちいて、Factor VIII が発現されていること確認する。同じ目的で in vitro での継代数、凍結保存日数を変えた

ものも使い、移植細胞としての HAC 導入細胞の品質管理法の検討を行う。間葉系幹細胞と ntES 細胞についてはその in vitro での分化能、各種マーカーの発現を HAC 導入、非導入細胞で比較する。

#### 4. iPS 細胞の作製

FVIII欠損マウス由来線維芽細胞取得についてはモデルマウスを用いる。患者由来ヒト線維芽細胞については現在のところ commercial available ではない。正式なインフォームド・コンセントのもと、その患者由来の iPS 細胞を作製しマウス由来の iPS 同様に FVIII発現 HAC ベクターを導入し、分化能や安全性をマウスで検討する。この患者由来の線維芽細胞に関しては名古屋大学医学部血液・腫瘍内科学分野講座の松下正講師に研究協力者として参加してもらい分与していただく。入手でき次第、iPS への誘導を遂行していく。必須の4つの iPS 誘導遺伝子、Oct3/4, Sox2, Klf4 及び c-Myc をレトロウイルスにより線維芽細胞へ導入し、G418 耐性コロニーをとってくる。

#### 5. 機能性 HAC の iPS 細胞への移入

CHO 細胞から微小核融合法で iPS 細胞に構築 HAC を移入し HAC 保持細胞を取得する。FISH 解析で HAC が一コピーの独立した極小染色体として保持されていることを確認する。

ELISA と Clotting assay にて iPS 細胞培養上清中の FVIII が発現、産生されていることを確認する。

#### 4. 研究成果

Factor VIII cDNA を 1, 2, 4, 8, 16 コピー搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行った。染色体解析の結果、これら HAC は独立したミニ染色体として安定に保持されていた。これらの細胞クローンでは Factor VIII のコピー数依存的な発現、そしてクローンに寄らない均一な発現を確認でき、Factor VIII を安定に産生できるかどうかを選択薬剤不含培地で長期培養後も安定に発現していることがわかった。これらの細胞を血友病モデルマウスへ移植すると尻尾切断後の出血死を免れたことから 4 コピーの Factor VIII 保持細胞で十分治療効果を発揮することがわかった。またこれらの細胞から間葉系幹細胞及び ntES 細胞へ微小核融合法で HAC 移入したクローンにおいてはそれぞれ Factor VIII の発現が確認された。

間葉系幹細胞に関しては Factor VIII cDNA を 0, 4 及び 16 コピー搭載したクローンをそれぞれ得ることができ、機能的な Factor VIII についてコピー数依存的な発現上昇が認められた。また HAC 本体の安定性と発現安定性を検討するために 16 コピー搭載 HAC クローンと 16 コピーの PAC をトランスフェクションさせた (いわゆるランダムインテグレーション

モデル) クローンについて長期培養 (50PDL) を行った。その結果、導入された Factor VIII cDNA は HAC クローンと PAC クローンともにきわめて安定に宿主に維持されていた。HAC は宿主染色体に非依存し独立して核の中に保持されており、PAC に関しては予想通り宿主染色体に挿入され維持されていることが FISH 解析によりわかった。Factor VIII 発現レベルを RT-PCR により測定した結果 HAC クローンでは培養初期とほぼ同等であったが、PAC クローンはクローニング初期に比べ減少していることがわかりおそらく宿主染色体側の配列がキーとなるサイレンシングを受けたと考えられる。

ntES 細胞については内胚葉系の肝細胞と血液系細胞へ分化誘導させると Factor VIII 発現レベルは上昇した。今回用いたプロモーターでは ES 細胞そのものよりも分化した細胞において強く働くことが示唆された。

iPS 細胞の作製について、FVIII欠損マウス由来線維芽細胞をモデルマウスから培養し、3 因子及び 4 因子搭載レトロウイルスを感染後、iPS 誘導を行った。未分化マーカーの発現及びテラトマ形成を確認できたので、FVIII発現 HAC ベクターを導入している。患者由来ヒト線維芽細胞については HAC 移入前と移入後の細胞で iPS 誘導を行ったが今のところ両者とも ES 様コロニーは確認できていない。マルチコピーの FVIII を搭載した HAC は少なくとも線維芽細胞に移入できるということは確認できたが iPS 細胞への移入は現在成功していない。

ヒト間葉系幹細胞の長期培養の結果から、Factor VIII cDNA マルチコピー搭載させた HAC についてはベクター上に余分な遺伝子が載っていないため、細胞側のサイレンシングなどの制御がかかりにくいことが考えられる。ヒト細胞における HAC ベクターによる導入遺伝子及びその発現の安定性を再確認することができた。

ntES 細胞分化誘導、Factor VIII 発現確認結果から最初に掲げたように幹細胞そのものではなく移植するにふさわしい、分化誘導した細胞を最少数にて高発現させるという目的からすると今回の結果は非常に理に適っている。ただ、現状使用している HAC ベクターはヒトの細胞において安定ではあるがマウスなどの細胞では選択薬剤フリーで培養すると早急に脱落してしまうことがわかってきた。分化誘導は薬剤を入れない手法であり、また今後モデルマウスに細胞移植してもその HAC は安定には維持されないことが想定される。マウスについては少なくとも iPS 誘導、HAC 移入は可能であり肝臓及び血球系細胞への分化誘導は検討済みであるので上清中の FVIII の発現を確認することを最優先していく。患者由来の

細胞は分裂能が著しく低下しており一時的に増殖を促すためp53ノックダウン及びhTERTの一過性発現後iPS化を試みている。

多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定した発現を保障するというHACの特性が十分に生かされたと言える。血友病の新規治療法としてのHACの将来的な利用に目処がついたと言える。

#### 結論

HACを用いる血友病の新遺伝子治療法の開発はウイルス、プラスミドベクターでは乗り越えることができなかった問題を一つずつ解決させることで有用性を見出すという点で進んだといえる。Factor VIII搭載HACのミニ染色体としての挙動、長期間安定で均一な発現、コピー数依存的な発現が確認できた。今後も本研究でめざした新規血友病治療法を完成させ、HACを用いた遺伝子治療において我が国が世界的リーダーとなるよう長期的な展望に立ち研究を進めたい。

#### 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)

①Kashiwagi A, Kurosaki H, Luo H, Yamamoto H, Oshimura M, Shibahara T. Effects of *Tritrichomonas muris* on the Mouse Intestine: A Proteomic Analysis. *Experimental Animals*, Vol. 58, No. 5 537-542, 2009, 査読有

[学会発表] (計4件)

①黒崎 創、血友病A型細胞補充療法を目指したヒト第VIII因子発現HACベクターの有用性の検討、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日、国際会議場(広島)

②Hajime Kurosaki, Human FVIII expression using a HAC vector toward stem cell-mediated gene therapy for hemophilia A, American Society of Human Genetics, 22, October, 2009, Honolulu, Hawaii

③宇野 愛海、血友病A型モデルマウス由来ntES細胞における第VIII因子発現HACベクターの有用性、第7回幹細胞シンポジウム、2009年5月15日、慶應義塾大学(東京都)

④ Hajime Kurosaki, Human FVIII Expression Using a HAC Vector Toward Gene Therapy for Hemophilia A, American Society of Gene Therapy 11<sup>th</sup> Annual

Meeting, May 31, 2008, Boston, Massachusetts in USA

[図書] (計1件)

黒崎 創、最新医学社、幹細胞研究の最近の進歩 幹細胞へのヒト人工染色体導入—医学・薬学への応用—、2009年、639~648

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

黒崎 創 (KUROSAKI HAJIME)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70464295