

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00531

研究課題名(和文) 血友病A治療を目指したユニバーサル細胞療法の創出

研究課題名(英文) Development of Universal Cell Therapy for Hemophilia A&#160;

研究代表者

嶋 緑倫 (Shima, Midori)

奈良県立医科大学・医学部・副学長

研究者番号：30162663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血友病A根治療法としての同種細胞療法の確立を目指し、1)幹細胞からの第VIII因子産生細胞の作製、2)効率的な細胞生着を可能とする移植法の開発(細胞シート等)、についての検討を実施した。

1)ヒト間葉系幹細胞およびヒトiPS細胞から第VIII因子産生能を有する肝類洞内皮様細胞を分化誘導法による手法で確立に成功した。

2)ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮前駆細胞をシート化して免疫不全マウス肝表面に移植した。結果、移植細胞がマウス肝組織に機能的に生着し、その一部はLYVE1陽性細胞であり、移植した血管内皮前駆細胞がFVIII産生責任細胞である肝類洞内皮細胞へ分化した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血友病Aの現在の標準治療は、第VIII因子製剤もしくは第VIII因子を模倣した抗体医薬による補充療法が主である。しかし、一生に渡る投与を要するため、患者QoLの低下と年間一千億円を超える莫大な医療費が問題となっている。現在、根治療法として遺伝子治療の臨床試験が進められているが、治療1年後以降に効果が減弱する傾向があり、現時点でその原因は明らかでない。一方で、細胞治療は遺伝子治療に続く次世代治療法として位置付けられており、遺伝子治療に起因する諸問題を解決することが期待できる。本研究の一連の成果は、血友病A根治療法としての細胞治療の実現化に向けた重要な基盤となる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish an allogeneic cell therapy as a curative therapy for hemophilia A, we attempted 1) the generation of factor VIII-producing cells from stem cells and 2) the development of transplantation methods (cell sheets, etc.) that enable efficient cell engraftment.

1) We succeeded in establishing a method for differentiating human mesenchymal stem cells and human iPS cells to liver sinusoidal endothelial-like cells capable of producing factor VIII in vitro.

2) We transplanted cell sheets consisting of endothelial progenitor cells induced from human iPS cells onto the surface of immunodeficient mouse liver. As a result, we confirmed that the transplanted cells formed a vascular network with mouse liver tissue, and a certain percentage of the transplanted cells differentiated into LYVE1-positive liver sinusoidal endothelial-like cells.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血友病A 細胞治療 凝固第VIII因子 肝類洞内皮細胞 iPS細胞 間葉系幹細胞 血管内皮前駆細胞 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は、凝固第 VIII 因子の欠損または活性低下が原因の遺伝性出血性疾患である。血友病 A の現在の治療は、第 VIII 因子製剤を静脈投与する補充療法が主であるが、一生にわたる頻回投与を要する。血友病を care ではなく cure する治療として近年期待されているのが、遺伝子治療である。血友病に対する遺伝子治療は、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターの静脈投与で肝細胞に正常遺伝子を導入する臨床試験が行われ、一定の治療効果が出つつある。しかし、AAV 粒子タンパクに対する自然抗体を保有する患者 (約 40%) は治療対象とならず、ウイルス投与に起因する肝障害も報告されている。また、産生される凝固タンパクの抗原値と活性値の乖離も指摘されている。肝細胞のターンオーバーに伴い導入遺伝子の治療効果が長期的に減弱する現象も確認されており治療効果は永続的ではないが、一度治療を受けた患者体内には抗 AAV 抗体が発生するためベクターの再投与は理論上不可能である。以上から、血友病遺伝子治療は当初期待されていたほど万能な治療でないことが分かってきた。このような背景から、従来の製剤治療や遺伝子治療を上回る、すべての血友病 A 患者に適応可能な長期治療効果 (cure) が期待できるユニバーサルな血友病 A 治療法の確立が求められる。本研究では、ユニバーサルな血友病 A 治療法の確立を可能とするものとして、高効率な第 VIII 因子産生能を備える細胞を移植することで体内に治療域の第 VIII 因子タンパクを持続的に供給できる細胞治療の確立に向けた検討を行う。

2. 研究の目的

血友病 A に対するユニバーサル治療としての細胞治療の実現化を目指し、(1) 血友病 A 細胞治療に最適な第 VIII 因子産生細胞の作製、(2) 効率的かつ長期的な細胞生着を可能とする移植法の開発、についての一連の検討を、主にマウスを用いて実施・検証する。

3. 研究の方法

(1) 血友病 A 細胞治療に最適な第 VIII 因子産生細胞の作製

諸研究により、第 VIII 因子 (遺伝子名; *F8*) の産生責任細胞は肝類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells; LSEC) であることが近年有力であることから、この細胞に焦点をあて、ヒト間葉系幹細胞やヒト iPS 細胞からの LSEC の作製を試みる。得られた LSEC について、第 VIII 因子の発現能・産生能を評価する。

(2) 効率的かつ長期的な細胞生着を可能とする移植法の開発

細胞の効果的な移植法について検討する。細胞移植法としては主に、対象細胞を細胞シート化した上でマウスに貼付移植する手法をとる。細胞シート作製には、Cell Seed 社の温度応答性培養皿 UpCell を使用するが、より機能的な細胞シート作製を目指し、温度応答性培養皿の改良も試みる。マウスへの細胞シート移植の際の移植部位としては、背部皮下への細胞シート貼付移植を基本とし、より効率的・長期的な生着が期待できる移植部位の検討も行う。具体的には、凝固因子の本来の産生臓器である肝臓の表面や肝臓ロブ間への貼付移植を試みる。移植後、経時的に部分採血を行い、血漿中の第 VIII 因子レベルを評価するとともに、移植細胞の局在や細胞特性を免疫染色にて確認する。

4. 研究成果

(1) 血友病 A 細胞治療に最適な第 VIII 因子産生細胞の作製

ヒト間葉系幹細胞からの LSEC 分化誘導

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて LSEC 分化を誘導する因子のスクリーニングを実施した。その結果、MSC を 4 種類のサイトカインおよび化合物 (bone morphogenetic protein 4, fibroblast growth factor 8b, transforming growth factor- β signal inhibitor, cyclic AMP) を用いて培養することで LSEC マーカー (LYVE1, CD36, FVIII) の遺伝子発現量が有意に増加した。分化誘導細胞は約 78% が LYVE1 陽性であった。また、分化誘導細胞において、血管内皮細胞に共通の機能である LDL の取り込み、ならびに LSEC 特異的な機能であるヒアルロン酸の取り込みが観察された。さらに、本分化誘導法における由来組織の異なるヒト MSC の分化能を比較した。その結果、骨髄由来 MSC から分化誘導した細胞が、臍帯血および脂肪組織由来の MSC から分化誘導した細胞よりも高い LSEC マーカーの遺伝子発現を示し、本分化誘導法に骨髄由来 MSC が適していることが示唆された。以上の結果から、本分化誘導法によりヒト骨髄由来 MSC から機能的な LSEC が分化誘導可能であることが示唆された (Mitani et al. Regen Ther 2023)。

ヒト iPS 細胞からの LSEC 分化誘導

ヒト iPS 細胞から LSEC 前駆細胞への分化誘導過程初期におけるサイトカイン・化合物の作用条件を改良した分化プロトコルを確立し、LSEC 前駆細胞マーカー (CD34, CD31) の陽性率をフローサイトメトリーにより評価した。さらに、LSEC まで分化誘導を行い、LSEC マーカー (CD32, CD31) の陽性率、及び LSEC 関連の機能評価を実施した。改良した分化誘導法で LSEC 前駆細胞まで分化誘導した細胞は、約 65% の細胞が LSEC 前駆細胞マーカー陽性であった。LSEC まで分化誘導を実施すると、約 50% の細胞が LSEC マーカー陽性であった。また、分化誘導した LSEC 様細胞は、LDL の取り込み、及びマトリゲル上での tube 様構造の形成を示した。さらに、分化誘導した LSEC 様細胞の培養上清から FVIII 抗原が ELISA により検出された (論文投稿中)。

(2) 効率的かつ長期的な細胞生着を可能とする移植法の開発

温度応答性表面の機能化及び血管内皮細胞シート作製への応用

血管内皮細胞シートの効率的な作製を可能とする培養器材を作成することを目指し、ヘパリンを分子末端選択的に温度応答性表面に固定する方法を開発した。まずアジド基を導入した温度応答性培養皿上で、分子末端にアルキン化したヘパリンをクリックケミストリーとして知られるアジド-アルキン環化付加反応 (CuAAC) の条件で処理し、ヘパリン分子末端を温度応答性表面に効率よく固定化した。CuAAC を用いて調製したヘパリン固定化温度応答性表面は、従来法である EDC/NHS 縮合により作成したヘパリン固定表面と比較して、機能的なヘパリンの固定量が多く、ヒト血管内皮コロニー形成細胞 (ECFC) に対して良好な接着性を示した。さらに、作製したヘパリン固定化表面上に塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を結合させると、ECFC の増殖能が向上した。また、通常の UpCell 上で培養したコンフルエント状態の ECFC は、温度低下時に細胞間の結合が破綻し細胞シートが回収できなかったのに対し、bFGF 結合ヘパリン固定化表面上で培養した ECFC は、温度低下により細胞シートを回収可能であった。ヘパリンは様々な生理活性分子と親和性があるため、本手法は様々なタイプの細胞の効率的な培養とシート作製を効率化することができると考えられる (Onodera et al. Macromol Biosci. 2024)。

ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞シートのマウスへの移植

移植細胞は、操作の容易性からヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮前駆細胞 (EPC) (LSEC の前段階にある細胞) を採用し、生体内で LSEC へと自然分化させることを目標とした。作製した EPC シートを免疫不全マウスの肝臓表面に移植したところ、移植 4 週間後の組織学的評価にてヒト CD31 陽性細胞に囲まれた管腔構造が確認された。このことから、移植した血管内皮前駆細胞に由来する血管ネットワークがマウス肝臓表面において形成され、マウス肝臓へ統合されて

いる可能性が示唆された。また、移植後 8 週間後の肝組織切片においては、わずかながらヒト LYVE1 陽性細胞も確認され、移植した血管内皮前駆細胞が FVIII 産生責任細胞である肝類洞内皮細胞へ分化した可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 VandenDriessche T, Tatsumi K, Shima M. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Should patients with haemophilia receive gene therapy? | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Lancet Haematol. | 6. 最初と最後の頁 e722-e723 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S2352-3026(22)00300-3 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Noda Masashi, Tatsumi Kohei, Matsui Hideto, Matsunari Yasunori, Sato Takeshi, Fukuoka Yasushi, Hotta Akitsu, Okano Teruo, Kichikawa Kimihiko, Sugimoto Mitsuhiro, Shima Midori, Nishio Kenji | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Development of alternative gene transfer techniques for ex vivo and in vivo gene therapy in a canine model | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Regenerative Therapy | 6. 最初と最後の頁 347 ~ 354 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.08.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 辰巳公平、三谷成二、小野寺悠、古川千裕、野田正志 | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 血友病に対する遺伝子細胞治療 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 バイオマテリアル—生体材料— | 6. 最初と最後の頁 234-239 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Onodera Yu, Kobayashi Jun, Mitani Seiji, Hosoda Chihiro, Banno Kimihiko, Horie Kyoji, Okano Teruo, Shimizu Tatsuya, Shima Midori, Tatsumi Kohei | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Terminus Selective Covalent Immobilization of Heparin on a Thermoresponsive Surface Using Click Chemistry for Efficient Binding of Basic Fibroblast Growth Factor | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience | 6. 最初と最後の頁 e2300307 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mabi.202300307 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mitani Seiji, Onodera Yu, Hosoda Chihiro, Takabayashi Yoko, Sakata Asuka, Shima Midori, Tatsumi Kohei | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Generation of functional liver sinusoidal endothelial-like cells from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Regenerative Therapy | 6. 最初と最後の頁 274 ~ 281 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.07.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 三谷 成二、小野寺 悠、古川(細田) 千裕、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術開発 |
| 3. 学会等名 第29回肝細胞研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 細田 千裕、三谷 成二、小野寺 悠、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞から肝類洞内皮前駆細胞への効率的な分化誘導法の開発 |
| 3. 学会等名 第69回日本生化学会近畿支部例会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 細田 千裕、三谷 成二、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 リプログラミングによる血管内皮細胞からの血管内皮前駆細胞作製 |
| 3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三谷 成二、小野寺 悠、細田 千裕、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 ヒト骨髓由来間葉系幹細胞から肝類洞内皮細胞への分化誘導技術の開発 |
| 3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 三谷 成二、細田 千裕、小野寺 悠、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞から機能性肝類洞内皮細胞への効率的な分化誘導法の開発 |
| 3. 学会等名 第30回肝細胞研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小野寺 悠、小林 純、嶋 緑倫、岡野 光夫、清水 達也、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 クリックケミストリーによる温度応答性表面の機能化及び血管内皮細胞シート作製への応用 |
| 3. 学会等名 第3回細胞シート工学イノベーションフォーラム |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 細田 千裕、三谷成二、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 化合物を用いたリプログラミングによる血管内皮細胞からの血管内皮前駆細胞作製 |
| 3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小野寺 悠、小林 純、嶋 緑倫、岡野 光夫、清水 達也、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 クリックケミストリーによる温度応答性表面の機能化及び血管内皮細胞シート作製への応用 |
| 3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三谷 成二、細田 千裕、小野寺 悠、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 凝固第VIII因子の分泌能を有するヒトiPS細胞由来肝類洞内皮細胞の効率的な分化誘導 |
| 3. 学会等名 第46回日本血栓止血学会学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 細田 千裕、三谷 成二、嶋 緑倫、辰巳 公平 |
| 2. 発表標題 化合物による血管内皮細胞からのCD34陽性細胞作製 |
| 3. 学会等名 第9回血管生物医学会若手研究会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 堀内久徳 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 東京：エル・アイ・シー | 5. 総ページ数 591 |
| 3. 書名 循環器疾患 2021 上巻 - モデル動物の作製と利用 | |

〔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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 堀江 恭二 (Horie Kyoji) (30333446) | 奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601) | |
| 研究分担者 | 辰巳 公平 (Tatsumi Kohei) (70555432) | 奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601) | |
| 研究分担者 | 坂田 飛鳥 (Sakata Asuka) (90528457) | 奈良県立医科大学・医学部・特任助教 (24601) | |
| 研究分担者 | 小田 朗永 (Oda Akihisa) (80547703) | 奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601) | |
| 研究分担者 | 荻原 建一 (Ogiwara Kenichi) (50623500) | 奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601) | |

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 |
|---------|---------|
| | |