

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790996

研究課題名（和文）

アデノ AAV ハイブリッドベクターを用いた造血幹細胞の BTK 遺伝子修復研究

研究課題名（英文）

BTK gene targeting in a hematopoietic stem cell using an adenovirus adeno-associate virus hybrid vector

研究代表者

落合 正行（OCHIAI MASAYUKI）

九州大学・医学研究院・生殖発達医学

研究者番号：90507782

研究成果の概要（和文）：

Bruton型無ガンマグロブリン血症の遺伝子治療を目的に、相同組み換えによる遺伝子修復が可能なヘルパー依存型アデノAAVベクターを作成した。造血幹細胞系でのBTK遺伝子の相同組み換えを解析した。Nalm-6細胞株では0.073%で相同組み換えを認めた。臍帯血由来造血幹細胞では、 $3.6 \times 10e-6$ でベクター遺伝子が組み込まれ、うち0.7%で相同組み換えを認めた。更にIgM陽性未熟B細胞への分化誘導後も組み換えをPCRで確認した。LAM-PCRでは複数のコロニーで同一遺伝子座への組み込みが認められた。

研究成果の概要（英文）：

For gene therapy of X-linked agammaglobulinemia, a helper-dependent adenovirus adeno-associated virus hybrid vector was constructed that contains Bruton's tyrosin kinase gene. We analyzed an efficiency of targeted integration or gene repair through homologous recombination (HR) into hematopoietic stem cells (HSCs). The efficiency of HR reached 0.073% per infected Nalm-6 cells. In HSCs derived human cord blood, integration was detected at $3.6 \times 10e-6$ per spreading cells, and HR was revealed 0.7% of those integrations. Furthermore, detection of integration or HR at DNA level by PCR revealed IgM positive-immature B cells that induced from HSCs. We also characterized chromosomal sites where the vector tends to integrate in a non-random manner by LAM-PCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1400000	420000	1820000
2010年度	1200000	360000	1560000
2011年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

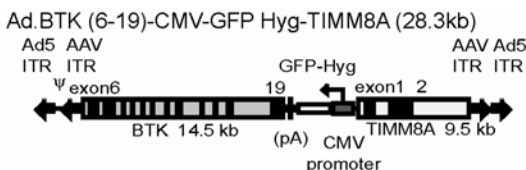
キーワード：移植・再生医療、遺伝子、ウイルス

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症候群の代表的疾患である Bruton 型無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、Bruton Tyrosin Kinase (BTK) 遺伝子の変異が原因である。ヘルパー依存型アデノ・アデノ関連ウイルス (AAV) ハイブリッドベクター (HD-Ad.AAV.ベクター) は、造血幹細胞 (HSC) で高い感染効率を示し、大きな遺伝子の搭載が可能なヘルパー依存型アデノウイルスベクターと、相同組換えにより目的遺伝子座領域での組込み (ターゲティング) による修復をおこし、長期間安定した遺伝子発現が可能な AAV ベクターの両者の長所を兼ね備えている。さらに XLA では、マウスモデルにより HSC の一部で変異遺伝子が修復され、かつ増殖優位性が獲得されれば治療に結びつく可能性がある。

XLA の遺伝子治療を目的に、BTK 遺伝子のエクソン 6 から 19 とその隣接遺伝子 TIMM8A を含むゲノム領域、および GFP と Hygromycin (Hyg) 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV.ベクターを作製した【図 1】。



【図 1】 HD-Ad.AAV.ベクター

HSC の BTK 遺伝子修復の予備実験として、血球系浮遊細胞株 K562 を用いた感染効率の検討では、感染多重度 (MOI) 500 で $25.8 \pm 2.1\%$ 、1000 で $40.7 \pm 3.0\%$ 、4000 で $90.9 \pm 1.1\%$ の GFP 陽性細胞を認め、いずれの細胞生存率も 95%以上であった。次に Hygromycin で薬剤選択を行い、MOI500 で $0.45 \pm 0.32\%$ 、1000 で $1.25 \pm 0.63\%$ 、4000 で $1.22 \pm 0.37\%$ で耐性株が得られた。サザンプロット法による解析では、MOI500 と 1000 で得られた Hyg 耐性株の一部で BTK 遺伝子領域へのターゲティングが認められた。

2. 研究の目的

これまでの得られた研究成果を、臨床応用を目標とした遺伝子修復研究につなげるために、(1)ヒト B 細胞由来細胞株でのターゲティング効率の算出と BTK 遺伝子機能解析、(2)正常ヒト由来の HSC での感染効率の検討および B 細胞系への分化誘導を行う。

3. 研究の方法

(1)細胞株の樹立

ヒト男性 preB-ALL 細胞株である NaIm-6 の培養系を定法に従い樹立した。

正常ヒト男性臍帯血より磁気ビーズ法により CD34 陽性細胞を分離する。メチルセルロース培地へ各種増殖因子 (GM-CSF、G-CSF、SCF、IL-3、EPO) を添加した。Hygromycin 薬剤選択によりコロニーアッセイを行った。

In vitro での B 細胞分化能を評価するため、前述の CD34 陽性細胞に各種増殖因子 (SCF、FLT3L、IL-7) に、ヒト間葉系幹細胞培養上清を添加して、IgM 陽性未熟 B 細胞まで分化させる培養系を確立した。

(2)ターゲティング解析

サザンプロット法

LA-PCR 法

ウェスタンプロット法

これまでの研究成果と同様の方法を行った。

た。

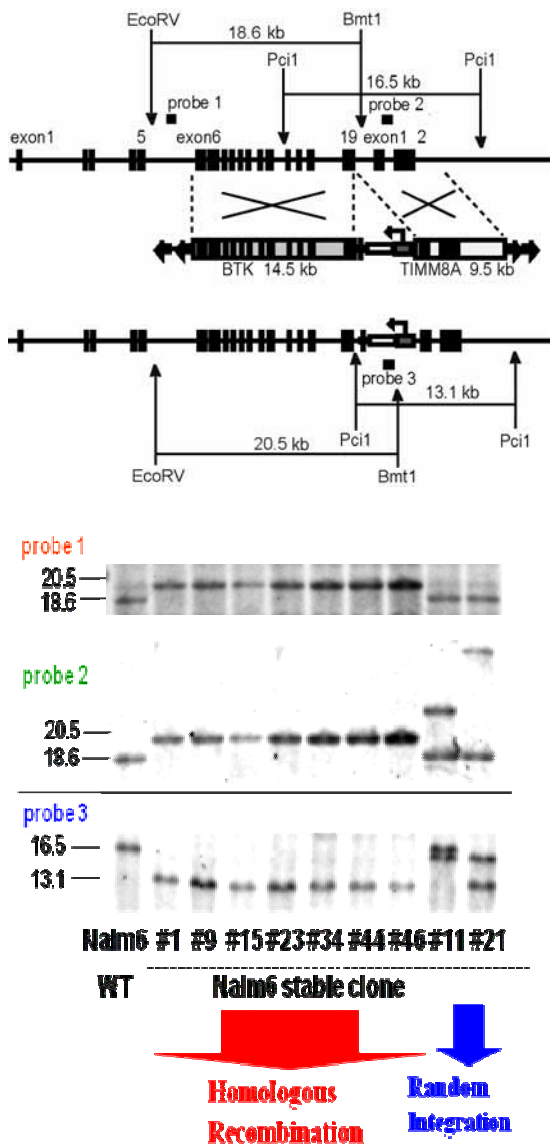
LAM-PCR 法

ベクターの宿主遺伝子導入部位の同定のために、Schmidt ら (*Nature Methods* 2007 ;4(12):1051-7) の LAM-PCR 法に従を行った。ベクター特異的配列 ITR にプライマーを設計し、ゲノム DNA 配列側に PCR を行う。制限酵素で切断し Nested-PCR により宿主遺伝子導入部位のクローニングを行った。

4. 研究成果

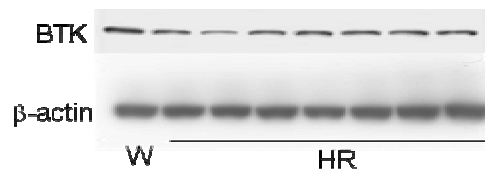
(1)NaIm-6 でのターゲティング解析

MOI 4000 で感染させた NaIm-6 から Hygromycin 耐性株 61 株 (0.63%) を得た。PCR 法によりスクリーニングを行い、サザンプロット法により、7 株 (0.073%) で相同組換えを証明した【図 2】。



【図2】Nalm-6株でのサザンブロッティング法によるターゲティング解析結果

全ての相同組換え株では、BTK 翻訳領域の mRNA 発現量は野生株と同様であり、シーケンスでベクター由来の配列が挿入されていないこと、また RT-PCR 法で翻訳領域の配列が正常であることを確認した。ウェスタンブロッティング法で野生株と同等の BTK 蛋白発現を認めた【図3】。



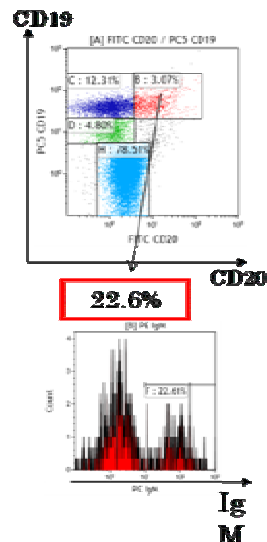
【図3】Nalm-6のHR株でのBTK蛋白発現

(2) ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞でのターゲティング解析

Nalm-6 と同様の感染方法を行い、MOI 4000 で 10% 程度の一過性 GFP 陽性細胞を認めた。Hygromycin で薬剤選択を行い、メチルセルロース培地にて 3 週間の培養によりハイグロマイシン耐性コロニーを得た。播種細胞数に対し 3.6×10^{-5} の頻度でベクター搭載遺伝子の組み込みを PCR により確認し、このうち 0.7% で BTK 遺伝子のターゲティングを認めた。

(3) ヒト臍帯血由来 CD34 陽性ターゲティング細胞の B 細胞への分化能解析

ヒト間葉系幹細胞培養上清を用いた培養系では、4 週間の培養により 22.6% の IgM 陽性未熟 B 細胞が得られた【図4】。



【図4】間葉系幹細胞培養上清を用いたヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の CD19+CD20+IgM+B 細胞への分化能

さらにベクターを感染させた幹細胞を上記方法にてB細胞系へと分化させた後、磁気ビーズ法にてCD19陽性細胞を分離した。DNAを抽出し、LA-PCRにてターゲティングを検出した。6回の検定のうち1回でターゲティング陽性細胞が検出された【図5】。



【図5】 相同組み換え検出 LA-PCR
#2で相同組み換え株HRと同様のPCRバンドが検出された。

(4) LAM-PCRによる遺伝子挿入部位の検討
コロニーアッセイ法で得られた遺伝子導入造血前駆細胞コロニーでは、遺伝子内外ともに挿入が認められたが、exon内への遺伝子挿入は認めなかった。複数のコロニーで同一部位への挿入が認められ、遺伝子導入は非ランダムであると考えられた【表1】。

No	Chromosome	Gene Symbol
1	12q14.1	LRIG3-157kb-IS-628kb-SLC16A7
2	4p16.3	TNIP2-14kb-IS-50kb-SH3BP2
4	3q22.3	STAG1
6	2q21.3	ZRANB3-59kb-IS-41kb-R3HDM1
7	8p22	SGGZ
8	4p16.3	TNIP2-14kb-IS-50kb-SH3BP2
13	6q25.1	ESR1
14	3p14.2	FHIT
21	4p16.3	TNIP2-14kb-IS-50kb-SH3BP2
22	13q32.2	FARP1
23	2q35	GPS1
25	7q22.1	CUX1
28	4p16.3	TNIP2-14kb-IS-50kb-SH3BP2
33	?	?
35	4p16.3	TNIP2-14kb-IS-50kb-SH3BP2
36	14q23.2	SYT16
37	2q22.3	ZEB2

【表1】 LAM-PCR法による遺伝子導入部位の特定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

相同組み換えによる遺伝子修復型の遺伝子治療法の開発

石村匡崇、山元裕之、落合正行ら
炎症と免疫 19巻 2011年 28-33頁

〔学会発表〕(計1件)

アデノ AAV ハイブリッドベクターを用いた BTK 遺伝子修復の試み

落合正行、石村匡崇、高田英俊ら
第112回日本小児科学会学術集会

平成20年4月19日奈良市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/pediatric/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 正行 (OCHIAI MASAYUKI)

九州大学・医学研究院生殖発達医学・助教
研究者番号：90507782

(2) 研究協力者

石村 匡崇 (ISHIMURA MASATAKA)

九州大学・医学研究院・大学院生

山元 裕之 (YAMAMOTO HIROYUKI)

九州大学・医学研究院・大学院生