

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591265

研究課題名(和文)

ダイヤモンド-ブラックファン貧血のモデル動物作製と新規治療法(遺伝子治療)の開発

研究課題名(英文)

Development of mouse model and novel gene therapy for Diamond-Blackfan anemia

研究代表者

三宅 弘一 (MIYAKE KOICHI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90267221

研究成果の概要(和文)：ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)の病因に関してはいまだ完全には解明されていないが、DBA患者の約25%においてリボソーム蛋白S19(以下RPS19)の遺伝子異常が報告されている。近年新たに他のリボソーム蛋白(RPS17, RPS24など)の異常が報告されており、これらの蛋白を抑制する誘導性レンチウイルスベクターの作製を行った。また、モデル動物作製の為に、RPS17またはRPS24に対するsiRNA及びGFPが発現するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターにKRAB(Kruppel-associated box)遺伝子を組み込んだシングルレンチウイルスベクターを作製し、マウスの骨髄細胞、マウスES細胞に遺伝子導入を行ったが、効率、細胞毒性が問題であり、さらなるウイルスベクターの改良が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a congenital red cell aplasia in which 25% of the patients have a mutation in the ribosomal protein S19 (RPS19) gene. Recently, it was reported that other ribosomal proteins (RPS17 or RPS24 etc.) were also mutated in DBA patients. We constructed lentiviral vector expressing siRNA against RPS17 or RPS24 to analyze the molecular mechanism of DBA. We also constructed an inducible single lentiviral vector, in which both siRNA and KRAB (Kruppel-associated box) gene were contained, and transduced with mouse bone marrow cells or ES cells for development of mouse model of DBA by tetracycline-induced siRNA against RPS17 or RPS24. However, transduction efficiency and cell toxicity of lentiviral vector was one limitation for making mouse model of DBA. Therefore, more development and/or modification of the lentiviral vector may be needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・小児科学

キーワード：貧血・モデル動物・RPS19・遺伝子治療・siRNA

1. 研究開始当初の背景

Diamond-Blackfan Anemia (DBA)は貧血を主症状とし、時に形態異常を伴う疾患であり、その病因に関してはいまだ完全には解明さ

れていないが、DBA患者の約25%においてリボソーム蛋白S19(以下RPS19)の遺伝子異常が報告されている。しかしながら現在までに有効な治療法は開発されていない。今までの

DBA 研究の問題点として(1)患者数が少なく研究に必要なサンプルが手に入りにくい。(2) DBA の細胞自体が *in vitro* でも増殖が困難である。(3) DBA の病体解析、治療効果検討を行えるモデルが存在しない。などがあげられ、これらの理由から DBA の病体解析およびその治療法の研究をするのは困難であった。我々が開発した DBA モデル (Blood. 105: 4627-4634, 2005, Mol. Ther. 11: 627-637, 2005) は DBA 患者のサンプルと同じ表現系(細胞増殖能低下、コロニー形成能の低下、赤血球系分化障害、など)をもち、これらのモデル細胞の使用により今までは不可能であった様々な解析が可能となり DBA 分子メカニズムの解析を行ってきた(Stem Cells. 26: 232-239, 2008, Blood. 109: 980-986, 2007)。これらの結果を基に、本研究では臨床応用を念頭に置いた新規治療法(遺伝子治療)の開発を行い、その有効性と安全性を検討する。また、そのために必要な DBA のモデルマウスの作製と本邦における DBA 患者の遺伝子解析も行っていく。

2. 研究の目的

本研究では DBA のさらなる病態解析、分子メカニズムの検討、また、治療法の開発を目指し、今までの研究結果を基に DBA の動物モデル(モデルマウス)の作製と、その臨床応用を念頭に置いた新規治療法(遺伝子治療)の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) DBA モデルマウスの作製

1) 薬剤(テトラサイクリン)誘導性レンチウイルスベクターの作製

RPS19 の siRNA 及び GFP が発現するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターに KRAB (Kruppel-associated box) 遺伝子 (Mol. Ther. 11: 627-637, 2005) を組み込んだシングルベクターを作製する(図 1)。

2) 骨髄移植による DBA モデルマウスの作製

マウス骨髄細胞に作製した誘導型シングルレンチウイルスベクターにて遺伝子導入後、骨髄移植を行い、生着を確認後、テトラサイクリンにて siRNA を発現し、RPS19 の発現を抑制する事により DBA モデルマウスを作製する。

3) トランスジェニックマウスの作製

マウス ES 細胞にテトラサイクリン誘導性に RPS19 の siRNA が発現するレンチウイルスベクターで遺伝子導入し、トランスジェニックマウスを作製する。マウスを作成後テトラサイクリンにて siRNA を発現させる。

(2) 新規治療法(遺伝子治療)の開発

造血幹細胞の自己複製を促進させ増幅させる因子である Homeobox transcriptional factor B4 (HoxB4) 発現ベクターに RPS19 を組み込み造血幹細胞に遺伝子導入後 *in vitro*, *in vivo* で増幅を行い治療効果の増強を試みる。まずは HoxB4 発現骨髄細胞にて疾患の治療が可能か、副作用は無いかを検討すると共に、患者サンプルにて *in vitro* での DBA 形質の改善、および改善された幹細胞の増幅を検討する。

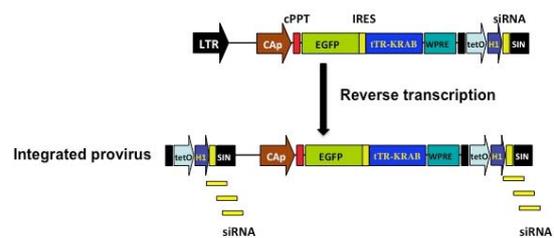
4. 研究成果

(1) DBA モデルマウスの作製

1) 薬剤誘導性レンチウイルスベクターの作製

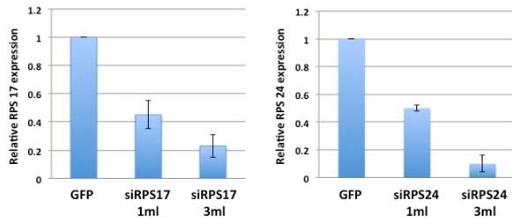
DBA のモデルマウスの作製の為の薬剤(テトラサイクリン)誘導性レンチウイルスベクターの作製を行った。RPS19 siRNA 及び GFP が発現するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターに KRAB 遺伝子を組み込んだシングルベクターを作製した。siRNA は 3' LTR に H1 プロモーターから発現するように組み込み、目的の細胞内では siRNA がダブルに発現するようにした(図 1)。このシングルベクタープラスミドにてレンチウイルスベクターを作製し、細胞株に遺伝子導入し、テトラサイクリンによる誘導性、siRNA の効果を検討したところ、テトラサイクリンの濃度に依存して RPS19 の発現抑制効果を認めた。

図 1. siRNA 発現レンチウイルスベクター



また、近年新たに RPS19 以外のリボソーム蛋白(RPS17, RPS24, RPL5, RPL11 など)の異常も報告されており、これらのリボソーム蛋白を抑制することによる影響をけんとうするために、RPS17 及び RPS24 の蛋白を抑制する誘導性レンチウイルスベクターの作製を行った。同様に HeLa 細胞に遺伝子導入を行い、RPS17 及び RPS24 の RNA 抑制効果をリアルタイム PCR にて検討したところ、レンチウイルスベクターの量依存性に抑制効果を認めた(図 2)。また、RPS17 及び RPS24 の発現抑制と共に細胞増殖能の低下を認めた。

図 2. siRNA 抑制効果の検討



さらに、モデル動物作製の為に、RPS17 または RPS24 に対する siRNA 及び GFP が発現するテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターに KRAB 遺伝子を組み込んだシングルレンチウイルスベクターを作製した。

2) 骨髄移植による DBA モデルマウスの作製

siRNA 持続発現レンチウイルスベクターでのマウス骨髄細胞遺伝子導入は、導入された細胞が増殖抑制を起こすために、薬剤誘導型のシングルレンチウイルスベクターを作製し、5FU 処置したマウス骨髄細胞に遺伝子導入を試みたが、十分な遺伝子導入効率を得ることが困難であった。レンチウイルスベクターのサイズが大きくなった為に高力化なレンチウイルスベクターを得ることが困難である為と考えられた。

3) トランスジェニックマウスの作製

マウス骨髄細胞と同様に RPS17 及び RPS24 の siRNA を発現する薬剤誘導型のシングルレンチウイルスベクターにてマウス ES 細胞に遺伝子導入を試みるも、細胞毒性、遺伝子導入効率に問題がありトランスジェニックマウスの作製に必要な遺伝子導入された十分な ES 細胞を得ることが困難であった。

(2) 新規治療法(遺伝子治療)の開発

現在の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の問題点として、遺伝子導入細胞の生着率が低く growth advantage を持たない細胞では治療効果が得にくいことがあげられる。本研究ではこの問題点を解決すべく、造血幹細胞の自己複製を促進させ増幅させる因子である HoxB4 を発現させ、遺伝子導入された造血幹細胞が増幅するような独創的なシステムの開発を試みており、HoxB4 発現アデノウイルスベクターの作製を行った。また、HoxB4 発現レトロウイルスベクターにてマウス骨髄細胞に遺伝子導入し、移植することにより異染性ロイコジストロフィーのモデルマウスの神経症状の改善を認めた (Mol. Ther. 18: 1373-1378, 2010)。

考察

今回 RPS17 及び RPS24 に対する siRNA 発現レンチウイルスベクターを作製した。細胞内においてこれらのリボソーム蛋白を抑制することにより、RPS19 を抑制した場合と同様に細胞増殖抑制を認め DBA の病態に関与しているものと考えられた。

リボソーム蛋白を抑制することにより、細胞増殖抑制が起こるため、骨髄移植及びトランスジェニックによる DBA モデル動物作製において、1 つのシングルベクターにて siRNA を薬剤誘導発現可能なレンチウイルスベクターを作製した。しかしながら、マウス骨髄細胞、ES 細胞共に十分な遺伝子導入効率を得られず、また、ウイルスベクターによる細胞毒性等も認められた。高力化なレンチウイルスベクターを得られないのはレンチウイルスベクターのサイズが大きいためと考えられた。さらなるウイルスベクターの改良を行っていくと共に、細胞毒性を軽減するためにウイルスベクターの精製法の検討も必要と考えられた。

自己複製促進増幅因子である HoxB4 を発現させ遺伝子導入された造血幹細胞に growth advantage を持たせ、増幅するシステムにより、異染性ロイコジストロフィーのモデルマウスの神経症状を改善することが可能であった。白血病を含め癌化などの副作用は観察した範囲では認めなかった。今後 DBA の遺伝子治療法をはじめとし、造血幹細胞を標的とした様々な遺伝子治療の応用に期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, Hirai Y, Shimada T: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. Brain Res. 2011; 10:19-26. (査読・有)
2. Miyake N, Miyake K, Karlsson S and Shimada T: Successful treatment of metachromatic leukodystrophy using bone marrow transplantation of HoxB4 overexpressing cells. Mol. Ther. 2010; 18:1373-1378. (査読・有)
3. Igarashi T, Miyake K, Masuda I, Takahashi H, Shimada T: Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. Hum Gene Ther. 2010; 21: 631-637. (査読・有)

4. Takizawa T, Gemma A, Ui-Tei K, Aizawa Y, Sadosky Y, Robinson JM, Seike M, Miyake K: Basic and clinical studies on functional RNA molecules for advanced medical technologies. J Nippon Med Sch. 2010; 77:71-79. (査読・有)

[学会発表] (計 40 件)

1. Tamai H, Miyake K *et al.* The Activated K-RAS protein accelerates human derived-MLL/AF4 induced leukemolymphomogenicity in transgenic mice model. 2010.12.6. Orlando, USA. The 52th American Society of Hematology Annual Meeting.
2. Miyake K *et al.* Development of adeno-associated viral (AAV) vector mediated muscle directed systemic cancer gene therapy. 2010.9.23. Osaka. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.
3. Miyake K. Application of AAV vectors for translational research. 2010.7.3. Tochigi. The 16th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy.
4. Matsumoto T, Miyake K *et al.* Adeno-associated virus (AAV) type8 mediated systemic neonatal gene therapy for hypophosphatasia. 2009.10.23. Hawaii 59th Annual Meeting of the American Society of Human genetics.
5. Miyake K *et al.* Efficient correction of cardiac abnormalities in Fabry mice by AAV type8 mediated systemic gene transfer. 2009.7.9. Osaka. The 15th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy.
6. Miyake K *et al.* Direct comparison of adeno-associated virus serotypes for systemic delivery by long term monitoring of *in vivo* quantitative noninvasive imaging. 2008.5.29. Boston, USA. The 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy.
7. Miyake K. Adeno-associated virus (AAV) serotypes: In vivo expression and tropism in mice. 2008.7.13. Sapporo. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy.
8. Miyake K. *et al.* Development of adeno-associated viral (AAV) vector mediated anti-angiogenic systemic cancer gene therapy. 2008.7.13. Sapporo. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 弘一 (MIYAKE KOICHI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90267221