

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461596

研究課題名(和文)ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新規動物モデル作製と治療法の開発

研究課題名(英文)Development of mouse model and therapy of Diamond-Blackfan anemia

研究代表者

三宅 弘一 (Miyake, Koichi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90267211

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)：リボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17)に異常を持つDBAの分子病態を解明するのを目的に、新規動物モデルの開発を行った。リボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17)に対するsiRNAを発現する薬剤(テトラサイクリン)誘導性レンチウイルスベクターを作製し、KRAB遺伝子組み込んだマウスより骨髓細胞を採取し、作製したレンチウイルスベクターで遺伝子導入後テトラサイクリンによる誘導を行なったが、十分な誘導を得ることは困難であった。今後誘導不十分である原因追求とともに、CRISPR-Cas9システムを用いたトランスジェックモデルマウスも検討していく。

研究成果の概要(英文)：We generated tetracycline inducible lentiviral vector expressing siRNA against RPL5, RPL11, RPS24, and RPS17 to analyze the molecular mechanism of DBA (Diamond-Blackfan anemia). To develop DBA model mouse, first, we generated KRAB (Kruppel-associated box) gene transgenic mouse. Bone marrow cells from KRAB mouse were transduced with the above lentiviral vectors and induced with tetracycline. Although expression of KRAB was detected, it was difficult to get enough inducible expression after tetracycline induction. Now, we have a plan to analyze the reason and have another strategy to make a DBA model mouse using CRISPR-Cas9 system.

研究分野：血液内科学

キーワード：リボソーム蛋白 貧血 先天異常 siRNA レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (Diamond-Blackfan anemia: DBA) の病因はいまだ完全には解明されていないが、DBA 患者の約 25% において RPS19 (ribosomal protein S19) の遺伝子異常が報告されている。また、近年 RPS19 以外のリボソーム蛋白 (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 等) の異常の報告もされてはいるが、その病態は依然として不明な点が多く、現在までに有効な治療法は開発されていない。今までの DBA 研究の問題点として (1) 患者数が少なく研究に必要なサンプルが手に入りにくい。 (2) DBA の細胞自体が *in vitro* でも増殖が困難である。 (3) DBA の病態解析、治療効果検討を行えるモデルが存在しない。などがあげられ、これらの理由から DBA の病態解析およびその治療法の研究をするのは困難であった。

我々が開発した RPS19 に異常を持つ DBA モデル (Blood. 105: 4627-4634, 2005, Mol Ther. 11: 627-637, 2005) は DBA 患者のサンプルと同じ表現系 (細胞増殖能低下、コロニー形成能の低下、赤血球系分化障害、等) をもち、これらのモデル細胞の使用により今までは不可能であった様々な解析が可能となり DBA 分子メカニズムの解析を行ってきた (Stem cells. 26: 323-329, 2008, Blood. 109: 980-986, 2007)。さらには近年 DBA のモデルマウスの作製にも成功している (Blood. 118: 6087-6096, 2011)。

本研究ではこれらの結果を基に、RPS19 以外のリボソーム蛋白 (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) に異常を持つ DBA の分子病態を解明することを目的に、新規動物モデルの開発を行う。さらにはこれらの結果をふまえ、申請者が新規に開発した Homeobox transcriptional factor B4 (HoxB4) を利用した新規骨髄移植法 (Mol Ther. 18: 1373-1378, 2010) を応用し、臨床応用を念頭に置いた新規治療法 (遺伝子治療) の開発を行なう。

2. 研究の目的

DBA の分子病態の解明と治療法の開発を目的として、リボソーム蛋白 (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) に異常を持つ新規マウスモデルの作製を行い、その病態の違い及び治療法の開発を行っていく。

3. 研究の方法

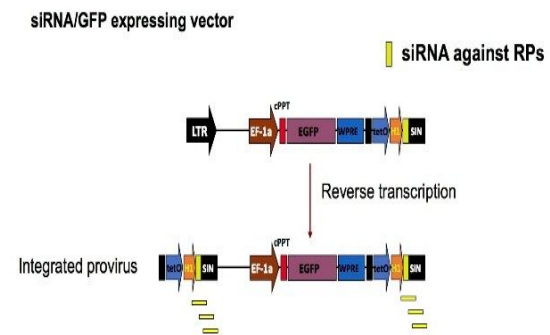
(1) リボソーム蛋白 (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) に異常を持つ新規動物モデルの作製

リボソーム蛋白に対する siRNA を発現する薬剤 (テトラサイクリン) 誘導性レンチウイルスベクターの作製

マーカー遺伝子として GFP を発現するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターに RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 に対する siRNA を組み込んだベクタープラスミド (図 1) と HIV の gag, pol, rev, tat を発現するパッケージングプラスミド及び VSV-G エンベ

ロープ発現プラスミドを 293T 細胞へトランスフェクションし組換えレンチウイルスベクターを作製する。

図 1. レンチウイルスベクタープラスミド



RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 に対する siRNA を LTR に組み込み、細胞感染後はダブルで発現する。

DBA モデルマウスの作製

今までの研究結果よりリボソーム蛋白を抑制する事により細胞増殖抑制が起こるためマウスモデル作製においても、テトラサイクリンによる薬剤誘導型のモデル作製を行う。そのためにまず、KRAB (Kruppel-associated box) 遺伝子 (Mol Ther. 11: 627-637, 2005) を組み込んだマウス (KRAB マウス) を既に作製済みである。この KRAB マウスより骨髄細胞を採取し、各リボソーム蛋白に対する siRNA を発現するレンチウイルスベクターにて遺伝子導入後、移植し、生着後テトラサイクリンにて siRNA を発現し、リボソーム蛋白を抑制する事により DBA モデルを作製する。

(2) 新規治療法 (遺伝子治療) の開発

作製された DBA モデルマウスを用いて *in vivo* における新規遺伝子治療の有用性を検討する。具体的には塩基置換により siRNA には影響されないが、正常なリボソーム蛋白を発現する治療用レンチウイルスベクター (Blood. 105: 4627-4634, 2005, Mol Ther. 11: 627-637, 2005) により、モデルマウス骨髄細胞に遺伝子導入後移植を行い治療効果を検討する。

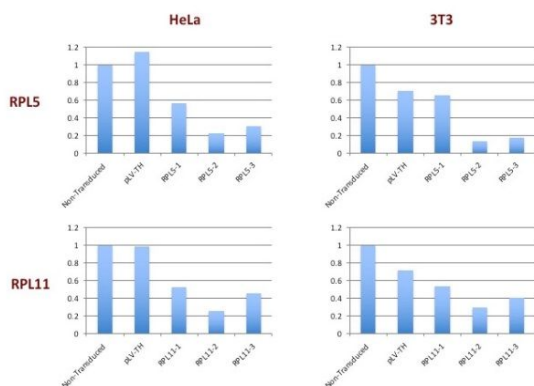
4. 研究成果

(1) リボソーム蛋白に対する siRNA を発現するレンチウイルスベクター

リボソーム蛋白 (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) に対する siRNA を発現するレンチウイルスベクターを作製した。siRNA はヒト及びマウスの両方の細胞に効果を発揮するように設計した。siRNA の抑制効果検討のために HeLa 細胞、3T3 細胞に RPL5 および RPL11 に対する siRNA 発現レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、RNA の抑制効果を検討したところ、コントロールと比較して約 40~80% の抑制効果を認めた (図 2)。同様に RPL5 および RPL11 に対する siRNA 発現レンチウイルス

ベクターでも約 40%~90%の抑制効果を認め
た。

図 2 . siRNA の抑制効果



(2) DBA モデルマウスの作製

KRAB マウスの骨髄細胞に siRNA と GFP を発現するレンチウイルスベクターにて遺伝子導入し、テトラサイクリン投与にて薬剤誘導性を検討した所、数%と低値であったため、遺伝子導入効率、薬剤誘導効率を上げる為にレンチウイルスベクターの濃縮精製を行い、数回の遺伝子導入を行った。これにより導入効率の上昇は見られたが、テトラサイクリン投与以前より発現が認められる。テトラサイクリンによる誘導率が低い。などの問題点が見られた。原因追及のため KRAB マウスの KRAB 遺伝子の発現を検討し、より高発現の KRAB マウスを選択し、テトラサイクリンによる誘導を行なったが、十分な誘導を得ることは困難であった。今後誘導不十分である原因追求とともに、この KRAB マウスを用いたモデル動物作製が困難な場合には CRISPR-Cas9 システムを用いたトランスジェックモデルマウスも検討していく。

(3) 新規治療法(遺伝子治療)の開発

HoxB4 及び siRNA には影響されないが、正常なリボソーム蛋白を発現するレンチウイルスベクターの作製を行った。今後上記モデルが出来次第治療実験をおさない有効性を検討していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1.Tamai H, Yamaguchi H, Miyake K, Takatori M, Kitano T, Yamanaka S, Yui S, Fukunaga K, Nakayama K, Inokuchi K.: Amlexanox Downregulates S100A6 to Sensitize KMT2A/AFF1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia to TNF Treatment. *Cancer Res.* 77:4426-4433, 2017 (査読有)
- 2.Omori I, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Kitano T, Inokuchi K.: D816V mutation in the KIT gene activation loop has greater cell-proliferative and anti-apoptotic ability than N822K mutation in core-binding factor acute myeloid

leukemia. *Exp Hematol.* 52:56-64.e4, 2017 (査読有)

3.Takahashi K, Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Yaguchi C, Iijima O, Yamazaki Y, Katakai Y, Miyake N, Kameya S, Shimada T, Takahashi H, Okada T.: Improved intravitreal AAV-mediated inner retinal gene transduction after surgical internal limiting membrane (ILM) peeling in cynomolgus monkeys. *Mol Ther.* 25:296-302, 2016 (査読有)

4. Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Kameya S, Fujimoto C, Nakamoto K, Takahashi H, Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Hirai Y, Shimada T, Okada T, Takahashi H.: Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Mol Vis.* 22:816-26, 2016 (査読有)

5.Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Miyake N, Igarashi T, Kanokoda C, Nakamura-Takahashi A, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán JL, Okada T, Shimada T.: Prevention of lethal murine hypophosphatasia by neonatal ex vivo gene therapy using lentivirally transduced bone marrow cells. *Hum Gene Ther.* 26:801-12, 2015 (査読有)

6.Dohi T, Miyake K, Aoki M, Ogawa R, Akaishi S, Shimada T, Okada T, Hyakusoku H.: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Suppresses Collagen Synthesis in Cultured Keloid Fibroblasts. *PRS Global Open* 3: e520, 2015 (査読有)

7.Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto M, Shimada T.: Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther.* 21:427-33, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Shimada T, Okada T.: Why are scAAV9 vectors able to transduce the CNS but not ssAAV9? ; The difference between the ssAAV9 and scAAV9 vector in transduction of CNS by intravenous injection. The 23th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2017.

2.Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Shimada T, Okada T.: Successful treatment of neonatal metachromatic leukodystrophy model mice by low dose of self-complementary AAV type 9 vector expressing ASA. 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2016.

3. Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto

M, Shimada T.: Successful treatment of neonatal metachromatic leukodystrophy model mice by intravenous injection of self-complementary AAV type 9 vector expressing ASA. The 21th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2015.
4. Omori I, Yamaguchi H, Kitano T, Miyake N, Miyake K, Inokuchi K.: The D816V c-kit mutation confers higher proliferation activity by JAK-STAT and Src family kinase pathway compared to N822K c-kit mutation in core-binding factor acute myeloid.56th ASH Annual Meeting & Exposition. 2014.

〔図書〕(計 1件)

1. Miyake K, Miyake N, Shimada T. : Gene delivery into central nervous system (CNS) using AAV vectors. Gene Therapy-Principles and Challenges. (Edited by Ibrahim Doaa Hashad, Published by InTech) 105-117, 2015 (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三宅 弘一(MIYAKE KOICHI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号:90267211