

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：32202
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659493
 研究課題名（和文）再生医療のための部位特異的遺伝子組込み法の開発：
 発生工学的手法を用いた基盤研究
 研究課題名（英文）Development of a site-specific gene insertion technology for
 regenerative medicine: Basic study using developmental engineering
 研究代表者
 小澤敬也（OZAWA KEIYA）
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号：30137707

研究成果の概要（和文）：アデノ随伴ウイルス（AAV）が第19番染色体のAAVS1領域に組み込まれる性質を利用し、挿入変異発癌のない遺伝子操作法を開発した。ヒトAAVS1領域を持つトランスジェニックマウス由来のiPS細胞のAAVS1領域にGFPプラスミドの導入を試み、約100個のクローンを分離したが、AAVS1にGFP遺伝子が組み込まれているのは1クローンのみであった。この低率を改善するためトランスフェクション法、プラスミドの構築の再検討が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed a site-specific gene insertion technology for stem cells by using an integration machinery based on adeno-associated virus (AAV), which preferentially integrates into the AAVS1 site on chromosome 19. We tested this system with a GFP plasmid for iPS cells originated from a transgenic mouse bearing human AAVS1 site. Approximately 100 clones were selected and we found just one clone had the insertion of GFP gene into the AAVS1 site. To improve the AAVS1-targeting efficiency, fine tuning of the method of plasmid transfection and redesign of the GFP plasmid is needed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：再生医療、幹細胞、iPS細胞、遺伝子導入、遺伝子組込み

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療に関しては、臨床的有効性が認められる疾患がまだごく一部に限られているのに対し、造血幹細胞遺伝子治療で白血病の発生という重大な副作用が出現したことから、依然として世界的に研究が低迷している。一方で、再生医療に対する期待が大きく膨らんできており、特にiPS細胞が樹立されてからは、多くの研究者がその分野に参入するよ

うになっている。このような幹細胞を用いた再生医療の実用化を一段と推進していくには、幹細胞を安全に遺伝子操作する技術の重要性が増しているものと判断される。即ち、再生医療に遺伝子治療研究で開発されたテクノロジーを組み合わせることは、先端医療の発展に向けて力を入れるべき方向性の一つであることは間違いない。

幹細胞レベルの遺伝子操作は挿入変異に

よる癌化のリスクを伴うことが懸念されており、その実用化に向けては安全性を高める技術開発が必須である。遺伝子変異がある場合にそれを正常化する場合には、理想的な方法は遺伝子相同組換え法である。この方法であれば、他の遺伝子に傷害を与えるリスクを抑えることが可能であるが、Znフィンガー・ヌクレアーゼを利用した新しい方法でも効率が高く、幹細胞レベルで相同組換え法を用いるのは技術的にまだ困難である。また本法は遺伝子修復には適しているが、細胞機能の強化を目的とした治療遺伝子の導入には不向きである。次に、標的細胞のゲノムにダメージを与えないように、細胞質型ベクターであるセンダイウイルスベクターも最近注目されている。しかしながら、このベクターは免疫原性が強いために、遺伝子操作した細胞を移植する場合にはベクターゲノムを予め取り除く必要がある。したがって、iPS細胞の作製のように体外培養をしている間だけ導入遺伝子を働かせる場合は問題ないが、治療遺伝子を体内で働かせることを目的とする場合には不向きである。

2. 研究の目的

我々の研究グループは、長年に亘って AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発を推進してきており、また並行して、非病原性の野生型 AAV の特徴を活かした第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域特異的遺伝子組込み法の開発にも地道に取り組んできてきている (Progress in Gene Therapy, Vol. 3, pp.19-46, 2008; J. Gen. Virol. 84: 2127-2132, 2003)。この方法は、AAV の二つのコンポーネント [ITR(inverted terminal repeat)配列と非構造蛋白質の Rep 蛋白質]を利用するもので、比較的高頻度で目的遺伝子が安全と考えられる AAVS1 領域に組み込まれる。このユニークなテクノロジーを、再生医療を目的とした幹細胞の遺伝子操作に応用すべく、本研究では発生工学的手法に基づいた基盤研究を実施した。既に、ヒト AAVS1 領域を持つトランスジェニックマウスの作製を行っており、このトランスジェニックマウス由来の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用い、ヒト AAVS1 領域特異的遺伝子組込み法のモデル実験を行った。

3. 研究の方法

(1)AAVS1 ターゲティングプラスミドの構築: AAVS1 特異的組込み介在配列には AAV ゲノム両末端の ITR と、AAVS1 特異的組込み活性を持つ Rep 蛋白質の発現をドライブする p5 プロモーター内の配列 (p5 配列) がある。ITR もしくは p5 配列をプラスミドに組み込んで

おけば、Rep を発現させることで AAVS1 へのプラスミドを組み込ませることができる。本研究では、AAVS1 でのトランスジェニックの組込みの方向が規定できる p5 配列を CMV-GFP-ires-プラストサイジン耐性遺伝子 (bsr) もしくは CMV-GFP-ires-ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hpt) カセットの上流に挿入したプラスミドを作製した。

(2)ヒト AAVS1 領域を持つトランスジェニックマウス: マウスゲノムにもヒトと同様の AAVS1 領域が存在するが、AAV のマウス AAVS1 ortholog への組込みはヒトの場合に比べ極端に低い。そこでヒト AAVS1 を持つトランスジェニックマウス 13 系統をすでに作出していたが、これらからシングルコピーの AAVS1 領域を持ち安定に次世代に継代できる系統を選び出した。

(3)iPS 細胞の作製: トランスジェニックマウスの皮膚から線維芽細胞を分離培養した。Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を発現するリプログラミング用センダイウイルスベクター (CytoTune-iPS Reprogramming kit、医学生物学研究所) を感染させ作製した。iPS 細胞かどうかの判断は、形態、未分化特異的マーカーの発現 (nanog、SSEA-1)、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色より行った。

(4)マウス iPS 細胞のヒト AAVS1 領域への遺伝子組込み: AAVS1 への組込み活性のある Rep 蛋白質の一つである Rep68 を SV40 プロモーターで発現するプラスミドと、p5 配列を持つ pCMVGFP/bsr もしくは pCMVGFP/hpt を樹立した iPS 細胞にコトランスフェクションし、プラストサイジンもしくはハイグロマイシン存在下で培養し薬剤耐性クローンを作製した。AAVS1 へ GFP プラスミドが組み込まれているかどうかの判定は、ヒト AAVS1 特異的プライマーと CMV 特異的プライマーで各クローンのゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、増幅産物が得られるかどうかで判断した。

4. 研究成果

(1)AAVS1 ターゲティングプラスミド: CMV プロモーター下に GFP、internal ribosome entry site (IRES) 下に薬剤耐性マーカー遺伝子 (bsr、hpt) を発現するカセットの上流に p5 プロモーター配列を逆向きに挿入したターゲティングプラスミドを構築した。p5 を逆向きに挿入することにより CMV プロモーターが AAVS1 へ直接つながる様に組み込まれる頻度が増すことを HeLa 細胞で確認した。

(2)ヒト AAVS1 領域を持つトランスジェニックマウス: 13 系統の中でシングルコピーの AAVS1 を保持し、しかも安定に継代できる 2 系統#1、#3 を選び出した。

(3)iPS 細胞の作製: 系統#3 の 8 週令のオスマウスの皮膚を採取し、常法に従い線維芽細胞

胞を分離、培養した。Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を発現するセンダイウイルスベクターをそれぞれ 3 CIU/cell で感染させ iPS 細胞を樹立した。代表的 iPS クローンを図 1 に示す。未分化のマーカールとされる NANOG、SSEA-1、ALP はいずれも陽性であった。

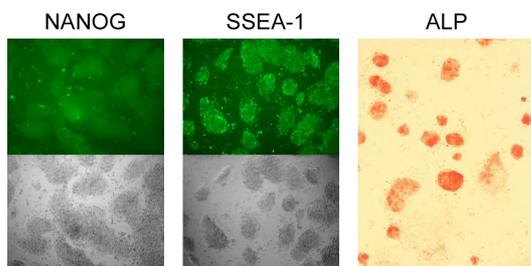


図 1. iPS 細胞の未分化マーカーの検出
NANOG、SSEA-1、ALP いずれも陽性

(4) マウス iPS 細胞のヒト AAVS1 領域への遺伝子組み込み: Rep 発現プラスミドと GFP/bsr プラスミドを iPS 細胞にコトランスフェクションし、ブラストサイジン存在下で培養を行い single cell clone を約 100 個選んだ。クローン間でばらつきはあるがいずれのクローンも GFP 陽性であった。AAVS1 へ GFP 遺伝子が組み込まれているか解析するためゲノム DNA を抽出し、CMV プライマーと AAVS1 プライマーで PCR を行い、PCR で増幅されるか検討したところ、1 クローンが AAVS1 領域に組み込まれていることが分かった。効率は低いがいPS細胞での AAVS1 特異的組み込み方法の基礎が確立したと考えられる。これまでの我々の研究によると、ヒト由来の細胞株 HEK293 細胞、HeLa 細胞での AAVS1 特異的組み込み頻度は約 10%程度であるので、プラスミドのデザイン、トランスフェクション法などの最適化が更に必要と考えられた。

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 17 件)

(1) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, and Sakata Y: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther.* 査読有, 21 巻, 2013, 318-323
DOI: 10.1038/mt.2012.258.

(2) Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa

K: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res.* 査読有, 73 巻, 2013, 364-372
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0088.

(3) Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Takahashi S, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M.: Downregulation of indoleamine-2, 3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol Rep.* 査読有, 28 巻, 2012, 1574-1578
DOI: 10.3892/or.2012.1984.

(4) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y: Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J. Thromb. Haemost.* 査読有, 10 巻, 2012, 1802-1813
DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04851.x.

(5) Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Ozawa K, and Suzuki M: Cetuximab inhibits the growth of mucinous ovarian carcinoma tumor cells lacking KRAS gene mutations. *Oncol Rep.* 査読有, 27 巻, 2012, 1336-1340
DOI: 10.3892/or.2012.1626.

(6) Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, and Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther.* 査読有, 19 巻, 2012, 476-482
DOI: 10.1038/gt.2011.183.

(7) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K, and Kume A: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice after liver-targeted gene therapy. *Neuroreport*, 査読有, 23 巻, 2012, 30-34
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834e3a87.

(8) Wang D, Saga Y, Mizukami H, Sato N, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M. Indoleamine-2, 3-dioxygenase, an immunosuppressive enzyme that inhibits natural killer cell function, as a useful target for ovarian cancer therapy. *Int J Oncol.* 査読有, 40 巻, 2012, 929-34.
doi:10.3892/ijo.2011.1295.

(9) Matsuda A, Taniwaki M, Jinnai I, Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kimura A, Tsudo M, Tohyama K, Takatoku M, and Ozawa K :

Morphologic analysis in myelodysplastic syndromes with del(5q) treated with lenalidomide. A Japanese multi-institutional study. *Leuk Res.* 査読有, 36巻, 2012, 575-80.

doi: 10.1016/j.leukres.2011.11.011.

(10) Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, and Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther.* 2012, 476-82

DOI: 10.1038/gt.2011.183.

(11) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K, Kume A.: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice after liver-targeted gene therapy. *Neuroreport.* 査読有, 23巻, 2012, 30-4.

DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834e3a87.

(12) Yoshida K, Nagai T, Ohmine K, Uesawa M, Sripayap P, Ishida Y, and Ozawa K: Vincristine potentiates the anti-proliferative effect of an aurora kinase inhibitor, VE-465, in myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 査読有, 82巻, 2011, 1884-1890.

DOI: 10.1016/j.bcp.2011.09.015.

(13) Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Urabe M, Kume A, Suzuki M, and Ozawa K: Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci.* 査読有, 102巻, 2011, 2272-7

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02099.x.

(14) Kaneda K, Kasahara H, Matsui R, Katoh T, Mizukami H, Ozawa K, Watanabe D, Isa T. Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin. *PLoS One.* 査読有, 5巻, 2011, e18452.

DOI: 10.1371/journal.pone.0018452.

(15) Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard W. J, and Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant.* 査読有, 46巻, 2011, 1557-1565.

DOI: 10.1038/bmt.2010.342.

(16) Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, and Ozawa K: Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytherapy.* 査読有, 13巻, 2011, 686-694

DOI: 10.3109/14653249.2010.542456.

(17) Yagi H, Ogura T, Mizukami H, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa H, Ozawa K, and Kume A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J. Gene Med.* 査読有, 13巻, 2011, 114-122

DOI: 10.1002/jgm.1543.

[学会発表] (計 17 件)

① Mizukami H, Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates following IV administration of AAV vectors. The 15th Annual Meeting of The American Society of Gene and Cell Therapy, 2012年5月16-19日, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

② Onishi A, AAV-vector mediated systemic delivery of interleukin-10 attenuates the progression of peritoneal fibrosis in a rat model of peritoneal dialysis. The 15th Annual Meeting of The American Society of Gene and Cell Therapy, 2012年5月16-19日, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

③ Tsukahara T, Evaluation of anti-tumor effects mediated by engineered T lymphocytes expressing a CD19 specific CAR for B cell lymphoma. The 15th Annual Meeting of The American Society of Gene and Cell Therapy, 2012年5月16-19日, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

④ Urabe M, Site-specific gene insertion of transgene by adeno-associated virus integration machinery. The 10th Annual Meeting of The International Society for Stem Cell Research, 2012年6月13-16日, Pacifico Yokohama (Yokohama)

⑤ Mizukami H, Relationship between vector dose and factor IX expression in non-human primates following administration of AAV8 vectors. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会, 2012年6月28-30日, 熊本テルサ(熊本)

⑥ Muramatsu S, AADC gene therapy for parkinson disease: long term outcomes and preliminary results of an autopsy case. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会, 2012年6月28-30日, 熊本テルサ(熊本)

⑦ Onishi A, Interleukin-10 prevents the progression of peritoneal fibrosis in an animal model of peritoneal dialysis. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会, 2012年6月28-30日, 熊本テルサ(熊本)

⑧ Tsukahara T, Genetically modified T lymphocytes targeted to CD19 mediated-

cytotoxicity for B cell lymphoma. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会, 2012 年 6 月 28-30 日, 熊本テルサ (熊本)

⑨ Urabe M, Manipulating the genome in stem cells. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会, 2012 年 6 月 28-30 日, 熊本テルサ (熊本)

⑩ Tsukahara T, Anti-tumor effects of anti-CD19 chimeric antigen receptor modified T-cells for B cell lymphoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, ロイトン札幌 (札幌)

⑪ Uehara T, A novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, ロイトン札幌 (札幌)

⑫ Mizukami H, Relationship between neutralizing Antibody and factor IX expression in non-human primates following iv administration of AAV8 vectors. The 14th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, 2011 年 5 月 19 日, The Washington State Convention Center (Seattle, USA)

⑬ Urabe M, The p5 promoter sequence of AAV genome regulates the direction of transgene insertion into the AAVS1 site. The 14th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, 2011 年 5 月 21 日, The Washington State Convention Center (Seattle, USA)

⑭ Urabe M, The role of the p5 promoter of adeno-associated virus in AAVS1-directed integration. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 2011 年 7 月 17 日, 九州大学医学部百年講堂 (福岡)

⑮ Urabe M, The p5 promoter of adeno-associated virus for AAVS1-specific integration. The XVth International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日, 札幌コンベンションセンター (札幌)

⑯ Mizukami H, Relationship between neutralizing Antibody and factor IX expression in non-human primates following iv administration of AAV8 vectors. The XVth International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日, 札幌コンベンションセンター (札幌)

⑰ Urabe M, The adeno-associated virus p5 promoter sequence mediated integration of transgene into the AAVS1 site. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 敬也 (OZAWA KEIYA)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：30137707

(2) 研究分担者

卜部 匡司 (URABE MASASHI)
自治医科大学部・医学・講師
研究者番号：40213516