

研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム
FS ステージ シーズ顕在化タイプ 事後評価報告書

研究開発課題名	: FIX 遺伝子導入ヒト増殖型前脂肪細胞を用いた血友病 B に対する革新的な細胞加工医薬品の研究開発
プロジェクトリーダー	: セルジェンテック(株)
所属機関	
研究責任者	: 黒田正幸(千葉大学)

1. 研究開発の目的

血友病 B の治療戦略に最適化したヒト第 IX 血液凝固因子 (hFIX) 分泌ヒト増殖型脂肪細胞を確立し、細胞加工医薬品の技術革新を図ると共に患者 QOL を向上させ生きていることの充実感を享受できる社会の実現を目指す。本目的の実現のため、以下の特性を有する hFIX 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞の作製を研究開発目標とする。

- 1) hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞の hFIX 分泌量が導入 hFIX 遺伝子数に依存して増加すること。
- 2) hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞が産生するタンパク質が hFIX の高次構造・糖鎖修飾を保持していること。
- 3) in vitro で hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞が hFIX タンパク質を 28 日以上にわたり分泌すること。
- 4) in vitro で hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞ががん化など形質転換しないこと。
- 5) 血友病 B モデルマウスに移植した hFIX 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞が、移植後最低 4 週間、最大 8 週間にわたり hFIX を持続分泌できること。

なお hFIX 補充療法を用いる臨床現場では、抗体 (inhibitor) 生成の確認が重要であり、また 5) の治療実験に先立ち、正常マウスで 3) の目指す性能や hFIX 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞の「持続補充」による抗体 (inhibitor) 生成の事前確認と抗体生成抑制のための免疫抑制剤の併用の必要性を把握するため、事前の予備検討を行い、病態モデル試験への移行のための移植試験と情報収集を行った。

2. 研究開発の概要

①成果

医薬品シーズとして実用化ステージへ移行可能な性能、即ち血友病 B モデルマウスにおいてヒト第 IX 血液凝固因子 (hFIX) 持続分泌および血液凝固作用を有する hFIX 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞の作製を目標に以下の研究開発を実施した。hFIX 及び His タグ付 hFIX (hFIX-His) 遺伝子を搭載したレトロ及びレンチウイルスベクターを構築し、これを用いて当該遺伝子導入ヒト及びマウス増殖型脂肪細胞を作製した。検討した範囲内で免疫沈降ウエスタンブロットに適切な市販抗 FIX 抗体がなく代わりに抗 His 抗体を用いて hFIX-His 産生を、また血液凝固測定系で血液凝固活性を in vitro でそれぞれ確認した。当初の計画では hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞を用いた治療実験を実施する予定だったが、上記 2. の事前予備検討の実施理由および時間的制約から、免疫抑制剤の併用下、健常マウスに hFIX-His 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞の移植実験を行い、hFIX-His の血中持続分泌を確認した。一方、本移植実験で、移植細胞から分泌される hFIX(-His) 活性は検出されなかったが、これは B6 マウスがもつ血液凝固活性の影響によるものであり、当該活性を有さない血友病 B マウスであれば移植細胞の hFIX(-His) 活性を血液凝固活性の増加分として検出できると考えられた。本研究成果で確立した hFIX-His 検出系を用いて次回の治療実験を実施できれば、当初の目標を達成できるものと推

測された。

研究開発目標	達成度
① hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞の hFIX 分泌量が導入 hFIX 遺伝子数に依存して増加すること。また、遺伝子導入増殖型脂肪細胞の選別法を確立する。	① 目的とする全てのレトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターを作製できた。hFIX 及び hFIX-His 遺伝子搭載レンチウイルスベクターはヒトあるいはマウス増殖型脂肪細胞に1コピー/細胞を越える遺伝子導入が可能であった。hFIX-His のタンパク質発現を確認できた。(達成率:70%)
② hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞が産生するタンパク質が hFIX の高次構造・糖鎖修飾を保持していること。	② 培養液中の hFIX-His 活性を確認できたこと、また予想される分子量のタンパク質として検出されたことから、高次構造は保持されていると考えられた。(達成率:60%)
③ in vitro で hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞が hFIX タンパク質を28日以上にわたり分泌すること。	③ 目標⑤に注力したため本研究は実施できなかった。in vitro での評価は実施できなかったが、健常マウスへの移植実験において、移植28日まで血中分泌が確認できたことから、移植細胞は少なくとも移植後28日以上生存し、hFIX-His タンパク質を分泌することが確認された。(達成率:70%)
④ in vitro で hFIX 遺伝子導入増殖型脂肪細胞ががん化など形質転換しないこと。	④ 目標⑤に注力したため本研究は実施できなかった。詳細な解析には至らなかったが、免疫抑制剤を投与した健常マウスへの移植において、腫瘍等の出現は認めなかった。(達成率:60%)
⑤ 血友病 B モデルマウスに移植した hFIX 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞が、移植後最低4週間、最大8週間にわたり hFIX を持続分泌すること。	⑤ 当該実験は技術的問題のため実施できなかった。しかし、免疫抑制剤併用下、hFIX-His 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞の健常マウスへの移植実験にて、持続的な血中分泌を確認でき、治療実験の実施の目途が得られた。(達成率:60%)

②今後の展開

「血友病 B」は重篤な希少疾患で患者数が少ないこと(国内患者数 約 1,000 人)から、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」に遵守して実施する臨床研究で有効性と安全性を確認したのち、(独) 医薬品医療機器総合機構との薬事戦略相談を踏まえ、非臨床試験、臨床試験(治験)を行い、臨床研究成績とあわせて薬事承認申請することを計画している。

3. 総合所見

部分的な目標達成、あるいは十分な成果ではないが、今後の取り組み次第でイノベーション創出の可能性はある。本課題は医学的に大きな価値があり、方法も独創性が高く、実現出来ればその医学

的・社会的インパクトは大きい。しかし、当初計画していたアッセイ系が設定出来ず、進捗が遅くなり、主要目標が達成出来なかった。産と学の役割分担を明確にし、企業化あるいはステージアップに必須なデータの取得を最優先とし、研究の迅速化が強く望まれる。