

令和元年9月4日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10005

研究課題名(和文) AAVベクター及びiPS細胞による非侵襲的な副腎皮質過形成症の遺伝子治療開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy for congenital adrenal hyperplasia using AAV vectors and iPS cells

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・内科系専門診療部・医師

研究者番号：20470007

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)：血清型2型アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて21水酸化酵素欠損症患者由来の線維芽細胞にCYP21A2遺伝子を導入することで、非ステロイド産生細胞において21水酸化酵素の活性が獲得され、培養液中の17ヒドロキシprogesteroneが11デオキシコルチゾールへ代謝されることを確認した。さらに11水酸化酵素欠損症のモデルマウスをゲノム編集技術を用いて作成し、その副腎皮質に直接血清型9型AAVベクターを用いてCyp11b1遺伝子を導入したところ、11水酸化酵素活性が獲得され血清中に蓄積されたデオキシコルチコステロンからコルチコステロンに代謝されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性副腎皮質過形成症は1万出生に1人生まれる比較的頻度の高い先天性疾患で新生児マススクリーニングの対象疾患である。新生児期に診断され生涯にわたるステロイド内服が必要で、重症の塩類喪失型の場合は急薬などにより副腎不全を来し死に至る。重症型の塩類喪失型と軽症の単純男性型にはわずかな酵素活性の違いしかないため、遺伝子導入によって酵素活性がわずかにでも獲得できれば疾患の軽症化を期待できる。今回研究対象としたAAVベクターはすでに他の単一遺伝子疾患の遺伝子治療やがんへの遺伝子治療の臨床試験が開始されており安全性は確認されていることよりAAVベクターを用いての遺伝子治療は十分に有効性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have constructed serum type 2 adeno-associated virus vector (AAV2) including CYP21A2. Fibroblasts from 21 hydroxylase deficient patients were infected with the vector and were cultured in the medium with 17 hydroxy progesterone. 17 hydroxy progesterone was converted to 11 deoxycortisol by 21 hydroxylase. Detected 11 deoxycortisol in medium demonstrated 21 hydroxylase activity had acquired in patients' fibroblasts.

We have also constructed serum type 9 adeno-associated virus vector (AAV9) including Cyp11b1 gene and developed Cyp11b1 deficient mice by gene editing as a model of 11-beta hydroxylase deficiency, respectively. The AAV9 vector was injected directly into the adrenal glands of the model mice and measured serum deoxycorticosterone and corticosterone. It was demonstrated that serum deoxycorticosterone/corticosterone ratio was improved and lasted for several months. These results suggested the possibility of gene therapy for congenital adrenal hyperplasia using AAV vectors.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：先天性副腎皮質過形成症 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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 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、怠れば致命的となる。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的风险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

本研究の目的は先天性副腎皮質過形成症の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* 欠損の成獣マウスに対して *Cyp21a1* 遺伝子を含む血清型 2 型アデノウィルス随伴ウィルス(AAV2)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デオキシコルチコステロン(DOC)に代謝される事を確認した。また先天性副腎皮質過形成症の 21 水酸化酵素欠損症と 11 水酸化酵素欠損症の線維芽細胞に対してそれぞれ AAV2 ベクターを用いて欠損遺伝子を導入したところ、21 水酸化酵素欠損症患者のみ酵素活性が獲得できた。このことより、本研究機関では先天性副腎皮質過形成のモデルマウスとして 11 水酸化酵素欠損症のモデルマウスを作成し、副腎皮質細胞に感染性のある血清型 9 型 AAV(AAV9)ベクターを用いて *Cyp11b1* 遺伝子を導入することの有効性の確認を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) ゲノム編集による *Cyp11b1* 欠損マウスの作成

*Cyp11b1* 欠損マウスは CRISPE/Cas9 によるゲノム編集により作製した。そのため、BDF1 系統の掛け合わせにより得た受精卵に *Cyp11b1* 上に設計した sgRNA と Cas9 をマイクロインジェクションし、37 で一晚培養後、2 細胞期になった杯を偽妊娠マウスの輸卵管に移植した。産仔の組織から調整したゲノム DNA を用いて PCR により遺伝子型判別を行い、フレームシフトになっている個体を選別し、系統の樹立を行った。

#### 2) *Cyp11b1* 欠損マウスの副腎内への *Cyp11b1* 遺伝子導入

pAAV-CMV-shuttle に *Cyp11b1* 遺伝子の cDNA を組み込んだ AAV9 ベクター (AAV9-*Cyp11b1*) を作成する。それを *Cyp11b1* ホモ欠損マウス 2 匹の副腎内へ直接  $1 \times 10^{11}$  GC 注射し投与前と投与後 4 週毎で血液中の DOC/コルチコステロン(B)比を測定する。

#### 3) AAV ベクターによるヒト *CYP21A2* 遺伝子欠損症由来線維芽細胞への *CYP21A2* 遺伝子の導入

pAAV-CMV-shuttle に *CYP21A2* 遺伝子の cDNA を組み込んだ AAV2-CYP21A2 を作成する。*CYP21A2* 欠損症患者の皮膚から線維芽細胞を初代培養し、AAV2-CYP21A2 を感染させて遺伝子を導入する。この培養液に 17 ヒドロキシprogesteron (17OHP) を  $2 \mu\text{M}$  相当添加、24 時間後に培養液を回収して 11 デオキシコルチゾール (DOF) 濃度を測定して 17OHP からの変換率を算出する。また PT-PCR で *CYP21A2* 遺伝子の発現を確認する。

### 4. 研究成果

#### 1) ゲノム編集による *Cyp11b1* 遺伝子欠損マウスの作成

得られたマウスはシーケンスにて欠損遺伝子の有無を確認する。こうして得られた *Cyp11b1* ヘテロ欠損マウス同士を交配させ *Cyp11b1* ホモ欠損マウス 2 匹を作成した。得られたホモ欠損マウスにおいて血液中の DOC と B の比を LC-MS/MS 法にて測定し DOC/B が異常高値よりホモ欠損マウスが 11 水酸化酵素欠損症を有することを確認した(表 1)。

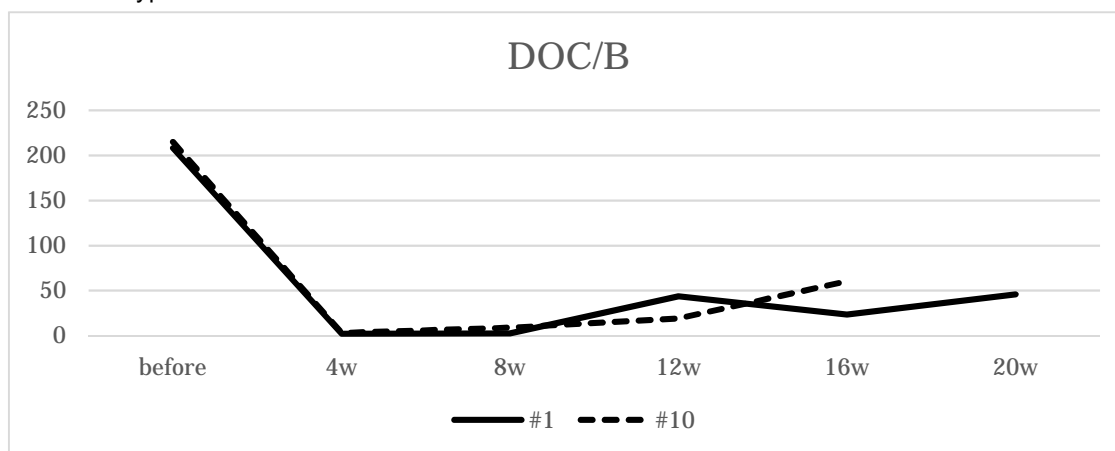
表 1 *Cyp11b1* 欠損マウスの DOC/B 比

	Wild type	Cyp11b1K01	Cyp11b1K02
DOC (ng/ml)	6.15	174.3	233.9
B (ng/ml)	405.9	0.81	1.12
DOC/B	0.015	201	208

#### 2) *Cyp11b1* 欠損マウスの副腎内への *Cyp11b1* 遺伝子導入

*Cyp11b1* ホモ欠損マウス 2 匹の背側より切開し、肉眼的にマウス副腎を確認して AAV-*Cyp11b1* を  $1 \times 10^{11}$  GC 副腎に注射投与した。投与前と 4 週、8 週、12 週、16 週、20 週に採血して血清中の DOC と B を測定して DOC/B 比の推移を求めた(図 1)。

図 1 AAV9-Cyp11b1 投与後の DOC/B 比



3) AAV ベクターによるヒト *CYP21A2* 遺伝子欠損症由来線維芽細胞への *CYP21A2* 遺伝子の導入  
表に 170HP からの変換率を示す。AAV-CYP21A2 をもちいて *CYP21A2* 遺伝子を導入した 4 名の  
21 水酸化酵素欠損症患者の線維芽細胞のうち、1 名を除き 170HP から 11DOF への変換を AAV2-  
*CYP21A2* の容量依存性に認めた。

表 2 AAV ベクターによる培養液中の 170HP からの変換率

表現型	遺伝子変異	170HP から DOF への変換率		
		control	× 1	× 3
単純男性型	I172N	0.00004%	7%	25%
塩類喪失型	IVS2-13A/C>G	0.0004%	0.0004%	0.006%
塩類喪失型	N.A.	0.0006%	22.5%	29.2%
塩類喪失型	N.A	0.0004%	18.8%	47.2%

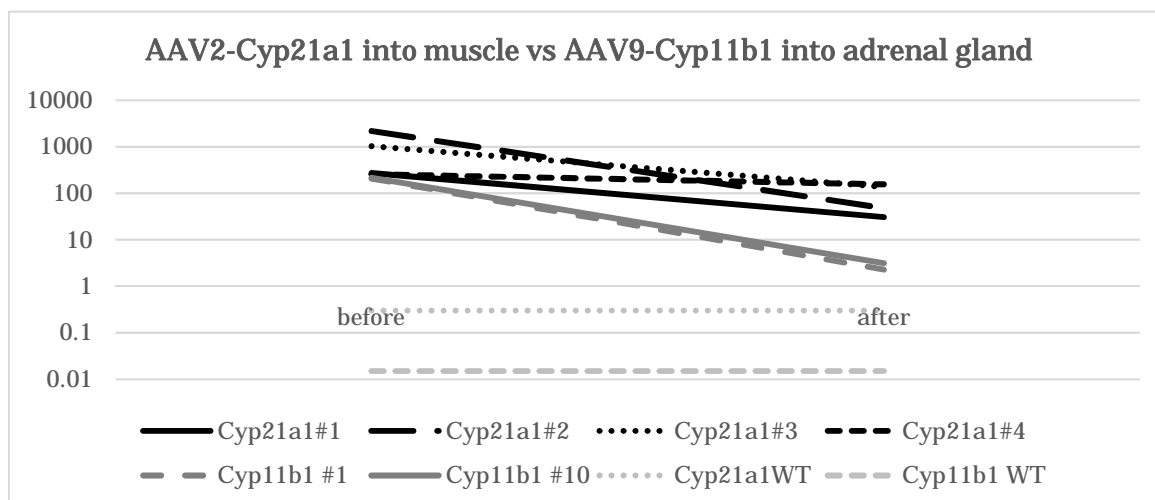
## 考察

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に AAV2 ベクターを使って 4 匹の *Cyp21a1* 欠損マウスの筋肉内に *Cyp21a1* 遺伝子を導入ところ、血液中のプロゲステロン (P4)/DOC 比が著明な改善を見たが一方 AAV2 ベクターでは副腎皮質への直接投与では 21 水酸化酵素の活性の改善を認めなかった。よって今研究期間では副腎皮質細胞へ感染性のある AAV9 ベクターを用いた実験を行ったところ、対象が *Cyp21a1* 欠損マウスと *Cyp11b1* 欠損マウスとの違いはあるものの AAV2 ベクターの筋肉内投与と比べ副腎皮質への直接の AAV9 ベクターの投与では著明なステロイド産生障害の改善を認めた(図 2)。この結果より先天性副腎皮質過形成症に対して 21 水酸化酵素欠損症では侵襲を伴わない AAV2 の筋肉内投与、11 水酸化酵素欠損症では副腎皮質動脈などへのカテーテル投与による AAV9 の副腎皮質投与によって筋肉内よりより効果の高い遺伝子治療の可能性が示唆された。

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小胞体上で働く 21 水酸化酵素のみならず、ミトコンドリア内で働く 11 水酸化酵素においても確認した。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及び 11 水酸化酵素欠損症由来の線維芽細胞から作成した iPS 細胞をステロイド産生細胞へ分化させたものを in vitro の患者副腎モデルとして用

いて、これに対して AAV による遺伝子治療の実験を進める予定である。

図 2AAV9-Cyp11b1 投与後の DOC/B 比と AAV2-Cyp21a1 投与後の P4/DOC 比の比較



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Naiki Y, Miyado M, Horikawa R, Katsumata N, Onodera M, Pang S, Ogata T, Fukami M. Extra-adrenal induction of Cyp21a1 ameliorates systemic steroid metabolism in a mouse model of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr J* 2016 Oct 29;63(10):897-904

〔学会発表〕(計 5 件)

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-11 水酸化酵素での検討 第 24 回日本ステロイドホルモン学会 2016 年 11 月 別府

Naiki Y, Miyado M, Hasegawa Y, Horikawa R, Pang S, Katsumata N, Fukami N. Induction of 21OHase by with AAV vector for ameliorates steroid metabolism in a mouse model and human fibroblasts of CAH. 9<sup>th</sup> Annual meeting of the Asia-Pacific Pediatric Endocrine Society 2017 年 9 月

Naiki Y, Miyado M, Hasegawa Y, Horikawa R, Pang S, Katsumata N, Fukami N. Induction of CYP21A2 with AAV vector for gene therapy of CAH. gene therapy of CAH. 100<sup>th</sup> Annual meeting of the Endocrine Society 2018 年 3 月 Chicago

内木康博、宮戸真美、長谷川雄一、堀川玲子、高田修治、勝又規行、深見真紀 AAV ベクターを用いた遺伝子導入による先天性副腎皮質過形成の遺伝子治療の試み 第 91 回日本内分泌学会学術集会 2018 年 4 月 宮崎

内木康博、宮戸真美、長谷川雄一、堀川玲子、高田修治、勝又規行、深見真紀 AAV ベクターを用いた遺伝子導入による先天性副腎皮質過形成の遺伝子治療の試み 第 52 回日本小児内分泌学会学術集会 2018 年 9 月東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：勝又規行

ローマ字氏名：Katsumata Noriyuki

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所

部局名：基礎内分泌研究室

職名：室長

研究者番号（8桁）：10260340

研究分担者氏名：深見真紀

ローマ字氏名：Fukami Maki

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所

部局名：分子内分泌研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：40265872

研究分担者氏名：高田修治

ローマ字氏名：Shuji Takada

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所

部局名：システム・再生医学研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：20372856

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。