

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 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790387

研究課題名（和文） トランスポゾンを用いた遺伝子治療法開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） Development of gene therapy for hemolytic anemia using iPS cells

研究代表者 三浦 由恵 (Miura Yoshie)

九州大学生体防御医学研究所 学術研究員

研究者番号：00388935

研究成果の概要（和文）：溶血性貧血疾患の治療法としては現在のところ同種造血細胞移植療法が選択されているものの、同種ドナー不足が懸念されている。これらの疾患のモデルマウスより樹立した自己細胞由来人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells；iPS細胞）を用いたこれらの疾患の遺伝子治療法モデルの開発を目的とする。野生型マウスまたは疾患モデルマウス線維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することにより iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞を最適な条件下で分化誘導し、血球系細胞の前駆細胞様細胞を得た。溶血性貧血のモデルマウスにおいて自己細胞由来の iPS 細胞を用いた病態解明、遺伝子治療法モデルが確立されれば、これらの疾患治療を考える上で重要な知見となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Pyruvate kinase (PK), especially the isozyme PKL and PKR are found in red blood cells, is an important enzyme in red blood cell metabolism. PK deficiency is one of the most common enzymatic defects of red cells. This disorder manifests clinically as anemia. The treatment of this disease includes blood transfusions or the removal of the spleen. However, the treatment usually only reduces the severity of the symptoms and does not cure it. Recently, there have been advances in cell-based therapy that show a lot promise treatment of patients afflicted with genetic and degenerative disorders. However, there are many limitations such as immunological rejection of transplanted tissue, ethical issues such as using embryonic stem cells. Induced pluripotent stem cells (iPS cells) can be established by using 4 transcription factors with mouse somatic cells *in vitro*. iPS cells can self-renew and differentiate into various types of mature tissue *in vitro*, so it is considered to be an ideal source for donor tissue. Skin fibroblast was harvested from the wild type mice and PK deficient mice. Then Yamanaka four genes were transduced into skin fibroblast using retrovirus and iPS cells were produced. iPS cells derived from wild type mice and PK deficient mice were differentiated into hematopoietic progenitor-like cells using cytokines and mouse stromal cells. iPS cell technology makes it possible to perform cell transplantation therapies for a wide variety of disease, and it can avoid ethical issues and immune rejection.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子治療、疾患特異的 iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は正常では赤血球膜上に存在する補体制御因子が欠損しているために、自己赤血球が補体により破壊されて、溶血性貧血をきたす血液疾患である。この補体制御因子である DAF/CD55、CD59 の両因子は glycosyl phosphatidyl inositol anchor (GPI アンカー) と呼ばれる共通の膜結合部分を持ち、異常赤血球はこの部分の欠損によって両因子をはじめとするすべての GPI アンカー型蛋白の発現を欠く。1993年に GPI アンカー生合成に関わる X 染色体上の遺伝子 PIG-A (PI glycan-complementation class A) がクローニングされ、この PIG-A が PNH における GPI アンカー欠損の責任遺伝子であることが報告されている (Miyata T *et al. Science*, 1993)。GPI アンカータンパク質の欠損は赤血球だけではなくすべての血球系においてみられ、また一方では正常の血液細胞もみられる。即ち PNH は後天的にある 1 つの造血幹細胞の PIG-A 遺伝子に突然変異が起き、GPI アンカー型蛋白が陰性になった後、何らかのメカニズムでクローン性に拡大することにより生ずる疾患といえる。PIG-A ノックアウト ES(embryonal stem)細胞を用いて作製したキメラマウス、PIG-A ノックアウト骨髄細胞の移植実験より PIG-A 破壊による GPI アンカー型タンパク質の欠損だけではクローンが優位性を獲得することはなく、他の要因が必要であることが示唆されている。ピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症は先天性非球形性溶血性貧血の中で最も頻度が高い疾患で、第一症例が 1961 年に発見されて以来、300 例以上が報告されてきている。1988 年から 1991 年にかけて共同研究者の谷らにより、ヒト PK cDNA のクローニングが報告され (Tani K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, Tani K *et al. Gene*, 1998, Kanno H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991)、PK 異常症遺伝子治療法開発のための基礎研究等を積極的に行ってきた。同定した PK 遺伝子変異は肝臓に発現が見られる L 型 PK 遺伝子のエクソン 10 のミスセンス変異 (1436G→A、479Arg→His) であり、この塩基置換によりスプライシング異常も来たことが予想されている。一方、PK 異常症モデルマウスは 1995 年に報告され、本疾患モデルマウスにおいてはヒトの PK 異常症と比較し網赤血球数増加と脾臓における赤血球前駆細胞数の増加、さらには著明な髄外造血が認められるのが特徴であり、重症な PK 異常症の病態を反映しているものと考えられる。今後さらに PK 異常症における赤血球崩壊の機構を詳細に検討するとともに、根

治的治療法を開発するうえでも本疾患モデルマウスは有用であると考えられる。重症の PNH 患者、PK 異常症患者に対する治療法は現在のところ同種造血細胞移植療法が選択されているものの、同種ドナー不足が懸念されている。近年、造血幹細胞を対象とした遺伝子治療法の開発がマウスレベルで、オンコレトロウイルスベクターを用いて試みられているものの (Tani K *et al. Blood*, 1994, Meza N.W. *et al. Human Gene Therapy*, 2007, Meza N.W. *et al. Mol Ther*, 2009)、遺伝子導入効率が未だ低いことに加え、安全性の観点からの十分な検証がなされておらず、実際の医療への応用はなされていない。

近年、マウスあるいはヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) が開発され (Takahashi K. *et al. Cell*, 2006&2007) 自己細胞を用いた再生医療が現実的なものとなってきている。特にマウスにおいては自己細胞より作製した iPS 細胞を用いた鎌状赤血球症モデルの治療法が報告されており (Hanna, J *et al. Science*, 2007)、ヒトにおいては筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (Dimos, J.T *et al. Science*, 2008)、脊髄性筋萎縮症 (Ebert, A.D *et al. Nature*, 2009)、I 型糖尿病 (Maehr, R *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009) 等の疾患において、疾患特異的 iPS 細胞の樹立が報告されており、これらの疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明や治療法の開発が進んでいる。申請者らはこれまでヒト ES/iPS 細胞を用いた高効率な造血幹/前駆細胞の分化誘導法開発に従事してきた。また、共同研究者の谷らはこれまでに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子導入自家腎癌細胞を用いた免疫遺伝子治療臨床研究において第 IV 期腎癌患者全例で腫瘍特異的な抗腫瘍免疫誘導と 2 例で 6 年以上の長期生存を得ている (Tani, K. *et al. Mol Ther*. 2004)。我々は既に野生型マウス胎仔および成体 (WT-F/WT-A)、PK 異常症モデルマウス胎仔および成体

(PK-F/PK-A) より皮膚線維芽細胞を採取し、オンコレトロウイルスベクターにより山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, c-myc, Klf4) を導入することで iPS 細胞様コロニーが得られている。これらの背景より、PNH や PK 異常症といった溶血性貧血のモデルとして疾患特異的 iPS 細胞を用い、トランスポゾンにより原因遺伝子の修復を試みることで溶血性貧血の遺伝子治療法開発のための基礎研究の着想に至った。

トランスポゾンは細胞内においてゲノム上の位置を転移することのできる塩基配列である。DNA が直接転移する DNA 型と、

転写と逆転写の過程を経る RNA 型がある。転移はゲノムの DNA 配列を変化させることで突然変異の原因と成り得、多様性を増幅することで生物の進化を促進してきたと考えられている。トランスポゾンには遺伝子導入のベクターや変異原として有用であり、遺伝学や分子生物学において様々な生物で応用されている。本研究では、溶血性貧血の遺伝子治療法開発の試みを非ウイルスベクターであるトランスポゾンベクターを用いて行い、従来選択されてきたレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターと比較する予定である。トランスポゾンベクターの利点は染色体への組込みによる発現の持続性である。実際にトランスポゾンを用いた細胞治療研究では、造血細胞が遺伝子組込みの対象となっており (Xue X. *et al. Blood*, 2009, Hollis R. *et al. Exp Hematol*, 2006)、これは増殖能の高い造血幹細胞や前駆細胞にトランスポゾンベクターで遺伝子を組込むことで遺伝子が組込まれた血球を多数かつ長期に供給でき高い治療効果が期待できるためである。トランスポゾン治療応用するにあたり最も懸念される問題は染色体への遺伝子組込みによる挿入変異の危険性である。この危険性を回避するために、トランスポゾンベクターの組込み位置の制御や Chromatin Insulator の導入といった解決策も研究されている。

2. 研究の目的

重症の PNH 患者、PK 異常症患者に対する治療法は現在のところ同種造血細胞移植療法が選択されているものの、同種ドナー不足が懸念されている。近年、造血幹細胞を対象とした遺伝子治療法の開発がマウスレベルで、オンコレトロウイルスベクターを用いて試みられているものの (Tani K *et al. Blood*, 1994, Meza N.W. *et al. Human Gene Therapy*, 2007, Meza N.W. *et al. Mol Ther*, 2009)、遺伝子導入効率が未だ低いことに加え、安全性の観点からの十分な検証がなされておらず、実際の医療への応用はなされていない。

近年、マウスあるいはヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) が開発され (Takahashi K. *et al. Cell*, 2006&2007) 自己細胞を用いた再生医療が現実的なものとなってきている。特にマウスにおいては自己細胞より作製した iPS 細胞を用いた鎌状赤血球症モデルの治療法が報告されており (Hanna, J *et al. Science*, 2007)、ヒトにおいては筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (Dimos, J.T *et al. Science*, 2008)、脊髄性筋萎縮症 (Ebert, A.D *et al. Nature*, 2009)、I 型糖尿病 (Maehr, R *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009) 等の疾患にお

いて、疾患特異的 iPS 細胞の樹立が報告されており、これらの疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明や治療法開発が進んでいる。これらの背景を基に、PNH や PK 異常症といった溶血性貧血のモデルとして疾患特異的 iPS 細胞を用い、トランスポゾンにより原因遺伝子の修復を試みることで溶血性貧血の遺伝子治療法開発の基礎的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

iPS 細胞の樹立および特性解析

疾患モデルマウスより皮膚線維芽細胞を採取し、レトロウイルスにより山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, c-myc, Klf4) を導入し iPS 細胞を樹立する。得られた ES 細胞様コロニーについて、以下の解析を行う。

1. マーカーの確認 :

- ・アルカリホスファターゼ染色、SSEA-1 免疫染色

- ・RT-PCR 法による ES 細胞マーカー (ERas, Fgf4, Dax1 等) の発現確認

2. in vitro/ in vivo differentiation :

- ・免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成能の確認

- ・in vitro における三胚葉各マーカーの発現確認

内胚葉 : Cytokeratin8, Cytokeratin19

中胚葉 : CD31, α -Smooth muscle actin,

外胚葉 : β -Tubulin III, Glial fibrillary acidic protein,

3. エピジェネティクス解析

Oct3/4, Nanog プロモーター領域のメチル化状態の確認

4. DNA microarray

ES 細胞様コロニーの血球細胞への分化能の検討

PK 異常症モデルマウスにおいては血液学的所見が明らかとなっており、赤血球数で正常対照と比べて約 50%、ヘモグロビン値で約 40% 以上もの著大な網赤血球増加を伴っている。PNH モデルマウス、PK 異常症モデルマウス由来の iPS 細胞の血球分化能を検討するため、各々の iPS 細胞を胚葉体形成後ストローマ細胞である OP9 細胞上で分化誘導を行う。経時的に浮遊細胞を回収し、ギムザ染色にて分化細胞の系譜をモニターする。また、フローサイトメトリー法により Flk1, c-kit, CD31, CD34, sca1 等マーカーの発現を確認し、iPS 細胞より造血幹/前駆細胞を得る最適な条件を検討する。

ベクターの構築

近年、Fanconi anaemia1 患者由来の iPS 細胞を用いて Fanconi anaemia 原因遺伝

子をレンチウイルスベクターにて修復し、正常な血球前駆細胞が誘導されたことが報告されている (Angel R et al. nature ,2009)。Gene targeting の手法としては、レンチウイルスベクター等ウイルスベクターの他に homologous recombination、zinc finger nuclease technology 等が知られている。本研究では従来遺伝子治療研究に用いられてきたレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターのほかに、非ウイルスベクターで構築が簡便なトランスポゾンベクターを使用する。pT2AL200R175-CAG-GFP (国立遺伝学研究所 川上浩一教授より分与)を用い、定法に従い正常 PIG-A 遺伝子、PK 遺伝子を発現するベクターを構築する。

iPS 細胞へのベクターの導入、導入条件の検討

構築した各種ベクターを用い、エレクトロポレーション法にて iPS 細胞またはマウス皮膚線維芽細胞にベクターを導入する。導入条件を予め検討しておく。レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、トランスポゾンベクターは染色体挿入型ベクターであるため、遺伝子導入後 LAM-PCR 法等で挿入部位の検討を行い、効率よく正常造血幹細胞が得られることを指標として遺伝子修復効率の検討を行う。適宜ベクターの改善を行う。遺伝子導入が行われた細胞を用いて、DNA シークエンシング等の手法を用いて変異遺伝子の修復が行われていることを確認する。皮膚線維芽細胞に遺伝子導入を行った場合は、修復が確認された後レトロウイルスを用いて iPS 細胞を誘導する。

造血幹/前駆細胞への分化誘導

検討した最適分化誘導条件を元に、修復 iPS 細胞より造血幹/前駆細胞を誘導する。この際、野生型マウス由来 iPS 細胞をコントロールとし、修復 iPS 細胞の血球細胞分化誘導能が野生型と同等であることを確認する。また、また疾患モデルマウス骨髓細胞より造血幹細胞分画を分離し各種ベクターにて遺伝子導入を行い、血球分化能を検討する。得られた修復造血幹細胞を放射線照射した疾患モデルマウスに移植し、治療モデルの確立を目指す。て iPS 細胞を誘導する。

4. 研究成果

野生型 (WT) および pyruvate kinase (PK) 欠損マウス胎児より皮膚線維芽細胞を採取後、レトロウイルスにより山中 4 因子 (Klf4, Oct3/4, c-Myc, SOX2) を導入し、iPS 細胞の樹立を試みた (図1)。iPS 細胞誘導に先

立ち、WT マウス、PK 欠損マウス胎児より得られた線維芽細胞を用いて genotyping を行い、PK ホモ欠損であることを確認した (図2)。レトロウイルスベクターによる山中 4 因子導入により得られた ES 細胞様のコロニーは、アルカリホスファターゼ染色陽性であり、

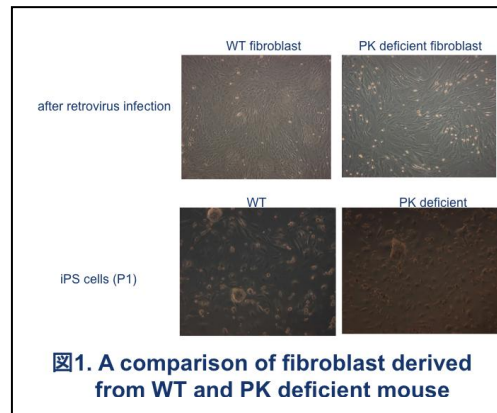


図1. A comparison of fibroblast derived from WT and PK deficient mouse

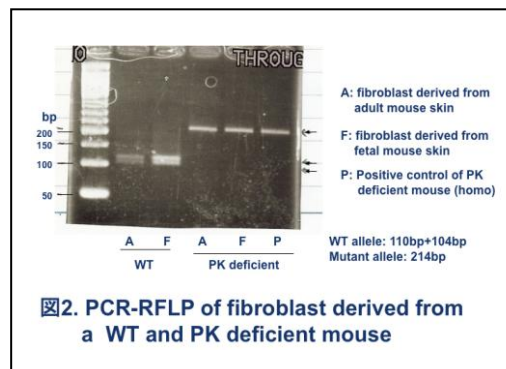


図2. PCR-RFLP of fibroblast derived from a WT and PK deficient mouse

蛍光免疫染色法により SSEA-1 陽性、Nanog 陽性であった。また、RT-PCR 法により Dax1, Eras 等の ES 細胞マーカーが検出され (図3)、レトロウイルスベクター由来の外因

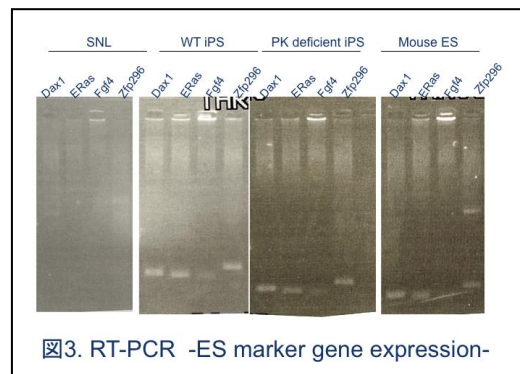


図3. RT-PCR -ES marker gene expression-

性遺伝子は消失しており、内因性の Klf4, Oct3/4, c-Myc, SOX2 の発現が確認された。免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成試験により、in vivo にて三胚葉への分化の確認を行い iPS 細胞の特性解析を行った。さらに、非ウイルスベクターで構築が簡便なトランスポゾンベクターを用い、正常 pyruvate kinase LR 遺伝子を発現するベクターを構築した。得られた WT マウス胎児由

来iPS細胞を用いて、血球細胞への分化誘導を行った。胚葉体(EB)形成8-12日目にOP9細胞上に再播種し、mVEGF, mIGFIIを含む分化誘導培地で5日間培養した。その後、mSCF, mIL-3, dexamethasone, hEPOを含む培地に置き換えさらに5日間培養し、MACS beadsを用いてCD71陽性細胞を分取した。フローサイトメトリー法によりCD71陽性細胞の割合を測定したところ、その割合は40-60%で



あった。CD71陽性細胞にmicroporatorにてGFPをレポーターとする遺伝子治療用ベクターを導入し、レトロネクチンコートしたプレート上に培養したOP9細胞上に播種した。播種5-7日後、GFP陽性細胞コロニーを顕微鏡下でピックアップし(図4)、ピックアップしたGFP陽性細胞コロニーをmSCF, mIL-3, dexamethasone, hEPO, mIL-6, seleniumを含む分化誘導培地上でOP9細胞と共培養した。21日後、CD71陽性、ter119陽性細胞の割合をフローサイトメトリー法にて測定したところ、その割合は約30%であった。トランスポゾンベクターは、哺乳類染色体への遺伝子組込みが可能であり、特定の位置に組込まれるものは報告されていないものの、転写活性化している遺伝子やヘテロクロマチン等、染色体の状態による影響は受けるため、組込まれる位置は完全にランダムというわけではない。治療を目的とした場合、挿入変異の危険性を回避することが必要であり、現在のところ臨床応用を目指した安全性の改善に向けた研究も進行しているため、マウスを用いた本研究の知見をヒトに応用できることが期待できる。また、溶血性貧血のモデルマウスにおいて自己細胞由来のiPS細胞を用いた病態解明、遺伝子治療法モデルが確立されればこれらの疾患治療を考える上で重要な知見となる可能性がある。

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3件)

(1) Maeda M et al. (10人中7番目)
Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestosexposed patients. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 45

795-803, 2011

DOI: 10.1165/rcmb.2010-04350C

(2) Maeda M et al. (10人中7番目) Reduction of CXCR3 in an in vitro model of continuous asbestos exposure on a human T-cell line, MT-2. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 45 470-479, 2011 DOI: 10.1165/rcmb.2010-02130C

(3) Liao J et al. (16人中10番目) Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol. Ther.* in press, 2013

[学会発表] (計6件)

(1) Kawano H et al. LYL1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Promotes Hematopoietic Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting 2011年5月18日~24日 米国

(2) Yamaguchi S et al. Oncogenic risk of induced pluripotent stem cells established from somatic cells with chromosome instability. American Society of Gene and Cell Therapy, 14th Annual Meeting 2011年5月18日~24日 米国

(3) Kawano H et al. A basic helix-loop-helix transcription factor Lyl1 regulates hematopoietic differentiation of common marmoset ES cells. 第17回日本遺伝子治療学会 2011年7月15日~17日

(4) Nii T et al. Efficient Differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells Into Hemangioblast-Like Cells by the Inhibition of PI3K-AKT Pathway. 53th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition 2011年12月10日~13日 米国

(5) Liao J et al. Efficient generation of induced pluripotent stem cells by the use of Pten inhibitor. International Society for Stem Cell Research, (ISSCR), 10th Annual Meeting 2012年6月13日~16日

(6) Tahara M et al. SIX IN A SINGLE PARTICLE: NOVEL NON-TRANSMISSIBLE MEASLES VIRUS VECTOR FOR DELIVERY OF SIX GENES ALL TOGETHER. 第18回日本遺伝子治療学会 2012年6月28日~30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 由恵 (Miura Yoshie)

研究者番号: 00388935

九州大学生体防御医学研究所
学術研究員