

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461575

研究課題名(和文) ips細胞およびAAVベクターを用いた先天性副腎皮質過形成の遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Extra-Adrenal Induction of Cyp21a1 Ameliorates Systemic Steroid Metabolism in a Mouse Model of Congenital Adrenal Hyperplasia

研究代表者

内木 康博 (Naiki, Yasuhiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・内分泌代謝科・医員

研究者番号：20470007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターによって21水酸化酵素欠損症のモデルマウス(Cyp21欠損マウス)の筋肉内にCyp21a1遺伝子を発現させて血液中のプロゲステロンからDOCへの代謝の改善を認めた。一方AAVベクターを直接Cyp21a1欠損マウス副腎へ投与したが血清中のプロゲステロン/DOC比は改善されなかった。さらに11水酸化酵素をコードするCYP11B1遺伝子を含んだ血清型2型のAAVベクターを用いて11水酸化酵素欠損症の患者の皮膚から初代培養して得られた線維芽細胞に遺伝子を導入したが、培養液中のDOCからcorticosteroneへの変換を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether transduction of murine Cyp21a1 in extra-adrenal tissues could rescue steroid metabolism in 21-OHD mice to develop a gene therapy for congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to steroid 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). We injected an adeno-associated viral (AAV) vector containing Cyp21a1 into the thigh muscles of 21-OHD mice. Serum progesterone/DOC ratios were markedly reduced in all four animals at 4 weeks after injection. These results indicate that extra-adrenal induction of Cyp21a1 ameliorates steroid metabolism in 21-OHD mice. We also introduced Cyp21a1 gene using AAV vector containing Cyp21a1 into the adrenal glands of 21-OHD mice. Instead of muscle injection, serum progesterone/DOC ratios did not change at 4 weeks after injection. We also evaluate the efficacy of induction CYP11B1 gene using AAV vector to the fibroblast CAH due to steroid 11beta-hydroxylase deficiency. The hydroxylation of steroid 11beta hydroxylase was not detected by this method.

研究分野：小児内分泌

キーワード：副腎皮質過形成症 遺伝子治療 アデノウイルス随伴ウイルスベクター 21水酸化酵素欠損症 11水酸化酵素欠損症

1. 研究開始当初の背景

先天性副腎皮質過形成は副腎におけるコレステロールからステロイド産生に関わる酵素のいずれかの異常によって生じる常染色体劣性遺伝の疾患である。病型として最も頻度が高いのは CYP21A2 遺伝子の異常によって生じる 21 水酸化酵素欠損症で、先天性副腎皮質過形成の 90%以上を占める。その病態として、17 ハイドロキシプロゲステロンおよびプロゲステロンの 21 位水酸化が障害され、糖質コルチコイドおよび硬質コルチコイドが産生できなくなる。そのため下垂体へのネガティブフィードバックがかからなくなり ACTH の過剰刺激が生じ、同じく副腎から産生されるが 21 水酸化酵素がその産生に関わらない性ステロイド過剰分泌が生じる。

塩類喪失型は最重症型で生後数日のうちに糖質コルチコイド不足によるショックと鉍質コルチコイド不足による低 Na、高 K 血症となる電解質異常をきたし、早期に診断し速やかに治療しなければ致死性的である。また胎内から生じる性ステロイドの過剰産生によって女兒において外性器の男性化が生じる。単純男性型には塩類喪失型に比べて、鉍質コルチコイドの分泌障害が軽く新生児期の電解質異常は来さないが、性ステロイドの過剰産生による女兒の外性器の男性化を生じる。このため塩類喪失型と単純男性型は糖質コルチコイドと鉍質コルチコイドを生涯にわたり内服し続ける必要があり、塩類喪失型で内服を怠れば低血糖ならびに電解質異常の副腎不全症状を示し、特に発熱などのストレス時には十分なステロイドの補充が必要であり、怠れば致死性的となる。マススクリーニングが開始されてからも副腎不全による死亡、並びに脳症の報告がなくなる。この意味でコルチコイドを十分量補充する必要があるが、過剰投与は低身長をきたす。

CYP21A2 遺伝子の変異解析が進み、塩類喪失型はほとんど 21 水酸化酵素の残存活性が

認められないが、単純男性型では 2-11%、非古典型では 20-60%の残存活性が認められている。このことは塩類喪失型に CYP21A2 遺伝子を導入することで 21 水酸化酵素活性を数%得られれば塩類喪失症状がなくなりストレス時の副腎不全による致死性的リスクが少なくなる可能性を十分に回避できることを示唆している。さらに残存活性があることより、コルチコイドの過剰投与が減り、過剰投与による身長予後の悪化の可能性も減る。1987年に Shiroishi らが新生児期に複数の仔体が死亡する系において 21 水酸化酵素欠損症のモデルとなる Cyp21a1 遺伝子の欠損を同定した。このマウスでは糖質コルチコイドとしてコルチコステロンが合成されるため、Cyp21a1 欠損マウスではコルチコステロンが合成されずプロゲステロンが蓄積する。1999年に Tajima らがこのマウスにアデノウィルスベクターに乗せた Cyp21a1 遺伝子を副腎に直接注入して発現させ、一時的にコルチコステロンの産生を見たことより遺伝子導入治療の有効性を見出した。しかし副腎への遺伝子注入は侵襲を伴い、ベクターのよっては副腎を癌化させる可能性もある。

2. 研究の目的

本研究の目的は 21 水酸化酵素欠損症のモデルマウス(Cyp21 欠損マウス)を用い、非侵襲的な遺伝子治療を確立することであった。昨年度までの研究で Cyp21a1 欠損の成獣マウス 3 個体に対して Cyp21a1 遺伝子を含む AAV ベクターを筋肉内に投与して血液中のプロゲステロンが、RV ベクターで Cyp21a1 遺伝子を発現させた線維芽細胞を自家移植した場合より効率よく DOC に代謝される事を確認した。本研究期間では Cyp21a1 遺伝子欠損マウスに対する iPS 細胞を用いた遺伝子導入の検討と AAV ベクターを用いた遺伝子導入の有効性と安全性の確立およびヒト線維芽細胞における有効性の確認を検討した。

3. 研究の方法

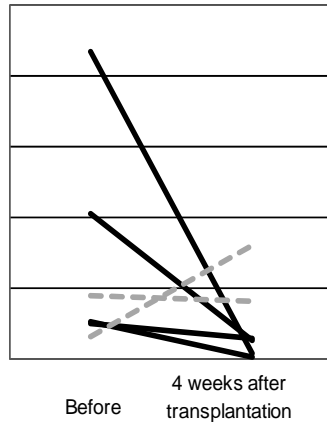
- 1) Cyp21a1 遺伝子を発現させた iPS 細胞の同種移植
Cyp21a1 ホモ欠損マウスから樹立した iPS 細胞にレトロウィルスベクターで Cyp21a1 遺伝子を導入し、その iPS 細胞を Cyp21a1 ヘテロ欠損マウスを交配して分娩させた 8 匹の新生児マウスの腹腔内に 5×10^3 細胞移植した。
- 2) AAV ベクターによる Cyp21a1 欠損マウス筋肉内への Cyp21a1 遺伝子導入
pAAV-CMV-shuttle に Cyp21a1 遺伝子の cDNA および対照として GFP 遺伝子を組み込んだ血清型 2 型の AAV ベクターをそれぞれ作成する。Cyp21a1 ホモ欠損マウスの四肢の筋肉内に計 1×10^{11} GC の AAV を注射し、投与前と投与後 4 週で血液中の P4/DOC 比を測定した。
- 3) AAV ベクターによる Cyp21a1 欠損マウス副腎内への Cyp21a1 遺伝子導入
同血清型 2 型の AAV ベクターを Cyp21a1 ホモ欠損マウス 2 匹の副腎内へ直接 1×10^{11} GC 注射し投与前と投与後 4 週で血液中の P4/DOC 比を測定した。
- 4) AAV ベクターによるヒト CYP11B1 遺伝子欠損症由来線維芽細胞への CYP11B1 遺伝子の導入
pAAV-CMV-shuttle に CYP11B1 遺伝子の cDNA を組み込んだ血清型 2 型の AAV ベクターをそれぞれ作成する。CYP11B1 欠損症患者の皮膚から線維芽細胞を初代培養し、それと対照として COS 細胞、Y1 細胞に感染させて遺伝子を導入する。ステロイド非産生細胞である線維芽細胞と COS 細胞にはさらに lipofectamin を用いて adrenodoxin および adrenodoxin reductase の cDNA を含んだプラスミド

を導入する。これらの培養液に DOC を $3 \mu\text{M}$ 相当添加、24 時間後 (Y1 細胞は 3 時間後) に培養液を回収してコルチコステロン (COS 細胞ではコルチゾンも) 濃度を測定して DOC からの変換率を算出する。

4. 研究成果

- 1) Cyp21a1 遺伝子を発現させた iPS 細胞の同種移植
生後 1 日目に iPS 細胞を腹腔内移植した仔マウス 8 匹のうち 2 匹がホモで、Cyp21a1 遺伝子が発現している iPS 細胞を移植したマウスでは軽度デオキシコルチコステロン (DOC) の産生が増加していたが全てのマウスで腹腔内に腫瘍を形成した。
- 2) AAV ベクターによる Cyp21a1 遺伝子欠損マウス筋肉内への Cyp21a1 遺伝子導入
図 1 に Cyp21a1 遺伝子の cDNA を組み込んだ血清型 2 型の AAV ベクターを筋肉内に注射した Cyp21a1 遺伝子ホモ欠損マウスから得られた投与前と 1 ヶ月後の血中の P4/DOC 比を Cyp21a1 遺伝子導入群を実線で、対照群を破線で示す。頭数が Cyp21a1 遺伝子導入群 4 匹で対照群が 2 匹であるため統計学的な有意差は認めなかったが図に示すように著明な P4/DOC の改善を認めた。

図 1 AAV ベクター投与前後の血中 P4/DOC の変化



3) AAV ベクターによる Cyp21a1 遺伝子欠損マウス副腎内への Cyp21a1 遺伝子導入
同ベクターを Cyp21a1 遺伝子ホモ欠損マウスの副腎内に直接投与することで 21 水酸化酵素の活性を認めなかった。遺伝子導入前後での P4/DOC 比は 159 810、447 417 と改善を認めなかった。

4) AAV ベクターによるヒト CYP11B1 遺伝子欠損症由来線維芽細胞への CYP11B1 遺伝子導入
表に DOC からの変換率を示す。CYP11B1 遺伝子導入した線維芽細胞では DOC からコルチコステロンへの変換を認めなかった。そのことより基質を 11 水酸化コルチゾール(11OF)に変更し、さらに対照として COS1 細胞、Y1 細胞にもそれぞれ感染させて 11OF からコルチゾールへの変換を見たところ COS1 細胞と同等の変換率にとどまった。

表 AAV ベクターによる培養液中の DOC からの変換率

細胞	対照 (DOC)	Fibroblast (DOC)	対照 (11OF)	Fibroblast (11OF)	COS	Y1
変換率	0.038	0.024	25.7	20.5	31	71

5. 考察

本研究の目的は先天性副腎皮質過形成に対する侵襲の少ない遺伝子治療を確立することである。

前回の研究期間において 21 水酸化酵素欠損症の疾患モデルである Cyp21a1 遺伝子ホモ欠損マウスから得た線維芽細胞にレトロウィルスベクターを用いて Cyp21a1 遺伝子を導入し、この細胞を皮下に自家移植することでマウス体内でのステロイド産生が改善したことを確認した。ただし初代培養で細胞が増殖するのに時間がかかり、短期間に有効な細胞数を得るのが困難で細胞数が不十分であったこともあり治療効果が限定的であったのと、時間がかかることから乳幼児期に治療を開始できないのが課題として残った。

また乳幼児期に治療開始する目的で、あらかじめホモの Cyp21a1 遺伝子欠損マウスの線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、それにレトロウィルスベクターを用いて Cyp21a1 遺伝子を発現させた細胞系を樹立し、Cyp21a1 遺伝子のヘテロ欠損マウス同士を交配させて出産したマウスに生後数日以内にこの iPS 細胞を腹腔内移植を行って乳幼児期に治療開始する効果を検証した。結果は今回移植した iPS 細胞は未分化細胞であったので全て腫瘍形成したのと、移植した仔マウスのうち遺伝子型を確認したところ 2 匹しかホモ欠損マウスは含まれておらず、それぞれ Cyp21a1 遺伝子発現 iPS 細胞とコントロールの iPS 細胞を移植し、そのステロイド産生は改善を認めなかった。このことからまず iPS 細胞を線維芽細胞へ分化させてから移植する必要性と、腹腔内移植では血流がなくステロイド代謝には効果が不十分な可能性、さらに移植した iPS 細胞の細胞数が不十分であった可能性が示唆された。これらは今後 ES 細胞を用いることも視

野に入れて継続して検討すべき課題と考える。

同様に線維芽細胞を初代培養する過程を省く目的で、Cyp21a1 欠損マウス体内に直接ウィルスベクターを用いて遺伝子を導入する方法として AAV ベクターを使って 1 匹の Cyp21a1 欠損マウスの筋肉内に Cyp21a1 遺伝子を注入して感染させたところ、血液中のプロゲステロンが他の方法より効率よく DOC に代謝されることが確認できた。

本研究期間では AAV ベクターによる遺伝子導入の有効性を確立するため個体数を増やして確認したところ、4 匹に投与して著明な改善を見た。乳児期に多くが副腎不全で死亡する Cyp21a1 遺伝子欠損マウスの成獣を得る事が困難であることを考えると十分な成果と考える。

加えて副腎皮質内で発現して活性を生じる Cyp21a1 遺伝子を副腎内で投与した場合、筋肉内投与と比べて有効なのか否かを確認する実験を行ったところ、少なくとも血清型 2 型の AAV ベクターでは 21 水酸化酵素の活性の改善を認めなかった。よって最近の治験から副腎皮質細胞へ感染性のある血清型 9 型の AAV ベクターを用いた実験を検討する必要が示唆された。

また小胞体で働く 21 水酸化酵素と異なりミトコンドリアで働く 11 水酸化酵素の欠損症における同治療法の有効性を確認する目的で患者皮膚から初代培養した線維芽細胞に CYP11B1 遺伝子を血清型 2 型の AAV ベクターを用いて導入した。結果 CYP11B1 遺伝子による 11 水酸化酵素の活性は認めず、21 水酸化酵素欠損症とは異なり副腎皮質細胞へ感染性のある血清型 9 型の AAV ベクターを用いた治療法を検討する必要性が示唆された。

今研究期間において AAV ベクターによる遺伝子導入が乳幼児期から治療が開始できる有用な治療法の候補としての有効性を確認

した。今後、長期的な効果や安全性の確認および将来の臨床応用を目指して 21 水酸化酵素欠損症患者の線維芽細胞を用いた実験を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

Naiki Y Extra-adrenal expression of *Cyp21a1* for gene therapy of CAH 16th International Congress of Endocrine Society 2014 年 6 月 Chicago

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、勝又規行、小野寺雅史、深見真紀 先天性副腎皮質過形成における副腎外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 10 月 浜松

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、勝又規行、小野寺雅史、深見真紀 先天性副腎皮質過形成における副腎外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み 第 22 回日本ステロイドホルモン学会 2014 年 11 月 東京

内木康博、宮戸真美、高田修治、堀川玲子、勝又規行、小野寺雅史、深見真紀 先天性副腎皮質過形成における副腎外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み 第 88 回日本内分泌学会学術集会 2015 年 4 月 東京

内木康博、宮戸真美、高田修治、堀川玲子、勝又規行、小野寺雅史、深見真紀 先天性副腎皮質過形成における副腎外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み 第 88 回日本内分泌学会学術集会 2015 年 4 月 東京

Naiki Y Extra-adrenal expression of *Cyp21a1* for gene therapy of CAH 18th Asian Society for Pediatric Research 2015 年 4 月 Osaka

内木康博、宮戸真美、高田修治、堀川玲子、勝又規行、小野寺雅史、深見真紀 先天性副腎皮質過形成における副腎外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み-11 水酸化酵素での検討 - 第 23 回日本ステロイドホルモン学会 2016 年 1 月 倉敷

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木康博

Naiki Yasuhiro

独立行政法人国立成育医療研究センター

内分泌代謝科

医員

研究者番号：20470007

(2) 研究分担者

勝又規行

Katsumata Noriyuki

独立行政法人国立成育医療研究センター

研究所 基礎内分泌研究室

室長

研究者番号：10260340

深見真紀

Fukami Maki

独立行政法人国立成育医療研究センター

研究所 分子内分泌研究部

部長

研究者番号：40265872