

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893164

研究課題名(和文)重症遺伝性赤血球異常症の治療モデルとしてのPK異常症への遺伝子治療法の検討

研究課題名(英文) Study of the gene therapy for pyruvate kinase abnormality as a model of therapy for serious heredity erythrocyte disease.

研究代表者

鶴田 敏久 (Tsuruta, Toshihisa)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70197771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ピルビン酸キナーゼ異常症(PKD)に対する新規遺伝子治療法の開発に向けて、PKDマウス由来iPS(PKD-iPS)細胞の有用性を検討した。

樹立したPKD-iPS細胞において、モデルマウスで認めたDNA変異を認めた。また、赤血球に分化誘導したところ、分化誘導可能であったが、その数は野生型に比べて減少傾向にあることが明らかとなった。さらに、変異PKLR遺伝子の修復に用いるガイドRNA/Cas9発現ベクター及び遺伝子修復用ドナーベクターを構築した。これらのベクターをiPS細胞に導入するための条件検討を行い、ゲノム編集に必要とされる遺伝子導入効率40%を上回る導入効率(50%)を実現した。

研究成果の概要(英文)：We examined the utility of the pyruvate kinase deficiency (PKD) mouse origin iPS (PKD-iPS) cell towards development of the new gene therapy to PKD.

In the established PKD-iPS cell, we found the same DNA variation that is existed in the cells of model mouse. The iPS cells were be able to differentiate to the erythroid cells, but the number of erythrocytes were decreased compared with cells from the wild-type iPS cells. Furthermore, we made the guide RNA / Cas9 gene expression vector and the donor vector for repairing the varied PKLR gene. To transfer these vectors into iPS cells efficiently, we examined the transgene efficiency, and get transfer efficiency 50% that is exceeding 40% of the transgene efficiency needed for genome edit.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 赤血球異常 造血幹細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

赤血球酵素異常症では赤血球機能を保つために重要な代謝系酵素の質的ないし量的な異常により溶血性貧血を来す。重症型では出生時より高度の溶血を来し、生涯にわたり頻回の輸血を必要とする例も多い。唯一の根治療法として同種造血幹細胞移植術が行われてきたが、同療法では移植片対宿主病などの合併症等の問題が懸念されている。

2. 研究の目的

本研究では重症型の赤血球解糖系酵素異常症の中で最も頻度の高いピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症に着目し、本疾患に対する根治療法の開発を目的として、PK 異常症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 (iPS 細胞) を用いて、ゲノム編集により異常 PK 遺伝子を修復、遺伝子修復後の iPS 細胞を造血幹/前駆細胞に分化誘導し、モデルマウスに自家移植 (造血幹細胞移植) し、重症 PK 異常症の遺伝子治療法の開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

これまでの研究で野生型マウス (WT 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山中 4 因子を導入する事により iPS 細胞を樹立し、血球細胞への分化誘導を行い、血球系細胞の前駆細胞様細胞を得る事ができた。

本年度は PK 欠損マウス由来 iPS 細胞を樹立して同様の検討を行った。また、正常 PKLR 遺伝子を発現するベクターを PK 欠損マウス由来 iPS 細胞に導入し、遺伝子治療モデルを確立する。さらに、近年その有用性が注目されている CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて、変異 PKLR 遺伝子を正常 PKLR 遺伝子に置き換える事による遺伝子治療の方法を確立する。PK 欠損マウス由来 iPS 細胞の PKLR 遺伝子の修復が確認できれば、血球細胞系への分化誘導を行い、WT マウスとの比較を行う。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できれば、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。

4. 研究成果

ピルビン酸キナーゼ異常症 (PKD) に対する新規遺伝子治療法の開発に向けて、PKD 疾患モデルマウス、及び細胞治療に供する PKD マウス由来 iPS (PKD-iPS) 細胞の有用性を検討した。これまでの研究で、野生型マウス線維芽細胞にレトロウイルスベクターによって山中 4 因子を用いて誘導した iPS 細胞について、血球細胞への分化誘導を行い、血球系細胞の前駆細胞様細胞を得ることができた。今回我々は、PKD 疾患モデル (PK-1) マウスの確認、PKD-iPS 細胞の樹立と赤血球への分化誘

導及びゲノム編集のためのベクターの構築を試みた。

(1) PK-1 マウスの表現型を解析した。野生型マウスでは見られない DNA 変異を PK-1 マウスで認めた。また、4 週齢と 8 週齢マウスを用いて血中赤血球数を測定したところ、4 週齢の時点で野生型マウスに比べ有意な赤血球数の減少を認めた (Fig.1)。

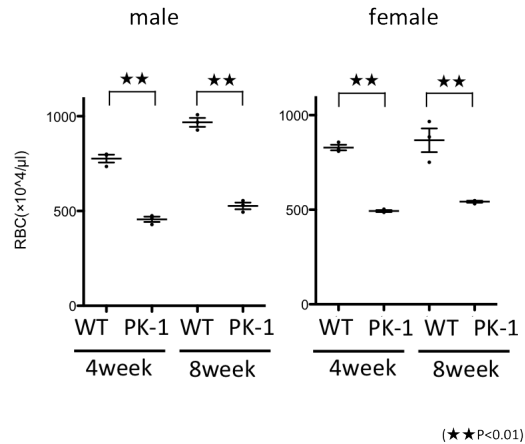


Fig.1 血中赤血球数

さらに脾臓を比較すると、PK-1 マウスの脾臓は野生型に比べ肥大しており (Fig. 2)、HE 染色により、溶血が起こっている様子が観察できた。

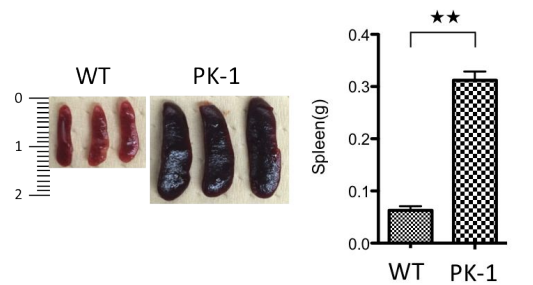


Fig.2 脾臓解析

マウスの末梢血、骨髄、脾臓それぞれについて赤血球マーカーである Ter119 と CD71 の発現を確認したところ、野生型マウスでは成熟赤血球 (Ter119+細胞) が多く、PK-1 マウスでは未熟な赤血球 (Ter119+CD71+) が多かった (Fig. 3)。

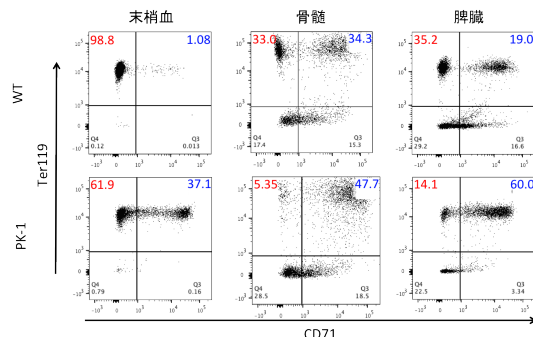


Fig.3 末梢血、骨髄、脾臓における赤血球マーカーの発現

(2) レトロウイルスベクターを用いて山中4因子を導入して樹立したPKD-iPS細胞についてDNA変異を確認したところ、マウスで確認されたDNA変異をPKD-iPS細胞でも認めた (Fig. 4)。

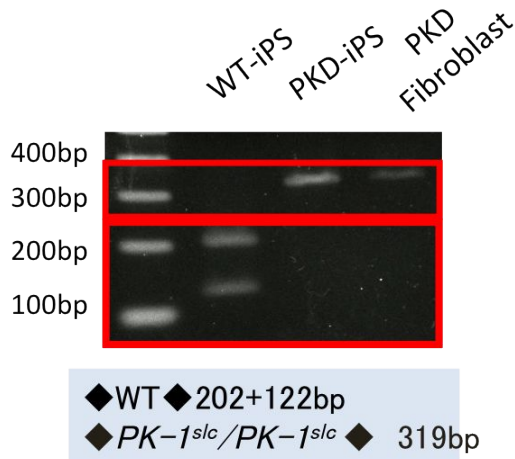


Fig. 4 DNA変異

このPKD-iPS細胞を適切な培養環境で赤血球に分化誘導したところ、FACS解析及びギムザ染色により赤血球に分化誘導可能であったが、その数は野生型に比べて減少傾向にあることが明らかとなった (Fig 5)。

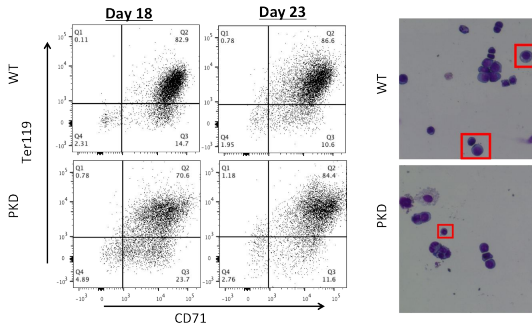


Fig. 5 PKD-iPS細胞を用いた赤血球への分化誘導

(3) ゲノム変異 PKLR 遺伝子の修復に用いるガイド RNA/Cas9 発現ベクター及び遺伝子修復用ドナーベクターを構築した。

ガイドRNAは遺伝子変異を持つエクソンの上流と下流のイントロンにそれぞれ1種類ずつデザインした。また、遺伝子修復された細胞を効率良く選択するために、イントロン部分に薬剤選択用マーカー (ネオマイシン耐性遺伝子など) が挿入されるようドナーベクターを設計した。

これらのベクターをiPS細胞に導入するための条件検討を行った。導入効率を評価するために、トランスフェクションした細胞をMEF上で2日間培養し、GFP発現細胞の割合を評価したところ、ゲノム編集に必要なとされる遺伝子導入効率40%を上回る導入効率(50%)を実現でき (Fig. 6)、この時の条件で今後のトランスフェクションを行う事に決定した。

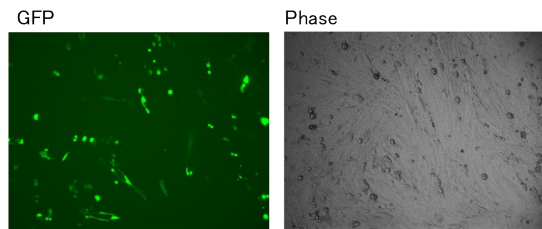


Fig. 6 GFP搭載ベクターの導入効率

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

鶴田 敏久 (TSURUTA, Toshihisa)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：70197771

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：