

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591427

研究課題名(和文) 血友病治療に対する人工多能性幹細胞の応用

研究課題名(英文) Application of iPSCs for hemophilia therapy

研究代表者

大森 司 (Ohmori, Tsukasa)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：血友病に対する人工多能性幹細胞(iPSC)を用いた細胞治療の開発を検討した。C57BL/6間葉系幹細胞に山中4因子を導入し、iPS細胞を得た。レンチウイルスベクターを用いて血液凝固第VIII因子(FVIII)を遺伝子導入し、30-100%の凝固因子活性をもつiPS細胞株を樹立した。この細胞をヌードマウスに皮下投与を行うと奇形腫の形成に伴い、血中の凝固因子抗原量がヒト治療域に達した。EF1プロモーターがiPS細胞で長期にわたり安定して遺伝子を発現することを明らかとした。血友病BマウスiPS細胞を樹立し、キメラ系性能を確認した。この樹立したiPS細胞からFIXを強発現する細胞株を得た。

研究成果の概要(英文)：We focused on the use of iPSCs for cell-based therapy of hemophilia. We generated iPSCs from mesenchymal stem cells isolated from C57BL/6 mice. The mouse iPSCs were generated through the induction of four Yamanaka transcription factor genes. The iPSCs released functional coagulation factor VIII (FVIII) following transduction with a lentiviral vector. The subcutaneous transplantation of iPSCs expressing FVIII into nude mice resulted in teratoma formation, and significantly increased plasma levels of FVIII. The plasma concentration of FVIII was at levels appropriate for human therapy at 2–4 weeks post-transplantation. We next examined which promoter was suitable for the production of coagulation factor from iPSCs, and found that EF1alpha promoter stably drove transgene in iPSCs. We also developed iPSCs from FIX-deficient mouse fibroblasts by sendai virus vector. The established iPSCs had a potency to produce chimeric mouse, and could produce functional FIX after the transduction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血栓・止血学

キーワード：遺伝子細胞治療 血友病 人工多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

血友病は血液凝固第 VIII 因子 (FVIII), または第 IX 因子 (FIX) の先天性遺伝子異常による出血性疾患である。先天性出血性疾患としては最も頻度が高く, 中でも血友病 A (FVIII 異常) が血友病 B の 5 倍の有病率である。血友病の治療は濃縮凝固因子製剤の投与が一般的である。しかし, 製剤の半減期は短く, 出血の予防・治療には頻回の投与が必要であり, 新規治療法の開発が必要である。

現在の血友病治療の問題点を解決するために遺伝子細胞治療法が進められている。血友病は, 血中凝固因子レベルの治療域が広く, また単一の遺伝子異常であることから, 遺伝子治療のよい対象疾患と考えられてきた。血友病に対する遺伝子治療には大きく分けて 2 つのアプローチが存在する。ひとつは遺伝子発現ベクターを直接体内に投与する方法である。もう一つは ex vivo で遺伝子導入を行った細胞を細胞移植の手法で体内に移植する細胞移植治療である。前者のアプローチにはアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) が最も用いられており, すでにヒトを対象とした第一相臨床試験が欧米で行われている。一方, 細胞治療については大きなブレイクスルーに至っていない。

2. 研究の目的

本研究では現行の血友病治療法が抱える問題点を解決する手法として細胞治療に着目し, 中でも自己の細胞を無限に増やすことが可能な人工多能性幹細胞 (iPSC) を用いた細胞治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) iPSC の樹立: ワイルドタイプマウス (C57/BL6J) より骨髓付着型細胞から間葉系幹細胞 (MSC) を樹立した。樹立した MSC は CD44 陽性, Stem Cell Angigen (Scal) 陽性を確認した MSC に山中 4 因子 (c-Myc, Sox2, Klf4, Oct3/4) を発現するプラスミド (Addgene) を Nucleofection により導入した。導入した細胞をマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) フィーダー細胞上に播種し, 1 か月後に ES 細胞様のコロニーをピックアップした。FIX ノックアウトマウス (血友病 B マウス) からの iPSC はセンダイウイルスベクターを用いて iPSC 細胞を誘導した (Cytotune iPSC, DNAVEC Corp.)。

2) iPSC 細胞の培養: マウス iPSC 細胞は Knock-out DMEM (Invitrogen) に 15% ウシ血清, モノチオグリセオール, NEAA, LIF (1 x 10³/ml) 存在下で培養を行った。

3) レンチウイルスベクター: 自己不活性化型の第 3 世代レンチウイルスベクターであるサル免疫不全ウイルスベクター (SIV) を用いた。遺伝子発現ベクターと共に Rev, VSV-G, Gag/pol を発現するベクターを同時に

HEK293T 細胞にトランスフェクションし, その上清を超遠心してウイルスベクターを濃縮し実験に用いた。ウイルスベクターのタイトルは UT-7/TPO 細胞株を用い, 感染後 48 時間の細胞 DNA にインテグレーションされるプロウイルス量を定量化し, EGFP 発現ベクターのそれと比較する形で算出した。

4) FVIII 活性・抗原量の測定: FVIII 活性 (FVIII:C) は凝固一段法により測定した (Sysmex 社 CA500)。FVIII 抗原量 (FVIII:Ag) は ELISA 法 (Diagnostica Stago 社) を用いた。

5) 奇形腫の発生: iPSC 細胞 (1 x 10⁶ 細胞) をヌードマウスに皮下移植を行った。

4. 研究成果

1) iPSC の樹立: 山中 4 因子を導入した MSC はより ES 様の細胞を得た。得られた細胞は c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nagnog などの初期化因子 mRNA が陽性であった (図 1)。また, 得られた細胞をヌードマウスに皮下投与したところ, 3 胚葉への分化を認める奇形腫を形成した (図 2)。以上より得られた細胞をマウス iPSC 細胞として用いた。

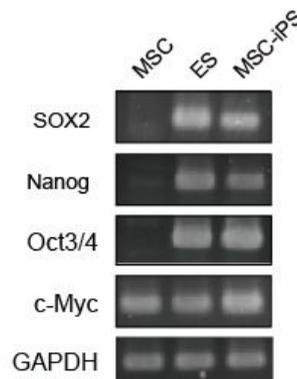


図 1 プラスミドトランスフェクションで得られた iPSC 細胞の初期化因子 mRNA の発現。

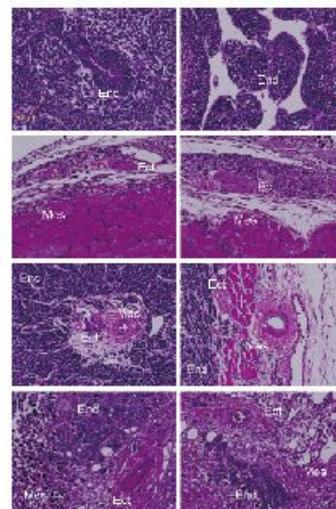


図 2 iPSC 由来奇形腫の形成 3 胚葉への分化を組織学的に確認した。

2) iPS 細胞からの FVIII 産生 : CAG プロモーターの下流で FVIII を発現する SIV ベクターを作成し、これをマウス iPS 細胞に感染させた。iPS 細胞はベクター用量依存性に上清に FVIII を産生した (図 3)。その後、FVIII 産生の良いクローンを 3 つ選択した (図 4)。

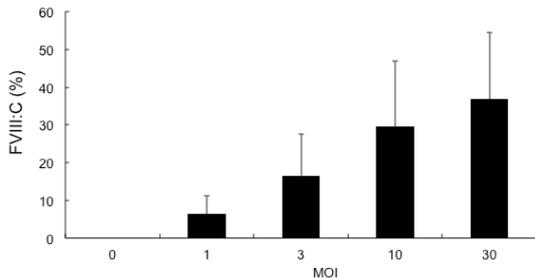


図 3 iPS 細胞からの FVIII:C 発現 MOI 依存性に FVIII の産生を認める。

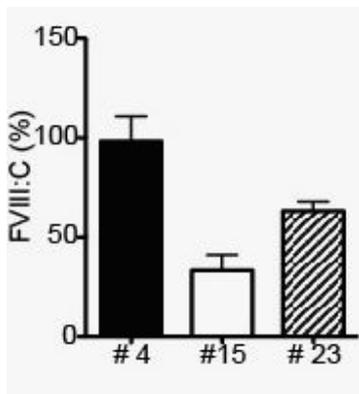


図 4 FVIII 発現 iPS クローンの選択

3) ノードマウスへの FVIII 発現 iPS 投与 : 上記の FVIII 産生クローンをノードマウスに皮下移植し、経時的に採血を行い血中のヒト FVIII:Ag を測定した。皮下移植後、奇形腫の形成と共に、徐々に FVIII:Ag は上昇し 4 週後にヒト血友病 A の治療域に達した (図 5)。

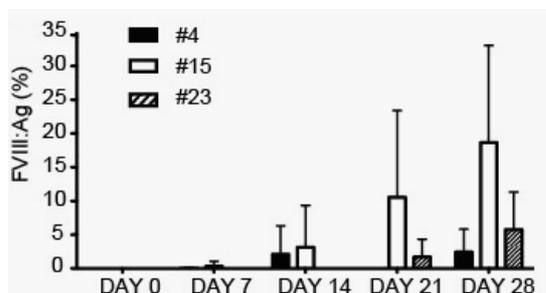


図 5 FVIII 発現 iPS 細胞移植後のノードマウス血中 FVIII:Ag の変化

4) FIX K/O ノックアウトマウス iPS の樹立 : FIX マウスの皮膚線維芽細胞にセンダイウイルスベクターを感染させ、iPS 細胞を樹立した。得られた iPS 細胞はワイルドタイプマウスの iPS 細胞同様に初期化因子が陽性であることを確認した (データ未提示)。また、キメラ型性能を保持していた (図 6)。



図 6 FIX ノックアウトマウス由来 iPS のキメラ形成能

5) iPS 細胞に適したプロモーターの選択 : CMV, CAG, EF1alpha, Ubiquitin (Ubc) プロモーターにより EGFP を発現しうる SIV ベクターを作成した。iPS 細胞に感染後に経時的に EGFP の発現を確認した。CMV, CAG プロモーターでは徐々に EGFP 発現が消失するクローンが多いのに対し、EF1alpha プロモーターや Ubc プロモーターでは EGFP の発現が持続した。中でも EF1 プロモーターが発現効率の面からは優れていた (データ未提示)。

6) FIX 発現 iPS 細胞の作成 : EF1alpha プロモーターの下流で FIX と EGFP を同時に発現する SIV ベクター、もしくは EF1alpha プロモーターの下流で EGFP 発現する SIV ベクターを感染させ、FIX、および EGFP を高発現する iPS クローンを得た。

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 7 件)

- 1) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* . 2014;20:e40-44..

- 2) Yasumoto A, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Mimuro J. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thromb Res.* 2013;131:444-449.
- 3) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y. Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver With Adeno-associated Virus 8 Vectors. *Mol Ther.* 2013; 21: 318-323.
- 4) Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim IK, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B. *Hum Gene Ther.* 2013;24:283-294.
- 5) Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One.* 2012;7:e49450.
- 6) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1802-1813.
- 7) Madoiwa S, Kobayashi E, Kashiwakura Y, Sakata A, Yasumoto A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Immune response against serial

infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 2012;18:e323-330.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 大森 司 : Development of a cell-based therapy for treating hemophilic arthropathy by local injection of transduced MSCs. 第35回日本血栓止血学会学術集会. 山形, 2013.5/30-6/1.
- 2) 柏倉 裕志、三室 淳、大西 彰、岩元 正樹、窓岩 清治、淵本 大一郎、鈴木 俊一、鈴木 美佐枝、千本 昭一郎、石渡 彰、安本 篤史、坂田 飛鳥、大森 司、橋本 径子、矢崎 智子、坂田 洋一：血友病Aクローンブタ 第35回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形 日本血栓止血学会誌(0915-7441)24巻2号 Page227(2013.04)
- 3) 柏倉裕志、大森 司、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：人工多能性幹細胞を用いた新規血友病治療法に対する基礎的検討 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都(10/20発表)
- 4) 水上浩明、三室 淳、塚原智典、卜部匡司、久米晃浩、大森 司、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也：Dose-response relationship of factor IX expression in non-human orimates using AAV8-based vector 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都(10/20発表)
- 5) 柏倉裕志、大森 司、三室 淳、安本篤史、石渡 彰、坂田飛鳥、窓岩清治、井上誠、長谷川 護、小澤敬也、坂田洋一：FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内移植は血友病 A マウスの血友病性関節症を改善する 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京

- 6) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J,
Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, Madoiwa
S, Inoue M, Hasegawa M, Watanabe N,
Tatsumi K, Ohashi K, Okano T, Sakata
Y: Intra-articular injection of autologous
mesenchymal stem cells ameliorates
hemophilic arthropathy in factor
VIII-deficient mice. ISTH2011.XXIII
Congress of the International Society on
Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual
SSC Meeting. 2011.7/25(7/23-28.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 司 (OHMORI, Tsukasa)
自治医科大学・分子病態治療研究センター
分子病態研究部・講師
研究者番号：70382843

(2) 研究分担者

窓岩 清治 (MADOIWA, Seiji)
自治医科大学・分子病態治療研究センター
分子病態研究部・講師
研究者番号：70296119

(3) 連携研究者

該当なし