

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590355

研究課題名（和文）骨髄造血幹細胞増殖制御システムを用いた骨髄キメリズム導入とヒト疾患モデル治療

研究課題名（英文）Human gene therapy model by induction of stable bone marrow chimerism with regulation of proliferative ability of hematopoietic stem cell

研究代表者

竹内 康雄（TAKEUCHI YASUO）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60286359

研究成果の概要（和文）：X連鎖型慢性肉芽腫症の根治的治療は造血幹細胞を用いた遺伝子治療だが、機能修復された好中球の消失により長期治療成績は芳しくない。今回、造血幹細胞増殖能を亢進制御する Lnk 遺伝子変異体導入により安定した遺伝子治療モデルの確立を試みた。ヒト遺伝子治療の問題点を再現した動物モデルを作成できたが、Lnk 変異体の導入及び発現効率の確認が困難となり、遺伝子ベクターの構造や導入方法について改変を行っている

研究成果の概要（英文）：The gene therapy using hematopoietic stem cells (HSCs) is a curative for X-linked chronic granulomatous disease. However, long-term treatment result is not satisfactory because of disappearance of neutrophils with functional reconstitution. We attempt the development of curative gene therapy model by transduction of Lnk-gene variant which promotes appropriate proliferation into HSCs. We made an animal gene therapy model with reproducing clinical problem of human gene therapy. But, the confirmation of the efficacy of transduction or expression of Lnk variant is difficult. We reexamine the modification of a gene vector or methods for transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：造血幹細胞、遺伝子治療、Lnk 遺伝子変異体、骨髄キメリズム、遺伝子導入、慢性肉芽腫症

1. 研究開始当初の背景

1) 造血幹細胞増殖能の亢進システムの構築
細胞内シグナル伝達系の相互作用を担うア

ダプター蛋白質は細胞機能を維持するうえで必要不可欠である。Sh2b3/Lnk は主に造血系細胞、リンパ組織に発現する細胞内アダプ

ター蛋白質である。構造上は、①富プロリン部を含む多量体形成に働く N 末端部、②PH, SH2 ドメイン、③チロシンリン酸化部位が保存されている C 末端部を含んでいる。これまでの Lnk 遺伝子欠損マウス (Lnk^{-/-}) およびトランスジェニックマウスの研究から、造血幹細胞の分化、自己複製の制御に深く関与するとされ、以下の重要な 2 点が注目される。(a) 造血幹細胞の複製、増殖を制御しており、Lnk^{-/-} マウスの造血幹細胞 (34-KSL 分画) を用いた競合的骨髄再構築法による解析では、Lnk^{-/-} により 34-KSL 細胞の約 10 倍の著しい増加と造血能亢進が認められる。これらの造血幹細胞の著増は白血病化を伴わない。(b) Lnk 蛋白質の SH2 ドメインが造血幹細胞増殖抑制に必須である。SH2 ドメイン変異体の誘導実験ではドミナントネガティブ変異体 (DN-Lnk) として作用し、さらに DN-Lnk 変異体-GFP 一過性共発現ベクターの遺伝子導入実験では DN-Lnk 変異体導入細胞の造血能の亢進が確認された。以上の結果から DN-Lnk 変異体を用いて造血幹細胞に内因性に発現する Lnk 機能を制御することは造血機能制御に非常に有用なアプローチであると考えた。

2) ヒト疾患モデルマウスの遺伝子細胞治療

慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) は先天性免疫不全症候群に属する疾患である。

a) 病因、所見：好中球内の食胞表面の電子伝達系を構成する 4 種類の蛋白質である gp91^{phox}, p22^{phox}, p44^{phox}, p67^{phox} のいずれかの遺伝子異常により食胞内の活性酸素が産生されず殺菌能が障害される。このため細菌、真菌感染を繰り返し、現在でも致死率 5-10% である。また、慢性炎症の持続のため肝臓、肺、腸管粘膜など重要臓器に多数の肉芽腫を形成し臓器機能不全に至る例もみられる。患者は比較的若年者が多く QOL が損なわれる

ことから安定した根治的治療法の確立が望まれる。

b) 根治的治療法として自己造血幹細胞を用いた遺伝子治療が行われる。しかし、長期治療成績は充分ではない。問題点として遺伝子導入され機能修復された好中球が患者末梢血から経過とともに減少、消失していくことが挙げられる。根治的治療のためには長期の安定した骨髄キメリズム誘導が不可欠である。我々は最も発症頻度が高い X 連鎖型 gp91^{phox} 遺伝子異常の患者と同様の遺伝子異常を持つモデルマウスを (X-CGD マウス) を用いて根治的遺伝子細胞治療法を確立するための基礎実験を継続してきた。本研究では上記に示した DN-Lnk 変異体導入により低侵襲の前処置にて長期の安定した骨髄キメリズム誘導を試み、X-CGD に対する根治的細胞移植治療モデルの確立を試みる。

2. 研究の目的

治療法が確立していない難治性疾患群—自己免疫疾患、先天性免疫不全、酵素欠損、構造蛋白異常、造血系異常など—に対して根治的治療として幹細胞移植や遺伝子治療が挙げられ、臨床上、有効であることが報告されている。しかし、臨床上の問題点として移植されたドナー細胞あるいは遺伝子導入細胞の末梢血からの減少、消失が挙げられる。もとより原因の検索は優先課題であるが、治療の観点からみると移植された細胞が治療効果を発揮するような状況を作り出すことも必要である。我々は疾患群造血幹細胞の競合的増殖能、つまり、患者造血幹細胞の増殖能がドナー造血幹細胞の増殖能を凌駕する可能性を提示してきた。そこでこの問題点を解析するため、1) ドナー造血幹細胞増殖能を亢進させるシステムを用いて、2) ヒト疾患モデル動物に対し細胞遺伝子治療を行い

長期安定した疾患治療モデルを確立することを試みた。

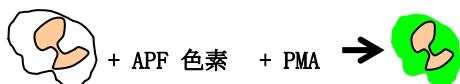
3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞への遺伝子導入および治療効果評価システムの構築

1) ヒト疾患モデルマウスの飼育、繁殖

①ヒト X 連鎖型慢性肉芽腫症 (X-CGD) モデルマウスである gp91^{phox} 遺伝子変異マウスを東京大学医科学研究所内動物実験センターにて飼育、繁殖する。同マウスは施設間の正式な手続きを経て北里大学医学部遺伝子高次機能センターにも搬入された。

②遺伝子変異マウスのスクリーニングは好中球活性酸素産生能の有無にて行う。APF 色素アッセイ法は従来法に比して、(1) 活性酸素の中でも殺菌に必要な・OH(ヒドロキシラジカル)等を特異的に検出でき、(2) autoxidation が認められないなど優れた点が多く、この方法を応用して疾患マウスの判別を行う。(図1)



APF: (2-[6-(4' amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid).

PMA: 4b-phorbol-12-myristate-13-acetate

活性酸素産生にて発光。
発光輝度は長時間安定

図1

2) cDNA プラスミドベクターの作成

すでに発現マーカー遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター(DNsam)に gp91^{phox} 遺伝子をサブクローニングし以下のベクターを作成。マーカー遺伝子には APF 色素とは検出波長の異なる Kusabira Orange (KuO), Plu_m を用いる。

- ①DNsam-マウス DN-Lnk + Plu_m,
- ②DNsam-マウス gp91^{phox} + KuO
- ③DNsam-Plu_m, DNsam-KuO

3) 遺伝子導入用ウイルスの作成

293GPG パッケージング細胞株を用いて安定ウイルス産生細胞株を樹立し、高タイター VSV-G pseudotyped ウイルスを産生する。作製したウイルスを Jurkat 細胞、NIH3T3 細胞等に感染させマーカー遺伝子の発現によりウイルス産生細胞株を選別する。

4) マウス造血幹/前駆細胞への遺伝子導入

マルチカラーフローサイトメトリー(FCM)にてマウス造血幹/前駆細胞 (c-kit⁺ lineage⁻: KL 細胞)を sorting する。KL 細胞へウイルスを感染させ遺伝子導入し3日間培養したところで発現マーカー陽性細胞を sorting する。当研究室にて至適化した方法では 90%以上の導入効率で、標的蛋白質を発現し、再構築能を保持した造血幹細胞分画を作製することが可能である。

5) 遺伝子治療の効果確認法の確立

①活性酸素産生機能からみた末梢血好中球再構築の解析

導入された gp91^{phox} cDNA の蛋白への発現の成否は好中球内の活性酸素産生の機能回復にて確認する。FCM 解析にて、APF 色素アッセイ法を用いた末梢血好中球内の活性酸素産生とマーカー遺伝子発現を同時に解析できる。

②真菌菌体成分に対する肉芽腫形成の有無による治療効果の確認

活性酸素産生が再構築された好中球にて治療効果が得られることを確認する。サブロー培地にて培養した *Aspergillus fumigatus* (以下 AF) をオートクレーブ滅菌し菌体成分を回収する。用手的、ソニケーター等で破碎し PBS に懸濁してマウスの耳介皮膚に皮下注する。同部位の 2-3 日後の肉芽腫様変化を観察する。

(2) 遺伝子導入された造血幹細胞の移植による治療モデルの確立

1) DN-Lnk-Plum 導入 KL 細胞の競合的骨髄再構築能亢進の有無を検討する。

DN-Lnk-Plum 導入 B6 Ly5.1 (2×10^5 個) と B6 Ly5.2 (2×10^5 個) の KL 細胞を同時に、4.5 Gy の全身放射線照射 (TBI) をしたホストマウス B6 Ly5.1+Ly5.2 F1 に移植する。この実験は、①ドナーに対する拒絶反応がなく、②移植後も B6 Ly5.1 KL 細胞への DN-Lnk-Plum 導入効率が解析できる効率の良いシステムである。

2) gp91^{phox} + KuO 導入 KL 細胞による遺伝子治療の閾値の検討

X-CGD KL 細胞に gp91^{phox} + KuO を導入し、X-CGD マウスに移植して治療効果を判定する。以下の実験条件にて遺伝子治療効果の認められなくなる閾値を設定する。

① 前処置の全身放射線照射 (TBI) 照射量を致死 (9.5 Gy)、非致死 (4.5 Gy)、無処置 (0 Gy) に分ける。

② 移植細胞数を 5×10^5 個/マウス、 10^5 個、 5×10^4 個、 10^4 個の 4 段階程度に調整する。

3) DN-Lnk-Plum および gp91^{phox} + KuO の共導入 KL 細胞移植による治療実験

X-CGD KL 細胞に DN-Lnk-Plum および gp91^{phox} + KuO の同時遺伝子導入を行う。FCM 解析にて KuO, Plum 共に陽性を示した細胞集団を sorting し培養した後に X-CGD マウスに移植する。移植細胞数は 2) で設定した閾値細胞数よりさらに 3-4 段階下げて、1) 長期安定した骨髄キメリズム誘導と、2) 治療効果の確認を行う。

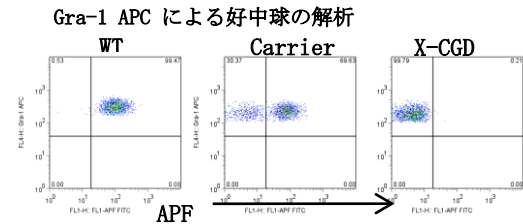
4. 研究成果

(1) ex vivo 好中球活性酸素産生能のスクリーニング法の確立: APF 色素アッセイ法により異常遺伝子キャリアーマウス、正常マウス、疾患マウスが明確に区別でき、簡便、確

実にマウススクリーニングが可能である。

(図 2 に FCM の結果を示す)

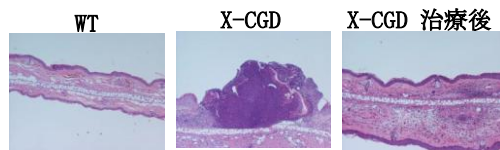
図 2



(2) 治療効果の確認: AF 投与 72 後時間後の耳介皮膚標本 (HE 染色) を WT, X-CGD, 遺伝子治療後 X-CGD にて比較した。WT では投与部位にわずかな円形細胞浸潤が見られるのみである。X-CGD では好中球浸潤と蓄積で肉芽腫様変化をきたしたが、治療後 X-CGD ではと同様にわずかな円形細胞浸潤が見られるのみであった。(図 3)

図 3

AF 皮下注 72 時間後



X-CGD では肉芽腫様変化を認める。
治療後は WT と同程度に改善

この方法で安全かつ簡便に治療効果の確認が可能である。

(3) 移植される細胞の一部の解析を行い、すべての細胞で発現マーカー陽性を確認し (図 4)、 5×10^5 個/マウスの遺伝子導入 KL 細胞を 9.5 Gy TBI 照射されたマウスに移植した。

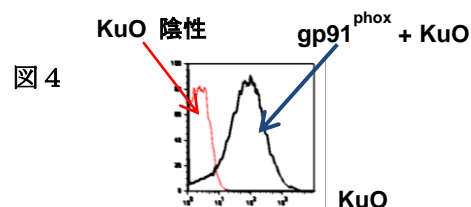
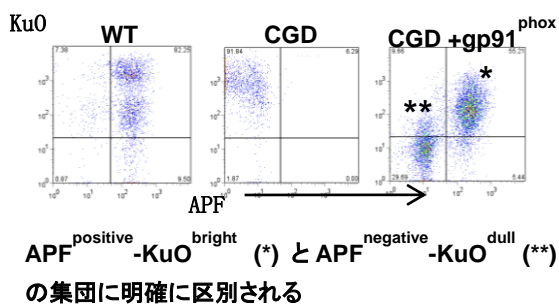


図 4

マウスは、①KuO→WT マウス (n=3)、②KuO→X-CGD マウス (n=3)、③gp91^{phox} + KuO→X-CGD マウス (n=5) の 3 群に分けた。移植後 4 週目の末梢血好中球活性酸素産生能を APF 色素ア

ッセイ法で解析したところ、①群ではすべての好中球で活性酸素陽性、②群では陰性を示した。③の治療群においては、APF 色素輝度と KuO 輝度は比例直線を呈するものと予想したが、活性酸素産生能が再構成された末梢血好中球 (APF^{positive}-KuO^{bright}) とそうでない好中球 (APF^{negative}-KuO^{dull}) の集団に明確に区別される結果となった(図5)。移植された KL 細胞には標的遺伝子が導入されているにも拘らず上記の2群に明確に区別される病態を解析することでより効率の良い遺伝子治療を行うことができる。ヒト遺伝子治療上の問題点を再現するものであり、本研究と別の研究課題として行う予定である。

図5 末梢血好中球の解析



(4) Lnk ドミナントネガティブ変異体 (Lnk-DN) 遺伝子導入用ウイルス作製：上記で使用したウイルスベクターに Lnk-DN 変異体遺伝子+発現マーカー (Plum) 遺伝子を組み込み (Lnk-DN+Plum) 遺伝子導入用ウイルス作製した。ここで発現解析の確認のため Jurkat 細胞に導入したが Plum の発現輝度が非常に低かった。ウイルス作製の過程の条件 (プラスミド使用量、パッケージング細胞の培養条件など) を検討したが輝度亢進は得られず元々の Plum 色素輝度の低さと考えられた。本来の目標である、HSC への gp91^{phox}+Lnk-DN 遺伝子の同時導入 (KO+Plum の重複) を Jurkat 細胞で確認するもフローサイトメトリーでは二重陽性細胞は正確には同定で

きなかった。他の発現マーカー候補がないため、gp91^{phox} + KO ベクターに Lnk-DN を組み込むこととし、同ベクターの作成中である。

(5) Lnk ドミナントネガティブ変異体 (Lnk-DN) 遺伝子導入後の HSC 増殖能の検討：きわめて低輝度であるため確実に判断できないが、マウス HSC に Plum 単独及び Lnk-DN-Plum 遺伝子を導入し、陽性と判断される細胞集団をフローサイトメーターで分離しマウスへの移植を試みた。現在、経過観察中である。

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0件)

[学会発表] (計1件)

- ① Takeuchi Y, Amirhosseini M, Franklin L, Takeuchi E, Nakauchi H, Otsu M : Development of experimental animal model of human gene therapy for X-CGD. 第38回ヨーロッパ骨髓移植会議, 2012, Apr1-4, Geneva, Switzerland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 康雄 (TAKEUCHI YASUO)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：60286359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大津 真 (OTSU MAKOTO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30361330