

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：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
2. 研究開発代表者：須磨崎 亮（筑波大学医学医療系）
3. 研究開発の成果

重症血友病 A は小児期に診断される不治の難病であり、生涯を通じて頻回注射が必要で、未だ根本的な治療法は開発されていない。本研究は、この血友病 A の患者さんに負担の少ない治療を実現するために、日本で作られた安全性の高い新規 RNA ベクターを利用して、遺伝子治療の実用化を目指す開発研究である。平成 27 年度の主な研究成果は以下のとおりである。

### （1）完全長ヒト第Ⅷ血液凝固因子を分泌できる新規 RNA ベクターの開発

平成26年度は、産業技術総合研究所で開発された新規RNAベクター（特願2015-007288）に、ヒト第Ⅷ血液凝固因子の全長cDNA (7, 056bp)、Bドメイン完全欠失型 (4, 398bp)、Bドメイン一部欠失型 (5, 046bp) を各々搭載したベクターを作成した。平成27年度には、このベクターを使った第Ⅷ血液凝固因子の発現レベルを検討した。第Ⅷ血液凝固因子のBドメイン完全欠失型 (4, 398bp) とBドメイン一部欠失型

(5, 046bp) は培養上清中に高濃度に検出できたが、全長型は検出できなかった。そこで、さらに新規遺伝子を追加して搭載すると、全長型第Ⅷ血液凝固因子の発現が100倍近く向上し、Bドメイン完全欠失型やBドメイン一部欠失型と同レベルで培養上清中に分泌された。この方法について特許出願の準備中である。大分子の第Ⅷ血液凝固因子をこのように効率的に産生させる遺伝子導入ベクターは従来の方法と比較して画期的であり、工業生産的にも高い有用性が期待される。

また、遺伝子治療用の臨床グレードのベクターを製造するために、GMP 製造、大量生産のための準備を行った。

### （2）非侵襲生体イメージングを利用した遺伝子導入細胞の動態解析

血友病治療のためには、生体内で第Ⅷ血液凝固因子を持続的に分泌できる遺伝子導入ベクターを開発する必要がある。生体内で非侵襲的に蛋白発現をモニターするために、新たな生体イメージング手法を開発した。近赤外光は、哺乳動物組織で吸収が小さく、かつ自家蛍光が少ないために、近赤外蛍光蛋白であるiRFPはGFPなどよりも深部からシグナルが得られ、非侵襲生体イメージングに適している。本研究では、iRFP遺伝子を搭載した新規RNAベクターを使用して、同一個体で、簡便かつ経時的に遺伝子導入細胞をモニターできることが示された。

その結果、この新規ベクターは、生体外で培養細胞を用いて導入するex vivo法のみならず、単にベクターを筋肉注射するだけのin vivo 遺伝子導入方法によっても、効率的にタンパク発現を誘導できることが判明した。更に、経時的に蛍光発現をモニターすると、遺伝子導入細胞は、長期間導入部位に局限して留まっており、安全性が高いことも推測された。この点については、さらに感度のよいRT-PCR法などを用いて、安全性の確認を続ける予定である。

マウスモデルで、この生体イメージングモニターを行うと、正常マウスでは、培養細胞系とは異なり、1~2 週間でタンパク発現が消失した。種々の免疫不全マウスを用いて、蛍光モニターの消失時間を検討したところ、本ベクターを導入した細胞の生体内寿命を規定している最大の要因として、「自然免疫」が関与していることが明らかになった。生体内では新規ベクターの導入細胞が異物として認識され、生体イメージング法を利用して、排除に働く免疫機構を簡単に検討できるようになった。免疫不全マウスの種類を変える事により、細胞レベル・分子レベルでベクター排除に関わる免疫システムを急速に解明しつつある。この新規ベクターは複数の遺伝子を搭載できるので、遺伝子導入細胞排除に関わる分子の発現を操作することで、生体全体には免疫抑制をきたすことなく導入細胞を免疫回避させ、第Ⅷ血液凝固因子を長期に分泌させる手法を開発できる期待が得られた。

### 【作成上の留意事項】

本報告書は、提出締切り時点（事業年度終了6 1日後）の情報として毎年度当機構ホームページ上に公開されます。知的財産関連の情報（\*）、個人情報等公開に適さない内容が含まれていないかご注意ください。

- （1）研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとします。
- （2）当該年度の研究班全体の成果が明らかになるように1600字以内（図表絵等を含めない）で簡潔に記載してください。研究開発期間最終年度の研究班の研究開発代表者は、初年度から最終年度までの全研究開発期間における活動総括概要を作成してください。

#### 4. その他

- （1）日本工業規格A列4番（A4）の用紙を用い、全文を1枚以内でまとめてください。
- （2）文字の大きさは、10～12ポイント程度とします。
- （3）当機構に提出の際はPDF\*に変換したファイルを送付してください。

---

※ PDF (Portable Document Format) とは、米国アドビシステムズ社が開発したドキュメント表示用のファイル形式のことです。ワープロソフト等の印刷可能なソフトウェアで作成されたドキュメントであれば、「Adobe Acrobat」という専用ソフトウェアを使って、原則としてすべて PDF ファイルに変換することができます。PDF に変換されたファイルは、無料で配布されている「Adobe Reader」（インターネットでダウンロードできます）で読むことができます。

#### （\*）公表資料（採択課題名、研究成果報告書）の作成にあたっての注意事項

研究成果の公表により、特許権を取得できない、ノウハウとして秘匿すべき事項（例えば、製造条件の詳細）が第三者に知られる、研究開発において第三者に先を越されるといった事態が起こり得ます。特に、創薬研究については、化合物情報（有効成分）、生物活性情報と治療対象疾患の情報から第三者が容易に研究内容を把握できてしまうため、下記のように、化合物情報と生物活性情報（治療対象疾患）のいずれかを公表しないと工夫をすることが必要です。公表資料に記載する事項については、各研究機関の知財担当者等と相談することをお勧めします。

##### 例1. ある化合物の生物活性が新規である場合

- × 課題名：A B 1 2（名称から化学構造式が明らか）のY Zキナーゼ阻害活性
  - 課題名：化合物XのY Zキナーゼ阻害活性
- 公表資料においては、例えば、化合物情報の具体的な開示を避ける。

##### 例2. 標的（Y Zキナーゼ）が抗がん剤のターゲットとして新規である場合

- × 課題名：化合物Xを有効成分とするY Zキナーゼ阻害剤－新規機序による抗がん剤の開発
  - 課題名：化合物Xを有効成分とする新規抗がん剤の開発
- 公表資料においては、Y Zキナーゼが抗がん剤の新規ターゲットとなることは、できる限り開示しない。化合物Xの具体的な開示も避ける。