

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名:

(日本語) 特異的デリバリーシステムを使用した造血幹細胞の *in vivo* 遺伝子治療

(英語) *In vivo* gene therapy of hematopoietic stem cells with a specific delivery system

研究開発実施期間: 令和4年7月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 内田 直也

(英語) Naoya Uchida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人東京大学・医科学研究所・特任研究員

(英語) The University of Tokyo・The Institute of Medical Science・Project Researcher

II 研究開発の概要

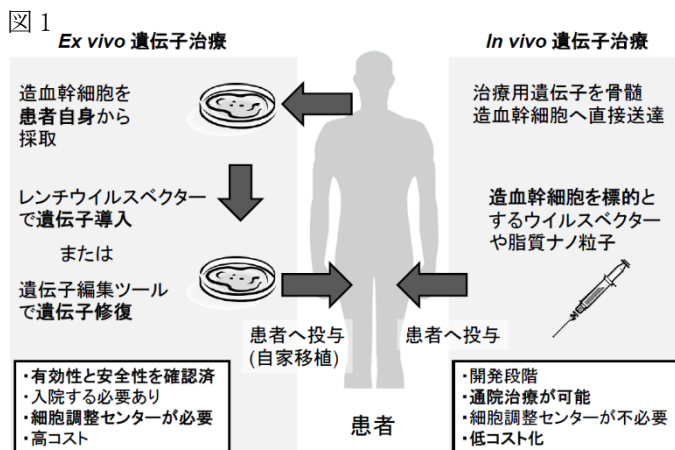
研究開発の成果およびその意義等:

抄録

体外で造血幹細胞の遺伝子を修飾する *ex vivo* 遺伝子治療が世界的に広まっており、様々な遺伝性疾患の治療が可能となっている。新世代のレンチウイルスベクターを使用することで、一度の治療で生涯にわたって症状を改善・消失させることができる。しかし、体外で遺伝子導入、移植する過程は複雑であり、遺伝子治療が広まる妨げとなっている。そのため、遺伝子治療ツールを全身投与することで、造血幹細胞に遺伝子を直接導入できる *in vivo* 遺伝子治療が望まれている。そこで本研究課題では、全身投与により造血幹細胞に遺伝子導入可能な標的レンチウイルスベクターを作製し、*in vivo* 遺伝子治療法の開発を可能とする。まず、DNA ライブラリーを使用して標的分子をスクリーニングし、造血幹細胞表面の特異抗原に対して接着能が高い標的分子を得た。次に、この標的分子を、ベクター表面のエンベロープに組み込み、標的レンチウイルスベクターを設計・作製した。また、この標的抗原を発現する細胞株を樹立し、標的遺伝子導入の評価を可能とした。このように最適化した標的ベクター・評価法を使用することで、標的抗原陽性細胞に対し、より効率の良い標的遺伝子導入を認めた。本研究課題により造血幹細胞抗原に対する標的ベクターを設計し、標的性が高いレンチウイルスベクターを得た。これにより、骨髄造血幹細胞へ直接遺伝子導入する *in vivo* 遺伝子治療が可能になることが期待される。

背景

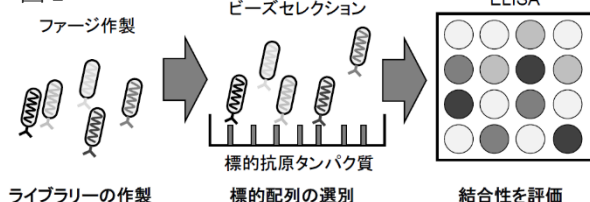
造血幹細胞を遺伝子レベルで修復する *ex vivo* 遺伝子治療の有効性と安全性が示されつつあり、様々な先天性疾患の治療が可能となっている (図 1)。造血幹細胞は生涯にわたって血液を産生するため、その病因遺伝子を修復することで半永久的に症状を改善・消失することができる。現在、その修復方法として、レンチウイルスベクターで治療遺伝子を組み込む遺伝子付加治療とゲノム編集で病因変異を直す遺伝子編集治療が開発されているが、どちらも医薬品製造規格 (GMP) に準拠した細胞調製センターにて幹細胞採取、CD34 選択、体外培養することが不可欠であり、そのことが、治療が広まる妨げとなっている。そのため、体外での細胞培養を必要としない *in vivo* 造血幹細胞遺伝子治療の開発が望まれる。そこで、造血幹細胞を標的とする *in vivo* 遺伝子送達法の開発が必要となる。本研究では、全身投与により造血幹細胞に遺伝子導入可能な標的レンチウイルスベクターを作製し、*in vivo* 遺伝子治療法の開発を可能とする。さらに、その方法を脂質ナノ粒子に応用することで、造血幹細胞を標的とした脂質ナノ粒子の開発も可能となる。これにより、全身投与のみで様々な疾患を遺伝子レベルで治療する *in vivo* 遺伝子治療法の開発を目指す。



方法・結果

(1) 標的遺伝子治療ベクターと脂質ナノ粒子の開発

図 2



1-1. 標的分子の最適化

標的ベクターの標的性を増強するため、造血幹細胞表面の特異抗原に対する標的分子を最適化するファージディスプレイ法を確立した (図 2)。ファージ表面に標的分子のライブラリーを発現させ、特異抗原に

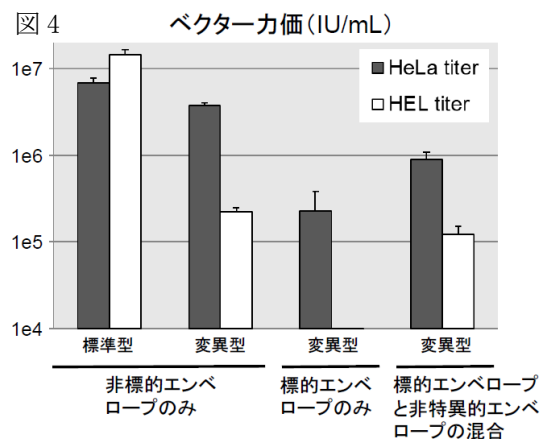
接着するファージを選別し、ELISAにて標的性を評価し、その配列をシーケンスした。その結果、標的性と配列の相同性が共に高いクローン (1, 5, 6, 7)、相同性は低いが標的性が保たれているクローン (2, 3, 4, 8, 9, 10)、標的性がやや劣るクローン (11, 12) と、様々な最適化標的分子を得た (図 3)。その後、相同性が高いクローン (5, 6, 7) と標的性が低いクローン (11, 12) を除き、さらなる評価を行った。

図 3 標的性と配列の相同性



1-2. 標的遺伝子治療ベクターの作製

図 4

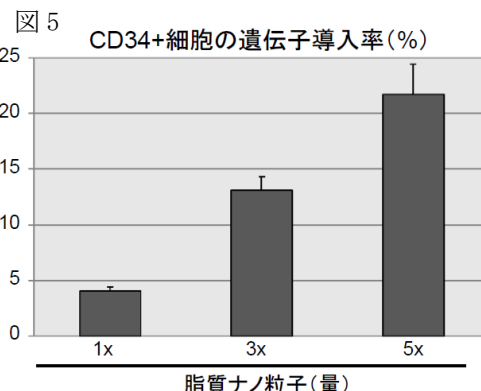


レンチウイルスベクター表面のエンベロップに標的分子を組み込み (標的エンベロップ)、標的レンチウイルスベクターを設計・作製し、ヒト細胞株 (HeLa 細胞と HEL 細胞) にてベクター力価 (titer) を評価した。標準型の非特異的エンベロップには非特異的な接着能があるため、接着部位に変異を加えて融合能のみを持つ変異型エンベロップを作製した。変異型エンベロップに標的分子を組み込み、標的エンベロップを作製した。しかし、標的エンベロップのみで標的ベクターを作製すると、ベクター力価が強く低下し (図 4)、エンベロップの機能 (融合能) が失われていると示唆された。そのため、

標的エンベロープ（特異的接着）と変異型エンベロープ（膜融合）を混合し、2種のエンベロープを合わせ持つベクターを作製することで、遺伝子導入可能な標的レンチウイルスベクターを得た（図4）。

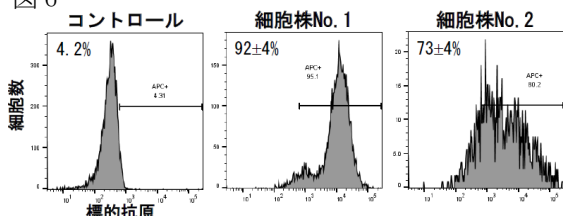
1-3. 標的脂質ナノ粒子の作製（オプショナル）

マイクロ流体デバイスを使用して、イオン化脂質とヘルパー脂質から、比較的均一な脂質ナノ粒子を作製し、同時に核酸の封入を確認した。GFP mRNAを封入した脂質ナノ粒子を使用して、ヒト細胞株やヒトCD34(+)造血幹・前駆細胞への効率的な遺伝子送達を確認した（図5）。また、標的分子を組み込んだ標的脂質ナノ粒子を設計し、その作製を進めていたが、研究代表者が海外の政府施設へ異動したことに伴い、研究体制を継続できなくなり、やむを得ず課題が中止となり、この目標（オプショナル）を達成できなかった。



(2) 標的抗原を発現する細胞を標的とした遺伝子導入の評価

図6 標的抗原を発現する細胞株の樹立



2-1. 標的抗原を発現する細胞株の樹立

標的抗原と抗がん剤耐性遺伝子を共に発現するプラスミドを設計・作製し、ヒト細胞株に対して遺伝子組み換えを行った。薬剤選択後にクローニングを行い、標的抗原を恒常的に発現する細胞株を樹立した（図6）。この標的抗原(+)の細胞株（No. 1）と、元のコントロール細胞株（標的抗原(-)）を使用して、標的遺伝子導入を評価する。

この標的抗原(+)の細胞株（No. 1）と、元のコントロール細胞株（標的抗原(-)）を使用して、標的遺伝子導入を評価する。

2-2. 標的抗原を発現する細胞株の遺伝子導入

最適化した標的分子（図3）を使用し、標的ベクターを作製した。標的抗原を発現する細胞株と発現しない細胞株を混合し、そこへ作製した標的ベクターを加え、標的ベクターの標的遺伝子導入を評価した。その結果、変異型 VSVG エンベロープのみを使用した非標的ベクター（融合能を持つが、接着能を失った最小コントロール）と比較して、標的抗原(+)細胞でのベクター力価（ベクター容量あたりの遺伝子導入率）が高くなった（図7）。また、標準型 VSVG エンベロープ（非標的接着能と融合能を持つ最大コントロール）と比較して、標的抗原(+)細胞株でのベクター力価がより高くまたは同等になった。そのため、標的エンベロープを併用することで、標的抗原(+)細胞に対する標的ベクターの接着能が改善し、標的遺伝子導入が可能になったと考えられた。また、標準型 VSVG エンベロープと同様、高効率の遺伝子導入が可能になると期待された。

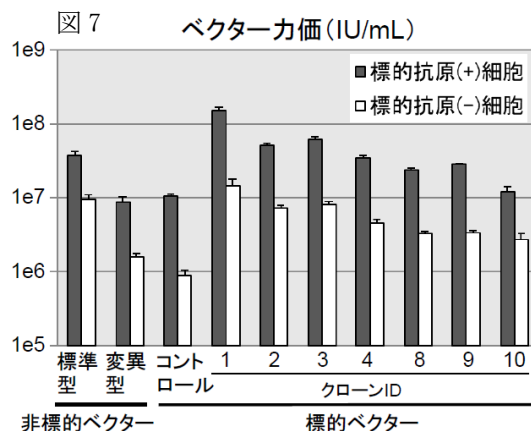
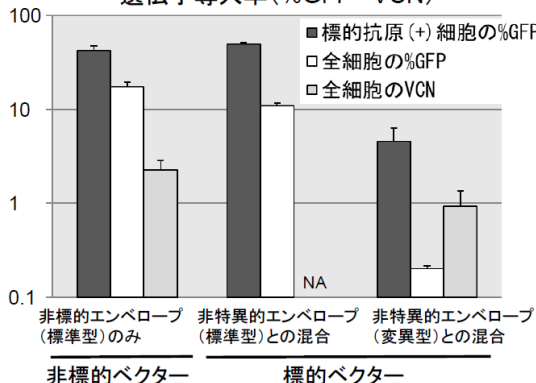


図8 遺伝子導入率(%GFP・VCN)



2-3. ヒト CD34(+)造血幹・前駆細胞の遺伝子導入

標的レンチウイルスベクターを使用して、ヒト CD34(+)造血幹・前駆細胞に遺伝子導入し、フローサイトメトリー (%GFP) や定量的PCR (ベクターコピー数 (VCN)) によって遺伝子導入率を評価した。その結果、標的抗原(+)細胞分画でのより高い遺伝子導入を認め、標的ベクターによる標的遺伝子導入が示唆された（図8）。標的エンベロープと変異型の非標的エンベロープを混合した標的ベクターを使用すると、遺伝子導入率が有意に低下してしまうため、CD34(+)細胞

胞へ標的遺伝子導入するためには、変異型エンベロップではなく、標準型の非標的エンベロップを組み合わせることが望ましいと考えられた。

(3) 造血幹細胞を標的とした *in vivo* 遺伝子導入の評価

ヒト CD34(+)細胞を免疫不全マウスに移植することで、ヒト化マウスモデルを作製する準備をした。標的レンチウイルスベクター（あるいは標的脂質ナノ粒子）をヒト化マウスモデルに全身投与して、ヒト造血幹細胞への *in vivo* 遺伝子導入を評価するため、標的ベクターの作製を進めていたが、研究代表者が海外の政府施設へ異動したことに伴い、研究体制を継続できなくなり、やむを得ず課題が中止となり、この目標を達成できなかった。

結論・展望

本研究課題により、造血幹細胞に対する標的ベクターを最適化し、標的性が高いレンチウイルスベクターを得た。また、CD34(+)造血幹・前駆細胞を使用し、培養下で、標的ベクターによる標的遺伝子導入を示した。これにより、全身投与による造血幹細胞の *in vivo* 遺伝子治療が可能となれば、低コスト化だけでなく全世界への遺伝子治療の拡大が期待される。この方法は、現行の *ex vivo* 遺伝子治療ベクターに応用することで *in vivo* 遺伝子治療を可能とするため、汎用性が高い。本研究では、造血幹細胞を標的とする標的脂質ナノ粒子への応用も目指しており、ウイルスベクターを使用せずに、脂質ナノ粒子の全身投与によって、遺伝子レベルで様々な疾患を通院治療することも期待される。これにより、他の核酸医薬や異なる標的臓器にも応用が可能となり、遺伝子治療の適応が飛躍的に拡大されることが期待される。

English statement

Hematopoietic stem cell (HSC)-targeted gene therapy is curative for various genetic diseases, including primary immunodeficiencies, hemoglobin disorders, and metabolic diseases. A therapeutic gene can be added to patient HSCs with lentiviral vectors (LVs) during *ex vivo* culture; however, a cell processing center is required, limiting gene therapy application. Recently, systemic injection of lipid nanoparticles (LNPs) was reported for *in vivo* delivery of genome editing tools, allowing for phenotypic correction in amyloidosis patients. However, the current LNPs are low-specificity for drug delivery, and thus, the development of an HSC-targeted delivery system is required for *in vivo* HSC gene therapy. Therefore, in this study, we sought to incorporate HSC-targeted molecules into LVs and LNPs, and the HSC-targeted LVs/LNPs can deliver gene therapy tools to HSCs by systemic injection, allowing for the development of *in vivo* HSC-targeted gene therapy.

In this study, we optimized HSC-targeting molecules via phage display screening to improve their affinity. The HSC-targeting molecules were combined with an envelope, which allowed for the preparation of targeted LVs. In addition, we established cell lines expressing the target antigen, enabling the evaluation of targeted transduction. The use of targeted LVs with optimized molecules resulted in more efficient transduction in the target antigen-positive cell line. The targeted LVs allowed for targeted transduction in CD34+ cells *in vitro*. HSC-targeted LNPs were designed with the same HSC-targeted molecules.

In summary, in this study, we designed HSC-targeted LVs, and high-efficiency targeted LVs were developed. Similarly, HSC-targeted LNPs were designed and under development. It would allow for the one-time cure of various diseases at the DNA level by systemic injection, and it can expand the indications for gene therapies.