

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08359

研究課題名(和文) AAVベクターおよびiPS細胞による副腎皮質過形成症の遺伝子治療の開発

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・小児内科系専門診療部・医師

研究者番号：20470007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルス随伴ウィルスベクター(AAV)を用いて21水酸化酵素欠損症(21OHD)モデルマウスでは血清型2型AAV(AAV2)の筋肉内、11水酸化酵素欠損症(11OHD)モデルマウスでは血清型9型AAV(AAV9)の副腎に遺伝子導入を行い酵素活性を獲得しえたが患者線維芽細胞に対するAAV2による遺伝子導入は21OHDでは有効であったが11OHDでは無効であった。11OHD患者由来のiPS細胞に対しステロイド産生細胞へ分化させたうえでAAV9をもちいてCYP11B1遺伝子を導入し酵素活性が獲得できた。このことは副腎皮質過形成の欠損酵素に応じた遺伝子治療戦略の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでの研究期間において先天性副腎皮質過形成症(CAH)の遺伝子治療モデルを開発してきた。本研究期間において疾患モデルマウスと患者由来のiPS細胞を用いて、欠損酵素によって遺伝子治療の対象組織を変える必要があることを示した。このことはCAHの遺伝子治療の臨床応用において欠損酵素に応じた遺伝子治療戦略の必要性を示し、より効果的で安全な遺伝子治療の開発をさらに推し進めることとなった。CAHのような単一遺伝子疾患に対する遺伝子治療において病型によって遺伝子治療の対象となる組織を変える必要性を示したことは今後多くの代謝性疾患などの単一遺伝子疾患に対する遺伝子治療開発に大きな知見となる。

研究成果の概要(英文)：In vitro assays demonstrated that gene induction with an adeno-associated virus type 2 (AAV2) vector into fibroblasts isolated from 21-hydroxylase-deficient (CYP21A2D) and 17-hydroxylase/17-lyase-deficient (CYP17A1D) patients improved defective enzymatic activity, but fibroblasts with 11-hydroxylase deficiency (CYP11B1D) did not show any improvement. Genetic replacement with an adeno-associated virus type 9 (AAV9) vector in CYP11B1D-iPSCs yielded 11-hydroxylase activity. Direct injection of Cyp11b1-containing AAV9 vectors into the adrenal gland of Cyp11b1 knockout mice significantly improved steroid hormone dysgenesis of the adrenal gland. These results point to the need for a causative-gene-dependent gene therapeutic strategy for CAH according to the defective gene. Defects in microsomal P450 can be treated with extra-adrenal gene induction, whereas defects in mitochondrial P450 may require adrenal gene induction.

研究分野：小児内分泌

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ィルスベクター 21水酸化酵素欠損症 11水酸化酵素欠損症 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、最重症型は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鉱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、鉱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。このため糖質コルチコイドと鉱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、発熱などのストレス時には十分なステロイドの補充を怠れば致死性となる。マスキ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。ただ重症型と軽症型の残存活性の差は数%であることより *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リスクが少なくなる可能性を十分に回避でき、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 21 水酸化酵素欠損症のモデルマウスである *Cyp21a1* ホモ欠損マウスに対して血清型 2 型アデノウィルス随伴ウィルス(AAV2)ベクターを用いて筋肉内に、11 水酸化酵素欠損症のモデルマウスである *Cyp11b1* ホモ欠損マウスに対して血清型 9 型アデノウィルス随伴ウィルス(AAV9)ベクターを用いて副腎皮質に遺伝子導入することでステロイド産生異常が改善することを示した。今研究期間では患者の線維芽細胞から iPS 細胞を作成し、それをステロイド産生細胞に分化させたうえで AAV ベクターを用いた遺伝子導入を行い、患者由来の iPS 細胞を用いた遺伝子治療モデルを検証することである。

3. 研究の方法

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

いずれも前研究期間に作成した *Cyp11b1* 遺伝子の cDNA を組み込んだ AAV9 ベクター(AAV9-*Cyp11b1*)を *Cyp11b1* ホモ欠損マウス 4 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 DOC/コルチコステロン(B)比を求める。さらに 2 匹においては投与後 4~5 カ月のあいだ 4 週毎に血液中の DOC/B 比を求める。

2) ヒト副腎皮質過形成症患者由来の繊維芽細胞の初代培養

患者の同意を得たうえで 21 水酸化酵素欠損症女児及び 17 水酸化酵素欠損症女児の外陰部形成術時に得られる余剰粘膜から、および 11 水酸化酵素欠損症患者の皮膚から初代培養を行って線維芽細胞を得る。

3) 11 水酸化酵素欠損症患者繊維芽細胞由来の iPS 細胞の作成

得られた 11 水酸化酵素欠損症患者の繊維芽細胞に対しレンチウィル

スペクターを用いて *Slc7a1* 遺伝子を導入する。次にレトロウィルスペクターを用いて *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF-4*, *c-MYC* の 4 種類の初期因子を導入して iPS 細胞を作成する。

4) iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導

得られた iPS 細胞およびコントロールの iPS 細胞をレチノイン酸を添加した培養液で培養した後ステロイド産生細胞のトリガーとなる転写因子 SF-1 と GFP 遺伝子を共に含むレンチウィルスペクターを用いて導入する。GFP の蛍光により *SF1* 遺伝子の導入確立を確認したのち cAMP を添加して培養することで分化誘導を行う。得られたステロイド産生細胞のステロイド合成酵素の発現を RT-PCR をもって確認する。

5) AAV ベクターを用いた遺伝子導入

21 水酸化酵素欠損症、17 水酸化酵素欠損症女、11 水酸化酵素欠損症患者の線維芽細胞、11 水酸化酵素欠損症患者由来の iPS 細胞から分化させたステロイド産生細胞に対して AAV ベクターを用いて遺伝子導入し定量的 RT-PCR で発現を確認するとともに培養液にステロイド代謝物を測定することで酵素活性を測る。

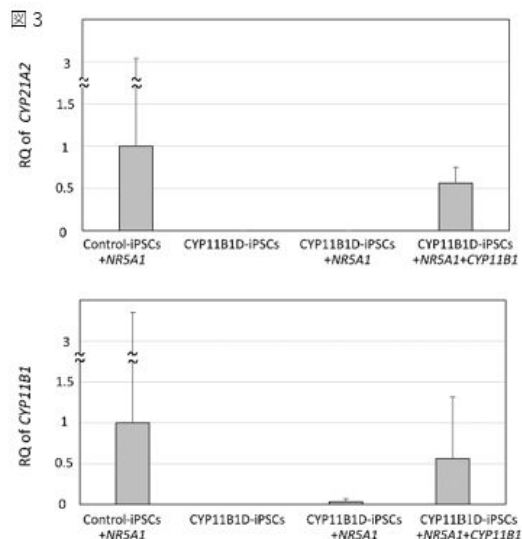
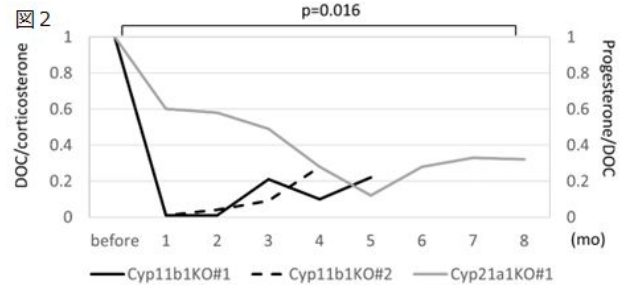
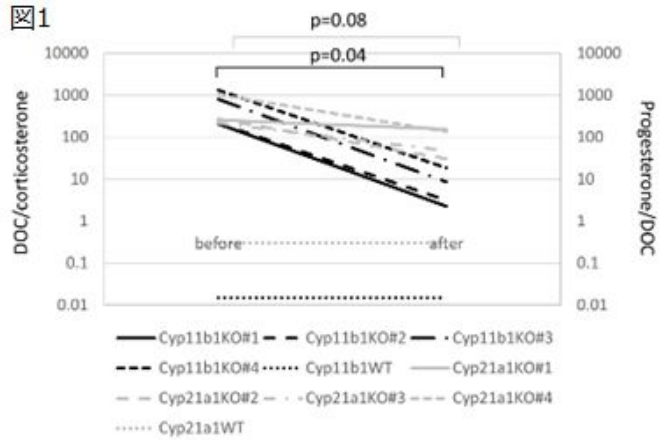
4. 研究成果

1) *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 4 匹の右副腎 AAV9-*Cyp11b1* を投与した。投与前と 4 週後採血して血清中の DOC と B を測定して DOC/B 比の推移を求めた。(図 1)。さらに投与後の *Cyp11b1* ホモ欠損マウスは 5 か月後まで DOC/B 比の推移を求めた(図 2)。副腎投与と筋肉内投与の効果と比較する目的で前研究期間に行った *Cyp21a1* ホモ欠損マウス 4 匹へ AAV2-*Cyp21a1* 投与後の progesterone/DOC も併記示すようにこの結果副腎投与は筋肉内投与より著しい改善を示した。

2) iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導 AAV ベクターを用いた遺伝子導入

図 3 に iPS 細胞から分化させたステロイド産



生細胞における *CYP21A2* (上段) および *CYP11B1* (下段) 遺伝子の発現を示した。コントロールの iPS 細胞由来ではいずれの遺伝子も発現しており、今回の誘導によって iPS 細胞がステロイド産生細胞に分化されたことを示した。

次に表 1 に 21 水酸化酵素欠損症、17 水酸化酵素欠損症、11 水酸化酵素欠損症の線維芽細胞に対して AAV2 を用いてそれぞれの遺伝子を導入し、得られた酵素活性を示す。これによって 21 水酸化酵素欠損症、17 水酸化酵素欠損症では AAV2 による線維芽細胞への遺伝子導入で活性が得られるが、11 水酸化酵素欠損症では補酵素を共発現しても AAV2 では活性が得られないことを示した。

表 1

Case	Phenotype	Mutation	% of converted steroids		
			Control	AAV2 1*10 ¹¹	AAV2 2*10 ¹¹
A. 21-hydroxylase deficiency			17 α -hydroxy progesterone to 11-deoxycortisol		
Case 1	Simple virilizing	p.I172N/p.I172N	0.00%	7.13%	26.43%
Case 2	Salt wasting	p.R356W/IVS2-13A/C>G	0.00%	22.50%	29.20%
Case 3	Salt wasting	N.A.	0.00%	18.80%	47.20%
Case 4	Salt wasting	IVS2-13A/C>GR483delInt.CGG>CC	0.00%	0.00%	0.00%
B. 17 α -hydroxylase/17-lyase deficiency			Progesterone to 17 α -hydroxy progesterone		
Case 1	Abnormal male genitalia	Δ F54/Y329KfsX418	0.04%	10.35%	14.35%
			Progesterone to androstenedione		
			0.013%	0.07%	0.15%
C. 11 β -hydroxylase deficiency			Control	AAV2 1*10 ¹¹	AAV2 1*10 ¹¹ +Adx+Adxr
Case 1	Hypertention	p.W116X/p.W116X	Deoxycorticosterone to corticosterone		
			0.04%	0.02%	0.02%

図 3 に 11 水酸化酵素欠損症の iPS 細胞由来のステロイド産生細胞にたいする AAV9 による遺伝子導入での *CYP11B1* 遺伝子の発現、さらに表 2 に 11 水酸化酵素活性を示す。これによって AAV9 を用いた遺伝子導入によって 11 水酸化酵素活性が獲得できていることを示された。

表 2

	Control-iPSs	CYP11B1D-iPSCs	CYP11B1D-iPSCs
Vector	Lenti- <i>NR5A1</i>	None	Lenti- <i>NR5A1</i> +AAV9- <i>CYP11B1</i>
% of DOC to B	0.01	0.00	0.75

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、11 水酸化酵素欠損症の疾患モデルである *Cyp11b1* 遺伝子ホモ欠損マウスの副腎皮質への AAV9 ベクターの投与によって著明なステロイド産生障害の改善を認めた。この結果より 21 水酸化酵素は小胞体上で働く microsomal P450 で、一方 11 水酸化酵素はミトコンドリア内で働く mitochondrial P450 であることから遺伝子導入の対象組織による有効性の違いが生じると仮定した。これをヒトで検証する目的で線維芽細胞での遺伝子導入で有効性が認められなかった 11 水酸化酵素欠損症由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作成、これ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 AAV による遺伝子治療の実験を進めた。この実験結果よりステロイド産生細胞では AAV9 ベクターによる遺伝子導入効果が認められたことより先天性副腎皮質過形成症の欠損酵素が microsomal P450 か mitochondrial P450 かによって治療戦略を選択することが必要で、microsomal P450 である 21 水酸化酵素欠損

症や 17 水酸化酵素欠損症などでは侵襲を伴わない AAV2 の筋肉内投与、mitochondrial P450 である 11 水酸化酵素欠損症やコレステロール側鎖開裂酵素欠損症などでは副腎皮質動脈などへのカテーテル投与による AAV9 の副腎皮質投与がより効果の高い遺伝子治療の可能性が示唆された。

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 1 件)

Naiki Y, Miyado M, Shindo M, Horikawa R, Hasegawa Y, Katsumata N, Takada S, Akutsu H, Onodera M, Fukami M.

AAV-mediated gene therapy for patients' fibroblasts, iPS cells, and a mouse model of congenital adrenal hyperplasia. Humane Gene Therapy (in printing)

[学会発表] (計 5 件)

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、高田修治、勝又規行、深見真紀 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスを用いた AAV9 ベクターによる遺伝子治療の試み 第 53 回日本小児内分泌学会学術集会 2019 年 9 月 京都

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、高田修治、勝又規行、深見真紀 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスを用いた AAV9 ベクターによる遺伝子治療の試み 第 27 回日本ステロイドホルモン学会 2019 年 11 月 浜松

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、高田修治、勝又規行、深見真紀 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスに対する AAV9 ベクターによる遺伝子治療の試み 第 93 回日内分秘学会学術集会 2020 年 7 月 浜松

Naiki Y, Miyado M, Horikawa R, Katsumata N, Takada S, Fukami M. Gene therapy for congenital adrenal hyperplasia with AAV vectors into fibroblasts and mice. 第 27 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2021 年 8 月 東京

内木康博、宮戸真美、堀川玲子、阿久津英憲、勝又規行、深見真紀 AAV ベクターによる 11 水酸化酵素欠損症の遺伝子治療モデルの作成 先天性副腎皮質過形成の遺伝子治療の試み 第 54 回日本小児内分泌学会学術集会 2021 年 10 月 東京

[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 (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)

研究者番号 : 20470007

(2) 研究分担者

勝又規行 (国立研究開発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)

研究者番号 : 10260340

深見真紀 (国立研究開発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)

研究者番号 : 40265872

阿久津英憲 (国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所)

研究者番号 : 50347225

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuhiro Naiki, Mami Miyado, Miyuki Shindo, Reiko Horikawa, Yuichi Hasegawa, Noriyuki Katsumata, Shuji Takada, Hidenori Akutsu, Masafumi Onodera, and Maki Fukami	4. 巻 -
2. 論文標題 AAV-mediated gene therapy for patients' fibroblasts, iPS cells, and a mouse model of congenital adrenal hyperplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内木康博
2. 発表標題 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスに対するAAVベクターによる遺伝子治療の試み
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内木康博
2. 発表標題 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスを用いたAAV9ベクターによる遺伝子治療の試み
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内木康博
2. 発表標題 11 水酸化酵素欠損症モデルマウスを用いたAAV9ベクターによる遺伝子治療の試み
3. 学会等名 第27回日本ステロイドホルモン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Naiki
2. 発表標題 Gene therapy for congenital adrenal hyperplasia with AAV vectors into fibroblasts and mice
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内木康博
2. 発表標題 AAVベクターによる11 水酸化酵素欠損症の遺伝子治療モデルの作成 先天性副腎皮質過形成の遺伝子治療の試み
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	勝又 規行 (Katsumata Noriyuki) (10260340)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分 泌研究部・室長 (82612)	
研究 分担者	深見 真紀 (Fukami Maiki) (40265872)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分 泌研究部・部長 (82612)	
研究 分担者	阿久津 英憲 (Akutsu Hidenori) (50347225)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研 究部・部長 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------