

平成 2 8 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実用化研究事業

(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Development of gene therapy for Hemophilia A by a novel RNA vector

研究開発担当者 (日本語) 筑波大学医学医療系 客員教授 須磨崎 亮

所属 役職 氏名：(英語) Sumazaki, Ryo

Visiting professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

実施期間：平成 2 6 年 4 月 1 日 ～ 平成 2 9 年 3 月 3 1 日

分担研究 (日本語) 脂肪細胞の体外培養技術の検討

開発課題名：(英語) development of *ex vivo* expansion culture system for adipocytes

研究開発分担者 (日本語) セルジェンテック株式会社代表取締役 麻生 雅是

所属 役職 氏名：(英語) Aso, Masayuki, CEO and president, CellGenTech, Inc.

分担研究 (日本語) 新規ベクターの開発および GMP 準拠作成、目的遺伝子の搭載

開発課題名：(英語) Development of improved RNA vector installed with desired genes, and preparation of the vector production protocol based on Good Manufacturing Practices (GMP)

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門

ヒト細胞医工学研究ラボ長 中西 真人

所属 役職 氏名：(英語) Mahito, Nakanishi

Laboratory Director, Research Laboratory for Human Cell Engineering,  
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National  
institute of advanced industrial science and technology

分担研究 (日本語) 遺伝子改変脂肪細胞の体外および体内での評価、予備的薬理試験  
 開発課題名: (英語) *ex vivo* and *in vivo* evaluation of vector transfected adipocytes

研究開発分担者 (日本語) エーザイ株式会社 h h c データクリエーションセンター  
 テクノロジークロスポイントラボ 伊藤 昌史  
 所属 役職 氏名: (英語) Ito, Masashi, Exective Director, Technology Cross Point Laboratories  
 hhc,Data Creation Center, Eisai Co., Ltd.

分担研究 (日本語) ヒト脂肪細胞の体外培養および遺伝子導入・発現試験  
 開発課題名: (英語) *ex vivo* gene expression by vector-transfected human adipocytes

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 教授 千葉 滋  
 所属 役職 氏名: (英語) Chiba, Shigeru  
 Professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) ヒト脂肪細胞の体外培養および遺伝子導入・発現試験  
 開発課題名: (英語) *ex vivo* gene expression by vector-transfected human adipocytes

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 准教授 長谷川 雄一  
 所属 役職 氏名: (英語) Hasegawa, Yuichi  
 Associate professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) 生体イメージング技術を用いた遺伝子導入脂肪細胞の生体内動態評価  
 開発課題名: (英語) non-invasive bioimaging and *in vivo* evaluation of Vector-infected cells

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 講師 三輪 佳宏  
 所属 役職 氏名: (英語) Miwa, Yoshihiro  
 Assistant professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) 脂肪細胞の機能評価・分泌機能解析  
 開発課題名: (英語) secretory mechanism and cell fuction of adipocytes

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 教授 久武 幸司  
 所属 役職 氏名: (英語) Hisatake, Koji  
 Professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) 脂肪細胞の機能評価・分泌機能解析  
 開発課題名: (英語) secretory mechanism and cell fuction of adipocytes

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 助教 西村 健  
 所属 役職 氏名: (英語) Nishimura, Ken

Assistant professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) PMDA との相談、薬事戦略立案  
開発課題名 : (英語) planning and management of consultation to PMDA

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 教授 柳 健一  
所属 役職 氏名 : (英語) Yanagi, Kennichi  
Professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) PMDA との相談、薬事戦略立案  
開発課題名 : (英語) planning and management of consultation to PMDA

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 教授 橋本 幸一  
所属 役職 氏名 : (英語) Hashimoto, Koichi  
Professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) 脂肪細胞および間葉系幹細胞利用法に関する研究  
開発課題名 (英語) Novel Gene therapy by using proliferating adipocytes or mesenchymal stem cells

研究開発分担者 (日本語) 筑波大学医学医療系 准教授 福島 敬  
所属 役職 氏名 : (英語) Fukushima, Takashi  
Associate professor, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

本研究は、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による共同研究の一部として実施された。主要な研究成果は、以下の3点である。

**（１）培養細胞系で、完全型第Ⅷ血液凝固因子（遺伝子サイズ 7kb）を持続的に分泌できる RNA ベクターが開発できた。**産業技術総合研究所では、理論上 13.5kb 程度までの外来遺伝子を搭載できる RNA ウイルスベクターが開発されていた。本研究ではまず、完全型、N6 型、または B ドメイン欠失型（BDD）の3種類の第Ⅷ血液凝固因子遺伝子を搭載した本ベクターを BHK21 細胞またはヒト脂肪組織由来天王培養細胞（ccdPA）に感染させたが、培養上清中の第Ⅷ因子活性は、N6 型および BDD に比較して、完全型遺伝子ではほとんど検出されなかった。そこで、完全型第Ⅷ因子遺伝子と共に或る遺伝子を搭載したところ、第Ⅷ因子活性が、N6 型または BDD とほぼ同レベルまで持続的に分泌されるようになった。

**（２）上記 RNA ベクターを用いて、マウスの系で血友病 A の遺伝子治療プロトコールが作成できた。**マウス第Ⅷ血液凝固因子を分泌する 3T3-F442A 細胞（マウス前脂肪細胞株）を作成し、血友病 A マウスに移植したところ、血漿中の第Ⅷ血液凝固因子活性が 10%以上に上昇したことから、本ベクターを用いた遺伝子治療が血友病 A マウスに有効なことが示された。さらにヒト脂肪組織由来 ccdPA と類似した性格を有する市販のヒト脂肪細胞由来の間葉系幹細胞に、本ベクターを用いてヒト第Ⅷ血液凝固因子を分泌させ、免疫不全（NOG）マウスに移植すると、マウス血漿中にヒト第Ⅷ血液凝固因子抗原が検出された。なお、本プロジェクトの開発対象物は、「新規ベクターによる遺伝子改変 ccdPA」であり、「ヒト第Ⅷ血液凝固因子を分泌するヒト間葉系幹細胞」はこれに相当する。以上の成果から、前臨床段階での proof of concept (POC)が立証できた。

**（３）生体イメージング手法を用いて、本 RNA ベクターの導入細胞またはベクター搭載遺伝子が生体内でどのような動態を示すかを非侵襲に評価した。**近赤外蛋白である iRFP の遺伝子を搭載した本ベクターを用いて、*in vivo* 法および *ex vivo* 法による遺伝子導入の効果および有害事象について同一個体を経時的に観察した。iRFP 搭載ベクターをマウスに身体各部に直接投与（*in vivo* 法）した後の蛍光の推移を確認し、投与方法による差異を比較検討したところ、筋肉内注射の効率が良好であった。一方、培養下で iRFP 搭載ベクターを作用させて作成した iRFP 産生細胞を、マウスの身体各部に移植（*ex vivo* 法）して、蛍光の推移を記録した。*in vivo* 法に比較して、*ex vivo* 法において、ベクター機能（近赤外蛍光）の持続が良好であった。*in vivo* 法および *ex vivo* 法のいずれにおいても、ベクターまたは遺伝子導入細胞を投与した局所以外への蛍光拡散はなく、予備的な薬物動態試験における安全性が確認された。

Research outline: Development of gene therapy for Hemophilia A using a novel RNA vector

This project is a co-operative work of the University of Tsukuba, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Eisai Co., Ltd., and CellGenTech Inc. The result includes three points.

- (1) A novel RNA vector can carry genes up to 13.5 kb altogether, and the full length gene of coagulation factor VIII, which is about 7 kb, can be available. (i) We use three gene types of factor VIII, full-length (FL), N6 type, and B-domain deleted (BDD) type, to be transfected into cells in a culture condition. We used both primary cultured *ceiling culture derived proliferating adipocytes* (ccdPA), BHK21 cell line, and 3T3-F442A cell line. We detected an activity of factor VIII in each supernatant of cells transfected with N6 type and BDD, although no activity in FL transfected cell supernatant was found. (ii) Using the novel RNA vector installing with other X genes involved in protein secretion, FL factor VIII was stably expressed at the same level of N6 type or BDD.
- (2) Therapeutic effects have been observed by *ex vivo* gene therapy protocols using the novel vector. (i) 3T3-F442A cells (mouse preadipocytes) were transfected with the mouse factor VIII gene and transplanted to hemophilia A mice. Activity of plasma factor VIII increased after the transplantation. We observed a pharmacological effect by transplantation of mouse factor VIII secreting cells to hemophilia A mice. (ii) Human mesenchymal stem cells (commercial basis, similar to human ccdPA) was transfected with the human factor VIII gene, and then transplanted to immunodeficient mice (NOG mice). Antigen of human factor VIII was detected in mice plasma after the transplantation. We have shown an *in vivo* function of the project product, human factor VIII secreting ccdPA (similar to human mesenchymal stem cells).
- (3) *In vivo* image analysis using the expression of near-infrared (NIR) fluorescent protein (iRFP) clearly demonstrated the distribution of the vector over time. We used a non-invasive bio-imaging method by the RNA vector installed with the iRFP gene, which is a useful longitudinal marker of an expression and dynamic movement of the vector in mice. (i) *In vivo* gene delivery: We injected the vector directly via either a subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, or intrarectum route. After that, the fluorescent emission was detected at only the injected site, independent of each injection route. The cells carrying the vectors were also detected histologically at the same site. (ii) *Ex vivo* gene delivery: We transplanted 3T3-F442A cells or human mesenchymal stem cells in which stably producing iRFP, via either an intramuscular or intraperitoneal route. The fluorescent signal was detected almost permanently in NOG mice at only the transplanted site.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 7 件）

1. Kimihiko Banno, Sayaka Omori, Katsuya Hirata, Nobutoshi Nawa, Natsuki Nakagawa, Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Mahito Nakanishi, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Toshiyuki Yamamoto, Chikara Kokubu, Junji Takeda, Hidetoshi Taniguchi, Hitomi Arahori, Kazuko Wada, Yasuji Kitabatake, Keiichi Ozono. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interactions of Trisomy 21 and GATA1 Mutations on Hematopoietic Abnormalities. *Cell Reports*, 2016, 15, 1228-1241.
2. Kohji Okamura, Hironari Sakaguchi, Rie Sakamoto, Mahito Nakanishi, Ken Nishimura, Mayu Yamazaki-Inoue, Manami Ohtaka, Vaiyapuri Periasamy, Ali Alshatwi, Akon Higuchi, Kazunori Hanaoka, Kazuhiko Nakabayashi, Shuji Takada, Kenichiro Hata, Masashi Toyoda, Akihiro Umezawa. Acceleration of genomic mutation speed in XPA-deficient cells. *Scientific Reports*, 2016, 6, 26342.
3. Ruxandra Dafinica, Jakub Scaber, Nidaa Ababneh, Tatjana Lalic, Gregory Weir, Jane Vowles, Andrew G. L. Douglas, Alexandra Fletcher-Jones, Cathy Browne, Mahito Nakanishi, Martin R. Turner, Richard Wade-Martins, Sally A Cowley, Kevin Talbot. C9orf72 Hexanucleotide Expansions are Associated with Altered ER Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in iPSC-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia *Stem Cells*, 2016, 134, 2063-2078.
4. Alvaro Muñoz-López, Damia Romero-Moya, Cristina Prieto, Verónica Ramos-Mejía, Antonio Agraz-Doblas, Ignacio Varela, Marcus Buschbeck, Anna Palau, Xonia Carvajal-Vergara, Alessandra Giorgetti, Anthony Ford, Majlinda Lako, Isabel Granada, Neus Ruiz-Xivillé, Sandra Rodríguez-Perales, Raul Torres-Ruiz, Ronald W Stam, Jose Luis Fuster, Mario. F. Fraga, Mahito Nakanishi, Gianni Cazzaniga, Michela Bardini, Isabel Cobo, Gustavo F Bayon, Agustín Fernández, Clara Bueno, Pablo Menendez. Development refractoriness of MLL-rearranged human B-cell acute leukemias to reprogramming into pluripotency. *Stem Cell Reports*, 2016, 7, 602-618.
5. Yzumi Yamashita-Sugahara, Masahito Matsumoto, Yutaka Nakachi, Manami Ohtaka, Ken Nishimura, Mahito Nakanishi, Kohnosuke Mitani, Yasushi Okazaki. An inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) promotes late stage terminal differentiation of form NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. *Scientific Reports*, 2016, 6, 35908.
6. Masayuki Sano, Minoru Iijima, Manami Ohtaka, Mahito Nakanishi. Novel Strategy to Control Transgene Expression Mediated by a Sendai Virus-based Vector Using a Nonstructural C Protein and Endogenous MicroRNAs. *PLoS One*, 2016, 11, e0164720.
7. Ken Nishimura, Shiho Aizawa, Fransiska Liliani Nugroho, Emi Shiomitsu, Tran Thi Hai Yen, Bui Phuong Linh, Borisova Dmitrievna Evgeniia, Yuta Sakuragi, Hitomi Takada, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Aya Fukuda, Mahito Nakanishi, Koji Hisatake. A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via CL1 during induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cell Reports*, 2017, 8, 787-801.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 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、口頭およびポスター、須磨崎亮、再生医療プログラム間連携のための情報交換会 (AMED) , 2016/5/30, 国内
2. Development and Application of Stealth RNA Vector、口頭、Mahito Nakanishi、2016 Annual Meeting of Korean Society for Stem Cell Research、 2016/8/18、国外
3. ステルス型 RNA ベクターの開発と応用、口頭、中西真人、第 9 回日本 RNAi 研究会・第 4 回細胞外小胞学会、2016/9/2、国内
4. 安全性の高い純国産遺伝子治療用ベクターの開発、口頭、中西真人、第 7 回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム、2017/1/19、国内
5. ステルス型 RNA ベクターの開発と応用、口頭、中西真人、第 6 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2017/2/28、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当事項なし。

(4) 特許出願

該当事項なし