

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591430

研究課題名(和文) 血友病Aインヒビター制御を目的とした人工多能性幹細胞の応用

研究課題名(英文) Development of novel thymus-directed strategy for central immune tolerance induction in hemophilia A

研究代表者

窓岩 清治 (MADOIWA, Seiji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70296119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血友病Aインヒビターの制御を目的に、血友病AマウスからiPS細胞を作製し、第VIII因子遺伝子を導入後に、胸腺髄質上皮細胞へ分化させた上で胸腺へ移植した。その結果、この細胞移植療法により第VIII因子に対するインヒビターの発生が抑制できることを明らかにするとともに、インヒビターの発生に関わる複数の免疫応答遺伝子群を特定し得た。

研究成果の概要(英文)：Hemophilia A is an X-linked, recessive hereditary bleeding disorder due to deficient coagulation factor VIII (FVIII). However, about 30% of patients with severe deficiency develop inhibitors or circulating alloantibodies against infused factor VIII. Once an inhibitor develops, treatment of bleeding episodes is quite difficult due to partial or complete lack of efficacy of replacement therapy. Immune tolerance induction (ITI) by prolonged administration of FVIII concentrates is currently the only therapy proven to eliminate persistent inhibitors in severe hemophilia A. In this project, we investigated central ITI by thymic implantation of epithelial progenitor cells derived from induced pluripotent stem (iPS) cells, which will be isolated from fibroblasts of congenic hemophilia A mice and transduced with the SIV encoding FVIII.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血友病 インヒビター 免疫寛容 人工多能性幹細胞 遺伝子治療 細胞移植療法 胸腺上皮細胞

1. 研究当初の背景

(1) 血友病A患者は、欠乏している第VIII因子の補充を目的とした第VIII因子製剤の家庭内自己注射療法の普及により、関節内出血や筋肉出血などの重篤な出血症状から解放されるようになった。しかしながら第VIII因子製剤の反復投与により5-30%の頻度で抗第VIII因子同種抗体(第VIII因子インヒビター)が発生する。第VIII因子インヒビターを有する血友病A患者は、第VIII因子製剤による止血効果が著しく低下するために致死的な出血の危険性に晒されている。第VIII因子インヒビター陽性血友病A患者に対する免疫寛容誘導療法 (immune tolerance induction therapy; ITI 療法)は、大量の第VIII因子製剤の頻回投与によりインヒビターの消失をはかる特異的かつ根治を目指した治療法である。現在の血友病臨床においてインヒビターの制御方法は克服すべき重要課題であり、副作用や医療経済効率などの観点を考慮した新たな免疫寛容誘導法が模索されている。血友病Aに対する免疫寛容は、CD40-CD40L など副反応系路を遮断する方法 (Peng B, Blood 2008) や、自然免疫に關与する Toll like receptor の制御による非特異的方法が報告されている (Allacher P, et al. Blood 2010)。本研究のような特異的免疫寛容を誘導する観点から iPS 細胞を用いた細胞療法の研究は世界的にみてもユニークな方策であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は血友病Aインヒビターの制御を主目的とし、血友病Aマウス個体において中枢性免疫組織である胸腺組織を標的に自己体細胞由来 iPS 細胞を超高解像度超音波システム下での直接的な細胞治療移植が抗原特異的な免疫寛容をもたらす、インヒビターの発症を予防する可能性を探る。特に、血友病Aマウスモデルから樹立した iPS 細胞による胸腺組織の再構築に主眼を置き、第VIII因子の遺伝子導入法、in vivo イメージングによる胸腺組織への選択的細胞移植手法を組み入れ、抗原特異的な中枢性免

疫寛容へ到る可能性を探索し、その成立機序を検証する。

本研究で得られる新知見は、体細胞の再プログラミングにより血友病Aインヒビターの発症予防を目的とした新規治療法の開発に繋がるとともに、臨床的には血友病患者自身の体細胞から作製した iPS 細胞を免疫寛容誘導に用いることにより、移植 iPS 細胞自身の拒絶を回避できるという優位性をもたらす。特に第VIII因子インヒビター発症のハイリスク群である重症型血友病Aの遺伝子型を保因する男児や既にインヒビター陽性血友病A患者に対して、自己 iPS 細胞由来胸腺上皮細胞を標的とした細胞治療法により第VIII因子に対する免疫寛容を成立させ得るならば、血友病インヒビター発症の予防のみならずインヒビターに対する特異的な新規治療という観点からも臨床的意義が大きい。

3. 研究の方法

1) 血友病Aマウスの皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立と胸腺上皮細胞 *in vitro* 分化誘導系の確立:(1) 成体血友病Aマウスの皮膚線維芽細胞を単離し、初期化因子遺伝子 (OCT3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入し血友病Aマウス由来 iPS 細胞を樹立した。(2) iPS 細胞を hanging drop 法により embryonic body を形成させた後に、コラーゲン Dish 上で FGF-7, FGF-10 および BMP-44 等の存在下で培養し、胸腺上皮細胞へ分化誘導した。

2) 遺伝子導入用 SIV ウイルスベクターの構築: サル免疫不全ウイルス (SIV) 由来ベクターを基本骨格として、5'側上流に CMV、EF-1alpha、および autoimmune regulator (AIRE)、cadherin 5、CD68 などの細胞特異的プロモーターを配置し、ヒト完全長第VIII因子 cDNA、eGFP および luciferase cDNA を組み込んだコンストラクトを構築した。

3) iPS 細胞由来 mTE 細胞の胸腺組織への選択的移植と免疫応答能の検証:(1) VEVO 超音波システムとマイクロインジェ

クター併用法により、マウス個体への低侵襲下で胸腺組織へ選択的な細胞移植を実施した。(2) iPS 細胞由来 mTE 細胞の移植マウスに対して、第 VIII 因子の反復刺激により生じる抗第 VIII 因子抗体を定量し免疫寛容誘導の有無を判定した。(3) マウス免疫組織から CD4+細胞を単離し、第 VIII 因子感作マウス由来抗原提示細胞共存下で精製第 VIII 因子抗原に対する応答能を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、自治医科大学生命倫理委員会の定める動物実験指針の基づき立案され、同倫理委員会により審査、承認(承認番号: 第 140146 号)されたものである。

4. 研究結果

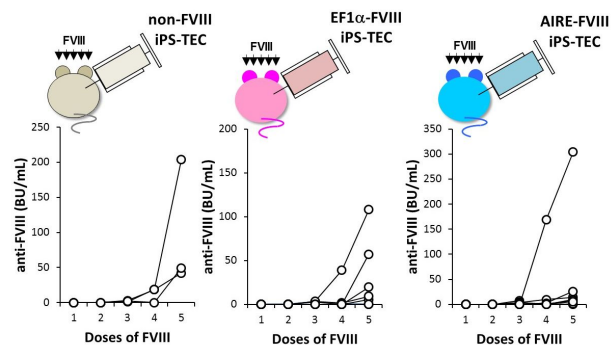
1) 血友病 A マウス由来 iPS 細胞の樹立と第 VIII 因子遺伝子導入法の確立:(1) 樹立した血友病 A マウス由来 iPS 細胞は、ALP 染色、FACS による SSEA-1 発現、Nanog, ERas, Rex1, Oct3/4, Fbx, Esg1 の遺伝子発現をマウス ES 細胞および B6 マウス由来 iPS 細胞と比較することにより検証した。(2) 血友病 A マウス由来 iPS 細胞を *in vitro* で胸腺上皮への分化誘導を行ない、EpCAM および PDGFRalpha 等の表面抗原の発現動態から mTE 細胞様への分化が可能であることを見出した。

2) SIV ウイルスベクターの構築と導入遺伝子の発現解析: 血友病 A マウス由来 iPS 細胞に対して、EF-1alpha プロモーターを用いることにより第 VIII 因子の持続的な高発現細胞が得られること、胸腺上皮細胞株 IT-76MHC 細胞に対して AIRE プロモーターにより特異的な発現が得られることを明らかにした。

3) iPS 細胞由来 mTE 細胞の胸腺組織への選択的移植と免疫応答能の検証:(1) 第 VIII 因子や e-GFP や luciferase などのマーカー遺伝子を組み込んだ SIV ベクターを用いて iPS 細胞に遺伝子後、*in vitro* で胸腺上皮細胞へ分化させたうえで、セルソーターにより EpCAM+PDGFRalpha+分画を

分取し、第 VIII 因子非暴露血友病 A マウス個体の胸腺組織へ選択的に細胞移植を行った。マウス個体に対する IVIS による luciferase 発現および胸腺組織の蛍光免疫法による eGFP の発現より、血友病 A マウス胸腺に移植した mTE 細胞が生着することを確認できた。(2) 第 VIII 因子を遺伝子導入した iPS 細胞を胸腺移植した血友病 A マウスは、iPS 細胞のみの移植マウスと比較して、第 VIII 因子反復刺激後の抗第 VIII 因子価が低下していた (24.8 ± 37.0 vs 98.9 ± 69.1 BU/mL, $p=0.025$) (図 1)。(3) 第 VIII 因子を遺伝子導入した iPSC の胸腺移植により第 VIII 因子に対する免疫寛容誘導状態と血友病 A マウスの胸腺、脾臓およびリンパ節の比較定量を Immune Array panel により行い、発現増加を示す免疫応答遺伝子群 (CD40Ig) 発現低下を示す遺伝子群を (IL17, IL6, EDN1, CSF3, IL2, IL13, IFN gamma, IL1alpha) を特定することができた。

図 1 . iPS 細胞の遺伝子細胞療法によるインヒビター制御



本研究における免疫応答の制御を目的とした胸腺標的遺伝子細胞療法は、自己体細胞由来 iPS 細胞を用いることにより移植細胞自身の拒絶を回避しながら抗原特異的免疫寛容を誘導し得ると考えられる。iPS 細胞や mTE 細胞の精度の高い純化法や効率性の改善などが臨床応用に向けた課題である。本研究は、血友病インヒビター発症の予防とともに抗原特異的な新規免疫寛容誘導療

法などの血友病研究の基盤となるものと考えられる。

5 . 主な発表論文

1. Madoiwa S. Endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *J Intensive Care*. 2015;3(8):1-8.

2. Watanabe H, Kikkawa I, Madoiwa S, Sekiya H, Hayasaka S, and Sakata Y. Changes in blood coagulation-fibrinolysis markers by pneumatic tourniquet during total knee joint arthroplasty with venous thromboembolism. *The Journal of arthroplasty*. 2014;29(3):569-73.

3. Wada H, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis DICs, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, and Seki Y. Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan". *Thrombosis research*. 2014;134(4):924-5.

4. Sanada Y, Sasanuma H, Sakuma Y, Morishima K, Kasahara N, Kaneda Y, Miki A, Fujiwara T, Shimizu A, Hyodo M, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Ihara Y, Urahashi T, Madoiwa S, Mimuro J, Mizuta K, and Yasuda Y. Living donor liver transplantation from an asymptomatic donor with mild coagulation factor IX deficiency: report of a case. *Pediatric transplantation*.

2014;18(8):E270-3.

5. Sakata A, Ohmori T, Nishimura S, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, and Sakata Y. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thrombosis journal*. 2014;12(1):1.

6. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, and Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *Journal of medical virology*. 2014;86(11):1990-7.

7. Koyama K, Madoiwa S, Nunomiya S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, and Sakata Y. Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study. *Critical care*. 2014;18(1):R13.

8. 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 : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2014;20(1):e40-4.

9. Yasumoto A, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T,

- Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, and Mimuro J. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thrombosis research*. 2013;131(5):444-9.
10. Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, and Sakata Y. Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(2):318-23.
11. Makino N, Madoiwa S, Ohmori T, Katoh K, Ookawara S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Ichimura K, and Sakata Y. Tissue plasminogen activator deficiency promotes early phase regeneration in the olfactory epithelium after bullectomy. *International forum of allergy & rhinology*. 2013;3(6):458-67.
12. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, and Mimuro J. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thrombosis research*. 2013;132(4):457-64.
13. Koyama K, Madoiwa S, Tanaka S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Nunomiya S, and Sakata Y. Evaluation of hemostatic biomarker abnormalities that precede platelet count decline in critically ill patients with sepsis. *Journal of critical care*. 2013;28(5):556-63.
14. Hosoya Y, Matsumura M, Madoiwa S, Zuiki T, Matsumoto S, Nunomiya S, Lefor A, Sata N, and Yasuda Y. Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. *Surgery today*. 2013;43(6):670-4.
15. Ashizawa M, Kimura S, Wada H, Sakamoto K, Sato M, Terasako K, Kikuchi M, Nakasone H, Okuda S, Kako S, Yamazaki R, Oshima K, Matsuura K, Ohmori T, Madoiwa S, Nishida J, Mimuro J, Tabei K, Sakata Y, and Kanda Y. Acquired factor V inhibitor associated with life-threatening bleeding and a mixing test result that indicated coagulation factor deficiency. *Hematology*. 2013;18(5):300-4.
16. Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, Mikawa S, Hashimoto M, Aoki Y, Najima Y, Takagi S, Suzuki N, Suzuki E, Kubo M, Mimuro J, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Sakata Y, Perry AC, Ishikawa F, et al. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell stem cell*. 2012;10(6):753-8.
17. Ohmori T, Yano Y, Sakata A, Ikemoto T, Shimpo M, Madoiwa S, Katsuki T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, and Sakata Y. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during

dual anti-platelet therapy. Thrombosis research. 2012;129(4):e36-40.

18. Norimatsu Y, Ohmori T, Kimura A, Madoiwa S, Mimuro J, Seichi A, Yatomi Y, Hoshino Y, and Sakata Y. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. The American journal of pathology. 2012;180(4):1625-35.

19. Makino N, Ookawara S, Madoiwa S, Ohta Y, Ishikawa T, Katoh K, Takigami S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Sakata Y, and Ichimura K. Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bulbectomy. The Journal of laryngology and otology. 2012;126(11):1114-20.

20. Madoiwa S, Kobayashi E, Kashiwakura Y, Sakata A, Yasumoto A, Ohmori T, Mimuro J, and Sakata Y. Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2012;18(3):e323-30.

21. 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. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2012;10(9):1802-13.

〔雑誌論文〕 (計 21件)

〔学会発表〕 (計 38件)

〔図書〕 (計 36件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

窓岩 清治 (MADOIWA, Seiji)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：70296119

(2)研究分担者

小林 英司 (KOBAYASHI, Eiji)
自治医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：00245044

大森 司 (OHMORI, Tsukasa)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：70382843