

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト造血幹・前駆細胞増幅を目的としたヒト iPS 細胞由来不死化造血支持細胞を用いた人工骨髄開発

(英語) Development of Artificial Bone Marrow Using Immortalized Hematopoietic Support Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells for ex-vivo expansion of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

研究開発実施期間: 令和/平成 年4月1日～令和 年3月31日(予定)

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高山直也

(英語) Naoya Takayama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院・准教授

(英語) Department of Regenerative Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine
Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

・ 背景と目的

造血幹細胞移植は難治性血液疾患における唯一の根治療法であるが、ソースとなる造血幹細胞ドナーの確保が課題である。臍帯血は採取時にドナー負担を伴わず、最適な幹細胞ソースではあるが、含まれている幹細胞数が少なく成人レシピエントに対しては高い確率で生着遅延や不全を起こしてしまう。また、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫では、自己の末梢血幹細胞を採取・保存後に、大量の抗がん剤投与を行い、保存しておいた自己の末梢血幹細胞を戻して、正常造血系を再構築する自己末梢血幹細胞移植の実施が生命予後を向上させるが、一部の患者では末梢血幹細胞の採取量不足のため、自己末梢血幹細胞移植が実施できない。

以上の背景から、造血幹細胞を体外で増幅する試みが様々に行われてきている。

造血幹細胞は、骨髄内で造血支持細胞と呼ばれる複数の細胞により構成される複雑な細胞環境ネットワークからのサポートを受けて、恒常性を維持している。しかし、*in vitro* の環境下では複数の造血支持細胞によるサポート環境を再現できていない。健常ドナーより採取した単独種の造血支持細胞が用いられて、一定の造血幹・前駆

細胞の増幅が確認されているが(NEJM2012 他)、以下の点で安定供給に課題が残り、同アプローチのさらなる検証が妨げられている状況である。

- 同じ造血支持細胞種でも細胞毎にサポート能力の不均一性
- 造血支持細胞自体の増殖能の限界
- 造血支持細胞採取に侵襲を伴い、一部造血支持細胞は採取困難

以上の課題を解決するため、本提案では、ヒト iPS 細胞の多分化能を利用して、様々な造血支持細胞をドナー非依存的に樹立し、さらに申請者らがこれまでに独自で開発してきた不老化細胞技術 (Stem Cell Rep2013, Cell Stem Cell2014)を用いて、複数の造血幹・前駆細胞サポート用不老化造血支持細胞を樹立する。造血支持細胞の混合比率を最適化し、ヒト臍帯血および末梢血、骨髓血由来造血幹・前駆細胞の増幅を目的とした人工骨髓開発を目指した。

・ 研究開発の成果

前駆細胞リプログラミング技術による多系統不老化細胞の樹立技術の確立；

不老化した間葉系幹細胞 (MSC)、巨核球、血管内皮細胞、マクロファージ株、それぞれ 3 株以上の樹立に成功した。本提案での老化耐性遺伝子導入過程で、興味深いことに、すでに分化した細胞が、その系列の前駆細胞段階へと若返り、老化耐性を獲得して、大量に増殖可能となることを見出した。我々はこの現象を“前駆細胞リプログラミング”と命名した (特許出願、2023 年度日本再生医療学会シンポジウム発表)。

これらの造血をサポートする不老化細胞株は、薬剤制御ベクターで特定の遺伝子発現を制御しており、任意のタイミングで外来性遺伝子発現を抑制することで分化することを確認した。分化後の細胞は、それぞれヒト初代 MSC、巨核球、血管内皮細胞、マクロファージと同等の遺伝子発現、細胞機能を有することを確認した。

不老化 MSC との共培養によるヒト造血幹細胞増幅；

不老化 MSC と臍帯血由来造血幹・前駆細胞を 1 週間 2 次元共培養することで、従来のサイトカインのみの造血幹細胞増幅条件と比較して、CD34+造血前駆細胞が 7 倍、CD45+34+90+45RA-造血幹細胞が 2.2 倍増加した。さらに、SR1 や UM171 といった造血幹細胞増幅低分子化合物 (Science2010, 2012) を加えると相乗効果を示し、CD34+造血前駆細胞が 391 倍、CD45+34+90+45RA-造血幹細胞が 52 倍増加した。

免疫不全マウスへの移植による限界希釈法解析から、機能的な造血幹細胞を持つ細胞の頻度が、MSC 単独で 3 倍、SU と組み合わせると 13 倍程度増幅していることが明らかになった。

不老化 MSC との共培養によるヒト造血幹細胞増幅機序の解明；

増幅機序の解明を目指し、MSC との共培養前後の HSC を RNA シークエンスで解析した。その結果。培養前臍帯血幹細胞での I 型インターフェロニンシグナル経路の遺伝子発現が、従来の培養条件 (サイトカインのみや、化合物)では急速に失われてしまうが、不老化 MSC との共培養で増幅された造血幹細胞では、培養前と同程度以上に維持しているという特性を新たに見出した。I 型インターフェロニンシグナル経路の遺伝子抑制実験から、この経路が幹細胞の能力を維持していることを明らかにした (特許出願、2024 年度日本血液学会総会発表)。

混合比率を最適化した不老化造血支持細胞との共培養によるヒト造血幹細胞増幅；

MSC 以外にも、血管内皮細胞、巨核球など単一の造血支持細胞との共培養により、ヒト造血幹細胞の増幅も確認できたため、次に 4 種類の造血支持細胞の協調的なサポート効果を期待して、混合比率の検証を行

った。その結果、ヒト臍帯血由来およびヒト骨髓血由来造血幹細胞について、従来のサイトカインのみを用いた増幅条件と比較して、造血幹細胞表面マーカーである CD45+34+90+45RA-の細胞集団が XX 倍、CD34+造血前駆細胞集団が YY 倍前後まで増幅させることに成功した。

増幅された細胞の機能評価のためには、

造血前駆細胞の評価；移植 2-4 週後の末梢血白血球キメリズム評価、血小板キメリズム評価、

造血幹細胞の評価；移植 4 ヶ月後の骨髓内キメリズム評価、が必要である。

予備的な検証から、NOG マウスおよび NOG マウスを元に樹立したヒトサイトカイントランスジェニックマウスなど 4 種類の新規免疫不全マウスを比較し、NOG-W41 マウスが造血幹細胞、前駆細胞評価に適していると判断した。このマウスを用いて、*in vitro* 実験で良好な結果を示した条件で増幅した造血幹・前駆細胞の移植実験を実施し、移植 2-4 週後の末梢血白血球キメリズム評価、血小板キメリズムの改善を確認している。長期骨髓再建能については、現在評価途中である。

さらに、混合造血支持細胞による造血幹・前駆細胞増幅の機序を解明するために、単一細胞およびバルク集団での RNA シークエンスを行い、詳細な機序の解明を進めている。

・ 医療分野の進展に与える影響

多発性骨髄腫や悪性リンパ腫では、病気の進行に伴い自己末梢血幹細胞移植の必要性が生じるが、幹細胞量の確保が課題である。さらに、臍帯血由来幹細胞増幅により、同種幹細胞移植への応用例が増加することが見込まれる。現在年間で、国内で数千人程度、世界では数十万人の造血幹細胞移植必要症例が存在するが、そのうち約 1/3～1/2 程度の患者しか、HLA の一致した造血幹細胞移植をうけられていない。最適で安全な造血幹細胞移植ドナー確保が求められている。本提案で幹細胞増幅が実現すれば、これらの疾患に対する造血幹細胞ソースの安定確保が期待できる。

・ 新技術の創出に対する影響

ヒト造血幹細胞増幅用人工骨髓；

造血幹細胞は、難治性血液疾患や自己免疫疾患の唯一の根治的な治療法として需要が高いことから、広範な普及が期待できる。また、新たな化合物の血液毒性試験において、骨髓球系とリンパ球系を同時に評価できるパネルとしての応用も期待される。

多系統不老化細胞マスターセルストックによる新たな細胞療法の提案；

本提案では、ヒト iPS 細胞から誘導した多系統の細胞種で、老化に対する耐性を獲得し、大量増殖可能であることを確認した。現在の iPS 細胞から直接目的細胞を誘導する技術は、目的細胞への到達過程に、多くの不確定要素があり、安定した品質の細胞産生は産業化における課題となっている。本技術は、この課題に対する最適解となりうる。具体的には、品質が保証された目的細胞の前駆細胞段階で不老化することで、マスターセルストックとして大量に長期保存可能となる。さらに HLA 欠失技術を組み合わせることで、万人に移植可能な細胞株を樹立し、安定した品質の“即時利用可能な”製剤として供給可能となり、産業化にむけた重要な貢献を果たすことができる。薬効・薬理、安全性試験、ウイルスクリアランス試験などを一括して行うことで、近年の細胞療法における高額な医療費の大幅な削減も期待できる。

MSC を用いた骨・軟骨再生や脳梗塞治療、免疫細胞を用いたがん細胞治療用 CAR 細胞などの各種再生医療への応用、動脈硬化性虚血性疾患の血管内皮細胞移植による血管再生療法など、応用は多岐にわたる。

多系統不老化細胞を用いた病態解明、創薬スクリーニング開発；

ヒト初代細胞は、病態解析や創薬スクリーニング研究での貴重な研究ツールとして活用されている。しかし、細胞採取数には限界があり、オミックス解析や大規模な薬剤スクリーニングに必要な大量数確保は困難である。本提案で樹立された様々な不老化細胞は、doxycycline 除去による導入遺伝子の抑制後は、正常に分化し、ヒト初代細胞とほぼ同等の細胞形質を獲得する。このため、病態解明や大規模薬剤スクリーニングに対する次世代の細胞株として有用である。本提案で樹立した不老化マクロファージ、血管内皮細胞などは動脈硬化研究ツールとしての応用を考えている。

• 社会的ニーズへの対応

社会高齢化に伴い、医療を必要とする高齢者人口が増加し、難治性血液疾患患者は増加している。しかし、ドナーとなる若年者は減少している。近年、免疫抑制療法の改善により、親子間の造血幹細胞移植も実施されるようになってきたが、やはり高齢化により血縁ドナーを確保できない症例も増加してくるため、安定した造血幹細胞ソースの確立が切望されている。

臍帯血や検査レベルでの骨髄穿刺液に含まれる少数の造血幹細胞から、十分な量を増幅できれば、ドナー確保が容易となり、ドナー不足の問題に対する解決策となる。

• 先行技術に対する優位性の確立

ヒト造血幹細胞増幅用人工骨髄；

現在、ヒト造血幹細胞の増幅に関する研究では、SR1 や UM171 といった低分子化合物を用いた方法が、臨床試験の途中である。我々の造血支持細胞を用いた増幅手法では、SR1+UM171 添加での培養と同等程度の造血幹・前駆細胞増幅を達成している。さらに、造血支持細胞との共培養系に、SR1+UM171 を加えることで相乗効果が得られることが明らかになっており、従来の増幅系の改良が期待できる。

細胞若返り技術；

本提案での不老化誘導プロセスでは、分化した細胞がその細胞系列の前駆細胞段階へと若返り、老化に対する耐性を獲得して、高い増殖能力を得ることを確認している。近年、山中博士らが発見した iPS 細胞誘導因子である OCT3/4, SOX2, KLF4 を断続的に発現させる部分リプログラミング技術により、細胞レベルで若返り、マウス個体の老化抑制が報告され注目を集めている (Cell 2018)。しかしこの技術では、万能因子である OCT3/4, SOX2, KLF4 を使用するため、若返り過程での細胞系譜の維持が困難であり、一部の細胞で Nanog などの多能性幹細胞遺伝子の発現上昇や他の系譜の細胞への転換が報告されている (Cell Syst2023)。一方、本提案における細胞若返りプロセスでは、他の系譜の細胞への転換は確認されず、安定した品質で大量の細胞培養が可能であり、細胞の若返りや大量培養の手法としては明確な優位性を保持している。

Hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the only curative therapy for refractory hematologic disorders, but securing donors remains a challenge. Umbilical cord blood, while an optimal stem cell source with minimal donor burden, often results in delayed or failed engraftment in adult recipients due to low stem cell numbers.

The proposal outlines a pioneering approach to address the challenges in HSC transplantation, focusing on expanding HSCs using immortalized hematopoietic support cells derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). Current methods face limitations due to variability in donor-derived hematopoietic support cells and their limited proliferative capacity. By utilizing iPSC technology and cellular rejuvenation techniques, we aim to establish an artificial bone marrow system capable of expanding HSCs from various sources.

Key Achievements:

1. **Establishment of multi-lineage immortalized cells by progenitor reprogramming:** We successfully rejuvenated various hematopoietic support cells, including mesenchymal stem cells (MSCs), megakaryocytes, endothelial cells, and macrophages, using progenitor cell reprogramming technology. These rejuvenated cells exhibited aging resistance and robust proliferation, crucial for supporting hematopoiesis.
2. **HSC ex-vivo expansion with immortalized MSC (imMSC):** Co-culturing imMSCs with CB-derived HSCs led to significant expansion. This approach resulted in a several-fold increase in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and CD45⁺34⁺90⁺45RA⁻ hematopoietic stem cells compared to conventional condition with basic cytokines. Synergistic effects with small compounds further enhanced expansion.
3. **Mechanism Elucidation:** RNA sequencing revealed that co-culture with imMSCs maintained the expression of critical genes involved in stemness, particularly the type I interferon signaling pathway. Suppression experiments confirmed the IFN signaling pathway's role in maintaining stem cell capabilities.
4. **Optimized Co-Culture Ratios:** By determining the optimal mixture ratio of immortalized hematopoietic support cells, including MSCs, endothelial cells, megakaryocytes, and macrophages, successful expansion of HSCs from various sources was achieved. This approach holds promise for stable and efficient expansion of hematopoietic stem cells.

Impact and Future Plans:

- **Medical Field Advancement:** The technology addresses the need for reliable sources of HSCs for transplantation, particularly in hematopoietic malignancies. It is expected to increase the utilization of matched stem cell transplantation, benefiting thousands of patients in Japan annually.
- **New Technologies Creation:** Beyond transplantation, the multi-lineage immortalized cells have broader applications in drug discovery and regenerative medicine.

In summary, the proposal represents a groundbreaking advancement in hematopoietic stem cell transplantation, offering a promising solution to current challenges and paving the way for improved treatment outcomes and patient care.