

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07750

研究課題名（和文）エンベロップ改変レンチウイルスを用いた新規遺伝子治療前臨床試験モデルの樹立

研究課題名（英文）Establishment of novel gene therapy preclinical model using Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector

研究代表者

伊川 泰広（Ikawa, Yasuhiro）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10722043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：DNA修復障害疾患は、遺伝子導入の際に必要なサイトカイン刺激により細胞死が誘導される。そのため、サイトカイン刺激を省いた新規遺伝子導入法の開発が求められる。Baboonエンベロップを用いたレンチウイルス（Ba-LV）はサイトカイン刺激を省くことが可能であるため、それを用いてDNA修復障害の代表的疾患であるBloom症候群モデルマウス（Blm）を用いて遺伝子導入を行う。しかし、Ba-LVの産生効率が非常に悪いことが明らかとなり、新規ウイルス産生方法を樹立した。次に、Blmより採取した骨髓細胞の脆弱性確認を行ったところ野生型との有意な差異を確認できた。今後、Ba-LVを用いた機能回復実験を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本結果は遺伝子治療が難しいと考えられていたDNA修復障害疾患という領域に、新たな可能性を見出すことに施行した。また、サイトカイン刺激は造血幹細胞の分化を進めてしまうことが知られている。そこで、本サイトカイン刺激を省いた新たな遺伝子導入法は、DNA修復障害疾患にかかわらず一般的な造血幹細胞を用いた遺伝子治療においても、より有効な遺伝子治療成績を出すことに寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：DNA repair disorders show the vulnerability by cytokine stimulations and induces apoptosis. Therefore, the establishment of novel transduction methodology, cytokine depletion method, was warranted. Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector (Ba-LV) transduce without cytokine transduction, therefore we planned gene transfer using Ba-LV to Bloom syndrome model mouse (Blm), which is one of the representative DNA repair disorder. However, the efficacy of virus production was very low. Therefore, we succeeded to establish novel Ba-LV production protocol. Thereafter, we verified vulnerability difference between wild type mouse's bone marrow cells and those of Blm by evaluating sister chromatid exchange. In the future, we would transduce Blm bone marrow cells with Ba-LV for recovering their function.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 Baboonエンベロップ レンチウイルス DNA修復障害 Bloom症候群

## 1. 研究開始当初の背景

Bloom 症候群は DNA 修復障害に関与する遺伝子異常により発症する単一遺伝子病である。致命的な合併症に、DNA 修復障害が原因で発症する血液腫瘍がある。本症では化学療法の副作用が強く治療不能となるため予後が非常に悪い。そのため血液腫瘍の発症予防を目的とした遺伝子治療が有効となる。しかし、DNA 修復障害疾患は遺伝子導入時に必須とされるサイトカイン刺激により細胞死が誘導されるため、サイトカイン刺激を不要とした新規遺伝子治療法の樹立が求められる。

## 2. 研究の目的

サイトカイン刺激が不要とされる Baboon ウイルスエンベロープを用いて改変レンチウイルスを作製する (Ba-LV)。また、DNA 修復障害疾患の代表的疾患の一つである Bloom 症候群モデルマウス (Blm マウス) より採取した骨髄細胞に Ba-LV を用いて遺伝子導入を行い導入効率や機能回復に関して検討する。

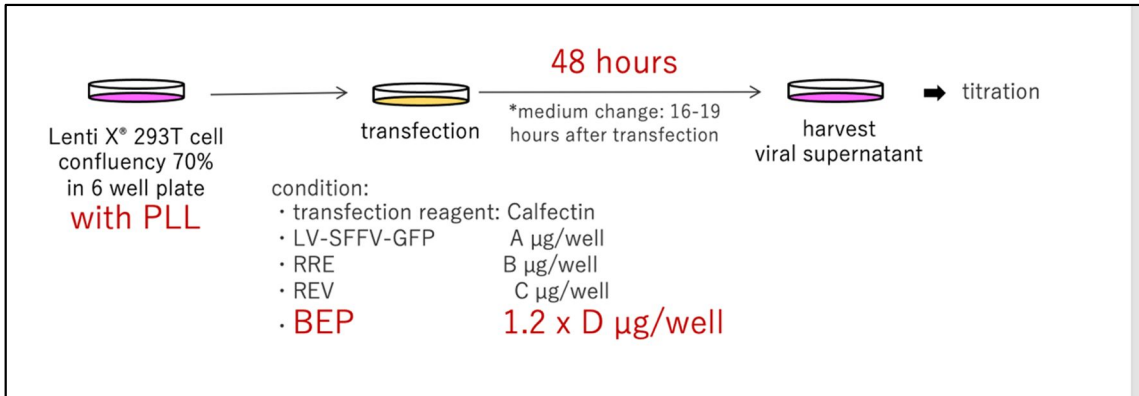
## 3. 研究の方法

サイトカイン刺激を不要とする Ba-LV を作製する。Blm 遺伝子、コントロールベクターとして GFP 遺伝子を Ba-LV に搭載する。

Blm マウスより採取した造血幹細胞にサイトカイン刺激を行わずに遺伝子導入を行い、遺伝子導入効率や導入後の機能回復をマイトマイシン C 暴露下でのコロニー形成数、姉妹染色分体 (SCE) を用いて評価する。

## 4. 研究成果

レンチウイルスを作製する一般的なプロトコールを用いて Ba-LV を作製したところ、通常用いられるエンベロープである VSVg を用いた際の 1/500 程度でしかウイルスを産生できなかった。その原因として、Baboon エンベローププラスミド (Ba-EP) をウイルス産生細胞である 293T 細胞にトランスフェクションしたところ、8 時間後に 293T 細胞に合胞体形成が開始され、48 時間後には培養プレート底面から剥離してしまった問題を挙げた。そこで、Ba-EP の量を検討したところ、通常量の 1.2 倍量を用いた際に最大量のウイルス産生を獲得できた。次に、293T 細胞の合胞体形成や剥離を考慮し、ウイルススプの採取時間を調整した。プラスミドをトランスフェクションした 48 時間後に採取することが最大産生量を獲得できることを確認した。最後に、293T 細胞がプレート底面から剥がれにくくする目的で poly-L-lysine を用いたところ、ウイルス産生量がさらに増加し、全ての改良点を合わせると約 10 倍のウイルス産生量を獲得できるようになった。



次に、Blm マウスと野生型マウスより採取した骨髄細胞の脆弱性の差異を確認する目的で、マイトマイシン C に種々の濃度で骨髄細胞を暴露させコロニー形成数を比較した。しかし、両者で差異を認めることはできなかった。そこで、それぞれの細胞を姉妹染色分体で比較を行ったところ、明らかに Blm マウスから採取した骨髄細胞が脆弱であることを確認できた。今後、作製したウイルスを用いて Blm マウスより採取した骨髄細胞に *Blm* 遺伝子を導入し、機能回復実験を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhiro Noguchi, Yasuhiro Ikawa, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Maxwell Chappell, Valentina Ghiaccio, Stefano Rivella and Taizo Wada
2. 発表標題 The establishment of high titer protocol for Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector focusing on syncytium formation phenomenon
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Noguchi, Yasuhiro Ikawa, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Maxwell Chappell, Valentina Ghiaccio, Stefano Rivella and Taizo Wada
2. 発表標題 The establishment of high titer protocol for Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector focusing on syncytium formation phenomenon
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------