

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591554

研究課題名(和文)ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新規分子病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Development of molecular mechanism and therapy of Diamond-Blackfan anemia

研究代表者

三宅 弘一 (Koichi, Miyake)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90267211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

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)の病因としてDBA患者の約25%においてリボソーム蛋白S19の遺伝子異常が報告されているが、いまだ完全には解明されていない。近年新たに他のリボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17)の異常が報告されており、これらの蛋白を抑制するレンチウイルスベクターを作製し、DBAモデル細胞の作製を行った。DBAモデル動物作製の為に、KRAB(Kruppel-associated box)遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの作製を行った。

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 gene. Recently, it was reported that other ribosomal proteins (RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) were also mutated in DBA patients. We constructed lentiviral vector expressing siRNA against RPL5, RPL11, RPS24, and RPS17 to analyze the molecular mechanism of DBA. We established cell line model of DBA after transduction with these lentiviral vector. To develop DBA model mouse, first, we generated KRAB (Kruppel-associated box) gene transgenic mouse. Using this mouse, we have a plan to make a tetracycline inducible DBA model mouse.

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：リボソーム蛋白 貧血 先天異常

1. 研究開始当初の背景

Diamond-Blackfan anemia(以下 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 RPS19 の遺伝子異常が報告されている。また、近年 RPS19 以外のリボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 等)の異常の報告もあるが、DBA の半数以上は依然として病因不明である。また、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 の病態解析、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 の病態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型 (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: 323-329, 2008, Blood. 109: 980-986, 2007)。

本研究ではこれらの結果を基に、siRNA を用いて様々なリボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 等)の異常を持つ DBA モデルの作製を行い、総合的にリボソーム蛋白異常の分子病態の解明を行う。さらにはこれらの結果をふまえると共に、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。

2. 研究の目的

(1) 今までの DBA 研究においては RPS19 異常による研究が主体であったが、他のリボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17 等)の異常も存在し、これらの異常を持つ *in vitro*, *in vivo* モデルを作製し、総合的に DBA の詳細な病態を行っていく。

(2) 新規治療法(遺伝子治療)においては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 *garoth 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 Homeobox transcriptional factor B4 (HoxB4) (Cell. 109: 39-45, 2002, Stem Cells. 24: 653-661, 2006) 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る。

3. 研究の方法

(1) リボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17)の異常を持つ DBA モデルの作製

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

RPS24, RPS17 に対する siRNA を組み込んだテトラサイクリン誘導性レンチウイルスベクターは作製済みであり、さらに RPL5, RPL11, に対する siRNA を組み込み新しいレンチウイルスベクターを作製する。

2) DBA モデル細胞の作製

KRAB 遺伝子 (Mol Ther. 11: 627-637, 2005) をすでに組み込んだ赤芽球系に分化可能な細胞(TF1, K562)に作製したレンチウイルスベクターを用い遺伝子導入し、テトラサイクリンにて siRNA を発現し、リボソーム蛋白の発現を抑制する事により DBA モデルを作製する。

3) DBA モデルマウスの作製

マウス ES 細胞にラサイクリン誘導性が可能となる KRAB(Kruppel-associated box) 遺伝子 (Mol. Ther. 11: 627-637, 2005) を組み込みトランスジェニックマウスを作製する。作製したマウスの骨髓細胞に各リボソームに対する siRNA を発現させるレンチウイルスベクターにて遺伝子導入後、移植しテトラサイクリンにて誘導し動物モデルを作製する。

(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) 発現アデノウイルスベクターを作製し造血幹細胞遺伝子導入時に HoxB4 を発現させ *in vivo* で増幅を行い治療効果の増強を試みる。

4. 研究成果

(1) DBA モデル細胞の作製

リボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17) に対する siRNA を組み込んだレンチウイルスベクターを TF1, K562 細胞に遺伝子導入した結果細胞増殖能低下、コロニー形成能の低下、を認めた。今後これらの細胞にてマイクロアレイ、もしくは蛋白アレイにて検討し、さらに詳細な分子病態を解明していく。

(2) DBA モデルマウスの作製

KRAB 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの作製に成功した。今後このマウスの骨髓細胞にリボソーム蛋白(RPL5, RPL11, RPS24, RPS17)に対する siRNA を組み込んだレンチウイルスベクターにて遺伝子導入し、テトラサイクリンによる誘導性を検討するとともに、移植する事により動物モデルの作製を行っていく。

(3) 新規治療法(遺伝子治療)の開発

HoxB4 発現アデノウイルスベクターの作製を行った。今後上記モデルが出来次第治療時に使用し有効性を検討していく。

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 15件)

1. Aoki M, Miyake K, Ogawa R, Dohi T, Akaishi S, Hyakusoku H, Shimada T: siRNA Knockdown of Tissue Inhibitor of

- Metalloproteinase-1 in Keloid Fibroblasts Leads to Degradation of Collagen Type I. *J Invest Dermatol.* 134:818-826, 2014 (査読有)
2. Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H: miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain.* 136:2738-2750, 2014 (査読有)
 3. Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H: Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. *Cerebellum.* 13:29-41, 2014 (査読有)
 4. komiyama H, Miyake K, Asai K, Mizuno K, Shimada T.: Cyclical mechanical stretch enhances degranulation and IL-4 secretion in RBL-2H3 mast cells. *Cell Biochemistry & Function.* 32:70-76, 2014 (査読有)
 5. Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Miyake N, Shimada T, Takahashi H.: Direct Comparison of Administration Routes for AAV8-mediated Ocular Gene Therapy. *Curr Eye Res.* 38:569-577, 2013 (査読有)
 6. Fujikura T, Takeshita T, Homma H, Adachi K, Miyake K, Kudo M, Takizawa T, Nagayama H, Hirakawa K: Team-based Learning Using an Audience Response System: A Possible New Strategy for Interactive Medical Education. *J Nippon Med Sch.* 80:63-69, 2013 (査読有)
 7. Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y.: Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 79: 394-402, 2012 (査読有)
 8. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, Kurihara C, Obata Y, Miyake K, Fukuda K, Ieda M.: Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of gata4, mef2c, and tbx5. *Circ Res.* 111:1147-1156, 2012 (査読有)
 9. Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, Watanabe A, Iijima O, Migita M, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T.: Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. *Hum Gene Ther.* 23:399-406, 2012 (査読有)
 10. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T.: AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood.* 119:64-71, 2012 (査読有)
 11. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T.: Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor-alpha is mediated by S100A6 up-regulation. *Blood Cancer Journal.* 1:e38, 2011 (査読有)
 12. Wakita S, Yamaguchi H, Miyake K, Mitamura Y, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K.: Importance of c-kit mutation detection method sensitivity in prognostic analyses of t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 25:1423-32, 2011 (査読有)
 13. Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren YR, Nakata Y, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H.: Parkin-mediated protection of dopaminergic neurons in a chronic MPTP-minipump mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70:686-97, 2011 (査読有)
 14. Tamai H, Miyake K, Takatori M, Miyake N Yamaguchi H, Dan K, Shimada T, Inokuchi K.: Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia.* 25:888-91,2011(査読有)
 15. Isotani M, Miyake K, Miyake N, Hirai Y, Shimada T.: Direct comparison of four adeno-associated virus serotypes in mediating the production of antiangiogenic proteins in mouse muscle. *Cancer Invest.* 29(5):353-359, 2011 (査読有)
- [学会発表](計 7件)
1. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M and Shimada T. : Successful Treatment of Adult MLD Model Mice By Intravenous Injection of Self-Complementary Type 9 AAV Vector Expressing ASA. 17th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Washington DC). May, 2014.
 2. Miyake N, Miyake K, and Shimada T.: Minimally invasive gene therapy of MLD

model mice by intrathecal and intravenous injection of AAV9 vector. 10th WORLDSymposium™ (San Diego, CA) Feb ,2014

3. Igarashi T, Miyake K, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Shimada T and Takahashi H.: Adeno-Associated Vector (Type 8)-Mediated Expression of siRNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Efficiently Inhibits Neovascularization in a Murine Choroidal Neovascularization Model. 16th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Salt Lake City, Utah). May, 2013.
4. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M and Shimada T. Long-Term Secretion of Arylsulfatase A without Antibody Formation after AAV Mediated Neonatal Gene Transfer into MLD Model Mice. 16th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Salt Lake City, Utah). May, 2013.
5. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, and Shimada T.: AAV9 mediated gene therapy of MLD model mice. 20th Annual Meeting of the European Society of Gene & Cell Therapy. (Versailles, France) October, 2012.
6. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, and Shimada T.: Gene therapy of adult MLD model mice by intrathecal administration of type 9 AAV vector. 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Philadelphia, Pennsylvania). May, 2012.
7. Miyake N, Miyake K, Sakai A, Yamamoto M, Endo A, Suzuki H, and Shimada T.: Intrathecal Administration of Type 9 AAV Vector Expressing Arylsulfatase A Is Effective for Reduction of Sulfatide Storage but Not for Correction of Neurological Deficits in Adult Metachromatic Leukodystrophy Model Mice with Overt Neurological Symptoms. 14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (Seattle, WA). May, 2011.

〔図書〕(計 2件)

1. Miyake K, Shimada T: Development of Muscle-Directed Systemic Cancer Gene

Therapy. Novel Gene Therapy Approaches (Edited by Ming Wei and David Good, Published by InTech) 119-127, 2013

2. Miyake K, Shimada T: Development and Application of HIV Vectors Pseudotyped with HIV Envelopes. Viral Gene Therapy (Edited by Ke Xu, Published by InTech) 355-370, 2011

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