

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659265

研究課題名(和文)新規相同組換え法を応用した遺伝子変異修復システム

研究課題名(英文)Gene correction therapy by homologous recombination

研究代表者

岡田 尚巳 (OKADA, Takashi)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00326828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)をはじめとする単一遺伝子病に対し、遺伝子治療によるタンパク質補充療法の非臨床試験が活発に推進され効果が期待されているが、将来的には遺伝子変異そのものの修正が根本的な治療として期待される。遺伝子組み換え技術を用いた遺伝子修正療法の実用化をめざし、より高い有効性と安全性、正確性を備えたシステムの構築を検討した。また、疾患モデルにおける炎症病態を解析し、遺伝子修正細胞のプラットフォームとして間葉系幹細胞や歯髄幹細胞の応用可能性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common form of childhood muscular dystrophy. Although current gene therapy strategies aim at protein supplementation to recover the function, to correct the mutation in the dystrophin gene must be much-awaited technology as an ultimate goal. Also, since correction by gene editing requires the stable transfer of a functional gene into the target cell, we investigated mesenchymal stromal cells and dental pulp stem cells as platforms of gene and cell therapeutics for the treatment of DMD.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：遺伝子修正 遺伝性神経筋疾患 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) をはじめとする様々な単一遺伝子病に対し、遺伝子治療によるタンパク質補充療法の非臨床試験が活発に推進され効果が期待されているが、将来的には遺伝子変異そのものの修正が根本的な治療として期待される。研究代表者は従来、核酸分解酵素および DNA 結合タンパク質を用いて、ウイルスゲノム上の短い相同領域において極めて効率よく外来遺伝子を挿入する遺伝子組み込み技術を開発した (特願 2008-330838)。遺伝子組み換え技術を用いた遺伝子修正療法の実用化をめざし、さらに機能強化を行い、より高い有効性と安全性、正確性を備えたシステムの構築を検討した。

2. 研究の目的

本研究では、安全な遺伝子組換え細胞医療技術を提供するため、染色体の特定部位に高い効率で治療遺伝子を正確に組み込む技術を検討した。疾患の原因となっている遺伝子の修復を安全にかつ正確に行うため、標的とする染色体の特定部位に短い相同領域において遺伝子組み換えを行うことをめざした。臨床応用に向けて、この遺伝子組み換え技術を用いた治療の実用化を推進するため、高い有効性と安全性、正確性を備えたシステムの構築が望まれる。このため本研究では、相同組み換え至適条件、クロマチン構造の変化による組み換え及び疾患原因遺伝子認識特異性の改善効果や遺伝子組み換え細胞の評価を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

標的染色体の特定部位に短い相同領域において高い効率で遺伝子組換えを行うためのベクター系を構築し、標的細胞に効率よく外来遺伝子を導入する条件を検証した。また、従来の Transcription activator-like effectors (TALE) を用いた Nicking では野生型および変異型の FokI 酵素活性部位をそれぞれ付加した一対の融合タンパク質を用いる必要があった。しかしながら、この場合には一対で最低でも 50-60bp 程度の TALE により特異的に認識される配列を選択せねばならず、必ずしも容易ではない。そこで我々は、近年報告された Bacillus phage HNHE に由来し、非分裂細胞においても Nicking 活性を持つとされる Gamma を融合させた TALE-Nickase を発現するカセットを搭載した AAV ベクタープラスミドを構築した。

4. 研究成果

(1) ZFNs による相同組み換えを誘導するために、DSB (double-strand break) を引き起こすための ZFNs 発現ベクター、および目的とする挿入遺伝子を含むターゲティングベクターを標的の細胞に導入する必要がある、これらの機能発現ベクターを構築した。ZFNs には、標

的配列上にて互いに会合した時のみ機能を発現する様に、FokI 消化酵素の2種類の変異体を各々融合させた。また、細胞内での組換え効率の促進を図るため、切断後に DNA 鎖の一方を消化する核酸分解酵素 TREX1 (3-prime repair exonuclease 1) および DNA 結合タンパク質 RAD51 (recA の同族体) を発現するベクターを構築した。さらに、標的細胞への遺伝子導入条件の検討として、ポリエチレンイミン (PEI) を応用し、効果的に骨髄間質細胞に外来遺伝子を導入する条件を検証した。

(2) 安全かつ高効率なホストゲノムの修正に有用な、二本鎖 DNA の一方の鎖のみを切断する Nicking 酵素活性部位を付加した TALE を搭載したベクターの開発を行った。標的とするゲノム領域のモデルとして、導入された遺伝子が locus effect によるサイレンシングを受けず、致命的な遺伝子を含まない、AAV integration site 1 (AAVS1) 領域を選択した。また、動物種には、ヒトと同じ霊長類であり、ゲノムの相同性が非常に高く保存されているコモンマーマセットを用いた。ヒトの AAVS1 領域については 19 番染色体 (19q13.4 qtr) に存在することが知られるが、マーマセットでは 22 番染色体上の 45.95-8Mb 付近に存在する相同領域中 1.6Kb が未知であった。独自に解析したところ、AAV ゲノムの挿入に必須とされる RBS および Trs 配列まで保存されていることを確認した。これらは野生型 AAV ゲノムがホストゲノムに挿入される際に必要であり、この近傍領域はゲノム編集を行っても安全であり、これらの配列を認識して結合する TALE を設計し、TALE-Nickase を発現するカセットを搭載したベクタープラスミドを構築した。

(3) DMD モデル動物の病態解析を推進すると同時に、治療用細胞の調製法や IL-10 を利用した細胞生存および炎症制御機能強化の作用機構と効果を検討した。IL-10 の安定発現によって移植細胞の生存が生体内で効果的に延長することを見つけた (特許出願 2013)。この際、MSC や歯髄幹細胞への遺伝子導入には 1 型 AAV が有効であることが判明した。また、歯髄由来幹細胞が高い炎症制御作用を有し、DMD 遺伝子修正治療における移植細胞として有用であることを確認した (特許出願 2014)。

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 10 件)

1. Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T: Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci Rep*, 9;5:8316, 2015

2. Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, and Takeda S. Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immunetolerance. *Mol. Ther.*, 23(4):627-37, 2015
 3. Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, Yuji Yamanashi. DOK7 Gene Therapy Benefits Mouse Models of Diseases Characterized by Defects in the Neuromuscular Junction. *Science*, 345;6203:1505-1508, 2014
 4. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Akiyo Nishiyama, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada; Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Human Molecular Genetics*, 23(15):3990-4000, 2014
 5. Motoi Kanagawa, Chih-Chieh Yu, Chiyomi Ito, So-ichiro Fukada, Masako Hozoji-Inada, Tomoko Chiyo, Atsushi Kuga, Megumi Matsuo, Kanoko Sato, Masahiko Yamaguchi, Takahito Ito, Yuki Katanosaka, Yuko Miyagoe-Suzuki, Keiji Naruse, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda, and Tatsushi Toda; Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Human Molecular Genetics*, 22(15):3003-15, 2013
 6. Nakamura, A., Kobayashi, M., Kuraoka, M., Yuasa, K., Yugeta, N., Okada, T. and Takeda, S. Initial pulmonary respiration causes massive diaphragm damage and hyper-CKemia in Duchenne muscular dystrophy dog. *Sci Rep.*, 3:2183., 10.1038/srep02183, 2013
 7. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K :Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy*, 20(7):1384-1392, 2012
 8. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Sachiko Ohshima-Hosoyama, Masanori Kobayashi, Hironori Okada, Michiko Wada-Maeda, Akinori Nakamura, Takashi Okada and Shin'ichi Takeda. : Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 20:168-177, 2012
 9. Nitahara-Kasahara Y, Takeda S and Okada T. Cell therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*, Vol.34;No4:198-205 2014
 10. Okada, T., Takeda, S.: Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy, *Pharmaceuticals*, 6(7), 813-836, 2013.
- [学会発表](計26件)
1. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T. Improved Transduction of Canine X-Linked Muscular Dystrophy With rAAV9-Microdystrophin By Using MSCs Pretreatment. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 14, 2015
 2. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Kuraoka M, Chiyo T, Okada H, Tsumita N, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T. Mesenchymal Stromal Cells Can Ameliorate the Progressive Phenotype of Dog With Duchenne Muscular Dystrophy. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 14, 2015
 3. Nakamura A, Miyake K, Watanabe A, Hirai, Y Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T. Prolonged Survival and Improved Phenotypes of Lethal Hypophosphatasia Model Mice By Adeno-Associated Virus-Mediated Muscle Transduction of Bone-Targeted Alkaline Phosphatase. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 16, 2015
 4. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Masuda C, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S and Okada T. Induction of local OPMD histopathology in common marmoset by rAAV1 and 8-mediated transduction. American Society of Gene and Cell

- Therapy 17th Annual Meeting DC, May 21-24,2014
5. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S. Immune tolerance induction of canine X-linked muscular dystrophy with fetal rAAV-microdystrophin transduction. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 6,2014
 6. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Okada T. rAAV1 and 8-mediated induction of local OPMD histopathology in common marmoset. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 6,2014
 7. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Tsumita N, Chiyo T, Okada H, Takeda S, Okada T. Engraftment of mesenchymal stem cells is effectively associated by IL-10 in skeletal muscle. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 8,2014
 8. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin Jin-Hong, Okada T, Takeda S. Effective microdystrophin expression in non-human primate muscle with rAAV type 2/8/9 vectors following immune suppression. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, Aug 6,2014
 9. Nakamura A, Iijima O, Miyake K., Watanabe A., Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S., Okada T, Shimada T. Improvement of hypophosphatasia model mice by muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014) Tokyo, August 6-8,2014
 10. Nakamura A, Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T. Rescue of lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus mediated muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics San Diego, California, October 18 - 22,2014.
 11. Hayashita-Kinoh H Nitahara-Kasahara Y, Okada H, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S. Immune tolerance induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with rAAV9-Microdystrophin Transduction. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, May 23 2014.
 12. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Takeda S, Okada T. Skeletal muscle engraftment of mesenchymal stromal cells is augmented by IL-10. American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, DC, May 23,2014
 13. Okada H, *et al.*(6th out of 7):Effective Transduction of Common Marmoset with rAAV1 and 9 To Generate NHP Model of Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting (Salt Lake City, USA). May, 2013.
 14. Nitahara-Kasahara Y, *et al.*(5th out of 6): Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells That Can Differentiate To Form Myogenic Cells Is Enhanced by Expressing IL-10 in Dog with Duchenne Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting (Salt Lake City, USA). May, 2013.
 15. Hayashita-Kinoh H, *et al.*(6th out of 7):Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with Trans-Placental rAAV9-Microdystrophin Transduction. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting (Salt Lake City, USA). May, 2013.
 16. Hiromi Hayashita-Kinoh, *et al.*(6th out of 7):rAAV9-Mediated Microdystrophin Gene Transfer with Immune Tolerance Induction Improves Dystrophic Phenotype of Canine X-Linked Muscular Dystrophy. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting (Philadelphia, USA). May, 2012.
 17. Hironori Okada, *et al.*(6th out of 7):Strategy for rAAV9-Mediated Transduction of Common Marmoset Skeletal Muscle To Generate NHP DMD. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting (Philadelphia, USA). May, 2012.
 18. Akiko Ishii, Hironori Okada, Hiromi Hayashita-Kinoh, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda: rAAV8/9-Mediated Muscle Transduction with Tacrolimus in Non-Human Primate. American society of gene & cell therapy 15th Annual meeting (Philadelphia, USA). May, 2012.
 19. Kasahara N.Y, *et al.*(9th out of

- 10): Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (Seattle, USA). May, 2011.
20. Hayashita-Kinoh H, *et al.* (6th out of 7): Immune tolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9- microdystrophin transduction. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (Seattle, USA). May, 2011.
21. Kasahara Y, *et al.* (9th out of 10): Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting (Washington DC, USA). May, 2010.
22. Kinoh H, *et al.* (5th out of 6): Induction of oral immunotolerance to rAAV9-microdystrophin in canine X-linked muscular dystrophy. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting (Washington DC, USA). May, 2010.
23. Ito M, *et al.* (3rd out of 9): rAAV8-mediated protein-anchoring therapy for targeting collagen Q-tailed acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting (Washington DC, USA). May, 2010.
24. Takashi Okada: AAV vector-mediated micro-dystrophin transduction with immune-modulation to improve DMD phenotype, 9th Japanese-French Symposium for muscular dystrophy, September 7-8, 2012, Tokyo
25. 倉岡睦季、木村円、永田哲也、岡田尚巳、今村道博、武田伸一 デュシェンヌ型筋ジストロフィー・イヌモデル CXMDJ を用いた血清オステオポンチンの解析. 第9回筋ジストロフィー治療研究合同発表会. 2014年11月1日 箱根
26. 笠原優子、喜納裕美、千代智子、岡田浩典、武田伸一、岡田尚巳 IL10 強制発現による機能強化型 MSCs の作製と生存解析 第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月2日 沖縄

〔図書〕(計1件)

1. Okada, T.: Efficient AAV vector production system: Towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. In Gene Therapy - Tools and

Potential Applications (ed. by Francisco Martin), InTech, pp429-440, 2013.

〔総説〕(計1件)

岡田浩典、伴野太郎、岡田尚巳: ゲノム編集技術を用いる遺伝子治療. 血液フロンティア, 25巻5号, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 歯髄由来多能性幹細胞を含有する筋ジストロフィー治療剤

発明者: 岡田尚巳、笠原優子、今川究

権利者: 国立精神・神経医療研究センター、JCR ファーマ

種類: 特許

番号: 2014-231379

出願年月日: 2014年11月14日

国内外の別: 国内

名称: 移植用幹細胞及びその製造方法 (MSC 調製方法及び免疫寛容誘導に関する特許)

発明者: 岡田尚巳、笠原優子、武田伸一

権利者: 国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 2013-108408

出願年月日: 2013年5月22日出願

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 尚巳 (OKADA, Takashi)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00326828