

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：22790995

研究課題名（和文）自己血管内皮前駆細胞による血友病 A に対する新規細胞療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel cellular therapy for hemophilia A using autologous blood outgrowth endothelial progenitors

研究代表者

松井 英人（MATSUI HIDETO）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00571027

研究成果の概要（和文）：我々はすでに、ex vivo で第Ⅷ因子遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞(Blood Outgrowth Endothelial Progenitor Cells：BOECs)による細胞療法を血友病 A マウス実験モデルで確立し、移植に伴う免疫応答の回避に成功した。本研究プロジェクトでは、これまでの研究成果を臨床展開に直結させるべく、よりヒトに近いと考えられる血友病 A イヌ実験モデルでの自己血管内皮前駆細胞を用いた細胞療法の確立を目標とした。現在血友病 A イヌでの移植実験を行う前段階まで到達した。

研究成果の概要（英文）：We have established ex vivo gene transfer system using genetically-modified blood outgrowth endothelial progenitor cells (BOECs) which are capable of synthesizing therapeutic levels of plasma FVIII over a prolonged time periods.<sup>20</sup> Using this ex vivo gene transfer strategy, we can provide for the safe and efficacious delivery of FVIII following subcutaneous implantation of BOECs in hemophilia A mouse model. Now, we would like to try this strategy in hemophilia A dog model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学

## 1. 研究開始当初の背景

血友病 A に対する治療法として、血漿由来または遺伝子組み替え第Ⅷ因子製剤の輸注療法が確立されている。しかしながら、治療薬の第Ⅷ因子製剤は極めて高価であり、我が国の医療財政を著しく圧

迫している現状である。また、過去に血液製剤による肝炎や HIV 感染症が社会問題となった歴史的背景からも、さらに安全かつ有効な次世代の治療法として、遺伝子治療ならびに細胞療法の確立が期待されている。現在、北米を中心に血友病

B に対して第 IX 因子発現ウイルスベクターを全身投与する臨床試験が行われているが、ウイルスベクターに対する免疫応答が原因で、十分な治療効果は得られていない。我々はすでにカナダクイーンズ大学との共同研究で、ex vivo で第 VIII 因子遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞 (Blood Outgrowth Endothelial Progenitor Cells: BOECs) による細胞療法を血友病 A マウス実験モデルで確立し、移植に伴う免疫応答の回避に成功している。

## 2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、これまでの研究成果を臨床展開に直結させるべく、よりヒトに近いと考えられる血友病 A イヌ実験モデルでの自己血管内皮前駆細胞を用いた細胞療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

まず第 VIII 因子を発現させたイヌ BOECs をイヌモデルでの実験に向けてその有用性を in vitro で十分に評価する。その後本格的にイヌ実験モデルを用いて細胞移植実験を行い、長期間にわたって第 VIII 因子活性ならびに同種抗体などの発生を含めた細胞療法の治療効果について詳細に検討する。

## 4. 研究成果

①まず 4 匹の血友病イヌから BOECs の単離培養に成功した (図 1)。

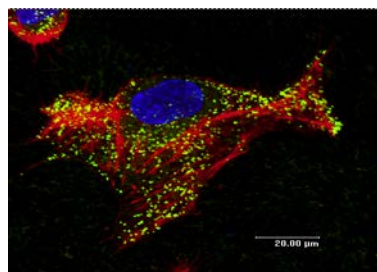


図 1. イヌ BOECs の免疫染色写真

②発現を制御するプロモーターが異なる 4 種類のイヌ第 VIII 因子発現レンチウイルス

ベクタープラスミドを構築し、全てにおいて高力価 ( $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  IU/ml) のウイルスベクターの作製が可能であった。そのうち新たに作製した EF1- $\alpha$ -EPCR promoter が最も高い発現を認めた (図 2)。

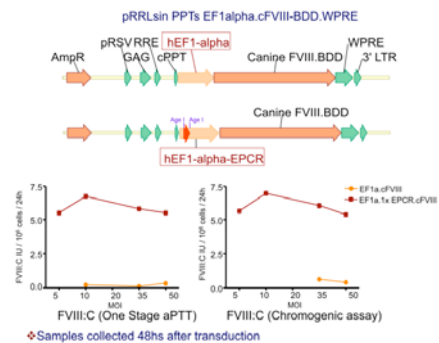


図 2. In vitro 実験系での cFVIII 発現

③GFP 陽性 BOECs をマトリゲルと共にマウス皮下へ移植すると、BOECs は生着し、血管内腔構造へと変化した (図 3)。

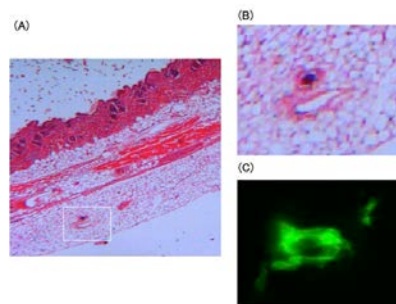


図 3. (A) (B) マウス皮下へ移植された BOECs は生着した。(C) 生着した BOECs は血管内皮細胞へと分化し、血管内腔構造をとった。

④BOECs をマトリゲル、FGF、フィブリンノーゲンと共にマウス皮下に移植すると、さらに多数の血管内腔構造を形成した (図 4)。

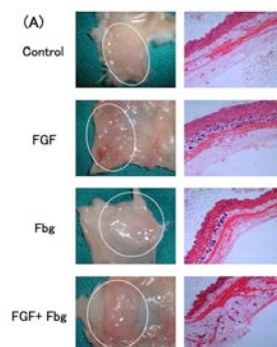


図 4. BOECs をマトリゲル、FGF、フィブリンノーゲンと共に皮下移植すると、多数の血管

内腔構造を形成した。

これらの結果をふまえ、現在血友病 A イヌへの移植実験を計画中である。

#### 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 4 件)

1. Matsui H: Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A.

**International Journal of Hematology** 95(2): 119-124, 2012

2. 松井英人: microRNA制御レンチウイルスベクターによる肝臓特異的の第Ⅷ因子誘導: 血友病 A インヒビターに対する新規免疫寛容導入アプローチ.

**日本血栓止血学会誌** 22(6): 377-383, 2011

3. Matsui H, Hegadorn C, Ozelo M, Burnett E, Tuttle A, Labelle A, McCray PB Jr, Naldini L, Brown B, Hough C, Lillicrap D: A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vectors mediated stable expression of FVIII in murine model of hemophilia A.

**Molecular Therapy** 19(4): 723-730, 2011

4. Thakur A, Sengupta R, Matsui H, Lillicrap D, Jones K, Hortelano G: Characterization of viability and proliferation of alginate-poly-L-lysine alginate encapsulated myoblasts using flow cytometry.

**Journal of Biomedical Material Research** 94B(2): 296-304 2010

[学会発表] (計 6 件)

1. Hideto Matsui, David Lillicrap, Mitsuhiko Sugimoto, Midori Shima.

Immune tolerance induction to FVIII in hemophilia A using autologous endothelial progenitors.

The 2nd Meeting of Asian Cellular Therapy Organization

2011 年 10 月 19 日, Miyazaki, Japan

2. 松井英人、David Lillicrap、杉本充彦、嶋緑倫

自己血管内皮前駆細胞移植による血友病 A インヒビターに対する新規免疫寛容導入療法

第 73 回日本血液学会学術集会

2011 年 10 月 16 日, 名古屋市

3. Hideto Matsui

Stem cell-based gene therapy for hemophilia A

The 7<sup>th</sup> Aso International Meeting

2011 年 7 月 30 日, Kumamoto, Japan

4. Hideto Matsui, David Lillicrap, Mitsuhiko Sugimoto, Midori Shima.

Long-term phenotypic correction of hemophilia A mice following injection of miRNA-regulated lentiviral vectors.

6<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis

2010 年 10 月 14 日, Bali, Indonesia

5. Hideto Matsui, Margareth Ozelo, Andrea Labelle, Carol Hegadorn, Patrick Thompson, Erin Burnnet, Christine Hough, David Lillicrap.

Sustained therapeutic levels of FVIII activity from lentivirally-engineered

blood outgrowth endothelial cells  
requires cell stability and augmented  
angiogenesis.

The 13<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society  
of Gene and Cell Therapy

2010年5月21日, Washington DC, USA

6. 松井 英人, 杉本 充彦, デービット・リ  
リクラブ, 柴田 優, 嶋 緑倫

第Ⅷ因子発現レンチウイルスベクターによる  
血友病A インヒビターに対する新規免疫寛容  
療法

第33回日本血栓止血学会学術集会  
2010年4月23日, 鹿児島市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松井 英人 (MATSUI HIDETO)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00571027

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし