

令和元年6月16日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09662

研究課題名(和文) ウイルスベクターを使用しない安全な血友病遺伝子・細胞治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel gene and cell therapy for Hemophilia without viral vector

研究代表者

松井 英人 (MATSUI, HIDETO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00571027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用を目的としてイヌの肝臓に対しトランスポゾンベクターを用いFVIII遺伝子導入が可能であるか血友病Aイヌモデルで検討した。全身麻酔下で、血友病Aイヌの大腿静脈からのカテーテル操作で区域肝静脈を一時的にバルーン閉塞し、FVIII発現トランスポゾンベクターをハイドロダイナミックジーンデリバリーシステムを用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入実施7日後に活性化部分トロンボプラスチン時間短縮によりFVIIIの発現を確認した。また全血を用いたThromboelastometry (ROTEM) で凝固時間の短縮を認めた。FVIII発現とその止血効果は6ヶ月以上にわたり持続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欠損遺伝子を強制的に導入する非ウイルスベクター系として、エレクトロポレーションによる方法、リボソーム被包化および受容体を介した導入など物理的な遺伝子運搬システムが試みられてきた。piggyBacトランスポゾン由来の発現ベクターは、トランスポゾンの転移酵素の触媒活性を利用して染色体への組込みを行うことで導入効率も高く、piggyBac由来ターミナルリピートで挿まれた遺伝子発現カセットの全長を欠損なく組込むことが可能である。これまでウイルスベクターに対する免疫反応を克服する新しい遺伝子導入法として血友病遺伝子/細胞治療に対する新しい遺伝子導入法として期待される。

研究成果の概要(英文)： Hydrodynamic gene delivery (HGD) is considered to be an alternative candidate to viral vectors. Previously, we tested the HGD in hemophilia A mouse model with the combination of non-viral piggyBac transposon vectors which can transfer the full-length FVIII transgene. As a result, we confirmed the sustained FVIII expression for over 300 days without any immune responses (Matsui H, et.al. PLoS One 9(8) e104597, 2014). While HGD system is effective and safe in small animal such as mouse (20-25g body weight), the major challenge is in applying this functioning procedure in the patients with hemophilia A. In the current study we focus on an assessment of the safety of liver-target HGD in dogs as the first step toward hydrodynamic gene therapy in clinic.

研究分野：小児科

キーワード：血友病 遺伝子治療 細胞治療 ベクター

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は血液凝固第 Ⅲ 因子(FⅢ)の量的および質的異常に起因する先天性血液凝固異常症である。現在の治療法として、血漿由来または遺伝子組換え FⅢ 製剤の輸注療法が確立されている。しかし、治療薬の FⅢ 製剤は CHO ハムスター細胞で主に生産されているが、極めて高価であり、月額医療費の上位 10 件中 9 件(月額 2000 万円以上)が血友病で占められていることなど、我が国の医療財政を著しく圧迫しているのが現状である。また、過去に血液製剤による肝炎ウイルスや HIV 感染症が社会問題となった歴史的背景からも、さらに安全かつ有効な次世代の治療法として、遺伝子治療ならびに細胞療法の確立が期待されている。数年前より欧米では、血友病患者に対しアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による遺伝子治療の臨床試験が行われているが、ベクターに対する免疫応答が原因で持続的な遺伝子発現が難しく、十分な治療成績は得られていない。研究代表者らは数年来、自己末梢血から単離した血管内皮前駆細胞をレンチウイルスベクターで遺伝子導入後に皮下移植する *Ex vivo* 遺伝子導入のアプローチで血友病 A マウスおよびイヌモデルでの検討を行ってきた。そのアプローチはウイルスベクターを静注する *In vivo* 遺伝子導入と比較して 宿主がベクターに対する免疫応答を起しにくい 不測の事態においては移植細胞を摘出し治療を中断できるという利点がある。

2. 研究の目的

piggyBac トランスポゾン由来の血液凝固第 Ⅲ 因子(FⅢ)導入発現ベクターを開発し、*in vitro* 実験系と *in vivo* 実験系の両面から有効性を検討したうえで、新システムによる血友病遺伝子/細胞治療法の確立を目指す。自己細胞を用いた細胞治療法をさらに安全に臨床応用するには、ウイルスベクターを使用せずに患者自身の細胞へ FⅢ を効率よく遺伝子導入し、持続して発現させることができるベヒクル細胞を大量に作製する方法を確立する必要がある。そこで、構築した *piggyBac* トランスポゾン由来の FⅢ 発現ベクターを血友病患者由来のヒト iPS 細胞へ導入し、FⅢ 遺伝子発現を検討する必要がある。また、FⅢ を導入した iPS 細胞を様々な細胞へ分化誘導することで、FⅢ がどの細胞で効率よく発現し分泌することが明らかになれば、細胞治療に必要なベヒクル細胞を患者 iPS 細胞から無限大に大量に作製することが可能となる。将来的には、自己細胞を用いることで移植に伴う免疫応答を完全に回避できる。ベクターは従来のウイルスベクターの様な封じ込め P2 レベルでの取り扱いが不要で、ウイルス由来タンパク質に対する免疫応答のリスクも少ない。目的細胞に転移酵素と同時にプラスミド導入を行うという簡便な操作で、安価に高効率で治療用遺伝子の挿入ができるプラスミド DNA ベクターである。これまでのウイルスベクターでは不可能であった、大きなサイズの cDNA 全長を導入できる。この新システムによる次世代血友病遺伝子/細胞治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

研究期間内に、正常ヒト iPS 細胞に数種のヒト FⅢ 遺伝子発現 *piggyBac* ベクターで遺伝子導入を行い、ピューロマイシン添加による細胞選別法を併用して、長期間の FⅢ の発現を比較検討する。また並行して血友病患者から手術時皮膚生検から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、遺伝子導入により FⅢ 発現を目指す。遺伝子導入した細胞を血友病 A マウスおよびイヌモデルで移植実験を行い、その止血効果を検討する。

4. 研究成果

① 遺伝子導入効率の検討

GFP 発現プラスミドのサイズが 4.1Kb であるのに対してヒト FⅢ (全長型、B ドメイン欠如型、ブタとヒトのハイブリッド型)発現プラスミドは、それぞれ 10.6 kb、8.1 kb、8.0 kb とサイズが大きく、プラスミド導入の効率が低下することが予想される。今までのところ、同時に遺伝子導入を行う *piggyBac* 転移酵素(transposase)発現プラスミドとの比率が 1:4 の場合が最も効率よく遺伝子導入が可能であるが、新規遺伝子導入法(Neon, Nucleofector, NEPA21 等の電気穿孔法)や、ベクターの複数回投与等、さらに詳細な検討を行うことで遺伝子導入効率の向上を検討する。その結果サイ

ズが大きくなればなるほど遺伝子導入効率は低下するが、複数回投与することで十分な FVIII 遺伝子発現に成功した。

分化多能性幹細胞における外来遺伝子のサイレンシングの検討

一般に ES 細胞や iPS 細胞等の未分化多能性幹細胞は、レンチウイルスベクター等による遺伝子導入効率が悪く、また導入した外来遺伝子の発現が維持できないサイレンシング現象がみられる。我々の iPS 細胞における GFP 遺伝子を導入した検討において、新規 *piggyBac* ベクターはレンチウイルスベクターよりも遺伝子導入効率がよく、また導入された遺伝子のサイレンシングもかなり回避出来ることを見出している。これらについては、分泌される F 活性の長期持続性によって確認する。また血友病患者より樹立した iPS 細胞へも F 発現 *piggyBac* ベクターを導入し、F の発現分泌を測定した。その結果改良型 FVIII を発現する Dox 応答型 *piggyBac* ベクターの構築に成功した。

F の分泌能力および生産性の検討

F は主に肝臓の類洞内皮細胞で産生されていることが知られている。F は巨大なタンパク質で、切断や糖鎖修飾など、複雑な翻訳後修飾を経て、ER 経路を経て分泌される。その為、未熟な多能性幹細胞よりも、ER 経路がより発達した肝細胞や血管内皮系細胞の方が基本的には F の分泌が高いことが期待される。そこで、さらに優れた F 産生細胞がないか検討するために、F を恒常的に発現している iPS 細胞を、EB(胚様体)形成を経てランダムに三胚葉由来の細胞群へ分化させ、F を高発現している細胞群を免疫染色後にソートし、ER マーカーや細胞表面マーカーから、どのような細胞種において F の発現が高いか探索を行った。その結果 vWF 陽性の血管内皮系細胞がより発現していることが確認した。

血友病 A 動物モデルへの移植実験

血友病 A マウスモデルを用いて細胞移植実験を行った。様々な FVIII 発現細胞を細胞シートにして移植する。細胞シート移植は、温度応答性細胞回収培養皿(セルシード社 UpCell)を使い F を発現する BOECs シートを作製する。その後細胞シートを作製しマウスの皮下へ移植する。細胞シートは生体内移植後の機能的接着に有効であるとともに、外来性マトリックスを使用しないため移植に伴う炎症を少なく押さえることが可能である。細胞移植実験後の治療効果は、

抗第 Ⅸ 因子抗体(インヒビター)産生量の ELISA 測定、生体内での免疫応答を確認するための サイトカインアッセイ(IL-6 TNF- α など)、T 細胞増殖試験、制御性 T 細胞誘導試験(F 特異的制御性 T 細胞発現誘導の検討)などを行い、免疫寛容成立のメカニズムを詳細に検討する。また同時に、実験によって起こり得る副反応等も慎重に観察する。現在長期間の FVIII 発現を検討中である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松井英人

血友病遺伝子/細胞治療の方向性

日本小児血液・がん学会雑誌 52(3)254-257 2015

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Hideto Matsui, Masashi Noda, Rie Utoh, Midori Shima, Teruo Okano, Mitsuhiro Sugimoto
Double-layered cell sheet transplantation that achieves durable factor VIII delivery in the mouse model of hemophilia A.

18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy

2015 年 5 月 13 日 ニューオリンズ アメリカ合衆国

2. 野田正志、松井英人、松成泰典、越智すなお、嶋 緑倫、中山正成、鶴頭理恵、岡野光夫、杉本充彦

自己細胞移植による新規血友病 A 細胞治療法の開発---イヌモデルでの検討

第 37 回日本血栓止血学会学術集会

2015 年 5 月 22 日 甲府市

3. Hideto Matsui, Masashi Noda, Midori Shima, Akitsu Hotta, Mitsuhiro Sugimoto.

Long-term phenotypic correction of hemophilia A mice by non-viral piggybac transposon vector.

International Society on Thrombosis and Haemostasis 2015 Congress

2015年6月24日 トロント カナダ

4. 野田正志、松井英人、松成泰典、越智すなお、嶋 緑倫、福岡靖史、佐藤健司、穴井 洋、吉川公彦、中山正成、杉本充彦

DNAトランスポゾンベクターを用いた新規血友病A遺伝子治療法の創出---イヌモデルでの検討
第158回日本獣医学会学術集会

2015年9月9日 十和田市

5. Hideto Matsui, Masashi Noda, Rie Utoh, Midori Shima, Teruo Okano, Mitsuhiko Sugimoto.
Endothelial cell sheet transplantation that achieves long-term phenotypic correction in hemophilia A mouse model.

第77回日本血液学会学術集会

2015年10月16日 金沢市

6. Masashi Noda, Hideto Matsui, Yasunori Matsunari, Sunao Ochi, Midori Shima, Yasushi Fukuoka, Takeshi Sato, Hiroshi Anai, Kimihiko Kichikawa, Masanari, Nakayama, Akitsu Hotta, Mitsuhiko Sugimoto.

Novel gene therapy strategy for hemophilia A by hydrodynamic gene delivery combined with non-viral piggyBac transposon vector in canine model.

2015 Annual Meeting of the American Society of Hematology

2015年12月7日 オーランド アメリカ合衆国

7. 野田正志、松井英人、松成泰典、越智すなお、嶋 緑倫、福岡靖史、佐藤健司、吉川公彦、中山正成、堀田秋津、堀田秋津、杉本充彦

ハイドロダイナミックジーンデリバリーシステムによる新規血友病遺伝子治療法の確立

第38回日本血栓止血学会学術集会

2016年6月18日 奈良市

8. 野田正志、松井英人、松成泰典、越智すなお、嶋 緑倫、福岡靖史、佐藤健司、吉川公彦、中山正成、堀田秋津、杉本充彦

トランスポゾンベクターによる血液凝固第VIII因子遺伝子導入法の検討

第159回日本獣医学会学術集会

2016年9月7日 藤沢市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

研究協力者

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：堀田秋津

ローマ字氏名：Akitsu Hotta