

## 1. 目的

提供者より得られたヒト脂肪組織を用いて、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以下の2研究より行う。

- ① 移植時および移植後の安全性を確保するため、潜在的に抗原性を有する物質または動物由来の抽出・精製蛋白を用いずに、脂肪組織からの前脂肪細胞の培養を行い、その増殖能および分化能について検討する。  
さらに安全性に関し、病原体の混在・不純物の混在のないことを確認する。
- ② 遺伝子導入された前脂肪細胞が、脂肪細胞へ分化した後に安定で持続的な治療遺伝子を発現する能力について検討する。

## 2. 脂肪細胞提供対象者

2.1 対象: 以下の者を脂肪細胞提供対象者(以下“対象者”と記することもある)とする。

- (1) 形成外科手術の際、皮下脂肪組織を含む組織の切除が必要とされた患者で、脂肪組織量から本研究に必要な脂肪組織量の提供が可能であり且つ、本研究への参加に同意が得られた者<sup>注)</sup>

<sup>注)</sup>あくまで手術上必要な組織に脂肪組織が含まれる際に採取を行うもので、本研究への提供を目的とするものではない。従って対象者が、本研究に負担を強いられるものではないこととする。

2.2 選択基準:

- (1) 20歳以上 69歳未満で、性別は不問とする。
- (2) 本研究の実施に先立ち(切除した皮下組織脂肪を調製する前まで。以下同様。)本研究の目的及び内容を説明し本人から文書同意が得られた者。

### 【設定根拠】

年齢は、脂肪組織摘出術の侵襲性と安全性面を配慮し設定した。未成年者の場合は、本人の自己決定権を附属病院で認めるに至っていないため除外した。

### 2.3 除外基準:

- (1) 手術侵襲後の合併症が危惧される重篤な肝、腎、心、肺疾患などを有する者
- (2) 十分な脂肪組織の採取が困難な者または摘出した脂肪組織から本研究に必要な脂肪組織の採取が困難な者
- (3) 栄養状態が極度に低下している者
- (4) 全身状態が極度に悪化している者
- (5) 妊婦、授乳期の女性、妊娠している可能性のある者
- (6) がん患者の場合には脂肪摘出1年前から化学療法剤の投与を受けていない者
- (7) その他、臨床症状、臨床検査項目など踏まえ研究担当者が不相当と判断した者  
(臨床検査は、HBV(B型肝炎ウイルス)、HCV(C型肝炎ウイルス)、HIV、HTLV-Iの問診・検査を行うがこれらは術前検査として行われる。パルボウイルスB19型、サイトメガロウイルス、EBウイルスについては活動性があると判断される場合必要に応じて検査)

## 3. 脂肪細胞提供対象者への情報提供及び同意

### 3.1 説明・同意文書の作成

本研究担当者は本研究の実施に先立ち、少なくとも下記の18項目の説明事項を盛り込んだ本研究の説明・同意文書を作成する。作成された説明・同意文書は、倫理委員会に提出され、予め倫理委員会の承認を得る。

なお、本研究の同意を得るために用いられる文書では、「対象者」は「患者」の用語に置きえてもよいこととする。また、説明事項についても下記の14項目を盛り込んだ内容であれば、各項目の順序及び項目のまとめ並びに用語の変更は可とする。

#### 【対象者への説明事項】

- (1) 本研究が医療行為ではないこと。
- (2) 本研究の目的。
- (3) 本研究の方法(研究的側面、対象者の選択基準など)。
- (4) 対象者の本研究への参加予定期間。

- (5) 本研究に参加する予定の対象者数。
- (6) 予期される臨床上的利益及び危険性又は不便(対象者にとって予期される利益がない場合には、対象者にその旨を知らせなければならない)。
- (7) 本研究への参加は対象者の自由意思によるものであり、対象者は、本研究への参加を随時拒否又は撤回することができること。また、拒否・撤回によって対象者が不利な扱いを受たり、本研究に参加しない場合に受けるべき利益を失うことはないこと。
- (8) 筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会が、研究記録を閲覧できること。その際、対象者の秘密は保全されること。また、同意文書に対象者が記名捺印又は署名することによって閲覧を認めたことになること。
- (9) 本研究の結果が公表される場合であっても、対象者の秘密は保全されること。
- (10) 対象者が費用負担をする範囲。
- (11) 対象者に金銭等が支払われないこと。
- (12) 本研究担当医師の氏名、職名及び連絡先。
- (13) 対象者が本研究及び対象者の権利に関してさらに情報が欲しい場合又は本研究に関する健康被害が生じた場合に照会すべき又は連絡をとるべき医療機関の相談窓口。
- (14) 対象者が守るべき事項。

### 3.2 同意の取得及び同意の記録

研究担当医師等は本研究の実施に先立ち、3.1に定める説明・同意文書を用いて、本研究の内容に関する事項を対象者となるべき者に十分説明し、内容をよく理解したことを確認した上で、本研究への参加について、対象者となるべき者の自由意思による同意を文書で得るものとする。

説明・同意文書には対象者本人の署名、同意年月日、説明を行った研究担当医師の署名、説明年月日を残すこととする。なお、説明・同意文書は、原本を匿名化担当者が保管し、その副本を対象者に手渡すものとする。

### 3.3 対象者への情報提供、説明・同意文書の改訂

対象者の同意に関連し得る新たな非臨床、臨床の情報が得られた場合には、研究責任者は速やかに当該情報に基づき説明・同意文書を改訂し、倫理委員会の承認を得るものとする。

#### 4. 脂肪組織採取方法

##### 4.1 皮下脂肪組織採取のプロセス

###### (1) 皮下脂肪摘出術による皮下脂肪組織採取のプロセス

形成外科手術上必要な脂肪組織を含む組織切除を行い、得られた切除組織から脂肪組織を採取する。本研究に必要な脂肪組織量は、生理的食塩水洗浄後10～20グラムを目途に得ることとする。

#### 5. 遺伝子治療用のヒト自己脂肪細胞を含む移植組成物の調製と評価

##### 5.1 ヒト脂肪細胞の調製方法

採取された脂肪組織は、血清を含まない生理的等張液(生理食塩水など)に浸され、氷中で保存された状態で搬入される。

- (1) 運搬容器から脂肪組織を培養ディッシュに移す。
- (2) 脂肪吸引の場合には原則ミンチは実施しないが、脂肪ブロックを扱う場合などは、眼科バサミ、カミソリ、ピンセット等を用いたミンチを適宜行う。
- (3) 脂肪組織 1 g ずつを 50 mL コニカルチューブに移し、37°C、1 時間、コラゲナーゼにより処理する。
- (4) 培養液を 10 mL 加え、室温、400 g、1 分間の条件で遠心分離をする。
- (5) 遠心後の沈殿を 1 mL、Stromal Vascular Fraction (SVF) として別容器に回収する。
- (6) (5)～(6)の操作をさらに 3 回行う。上層に浮遊している脂肪組織分画を、培養液が入った培養フラスコに移す。
- (7) 培養フラスコに培養液を充填し、培養面(細胞培養用の表面処理が施されている面)を上側にして炭酸ガスインキュベーター内で培養する(天井培養法)。
- (8) (5)で調製した SVF についても 5.2 以降の操作を適宜実施し、天井培養法で獲得した前脂肪細胞との性質の相違などを検討する。

## 5.2 遺伝子の導入方法

- (1) 脂肪細胞を培養ディッシュに播種し、一晚培養する。
- (2) 培養液を吸引除去し、RNAベクター感染用培養液に置換する。
- (3) 力価の測定されたRNAベクター含有上清を添加する。
- (4) 一定時間培養後、RNAベクターを含む培養液を吸引除去し、新鮮な培養液に置換する。
- (5) 導入 2 日目以降、RNAベクターにより導入された遺伝子の発現を観察する。

## 5.3 遺伝子組み換えウイルスならびにそれを用いた実験への配慮

本研究はカルタヘナ法第一種使用規程準拠の対象であり、本法の対象となる遺伝子組換え生物等は「ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター」である。本研究では遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞を作製とその特性解析を目的に、本法に基づき使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為を以下の通り実施する。

- ① ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター溶液は、容器に密閉後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの拡散防止措置を執ることができる施設可能な筑波大学附属病院B棟2階内の P2 管理区域(以下区画内)に設置した冷凍庫に保管する。
- ② ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター溶液の溶解、希釈及び分注操作は、上記区画内の安全キャビネット内又は区画内で閉鎖系にて行う。ヒト増殖型脂肪細胞へのヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター導入操作、ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター導入細胞(以下「血液凝固因子遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞」)の培養その他のヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター希釈溶液及び血液凝固因子遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の取扱いも同様に区画内の安全キャビネット内又は区画内で閉鎖系にて行う。ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター希釈溶液及びヒト血液凝固因子遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の保管は、区画内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。
- ③ ヒト血液凝固遺伝子搭載RNAベクター溶液(希釈溶液も含む)又はヒト血液凝固因子遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞を廃棄する際には、ベクター不活性化を行った後、廃棄する。

6. 遺伝子導入組成物の評価項目

6.1 脂肪細胞の評価

- (1) 脂肪細胞の増殖能を検討するために、ヌクレオカウンターを用いた計測、ならびに含有DNAの増加量を測定する。
- (2) 脂肪細胞としての性質を検討するために、組織化学的手法(脂肪染色)および分化能や細胞表面抗原解析(FACS)を行う。
- (3) 遺伝子導入効率に関する評価を行うために、遺伝子の導入コピー数、発現量、遺伝子産物である分泌タンパク活性(人工基質測定法)・抗原量(免疫学的測定)を解析する。

6.2 遺伝子導入組成物の評価

移植組成物の評価項目

前脂肪細胞の分化・増殖と遺伝子導入効率・発現効率について

ヒト脂肪組織から調製した前脂肪細胞が目的の移植組成物として成立する条件として、増殖能をもつこと、遺伝子導入が可能であること、成熟脂肪細胞への分化能を有することが挙げられる。

① 増殖能

細胞数をカウントして増殖曲線を作成する方法と、含有DNAの増加量を測定する方法。

② 遺伝子導入とその発現

ヒト血液凝固因子遺伝子を搭載したRNAベクターで感染を行い、免疫染色手法での観察・解析によりその導入効率を評価する。また、その発現量(免疫学的手法)・活性(人工基質測定法)を測定する。

評価及び目的	候補遺伝子
遺伝子導入効率	第Ⅷ、第Ⅸヒト血液凝固因子
治療目的遺伝子の発現量と活性	第Ⅷ、第Ⅸヒト血液凝固因子

③ 分化能

インスリン・デキサメサゾンを追加後、オイルレッドO染色により分化能について評価を行う。

④ 更に、遺伝子産物である発現蛋白を測定する。

### 6.3 移植時を想定した安全性評価について

遺伝子導入後の細胞に関する安全性評価項目として、細胞純度試験・無菌試験・マイコプラズマ試験・エンドトキシン試験・製造工程由来不純物試験・目的外生理活性物質試験、ウイルス試験(遺伝子導入に用いるウイルスベクター以外のもの)・野生型センダイウイルス検出の有無について評価する。

## 7. 脂肪細胞提供対象者からの脂肪細胞・組織利用打ち切り

### 7.1 中止基準

対象者が以下の項目に該当した場合には、本研究への当該対象者からの脂肪細胞・脂肪組織の使用を中止する。

- (1) 選択基準の逸脱又は除外基準に抵触していること、或いは研究実施計画書からの逸脱が判明した場合
- (2) その他、研究担当医師等が中止すべきと判断した場合

### 7.2 脱落基準とその対応

中止基準には該当せず、対象者からの申し出による同意の撤回があった場合、対象者の判断や自己都合で本研究を打ち切った例を脱落例とし、当該対象者の脂肪組織またはそれに由来する細胞や血液を用いた研究は行わない。

## 8. 目標対象者数と設定根拠

目標対象者数は、26人とする。ただし、そのうちの初期6症例はLCATプロジェクトにおける実施内容と全く同一であるため、重複させる必要はないものとする。

脂肪組織の調整と前脂肪細胞の分離・培養の習熟に6例、  
遺伝子の導入効率向上性の検討に10例、  
遺伝子導入細胞の増殖・遺伝子発現確認・安全性試験のために10例  
を想定している。

## 9. 研究実施期間

研究期間:倫理委員会承認後から2018年(平成30年)3月31日まで

なお、対象者登録は、倫理審査委員会承認後から2016年(平成28年)12月末日まで、脂肪細胞提供は倫理審査委員会承認後から2017年(平成29年)3月末日までとする。

## 10. 研究の倫理的実施

### 10.1 病院臨床研究倫理審査委員会ならびに医の倫理委員会による審議

本研究実施に先立ち、病院臨床研究倫理審査委員会ならびに医の倫理委員会にて、研究実施計画書、症例報告書、対象者への説明・同意文書の記載内容及び研究実施の適否に関して審査を行う。

### 10.2 生命倫理の遵守

本研究は、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、考え方を踏まえ実施する。

### 10.3 研究実施計画書の改訂

本研究の安全性に関する事項、その他研究を適正に行うに当たって重要な情報を入手した時は、必要に応じて研究実施計画書の改訂を行い、倫理委員会にて審議を行う。



#### 10.4 研究試料(ヒト脂肪細胞)の施設外への持出し

本研究において実施する一部試験については、試験設備の都合により、外部委託を必要とする場合があることから、その際には、倫理委員会への届出を行なうことで、研究試料の施設外への持出しを可能とする。

#### 11. 費用

対象者は治療行為に対する医療費を支払う必要があるが、本研究に関する部分に対し費用は負担しない。

#### 12. 連絡先

筑波大学小児科	須磨崎 亮、福島 敬
029-853-5635	(小児科秘書室)
029-853-7923	(須磨崎PHS)
029-853-7868	(福島PHS)

#### 13. 研究実施体制

##### 13.1 実施機関並びに研究責任者

###### <実施機関>

筑波大学 医学医療系 生命医科学域・臨床医学域

筑波大学附属病院・CREILセンター、生命科学動物資源センター

###### <支援組織> (以下の三者と秘密保持契約締結済)

セルジェンテック株式会社

エーザイ株式会社

産業技術総合研究所

筑波大学医学医療系教授 須磨崎 亮

本研究全体の総括を行い、研究が実施計画書に基づき適切に行われているか確認する。

13.2 研究分担者と分担研究(学外の研究者を含む)

研究分担者	所属	分担研究課題	実施場所
長谷川雄一	筑波大学医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	輸血部CPF(P2) 附属病院P2室
足立 孝二	筑波大学 医学医療系	皮下脂肪摘出	附属病院手術室
島野 仁	筑波大学 医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207
大根田 修	筑波大学 医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207
久武 幸司	筑波大学 医学医療系	遺伝子導入・発現率の 評価	健康医科学 イノベーション棟 207
長野 真澄	筑波大学 医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207
西村 健	筑波大学 医学医療系	RNAベクター機能評価	健康医科学 イノベーション棟 207
鈴木 浩明	筑波大学 医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207
橋本幸一	筑波大学 医学医療系	匿名化担当責任者 臨床研究進捗管理	CREILセンター
藤澤 千寿子	筑波大学 医学医療系 支援室	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207
磯山 茂美	筑波大学 医学医療系 支援室	RNAベクターの感染 高率評価	医学系学系棟 163
山下 年晴	筑波大学 医学医療系	遺伝子治療用 脂肪細胞調製	健康医科学 イノベーション棟 207

研究分担者	所属	分担研究課題	実施場所
福島 敬	筑波大学 医学医療系	薬効・薬理試験・安全性評価等	輸血部CPF(P2) 附属病院P2室
八牧 愉二	筑波大学附属病院	薬効・薬理試験・安全性評価等	附属病院
岩淵 敦	筑波大学医学医療系	薬効・薬理試験・安全性評価等	輸血部CPF(P2) 附属病院P2室
三輪 佳宏	筑波大学 医学医療系	遺伝子改変脂肪脂肪の生体内動態	生命科学動物資源センター
中西 真人	産業技術総合研究所	遺伝子搭載RNAベクター等の作成・提供	産業技術総合研究所、
伊藤 昌史	エーザイ株式会社ネクスト・ジェネレーション・システムズ	前毒性試験、非臨床試験(GLP)、生体内動態	エーザイ筑波研究所
谷尾 政美	セルジェンテック株式会社	遺伝子治療用脂肪細胞調製・性能評価	セルジェンテック株式会社研究所

### 13.3 匿名化担当責任者

所属 職名 氏名  
筑波大学 CREIL Center 教授 橋本 幸一

### 13.4 会議体 以下は、本研究の研究責任者ならび分担者により開催する。

#### 研究計画確認会：

研究の開始に先立ち、研究実施計画書の確認を行う。

#### 対象者由来細胞の取扱い検討会：

対象者の組織・細胞処理に関して、必要に応じて、検討会を開催し、取扱いに関する確

認を行う。

結果報告会：

研究報告書を元に報告会を開催する

#### 14. 研究成績の公表

本研究全体の成績は原則として公表する。

特許申請を優先すべきと判断された事項は、申請終了後まで公表を控える。



別記様式4（第21項関係）

## 臨床研究倫理審査結果通知書

平成26年3月26日

申請者（実施責任者）

・須磨崎 亮 殿

附属病院長 五十嵐 徹也

平成26年2月13日付けで倫理審査申請のありました臨床研究の実施について、審査の結果、下記のとおり判定しましたので通知します。

### 記

1 臨床研究題目（H25-150）

「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）」

2 判定

- 承認
- 条件付承認
- 変更の勧告
- 不承認
- 非該当

3 理由等（判定が承認以外の場合）

研究期間 2014年3月26日～2018年3月31日  
(ただし、臨床研究保険に加入する場合の研究開始日は、臨床研究保険補償開始日とする。)

業務報告書(長谷川ら)資料6

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  
研究進捗検討会の実施

担当責任者	柳 健一	（筑波大学医学医療系）
同	橋本 幸一	（同上）
同	福島 敬	（同上）

研究要旨

平成 27 年 4 月の日本医療研究開発機構発足に向けて、種々の法律や行政ガイドラインの整備が進められているため、それらに関する情報をリアルタイムに収集しながら、本実用化研究を推進した。本実用化研究が 2015 年 12 月 3 日に開始された直後の平成 26 年 12 月 10 日に検討会、次いで平成 27 年 2 月 6 日にセミナーを開催し、最新の情報を共有し、本実用化研究における役割分担およびタイムスケジュールを確認した。

A. 研究目的

臨床応用に向けて各分担研究課題の進捗確認および課題解決のための検討会を随時実施する。

B. 研究方法

各業務項目担当者間での情報共有およびデータ検討・評価、方針の検討等を目的として、検討会およびセミナーを開催した。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、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、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、カルタヘナ条約等を踏まえて研究計画を立案した。研究計画について、筑

波大学臨床研究倫理審査承認、筑波大学遺伝子組み換え実験計画承認を得て実施した。

C. 研究成果

1. 検討会

情報共有、および役割分担とタイムスケジュールを確認する目的で、以下の通り開催した。平成 26 年 12 月 10 日（水）13 時 00 分～15 時 15 分、筑波大学附属病院 特別第三会議室を会場とした。業務項目担当責任者のうち参加者は、須磨崎亮，中西真人，伊藤昌史，久武幸司，橋本幸一，柳健一，長谷川雄一，三輪佳宏，西村健，福島敬、（欠席：千葉滋、麻生雅是）、および協力者として、大根田修（筑波大学医学医療系），吉田尚美（産業技術総合研究所），藤沢千寿子（筑波大学医学医療系），久原健嗣（エーザイ株式会社筑波研究所），八牧愉二（筑波

大学附属病院), 福島紘子 (筑波大学医学医療系), 今川和生 (筑波大学大学院人間総合科学研究科), 鈴木涼子 (筑波大学大学院人間総合科学研究科), 藤山聡 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)、および事務陪席者 2 人であり、議事録を作成した (非開示)。

## 2. セミナー

最新の学術情報および立法・行政情報を得る目的で、平成 27 年 2 月 6 日 (金) 18 時 00 分～19 時 00 分に「くすりとしての遺伝子治療」のタイトルで、本学非常勤講師である小野寺雅史博士 (国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部・部長) による医学セミナーを開催した。

## D. 考察

医薬品・医療機器等および再生医療・遺伝子治療の開発・実用化に関連する法律の制定および行政ガイドラインの改訂作業が進行中であり、本実用化研究においても、広く情報収集しながら、効率よい作業を行うべく、臨機応変に対応する必要がある。

## E. 結論

平成 26 年 12 月 10 日に検討会、平成 27 年 2 月 6 日にセミナーを開催し、情報を共有し、本実用化研究における役割分担およびタイムスケジュールを確認した。

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

(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

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

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  
新規 RNA ベクターに関わる研究開発およびGMP生産の検討

担当責任者 中西 真人（産業技術総合研究所 幹細胞工学センター）

## 研究要旨

（独）産業技術総合研究所が開発した新規 RNA ベクターを血友病 A の治療に応用するための実用化研究を進め、以下の成果を得た。（1）蛍光タンパク質遺伝子トランスジェニックマウスを利用した生体イメージングのための iRFP 遺伝子搭載ベクターを作製した。（2）マウスおよびヒトの血液凝固第 VIII 因子の完全型、B ドメイン欠失型および N 6 型の遺伝子を搭載したベクターを作製した。さらに、以上の成果を含む新型 RNA ベクターによる再生医療や遺伝子治療を実用化するために、ときわバイオ株式会社を設立した。

### A. 研究目的

近年、重症複合免疫不全症の遺伝子治療では、レンチウイルスベクターを使った造血幹細胞への遺伝子導入により良好な結果が報告されている。一方、血友病の遺伝子治療では、血友病 B で血液凝固第 IX 因子 cDNA を搭載したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使った臨床試験が行われているものの、血友病 A では血液凝固第 VIII 因子 cDNA のサイズが 7.2 キロ塩基対と大きいため、これを搭載して安定に発現できるベクターがほとんど無く、研究は進んでいない。

（独）産業技術総合研究所で開発された新規 RNA ベクター「ステルス型 RNA ベクター」は、最大で 13.5 キロ塩基の大きな cDNA を搭載して染色体に挿入することなく持続的に発現できる特徴を持っている。そのため血液凝固第 VIII 因子 cDNA の全長を搭載することが可能で、挿入変異による細胞ガン化の可能性も無く、安全性の高い血友病 A

の遺伝子治療が実現できる可能性がある。本年度は、ステルス型 RNA ベクターを使った血友病 A の遺伝子治療の可能性を *in vitro* および *in vivo* での評価することを目的として、蛍光タンパク質遺伝子、マウス血液凝固第 VIII 因子遺伝子、およびヒト血液凝固第 VIII 因子遺伝子をそれぞれ搭載したステルス型 RNA ベクターを作製する。また、この研究成果を実用化するための準備を進める。

### B. 研究方法

#### 1. 遠赤外蛍光タンパク質をコードする cDNA の作製

本研究で使用する遠赤外蛍光タンパク質 iRFP は 2 量体となって蛍光を発するが、細胞内での 2 量体化の効率が低いことが報告されている。そこで、筑波大学・三輪佳宏博士の助言により、67 アミノ酸残基のリンカー配列を使って iRF を人工的に 2 個融合



させたタンパク質 iRFPx2 を使用することに決定した。iRFPx2 をコードする cDNA は、動物細胞で効率よく翻訳されるように OptimumGen Gene Design System (GenScript USA Inc.) によりコドン最適化した後、ステルス型 RNA ベクターに搭載できるように Acc65I/XhoI で切り出せる形で合成した。

## 2. 血液凝固第Ⅷ因子をコードする cDNA の作製

血液凝固第Ⅷ因子をコードする全長 cDNA は 7056 塩基あり、動物細胞での発現やウイルスベクターへの搭載は困難とされてきた。そのため、cDNA の中心部分に位置している第Ⅷ因子の活性には必要無いとされている B ドメイン (741-1648 アミノ酸残基) を欠失した変異体が使われることが多い。本研究では、血液凝固第Ⅷ因子をコードする全長 cDNA (7056 塩基) の他に、B ドメイン欠失型 (塩基)、及び B ドメインの N 末端側 226 アミノ酸残基を残した N6 変異体 (Miao, et al., Blood, 103, 3412-3419, 2004) (塩基) を準備した。各 cDNA は OptimumGen Gene Design System (GenScript USA Inc.) によりコドン最適化した後、ステルス型 RNA ベクターに搭載できるように Acc65I/XhoI で切り出せる形で合成した。

### (倫理面への配慮)

筑波大学を中心とする共同研究であることから、筑波大学の規程に沿い、研究実施にあたって同大学医学医療系・附属病院、遺伝子実験センター、および動物実験センターの承認を得て研究を進めた。

## C. 研究成果

### 1. 遠赤外領域蛍光タンパク質 iRFP をコードする cRNA を搭載したステルス型 RNA ベク

### ターの作製

ステルス型 RNA ベクターは、*in vitro* の実験系では、脂肪細胞を含むほぼすべてのヒトおよびマウス細胞で安定な持続的遺伝子発現を行うことができる。しかし、免疫反応が無い *in vitro* での実験と異なり、免疫系による異物が排除される生体内での遺伝子発現の安定性は十分に検討されていない。そこで、本年度は、体内の深部で励起可能な遠赤外領域蛍光タンパク質 iRFP を使った生体内での遺伝子発現を検討するため、2 個の iRFP タンパク質をリンカー配列によって融合させた iRFP ダイマー (iRFPx2) の cDNA をコドン最適化した上で合成し、この cRNA を搭載したステルス型 RNA ベクターを作製した。また、同時に、発光によりイメージングできるルシフェラーゼ遺伝子 (Luc2CP)、マウスに対する抗原性を持たない薬剤耐性遺伝子としてマウス・ジヒドロ葉酸レダクターゼ (Dihydroxyfolate reductase, DHFR) の methotrexate 耐性変異体 (L22Y) をコードする遺伝子、細胞障害性 T 細胞を抑制して免疫応答を回避するためのマウス PD-L1 をコードする遺伝子を、さまざまに組み合わせて搭載した (図 1)。今後は、このベクターにより遺伝子を導入したマウス細胞を、iRFP を局所で発現するトランスジェニックマウス (iRFP に対する免疫応答は誘導されない) に移植して、その安定性を遠赤外光の蛍光イメージャルシフェラーゼによる発光イメージにより観察する予定である。

### 2. 血液凝固第Ⅷ因子遺伝子を搭載したステルス型 RNA ベクターの作製

(独) 産業技術総合研究所では、これまでに、持続感染する特殊な変異センダイウ

イルスを素材として欠損持続発現型センダイウイルスベクター (SeVdp) の開発に成功した (Nishimura, Nakanishi et al. J. Biol. Chem., 2011; Nakanishi & Otsu, Current Gene Therapy, 2012; 特許第 4936482 号、西村健・他、平成 24 年 3 月 2 日登録)。このベクターは、標的細胞のゲノムに入り込むことはなく細胞質で持続的な遺伝子発現を行うという非常にユニークな性質を持っている。またインターフェロン誘導や細胞傷害性が低く、LLCMK2 細胞 (サル腎由来細胞株) やヒトの線維芽細胞を用いて、1 年間以上の長期にわたり安定な持続発現が確認されている。一方、SeVdp ベクターに搭載可能な遺伝子のサイズは 4.8 キロ塩基までが報告されているのみで、より大きな遺伝子の搭載は課題として残されていた。

本年度は、SeVdp ベクターの構造を根本から見直したステルス型 RNA ベクターの作製に成功し、搭載する遺伝子のサイズの上限が従来の 4.8 キロ塩基から 13 キロ塩基へと大幅に拡大することができた (特願 2015-007288)。そこで本研究では、血液凝固第Ⅷ因子をコードする全長 cDNA (7 キロ塩基) やその欠失変異体を搭載したステルス型 RNA ベクターを作製した (図 2)。ヒト血液凝固第Ⅷ因子遺伝子を搭載したベクターには、発現マーカーとして EGFP、薬剤耐性遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子を搭載して、BHK 細胞や HeLa 細胞で安定に持続発現することを確認した。また動物実験用には、マウス血液凝固第Ⅷ因子遺伝子と、マウスに対する抗原性を持たない薬剤耐性遺伝子としてマウス・ジヒドロ葉酸レダクターゼ (Dihydroxyfolate reductase, DHFR) の methotrexate 耐性変

異体 (L22Y) をコードする遺伝子、細胞障害性 T 細胞を抑制して免疫応答を回避するためのマウス PD-L1 をコードする遺伝子を、さまざまに組み合わせて搭載した

#### D. 考察

(独) 産業技術総合研究所で開発されたステルス型 RNA ベクターは、遺伝子治療の臨床応用の際に有利な以下の特徴を持っている。(1) 治療目的の遺伝子だけでなく、免疫回避に必要な遺伝子や薬剤選択に必要な遺伝子など、複数の遺伝子を搭載して同時に発現することが可能になった。(2) 造血幹細胞を用いた研究では、何度も細胞分裂を繰り返し、分化・成熟したのちの血液細胞にも、導入遺伝子が良好に発現し続けていることが確認された。(3) 従来のセンダイウイルスベクターと異なりインターフェロンの誘導や細胞障害性が少なく、宿主から免疫的に排除されにくいことが期待される。(4) 遺伝子治療の対象とする標的細胞の制約が少なく、当研究で対象とする脂肪細胞への効率の良い遺伝子導入が可能である。(5) 細胞のゲノムには入り込まず、ガン関連遺伝子も存在しないので、腫瘍化・発がん性のリスクはゼロである。

本年度 (再生医療実用化研究事業の初年度) の研究成果の意義は以下ようになる。

1) iRFP 搭載ベクターの作成によって、これを B 6 マウス脂肪細胞に作用させて、同系の蛍光色素遺伝子トランスジェニックマウスに移植し、三輪らの特許技術である生体イメージング (本報告書の II 2 を参照) によって体内動態を継続的に評価するための準備が整った。

2) マウス血液凝固第Ⅷ因子遺伝子を搭載

したベクターの作成によって、これをB6マウスの脂肪細胞に作用させた後、血友病マウスに同系移植して治療効果を評価するための準備が整った（本報告書のII 3を参照）。

3) ヒト血液凝固第VIII因子遺伝子搭載ベクター作成によって、ヒト脂肪細胞に対する遺伝子導入・発現を評価する *ex vivo* 前臨床研究を開始可能になった（本報告書のII 4を参照）。

血液凝固第VIII因子の全長 cDNA を搭載したベクターの作製に成功したので、次年度は、動物実験に使用するための大量生産を行う。また、並行してベクター骨格のさらなる改良も進める。血友病Aの遺伝子治療では、遺伝情報を体内でいかに安定に維持できるかが鍵となるが、現在のステルス型RNAベクターはまだ低レベルのインターフェロンを誘導するため、これが持続性や安定性に影響を与える可能性がある。そのため、インターフェロン誘導を積極的に阻害するヒト細胞由来の因子を搭載して、その効果を見る。また、異種抗原発現細胞を攻撃するT細胞の活性を阻害する分子であるPD-L1やCTLA4を同時に搭載して、動物体内での安定性に与える効果を検討する。

さらに、GMP製造のための準備として、ベクター精製のプロトコルを確立すると共に、ベクターを産生するための新しい細胞株を樹立する予定である。また、ベクターの実用化やGMP製造はアカデミアだけでは困難であり、平成26年12月に産総研の技術移転ベンチャー「ときわバイオ株式会社」を設立し、GMP製造の検討等は同社において検討する予定である。

## E. 結論

1. 蛍光色素遺伝子トランスジェニックマウスを利用した生体イメージングのためのiRFP遺伝子搭載ベクターを作成した。
2. マウスおよびヒトの血液凝固第VIII因子遺伝子のうち、完全型、Bドメイン欠失型およびN6型を搭載したベクターを作成した。
3. 産総研の技術移転ベンチャー「ときわバイオ株式会社」を設立し、本研究の成果の実用化の準備を開始した。

F. 健康危険情報                    なし

## G. 研究発表

### 論文

1. Watanabe-Susaki, K., Takada, H., Enomoto, K., Miwata, K., Ishimine, H., Intoh, A., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Sugino, H., Asashima, M. and Kurisaki, A. (2014). Biosynthesis of Ribosomal RNA in Nucleoli Regulates Pluripotency and Differentiation Ability of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 32: 3099-3111.
2. Nishimura, K., Kato, T., Oinam, L., Shiomitsu, E., Ayakawa, D., Ohtaka, M., Fukuda, A., Nakanishi, M. and Hisatake, K. (2014). Manipulation of Klf4 expression generates paused iPSCs stalled at distinct stages of reprogramming. *Stem Cell Reports* 3: 915-929.
3. Trokovic, R., Weltner, J., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M.,

- Salomaa, V., Jalanko, A., Otonkoski, T. and Kyttälä, A. (2014). Advanced Feeder-Free Generation of iPSC Directly From Blood Cells. *STEM CELLS Translational Medicine* 3: 1402-1409.
- 4, Takayama, K., Morisaki, Y., Kuno, S., Nagamoto, Y., Harada, K., Furukawa, N., Ohtaka, M., Nishimura, K., Imagawa, K., Sakurai, F., Tachibana, M., Sumazaki, R., Noguchi, E., Nakanishi, M., Hirata, K., Kawabata, K. and Mizuguchi, H. (2014). Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 16772-16777.
- 学会発表
1. 中西真人：ステルス型 RNA ベクターの開発と再生医療への応用、第 14 回日本再生医療学会総会（2015,3,横浜）
  2. 大高真奈美、久保陽子、西村健、佐野将之、中西真人：Feeder-free 及び xeno-free 条件下でのヒト末梢血由来単球からの iPSC 細胞誘導、第 14 回日本再生医療学会総会（2015,3,横浜）
  3. 佐野将之、大高真奈美、飯島実、中西真人：SeVdp ベクターを利用した細胞リプログラミングにおけるマイクロ RNA 検出系の評価、第 14 回日本再生医療学会総会（2015,3,横浜）
- 著書  
なし
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許第 5633075 号「多能性幹細胞作成用ベクター材料及びこれを用いた多能性幹細胞作成方法」：中西真人・西村健・大高真奈美・佐野将之（（独）産業技術総合研究所）2014 年 10 月 24 日登録
  2. 特願 2015-007288 「ステルス性を有する RNA を使った遺伝子発現系および当該 RNA を含む遺伝子導入・発現ベクター」：中西真人・飯島実（（独）産業技術総合研究所）2015 年 1 月 16 日出願