

2019 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

| | |
|-------|--|
| 研究課題 | 血液凝固第 VIII 因子産生細胞の同定および網羅的遺伝子解析 — 血友病 A の新規遺伝子治療法開発に向けての基礎研究 — |
| キーワード | ①血友病、②血液凝固第 VIII 因子、③多能性幹細胞 |

研究者の所属・氏名等

| | | | |
|------------|--|-----|------------------------|
| フリガナ 氏名 | ヒラモト タカフミ 平本 貴史 | 所属等 | 自治医科大学 病態生化学部門 特命助教 |
| プロフィール | 早稲田大学理工学部化学科、同大学院修士課程（浅野茂隆研究室）修了、九州大学医学府医学科博士課程（谷憲三朗研究室）修了、医学博士取得。4年間の University of Washington (David W. Russell 研究室) 留学後、現自治医科大学生化学講座病態生化学部門に所属。 | | |

1. 研究の概要

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII 因子) の質的・量的異常に起因する血友病 A は先天性凝固障害症の中で最も出生頻度が高い。現治療法に変わる新規治療法として、FVIII 遺伝子を標的とした遺伝子治療が期待されているが、遺伝子治療の開発に必要な FVIII 因子産生細胞の同定、および FVIII 因子産生機序について明らかになっていない。本研究は、マウスおよびヒト多能性幹細胞より FVIII 因子産生細胞を分化誘導し、FVIII 因子産生細胞を特徴づける遺伝子発現、およびタンパク質発現を同定する。

本研究の前に FVIII 産生に付随して GFP が発現するマウス (F8KI マウス) 由来マウス胚性幹細胞 (ES 細胞)、および健常人由来ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から FVIII 因子産生細胞へ分化誘導を行った。ハンギングドロップ法による胚様体形成開始後 4 日目において、Flk-1 発現を、その後 14 日目においておよそ 30% 程度の細胞において CD31 発現を確認した。CD31 発現確認後、TGF- β 阻害剤を添加し、4 日間培養することで、肝類洞内皮細胞のマーカの一つである、2% 程度の Lyve-1 発現が確認でき、Lyve-1 陽性細胞中に 1% 程度の GFP 陽性細胞が確認できた。健常人男性由来 iPS 細胞をタカラバイオ社のキットを用いて血管内皮細胞へ分化誘導することにより、CD31 陽性細胞が確認できた。CD31 陽性細胞確認後、TGF- β 阻害剤を添加し 2 週間培養を行なったが、肝類洞内皮細胞成熟マーカーである、ASGPCR2 の発現は見られず、培養液中の FVIII 発現も見られなかった。そのため通常の内皮細胞とは性質や分化の過程がことなることが示唆された。

今後、マウス ES 細胞由来、およびヒト iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞にウイルスベクターを用いて候補遺伝子を強制発現させることにより、FVIII 産生細胞へ効率的に分化誘導できないか検討を行う。

2. 研究の動機、目的

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII 因子) の質的・量的異常に起因する血友病 A は先天性凝固障害症の中で最も出生頻度が高い。現治療法の凝固因子製剤による FVIII 因子補充療法は、終生まで連続した投与が必要だけでなく、約 2 割の患者において同種抗体が出現し、治療困難になる。現治療法に変わる新規治療法として、FVIII 遺伝子を標的とした遺伝子治療が期待されている。しかし、遺伝子治療の開発に必要な FVIII 因子産生細胞の同定、および FVIII 因子産生機序について明らかになっていない。そこで本研究はこれまでに明らかになっていない、FVIII 因子産生細胞の細胞生物学的な特徴、特に発生から FVIII 因子産生細胞分化を特徴づける因子、およびその起源や特異的マーカーを同定することを目的とし、マウスおよびヒト多能性幹細胞より FVIII 因子産生細胞を分化誘導し、FVIII 因子産生細胞を特徴づける遺伝子発現、およびタンパク質発現を同定する。

本研究の前に FVIII 産生に付随して GFP が発現するマウス (F8KI マウス) を用いて、FVIII 因子産生前駆細胞と FVIII 産生細胞の網羅的遺伝子解析を行った。そこで、本研究ではマウス胚性幹細胞 (ES 細胞)、健康人由来ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から FVIII 因子産生細胞へ分化誘導し、その分化途中において、網羅的遺伝子解析によって有意な発現差が見られた遺伝子の強制発現を計画した。本年ではマウス ES 細胞、ヒト iPS 細胞からの FVIII 因子産生細胞への分化誘導の検討を行った。

(1) マウス ES 細胞からの FVIII 因子産生細胞への分化誘導

F8KI マウス由来 ES 細胞 (F8KI-ES 細胞)、あるいは C57BL6/J マウス由来 ES 細胞 (B6J-ES 細胞) をフィーダーフリー条件下で培養維持する。その後、ハンギングドロップ法によって分化誘導を開始し、Flk-1 発現が確認できた時点で接着培養へ移行する。血管内皮増殖因子 (VEGF)、アドレノメデュリン (AM) 存在下、CD31 の発現が確認できるまで培養を行い、その後、上記の培養液に TGF- β 阻害剤を添加し 1 週間培養を行なった。その後フローサイトメーターを用いて GFP 発現を解析する。

(2) ヒト iPS 細胞からの FVIII 因子産生細胞への分化誘導

健康な男性より採取した末梢血よりフィーダーフリー条件下で iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞をタカラバイオ社の MiraCell® iPS Cell to Endothelial Cell Differentiation Kit を用いて CD31 陽性血管内皮細胞へ分化誘導する。その後、VEGF、TGF- β 阻害剤存在下で培養を行い、培養液中のヒト FVIII 発現、および FC γ レセプター (Fc γ RIIb) の発現を解析した。

3. 研究の結果

(1) F8KI-ES 細胞、B6J-ES 細胞ともにフィーダーフリー条件下で 5 継代以上、未分化マーカーである SSEA-1 発現を維持したまま培養が可能であった。ハンギングドロップ法による胚様体形成開始後 4 日目において、Flk-1 発現をフローサイトメトリー法によって確認した。よって、4 日目よりコラーゲンタイプ I をコーティングしたディッシュ上に胚様体を播種し VEGF、AM 存在下で培養した。接着培養開始後 1 日目より、胚様体より排出した細胞が見られ、接着培養開始 10 日目において約 3 割の細胞において CD31 発現を確認した。CD31 発現確認後、TGF- β 阻害剤を添加し、4 日間培養することで、肝類洞内皮細胞のマーカーの一つである、Lyve-1 発現が約 2% の細胞において確認できた。フローサイトメーターを用いて、Lyve-1 陽性細胞中の GFP 陽性率を計測すると、1% 程度の GFP 陽性細胞が確認できた。

マウス ES 細胞から FVIII 産生細胞への分化誘導は、既に報告があるが (Arai, T. et al. Peptides. 2011 など)、今回の検討では FVIII 産生はほとんど観察されず、また FVIII 産生細胞への分化誘導効率は低いことがわかり、これまでの報告以外にも FVIII 産生細胞への分化誘導、または特徴づける未知の因子の存在が示唆された。

(2) 健常人男性由来 iPS 細胞は iPS 細胞未分化マーカーである、OCT4、NANOG、SSEA4、Tra-1-60 発現が確認できた。本 iPS 細胞をタカラバイオ社のキットを用いて血管内皮細胞へ分化誘導することにより、分化誘導開始 14 日目において約 16% の CD31 陽性細胞が確認できた。CD31 陽性細胞確認後、TGF- β 阻害剤を添加し 2 週間培養を行なったが、肝類洞内皮細胞成熟マーカーである、ASGPCR2 の発現は見られず、培養液中の FVIII 発現も見られなかった。

マウス ES 細胞による検討は異なり、ヒト CD31 陽性細胞より FVIII 産生細胞は観察されなかった。そのため、分化誘導機序がヒトとマウスで異なる可能性が示唆された。現在、AM を添加し、同様に CD31 陽性細胞より肝類洞内皮細胞への分化誘導を行っているが、マウスによる検討を鑑みるに、その効率は低いと考え、高効率な FVIII 産生細胞への分化誘導には、当初の予定通り候補遺伝子の強制発現が必要になると考える。

4. 研究者としてのこれからの展望

FVIII 産生細胞への分化誘導には、既報がある TGF- β 、adrenomedullin-RAMP2 経路の活性化以外にも、何らかの刺激が必要であると考えている。そこで、分化誘導途中においてウイルスベクターを用いて FVIII 産生細胞特異的遺伝子を強制発現させることを考えている。ヒト iPS 細胞への遺伝子導入効率は、レトロウイルス、レンチウイルスベクターともに低く、また導入遺伝子が CD31 陽性細胞への分化を妨げる可能性がある。そこで、CD31 陽性細胞を分取し、レトロウイルスベクターによって候補遺伝子を発現させる系を考えており、現在準備を行っている。

5. 社会に対するメッセージ

再生医療に限らず、多能性幹細胞を用いた研究では、高効率、高純度で目的細胞への分化誘導が求められる。本研究助成により、FVIII産生細胞分化誘導に必要な因子の探索に必要な系の開発に成功した。今後開発した系を用いて、FVIII因子を規定する因子の探索を行い、それを血友病に対する遺伝子治療に結び付けていきたいと考える。