

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890088

研究課題名（和文）iPS細胞の遺伝子治療戦略を可能とする非ウイルス型ベクターの開発
 研究課題名（英文）Development of non-viral vector for gene therapy strategy using iPS cells.

研究代表者

堀田 秋津（HOTTA AKITSU）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50578002

研究成果の概要（和文）：血友病Aに対する遺伝子治療法を目指し、長期間安定に外来遺伝子の発現を維持可能な、非ウイルス型ベクターの開発を行った。新規トランスポゾンを利用することにより、ヒトiPS細胞において150日以上、外来遺伝子発現を維持可能である事を示した。また、遺伝子治療用ベクターとしては初めて、7.0kbものサイズを持つ全長型第Ⅷ因子cDNAの発現に成功した。本研究の新規トランスポゾンベクターは、血友病遺伝子治療用のベクターとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Aiming for developing a novel gene therapy of hemophilia A, we have developed non-viral based gene delivery vectors that can maintain foreign gene expression for long term. We identified that new transposon vectors were able to maintain reporter gene expression in human iPS cells for up to 150 days. In addition, we report here for the first time that we can deliver the full-length Factor VIII cDNA with 7.0 kb in size by using our transposon vectors. Our transposon vector is a promising technology for future gene therapy of severe hemophilia A.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2011年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類遺伝学（6907）

キーワード：遺伝子治療、iPS細胞、遺伝子導入ベクター、血友病A

1. 研究開始当初の背景

(1) iPS細胞は患者からの樹立が可能であり、増殖能力も高いことから、*ex vivo* 遺伝子治療用のターゲット細胞として有望である。

(2) しかしながら、iPS細胞などの多能性幹

細胞は、治療用遺伝子の発現に用いられるレトロウイルスベクターを抑制することが知られており、長期間安定な発現を得る事が難しかった。

(3) また、血友病Aの遺伝子治療を行う為に

は、欠損している血液凝固第VIII因子を外部より補う必要がるが、全長型の第VIII因子 cDNA は 7.0 kb もあり、今まではもっぱら B ドメイン欠失型のショートフォームが使われている。全長型第VIII因子を効率良く導入可能なベクターの報告はまだ無い。

2. 研究の目的

- (1) 今まで遺伝子治療ベクターの主流であったレトロウイルス・レンチウイルスに変わり、piggyBac トランスポゾン由来ベクターを開発する。
- (2) トランスポゾンベクターを用いてヒト iPS 細胞への導入条件を最適化し、長期に渡る発現安定性を検討する。
- (3) 血液凝固異常症である血友病 A の遺伝子治療を目指し、血液凝固第VIII因子を発現するベクターを作製し、性能を評価する。

3. 研究の方法

我々はまず、piggyBac ベクターの導入効率を検定するために、EGFP を発現するレポーターベクター、および B ドメイン欠損型ヒト第VIII因子、B ドメイン欠損型イヌ第VIII因子、および全長型ヒト第VIII因子を発現するベクターを作製した。piggyBac ベクターが導入された細胞だけを選択するために、IRES の下流にピュロマイシン耐性遺伝子または EGFP 遺伝子を挿入した。

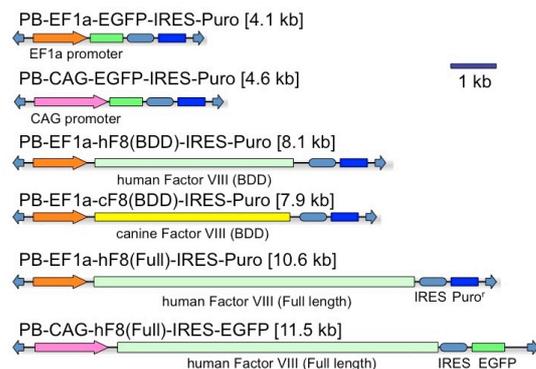


図1
EGFPおよび血液凝固第八因子を発現するpiggyBacベクターの概略図。CAGプロモーターまたはEF1αプロモーターにより転写され、IRESによって結合された二つの遺伝子が同時に発現するようにデザインされている。各ベクターのサイズを角括弧内に記載。

4. 研究成果

構築した piggyBac ベクターの導入効率を最適化するために、プラスミド導入効率の高

い HEK293T 細胞およびヒト iPS 細胞(201B7株)をターゲット細胞として、Lipofection法やNucleofection法による導入条件検討を行った。その結果、piggyBac 転移酵素の量を相対的に少なくすることで、宿主染色体への導入効率が向上することが判明した。

上記の最適化条件を用いて、HEK293T 細胞へ piggyBac ベクターを導入し、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡で EGFP レポーターの蛍光を観察した所、非常に高い効率で EGFP の導入発現が可能となった。また、GFP 陽性細胞の割合は低下するものの、全長第VIII因子を導入したベクター (PB-CAG-hF8(full)-IRES-EGFP) においても、GFP 陽性細胞が観察された。

その後、血液凝固第VIII因子(全長型およびBドメイン欠損型)のcDNAを上述のpiggyBacベクターに組み込み、全長のcDNA塩基配列をサンガーシーケンス法により確認した。piggyBacベクターを293T細胞及びヒトiPS細胞へ導入した後、ピュロマイシンで選択を行い、ベクターが導入された細胞のみを選択した。その後、ゲノムDNAへのpiggyBac挿入コピー数を定量PCRで検討した。GFPを搭載したベクターは平均で2コピー近いゲノムへの挿入を確認できたが、サイズの大きい第VIII因子(BDDおよび全長型)は平均0.5から1.1コピーに留まった。驚くべき事に、全長第VIII因子とBDD第VIII因子ではゲノムに挿入されたコピー数に大きな差はなかった。またmRNAの転写量を比較するために、すべてのベクターに共通するIRES部分を増幅するプライマーを用いて、定量PCRを行った。その結果、第VIII因子はEGFPに比べ、一桁から二桁低い発現量となったものの、十分検出可能な量の発現が観察された。

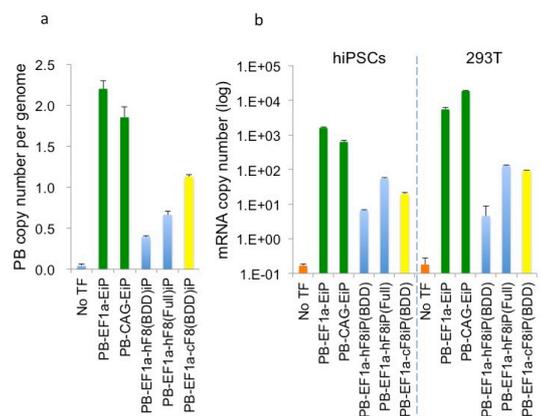


図2
piggyBacベクターによる染色体挿入効率およびmRNAの発現解析。(a) piggyBacベクターをHEK293T細胞へ導入した後、ゲノムDNAを抽出し、染色体に挿入されたpiggyBacベクターのコピー数について、5'TRを標的とするプライマーを用いてReal time-PCRで検討した。(b) piggyBacベクターをヒトiPS細胞(201B7株)およびHEK293T細胞へ導入した後、mRNAを抽出した。導入ベクターの転写レベルを解析するために、IRESの部分を増幅するプライマーを利用して、Real time-PCRにて検討を行った。

また、第 VIII 因子は細胞外分泌タンパク質であるが、小胞体を經由して分泌することが知られている。そこで、*piggyBac* ベクターを HEK293T 細胞へ導入を行い、三日後に細胞を固定して、ヒト第 VIII 因子を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。すると、細胞質の小胞体部分においてヒト第 VIII 因子の特異的なシグナルを検出することができた。また、IRES-EGFP を持つ全長型ヒト第 VIII 因子に関しては、EGFP 発現強度と第 VIII 因子染色シグナル強度の間に強い相関が観察された。

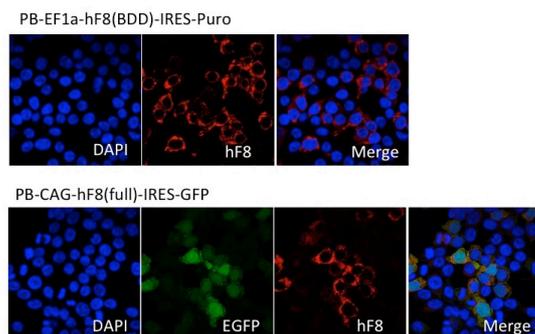


図3 免疫染色による導入第VIII因子の発現確認。
*piggyBac*ベクターをHEK293T細胞へ導入した後、ヒト第VIII因子を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。細胞核はDAPI(青)で、抗ヒト第VIII因子抗体はAlexa633標識二次抗体(赤)で染色した。

さらに、細胞外に第 VIII 因子タンパク質が活性を持って細胞外に分泌生産されているか検定するために、培養上液中の第 VIII 因子活性を APTT (activated partial thromboplastin time) で測定した。驚くべきことに、単位細胞数当たりの第 VIII 因子活性値においても、全長型第 VIII 因子の方が BDD 欠損型よりも多く測定された。さらに、イヌ第 VIII 因子は、ヒト第 VIII 因子よりも高い比活性を持つ事が知られている。そこで我々はイヌの BDD 型第 VIII 因子もクローニングして導入した所、ヒト第 VIII 因子よりも 2.7 倍から 2.9 倍高い活性値を確認することが出来た。イヌ第 VIII 因子を発現する *piggyBac* ベクターは、血友病犬への遺伝子治療の他、ヒト第 VIII 因子製剤に対してインビター(中和抗体)の認められる患者に対しても、バイパス製剤の選択肢の一つとして有効となる可能性がある。

piggyBac ベクターを用いる事で、7kb の巨大 cDNA を含む発現カセットを導入可能であることを確認出来た。これは、血液凝固第 VIII 因子のような巨大 cDNA の導入に有効である。しかしそれと同時に、搭載遺伝子サイズが大きくなる程、導入効率が下

がる傾向が観察された。今後、すでに報告されている高活性型転移酵素の利用や、ベクターのさらなる改変により、大きなベクターにおける導入効率を高めていきたい。また、すでに構築済みのベクターに関しては、マウスへの導入実験を行い、生体内での発現量および有効性を確認している最中である。

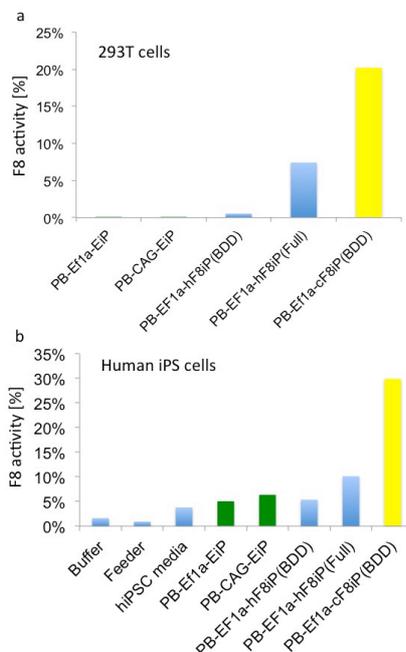


図5 培養上清に分泌された第VIII因子の活性測定。
*piggyBac*ベクターをHEK293T細胞(a)およびヒトiPS細胞(b)へ導入した後、細胞培養上清を回収し、APTT活性測定を行った。ヒト第VIII因子製剤1 IUを100%第VIII因子活性として表している。

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1件)

1) 堀田秋津.

“iPS 細胞の小分子制御”

学術の動向, 査読無, 2011; Vol.16 (5): p62-65.

[学会発表] (計6件)

1) Hotta A, Fujimoto N, Nakano T, Sasakawa N, Woltjen K, Gervier SR, Matsui H, Yamanaka S.

“EFFICIENT AND STABLE EXPRESSION OF NON-VIRAL VECTORS IN HUMAN IPS CELLS: TOWARDS A GENE THERAPY APPROACH FOR HEMOPHILIA.”

ISSCR annual meeting, 2012, 6/13, パシフィコ横浜

2) Li H, Fujimoto N, Sasakawa N, Shigi N, Komiyama M, Hotta A, Yamanaka S
“SITE SPECIFIC GENOME EDITING OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY PNA”
ISSCR annual meeting, 2012, 6/13, パシフ
ィコ横浜

3) Hayakawa K, Kato T, Akira N, Ikeya M, Otsuka T, Hotta A, Toguchida J
“GENERATION OF CANINE IPS CELLS AND THEIR CHARACTERISTICS”
ISSCR annual meeting, 2012, 6/13, パシフ
ィコ横浜

4) Duhamel M, Perillous S, Epinat JC, Cedrone F, Englund M, Ellerström C, Hyllner J, Hotta A, Yamanaka S, Balbirnie E, Sourdive D, Rochon C
“DERIVATION OF NANOG KNOCK-IN GFP REPORTER IPS CELL LINES USING MEGANUCLEASE-INDUCED HOMOLOGOUS RECOMBINATION”
ISSCR annual meeting, 2012, 6/14, パシフ
ィコ横浜

5) Tanaka A, Woltjen K, Hotta A, Ikeya M, Shoji E, Isobe K, Sakurai H
“GENERATION FUNCTIONAL MYOCYTES FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS”
ISSCR annual meeting, 2012, 6/14, パシフ
ィコ横浜

6) Hotta A
“Efficient and stable expression of non-viral vectors in human iPS cells: towards a gene therapy approach for hemophilia.”
Canada Stem Cell Network Annual Scientific Meeting, 2010, 11/22, Calgary, Canada

[その他]

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/hotta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 秋津 (Hotta Akitsu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：50578002

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

松井 英人 (MATSUI Hideto)

奈良県立医科大学・小児科・講師