

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591527

研究課題名(和文) ジンクフィンガーによる相同組換えを用いたライソゾーム病に対する遺伝子治療研究

研究課題名(英文) Gene Therapy for the Krabbe disease using zinc finger nuclease system

研究代表者

小林 博司 (Kobayashi, Hiroshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90266619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：準備段階としてKrabbe病モデルマウス遺伝子の遺伝情報(シーケンス)から疾患の原因となる点変異を改善するためのdonor plasmid (DP)、相応するZinc Finger Nuclease (ZFN)を作製。モデルマウスのシュワン細胞由来の細胞株に対しZFN, DPをコトランスフェクションし、相同組換え状況を検討した結果、ターゲットとした点変異の正常化が見られ、Krabbe病の欠損酵素であるGALCの酵素活性が元の細胞と比較して導入細胞で有意に上昇($p=0.0208$)、同時に蓄積物質サイコシンの低下が見られた。この結果は培養を継続しある程度継代しても維持された。

研究成果の概要(英文)：We prepared the specific donor plasmid (DP) and zinc finger nuclease (ZFN) for homologous recombination of the point mutation (chromosome 12, exon 10) in the model mouse of Krabbe disease, and co-transfected them into the Schwann cell line origin from the model mouse by the nucleofecta (electroporation system), resulted in normalize of the point mutation, efficient high expression of GALC enzyme (deficient in the Krabbe disease) activity, reduction of psychosine in the treated cell, and it has been maintained after some passages.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：Krabbe病 Zinc Finger GALC

1. 研究開始当初の背景

遺伝病、悪性新生物など難治性疾患の根本的な治療法として期待されている遺伝子治療は1990年代から研究され、近年臨床での応用効果も報告されているが、従来のウイルスベクターによる方法は臨床応用においては長期の効果持続、安全性の面から必ずしも十分とはいえない状況である。特にウイルスベクターによる染色体上の非特異的部位への挿入による、発がんなどの遺伝毒性の確実な回避を可能にする新たな遺伝子導入法が求められている。

2. 研究の目的

本研究では先天性代謝異常症の代表的疾患であるライソゾーム蓄積疾患をモデルターゲットとして、近年開発された zinc finger nuclease (ZFN) system を用いた染色体部位特異的な相同組替えによる、より安全で効果的な新しい遺伝子治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

まずZFN (変異部位を特異的に同定し切断する合成キメラ蛋白発現mRNA) および鋳型となるdonor plasmid (DP)のデザインをすでに我々が入手しているKrabbe病モデルマウス由来細胞の遺伝子変異に対応したものにし、mRNA作成はこの分野ですでに特許を得ているSIGMA -ALDRICH社に依頼する。作製したZFN と欠損酵素発現遺伝子 (mouse β -galactocerebrosidase, GALC) を含むドナープラスミドをコ・トランスフェクションにより、Krabbe病モデルマウス由来細胞(シュワン細胞株・iPS細胞など)に導入し相同組換えによる遺伝子導入効果を評価する。具体的には欠損酵素GALCの酵素発現および蓄積物質 psychosine をZFN未導入細胞と比較し検討する。

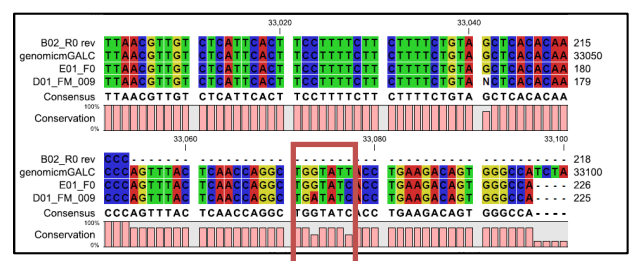
Krabbe 病モデルマウスの変異に対応して新たにデザインしたZFN および鋳型となるDP

を用いて、ドナーマウスの骨髄幹細胞へ electroporationによる相同組替え法にて遺伝子導入し、導入した細胞をレシピエントマウス(新生児モデルマウス)に骨髄移植する。これはヒトでは自家骨髄に遺伝子導入して戻す、いわゆる*exo-vivo* gene therapy のモデルである。この実験プロトコールは代表研究者の小林が従来行ってきた新生児マウスへの遺伝子導入実験をベースにするものであり系としては確立されている。(Kobayashi H, et al. Mol. Ther. 2005; 11(5): 776.) これらの方法は従来のウイルスベクターによる方法よりも現時点では、導入効率において劣る可能性が高いが、臨床応用を考えた際の安全性において非常に有用であり、遺伝子導入された骨髄幹細胞のアドバンテージを持った増殖による表現形の改善を目標とする。その評価としてはKrabbe病では5週齢での各臓器の酵素活性、蓄積物質の測定、オートファジー機構の変化(ウェスタンブロット、LC3 や P62 などを用いた抗体染色)、染色体挿入部位の同定など*in vitro*の結果に準じて施行する。

4. 研究成果

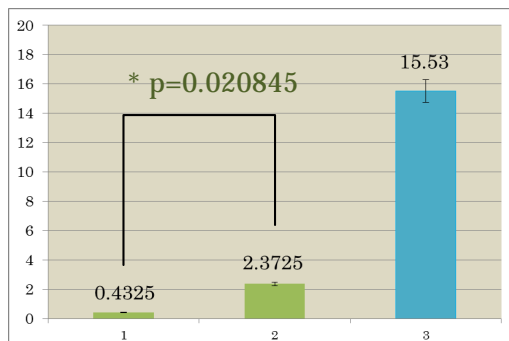
準備段階として Krabbe 病モデルマウス遺伝子の遺伝情報(シーケンス)から疾患の原因となる点変異を改善するための donor plasmid (DP)、相応する Zinc Finger Nuclease (ZFN)を作製。

1) モデルマウスのシュワン細胞由来の細胞株に対し ZFN, DP をコ・トランスフェクションし 相同組換え状況を検討した結果、シーケンス解析にてターゲットとした点変異の正常化が見られた。



- 2) ZFN による組換え細胞群で Krabbe 病の欠損酵素である GALC 酵素活性の有意な発現上昇 ($p=0.020845$) が見られた。

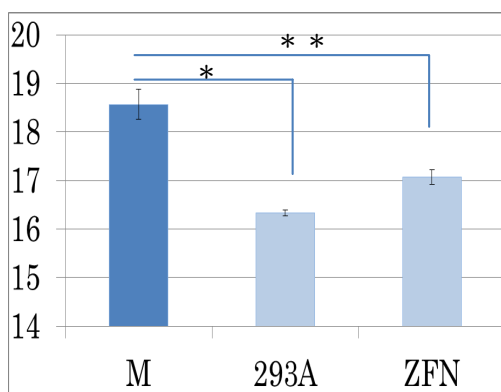
図 1 GALC expression (nmol/17h/mg)



- 1: mock
 2: cell of homologous recombination by ZFN and DP co-transfecton
 3: 293A cell as wild type

同時に ZFN による組換え細胞群で蓄積物質サイコシンの有意な低下が見られた。

図 2 Psychosine Accumulation (pmol/cell culture)

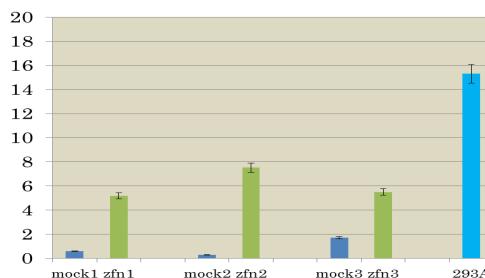


- M: Mock
 293A: wild type cell
 ZFN: cell of homologous recombination by ZFN and DP co-transfecton

*, ** $p < 0.04$

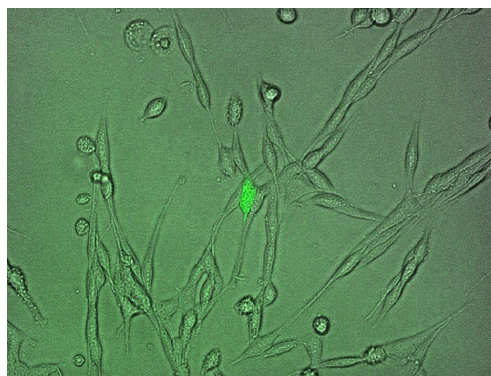
- 3) ZFN により遺伝子組換えされた細胞群における GALC 酵素活性は、培養を維持・継代しても保たれた。

図 3 Time course of GALC expression (nmol/17h/mg)



- 4) 更に Krabbe 病由来の iPS 細胞を用いて同様に ZFN をコ・トランスフェクションすることで導入に成功し、今後神経細胞に分化させる方向で検討している。

図 4 GALC とともにマーカー遺伝子として GFP を組込んだ鑄型プラスミド (DP) と ZFN をコ・トランスフェクションしたマウス Krabbe 病由来 iPS 細胞



- 5) 研究計画の後半に盛り込んだ ZFN にて遺伝子編集した iPS 細胞を使用したモデルマウスの *exo vivo* gene therapy は *in vitro* での導入効率がまだ不十分である点から開始していない。

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2件)

1. Hiroshi Kobayashi, Masamichi Ariga, Yohei Sato, Taichi Wakabayashi, Yota Shimada et al. Gene Therapy for Krabbe disease using the system of lentiviral vector and zinc finger nuclease. 第20回日本遺伝子治療学会 (2014.8.6.-8.8. 東京)

2. Hiroshi Kobayashi. Gene Therapy for Krabbe Disease Using the System of Lentiviral Vector and Zinc Finger Nuclease. The 4th Asian Congress For Inherited Metabolic Diseases (2015.3.19-22, Taipei)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 博司 (KOBAYASHI, Hiroshi)

東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター遺伝子治療研究部・准教授

研究者番号：90266619

(2)研究分担者

嶋田洋太 (YOTA, Shimada)

東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター遺伝子治療研究部・助教

研究者番号：20560824

(3)連携研究者

()

研究者番号：