

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591559

研究課題名(和文)凝固第Ⅷ因子抗体に対する自己血管内皮前駆細胞移植による新規免疫寛容導入療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of immune tolerance induction therapy for FVIII inhibitors by subcutaneous implantation of blood outgrowth endothelial cells

研究代表者

松井 英人 (MATSUI, HIDETO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00571027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：血友病Aマウスにイヌ第Ⅷ因子(cFVIII)を静注し、抗イヌ第Ⅷ抗体(インヒビター)の発生を誘導した。cFVIIIを発現しているマウス血管内皮前駆細胞(BOECs)をcFVIIIインヒビター陽性血友病Aマウスへ皮下移植し、cFVIIIに対する免疫寛容導入成立の可否を検討した。結果、すべてのインヒビター陽性マウスでインヒビター力価の低下を認め、免疫寛容の成立には制御性T細胞の関与が示唆された。自己細胞移植による血友病インヒビター患者への免疫寛容導入療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The levels of FVIII inhibitors began to decline within 6 weeks after subcutaneous BOECs implantation and finally, the inhibitor levels had declined less than 5 BUs after the multiple implantations of transduced BOECs. The significant numbers of CD4+ CD25+ Foxp3 regulatory T cells were detected in spleen and draining lymph nodes of these partially tolerized mice and these suppressive effects against cFVIII could be adoptively transferred to naïve hemophilia recipient mice. We show that FVIII releasing subcutaneous depots play an important role of immunomodulatory effects that have a potential to reduce the levels of anti-FVIII inhibitor titers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血友病 インヒビター 細胞移植 免疫寛容 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

現在我が国において血友病患者の多くは、安全な血液凝固因子の定期補充療法が可能となり、関節内出血や筋肉内出血などの重篤な出血症状を認めることは少なくなった。しかしいまだに、製剤の反復投与が原因で約25%の血友病 A 患者に凝固因子(F)に対する同種抗体(インヒビター)の発生が認められる。インヒビターが発生した血友病 A 患者は、補充療法が無効となり止血管理が極めて難しくなる。これまでに、インヒビター消失を目指した免疫寛容導入療法が試みられ一定の成績が報告されているが、副作用や莫大な医療費の問題があり、新たな方法の開発が待たれている。一方、遺伝子治療/細胞療法の研究分野においてはめざましい技術的な進歩により、ウイルスベクターなどを用いて外来遺伝子を強制的に導入する方法で F の持続的発現が可能となった。我々はすでにカナダクイーンズ大学との共同研究で、*ex vivo*で F 遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞(Blood Outgrowth Endothelial Progenitor Cells:BOECs)による細胞移植を血友病 A マウスモデルで確立し、移植に伴う免疫応答の回避に成功している。(Matsui H, et.al. Stem Cells 25:2660-2669, 2007)。

2. 研究の目的

本研究は、従来のような F の頻回静脈投与が必要であった方法を回避し、臨床応用時に血友病患者への負担が軽減できるより安全かつ効果的な自己血管内皮前駆細胞移植による新規免疫寛容導入療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

従来の F 補充療法による免疫寛容導入療法に代えて細胞移植による新規免疫寛容導入療法を確立するには、循環血液中で F 活性を長期間維持するための運搬役:ペヒクル細胞が必要となる。F は血漿中では von Willebrand 因子(VWF)と複合体を形成することで、プロテアーゼなどによる分解から保護されている。我々は、VWF を内在発現している血管内皮前駆細胞である BOECs において F を強制発現させる手法を選択した。また BOECs は末梢血から簡便かつ再現性よく単離することができる利点がある。本研究では血友病 A マウスの末梢血より BOECs を単離培養した後、ウイルスベクター等で F 遺伝子を *ex vivo*で導入し、インヒビター陽性血友病 A マウスへ皮下移植し効果を検討する。マウスモデルでの有効性が確認された後、我々の施設のアドバンテージ(我が国で唯一の血友病 A 犬コロニーを保有)を生かし、実際によりヒトに近いと考えられる犬モデルを使った動物実験でその有効性の確認を行いたいと考えている。

4. 研究成果

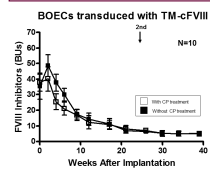
抗イヌ FVIII インヒビター陽性血友病 A マウスモデルの作製

6-8 週令の血友病 A マウスへイヌ FVIII(80U/Kg)を週 1 回 4 週間連続投与することで 21.1-40.9BU の抗 FVIII インヒビターを誘導した。

イヌ FVIII 発現血管内皮前駆細胞(BOECs)の移植による免疫寛容導入

イヌ FVIII 発現 BOECs を皮下移植すると、全てのマウスで移植後 6 週頃からインヒビター力価の低下を認めた。またサイクロフォスマイドを使用しないマウス群では細胞移植初期にインヒビター力価の上昇を認めたが、約 10 週頃には同様のインヒビター力価になり推移した。

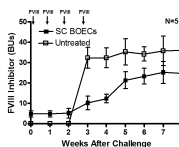
細胞移植によるインヒビター力価の推移



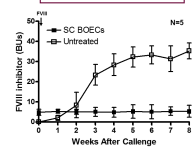
FVIII の再投与試験

インヒビター力価の低下のメカニズムを明らかにするための静脈投与群と皮下投与群にわけて行った。静脈投与群(左)は、通常 FVIII を 4 回投与するとインヒビターの発生を認めた。しかし BOECs 移植群では、有意にインヒビター力価の上昇は抑制された。FVIII 皮下投与群(右)はコントロール群で投与 2 週間後からインヒビターの発生を認めた。しかし BOECs 移植群ではインヒビター力価の上昇を認められなかった。その結果 BOECs 皮下移植でイヌ FVIII に対する免疫寛容が誘導されている可能性が示唆された。以下は免疫寛容が成立していると思われるマウス群のみで検討した。

静脈チャレンジ群

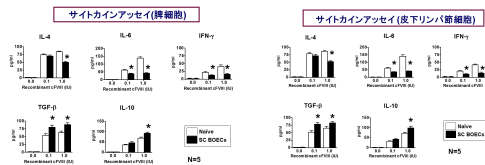


皮下チャレンジ群



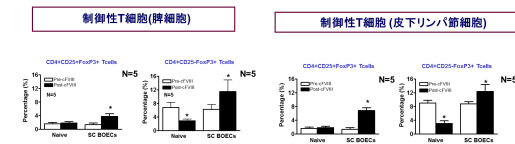
In Vitro FVIII チャレンジと Adoptive transfer 実験

マウスの脾臓および皮下リンパ節からリンパ球を分離、InvitroでFVIII存在下で培養して、サイトカイン産生能試験およびT細胞増殖能試験を検討した。制御性T細胞の誘導については発現をフローサイトメーターで検討した。さらに、脾臓および皮下リンパ節から分離したリンパ球の一部からCD4陽性リンパ球を分離して、ナイーブ血友病 A マウスへ移植し、イヌ FVIII を皮下注しイヌ FVIII に対する免疫寛容が移行可能であるか FVIII インヒビターの推移を確認した。

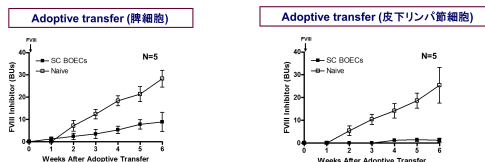


免疫寛容が成立していると考えられるマウス脾臓由来リンパ球(左)のサイトカイン産生の推移をしめすが、FVIII 添加量依存性に、炎症性サイトカインである IL-4, IL-6, IFN- γ の産生はコントロール群のナイーブマウスと比較して低下していた。一方で抗炎症性サイトカインである TGF- β および IL-10 の産生は上昇していた。皮下リンパ節由来リンパ球(右)でも同様の現象を認めました。

T 細胞増殖試験の結果、脾臓およびリンパ節由来の両方のリンパ球でナイーブマウスリンパ球と比較して、T 細胞増殖の低下が認められた。その程度は添加 FVIII 量に依存して抑制された。



制御性 T 細胞の検討の結果、脾臓由来リンパ球において制御性 T 細胞は FVIII 添加培養後、コントロールナイーブマウスと比較して有意に増加していた。同様にリンパ節由来リンパ球でも有意に制御性 T 細胞の増加を認めた。サイトカイン産生能試験、T 細胞増殖試験などの結果、BOECs を移植したインヒビター陽性血友病 A マウスはイヌ FVIII に対して免疫寛容が成立し、その成立には制御性 T 細胞の誘導が関与していることが示唆された。



CD4 陽性リンパ球移植実験の結果、脾臓由来 CD4 陽性リンパ球をナイーブ血友病 A マウスへ移植した場合、コントロール群と比較して FVIII インヒビターの発生は有意に抑制されていた。特にリンパ節由来 CD4 陽性リンパ球を移植した場合、FVIII インヒビターの発生を認めなかった。結果、免疫寛容の移行は可能で、制御性 T 細胞が FVIII インヒビター制

御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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 3 件)

1. Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A: Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* 9(8): e104957, 2014

2. Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, Ohashi K, Okano T, Matsui H: A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* 8(12): e83280, 2013

3. Matsui H: Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A. *International Journal of Hematology* 95(2): 119-124, 2012

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 松井英人

血友病の診療の進歩と今後の課題---血友病遺伝子・細胞治療の方向性
第 56 回日本小児血液・がん学会
2014 年 11 月 28 日、岡山市

2. 野田正志、松井英人、松成泰典、越智すなお、嶋 緑倫、中山正成、杉本充彦
血友病 A イヌモデルを用いた自己細胞移植による新規血友病 A 細胞治療法の開発検討
第 157 回日本獣医学会学術集会
2014 年 9 月 10 日、札幌市

3. 松井英人

血友病 A に対する新規遺伝子・細胞治療戦略 ~ 自己細胞移植による細胞治療
第 36 回日本血栓止血学会学術集会
2014 年 5 月 29 日、大阪市

4. Hidetoshi Matsui, Masashi Noda, Rie Utoh, Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Midori Shima, Mitsuhiro Sugimoto, Teruo Okano.

Successful long-term phenotypic correction of hemophilia A mice by multi-layered endothelial cell sheet transplantation.

The American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting

2014 年 5 月 23 日, Washington DC, USA

5. 松井英人、野田正志、杉本充彦、嶋 緑倫、鶴頭理恵、大橋一夫、岡野光夫

自己細胞シート移植による新規血友病 A 治療法の開発

第 13 回日本再生医療学会総会
2014 年 3 月 5 日、京都市

6. 松井英人

血友病治療の近未来予想図 遺伝子・細胞治療は定期補充療法に取って代われるのか？

第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム
2014 年 2 月 22 日、東京都

7. Hideto Matsui, Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Midori Shima, Mitsuhiro Sugimoto, Teruo Okano.

Successful long-term phenotypic correction of hemophilia A mice by engineering functional factor VIII delivery system in vivo using autologous endothelial cell sheets.

56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition
2013 年 12 月 5 日、New Orleans, USA

8. Hideto Matsui, Mitsuhiro Sugimoto, Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Midori Shima, Teruo Okano.

Establishment of novel cell-based therapy for hemophilia A.

第 75 回日本血液学会学術集会
2013 年 10 月 11 日、札幌市

9. Hideto Matsui, Mitsuhiro Sugimoto, Midori Shima, Naoko Fujimoto, Akitsu Hotta.

Long-term phenotypic correction of hemophilia A by non-viral piggyBac transposon vector.

The American Society of Gene and Cell Therapy 16th Annual Meeting.

2013 年 5 月 17 日、Salt Lake City, USA

10. Hideto Matsui, Mitsuhiro Sugimoto, Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Midori Shima, Teruo Okano.

Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A.

7th Congress of Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis

2012 年 10 月 30 日、Melbourne, Australia

11. Hideto Matsui, Mitsuhiro Sugimoto, Midori Shima, Naoko Fujimoto, Akitsu Hotta.

Establishment of the novel piggyBac transposon vector for the treatment of hemophilia A.

第 74 回日本血液学会学術集会
2012 年 10 月 20 日、京都市

12. 松井英人、杉本充彦、David Lillicrap、嶋 緑倫

microRNA 制御凝固第 VIII 因子発現レンチウイルスベクターによる新規血友病 A 遺伝子治療

第 19 回肝細胞研究会

2012 年 6 月 29 日、札幌市

13. Akitsu Hotta, Naoko Fujimoto, Takao Nakano, Noriko Sasakawa, Knut Woltjen, Sylvie Rival-Gervier, Hideto Matsui, Shinya Yamanaka.

Efficient and stable expression of non-viral vectors in human iPS cells: towards a gene therapy approach for hemophilia.

The 10th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research

2012 年 6 月 16 日、横浜市

14. 松井英人、辰巳公平、大橋一夫、杉本充彦、嶋 緑倫、岡野光夫

自己血管内皮前駆細胞シート移植による新規血友病 A 細胞療法の確立

第 34 回日本血栓止血学会学術集会

2012 年 6 月 9 日、東京都

15. Hideto Matsui, Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Mitsuhiro Sugimoto, Midori Shima, Teruo Okano.

Proliferative endothelial progenitors as a therapeutic vehicle for the treatment of hemophilia

The American Society of Gene and Cell Therapy 15th Annual Meeting

2012 年 5 月 19 日、Philadelphia, USA

〔図書〕(計 4 件)

1. 松井英人、杉本充彦

カラーテキスト 血液病学第 2 版 第 3 章 血液疾患の診断: 主要兆候と検査値の異常の解釈 E: 血栓傾向の診断と鑑別

93-95、中外医学社 2013

2. 松井英人、杉本充彦

カラーテキスト 血液病学第 2 版 第 9 章 出血・血栓性疾患 H 血栓症

665-679、中外医学社 2013

3. 松井英人、杉本充彦

EBM 血液疾患の治療 2013-2014 V. 出血・血栓性疾患 9. 深部静脈血栓症に対する対策と治療

466-472、中外医学社 2012

4. 松井英人

最新疾患モデルと病態解明、創薬応用研究、細胞医薬創製研究の最前線 最新疾患モデル動物、ヒト化マウス、モデル細胞、ES・iPS 細胞を利用した病態解明から創薬まで 第 2

章 8 血液疾患 1)血友病モデル犬を用いた創薬/臨床応用研究
219-223、メディカルドゥ 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 英人 (MATSUI HIDE TO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00571027

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

堀田 秋津 (HOTTA AKITSU)
京都大学・助教
研究者番号：50578002