

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2019B-11

課題名：副腎皮質過形成症患者の線維芽細胞由来ステロイド産生細胞に対する遺伝子治療効果の検討

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・職名 氏名) 生体防御系内科部内分泌代謝科医長 内木 康博

(研究成果の要約) ヒト副腎皮質過形成症患者にリクルートし患者由来の線維芽細胞の初代培養に成功した。これにレンチウイルスベクターを道いてステロイド酵素転写因子遺伝子を導入し、その SF1 発現線維芽細胞を作成した。ただしその後の分化誘導を進めるためにフローサイトメトリーで選別したが十分は細胞数が得られなかった。これに対して線維芽細胞から iPS 細胞を作成しステロイド産生細胞に分化させたところ、*CYP21A2* の発現を認めたことから分化することに成功した。これに対して血清型 9 型アデノウイルス随伴ウイルス (AAV9) ベクターを用いて *CYP11B1* を導入したところ、導入した細胞にのみ発現を確認するとともに培養液のコルチコステロンが測定しえたことから遺伝子導入により欠損酵素の活性を獲得しえたことを証明できた。

1. 研究目的

本研究の目的は副腎皮質過形成症の遺伝子治療モデルの開発である。ヒト副腎皮質過形成症患者の線維芽細胞をステロイド産生細胞に分化させ、これに対して AAV9 ベクターを用いて *CYP11B1* を導入し、発現を確認するとともに 11β 水酸化酵素の酵素活性を測ることで遺伝子治療の効果判定を行う。

2. 研究組織

研究者 所属施設
深見 真紀 国立成育医療研究センター
分子内分泌研究部
阿久津 英憲 国立成育医療研究センター
再生医療センター生殖
医療研究部

3. 研究成果

1) 本年度の研究は、昨年度作成した、11β 水酸化酵素欠損症由来の iPS 細胞をレンチノイン酸含む培養液で培養ののちにレンチウイルスベクターを用いて SF1 遺伝子を導入後 cAMP を含む培養液で培養してステロイ

ド産生細胞に分化誘導した。ステロイド産生細胞への分化は *CYP21A2* 遺伝子の発現を RT-PCR を用いて確認した。

2) ステロイド産生細胞に対して AAV9 ベクターを用いて *CYP11B1* を導入し、定量的 RT-PCR で発現を確認した(図)。

培養液中の DOC からコルチコステロンへの変換を確認した(表)。これによって AAV9 による 11β 水酸化酵素欠損症に対する遺伝子治療の可能性を確認した。

Cells	Cont-iPS	11β-OHD-iPS	11β-OHD-iPS	11β-OHD-iPS
Vector	Lenti-SF1	N.A.	Lenti-SF1	Lenti-SF1 +AAV9-CYP11B1
% of DOC>B	0.01	0.00	0.00	0.75

4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および人を対象とする医学研究に関する倫理指針を遵守して実験を行った。

