

細胞ファイバ技術を用いた炎症性腸疾患に対する間葉系幹細胞療法の開発

札幌医科大学 医学部解剖学第二講座 永石 歓和

Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory bowel disease using cell fiber technology

Kanna Nagaishi, M.D., Ph.D, Second Department of Anatomy

概要

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells, 以下MSC)と細胞ファイバ技術を組み合わせた腸管局所細胞治療剤を開発する。MSCをゲルチューブに封入した **MSC-fiber** を作製した。MSCに由来する組織修復因子や炎症制御因子はゲルを透過してファイバの外に放出された。MSC-fiberを慢性腸炎モデルに投与したところ、腸炎の重症化が持続的に抑制された。難治性炎症性腸疾患に対する、持続的で安全性の高い細胞治療剤を開発する。

背景

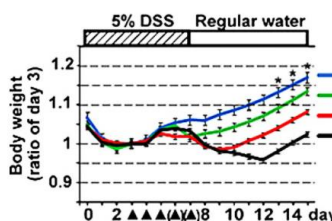
✓ 炎症性腸疾患(IBD)とは

主にクローン病(CD)と潰瘍性大腸炎(UC)に大別される慢性難治性炎症性腸疾患で、国内の患者数はCD 7万人、UC 22万人(2016年 厚生労働省)で増加の一途である。若年者に多く、再燃寛解を繰り返し、QOL低下や炎症関連発癌のリスクが大きい。下痢や血便、腹痛、発熱、体重減少のほか、CDでは難治性の肛門病変が頻発する。ステロイド剤、免疫調節剤、生物製剤等の既存治療に不応な例や難治例が多く、新たな治療法の開発が望まれている。

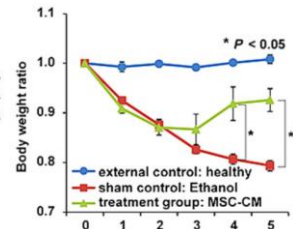
✓ 間葉系幹細胞を用いた細胞治療

MSCは、多彩な液性因子を介したパラクライン効果により組織修復能や免疫制御能を発揮する。MSCの培養上清(MSC-CM)を腸炎モデルに投与したところ、腸炎の回復促進効果と増悪抑制効果を示した。

DSS腸炎に対する回復促進効果



TNBS腸炎の制御効果



(Watanabe S, et al. J Gastroenterol. 2014)

MSC-CMの課題

- 1) 有効成分の生体内拡散による腸管局所の炎症制御効果の低下
- 2) 有効成分の分解・代謝による効果の持続性低下

新規技術 [細胞ファイバ]

直径数百マイクロメートルのゲルチューブに内包された細胞および細胞外マトリクス(ECM)から成る構造体で、細胞種と細胞密度、ECMの種類を自在に調節できる。内部の細胞凝集体は、生体内環境や炎症細胞等の周囲のストレスから保護される。また構造上、生体投与後にファイバごと細胞を除去することも可能である。この技術とMSCを組み合わせる。



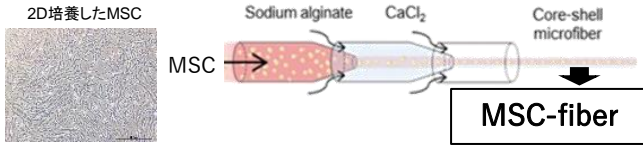
(株セルファイバ資料)

【知財】特許第6601931号
(株セルファイバ)

✓ MSC-fiberの作製

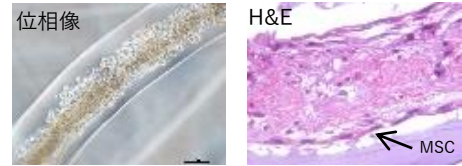
MSCを各種ECMとともにアルギン酸カルシウムの外殻ゲルに封入した。異なるECMを用いて4種のMSC-fiberを作製した。

CF-A / CF-B / CF-C / CF-D



(Ikeda K. et al. Sci Rep 2017, 7(1):2850)

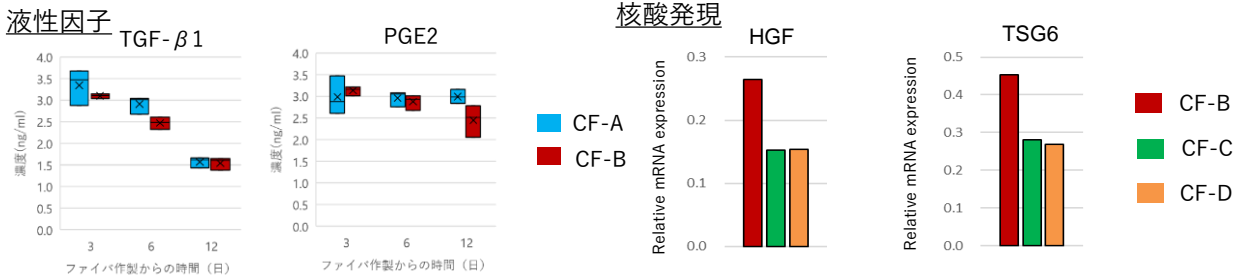
✓ MSC-fiberの形態解析



MSCはゲル内でECMとともに凝集塊をつくり、中心部を足場として表層に細胞層を形成した。

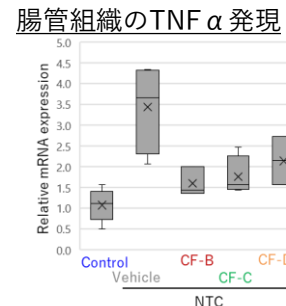
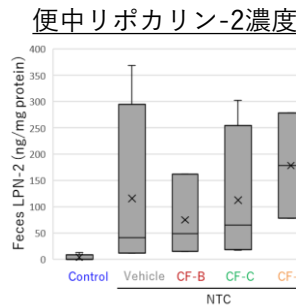
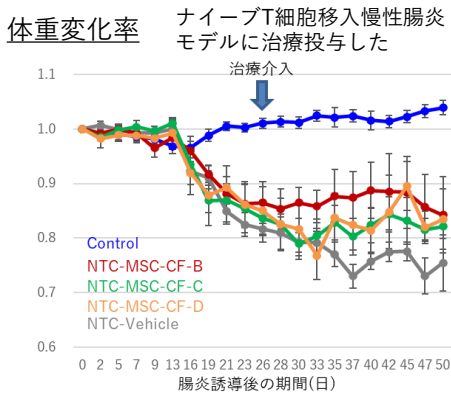
【特願2020-183302】ハイドロゲルファイバ、ハイドロゲルファイバの製造方法、治療剤及び移植方法」(2020.10)

✓ MSC-fiberの組織修復因子・免疫制御性因子の産生・分泌と発現量



MSC-CFはTGF-β1, PGE2を分泌し、その分泌傾向はCF-A, -Bで類似した。また、HGF, TSG6を発現し、特にMSC-CF-Bで高発現を示した。

✓ MSC-fiberの腸炎制御効果



MSC-CF-B投与群で有意に腸炎の重症化による体重減少が持続的に抑制された。さらに、便中および腸管組織の炎症性サイトカイン量が低下した。

今後の開発計画

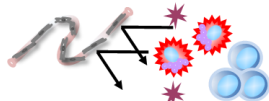
医療グレードのMSC製造



GMP製造に着手している
企業との連携

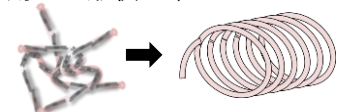
生体適合性素材の選択

強度が維持され、移植拒絶や線維化・バイオフィルムを防ぐ素材による製造と安全性評価



ファイバの成型

標的部位へ安定的に投与され、液性因子が効率的に分泌・作用する形状の確立



高悪性度肉腫に対する癌幹細胞抗原を標的とした CAR-T細胞療法の開発

病理学第一講座 鳥越 俊彦、塚原 智英

Development of CAR-T cells targeting cancer stem cell antigen DNAJB8 against high-grade sarcoma.

Toshihiko Torigoe MD, PhD, Tomohide Tsukahara MD, PhD

Department of Pathology

背景 Background

骨肉腫（高悪性度肉腫の代表）には新しい治療法の開発が急務である。

1. 稀だが若年者に多く発生。
2. 化学療法不応例・肺転移例の予後は不良（5年生存率20%）。
3. 有効な薬剤は30年間変わっていない。

標的がん幹細胞抗原DNAJB8と人工抗体クローンB10について。

1. DNAJB8は、高い造腫瘍能・薬剤耐性能を示すがん幹細胞に発現。
2. DNAJB8の正常組織での発現はHLAを欠失している精巢に局限。理想的発現様式。
3. B10は腫瘍細胞表面に提示されるHLA-A24/DNAJB8由来ペプチド複合体を特異的に認識するscFv(single chain variable fragment)人工抗体クローン。

【 開発品(B10 CAR-T)について 】

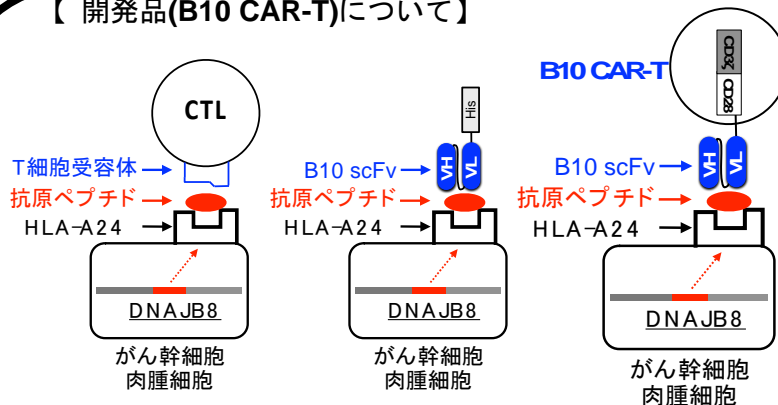


図1. 肉腫細胞表面に提示される HLA-A24/がん幹細胞抗原 DNAJB8 由来ペプチド複合体を認識する B10 CAR-T 細胞の概略. 細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の T 細胞受容体に類似した特異性を持つ B10 scFv を既存の第二世代 CAR に搭載した B10 CAR-T 細胞を構築した.

【 有効性について 】

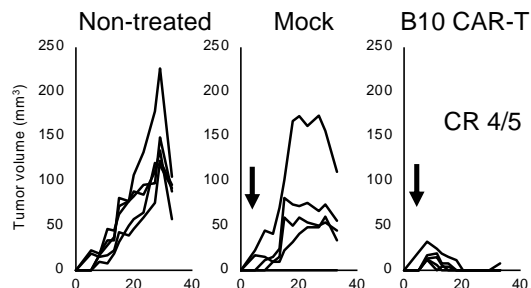
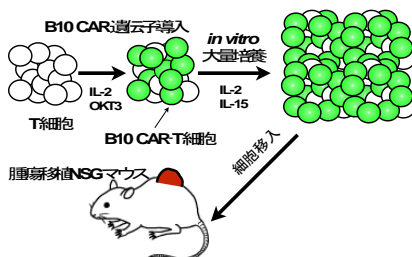


図2. 腫瘍移植マウスモデルに対する B10 CAR-T 細胞の in vivo 抗腫瘍効果. 骨肉腫細胞株 KIKU を移植した免疫不全マウスに対して移植腫瘍の生着が確認された Day 5 で 1×10^7 個の B10 CAR-T 細胞を輸注した. B10 CAR-T 細胞投与群で腫瘍縮小効果を認めた.

特許情報: 特願2020-551131, 17/279,965(US), 19870017.1 (EP)

治療抵抗性がん幹細胞を標的できる免疫療法の開発

札幌医科大学 医学部 病理学第一講座 准教授 廣橋良彦

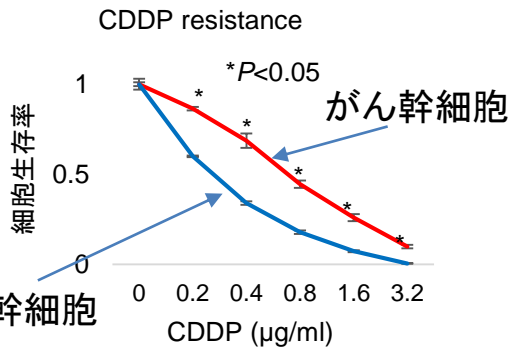
Establishment of treatment resistant cancer stem-like cell targeting immunotherapy

Yoshihiko Hirohashi

Associate Professor, Dept. Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

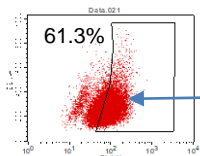
背景1: 治療抵抗性がん幹細胞

ヒト癌幹細胞 (cancer stem-like cell) は、①高い造腫瘍能を有する、②自己複製能がある、③多分化能がある癌細胞亜集団と定義される。癌幹細胞は下記の様に、抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示し、どのように標的するかが問題となる。



結果1: 安定的がん幹細胞モデル作製

ALDEFLUOR や、細胞表面マーカー (CD44) など で分離したがん幹細胞は、in vitro 培養で分化し、不安定である。HLAリガンドーム解析には、多数 (10⁹個) の細胞が必要となる。そこで、ALDEFLUOR 法にて分離した細胞をクローン化し、in vitro でも安定的に増殖出来るがん幹細胞モデルを作製した。

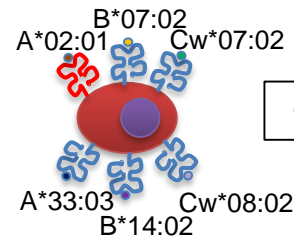


がん幹細胞モデルクローンでは高いALDH^{high}細胞を示す。

背景2: 免疫標的スクリーニング

免疫療法のエフェクターとなる細胞傷害性T細胞 (CTL) は、human leukocyte antigen (HLA) クラス1に提示される抗原ペプチドを認識する。我々は、抗原ペプチドを包括的にスクリーニングするHLAリガンドーム解析を用いる事により、ペプチドミクスを可能とした(Kochin et al., Oncoimmunol 2016)。

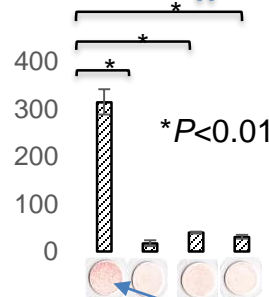
結果2: がん幹細胞抗原ペプチド解析



モデルがん幹細胞

HLA クラス1精製
ペプチド解析

がん幹細胞免疫応答確認



がん幹細胞に対するIFN γ 分泌を確認し、がん幹細胞標的免疫療法ターゲットを同定した。

胃がんに関わる長鎖非コードRNAを標的とした治療法の開発

分子生物学講座 北嶋洋志、鈴木 拓

Identification of a long non-coding RNA as a therapeutic target in gastric cancer

Hiroshi Kitajima MS, Hiromu Suzuki MD, PhD

Department of Molecular Biology

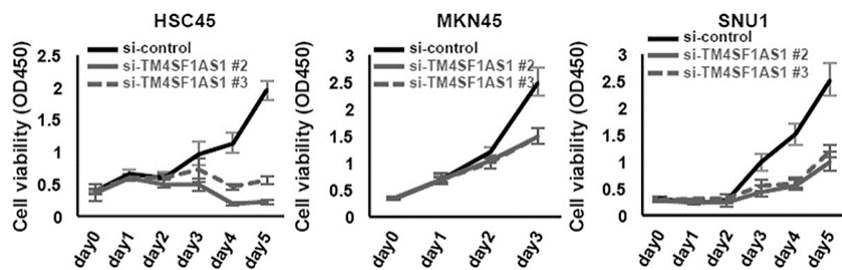
背景 Background

胃がんはヘリコバクターピロリ菌感染による慢性胃炎が発生母地となる。近年、長鎖非コードRNA (lncRNA)のがんにおける役割が注目されているが、一万種類あるとされるlncRNAの大半は機能が明らかにされていない。

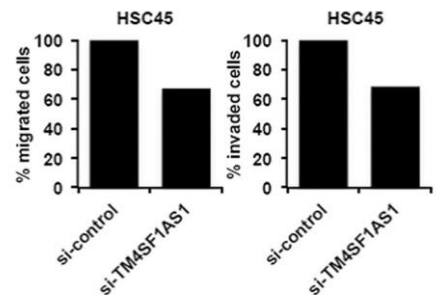
我々は、胃がんおよび慢性胃炎において高発現するlncRNAとしてTM4SF1AS1を同定した。

TM4SF1AS1ノックダウンによる増殖・遊走・浸潤能の抑制

細胞増殖能の抑制

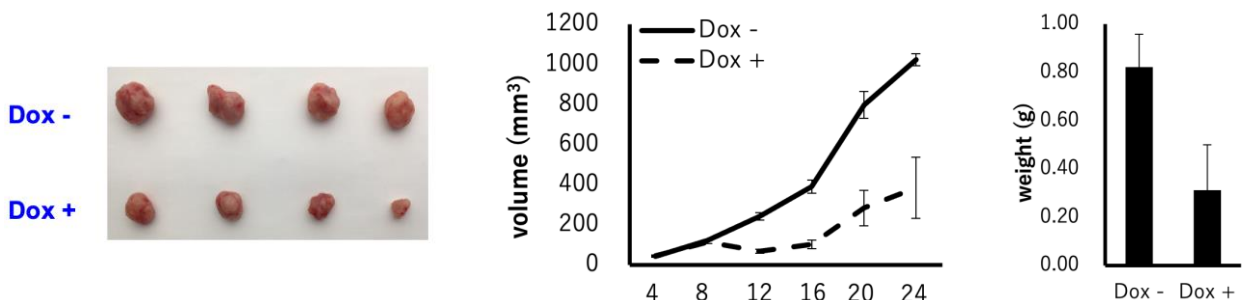


遊走浸潤能の抑制



これらの結果から、TM4SF1AS1のがん遺伝子的機能が示唆された。

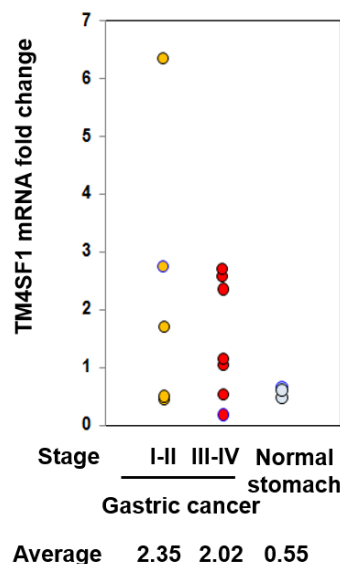
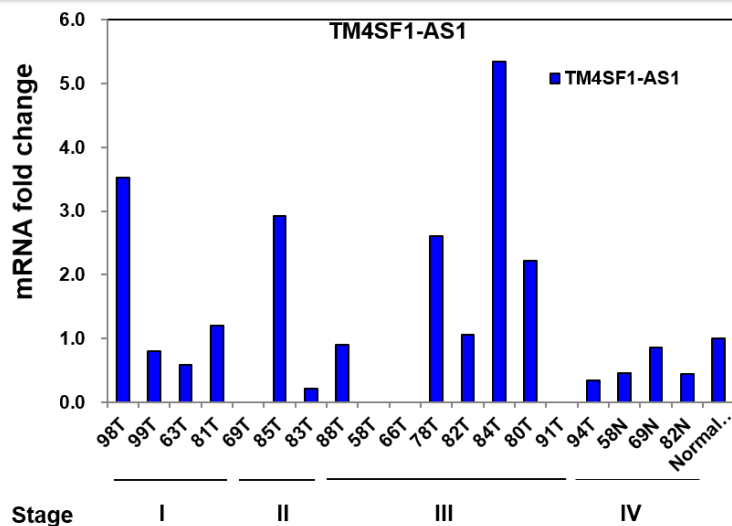
TM4SF1AS1ノックダウン(Tet on誘導shRNA)によるin vivo腫瘍形成能の抑制



TM4SF1AS1の過剰発現は腫瘍形成を促進し、そのノックダウンは腫瘍形成を抑制する。

これらの結果から、TM4SF1AS1を標的とした、胃癌の新たな治療法の可能性が示された。

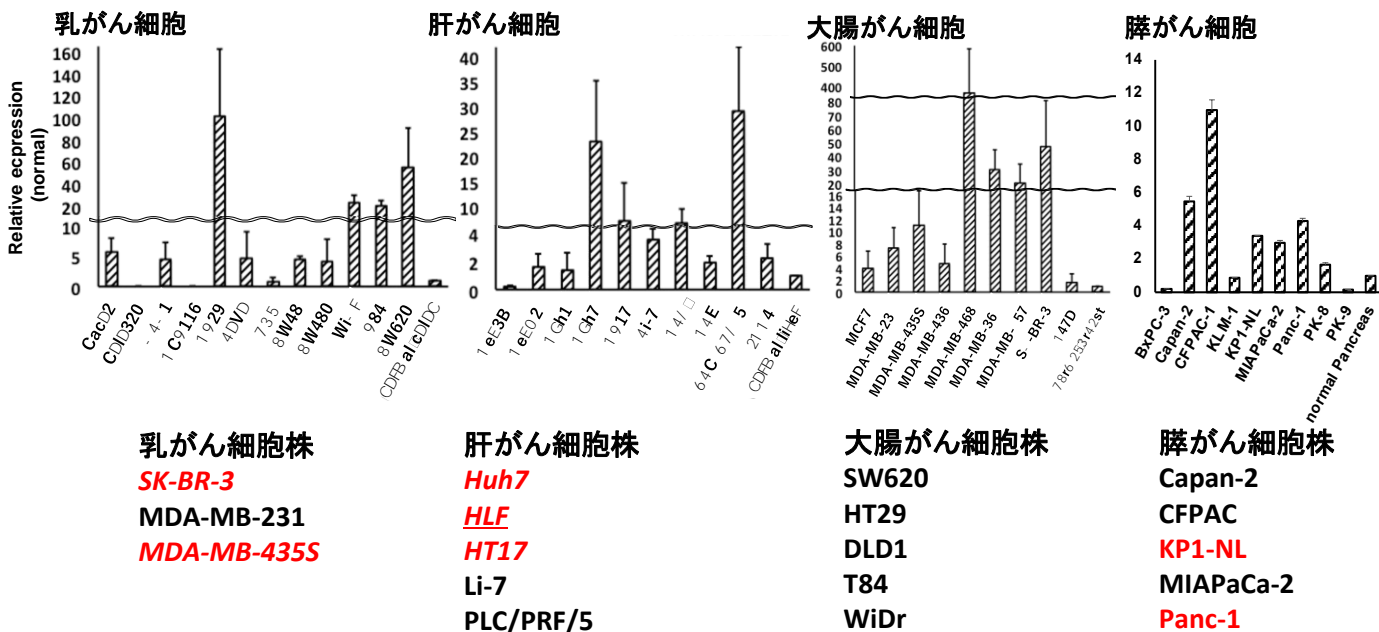
各胃がんステージの臨床検体におけるTM4SF1AS1の発現



がん化の進行に伴うTM4SF1AS1の発現亢進が確認された。

TM4SF1AS1は胃がんの早期から発現上昇することから、early stageでの検出等、胃がんの予防や早期治療の標的となりうる可能性がある。

他のがん細胞におけるTM4SF1AS1の発現



赤字の細胞株において、TM4SF1AS1ノックダウンによる細胞増殖の抑制が確認された。胃以外の組織においてもTM4SF1AS1の発現は亢進し、がん遺伝子として機能していることが示唆された。

感染部位特異的細菌感染症治療法の確立に向けた vivoEF 阻害剤の検索

微生物学講座 佐藤 豊孝

(現所属: 北海道大学 大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室)

Screening of vivoEF inhibitors for site-specific therapy against bacterial infections

Toyotaka Sato, PhD

(Current affiliation: Department of microbiology, faculty of veterinary medicine, Hokkaido university)

従来の抗菌薬開発での課題

<耐性菌制御の問題点>

1. 既存抗菌薬の性質 = 病原菌・常在菌 / 感染部位・非感染部位 問わず選択圧
2. 新規標的因子が未発見 = 多剤耐性菌へのアプローチの困難さ
3. 新規抗菌薬開発の減少 = 新系統の開発はほぼない

<ブレイクスルーへの鍵>

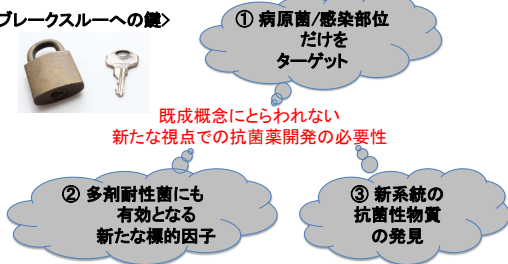


図1. 耐性菌制御への問題点とブレイクスルーへの鍵

使用による選択圧を病原体・感染部位に限定し、多剤耐性菌にも有効な新系統の抗菌薬開発の必要性

vivoEF 阻害剤と『感染部位特異的治療』の可能性

<Bacterial factor of interest>

一般的な培養法では菌の発育に影響を与えないが、感染部位などの特定の生体内で菌の発育・生存に必須となる細菌因子

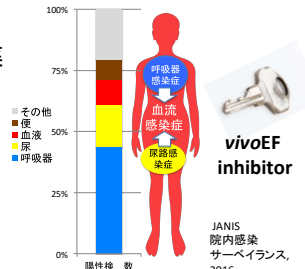
→ *in vivo* bacterial Essential Factor = vivoEF



例) 血液内での vivoEF の阻害 → 敗血症への新規治療薬

現在実施中の研究 vivoEF と vivoEF 阻害剤をセットで網羅的に同定

<国内外での動向>
・先行化合物は未同定



vivoEF とその阻害物質 (vivoEF 阻害剤) の組み合わせにより、課題①-③を克服可能に。

vivoEF 阻害剤のスクリーニング

特開2019-71853

adding *in vivo* components in medium
= adding serum (blood components) in medium



Compound	Antibacteriosidal effect		vivoEF inhibitors
	Serum (1st screening)	without serum (2nd screening)	
Compound A	-	-	×
Compound B	+	+	×
Compound C	+	-	□

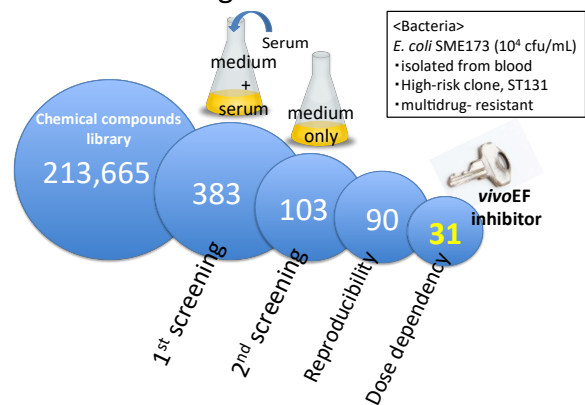
Compound A : Not antimicrobials

Compound B : General antimicrobials
(= general antimicrobial screening so far)

Compound C : Antimicrobials **only in the blood**
(= vivoEF inhibitors in blood stream infections)

vivoEF 阻害剤のスクリーニング結果

Screening of vivoEF inhibitors



生体内成分存在下でのみ抗菌活性を示すものを対象 = 従来の抗菌活性物質の検索では検出できないものを対象

vivoEF 阻害剤の特徴

- ① 生体内成分存在下でのみ抗菌活性を示す = 選択圧がかかる部位が感染部位に限定
- ② 既存抗菌薬とは異なる細菌因子を標的 = 多剤耐性菌にも有効
- ③ 既存抗菌薬とは異なる化学構造 = 新規系統の抗菌薬となり得る可能性

《連絡先》 札幌医科大学附属産学・地域連携センター
TEL:011-611-2111(内線21570) email:chizai@sapmed.ac.jp

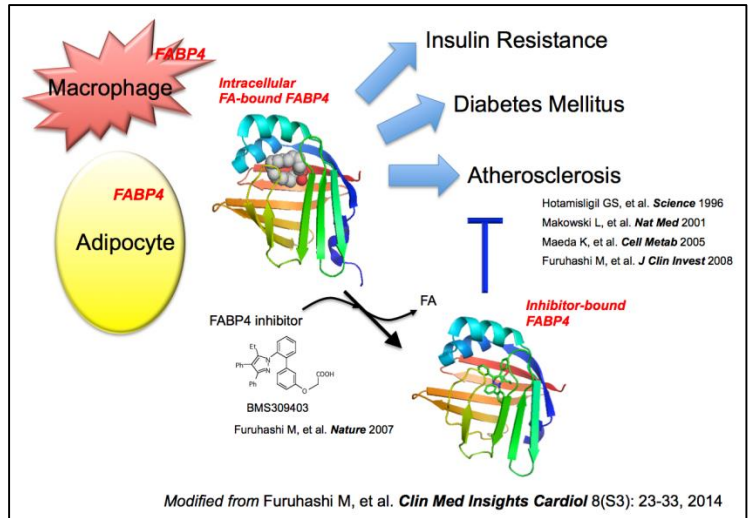


心血管・腎・代謝疾患における脂肪酸結合タンパク4 (FABP4)の役割解明 循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座 古橋 真人

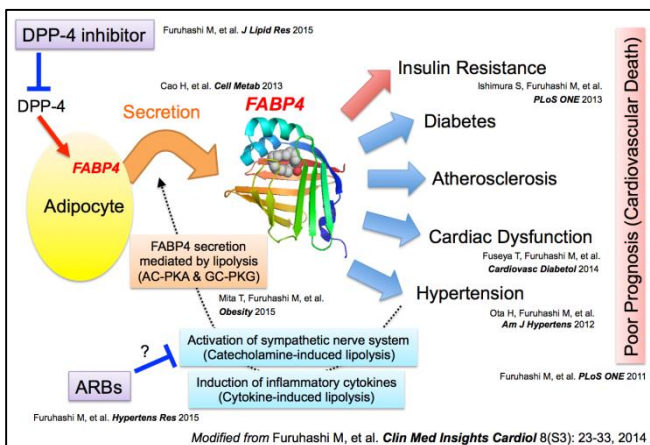
Elucidation of role of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) in cardiovascular, renal and metabolic diseases
Masato Furuhashi, MD, PhD
Department of Cardiovascular, Renal and Metabolic Medicine

Gene	Common name	Alternative names	Expression
<i>Fabp1</i>	Liver FABP	L-FABP	Liver, intestine, pancreas, kidney, lung, stomach
<i>Fabp2</i>	Intestinal FABP	I-FABP	Intestine, liver
<i>Fabp3</i>	Heart FABP	H-FABP, MDGI	Heart, skeletal muscle, brain, kidney, lung, stomach, testis, aorta, adrenal gland, mammary gland, placenta, ovary, brown adipose tissue
<i>Fabp4</i>	Adipocyte FABP	A-FABP, aP2	Adipocyte, macrophage, dendritic cell
<i>Fabp5</i>	Epidermal FABP	E-FABP, PA-FABP, mal1	Skin, tongue, adipocyte, macrophage, dendritic cell, mammary gland, brain, intestine, kidney, liver, lung, heart, skeletal muscle, testis, retina, lens, spleen
<i>Fabp6</i>	Ileal FABP	IL-FABP, I-BABP, gastrotropin	Ileum, ovary, adrenal gland, stomach
<i>Fabp7</i>	Brain FABP	B-FABP, MRG	Brain, glia cell, retina, mammary gland
<i>Fabp8</i>	Myelin FABP	M-FABP, PMP2	Peripheral nervous system, Schwann cell
<i>Fabp9</i>	Testis FABP	T-FABP	Testis, salivary gland, mammary gland

Furuhashi M & Hotamisligil GS. *Nat Rev Drug Discov* 7: 489-503, 2008

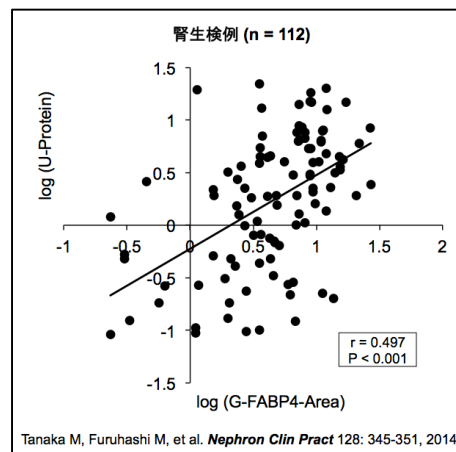
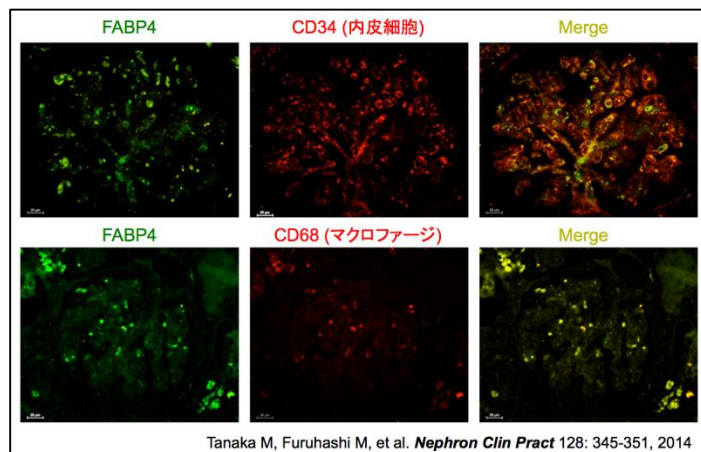


脂肪酸結合タンパク (FABP: Fatty Acid-Binding Protein) は長鎖脂肪酸などの疎水性リガンドと結合する分子量約14-15 kDaの可溶性タンパク質で、これまでに少なくとも9つのアイソフォームが同定されている。このうち、**FABP4 (A-FABP/aP2)** は脂肪細胞とマクロファージに発現し、欠損マウスの解析からインスリン抵抗性および動脈硬化の形成に重要な役割を果たすことが示されている (Furuhashi M, et al. *Nat Rev Drug Discov* 2008)。我々は、骨髄移植や共培養実験からFABP4が脂肪細胞とマクロファージの両方で代謝および炎症反応をつかさどり、インスリン抵抗性および動脈硬化に関連することを見いだした (Furuhashi M, et al. *J Clin Invest* 2008)。さらに、製薬会社との共同研究でFABP4の特異的阻害薬を開発し、新規カテゴリーの治療薬として糖尿病および動脈硬化を改善させることを明らかにした (Furuhashi M, et al. *Nature* 2007)。



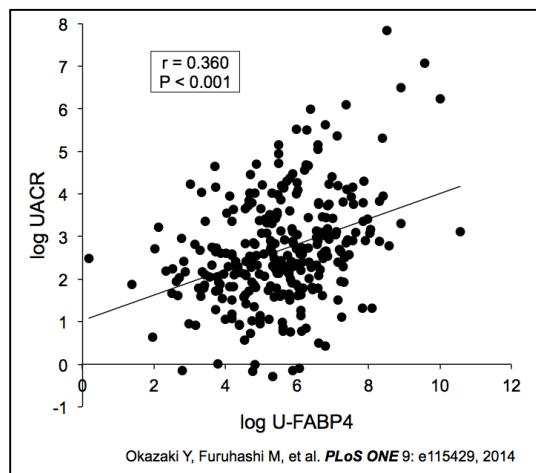
FABP4はアミノ酸配列上明らかなシグナルペプチドを持たないため、非分泌タンパクと考えられていたが、最近我々はFABP4が脂肪分解とともに非古典的経路を介して脂肪細胞から分泌されることを明らかにし (Mita T, Furuhashi M, et al. *Obesity* 2015)、*in vivo*および*in vitro*の検討からFABP4が新規のアディポカインとしてインスリン抵抗性を惹起することを初めて見いだした (Cao H, et al. *Cell Metab* 2013)。

臨床的な意義を検討するために、当教室で35年以上継続している端野・壮瞥町研究の血液サンプルを用いて、無治療の健診者を対象として血清FABP1~5濃度を測定したところ、FABP4濃度が最も高値で、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-Rと独立して関連すること (Ishimura S, Furuhashi M, et al. *PLoS ONE* 2013) やFABP4濃度が心エコーで評価した左室拡張能障害と関連することを明らかにした (Fuseya T, Furuhashi M, et al. *Cardiovasc Diabetol* 2014)。また別の検討から、本態性高血圧患者や高血圧の家族歴のある若年者では対照群に比べてFABP4濃度が有意に高値であること (Ota H, Furuhashi M, et al. *Am J Hypertens* 2012)、降圧薬である各種アンジオテンシン受容体拮抗薬 (Furuhashi M, et al. *Hypertens Res* 2015)や糖尿病薬であるDPP-4阻害薬のシタグリプチン (Furuhashi M, et al. *J Lipid Res* 2015)がFABP4濃度を有意に低下させること、さらにはFABP4濃度が心血管イベントの独立した新規の予後規定因子になる可能性を初めて報告した (Furuhashi M, et al. *PLoS ONE* 2011)。



最近、FABP4は脂肪細胞やマクロファージのみならず、心臓や腎臓を含めた臓器における末梢の毛細血管や小静脈の血管内皮細胞に発現することが示された。その生理的意義については、毛細血管レベルでの脂肪酸輸送に関わっていることが示唆されている。通常、動脈の血管内皮細胞にはFABP4の発現は認めないが、興味深いことに細胞老化や血管傷害などにより血管内皮細胞にFABP4が異所性に誘導され、内皮機能障害と関連することが報告された。

現在、尿中FABP1 (L-FABP)排泄量が腎尿細管障害マーカーとして臨床応用されているが、我々はヒト腎組織での検討において、障害された糸球体にFABP1ではなくFABP4が異所性に新規に発現することを初めて見出し、糸球体FABP4発現量が尿蛋白や腎予後に関わることを見いだした (Tanaka M, Furuhashi M, et al. *Nephron Clin Pract* 2014)。



さらに、端野・壮瞥町研究の尿サンプルを用いた検討から、尿中FABP4排泄量が早期糸球体障害の指標になる可能性を初めて明らかにした (Okazaki Y, Furuhashi M, et al. *PLoS ONE* 2014)。今後各種腎疾患でのさらなる検討を予定している。

特許情報

1. ・日本国特許第6558729号 糸球体障害の検査方法 (尿中FABP4)

陰茎海綿体神経電気損傷ラットモデルの勃起障害に対する 骨髄幹細胞移植の有効性

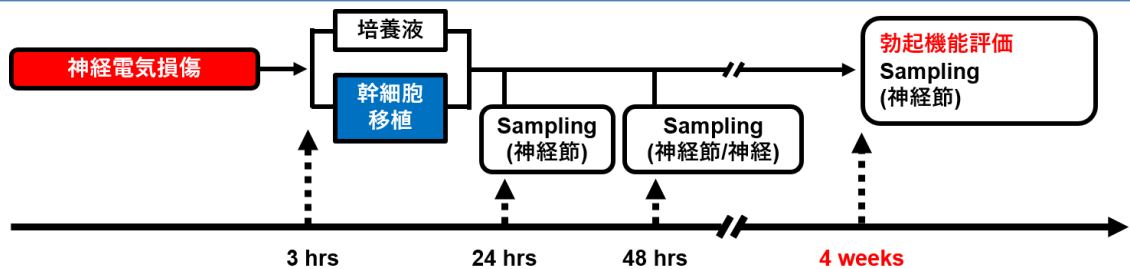
泌尿器科学講座 松田 洋平、舩森 直哉

Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces erectile dysfunction following cavernous nerve injury in rats

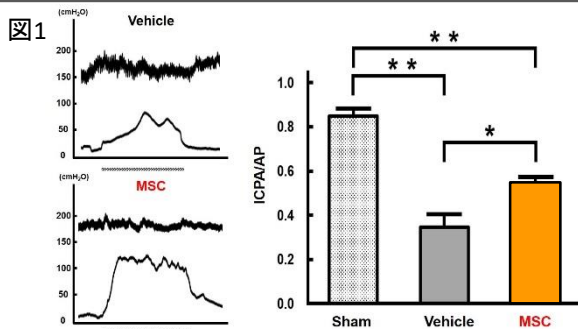
Yohei Matsuda, MD, Naoya Masumori, MD, PhD

Department of Urology

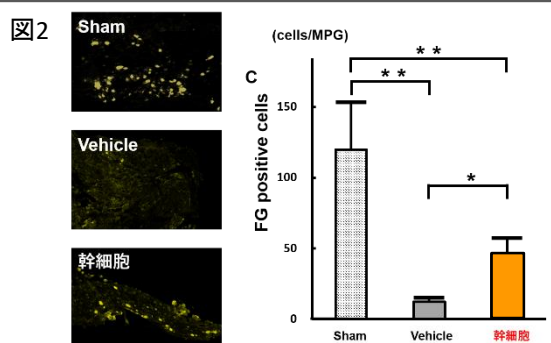
根治的前立腺摘除術後の勃起障害を想定した陰茎海綿体神経電気損傷モデルを用いて骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植の勃起機能に対する有効性を検討した



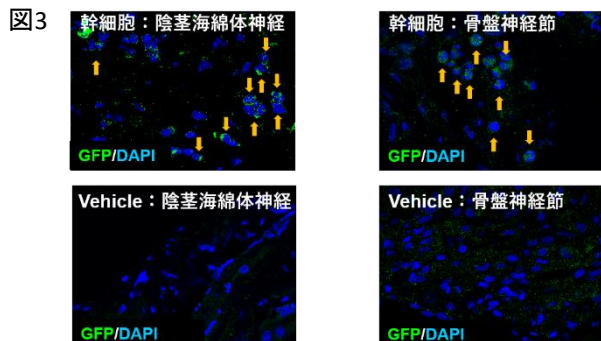
MSC移植により勃起機能は改善



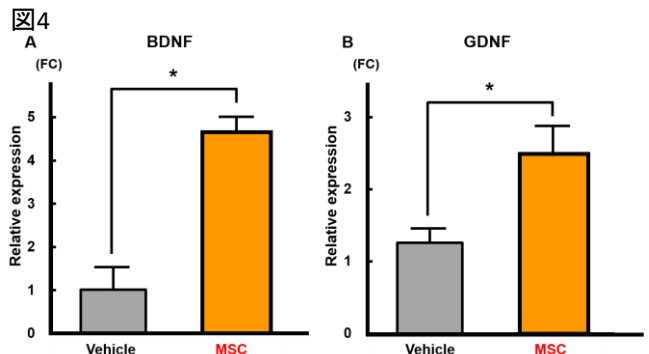
MSC移植により陰茎海綿体神経は保護された



MSCは神経節・神経損傷部にhoming



骨盤神経節にて神経栄養因子の発現亢進



陰茎海綿体神経電気損傷後のMSC移植により勃起機能・神経細胞は温存された(図1,2)。MSCは移植後に陰茎海綿体神経や骨盤神経節にhomingし、神経栄養因子の発現亢進に寄与していると考えられる(図3,4)。MSC移植は前立腺全摘除術後の勃起障害に対する新規治療として期待される。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する革新的治療法の開発と臨床応用

小児科学講座 福村 忍

Development of the innovative remedy and clinical application
for Duchenne Muscular Dystrophy

Shinobu Fukumura, MD, PhD Department of Pediatrics

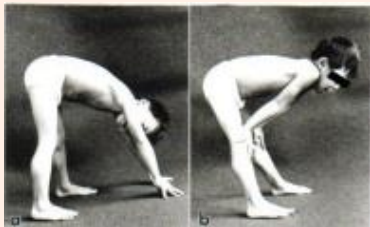
概要 summary

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は治療法のない遺伝性進行性の致死性疾患です。我々は、タンパク質脱アセチル化酵素SIRT1活性化薬レスベラトロールがDMD骨格筋の筋量増加、線維化抑制、筋崩壊抑制、筋力と筋持久力増加、心筋線維化抑制と心機能を保つことを見出し、小規模臨床研究でも効果を得た。レスベラトロールをDMD治療薬として開発する。

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most prevalent lethal X-linked myopathy, and it is severe. We found that resveratrol, an activator of protein deacetylase SIRT1, ameliorates muscular and cardiac pathophysiology of DMD. Our clinical trial also showed its effectiveness. We are trying to develop resveratrol as a standard remedy for DMD.

DMDってなに？

次第に筋肉や心臓が衰えていく希少遺伝病であり、治療法がない。3歳ぐらいから発症。



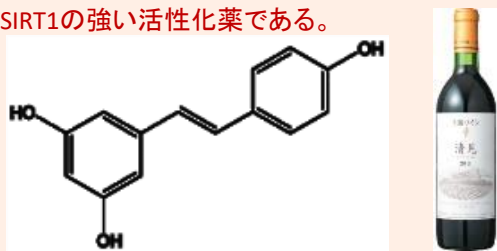
<https://www.jmda.or.jp/mddictsm/mddictsm2/mddictsm2-1-1/mddictsm2-1-1/>

SIRT1ってなに？

長寿遺伝子と呼ばれ、酵母の寿命を延ばす遺伝子のホモログ。転写調節を行う脱アセチル化酵素として機能し、酸化ストレスを下げ細胞の生存を促す。

レスベラトロール (RSV) ってなに？

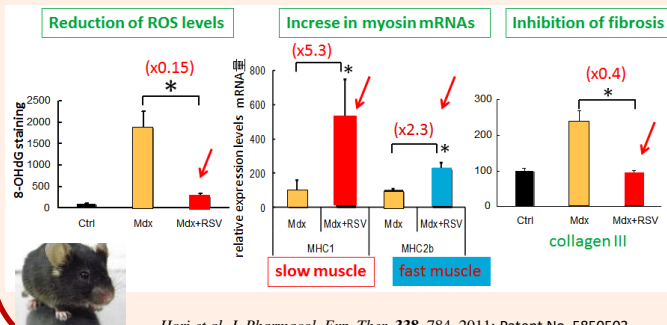
赤ワインなどに含まれるポリフェノール。SIRT1の強い活性化薬である。



レスベラトロール(RSV)のDMDモデルマウス骨格筋への作用

Effects on skeletal muscles

酸化ストレスROS著減 筋肉mRNA量増加 繊維化抑制

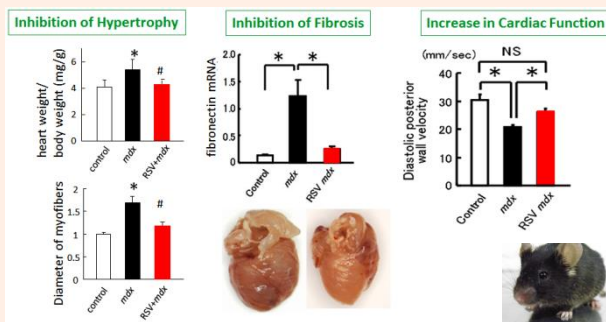


Hori et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 338, 784, 2011; Patent No. 5850503

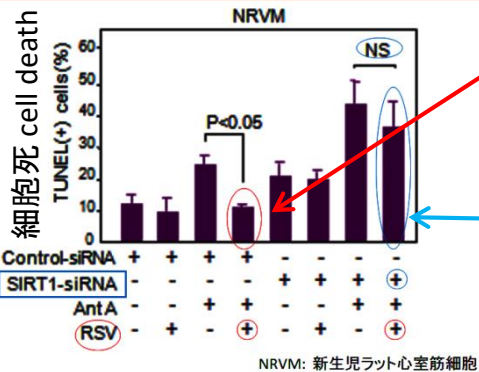
レスベラトロール(RSV)のDMDモデルマウス心筋への作用

Effects on the heart

心筋肥大の抑制 心筋線維化の抑制 心機能の亢進



レスベラトロール(RSV)はSIRT1を介して効いているの？ SIRT1 involved?

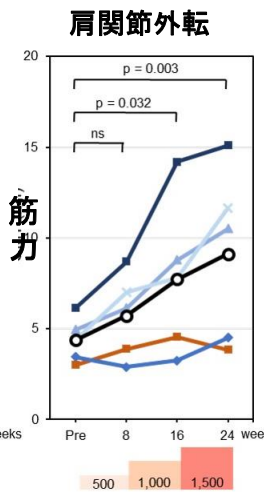
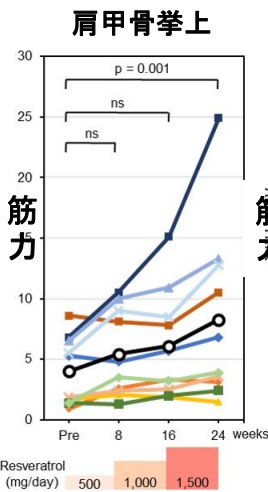
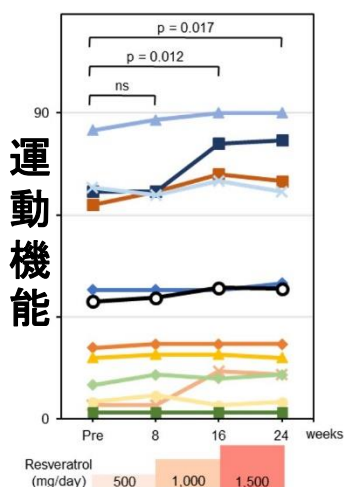


レスベラトロール (RSV)は細胞死を抑制
Resveratrol (RSV) inhibits cell death

SIRT1がないとレスベラトロール
は細胞死を抑制できない
Resveratrol does not inhibit cell
death in the absence of SIRT1

Tanno et al. J. Biol. Chem. 285, 8375, 2010

筋ジストロフィーに対するレスベラトロール(RSV)の臨床試験 Clinical trial



レスベラトロール (RSV)を24週投与することで、運動機能、肩甲骨挙上、肩関節外転の改善が得られた
Resveratrol (RSV) improved MFM score, scapular elevation, and shoulder abduction.

Kawamura et al. Sci Rep 25, 20585, 2020

展望 Future Prospects

- 医薬品としてレスベラトロールの化学合成
Chemical Synthesis of Resveratrol for Medical Uses
- レスベラトロールの安全性試験
Safety Tests (GLP levels)
- 製剤化 Formulation for Child Patients (GMP levels)
- 臨床試験 Clinical Trials for Duchenne Muscular Dystrophy
- レスベラトロール (RSV) 利用の応用
Explore Other Possibilities of RSV

レスベラトロール (RSV) の利点
Advantages of RSV

- 長い歴史
Long history as a health food
- 低副作用
Mild adverse effects
- 経口
Oral administration

特許情報

- 日本国特許第5850503号
筋ジストロフィーを処置するための組成物

p53誘導アポトーシス阻害遺伝子の抑制による癌治療

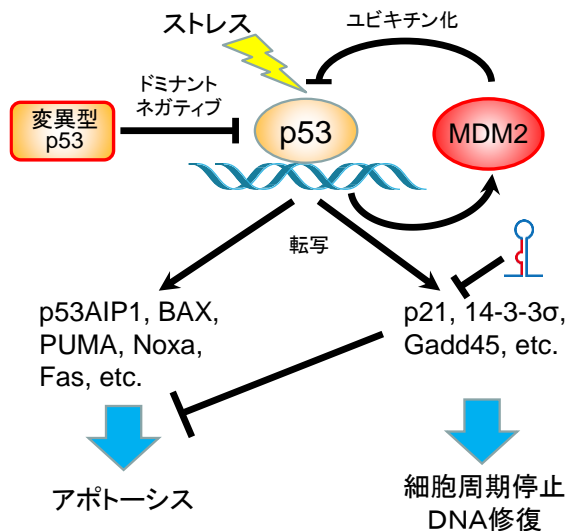
附属フロンティア医学研究所 ゲノム医科学部門 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野隆至

A single adenovirus co-expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs improves therapeutic outcome in cancer

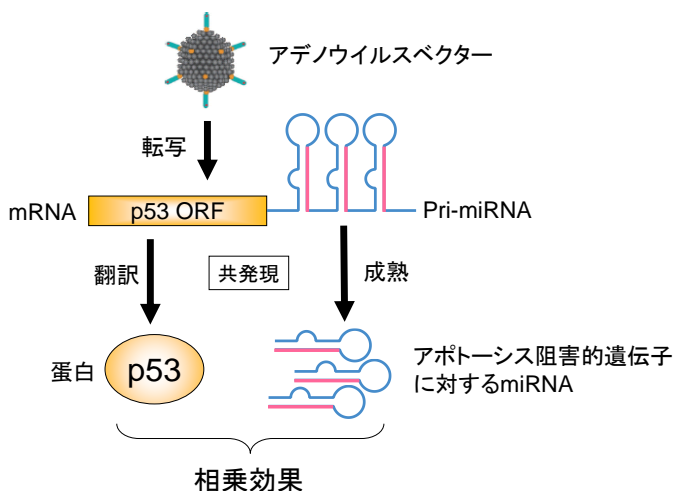
Masashi Idogawa, MD, PhD, Yasushi Sasaki, MD, PhD, Takashi Tokino, PhD

Dept. of Medical Genome Sciences, Research Institute for Frontier Medicine

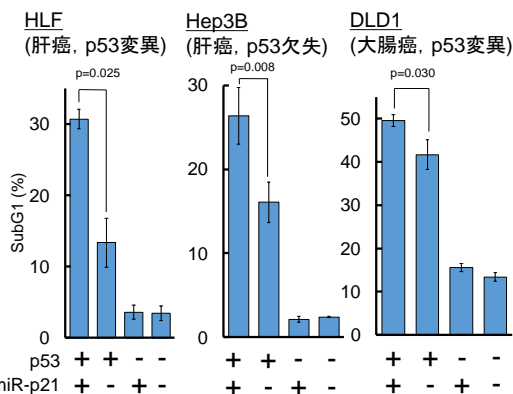
p53によるアポトーシス制御



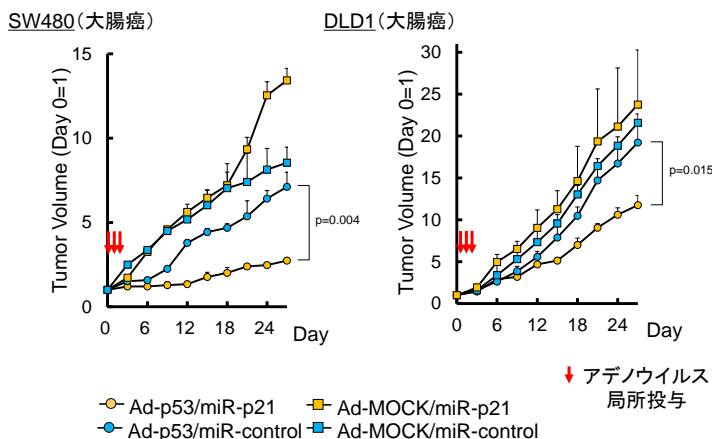
p53とmiRNAの共発現による癌治療



p21に対するmiRNAとp53の共発現によるアポトーシス増強



p53/miR-p21共発現アデノウイルスによる治療効果(マウスモデル)



p53とそのアポトーシス阻害遺伝子p21を抑制するmiRNAのアデノウイルスによる共発現が癌治療効果を増強する。

Idogawa, et al. Clinical Cancer Research 2009.

日本国特許第5630769号 アポトーシス誘導剤
米国特許US8686127 Apoptosis Inducer
中国特許ZL 200980121910.2

《連絡先》 札幌医科大学附属産学・地域連携センター
TEL:011-611-2111(内線21570) email:chizai@sapmed.ac.jp

胆汁排泄型肝臓オルガノイドの創出方法およびそれを用いた新たなNASH Ex vivoモデル

非常勤講師 谷水 直樹

附属フロンティア医学研究所 組織再生学部門

(現所属: 東京大学医科学研究所幹細胞治療センター再生医学分野)

Liver organoid model for pharmacokinetic assay

Naoki Tanimizu, Ph. D. Associate Professor

Department of Tissue Development and Regeneration Research Institute for Frontier Medicine

(Current affiliation: Division of Regenerative Medicine, Center of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Core Benefit

- ・ 量産可能な創薬開発用肝臓in vitroモデル/肝臓・胆管接続部という生体内構造のEx vivoモデル
- ・ CYP3A4活性とアルブミン分泌の誘導と長期間維持を確認済
- ・ 候補化合物の肝臓から胆管への代謝と肝毒性を評価可能
- ・ 肝オルガノイド構築と脂肪肝病態を短時間(3~4週間程度)で誘導可能
- ・ 肝細胞への遊離脂肪酸(FFA)の蓄積状況をリアルタイムで把握可能

Background and Technology

創薬の前臨床試験では、生体内と同等の高い代謝活性を示す肝細胞を用いた活性・毒性試験が望まれる。in vitroの試験を実施するためには、動物またはヒトの肝臓から得た肝細胞を培養する必要がある。

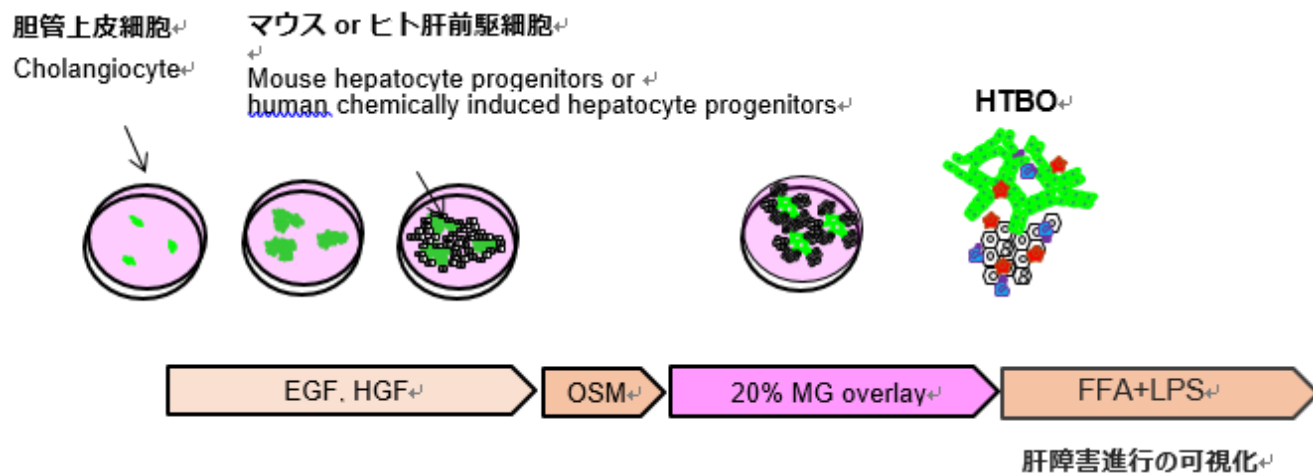
しかしながら、初代肝細胞は培養過程で速やかに機能を失い、健全なヒト肝細胞を大量に得ることは困難であるうえに個体差が大きいなどの理由から、取得データの信頼性担保が難しいという課題があった。また、多くのin vitro 安全性試験に用いられているHepG2, HepRGなどの肝癌細胞株は、機能面で充分とは言えない。

さらに、従来培養では、生体内と同様な肝組織構造が構築されていないために、肝組織内での薬物動態を再現することが不可能であった。

本技術の発明者は、マウスの小型肝細胞(SH※)とマウスの胆管上皮細胞(BEC)を用いて、以下のプロトコルを用いて胆管構造を備える新規肝臓オルガノイド (Hepatobiliary Tubular Organoid; HBTO) の作成に成功した。

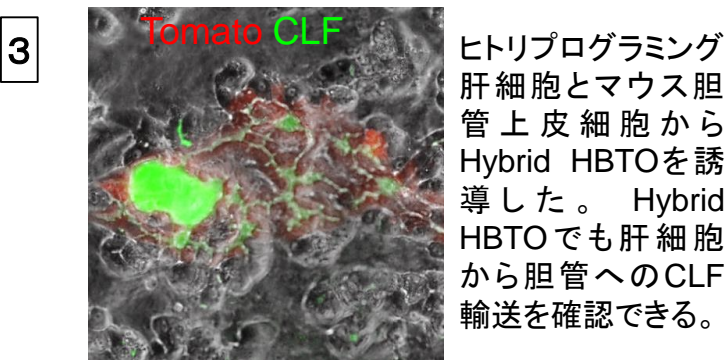
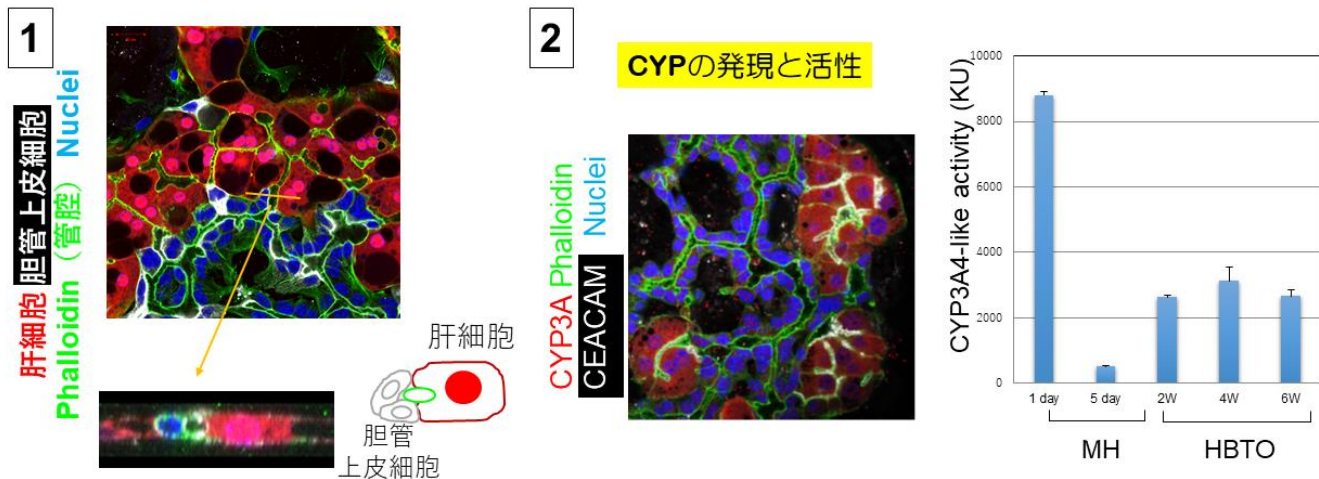
HBTOでは毛細胆管と胆管が接続しており、高度の肝細胞機能を長期間維持することや、肝細胞代謝産物の組織内動態を再現することなどが可能になった。

オルガノイド構築と病態誘導の流れ



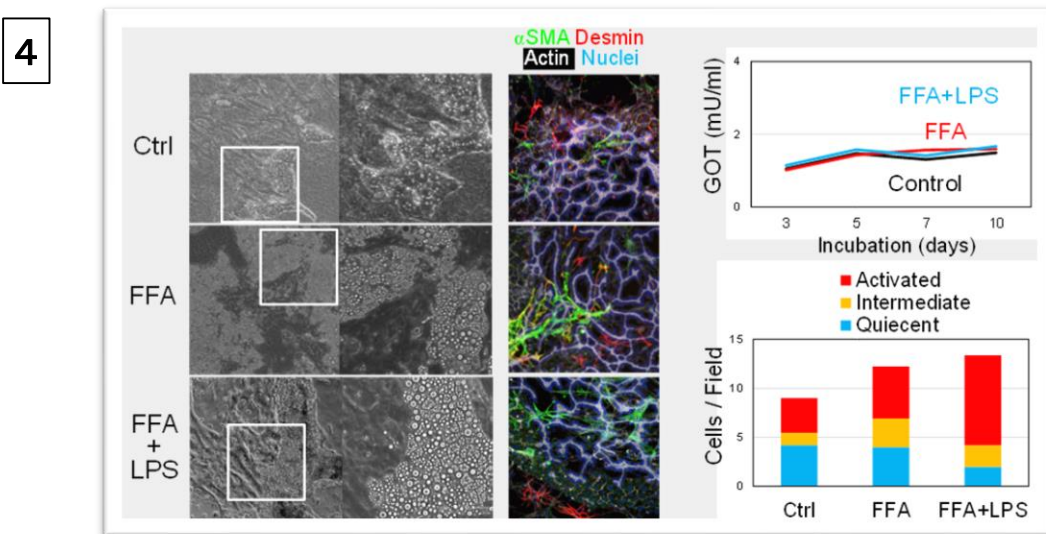
Data

- ・毛細胆管と胆管の接続部構造が肝細胞と胆管上皮細胞によって構築されている (図1)
- ・肝細胞単独培養では急速に消失するCYP活性が、1カ月以上安定に維持される (図2)
- ・ヒト肝細胞とマウス胆管上皮細胞からHybrid HBTOを誘導可能である(図3)
- ・脂肪酸(FFA)とリポ多糖(LPS)添加によって炎症を誘導すると活性化された星細胞が増加する(図4)



Patent

特願 2021-507438
17/440,568 (US)
20773734.7 (EP)



慢性炎症疾患の背景にある免疫病態の解明と臨床への応用

フロンティア医学研究所 免疫制御医学部門 池上一平、亀倉隆太、一宮慎吾

Study of immunopathology underlying chronic inflammatory diseases and clinical application

Ippei Ikegami, Ryuta Kamekura, Shingo Ichimiya

Department of Human Immunology, Research Institute for Frontier Medicine

免疫応答遷延化の新規要因に基づくアプローチ

自然免疫

炎症性サイトカイン-上皮細胞-マスト細胞連関

適応免疫

濾胞ヘルパーT細胞 (Tfh細胞：抗体産生)

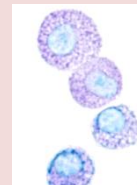
免疫老化

末梢ヘルパーT細胞 (Tph細胞：組織傷害)

臨床検体の解析



動物モデルの解析

CRISPR/Cas9による
コンディショナル
遺伝子欠損
マウス※ 高親和性抗体の産生を調節するTfh細胞 (PD1⁺CXCR5⁺)
と細胞傷害能を示すTph細胞 (PD1⁺CXCR5⁻) の病態研究Bob1によるCD4⁺ T細胞の機能調節機構*Eur J Immunol.* 2016.*Biochem Biophys Res Commun.* 2019.IgG4関連疾患とPD-1^{hi}BCL6^{hi}Tfh細胞*J Immunol.* 2017.*Front Immunol.* 2022.

Tfh細胞とTph細胞の協調による慢性炎症

Curr Opin Rheumatol. 2019.CX3CR1⁺Tph細胞が介在する

免疫関連病変の組織傷害

Mod Rheumatol. 2021.

血液Tfh細胞サブセットの生理的機能変容

J Hum Genet. 2017.

特発性肺線維症の病態形成とTfh細胞

Respir Res. 2019.アトピー性気管支喘息の重症度および
治療反応性とTfh細胞*Allergol Int.* 2020.IL-36 γ が介在する掌蹠膿疱症の皮膚病理*J Invest Dermatol.* 2020.

IL-9 – PYY連関による慢性皮膚炎症

J Invest Dermatol. 2022.

腹部血管3DCTにおける静脈位相のスキャンタイミングを個別化する

Double bolus tracking (DBT)法の開発

札幌医科大学附属病院放射線部 大橋 芳也、小倉 圭史

Development of double-bolus tracking (DBT) for individualized scan timing of venous phase in abdominal vascular 3DCT.

Yoshiya Ohashi, B.Sc, Keishi Ogura, PhD

Division of Radiology, and Nuclear Medicine, Sapporo Medical University Hospital

背景 Background

近年、腹腔鏡や手術支援ロボットを用いた低侵襲手術が普及してきたことから、術前に静脈の位置や走行バリエーションを詳細に把握することへの要望が高まっている。例えば、横行結腸癌手術では、脆弱な静脈の裂傷リスクを避けるため、上腸間膜静脈周囲の明瞭な3DCT画像が安全な手術を行うために重要になる。しかし、体内に注入された造影剤は心臓から全身を巡る過程で薄まり、被検者ごとに診断領域の静脈への到達するまでの時間も異なる。そのため、従来のX線CT装置では、被検者によらず静脈を明瞭に撮影することが困難な状況にあった。本発明は、この問題を解決するために開発された。目的は、CTアンギオグラフィーにおいて被検者ごとに静脈（特に門脈系）を明瞭に描出することが可能なX線CT装置、撮像方法そしてプログラムを提供することである。具体的には、主に動脈の描出を改善するための造影CT撮影法として、体内の造影剤の循環をリアルタイムでモニタリングしながら撮影するBolus tracking (BT) 法を改良し、動脈だけでなく静脈もモニタリングしながら撮影するDouble bolus tracking (DBT) 法を開発した。これにより、被験者個別の静脈の循環に合わせて撮影することが可能となる。

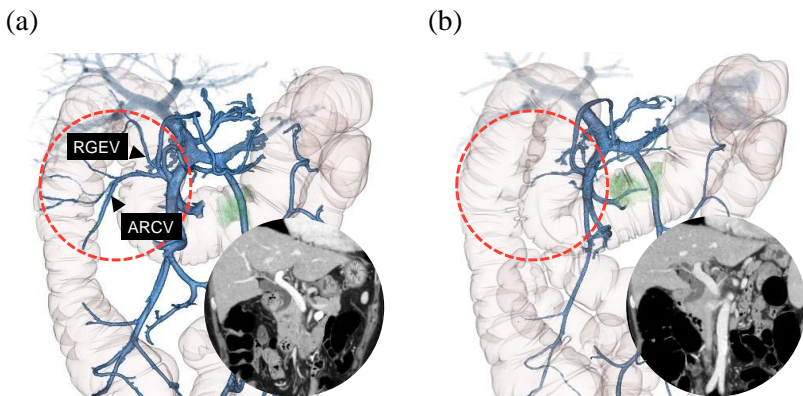


図2. (a) DBT法による3D-CT画像では、副右結腸静脈(ARCV)と右胃大網静脈(RGEV)からなる胃結腸静脈幹(GCT)が確認できる。(b) 従来法による3D-CT画像では、明確な静脈の描出は困難である。

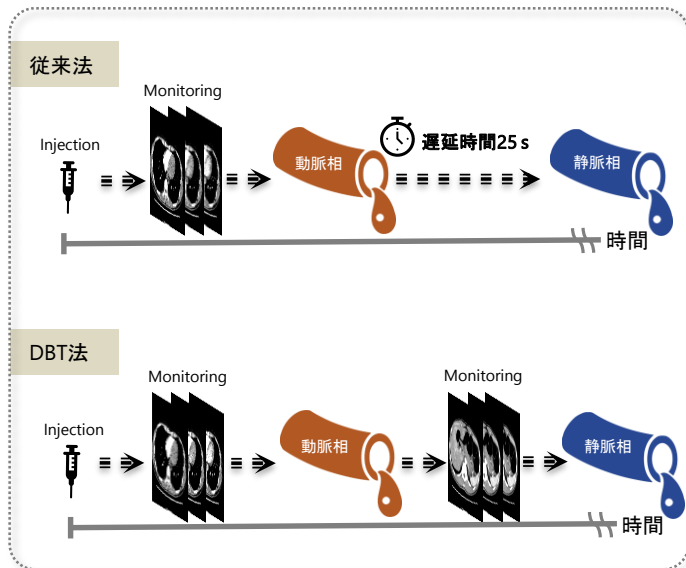


図1. 従来の遅延時間固定法とDBT法の撮影プロトコル

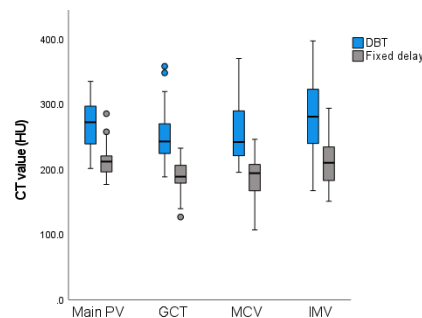


図3. 主門脈(Main PV)、胃結腸静脈幹(GCT)、中結腸静脈(MCV)、下腸間膜静脈(IMV)のCT値。DBT法において著しい造影増強効果を認めた。

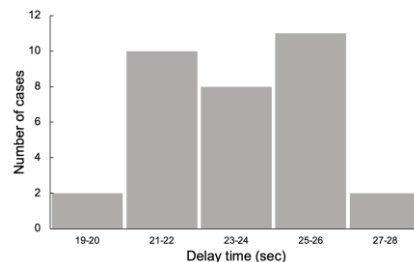


図4. DBT法における動脈-静脈位相間の遅延時間(範囲: 20.6-27.6秒、中央値: 23.5秒)