

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22974

研究課題名(和文) 先天的な遺伝子多型の改善を可能とする安全で簡便な移植療法の開発

研究課題名(英文) Development of a safe and simple transplant therapy to treat congenital gene polymorphism

研究代表者

小島 伸彦(Kojima, Nobuhiko)

横浜市立大学・理学部・准教授

研究者番号：90342956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝代謝酵素、例えばALDH2の多型によって、多くの日本人はアルコールに弱いという体質を持つ。肝臓移植を行うほどではないこのような「体質」は生まれつきのもので受け入れるしかなかった。本研究では体質に悩まなくてもよくなる社会を目指して、「肝機能を付与した赤血球を血液中に輸血する」という手法を提案・検証することを目的とした。当初は赤芽球の段階で野生型ALDH2を発現させることを計画したが、途中で赤血球ゴーストにALDH2タンパク質を封入するアプローチへと変更した。赤血球ゴーストにタンパク質を封入する条件については検討が完了し、機能的なALDH2を作製するところまで研究が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の代謝酵素には多型が存在し、これによって様々な疾患や体質が生じる。重篤な症状を伴う場合は肝臓移植が実施されるが、生涯にわたって厳しい食事制限を強いられる場合でも、肝臓移植が適用にならないケースも多い。代替法として、血液中に代謝酵素を投与する酵素補充療法があるが、酵素が分解されやすく毎日の投与が必要となる。本研究の方法論では、代謝酵素を赤血球の細胞膜で包むため血液中での安定性が増すことや、補酵素をともに充填して酵素活性を高めることが期待できる。代謝酵素の多型は我々の生活を制約する運命そのものである。本研究成果は運命に左右されずに生活できる社会の実現に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Many Japanese have low alcohol tolerance. This is due to ALDH2 polymorphism. To treat such genetic constitution, we tried to develop red blood cell containing wild-type ALDH2, which can be transfused into blood stream without immunosuppressants. Our original plan was to express ALDH2 in erythroblasts but we changed it to stuff ALDH2 protein into red blood cell ghost. We found a condition to fill red blood ghost with protein. It was also confirmed functional ALDH2 was overexpressed in animal cell lines. We are now selecting stable transfectants and trying to make red blood cells possessing ALDH2.

研究分野：細胞生物学、組織工学、臓器設計学

キーワード：赤血球 赤血球ゴースト ALDH2 レンチウイルス 強制発現 遺伝子治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は様々な代謝機能を担う重要な臓器である。500種類以上の化学反応を担っているともいわれており、遺伝子多型などによってコードされる酵素の働きが変化することで、体質に様々な個性が生まれる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (ALDH2) はアセトアルデヒドを酢酸に代謝する酵素であるが、日本人はこの酵素の遺伝子多型を持つことが多く、飲酒した際に顔が赤くなり頭痛が生じる、あるいは二日酔いになるなど、いわゆる「お酒に弱い」原因となる遺伝子の一つである。この酵素の働きを高めたい場合、従来の発想では患者由来 iPS 細胞を作り、ゲノム編集技術などを用いて ALDH2 の多型を修復して肝細胞へと分化させて体内に戻す、という形がとられる。このような従来法による移植には、いくつかの困難やリスクが伴う。すなわち、「移植の際の内視鏡手術」、「生着効率の低さ」、「接着性細胞の移植による肺塞栓の危険性」、「ゲノム編集技術のオフターゲット、あるいは他人の肝細胞を用いる場合は免疫抑制剤の摂取」、「がん化の恐れ」、などである。

つまり、お酒に弱いという遺伝的な体質を改善したくても、移植治療のリスクが非常に大きく現実的ではない。この問題を解決するためには、遺伝子改変した肝細胞を肝臓に移植するという方法とは異なるアプローチを考える必要がある。例えば、ALDH2 の多型によってアセトアルデヒドを酢酸に代謝する速度が遅い場合、アセトアルデヒドは血液中に蓄積する。したがって、血液中でアセトアルデヒドを酢酸に代謝すればよい。このとき、ALDH2 を持つ細胞であれば肝細胞でなくともアセトアルデヒドを減少させることができるだろう。例えば血液中に存在する赤血球の一部にその役割をもたせることができれば、先にあげたリスクをすべてクリアすることができる。

### 2. 研究の目的

肝機能を付与した赤血球を血液中に移植するという手法を提案・検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の (1) と (2) を初年度に、(3) と (4) を最終年度に実施した。

- (1) マウス赤血球前駆細胞株 (MEDEP-BRC5) の利用可能性の検討
- (2) ALDH2 強制発現用レンチウイルスの作製
- (3) 赤血球ゴーストの作製法および薬剤封入法の検討
- (4) 強制発現した ALDH2 の活性測定

### 4. 研究成果

- (1) マウス赤血球前駆細胞株 (MEDEP-BRC5) の利用可能性の検討

本研究の当初の実験計画では、未分化な赤芽球の時点でレンチウイルスを感染させ、目的とする代謝酵素、すなわち ALDH2 を強制発現させて、その後脱核を伴う分化誘導によって ALDH2 を内包した赤血球を得るというものであった。将来的にはヒト iPS 細胞由来赤芽球を用いるという計画のうえで、現時点では成熟した赤血球に分化誘導することが可能な赤芽球細胞株である MEDEP-BRC5 を利用することを検討した。MEDEP-BRC5 は問題なく培養することができたが、分化をうまく誘導することができなかった。また、iPS 細胞から完全に分化した赤血球を得ることはできておらず、ごく短期間に実用化するというのを考えた場合には、患者から得た赤血球や、献血による赤血球を利用したほうが適切である可能性が高いと考えた。そこで、当初の計画を変更し、赤芽球に対してレンチウイルス感染によって目的代謝酵素を強制発現させる方法ではなく、成熟した赤血球に直接的に代謝酵素を封入する方法を用いた研究開発へと方法論を変更した。

- (2) ALDH2 強制発現用レンチウイルスの作製

当初は、赤芽球にレンチウイルスシステムによって ALDH2 を発現させることを計画していたため、ALDH2 を発現するレンチウイルスの作製を進めていた。途中で赤血球ゴーストを経て、赤血球内に ALDH2 タンパク質を封入する手順へと変更したが、レンチウイルス感染により動物細胞で強制発現させた ALDH2 は赤血球中に封入するために使用できる。したがって、ALDH2 を発現するためのレンチウイルスの作製を続けた。

ALDH2 タンパク質はミトコンドリアに局在するため、リボソームで翻訳を受けた直後にはミトコンドリア局在シグナルペプチドを有する。レンチウイルスによって強制発現する ALDH2 として、このシグナルペプチドを含む全長遺伝子とシグナルペプチドを含まない成熟遺伝子との 2 種類を設計した。全長遺伝子を発現させるウイルスを Hep G2 細胞に強制発現させ、遠心による分画法によって、ミトコンドリアと細胞質画分へと分画した。ミトコンドリア画分においてシグナルペプチドを欠いた成熟タンパク質を検出したが、その量は少なく、多くのウイルス由来 ALDH2 は細胞質にシグナルペプチドが除去されていない、未成熟の状態で存在していることがわかった。これは ALDH2 タンパク質がミトコンドリアへ収容されるステップが律速になっ

ていることが原因と考えられた。シグナルペプチドが切断されていない状態では ALDH2 活性に影響が出る可能性もある。赤血球ゴーストに封入するための ALDH2 タンパク質を、レンチウイルスを用いて動物細胞で産生するためには、成熟遺伝子配列を用いたうえで細胞質画分のタンパク質を使用するという方法が効率的と考えられた。

### (3) 赤血球ゴーストの作製法および薬剤封入法の検討

従来より赤血球ゴーストに外来の薬剤やタンパク質を封入する技術は存在する[1]。その概要は低張液処理によって赤血球をバーストさせることで、赤血球細胞膜となった「赤血球ゴースト」を作製し、再び等張液に戻すことで赤血球構造を再生させつつ、任意の分子を赤血球内部に封入するというものである。

まず、低張液処理によって赤血球がバーストすることについて確認を行なった。低張液の処理によって、細胞外にタンパク質が流出することから、赤血球がバーストして赤血球ゴーストの状態になっていることがわかった。次に、分子量 70,000 の FITC-デキストランを含んだ等張液によってゴースト赤血球を処理すると、破裂していた赤血球の形状が破裂前の中央が凹んだ赤血球様へと戻った。PBS で洗浄したのちに共焦点顕微鏡で観察すると、内部には FITC に由来する蛍光が検出されたことから、外来の分子を赤血球内部に封入できていることが確認できた(図1)。FITC-デキストランの他にも分子量 53,000 の FITC-ストレプトアビジンの封入も行なった。おおよそ FITC-デキストランと同様の結果が得られ、多糖類やタンパク質などの種別に関係なく、封入が可能であると考えられた。またフローサイトメーターを用いて、細胞ごとの蛍光色素のばらつきを検討したところ、比較的均一なシグナル分布が得られた。なお、封入効率は少なくとも 70%程度であった。

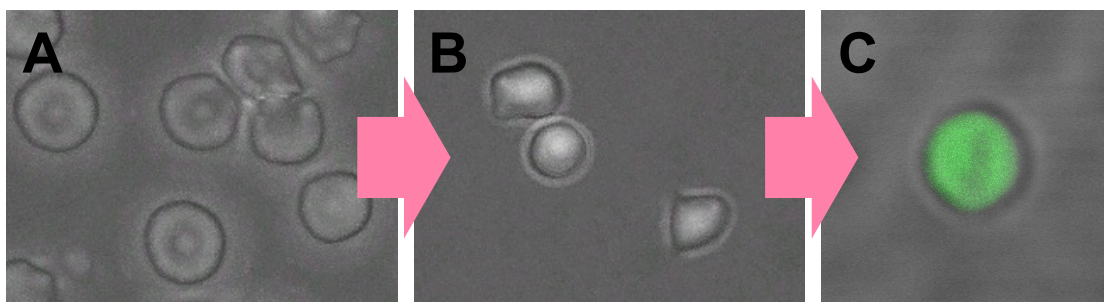


図1 ラット赤血球を用いた赤血球ゴースト作製と外来分子封入条件の検討

A : 単離した正常なラット赤血球。中央部分が凹んだ赤血球らしい形状をしている。B : 低張液処理した直後の赤血球ゴースト。細胞が膨らみ、一部が破裂しているようにもみえる。C : 等張液処理によって FITC-デキストランを封入したラット赤血球。中央部分が凹んだ形まで復元できていることがわかる。

### (4) 強制発現した ALDH2 の活性測定

Hep G2 細胞に ALDH2 発現レンチウイルスを感染させて、発現した ALDH2 の活性を測定した。活性の測定には Abcam 社の mitochondrial ALDH2 activity assay kit を使用した。これは細胞内の ALDH2 を 96 ウェルプレート上に結合した抗体でトラップし、ALDH2 活性を NADH の産生量によって計測するものである。その結果、外来の ALDH2 を発現している細胞は、Control と比べて、1.3 倍程度の活性速度を示した(図2)。外来遺伝子が機能していることは明らかであるが、この Transient transfectant からタンパク質を抽出して赤血球に充填するには、まだ発現量が十分ではないと考えた。

そこで、動物細胞で安定に ALDH2 を高発現する stable transfectant の作製を試みた。具体的には、Zeocin 耐性遺伝子が組み込まれたウイルス発現ベクターを用い、ウイルス感染した細胞を Zeocin でスクリーニングすることで目的遺伝子を安定して発現する細胞の選択を試みた。Hep G2、NIH3T3、HEK293T の 3 種類の細胞で stable transfectant を得ることを試みた。この取り組みは研究期間内に終了していないが、stable transfectant の樹立を試みつつ、transfectant そのものを使って (*in vivo*で) アセトアルデヒドの代謝が可能かどうかについて、活性の測定を行っている。

これまでの記述のように、当初は赤芽球にウイルス感染によって ALDH2 を発現させるという計画であったため、レンチウイルスの動物細胞への感染という方法によって、ALDH2 の発現および精製を試みてきた。一方、コストや発現量という点では大腸菌での発現系も検討すべきであると考え、こちらの発現系についても検討中である。

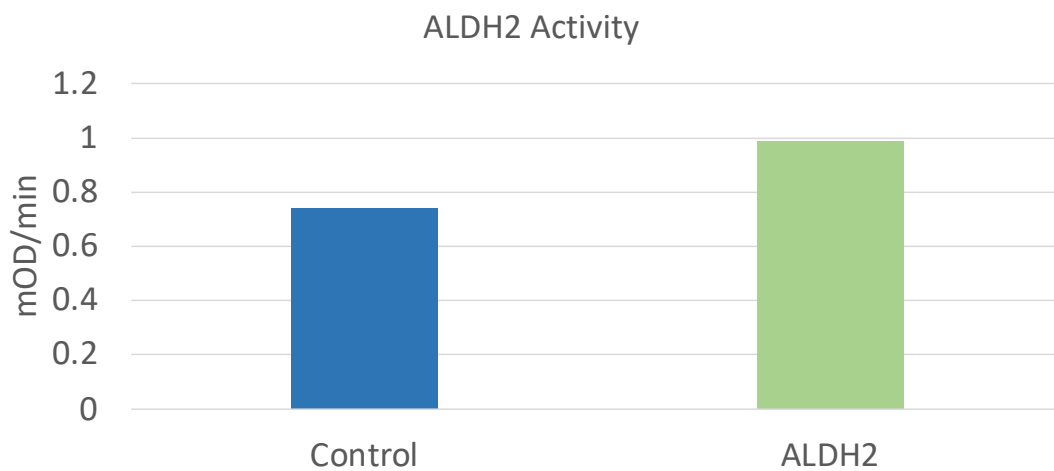


図2 Hep G2 に強制発現した ALDH2 活性

Hep G2 はもともと ALDH2 活性を持っているため、Control=外因性の ALDH2 を発現させていない条件（左）でもバックグラウンド活性が存在する。一方、強制発現した条件（右）では、Control 条件よりも高い活性がみられた。この実験では transient の条件であり、高コピー数をもつ stable の樹立を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小島伸彦	4. 巻 98
2. 論文標題 赤血球による身体機能の拡張	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 256
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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 小島伸彦	4. 巻 14
2. 論文標題 液体肝臓を用いた先天代謝異常症の治療法開発への期待	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 タンデムマス通信	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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島伸彦
2. 発表標題 Alternative Liver Design for Transplantation
3. 学会等名 第5回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島伸彦
2. 発表標題 液体肝臓による先天性代謝異常症の治療
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸青里香、花田三四郎、齋藤玲子、齋藤誠、小島伸彦
2. 発表標題 先天性代謝異常症の治療を目指した液体肝臓作製技術の確立
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
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

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