

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21176

研究課題名(和文) 遺伝子修復間葉系幹細胞を用いた低フォスファターゼ症の治療技術開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic technology for hypophosphatasia using genetically corrected mesenchymal stem cells

研究代表者

小田 泰昭(Oda, Yasuaki)

島根大学・医学部・研究員

研究者番号：70602473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低フォスファターゼ症は、組織非特異的アルカリフォスファターゼの変異により発症する難病であり、重症例では重度の骨形成不全を示し、致死的な経過をたどる。本研究では、根治療法のない本疾患に対して、遺伝子修復間葉系幹細胞などを用いた自家移植モデルによる治療法開発を試みた。患者間葉系幹細胞への遺伝子修復はまだ達成できていないが、様々なアプローチで改善を試みており、細胞移植の評価系を構築しつつある。

一方、臨床研究に必要な細胞培養施設の標準作業手順書の作製、衛生・品質管理基準の文書化を行い、島根大学医学部附属病院での臨床研究体制を築いた。本研究を発展させることで、他の骨系統疾患への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hypophosphatasia (HPP) is an intractable disease caused by mutation(s) in the alkaline phosphatase, liver/bone/kidney gene, and in severe cases it shows severe bone formation failure and follows a lethal course. In this study, we attempted to develop a therapeutic method for HPP based on autologous transplantation model using gene repair mesenchymal stem cells and other cells. Although gene repair to patient mesenchymal stem cells has not yet been achieved, we attempt to improve them using various approaches, and an evaluation system for cell transplantation is being constructed.

On the other hand, we prepared a standard operating procedure manual for cell culture facilities required for clinical research, documented hygiene and quality control standards, and established a clinical research system at Shimane university hospital. By developing this research, it is expected to be applied to other bone diseases.

研究分野：幹細胞

キーワード：低フォスファターゼ症 間葉系幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

低フォスファターゼ症は、組織非特異的アルカリフォスファターゼ (ALP) の変異により発症する難病である。胎児期および新生児期で発症した重症の患者は、重度の骨形成不全を示し、致命的な経過をたどる疾患である。本疾患に対して、骨への結合能を高めた ALP 酵素製剤が開発され、低フォスファターゼ症モデルマウスの骨形成能の改善と延命効果が報告された。この酵素製剤はヒトでも治験が行われており、phase II 試験においてもその有効性が報告された。しかし、酵素製剤は血液脳関門を通過することができないため、本疾患の合併症であるけいれんや脳の発達障害に対する効果は期待できないと考えられた。したがって、酵素製剤による治療は骨形成に対して一定の効果は期待できるが、根治療法としては不十分であることが予想された。

連携研究者の竹谷および研究代表者を含む研究チームは、低フォスファターゼ症患者に対して同種間葉系幹細胞 (MSC) 移植による臨床研究を 2010 年から行っており、延命効果や骨形成能の改善が認められた。しかし、一定の治療効果は認められたものの、正常な骨構造へ改善するには至っていない。MSC 移植により患者の QOL を高めるためには、移植細胞の生着率の向上や患部へのホーミング、移植する MSC の品質の向上など、さらに詳細な検証が求められる。これらの問題点を打開するためには、より高純度で高品質な MSC を利用することが望ましい。生着率の向上のためには、自家移植による治療が望ましいが、患者は先天性の遺伝子疾患であるため適用できない。自家移植という点では、患者 iPS 細胞を用いる方法も挙げられるが、患者由来である限りは変異した遺伝子の修復が必要となる。さらに、iPS 細胞から MSC を高効率で分化誘導すること、未分化な iPS 細胞の混入を防ぐこと等が求められ、多大な労力を必要とする。

そこで本研究では、患者の MSC で ALP 遺伝子の修復を行い、患者に移植する自家移植による治療モデルの確立を目指す。具体的には、臨床研究で必須となる医療グレードでの細胞調製施設の基盤整備と、MSC 等を用いた低フォスファターゼ症モデルマウスに対する治療効果や安全性の検証を行う。

2. 研究の目的

本研究では、医療グレードでの細胞調製施設の基盤整備と、遺伝子修復を行った MSC 等を用いた、低フォスファターゼ症に対する自家移植による治療モデルを確立することを目的とする。

臨床レベルでの細胞移植治療を行うためには、無菌的環境下かつ医療グレードでの細胞調製が必要となる。そこで、島根大学医学部附属病院が保有する閉鎖型細胞調製シ

テム (Cell Processing Work Station) を用いて、臨床研究に必要な手順書の作製や衛生・品質管理等の基盤整備を行う。

骨髄由来 MSC に加え、連携研究者の松崎らが開発した増殖・分化能に優れた高純度 MSC、さらに患者 iPS 細胞から分化誘導した MSC も同様に用いて検証を行う。遺伝子修復したこれらの患者の MSC が、正常な骨形成能を持つか検証する。さらに、低フォスファターゼ症モデルマウスに移植して、生体内における骨形成能の確認と、安全性および治療効果についても検証する。

本研究の基盤技術が確立されれば、根治治療のない骨系統疾患への応用はもちろん、MSC を適用可能な、様々な疾患の実用化が可能になると期待される。

3. 研究の方法

本研究は以下に述べる 2 つの研究を柱とするため、それぞれに分けて記載する。

【閉鎖型細胞調製システムを用いた臨床研究の基盤整備】

研究の基盤整備に必要なヒト骨髄は、事前にインフォームドコンセントを行って書面による同意を得られた方のうち、診療や検査等で余剰となった分のみを用いた。まず、医療用のヒト骨髄液を閉鎖型細胞調製システム内で培養皿に播種し、線維芽細胞様の細胞を増殖させることで従来法の MSC を得た。そのまま閉鎖型細胞調製システム内で拡大培養を行い、マスターストックを作製した。一連の作業工程を細かく文書化した「標準作業手順書」や、作業過程ならびに移植用の最終製品を想定した細胞の「製造管理基準書」、「衛生管理基準書」、「品質管理基準書」をそれぞれ文書化した。また、一連の作業工程を繰り返すことで手順や文書の最適化を行った。

【遺伝子修復 MSC の作製と低フォスファターゼ症モデルマウスを用いた治療効果の検証】

低フォスファターゼ症患者 MSC は保有数に限りがあるため、まずは市販の MSC を用いて遺伝子修復実験の条件検討を行った。Addgene から購入した遺伝子改変用のプラスミド (EGFP 遺伝子搭載) をトランスフェクション試薬、およびエレクトロポレーション法にて細胞へ導入した。細胞への遺伝子導入効率は、EGFP の蛍光観察により判定した。また、iPS 細胞での遺伝子修復を試みるため、健常者 iPS 細胞を用いて同様の実験を行った。

低フォスファターゼ症モデルマウスに対する、間葉系幹細胞移植による治療研究は過去に報告がないため、まずは移植の条件検討を行った。細胞は市販の健常者 MSC と、健常者の骨髄細胞から CD90 および CD271 の両強陽性となる細胞集団から single cell sorting により単離・増殖させることで調製

した高純度 MSC を用いた。それぞれの細胞が *in vitro* で骨分化能を有することを確認した上で、生後 8 週齢の野生型 B6 マウスへ移植した。移植細胞数は、 1×10^5 cells ~ 1×10^7 cells / 1 個体とし、適切な移植細胞数を検討した。

次に、MSC および高純度 MSC が Akp2 KO マウスの骨形成能改善と延命への寄与を検討するために、低フォスファターゼ症モデルマウスへ経静脈的に移植した。低フォスファターゼ症モデルマウスは、生後 3 週間程度で全例が死亡してしまうこと、胎児期や新生児期は免疫系が未熟なことを考慮して、日齢 0~2 日目の生後間もない新生児マウスへ移植を実施した。

4. 研究成果

【閉鎖型細胞調製システムを用いた臨床研究の基盤整備】

研究期間中、延べ7名の医療用骨髄液を用いて、閉鎖型細胞調製システム内でMSCの培養・増殖を行い、マスターストックを凍結保存した。具体的には、数mlの骨髄液を遠心分離して血漿成分を除き、そこに培地を加えてT75フラスコに播種した。播種3日後から1日おきに培地交換を行い、播種から10~14日後に酵素処理して細胞数を計数し、新しいT75フラスコ複数本に播種した。その後、増殖した細胞を凍結してマスターストックとした。

細胞培養に使用する機器や試薬類、作業手順を含め、一連の作業で要求される全ての事案を文書化して「標準作業手順書」を作製した。また、作製した「標準作業手順書」を用いて一連の作業を再度行い、手順書の細かな箇所の改訂を行ったうえで最終的な「標準作業手順書」を作製した。一方、ヒトへの臨床研究を前提としているため、「標準作業手順書」に従って作製する途中工程での細胞ならびに最終産物での無菌性や品質の担保、作業空間の衛生等を定めた「製造管理基準書」、「衛生管理基準書」、「品質管理基準書」もそれぞれ文書化した。いずれも代表研究者が中心となり、連携研究者や協力研究者、病院内の関係者と協議して、手順や文書の最適化を行った。

このようにハード面、ソフト面での製造管理・衛生管理・品質管理体制の基盤を作り、所轄となる中国四国厚生局へ「特定細胞加工物製造届書」を申請し、受理された(施設番号:FC6150174、2016/02/26 受理)。これにより、医療用骨髄液からの移植用 MSC の調製を島根大学医学部附属病院内で実施することが可能となった。一方、島根大学医学部附属病院では、これまで再生医療を専門として行う組織や部署が存在しなかった。そこで、連研究者の竹谷を中核として、「島根大学医学部附属病院再生医療センター」が 2016 年 1 月 1 日付で発足した(その他 新聞報道)。本研究と関連するスピンオフとして、連携研

究者の松崎を中心に、高純度 MSC の基礎・臨床応用を目的とした島根大学発のベンチャー企業も設立された(その他 新聞報道)。

【遺伝子修復 MSC の作製と低フォスファターゼ症モデルマウスを用いた治療効果の検証】

低フォスファターゼ症患者のMSCは保有数に限りがあるため、まずは健常者のMSCで条件検討を行った。Addgeneから購入した遺伝子修復用のプラスミド(pX458, CRISPR/Cas9とEGFP遺伝子搭載)を、健常者のMSCにトランスフェクション試薬およびエレクトロポレーション法で導入した。トランスフェクション試薬ではプラスミドが殆ど導入されず、エレクトロポレーション法で様々な条件を試したが、20%程度しか導入できなかった(図1)。

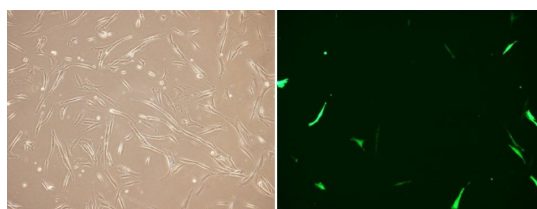


図1. ヒトMSCへの遺伝子改変プラスミド導入

貴重な患者MSCでは遺伝子改変が困難と考えられたため、代表研究者が過去に作製した患者iPS細胞で遺伝子修復を行うことを計画した。まず、条件検討として健常者iPS細胞に、上記の遺伝子修復用プラスミドをエレクトロポレーション法で導入した。通常、正常なiPS細胞はALP活性を示すため、ALP染色で赤色を呈するが、遺伝子修復用プラスミド(この実験では遺伝子破壊のみを行っている)を導入した健常者iPS細胞はALP染色が完全に陰性であった。このiPS細胞のALP遺伝子を調べると、予想していた箇所ではALP遺伝子の破壊(切断)が生じていた(図2)。図1に示したように、

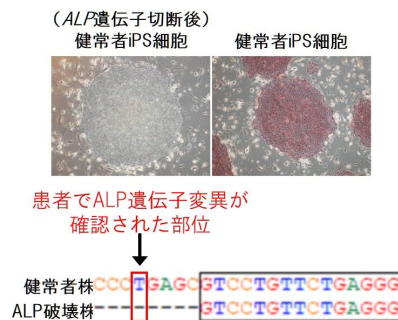


図2. CRISPR/Cas9ベクターによるALPL遺伝子切断の確認

MSCへの遺伝子修復用プラスミドの導入効率がいいため、現在はプラスミドではなく、mRNAやタンパク質でのCas9の導入を試みている。

低フォスファターゼ症モデルマウスに対するMSC移植治療の条件検討を行うために、市販の凍結骨髄由来単核球細胞から、CD90およびCD271の両強陽性となる細胞集団から

single cell sorting により単離・増殖させることで高純度 MSC を調製した(図 3A)。市販の骨髄由来 MSC および骨髄由来高純度 MSC を培養して、invitro での分化能を検証した(図 3B, 3C)。骨髄由来 MSC に比べ、骨髄由来高純度 MSC は非常に効率よく脂肪細胞および骨芽細胞へと分化することが確認された。

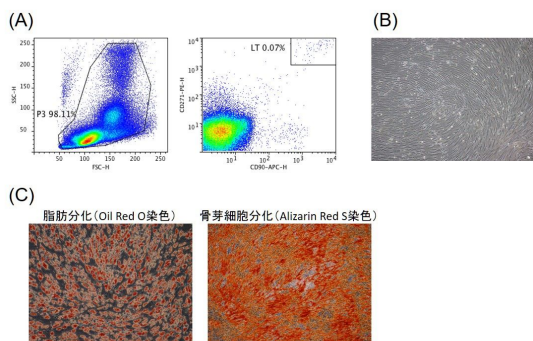


図3. 高純度MSCの分離培養と分化能評価

- A) 市販の骨髄から高純度MSCのマーカー(CD90およびCD271陽性の細胞分画: LTと記載)で細胞を分離した。
 B) 増殖した高純度MSCの形態。
 C) 高純度MSCの脂肪細胞および骨芽細胞への分化。

この MSC と高純度 MSC を、8 週齢の野生型 B6 マウスに移植した。移植細胞数は、 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 , 1×10^7 cells / 1 個体とした。骨髄 MSC は 1×10^6 cells までには問題なく生存したが、 2×10^6 cells 以上では移植後 2,3 分あまりで死亡した(肺塞栓と推察される)。一方、高純度 MSC を移植したマウスでは、全ての移植細胞数でマウスは全例生存し、移植後 1 か月以上経過しても有害事象は認められなかった(図 4)。



図4. MSCと高純度MSCの細胞移植成績の比較

次に、MSCおよび高純度MSC が低フォスファターゼ症モデルマウスの骨形成能改善と延命への寄与を検討するために、それぞれの細胞を経静脈的に移植した。日齢0~2 日目の生後間もない新生児マウスへ 5×10^5 cells の高純度MSC を経静脈的に移植した。移植後の有害事象は認められなかったものの、移植したマウスにおいて明らかな改善は認められなかった(体の大きさ、体重、骨形成能、寿命など)。免疫システムが確立していない新生児マウスに移植することで高純度MSC の生着を期待したが、現時点では有意な効果は認められていない。ヒト-マウス間での移植であるため、移植した高純度MSC が拒絶されている可能性が高いと考えられる。現在、移植マウスの大腿骨の組織学的解析を行っており、移植

した細胞の生着の有無を確認中である。また、移植方法などについても、移植から24,48 時間以内での解析や、Akp2 KO マウスと超重度免疫不全マウス(NOG or NSG マウス)との交配による免疫不全Akp2 KO マウスの作製など、様々な手法を検討している。遺伝子修復した低フォスファターゼ症患者MSCを、上述で検討した手法により移植し、その有効性を確認する予定である。

最後に、本研究をご支援下さった日本学術振興会ならびに関係者各位に深謝申し上げたい。

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 1 件)

Yasuaki Oda, Mika Tadokoro, Shunsuke Yuba, Hajime Ohgushi, Seiji Yamaguchi, and Takeshi Taketani. "Treatment approach for hypophosphatasia via genetically modified patient's MSCs derived from iPS cells" 第11回 ALPS 研究会. 日本女子大学, 2015年7月18日

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

島根大学医学部附属病院 「再生医療センターの開設について」

http://www.med.shimane-u.ac.jp/h_docs/2016022900011/

新聞報道等

山陰中央新報、島根大病院 再生医療
センター開設、2016年2月23日

山陰中央新報、島根大医学部 再生医
療技術のベンチャー設立、2016年1
月20日、紙面24ページ

山陰中央新報、島根大ベンチャー 骨
や軟骨形成幹細胞 REC の活用、2016
年1月28日、紙面28ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 泰昭 (ODA, Yasuaki)
島根大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号：70602473

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

竹谷 健 (TAKETANI, Takeshi)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：30359880

松崎 有未 (MATSUZAKI, Yumi)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：50338183

(4) 研究協力者

持田 美保 (MOCHIDA Miho)
永瀬 真弓 (NAGASE Mayumi)
内藤 真祐美 (NAITOU Mayumi)
陶山 隆史 (SUYAMA Takashi)