

## DNA トランスポゾンベクターによる次世代型血友病遺伝子細胞治療法の確立

松井英人

奈良県立医科大学 血栓制御医学

### 【研究の背景】

欧米では数年来、血友病患者に対しアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による遺伝子治療の臨床試験が行われているが、ベクターに対する免疫応答が原因で持続的な遺伝子発現が難しく、十分な治療成績は得られていない。我々は、自己末梢血から単離した血管内皮前駆細胞をレンチウイルスベクターで遺伝子導入後に皮下移植する *ex vivo* 遺伝子導入のアプローチで血友病 A マウスおよびイヌモデルでの検討を行ってきた。そのアプローチはウイルスベクターを静注する *in vivo* 遺伝子導入と比較して①宿主がベクターに対する免疫応答を起こしにくい、②不測の事態においては移植細胞を摘出し治療を中断できるという利点がある。

### 【目 的】

血友病遺伝子細胞治療に対する新しい遺伝子導入ツールとして非ウイルス型の *piggyBac* トランスポゾン由来のベクターを開発し、臨床応用へ向けた有効性を確認する。本ベクターは従来のウイルスベクターの様な封じ込め P2 レベルでの取り扱いが不要で、ウイルス由来タンパク質に対する免疫応答のリスクも少ない。目的細胞に転移酵素と同時にプラスミド導入を行うという簡便な操作で、安価に高効率で目的遺伝子の挿入ができるプラスミド DNA ベクターである。これまでのウイルスベクターでは不可能であった、大きなサイズの cDNA 全長を導入できる革新的なシステムで次世代型血友病遺伝子細胞治療法の確立を目指す。

### 【方 法】

①GFP 発現プラスミドのサイズが 4.1Kb であるのに対してヒト第Ⅷ因子(FⅧ:全長型、Bドメイン欠如型、ブタとヒトのハイブリッド型)発現プラスミドは、それぞれ 10.6 kb、8.1 kb、8.0 kb とサイズが大きく、プラスミド導入の効率が低下することが予想される。今までのところ、同時に遺伝子導入を行う *piggyBac* 転移酵素(transposase)発現プラスミドとの比率 1:4 が最も効率よく遺伝子導入が可能であるが、新規遺伝子導入法(Neon、Nucleofector、NEPA21 等の電気穿孔法)や、ベクターの複数回投与等、さらに詳細な検討を行うことで遺伝子導入効率の向上を検討する。

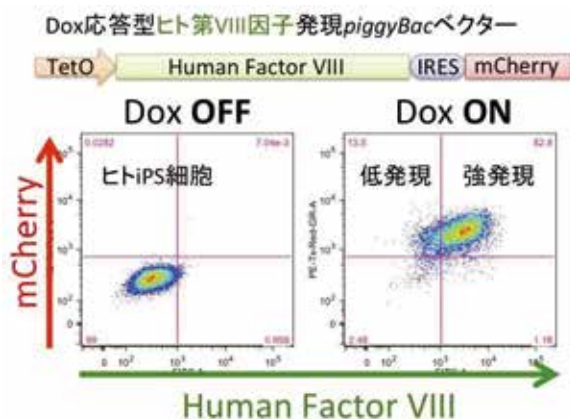
②ES 細胞や iPS 細胞等の未分化多能性幹細胞は、レンチウイルスベクター等による遺伝子導入効率が悪く、また導入した外来遺伝子の発現が維持できないサイレンシング現象がみられる。我々の iPS 細胞における GFP 遺伝子を導入した検討において、新規 *piggyBac* ベクターはレンチウイルスベクターよりも遺伝子導入効率がよく、また導入された遺伝子のサイレンシングもかなり回避出来ることを見出している。これらについては、分泌される FⅧ活性の長期持続性によって確認する。また血友病患者より樹立した iPS 細胞へも FⅧ発現 *piggyBac* ベクターを導入し、FⅧの発現分泌を測定する。

③FⅧは主に肝臓の類洞内皮細胞で産生されていることが知られている。FⅧは巨大なタンパク質で、切断や糖鎖修飾など、複雑な翻訳後修飾を経て、ER 経路を経て分泌される。その為、未熟な多能性幹細胞よりも、ER 経路がより発達した肝臓細胞や血管内皮系細胞の方が基本的には FⅧの分泌が高いことが期待される。そこで、さらに優れた FⅧ産生細胞がないか検討するために、FⅧを恒常的に発現している iPS 細胞を、EB(胚様体)形成を経てランダムに三胚葉由来の細胞群へ分化させ、FⅧを高発現している細胞群を免疫染色後にソートし、ER マーカーや細胞表面マーカーから、どの様な細胞種において FⅧの発現が高いか探索を行う。

【結 果】

①iPS 細胞から FVIII 生産細胞への分化誘導

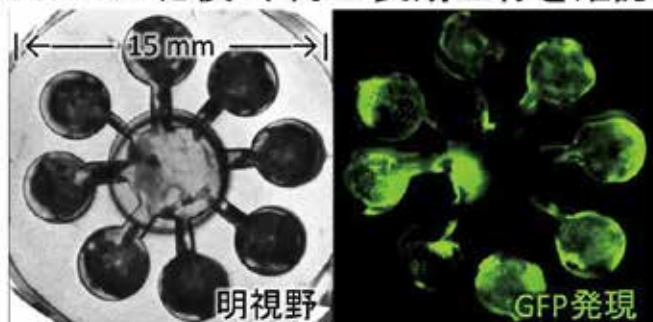
FVIII の分泌生産に適した細胞種マーカーを指標に、健常人 iPS 細胞および血友病患者由来 iPS 細胞を目的の細胞種へと分化誘導を行った。その結果、改良型 FVIII を発現する Dox 応答型 *piggyBac* ベクターの構築に成功した。今後分化細胞に導入して、従来型との分泌量比較実験を行う予定である。



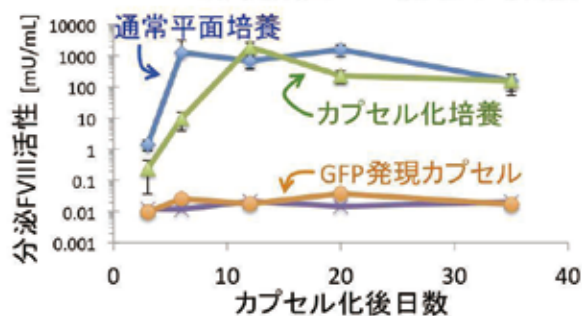
②半透膜デバイスによる高機能獲得型 FVIII 発現の検討

水溶性分泌タンパク質である FVIII は透過するが、数十  $\mu\text{m}$  を超える細胞は透過しない 1-2  $\mu\text{m}$  の孔径をもつ生体親和性のポリエチレンテレフタレート膜でデバイスを作成し、FVIII 生産細胞を内部へ封入する。可溶性栄養分の流入や FVIII 分泌を効率化するために、表面積を広くした円盤状の新規開発デバイスであり(下左図)、まずは培養皿上で長期にわたる FVIII の分泌効率および、生産細胞の生存を観察した(下右図)。今後はマウスの背面皮下にデバイスを移植し、市販の TheraCyte デバイスとの比較、およびデバイスの有無において FVIII の血中生産量、中和抗体の生成、および発現期間を検討した。

カプセル化後1ヶ月の長期生存を確認



カプセルから高活性FVIII分泌を確認



【考 察】

遺伝子細胞治療/再生医療分野におけるウイルスベクター等は、GMP レベルでの作製が義務付けられており厳しい規制や制限がある。我々が開発した新規 *piggyBac* ベクターは、非ウイルス性のプラスミドベースの遺伝子導入ベクターであり、従来のウイルスベクターと比較して少ない規制や制限で安価に作製できるという大きな特徴がある。本ベクターの有効性が明らかとなり、血友病のみならず他の先天性単一遺伝子欠損症疾患を含め様々な疾患等に対する遺伝子導入ツールとして発展することが期待される。また、もし iPS 細胞での高発現が可能となった場合、細胞移植療法用途だけでなく、現在のハムスター型の翻訳後修飾ではないヒト型の翻訳後修飾の組換えヒト FVIII 製剤の大量生産即ち、「iPS 細胞で作製した世界初の FVIII 製剤」という新ブランドが確立できる。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

血友病遺伝子細胞治療をさらに安全に臨床応用するには、ウイルスベクターを使用せずに患者自身の細胞へ FVIII を効率よく遺伝子導入し、持続して発現させることができるベヒクル細胞を大量に作製する方法を確立する必要がある。そこで、構築した *piggyBac* トランスポゾン由来の FVIII 発現ベクターを血友病患者由来のヒト iPS 細胞へ導入し、FVIII 遺伝子発現を検討する必要がある。また、FVIII を導入した iPS 細胞を様々な細胞へ分化誘導することで、FVIII がどの細胞で効率よく発現し分泌するかが明らかになれば、細胞治療に必要なベヒクル細胞を患者 iPS 細胞から無限大に大量に作製することが可能となる。将来的には、自己細胞を用いることで移植に伴う免疫応答を完全に回避できる新しい血友病遺伝子細胞治療法を創出することにつながる。

### 【参考・引用文献】

- 1) Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, Ohashi K, Okano T, Matsui H. A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. **PLoS One** 8(12) e83280, 2013 (**Corresponding author**)
- 2) Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A. Delivery of factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. **PLoS One** 9(8) e104957, 2014 (**First & Corresponding author**)
- 3) 松井英人 血友病遺伝子/細胞治療の方向性  
日本小児血液・がん学会雑誌 52(3) 254-257 2015