

機関番号：32653  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591264  
 研究課題名（和文） ピルビン酸キナーゼ異常症に対する新規遺伝子治療法の開発  
 研究課題名（英文） A novel gene therapy for pyruvate kinase deficiency.

研究代表者  
 槍澤 大樹（UTSUGISAWA TAIJU）  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：30337133

研究成果の概要（和文）：新しい戦略に基づいて作成したレンチウイルスを用いて、ピルビン酸キナーゼ（PK）異常症に対する、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法を開発した。構築したレンチウイルスベクターはドミナントネガティブ効果を有する変異タンパクの発現を抑制する short interfering RNA（siRNA）および siRNA 抵抗性の野生型 PK mRNA を同時に発現することが確認された。このベクターを用いて、細胞内の異常 PK タンパクを正常 PK タンパクにより置換することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：To establish effective hematopoietic stem cell targeted gene therapy for pyruvate kinase (PK) deficiency, we generated a lentiviral vector based on a novel strategy. The lentiviral vector is capable of dual expression of short interfering RNA (siRNA) against mutated mRNA and siRNA resistant wild type PK mRNA, resulted in substitution of abnormal PK for the normal enzyme in vivo.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子治療・PK 異常症・レンチウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化機構を持たない赤血球の生理機能の維持にとって、解糖系は極めて重要な代謝経路であり、解糖系酵素活性の低下は溶血性貧血の原因となる。ピルビン酸キナーゼ（PK）異常症は赤血球型（R）PK 遺伝子内の様々な分子異常により酵素タンパクの質的異常またはタンパク発現量の低下をきたし、赤血球内

ATP の低下により溶血をきたす。1995 年に研究分担者らは *Pk-I<sup>slc</sup>* マウスに RPK 活性中心の近傍の単一アミノ酸置換（Gly338Asp）が存在し溶血性貧血の病因となっていることを同定した。またフレンドウイルスに感染させた *Pk-I<sup>slc</sup>* マウスの脾臓細胞から、継代の過程で約 30%がアポトーシスを起こし、赤血球分化誘導によりアポトーシス細胞が著明に増加する赤芽球系細胞株 SLC 3 および SLC 4 を樹

立した。

PK 異常症の治療は、脾臓を摘出する以外には特異的なものは存在せず、重症例では頻回の輸血によるヘモジデロシスに陥る場合もあり、より有効な根治的治療法の開発が求められている。造血幹細胞 (HSC) 移植は PK 異常症の根治治療として有効であるが、移植後の移植片対宿主病 (GVHD) により生命に危険を及ぼす可能性もあり、その適応には慎重にならざるを得ない。

そこで我々は *Pk-I<sup>slc</sup>* マウスに対する遺伝子治療の基礎的研究として、正常 RPK 遺伝子によるトランスジェニックレスキューを試みたが、導入された正常 RPK 遺伝子の発現量が内因性の異常 RPK 1 対立遺伝子と同程度では十分な治療効果が得られないことが判明した。RPK タンパクは赤血球内で 4 量体を形成して酵素活性を発揮するため、残存する異常 RPK タンパクと正常 RPK タンパクがヘテロ 4 量体を形成し、その酵素活性を阻害する“ドミナントネガティブ効果”が原因として考えられた。

マウス白血病ウイルス (MLV) などのオンコレトロウイルスベクターを用いた HSC をターゲットとした遺伝子治療は、遺伝性血液疾患の根治的治療として有望と考えられているが、レトロウイルスが染色体に組み込まれる際の挿入変異による発癌の可能性が危惧されるため、より安全な遺伝子治療法を確立する必要があると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

レンチウイルスはオンコレトロウイルスに比べて挿入変異原性が低いことが報告されており、より安全性の高い遺伝子治療用ベクターとして注目されている。本研究では PK 異常タンパク質の“ドミナントネガティブ効果”を克服するために、内因性の異常 RPK mRNA を標的とした siRNA と siRNA 抵抗性でありながら正常 RPK タンパクをコードする cDNA を同時に発現させることが可能なレンチウイルスベクターを構築し、*Pk-I<sup>slc</sup>* マウスを用いて PK 異常症に対する、より有効な新規遺伝子治療を開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ①変異を有する異常 RPK 遺伝子の 5' 側と 3' 側に siRNA を設定した。(図 1)

②それぞれの siRNA 認識配列部分のコードをアミノ酸変異が起らないように最大限 (5' 側 ; 73.7%、3' 側;47.9%) 改変し、siRNA 抵抗性を有しながら正常 PK タンパクをコードする cDNA を作成した。(図 2) 改変に

用いたコドン、ヒトでの使用頻度がほぼ同じものを選択した。

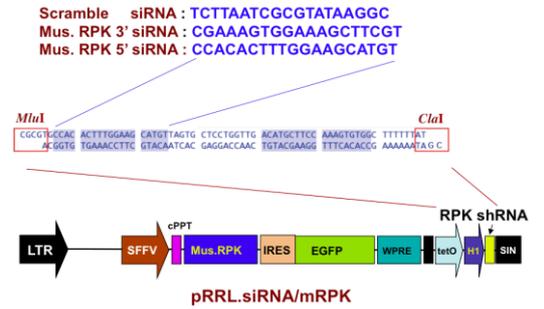


図 1. 変異 RPK mRNA を阻害する siRNA

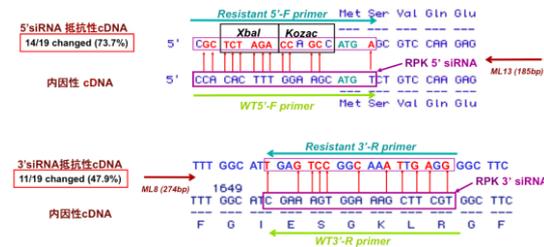


図 2. コドン改変による siRNA 抵抗性の正常 RPK cDNA の作成

③設定した siRNA と同様の配列を有する short hairpin (sh) RNA を H1 プロモーターにより発現させ、コドンを改変した正常型 RPK 遺伝子を SFV プロモーターにより、またマーカーとしての Green Fluorescent Protein (GFP) を Internal ribosome entry site (IRES) を介して発現させるようなレンチウイルスベクターを構築した。shRNA 発現ユニットは 3' long terminal repeat (LTR) 内に挿入し、ゲノムに取り込まれる際に gene transfer により 5' LTR にコピーされ効率よく shRNA を発現させることが出来る。(図 3)

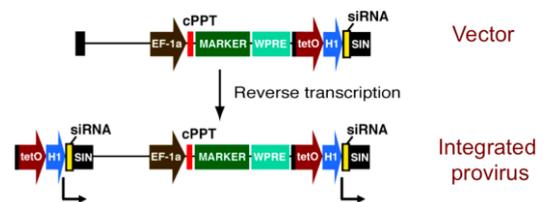


図 3. Gene transfer による shRNA 発現の効率化

最終的に siRNA 単独、siRNA と正常 PK を発現する cDNA および、siRNA と正常 PK の C 末端に myc-Tag を付加するようなベクターを同時に作成し、発現効率に違い生じるか検討した。(図 4)

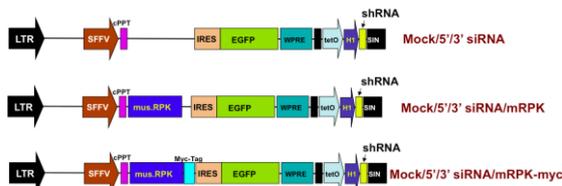


図4. 正常 PK および PK-myc を発現させるベクターの構築

(2) ①作成したそれぞれのレンチウイルスベクターをヘルパープラスミドとともに 293T 細胞にリポフェクション法にて遺伝子導入し、ウイルス液を作成した後、超遠心法にて濃縮した。

②SLC 3 細胞株にウイルスを感染させ、GFP 陽性細胞をソーティングし感染細胞集団を得た。

(3) ①内因性的の変異 RPK mRNA と siRNA 抵抗性の正常 RPK mRNA の発現を区別してリアルタイム PCR 法で定量するために、それぞれに特異的な PCR プライマーを作成した。

野生型配列、すなわち内因性的の変異型 PK 遺伝子を認識する WT-primer、siRNA 認識部位のコドンを変更し siRNA 抵抗性とした野生型 PK 遺伝子を認識する Resistant-primer を設定し、ML13 reverse primer (PCR 産物 185bp) および ML8 forward primer (PCR 産物 274bp) を組み合わせた。(図 2)

②それぞれの感染細胞から RNA を抽出し、作成したプライマーを用いて変異 RPK と正常 RPK の mRNA の発現量を定量した。

③それぞれの感染細胞からタンパクを抽出し抗 PK 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、PK タンパクの発現量の変化を観察した。

④それぞれの感染細胞からタンパクを抽出し PK 活性を測定し、本ベクターによる実際の酵素活性の改善効果を確認した。

(4) 正常マウスから得た骨髄細胞から、造血前駆細胞を含むと考えられている、分化マーカー (CD4, CD8, CD5, Gr1, Mac1, B220, および TER119) 陰性細胞をマグネットビーズを用いて分離し、作成したウイルスを感染させて、GFP 陽性細胞をフローサイトメーターで測定し、その感染効率を調べた。

#### 4. 研究成果

内因性的の変異 PK mRNA のみを認識する WT-primer を用いた定量では、RPK cDNA の付加の有無にかかわらず、5', 3' siRNA とともに変異 RPK mRNA に対する発現抑制効果が認められた。この効果は非特異的な siRNA (Mock) では観察されなかった。一方、ベクター由来の正常 RPK のみを認識する Resistant-primer を用いた定量では siRNA 抵抗性 RPK cDNA を付加したベクターでのみ RPK の発現を認め、

myc-Tag を付加した RPK cDNA の発現が内因性的の RPK より近い発現量であった。これらの結果は 5' 側に設定したプライマーを用いた場合 (図 5) も 3' 側のプライマーの場合 (図 6) もほぼ同様であった。

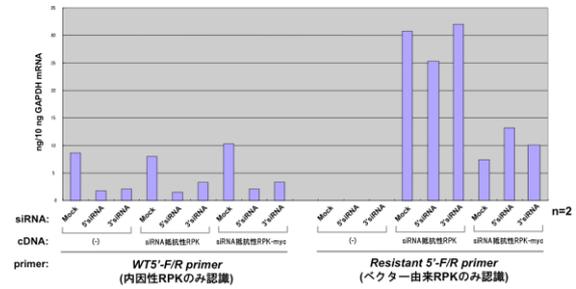


図5. 5' プライマーを用いた内因性的変異 PK およびベクター由来正常 PK mRNA の発現定量

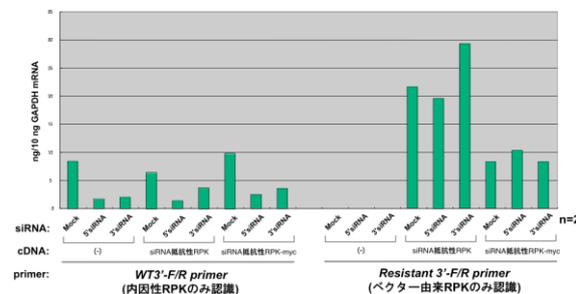


図6. 3' プライマーを用いた内因性的変異 PK およびベクター由来正常 PK mRNA の発現定量

mRNA 発現の定量結果がタンパクの発現に反映されているかどうかを調べるために、ウイルスを感染させた細胞からタンパク質を抽出し、抗 PK 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。RPK cDNA を含まないベクターでは 5' および 3' 両方の siRNA により内因性的の変異 PK タンパクの発現抑制が認められた。この効果は非特異的な siRNA (Mock) では観察されなかった。siRNA 抵抗性の RPK cDNA を含むベクターではいずれの siRNA の影響も受けずに、正常の RPK タンパクの発現が回復していることが分かった。(図 7) (PK タンパクは N 末端がプロセッシングを受け活性を発揮するようになるが、この抗体では両方のバンドが認められる。)

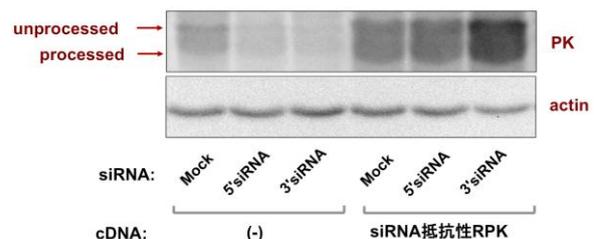


図7. siRNA による内因性的変異 RPK タンパク

## 抑制作用と siRNA 抵抗性正常 RPK タンパクの発現回復

本ベクターによって細胞内での RPK の酵素活性を実際に回復させることができるかどうかを調べるために、ウイルスを感染させた細胞からタンパク質を抽出し、PK 酵素活性を測定した。SLC3 細胞株では正常マウスから樹立した赤芽球系細胞株 CBA2 にくらべ著明な PK 酵素活性の低下が認められた。SLC3 に正常 RPK を発現させると、非特異的な siRNA (Mock) を同時発現させた場合よりも、RPK 特異的な siRNA にて内因性変異 RPK を抑制した場合の方が、より効果的に RPK 酵素活性を回復させること判明した。(図 8) このことより、細胞内に残存する内因性の変異 RPK は正常 RPK の活性を阻害するドミナントネガティブ効果を有することが確かめられ、siRNA を同時発現させることでより効果的に RPK の機能が回復することがわかった。

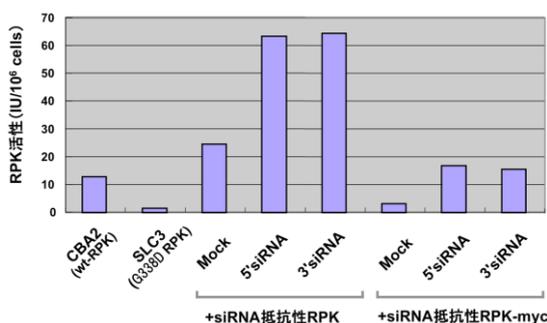


図 8. siRNA と cDNA の同時発現による RPK の酵素活性回復効果の増強

PK 異常症  $Pk-I^{slc}$  マウスの造血幹細胞の遺伝子治療を行う前段階として、正常マウス的大腿骨より採取した骨髓細胞から血球分化マーカー (CD4, CD8, CD5, Gr1, Mac1, B220, および TER119) 陰性細胞 ( $Lin^-$ ) をマグネットビーズを用いて分離し、本ウイルスベクターを感染させ、その感染効率を調べた。(図 9) 感染直後 (左) に比べて 24 時間後 (中)、48 時間後 (右) と GFP 陽性細胞が増加し、70% 以上の感染効率を示すことが示された。

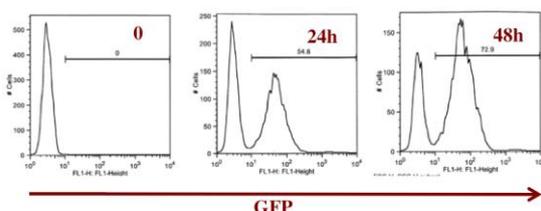


図 9. マウス造血前駆細胞  $Lin^-$  におけるウイルスベクターの感染効率

今後は PK 異常症の自然発症モデルである  $Pk-I^{slc}$  マウスを用いて、造血前駆細胞を採取し同様に遺伝子導入・骨髓移植を行い、PK 異常症の症状である溶血性貧血と著明な脾腫を改善させることができるかどうかを明らかにし、本ベクターを用いた遺伝子治療の有効性について、さらに検証して行きたい。

## 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)

①Miyake K, Utsugisawa T (他 5 名, 2 番目), Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia, Stem Cells, 26(2) 323-329, 2008, 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

槍澤 大樹 (UTSUGISAWA TAIJU)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30337133

### (2) 研究分担者

菅野 仁 (KANO HITOSHI)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70221207

### (3) 連携研究者

藤井 寿一 (FUJII HISAICHI)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70107762