

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659708

研究課題名(和文)軟骨無形成症に対する生体適合性ナノキャリアを用いた新規遺伝子治療法の確立

研究課題名(英文)Gene therapy for achondroplasia using a biocompatible non-viral gene delivery system

研究代表者

位高 啓史 (Itaka, Keiji)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60292926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症の根治的治療を目指し、FGFR3シグナル制御を目的としたCNP(C型ナトリウム利尿ペプチド)発現遺伝子投与を検討した。非ウイルス性キャリアを用いて、幼少マウスへCNP発現遺伝子を投与すると、正常マウスで非投与群と比べ平均2%ほどの骨伸長効果が得られたが、軟骨無形成症モデルマウスでは有意な効果は得られなかった。一方、さらに高い効率の導入法として、スフェロイド細胞培養塊の細胞移植治療を検討したところ、遺伝子導入したスフェロイドのマウス皮下移植により、マウス体内で高い遺伝子持続発現を得た。今後さらにスフェロイド移植の軟骨無形成症への展開を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：This study is aiming at definitive therapy of achondroplasia by regulating FGFR3 signals using CNP (C-type natriuretic peptide)-expressing gene. Introducing the gene into wild-type infant mice using a non-viral gene carrier, polyplex nanomicelle, induced a therapeutic effect of bone elongation of the extremities at approximately 2% compared with control mice. However, in experiments using model mice of achondroplasia, no significant effects were observed. Pursuing a more effective technique to introduce gene, cell spheroid transplantation system combined with genetic modification was investigated. Subcutaneous transplantation of spheroids that had received gene transfection using the nanomicelle provided high continuous transgene expression in host mice. We are planning to apply the cell transplantation system for treating achondroplasia in the future study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨無形成症 遺伝子治療 細胞治療 細胞移植 遺伝子キャリア スフェロイド C型ナトリウム利尿ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨無形成症は、四肢短縮型低身長を呈する骨系統疾患の代表であり、全世界で 25 万人を超える患者数がある。障害の改善を目指した薬物療法は、これまで成長ホルモンの投与にほぼ限られ、5cm 程度の身長改善効果は得られるが、例えば軟骨無形成症の重大な合併症である脊柱後弯変形、脊柱管狭窄症といった問題には対応できず、根治的な治療とはなっていない。

一方近年の分子生物学的な研究の進展により、軟骨無形成症は FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) 遺伝子の活性型変異であることが明らかとなってきた。過剰な FGFR3 シグナルは、成長軟骨において、軟骨細胞の増殖・最終分化を抑制し、成長を障害する。さらに近年、軟骨無形成症の脊柱管狭窄は、脊柱管などに存在する synchondrosis が早期に癒合する結果生ずることが、動物モデルを用いて示された (*Hum Mol Genet* 18:227, 2009)。従って、この FGFR3 シグナル活性を成長期にわたって全身的に制御することができれば、骨格成長の障害や脊柱変形など軟骨無形成症の表現形を根治的に改善できる可能性があるものと考えた。

FGFR3 に関連するこれまでの治療の試みとして、がん分野で阻害薬剤や中和抗体が一定の成果を挙げている。また CNP (C 型ナトリウム利尿ペプチド) が FGFR3 シグナルを拮抗しうることを示され、軟骨無形成症動物モデルに対してもリコンビナント CNP の持続投与が試みられている (*Endocrinology* 150:3138, 2009)。しかし、軟骨無形成症への適応では、身体各所に広く薬物をデリバリーする必要性があり、出生から骨格成長の終了まで長期にわたる治療期間が必要となるなど、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の観点から、大きな課題が残る。

## 2. 研究の目的

本研究では、軟骨無形成症に対する新しい治療戦略確立を目標として、モデル動物に対する幼少時からの薬物投与を行い、効果の実証を得ることを目的とした。薬物の持続的徐放が必要であるとの背景から、遺伝子からのタンパク発現を利用した遺伝子治療を計画し、当初計画では、応募者らがこれまで独自に研究開発を進めてきた生体適合性遺伝子ナノキャリアの応用を検討した。しかし後述するように、幼少マウスへの投与の技術的な問題、発現効率の限界もあったため、より高い効率の得られる手法として、遺伝子導入を融合した細胞移植システムの開発も、本研究の目的として検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 正常幼少マウスを用いた遺伝子投与方法の検討と、CNP 遺伝子投与

まず予備的な検討として、正常な幼少マウスへの遺伝子投与方法の検討を行った。投与に

は、我々が独自開発した生体適合性ナノキャリアを用いた。これは、ポリエチレングリコール (PEG) とポリカチオンからなるブロック共重合体をベースとして、DNA と混合して形成されるナノミセル型のキャリアである。In vivo 遺伝子導入において、周囲を PEG で被われることによる安定性・安全性、効率よいエンドソーム脱出能による高い遺伝子導入効率を持つ。本キャリアを用いて、四肢骨格筋への筋注またはハイドロダイナミクス法投与、遺伝子キャリアを保持するコラーゲン担体の皮下留置による方法、尾静脈注または眼窩静脈叢注による肝ターゲットハイドロダイナミクス投与を検討した。

## (2) 軟骨無形成症モデルマウス の確立

FGFR3 遺伝子変異マウス (ヒトの軟骨無形成症原因遺伝子である G380R に相当する G374R のノックインマウス) を用い、Prx1-Cre マウスとの交配で、四肢にのみ短縮形質を発現するモデルマウスを作成した。ジェノタイプングにより遺伝子変異の確認を行い、産生されたマウスの表現形を確認した。

## (3) CNP 発現 DNA の投与

正常マウスおよび (2) にて作成した疾患モデルマウスに対して、(1) で検討した手法を用いて、CNP 発現 DNA を投与した。骨伸長効果はレントゲンおよびマイクロ CT を用いて評価した。

## (4) 細胞移植手技の検討

幼少マウスへのより高い遺伝子導入効率を得るため、スフェロイド細胞培養塊を用いた細胞移植治療の検討を行った。スフェロイド培養は細胞の生存や機能維持・活性化に優れた効果を示すことが知られる。細胞接着部位を 100 $\mu$ m 径にアレイ化したマイクロパターン化培養プレートを用いて、スフェロイドの大量調製法を確立し、さらに目的とする遺伝子の持続発現を得るための遺伝子導入法を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 正常幼少マウスへの遺伝子導入

上述の各投与経路による遺伝子導入では、尾静脈または眼窩静脈叢からのハイドロダイナミクス法によるナノキャリア投与で、最も高い発現が肝を中心に観察された (図 1)。特に比較的個体差が少ない一定の発現が得られるとの特徴から、眼窩静脈叢からの投与が今後の実験に用いる投与方法に適すると判断した。投与後の毒性、眼障害などの合併症は特に見られなかった。

### (2) 軟骨無形成症モデルマウス

上述の手法により作成した Prx1-Cre<sup>+/+</sup>、FGFR3 G374R<sup>+/+</sup> マウスでは、想定通り四肢短縮の表現形が観察された (図 2)。

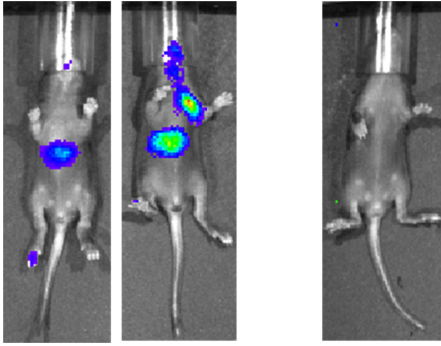


図 1: 眼窩静脈叢からのルシフェラーゼ遺伝子投与・左 (n=2) 投与群, 右コントロール

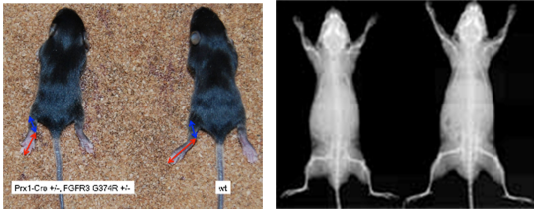


図 2: 軟骨無形成症モデルマウス(左), 正常マウス(右)

### (3) CNP 発現 DNA の投与

まず野生型幼少マウス(生後1週)に対して, CNP 発現 DNA を内包したナノキャリアの眼窩静脈叢ハイドロダイナミクス法投与を行い, 1 週間後の大腿骨および脛骨の骨長を摘出骨標本やレントゲン検査で計測すると, 無治療群と比べ, 1-3% 程度の骨長の増加が観察された(図3)。一方, その後の長期的な効果には乏しかった。

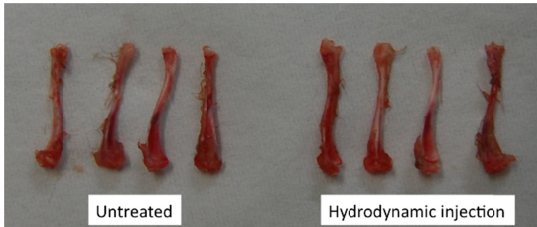


図 3: 投与後の脛骨摘出標本。(左)無処置 (右)CNP 遺伝子のハイドロダイナミクス投与

一方, 軟骨無形成症モデルマウスに対して同様に CNP 発現 DNA 投与を行い(生後 10, 20 日後の計 2 回), 大腿骨, 脛骨の骨長をマイクロ CT 撮影にて経時的に計測したところ, 残念ながら, 正常マウスと比べて骨長の短縮が残る状況が続き, 明らかな治療効果としては観察されなかった(図4)。

以上の結果に基づく問題点として, 以下の点が考えられた。

眼窩静脈叢への投与は軽度ながら投与局所に侵襲性があり, 組織癒痕などの影響で, 同一部位への反復投与は困難であった。すなわち, 同一個体へは上記のように計 2 回が上限となった。

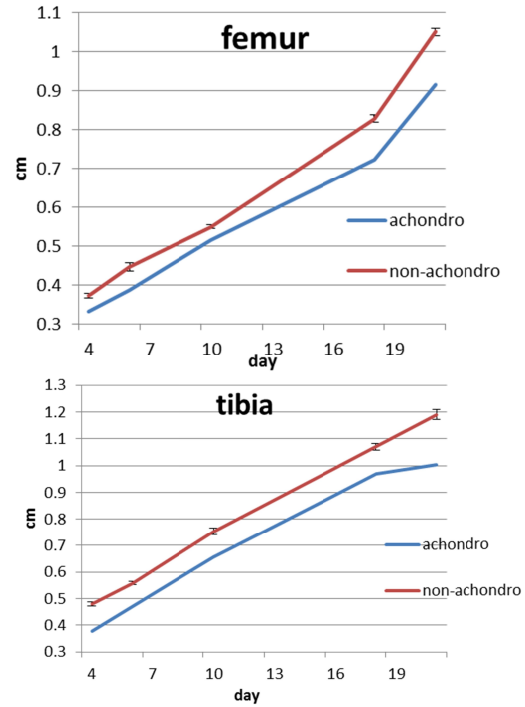


図 4: CNP 発現 DNA 投与後の骨長計測(マイクロ CT). 赤: 軟骨無形成症マウス (n=1) 青: 正常マウス (n=4)

ルシフェラーゼでは発現はよく検出されたものの, 先述の CNP タンパク持続投与報告例などと比べても, 十分な治療効果を得るための遺伝子発現量が十分得られていないことが懸念された。

実験実施上の障害として, 軟骨無形成症モデルマウスの個体数が十分得られなかった。四肢短縮の表現形は G374R+/-, Prx1-Cre+/- 交配によるホモ接合で得られるが, 理論上 1/4 の割合で出生するマウスが, 実際には非常に限られた個体数しか得られなかった。

上述の問題点に対応して, 幼少マウスへの新しい遺伝子投与方法として, 細胞移植を応用する手法を検討した。

### (4) スフェロイド細胞移植

細胞接着部位を 100 $\mu$ m 径にアレイ化したマイクロパターン化培養プレートに細胞を播種すると, 接着部位に細胞が凝集してスフェロイド形成し, 径の揃ったスフェロイドを大量に調製することができる。さらにここにナノミセル型キャリアを用いると, スフェロイド構造に影響を与えずに遺伝子導入が可能であることを見出した。マウス初代培養株肝細胞を用いたスフェロイド細胞凝集塊にルシフェラーゼ遺伝子を導入し, さらにこれを回収しマウス皮下へ注射により移植すると, マウス体内で 1 ヶ月を超える持続発現が確認された(図5)。治療効果の実証として, エリスロポエチン (EPO) 遺伝子を導入したスフェロイド細胞塊を移植すると, マウス体内への EPO 徐放により, 長期にわたる血球増加,

ヘモグロビン増加が観察された。

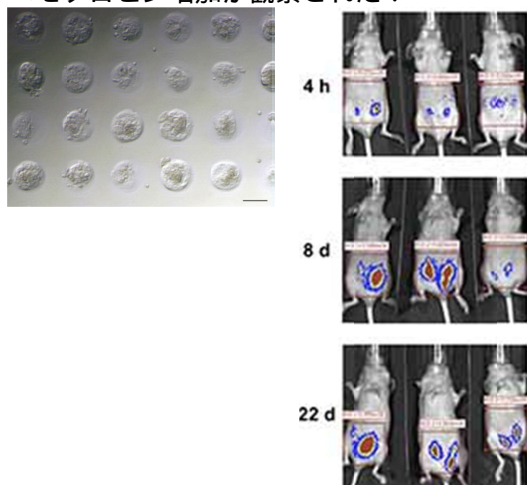


図5:(左)初代培養株肝細胞によるスフェロイド (右)ルシフェラーゼ遺伝子導入スフェロイドのマウス皮下移植後の、ルシフェラーゼ持続発現

本スフェロイド細胞塊移植システムは注射により簡便に移植を行うことができ、幼少マウスへの移植も容易に実施可能と考えられる。本挑戦的萌芽研究の期間内では、幼少マウスおよび軟骨無形成症モデルマウスへの細胞移植実験に着手することが出来なかったが、既に使用する細胞種や移植の諸条件最適化に向けた検討を行っており、今後さらに研究を推進していく予定である。

## 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2件)

Uchida S, Itaka K, Nomoto T, Endo T, Matsumoto Y, Ishii T, Kataoka K. An injectable spheroid system with genetic modification for cell transplantation therapy. *Biomaterials*. (2014) 35(8):2499-506. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.012. 査読有

Endo T, Itaka K, Shioyama M, Uchida S, Kataoka K. Gene transfection to spheroid culture system on micropatterned culture plate by polyplex nanomicelle: a novel platform of genetically-modified cell transplantation. *Drug Deliv. and Transl. Res.* (2012) 2:398-405. DOI 10.1007/s13346-012-0091-1. 査読有

### [学会発表](計5件)

内田智士, 位高啓史, 遠藤泰輔, 柳原歌代子, 野本貴大, 松本有, 石井武彦, 片岡一則. 3次元スフェロイド培養と非ウイルス性遺伝子ベクターを組み合わせ

た新規細胞移植システムの開発. 第35回日本バイオマテリアル学会大会. 2013年11月26日, タワーホール船堀.

内田智士, 位高啓史, 遠藤泰輔, 野本貴大, 松本有, 片岡一則. 3次元スフェロイド細胞培養とナノミセルによる遺伝子導入を融合した新規細胞移植システム. 第29回日本DDS学会学術集会. 2013年7月4日, 京都テルサ.

柳原歌代子, 内田智士, 池上賢, 前田祐二郎, 大庭信介, 位高啓史, 片岡一則. 3次元スフェロイド培養を用いた間葉系幹細胞移植による骨欠損治療. 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム. 2013年5月11日, 帝京大学板橋キャンパス.

位高啓史, 内田 智士, 池上 賢, 柳原 歌代子, 遠藤 泰輔, 片岡 一則. マイクロパターン化基盤スフェロイド細胞培養と生体適合性遺伝子キャリアの融合による新規細胞移植システム. 第12回日本再生医療学会総会. 2013年3月23日, パシフィコ横浜.

Itaka K, Endo T, Uchida S, Kataoka K. A novel platform of genetically-modified cell transplantation using 3D spheroid culture system on micropatterned substrates and polyplex nanomicelles. American Society of Gene & Cell Therapy 15th Annual Meeting. 2012年5月19日, Philadelphia, PA, USA.

### [その他]

研究室ホームページ

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

位高 啓史 (ITAKA Keiji)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60292926

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

芳賀 信彦 (HAGA Nobuhiko)

東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 80251263