

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11379

研究課題名(和文)自己細胞由来誘導性血小板成長因子剤によるパーソナル治療

研究課題名(英文)The autologous cure by manufacturing platelets from a human cell line

研究代表者

矢澤 真樹 (YAZAWA, Masaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60327567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血小板には各種成長因子が多く含まれており、止血・凝固作用後の傷において、これらの成長因子が複合的に働き、創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで自己細胞由来誘導性血小板を作製してパーソナル治療剤の開発に繋げる本研究を行った。自己細胞由来誘導性血小板は、創傷治癒に有効性を示すサイトカインを含有し、刺激による活性化能を有していた。免疫不全創傷治癒モデルマウスを用いてbFGFと比較した検討を行った。活性化した自己細胞由来誘導性血小板は、bFGF濃度が低くても、様々なサイトカインや成長因子の相互作用により、bFGF単体より創傷治癒効果が高いことが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長い間、血小板の主な機能は、止血作用と凝固作用と考えられてきた。しかし近年の研究で、血小板には各種成長因子が多く含まれており、止血・凝固作用後の傷において、これらの成長因子が複合的に働き、創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで自己組織から作成した血小板に凝固作用・止血作用があることを確認し、この血小板に含まれる成長因子の解析や創傷治癒効果の検討を行い、動物実験で創傷治癒効果を確認できた。自己細胞由来血小板から複数の成長因子を同時に安定して獲得することができる。パーソナル治療剤として利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Platelets are released from mature megakaryocytes and have an essential role in hemostatic plug formation. Recently, a line of evidence supports the clinical application of platelets to accelerate wound healing. However, it is difficult to use peripheral platelets for wide-range wound. Pre-adipocyte-derived platelets have the ability of activation and contain cytokines in relation to wound healing. We examined the effect of pre-adipocyte-derived platelets on wound healing of immunodeficient NOG mouse with full-thickness excisional wound in comparison to bFGF. While bFGF concentration in supernatant of activated platelets was low, they released various cytokines and growth factors related tissue repair and showed more beneficial effects on wound healing than bFGF.

研究分野：形成外科

キーワード：再生医療 血小板

1. 研究開始当初の背景

長い間、血小板の主な機能は、止血作用と凝固作用と考えられてきた。しかし近年の研究で、血小板には各種成長因子が多く含まれており、止血・凝固作用後の傷において、これらの成長因子が複合的に働き、創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで現在は、患者自身の血小板を採血により採取し遠心分離法を組み合わせることで濃縮調整することで、多血小板血漿 (PRP: platelet rich plasma) を作成し、創部の創傷治癒の促進を期待して、直接創部に適応されるようになったが、その血小板数などの調整は患者毎に不安定であるため、期待される効果も予測不能であり確実ではない。一方で、創傷治癒に十分量となる多種の成長因子を合成タンパクで応用することは、作業効率、コストから現状では困難である。近年、iPS細胞の開発に始まる自己細胞をソースとした治療法が開発が進んでいるが、iPS細胞の作成には、作成後の腫瘍化など安全面での課題は多く、臨床応用には、その解決が急務となっている。その中で、そもそも血小板は核を持たないことから、安全面に関しては、最も臨床応用に近い素材の1つとして注目され、自己細胞由来誘導性血小板は、大量出血時に必要な血小板輸血や、造血器疾患等で繰り返し必要になるHLA血小板などの血小板のソースとして、献血者の負担軽減のための開発が行われ、自己細胞をソースとした血小板の大量作成が期待されている。

2. 研究の目的

近年、自家細胞をソースとした血小板作成が可能となり、核を含まない血小板は、最も臨床応用に近い素材の1つとして注目されている。われわれはiPS細胞よりも安全に脂肪組織をソースとした血小板作成に成功し(Matsubara et al. Blood 2012)、止血・凝固作用、マウスでの創傷治癒促進作用を確認してきた。仮に、この自己細胞由来血小板に成長因子が十分含まれていれば、自己細胞由来血小板から複数の成長因子を同時に安定して獲得することができる。パーソナル治療剤として利用できる可能性があると考えている。本研究では、自己細胞由来誘導性血小板を臨床応用する疾患の選定とプロトコルの決定、必要な安全性の検証を行い、血小板に含まれる成長因子による、パーソナル治療剤の臨床応用に向けた最終的な検証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 疾患モデル(マウス)における自己細胞由来血小板の適応効果判定

免疫不全マウス疾患モデルに対し、創傷を作成し、ヒト細胞由来血小板を投与し、創傷治癒への影響を調査する。ヒト細胞由来血小板を大量培養し、創傷治癒遅延動物モデル(Kimura, Yazawa et al. J Dermatol Sci 2005)に適応する。ヒト細胞由来血小板の創傷治癒能力を臨床応用する際に、何が最も適しているか、適応選定の根拠とする。

(2) 臨床応用に向けた細胞由来血小板の効果的投与方法の検討

(1)で選出した疾患モデルにおいて、ヒト細胞由来血小板の投与方法を検討し、最も効果的な投与方法を探ることで、臨床応用する際のプロトコルするための根拠とする。ヒト細胞由来血小板の濃度、投与期間と間隔など、臨床応用を前提とした様々な適応方法をin vivoで評価する。これと同時に、ヒト細胞由来血小板の安全性について、次世代シーケンサーにより、血小板誘導前後における突然変異の有無について、検証する。

(3) 自己細胞由来血小板によるパーソナル治療薬の開発

臨床応用に向けて、ヒト細胞由来誘導性血小板に必要な安全性の確認や個体による差異などの検証を行い、パーソナル治療薬の開発を行う。

まず、複数の個体(ヒト)から誘導性血小板の大量作成を行うため、再建手術を受ける患者の余剰となった脂肪組織を利用して誘導性血小板の大量作成を行う(倫理委員会承認済)。細胞ソースとなった個体毎に、作成された誘導性血小板に差がないか、年齢・血型・HLA等による影響の有無を調査する。安全性について、次世代シーケンサーで突然変異の有無を調べる。誘導性血小板の創傷治癒能力と安全性の確立後、臨床応用をすすめるとともに、自己細胞由来成長因子によるパーソナル治療剤の臨床応用法の確立(作成法・保存法・適応など)を行う。

4. 研究成果

(1) 疾患モデル(マウス)における自己細胞由来血小板の適応効果判定

(2) 臨床応用に向けた細胞由来血小板の効果的投与方法の検討

免疫不全マウス疾患モデルとして、糖尿病モデルマウスを選択し創傷に大量培養したヒト細胞由来血小板を投与して創傷治癒能力の判定を行い、ヒト細胞由来血小板の外投与による創傷治癒効果において良好な結果を得た。(Tozawa et al. XXVI The International Society on Thrombosis and Haemostasis)

(3) 自己細胞由来血小板によるパーソナル治療薬の開発

臨床応用にむけたヒト細胞由来血小板の投与方法の検討をするにあたり、ヒト細胞由来血小板の安全性確認が必要となり、既存の試料から次世代シーケンサーによる有害な突然変異のチェックを行い、特に安全性について、次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンシングにより病因となり得る有害な突然変異がないことを確認した。また、治験および臨床応用に用いるヒト細胞由来血小板の作製過程における安全性確認も必要であり、現在行っている。さらに、

より実際の臨床応用の仕方にそった材料確保に向けて、非臨床安全性試験のための試料獲得準備として、健康な個体（ヒト）からの脂肪提供による細胞ソースの確保が必要であり、そのための倫理申請を行い、複数の協力機関から同一方法で細胞ソースを確保するシステムの確立をした。加えて、臨床応用のための治験に向け、創傷治癒の効果判定にもちいる評価方法について、非臨床安全性試験を実行するための倫理申請を行った。今後は、治験にむけて、計画の策定を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tozawa Keiichi, Ono-Uruga Yukako, Yazawa Masaki, Mori Taisuke, Murata Mitsuru, Okamoto Shinichiro, Ikeda Yasuo, Matsubara Yumiko	4. 巻 133
2. 論文標題 Megakaryocytes and platelets from a novel human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 633 ~ 643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-842641	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara
2. 発表標題 Function of Manufactured Platelets from Adipose Stem Cell Line: Compared to Platelet Concentrates
3. 学会等名 第79回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara, Masaki Yazawa
2. 発表標題 Effects of Activated Human Platelet Releases on Wound Healing Immunodeficient Mice: Comparison with basic FGF.
3. 学会等名 XXVI The International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara
2. 発表標題 Manufacture of Platelets from Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Functional Comparison to Platelet Concentrates
3. 学会等名 The 58th the American Society of Hematology (ASH) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Agent for promoting wound healing comprising platelet-like cell co-expressing platelet surface antigen and mesenchymal cell surface antigen	発明者 Matsubara, Yazawa, Mori	権利者 Keio University
産業財産権の種類、番号 特許、00	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 血小板表面抗原と間葉系細胞表面抗原を共発現する血小板様細胞を含む創傷治癒促進剤	発明者 松原由美子、矢澤真樹、森泰昌他	権利者 学校法人 慶應義塾
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-034917	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	森 泰昌 (MORI Taisuke) (00296708)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員 (82606)	
研究分担者	松原 由美子 (MATSUBARA Yumiko) (70365427)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授 (32612)	