

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：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791147
 研究課題名（和文）相同組換えによる安全な遺伝子修復法のアデノシンデアミナーゼ欠損症への適用
 研究課題名（英文）Homologous recombination-mediated gene correction for Adenosine deaminase deficiency
 研究代表者
 内山 徹（UCHIYAMA TORU）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：10436107

研究成果の概要（和文）：ADA 欠損症患者の Fibroblast より iPS 細胞を作製し、その後アデノ随伴ウイルスベクターによる相同組換え（遺伝子修復）を試みた。デオキシアデノシンによる選択では、耐性クローン（ADA 修復クローン）の獲得はできず、現在一般的なセレクトションマーカーの使用を検討中である。また相同組換え後の血球系分化の前実験として、OP-9 ストローマ細胞上にてマウス ES, iPS 細胞から T リンパ球や B リンパ球への分化に成功した。

研究成果の概要（英文）：iPS cells were derived from skin fibroblasts of ADA deficiency patients. While AAV-mediated gene targeting for the homologous recombination, followed by the selection with deoxyadenosine, was performed, corrected clones were not obtained. iPS cells showed the differentiation into T and B lymphocytes in the culture with OP9 stromal cells. This system is thought to be useful for the functional analysis of corrected ADA gene in iPS cells.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

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：原発性免疫不全症・遺伝子治療・相同組換え・iPS 細胞・造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症の根治的治療は造血幹細胞移植であるが、HLA 一致ドナーが存在しない場合には、移植関連合併症により良好な成績が得られない場合がある。そのような患者に対し、1990 年よりレトロウイルスベクターによる遺伝子治療が行われてきた。現在までにアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症、X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）、慢性肉芽腫症、Wiskott-Aldrich 症候群に対し遺伝子治療が行われ、その効果（免疫系の再構築）

が認められている。しかし、2002 年に X-SCID への遺伝子治療において白血病という重大な問題が報告された。レトロウイルスベクターは染色体状にランダムに挿入され、さらにウイルスベクターの long terminal repeat 内のエンハンサーにより、挿入部位近傍の癌原遺伝子が活性化された結果であった。申請者らも、フランスのグループとの共同臨床研究として、X-SCID に対する遺伝子治療を計画し、準備を進めてきたが、結果的に計画を中止することとなった。

従来のレトロウイルスベクターによる遺伝子付加型 (gene addition) 遺伝子治療では、高い効率での遺伝子導入が可能であるが、上記の挿入発癌変異の危険性が常に存在する。遺伝子治療の理想的な方法は、相同組換えを利用した遺伝子修復 (gene correction) であり、近年様々な手法が報告されている。しかし、その効率は低く、造血幹細胞のような *ex vivo* での増幅が難しい細胞では使用へのハードルが高い状況である。

ADA 欠損症は重症複合免疫不全症の一つであり、ADA 遺伝子の変異によって引き起こされる。他の免疫不全症同様に根治的治療は造血幹細胞移植であるが、HLA 一致血縁ドナーが存在しない場合の成績は不良である。また酵素補充療法 (PEG-ADA) は、重症型での完全な免疫能の回復は難しく、同時に経済的な負担も非常に大きい。これらの理由により、至適ドナーがいない患者に対する遺伝子治療の必要性が唱えられてきた。

2. 研究の目的

これまでの報告において相同組換えによる遺伝子修復の効率は極めて低く、初期培養細胞では、遺伝子修復後の minor popularity を選択、増殖させるのは極めて困難であった。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、重症複合免疫不全症の一つである、ADA 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 ADA 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、増幅した後に造血幹細胞への分化を図り、*in vitro* および *in vivo* における各血球系の分化を評価する。以上の研究を遂行することで、原発性免疫不全症へのより安全な遺伝子治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ADA-SCID 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 (ADA-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) 相同組換えは 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。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することで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 ADA-iPS に遺伝子導入する。

(3) 遺伝子修復クローンの選択はデオキシアデノシン (dAdo) を使用する。ADA 欠損細胞は dAd 存在下では、その細胞毒性の為に生存できない。しかし ADA が修復されることでデオキシイノシンが代謝され、生存が可能となる。この方法を用いて、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 OP-9 ストローマ細胞上でサイトカイン (BMP4、VEGF、SCF、FGF、TPO、Flt ligand) 存在化で培養し、CD34 陽性細胞へ分化誘導させる。In vitro、in vitro において各血球系に分化させ、同時に ADA 活性の測定を行う。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞の作製

ADA 欠損症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、Tra1-60、Tra1-81 の発現が確認され、また NOD-scid マウスでの奇形種形成も確認された。

(2) 相同組換え (ジーンターゲッティング) 用アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)

の作製

ADA-iPS は Exon7 にホモの変異を持っているため、Exon7 の全配列および両端イントロン配列(約 1.5kb)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。

(3) 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、同じ 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。

(4) 相同組替えの実施
AAV ターゲティングベクターにより、MOI=2000~20000 で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 48 時間後より、デオキシアデノシンによる選択を行った。濃度は 1~100 μ M で行ったが、耐性クローンの獲得はできなかった。その理由としては様々な要因が考えられた。ADA 欠損症は常染色体劣性遺伝形式を取るため、正常人と患者では ADA 遺伝子は 2 コピーの違いがある。もし片側アレルのみの遺伝子修復が達成されても、選択に耐えうるだけの ADA 活性が回復されない可能性が考えられる。また、ADA-iPS と normal-iPS での ADA 活性の差がそれほど大きくない場合には、より細かな dAdo の濃度設定が必要とも考えられた。現在は一般的な選択遺伝子を利用した positive/negative selection (ネオマイシン耐性、HSV-tk) を利用した方法を検討中である。

(5) iPS 細胞の造血細胞への分化誘導
遺伝子修復後の iPS 細胞の分化誘導の前実験としてマウスの ES および iPS 細胞の造血幹細胞への分化誘導実験を行った。これまでの報告に従い、ES および iPS 細胞に HoxB4 遺伝子を導入し、OP-9 ストローマ細胞および OP9-DLL1 (NOTCH リガンドの delta like1 を強発現させた) 上にて培養し分化誘導を試みた。造血幹細胞への分化誘導はうまくいかず、奇形種の形成が起こってしまった。In vitro

での実験系では、T 細胞 (CD3 陽性)、B 細胞 (B220 陽性) への分化誘導を認めた。iPS 細胞の造血幹細胞への分化にはいまだ克服すべき問題が多く、本実験でも成功できなかった。T、B 細胞への分化は可能であり、今後相同組換えによる遺伝子修復後の iPS 細胞の機能の評価は可能であると思われた。

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 5 件)

- ① Kitazawa H., Moriya K., Niizuma H., Kawano K., Saito-Nanjo Y., Uchiyama T., Rikiishi T., Sasahara Y., Sakamoto O., Setoguchi Y., Kure S. Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations. *Eur J Pediatr.* (in press) (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. 20122012 (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): 1270-9, doi: 10.1038/mt.2011.282. 2012 (査読あり)
- ④ 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 2012 (査読あり)

⑤Adriani 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): 6608-11, doi: 10.1182/blood-2010-12-322834. 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・がん学会学術集会、2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日、横浜

②Toru Uchiyama、Satoshi Horino、Yoji Sasahara、Naoto Ishii、Fabio Candotti、Development of Foamy Virus Vector System for Primaryimmunodeficiencies、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、骨髓非破壊的前処置にて同種骨髓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、RIST 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

⑧Toru 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、シンポジウム、2011 年 7 月 15 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 徹 (UCHIYAMA TORU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10436107

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者