

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461460

研究課題名(和文) 血友病Aに対する有効な遺伝子治療法の開発を目指した基礎的検討

研究課題名(英文) Development of gene therapy approaches towards hemophilia A

研究代表者

水上 浩明 (Mizukami, Hiroaki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20311938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血友病Aの遺伝子治療を目指して、凝固第Ⅷ因子の遺伝子をAAVベクターに搭載して発現させる検討を行った。この遺伝子は全長で約9kbあり、そのままではAAVベクターに搭載することはできないことから必須の部分のみに短縮し、短く肝臓特異的なプロモーターを用いてベクターを構築した。その結果、*in vitro*でもマウスを用いた検討でも凝固第Ⅷ因子の活性が得られた。しかしながらその産生効率は野生型相当の長さを持つものに比べて有意に低下しており、より短くかつ十分な発現が期待できるプロモーターの使用が望ましいものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tested the efficacy of factor VIII expression using AAV vectors to achieve gene therapy for hemophilia A. As the length of factor VIII gene exceeds the packaging capacity of AAV, we constructed vectors using essential parts of factor VIII gene, combined with short, liver-specific promoter. Expression of factor VIII were achieved both *in vitro* and *in vivo* (mouse) experiments. On the other hand, the efficiency of vector production was much lower than the regular sized vectors. Further investigation is required to optimize the vector structure, mainly testing shorter promoter elements to improve the vector production rate.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：AAVベクター 血友病 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは安全性が高く、近年さまざまな領域で臨床応用が始まり、効果がもたらされている。血友病遺伝子治療においても、8型などの血清型に基づくベクターの有効性が高く、これまで2型などを用いて効果不十分であった臨床研究が成功を収めるに至っている。実際、最近英国と米国の二施設共同で行われた血友病Bの臨床研究においては、8型ベクターの静注により治療域に達する効果が得られている。一方で、より対象者の多い血友病Aに対しては、各種のベクターを用いた様々な方法が提唱されているものの、凝固第 因子の遺伝子は第 因子に比べて長いことなどから、そのまま単一のベクターに搭載するのは難しいことが問題となっており、AAV ベクターを用いて血友病Aに対する遺伝子治療を進めていくためには、この点を解決する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では血友病Aの遺伝子治療の実現に向けて最適な方法を探索することを目指した。AAV ベクターは4.7kbの遺伝子を持つ野生型に由来する。一方、第 因子遺伝子はエクソン部分のみでも全長が約7kbあり、そのままではAAVベクターに搭載可能な長さを超えている。この点を克服するため、第 因子の軽鎖・重鎖の構成要素であるA1,A2,A3及びC1,C2のドメインのみを採用し、B領域は取り除いた、いわゆるB Domain Deleted(BDD)型の第 因子遺伝子を用いて、単一のAAVベクターとしての作製効率を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

凝固第 因子に必須な遺伝子部分のみを取り出した、いわゆるBDD型の遺伝子に加えて、全長の短いプロモーターを用いてベクターを構築し、作製効率を検討した。AAVベクターの作製効率に関しては、野生型の4.7kbを少し上回るところまでは影響はないものの、5kbを超えると急激に低下するとされる。しかしながらベクターに搭載した遺伝子の長さで作製効率の関係は十分に明らかになっているとはいえないことから、この点を検討した。ベクターの作製効率に関しては用いる血清型によっても違いが認められ、制限長を超えた場合の作製効率の低下に関しても血清型によって異なる可能性があることから、この点も比較検討した。

4. 研究成果

血友病Aの遺伝子治療に向けた基礎的検討として、凝固第 因子の遺伝子をAAVベクターに搭載して効率良く発現させることを目指して検討を行った。凝固第 因子の遺伝子はいわゆるBDDタイプの遺伝子(4.4kb)を用い、単一のベクターによる肝臓への遺伝

子導入を目指したところ、BDD型の遺伝子に肝臓特異的なプロモーターを短縮して組み合わせたベクターが好適と考えられ、*in vitro*のみならずマウスを用いた検討でも凝固第 因子の活性が得られた。AAVベクターの作製効率に関しては、ベクター長との関連が大まかに知られており、ベクターの全長が野生型に相当する4.7kbを超えた場合、作製効率が低下する傾向があることが知られている。血友病Bに対する遺伝子治療法の開発に際して使用した肝臓への特異性の高いプロモーターを搭載すると5.4kbのベクター長となり、発現効率は良好であるものの、その産生効率は野生型相当の長さを持つものに比べて有意に低下していた。また、血清型による違いに関しては明らかな差は認められなかった。治療法として開発を進めていくためには、より短く、かつ十分な発現が期待できるプロモーターの使用が望ましく、今後更に検討を要するものと考えられた。

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 10 件)

Takahashi, Y., Saga, Y., Koyanagi, T., Takei, Y., Machida, S., Taneichi, A., Mizukami, H., Sato, Y., Matsubara, S., Fujiwara, H.: Vasohibin-1 expression inhibits advancement of ovarian cancer producing various angiogenic factors. **Cancer Sci** 107: 629–637, 2016.

doi:10.1111/cas.12911.

Maeda, M., Fukuda, S., Kameda, H., Murabe, N., Isoo, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Sakurai M.: Corticospinal axons make direct synaptic connections with spinal motoneurons innervating forearm muscles early during postnatal development in the rat. **J Physiol**, 594:189-205, 2016. doi:10.1113/JP270885.

Hidema, S., Fukuda, T., Hiraoka, Y., Mizukami, H., Hayashi, R., Otsuka, A., Suzuki, S., Miyazaki, S., Nishimori, K.: Generation of *Oxtr* *cDNAHA-Ires-Cre* Mice for Gene Expression in an Oxytocin Receptor Specific Manner. **J Cell Biochem**, 117:1099-1111, 2016.

doi:10.1002/jcb.25393.

Kasahara, T., Takata, A., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, A.,

Mizukami, H., Kaneda, D., Ozawa, K., Kato T.: Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. **Mol Psychiatr**, 21:39-48, 2016.

doi:10.1038/mp.2015.156.

Sadakane, O., Masamizu, Y., Watakabe, A., Terada, S., Ohtsuka, M., Takaji, M., Mizukami, H., Ozawa, K., Kawasaki, H., Matsuzaki, M., Yamamori, T.: Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates. **Cell reports**, 13:1989-99, 2015.

doi:10.1016/j.celrep.2015.10.050.

Sadakane, O., Watakabe, A., Ohtsuka, M., Takaji, M., Sasaki, T., Kasai, M., Isa, T., Kato, G., Nabekura, J., Mizukami, H., Ozawa, K., Kawasaki, H., Yamamori, T.: In Vivo Two-Photon Imaging of Dendritic Spines in Marmoset Neocortex (1,2,3). **eNeuro**, 2:e0019-15, 2015.

doi:10.1523/ENEURO.0019-15.2015.

Takahashi, Y., Saga, Y., Koyanagi, T., Takei, Y., Machida, S., Taneichi, A., Mizukami, H., Sato, Y., Matsubara, S., Fujiwara, H.: The angiogenesis regulator vasohibin-1 inhibits ovarian cancer growth and peritoneal dissemination and prolongs host survival. **Int J Oncol**. 47:2057-63, 2015.

doi:10.3892/ijo.2015.3193.

Kamiyama, T., Kameda, H., Murabe, N., Fukuda, S., Yoshioka, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Sakurai, M.: Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. **J Neurosci**, 35:1181-91, 2015.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.2842-13.2015.

Tsukahara, T., Iwase, N., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Yasushi, S., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., Ozawa, K.: The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for

B-cell malignancies. **Gene Ther**, 22:209-15, 2015. doi:10.1038/gt.2014.104.

Watakabe, A., Ohtsuka, M., Kinoshita, M., Takaji, M., Isa, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Isa, T., Yamamori, T.: Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. **Neurosci Res**, 93:144-57. 2015. doi:10.1016/j.neures.2014.09.002.

〔学会発表〕(計 3 件)

Mizukami H., Ohmori T, Uchibori R, Tsukahara T, Saga, Y, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K.: Long-term efficacy of factor IX gene expression following AAV8-mediated liver transduction in macaques, 日本遺伝子治療学会, 2015/7/25, 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

Mizukami H., Ohmori T, Uchibori R, Tsukahara T, Saga, Y, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K.: Long-term expression of coagulation factor IX gene transduced by AAV8 into macaques, 日本血液学会, 2015/10/17, 石川音楽堂他(石川県金沢市).

Mizukami H., Ohmori T, Uchibori R, Tsukahara T, Saga, Y, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K.: Persistent factor IX expression following AAV8-mediated liver transduction in macaques, 欧州遺伝子細胞治療学会, 2015/9/17, ヘルシンキ(フィンランド).

〔図書〕(計 2 件)

Ohmori T, Mizukami H., Ozawa K, Sakata Y, Nishimura S. Wiley. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. **J Thromb Haemost**. 2015, 13 Suppl 1, S133-42.

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共 通)

Mizukami H, Mimuro J, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K. Springer. AAV Vector-mediated Liver Gene Therapy and its Implementation for Hemophilia. Gene Therapy and Cell Therapy through the Liver, Current Aspects and Future Prospects (Terai S. and Suda T. Eds). 2015, 59-73

〔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

<http://www.jichi.ac.jp/laboratory/molecula/gene/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水上浩明 (MIZUKAMI Hiroaki)

自治医科大学・遺伝子治療研究部・教授

研究者番号：20311938

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし