

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08833

研究課題名(和文) 次世代再生医療ダイレクト・リプログラミングによる新規リンパ管再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel lymphatic regeneration therapy by direct reprogramming

研究代表者

齊藤 幸裕 (SAITO, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：80540583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイレクト・リプログラミング(D-reP)技術を利用した、静脈をリンパ管へと誘導するリンパ浮腫新規治療法の開発研究である。先行研究の結果からD-reP因子としてProx1とVEGFR-3が候補となった。伏在静脈内皮細胞(HSaVEC)、にProx-1、VEGFR-3プラスミドを遺伝子導入したところ、これらの発現上昇は確認されたがリンパ管マーカーの発現に変化はなくHSaVECをLECへと誘導することはできなかった。追加因子を探索した。網羅的解析の結果、130の追加候補を同定した。今後は候補からD-reP因子を特定する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫は根治療法が存在しない難治性疾患で、新たな治療法の開発が切望されている。先端医療(遺伝子治療、再生医療)としていくつかの治験が進行中であるが臨床へたどり着いたものはない。他疾患も含めD-reP技術を用いた再生医療の臨床報告例はない。今回の我々の試みは次世代再生医療技術開発、リンパ浮腫治療法開発のいずれにおいても、新規性、知財面において有望な開発と考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study is a research project to develop a new lymphedema treatment method using direct reprogramming (D-reP) technology to direct veins to lymphatic vessels. Based on the results of previous studies, Prox1 and VEGFR-3 were candidates as D-reP factors. Gene transfer of Prox-1 and VEGFR-3 plasmids into saphenous vein endothelial cells (HSaVECs) showed increased expression of these factors, but no change in expression of lymphatic markers, and HSaVECs could not be induced to become LECs. Additional factors were explored. Exhaustive analysis identified 130 additional candidates. Future work will identify D-reP factors from the candidates.

研究分野：脈管学

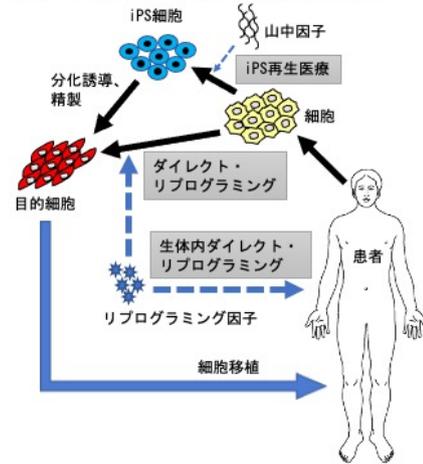
キーワード：リンパ管 静脈 ダイレクト・リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

(1) 次世代再生医療としてのダイレクト・リプログラミング技術

iPS 細胞の登場は世界に衝撃を与え、早期の臨床応用が期待されたが、未だ多くの障壁が残っている。文科省をはじめ多くの機関より次世代再生医療技術の開発が言及される中、ダイレクト・リプログラミング (D-reP) 技術は有力な候補である。これまでに D-reP で線維芽細胞から骨格筋細胞 (Davis RL, et al. Cell 1987; 51 (6):987-1000)、心筋細胞 (Ieda M, et al. Cell 2010;142(3):375-386) などの誘導に成功した報告がある。患者から得られた細胞に ex vivo で D-reP する方法もあるが、D-reP 因子を直接患者体内に導入する生体内 D-reP が臨床応用の上では簡便で開発の障壁が少ない (Fig. 1)。

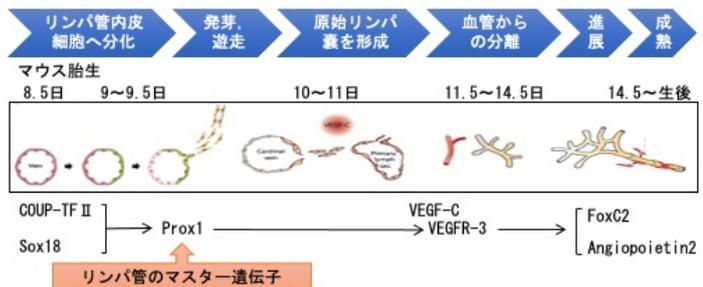
Fig.1 ダイレクト・リプログラミングの概要



(2) リンパ管の発生とリンパ浮腫

リンパ管は胎生期の静脈壁から分化し発生することが知られている (Sabin FR. Am J Anat, 1902)。リンパ管のマスター遺伝子と認識されている Prox1 や VEGFR-3 の遺伝子発現が発生、分化に重要であることが明らかになっている (Fig. 2)。リンパ浮腫は進行性の難治性疾患で死には至らないものの醜形と身体活動の制限から QOL を著しく低下させる。しかし根治的な治療手段は現在存在しない。そこで我々は肝細胞増殖因子 (HGF) のリンパ管新生による遺伝子治療法を開発し (Y Saito, et al. Circulation 2006: Biomed Res Int. 2013)、第 I/II 相試験を実施した。本治療法は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)。しかし単純な増殖因子の投与のみではリンパ管が決定的に不足している病態に対して効果は限定的であり、リンパ管増殖の起源となりうる有効な再生医療の手法が、次世代治療法の開発において必要である。

Fig.2 リンパ管の発生



(3) 先行研究の結果

我々は先行研究においてスクリーニングの結果から D-reP 因子として Prox1 と VEGFR-3 が候補となることを見出した。これら因子によって静脈からリンパ管へと D-reP が可能であるのか、それは臨床応用を目指したときに必要かつ十分であるのか、不足があるとすれば何を追加しなければいけないのか、また生体内 D-reP の効果的なアプローチ法は何か、が次のステップ (臨床応用) を見据えた課題である。

2. 研究の目的

本研究では先行研究を引き上げ臨床へ近づけるため、正常血管内皮細胞や静脈がリンパ管構造に D-reP されることを確認する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養系

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト伏在静脈内皮細胞 (HSaVEC) およびヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC) の 3 細胞培養系 (タカラバイオ社) を使用した。細胞はそれぞれ Endothelial Cell Growth Medium 2 (HUVEC および HSaVEC)、Endothelial Cell Growth Medium MV 2 (HDLEC) を使用して培養し 6~8 継代で実験に使用した。培養はインキュベーターを使用し 37°C、5%CO₂、100%湿度とした。

細胞への遺伝子導入は Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) を使用した。導入 2 時間後に培地交換し、その後は回収まで 1 日、3 日、5 日間それぞれ培養した。

(2) real time PCR

細胞は 100mm Dish に 100%コンフルエントとなるまで培養し、トリプシン処理でペレットとした。細胞ペレットより mRNA を抽出 (QIAGEN 社 RNeasy Plus Mini Kit 使用) し cDNA 化 (Roche 社 Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit 使用) した。各遺伝子発現は TaqMan Probe 法により qPCR (Roche 社 LightCycler96 システム使用) で評価した。GAPDH を内在性コントロールとして使用した。使用したプローブは以下の通りである; GAPDH、Ets-1、Ets-2、Prox1、VEGFR-3、ANGPT2、LYVE-1 (以上 ThermoFisher SCIENTIFIC 社)、HGF、Met、Sox18、FoxC2、VEGF-A、VEGF-C、TGF- β 1 (以上 Roche 社)。

(3) 過剰発現ベクターの作成

Prox1 および VEGFR-3 の過剰発現ベクターを作成した。Prox1 遺伝子と VEGFR-3 遺伝子は以下の PCR プライマーを使用し、HDLEC の cDNA をテンプレートとして PCR により増幅 (タカラバイオ社 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 使用)、回収 (QIAGEN 社 QIAquick Gel Extraction Kit 使用) した。Prox1; 5' -TATGAATTCGTGATGCCTGACCATGAC、GAGCTGCTTCATGAGTAGAAATCTAGAATA-3'、VEGFR-3; 5' -ATAAAGCTTCGGCCGAGATGCAG、GGACAAGAGGAGCATGAAAGTCTAGATAT-3'。PCR 産物および pcDNA3.1+ (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) を制限酵素 EcoR I あるいは HindIII、および Xba I (すべてタカラバイオ社) で処理した後、ライゲーション (タカラバイオ社 DNA Ligation Kit <Mighty Mix>使用) し過剰発現ベクターを作成した。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

網羅的遺伝子解析にはマイクロアレイによる解析を実施した。アレイは Affymetrix 社 Clariom D を使用した。各細胞より total RNA を抽出 (QIAGEN 社 RNeasy Plus Mini Kit 使用) し解析に使用した。

(5) 統計解析

すべての結果は ANOVA により統計解析した。Tukey's multiple comparisons test により比較した。P<0.05 を統計学有意とした。解析には GraphPad Prism Version9 を使用した。

4. 研究成果

(1) リンパ管マーカーの探索

D-reP が誘導できたかを確認するためのマーカーが必要となる。そこで LEC と誘導のターゲットとなる成熟した静脈として HSAVEC、また LEC に近い未成熟な静脈として HUVEC の 3 細胞培養系を用いて探索した。これまでに血管、リンパ管のマーカーとして報告のある以下の 13 遺伝子について発現を real time PCR で確認した; Prox1、HGF、Met、LYVE-1、Ets-1、Ets-2、VEGF-A、Sox18、VEGFR-3、TGF- β 1、FoxC2、ANGPT2、VEGF-C。これらで常に LEC で HSAVEC と HUVEC の両方より有意に高発現していたのは Prox1、VEGFR-3、ANGPT2、LYVE-1 の 4 遺伝子であった (Fig. 3)。Prox-1 と VEGFR-3 は D-reP 因子として利用するため、ANGPT2 と LYVE-1 の 2 つをマーカーとして利用することとした。

(2) 候補 D-reP 因子発現の確認

候補 D-reP 因子が HSAVEC において十分に遺伝子発現するかを確認した。HSAVEC に Prox-1 プラスミドを導入した群、VEGFR-3 プラスミドを導入した群、Prox-1 と VEGFR-3 プラスミドを共導入した群、コントロールとして GFP プラスミドを導入した群の 4 群で検討した。導入 1 日目、3 日目、5 日目の 3 時点で検討した。Prox-1 と VEGFR-3 の発現は real time PCR で確認した。GFP 導入群に比較して D-reP 因子候補遺伝子を導入した群において 5 日目まで有意に高発現していることを確認した (Fig. 4)。

(3) D-reP 誘導の確認

次に同様の各群において HSAVEC がリンパ管内皮細胞化したのかをマーカーである ANGPT2 と LYVE-1 の遺伝子発現で確認した。候補 D-reP 因子を遺伝子導入したすべての群、時点で ANGPT2 と LYVE-1 の発現に有意な変化はなく HSAVEC を LEC へと誘導することはできなかった。

Fig. 3 各内皮細胞の遺伝子発現

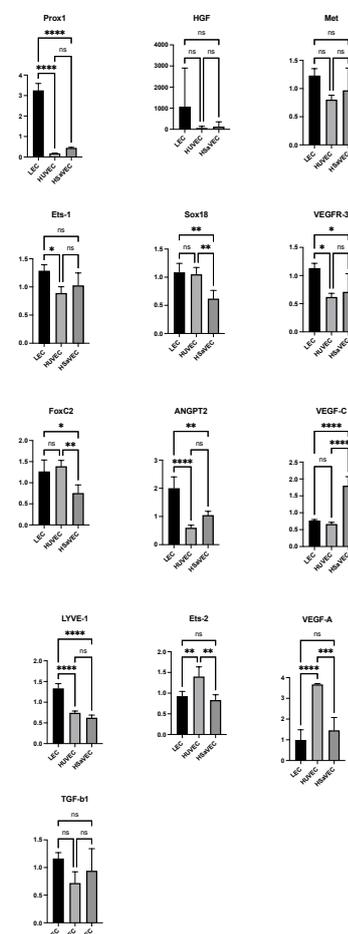


Fig. 4 Prox1、VEGFR-3プラスミドの導入

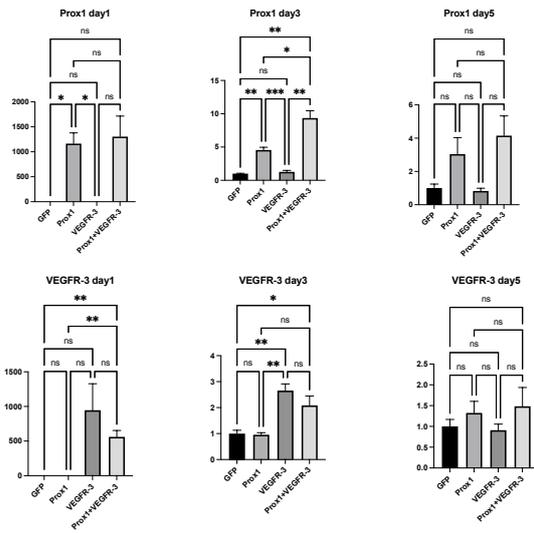
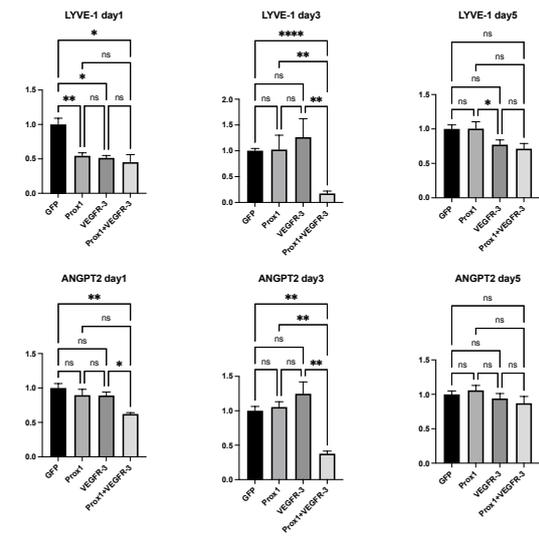


Fig. 5 HsAVECのLEC化

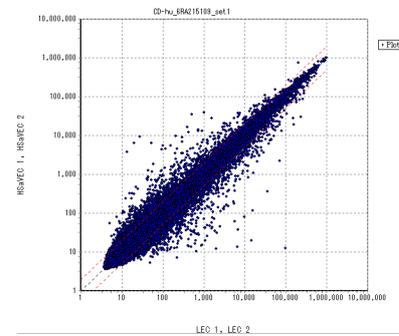


(4) 網羅的遺伝子発現解析

Prox-1、VEGFR-3 の 2 つの遺伝子導入のみで D-reP することは困難と考え追加因子を探索した。miRNA も含め検索可能な Affymetrix 社の Clariom D を使用し、マイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を実施した。解析の結果、HsAVEC と比べ LEC で 10 倍の発現を認めたものは 82 配列、0.1 倍の発現を認めたものは 48 配列、合計 130 配列であった (Fig. 6)。

今後、これらの追加候補因子より有効な因子を絞り込んでいく。

Fig. 6 マイクロアレイによる網羅的解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤 幸裕
2. 発表標題 原発性リンパ浮腫の現況とこれから
3. 学会等名 第5回日本リンパ浮腫治療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤 幸裕
2. 発表標題 リンパ浮腫の先進的治療法開発 –世界の現況と我々の取り組み
3. 学会等名 第6回日本リンパ浮腫治療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------