

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09859

研究課題名（和文）移植後生着細胞からのアプローチによる脂肪細胞遺伝子治療製品の移植効率向上研究

研究課題名（英文）Study on improvement of transplantation efficiency of adipocyte gene therapy product by approach from engrafted cells after transplantation

研究代表者

黒田 正幸（Kuroda, Masayuki）

千葉大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00253005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、脂肪組織から天井培養法により調製した前駆脂肪細胞を標的として、ex vivo遺伝子細胞治療の実用化研究を進めている。本研究では、移植後生体内で生存した細胞を取り出し、移植前の細胞と比較することで、生存している細胞がなぜ移植後の環境で生存・生着し得たのかを解明し、細胞の移植環境適応性に基づく新たな移植効率向上に関連した責任遺伝子を同定、さらにその修飾・制御により前駆脂肪細胞移植効率を向上させる新たな原理の確立を目的とした。その結果、移植生着後に重要な役割を担っていると考えられる遺伝子が同定された。今後細胞の特性試験や非臨床動物試験等の安全性試験を経て、実用化につなげていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子治療の分野において、ex vivo遺伝子細胞治療はAAVを用いるin vivo遺伝子治療に比較して、実用化研究が進んでいない。私たちの開発している脂肪細胞を用いたex vivo遺伝子細胞治療は再生医療等安全性確保法下でのFIH臨床研究において、有効性が示唆されている本邦初のシーズである。今後本研究で得られた成果を活用するために解決すべき課題はまだあると考えられるが、患者より採取する脂肪組織量の軽減、移植細胞数の減少に伴うコストカットに繋がるのが期待される。それにより本シーズの汎用性をさらに高めることが可能であるとともに、さらに他の再生医療研究へも応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We are conducting research on the practical application of ex vivo gene/cell therapy using preadipocytes prepared from adipose tissue by ceiling-culture technique. In this study, by extracting cells that survived in vivo after transplantation and comparing them with cells before transplantation, we have elucidated why the survived cells were able to adapt and engraft in the post-transplantation environment. We have tried to identify responsible genes for improving transplantation efficiency based on the adaptability to the transplanted environment, and to establish new principles for improving preadipocyte transplantation efficiency by modifying and regulating them. As a result, we have identified candidate genes that are thought to play important roles after engraftment. In the future, it is planned to lead to practical application through cell characteristics tests and safety tests such as preclinical animal tests.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：脂肪細胞 移植 ex vivo遺伝子治療 天井培養法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療等安全性確保法、改正薬事法が平成 26 年 11 月 25 日より施行され、本邦における再生医療の実用化研究は今後飛躍的に発展することが期待される。これらの再生医療研究の成果は、治験での実証を経て、再生医療等製品として薬事承認を受け、患者に届けられる。再生医療等製品には、iPS 細胞や ES 細胞などの幹細胞製品から、例えば CAR-T 療法 (キムリア) など、体外に取り出した細胞に遺伝子を導入し、体内に戻すことを原理とした *ex vivo* 遺伝子治療製品も含まれる。近年、遺伝子治療の分野は海外において多くの製品が承認されているが、国産のシーズについては、明らかに海外のシーズ開発に遅れを取っている。

申請者らは、前駆脂肪細胞を標的とし、*ex vivo* 遺伝子導入と細胞移植に基づく欠損タンパク質補充療法の開発研究を実施してきた。脂肪細胞に関するがん化の報告は稀であり、移植用細胞として安全性が高いことは、乳房再建技術などの臨床実績からも証明されてきた。脂肪組織からは 2 種類の前駆脂肪細胞を調製することが可能である。一つは、脂肪組織コラゲナーゼ処理・遠心後の沈査 (Stromal vascular fraction、SVF) から調製される接着細胞、いわゆる脂肪幹細胞 (ASC) である。もう一つはコラゲナーゼ処理・遠心後の浮遊分画 (成熟脂肪細胞) から天井培養法により調製される接着細胞であり、申請者らは ceiling culture-derived proliferative adipocyte (ccdPA) と呼び研究開発の対象としてきた。マウス脂肪組織より調製したインスリン遺伝子導入 ccdPA は、糖尿病モデルマウスの移植実験で長期に血糖降下作用を示す (Diabetologia, 2005)。この成果をもとにコンセプト特許「遺伝子治療用初代脂肪細胞」が成立している。さらに遺伝子治療法に最適な細胞 (低平均導入コピー数で高い陽性率) の調製技術を標準化した (TOGTJ, 2011、JDI, 2011、特許第 5806791)。当該技術を難治性疾患の酵素補充療法に応用展開し、千葉大学医学部附属病院未来開拓センターを拠点とし、患者を対象とした First in human 第一種再生医療臨床研究「家族性レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」(2016 年 8 月 8 日付、厚生労働省発医政 0808 第 2 号) を、再生医療等安全性確保法下、実施中である。第一症例において、移植 2 年半後の現在も、治療遺伝子産物である LCAT の分泌が持続しており、さらに合併症に改善が認められている。このシーズの特徴は、治療遺伝子を変更することで、細胞調製・移植法を変えることなく、糖尿病、血友病、ライソゾーム病など、あらゆる全身性の酵素補充療法に適応可能であり、製剤化技術次第で、脳内、硝子体内など局所での治療タンパク質補充も視野に入る。この汎用性から、遺伝子治療の分野において、アデノ随伴ウイルスベクターを直接患者に投与方法、遺伝子導入した血球系 (幹) 細胞を輸注する方法、に続く第 3 の機軸を形成できる本邦発の技術である (CPB, 2018)。

この技術を多様な疾患領域に普及するための大きな課題は、移植効率を如何に向上させるかである。形成外科領域で行われる脂肪移植術においても、生着率は向上の余地が残されている。キムリアの薬価は 3 千万超であり、遺伝子治療製品の医療経済への影響が懸念されている。移植効率の向上により、申請者らが承認を目指す再生医療等製品についても細胞培養・調製スケールの縮小と大きなコストカットが実現でき、患者への侵襲性も低減できる。

これまでの移植効率の向上化に関する研究は、細胞の Hypoxia 曝露、Scaffold の開発、増殖因子の添加など、細胞に刺激や環境変化を積極的に加える手法での検討が行われてきており、申請者も同様の研究を進めてきた。しかし、申請者が通常行っているマウスでの移植試験においても、成績が良い場合で 30% 程度である。さて、生存し得た細胞とそうでない細胞の違いはどこから生まれるのか? このような「問い」から、申請者らは、

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

以下の従来とは異なる手法を用いることにより、移植効率の向上につながる新規原理が確立できるのではないかと本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、移植後生体内で生存した細胞を取り出し、移植前の細胞と比較することで、生存している細胞がなぜ移植後の環境で生存・生着し得たのかを解明し、細胞の移植環境適応性に基づく新たな移植効率向上に関連した責任遺伝子を同定、さらにその修飾・制御により前駆脂肪細胞移植効率を向上させる新たな原理の確立を目的とする(図2)。申請者らの確立した中空系包埋技術(図3)を用いて、細胞をマウスに移植する。生存した細胞を回収し、移植前の細胞と比較することにより、移植後の生体内環境に適応した細胞に特徴的なプロファイルを特定する。移植後の効率的な生着に適したプロファイルを細胞に付与するための方法・原理を考察し、その仮説を細胞培養実験、動物実験において検証する。

3. 研究の方法

マウス及びヒト脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞に治療候補遺伝子を導入し、移植用細胞を準備する。細胞を中空系に包埋し、B6 マウスに中空系を移植する。移植後の中空系を取り出し、生存している細胞を回収し、その細胞の特性を網羅的遺伝子発現解析により移植前の細胞と比較し、生存能に寄与する候補遺伝子を複数同定する。これまでの研究において移植細胞は脂肪分化することから、脂肪分化マーカーを指標に、網羅的遺伝子発現解析に供する検体採取の時期を予備実験で事前に特定する。

同定された遺伝子について RNAi、ゲノム編集実験により、その脂肪細胞における機能を明らかにし、さらに遺伝子発現を制御できる手法を確立する。候補遺伝子産物の性質に応じて、生着性能の優れた細胞集団を獲得できる方法を検討する。(候補遺伝子産物が表面抗原である場合にはセルソーティングなどを検討する。)

以上の解析で確立した遺伝子発現の修飾法を用いて調製した脂肪細胞をマウスに通常移植および中空系移植し、細胞の生着率を評価し、仮説の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 生存に寄与する新規候補遺伝子の同定

健康人ボランティアより調製した前駆脂肪細胞(cddPA)を用いて LCAT 遺伝子導入細胞を調製、中空系に包埋後、B6 マウスへの移植実験を実施した。移植後、脂肪細胞へと分化成熟することを期待する治療法であることから、中空系包埋後の細胞について、脂肪細胞への分化刺激をした群としていない群の 2 群を準備し移植した(図1)。中空系包埋前(pre)、中空系包埋後の分化誘導あり(P)、分化誘導なし(M)、それぞれの中空系を移植 14 日後の細胞(TP および TM)を回収し、RNAseq 解析を実施した。

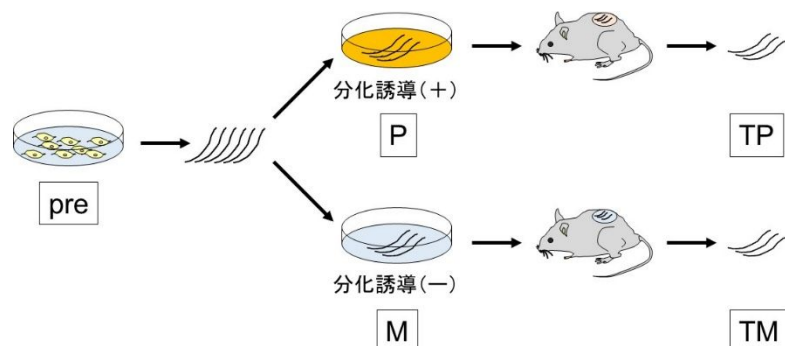


図1. 中空系に包埋した細胞の移植実験

分化誘導刺激に関係なく移植後に発現上昇の認められる遺伝子を検索し、1つの転写制御因子遺伝子(遺伝子A)を同定した(図2)。また、P群ではPPAR 遺伝子発現の発現上昇を認めたものの、TM群、TP群共に認めなかったこと、一方で、過去に我々の報告したアポトーシス関連遺伝子の発現解析(EMM 2012)に基づいて解析したところ、TM群、TP群の検体ではアポトーシスにより誘導される遺伝子群の発現は低下していたことから、採取したTM、TPの細胞集団では、移植部位で、生き残った細胞が、生着に向けてその周囲環境を整備し始めている時期であることが示唆された。

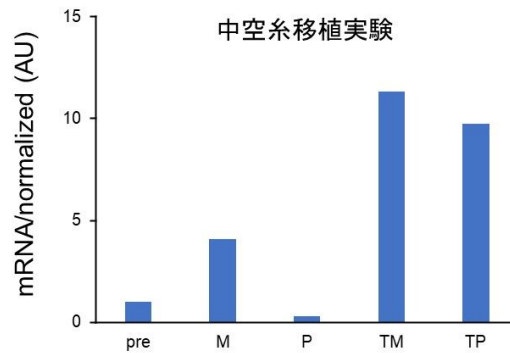


図2. 移植後に発現上昇が認められる遺伝子の同定
AU: arbitrary unit

(2) 遺伝子Aの前駆脂肪細胞における役割の検討

遺伝子Aは転写制御因子であるが、一方で脂肪細胞での機能が十分に解明されていなかったため、レンチウイルスベクターによる過剰発現及びRNAi実験を行うこととした。過剰発現するレンチウイルスベクター及びshRNAを発現するレンチウイルスベクターを構築し、遺伝子導入実験を実施した。遺伝子Aを40倍程度高発現する細胞と発現が50%程度ノックダウンされた細胞を調製することができた(図3)。

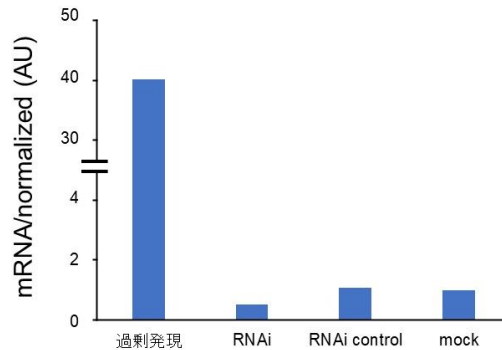


図3. 遺伝子Aの過剰発現細胞とノックダウン細胞の調製
AU: arbitrary unit

調製された細胞を用いてRNAseq解析を実施し、過剰発現細胞、およびノックダウン細胞においてどのような遺伝子発現の変化が生じているかを網羅的に解析した。

過剰発現細胞においては、細胞増殖、分化誘導、アポトーシス等の細胞死に關与する遺伝子群の発現には顕著な変化は認められなかったが、間葉系幹細胞において脂肪細胞への分化誘導に抑制的に働くことが知られている遺伝子Bの発現を対照群に比較して50%程度に抑制されていることが確認された(図4)。

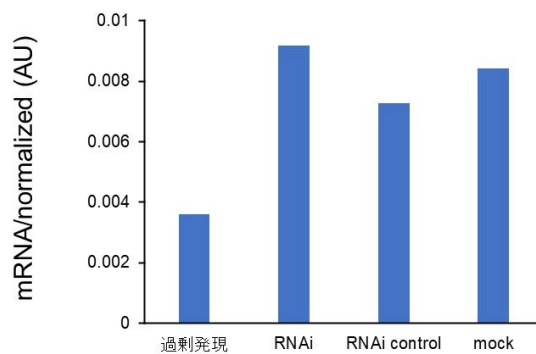


図4. 遺伝子Bの発現に対する遺伝子Aの影響
AU: arbitrary unit

一方ノックダウン細胞においては、TM4SF1、TNFRSF11B、IL15RA等の膜タンパクの発現上昇が認められた。TM4SF1はがん細胞ではアポトーシス感受性に關与し、脂肪細胞ではその細胞のサイズに關与するタンパク質であることが知られている。TNFRSF11B、IL15RAは肥満との關連性が報告されている。また、複数のドナーより調製した細胞において、遺伝子Aの発現とTNFRSF11Bの発現に關連がある可能性が示唆された。検体数が少ないため、さらに解析が必要

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

と考えられる。このように、遺伝子 A の発現を修飾することが用いた前駆脂肪細胞の機能に影響を与えることが示唆された。

(3) 考察

この過剰発現細胞、ノックダウン細胞の遺伝子発現解析と中空系の移植実験における遺伝子発現解析に基づいて、解析検討したところ以下の可能性が考えられた。遺伝子 A 産物は転写制御因子であることから、複数の pathway に影響を与えることが示唆されたものの、その過剰発現細胞では大きな影響を受けた既知の pathway はなかった。既知の論文情報等から、数多くのタンパク質と相互作用することが知られているため、その相互作用が重要な役割を果たしている可能性がある。またアポトーシス実行に関与するユビキチン化関連酵素群の発現を上昇させる傾向があった。一方、ノックダウン細胞では NF- κ B、MAPK、Rap1 等の細胞の生存に寄与する考えられるシグナル伝達経路に関与する遺伝子の発現を少しずつではあるが増加させる傾向があった。細胞の移植部位では、まず移植細胞の細胞死が起こり、その環境下での一部の細胞の生存と移植部位での生着に適した環境構築が起こる必要がある。このような細胞の周囲環境の劇的な変化には多様な pathway が相互に関連しつつ細胞の生着へとつながって行く必要があり、少なくとも本研究で同定した遺伝子が担っているものと考えられる。

今後、過剰発現細胞、およびノックダウン細胞における増殖能、脂肪細胞への分化能、及びマウスへの移植実験等を実施し、遺伝子 A をどのように制御することが生着性の向上に寄与するのかを解明したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kubota Yoshitaka, Nagano Hidekazu, Kosaka Kentaro, Ogata Hideyuki, Nakayama Akitoshi, Yokoyama Masataka, Murata Kazutaka, Akita Shinsuke, Kuriyama Motone, Furuyama Nobutaka, Kuroda Masayuki, Tanaka Tomoaki, Mitsukawa Nobuyuki	4. 巻 321
2. 論文標題 Epigenetic modifications underlie the differential adipogenic potential of preadipocytes derived from human subcutaneous fat tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C596 ~ C606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00387.2020	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 Masuda Takahito, Fujimoto Hiroshi, Teranaka Ryotaro, Kuroda Masayuki, Aoyagi Yasuyuki, Nagashima Takeshi, Sangai Takafumi, Takada Mamoru, Nakagawa Ayako, Kubota Yoshitaka, Yokote Koutaro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 180
2. 論文標題 Anti-HER2 antibody therapy using gene-transduced adipocytes for HER2-positive breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 625 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-020-05581-x	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田正幸、麻生雅是、和田淳、益崎裕章、山本徳男、花岡英紀、齋藤康、横手幸太郎
2. 発表標題 加工脂肪細胞 (GMAC) を用いた遺伝子/再生医療技術による難病治療法の実用化研究
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒田正幸、前澤善朗、山本徳男、三川信之、和田淳、益崎裕章、花岡英紀、麻生雅是、齋藤康、横手幸太郎
2. 発表標題 Familial LCAT deficiency and its treatment by Genetically Modified Adipocytes, GMAC
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 正幸、石川 耕、前澤 善朗、三川 信之、窪田 吉孝、青柳 靖之、浅田 咲世、鬼武 彰宣、切無澤 美香、和田 淳、山本 徳男、花岡 英紀、麻生 雅是、齋藤 康、横手 幸太郎
2. 発表標題 LCAT遺伝子導入脂肪細胞 (LCAT-GMAC) による家族性LCAT欠損症の治療
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	窪田 吉孝 (Kubota Yoshitaka) (10375735)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

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
---------	---------