

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

高性能の新規 RNA ベクターによる血友病遺伝子治療の開発
プロジェクトの総合推進

安全性評価のための発がん関連遺伝子変異スクリーニングシステム検討

担当責任者	須磨崎 亮	（筑波大学医学医療系）
同	千葉 滋	（同上）
研究協力者	野口 恵美子	（同上）
同	福島 絃子	（同上）

研究要旨

本遺伝子治療実用化研究は、先行する「ヒト前脂肪細胞にレトロウイルスベクターを用いてヒトレシチン-コレステロール：アシルトランスフェラーゼ（hLCAT）遺伝子を導入し、LCAT 欠損症患者に自家移植する遺伝子脂肪治療」技術の実用化共同研究において、セルジェンテック株式会社が独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）対面助言で得たコメントのうち、安全性確保と評価に関する指摘を踏まえて、腫瘍性増殖能獲得の有無をスクリーニングするシステム構築を目的とした。他の業務項目との総合的役割分担として培養・遺伝子導入脂肪細胞の発がん関連遺伝子に変異が生じるか否か、次世代シーケンサを用いた網羅的スクリーニングシステムを構築するための基礎的検討を行った。

遺伝子治療においてもっとも危惧されるリスクの1つが発がん性であり、過去に実施された遺伝子治療臨床研究のうち、原発性免疫不全症患者の造血細胞を標的として目的遺伝子を導入・発現させた複数例において白血病の発症が報告された。ヒト前脂肪細胞にレトロウイルスベクターを用いてヒトレシチン-コレステロール：アシルトランスフェラーゼ（hLCAT）遺伝子を導入し、LCAT 欠損症患者に自家移植する遺伝子脂肪治療」技術は、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社が特許を保有する技術（I. 総括報告書資料参照）であるが、

この開発過程においても PMDA からは、発がん性評価に関する指摘があった。染色体には組込まれない RNA ベクターを用いるのが本実用化研究であるが、最新の手法を利用して発がんメカニズムに関連することが知られている遺伝子変異のスクリーニングシステムを構築し、利用することは非常に有意義であると考えられる。

A. 研究目的

本遺伝子治療の安全性確認の一環として、まず、遺伝子治療対象者本人が、もともと発がん関連遺伝子変異を有していないかど

うか確認するためのスクリーニングシステムを構築する。同時に、*ex vivo* において新規 RNA ベクターによって血液凝固因子遺伝子を導入し、発現させた脂肪細胞の発がん関連遺伝子に変異が生じているか否かのスクリーニングに利用するための基礎的データを得る。

B. 研究方法

Targeted resequence に適した方法として、これまでも実績がある Life Technologies 社の IonPGM システムを選択した。

IonDesigner を用いて、まず代表的な家族性がんの原因遺伝子である p53 を含めた遺伝子の翻訳領域をターゲットとし、アンプリコンを設計した。

日本人における変異が十分に解析されている p53 遺伝子変異を持つ患者 (Li-Fraumeni 症候群) を positive control として、スクリーニングシステムを検証した。

患者末梢血より DNA を抽出した。前述の方法で設計されたアンプリコン、Ion AmpliSeq Library Preparation を用いライブラリー作成した。IonPGM OT2 400 kit を用いテンプレート調整を行い、IonPGM システムを用いて、シーケンスを行った (全て Life Technologies 社)。得られた結果は IonReporter を用いて、alignment, mapping 等を行って判定した。

また、同様の手法が本システムで再現可能かにつき、代表的な家族性がんの原因遺伝子 47 遺伝子の全翻訳領域 (283kb) を IonDesigner を用いアンプリコン設計し、検討した。

(倫理面への配慮)

予期しない家族性発がん原因遺伝子変異を検出した場合には、過去の報告などを踏まえ、病的変異かどうかを慎重に判断する。確定された変異箇所が胚細胞系列に認めない新規体細胞変異かの検証を行う際には、あらかじめ患者に説明し、結果開示の希望調査を行った上で胚細胞系列の塩基配列の同定を行う。

ただし、遺伝子変異のみで発病するかの予測は非常に困難であるため、患者に確定的な結果を伝えられる可能性は非常に低いと予想される。

結果を伝える際には、希望に応じて十分な遺伝カウンセリングを受ける機会を保証する。

C. 研究成果

Ion Designer を用いて p53 の全エクソン及び UTR 領域を含めた標的遺伝子領域を増幅するアンプリコンを設計した。p53 のエクソン領域は 100% がカバーされた。IonPGM システムを用い、シーケンスを行ったところ、一般多型 3 か所、変異 p. Y220C が同定された。あらかじめエクソン領域に絞って Sanger 法で同定されていた配列は全て IonPGM システムで同定された。Sanger 法でカバーされていない intron 領域の多型が 1 か所 IonPGM システムで同定された。

発がんメカニズムとの関連が明らかにされている代表的な遺伝子 (例、TP53、RB1、WT1、APC など) を中心とし、47 遺伝子の全翻訳領域 (283kb) を、Ion Designer を用いてアンプリコンを設計した。1 遺伝子においてカバー率が 45.1% と、極端に低値で

あったため、46 遺伝子を対象とした。

46 遺伝子の全翻訳領域のうち、99.46%がカバーされた。また、カバーされていない領域内で、非常に重要な変異はごくわずかであり、当該箇所は Sanger 法で確認可能と判断した。

D. 考察

本システムを用いて、発がん遺伝子変異のスクリーニングが可能と考えられるが、*ex vivo* で培養した脂肪細胞には、細胞毎に異なる遺伝子変異が生じる可能性がある。このような検体を用いた場合の検出能については、更に検討が必要である。

E. 結論

作成した発がん関連遺伝子変異スクリーニングシステムは、simulation 上、全標的遺伝子の 99.46%をカバーし、p53 遺伝子変異検体の変異部位を高精度に検出した。

F. 健康危険情報 (該当せず)

G. 研究発表

- | | |
|---------|----|
| 1. 論文発表 | なし |
| 2. 学会発表 | なし |

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

高性能の新規 RNA ベクターによる血友病遺伝子治療の開発
遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
(蛍光色素遺伝子トランスジェニックマウスの開発と利用)

担当責任者 三輪佳宏（筑波大学医学医療系）

研究要旨

iRFP を腭限定的に発現させたマウスの作成によって、生体イメージング技術を実用化研究にも利用可能となった。iRFP 遺伝子を導入した脂肪細胞を、このマウスに皮下移植し、体内動態を継時的に追跡評価することができる。継時的に解剖する必要がなくなり、実験動物の殺処分を最小限におさえることが可能であるという側面においても、大きなメリットを得られる。本実用化研究にとどまらず、新規細胞療法の開発・実用化研究において、汎用性のある技術として有用である。

A. 研究目的

新規 RNA ベクターを用いて蛍光色素遺伝子を導入した脂肪細胞のマウス体内での動態を解析するシステムを構築する。生体イメージング技術（特許）を利用し、移植した遺伝子導入脂肪細胞の三次元的追跡システムの構築を検討する。

B. 研究方法

腭にのみ iRFP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。胎児期から iRFP を腭に発現するため、免疫学的寛容が成立した。

発現が腭のみに限られるため、マウス脂肪細胞を移植する部位を選ぶことによって、腭の蛍光の影響を避けて評価することが可能となった。

一方で、通常の飼料には大量の蛍光物質

が含まれ、これを与えている状態であると、消化管に多くの蛍光が発生してしまうため、オリエンタル酵母株式会社と協力して、無蛍光飼料を開発した。この飼料を与えることによって、消化管由来の蛍光ノイズを回避可能になった。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え実験計画について、筑波大学遺伝子実験センターにおける審査を受け、学長による承認を得て実施した（筑大研企第 11-15 号、資料）。

C. 研究成果

遺伝子導入脂肪細胞の実験に向けて、使用する蛍光タンパク質 iRFP のマウス側への影響を検索し、一方では iRFP そのものがマウスの免疫系から異種蛋白として認識さ

れ、排除されるメカニズムの回避方法を確立した。

D. 考察

本研究での遺伝子発現のモニタリングには、2011年に開発されたばかりの近赤外線新規蛍光タンパク質iRFP (Filonov et al. Nat Biotechnol. 2011)を応用する。この近赤外の波長域は、哺乳動物の体内への浸透度が高いため、マウスであれば非侵襲のままに完全に体内を3次元イメージングすることが可能になった。筑波大学生命科学動物資源センターでは、三輪らが開発したイメージング手法 (Tamura, Miwa et al. PNAS 2008)に取り入れることによって、感度・特異度を高める工夫を重ね、長期間にわたる非侵襲イメージング解析を実現した応用例としても注目度の高い手法である。

本システムを利用し、以下に示す実験手順に沿って、研究を遂行する準備が整った。すなわち、iRFP 遺伝子を導入したマウス脂肪細胞をマウスに移植し、最長2年間の観察を行う。体重・活動性を評価し、三輪らが開発した生体イメージングの手法

(Tamura, Miwa et al. PNAS 2008)を利用して、継時的に生体内分布の推移を評価する。一定の時期にマウスを解剖し、各臓器においてベクターおよびiRFP 遺伝子検出の有無を確認する。抗センダイウィルス抗体をELISAによってスクリーニングする。次世代へのベクターおよびiRFP 遺伝子移行の有無を評価する。

E. 結論

遺伝子導入脂肪細胞の体内動態を、非侵襲的に、長期間にわたって追跡することが

可能なシステムを構築した。

F. 健康危険情報 該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, Horikawa DD, Katayama T, Arakawa K, Toyoda A, Kubo T, Kunieda T. Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. Plos One. 2015 Feb 12;10(2):e0118272. doi: 10.1371/journal.pone.0118272. eCollection 2015.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年も記入)

三輪佳宏 “近赤外非侵襲蛍光イメージング技術の開発と応用” 日本動物実験代替法学会 第27回大会 シンポジウム 招待講演、12月6日2014年(横浜) 講演要旨集 p62 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

特許第4944781号 「テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法」 発明者 三輪佳宏、出願 科学技術振興機構 取得日：平成24(2012)年3月9日

特許第4415152号「蛍光資料の蛍光の局在態様を調べる方法」発明者 三輪佳宏 出願 筑波大学 登録日：平成21(2009)年12月4日

特許第5126907号「抗生物質によるタンパ

ク質の転写・分解二重制御法」発明者 三輪佳宏 出願 科学技術振興機構 取得日：平成24(2012)年11月9日 取得日（アメリカ）US8,232,099B2 2012年7月31日

特許第5510914号 「細胞透過型新規蛍光色素」09年3月11日 発明者 三輪佳宏、千田直子、新井達郎 出願 筑波大学 取得日 2014年4月4日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

筑大研企画 第11-15号
平成23年 3月 4日

遺伝子組換え実験責任者
人間総合科学研究科
三輪 佳宏 殿

学 長
山 田 信 博
(公印省略)

遺伝子組換え実験計画の承認について (通知)

下記の遺伝子組換え実験計画を承認したので通知します。
実施に当たっては、適切な拡散防止措置を執ること等、「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」等の関係法令を遵守してください。

記

承認番号	実験課題名	実験実施 期間	実験の 区分	実験室名	安全主任者
100195	蛍光タンパク質を応用したin vivo イメージング技術の確立-2	~H28.3	動物	生命科学動物資源センター発生工学棟マウス飼育エリアF	國田智
100196	蛍光タンパク質を用いたイメージング技術の開発と応用	~H28.5	微生物	生命科学動物資源センター学生実習室、遺伝子構造解析室	入江賢児 國田智

文部科学省 ライフサイエンスの広場 <http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html>
筑波大学 ライフサイエンス実験の安全 <http://anzenmon.jp/page/622891>

業務報告書(三輪)資料

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

高性能の新規 RNA ベクターによる血友病遺伝子治療の開発
遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（血友病モデルマウスに対する薬理効果の評価）

担当責任者	福島 敬	（筑波大学医学医療系）
同	久武 幸一	（同上）
同	西村 健	（同上）
同	三輪 佳宏	（同上）
研究協力者	八牧 愉二	（筑波大学附属病院）

研究要旨

マウスの第 VIII 血液凝固因子遺伝子等を脂肪細胞に導入し、発現させたものを同系移植し、血友病 A モデルマウスに対する治療効果を確認するシステム構築を検討することを目的とした。血友病 A モデルマウスの個体数を安定的に確保するシステムを学内において構築し、作業を開始した。血友病 A モデルマウスに対する予備的薬理試験プロトコルを作成した。マウス第 VIII 血液凝固因子の活性および抗原定量システム構築を継続して検討する。

A. 研究目的

マウスの第 VIII 血液凝固因子遺伝子等を脂肪細胞に導入し、発現させたものを同系移植し、血友病モデルマウスに対する治療効果を確認するシステム構築を検討する。

（倫理面への配慮）

「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」および「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」を踏まえて計画し、筑波大学の遺伝子実験センターおよび生命科学動物資源センターの承認を得て実施した（資料 1）。

B. 研究方法

市販の第 VIII 血液凝固因子遺伝子ノックアウトマウス（血友病 A モデルマウス）を手順に沿って輸入し、筑波大学生命科学動物資源センターにおいて胚移植を行って効率よく繁殖させる作業を開始した。

予備的薬理試験として、血友病モデルマウスに対する本遺伝子治療の有効性を確認するためのプロトコルを作成した。

C. 研究成果

血友病 A モデルマウス（第 VIII 血液凝固因子ノックアウト）を Jackson 研究所から購入し、生命科学動物資源センターに搬入した。検疫の後、胚移植によって効率よく

繁殖させるための作業を開始した。

血友病Aモデルマウスに対する遺伝子導入脂肪細胞同系移植の薬理効果を予備的に評価するためのプロトコールを作成した。概要を資料2に示す。

D. 考察

血友病Aモデルマウスに対する治療効果の確認のために、既報論文等では、部分トロンボプラスチン時間や出血時間の測定が用いられたが、更に高精度に評価するために、マウス第VIII血液凝固因子の活性および抗原定量システム構築を検討する。

E. 結論

血友病Aモデルマウスの個体数を安定的に確保するシステムを構築し、作業を開始した。

血友病Aモデルマウスに対する予備的薬理試験プロトコールを作成した（資料2）。

F. 健康危険情報 該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

（発表誌名巻号・頁・発行年も記入）

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許第4478788号「センダイウイルス温度感受性株由来のウイルスベクター」：西村健・瀬川宏知・中西真人（（独）産業技術総合研究所）平成22年3月26日登録

特許第4936482号「改良された持続感染型

センダイウイルスベクター」：西村健・瀬川宏知・中西真人（（独）産業技術総合研究所）平成24年3月2日登録

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成 26 年度 動物実験計画書

生命科学動物資源センター

受付 No.

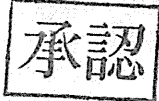
347

筑波大学長 殿

申請日 平成 27 年 1 月 26 日

動物実験責任者	所属	医学医療系		職名	教授	
	氏名	須磨崎 亮 		動物実験に関する全学講習会の受講	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 受講予定: 年 月	
	連絡先	TEL 内線 3785 PHS e-mail rsuma@md.tsukuba.ac.jp 連絡担当者 福島敬准教授 PHS 7868 e-mail tksfksm@md.tsukuba.ac.jp				
<input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 企業との連携が多いため) <input type="checkbox"/> 新規 <input type="checkbox"/> 継続						
研究課題名 RNA ベクターを用いた遺伝子改変脂肪細胞の生体内動態解析および血友病モデルマウスの治療実験						
実験期間 承認の日 ~ 平成 27 年 5 月 31 日 (対象となる実験予定期間: 平成 26 年 6 月 1 日 ~ 平成 27 年 5 月 31 日)						
飼養保管施設 <input checked="" type="checkbox"/> 生命科学動物資源センター C 棟 <input type="checkbox"/> 2E115 <input type="checkbox"/> 2E117/119 <input type="checkbox"/> 2E 棟 2 階 (島野教授スペース) <input type="checkbox"/> 生物・農林学系棟 D603 <input type="checkbox"/> 生物科学系フジプレハブ <input type="checkbox"/> 共同研究棟 A203 <input type="checkbox"/> 5C115 <input type="checkbox"/> 体育科学系棟 A207-2 <input type="checkbox"/> 総合研究棟 D 棟動物飼養保管施設 <input type="checkbox"/> 生命領域学際研究センター <input type="checkbox"/> 農林技術センター <input type="checkbox"/> 遺伝子実験センター <input type="checkbox"/> 下田臨海実験センター <input type="checkbox"/> 菅平高原実験センター <input type="checkbox"/> 医科学棟ゼブラフィッシュ飼育施設 <input type="checkbox"/> 国際統合睡眠医科学研究機構マウス飼育室 Y <input type="checkbox"/> 国際統合睡眠医科学研究機構マウス飼育室 U <input type="checkbox"/> その他 ()						
動物実験室 (飼養保管施設に併設した動物実験室以外を使用する場合に記入。)						
動物実験実施者	氏名	所属系・職名 (学生は所属・年次)	全学講習会の受講	氏名	所属系・職名 (学生は所属・年次)	全学講習会の受講
	田中 順子	医学医療系・非常勤 研究員	<input checked="" type="checkbox"/> 有	河村 光佑	修士 1 年	<input checked="" type="checkbox"/> 受講予定: 27 年
坂口 翔太	修士 2 年	<input checked="" type="checkbox"/> 有	須磨崎 亮	医学医療系・教授	<input checked="" type="checkbox"/> 有	
黒山 喬允	修士 2 年	<input checked="" type="checkbox"/> 有	福島 敬	同・准教授	<input checked="" type="checkbox"/> 受講予定: 27 年	
逆井 智貴	修士 1 年	<input checked="" type="checkbox"/> 有	八牧 倫二	附属病院・講師	<input checked="" type="checkbox"/> 受講予定: 27 年	
				磯山 茂美	技術職員	<input checked="" type="checkbox"/> 有
				藤沢 千寿子	技術職員	<input checked="" type="checkbox"/> 有
代替法の検討 <input checked="" type="checkbox"/> 1. 代替法がない <input type="checkbox"/> 2. 代替法の精度が不十分 <input type="checkbox"/> 3. その他 ()						
予想される苦痛の程度 <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input checked="" type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> V ※ 別表 1 動物実験の倫理カテゴリーを参照。 ※ 基準 IV、V に相当する実験は、動物実験以外の代替手段の有無、実験結果の意義・重要性、実験方法の妥当性について、別紙を添付して詳細に説明する。						
実験動物	動物の種類	系統	性別	匹数	微生物学的品質 (導入時の品質を記入)	入手先
	マウス	C57BL/6J B6(Cg)-Tyrc-2J B6hr/hr Balb/c C3H 凝固因子 KOB6	オス・メス オス・メス オス・メス オス・メス オス・メス オス・メス	50 200 100 50 30 30	<input checked="" type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> コンベンショナル <input type="checkbox"/> その他 ()	<input checked="" type="checkbox"/> 動物生産業者 <input type="checkbox"/> 大学 <input type="checkbox"/> 研究所 <input checked="" type="checkbox"/> その他 (センター内繁殖)
<input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 民間企業との連携が多いため) ※ 直接的な目的だけでなく、その動物実験が必要な理由、他の方法で代替できない理由、その動物実験の科学的・社会的意義等について具体的に記載する。						
研究目的と意義、実験の必要性 RNA ベクターを用いて蛍光色素遺伝子を導入したマウス脂肪細胞を同系移植し、蛍光 in vivo イメージングを用いて生きたまま、時間を追って体内分布、維持期間等を検証する。維持期間を延長させる手法について、検討する。 血友病の根治を目指した遺伝子改変脂肪細胞自家移植療法の効果を、血液凝固因子遺伝子ノックアウトマウスを用いて確認することは、欠かせないステップである。						
実験内容 <input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 民間企業との共同実用化研究であるため) ※ 実験群、使用匹数及びその算出根拠、動物に加える処置の内容及び期間、使用機器等を具体的に記入するとともに、実験方法に科学的な妥当性があることを記載する。						

業務報告書(福島ら)資料1

	<p>RNA ベクターを用いた遺伝子改変脂肪細胞の生体内動態解析</p> <ol style="list-style-type: none"> RNA ベクターを用いて蛍光色素遺伝子を導入したマウス脂肪細胞を、<i>in vivo</i> 蛍光イメージング用に開発したマウスに同系移植する。脂肪細胞はマウスの腰部から採取し、培養液中でRNAベクターを作用させた後に、蛍光発現を確認し、同系マウス背部に注入・移植する。 移植後の脂肪細胞が発する蛍光を利用して、その分布、維持期間(約2年を観察期間の上限)を確認する。 安楽死後に解剖して、RNA ベクターの体内分布を確認する。 RNA ベクターに対する抗体等が産生されていないか、確認する。 次世代へのベクターまたは搭載遺伝子の移行の有無について確認する。 <p>遺伝子改変脂肪細胞による血友病モデルマウスの治療実験</p> <ol style="list-style-type: none"> RNA ベクターを用いて血液凝固因子遺伝子を導入したマウス脂肪細胞を、ノックアウトマウスに同系移植(背部皮下に移植)する。 血液凝固能、APTT の改善、凝固因子の抗原/活性定量値の改善を評価し、薬理効果を検証する。 妥当な脂肪細胞移植数を検討する。 効果の持続時間を確認する。
<p>苦痛軽減法 (麻醉法等)</p>	<p>※ 実験処置により予想される障害、症状、苦痛の程度及びその軽減方法について記載。 特に、苦痛の程度が高い場合には、人道的エンドポイントを設定し、記載する。(例：全身症状の悪化や腫瘍サイズの増加(体重の10%まで)が見られる場合には、実験を終了し、安楽死させる。)</p> <ul style="list-style-type: none"> IVIS によるイメージングでは、イソフルラン麻酔下で非侵襲イメージングを行い、苦痛はない。 連続イメージングの解析には、イソフルラン麻酔下で開腹術を行い組織の蛍光を観察するため、術後数日間、中程度の痛みは避けられない。しかし、臓器を大きく欠失させる事は無いので、長期間にわたる術後の苦痛は少ないと考えられる。また、観察用の顕微鏡のレンズが内視鏡のように細く、開腹の際切開する範囲を狭められるため、通常の観察よりも苦痛を軽減できると考えられる。
<p>安楽死法</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> 麻酔薬 (イソフルラン) の過剰投与 <input checked="" type="checkbox"/> CO₂ <input checked="" type="checkbox"/> 頸椎脱臼 <input type="checkbox"/> 全身麻酔下での全採血等 <input type="checkbox"/> その他 ()</p>
<p>特殊実験 区分</p>	<p><input type="checkbox"/> 特殊実験に該当しない <input checked="" type="checkbox"/> 遺伝子組換え生物使用実験 <input checked="" type="checkbox"/> 承認済 <input type="checkbox"/> 承認申請中 ※1 <input checked="" type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> 感染動物実験 <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3 (様式2を添付する。) ※2 <input type="checkbox"/> 有害物質投与動物実験 (様式2を添付する。) <input type="checkbox"/> 放射性同位元素・放射線使用動物実験 <input type="checkbox"/> イヌ・ネコ・サル使用実験</p> <p>※1 遺伝子組換え生物使用実験は、別途「遺伝子組換え実験計画承認申請書」の承認申請が必要です。 ※2 感染動物実験 (BSL2, BSL3) は、別途「研究用微生物等利用・保管届出申請書」の届出又は承認申請が必要です。</p>
<p>委員の意見</p>	<p>遺伝子改変マウスの繁殖は計画的に実施し、必要最小限の匹数にて系統維持下さい。動物は頻繁に観察し、定期的に体重を記録、病態状態の把握に努めて下さい。苦痛を伴う場合は必要に応じて鎮痛薬の投与を行い、苦痛の軽減を図ってください。全身症状悪化が見られる場合は安楽死を実施してください。 (RNAウイルスベクター導入)</p> <p>RNA ベクターは非増殖性のセンダイウイルスベクターを用いると思いますが、感染細胞の動物接種は個別飼育区域で実施ください。また、本区域での繁殖は基本的に認められませんが、しかし“次世代への搭載遺伝子移行確認実験”については F1 個体採取のみ最小限のケージ数にて許可しますので実施の際は実験動物管理者に申し出てください。ベクターの概要が分かる図を実験実施前に必ずご提出ください。</p> <p style="text-align: right;">動物実験委員会委員長確認 八 神 健 一</p>
<p>学長承認欄</p>	<p>承認日： 27年 2 月18 日 承認番号： 第 14-424 号</p> <p style="text-align: right;">筑波大学長 </p>

(注) 太枠内のみ記入して下さい。

血友病マウス遺伝子治療実験概要

(予備的薬理試験：治療効果の評価)

材料

マウス：B6;129S-*F8^{tm1Kaz}*/J (The Jackson Laboratory, #4424) ♂?

ベクター：ステルスベクター (非増殖型センダイウイルスベクター)

マウス FVIII cDNA：N6 を優先 マウスに余裕があれば、full length, BDD

測定キット：①VisuLize FVIII Antigen Kit (Affinity Biologicals)

②Coatest SP4 Factor VIII (Chromogenix)

③APTT 測定キット

その他 (抗センダイウイルス抗体価等)

実験の流れ

B6 マウスの脂肪細胞採取

↓

天井培養 (vs 通常培養)

↓

回収細胞へのマウス FVIII 遺伝子導入

(FVIII cDNA 搭載ステルスベクターは産総研から供与)

↓

遺伝子導入細胞の培養、遺伝子発現の確認 (培養上清中 FVIII 定量)

↓

遺伝子導入細胞の回収

↓

血友病マウスへの同系移植 (皮下)

↓

↓ ←→

マウス個体数に余裕あれば、FVIII 遺伝子搭載ベクターの
直接投与方法 (皮下、注腸) との比較検討

↓

遺伝子治療実施後のマウスから継時的に採血

↓

血漿中の FVIII 抗原定量 (ELISA (VisuLize FVIII Antigen Kit)) および活性
(Chromogenic assay (Coatest SP4 Factor VIII)) を測定。

Tail cut により出血時間を評価する。

抗センダイウイルス抗体スクリーニング

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

高性能の新規 RNA ベクターによる血友病遺伝子治療の開発
遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（ヒト脂肪細胞を用いた前臨床研究）

担当責任者 長谷川 雄一（筑波大学医学医療系、CREIL センター）
同 橋本 幸一（同上）
同 柳 健一（同上）
研究協力者 大根田 修（同上）
同 藤澤 千寿子（同上）

研究要旨

平成26年12月3日から平成27年3月31日の期間、本実用化研究を行った。先行して実施してきたプロジェクトである、ヒト前脂肪細胞にレトロウイルスベクターを用いてヒトレシチン-コレステロール：アシルトランスフェラーゼ（hLCAT）遺伝子を導入し、LCAT欠損症を治療することを目指した「遺伝子治療用ヒト自己脂肪細胞およびその移植組成物の調製に関する研究」との共通部分については、その成果を参考にした。特に、ベクターを作用させる対象細胞として、当初は天井培養で得られる細胞集団に混在する前脂肪細胞を念頭に置いたが、近年の研究によって脂肪組織には間葉系幹細胞が存在することが示され、あらためて、ヒト皮下脂肪組織から得られる細胞の質的評価システムを検討し、特許技術である天井培養によって得られる細胞群と底層の細胞群との表面形質と *in vitro* 分化能とを解析し、質的に比較した（資料1-4）。

A. 研究目的

ヒト脂肪細胞にヒト第VIII血液凝固因子遺伝子等を導入・発現させて、その効率や効果の持続期間を *ex vivo* で評価するシステムの構築を検討し、通常の培養法によって得られた細胞と天井培養で得られた細胞との質的相違点を分析する。

B. 研究方法

筑波大学附属病院においてヒト脂肪細胞の提供を受け、手順に沿ってコラゲナーゼ

処理の後、7日間の天井培養を行った。天井培養の手順および条件は、セルジェンテック株式会社およびエーザイ株式会社が特許を保有する方法によって行った（I. 総括報告書資料参照）。

その後、天井培養で得られた細胞と、通常の培養方法で得られた細胞とについて、フローサイトメトリーによる表面形質を評価し、次に、分化培地において20日間の培養を行い、脂肪細胞または骨細胞への分化状態を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では、世界医師会による「ヘルシンキ宣言」(2000年改訂)に示された倫理規範や考え方等、「遺伝子組換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ条約)」、「臨床研究に関する倫理指針(2003年)」を踏まえ、特に筑波大学附属病院において形成外科手術を受ける患者から脂肪組織の研究用提供を受ける手順に対して、臨床研究倫理審査承認を得て、「筑波大学研究倫理に関する指針」を遵守して実施した(資料5, 6)。

C. 研究成果

3症例から皮下脂肪組織の提供を受けた。

1gの組織を使用して天井培養を7日間実施した結果得られた細胞数は、それぞれ、

1例目 1.44×10^6 個

2例目 3.18×10^6 個

3例目 3.88×10^6 個

であり、セルジェンテック株式会社におけるデータとほぼ一致する結果であった。

天井培養で得られた細胞をフローサイトメトリーで表面形質を評価した結果、資料1に示すように、陽性であった抗原は、CD13、CD166、CD73、CD90、CD105、HLA-A/B/C(Class I MHC)、CD146であり、陰性であった抗原は、CD31、CD34、CD14、CD45、HLA-DR(Class II MHC)であった。

天井培養で得られた細胞と、底層の細胞との表面形質を比較した結果、資料2に示す通り、質的差異は認められなかった。

脂肪細胞への分化能を評価した結果を資料3に示す。天井培養後に得られた細胞を20日間分化培養すると、免疫染色で赤色に

染色される脂肪細胞の存在が確認された。脂肪細胞分化培地を使用しなかった対照細胞は、赤色に染色されなかった。同様の培養実験を、天井培養ではなく、底層の細胞を用いて行ったところ、ほぼ同様の結果が得られた。

骨細胞への分化能を評価した結果を資料4に示す。天井培養後に得られた細胞を20日間分化培養すると、免疫染色で赤色に染色される骨細胞の存在が確認された。骨細胞分化培地を使用しなかった対照細胞は、赤色に染色されなかった。同様の培養実験を、天井培養ではなく、底層の細胞を用いて行ったところ、ほぼ同様の結果を得た。

D. 考察

天井培養で得られる細胞と、底層細胞との質的相違点は確認されず、双方の細胞集団には、間葉系幹細胞が混在していることが示唆された。

E. 結論

天井培養で得られる細胞群と通常の培養方法で得られる底層細胞群との比較検討で、表面形質に差異はなく、脂肪細胞への分化能、および骨細胞への分化能は、いずれも同等であることを示す結果が得られた。

F. 健康危険情報 該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

(発表誌名巻号・頁・発行年も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

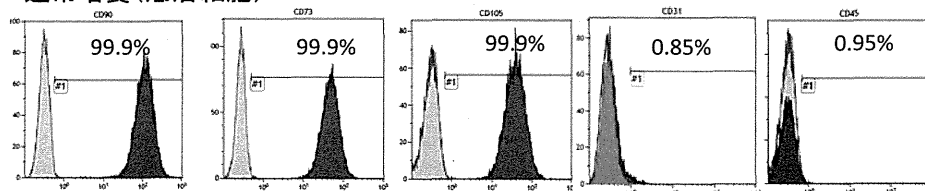
- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

資料(1) 天井培養後の表面形質

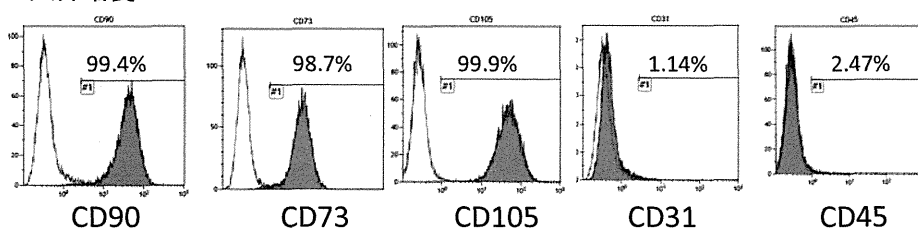
CD number	主な抗原分布	発現の有無
CD13	Aminopeptidase-N	+
CD31	PECAM-1	-
CD34	造血前駆細胞, 血管内皮細胞	-
CD166	ALCAM, BEN	+
CD14	MY4, LPS/LBP-R	-
CD73	Ect-5'-nucleotidase	+
CD90	Thy-1	+
CD45	LCA, T200	-
CD105	Endoglin	+
HLA-ABC	MHC-Class 1	+
HLA-DR	MHC-Class 2	-
CD146	MUC18, s-endo, Mel-CAM	+
SSEA4		

資料(2) 表面形質の比較

通常培養(底層細胞)



天井培養



資料(3) 脂肪細胞への分化能

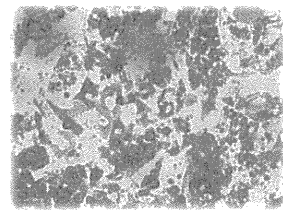
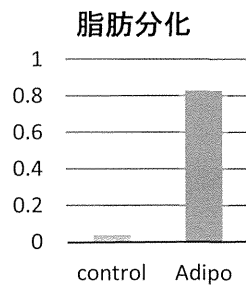
- 4 well plate に細胞を播種



confluent で分化培地に交換



day 20 染色



資料(4) 骨細胞への分化能

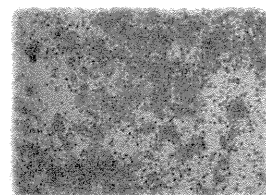
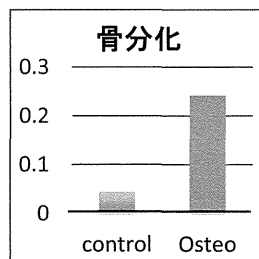
- 4 well plate に細胞を播種



confluent で分化培地に交換



day 20 染色



観察研究用実施計画書

研究課題名

遺伝子治療用ヒト脂肪細胞およびその移植組成物の調製に関する研究
(その2：国産RNAベクターの臨床実用化に向けた前臨床研究)

第1版 平成26年2月18日

はじめに

遺伝子治療における安全性と有効性を決定づける要因として、以下に挙げる3点が重要とされている。

- ①遺伝子導入の標的となる組織や細胞の選択、
- ②遺伝子発現の緻密な量的・時間的な調節方法、
- ③導入後の組織・細胞の特性保持。

先天性代謝異常に伴う生理活性タンパク質欠損症の遺伝子治療による当該蛋白補充療法を臨床実用化させるためには、侵襲性、治療頻度などの患者負担・リスクの軽減と、欠損タンパク質を持続的に供給可能な手法の確立が必要である。

申請者らが着目する脂肪細胞は、生体からの抽出と細胞の調製、そして遺伝子導入された細胞の自家移植術が比較的容易な組織である。更に生体内に比較的豊富に存在しており、かつ抽出に関わる安全性が高い。そしてこの組織から脂肪細胞への分化能を有する『前脂肪細胞』を調製し、遺伝子導入の標的細胞に選択した。前脂肪細胞には、基礎的遺伝子治療研究での実績と以下に示す根拠によって、遺伝子治療に使用する妥当性があると考えている。

1) 自家移植の効率の向上

脂肪細胞は、生理活性タンパク質を分泌する機能を有している。血管新生因子である vesicular endothelial growth factor (VEGF) を脂肪細胞が産生・分泌することが報告されている。このことから遺伝子導入された標的細胞を生体脂肪組織内へ自家移植した際に、VEGF による生着率の向上が期待される。

2) 導入遺伝子産物の安定・持続的な産生と前脂肪細胞の増殖能

治療遺伝子を標的細胞の染色体上に組み込まないことで、ゲノムへの直接的影響を排除した状態で遺伝子発現できる特徴をもつRNAベクターを使用する。われわれは既に別の遺伝子治療研究の pre, pre-clinical run において、3症例の脂肪組織より調製された前脂肪細胞には増殖能があることを確認した。その研究では、レトロウイルスベクター(複製能力欠失)を使用するが、本研究に用いるRNAベクターは、ヒトには病原性のないセンダイウイルスの遺伝子(RNA)を骨格にして、開発者の中西らによって工夫が重ねられ、ヒト iPS 細胞を誘導する際には非常に簡便で

効率的なツールとして普及している。その後、更に効果の持続性確保(細胞質内での安定性)、細胞傷害性・免疫原性の減弱、および搭載可能遺伝子のサイズ制限の大幅な改善等、有効性と安全性とを同時に高めることが可能なベクターへと改善されたもの(特許 4478788 号、同 4936482 号)を本研究では使用する。更に、従来のセンダイウイルスベクターの作用は持続しないことが確認されていたが、本 RNA ベクターは、その細胞が分裂・増殖しても遺伝子発現効果が減弱しないことが、造血幹細胞への遺伝子導入実験によって確認されている。

一方で、本遺伝子治療研究で最初の対象疾患として考えている血友病では、過去の遺伝子治療研究において血液凝固因子を脂肪細胞が分泌することの確認がなされていることも本遺伝治療を指示する実績である。

これらの基礎的知見を基に、本研究では、「遺伝子治療用ヒト自己脂肪細胞およびその移植組成物の調製」を

- ①脂肪細胞の増殖性の確認と非抗原性の維持による安全性の確保、
- ②導入遺伝子の長期持続発現・安定発現、
- ③RNAベクターの抗原性評価

の3点に焦点をあて本学において検討し、タンパク質欠損症の充填療法としての実用化の可能性を見極めることを主眼とする。

なお、本研究では、世界医師会による「ヘルシンキ宣言」(2000年改訂)に示された倫理規範や考え方等、「遺伝子組換え生物等の使用などの規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ条約)」、「臨床研究に関する倫理指針(2003年)」を踏まえ、「筑波大学研究倫理に関する指針」を遵守する。