

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08370

研究課題名(和文) 血液凝固第VIII因子産生細胞の起源解明による新たな血友病治療への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the origin of blood coagulation factor VIII-producing cells for the development of new hemophilia treatment

研究代表者

大森 司 (Ohmori, Tsukasa)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70382843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではFVIII産生細胞がEGFP発現細胞として観察できるノックインマウスを用いてFVIII産生細胞の同定を試みた。FVIII産生細胞は肝類洞のみに認められた。FVIII産生細胞はCD146、CD31、Lyve1というリンパ管内皮細胞の特徴をもつが、一方で血小板マーカーであるClec-2を発現した。胎仔肝では胎生12.5日よりFVIII産生細胞を認め、発生とともに発現が増加し、出生時には成マウスと同程度となった。FVIIIコンディショナル欠損マウスはLyve1-Creマウスとの交配によりFVIIIが低下した。さらにAAVベクターで効率よくFVIII産生細胞にレポーター遺伝子を発現できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでFVIIIの産生細胞について一貫した報告はなかった。本研究でFVIIIは臓器の中でも肝臓のみに発現し、かつ類洞内皮細胞の一部がFVIII産生を担っていることを明らかとした。さらに、FVIII産生細胞はリンパ管内皮細胞と同様の性質を有するが、特徴的な表面マーカーとして血小板に存在するClec-2を同定した。さらに、FVIII産生細胞の分化過程を明らかにし、発現が上昇する分子からFVIII産生細胞に遺伝子導入が可能なプロモーター領域を見出した。これらの研究成果は、FVIIIが遺伝的に欠損する血友病Aに対する新たな遺伝子治療、細胞治療に結びつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Since coagulation factors are produced by hepatocytes, the coagulation factors in blood are decreased in cirrhosis. However, blood coagulation factor VIII (FVIII) is rather elevated. Here, we attempted to identify FVIII-producing cells by using knock-in mice in which FVIII-producing cells were observed as EGFP-expressing cells. EGFP-expressing FVIII-producing cells were found only in hepatic sinusoids. FVIII-producing cells had characteristics of lymphatic endothelial cells, including CD146, CD31, and Lyve1, but also expressed the platelet marker Clec-2. FVIII-producing cells in the fetal liver were observed from E12.5 and increased with development to the same level as in adult mice at birth. FVIII-conditional deficient mice showed reduced FVIII levels when crossed with Lyve1-Cre mice. Finally, the AAV vector could efficiently express the reporter gene in FVIII-producing cells.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血液凝固第VIII因子 血友病A 再生医療 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

凝固因子は肝臓で産生される。肝硬変では多くの凝固因子産生が低下するが、唯一、血液凝固第VIII因子 (FVIII) は低下しない。そのため、FVIIIは肝臓実質細胞以外の細胞から産生されていると考えられ、その部位や細胞種について多くの報告・議論がされてきた。現在では、類洞内皮細胞、肺内皮細胞、リンパ管内皮細胞、骨髄細胞や間葉系幹細胞がFVIIIの産生部位の候補として報告されている。しかし、実際のFVIII産生細胞の臓器や細胞学的特性、各臓器におけるFVIIIタンパク質の発現も明らかではなかった。事実、多くの組織でmRNAレベルではFVIIIの発現を認める。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FVIII産生細胞の細胞生物学的な特徴、特に発生からFVIII産生細胞分化を決定する因子・その起源や特異的マーカーを同定することである。さらに同定した分化促進因子 (転写因子)・特異的発現タンパク質の特性から、FVIII産生細胞への *in vivo* 遺伝子導入を効率化する手法を開発する。

3. 研究の方法

- (1) FVIII産生細胞の同定：FVIII-ノックインマウスを用いてFVIII産生細胞 (EGFP陽性細胞) の産生臓器、表面マーカー、その時期を免疫染色やフローサイトメーターを用いて検出した。
- (2) FVIII産生細胞の特性解析：発生過程におけるFVIII産生細胞のmRNA発現をマイクロアレイ解析により検討した。
- (3) FVIII産生細胞への高効率な *in vivo* 遺伝子導入：CAGプロモーターの下流でtdTomatoを発現するAAVベクターに組み込み静脈投与し、*in vivo*でFVIII産生細胞に遺伝子導入が可能かを検証した。
- (4) FVIII-ノックインマウスES細胞の樹立：FVIII-ノックインマウスの受精卵からES細胞を樹立した。

4. 研究成果

(1) FVIII ノックインマウスの作製

我々が作製したFVIII-ノックインマウス (KIマウス) はCre発現によって、FVIII産生細胞がEGFPを発現する (図1)。CAG-Creマウスとの交配を行い血中FVIII活性が1%未満であることを確認した。この遺伝子改変マウスを用いて、FVIII産生細胞を同定、解析を行った。

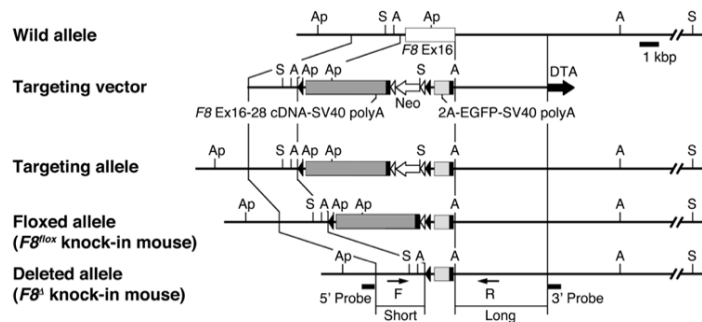


図1 ノックインマウスの概略

(2) FVIII産生細胞の同定

CAG-Creマウスと交配したKIマウスを用いて、FVIII産生細胞をEGFP陽性細胞として同定した。各臓器の細胞を回収しフローサイトメトリーで検証すると、EGFPが発現するCD31陽性内皮細胞は肝臓のみに認め、その他の肺、腎、脾、小腸、リンパ節、骨髄にはEGFP発現を認めなかった。さらに肝臓でのEGFP発現細胞の特徴を検討した。肝臓細胞をCD31とCD146で展開すると、CD31およびCD146が高発現している細胞にのみEGFP発現を認めた。EGFP陽性細胞はリンパ管内皮細胞のマーカーであるLyve1を発現するが、podoplaninは陰性であり、かつ血小板マーカーであるCLEC-2を発現することが明らかになった (図2)。

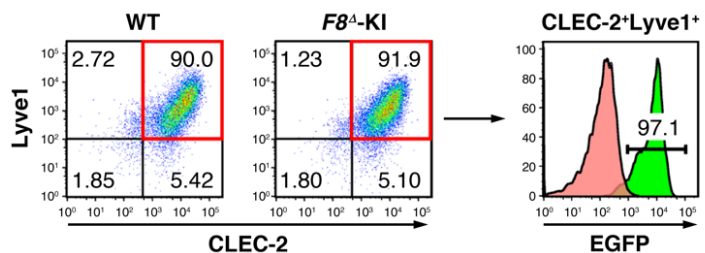


図2 FVIII産生細胞の表面マーカー

(3) FVIII産生細胞の局在

次に免疫染色によってFVIII産生細胞の局在を検証した。EGFP陽性のFVIII産生細胞は肝組織において、CD146、Lyve1、VWF、Clec-2陽性の内皮細胞であり、この内皮細胞は類洞にのみ局在し、中心静脈には存在しなかった(図3)。一方、VWFは中心静脈内皮細胞にも同定できた。

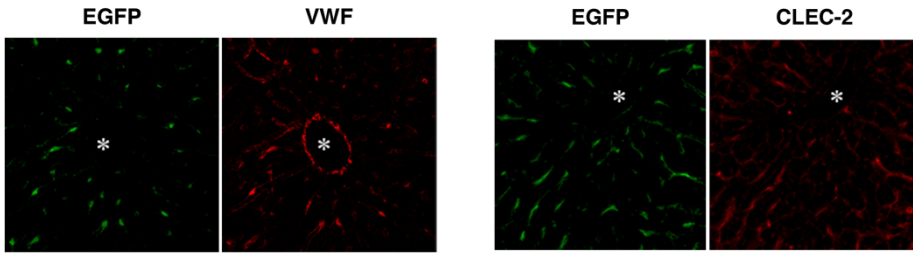


図3 FVIII産生細胞の局在  
\*中心静脈

(4) 発生過程でのFVIII産生細胞の分化

さらに発生におけるFVIII産生細胞の動態を観察した。胎生10.5日の肝臓にはEGFPはEGFP発現を認めなかった(データ未提示)。その後、CD31、CE146、Lyve1陽性細胞におけるEGFPの発現は徐々に上昇し、胎生12.5日には5%程度、14.5日には80%、生後には90%以上に達した(図4)。さらに、胎生12.5日と17.5日の胎仔肝を用いてマイクロアレイ解析を行った(図5)。45,037のプローブの中で2倍以上変化が認められた遺伝子群を、7.0~8.0%(上昇、低下)に認めた。特にCD34発現の低下やFcgr2b、F8の発現上昇を確認した。さらにClec-2を含む複数のClec属の発現上昇を認めた(図6)。

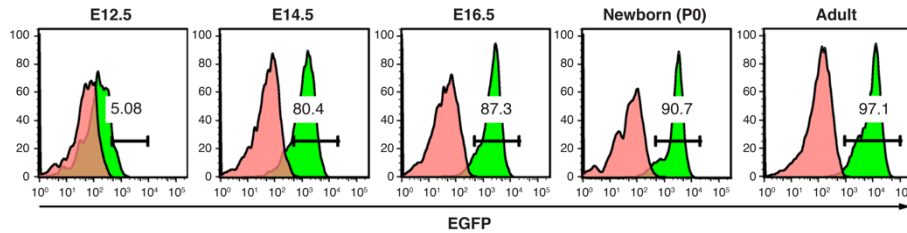


図4 胎生期肝臓におけるFVIIの発現

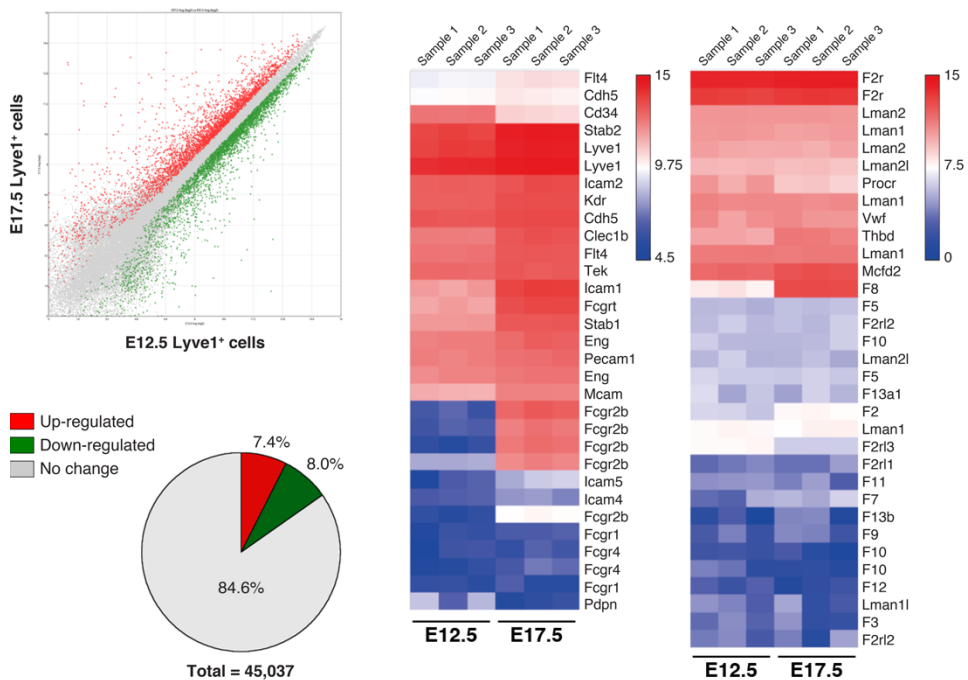


図5 胎生12.5日と17.5日のLyve1陽性肝臓細胞の遺伝子プロファイルの比較(1)

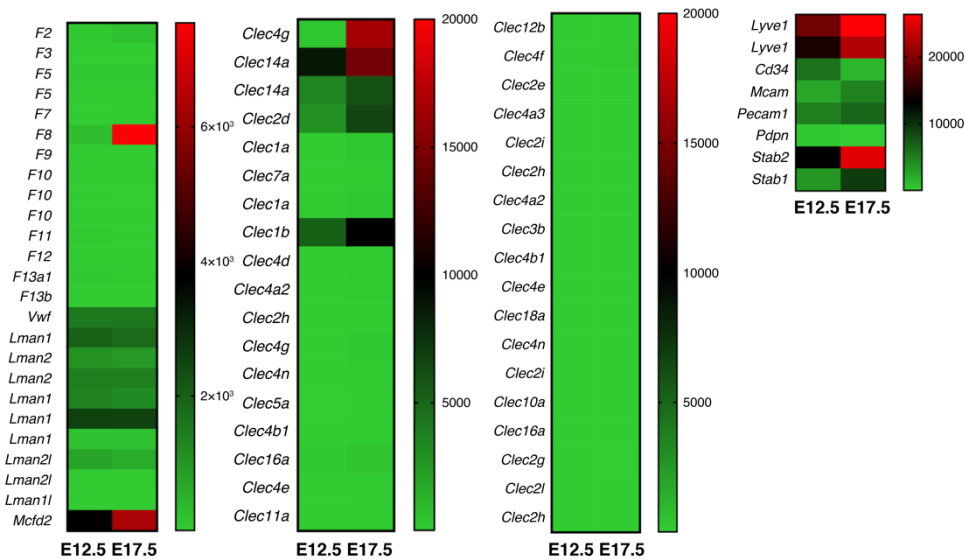


図5 胎生12.5日と17.5日のLyve1陽性肝臓細胞の遺伝子プロファイルの比較(2)

- (5) コンディショナルノックアウトマウス  
次にF8コンディショナルノックアウトマウスを複数のCreマウスとの交配によって血中FVIIIが低下するかどうかを検証した(図7)。肝実質細胞でCreを発現するAlb-Creマウスとの交配では血中FVIIIは低下せず、内皮細胞でのCre発現であるTie2-Cre、またリンパ管内皮細胞や類洞内皮細胞でCreを発現するLyve1-Creマウスとの交配により血中FVIIIが低下した。

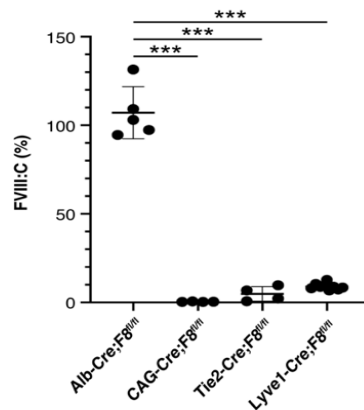


図7 コンディショナルノックアウトマウスの血中FVIII活性

- (6) FVIII産生細胞への遺伝子導入  
上記の結果を踏まえてFVIII産生細胞である類洞内皮細胞へ遺伝子導入を試みた。CAGプロモーターの下流にTdTomatoを発現するAAVベクター(血清型X)を作製し、野生型マウスに静脈投与した。ベクター投与後に類洞内皮細胞に効率的なTdTomatoの発現を認めた(図8)。さらに、マイクロアレイ解析から同定した発現因子プロモーター領域(Y、Z)を同定し類洞内皮細胞で遺伝子発現が可能であること、また複数のエンハンサー領域の中から同プロモーター活性が上昇する領域を同定した。

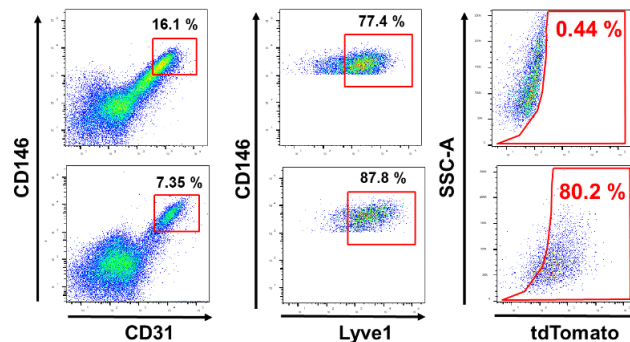


図8 AAVベクターを用いたFVIII産生細胞へのTdTomato発現  
上段: コントロール、下段: TdTomato発現AAVベクター

- (7) ES細胞の樹立  
ノックインマウスからES細胞を樹立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Reiss Ulrike M., Zhang Lei, Ohmori Tsukasa	4. 巻 27
2. 論文標題 Hemophilia gene therapy?New country initiatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haemophilia	6. 最初と最後の頁 132 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hae.14080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito H, Hayakawa M, Kamoshita N, Yasumoto A, Suzuki-Inoue K, Yatomi Y, Ohmori T	4. 巻 111
2. 論文標題 Establishment of a megakaryoblastic cell line for conventional assessment of platelet calcium signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 786-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02853-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohto-Ozaki H, Hayakawa M, Kamoshita N, Maruyama T, Tominaga S-I, Ohmori T	4. 巻 204
2. 論文標題 Induction of I B augments cytokine and chemokine production by IL-33 in mast cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 2033-2042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900315.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watano R, Ohmori T, Hishikawa S, Sakata A, and Mizukami H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Utility of microminipigs for evaluating liver-mediated gene expression in the presence of neutralizing antibody against vector capsid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 427-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41434-020-0125-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohmori T	4. 巻 111
2. 論文標題 Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 31~41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2513-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohmori Tsukasa, Mizukami Hiroaki, Katakai Yuko, Kawai Sho, Nakamura Hitoyasu, Inoue Makoto, Shu Tsugumine, Sugimoto Hideharu, Sakata Yoichi	4. 巻 108
2. 論文標題 Safety of intra-articular transplantation of lentivirally transduced mesenchymal stromal cells for haemophilic arthropathy in a non-human primate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2465-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大森 司	4. 巻 59
2. 論文標題 血友病遺伝子治療開発の現状と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 2238 ~ 2246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.2238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大森 司	4. 巻 29
2. 論文標題 血友病の遺伝子治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 760 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.29.760	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大森司	4. 巻 28
2. 論文標題 特集 ゲノム編集技術の基礎と応用 5.ゲノム編集とウイルスベクター	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 血液フロンティア	6. 最初と最後の頁 1053 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20837/52018071053	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクターをも用いた血友病に対する遺伝子治療
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病に対する遺伝子治療の現状
3. 学会等名 第15回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 いちから学ぶ出血傾向
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病の病態解明と治療への応用
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森 司, 水上 浩明, 片貝 祐子, 川合 創, 中村 仁康, 井上 誠, 朱 亜峰, 杉本 英治, 坂田 洋一
2. 発表標題 カニクイザルを用いた血友病性関節症に対する凝固因子発現間葉系幹細胞の安全性評価
3. 学会等名 第41回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohmori, T., Mizukami, H., Hishikawa, S., Nakamura, H., Katakai, Y., Muramatsu, S., Ozawa, K., and Sakata, Y.
2. 発表標題 Adeno-associated virus vector based on serotype 3 represents an alternative serotype for hemophilia gene therapy
3. 学会等名 Congress The International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病に対する遺伝子治療とゲノム編集治療
3. 学会等名 BioJapan2019（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病に対する遺伝子治療とゲノム編集治療の進歩
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 ゲノム編集技術による疾患治療戦略
3. 学会等名 日本小児神経学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病に対するin vivoゲノム編集治療
3. 学会等名 第3回日本ゲノム編集学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukasa Ohmori
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing for Hemophilia B by AAV vector
3. 学会等名 The 10th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 Development of Genome editing treatment for Hemophilia
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病に対する遺伝子治療の展望
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 ゲノム編集による血友病治療の試み
3. 学会等名 創薬薬理フォーラム第26回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 司
2. 発表標題 血友病遺伝子治療の現状と展望
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 平井 宏和、日置 寛之、小林 和人	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 285
3. 書名 決定版 ウイルスベクターによる遺伝子導入実験ガイド	

1. 著者名 大森 司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 660
3. 書名 EBM血液疾患の治療2021-2022	

1. 著者名 大森 司	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 390
3. 書名 血液疾患最新の治療2020-2022	

1. 著者名 大森 司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 9
3. 書名 臨床に直結する血栓止血学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	早川 盛禎  (Hayakawa Morisada)  (30326847)	自治医科大学・医学部・講師    (32202)	
研究分担者	長尾 恭光  (Nagao Yasumitsu)  (80303874)	自治医科大学・医学部・准教授    (32202)	
研究分担者	鴨下 信彦  (Kamoshita Nobuhiko)  (90302603)	自治医科大学・医学部・講師    (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関