

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K10229
研究課題名(和文)リンパ管遺伝子細胞治療によるリンパ浮腫治療法の開発

研究課題名(英文)Gene and Cell Therapy for Lymphedema

研究代表者
齊藤 幸裕 (SAITO, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80540583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用い、肝細胞増殖因子(HGF)を発現させることで効率的にリンパ管内皮細胞へ分化を促進させることを目的に実験を行った。マウスiPS細胞に対してHGFプラスミドを遺伝子導入し、HGF恒常発現細胞株の樹立を試みたが樹立はできなかった。iPS細胞をOP-9細胞を利用してリンパ管内皮細胞へ分化させる実験を行ったが、既報のような細胞培養系を得ることはできなかった。iPS細胞へHGFを一過性に発現させてiPS細胞がリンパ管内皮細胞の特徴を獲得するかを確認したが、継続してリンパ管内皮細胞へ分化させる事はできなかった。以上から、これまでに報告のあるリンパ管内皮細胞への分化は困難であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to induce iPS cells into lymphatic endothelial cells by transfection of hepatocyte growth factor (HGF) plasmid DNA. 1) We could not obtain the mouse iPS cell line of HGF stable expression. 2) We could not establish the lymphatic endothelial cell line from mouse iPS by co-culture method with OP-9. 3) When HGF was expressed in iPS cell transiently, lymphatic cell markers, such as Sox18, FoxC2, VEGFR3, and Prox1, were up-regulated at 5-day after transfection, but these up-regulation were neutralized at 14-day.

研究分野：血管外科

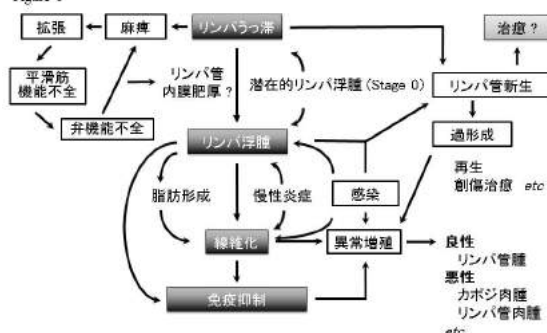
キーワード：リンパ管内皮細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ浮腫の現状

リンパ浮腫は発症原因により原発性と続発性に大別される。いずれの場合でも病態生理は共通しており、リンパ管の先天の欠損、異常(原発性)や癌治療でのリンパ節郭清および放射線治療による閉塞(続発性)によるリンパうっ滞から始まる (Fig.1)。組織にリンパ液が貯留してリンパ浮腫が発症した時点では、すでにリンパ管は変性しており、これを元に戻す治療手段は現在存在しない。現在の中心的治療である複合的理学療法(複合的治療)やリンパ管静脈吻合術では組織の浮腫を改善するのみで根治を望むことは難しい。従ってリンパ浮腫は患者の Quality of life を著しく障害し、多くの患者が革新的な治療法の開発を切望している。

Figure 1



(2) リンパ浮腫に対する分子生物学的アプローチ

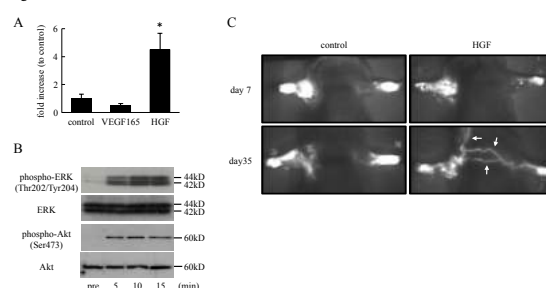
1990年代の血管分子生物学の発展に伴い、リンパ管新生についてもいくつかの報告が認められるようになった。そのような中リンパ管研究を後押しする発見が2000年代になされた。1) リンパ管内皮細胞特異マーカー (LYVE-1, Prox1) などの発見, 2) リンパ管の直視下動態観察が可能な蛍光色素を用いる近赤外光リンパ管描出法の開発, 3) 有用な中、小動物実験モデルの開発である。さらに遺伝子改変動物の解析などからリンパ管新生作用を有するいくつかの分子も報告された。代表的なものは VEGF-C, VEGF-D, FGF-2 である。これらで臨床に応用されたものは存在しない。

(3) 我々のリンパ浮腫遺伝子治療の試み

このような背景から我々はリンパ浮腫の根治を目指し、これまでに血管新生因子として報告がある肝細胞増殖因子(HGF)に注目し、リンパ管新生作用とリンパ浮腫動物モデルでの治療効果を報告した(Y. Saito, et al. Circulation. 2006; Y. Saito, et al. Biomed Res Int. 2013)。具体的には、1) HGF の受容体である c-met がリンパ管内皮細胞に発現している, 2) HGF によりリンパ管内皮細胞の増殖能と遊走能が増加する (Fig. 2A), 3) これらの反応は ERK と Akt のリン酸化により

起こっている (Fig. 2B), 4) ラットリンパ浮腫モデルに HGF 遺伝子を導入すると有意に浮腫が改善し、新生リンパ管が認められた (Fig2C)。

Figure 2



これらの成果を基盤として、現在第 I / II 相試験が進行中である。本試験は原発性リンパ浮腫を対象としており 20 例を登録予定である。患者の登録は順調に進んでおり、2015 年春に終了し、秋には結果が開示される予定である。世界初のリンパ浮腫遺伝子治療薬として成果が期待される (特許 4111993)。

2. 研究の目的

本申請では以下の 2 点を目標に実験を計画する。

- (1) HGF 遺伝子を導入した iPS 細胞を樹立し、リンパ管内皮細胞への分化法を確立する
- (2) リンパ浮腫モデルに遺伝子細胞療法を施行し、治療効果を確認する。

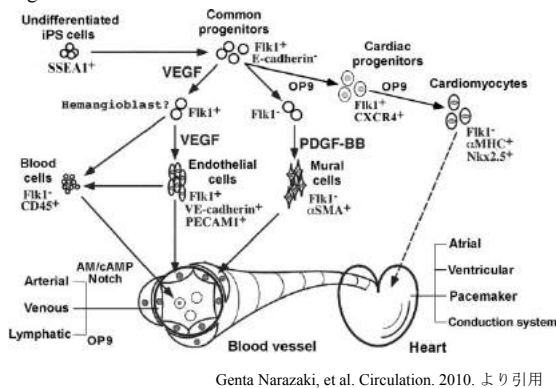
これまでの研究からリンパ浮腫遺伝子治療は高位リンパ管異常や限局的なリンパ管欠損による原発性リンパ浮腫、あるいは外科治療後の続発性リンパ浮腫には十分な効果があると確信している。しかし無形成、広範囲低形成の原発性リンパ浮腫や放射線治療による続発性リンパ浮腫に対しては、効果が限局的であると予測される。これらに対して次の治療法が求められる。

治療抵抗性のリンパ浮腫に共通した病態は、正常リンパ管の広範囲欠損である。従って変位部位に十分な正常リンパ管内皮細胞、さらには集合リンパ管を形成するための平滑筋細胞が供給されれば、この問題を克服できるのではないかと考えた。しかし単純な間葉系幹細胞を利用したリンパ管再生治療の報告を認めるもの (Claudius Conrad, et al. Circulation. 2009)、臨床を目指すには至らず効果が不十分であることが予測される。

そこで我々は HGF 遺伝子治療と iPS による再生治療をハイブリッドにした遺伝子細胞療法を計画する。iPS 細胞からリンパ管内皮細胞へ誘導する方法はすでに iPS 細胞研究所 山下潤先生から報告されており (Fig. 3) 技術的には可能と考える (Genta Narazaki, et al. Circulation. 2008)。

本研究の最終的な目標は遺伝子治療単独療法へ治療抵抗性のリンパ浮腫に対する臨床応用である。その際にはiPS細胞の利用を第一に考えているが、我々は別の研究から脂肪組織内に間葉系幹細胞より多分化能を有する組織幹細胞の分離に成功している (Maki Kabara, et al. Lab Invest. 2014.)。またこの細胞を高率に脂肪組織から分離する表面マーカーの同定もできており (未発表)、iPS細胞よりさらにハードルの低い細胞治療の応用も視野にいられている。

Figure 3



3. 研究の方法

本研究計画の概要を右図に示す (Fig. 4)。研究目的を達成するために本研究では3年間の研究期間で以下の実験を計画する。

- ・iPS細胞を使用したHGF遺伝子発現細胞を樹立し、これをリンパ管内皮細胞へ分化誘導する。

- ・樹立した細胞系をリンパ浮腫モデルに導入し、治療効果を確認するとともに、最適なiPS細胞の分化度、HGF遺伝子を細胞へ導入したほうが良いのか、別に遺伝子導入したほうが良いのか、適切な投与部位はどこかを検討する。

なお本研究に使用するマウスiPS細胞、OP9細胞、マウスES細胞はiPS細胞研究所 山下潤先生より分与いただいております、すでに我々の研究室で保有し、培養している。なお我々は通常マウスiPS細胞の維持にはフィーダー細胞は使用せずLIFを用いている。

(1) HGF恒常発現iPS細胞培養系の樹立

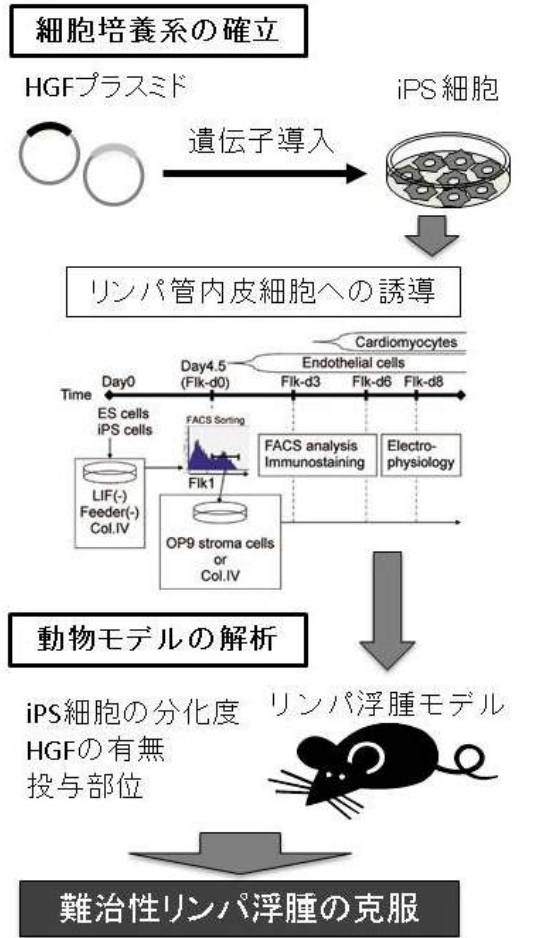
① HGF遺伝子の導入：現在保有しているHGF遺伝子を組み換え、レトロウイルスによりiPS細胞へ導入する (Cell Biolabs, Inc.社 Pantropic Retroviral Expression System)。ネオマイシン耐性を利用しG418 (ナカラ社) でセレクションする。

② 遺伝子発現の確認：樹立した細胞株がiPS機能を損なっていないか確認するために、mRNAを回収しreal time PCRで解析する。項目はNanog, Oct3/4, Flk1, Brachyury, Islet1, Nkx2.5, β-actinを予定している。

(2) リンパ管内皮細胞への分化誘導確認

前述の論文に従い (Genta Narazaki, et al. Circulation. 2010), 樹立したHGF恒常発現iPS細胞および対照iPS細胞でリンパ管内皮

Figure. 4 実験計画の概要



細胞への分化誘導を確認する。概要は以下の手順である。

- ① コラーゲンIVコート培養皿に細胞を播種し、分化培地 (α-MEM, 10%FBS, 5 x 10⁻⁵mol/L 2-mercaptoethanol) で培養する。
- ② 4.5日目にFACSでFlk-1陽性細胞を分離する
- ③ 分離したFlk-1陽性細胞をさらにOP-9をフィーダーにした培養皿で培養する。
- ④ 再培養3日目にリンパ管内皮細胞へ誘導される。

細胞がリンパ管内皮細胞へ誘導されたかはVEGFR-3陽性細胞をFACSで解析することで確認する。さらにCD31, LYVE-1, Prox1, VE-cadの免疫染色も施行する。

4. 研究成果

(1) HGF恒常発現iPS細胞培養系の樹立

使用細胞：マウスiPS細胞
遺伝子導入方法：リポフェクション法およびエレクトロポレーション法

① 予備実験

導入遺伝子：EGFP遺伝子
結果：ごくわずかの細胞 (5%以下) に蛍光を認めたが、ほとんどの細胞は蛍光を発していなかった。

② HGF恒常発現

導入遺伝子：HGFプラスミド

結果：細胞培養上清及び細胞抽出液のHGF タンパク濃度をELISA法で測定したが検出限界以下であった。また細胞よりcDNAを作成し、real time PCR法で測定したが、一定した有意な結果を得ることはできなかった。

以上の結果より、遺伝子導入によりHGF恒常発現のiPS細胞株を樹立することは困難と判断し、次の実験へ移行した。

(2) iPS細胞をリンパ管内皮細胞へ分化

既報の方法(G Narazaki, J.K. Yamashita, et al. Circulation. 2008)によりマウスiPS細胞をリンパ管内皮細胞へ分化誘導することを試みた。使用したOP-9細胞は同論文の山下ラボより分与いただいたものを使用した。しかし既報のようなリンパ管内皮細胞へ効率的に誘導することはできず、MACSでLIVE-1を表面マーカーとして精製を試みたが、培養細胞を得ることはできなかった。

(3) 一過性発現の検討

iPS細胞にHGF遺伝子を導入し、導入後5日目の細胞よりcDNAを作成しreal time PCRで検討したところ、Sox18、FoxC2、VEGFR3、Prox1といったリンパ管内皮細胞特異マーカーの上昇を認めたが、統計学的有意差を得るには至らなかった。同様に誘導後14日目の細胞を検討したが、リンパ管内皮細胞特異マーカーの上昇は認めなかった。以上より、この方法による分化誘導は一過性の反応であり、真にリンパ管内皮細胞へ誘導されたかは判断できないと考えた。

以上の結果から、これまでに報告のあるiPS細胞でのリンパ管内皮細胞への分化は困難であると考えられ、抜本的な方法論の見直しが必要との結論に至った。この結果を踏まえ、未分化細胞からの分化ではなく、分化した静脈内皮細胞を直接リンパ管内皮細胞へリプログラミングする可能性を検討することとした。

ここまでで多くの研究期間を要したため、さらなる検討は今後の課題とすることとした。

<引用文献>

- ① Saito Y, Nakagami H, Morishita R, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. Circulation. 2006 Sep 12;114(11):1177-84.
- ② Conrad C, Niess H, Huss R, Huber S, von Luetlichau I, Nelson PJ, Ott HC, Jauch KW, Bruns CJ. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. Circulation. 2009 Jan 20;119(2):281-9.

- ③ Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation. 2008 Jul 29;118(5):498-506.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 幸裕 (SAITO, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80540583