

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
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 人工ナノ粒子放出型細胞による次世代の細胞遺伝子治療プラットフォーム開発
(英 語) Development of a next-generation cell and gene therapy platform
utilizing engineered nanoparticle-secreting cells

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 堀田 秋津
(英 語) Akitsu Hotta

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人 京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
(英 語) Kyoto University, Center for iPS cell Research and Application, Associate Professor

II 研究開発の概要

これまで、失われた細胞を補充する細胞治療、そして遺伝子機能を補充する遺伝子治療や遺伝子変異を修復するゲノム編集治療は別々に研究されてきた。細胞治療は失われた細胞を補填することが出来るが、根本原因の遺伝子変異を修復することはできない。一方、ゲノム編集による遺伝子治療は、変異遺伝子の修復はできるが、失われた細胞を補うことは出来ず、生体内への送達方法にもまだまだ課題がある。本課題では、iPS 細胞由来 iMSC 等を用いた細胞移植と、CRISPR-Cas9 を内封した人工ナノ粒子 (EEV) を組み合わせた、新しい治療法開発を目指している。

我々はこれまでに、EEV 産生ベクターの最適化と産生条件検証、HLA ゲノム編集により免疫拒絶を低減した iPS 細胞の利活用、iPS 細胞由来 iMSC への各種導入方法を用いた遺伝子導入条件の検討、そしてマウス移植実験を実施した。細胞レベルではゲノム編集効率およびナノ粒子産生効率を計測した。手始めにルシフェラーゼたんぱく質を搭載した EEV の活性を指標に機能性の確認解析を実施し、マウスに移植した細胞からルシフェラーゼを周辺組織に送達可能であることを見出した。

さらに、CRISPR-Cas9 を搭載した EEV の産生細胞の改良を進めると同時に、構成因子個別の発現量検討および最適化を実施した。筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞を MYOD1 強制発現により骨格筋細胞へと分化誘導し、EEV 産生細胞と共培養を行ったのち、ジストロフィンたんぱく質の免疫染色を行った所、ジストロフィン遺伝子を標的としたゲノム編集を誘導することによるジストロフィンたんぱく質陽性の筋線維を多数検出することができた。

さらには、筋ジストロフィーモデルマウスへの in vivo 投与試験を実施することで、投与部位周辺部位においてエクソンスキッピング誘導活性を確認することができた。課題終了時の達成目標として、EEV 産生ベクターを 5 種類以上、EEV 産生細胞株を 3 種類以上構築し、細胞移植時の有効性及び安全性をマウスモデルで検証することを予定していたが、これらの目標は無事に達成することができた。以上の結果より、当初の目標であった、細胞移植と EEV 送達の組み合わせによる治療コンセプトの可能性を示すことができたと考えている。

以上の本研究課題で得られた研究成果は、国内外の複数の学会でポスターおよび口頭発表を行った。さらに、要素技術の一部(iPS 細胞由来 iMSC への遺伝子導入)について論文発表(Gao P et al., Stem Cell Res Ther 2024)を行った他、ゲノム編集酵素の in vivo 送達技術に関する和文総説 (パンら, 実験医学, 2024) や、HLA 等の遺伝子改変による免疫拒絶回避方法およびその臨床応用に関する英文総説 (Hotta et al., Nat Rev Bioeng, 2024) の発表を行った。本研究提案内容の成果をまとめた論文についても、現在執筆準備を進めている。

目に見える形での研究成果に加えて、本研究課題の遂行に際しては、大学院生を含む多くの若手研究者を積極的に参画させ、技術習得や研究推進のトレーニングの機会を提供すると共に、参画研究室での合同セミナーの実施や、上述した学会での発表の機会を提供することで、若手研究者の育成にも貢献できたと考えている。複数研究室間での密な連携を促進するため、グループチャットを活用して実験成果を迅速に情報共有し、成果マテリアルについても作製が完了したものから順次供与を行うことにより、シームレスかつ効率的に 3 研究室の共同研究を実施することができた。

iPS 細胞由来細胞等を用いた細胞治療は様々な疾患に対して臨床応用が進んでいるが、細胞自身の能力だけで治療できる範囲には限界があると考えられる。遺伝子改変技術やナノ粒子を介した送達技術と組み合わせることを可能とする本研究課題の成果により、将来の治療標的拡大や次世代の方法論を提案することができると期待している。

(英語)

Until now, cell therapy to replenish lost cells and gene therapy to replenish or repair genetic mutations have been studied separately. Cell therapy can replenish lost cells, but it cannot repair the gene mutation that is the root cause. On the other hand, gene therapy by genome editing can repair mutated genes but cannot replace lost cells, and there are still issues in the method of delivery to the living body. In this project, we aim to develop a new therapeutic approach by combining cell transplantation using iPS cell-derived mesenchymal stem cells (iMSCs) and engineered extracellular nano-vesicles (EEVs) containing CRISPR-Cas9.

We have optimized EEV-producing vectors and verified their production conditions, utilized iPS cells with reduced immune rejection by HLA genome editing, investigated gene transfer conditions using various methods to iMSCs derived from iPS cells, and conducted transplantation experiments in mice. At the cellular level, we measured the efficiency of genome editing and nanoparticle production. As a first step, we analyzed the activity of EEV carrying luciferase protein to confirm its functionality and found that it can deliver luciferase from transplanted mouse cells to surrounding tissues.

In addition, we improved the production vector of EEV with CRISPR-Cas9 and examined and optimized the expression levels of individual components of EEV. After differentiating iPS cells derived from muscular dystrophy patients into skeletal muscle cells by forced expression of MYOD1 and co-culturing them with EEV-producing cells, immunostaining for dystrophin protein was performed, and a number of dystrophin protein-positive myofibers were detected by inducing genome editing targeting the dystrophin gene. The immunostaining for dystrophin protein was performed in EEV cells.

Furthermore, by conducting in vivo administration tests on mouse models of muscular dystrophy, we were able to confirm exon-skipping induction activity in the area surrounding the administration site. We had planned to construct at least five types of EEV-producing vectors and three types of EEV-producing cell lines, and to verify their efficacy and safety for cell transplantation in a mouse model. Based on these results, we believe that we have successfully achieved our initial goal of demonstrating the potential of a treatment concept based on the combination of cell transplantation and EEV delivery.

Cell therapy using iPS cell-derived cells has been applied clinically to a variety of diseases, but there are limits to the extent to which cells can be treated using only their own abilities. We expect that the results of this research project, which enables the combination of gene modification technology and nanoparticle-mediated delivery technology, would enable us to expand future therapeutic targets and propose next-generation methodologies.