

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22249043

研究課題名(和文) 原発性免疫不全症における遺伝子変異の修復による自己細胞再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene repair therapy using autologous cells for primary immunodeficiencies

研究代表者

原 寿郎 (HARA, Toshiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40150445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBTK遺伝子のexon6-19とその隣接遺伝子TIMM8Aを含むゲノム領域、およびGFP、ハイグロマイシン耐性遺伝子を搭載したHD-Ad.AAV.BTKベクターを作製した。このベクターを感染させた臍帯血由来CD34陽性細胞から755個のハイグロマイシン耐性赤芽球コロニーを得て、そのうち4個のコロニーでBTK遺伝子座における相同組み換えを認めた。同様に感染させたCD34陽性細胞から分化誘導したCD19陽性細胞においても相同組み換えを検出した。本ベクターにより造血幹細胞における相同組み換えによるBTK遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We constructed a HD-Ad.AAV BTK targeting vector that is composed of the genomic sequence containing BTK exons 6-19, TIMM8A and GFP/hygromycin resistant gene. By using HD-Ad.AAV. BTK vector, we found that the targeting in the BTK gene occurred in 4 among 755 hygromycin-resistant BFU-E colonies differentiated from the cord blood CD34+ cells. Importantly, the gene targeting was also observed in CD19+ lymphoid progenitor cells that could be differentiated from the homologous recombinants of CD34+ cells. Our study shows the potential of HD-Ad.AAV. BTK vector for the BTK gene therapy by homologous recombination in hematopoietic stem cells.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝子修復治療

1. 研究開始当初の背景

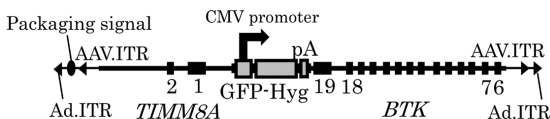
- (1) 世界中で遺伝子治療の臨床研究が行われているが、成功例はごくわずかで原発性免疫不全症(X連鎖重症複合免疫不全症:X-SCID、ADA欠損症)はその代表である。しかし、ベクター由来遺伝子のランダムな組込みによる発がんが大きな問題となった。このように現在の“遺伝子治療”は、正規の遺伝子の場所に関係なく付加的に遺伝子を導入する方法であり、変異遺伝子自体を修復する遺伝子修復治療は世界的にも開発途上であり、臨床応用されていない。
- (2) X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)は、X染色体長腕に位置するBruton's tyrosine kinase (BTK)遺伝子変異によって生じるB細胞の分化障害が原因である。この疾患では、細菌性肺炎などの重症感染症を繰り返し、生涯にわたってガンマグロブリンを補充する必要がある。また合併症として消化器がんなどの悪性腫瘍や、進行性のウイルス性脳炎を起こすこともあることも重要な問題である。Btk変異を有する骨髓細胞を致死放射線照射マウスに移植する際、正常骨髓細胞を0.5%混入させるだけで60%のマウスが免疫グロブリン産生能を回復することから、遺伝子修復された細胞がわずかであっても、B細胞の増殖優位性により治療の可能性が示されている。

2. 研究の目的

造血幹細胞に感染性を示すAd5/35キメラベクターと、相同組換えによる目的遺伝子の修復を起こすアデノ随伴ウイルスベクターとの両者の長所を備えているヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルス(HD-Ad.AAV)ハイブリッドベクターを用いて、原発性免疫不全症における遺伝子変異の修復による自己細胞再生療法の開発を行う。

3. 研究の方法

- (1) BTK遺伝子のexon6~exon19領域、隣接遺伝子であるTIMM8Aの全遺伝子およびGFP-ハイグロマイシン耐性遺伝子を搭載したHD-Ad.AAV.BTKベクターを作製した(図1)。



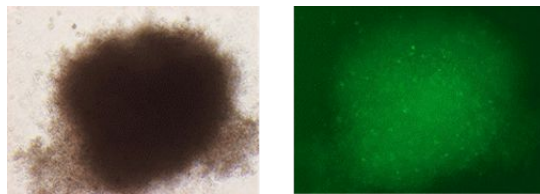
(図1) HD-Ad.AAV.BTKベクターの構造

- (2) 同ベクターを用いて臍帯血由来のCD34陽性細胞でのBTK遺伝子の修復について検討を行った。

- (3) ヒトXLAモデルマウス、BTK-cDNA搭載レンチウイルスベクターを用いて、*in vivo*でのB細胞の再構築を検討した。
- (4) XLA患者の骨髓線維芽細胞よりiPS細胞を樹立し、*in vitro*でB細胞へ分化誘導する培養系の検討を行った。

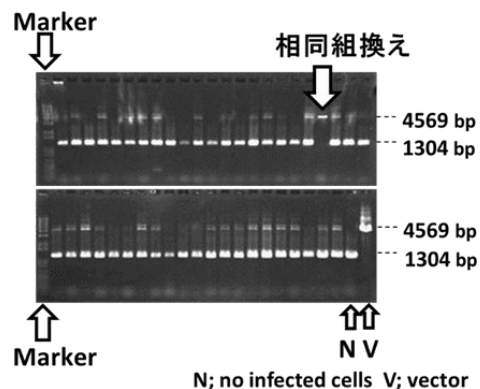
4. 研究成果

- (1) 正常ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞にベクターを感染させコロニー解析を行ったところ、出現するコロニーはBFU-Eがほとんどであった。相同組換えがおこったコロニーは、導入されたGFP遺伝子が発現していることが蛍光顕微鏡で確認された(図2)。



(図2) 相同組換えが確認されたBFU-E

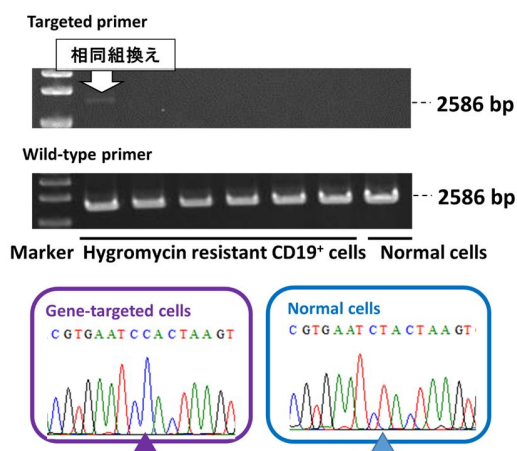
ハイグロマイシン耐性を示すBFU-Eコロニーを対象として相同組換え効率を検討した。15回のアッセイで、CD34陽性細胞総数 1.5×10^7 個の細胞へ感染させた結果、4個のBFU-Eで相同組換えを確認した(図3)。



(図3) BFU-Eにおける相同組換えの確認

また、ハイグロマイシン耐性のBFU-Eコロニーを対象として、ベクター由来遺伝子のランダムな挿入部位をLAM-PCRで検索した。結果、挿入部位に偏りが無いことを証明した。

- (2) 正常ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞にベクターを感染させた後、B細胞系細胞へ分化させた。15回のアッセイで、CD34陽性細胞総数 1.8×10^7 個の細胞へ感染させた結果、5回のアッセイで相同組換えを確認した(図4)。



(図4) CD19 陽性細胞における相同組換え

- (3) BTK-cDNA 搭載レンチウイルスベクターを用いてヒト化 XLA モデルマウスに遺伝子導入を行った結果、B 細胞の増加を認めた。
- (4) XLA 患者の骨髓線維芽細胞より iPS 細胞を樹立した。この患者由来細胞と正常ヒト iPS 細胞株より *in vitro* で CD34 陽性の血液細胞を誘導した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T: "Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant." *Pediatr Transplant* 18:208-11 (2014), 査読有
DOI: 10.1111/petr.12297

石村匡崇、高田英俊、原寿郎：限られたウイルスに易感染性を示す免疫不全症（単純ヘルペス脳炎、EBV、パピローマウイルス、細胞融解型感染形式をとるウイルス）小児内科 46(10):1470-4 (2014), 査読なし

Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T: "B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID." *Int J Hematol* 98. 355-60 (2013), 査読有
DOI: 10.1007/s12185-013-1408-7

Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T: "A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene

expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells" *J Clin Immunol* 33(5). 1018-26 (2013), 査読有
DOI: 10.1007/s10875-013-9897-y

原寿郎："2. 幹細胞異常と内科系疾患、現状と展望 1) 造血幹細胞の異常：先天性免疫不全症" *日本内科学雑誌* 102(9). 2255-61 (2013), 査読無

Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: "NKR1A+ and T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection." *Hum Immunol* 73. 623-628 (2012), 査読有
DOI: 10.1016/j.humimm.2012.04.006

Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: "Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan." *Clin Endocrinol. (Oxf)* 77. 628-634 (2012), 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2265.2012.04390.x

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: "Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan" *J Clin Immunol* 31. 309-314 (2011), 査読有
DOI: 10.1007/s10875-010-9498-y

Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T: "Potent induction of IFN- γ production from cord blood NK cells by the stimulation with single-stranded RNA" *J Clin Immunol* 31. 728-735 (2011), 査読有
DOI: 10.1007/s10875-011-9528-4

Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T: "Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan" *J Clin Immunol* 31. 968-976 (2011), 査読有
DOI: 10.1007/s10875-011-9594-7

Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K, Kira R, Torisu H, Ihara K, Sakai Y, Sanefuji M, Pipo-Deveza JR, Silao CL, Sanchez BC, Lukban MB, Salonga AM, Hara T: "PD1 as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis." *Hum Genet* 127.

411-419 (2010), 査読有
DOI: 10.1007/s00439-009-0781-z

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A: "Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development." J Immunol 185. 842-55 (2010), 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.0904100

Picard C1, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïm A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowski J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL: "Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and My D88 Deficiency." Medicine(Baltimore) 89. 403-425 (2010), 査読有
DOI: 10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3

〔学会発表〕(計7件)

石村匡崇、山元裕之、落合正行、高田英俊、土居岳彦、楠原浩一、中津可道、續輝久、三谷幸之介、原寿郎、アデノ・アデノ随伴ウイルスベクターを用いた相同組換えによる BTK 遺伝子修復、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11 日～13 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

山元裕之、石村匡崇、土居岳彦、高田英俊、原寿郎、*BTK* gene repair by homologous recombination using helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector、第 42 回日本免疫学会、2013 年 12 月 11 日～13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Hara T, Innate immunity and infection in the newborn, The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Sarawak, Malaysia

Hara T, Ishimura M, Takada H, Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases, The 2nd International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, April 4-6, 2013, Budapest, Hungary

Hara T, A critical role of the innate immune system to host defense in infants, The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17-19, 2012, Seoul, Korea

Hara T, Pediatric Research From Bedside to Bench to Bedside, The Pediatric Academic Societies / The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research, April 30 - May 3, 2011, Denver, USA

Hara T, A Critical Role of Innate Immunity Receptors in the Development of Kawasaki Disease, Pediatric Academic Societies, May 1-4, 2010, Vancouver, Canada

〔図書〕(計4件)

原寿郎: "希少疾患/難病の診断・治療と製品開発" (株)技術情報協会. 17 (2013)

原寿郎(分担): "今日の治療と看護 改訂第3版 原発性免疫不全症候群"南山堂. 1345-9 (2013)

原寿郎: "免疫学コア講義 改訂3版"南山堂. 234-252 (2012)

原寿郎: "今日の診断指針 症候編第6版 自己炎症性症候群"医学書院. (2010)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原寿郎 (HARA, Toshiro)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 40150445

(2)研究分担者

高田英俊 (TAKADA, Hidetoshi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 70294931

井原 健二 (IHARA, Kenji)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：80294932

宮脇 利男 (MIYAWAKI, Toshio)
富山大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10143885
(平成 22 年度研究分担者、平成 23 年度連携
研究者)

中畑 龍俊 (NAKAHATA, Tatsutoshi)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：20110744
(平成 22 年度研究分担者、平成 23 年度連携
研究者)

中津 可道 (NAKATSU, Yoshimichi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：00207820
(平成 22 年度研究分担者、平成 23 年度連携
研究者)

(3)連携研究者

石川 文彦 (ISHIKAWA, Fumihiko)
理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合
研究センター・ヒト疾患モデル研究グルー
プ・グループディレクター
研究者番号：30403918
(平成 23 年度連携研究者)