

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659238

研究課題名（和文） 血友病治療のためのヒト人工染色体の開発

研究課題名（英文） Human arterial chromosomes for new hemophilia therapy

研究代表者

武谷 浩之（TAKETA HIROYUKI）

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60222105

研究成果の概要（和文）：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。本研究では、人工染色体とiPS細胞を用い、血液凝固因子の遺伝的欠損である血友病の新規の遺伝子治療法の開発研究を行った。この時、凝固因子の補充療法で問題となっている中和抗体（インヒビター）の出現を抑える工夫を行った。これとは別に、組換え凝固因子（第Ⅷ因子およびフォンヴィレブランド因子）発現システムの構築を試みた。

研究成果の概要（英文）： Human artificial chromosome (HAC) vectors show considerable promise for gene therapy applications as they have the capacity to deliver an extremely large genetic region and are stably maintained independent of the host chromosome, thus diminishing risks of insertional mutagenesis. In this study, we have developed HAC vectors for gene therapy of hemophilia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：分子血栓止血学、遺伝子治療、組換えタンパク、血友病、遺伝子工学、細胞工学

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、Ⅸ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。

(2) 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。

(3) 鳥取大学の世界的技術である染色体工学技術(文科省 21 世紀 COE プログラム「染色体工学技術開発の拠点形成(代表: 押村光雄)」など)で開発されたヒト人工染色体は、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。

(4) 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。

(5) 凝固因子製剤の補充療法では、補充した凝固因子に対する中和抗体(インヒビター)の産生が問題となっている。

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) 血友病患者由来滑膜細胞などを 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数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) 発現には血小板第 4 因子(Platelet factor 4: PF4)のプロモーター領域を用い、凝固第 VIII 因子を血小板特異的に発現させて、出血部位でのみ活性化血小板から放出させるように設計した(図 1)。PF4 プロモーターは強力で厳密な血小板特異的発現のために上流-2 kbp までの領域を用いた。線維芽細胞発現用に構築した第 VIII 因子のマルチコピー発現ユニットの CAG プロモーターと置換し、CHO 細胞保持の HAC に搭載した。

von Willebrand (VWF) との複合体形成 組織損傷・出血部位でのみ限局的に FVIII 放出

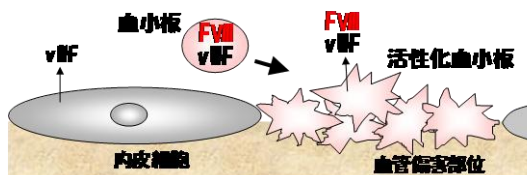


図 1. インヒビター対策. 第 VIII 因子 (FVIII) は、血小板特異的に発現するように設計した。血小板には、VWF が存在しており、第 VIII 因子との複合体を形成し安定化することが予想された。また、この複合体は出血部位においてのみ放出され、インヒビターの発生を抑制し、また、インヒビター保有患者においても有効であることが想定された。

(2) 発現ユニットの両端はトリ β グロビン HS4 インスレータで挟んだ。

(3) 第 VIII 因子発現ユニットは 1 ~ 4 コピーを挿入した(図 2)。

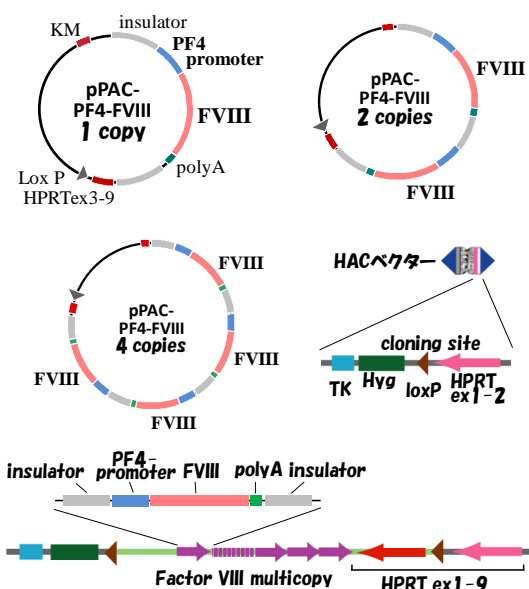


図 2. 第 VIII 因子をタンデムに搭載した人工染色体. 現在、第 VIII 因子発現カセットを 4 コピー搭載した人工染色体を構築することができている。

(4) 巨核芽球性白血病細胞の UT-7/GM 細胞に導入し、トロンボポエチン(TPO)で巨核球/血小板への分化を誘導した。

(5) 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。

(6) 微小核融合法により HAC を iPS 細胞に移入し、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* において巨核球へ分化誘導させた。

(7) iPS 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。
 (8) 同様に VWF 搭載人工染色体を構築し、その発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 血小板特異的に VIII 因子を発現させるために PF4 プロモーターを選択し、その下流に VIII 因子遺伝子を配置した発現カセットを構築した。第 VIII 因子発現カセットは 1~4 コピーを挿入し、巨核芽球性白血病細胞の UT-7/GM 細胞に導入し、トロンボポエチンで巨核球/血小板への分化を誘導したところ、第 VIII 因子がコピー数依存的に発現することが確認された (図 3)。

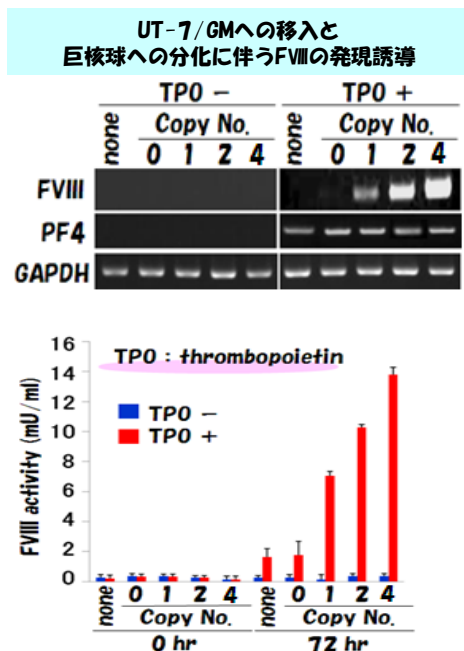


図 3. 分化とコピー数に依存した第 VIII 因子の発現。PF4 は血小板の分化マーカー。

(2) 第 VIII 因子遺発現カセットをタンデムに 4 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 (図 4)。

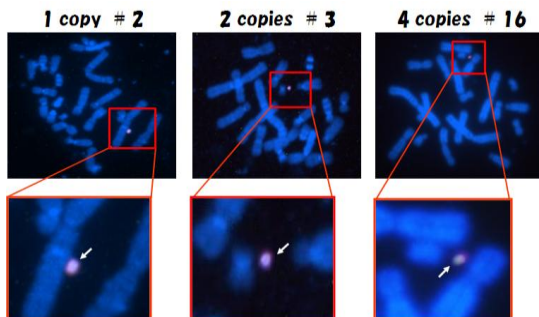


図 4. CHO 細胞内で構築した人工染色体ベクターの FISH 解析。

(3) CHO 細胞の人工染色体を微小核細胞融合法によりマウス iPS 細胞に移入した。FISH による核型解析により、人工染色体は宿主染色体とは独立して存在することが確認された (図 5)。

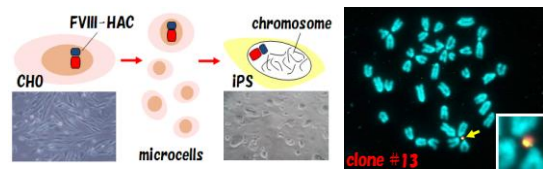


図 5. 人工染色体の iPS 細胞への移入。

(4) 第 VIII 因子搭載人工染色体を導入した iPS 細胞を TPO を用いて巨核球・血小板系へと分化誘導したところ、第 VIII 因子の発現が確認された (図 6)。

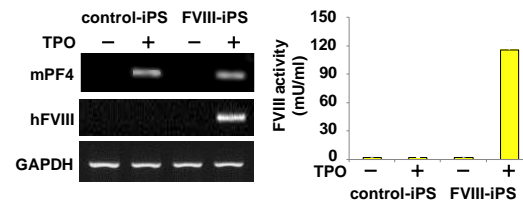


図 6. 巨核球・血小板への分化 (*in vitro*) に伴う第 VIII 因子発現の確認。

(5) 人工染色体を導入したマウス iPS 細胞からキメラマウスを作製した (図 7)。人工染色体ベクターに搭載の GFP 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。組織におけるヒト第 VIII 因子の発現を検討したところ、キメラマウスの骨髄においてのみ、その発現が確認された。すなわち、第 VIII 因子搭載人工染色体を導入した iPS 細胞が巨核球へと分化し、それに伴い第 VIII 因子の発現が誘導されたことが、*in vivo* においても確認された。そこで、次にキメラマウスの骨髄を採取し、その検証をおこなった。

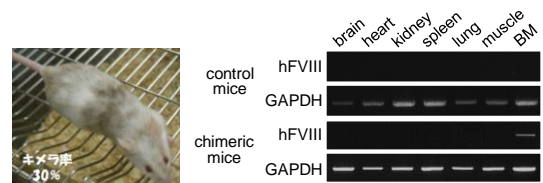


図 7. ヒト第 VIII 因子搭載 iPS 細胞から作製したキメラマウス。キメラマウスの骨髄 (BM) においてのみ、ヒト第 VIII 因子の発現が観察された。

(6) キメラマウスの骨髄において分化マーカーの糖タンパク (GP) IIb/IIIa の発現を指標に巨核球を蛍光染色した。また、GFP 発現を指標に人工染色体保持細胞を検出した。GPIIb/IIIa 陽性かつ GFP 陽性の細胞に、ヒト第 VIII 因子の発現が確認された。

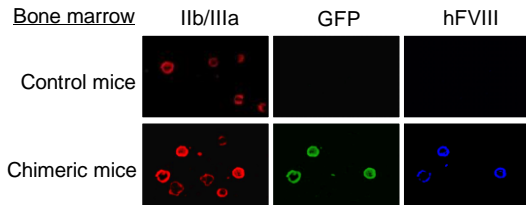


図 8. キメラマウス骨髄の GPIIb/IIIa と GFP の陽性細胞において、ヒト第VIII因子の発現が確認された。

(7) キメラマウス血中から採取した血小板の中に、ヒト第VIII因子を発現する血小板の存在が確認された (図9)。

Chimeric mice platelet

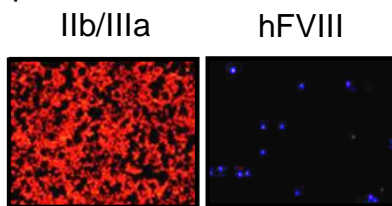
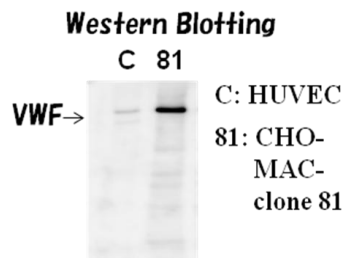


図 9. キメラマウス血小板におけるヒト第VIII因子の発現。

(8) VWF についても同様に人工染色体を構築し、その発現を確認した (図10)。



(9) 治療効果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

(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8件)

- ① Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. 査読有、Biochim Biophys Acta. 1824:164-76、2012、doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.009.
- ② Shakor AB, Taniguchi M, Kitatani K,

Hashimoto M, Asano S, Hayashi A, Nomura K, Bielawski J, Bielawska A, Watanabe K, Kobayashi T, Igarashi Y, Umehara H, Takeya H, Okazaki T. Sphingomyelin synthase 1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation. 査読有、J Biol Chem. 286:36053-62、2011 PubMed PMID: 21856749; PubMed Central PMCID: PMC3195583.

- ③ Kurosaki H, Hiratsuka M, Imaoka N, Iida Y, Uno N, Kazuki Y, Ishihara C, Yakura Y, Mimuro J, Sakata Y, Takeya H, Oshimura M. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. 査読有、J Hum Genet. 56:727-33、2011、doi: 10.1038/jhg.2011.88.
- ④ Taniguchi M, Ono N, Hayashi A, Yakura Y, Takeya H. Effect of dibutyril cyclic adenosine monophosphate on the gene expression of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor in adipocytes. 査読有、Thromb Res. 128:375-80. 2011、PubMed PMID: 21496886.

[学会発表] (計38件)

- ① 矢倉裕奈、黒崎 創、石原千恵、香月康宏、土井健史、松下 正、武谷浩之、押村光雄、人工染色体ベクターを用いた新規血友病A遺伝子治療法の開発、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月14日、横浜
- ② 矢倉裕奈、黒崎 創、石原千恵、香月康宏、土井健史、武谷浩之、押村光雄、ヒト人工染色体を用いた血小板特異的FVIII発現iPS細胞の作製—新規治療法確立へ向けて、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月9日、東京
- ③ Hayashi A, Yakura Y, Taniguchi M, Tomita A, Takeya H: Suppressive actions of fucoidan on lipid droplet formation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011年7月26日、京都
- ④ Fujii, T, Hayashi A, Yakura Y, Taniguchi M, Watanabe K, Kitatani K, Okazaki T, Takeya H: Thrombocytopenia in mice lacking sphingomyelin synthase 1. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011年7月25日、京都

- ⑤ Yakura Y, Taniguchi M, Morimoto K, Hayashi A, Takeya H: Transcription factor NFAT but not NF- κ B is essential for thrombin- induced tissue factor expression. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011年7月28日、京都
- ⑥ Hayashi A, Taniguchi M, Yakura Y, Miyabara J, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Okazaki T, Takeya H: Regulation of leukotriene production and plasimonen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011年7月26日、京都
- ⑦ 矢倉裕奈、石原千恵、藤井昂洗、香月康宏、黒崎 創、土井健史、小松則夫、押村光雄、武谷浩之、ヒト人工染色体と iPS 細胞を用いた新規血友病遺伝子治療法、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ⑧ Yakura Y, Ishihara C, Hayashi A, Matsui T, Matsumoto S, Kurosaki H, Oshimura M, Doi T, Komatsu N, and Takeya H: Development of human artificial chromosome vectors for gene therapy of hemophilia A. XXIIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2009 年 7 月 16 日、Boston
- ⑨ 矢倉裕奈、石原千恵、林 輝、松井俊樹、松本幸子、黒崎 創、押村光雄、土井健史、小松則夫、武谷浩之、ヒト人工染色体を用いた血小板特異的な第Ⅷ因子発現系の確立、第 32 回日本血栓止血学会学術集会、2009 年 6 月 4 日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武谷 浩之 (TAKETA HIROYUKI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60222105

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

黒崎 創 (KUROSAKI HAJIME) (H21)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70464295