

## 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 5月 27日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790602

研究課題名（和文）宿主ゲノムへの挿入がない単一造血系遺伝病に対する安全な遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the safe gene therapy method for single gene disorder without insertion to a host genom

研究代表者

吉田 久美（YOSHIDA KUMI）

九州大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：80553271

研究成果の概要（和文）：

GFP 遺伝子搭載 rSeV にて遺伝子導入された移植骨髄より全血球系の再構築がなされることを報告していたが、半永久的な遺伝子導入蛋白の発現を維持するまでには至っていない。そこで、特に、rSeV の造血幹細胞の生体内での自己複製能に与える影響と関連して、体内での活性酸素種・Ca<sup>2+</sup> の動態を調べた。その結果、抗酸化剤にて活性酸素種を減少させるだけでは半永久的に導入遺伝子の発現を維持したまま長期生存は見られなかった。rSeV による遺伝子導入骨髄造血幹細胞移植マウスの血中において Ca<sup>2+</sup> 及び関連ホルモンの変化も確認された。rSeV にて導入した遺伝子の半永久的発現の維持においては、活性酸素種だけでなく、Ca<sup>2+</sup> の関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We had reported that in vivo repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by tsSeV/dF-GFP. But, it has not reached in semipermanent maintenance of transgenics protein. Then, to notice the self renewal of hematopoietic stem cells. We investigated how rSeV influenced to reactive oxygen species and the dynamic state of Ca<sup>2+</sup> in vivo. As a result, long-term survival and maintaining of transgene semipermanently was not only by decreasing reactive oxygen species with an antioxidant agent.

Change of the hormone relevant to Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the gene transferred bone marrow transplant mouse by tsSeV/dF-GFP was seen.

In maintenance of semipermanent of the gene transferred by tsSeV/dF-GFP, the relation of not only reactive oxygen species but also Ca<sup>2+</sup> was suggested deeply.

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	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：遺伝子治療、単一遺伝子欠損症、

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

単一遺伝病である先天性重症免疫不全症候群の治療法においては、欠損遺伝子を補充する遺伝子導入造血幹細胞移植が有効であることが約10年の追跡調査でも明らかとなった (*N Engl J Med.* 2010)。しかし、レトロウイルスベクターを用いたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の患者へのIL-2 receptor common gamma chain(IL-2R $\gamma$ )遺伝子導入骨髄移植治療では、宿主染色体へのベクター挿入が原因と考えられる白血病が発生し、死亡例が出るという重大な副作用が問題となっている。そこで、遺伝子発現に核内移行やゲノム挿入を必要としない組換えセンダイウイルスベクター(rSeV)を用いて造血幹細胞への遺伝子導入・発現維持技術を確認することが急務であると考えられた。

### (2) 研究開発当初までの研究成果と着想に至った経緯

rSeVによる遺伝子導入細胞が*in vitro*においては半永久的に遺伝子発現の持続が見られることを報告している (*FASEB J.*, 2001)。さらにrSeVは臍帯血由来CD34陽性細胞に高効率遺伝子導入が可能で、全血球系の前駆細胞への分化へ影響せず、高い遺伝子発現を示すことを証明している (*Gene Ther.* 2003)。そのため、骨髄移植により永続的遺伝子発現について検討した。その結果、rSeV/GFP遺伝子導入骨髄移植マウスの末梢血細胞におけるGFP陽性率は、1週目では比較的高く、移植後4週目でも10%以上であることを報告した。また、脾臓、骨髄細胞においてもGFP陽性の血球系3系統へと正常に分化していることが確認された。さらに*in vitro*においては、遺伝子導入造血幹細胞enrich分画は正常に分化増殖を行うことを確認している。これは細胞質転写複製型ベクターを用いて遺伝子導入された骨髄移植によ

って、生体内で遺伝子発現細胞が **repopulation** させることに初めて成功した報告 (*BBRC.* 2007)であったが、末梢血中のGFP高発現個体は汎血球減少により死亡するため、導入遺伝子の安定した長期発現には未だ至っていない。いくつかの検討の結果、末梢血中のGFP高発現個体での汎血球減少による死亡は、ts-rSeVを用いた遺伝子導入造血幹細胞の自己複製能に関わるいくつかの因子になんらかの影響を与えているため、遺伝子導入造血幹細胞の枯渇(nicheへの維持不全)が生じている可能性が想定された。

また、造血幹細胞(HSCs)が自己複製能(**self renewal**)を保つためには骨髄の**niche**に存在している必要があり、その為にはいくつかの環境条件が必要だと想定されている。特に周辺環境の低酸素状態と、細胞外のCa<sup>2+</sup>濃度がある一定の濃度存在する必要性に着目している。その理由としては、①造血幹細胞中の活性酸素種(ROS)が高濃度なマウスにおいて、抗酸化剤を投与することで造血幹細胞の自己複製能が回復する (*Nature.* 431, 977-1002, 2004) こと、②HSCs表面には細胞内外のCa<sup>2+</sup>濃度の調整に重要なCaR (calcium-sensing receptor)が存在しており、このCaR<sup>-/-</sup>マウスでは胎児期の肝臓でのHSCsは正常であるにも関わらず、HSCsを骨髄の**niche**に留めておくことができない (*Nature.* 439, 599-603, 2006) ことが報告されていることによる。rSeVは感染時の膜融合の際、Ca<sup>2+</sup>を使用するため細胞内外の濃度を変化させることや、ラジカル(NO)を発生することが報告されており、また申請者はts-rSeV/dF-GFPにて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウスにおいて、GFP陽性高発現死亡個体の骨髄組織にてCaR<sup>-/-</sup>と同様な空洞が多数確認している(未発表データ)ことから、Ca<sup>2+</sup>との関連が強く示唆されていた。

## 2. 研究の目的

具体的には、宿主ゲノムへの挿入がない安全な組換えセンダイウイルスベクター (rSeV) を用い、責任遺伝子欠損マウスにおいて、責任遺伝子導入骨髄移植を行うことで、半永久的な遺伝子発現の維持を最終目的とする。これまで、GFP 遺伝子搭載 rSeV にて遺伝子導入された移植骨髄より全血球系の再構築がなされることを報告しているが、半永久的な導入遺伝子の発現を維持するまでには至っていない。rSeV 感染造血幹細胞の分化には異常が認められないことから、移植個体内の遺伝子導入造血幹細胞の自己複製能と関連があると考えられる。本研究では、rSeV の造血幹細胞の自己複製能と関わる体内の活性酸素種・Ca<sup>2+</sup>の動態を調べることにより、単一造血系遺伝病に対する遺伝子治療法の基盤技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

ts-rSeV/dF-GFP (rSeV-GFP) にて GFP 遺伝子を導入した骨髄造血幹細胞を用いて、lethal radiation (10Gy) 照射後のマウスに移入することで、骨髄移植を行い、rSeV を用いた遺伝子導入による骨髄造血幹細胞の変化を検討する。

### (1) 活性酸素種 (ROS) との関連検討

rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウスにおける活性酸素種の変化を DCFH-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) を用いて検討し、また、遺伝子導入の際に発生した活性酸素種の影響を抑制するために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を経口投与し、その後の GFP 遺伝子発現率の変化と、生存の延長を調べる。

### (2) カルシウム濃度との関連検討

① naive な骨髄造血幹細胞と rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄造血幹細胞の細胞表面を anti-CaR 抗体にて免疫染色後、FACS にてその発現の変化を解析する。

② rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウス血中の Ca<sup>2+</sup>濃度を測定するため、骨髄移植マウスの血清を採取し、Ca<sup>2+</sup>の濃度を ELISA にて測定する。

③ rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウス血中の PTH 分泌の移植後での変化を調べる為に、血清を採取し、PTH濃度を ELISA で測定する。

### (3) rSeV-GFPの発生段階における造血系の構築への影響

ES 細胞へ rSeV-GFP を用いて遺伝子導入を行った後、その遺伝子導入 ES 細胞を受精卵に挿入することで、トランスジェニックマウスを作成し、造血系を含む全ての個体発における rSeV-GFP の影響を組織学的に検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 活性酸素種 (ROS) との関連検討

rSeV-luci にて遺伝子導入された骨髄造血幹細胞では、細胞内の ROS が上昇傾向であった。

また、rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウスへの抗酸化剤である NAC の投与により、導入遺伝子 GFP の血中での発現維持は上昇の傾向が見られたが、最終的には全例が汎血球減少により死亡した。

このことより、導入遺伝子の維持には ROS は関連している可能性が考えられたが、結果、高い遺伝子発現を維持した NAC 投与骨髄移植マウスは全例死亡したことで、その造血幹細胞の長期の維持については、不十分であったと考えられた。

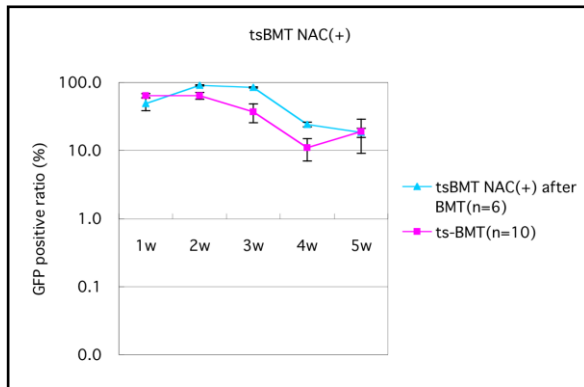


図1) tsSeV-GFP 遺伝子導入骨髄移植マウスにおける NAC の効果 (血中 GFP 陽性細胞数変化)

(2) カルシウム濃度との関連検討

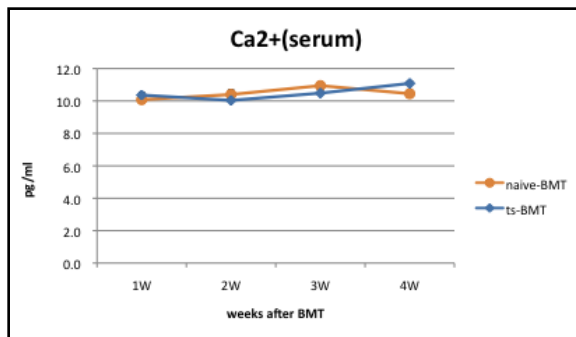


図2) rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウス血清中の Ca2+濃度変化

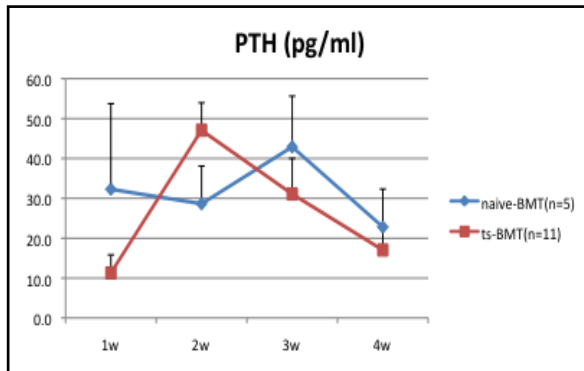


図3) rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウス血清中の PTH 分泌

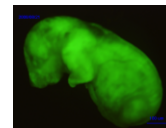
rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウスの血清中の Ca2+濃度は、naive の骨髄移植マウスと比較して低下の傾向はあるが、ほとんど変化は見られない。しかし、血清中の Ca2+濃度の調整を行うホルモンである PTH の濃度は rSeV-GFP にて遺伝子導

入された骨髄細胞移植マウスにおいて一過性に上昇傾向であった。

これは、rSeV-GFPによる遺伝子導入によって、Ca2+濃度に何らかの影響が及ぼされているもの、血中のCa2+濃度はPTH ホルモンによって調整されているため、変化が現れていないのではないかと推測された。

また、rSeV-GFP にて遺伝子導入された骨髄細胞移植マウスにおいては、骨がもろく空洞化した組織を観察しており。この現象とも一致する。

(3) rSeV-GFPの発生段階における造血系の構築への影響



rSeV-GFP を用いて遺伝子導入を行った ES 細胞を受精卵に挿入することで、トランスジェニックマウスを作成したところ、正常な個体発生がみられ、胎生期において特に異常は観察されなかった。

しかし、生後 24 時間以内に全例が死亡。組織学的解析を行ったが、消化器・呼吸器・肝臓・脳等の器官に異常は見られなかった。

通常、哺乳類はその発生の段階において、胎児期は肝臓にて造血を行い、母親の胎内から出てしばらくすると骨髄で造血を行うようになると言われている。特に、マウスでは、胎生 11.5 日には HSCs は肝臓に存在し、生後骨髄へと HSCs が移動する。

今回のトランスジェニックマウスの死亡が生後の造血異常に関連しているかは明確ではないが、個体発生は正常であり、その器官等に異常がみられなかったことから、血液系の異常が原因である可能性も考えられる。rSeV-GFP による遺伝子導入の影響が、HSCs

の niche への homing に関連している可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉田 久美 (YOSHIDA KUMI)

九州大学・薬学研究院・革新的バイオ医薬  
創成学・特任助教

研究者番号：80553271

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし