

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659511
 研究課題名（和文）オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症由来 iPS 細胞の相同組換えによる遺伝子修復
 研究課題名（英文）Homologous recombination-mediated gene correction in iPS cells of Ornithine transcarbamylase deficiency
 研究代表者
 土屋 滋（TSUCHIYA SHIGERU）
 東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授
 研究者番号：30124605

研究成果の概要（和文）：OTC 欠損症患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を行った。AAV ベクターによる相同組換えによる遺伝子修復を行ったが、修復クローンの獲得はできず、現在アデノウイルスベクターによる方法を検討中である。また iPS 細胞への利用を目的とした初期培養細胞の樹立を目指し、毛髪からのケラチノサイトの樹立に成功した。樹立した細胞は cytokeratin5/14 を発現し継代が可能であった。現在これらの細胞を利用した iPS 細胞の樹立に向け研究中である。

研究成果の概要（英文）：iPS cells was derived from fibroblasts of OTCD. While the cells were transduced with AAV targeting vector for the homologous recombination-mediated gene correction, corrected clones were not obtained. For making iPS cells, we developed the strategies of culturing keratinocytes from human hair. These cells can be passaged and cultured for a long time. The establishment of iPS cells using these cells is in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：遺伝子修復・iPS 細胞・OTC 欠損症

1. 研究開始当初の背景

オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（OTCD）は、先天性尿素サイクル異常症の中でも最も頻度が多く重篤な疾患である。OOT の欠損により高アンモニア血症から脳への障害を来し、その予後も悪いことから、本疾患に対しては以前より遺伝子治療の可能性が検討されてきた。OTCD マウスに対するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを利用した遺伝子治療では、OTCD 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを門脈もしくは腹腔内に直接投与する方法が用いられ、その効果は反復投与

無しでも 20 ヶ月と長期に渡り、尿中オロト酸の低下および肝臓での OTC 活性の上昇が認められている。しかし、AAV ベクターはアデノウイルスベクターに比べて、安全性で勝っているものの、一部で染色体への組み込みが認められ、挿入発がん変異の可能性は完全に否定できず、実際にマウスの実験系で hepatocellular carcinoma の発生が報告された。一方、先天性代謝異常症に対し、細胞療法として Embryonic stem (ES) 細胞より分化誘導した肝細胞の移植なども研究されてきたが、移植肝細胞の拒絶を抑えるために長期

にわたる患者の免疫抑制の必要性が指摘されている。

2. 研究の目的

自己の細胞による細胞療法では拒絶の問題を回避できるが、先天性遺伝子疾患の患者では自家細胞は使用できない。また他人由来の細胞（ES細胞を含む）では治療後も免疫抑制が必要である。これらの理由から遺伝子治療（遺伝子の付加）の研究が行われてきたが、レトロウイルスベクターやAAVベクターの挿入発がん変異の可能性などが否定できない。本研究では、iPS細胞および相同組換えの手法を利用することでこれらの克服を試みる。レトロウイルスベクターやAAVベクターが遺伝子に組み込まれる際には、挿入部位近傍の遺伝子の活性化の可能性が常に存在する。理想的な遺伝子治療法は、相同組換えによる遺伝子修復であり、これは変異遺伝子を正常遺伝子に置き換える方法である。しかし、これまでの報告ではその遺伝子修復効率は1%以下と非常に低いものである。初期培養細胞で遺伝子修復を行ったとしても、遺伝子修復クローンを体外で治療有効な数まで増幅させることは非常に難しく、この点で臨床応用には高い壁が存在する。この問題点を克服する方法として、iPS細胞を利用する遺伝子治療が挙げられる。iPS細胞は無限に増殖させることが可能であり、適当な選別法があれば遺伝子修復クローンのみを選択的に増殖させることが可能である。また、iPS細胞での相同組換えも、プラスミドによるエレクトロポレーション法や、ウイルスベクターによる方法が確立されている。今回申請者は、OTC欠損症患者からのiPS細胞を樹立し、アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated viral: AAV）ベクターによるOTC遺伝子の修復（gene targeting）を試みる。その後遺伝子修復されたクローンを選択、増幅した後に肝細胞への分化を図り、in vitro および in vivo における機能の回復を評価する。以上の研究を遂行することで、OTC欠損症患者へのより安全な遺伝子・細胞治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) OTC患者の皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスベクターによりc-Myc、Oct3/4、Sox2、Klf4を導入する。出現したiPS細胞(OTC-iPS)に関して、その多能性を免疫染色や奇形種の形成で確認する。

(2) 同時に患者からより負担の無い初期培養細胞の樹立を目指し、毛髪からケラチノサイトの樹立を行う。患者から特別な手技無く採取した毛髪を、トリプシンによる処理を行い、培地に浮遊させる。遊出した細胞をフィーダー細胞上にて培養を行い、その後

Cytokeratin5/14の染色を確認する。樹立した毛髪由来ケラチノサイトを利用し、iPS細胞の樹立を行う。

(3) 相同組換えにはAAVベクターを使用する。変異エクソンに対応する正常エクソンと両端に約1.5kbのホモロジーアームを含む配列をAAVベクターに組み込む。選択遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子をloxP配列にて挿入する。このベクタープラスミドを、アデノウイルスヘルパープラスミドとAAV-Rep/Capプラスミドとともに293T細胞にトランスフェクションレウイルスを作製する。このウイルスを使用してgene targeting（相同組換え）を行う。MOI=2000~3000でOTC-iPSに遺伝子導入し、その後耐性遺伝子による遺伝子修復クローンの選択を行う。

(4) 遺伝子修復後のiPS細胞をこれまでの報告を参考にして肝細胞へ分化誘導する。具体的にはCHIR9201, Ly294002, Actvin, FGF2, BMP4, B27 および CDM-PVA (Chemically defined medium with polyvinyl alcohol) にてhepatic progenitorsに分化誘導し、その後HGFとOncostatin-M添加肝細胞培地にて培養する。樹立した肝細胞はAFP、AAT、alpha-antitrypsinの発現を確認し、またglycogenやLDLの取り込み、アルブミンの分泌能などを評価する。

4. 研究成果

(1) iPS細胞の作製

OTCD患者および正常人の皮膚線維芽細胞に、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Klf4をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した。遺伝子導入後にフィーダー細胞上で培養したところES細胞様のコロニーが出現した。これらのコロニーは、Nanog、Oct3/4、SSEA3、SSEA4、Tral-60、Tral-81の発現が確認された。正常人由来のiPSはNOD-scidマウスでの奇形種形成も確認されたが、OTCD患者由来のiPS細胞では奇形種の形成は認められなかった。原因として、リプログラミング手技によるもの、皮膚線維芽細胞の培養中にOTC欠損による性質の変化などが考えられた。

(2) 患者毛髪からのケラチノサイトの樹立の前段階として、正常人からのケラチノサイトの樹立を行った。採取した毛髪を6時間トリプシン処理し、その後IMDM培地に浮遊させる。48時間後に、毛髪より細胞が遊出してきたことを確認後、Defined Keratinocyte-serum free mediumにて培養を行ったが、培養可能な細胞を得ることができなかった。そこで、放射線照射したNIH 3T3細胞をフィーダー細胞として用いたところ、培養および継代可能なケラチノサイトを得

ることに成功した。樹立後は、フィーダーフリーの環境でも培養可能であり、また免疫染色により cytokeratin5/14 の発現も確認された。この細胞に対し、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Klf4 をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入したが、ES 細胞用のコロニーは出現しなかった。ケラチノサイトからの iPS 細胞の樹立の報告は非常に少なく、培養過程でのより細かな条件の検討が必要と考えられた。

(3) 相同組換え (ジーンターゲットニング用) アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製

OTCD-iPS は Exon4 にホモの変異を持っているため、Exon4 の全配列および両端イントロン配列とネオマイシン耐性遺伝子を AAV ベクターに挿入した。このベクタープラスミドをアデノウイルスヘルパープラスミドおよび AAV-Rep/Cap プラスミドともに 293T 細胞へトランスフェクションし、その後 CsCl にて精製した。

(4) 血清型による遺伝子導入効率の比較
AAV の血清型 (serotype) にはいくつかの報告がある。2 型および 3 型の AAV-EGFP ウイルスを作製し、iPS 細胞に導入したところ、2 型ウイルスがより高効率で遺伝子導入できることが判明した。

(5) 相同組換えの実施
AAV ターゲティングベクターにより遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 48 時間後より、ネオマイシンによる選択を行ったが、耐性クローンの獲得はできなかった。AAV 遺伝子は挿入可能な配列の長さには限度があり、両端の ITR 配列および内部の配列の上限は 4.7kb である。本研究ではエクソンおよびホモロジー配列の他にセレクションマーカー (ネオマイシン耐性遺伝子) を挿入しており、このことからウイルスのパッケージング能力が低下した可能性が考えられた。至適血清型の検討の際に作製した EGFP ウイルスに比べ、リアルタイム PCR にて検出したベクターコピー数は、有意に低かった。安定した遺伝子導入のため、より長い配列の組み込みが可能なアデノウイルスベクターの利用を検討している。

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 12 件)

1 . Nakayama T, Tanaka S, Uematsu M, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Morimoto T, Sakamoto O, Tsuchiya S, Kure S, Effect

of a blackout in pediatric patients with home medical devices during the 2011 eastern Japan earthquake. *Brain Dev.*, (in press) 2013 (査読あり)

2 . Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamuta K, Ishii N. Development of a Multi-Step Leukemogenesis Model of MLL-Rearranged Leukemia Using Humanized Mice. *PLoS One.* 7(6):e37892. doi:10.1371/journal.pone.0037892. 2012 (査読あり)

3 . Uchiyama T, Adriani M, Jagadeesh GJ, Paine A, Candotti F. Foamy Virus Vector-mediated Gene Correction of a Mouse Model of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Mol. Ther.* 20(6): 1270-1279, doi: 10.1038/mt.2011.282. 2012 (査読あり)

4 . Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Maysubara Y, Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.*, 36(8): 1009-1015, doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.018. 2012 (査読あり)

5 . Tsuburaya R, Uematsu M, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Kunishima S, Kato M, Haginoya K, Tsuchiya S, Unusual ribbon-like periventricular heterotopia with congenital cataracts

- in a Japanese girl. *Am J Med Genet.*, 158A(3): 674-677, doi: 10.1002/ajmg.a.34258. 2012 (査読あり)
6. Ishimura M, Takada H, Imai k, Sasahara Y, Kanegane H, Nishinomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T, Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency disease in Japan. *J Clin Immunol.*, 31(6)968-976, doi: 10.1007/s10875-011-9594-7. 2011 (査読あり)
7. Looi CY, Imanishi M, Takaki S, Sato M, Chiba N, Sasahara Y, Futaki S, Tsuchiya S, Kumaki S, Octa-arginine mediated delivery of wild-type Lnk protein inhibits TPO-induced M-MOK megakaryoblastic leukemic cell growth by promoting apoptosis. *PLoS One*, 6(8):e23640. doi: 10.1371/journal.pone.0023640. 2011 (査読あり)
8. Niizuma H, Uematsu M, Sakamoto O, Uchiyama T, Horino S, Onuma M, Matsuhashi T, Rikiishi T, Sasahara Y, Minegishi M, Tsuchiya S. Successful cord blood transplantation with reduced-intensity conditioning for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy at advanced and early stages. *Pediatr. Transplant.*, 16(2): E63-70, doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01539.x. 20112012 (査読あり)
9. Adriani M, Jones KA, Uchiyama T, Kirby MR, Silvin C, Anderson SM, Candotti F. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells. *Blood*, 117(24): 6608-6611, doi: 10.1182/blood-2010-12-322834. 2011 (査読あり)
10. Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Abe M, Ishioka N, Harigae H, Tsuchiya S, Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol.*, 93(5): 645-651, doi: 10.1007/s.12185-011-0830-y. 2011 (査読あり)
11. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y, Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.*, 208(2): 235-249, doi: 10.1084/jem.20100799. 2011 (査読あり)
12. Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Uematsu M, Tsuchiya S, A female case of West syndrome with remission of spasms following multiple cerebral hemorrhages. *Brain Dev.*, 33(8):678-682, doi: 10.1016/j.braindev.2010.10.010. 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. 森谷邦彦、松橋徹朗、小沼正栄、内山徹、力石健、浅田洋司、鈴木潤、笹原洋二、呉繁夫、リツキシマブが有効であった乳児自己免疫性溶血性貧血の 1 例、第 54 回小児血液・がん学会、2012 年 11 月 30 日、横浜

2. Toru Uchiyama、Satoshi Horino、Yoji Sasahara、Naoto Ishii、Fabio Candotti、Development of Foamy Virus Vector System for Primary immunodeficiencies、第 18 回日本遺伝子治療学会、2012 年 6 月 28 日、熊本

3. 笹原洋二、佐藤美季、斉藤由佳、小沼正栄、入江正寛、内山徹、力石健、呉繁夫、Spontaneous reversion を伴う原発性免疫不全症 2 症例における長期的臨床経過の検討、第 115 回日本小児科学会学術集会、2012 年 4 月 20 日、福岡

4. 笹原洋二、渡辺祐子、小沼正栄、新妻秀剛、内山徹、力石健、峯岸政好、久間木悟、土屋滋、骨髄非破壊的前処置にて同種骨髄移植を施行した慢性活動性 EBV 感染症 4 例の臨床的検討、第 34 回日本造血幹細胞移植学会学術集会、2012 年 2 月 24 日、大阪

5. 笹原洋二、力石健、北沢博、内山徹、森尾友宏、峯岸政好、久間木悟、土屋滋、RIS を施行した当科年長児および成人期 WAS/XLT 3 症例の臨床的検討、第 5 回日本免疫不全症研究会、2012 年 1 月 21 日、東京

6. 片山紗乙莉、小沼正栄、内山徹、新妻秀剛、力石健、笹原洋二、呉繁夫、SKY 法が複雑型染色体異常の同定に有用であった急性白血病の 2 例、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25 日、前橋

7. 内山徹、Fabio Candotti、土屋滋、フォーミーウイルスベクターによる Wiskott-Aldrich 症候群への遺伝子治療、第 114 回日本小児科学会学術集会、2011 年 8 月 12 日、東京

8. Toru Uchiyama、The progress of stem cell gene therapy for primary immunodeficiency、第 17 回日本遺伝子治療学会学術集会、2011 年 7 月 15 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 滋 (TSUCHIYA SHIGERU)

東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授

研究者番号：30124605

(2) 研究分担者

坂本 修 (SAKAMOTO OSAMU)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：20333809

内山 徹 (UCHIYAMA TORU)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10436107

(3) 連携研究者

()

研究者番号：