

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591148

研究課題名(和文)線維芽細胞を用いた遺伝子導入による先天性副腎皮質過形成の治療の開発

研究課題名(英文)Extra-adrenal expression of Cyp21a1 for gene therapy of congenital adrenal hyperplasia

研究代表者

内木 康博(Naiki, Yasuhiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター・内分泌代謝科・医師

研究者番号：20470007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：21水酸化酵素欠損症のCyp21a1欠損ホモマウスを作成し、その尾より線維芽細胞を初代培養する。この培養細胞にCyp21a1のcDNAを組み込んで作成したレトロウイルスを感染、マウスの皮下に自家移植した。移植前と後で血中のP4とDOCを測定し、21水酸化酵素の活性が改善したことを確認した。Cyp21a1遺伝子のcDNAを組み込んだアデノウイルス関連ウイルスベクター(AAV)を作成し、これを2匹のホモ欠損マウスの筋肉内に注射した。投与前と1ヶ月後の血中のP4とDOCを測定し、21水酸化酵素の活性が著しく改善したことを確認した。以上より侵襲の少ない遺伝子治療の可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：21-hydroxylase deficient (Cyp21a1D) mice were made by breeding with heterozygous of H-2aw18 haplotype mice. Retrovirus vector containing mouse Cyp21a1 cDNA was constructed and transmitted to fibroblasts cultured from 21OHD mice. Cyp21a1-induced fibroblasts were injected into Cyp21a1D mice. Adenoassociated virus vector containing Cyp21a1 cDNA (AAV-Cyp21a1) was constructed with pAAV-CMV-shuttle and injected into limbs muscles of 21OHD mice. Serum P4 and DOC concentrations were also measured before and after injection. Transplantation of the transgenic fibroblasts into Cyp21a1D mice showed slight change serum P4/DOC ratio. Transgenic 21OHD mice with AAV-Cyp21a1 showed increase DOC production and decreased P4/DOC ratio (1223 to 39.2) at 4weeks after injection. We succeeded recovering 21OH activity steroid production in Cyp21a1D mice by introducing Cyp21a1 gene into muscle with adenoassociated virus vectors for 4 weeks.

研究分野：医歯薬学

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 副腎皮質過形成 レトロウイルスベクター アデノウイルス関連ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

先天性副腎皮質過形成は副腎におけるコレステロールからステロイド産生に関わる酵素のいずれかの異常によって生じる常染色体劣性遺伝の疾患である。病型として最も頻度が高いのは CYP21 遺伝子の異常によって生じる 21 水酸化酵素欠損症で、先天性副腎皮質過形成の 90%以上を占める。その病態として、17 ハイドロキシプロゲステロンおよびプロゲステロンの 21 位水酸化が障害され、糖質コルチコイドおよび硬質コルチコイドが産生できなくなる。そのため下垂体へのネガティブフィードバックがかからなくなり ACTH の過剰刺激が生じ、同じく副腎から産生されるが 21 水酸化酵素がその産生に関わらない性ステロイド過剰分泌が生じる。

塩類喪失型は最重症型で生後数日のうちに糖質コルチコイド不足によるショックと鉱質コルチコイド不足による低 Na、高 K 血症となる電解質異常をきたし、早期に診断し速やかに治療しなければ致死性である。また胎内から生じる性ステロイドの過剰産生によって女兒において外性器の男性化が生じる。単純男性型には塩類喪失型に比べて、鉱質コルチコイドの分泌障害が軽く新生児期の電解質異常は来さないが、性ステロイドの過剰産生による女兒の外性器の男性化を生じる。このため塩類喪失型と単純男性型は糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドを生涯にわたり内服し続ける必要があり、塩類喪失型で内服を怠れば低血糖ならびに電解質異常の副腎不全症状を示し、特に発熱などのストレス時には十分なステロイドの補充が必要であり、怠れば致死性となる。マスキリングが開始されてからも副腎不全による死亡、並びに脳症の報告がなくなる。この意味でコルチコイドを十分量補充する必要があるが、過剰投与は低身長をきたす。

CYP21 遺伝子の変異解析が進み、塩類喪失型はほとんど 21 水酸化酵素の残存活性が

認められないが、単純男性型では 2-11%、非古典型では 20-60%の残存活性が認められている。このことは塩類喪失型に CYP21 遺伝子を導入することで 21 水酸化酵素活性を数%得られれば塩類喪失症状がなくなりストレス時の副腎不全による致死性リスクが少なくなる可能性を十分に回避できることを示唆している。さらに残存活性があることより、コルチコイドの過剰投与が減り、過剰投与による身長予後の悪化の可能性も減る。1987年に Shiroishi らが新生児期に複数の仔体が死亡する系において 21 水酸化酵素欠損症のモデルとなる Cyp21a1 遺伝子の欠損を同定した¹⁾。このマウスでは糖質コルチコイドとしてコルチコステロンが合成されるため、Cyp21a1 欠損マウスではコルチコステロンが合成されずプロゲステロンが蓄積する。1999年に Tajima らがこのマウスにアデノウイルスベクターに乗せた Cyp21 遺伝子を副腎に直接注入して発現させ、一時的にコルチコステロンの産生を見たことより遺伝子導入治療の有効性を見出した²⁾。しかし副腎への遺伝子注入は侵襲を伴い、ベクターのよっては副腎を癌化させる可能性もある。

2. 研究の目的

本研究目的は先天性副腎皮質過形成の治療で、特に頻度の高い 21 水酸化酵素欠損症を対象とし Cyp21 遺伝子欠損マウスを用いて遺伝子治療モデルを開発することにある。

3. 研究の方法

1) 線維芽細胞における Cyp21a1 遺伝子発現マウスのステロイド 21 水酸化酵素をコードする Cyp21a1 の cDNA をレトロウイルス発現ベクターのシャトルプラスミド pGCDNsap に組み込む。このベクターをパッケージング細胞 293gpg に導入しレトロウイルスベクターを作成する。^{H-2aw18} ハプロタイプを持つ Cyp21a1 ヘテロ欠損マウス同士を交配させて作成した仔マウスのうち、PCR

を用いて遺伝型を決定したホモ欠損マウスの尾から線維芽細胞を初代培養する。この線維芽細胞に先に作成したレトロウイルスベクターを感染させ、Cyp21a1 遺伝子を発現させる。その後培養液にプロゲステロン(P4)を添加し、24 時間後の P4 からデオキシコルチコステロン(DOC)への変換を培養液中の濃度を測定して調べる。

2) Cyp21a1 遺伝子を発現させた線維芽細胞の自家移植

H-2aw18 ハプロタイプを持つ Cyp21a1 ヘテロ欠損マウス同士を交配させて作成した仔マウスを生直後からコルチゾールとフルドコルチゾンを生後 21 日まで連日注射投与して生存させる。この間に尾の一部を用いて線維芽細胞を初代培養し、その一部から PCR にて遺伝型を決定する。ホモ欠損マウスの線維芽細胞にはレトロウイルスベクターを用いて Cyp21a1 遺伝子を発現させ、この線維芽細胞 6×10^4 個をホモ欠損マウスの皮下に自家移植し、移植前後で血清中の P4 と DOC を LC/MSMS を用いて測定した。

3) Cyp21a1 遺伝子を発現させた ips 細胞の同種移植

Cyp21a1 ホモ欠損マウスから樹立した ips 細胞にレトロウイルスベクターで Cyp21a1 遺伝子を導入し、その ips 細胞を Cyp21a1 ヘテロ欠損マウスを交配して分娩させた 8 匹の新生児マウスの腹腔内に移植し、数週間後血清中の P4 と DOC を LC/MSMS を用いて測定した。

4) アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターによる Cyp21a1 遺伝子導入

pAAV-CMV-shuttle に Cyp21a1 遺伝子の cDNA を組み込んだ AAV ベクターを作成する。Cyp21a1 ホモ欠損マウスの四肢の筋肉内に計 1×10^{11} GC の AAV を注射した。投与前

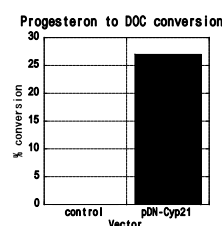
と 4 週後の血清中の P4 と DOC を LC/MSMS を用いて測定した。

4. 研究成果

1) 線維芽細胞における Cyp21a1 遺伝子発現

ホモ欠損マウスから初代培養して得られた線維芽細胞に先に作成したレトロウイルスベクターを感染させ、RT-PCR で Cyp21a1 遺伝子の発現を確認した。また培養液中にプロゲステロンを加え、経時的に培養液中のデオキシコルチコステロンを測定したところ培養液中のプロゲステロンがデオキシコルチコステロンへ変換され線維芽細胞が 21 水酸化酵素の活性を獲得したことを確認した(図 1)。Cyp21a1 遺伝子は細胞内の小胞体上で働く酵素であることと、ステロイドは細胞膜を容易に貫通することより、培養液中のプロゲステロンが細胞内に入って小胞体で 21 水酸化酵素によってデオキシコルチコステロンへ変換され、これがふたたび細胞外へ漏出したと考えられる。

図 1 レトロウイルスベクター培養液中のプロゲステロンからデオキシコルチコステロンへ変換率



2) Cyp21a1 遺伝子を発現させた線維芽細胞の自家移植

Cyp21a1 遺伝子を導入した線維芽細胞 6×10^4 個をホモ欠損マウスの皮下に自家移植し、移植前後で血清中の P4 と DOC を LC/MSMS を用いて測定した。移植後の組織を HE 染色したが癌化等は認められなかった(図 2)。投与前後の P4/DOC 比の平均は投与前が 2515 ± 2133 、投与後が 1435 ± 769 であった。移植後から採

血までの期間の平均は 21.6 日であった。この比の推移を図 3 に示す。野生型マウスの P4/DOC 比が 0.22 ± 0.88 で無治療のホモ欠損マウスの P4/DOC 比が 2223.69 ± 25.34 であることから、レトロウイルスベクターによる Cyp21a1 遺伝子導入によって軽度に改善が認められた。

図 2 レトロウイルスベクター感染線維芽細胞の皮下への移植後の HE 染色による組織像 (矢印が刺入部位)

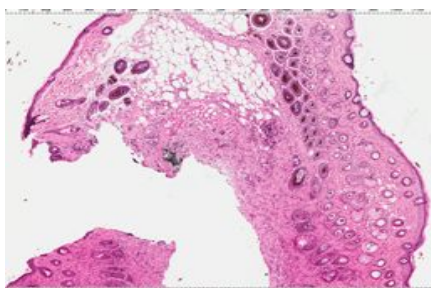
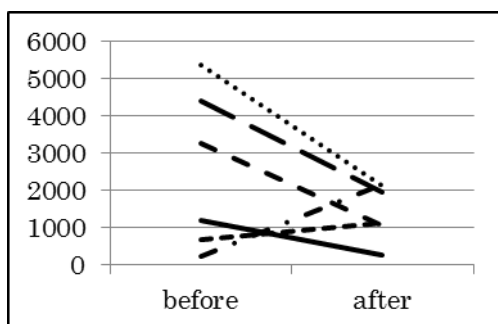


図 3 レトロウイルスベクター感染線維芽細胞移植前後の血中 P4/DOC の変化



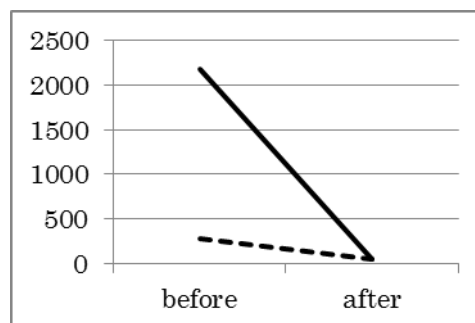
3) Cyp21a1 遺伝子を発現させた ips 細胞の同種移植

Cyp21a1 ホモ欠損マウスから樹立した ips 細胞にレトロウイルスベクターで Cyp21a1 遺伝子を導入し、その ips 細胞を Cyp21a1 ヘテロ欠損マウスを交配して分娩させた 8 匹の新生児マウスの腹腔内に 5×10^3 細胞移植した。すべてのマウスが腹腔内に腫瘍を形成した。移植後 4 週間の血中 P4/DOC 比は Cyp21a1 発現 ips 細胞移植個体 462 とコントロール 638 と比べ軽度に改善した。

4) AAV ベクターによる Cyp21a1 遺伝子導入

Cyp21a1 ホモ欠損マウスの四肢の筋肉内に計 1×10^{11} GC の AAV を注射し、投与前後の P4 と DOC を測定し、LC/MSMS で測定した。P4/DOC 比はそれぞれ投与前が 2175、272、投与後が 47.8、30.74 であった (図 4)。野生型マウスの P4/DOC 比が 0.22 ± 0.88 で無治療のホモ欠損マウスの P4/DOC 比が 2223.69 ± 25.34 であることから、AAV ベクターによる Cyp21a1 遺伝子導入によって有意に改善したことが確認できた。

図 4 AAV ベクター投与前後の血中 P4/DOC の変化



5) 考察

本研究の目的は先天性副腎皮質過形成に対する侵襲の少ない遺伝子治療を確立することである。まず培養細胞を用いて、ステロイド代謝が細胞内外を通じて行われることを確認した。このことより患者血清中に漏れ出るステロイド中間代謝物を副腎皮質外でも代謝することが可能で、同様にそこで代謝されたステロイド中間代謝物が再度副腎皮質のステロイド産生細胞に取り込まれて最終産物まで生成しうる可能性を確認した。実際に 21 水酸化酵素欠損症の疾患モデルである Cyp21a1 遺伝子欠損マウスから得た線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて Cyp21a1 遺伝子を導入し、この細胞を皮下に自家移植することでマウス体内でのステロ

イド産生が改善したことを確認した。ただし初代培養で細胞が増殖するのに時間がかかり、短期間に有効な細胞数を得るのが困難で細胞数が不十分であったこともあり治療効果が限定的であったのと、時間がかかることから乳幼児期に治療を開始できないのが課題として残った。

乳幼児期に治療開始する目的で、あらかじめホモの Cyp21a1 遺伝子欠損マウスの繊維芽細胞から ips 細胞を樹立し、それにレトロウイルスベクターを用いて Cyp21a1 遺伝子を発現させた細胞系を樹立し、Cyp21a1 遺伝子のヘテロ欠損マウス同士を交配させて出産したマウスに生後数日以内にこの ips 細胞を腹腔内移植を行って乳幼児期に治療開始する効果を検証した。結果は今回移植した ips 細胞は未分化細胞であったので全て腫瘍形成したのと、移植した仔マウスのうち遺伝子型を確認したところ 2 匹しかホモ欠損マウスは含まれておらず、それぞれ Cyp21a1 遺伝子発現 ips 細胞とコントロールの ips 細胞を移植し、そのステロイド産生は改善を認めなかった。このことからまず ips 細胞を線維芽細胞へ分化させてから移植する必要性と、腹腔内移植では血流がなくステロイド代謝には効果が不十分な可能性、さらに移植した ips 細胞の細胞数が不十分であった可能性が示唆された。これらは今後検討すべき課題と考える。

同様に線維芽細胞を初代培養する過程を省く目的で、第三年度から研究期間を延長して Cyp21a1 欠損マウス体内に直接ベクターを用いて遺伝子を導入する方法を検討した。レトロウイルスベクターは分裂期の細胞に感染して細胞ゲノム内に取り込まれ、細胞分裂後も導入した遺伝子を発現させ続けるが、細胞が分化し分裂の乏しい組織への感染が難しいのが難点であった。一方アデノウイルスベクターは分裂期以外の細胞にも感染し、遺伝子を発現させうるがゲノム内には取り

込まれないため分裂後の細胞へは遺伝子は伝達されない。この点、近年新たに臨床応用が始まった AAV ベクターはアデノウイルスベクター同様、分裂期以外の細胞にも感染し、レトロウイルスベクターと同じく細胞ゲノム内に取り込まれるため、分裂後の細胞にも遺伝子が受け継がれる性質を兼ね備えている。よって AAV ベクターを使って Cyp21a1 欠損マウスの筋肉内に Cyp21 遺伝子を注入して感染させたところ、血液中のプロゲステロンが他の方法より効率よく DOC に代謝されることが確認できた。よって AAV ベクターによる遺伝子導入が乳幼児期から治療を開始できる有用な治療法の候補として今後、長期的な効果や安全性および乳児期からの治療に関して検討を進める予定である。

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 1 件)

Noriyuki Katsumata, Novel intronic CYP21A2 mutation in Japanese patient with classic salt-wasting steroid 21-hydroxylase deficiency. *Metabolism*, 59.1628-1632, 2010

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木康博(独立行政法人国立成育医療研究センター 内分泌代謝科)

研究者番号: 20470007

(2) 研究分担者

勝又規行(独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 基礎内分泌研究室)

研究者番号: 10260340

深見真紀(独立行政法人国立成育医療研

究センター研究所 分子内分泌研究部)

研究者番号：40265872

小野寺雅史(国立成育医療研究センター
研究所 成育遺伝研究部)

研究者番号：10334062