

平成 31 年 1 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461440

研究課題名(和文) 遺伝子導入血小板を用いた新規血管再生治療の開発

研究課題名(英文) Genome Editing of Eucleating Progenitor Cells to Achieve Safe and Effective Therapeutic Neovascularization

研究代表者

舘野 馨 (TATENO, Kaoru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20532758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動脈硬化等のために四肢に十分な血流が行き届かない状態を改善する、血管再生治療の効果改善を目的とした基礎研究である。治療効果改善に重要な分子をiPS細胞に遺伝子導入した後、血小板へ分化させ、患肢に注射する治療法であるが、血小板へ分化する過程で細胞核と同時に導入遺伝子が取り除かれることから、安全性の高い治療法になると期待される。今回までに十分な量の血小板を得ることができなかったが、予定より少量を投与する予備実験を行い、統計学的に優位ではないものの、虚血肢血流および組織再生の改善傾向を得ることができた。本研究は別途資金により継続し、臨床応用を目指したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The project was intended to improve the efficacy of therapeutic neovascularization, which mends limb ischemia due to atherosclerosis and similar illness that obstruct blood perfusion. We found a molecule that improve neovascularization, and introduced its gene into iPS cells. They were differentiated into platelets, and injected into ischemic limb. During this differentiation process, cell nucleus containing introduced gene are eliminated, making the therapy safer than the ordinary gene therapies. In this funding program we could not afford to obtain enough amount of platelet. But our preliminary investigation using fewer platelets showed that the therapy recovers ischemia to some extent. We are willing to further promote our project, which seems promising to be applied into clinical application.

研究分野：循環器疾患に関する再生医療

キーワード：遺伝子治療 iPS細胞 造血幹細胞 Notchシグナル 重症下肢虚血

1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患により四肢に安静時疼痛や皮膚潰瘍を呈する重症下肢虚血症例 (Critical limb ischemia; CLI) は、糖尿病や血液透析症例の増加に伴い急増しており、本邦では年間約 5000 名が下肢切断を余儀なくされている。CLI は長期間の集学的治療を要し、患者 ADL の低下による社会的損失はもとより、医療経済的にも国民の大きな負担である。これに対し遺伝子治療および自家細胞移植による血管再生治療が研究されてきたが、前者は遺伝子発現期間の調整が困難であったこと等から有用性が示されず、後者も Responder が 60-70% にとどまるなど、残念ながら現時点では血管再生治療が医療ニーズに十分に答えているとは言い難いのが現状である。

我々は 100 例を超える CLI 患者に末梢血単核球細胞移植による血管再生治療を実施してきたが、移植細胞の遺伝子発現を詳細に検証した結果、Non-responder では移植細胞中の Jagged-1 発現が有意に低いことを発見した。そこで Jagged-1 conditional KO マウスの末梢血単核球をマウス虚血下肢に筋注射したところ、臨床データと同様、血管再生効果が劣ることが判明した。逆に、遺伝子導入により骨髓有核細胞に Jagged-1 を過剰発現させて、マウス虚血下肢に移植したところ、顕著な血管再生効果を得ることに成功した。以上より、移植細胞中の Jagged-1 発現が低い Non-responder 候補症例に対して、何らかの形で Jagged-1 を投与することで、治療効果を改善できることが期待された。

しかし遺伝子導入された血球系細胞が患者体内で生存を続けると、免疫機構や発癌機構に大きな影響を及ぼす懸念があり、臨床応用することは事実上困難であった。我々は他にも Notch アゴニスト抗体を用いた抗体療法を検討したが、近年、類似の治療法にて健康人に重篤な副作用が報告され、安全性を担保するにはハードルが高いと思われた。また Jagged-1 は細胞膜上で clustering しないと作用が不安定であり、Fc 蛋白投与等では十分な効果が得られないとも考えられた。

2. 研究の目的

このような背景のもとで、我々は巨核球に Jagged-1 を遺伝子導入し、のちに脱核した血小板を用いる方法を検討した。この方法であれば、細胞膜上で clustering した Jagged-1 を虚血局所に投与でき、なおかつ導入遺伝子が患者体内に移行する危険性も極めて低くなると期待される。骨髓由来の巨核球は非常に少量で遺伝子導入効率も低く、実用化の見込みに乏しいが、最近ヒト iPS から分化させた巨核球を用いて、高い遺伝子導入効率と十分量の血小板産生が得られることが報告された。この方法を応用することで、Jagged-1

遺伝子導入細胞を用いた新規血管再生治療の開発を進められると我々は考えた。

本研究ではまず、ヒト iPS 細胞から巨核球を分化させる過程で Jagged-1 遺伝子を過剰発現させ、これが Megakaryopoiesis および Thrombopoiesis に影響を及ぼしうるか検証することとした。続いて生成された Jagged-1 過剰発現血小板をマウス虚血下肢に筋肉注射し、血管再生の過程が改善しうるか検証したいと考えた。さらに臨床応用へ向けて安全性を担保するために、導入遺伝子片および Jagged-1 過剰発現血小板の体内遺残動態を定量する予定を立てた。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来 巨核球および血小板の作製技術の確立： DNAVEC 社 CytoTune-iPS キットを用い、ボランティアドナーの末梢血単核球から樹立する。巨核球および血小板の作成は既報の方法を踏襲して行う。

(2) ヒト iPS 細胞由来 巨核球への Jagged-1 遺伝子導入技術の確立：ヒト iPS 細胞または巨核球に、Tet-ON Lentivirus システムを用いて Jagged-1 遺伝子を導入する。これにより高効率に遺伝子導入が可能となるばかりか、後述のとおり Doxycycline を用いて遺伝子発現のタイミングを調整することが可能となる。遺伝子導入は既報の方法により行い、real-time PCR 法と Flow cytometry にて導入効率を確認する。

(3) ヒト iPS 細胞由来 Jagged-1 遺伝子導入巨核球による血小板形成能の確認：iPS 細胞から巨核球への分化誘導過程のなか、複数のポイントにおいて、Jagged-1 の発現を誘導し、Megakaryopoiesis および Thrombopoiesis に影響しないか、Flow cytometry にて確認する。以上をもって、最も効率よく Jagged-1 過剰発現血小板が得られる条件を探索する。

(4) Jagged-1 過剰発現血小板によるマウス下肢虚血に対する血管再生効果の検証：NOD/Scid マウスの左大腿動脈を麻酔下にて結紮し、24 時間後に上記にて産生した Jagged-1 過剰発現ヒト iPS 由来血小板を虚血骨格筋に筋注する。投与する血小板数は、当研究室でこれまで行ってきた末梢血単核球細胞移植に混入していた血小板数を参考に、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9 / \text{kg}$ の範囲を想定している。治療直前 (d1) および治療後、経時的 (d3, 7, 14, 21, 28) にレーザー Doppler 血流計により足尖血流の回復を定量するとともに、組織切片染色により骨格筋・血管再生効果を検証する。

(5) Jagged-1 発現血小板投与後の体内遺残有無の検証：得られた血小板を非放射性的マンガン (Mn) で標識したうえでマウス虚血下肢に筋注投与し、小動物用 MRI 撮像装置を用いて移植血小板の体内遺残の経時的变化を確認する。

(6) Jagged-1 発現血小板投与後の発癌性有無

の検証：移植後のマウスを長期的に飼育し、体内での腫瘍原性を確認する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞由来 巨核球および血小板の作製技術確立：DNAVEC 社 CytoTune-iPS キットを用い、ボランティアドナーの末梢血単核球から樹立した。同キットはセンダイウィルス SeV を用いて山中4因子を導入するものであり、iPS クローンの確立は極めて容易であったが、SeV ベクターを除去するまで、本ドナー由来の iPS では若干の時間を要した。その後、SeV-free クローンを複数確立し、既報の方法 (N. Takayama et al., J Exp Med 207, 281) を用いて巨核球および血小板を作成し、血液前駆細胞の生成高率が最も良いクローンの確立に成功した。また同クローンは、血小板生成も良好であった。

(2) ヒト iPS 細胞由来 巨核球への Jagged-1 遺伝子導入技術の確立：ヒト iPS 細胞または巨核球に、Tet-ON Lentivirus システムにより Jagged-1 遺伝子の導入を試みたが不成功に終わった。ここに時間を奪われてしまったが、これに替わる方法として zinc-finger nucleases によるゲノム編集を試み (Nat Biotechnol. 2009 27 851) ようやくの事で Tet-On システム制御 Jagged-1 遺伝子導入に成功した。

(3) ヒト iPS 細胞由来 Jagged-1 遺伝子導入巨核球による血小板形成能の確認：Tet-On システム制御 Jagged-1 遺伝子導入 iPS 細胞に様々なタイミングで Doxycycline を投与し、最も効率よく Jagged-1 過剰発現血小板が得られる条件を探索したが、現時点までに最善の条件を見出すことができていない。

(4) Jagged-1 過剰発現血小板によるマウス下肢虚血に対する血管再生効果の検証：NOD/Scid マウスの左大腿動脈を麻酔下にて結紮し、24 時間後に上記にて産生した Jagged-1 過剰発現ヒト iPS 由来血小板を虚血骨格筋に筋注した。投与する血小板数は、当研究室でこれまで行ってきた末梢血単核球細胞移植に混入していた血小板数を参考に、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ /kg の範囲を目標としたが、治療効果を示し得る、十分な実験動物数に足るだけの血小板を得ることができず、本研究期間の期限を迎えた。したがって、Jagged-1 発現血小板投与後の体内遺残有無の検証や、Jagged-1 発現血小板投与後の発癌性有無の検証を行うには至らなかった。

本研究を推進するうえで研究組織のマンパワー不足があり、さらに本研究の raison d'etre である血管再生治療の再生医療新法への対応など、研究機関内における業務増大

による研究者エフォート分配の減少によって、結果的に本研究は時間切れとなってしまった。国民から徴収された税金等でまかなわれた科研費を用いていながら、完成した形で報告できなかったことは、大いに反省すべきである。しかしながら、iPS 由来 Jagged-1 過剰発現血小板を予定より少量投与する予備実験を行い、統計学的に優位ではないものの、虚血肢血流および組織再生の改善を得ることができた。

近年、iPS 由来巨核球からの血小板生成効率を向上させ得る因子が明らかとなりつつある。この因子と、血小板生成効率が最善となる Jagged-1 遺伝子発現タイミングの確立によって、十分な量の血小板を容易に得ることができるになれば、本研究は飛躍的に進行するはずである。本科研費で可能となったこの研究は、さらに継続することによって、一定の成果が得られるものと強く期待される。国民から頂いた研究費を無駄にせず社会に還元するため、当初の予定であった研究は、研究者の責任で完了させたいと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

館野 馨 (TATEN0, Kaoru)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20532758

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし ()