

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300174

研究課題名(和文) 組織工学を基盤とした自己細胞による血友病治療の創出

研究課題名(英文) Cell-based Therapies Toward Hemophilia Using Autologous Cells from Hemophilic Individuals

研究代表者

大橋 一夫(OHASHI, KAZUO)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40364062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本疾患では患者自己の細胞による血友病治療法の確立を目指して、肝細胞と血液派生血管内皮細胞(BOECs)を取り扱った。通常培養環境下では分離肝細胞は増殖しないという課題がある。そこで、uPA/SCIDマウスの肝臓を細胞培養器と考え、肝細胞の大量増殖と遺伝子修飾の場としての有用性を検討した。結果として、uPA/SCIDマウス肝臓を完全に置換するまでの肝細胞増殖を行い得た。また、それらマウス肝臓内での血友病肝細胞に遺伝子修飾した後に細胞を取り出して、血友病個体に移植したところ、治療効果を獲得した。また、BOECsは培養環境下で継代と遺伝子修飾できることも確認した。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to create cell-based therapy toward hemophilia. Basic concept of this project is to proliferate patient's own cells with the genetic modification using viral vectors. Hepatocytes and blood outgrowth endothelial cells (BOECs) were used. For hepatocyte proliferation, we isolated hemophilic hepatocytes from factor IX-knockout mice which were then transplanted into uPA/SCID mouse livers. After the transplantation, the hemophilic hepatocytes had been actively proliferated to fully reconstitute uPA/SCID mouse livers. Injecting AAV vectors into the uPA/SCID mice resulted in high level of FIX gene transduction to the reconstituted hemophilic hepatocytes within the liver. The genetically-modified hemophilic hepatocytes were subsequently recovered, followed by their transplantation back into the hemophilic individuals. The present study also utilized blood outgrowth endothelial cells established from factor IX-knockout mice for FIX gene transduction.

研究分野：消化器外科 再生医療

キーワード：再生医療 血友病 細胞遺伝子治療 血液凝固因子

1. 研究開始当初の背景

本研究で取り上げる血友病は、血液凝固因子 VIII または IX の産生欠損により出血症状を繰り返す X 染色体劣性遺伝性疾患である。本邦で約 5,000 人、世界で約 250,000 人の患者数が報告されている。現行治療としての血液凝固因子製剤の補充療法は、高額な薬剤費のため、世界の約 80% の患者は治療を受けることができない状況にある。日本の高額医療費トップ 10 例のうち 9 例を血友病が占め¹⁾、医療経済的にも新規治療の開発が望まれる。また、凝固因子製剤の注入も安定な血液凝固活性を得ることは難しく、関節出血や時には致命的出血を発生する。そのような背景の中、血友病患者団体からは、新規治療法の実現に関する強い希望が常に寄せられており²⁾、再生医療の確立は、最も期待が高く、その確立が切に願われている。

2. 研究の目的

遺伝性肝臓疾患に対する新しい治療法の実現を目的に、本申請研究においては、自己細胞を用いた治療基盤の確立を目指す。対象疾患の代表として、血友病(血液凝固因子の産生を先天性欠損に起因する疾患)を代表疾患として取り上げる。研究の重要骨子は、様々な自己細胞に遺伝子修飾を行った後に、組織工学技術を用いて培養下に組織体としてくみ上げ、それら組織体を用いて生体内に治療用組織を構築することである。従来の細胞注入移植や遺伝子治療で様々な課題が明らかとなってきた現状において、生体内に機能的な組織を組み上げるアプローチは再生医療の次世代を担う重要なテーマである。組織工学技術を駆使することにより、患者自己細胞の利用を基盤とした新基軸の再生医療を構築する。“患者自身の自己細胞を基盤とした治療”は、他科細胞とは比較にならない安全性を担保することから、患者オリエンテッドな未来型治療の実現を目指すことを特に強調したい。

3. 研究の方法

(1) 血友病マウス由来細胞分離と大量増殖系の確立

血友病マウスからの肝細胞分離

肝細胞ドナーマウスとしては、血液凝固第 IX 因子遺伝子(FIX)ノックアウト(KO)マウスを用いた。最初に EGTA 含有液、次いでコラゲナーゼ液を灌流する、2段階コラゲナーゼ灌流法にて、血友病 B マウス肝細胞分離を行った。各溶液の温度、灌流圧、灌流速度、灌流時間等の観点で、条件の至適化を行った。消化過程が完了した後、肝臓を取り出し、FBS 含有の培養液中にて肝臓から細胞分散させ、メッシュフィルターを通して細胞懸濁液を回収した。肝細胞の精製は、50g 等の低速遠心の繰り返しと、Percoll 液による比重遠心を組み合わせる手法によって肝細胞純化率を 95%以上になるように設定した。肝細胞生存率はトリパンプルー排泄試験で評価し、85%以上の生存を目標とした。

マウス肝臓を培養器として利用した血友病肝細胞の大量増殖系

レシピエントマウスとして uPS/SCID マウスを用いた。上記で分離精製した FIX-KO 肝細胞を門脈穿刺注入によって uPS/SCID マウス肝臓へ移植した。移植後の FIX-KO 肝細胞の増殖占拠率は、レシピエントマウスの血中 FIX 活性の変化で評価した。

血友病マウス由来血管内皮前駆細胞(HB-BOEC)の樹立

血友病マウス血液に Lymph Separation Medium を加え、単核球画分を分離し、コラーゲンコート培養皿で培養後、FCM で CD34⁺, CD31⁺, CD45⁻ の細胞群を BOECs として継代増殖させた。

(2) 自己細胞としての uPS/SCID 内増殖血友病肝細胞への遺伝子導入と細胞治療法の実現

遺伝子治療ベクターの準備と投与

肝臓が血友病肝細胞で完全に置換された

uPA/SCID マウスに AAV vector を注入した。ベクターは、AAV serotype8 を基本骨格とし、hAAT promoter 下に FIX を発現するベクターを用いた。尾静脈静注でベクターを投与した。

血友病肝細胞分離と血友病マウスへの移植

AAV ベクターを投与した uPA/SCID マウス肝臓を分離し、遺伝子治療済の血友病肝細胞を取得した。それら肝細胞を血友病マウスの門脈に注入する肝細胞移植法³⁾及び、腎被膜下に移植して肝組織を作製する肝組織工学的的手法⁴⁾を行い治療効果の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 血友病マウス肝細胞分離と大量増殖系の確立

血友病マウスからの肝細胞分離

コラゲナーゼ灌流法にて血友病 B マウス肝臓から肝細胞分離を行った。各種溶液の灌流圧、灌流速度、温度を至適化した。また、細胞消化停止時期、肝臓からの肝細胞分散手技、肝細胞遠心純化法の至適化も行った。これら手技の総合的検討の結果、トリパンプルー排泄試験で 85%以上の生存を示す高品質な血友病肝細胞を取得することに成功した。

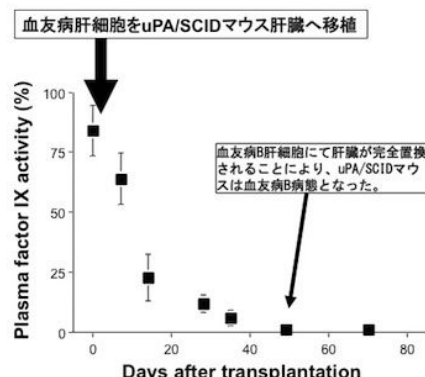
これら分離血友病 B 肝細胞の細胞品質の評価を細胞接着率とコンフルエント度にて評価した。Primaria 培養皿上に肝細胞を播種し、1 日目にて評価したところ、多くの分離細胞ロットにおいて 70%以上の細胞接着率を示した。また、培養3 日目にて接着細胞の占有面積を計測してコンフルエント度を評価したところ 90%以上を示した。これらの総合的検討結果は、良好な品質の血友病肝細胞を分離・回収手技を確立できたことを示している。

マウス肝臓を培養器として利用した血友病肝細胞の大量増殖系

uPS/SCID マウスの肝臓内において、血友病肝細胞を大量増殖させる実験を行った。移植細胞数の至適化を行った上で実験をすすめたところ、移植後から血友病肝細胞は活発かつ連続的に

増殖し、uPA/SCID マウス肝臓はほとんど全て血友病肝細胞で置換された。血友病肝細胞

血友病肝細胞の持続的増殖によるマウス肝臓の完全置換



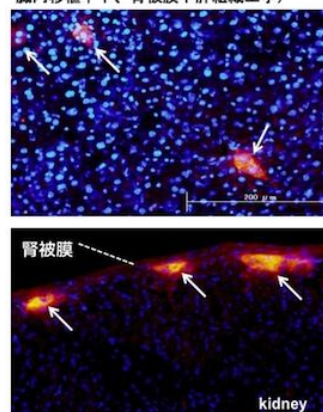
置換の uPS/SCID マウスは、従来正常であった血液凝固第9因子活性が、検出下限以下の血友病 B 病態となったことは、血友病肝細胞によって完全置換されたことを支持する結果である(図)。

(2) 自己細胞としての uPS/SCID 内増殖血友病肝細胞への遺伝子導入と細胞治療法の開発

ウイルスベクターを用いた uPS/SCID マウス内増殖自己血友病肝細胞への遺伝子治療
血液凝固第 IX 因子遺伝子を搭載した guttless

アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを、血友病肝細胞で置換された

マウス内増殖の遺伝子治療済血友病肝細胞を用いた血友病細胞治療 (上、肝細胞の肝臓内移植; 下、腎被膜下肝組織工学)



uPA/SCID マウスへ投与した。両ベクターともに 90%以上の遺伝子導入効率を示し、特に AAV ベクターは、導入後の FIX 産生が安定していた。

遺伝子修飾済自己肝細胞の回収と血友病個体への細胞治療

AAV ベクターでの遺伝子治療を完了した uPA/SCID マウス肝臓から肝細胞を分離・精製し、血友病マウスへ移植した。血友病マウス肝臓内への肝細胞移植および腎被膜下への肝組織工学を行ったところ、両細胞移植法ともに、良好に肝細胞が生着することを確認した。この結果は、uPA/SCID マウスから回収した肝細胞は自己の肝細胞であることを立証している。

両肝細胞移植法ともに、血友病マウスで治療効果レベルの血液凝固活性を獲得した。

(2) 血液派生血管内皮前駆細胞(BOECs)の増殖と遺伝子導入

血友病 B マウスから分離取得した BOECs は、培養皿初期播種数と比較して 20 倍以上に増殖することが可能となった。また、この増殖 BOECs にアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入実験を行った結果、90%以上の細胞に遺伝子修飾を行い得た。

引用文献

1. 健康保険組合連合会調べ平成 22 年度 <http://miscr.asp.iji-net.jp/viewFile.php?id=15162>
2. 血友病患者さんアンケート調査 血友病在宅治療支援プログラム委員会 2008 年調査報告書
3. Tatsumi K, Ohashi K, et al. *Transplantation* 86:167-170, 2008.
4. Ohashi K, et al. *Hepatology* 41: 132-140, 2005.

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 13 件)

Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, Okamoto R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Enhancement of survival rate by human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation in acute liver failure mice. *J Hepatol*, 64: 1068-1075, 2016.

Iizuka S, Sakurai F, Shimizu K, Ohashi K, Nakamura S-I, Tachibana M, Mizuguchi H. Evaluation of transduction properties of an adenovirus vector in neonatal mice. *Biomed Res Int* ID68374, 2015.

Takayama K, Kawabata K, Inamura M,

Ohashi K, Nagamoto Y, Okuno H, Yamaguchi Y, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda-MF, Mizuguchi H. CCAAT/ enhancer binding protein-mediated regulation of TGF receptor 2 expression determines hepatoblast fate decision. *Development* 141: 91-100, 2014.

Ohashi K, Okano T. Functional tissue engineering of the liver and islets. *Anat Record* 297: 73-82, 2014.

Tatsumi K, Ohashi K, Kanegae K, Shim IK, Okano T. Perioperative haemostatic management of haemophilic mice using normal mouse plasma. *Haemophilia* 19: e335-e343, 2013.

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*, Dec 16, 8(12), e83280, 2013.

Sakai Y, Koike M, Hasegawa H, Yamanouchi K, Soyama A, Takatsuki M, Kuroki T, Ohashi K, Okano T, Eguchi S. Rapid fabricating technique for multi-layered human hepatic cell sheets by forceful contraction of the fibroblast monolayer. *PLoS One* 28(7), e70970, 2013.

〔学会発表〕(計 23 件)

Ohashi K, Yamashita S, Utoh R, Tsuchiya H, Yamamoto M. Hepatocyte transplantation for the assessment of hepatocyte proliferation and their streaming. 2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11 月,メルボルン、オーストラリア

Ohashi K, Kuge H, Kosai K-I, Tsuchiya H. Therapeutic effects of ectopic liver tissue engineering on lethal acute liver failure in mice. 2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11 月,メルボルン、オーストラリア

Ohashi K. Hepatocyte; A cell source for liver regeneration and liver organogenesis. 2015 IPITA+CTS+IAX Jint Meeting, 2015 11 月,メルボルン、オーストラリア

Iizuka S, Sakurai F, Shimizu K, Tachibana M, Ohashi K, Mizuguchi H. Evaluation of transduction properties of an adenovirus vector in neonatal mice. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会 2015 7 月 大阪市、大阪

大橋一夫 次世代治療としての生体内肝組織構築(肝組織工学)開発の現状と展望 第 22 回肝細胞研究会 レビュー 2015 6 月, 米子市、鳥取

大橋一夫 単層組織からの臓器創生-臓器創生幹細胞としての肝細胞の働き 第51回日本肝臓学会総会 2015 5月 熊本市、熊本

Ohashi K, Nakajima Y. Synchronous parenchymal and non-parenchymal cell proliferation contribute to the regenerative growth of the engineered liver tissues. World Transplant Congress 2014. 2014 8月, サンフランシスコ, 米国 Hanayama H, Ohashi K, Utoh R, Ise K, Shimizu T, Yamato M, Mizuguchi H, Sakurai F, Okano T, Gotoh M. Apoptosis-resistant and highly functional islet cell sheets for transplantation. World Transplant Congress 2014. 2014 8月, サンフランシスコ, 米国

大橋一夫肝細胞移植-生着向上をめざした細胞配置 東北大学第3回先進医療開発コアセンターシンポジウム 2013 3月 仙台市、宮城

〔図書〕(計3件)

大橋一夫 肝細胞移植 医学大辞典 南山堂 pp441, 2015.

大橋一夫 人工肝臓 医学大辞典 南山堂 pp1216, 2015.

大橋一夫 肝細胞移植と肝ティッシュエンジニアリング「みんなに役立つ血友病の基礎と臨床(改訂版)」 医薬ジャーナル社 pp329-337, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Synthesis and analysis of novel compound capable of inducing differentiation of human mesenchymal stem cell into hepatocyte.

発明者: Shiota G, Ohashi K, et al.

権利者: Tokyo Women's Medical University, National University Corporation Tottori University 及び発明者全員

種類: PCT 国際出願

番号: PCT/2012/059021

国内外の別: 国外

取得状況(計3件)

名称: 臍島細胞シート、製造方法及びその利用方法

発明者: 清水裕志、大橋一夫、他

権利者: 東京女子医科大学

種類:

番号: 5717253

取得年月日: 平成 27 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

名称: 複合型肝細胞組織体およびその作製方法

発明者: 大橋一夫、立野知世、他

権利者: 大橋一夫

種類:

番号: 特願 2006-222787

取得年月日: 平成 27 年 5 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 複合型肝細胞組織体およびその作製方法

発明者: 山田真澄、大橋一夫、他

権利者: 国立大学法人千葉大学、大橋一夫

種類:

番号: 特願 2011-123856

取得年月日: 平成 28 年 4 月 12 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 一夫 (OHASHI, Kazuo)

大阪大学・薬学研究科・特任教授

研究者番号: 40364062

(2) 研究分担者

杉本 充彦 (SUGIMOTO, Mitsuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・教授

(3) 研究分担者

中山 正道 (NAKAYAMA, Masamichi)

東京女子医科大学・医学部薬・講師

研究者番号: 00338980

(4) 連携研究者

水口 裕之 (MIZUGUCHI, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号: 50311387

(5) 連携研究者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 30160120