

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

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に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務責任者 須磨崎 亮

平成 27 (2015) 年 3 月

委託業務成果報告書

目 次

委託業務成果報告（総括）

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
（ 須磨崎 亮 ）

研究成果の刊行に関する一覧表（学会発表を含む）

以上

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（総括）

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

業務主任者 須磨崎 亮 （筑波大学医療系）

研究要旨

血友病の新規治療開発研究の世界的動向、および各種バイオ医薬品開発実用化の状況を踏まえると、血友病に対する遺伝子治療技術の国産開発は非常に意義のあるテーマであると考えられる。脂肪細胞を用いたデリバリーシステムは、血液凝固因子においても利用可能である。平成 27 年 4 月に日本医療研究開発機構が発足する予定であることを追い風として、筑波大学、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社のそれぞれが保有する特許技術の合体によって、効率的に実用化研究を実施することが可能である。

プロジェクトの総合推進

須磨崎亮（筑波大学医学医療系教授）

千葉滋（筑波大学医学医療系教授）

遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（生体イメージング）

三輪佳宏（筑波大学医学医療系講師）

遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（血友病マウスに対する治療）

福島敬（筑波大学医学医療系准教授）

久武幸司（筑波大学医学医療系教授）

西村健（筑波大学医学医療系助教）

遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発
（ヒト脂肪細胞の培養実験）

長谷川雄一（筑波大学医学医療系准教授）

橋本幸一（筑波大学医学医療系教授）

柳健一（筑波大学医学医療系教授）

研究進捗検討会の実施

福島 敬（筑波大学医学医療系教授）

新規 RNA ベクターに関わる研究開発およ

び GMP 生産の検討

中西 真人（産業技術総合研究所幹細胞
工学研究センター副センター長）

血液凝固因子抗原性および活性評価系の
開発およびベクターの性能評価

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機能ユニット細
胞研究グループ統括課長）

遺伝子導入脂肪細胞を開発対象とした G
MP 生産・非臨床試験計画（予備的毒性試験）
の構築に向けた規制対応研究の計画の共同
立案

麻生雅是（セルジェンテック株式会社代
表取締役社長）

A . 研究目的

血友病 A に対する根治療法を実現し、患
者の QOL 向上のために、遺伝子治療臨床応用

を目指し、過去には成功例のない天然型(完全型)第VIII血液凝固因子遺伝子を搭載可能な新規国産RNAベクター(研究分担者である中西らが特許出願中)を利用して、自家脂肪細胞に目的遺伝子を導入して欠損蛋白を分泌させる技術(研究分担者の麻生、伊藤らが特許を保有、登録番号4879867)と合体させた治療技術を開発する。同時に、血友病B(第IX血液凝固因子欠乏症)について、比較検討する。従来の遺伝子治療技術では実現されなかった大きいサイズの蛋白分子欠損症に対する応用可否について検討する。このうち、筑波大学ではプロジェクトの総合的推進、体外実験、動物を用いた遺伝子導入脂肪細胞の性能評価を担当し、産業技術総合研究所では、新規RNAベクターの開発とGMP製造の検討、目的遺伝子cDNAの選択とベクターへの搭載を担当する。エーザイ株式会社筑波研究所は、第VIII血液凝固因子等の定量システムの構築の検討、およびベクターの性能評価系の構築、セルジェンテック株式会社は、遺伝子改変脂肪細胞のGMP生産・非臨床試験計画の構築に向けた規制対応研究の計画の共同立案(既に得たPMDA対面助言による)等を行う。

B. 研究方法

筑波大学、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社の四者間で、「ステルス型RNAベクターを用いた遺伝子導入脂肪細胞の移植治療に関する前臨床研究」について平成26年3月24日付で共同研究計画を締結して役割分担に沿って作業を進めて来たものである。

平成26年12月3日から平成27年3月

31日の期間内において、本課題「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」の委託契約書に基づいて実施した。

特に、この委託業務成果報告書(総括)においては、本遺伝子治療技術の対象疾患を選ぶ際に検討した社会的背景を検証した。次に脂肪細胞の臨床応用の現状と、本遺伝子治療を応用する妥当性について検討した。上記を踏まえて、本実用化研究を四者共同研究として継続発展させるため、本共同研究体制によるメリットを確認した。

(倫理的側面)

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

【新規血友病治療法の必要性】

血友病は最も頻度の高い遺伝性の血液凝固異常症であり、乳幼児期に発症することが多く、生涯にわたって症状と付き合い、注射によって凝固因子を補充するという痛みの伴う治療の継続が必要となる。血友病患者では、出血症状の反復や関節症による歩行障害、凝固因子補充のための自己注射や保護者による注射が必要であり、日常生活上の負担増大・QOL低下が問題となっていた。近年では重症者に対する凝固因子定期補充療法が一般的となり、出血症状の反

復は回避できるようになってきているが、自己注射や保護者による注射の負担は依然として存在し、患者負担を軽減する根治療法の開発が望まれている。同時に、大災害等によって流通が遮断された際にも影響を受けないという観点からも、根治療法の開発は非常に有用である。

本邦の重症血友病患者数は血友病 A が約 2,800 人、血友病 B が約 500 人である。血友病の主な治療である凝固因子製剤の定期補充療法は、血友病 A では主に週 3 回、血友病 B では主に週 2 回の自己注射を行う必要がある。これを薬価で換算すると、血友病 A で 1,050 万円 / 人・年、294 億円 / 総数・年、8 億円 / 人・75 年、血友病 B で 2,000 万円 / 人・年、100 億円 / 総数・年、15 億円 / 人・75 年と極めて高額であり、これらはすべて公的負担により支払われている。

【血友病根治療法実用化の動向】

現在、世界中で血友病 A・血友病 B の根治療法の開発・実用化研究が推進されている。血友病 B では遺伝子治療臨床成功例が報告され、根治療法の普及に期待がもたれている。一方、血友病 A では、欠損している第 VIII 血液凝固因子の分子量が大きいことが制約条件となり、遺伝子治療を含め、根治療法が存在しない。

米国のバクスターインターナショナル社はチャタム・セラピューティクス社と同社の遺伝子治療技術を活用した血友病 B の治療法の実用化について、独占契約を締結したことを 2012 年に発表した。また、ドイツのバイエルヘルスケア社とディメンションセラピューティクス社は、血友病 A に対する新規遺伝子治療の開発と商業化の

ための契約を締結したことを 2014 年に発表しており、大手製薬会社が血友病遺伝子治療開発に乗り出している。

本研究では日本製の高性能 RNA ベクターを用いて自家脂肪細胞に第 VIII 血液凝固因子遺伝子を導入し、その脂肪細胞を自家移植することにより血友病 A の根治療法を世界で初めて開発することを目指している。本研究が成功し根治療法が開発されたならば、日本のみならず世界の血友病 A 患者の QOL が飛躍的に改善し、一方で医療経済的にも大きな貢献が可能である。

【本事業による波及効果】

バイオ医薬品は、遺伝子組み換え技術や細胞融合などのバイオテクノロジーを活用して製造される医薬品であり、ターゲットが明確な分子標的薬で創薬の成功率が高く、バイオ医薬品が医薬品開発の主流である。2012 年の世界販売額上位 10 医薬品のうち、7 つがバイオ医薬品である。実用化されているバイオ医薬品の中心は体外で合成した組換えタンパク質であるが、注射によって継続的に体内に薬品を注入する必要があり、いずれも極めて高額な医薬品で、しかも日本はそのほとんどを輸入に頼っている。医療経済のみならず国際収支にも及ぶ課題を解決するためには、国産の次世代バイオ医薬品システムの開発が必要である。

本研究では次世代バイオ医薬システム、すなわち体内で持続的に組換えタンパク質を作らせる方法を開発し、患者ニード・医療経済的ニードに応え、技術的困難度の高い重症型血友病 A の根治療法の実現を目標としている。更に、本研究が成功すれば、他の難治性疾患のオーダーメイドバイオ医

薬品創出の開発プラットフォームとなり、患者体内で産生させる遺伝子治療法として、機能分子の欠乏する希少難治性疾患、抗体医薬の対象となる自己免疫性疾患・がん、インターフェロンによるウイルス肝炎治療などへの広範囲の応用が可能である。

【脂肪細胞・間葉系幹細胞の臨床応用】

骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などへの分化能をもつ間葉系幹細胞は、脂肪組織、歯根組織または骨髄組織中に存在し、細胞治療・再生医療への応用が検討されている。間葉系幹細胞は免疫抑制作用を有することも判明し、治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞療法剤としても注目されている。脂肪組織は、エネルギー貯蔵庫としての役割のみならず、さまざまな生理活性物質を産生・放出する内分泌器官であることや、多能性幹細胞（脂肪由来間葉系幹細胞）が存在することが報告されている。脂肪組織1グラムから約 5×10^3 個の脂肪由来間葉系幹細胞が採取できるとされ、同量の骨髄組織よりも500倍も多く、皮下脂肪組織の採取が比較的容易であることは、自己の細胞を使った治療を考える上で大きな利点である。

脂肪細胞移植あるいは間葉系幹細胞移植は、現在、様々な分野で臨床応用のための研究が進んでいる。心血管領域では間葉系幹細胞を用いた心筋梗塞治療や下肢虚血治療の前臨床試験が進行中である。脂肪組織由来間葉系幹細胞を併用した脂肪細胞移植の臨床的有効性が徐々に確認され、形成外科領域での顔面脂肪萎縮、美容目的の豊胸術や乳房切除後の乳房再建にも応用されている。整形外科領域では、治療抵抗性の関

節リウマチ患者に免疫抑制効果を期待して脂肪組織由来間葉系幹細胞を全身投与するという臨床試験も欧米で行われている。

本邦ではOgataらが2004年にレンチウイルスベクターを用いて培養ヒト脂肪細胞にBドメイン欠損ヒト血液凝固第VIII因子遺伝子を導入し、培養上清中に巨大分子である血液凝固第VIII因子が分泌されることを報告 (Gene Therapy 2004: 11; pp. 253-259) しており、デリバリーシステムとして脂肪細胞を利用した遺伝子発現系による血友病治療の実現可能性が示唆されている。

【四者共同研究のメリット】

筑波大学附属病院で実施した最初の遺伝子治療臨床研究は、MoIMed社（イタリア）との協力による「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するHSV-TK遺伝子導入ドナーリンパ球輸注の臨床研究」であった。次に、セルジェンテック株式会社およびエーザイ株式会社との共同研究として、「LCAT（レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症に対するLCAT遺伝子導入脂肪細胞自家移植療法の前臨床研究」の実績・経験を有することが利点であると考へ、3件目のテーマとして、本遺伝子治療の開発/実用化研究を、産業技術総合研究所、エーザイ株式会社およびセルジェンテック株式会社との共同研究契約の下で、能率的に進めている。

本研究で共同研究を行うエーザイ株式会社はレトロウイルスベクターと脂肪細胞天井培養技術を用いた遺伝子治療用培養脂肪細胞に関する特許を取得しており、その技術を用いて培養マウス脂肪細胞に胎盤型ア

ルカリホスファターゼ (PLAP) 遺伝子を導入し、それをヌードマウスに皮下移植することにより、マウス体内で PLAP の発現が 300 日以上維持されていることが既に確認されている。

D . 考察

本研究では、【脂肪細胞・間葉系幹細胞の臨床応用】の項で述べた遺伝子発現脂肪細胞を用いた治療技術に加え、分担研究「遺伝子導入脂肪細胞に関わる技術開発 (生体イメージング)」、および「新規 RNA ベクターに関わる研究開発および GMP 生産の検討」において述べる特許技術を合体させて、血友病に対する根治的な遺伝子治療の効率的な実用化研究を実施することが可能であると考えられた。

E . 結論

1 . 血友病の新規治療開発研究の世界的動向、および各種バイオ医薬品開発実用化の状況を踏まえると、血友病に対する遺伝子治療技術の国産開発は、時宜を得たものであり、非常に意義のあるテーマであると考えられる。

2 . 脂肪細胞を用いたデリバリーシステムは、血液凝固因子においても利用可能である。

3 . 四者間の共同研究によって、効率的に実用化を目指すことが可能である。

F . 健康危険情報 該当事項なし。

G . 研究発表
(研究成果の刊行に関する一覧表を参照)

1 . 論文発表

2 . 学会発表

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 (検討中)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

学会等発表実績

委託業務題目「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」

機関名 国立大学法人 筑波大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
近赤外非侵襲蛍光イメージング技術の開発と応用 （招待講演）	三輪佳宏	横浜（第 27 回日本動物 実験代替法学会）	2015 年 3 月	国内
ステルス型 RNA ベクターの開発と再生医療への応用 （口演）	中西真人	東京（第 14 回日本再生 医療学会総会）	2015 年 3 月	国内
Feeder-free 及び xeno-free 条件下でのヒト末梢血由来単 球からの iPS 細胞誘導（口演）	大高真奈美、久保陽子、西村健、 佐野将之、中西真人	東京（第 14 回日本再生 医療学会総会）	2015 年 3 月	国内
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（口演）	佐野将之、大高真奈美、飯島実、 中西真人	東京（第 14 回日本再生 医療学会総会）	2015 年 3 月	国内

2 . 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells.	Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, Horikawa DD, Katayama T, Arakawa K, Toyoda A, Kubo T, Kunieda T.	Plos One	2015 Feb 12; 10(2):e0118272. doi: 10.1371/journal.pone.0118272. eCollection 2015	国際誌
Biosynthesis of Ribosomal RNA in Nucleoli Regulates Pluripotency and Differentiation Ability of Pluripotent Stem Cells.	Watanabe-Susaki, K., Takada, H., Enomoto, K., Miwata, K., Ishimine, H., Intoh, A., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Sugino, H., Asashima, M. Kurisaki, A.	Stem Cells	32: 3099-3111, 2014	国際誌
Manipulation of Klf4 expression generates paused iPSCs stalled at distinct stages of reprogramming.	Nishimura, K., Kato, T., Oinam, L., Shiomitsu, E., Ayakawa, D., Ohtaka, M., Fukuda, A., Nakanishi, M. Hisatake, K.	Stem Cell Reports	3: 915-929,2014	国際誌

<p>Advanced Feeder-Free Generation of iPSC Directly From Blood Cells.</p>	<p>Trokovic, R., Weltner, J., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Salomaa, V., Jalanko, A., Otonkoski, T. and Kyttälä, A.</p>	<p>STEM CELLS Translational Medicine</p>	<p>3: 1402-1409,20 14</p>	<p>国際誌</p>
<p>Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes.</p>	<p>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. Mizuguchi, H</p>	<p>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</p>	<p>111: 16772-16777, 2014</p>	<p>国際誌</p>