

7, 8, 9型が次善と考えられた。但し肝臓において意図しない発現が見られることから、8, 9型を用いる際には注意が必要と考えられる。サルにおいても骨格筋に対してはこれまでのところ1型が最も有効であった。現時点では分子基盤は不明であるが、1型のベクターと骨格筋の間には高い親和性があるものと考えられる。一方、肝臓を標的とした場合には8, 9型を用いることでマウスにおいて高い効果が認められており、8型に関しては更にイヌでも高い効果が報告されていることから、霊長類においても同様の傾向が見られるものと期待して検討を行った。しかしながら投与量を上げて期待したほどの効果は得られなかった。このため、遺伝子導入・発現の過程に阻害的に働く因子の解析を行った。これまでのところ注入前の中和抗体の力価及び導入遺伝子産物に対する免疫反応は明らかでなく、8型のベクターの効果には種特異性が存在する可能性がある。一方、9型を用いることで霊長類においても効果が期待できる可能性もあることから、この点についても検討に着手している。

脂肪組織を標的とする方法では8型を用いて検討を行った結果、治療域に達する凝固第IX因子の血中濃度が得られたものの、肝臓における発現が大部分を占めていることが判明した。8型を用いた場合には脂肪組織に特異的な発現を期待することは困難と考えられたため、1型を用いて投与量を増加させるなどの検討を行ったものの、効果は不十分であった。エリスロポエチンなどとは異なり凝固第IX因子を用いた場合には脂肪組織における導

入遺伝子産物の合成・修飾・分泌のいずれかの過程で効率が悪いものと考えられた。

最近、導入遺伝子の発現と免疫反応の関係が認識されるようになってきており、たとえ低力価であっても中和抗体が存在することで影響が出ることを示唆されている。今回霊長類医学センターのサルを用いた検討では、1型の抗体価陽性例は散見されるものの、中和抗体の陽性例は少なかった。1型はサルに由来すると考えられており、これまでの報告にほぼ合致している。8, 9型に関してはまだ報告はないものと思われるが、実際の臨床応用を視野に入れた場合、ヒト及びサルにおける抗体の陽性率は重要な意味を持つてくるものと思われる。遺伝子導入の効果に関しては種による大きな違いが存在する可能性もあり、この点についても今後の検討が必要である。

樹状細胞に対する遺伝子導入効率に関しては、5型を用いた場合に顕著な結果が認められた。導入遺伝子の発現を担保するという視点からすると5型以外のベクターを用いることが望ましいと考えられるが、免疫遺伝子治療やワクチン開発などのように免疫反応を積極的に利用する領域において応用が期待できる知見と考えられる。

血友病Bに対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的として2型AAVを用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても長期的な効果は認められなかったと最近報告されている。また、より患者数の多い血友病Aの場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるも

のと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いて検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果を挙げていきたい。

E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。以上の技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発に通じることが期待される。

F. 研究発表 (原著論文)

Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med (in press)*

Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther (in press)*

Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y.,

Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res (in press)*

Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther (in press)*

Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.

Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.

Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.

Liu, Y., Okada, T., Sheykholslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.,

Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.

Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.

Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-70, 2005.

Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Matsushita, T., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 113: 54-8, 2005.

G. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

第3世代レンチウィルスベクターを用いた血友病A遺伝子治療（イヌモデル）
および肝臓外肝細胞移植による肝組織新生の試み

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

研究要旨；血友病Aの cure という観点から、患者が第VIII因子製剤による補充療法に依存するのではなく、自らの生体内で一定の第VIII因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減～脱却を計ることを目的とする。これにより、患者自身のQOLが著明に改善するのみならず、血液製剤由来の既知・未知の感染性病原体伝搬問題の解決や、非常に高価な第VIII因子製剤の使用量の大幅な減少などが期待できる。

これまで第VIII因子ノックアウトマウスを用いたほとんどすべての遺伝子治療の研究は導入遺伝子産物の低発現と第VIII因子インヒビターの発生により、十分な治療効果がえられていない。今回、従来のベクターの作製法に改良を加え、免疫機構が未成熟と考えられる新生仔マウスに第VIII因子遺伝子を組み込んだレンチウィルスベクターを投与した。肝特異的プロモーターを有するベクターを静脈内投与した群では5/6に第VIII因子活性をみとめた。3匹のマウスで70日以上にわたって第VIII因子活性を検出した。これらの実験結果から、レンチウィルスベクターの新生仔マウスへの投与により、インヒビターを発生することなく、長期間にわたって第VIII因子を発現しうることを初めて証明した。ベクターのプロモーターの種類および投与経路が免疫寛容の導入に際して重要であることも証明された。

またこれまでわれわれは、野生型マウスから分離した肝細胞を細胞外マトリックスとともに第VIII因子ノックアウトマウスの腎被膜下や機能的血管ネットワーク構築後の皮下に移植し肝 tissue engineering を行ったところ、治療レベル（5-10%）の第VIII因子活性を獲得することを明らかにしてきたが、今回、移植治療に用いる肝細胞を調達する手法を確立することを目的として、uPA/SCID マウスを分離肝細胞の増殖プラントとして利用する方法に取り組んだ。マウスあるいはイヌ正常肝細胞はuPA/SCID マウスの肝臓に移植したところ、移植細胞は持続増殖し、uPA/SCID マウス肝のほぼ全てを置換し得ること明らかにした。さらにイヌ肝細胞により肝臓を置換したuPA/SCID マウスの血漿中にはイヌ由来の第IX因子抗原を検出した。これらの実験結果は、肝細胞を利用した新たな血友病治療法の確立と、特異的機能を保持した状態で、肝細胞を増殖するシステムを確立したことを意味している。

A. 研究目的

血友病Aは、X染色体（Xq28）に存在する血液凝固第VIII因子遺伝子の異常に起因する先天

性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第VIII因子濃縮製剤を出血時あるいは予防

的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計る、という補充療法を主体とする血友病の care である。今後さらに進めた血友病 A の cure という観点から、患者が第 VIII 因子製剤による補充療法に依存するのではなく、自らの生体内で一定の第 VIII 因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減～脱却を計ることを目的とする。これにより、患者自身の QOL が著明に改善するのみならず、血液製剤由来の既知・未知の感染性病原体伝搬問題の解決や、非常に高価な第 VIII 因子製剤の使用量の大幅な減少などが期待できる。これを達成するため、われわれはレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療、および肝細胞移植の研究をすすめてきた。

これまで第 VIII 因子ノックアウトマウスを用いたほとんどすべての遺伝子治療の研究は導入遺伝子産物の低発現と第 VIII 因子インヒビターの発生により、十分な治療効果がえられていない。これらの結果は持続的に高発現の得られるベクターシステムの開発および第 VIII 因子インヒビター発生メカニズムの解明とその克服が重要な課題であることを示している。今回、われわれは第 3 世代レンチウイルスベクターを免疫機構が未成熟と考えられる新生仔マウスに経静脈的に投与し、第 VIII 因子に対する免疫寛容が獲得されるか否かを検討した。

また昨年度の研究において、われわれは成熟マウスから分離した成熟肝細胞を用いた肝 tissue engineering の手法を確立した。具体的には、細胞外マトリックスと機能的血管ネットワークを構築することにより、皮下や腎被膜下において 300 日を超えて半永久的に安定して機能する肝組織を作製する手法である。さらにわれわれは、この肝 tissue engineering の手法は血友病治療における新規治療法となり得ることをマウスの実験系において示し得た。血友病 A のモデルマウスに

野生型マウスから分離した肝細胞を移植し肝 tissue engineering を行ったところ、治療レベル (5-10%) の第 VIII 因子活性を獲得することを明らかとした。この肝 tissue engineering ならびにそれを用いた血友病治療法の確立は、世界に類をみない新しいアプローチであり、この手法により肝外部位において肝組織を長期に安定して機能せしめることが可能となり、血友病治療における有効な手段であることを証明した。実際の肝細胞移植の臨床応用に際し問題となるのは、これまでの培養法等において分離肝細胞を継代増殖する手法が存在しないことである。そこで、今年度は uPA/SCID マウスを分離肝細胞の増殖プラントとして利用する方法に取り組んだ。

B. 研究方法

1) 第 3 世代レンチウイルスベクターを用いた新生仔血友病 A マウスの遺伝子治療

(カナダ・クイーンズ大学と共同研究)

細胞培養プレートへの poly-L-lysine のコーティング、Chen-Okayama トランスフェクション法、酪酸ナトリウムおよび無血清培地を用いた方法を用いて、B ドメイン欠失イヌ第 VIII 因子遺伝子を組み込んだ第 3 世代レンチウイルスベクターを作成した。肝特異的プロモーター (HCR-hAAT) を有するベクター (hAAT-cFVIII-LV) および CMV プロモーター制御下のベクター (CMV-cFVIII-LV) の 2 種類を作製した。これらのベクターを日齢 2 以内の新生仔 Balb/c 血友病 A マウスに静脈内 (経側頭静脈的)、腹腔内および皮下の 3 経路で投与し、第 VIII 因子の発現およびインヒビター発生率を検討した。

2) uPA/SCID マウスを用いた肝細胞の増殖

(奈良県立医科大学 消化器・総合外科学教室および 広島県産業科学技術研究所との共同研究)

アルブミンエンハンサープロモーター下に

ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを肝臓特異的に発現するトランジェニックマウスを免疫不全マウスである SCID マウスと交配した uPA/SCID マウスは肝臓特異的に産生される uPA により持続的な肝障害を発生する。この肝臓に uPA を産生しない野生型の肝細胞を移植すると、移植肝細胞の選択的な増殖が誘導され、このトランジェニックマウスの肝臓の大部分あるいはほぼ全体を占めるまでの増殖が可能となる。SCID マウスをベースにしているため、allogeneic なマウス肝細胞のみならず、xenogeneic なイヌやヒト肝細胞もこのシステムを用いた増殖が可能と推測される。今回、基礎的実験としてマウスから分離した正常肝細胞ならびにイヌ正常肝細胞を uPA/SCID マウスの肝臓に移植し、移植細胞の増殖形態ならびに uPA/SCID マウスの肝臓の形態的变化について検索を行った。イヌ肝細胞を用いた実験においては、マウス体内において移植し増殖したイヌ肝細胞から産生される血液凝固第 IX 因子を検索した。さらに、マウス肝細胞を用いた実験系においては、移植したマウス肝細胞により占拠された uPA/SCID マウス肝より肝細胞を分離し、ドナーとして使用したマウスと同系マウスの腎被膜下に移植し、uPA/SCID マウス内にて増殖した肝細胞の機能的な評価を行った。

C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

1) 第3世代レンチウイルスベクターを用いた新生仔血友病 A マウスの遺伝子治療

hAAT-cFVIII-LV の静脈内投与群では 6 匹のマウスのうち 5 匹に第 VIII 因子活性をみとめた。3 匹のマウスでは 70 日以上にわたって第 VIII 因子活性を検出した。腹腔内および皮下投与群では第 VIII 因子活性は検出されなかった。また静脈内投与群ではインヒビターは発生しなかったのに対し、腹腔内および皮下投与群ではすべてのマウスがインヒビターを発生した。CMV-cFVIII-LV を静脈

内投与したものでは、第 VIII 因子活性は検出されず、5 匹のうち 4 匹にインヒビターを検出した。これらの実験結果から、レンチウイルスベクターの新生仔マウスへの投与により、インヒビターを発生することなく、長期間にわたって第 VIII 因子を発現しうることを初めて証明した。ベクターのプロモーターの種類および投与経路が免疫寛容の導入に際して重要であることも証明された。ウイルスベクターの全身投与については、遺伝子付加に伴う癌遺伝子の活性化や生殖細胞への影響など解決すべき問題点は多いが、インヒビターの発生を回避する手段として、血友病 A の新生児（仔）に対する治療は今後も考慮され、発展されるに値するものと考えられた。

2) uPA/SCID マウスを用いた肝細胞の増殖

allogeneic なマウスの肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、移植 5 週間後には、uPA/SCID マウスの肝臓を構成するほぼ全ての肝細胞が移植した肝臓に置換していることを確認した。この実験において増殖置換したマウス肝細胞を分離/精製し、ドナーと同系マウスの腎被膜下に移植した。その結果、腎被膜下において 100 日を超えて安定して生着し、小肝組織を作製していた。

イヌ肝細胞移植を行った 8 匹の uPA/SCID マウスのうち、移植後 5 週目において 5 匹のマウスから 66~81% のイヌ由来の第 IX 因子抗原を検出した。55 日目に摘出したイヌ第 IX 因子抗原陽性マウスの肝臓の組織学的観察において、uPA/SCID マウス肝の肝細胞は約 85% が移植したイヌ由来の肝細胞に置換されていることを、形態学的ならびに抗イヌアルブミン抗体を用いた免疫染色において確認した。これらの結果は、イヌ成熟肝細胞は、uPA/SCID マウスの体内で活発な増殖が可能であり、増殖後も第 IX 因子の合成能を良好に保持していることを示している。

これらの実験結果は、これまでには存在しなかった、分離肝細胞を増幅する全く新しいシステムを確立したことを示している。肝細胞移植治療による有用性はこれまでに様々な実験系あるいは臨床試験において示されているが、今後の発展においてその細胞源をいかに確保するかが重要な問題と認識されている。その点からも、本研究は肝細胞を安定して増幅供給し得ること、そして、それら増幅した肝細胞は良好な機能を有していることから、この分野の発展に大きく寄与するものと考えている。

D. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：

柴田 優、嶋緑倫、田中一郎、野上恵嗣、櫻井嘉彦、辰巳公平、粕田承吾、中宏之、山内昌樹、織順一

奈良県立医科大学消化器・総合外科学教室：

大橋一夫、久下博之、横山貴司、中島祥介
クイーンズ大学病理学及び分子医学部門：

David Lillicrap

広島県産業科学技術研究所：

片岡美穂、立野知世

E. 研究発表

- 1) Ko S, Tanaka I, Kanehiro H, Kanokogi H, Ori J, Shima M, Yoshioka A, Giles A, Nakajima Y. Preclinical experiment of auxiliary partial orthotopic liver transplantation as a curative treatment for hemophilia. *Liver Transplantation* 11: 579-584, 2005
- 2) Morimoto Y, Yoshioka A, Sugimoto M, Imai Y, Kirita T. Haemostatic management of intraoral bleeding in patients with von Willebrand disease. *Oral Disease* 11, 243-248, 2005
- 3) Yoshioka A. Products used to treat hemophilia : recombinant products. In

Textbook of Hemophilia, Blackwell Publishing: 136-141, 2005

- 4) Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nakajima Y. Stability and repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplantation*, 14: 621-627, 2005

- 5) Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nagao M, Sho M, Nakajima Y. Heterotopically transplanted hepatocyte survival depends on extracellular matrix components. *Transplantation Proceedings*, 37: 4587-4588, 2005

- 6) Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Nakajima Y, Yokoyama T, Kuge H, Yamanouchi M, Naka H, Yoshioka A, Kay MA. Liver tissue engineering at extra-hepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41: 132-140, 2005

- 7) Ohashi K, Nakai H, Couto LB, Kay MA. Modified infusion procedures affect recombinant adeno-associated virus vector type 2 transduction in the liver. *Human Gene Therapy*. 16:299-306, 2005

- 8) Nogami K, Zhou Q, Myles T, Leung LL, Wakabayashi H, Fay PJ. Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *Journal of Biological Chemistry* 280:18476-18487, 2005

- 9) Nogami K, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood* 105:4362-8, 2005

- 10) Ori J, Tanaka I, Kubota Y, Shima M, Matsumoto T, Yoshida K, Sakurai Y, Yoshioka

- A. Highly conserved antigenic structure of the factor VIII C2 domain in some mammals. *Int J Hematol.* 82:351-6, 2005
- 11) Yokoyama T, Ohashi K, Kuge H, Kanehiro H, Yamato M, Iwata H, Nakajima Y. In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *American Journal of Transplantation* 6: 50-9, 2006
- 12) Kuge H, Ohashi K, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Koyama F, Bumgardner GL, Kosai K-I, Nakajima Y. Genetic modification of hepatocytes towards hepatocyte transplantation and liver tissue engineering. *Cell Transplantation*, in press.
- 13) 吉岡 章 特集 I 第 23 回日本思春期学会学術集会 教育講演 I 思春期の出血症と血栓症 *思春期学* 23: 11-19, 2005
- 14) 西野 正人, 吉岡 章 血友病、von Willebrand 病の診断基準・病型分類・重症度. *内科* 95: 1699-1702, 2005
- 15) 福武勝幸、新井盛大、稲葉浩、花房秀次、三間屋純一、高松純樹、吉岡章、嶋緑倫、白幡聡、藤巻道男、リコネイト(PTPs)研究会. 過去に治療歴ある血友病 A 患者に対する遺伝子組換え型血液凝固第 VIII 因子製剤(リコネイト)の市販後の多施設臨床評価(使用成績調査) *日本血栓止血学会誌* 16:650-663, 2005
- 16) 櫻井嘉彦. 血友病インヒビター患者における免疫寛容療法の基礎—免疫学的観点から. *日本血栓止血学会誌* 16:330-333, 2005
- 17) 田中一郎、嶋緑倫. 後天性血友病の標的自己抗原エピトープ. *臨床免疫* 43:507-513, 2005
- 18) 田中一郎、嶋緑倫. 後天性血友病—本邦における実態と抗第 VIII 因子自己抗体の免疫生化学的特性. *臨床血液* 46:91-98, 2005
- 19) 大橋一夫 肝 tissue engineering による次世代療法の確立にむけて *昭和医学会雑誌* in press
- 20) 大橋一夫、中島祥介 肝ティッシュエンジニアリングによる次世代療法の確立にむけて. *分子細胞治療* 4: 306-312, 2005
- 21) 大橋一夫 肝ティッシュエンジニアリングにおける新展開—シート工学を応用した新規肝再生治療 *東京女子医科大学雑誌*, 2006, in press

研究要旨：これまでの研究成果を確実に臨床に繋げるため中型動物の疾患モデル開発が今後必須となった。そこで、今年度の分担研究としてクローン技術を用いた遺伝子改変ミニブタ作成のための基礎データを用い、血友病治療研究用の疾患モデル作成の可能性を検討した。ドナー細胞としてミニブタの胎児繊維芽細胞を用い、核への GFP 遺伝子組み換えの有無による再構築胚の発育率を調べ、さらに再構築胚を発情同期化したミニブタに胚移植し、クローン胚の全能性を検討した。その結果、ドナー細胞の遺伝子組み換えの有無による再構築胚の発育差は認められず、発情同期化したミニブタに再構築胚を移植してクローン産子を作成した。以上より、遺伝子組み換えドナー細胞を用いたクローン技術で血友病疾患モデルミニブタ作成の可能性が示唆された。

A. 研究目的

遺伝子治療や細胞治療などの先端医療を用いた治療法が血友病患者に臨床応用が検討されているが、ベクターの安全性や細胞ソースなど克服する課題が山積している。そこで、臨床応用する場合、実際臨床で使用する技術を確認のためにサイズ、生理学的または解剖学的にも人と類似しているモデルが必要である。特にカテーテル操作など治療行為を行う点で実際の臨床を踏まえた中型動物の疾患モデルが重要であるが、血友病モデルは犬しか存在せず、現在、繁殖性などの点で困難をきたしている。一方、ブタは遺伝子改変技術が近年進歩して、遺伝子操作（遺伝子挿入と Knock-out gene）を行ったドナー核を用いたクローン技術により前核期受精卵への遺伝子挿入よりも形質転換動物の作成効率が向上している。

本研究班においては継続した血友病治

療を行うため、今後有効な中型動物での疾患モデルの要求が高まった。そこで、インヒビター抑制の免疫調節や肝への遺伝子導入の研究については、他の分担者に協力した（分担者報告参考）。これまでの成果を踏まえ今年度の分担研究として、遺伝子改変ブタ作出のためにクローン技法の基礎データをとった。

B. 研究方法

1) ドナー細胞(核)として、ミニブタの胎児繊維芽細胞を用い、その細胞ラインを樹立し、一部の細胞はエレクトロポレーションにより GFP 遺伝子を挿入した細胞ラインを樹立した。

2) レシピエント卵子は、食肉センター由来の家畜ブタ屠体の卵巣より採取し、体外成熟培養を行い、成熟卵子から核を除去したものを使用した。

3) 核移植は、ドナー細胞の核をレシピエント卵子の細胞質に挿入し、クローン

胚は活性化法とした後に体外培養し、培養6日後の胚盤胞期への発育率と細胞数を調べた。

4) クローンブタ作出のためミニブタにホルモン処置で発情同期化を行い、発情した仮腹ミニブタに核移植で作成したクローン胚(核移植1日目2日目と3日目)を麻酔下、卵管采より卵管膨大部に移した。

5) 実験として、

- ①ドナー核としてGFP (+/-) でのクローン胚の発育率への影響
- ②クローン胚への活性化による発育率への影響
- ③仮腹ブタへの発情同期化法の検討
- ④クローン胚を仮腹ミニブタに移植してクローン産子の作出試験

C. 研究結果

1) エレクトロポレーションによりGFP遺伝子を挿入した細胞を、ドナー細胞に用いたクローン胚の胚盤胞期胚への発育率は、GFP(-)と有意差は認められなかった。

表1. ドナー細胞のGFP遺伝子(+/-)によるクローン胚の発育率への影響

ドナー細胞	再構築胚数	分割率 (%)	胚盤胞期への発育率 (%)
GFP (-)	376	44.0	3.0
GFP (+)	46	43.0	4.0

2) クローン胚への活性化法として、電気刺激とシクロヘキシミド処置後に、サイトカラシンB処置はクローン胚の発育率を有意に向上させることが明らかになった。

表2. クローン胚への活性化による発育率への影響

活性化法	再構築胚数	分割率 (%)	胚盤胞期への発育率 (%)
サイトカラシンB (-)	60	30.0	1.7
サイトカラシンB (+)	136	34.3	10.0

3) ミニブタに5種類のホルモン量で発情同期化を行い、仮腹ブタとして移植予定日に、卵巢の反応と排卵された成熟卵子を回収して、比較検討した結果、Aの低単位(PMSG200IU, HCG100IU, HCG100IU)が発情誘起率、推定反応卵胞数ともに最良であった。

Aの低単位ホルモン処置で発情誘起後、自然交配をして60%(3/5)受胎し、妊娠が維持されることが確認された。

表3 仮腹ブタへの発情同期化法の検討 (mean ± S. D)

投与群	使用頭数	月齢	発情誘起率	推定反応卵胞数
A	18	13.4 ± 1.6	83.3	22.5 ± 1.8
B	21	9.3 ± 7.2	81.0	12.7 ± 2.8
C	5	6.0 ± 0.0	60.0	11.3 ± 1.3
D	4	9.8 ± 1.0	75.0	7.4 ± 3.4
E-1	5	8.8 ± 0.5	60.0	20.0 ± 0.0
E-2	6	5.8 ± 2.5	66.7	14.5 ± 3.7

A- E - 1 ; ミニブタ使用、
E - 2 ; 家畜ブタ

第1日目	第4日目	第6日目
MSG, HCG	(72時間) HCG	(HCG投与後) 40~48時間観察
A: 200IU	100IU	100IU
B: 300IU	150IU	150IU
C: 200IU	150IU	750IU
D: 300IU	100IU	750IU
E: 1,500IU		750IU

4) ブタでは妊娠が成立されるためには12日までに4個以上の胚が子宮角に生存維持される必要がある。そこで、クローン胚を仮腹ミニブタに移植してクローン産子の作出試験で、単為発生胚を供移植してその効果を検討した。その結果、単為発生胚を供移植した4頭のうち3頭が妊娠し、1頭で妊娠が維持されてクローン産子が得られた。残り2頭は、50日以降に胎児死滅が起こったが、黄体が維持され、子宮粘膜が水腫を起した状態で113日無発情状態が維持された。単為発生胚を供移植しなかったクローン胚のみでは妊娠せず発情回帰が認められた。

表4. クローン胚を仮腹ミニブタに移植してクローン産子の作出試験 (mean±S.D)

活性化法 数	移植頭数	移植胚 と種類 (1頭の仮腹ブタ)	発情回帰	受胎頭数	分娩頭 数
A	4	NT: 84~143	4+	0	0
B	4	NT-C: 60~126 NT-G: 82~131 P: 40~60	1+	3	1
B	4	NT-C: 200~396	4+	0	0

A: サイトカラシン B (-) 活性化法、

B: サイトカラシン B (+) 活性化法

NT-C: クラウン系ミニブタのクローン胚、

NT-G: ゲッチングン系ミニブタのクローン胚

P: 単為発生胚、

D. 考察

本研究では、人獣共通感染症や家畜間特
性疾病などの微生物コントロールが容易な

実験動物としてのミニブタをクローン胚移植用の仮腹ブタとドナー細胞由来ブタに用い、医学部実験施設でも飼養管理の容易な小型のミニブタを用いてクローン産子を得ることができたことは意義深い研究である。

本研究より、

- ① ドナー細胞としてミニブタの胎児繊維芽細胞を用いたが、GFP 遺伝子を挿入しも、クローン胚の発育率に影響を与えないことが確認された。
- ② 核移植後に、活性化処置としてサイトカラシン B 処置により発育率が向上することが確認された。
- ③ ミニブタを仮腹ブタに用いる場合、低単位ホルモン処置で良好な発情が誘起され、交配すれば受胎し、妊娠維持がされることが確認された。
- ④ ミニブタを仮腹ブタに用い、単為発生胚を供移植すれば、受胎し、クローン産子を作成できることが確認された。

以上より、遺伝子改変したドナー細胞を用いたクローン技術により、血友病疾患モデルであるミニブタ作成の可能性が示唆された。

本業績をもとに今後ノックアウトベクターを作成し、第八因子OK細胞を樹立し、KOブタ作出へと取り組みたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Komiya, K., Sato, Y., Wainai, T., Murayama, M., Yamada, A., Hiruta, N, Seo, N., Yoshino, H., Tanaka, H., Kobayashi, E.,: Evaluation of

intraoperative infusion solution
Using a complete anhepatic model
In baby pigs. Transplantproc37:
2341- 2346, 2005.

2. Miki, A., Narushima, M., Okitsu, T.,
Takeno, Y., S-Gutierrez, A., Rivas
-Carrillo, J.D., N-Alvarez, N.,
Chan Y., Tanaka, K., Noguchi, H.,
Matsumoto, S., Kohara, M., Lakey,
J.R.T., Kobayashi, E., Tanaka, N.,
Kobayashi, N., : Maintenance of
Mouse Rat, and pig pancreatic islet
functions by coculture with human
islet-derived fibroblasts.
Cell Transplant (in press).

3. Murayama, T., Sato, Y., Wainai, T.,
Sato, A., Seo, N., Yoshinori, H.,
Kobayashi, E., : Effect of
continuous infusion of propofol
in its concentration in blood
without the liver in pigs.
Transplant Proc37:4567-4570. 2005

2. 学会等発表 25件

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

SIV ベクターの臨床応用を目指した基本性能データの取得

分担研究者 長谷川 護

ディナベック株式会社

代表取締役社長

研究要旨

サル免疫不全ウイルス（SIVagm）ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて、必要とされるベクター基本性能に関して検討をおこなった。SIVagm ベクターは、インテグラーゼの働きで第 VIII 因子等の治療遺伝子をゲノムに組み込むことができる。このことによって、持続した発現が可能であり、安定した治療効果が期待できる。一方、ゲノムに治療遺伝子を組み込むことによって、挿入部位の位置によっては、がんを発生する可能性が示唆されている。本年度は SIVagm ベクターによる持続発現期間の検討、および、LAM-PCR（Linear amplification-mediated PCR）法による SIVagm ベクターによる遺伝子の挿入部位をヒトゲノムデータベースを利用して解析した。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、今までの研究成果に基づいて、血友病遺伝子治療の実現を可能にすることである。この視点から、基礎研究ではなく、SIVagm ベクターによる血友病遺伝子治療臨床試験の実施を可能にする技術の検討を行う。本年度の検討課題は、(1) ベクター安全性基礎データとして染色体組込み部位の解析および (2) 昨期に、閉鎖系の生産性を検討したセンダイウイルス F/HN シュードタイプ化 SIV ベクターを使用した持続発現期間の検討である。

(1) 染色体組込み部位の解析

染色体組込み部位の解析は LAM-PCR（Linear amplification-mediated PCR）法を用いておこなう。まず、LAM-PCR のプロトコール作成（条件検討）とヒトゲノムデータベースを利用した染色体組込み部位の解析についての方法論を確立し、臨床に対応できる基

礎データの取得をおこなえる体制を築く。

SIVagm ベクターはインテグラーゼの働きでゲノムに治療遺伝子を組み込むことによって、その遺伝子を長期間発現することから安定した治療効果が期待できる。この特徴は一方で、遺伝子挿入部位の位置によっては、がんを発生する可能性があることを示唆している。実際に、マウス白血病ウイルス（MLV）ベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症の遺伝子治療において、白血病を発症した例が報告されている。この時、遺伝子挿入部位の問題点が指摘されているが、さらに治療用遺伝子・ベクターの性能など幾つもの発癌因子が重複した結果であると現在では考えられている。しかし、組込み部位のデータ情報は重要であり、SIVagm ベクターに関しても、挿入部位の網羅的な解析をおこない、このベクターの挿入部位の傾向を把握し、癌原性遺伝子への影響は無いか或いは極めて少ないことを示すこ

とを目的とする。

(2) SIV ベクターによって導入した遺伝子の発現期間の検討

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターに比べて、非分裂細胞に遺伝子を導入しやすいこと、幹細胞に遺伝子を導入した場合のジーンサイレンシングが起きにくいことなどが大きな利点としてあげられる。臨床応用を考慮した場合、遺伝子治療によって導入した遺伝子が造血幹細胞・組織幹細胞に導入されれば、一回の治療で血友病を治癒することが可能となる。したがって、SIVagm ベクターによって導入した遺伝子が、どのくらいの期間持続発現するかを検討することは臨床学的にも、きわめて重要である。この点を把握するために、*in vivo* での遺伝子導入実験（動物実験）を行い、導入遺伝子の発現期間を検討した。

これらの研究を実施することで、SIVagm ベクターを使用した遺伝子治療による、血友病の完治・根治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

(1-1) LAM-PCR による SIVagm ベクター挿入部位のクローニング：LAM-PCR 法のプロトコルの確立

LAM-PCR 法によりヒト上皮細胞株を使用し、SIVagm ベクターによる挿入部位を同定した。今回はモデル遺伝子として EGFP 遺伝子搭載 SIVagm ベクターを使用した。非分裂状態にした静止期の細胞株にベクター感染をおこなひ、3 日後に、この細胞からゲノムを精製した。本実験では、なるべく挿入部位に選択圧がかからないような実験条件にして、SIVagm

ベクターの挿入部位の傾向を網羅的に解析した。また、精製したゲノムの SIVagm ベクター挿入部位の総数はリアルタイム PCR で概算し、この精製ゲノムから LAM-PCR 法で、SIVagm ベクターを含む DNA フラグメントを選択的に増幅、T-ベクターで TA クローニングした。次に T-ベクター上のユニバーサルプライマーを利用して塩基配列を解読した。

(1-2) ヒトゲノムデータベースを利用した SIV ベクター挿入部位の解析

挿入部位の解析は、ヒトゲノムデータベース（NCBI Human Genome Resources および UCSC Genome Bioinformatics）上で検索した。検索項目は (1) CpG 配列、(2) LINE、SINE などの繰り返し配列、あるいは (3) 遺伝子内（イントロンかエクソン）か、(4) 癌原性遺伝子、癌抑制遺伝子内か、(5) 遺伝子近傍の挿入部位の場合は転写開始点からの距離等を調べた。また、(6) 挿入部位の偏りの検定にはコンピュータ・シミュレーションによる *In Silico* 実験を対照に比較検討し、SIVagm ベクター安全性の基礎データを作成する体制を整えた。

(2) SIV ベクターによって導入した遺伝子の発現期間の検討

昨期に臨床に対応可能な閉鎖系での生産性を検討した F/HN シュードタイプ SIV ベクターを使用し、220 日までの遺伝子発現を GFP の蛍光で観察した。一般にシュードタイプに使用されている VSV-G ではなく、気道感染系ウイルス（パラミクソウイルス）であるセンダイウイルスの 2 つのエンベロップ蛋白質（F と HN）でシュードタイプすることで、気道組

織に存在する粘液を貫通して粘膜気道上皮細胞に効率的に遺伝子導入することが可能になる。F/HN-シュードタイプ SIV ベクターのマウス鼻腔への投与はカテーテルを使用した。鼻腔は、完全に組織表面が粘液で覆われており、VSV-G-シュードタイプを対照とした場合、F/HN-シュードタイプの粘液貫通能および遺伝子導入効率を容易に評価できる。遺伝子発現の解析は、鼻骨上面からの肉眼的所見を GFP の透過光で観察し、さらに同試料から鼻腔の凍結切片を調製し詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

SIVagm ベクターはアフリカミドリザルから単離した免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトにおいて病原性の報告はない。HIV に比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために SIVagm ゲノムで病原性に関与する可能性のある遺伝子領域は欠失させた。レンチウイルスベクターの取り扱いには P2 での取り扱いが認可されており、法令を遵守した実験操作法をおこなった。ベクターの生産・精製は P2A クラス安全キャビネットを使用し、P2 実験室でおこなった。動物実験はおもに P2 クラスの設備で実施した。また、本研究において動物実験等に与える影響は最小限にとどめ、動物等への投与実験は厳選しておこなうものとし、その際には動物愛護の基準にしたがっておこなわれた。また本研究を実施するにあたり、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律およびその関連法規を遵守した。

C. 研究結果

(1) SIVagm ベクター染色体組込み部位の解析

本年度は LAM-PCR のプロトコルの確立(反応条件の検討)とデータ検索の方法を検討した。モデルシステムとして、染色体構造(染色体の倍加や部分的な欠損)に問題の少ないことが報告されているヒト上皮細胞株と VSVG シュードタイプ EGFP 搭載 SIVagm ベクターを使用した。レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターの LAM-PCR 用プライマーは、一般的に LTR のリピート部分が使用されている(ref)。このプライマーに加えて、ベクターLTR の内側でデザインした独自のプライマーを使用した。クローニングされた部位の多様性で比較したところ、独自のプライマーを使用した方が、さまざまなクローンが同定された。また、ネスト PCR ではプライマーの組み合わせが重要であることが示唆された。

ヒトゲノムデータベースはおもに UCSC Genome Bioinformatics を、補足的に NCBI のデータベースを使用した。解析数は 69 クローンで、ヒトゲノムデータベースで 43 クローンが同定できた(効率としては 63%の判明率)。判明した SIVagm ベクター挿入部位の約 50%は遺伝子内(その多くはイントロン部分に挿入)であった。今回の予備検討の結果、各クローン部位の多様性から、大規模解析が可能であることが示唆された。

(2) SIVagm ベクターによって導入した遺伝子の発現期間の検討

SIV ベクターによって導入した遺伝子発現期間の検討の結果、投与後 10 日目において、VSV-G では全くマウス鼻腔に遺伝子の導入はみられなかったが、F/HN では効率よく遺伝子導入がされていることが搭載遺伝子として

EGFP を使用してわかった。さらにベクター性能評価として、長期発現実験をおこなった。現在までに 220 日までの遺伝子発現の持続を確認しており、マウス鼻腔気道上皮の幹細胞への遺伝子導入が示唆された。

D. 考察

LAM-PCR 法で挿入部位を同定するにあたって、(1) 各挿入部位に選択圧をかける場合がある。細胞株では、数十代継代して最終的に選択されてくる挿入部位を同定する方法である。もうひとつの方法は (2) なるべく選択圧をかけずに、たとえば SIVagm ベクターではインテグラーゼの組み込み指向性をできるだけ純粋に評価する条件設定である。本年度は、方法の検討がおもな目的だったので、(2) の条件を用いて細胞株からゲノムを精製し、使用した。LAM-PCR で多様なクローンを取得するには最初のステップであるプライマー伸長反応に使用するプライマーのデザインが最も重要であった。さらに、その後のネスト PCR のプライマーの組み合わせによってもクローン取得の効率が変わってくる可能性が示唆された。これまでの検討項目の結果、最良の条件設定を用いれば、少量の臨床試料を使用しても SIVagm ベクター挿入部位の解析が十分に可能であると判断され、現在数百クローン単位での解析が進行中である。

SIVagm ベクターによる搭載遺伝子の発現は、今回十分に持続することが確認できた。基本的性能としての、*in vivo* での長期遺伝子発現が再確認できたとともに、粘液で覆われている鼻腔上皮細胞での長期発現ができたことから、同様に投与方法を変えれば肺を標的臓

器とした場合も持続発現が期待できる。肺は各種遺伝子疾患で欠損している蛋白の生産臓器になる可能性が指摘されていることから、血友病の遺伝子治療にも応用できる可能性はある。再生医療において治療ポテンシャルが高いと言われている ES 細胞は、非自己の細胞であることから、臓器移植と同様に拒絶の問題が指摘されている。肺に存在する患者の組織幹細胞に SIVagm ベクターを使用して、補充療法で使用されている蛋白の生産・供給をおこなえば、より安全で患者に負担の少ない治療が可能であると考えられる。

E. 結論

LAM-PCR による挿入部位のクローニングおよびヒトゲノムプロジェクトのデータベースを利用した解析方法を確立した。今回の検討項目によるデータから、方法論的に問題はなく、少量の試料からでも十分な検出感度で挿入部位を同定できることが示された。したがって、将来的に血友病治療遺伝子を搭載した SIVagm ベクターを使用して、治療が予定されている組織あるいは細胞で十分なデータ解析が可能になった。

また、SIV ベクターの持続発現期間の検討では、マウス鼻腔を使用した場合、現在まで少なくとも 220 日間持続発現していることが確認された。上皮細胞の寿命は一般的に 90 日と報告されており、間接的な証拠ではあるが、幹細胞に遺伝子導入されていることが示唆された。さらに SIVagm ベクターによる導入遺伝子の発現はメチレーションなどのエピジェネティクス制御の影響を強く受けていない可能性がある。さらに自治医科大学と共同で血友

病の患者で欠損している因子の生産細胞・組織を検討すれば、臨床応用に大きく近づくことになる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S. I., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y. Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther* 12: 203-210, 2005.

Kikuchi, J., Mimuro, J., Ogata, K., Tabata, T., Ueda, Y., Ishiwata, A., Kimura, K., Takano, K., Madoiwa, S., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y. Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med* 6: 1049-1060, 2004.

Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takano, K., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther* 11: 253-259, 2004.

Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Shirakura, M., Kanaya, T., Yoshizaki, M., Hironaka, T., Nagai, Y., Iida, A., and Hasegawa, M. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer

with preferable properties. *J Gene Med* 6: 1069-1081, 2004.

2. 学会発表

Katsuyuki Mitomo, Uta Griesenbach, Makoto Inoue, Toshiaki Tabata, Yasuji Ueda, Satoshi Fujikawa, Kentaro Washizawa, Lucinda Somerton, Duncan M. Geddes, Eric W.F.W. Alton, and Mamoru Hasegawa New Pseudotyping with Sendai Virus Glycoproteins Realized Very Long-Term Gene Expression in Airway Epithelia by Simian Immunodeficiency Virus Vector. The 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, (05. 10. 30.) October 29-November 1 (Prague, Czech Republic), 2005

Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, Mie Ikegami, Uta Griesenbach, Eric Alton, Mamoru Hasegawa. Towards Cystic Fibrosis and airway gene therapy : Evaluation of EGFP Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN. The American society of gene therapy's 8th annual meeting June 1-5 (Saint Louis, MO, USA), 2005

Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, Mie Ikegami, Satoshi Fujikawa, Kentaro Washizawa, Uta Griesenbach, Eric W.F.W. Alton, and Mamoru Hasegawa Evaluation of EGFP Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN International Union of Microbiological Societies XIII International Congress of Virology July

23-28 (San Francisco, California, USA),
2005

(7) 「血液凝固異常の治療方法」 (D4-A0506)
状態：出願中 (未公開) (2005/10/28)

h. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 「2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター」

出願番号：特願平 11-175646 (1999/6/22)

登録番号：3526844 (2000/9/28)

存続期限：2020/9/28

状態：登録済み

(8) 「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシールドタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」
(D4-A0510)

状態：出願中 (未公開) (2005/10/28)

(2) 「ヘマグルニチン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクター」

出願番号：特願 2002-500700 (2000/6/1)

状態：出願公開中

(3) 「VSV-G シールドタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」

出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態：審査請求済み

(4) 「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」 (D3-A0204)

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態：出願公開中

(5) 「SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

(6) 「PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
平成 17 年度 分担研究報告書
血友病 B の遺伝子解析と発現実験を用いた分子病理に関する研究
分担研究者 天野 景裕 東京医科大学

研究要旨:

血友病 B 患者に見いだされた 4 種のミスセンス変異 (A28P、Q50K、P193L、L300P) の変異体を作製し、哺乳動物細胞に発現させ、その細胞内合成、分泌動態を野生型と比較、検討した。A28P の患者血漿中第 IX 因子 (FIX) 活性は <1% の重症型、Q50K は 7% の軽症型、P193L と L300P は <1% の重症型であり、培養液中の FIX 活性はそれぞれ 6%、4%、1%、<1% であった。4 種の患者血漿中 FIX 抗原量は 39%、16%、未測定、<1% であるのに対し培養液中の FIX 抗原量は 64%、77%、5%、5% であった。また、トランスフェクション後に回収した HEK293 細胞を破碎し測定したそれぞれの細胞内の FIX 抗原量は 70%(A28P)、67%(Q50L)、92%(P193L)、39%(L300P) であった。4 種の変異体の発現実験の結果から、遺伝子解析で認められた各々の変異が FIX 活性の低下をもたらす血友病 B の原因となっていることが確認された。

A. 研究目的

血友病 B は血液凝固第 IX 因子 (FIX) の質的・量的異常であり、関節出血や筋肉内出血などの反復症状を特徴とする。本症は X 染色体性劣性遺伝形式を呈し、本邦では 2004 年の血液凝固異常症調査で 872 人の患者の生存が報告がされている。1985 年に第 IX 因子遺伝子 (F9) の全塩基配列が決定されて以来、血友病 B における遺伝子解析は、生化学的手法の発展と相まって、F9 遺伝子異常に関する多くの知見が蓄積されてきた。血友病に対する遺伝子治療の開発には、遺伝子異常を含む患者個々の症例の情報が重要になる。そこで、我々は、昨年度 27 例の日本人血友病 B 患者の遺伝子解析を行い、21 種類の変異を検出し、それらの遺伝子型と血漿レベルの表現型との関連について検討した。うち 5 種の変異は、データベースにて既存の報告でないことを確認したので、今回、これら未報告変異のうちエクソン領域に点変異を有する 4 種の F9 変異体を作成し、それぞれのタンパク発現様式について、その細胞内合成、分泌動態を検討した。

B. 研究方法

①変異 FIX プラスミドの作成

A28P、Q50K、P193L、L300P の 4 種を作成した。F9 発現のためのベクターには pcDNA3.1 を用い、F9 野生型を挿入し、発現ベクターを構築した。これをテンプレートとして、site-directed mutagenesis kit を用い、それぞれの変異 FIX 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを得た。組み込まれた変異はダイレクトシーケンスにてその配列を確認した。

②リコンビナント FIX の発現

精製したプラスミドは HEK293 細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションを行った。ビタミン K1 を含む培養液で培養し、48 時間後の上清ならびに細胞を回収した。回収した細胞は凍結融解処理した後、細胞抽出液 NP40 を用い、細胞内抗原量測定用とした。

③FIX 活性および抗原量の測定

FIX:C は自動血液凝固能測定装置を用い、APTT 試薬と FIX 欠乏血漿を用いて凝固一段法で測定した。FIX:Ag はポリクロナール抗体を用いたサンドイッチ EIA 法で測定した。

④分子高次構造モデリング

変異タンパクの解析には、PDB(Protein Data Bank) コード「1PFX」、「1EDM」をもとに分子グラフィックスソフト RasMol を用いて FIX モデルを作成した。

C. 研究結果

A28P の血漿中 FIX:C は<1%の重症型、Q50K は 7%の軽症型、P193L と L300P は <1%の重症型であり、発現実験の結果、培養液中の FIX:C はそれぞれ 6%、4%、1%、<1%であった。4種の血漿中 FIX:Ag は 39%、16%、未測定、<1%であるのに対し培養液中の FIX:Ag は 64%、77%、5%、5%であった。また、トランスフェクション後に回収した HEK293 細胞を破砕し測定したそれぞれの細胞内の FIX:Ag は 70%(A28P)、67%(Q50L)、92%(P193L)、39%(L300P)であった。

D. 考察

4 種の変異体の発現実験の結果から、遺伝子解析で認められた各々の変異が FIX 活性の低下をもたらす血友病 B の原因となっていることが確認された。立体構造解析と発現実験結果により、各々の変異についてその分子病理を考察する。

A28P は、Gla ドメインに検出された未報告のミスセンス変異である。分子高次構造モデリングの検討では、Ala28 からイミノ酸である Pro への置換は、Gla ドメイン全体の高次構造を歪ませることが考えられた。また、これは同一ヘリックス上に位置する Gla27 と Gla30 に影響を及ぼし、結果として Ca²⁺結合の機能障害をきたすことが推測された。発現実験においては、A28P 変異体は、野生型 100%に比較して、培養上清中の FIX:C は 6%であり、患者血漿同様に分子異常を示した。しかし、培養上清中の活性が 6%あったことは、この変異体は Ca²⁺-リン脂質結合が不完全ではあるが、残りの Ca²⁺結合によって若干の活性を維持することが示唆された。

Q50K は、FIX 分子の EGF-1 ドメイン内に

検出したミスセンス変異であり、EGF-1 ドメインの点変異は、データベースには 179 例が登録されている。立体構造予測から、Q50K 変異体は、正常な Ca²⁺結合配位は保たれず、野生型と異なった新たな EGF-1 ドメイン分子構造を呈し、Ca²⁺結合機能が弱まるために機能異常を示すと考えられた。発現実験では培養上清中の FIX 抗原量は、患者血漿中の抗原量より増加していた。これは、変異 FIX タンパクの構造上の不安定さにより、血漿中においては、なんらかの作用を受け易分解となっている可能性が示唆される。

2 種の変異、P193L と L300P は、プロテアーゼドメイン内に位置する変異である。データベースには、プロテアーゼドメイン内の変異は多数報告されており、またそれに相当する多彩な表現型が示されている。発現実験では、両変異とも、野生型とほぼ同程度に十分な細胞内合成が行われているが、高度な細胞外への分泌障害が認められた。立体構造解析からは、検出した両変異のアミノ酸の位置は、セリンプロテアーゼ触媒活性に直接反応する活性触媒基などのアミノ酸残基からは離れて位置しており、これら 2 箇所の位置でのアミノ酸置換がセリンプロテアーゼ活性に直接的に影響を及ぼすことは少ないと考えられた。一方、両変異はそれぞれ、ドメイン分子表面上ではなく、分子内部に向かってβターンを形成していた。分子内部のターン上にあるアミノ酸に置換が起こると、そのアミノ酸近傍だけではなく、分子構造全体が破壊される可能性が推測された。

E. 結論

血友病 B 患者の個々の症例において、F9 の遺伝子型を把握し、発現実験でその分子病理を確認することは、ナンセンス変異、欠失、挿入などに起因する重症例における高率なインヒビター出現を考慮し、慎重に補充療法を進めるうえで重要である。また、今後の本邦での遺伝子治療の臨床応用に向け、遺伝子型の把握と確認は不可欠である。