

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791049

研究課題名(和文)トランスポゾンを用いた慢性肉芽腫症に対する新たな遺伝子治療の開発

研究課題名(英文)Development of new gene therapy for chronic granulomatous disease using Piggyback transposon

研究代表者

重村 倫成 (SHIGEMURA, Tomonari)

信州大学・医学部・助教(受託研究)

研究者番号：70623916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：CYBB遺伝子変異のある慢性肉芽腫患者T細胞にセンダイウイルスを用いてOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycを導入しiPS細胞の樹立に成功した。さらに、PiggyBacトランスポゾンを用いて患者T細胞へCYBB遺伝子を導入し、同様の方法でiPS細胞の樹立に成功した。

樹立したiPS細胞の多能性幹細胞マーカーの発現と免疫不全マウスへの移植によりテラトーマ形成能が確認できた。AGM-3細胞株細胞と共培養により単球、好中球へ分化誘導に成功したが、活性酸素産生は確認できなかった。

以上からこの方法によって遺伝子改変したiPS細胞は目的遺伝子発現を維持することが困難であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from peripheral T cells of chronic granulomatous disease patient with CYBB gene mutation, using sendai virus vector carrying reprogramming factors OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC. In the same way, we generated corrected iPSCs derived from CYBB-transduced T cell using PiggyBac transposon.

We confirmed expression of pluripotency markers (Oct4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog) by immunofluorescence assays. In addition, these iPSCs showed teratoma formation when injected into immunodeficient mice. These colonies could be differentiated to monocytes and neutrophils with AGM-3 stroma cells. Monocytes and neutrophils derived from non-corrected and corrected iPSCs were devoid of oxidase activity by DHR.

These data suggest iPSCs modified by this method were difficult to maintain transgene expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：慢性肉芽腫症 iPS細胞 トランスポゾン PiggyBac 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

慢性肉芽腫症 (CGD) は好中球などの食細胞が活性酸素を産生できないために殺菌能が極度に低下し、重篤な細菌・真菌感染症を繰り返す遺伝性免疫不全症である。根治的治療として造血幹細胞移植が行われているが、潜在的に存在する感染症のコントロールが困難であること、適切なドナーが存在しないこと、移植後の移植片対宿主病などの理由で、実施される症例は必ずしも多くない。

もう一つの根治的な治療として造血幹細胞を標的とした遺伝子治療があり、すでに2002年以降 *CYBB* 遺伝子に変異のある X 劣性 CGD (X-CGD) に対してドイツとスイスで非骨髄破壊の前処置を取り入れた遺伝子治療が始められた。最初の2例は長年にわたる難治性感染症が治癒し、劇的な臨床的效果を示したが、経過中に2例とも骨髄異形成症候群を発症した。その原因として遺伝子治療に用いられたレトロウイルス (RV) が *MDS1-EV1* 領域に挿入され、そのクローンが著明に増殖し、その結果7番染色体を欠失した細胞が出現し骨髄異形成症候群を発症したと結論づけられた (Stein et al., Nature medicine. 2010)。また、RV を用いた X 連鎖重症複合免疫不全症に対する幹細胞遺伝子治療でも白血病が発症しており、その安全性が疑問視され、新たな造血幹細胞遺伝子治療の開発が強く望まれていた。

本研究者らは DNA プラスミドである *piggyBac* トランスポゾンを用いたヒト造血幹細胞への非ウイルス遺伝子導入の開発を試みてきた。*piggyBac* 法を用いたヒト T 細胞遺伝子導入では 1) 約 40% の効率で長期間安定して外来遺伝子を発現できること、2) 複数の遺伝子を同時に導入できること、3) 13 kb の巨大な遺伝子を導入できること、4) 遺伝子治療の安全弁として目的遺伝子と

ともに自殺遺伝子を発現できることを報告した (Nakazawa Y, et al. J Immunother. 2009)。また、遺伝子導入されたヒト T 細胞のゲノム網羅的解析から、RV による遺伝子導入では約 16% に癌原遺伝子内あるいはその近傍への挿入が認められるのに対して、トランスポゾンを用いた遺伝子導入による癌原遺伝子内・近傍への挿入頻度はランダムコントロールと同程度の約 5% に過ぎなかった (Galvan DL, Nakazawa Y, et al. J Immunother. 2009)。予備実験として *piggyBac* トランスポゾンを用いて、ヒト造血幹細胞へ遺伝子導入を図ったが、エレクトロポレーションによる電気刺激では少量しか採取できない造血幹細胞のダメージが強く、また導入効率が悪いことが判明した。そこで新たな戦略を考案し研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、非ウイルスベクターでは困難とされる造血幹細胞に対する遺伝子修復を、非ウイルス遺伝子導入技術である *piggyBac* トランスポゾン法と iPS 細胞技術を組み合わせることにより、安全性の高い遺伝子治療を開発する。即ち、1) 非ウイルス遺伝子改変技術 *piggyBac* トランスポゾン法を用いて、末梢血 T 細胞の変異遺伝子を修復改変する。2) 改変した T 細胞から宿主染色体に傷害を与えないセンダイウイルスを使用し induced pluripotent stem (iPS) 細胞を樹立する。3) 樹立した iPS 細胞から血液細胞へ誘導する。

3. 研究の方法

(1) *CYBB* をトランスポゾンベクターへサブクローニングし、X-CGD 患者4名の末梢血単核球 (PBMC) に nucleofection 装置を用いて pIRII-*CYBB* と *piggyBac* ベクターをそれぞれ同時に遺伝子導入した。遺伝子導入 20 - 24 時間後に抗 CD3/CD28 抗体で T

細胞を刺激し、インターロイキン(IL)-15 添加培地で 7 - 10 日間培養した。同様に CYBB 遺伝子未導入 T 細胞も刺激、培養した。

(2) CYBB 遺伝子導入と遺伝子未導入した活性化 T 細胞へそれぞれ Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の cDNA をセンダイウイルスにより transfect し、mitomycin 処理したマウス胎児線維芽細胞を feeder 細胞として 5 ng/ml basic fibroblast growth factor を含む ES 細胞用培地で培養し、iPS 細胞を得た。

(3) 樹立された細胞を未分化マーカーである Oct4、SSEA-3、SSEA-4、tumor-related antigen(TRA)-1-60、TRA-1-81、Nanog の発現およびアルカリフォスファターゼ活性を検討し iPS 細胞を同定した。piggyBac トランスポゾン法により遺伝子修復した T 細胞由来 iPS 細胞を、遺伝子導入される CMV promoter 領域のベクター特異的 PCR 法を用いて同定した。樹立した iPS 細胞を継代し、センダイウイルスが消失したことを確認した。

(4) X-CGD 患者 T 細胞由来 iPS 細胞と、放射線照射処理したマウス AGM-3 細胞株細胞と共培養し、単球、好中球へ分化誘導を行った。

(5) 修復 iPS 細胞由来単球、好中球の活性酸素産生を未修復 iPS 細胞由来単球、好中球と比較した。

4 . 研究成果

慢性肉芽腫患者 4 名と臍帯血から T 細胞を刺激活性化させ、ホストゲノムへの挿入が起こらない(-)鎖 RNA ウイルスであるセンダイウイルスを用いて山中因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入し、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞の AP 活性および Oct4、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Nanog の発現を確認し、免疫不全マウスへの移植によりテラトーマ形成能を確認した。これらの iPS 細胞から AGM-S3

細胞上で、day 0-4 までは BMP4 40ng/ml、day 4-6 は SCF 50ng/ml、VEGF 40ng/ml 内で培養し、day 6 以降は SCF 50ng/ml、TPO 10ng/ml、G-CSF 50 ng/ml IL-3 50 ng/ml、FLT3-L 50 ng/ml で培養した。Day 15 での培養細胞をメイギムザ染色、ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色を行い、単球、好中球を確認した。慢性肉芽腫症患者 iPS 細胞からは活性酸素産生は確認されず、臍帯血由来の iPS 細胞から活性酸素産生を確認した。

PiggyBac トランスポゾン法を用いて、慢性肉芽腫症患者末梢血 T 細胞へ目的遺伝子遺伝子を導入し、T 細胞の遺伝子改変を行った。薬剤にて遺伝子導入された細胞を選択肢しセンダイウイルスを用いて iPS 細胞への誘導を行った。50 個以上の ES 細胞様コロニーが出現し、それらのコロニーは遺伝子導入されていることを確認した。しかし改変 T 細胞由来の iPS 細胞から単球、好中球への分化誘導を行ったが、目的蛋白の発現、活性酸素産生能の回復を認めなかった。原因として目的遺伝子発現の CMV promoter がサイレンシングされた可能性があり、幹細胞での発現のよい EF1- promoter へ変更した。まずサイレンシングの有無を確認するため Green Fluorescent Protein (GFP) を目的遺伝子として導入し、T 細胞の遺伝子改変を行い、センダイウイルスを用いて iPS 細胞へ誘導を行った。GFP 発現のある iPS 細胞様コロニーが出現したが、2 - 3 継代でその発現は消失し、目的遺伝子発現を維持することが困難であることが判明した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

第 115 回日本小児科学会学術集会
福岡国際会議場

PiggyBac トランスポゾンと iPS 技術を組み

合わせた慢性肉芽腫症に対する新たな遺伝子治療の開発 福岡国際会議場 4F
401-403 会議室(第 4 会場)
重村倫成、中沢洋三、松田和之、小池健一
2012 年 4 月 21 日(土)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重村 倫成 (SHIGEMURA, Tomonari)
信州大学・医学部・助教 (受託研究)
研究者番号 : 70623916

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :