

AAV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験

研究分担者：自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

教授 小澤敬也、講師 水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて基礎的検討を行った。AAV ベクターは骨格筋や肝臓などの非分裂細胞への遺伝子導入に有用であるが、より高い効果を得るためにキャプシド及びプロモーターの点から検討を行うとともに、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して測定系を改良し、遺伝子導入の効果との関係を明らかにした。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。また、主に第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用してマウス及び霊長類モデルに対する投与を行い、治療法の有効性と安全性につき検討する。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに動物個体を用いた解析を行った。特にベクターキャプシドに対する中和抗体は低力価であっても大きな影響を与える事が示唆されたことから、検出感度の向上を目指して改良を行った。

・遺伝子導入動物実験：特に霊長類（カニクイザル）において様々な構築の AAV ベクターを骨格筋又は肝臓を標的として投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。

また、ベクターに対する中和抗体が陽性である個体への投与方法として、ベクター投与方法に関する検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、比色定量法および標的細胞に関する検討に加えて培養細胞に対する感染増強法を探索し、培地に糖類を加えることで AAV ベクターの感染効率が飛躍的に増強するこ

とを見出した。この方法を通じて実験条件の最適化を行い、中和抗体の検出感度を高めることができた。この方法を用いて過去のサンプルを再検討するとともに、遺伝子導入実験の対象となるカニクイザルのスクリーニングを行い、真に陰性もしくは弱陽性の個体を選定した。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第IX因子遺伝子を搭載したベクターを投与した。その結果、1型を骨格筋に投与した3頭においてはいずれも治療域に達する血中濃度が長期にわたって認められ、最高で正常値の40パーセント相当の濃度に達した。一方、8型のベクターを門脈内に注入した場合には、中和抗体陰性と判定した個体において治療域に至る血中濃度が認められ、長期的な発現が得られた。また、より実際的な投与方法として末梢静脈へのベクター注入によっても効果が得られることを2頭において確認した。更には中和抗体陽性の個体に対する投与方法として門脈内への急速大量注入法を行ったところ、試みた3頭の全てにおいて治療域に達する効果が長期にわたり得られた。以上の実験を通じてベクターによる有害事象を示唆するような所見は認められなかった。

D. 考察

骨格筋・肝臓を標的とした遺伝子導入法に関しては自験例を含めて世界中で様々なノウハウの蓄積が見られ、用いるベクターの血清型及びプロモーターについても概ね結論が得られている。これまでの結果を含めて総括すると、骨格筋に対してはこれまでのところ1型が最も有効と考えられており、肝臓を標的とした場合には8, 9型の有用性が高く、プロモーターに関しても今回用いたhAATプロモーターなどが有力と考えられている。また、中和抗体は遺伝子導入に対する影響が非常に大きいものと考えられることから、ベクター投与に際しては事前に中和

抗体のスクリーニングを行う必要があり、これはヒトに対して治療を行う際にも必須の検査であると思われる。9型に対する中和抗体の検出感度に関しては今後更に改良が望ましい。これは効率よく感染する細胞が見出されていないため、より多くのベクター粒子が必要であることが主な原因である。従って、より好適な細胞を見出す事が重要であり、肝臓・肺由来の細胞株などを幅広く試すと共に、他の施設における情報にも気を配る必要がある。

8型、9型などに由来するベクターは動物実験の結果からは非常に有望であるが、一方で中和抗体陽性率に関しては未知である。遺伝子治療の対象者をできるだけ多くするため、このような陽性例に対しても何らかの方策がある事が望ましい。そこで、肝臓を標的とした門脈内への注入に際して検討を行った。すなわちベクター溶液注入の前後に生理食塩水を急速かつ大量に注入することで、ベクターが血液中の抗体と反応して不活化されるのを防ぐことにある。このような目的での研究はこれまでなされておらず、注入量の決定は困難であったが、肝臓・門脈内の血管床を十分に満たすこと、ならびに循環器系をはじめとする各器官への悪影響を生じないこと、の2点から検討した結果、体重の1-2%を総注入量として設定した。総注入量を体重の2%とした個体では、一過性に心不全が認められたことから、更に少ない量で検討を重ねた結果、1%程度でも安全に効果が得られることが判明した。今回の検討では用いたサルの大きさの関係もあり、開腹下に門脈を直接穿刺する操作を取り入れたが、ヒトに対しては既存のカテーテルによって同様の操作が可能であり、より低い侵襲で実施可能であると考えている。この方法により中和抗体が陽性の個体に対しても遺伝子治療が可能になることが期待される。

今後は改良した測定法を用いてヒトにおける8型・9型のベクターに対する中和抗体の陽性率を測定し、それぞれの投与法の対象となる症例の割合を推定することで臨床研究に繋げていきたいと考えている。

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)

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Gene Ther** (*in press*)

Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H., Takayama, T., Ohwada, M., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. **Mol Cancer Ther** 7: 704-11, 2008.

Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. **J Gene Med** 10: 368-74, 2008.

Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against

Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. **Mol Ther** 16: 474-80, 2008.

Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circ Res** 101: 734-41, 2007.

Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. **Hypertension** 50: 531-6, 2007.

Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. **Int J Mol Med** 19: 75-9, 2007.

Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. **Int J Cancer** 120: 278-84, 2007.

Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, K.Q., Ozawa, K., Ushijima, H.: Tendon healing *in vitro*: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with

persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. **Plast Reconstr Surg** 119: 227-34, 2007.

Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. **J Virol** 80: 11899-910, 2006.

Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer by using adeno-associated virus vectors. **Hum Gene Ther** 17: 921-8, 2006.

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** 8: 990-7, 2006.

Zhang, Y., Wang, C., Mizukami, H., Itoh, H., Kusama, M., Ozawa, K., Jinbu, Y.: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. **J Exp Clin Cancer Res** 25: 417-23, 2006.

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** 13: 823-8, 2006.

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** 118: 627-35, 2006.

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** 13: 738-46, 2006.

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.

G. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
平成 18—20 年度総合（分担）研究報告書

血友病（マウスおよびイヌモデル）の遺伝子治療および
成熟肝細胞・ES 細胞を用いた細胞治療

研究分担者 吉岡 章、 嶋 緑倫 奈良県立医科大学

研究要旨；血友病患者が血液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 因子あるいは第 IX 因子を産生し、出血症状の改善を図ることを目的として遺伝子・細胞治療の研究を行った。

これまでに我々はマウスを用いた実験において、肝細胞移植が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとした。本法を発展させるため 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の開発に取り組んだ。マウスおよびヒト由来の移植肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、第 IX 因子の合成能を良好に保持していた。本法は自己の肝細胞を安定して増幅供給し得る手段として有用と考えられた。また血友病 B における肝細胞移植の治療効果をマウスモデルを用いて検討した。C57BL6 野生型のマウスから肝細胞を分離・精製し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの肝臓に脾臓経由で移植した。移植群では 1-2%の活性の上昇がえられ、移植後 5 週まで維持された。FISH 解析により、移植細胞の生着を確認した。成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対する有用な治療法となりえることを示した。また移植細胞を肝以外の部位に移植する肝ティッシュエンジニアリングの血友病 B への応用として FIX ノックアウトマウスの腎皮膜下への移植も試みた。作成された肝組織は形態学的に正常な肝組織構造を形成しており、移植群では 0.5-2%の第 IX 因子活性の上昇がえられ、移植後 8 週まで維持された。成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対しても有用な治療法となりえることを示した。

また、これまで、われわれは tetracycline (DOX) 誘導により遺伝子の過剰発現が可能な ES 細胞 (Ainv18) を用いてヒト第 VIII 因子産生細胞の作製に取り組んできた。未分化 ES 細胞および中胚葉条件で分化誘導した場合には DOX 投与にても第 VIII 因子は検出できなかったが、内胚葉条件では第 VIII 因子活性および抗原が検出された。さらに第 VIII 因子産生 ES 細胞を SCID マウスの脾臓へ移植したところ、移植後 3 週間でヒト第 VIII 因子抗原をマウス血中に検出した (13~43%) が、脾臓にはテラトーマが形成されていた。次に免疫不全のない血友病 A マウスへの移植を試みた。四塩化炭素の前処置により肝再生刺激を加えた血友病 A マウスに第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を移植した。血中に第 VIII 因子活性は検出されなかったが、免疫組織染色でヒト第 VIII 因子を検出し、移植細胞の肝臓への生着を確認した。ES 細胞が血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうるものと考えられた。

血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた遺伝子治療に関する基礎的検討を行った。EPC は患者末梢血から容易に採取でき、in vitro で大量に増殖可能であるという点で ex vivo 遺伝子治療における理想的な vehicle であるといえる。マウス血液から血管内皮前駆細胞の分離培養法を確立した。細胞は CD34、VEGFR2、vWF などの表面および核内抗原を有し、血管内皮細胞の特徴を有していた。これらの細胞にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。10 回の継代後も第 VIII 因子活性は低下しなかった。EPC を用いた遺伝子治療の有用性が示唆された。

A. 研究目的と背景

血友病 A および B は、重篤な出血症状を呈する疾患である。これまでの治療は、第 VIII 因子あるいは第 IX 因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に静脈内投与す

る補充療法が主体であったが、自らの生体内で一定の第 VIII (IX) 因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状を回避する新たな治療法が期待される。以上の事を達成するための基礎研究とし

て、イヌとマウスモデルを用いて、以下の方法で取り組んだ。

B. 研究方法

1) 成熟肝細胞移植による血友病の治療 (uPA/SCID マウスを用いた肝細胞増殖系の確立)

これまでに我々はマウスを用いた実験において、成熟肝細胞移植が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとしてきた。実際の肝細胞移植の臨床応用に際して使用する細胞源としては、免疫抑制剤を必要としない点から自己肝細胞を利用する手法が期待されるが、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、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の開発に取り組んだ。この uPA/SCID マウスシステムにおいては肝臓特異的に産生される uPA により持続的な肝細胞障害が発生し、この肝臓に野生型の肝細胞を移植すると、uPA を発現しない野生型肝細胞が選択的に増殖し、最終的にはトランジェニックマウスの肝臓全体を占めるまで増殖する。SCID マウスをベースにしているため、イヌやヒト肝細胞等の異種肝細胞もこのシステムで増殖が可能である。今回、血友病治療への応用にむけて、uPA/SCID マウス肝内における移植肝細胞の増殖と凝固因子の発現につき検討した。

2) 血友病 B マウスに対する成熟肝細胞移植療法

血友病 B における肝細胞移植の治療効果をマウスモデルを用いて検討した。C57BL/6 野生型のマウスからコラゲナーゼ灌流法にて肝細胞を分離・精製し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの肝臓に脾臓経由で移植した。移植後経時的に採血を行い第 IX 因子活性を測定した。肝細胞を移植したマウスから RNA を抽出し第 IX 因子 mRNA の発現を定量した。また、肝組織標本を作製し、FISH 解析を用いて移植細胞の生着率を評価した。

3) 血友病 B マウスに対する肝ティッシュエンジニアリングの有用性

移植細胞を肝臓以外の部位に移植することにより生体第 2 の肝組織を作成する「肝ティッシュエンジニアリング」が、血友病 A と同様に、血友病 B に対して有効であるか検討を行った。C57BL/6 野生型のマウスからコラゲナーゼ灌流法にて肝細胞を分離・精製し、細胞外マトリクス成分としてのマトリゲルに混和した上で、同種同系の FIX ノックアウトマウスの両側腎被膜下に移植した。移植後経時的に血中第 IX 因子活性を測定した。また、腎被膜下に作成された肝組織の形態学的評価を HE 染色および PAS 染色で行い、さらに凍結組織切片から Laser Capture Microdissection により採取した腎被膜下肝組織から得られた RNA を用いてマウス第 IX 因子 mRNA の発現を評価した。

4) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植による血友病 A の細胞療法

AinV18 は Kyba らによって開発された ES 細胞で (Cell 109:29-37, 2002)、Cre リコンビナーゼを用いた相同組換えにより、Tet オペレーター配列の下流に外来遺伝子を導入できるシステムである。導入遺伝子の高発現が期待でき、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (DOX) で発現の調節が可能である。われわれは hFVIII 遺伝子を導入した AinV18 を培養し、各分化状態において TC アナログである doxycycline (DOX) を投与することによって培養上清中への FVIII の分泌を検討した。さらに得られた第 VIII 因子産生 ES 細胞を脾臓経由でマウスに移植した。

5) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病 A の遺伝子治療

ex vivo の遺伝子治療はウイルスベクターの全身投与に伴う合併症、発癌および生殖細胞への移行の危険が少なく、安全面から有意義な方法であるが、移植細胞の viability や発現量の問題から有効な成果が得られていない。EPC は患者末梢血から容易に採取でき、in vitro で大量に増殖可能であるという点で理想的な vehicle であるといえる。第 VIII 因子の産生責任細胞として血管内皮細胞が重要な役割を果たしている可能性があり、これを用いた第 VIII 因子の遺伝子治療の有効性が期待される。これまで我々は末梢血から分離したイヌ EPC にレンチウイルスベクターを用いて第 VIII 因子遺伝子を導入した後、細胞外マトリクスと共に NOD/SCID マウスの皮下に移植したところ、細胞の生着と血中へのイヌ第 VIII 因子の分泌を確認した。今回我々はマウスの末梢血から EPC を分離し、安定的培養条件を確立するために、種々の分離条件、培養条件を試みた。得られたマウス EPC の表面抗原、細胞内抗原について検討した。次にレンチウイルスベクターを用いてマウス EPC をヒト第 VIII 因子発現細胞に改変し、第 VIII 因子分泌能を評価した。

C. 研究結果・考察・今後の展望

1) 成熟肝細胞移植による血友病の治療 (uPA/SCID マウスを用いた肝細胞増殖系の確立)

マウスおよびヒト由来の移植肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、マウス肝の 70% 以上を置換するに至った。これら増殖した移植肝細胞の凝固第 IX 因子発現能が正常であることを ELISA、免疫組織学的検索、RNA 検索および血液凝固一段法にて確認した。本研究は自己の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、肝細胞移植療法の発展に大きく寄与するものと考えられた。

2) 血友病 B マウスに対する成熟肝細胞移植療法

25 匹の血友病 B マウスに細胞移植したところ、移植群

では1-2%の活性の上昇がえられ、移植後5週まで維持された。sham operation 群では活性の増加は認めなかった。レシピエントマウスに明らかな肝障害はみられなかった。雄性肝細胞を雌性肝臓に移植したマウスを選択し、FISH 解析を行なったところ、レシピエントの肝組織標本に Y 染色体が検出され、移植細胞の生着が確認できた。移植マウス肝では第 IX 因子 mRNA の発現が認められ、また脾臓でもわずかに第 IX 因子 mRNA の発現をみとめた。肝細胞は移植後もその第 IX 因子合成能を保持しており、成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対する有用な治療法となりえることを示した。

3) 血友病 B マウスに対する肝ティッシュエンジニアリングの有用性

C57BL/6 野生型のマウスから分離・精製した肝細胞を、マトリゲルに混和し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの両側腎被膜下に移植した。移植後、レシピエント血中に 0.5-2.0% の第 IX 活性の増加が認められ、それが移植後 8 週まで維持されるのを確認した。作成された肝組織は形態学的に正常な肝組織構造を形成しており、また、第 IX 因子 mRNA の発現が認められた。以上から、成熟肝細胞を用いた肝ティッシュエンジニアリングの手法は、肝細胞移植と同様、血友病 B に対する有用な治療法であると考えられた。

4) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植による血友病 A の細胞療法

ヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだ Ainv18 ES 細胞を作製し、DOX で誘導した。未分化 ES 細胞および中胚葉条件で分化誘導した場合には DOX 投与にても第 VIII 因子は検出できなかったが、内胚葉条件では微量ではあるが第 VIII 因子活性および抗原を検出し (~15 mU/ml)、DOX 量に比例していた。次に第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を脾臓経由で SCID マウスの肝へ移植した。ヒト第 VIII 因子抗原をマウス血中に検出し (13~43%)、ES 細胞からの第 VIII 因子の分泌が確認されたが、脾臓にはテラトーマが形成されていた。次に免疫不全のない血友病 A マウスへの移植を試みた。四塩化炭素の前処置により肝再生刺激を加えた血友病 A マウスに第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を移植した。血中に第 VIII 因子活性は検出されなかったが、肝組織からヒト第 VIII 因子 mRNA が検出され、免疫組織染色でもヒト第 VIII 因子を検出し、移植細胞の肝臓への生着を確認した。現在、テラトーマの発生の有無について観察中である。ES 細胞が血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうるものと考えられた。

5) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病の遺伝子治療

rhG-CSF を前投与した 20 匹の C57BL/6 マウスから血液を採取し、比重遠心法にて単核球分画を分離し、コラゲンをコーティングしたプレート上で VEGF を含む培地

を用いて培養した。約 4 週間後に敷石様細胞のコロニーを確認した。細胞集団の表面抗原あるいは核内抗原をフローサイトメトリーで測定したところ、細胞は CD34、VEGFR2、vWF などの血管内皮細胞の特徴を有していた。細胞はさかんに増殖を続け、20 代以上継代を重ねても細胞の形態と増殖力は保持されており、マウス末梢血由来の血管内皮前駆細胞の分離培養に成功した。これらの細胞にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。10 回の継代後も第 VIII 因子活性は低下しなかった。今後は、この細胞を免疫不全のない第 VIII 因子 KO マウスに移植し、治療効果やインヒビター産生の有無について検討する予定である。

4. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：

柴田 優、田中一郎、野上恵嗣、櫻井嘉彦、辰巳公平、西屋克己、荻原建一、矢田弘史、織順一

奈良県立医科大学消化器・総合外科学教室：

高 濟峯、久下博之、横山貴司、中島祥介

奈良県立医科大学循環器腎臓代謝内科学教室：

久保篤史

奈良県立医科大学法医学教室：粕田承吾、

東京女子医科大学先端生命医科学研究所：大橋一夫

広島県産業科学技術研究所：片岡美穂、立野知世

5. 研究発表

原著論文

1. Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J Biol Chem.* 2008 Dec 1. [Epub ahead of print]
2. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol.* 143: 409-20, 2008
3. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Sakurai Y, Matsumoto T, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Selective factor VIII and V inactivation by iminodiacetate ion exchange resin through metal ion adsorption. *Br J Haematol.* 142: 962-70, 2008
4. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation.* 86: 167-70, 2008.

5. Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 106-10, 2008.
6. Kasuda S, Kubo A, Sakurai Y, Irion S, Ohashi K, Tatsumi K, Nakajima Y, Saito Y, Hatake K, Pipe SW, Shima M, Yoshioka A. Establishment of embryonic stem cells secreting human factor VIII for cell-based treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 6: 1352-9, 2008.
7. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost.* 99: 883-91, 2008.
8. Uchida Y, Sakurai Y, Ogiwara K, Chiyonobu T, Higuchi B, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Successful management of Mallory-Weiss syndrome in a haemophilia A patient with inhibitor by recombinant activated factor VII. *Haemophilia.* 14: 841-3, 2008.
9. Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Biochim Biophys Acta.* 1784: 753-63, 2008.
10. Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, Yoshioka A, Shima M. Identification of a thrombin-interactive site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol.* 140: 433-43, 2008.
11. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会. インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン. 日本血栓止血学会誌. 19, 520-539, 2008.
12. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫. わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査 予後因子に関する検討. 日本血栓止血学会誌 19: 140-153, 2008.
13. Takeyama M, Sakurai Y, Shima M, Matsumoto T, Nogami K, Tanaka I, Takeda T, Giddings JC, Yoshioka A. Heparin-induced inhibitory effects of a prothrombin complex concentrate on global tests of haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007. 18: 1-7.
14. Nogami K, Shima M, Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A. Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain. *Int J Hematol.* 2007. 85: 317-22.
15. Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A. Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem.* 282: 5287-95, 2007.
16. Sakurai Y, Sugimoto H, Yoshida K, Tanaka I, Shima M, Tanaka Y, Takeda M, Nonomura A, Yoshioka A. Superficial fibromatosis mimicking subcutaneous hematoma: an unusual and difficult diagnosis in a patient with mild hemophilia A. *Int J Hematol.* 85: 1-4, 2007.
17. Takeyama M, Kasuda S, Sakurai Y, Shima M, Takeda T, Omura S, Naka H, Yoshioka A. Factor VIII-mediated global hemostasis in the absence of von Willebrand factor. *Int J Hematol.* 85: 397-402, 2007.
18. 福島優理, 吉田幸一, 黒澤知子, 櫻井嘉彦, 安原肇, 高橋幸博, 嶋緑倫, 吉岡章. 臍出血で発症した重症血友病 A の新生児例. 日本小児血液学会雑誌 21: 29-31, 2007.
19. 嶋緑倫, 松本智子. 血栓・止血検査の最前線(2)・トロンピン生成試験の実際と応用. 日本血栓止血学会誌 18: 217-225, 2007.
20. Suzuki H, Shima M, Nogami K, Sakurai Y, Nishiya K, Saenko EL, Tanaka I, Yoshioka A. Factor V C2 domain contains a major thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed factor V activation. *J Thromb Haemost.* 4: 1354-60, 2006.
21. Yoshioka A, Fukutake K, Takamatsu J, Shirahata A. Kogenate Post-Marketing Surveillance Study Group. Clinical evaluation of recombinant factor VIII preparation (Kogenate) in previously treated patients with hemophilia A: descriptive meta-analysis of post-marketing study data. *Int J Hematol.* 84:158-65, 2006.
22. Kuwahara M, Yurugi S, Takeda M, Fukuda K, Yoshioka A. Hemophilia B diagnosed by hematoma at the columella base. *Plast Reconstr Surg.* 117:1647-8, 2006.
23. Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, Giles AR, Yoshioka A. The measurement of low levels of factor VIII or

- factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*; 4: 377-84, 2006.
24. Inoue T, Shima M, Takeyama M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Sakurai Y, Giddings JC, Yoshioka A. Higher recovery of factor VIII (FVIII) with intermediate FVIII/von Willebrand factor concentrate than with recombinant FVIII in a haemophilia A patient with an inhibitor. *Haemophilia*. 12: 110-3, 2006.
25. Sakurai Y, Shima M, Imai Y, Omura S, Kirita T, Yoshioka A. Successful use of recombinant factor VIII devoid of von Willebrand factor during multiple teeth extractions in a patient with type 3 von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 17:151-4, 2006.
26. 藤井輝久, 高田昇, 日笠聡, 酒井道生, 竹谷英之, 櫻井嘉彦, 花房秀次, 小阪嘉之, 天野景裕, 嶋緑倫, 吉岡章. 日本の血友病類縁疾患患者の入院医療コストの集計 多施設共同研究. *日本血栓止血学会誌* 17: 446-453, 2006.
27. 白幡聡, 岡敏明, 福武勝幸, 新井盛大, 花房秀次, 瀧正志, 長尾大, 三間屋純一, 芳賀信彦, 高松純樹, 神谷忠, 嶋緑倫, 垣下榮三, 竹谷英之, 高田昇, 小林正夫, 内田立身, 小野織江, 吉岡章. インヒビター保有血友病患者における遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤(注射用ノボセプン)の長期的安全性および有効性, 5年間の市販後調査中間解析報告. *日本血栓止血学会誌* 17: 331-344, 2006.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総合（分担）研究報告書

血友病治療のための新しい遺伝子導入法の開発

研究分担者 小林 英司 自治医科大学

（研究協力者：菱川 修司 自治医科大学 講師）

研究要旨

初年度は、Naked DNA を高圧で脈管系から注入することで、ミニプタへの遺伝子導入実験を行った。ミニプタに GFP マーカー遺伝子発現を種々の圧条件下で試みた。カテーテルを使用して、ミニプタ肝臓に亜区域特異的に遺伝子導入発現を認めた。遺伝子発現には血液の存在が不利であり、また、注入圧による障害を防ぐ必要があった。

2 年目以後は前臨床モデル確立のためカニクイザル肝臓に対する経門脈的遺伝子導入手法を完成させた。そして生体カニクイザルを使い「門脈本幹直接穿刺法」にて AVV ベクターによる肝臓への遺伝子導入手術を実施した。3 例全例共に出血や門脈狭窄等の術後合併症は認められなかった。

A. 研究目的

血友病の遺伝子治療として、欠損凝固因子を遺伝子治療によって補う試みがこれまでなされてきており、我々も種々のウイルスベクターや非ウイルス法を駆使して、遺伝子導入実験を行ってきた。まず初年度は、これまで検討してきた Naked DNA による肝臓での遺伝子導入法を前臨床を意識してプタで確認した。

さらに 2 年目以後は AVV ベクターの門脈注入による肝臓における遺伝子発現は、マウスを対象にした実験では確認されているが、現在までのところ前臨床となるサルを使ったそれでは成功していない。原因として「対象とするカニクイザル血液中に AVV ベクターに対する中和抗体が存在し、注入後ベクターが肝臓に到達する前に抗体により中和されてしまう」という理由が推測されていた。そこでまず手技の確立のため他の実験で犠牲死したサルを用いて

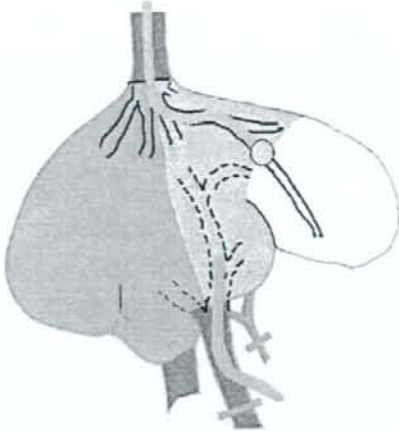
カテーテル留置等の条件設定を行った。さらにベクター注入開始前に門脈血流を遮断し、生理食塩水等で門脈内を flash out させた後に AVV ベクターを注入する方法（門脈本幹直接穿刺法）を行った。

B. 研究方法

自治医科大学においてミニプタにおける Naked DNA による肝への選択的遺伝子導入法

使用動物：ミニプタを使用した。

バルーン付きカテーテルを肝静脈より挿入しバルーンで流出路を閉鎖した上で静水圧により EGFP 発現プラスミド DNA を肝臓に選択に導入した(図 1 及び図 2)。

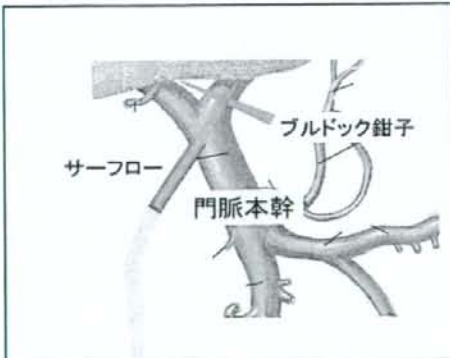


(図1：カテーテル挿入法)



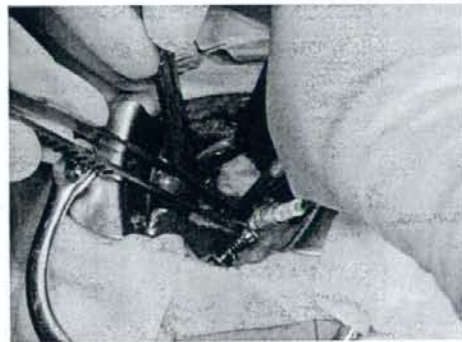
(図2：パワーインジェクターによる注入)

2年目以後は医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターにて2007年12月から2008年7月までにカニクイザルを対象に計3回(3頭)の本実験を行った(図3)。



(図3：門脈本幹直接穿刺法スキーマ)

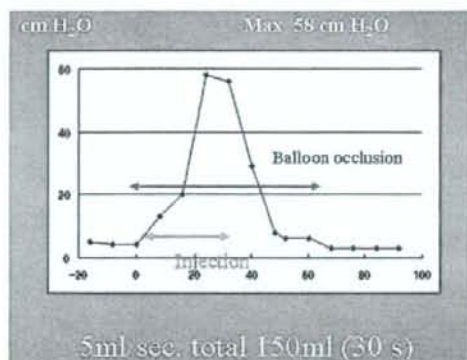
全身麻酔下に、右季肋下に皮膚を切開(約10cm)し肝門部を明らかにした。門脈本幹ならびに門脈左右枝を露出した後に、門脈本幹より血管留置針(サーフロー・20G:テルモ株)を挿入した。次に血管留置針先端を門脈左枝に誘導し、門脈左枝をブルドック鉗子にてクランプした後に、同留置針を通じて生理食塩水(flash out)→AAVベクター溶液→生理食塩水を順に門脈に直接注入した。門脈注入終了後、血管留置針を抜去し、血管壁穿孔部を8-0ナイロンにて縫合閉鎖した。止血確認後、腹壁を4層にて閉鎖し手術を終了した(図4)。



(図4：肝門部処置図)

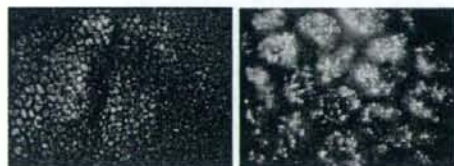
C.結果

ブタを用いて Naked DNA による遺伝子導入法の検討では、注入圧を 40~50mHg で 10 秒程度打ち込むことで安全に注入ができた (図5)。



(図5：圧データ)

カテーテル法により肝臓亜区域に限局して EGFP 発現を認めた (図6)。



(図6：目的領域の GFP の発現)

カニクイザルを用いた AAV ベクターによる遺伝子導入法の検討では、総手術時間は 1 時間 53 分±5 分で、術中の出血量はいずれも微量であった。肝門部を露出後、門脈本幹ならびに門脈左枝の外径を測定したところ、それぞれ 6 ± 0.8 , 4 ± 0.8 mm であった。血液 flash out 用の生理食塩水量は 3 回共 40ml で注入時間は 56 ± 11 秒、ベクター溶液量はそれぞれ 10, 8, 10ml で注入時間は共に 10 秒、ベクター注入後の生理食塩水量は 15 ± 5 ml、注入時間は 18 ± 1 秒であった。門脈左枝遮断から遮断解除までの門脈左枝

阻血時間は 8 ± 3.5 分であった。血管留置針抜去後の門脈穿刺部閉鎖処置もスムーズに行われ、同処置による門脈狭窄等は認められなかった。

D.考察・結論

大動物であるミニブタにおいてカテーテルにより選択的に遺伝子を肝臓に導入することができた。カテーテルを使用しミニブタに選択的に遺伝子を導入することが出来た。本法により欠損遺伝子を簡便に導入することができる。

また AAV ベクター法では、生体のカニクイザル対し開腹下に「門脈本幹直接穿刺法」によるウィルスベクターの門脈注入実験を行い全例とも成功した。全ケースにおいて総手術時間が 2 時間以内かつ門脈阻血時間も 8 分程度で処置を完遂でき、出血や門脈狭窄等の術後合併症も認められなかった。

両システムは前臨床実験としてはほぼ完成されたモデルと考えられる。今後は同システムを基盤とした、実際の臨床治療における遺伝子導入方法を検討する予定である (図7)。



(図7：手術風景)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）

総合（分担）研究報告書

血友病遺伝子治療に向けたサル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターの製造システムの構築と
安定性評価

研究分担者：ディナベック株式会社

代表取締役社長 長谷川 護

研究要旨

我々が開発したサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターは、有効性、安全性試験の実施あるいは製造法の構築が進められており、開発が進んでいるレンチウイルスベクターのひとつである。この SIV ベクターを使用した血友病遺伝子治療を実現するためにベクターデザインの改良、ベクター性能、安定性および GMP 製造システムの構築に向けた検討についての評価を行った。(初年度)ベクターゲノムの宿主染色体へのインテグレーション数による機能力価の測定法の検討を行った。リアルタイム PCR 法によるマーカー遺伝子以外の搭載遺伝子について機能力価を算出するプロトコルを確立した。またベクターの安全性の確保および生産性の向上のために第3世代パッケージングベクターの改良を行った。第3世代パッケージングベクターの gag/pol 遺伝子をヒト細胞に最適化するためにコドンの改変を行い、第3世代パッケージングベクターからウイルス由来の RRE 配列を除去することが可能になった。(次年度)製造システムの最適化に向けてプラスミド量と細胞播種密度の検討を行った。その結果、ジーントランスファーベクターの量を最適化することにより、ベクターの生産性は数倍上昇することが分かった。また細胞播種密度を最適化した結果、生産性が高く粒子力価と機能力価の比が小さくなる条件を見いだした。高速遠心濃縮の効率化の検討を行った結果、従来法よりも2倍時間を短縮することが可能になった。(最終年度)SIVベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討を行った。SIVベクターの生産においては、293T細胞と293T/17細胞の間に大きな違いは認められなかった。また、SIVベクターの安定性試験を行った。その結果、4℃または輸送用液体窒素容器(ドライシッパー)中においては、SIVベクターが安定であることが確認でき、臨床施設においてSIVベクターが安定に使用できることがわかった。以上の検討によりSIVベクターの血友病遺伝子治療の臨床応用に向けた生産性および基本性能に関するデータが取得できた。

A. 研究目的

サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターを含むレンチウイルスベクターは、レトロ

ウイルスベクターの欠点を克服するために開発されたベクターで、終末分化している非分裂細胞へも効率良く遺伝子導入でき、

シュードタイプ化による広範な細胞や組織への遺伝子導入能を有している。また、導入遺伝子が宿主ゲノムに組み込まれ、遺伝子発現が長期間持続することから、血友病に対する遺伝子治療適応のポテンシャルを有するベクターとして期待される。本研究では、血友病遺伝子治療に向け、SIV ベクターの安全性や製造効率を高めるためにベクターデザインの改良、製造システムにおける各ステップの改善およびベクター安定性についての評価を行った。(初年度)臨床試験に使用するベクターは、GMP 基準に則って作製し、品質規格に適合したものを使用しなければならない。GMP グレードのベクターを製造するプロトコルの作成にあたっては、ベクターの生産性が高く、ヒトに投与することを前提とした安全性の確保が重要である。これらの点を考慮し、ベクターゲノムの宿主染色体へのインテグレーション数による機能力価の測定法の検討、ベクター生産性の向上および安全性の確保を目的とした SIV ベクター遺伝子配列のコードンのヒト化についての検討を行った。

(次年度)ベクター生産性を向上するための生産プロトコルの条件検討とベクターを取り扱う際に必要なベクター安定性に関する検討を行った。(最終年度)次年度に引き続きベクター生産条件の検討および安定性の検討を行った。

B. 研究方法

(初年度)

(1) SIV ベクター機能力価 (インテグレーションタイター) の測定法の確立

SIV ベクターを用い遺伝子導入した細胞からゲノム DNA を精製し、SIV ベクターの

組み込み部位数を SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法により測定した。SIV ベクターを 293T 細胞に導入し、3-4 日後にトリプシン/EDTA 処理を行い、細胞を回収した。回収した細胞は血球計算盤で細胞数を測定後、界面活性剤で細胞膜を溶解して核のみを遠心精製した。精製した核は、変性剤として尿素を使用して溶解した。その後、フェノール/クロロホルムとエタノールによりゲノム DNA を精製した。精製ゲノム DNA は吸光度比 260/280 が ~ 2 の高度に精製したサンプルを使用し、細胞あたりのゲノム量 (二倍体細胞で細胞あたり $\sim 6\text{pg}$) からほぼ 100%のゲノム回収率が可能な実験方法を確立した。リアルタイム PCR の検量線は、ジーントランスファーベクターを用い作成した。遺伝子導入プラスミドを 10^4 から 10^6 分子を使用した。プライマーはヒトゲノム上に類似の配列が存在しない WPRE 配列を利用し、100ng のヒトゲノム上のインテグレーション数を測定した。最初に測定しておいた細胞数とリアルタイム PCR で測定した値から細胞一つあたりのインテグレーション数を算出した。

(2) コドンの最適化による SIV ベクターの改良

SIV の gag, pol 遺伝子のコードンをヒトのコードン表 (Human Codon Usage (36349745codons): www.kazusa.or.jp/codon/) をもとに最適化した。ヒト化した gag, pol 遺伝子の全合成は、それぞれ 12-16 塩基をオーバーラップしている合成オリゴプライマー約 150 本使用し、PCR によって段階的に接続した。塩基配列の置換法としては Kotsopoulou らの HIV ベクター-gag, pol と GFP 遺伝子を EGFP 遺伝子にした文献

(Zolotukhin et al., J. Virol. 70, 4646-4564; Haas et al., Cur. Biol. 6, 315-324, 1996) を参考にした。SIV の gag, pol 遺伝子で重複している約 300 塩基の領域を除いたすべてのコドンの gag, pol コドンをヒト化した。ヒト化 gag, pol 合成遺伝子を用いて、第3世代のパッケージングベクターを再構築し、SIV ベクターの生産性の検討を行った。

(次年度)

(1) SIV ベクター生産条件の検討

1-1. プラスミド量

SIV ベクターは現在、一過性のトランスフェクションで生産している。トランスフェクションに使用する4種類のプラスミド (pGTV-EGFP: EGFP 搭載ジントランスファクター, PV 3rd: 第3世代パッケージングベクター, pVSVG: VSVG エンベロープ蛋白質発現プラスミド, pCI-rev: Rev 発現プラスミド) の使用量比と生産性を比較することによって、プラスミド使用量の最適値を求めた。293T 細胞に4種類のプラスミドをトランスフェクションし、2日後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、0.45 μm のフィルターでろ過した後、それぞれの力価を測定した。

1-2. 細胞播種密度

SIV ベクターの生産には、293T/17 細胞を使用している。細胞播種密度とベクター生産性を比較検討した。

(2) SIV ベクター濃縮条件の検討

SIV ベクターを動物実験に使用する場合、高速遠心法でベクターの濃縮と精製を行っている。従来法では、20,000xg で4時間遠心濃縮を行っていたが、今回は40,000xg で2時間の検討を行った。

(3) SIV ベクターの安定性試験

精製した SIV ベクターを動物実験に使用する場合の安定性について検討した。

3-1. 凍結融解の繰り返し

遠心濃縮精製し、力価を測定した SIV ベクターは、1ml のセラムチューブに 200 μl の容量で分注し、使用時まで -80°C で保存している。凍結融解は 37°C で急速融解、ドライアイスエタノールバスによって急速凍結を行った。凍結融解の繰り返しは10回まで行い、そのベクター安定性を検討した。

3-2. ドライシッパー

ドライシッパーは、液体窒素の層の内側にサンプルを保存する空間があり、液体窒素とサンプルは直接触れない構造になっている。ベクター輸送を考慮した実験条件として、 -80°C の保存温度から -195°C のドライシッパーにベクターを移して3日間放置した。その後、再び -80°C に移し、一晩おいてから力価を測定した。対照のベクターは、 -80°C に試験期間保存しておいたベクターを用いた。温度変化が予想される移動は迅速に行い、力価の測定は急速融解を基本操作とした。

(最終年度)

(1) SIV ベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討

SIV ベクターは、リン酸カルシウム法により一過性に作製した。293 細胞、293T 細胞または 293T/17 細胞に4種類のプラスミド (pGTV-EGFP, PV 3rd, pVSVG, pCI-rev) をトランスフェクションし、2日後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、0.45 μm のフィルターでろ過した後、それぞれの粒子力価および機能力価を測定し、生産

性の比較検討を行った。粒子力価の測定は、回収した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。機能力価の測定は、回収した SIV ベクターを 293T/17 細胞に感染させ、2 日後、EGFP 発現細胞をカウントし、行った。

(2) SIV ベクター安定性試験

高速遠心 (40,000g x 2h)により濃縮した SIV ベクターを 4℃または輸送用液体窒素容器 (ドライシッパー) 内での安定性試験に使用し、機能力価の測定を行った。-80℃冷凍庫で凍結保存してある濃縮ベクターを 37℃ウォーターバスで融解後、4℃に移し放置した。2 時間、5 時間、10 時間後にそれぞれの機能力価の測定を行い、安定性の比較検討を行った。また-80℃冷凍庫で凍結保存してある濃縮 SIV ベクターを、液体窒素を充填したドライシッパー内に移し放置した。3 日後、7 日後に機能力価の測定を行い、安定性の検討を行った。

(倫理面への配慮)

レンチウイルスベクターの取り扱いが P2 レベルでの取り扱いが認可されており、「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」に従って、「組換え DNA 実験指針」(平成 4 年 1 月 3 1 日付け文部科学省告示第 5 号)を遵守した実験操作法を行った。

C. 研究結果

(初年度)

(1) SIV ベクター機能力価 (インテグレーションタイター) の測定法の確立

SIV ベクターによる組み込み部位を、遺伝子導入した細胞から精製したゲノム DNA を材料にしてリアルタイム PCR で定量することが可能になった。細胞あたりのインテグレーション数は、回収した細胞で測定した。インテグレーション数の測定が正確に実施できていることは、同時に生産した GFP 搭載遺伝子の GFP 力価とベクター粒子力価の数値を比較することにより確認した。

(2) コドンの最適化による SIV ベクターの改良

ヒトのコドン使用頻度を利用して、SIV の gag, pol について遺伝子の全合成を行った。鋳型を使用しない条件で、12 本のオーバーラップしているプライマーの接続が PCR によって可能であった。12 本のプライマーを接続した 300-350bp の合成遺伝子を 9 本作製し、PCR で段階的に接続し、完全合成した 4.5kb の gag, pol 遺伝子を得た。このヒト化 gag, pol 合成遺伝子を用いて、第 3 世代のパッケージングベクターを再構築した。このプラスミドを用い、ベクター生産性の検討をおこなった結果、従来型の第 3 世代パッケージングプラスミド ($2.7 \pm 0.1 \times 10^8$ TU/ml) と比べ改変型では、機能力価の大きな低下もなく、 10^8 レベルの生産性が得られた ($1.6 \pm 0.2 \times 10^8$ TU/ml)。また RRE 配列をパッケージングベクターから除去した場合でも、機能力価の低下は見られなかった ($1.7 \pm 0.1 \times 10^8$ TU/ml)。しかしながら、rev を加えていない場合は、大きな低下が見られた ($7.7 \pm 1.3 \times 10^6$ TU/ml)。

(次年度)

(1) SIV ベクター生産条件の検討

1-1. プラスミド量

SIV ベクターを一過性のトランスフェク

ションで生産する場合に使用するプラスミドの基本使用量比を再検証した。決定した量比での生産性は、マーカー遺伝子 GFP の場合、約 5×10^7 TU/ml であった。ジーントランスファーベクターは実験によって搭載遺伝子の種類が異なる。血友病では血液凝固因子が治療用遺伝子としてジーントランスファーベクターに搭載されている。搭載遺伝子の異なる SIV ベクターを大量生産する必要がある場合には、大量生産前にジーントランスファーベクターの量を最適化すると SIV ベクターの生産性は数倍向上することが分かった。

1-2. 細胞播種密度

トランスフェクション前日に 15cm シャーレに播種する 293T の細胞数を再検討した。15cm シャーレ 1 枚あたりに使用する細胞数は 1.2×10^7 の場合に生産性が高く約 5×10^7 TU/ml であった。また粒子力価も合わせて比較検討した結果、同条件で粒子力価と機能力価の比が最も小さかった。すなわち、この細胞数を用いた生産条件で回収した SIV ベクターは質的に良いベクターであることを示している。

(2) SIV ベクター濃縮条件の検討

SIV ベクターを濃縮する場合、従来は 20,000xg で 4 時間行っていた。作業時間を短縮するために 40,000xg、2 時間の条件と比較検討した。その結果、従来法の半分の時間の 2 時間でも 40,000xg であれば従来法と同等の 60%以上のベクターを回収可能であることが分かった。SIV ベクターの濃縮には、高速遠心機；ベックマン製 Avanti J-25I を使用している。使用ローターは、ベックマン製 JA-18、fixed angle である。SIV ベクターの遠心濃縮には swing

type の SW ローターよりも fixed angle type のローターを用いた方が回収率は高かった。また、遠心管の材質も回収率に影響を与え、これまでの検討ではポリカーボネート製の遠心管を使用した場合が最も良好な回収率であることが確認されている。

(3) SIV ベクターの安定性試験

3-1. 凍結融解の繰り返し

SIV ベクターの凍結融解の繰り返しは、37°Cでの急速融解、ドライアイスエタノールバスでの急速凍結を基本操作として行い、1ml のセラムチューブに 200 μ l のベクター量で行った。温度変化は、-80°C→37°C→4°Cである。その結果、凍結融解の繰り返しによる濃縮精製したベクター (1×10^9 TU/ml) の機能力価に変化は認められなかった。動物実験等で使用する場合には、通常-80°Cから 1 回のみベクター融解操作なので測定した力価通りの値で実験操作が可能であることが分かった。

3-2. ドライシッパー (3 日間)

SIV ベクターの長距離輸送を想定し、ドライシッパー中の安定性のデータを把握することは、生産プロトコルの確立と同様に必要不可欠なデータである。濃縮精製ベクター (2×10^9 TU/ml) をドライシッパー内に 3 日間保存した条件で安定性を検討した。温度変化は、通常の保存温度が-80°Cで、ドライシッパーが-195°C、3 日後に再び-80°Cのフリーザーに戻した後、SIV ベクターを融解して力価を測定した。その結果、SIV ベクターは、本実験条件において、その力価は対照の-80°Cに保存しておいたものが $2.0 \pm 0.2 \times 10^9$ TU/ml であるのに対し、ドライシッパーでは $2.1 \pm 0.3 \times 10^9$ TU/ml の測定力価であった。このことから、ドラ

イシッパー内で少なくとも3日間はSIVベクターの力価は安定であることが示された。(最終年度)

(1) SIVベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討

293, 293T, 293T/17 それぞれの細胞で生産したSIVベクターの機能力価の測定を行った。その結果、293細胞を用い生産したSIVベクターの機能力価は 1.2×10^5 TU/ml, 293T細胞は 3.5×10^7 TU/ml, 293T/17細胞は 4.3×10^7 TU/mlであった。同様に粒子力価の測定を行った結果、293細胞を用い生産したSIVベクターの粒子力価は 3.8×10^7 viral genomes/ml, 293T細胞は 3.5×10^9 viral genomes/ml, 293T/17細胞は 5.2×10^9 viral genomes/mlであった。

(2) SIVベクターの安定性試験

-80°C保存サンプルを37°Cウオーターバスで融解後、4°Cで保存したSIVベクターのそれぞれの機能力価は、0時間(control)； 6.5×10^9 TU/ml, 2時間後； 5.9×10^9 TU/ml, 5時間後； 5.4×10^9 TU/ml, 10時間後； 5.1×10^9 TU/mlであった。-80°C保存してあるSIVベクターをドライシッパー内に移し保存した場合、それぞれの機能力価は、0日(control)； 3.6×10^9 TU/ml, 3日後； 4.8×10^9 TU/ml, 7日後、 3.8×10^9 TU/mlであった。

D. 考察

前臨床試験とともに臨床試験において、SIVベクターの性能を正確に測定し、搭載遺伝子の種類によらず、普遍的にSIVベクターの機能力価を測定できる方法を確認しておくことは重要である。今回、リアルタイムPCRによるインテグレーションタイトターの測定法を確立した。この方法により、正確な機能力価の測定が可能になり、投与

量による治療効果の再現性ととも、組み込み数を制御することによって一定の安全性を臨床で確保することができる。また、ベクターの機能としてインテグレーションを測定することによって、一つの細胞のゲノムに対して一ヶ所の組み込み部位ができるように機能力価を設定することが可能になる。インテグレーションタイトターの測定は組み込み型のベクターの場合、安全性の面からも非常に重要なベクターの基礎データである。

ウイルス由来遺伝子のほ乳類細胞での発現量は一般的に低いが、コドンを最適化することによってその発現量を高めることができる。本実験においてgag, pol遺伝子のコドン改変は、結果的にSIVベクターの生産性を向上させることはできなかったが、第3世代のパッケージングベクターからRRE配列を除去することが可能になった。パッケージングシグナルとgag遺伝子の5'側の配列はオーバーラップしていることから、ジーントランスファーベクターとパッケージングベクターの間で一部全く同じDNA配列が存在し、ベクター生産細胞内で組み換えがおこる可能性がある。しかしながら、今回のコドン改変による塩基配列の置換によって、組換えによる複製型ウイルスの発生率を低減させ、高い安全性を確保することができたと考えられる。

SIVベクターの生産に使用するプラスミド量、細胞播種密度、ベクター濃縮条件を最適化することにより、従来法よりも数倍のベクター生産が期待できることが分かった。また、生産条件によりSIVベクターの品質が異なることが分かった。品質は主に粒子力価と機能力価の比で表される。一般

的に粒子力価の方が機能力価よりも大きく、このことは生産した SIV ベクター粒子の中に非感染性の粒子が含まれていることを意味する。トランスフェクション時に最適な細胞数を使用することにより、粒子力価と機能力価の比を小さくすることができる。すなわち、より品質の高いベクター生産が可能であることが判明した。また、遠心精製により培地からウシ由来の蛋白質をできる限り除去することも重要であり、免疫反応は一般的に低い方が遺伝子治療の成績が良くなる傾向も報告されている。無血清培地を使用するなどベクター回収用培地の検討が必要である。

SIV ベクターの生産に使用する細胞の比較検討を行った結果、293T 細胞と 293T/17 細胞の間に大きな違いは認められなかった。しかしながら、293 細胞を用いたベクターの生産性は、293T 細胞および 293T/17 細胞を用いた場合に比べてかなり低い効率であった。粒子力価で約 100 倍、機能力価で約 300 倍低い値を示した。293T 細胞は 293 細胞に Simian Virus 40(SV40)のラージ T 抗原を組み込んで作製された細胞株であり、293T/17 細胞は 293T 細胞のクローン派生株である。293T 細胞および 293T/17 細胞は、SV40 のラージ T 抗原を持ち、SV40 の複製開始点を持つプラスミドの複製を増強するためベクターの生産性が向上する。一方で、SV40 ラージ T 抗原は、癌原性遺伝子であるので、293T または 293T/17 細胞を用い生産した SIV ベクターでは、その安全性に問題が生じる可能性が考えられる。しかしながら、これまでレンチウイルスベクターの投与による腫瘍誘発の報告はなく、ベクター精製過程においてベンゾナーゼ処理等によ

り細胞ゲノム由来の残存 DNA を WHO が示した基準値以下にすることが可能であることから、必ずしも懸念する必要はないと思われる。

実際の臨床試験を想定して行った。GMP に準拠したベクター製造施設で製造された遺伝子治療用ベクターを輸送する場合には、一般的に輸送用の液体窒素容器（ドライシッパー）を用いる。ベクター製造は海外で実施されることも想定されるため、本実験においては 7 日後までのドライシッパー内における安定性の検討を行った。その結果、ドライシッパー内に SIV ベクターを 7 日間保存した場合においても安定であることが分かった。また 4℃ 保存や凍結融解の繰り返しにおいても比較的安定していた。低分子化合物と異なり遺伝子治療用ベクターなどのバイオリジクスの場合は、特に安定性が問題となるが、SIV ベクターでは適切な基本操作を行っている限りその安定性には特に問題がないことが分かった。

E. 結論

GFP および治療遺伝子を搭載した SIV ベクターのインテグレーション部位数を新規のプロトコールを用いて算出し、染色体組み込み数による機能力価測定法を確立した。その結果、搭載遺伝子の種類を問わず、SIV ベクターの機能力価を算出できるようになった。

SIV の gag, pol 遺伝子のコドン使用頻度をヒト化した遺伝子を合成した。この遺伝子を用いて、第 3 世代のパッケージングベクターを再構築した。その結果として第 3 世代のパッケージングベクターから RRE 配列を除去することが可能になった。したが

って、相同組換えによる増殖型ウイルス出現のリスクが低減し、安全性が向上した。また、この改変による大きな力価の減少はなく、実用的で安全性の高いベクター製造が可能になった。

SIV ベクターを動物実験等に用いるためには、大量生産を行い、濃縮精製する必要がある。in vivo 投与実験においては、ベクター力価の安定性が保たれる条件で実施することが重要であり、その結果、実験結果の再現性が保たれる。以上のことをふまえて、生産条件については、プラスミド量、細胞播種密度の最適条件を再検証し、遠心濃縮条件については、ベクター回収率を指標として遠心力、時間、ローター、遠心管の材質を検討した。その結果、従来のプロトコールに比べて数倍のベクター力価が回収可能であることが示された。また、安定性試験については、使用時のベクターの凍結融解は通常 1 回であるが、10 回の凍結融解を繰り返し行った場合でも、SIV ベクターの力価は減少することなく、きわめて安定であることが判明した。さらに、長距離輸送時に使用される液体窒素容器ドライシッパー内や 4°C の条件化においても SIV ベクターは、安定であることが確認できた。

SIV ベクターの生産に用いる細胞種の検討を行った結果、293 細胞よりも 293T 細胞、293T/17 細胞を用いて生産した方がより高い効率で生産できることが確認できた。

以上の結果より、SIV ベクターは他のレンチウイルスベクターと同等あるいはそれ以上に使用しやすい実用的なベクターであり、血友病遺伝子治療への応用が期待される。

F. 健康危険情報

本ベクターの基本骨格となっている SIV_{agm} 株は自然宿主であるアフリカミドリザルに対し病原性はなく、実験的に他のサルに接種した場合でも病原性を示さないことが報告されている。またヒトに対する病原性は知られていない。我々のベクターデザインは、ウイルスのパッケージに必要な遺伝子群とマーカー遺伝子(治療遺伝子)、エンベロープ蛋白質遺伝子を別々のプラスミドに搭載している。また現在の使用している第 3 世代ベクターではパッケージングベクターから rev 発現プラスミドを分割し、さらに隣接遺伝子への影響を少なくするように 3'LTR を改変し、自己不活化を行っている。従って、このシステムで生産するベクターは、非増殖型のベクターで、野生型ウイルスのように自己増殖可能なウイルスの出現の可能性はほとんどないと考えられる。また、HIV ウイルスの遺伝子との相同性も 30-60%と低いため HIV ベクターと異なり、HIV の保因者への感染による組換えウイルス出現の可能性も低いと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki M., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Goto Y., Kohno R.I., Murakami Y., Inoue M., Ueda Y., Hasegawa M., Tobimatsu S., Sueishi K. and Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent