

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670264

研究課題名(和文)新規高性能ベクターを生体イメージングで評価し血友病遺伝子治療に応用するための研究

研究課題名(英文)A novel gene therapy by full-length coagulation factor VIII

研究代表者

福島 敬 (FUKUSHIMA, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30323299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規ベクターを用いて、培養細胞にヒト第VIII血液凝固因子遺伝子を発現(分泌)させることが可能であった。完全長型遺伝子を用いた場合にも、Bドメイン欠失型と同等の活性を得られ、従来の搭載遺伝子サイズ上限を上回った。次いで、上記のヒト第VIII血液凝固因子分泌細胞を血友病Aマウスに移植したところ、マウス血中第VIII凝固因子活性が有意に上昇した。一方で、近赤外蛋白であるiRFPの遺伝子を搭載した本ベクターを用いて、マウスにin vivo法およびex vivo法によって遺伝子治療を実施し、経時的に近赤外蛍光を観察したところ、ベクターまたは遺伝子導入細胞を投与した局所以外への蛍光拡散は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：The following results have been shown by this research
(1)A novel RNA vector can carry genes up to 13.5 kb altogether. We detected an activity of coagulation factor VIII (FVIII) in the culture supernatant of transfected cells. Concentration of FVIII was the same between a culture of full length (FL) FVIII secreting cells and B domain deleted (BDD) FVIII secreting cells.(2)We observed a therapeutic effect by transplantation of mouse FVIII secreting cells to hemophilia A mice.(3)Only local distribution of RNA vector was confirmed after intramuscular injection, subcutaneous injection, intraperitoneal injection or enema by both in vivo and ex vivo gene therapy, under non-invasive bio-imaging. We used iRFP gene carrying RNA vector to observe distribution or migration of gene transduced cells using a fluorescent detector.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝子治療 血友病A 全長型

1. 研究開始当初の背景

幾多の遺伝子治療研究において使用されてきたベクターは、搭載できる遺伝子サイズの制限、標的細胞への遺伝子導入効率、遺伝子改変細胞での遺伝子発現効率、および遺伝子発現の持続期間等のハードルが複数あった。それら制限の範囲で工夫し、2011年に血友病 B 遺伝子治療の臨床成功例が報告された。第 血液凝固因子と比較して分子量の小さい第 血液凝固因子 (分子量 5.5 万) 遺伝子を搭載したアデノウイルス随伴ベクターを、血友病 B 患者に静脈注射することで効果を得られた。

連携研究者である中西らが、持続感染する特殊な変異センダイウイルスを素材として開発した持続発現型 RNA ウィルスベクターは、標的細胞のゲノムに入り込むことはなく細胞質で持続的な遺伝子発現を行い、また細胞傷害性・抗原性が最小化され免疫学的排除を受けにくいこと、脂肪細胞に感染することが確認された (特許第 4936482 号、西村健・他、平成 24 年 3 月 2 日登録)。現在、さらにベクターの改良が進み、完全長型の血液凝固第 因子 cDNA (約 7kbp) を含む複数の遺伝子を同時に搭載できるベクターが完成した。研究協力者である伊藤らは、脂肪細胞を体外で培養・増殖させ、レトロウィルスベクターを用いて分泌蛋白の遺伝子を導入して疾患を治療する技術を開発し (特許 4879867 号)、インスリン遺伝子導入脂肪細胞を糖尿病マウスに戻すことによって血糖値を是正することを示した。さらに研究協力者の麻生らは、LCAT 遺伝子を導入し、生体に戻すことによって LCAT 欠損症を治療する技術を開発し、現在は前臨床研究および臨床試験が進行中である。一方で自治医科大学のチームは、レンチウィルスを用いた血友病 A の遺伝子治療標的細胞として脂肪細胞が有望である可能性を示した。

本学附属病院で小児例を含めて実施した

「同種骨髄移植後再発白血病に対する HSV - TK 遺伝子導入ドナーリンパ球輸注療法」の臨床研究 に次ぐ遺伝子治療候補として、「新規高性能ベクターを利用した血友病遺伝子治療」を提案すべく本研究を実施した。

2. 研究の目的

平成 26 年～28 年の研究期間内に以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) 持続発現型 RNA ウィルスベクターへの目的遺伝子搭載の可否を確認する。
- (2) 上記ベクターによるマウス脂肪細胞への遺伝子導入・発現を検証する。
- (3) 血液凝固因子産生脂肪細胞による血友病マウスへの治療効果を評価する。
- (4) 培養ヒト脂肪細胞への遺伝子導入・発現および効果持続期間を評価する。
- (5) 本遺伝子治療技術の臨床応用可能性を評価するためのデータを得る。

3. 研究の方法

本研究は、筑波大学、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社による共同研究の一部として実施された。

- (1) RNA ベクターに搭載する遺伝子の選択
第 血液凝固因子の発現を最大化するために、コドンと二次構造の最適化を行った合成 cDNA を選択した。全長型 (FL)、N6R、B ドメイン欠失型 (BDD) の 3 つの遺伝子型を使用した。

(2) マウス脂肪細胞への遺伝子導入実験

脂肪細胞への分化能を有する 3T3-F442A 細胞を用いて、iRFP (近赤外蛍光色素) の遺伝子を導入し、発色を確認した。

iRFP 遺伝子導入脂肪細胞をマウスに移植し (ex vivo 法) 一方では、iRFP 遺伝子搭載ベクターをマウスに直接投与 (in vivo 法) し、生体イメージングの手法 を利用して、継続的に生体内分布の推移を評価した。

(3) 血友病マウスへの薬理効果検証。

血友病 A マウス (Jackson 研究所) または 3T3-F442A 細胞にマウス第 血液凝固因子の遺伝子導入し、培養上清中の第 血液凝固因子活性を測定した。

遺伝子導入 3T3-F442A 細胞を血友病マウスに移植し、マウス血漿中の第 血液凝固因子活性を測定した。

(4) ヒト脂肪細胞への遺伝子導入研究

ヒト脂肪細胞を培養し、天井培養細胞 (ccdPA) を抽出し、ヒト第 VIII 血液凝固因子遺伝子を導入し、培養上清中にヒト第 VIII 血液凝固因子活性および抗原が確認された。また、ccdPA と同じ性質と考えられる脂肪組織由来間葉系幹細胞を使用して、ヒト第 VIII 血液凝固因子を発現させたものを作成し、NOG マウスに移植して、血漿中のヒト第 VIII 血液凝固因子抗原を定量した。

4 . 研究成果

主要な研究成果は、以下の 4 点である。

(1) Codon を最適化したヒト第 VIII 血液凝固因子遺伝子を搭載したベクターを使用した。ベクターを BHK21 細胞感染させたところ、FL (7kb; 従来のベクターには搭載できないサイズ) , N6R および BDD のいずれの遺伝子を使用した場合も、培養上清中に十分量の第 VIII 血液凝固因子遺伝子の活性を確認することができた。

(2) *in vivo* 法および *ex vivo* 法による iRFP 遺伝子導入細胞の生体内動態について、同一個体を用いて経時的に観察した。iRFP 搭載ベクターをマウスに身体各部に直接投与 (*in vivo* 法) した後の蛍光の推移を確認し、投与方法による差異を比較検討したところ、筋肉内注射の効率が良好であった。一方、培養下で iRFP 搭載ベクターを作用させて作成した iRFP 産生 3T3-F442A 細胞を、マウスの身体各部に移植 (*ex vivo* 法) して、蛍光の推移を記

録した。 *in vivo* 法に比較して、 *ex vivo* 法において、ベクター機能 (近赤外蛍光) の持続が良好であった。 *in vivo* 法および *ex vivo* 法のいずれにおいても、ベクターまたは遺伝子導入細胞を投与した局所以外への蛍光拡散は観察されなかった。

(3) 血友病 A マウスへの治療効果確認。マウス第 血液凝固因子を分泌する 3T3-F442A 細胞 (マウス前脂肪細胞株) を作成し、血友病 A マウスに移植したところ、血漿中第 血液凝固因子活性が 10% 以上に上昇したことから、本ベクターを用いた遺伝子治療が血友病 A マウスに有効なことが示された。

(4) ヒト第 血液凝固因子を分泌させた市販のヒト脂肪細胞由来間葉系幹細胞を、NOG マウスに移植した後、マウス血漿中にヒト第 血液凝固因子抗原が検出された。なお、本プロジェクトの開発対象物は、「新規ベクターによる遺伝子改変 ccdPA」であり、「ヒト第 血液凝固因子を分泌するヒト間葉系幹細胞」はこれに相当する。以上の成果から、前臨床段階での proof of concept (POC) が立証できたと考えられる。

< 引用文献 >

- AC. Nathwani, New Engl J Med 2011
- K. Nishimura, M. Nakanishi et al. J. Biol. Chem., 2011;
- M.Nakanishi, M.Otsu, Current Gene Therapy, 2012;
- M.Ito et al. Diabetologia, 2005
- M. Aso et al. Exp Mol Med, 2011
- 福島他、日本小児血液学会雑誌、2005
- M. Tamura, Y.Miwa et al. PNAS 2008

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

1. Kimihiko Banno, Sayaka Omori, Katsuya Hirata, Nobutoshi Nawa,

- Natsuki Nakagawa, Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Mahito Nakanishi, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Toshiyuki Yamamoto, Chikara Kokubu, Junji Takeda, Hidetoshi Taniguchi, Hitomi Arahori, Kazuko Wada, Yasuji Kitabatake, Keiichi Ozono. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interactions of Trisomy 21 and GATA1 Mutations on Hematopoietic Abnormalities. *Cell Reports*, 2016, 15, 1228-1241. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031. 査読あり
2. Kohji Okamura, Hironari Sakaguchi, Rie Sakamoto, Mahito Nakanishi, Ken Nishimura, Mayu Yamazaki-Inoue, Manami Ohtaka, Vaiyapuri Periasamy, Ali Alshatwi, Akon Higuchi, Kazunori Hanaoka, Kazuhiko Nakabayashi, Shuji Takada, Kenichiro Hata, Masashi Toyoda, Akihiro Umezawa. Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders. *Scientific Reports*, 2016, 6, 26342., doi: 10.1038/srep26342. 査読あり
 3. Ruxandra Dafinica, Jakub Scaber, Nidaa Ababneh, Tatjana Lalic, Gregory Weir, Jane Vowles, Andrew G. L. Douglas, Alexandra Fletcher-Jones, Cathy Browne, Mahito Nakanishi, Martin R. Turner, Richard Wade-Martins, Sally A Cowley, Kevin Talbot. C9orf72 Hexanucleotide Expansions are Associated with Altered ER Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in iPSC-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Stem Cells, 2016, 34, 2063-2078. doi: 10.1002/stem.2388 査読あり
 4. Alvaro Muñoz-López, Damia Romero-Moya, Cristina Prieto, Verónica Ramos-Mejía, Antonio Agraz-Doblas, Ignacio Varela, Marcus Buschbeck, Anna Palau, Xonia Carvajal-Vergara, Alessandra Giorgetti, Anthony Ford, Majlinda Lako, Isabel Granada, Neus Ruiz-Xivillé, Sandra Rodríguez-Perales, Raul Torres-Ruiz, Ronald W Stam, Jose Luis Fuster, Mario. F. Fraga, Mahito Nakanishi, Gianni Cazzaniga, Michela Bardini, Isabel Cobo, Gustavo F Bayon, Agustín Fernández, Clara Bueno, Pablo Menendez. Development refractoriness of MLL-rearranged human B-cell acute leukemias to reprogramming into pluripotency. *Stem Cell Reports*, 2016, 7, 602-618. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.013. 査読あり
 5. Yzumi Yamashita-Sugahara, Masahito Matsumoto, Yutaka Nakachi, Manami Ohtaka, Ken Nishimura, Mahito Nakanishi, Kohnosuke Mitani, Yasushi Okazaki. An inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) promotes late stage terminal differentiation of form NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. *Scientific Reports*, 2016, 6, 35908. doi: 10.1038/srep35908. 査読あり
 6. Masayuki Sano, Minoru Iijima, Manami Ohtaka, Mahito Nakanishi. Novel Strategy to Control Transgene

Expression Mediated by a Sendai Virus-based Vector Using a Nonstructural C Protein and Endogenous MicroRNAs. PLoS One, 2016, 11, e0164720. doi: 10.1371/journal.pone.0164720. eCollection 2016. 査読あり

7. Ken Nishimura, Shiho Aizawa, Fransiska Liliani Nugroho, Emi Shiomitsu, Tran Thi Hai Yen, Bui Phuong Linh, Borisova Dmitrievna Evgeniia, Yuta Sakuragi, Hitomi Takada, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Aya Fukuda, Mahito Nakanishi, Koji Hisatake. A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via CL1 during induced pluripotent stem cell generation. Stem Cell Reports, 2017, 8, 787-801.doi:10.1016/j.stemcr.2017.01.026. 査読あり

[学会発表](計 31 件)

- 1 .ステルス型 RNA ベクターの開発と応用、中西 真人、第 6 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2017/2/28、東京大学・東京都・文京区
- 2 .安全性の高い純国産遺伝子治療用ベクターの開発、中西 真人、第 7 回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム、2017/1/19、東京慈恵会医科大学・東京都・港区
- 3 .ステルス型 RNA ベクターの開発と応用、中西 真人、第 8 回日本 RNAi 研究会・第 3 回細胞外小胞学会、2016/9/2、グランドプリンスホテル広島・広島県・広島市
- 4 .Development and Application of Stealth RNA Vector、Mahito Nakanishi、2016 Annual Meeting of Korean Society for Stem Cell Research、2016/8/18、グランドヒルトン ソウル ホテル・ソウル市・大韓民国

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福島 敬 (Fukushima, Takashi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号 : 30323299

(2)研究分担者

三輪 佳宏 (Miwa, Yoshihiro)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号 : 70263845

(3)連携研究者

中西 真人 (Nakanishi, Mahito)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・ヒト細胞医工学研究ラボ長
研究者番号 : 10172355

(4)研究協力者

伊藤 昌史 (Ito, Masashi)
エーザイ株式会社
麻生 雅是 (Aso, Masayuki)
セルジェンテック株式会社
長谷川 雄一 (Hasegawa, Yuichi)
筑波大学・医学医療系・准教授
大根田 修 (Oneda, Osamu)
筑波大学・医学医療系・教授
西村 健 (Nishimura, Ken)
筑波大学・医学医療系・助教
久武 幸司 (Hisatake, Koji)
筑波大学・医学医療系・教授
橋本 幸一 (Hashimoto, Koichi)
筑波大学・医学医療系・教授
柳 健一 (Yanagi, Kennichi)
筑波大学・医学医療系・教授
千葉 滋 (Chiba, Shigeru)
筑波大学・医学医療系・教授
逆井 智樹 (Sakasai, Tomoki)
筑波大学・人間総合科学研究科
田中 順子 (Tanaka, Junko)

筑波大学・医学医療系・研究員
八牧 愉二 (Yamaki, Yuni)
筑波大学・附属病院・講師
今川 和夫 (Imagawa, Kazuo)
筑波大学・附属病院・助教
福島 紘子 (Fukushima, Hiroko)
筑波大学・医学医療系・講師
藤山 聡 (Fujiyama, Satoshi)
筑波大学・人間総合科学研究科
野口 恵美子 (Noguchi, Emiko)
筑波大学・医学医療系・教授
須磨崎 亮 (Sumazaki, Ryo)
筑波大学・客員教授
磯山 茂美 (Isoyama, Shigemi)
筑波大学医学医療系技術室
三島 初 (Mishima, Hajime)
筑波大学・医学医療系・准教授
藤澤 千寿子 (Fujisawa, Chizuko)
筑波大学・つくば臨床医学研究開発機構

以上