

多種類のヒト細胞不老化による長期的大量培養を 実現する技術開発

千葉大学 大学院医学研究院 イノベーション再生医学・准教授
高山 直也

本日の内容

- ✓背景；前駆細胞リプログラミングとは？
- ✓従来技術の問題点-1
- ✓従来技術の問題点-2
- ✓想定される用途
- ✓実用化に向けた課題
- ✓共同研究について

再生医療（細胞療法）の課題

- (1) 品質保証細胞の安定供給方法が未確立**
(ヒトiPS細胞は、**分化の不均一性**など細胞供給の安定性が確保できない)
- (2) 高費用対低効果**
(自家細胞療法は、ウイルスクリアランス試験などを個別に実施し、治療開始まで**数ヶ月**に及ぶ準備期間と**数千万円**という高額な治療費が発生)

抗老化研究の課題

- (1) 再現性の高い介入方法が未確立**
(ビタミン剤や抗酸化剤、抗老化物質の探求、senolysis研究は再現性が難しく、**確実な若返りの実現には至っていない**)
- (2) 山中初期化因子での細胞系譜制御方法が未解決**
(山中因子での一過性不完全リプログラミング法は**細胞系列の維持ができない**)

前駆細胞リプログラミングとは？

ヒト多系統老化耐性細胞を用いた**混合型細胞療法**技術開発

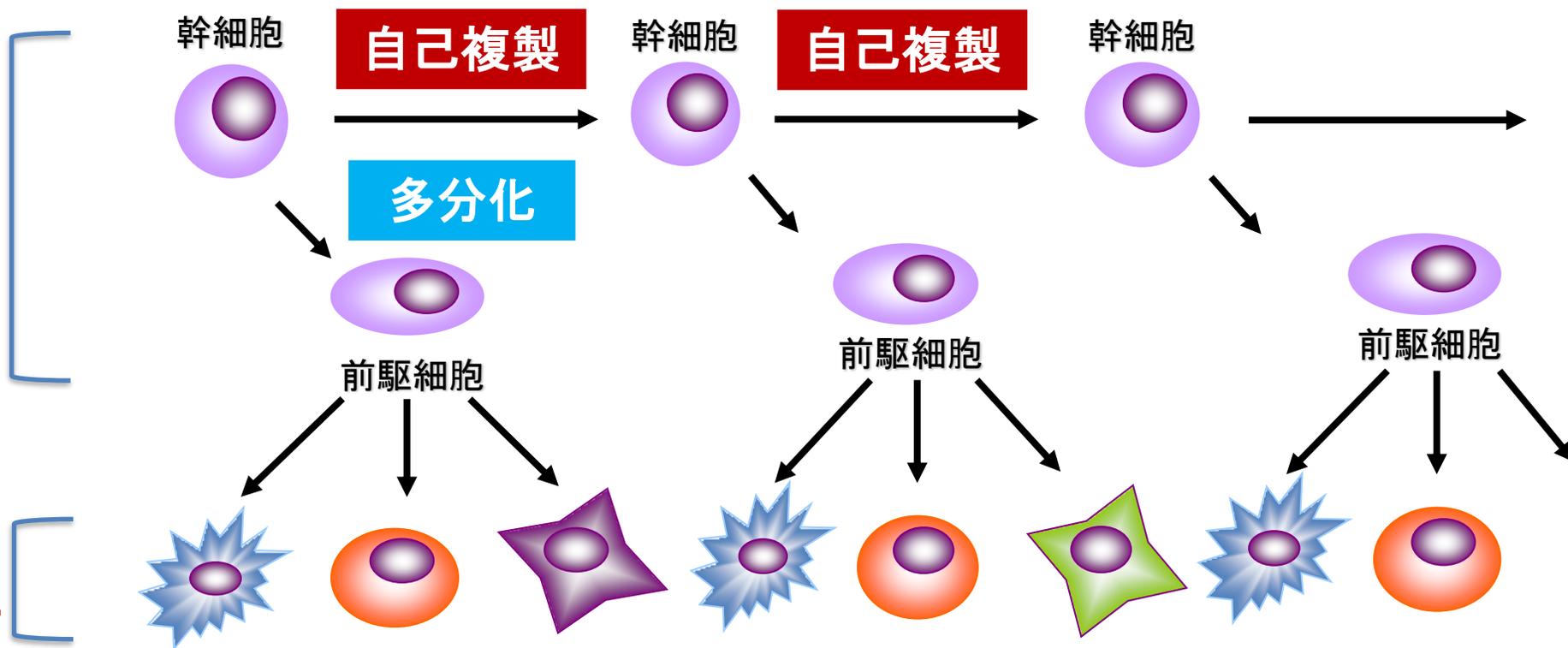
細胞の若返り技術（最終的には人工不老長寿技術開発）

幹・前駆細胞とは何か？ (幹細胞の2つの能力)

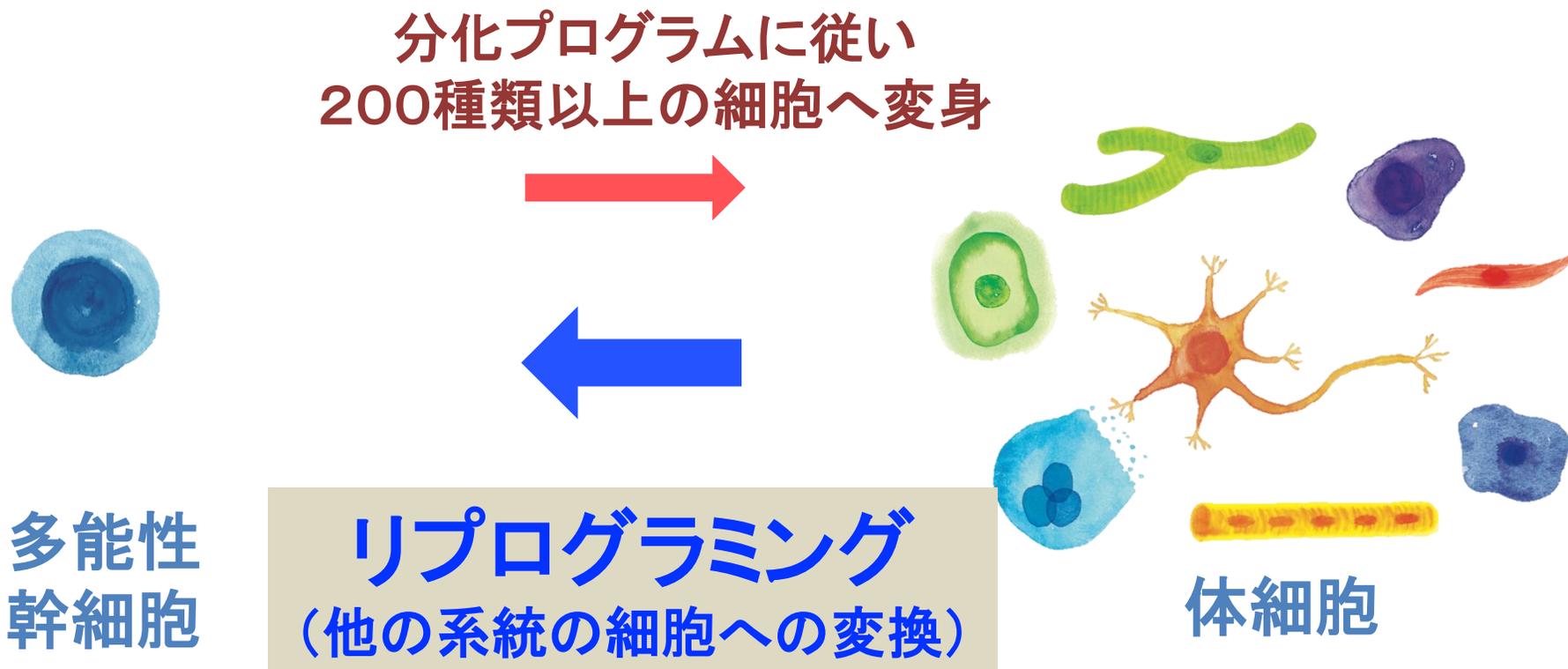
例；造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など

幹・前駆細胞
全体の1%未満
増殖能力高い

分化細胞
全体の99%以上

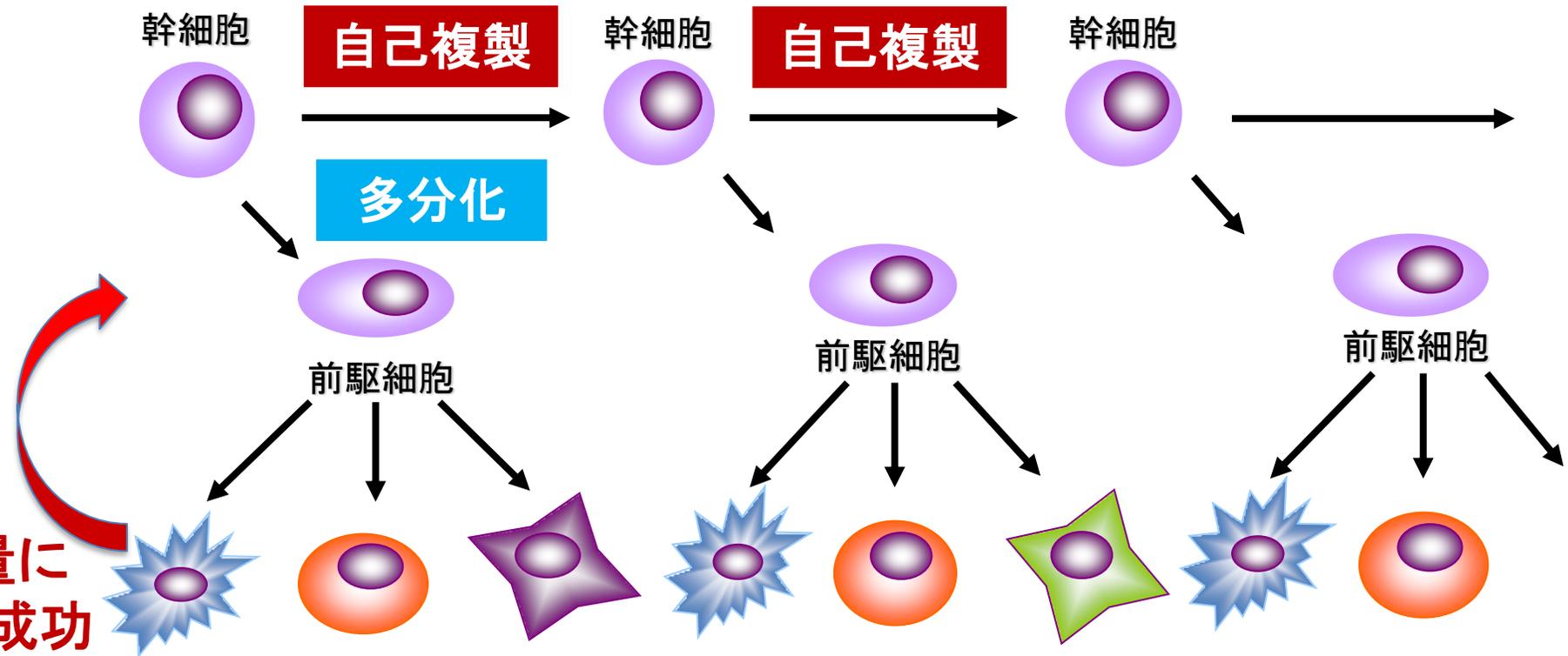


体細胞を他の細胞の状態に変更させる (リプログラミング、例；多能性幹細胞)



前駆細胞リプログラミングとは何か？

大量に存在する分化細胞から、能力の高い同系列の前駆細胞を生み出す技術



幹・前駆細胞へ
若返らせて、大量に
作製する技術に成功

今回の技術のポイントは2つ

- ✓細胞老化耐性獲得技術(大量で均一な質の細胞供給)
- ✓細胞若返り技術(個体の若返りにもつながりうる)

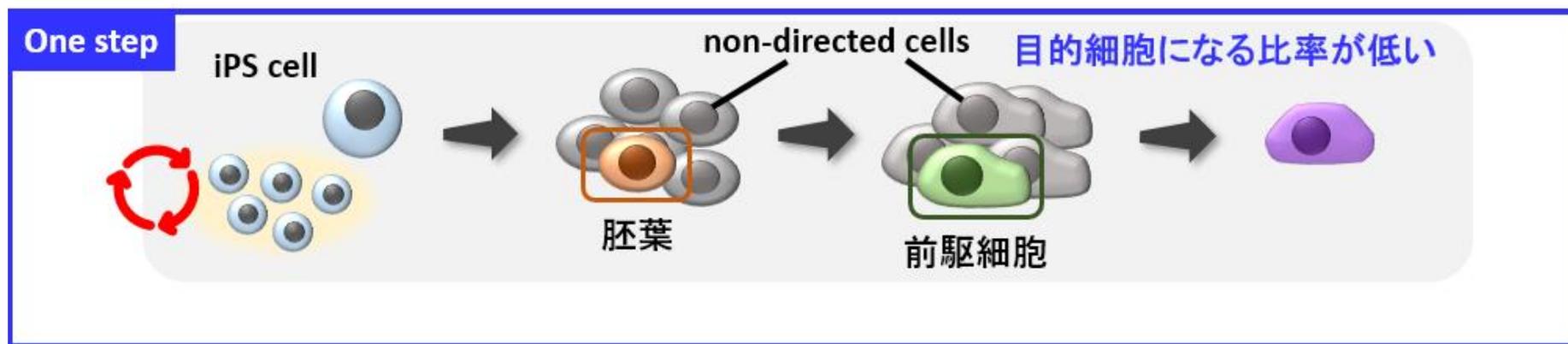
従来技術とその問題点-1

- (1) 品質保証細胞の安定供給方法が未確立
- (2) 高費用対低効果

従来技術とその問題点-1 (細胞療法)

iPS細胞が臨床応用可能な目的細胞を生み出せるか？

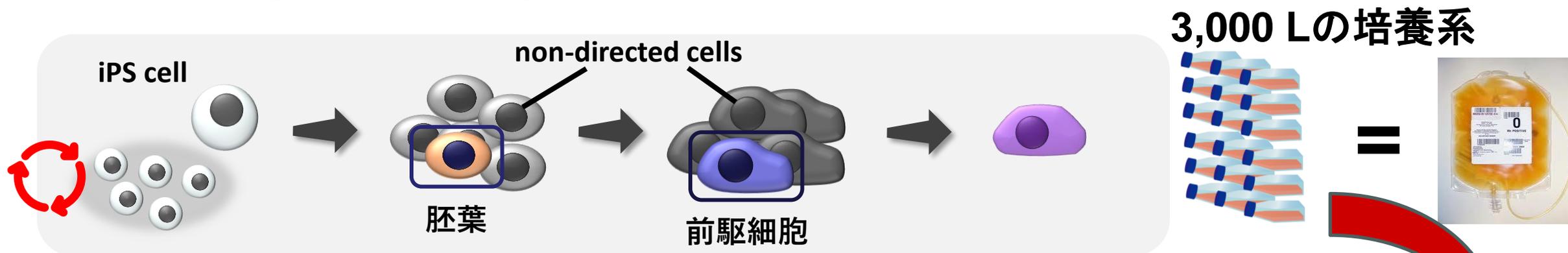
Takayama, Blood2008, JEM2010



- iPS細胞毎のクローン間差や、分化試行毎のばらつきにより、安定した目的細胞産生が難しい。
- 目的の細胞になる比率が低いため、**大量の培養系**と**長期間**の培養が必要になる。

例えば、1Packの血小板製剤には、3000Lの培養系、1ヶ月以上の培養が必要であり、培養期間、コストの面から産業化は不可能である。

新技術の特徴・従来技術との比較



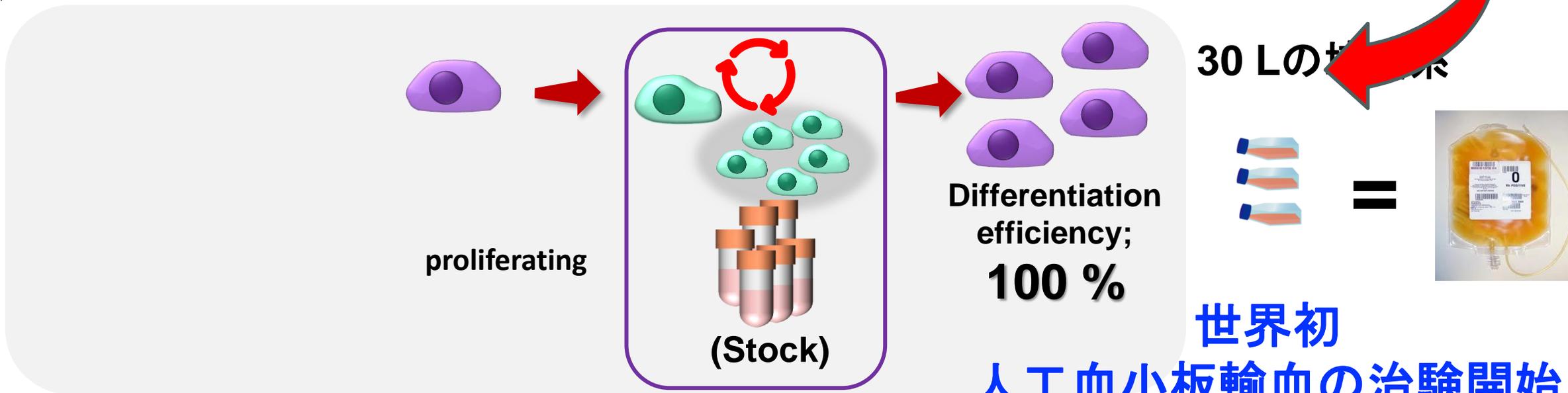
従来法

iPS細胞は目的の細胞になる比率が低く、非常に大量の培養系・長期間の培養が必要

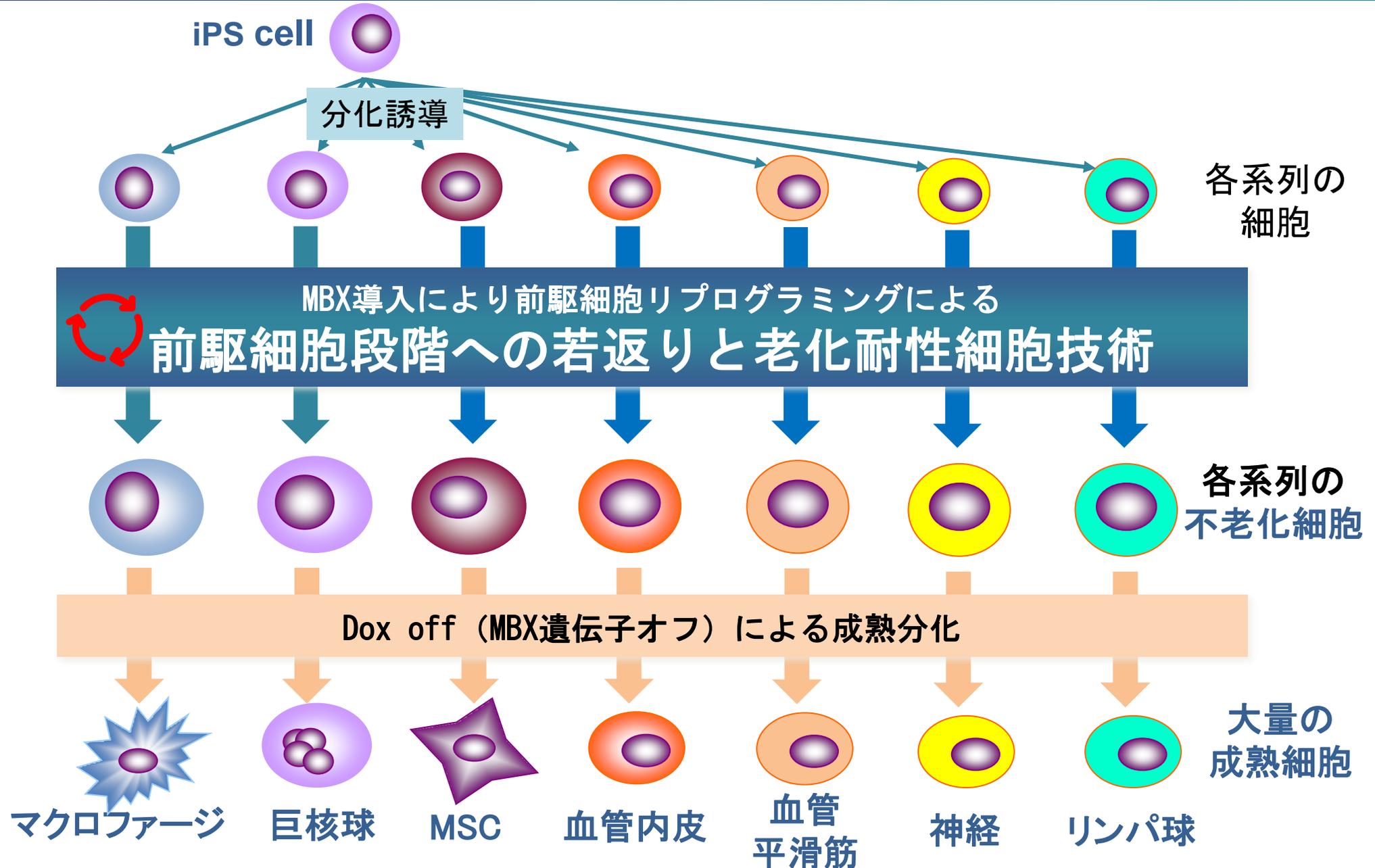
新法

目的の細胞の前駆細胞段階で大量増殖する能を付与する

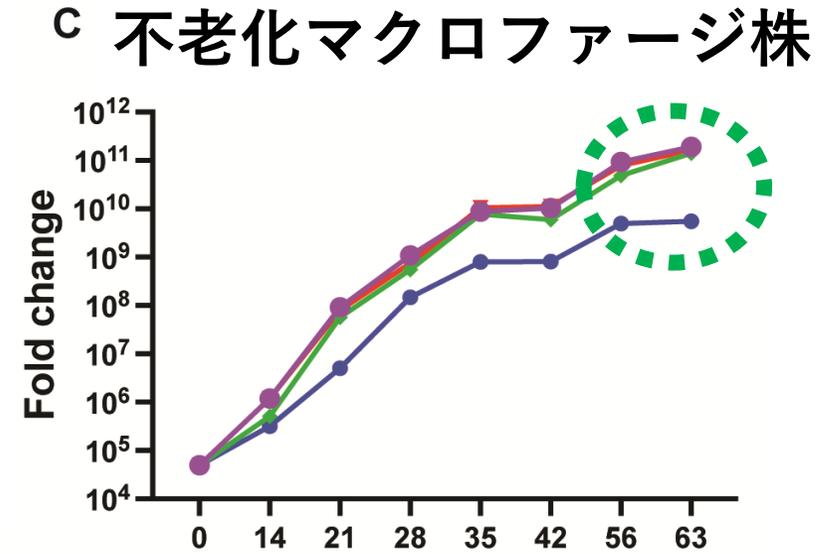
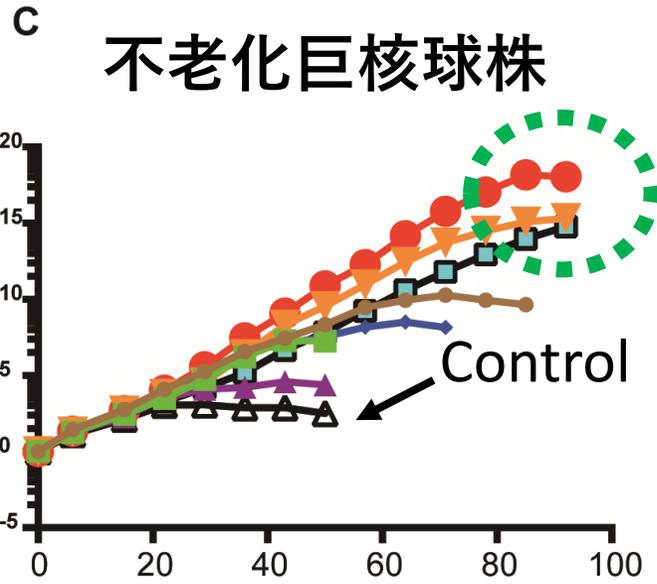
1/100に減少



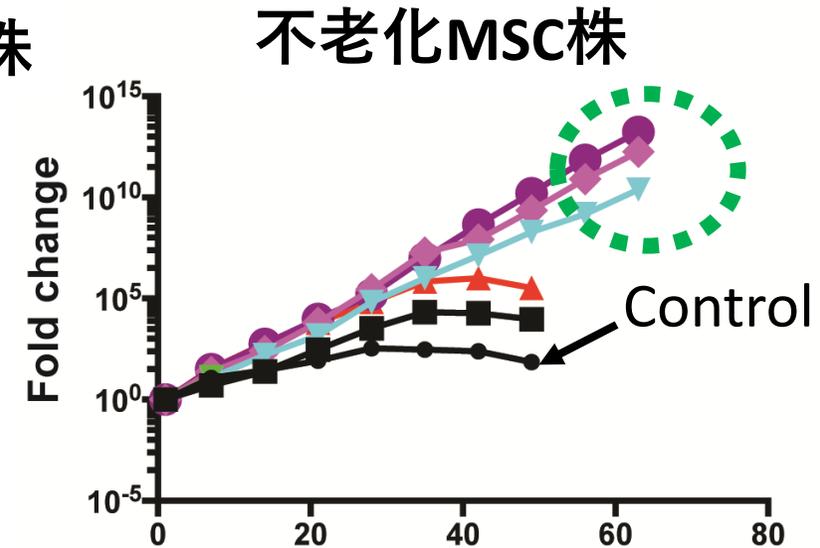
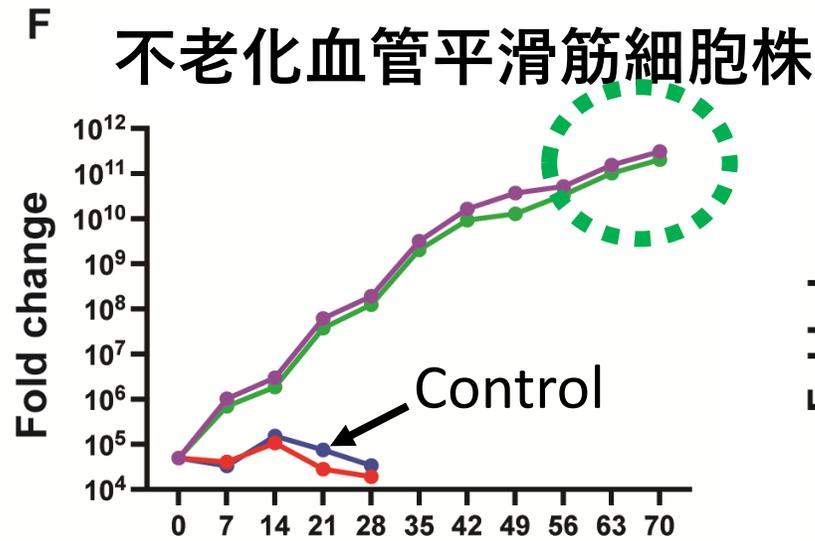
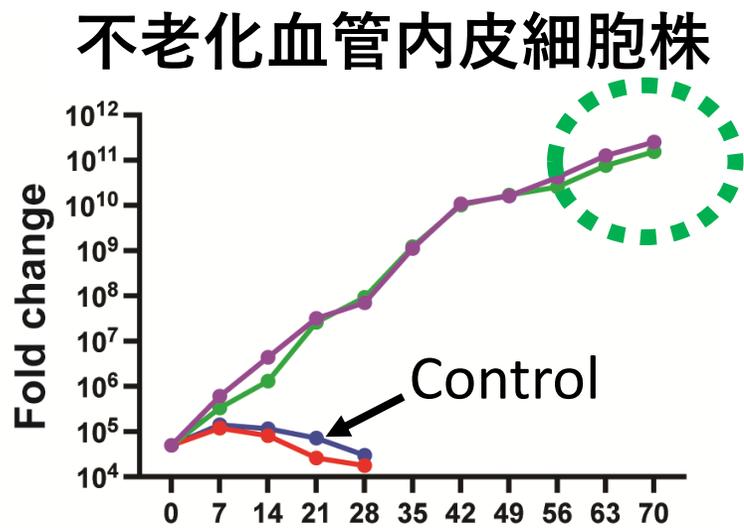
多種類の細胞の老化耐性獲得と大量増幅技術



多種類の細胞の老化耐性獲得と大量増幅技術

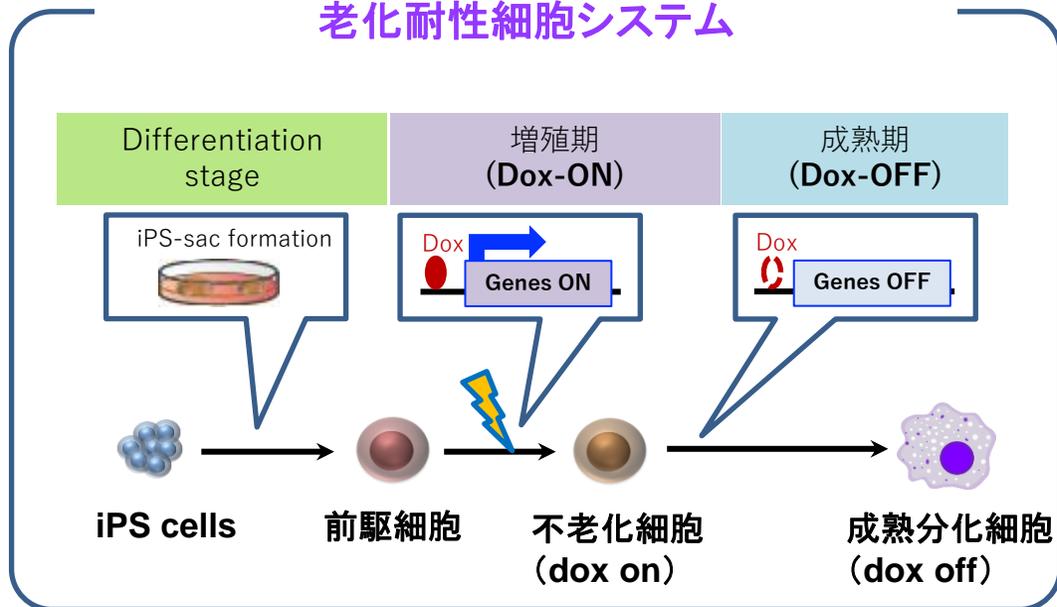


緑枠：MYC/BMI1
などにより安定した
増殖を達成



MBX遺伝子オフ後は成熟分化する

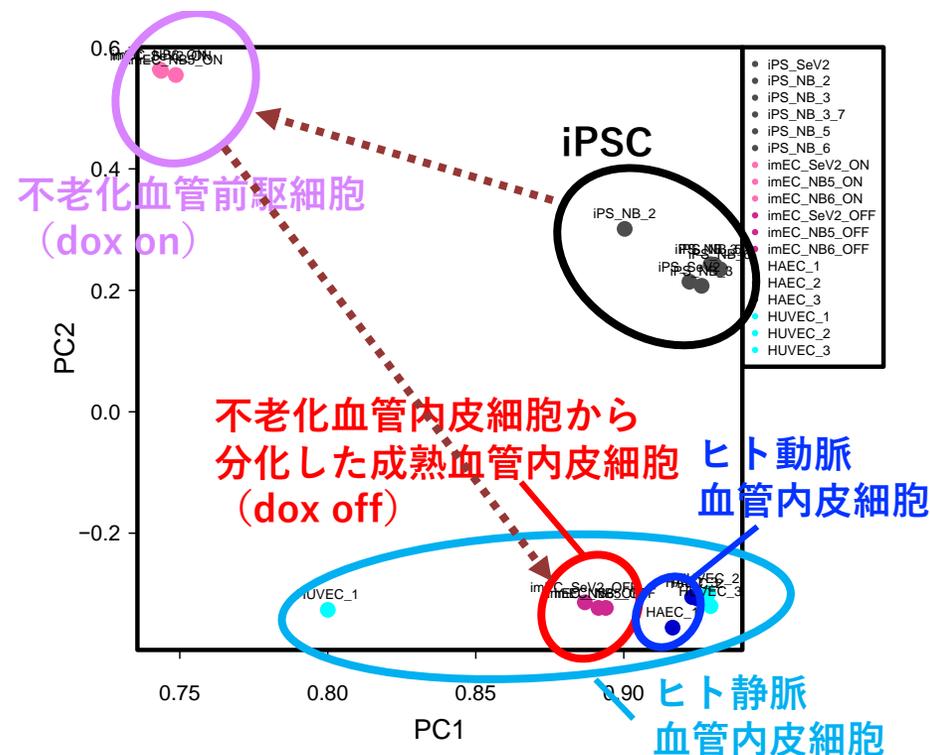
本特許の 老化耐性細胞システム



Doxycycline添加時 (MBX **on**) の時に**増殖**して、
Doxycycline除去時 (MBX **off**) に**分化**が進む。

M; c-MYC
B; BMI1
X; BCL-XL

不老化血管内皮細胞の例



RNAシーケンス解析による
性質の近さを距離で示した図。

不老化血管前駆細胞から分化成熟した血管内皮細胞(赤枠)は、健常者由来血管内皮細胞(ヒト動・静脈血管内皮細胞；青枠、水色枠)と性質が同等（距離が近い）である。

Dox除去により分化した血管内皮細胞はヒト体内の血管内皮細胞と同等の遺伝子発現パターンを示す

従来技術とその問題点-2

**(3)山中初期化因子での細胞若返りでは、
細胞系統が不安定化する**

OSKによる一過性不完全リプログラミングによる老化の抑制

Article

Cell

In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming

Graphical Abstract

Authors

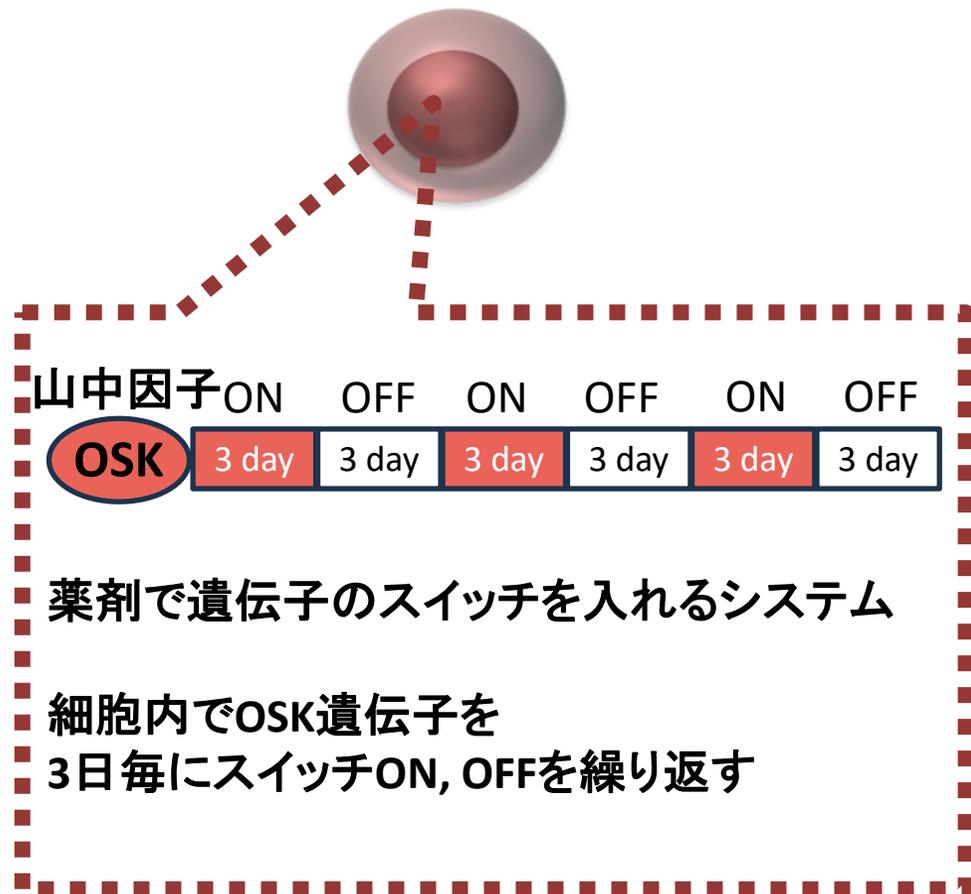
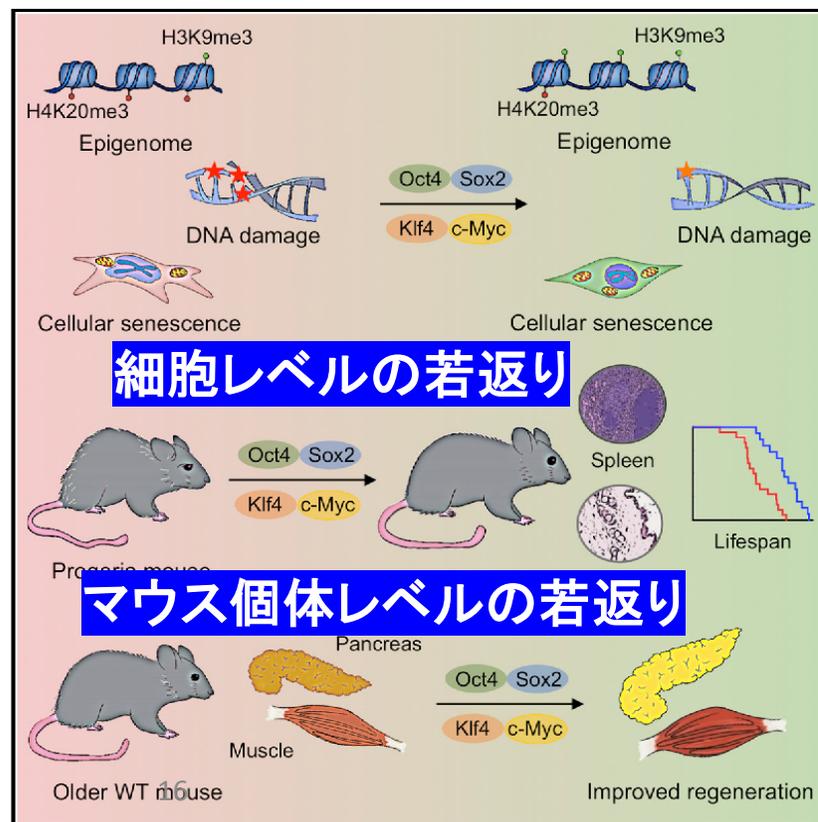
Alejandro Ocampo, Pradeep Reddy, Paloma Martinez-Redondo, ..., Isabel Guillen, Pedro Guillen, Juan Carlos Izpisua Belmonte

Correspondence

belmonte@salk.edu

In Brief

Cellular reprogramming by transient expression of Yamanaka factors ameliorates age-associated symptoms, prolongs lifespan in progeroid mice, and improves tissue homeostasis in older mice.

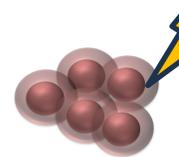


OSK; OCT4/SOX2/KLF4

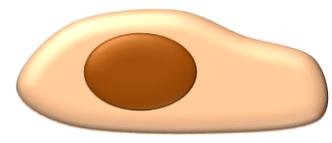
一過性不完全リプログラミングと前駆細胞リプログラミングの違い

一過性不完全
リプログラミング

OSK

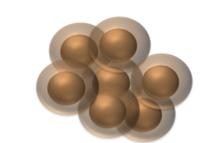


iPS cells



同系列の
前駆細胞への
一部初期化

OSK;
OCT4/SOX2/KLF4

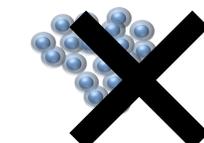
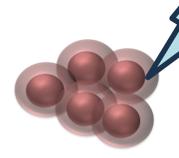


別系統の
細胞

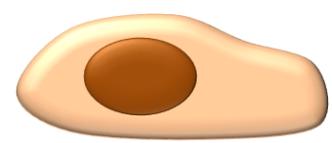
OSKは万能因子であり、導入すると一部の細胞で、元の細胞系列が失われてしまう

前駆細胞
リプログラミング

MB



iPS cells



同系列の
前駆細胞への初期化
大量培養化

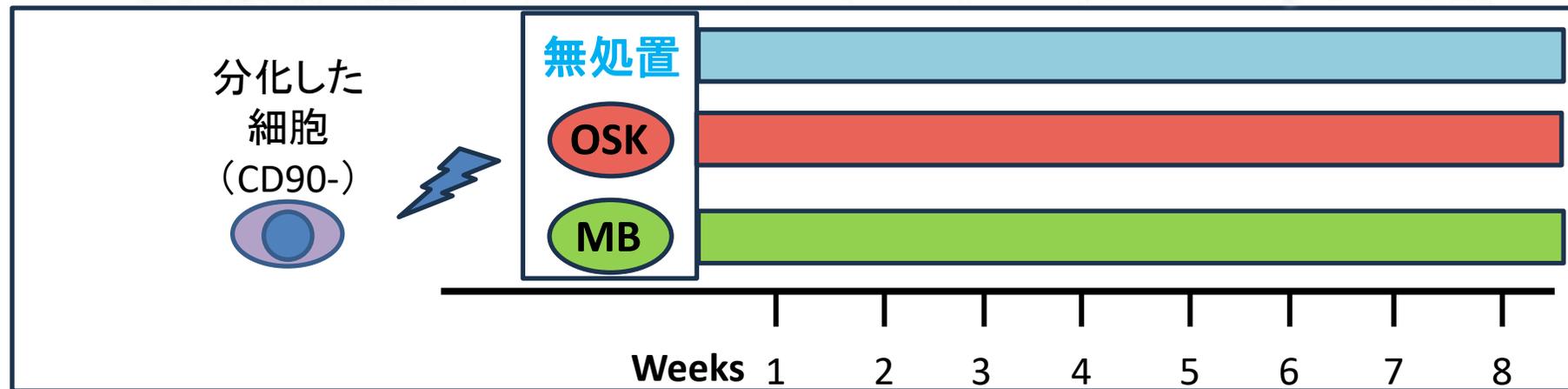
MB; c-MYC/BMI1



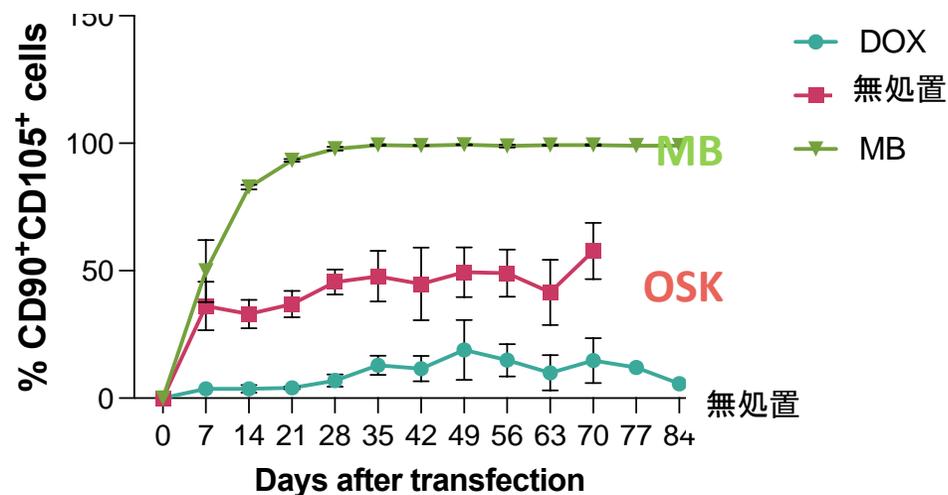
別系統の
細胞

MB (c-MYC/BMI1) は幹・前駆細胞に発現している因子であり、導入すると元の細胞系列の前駆細胞のみに戻る

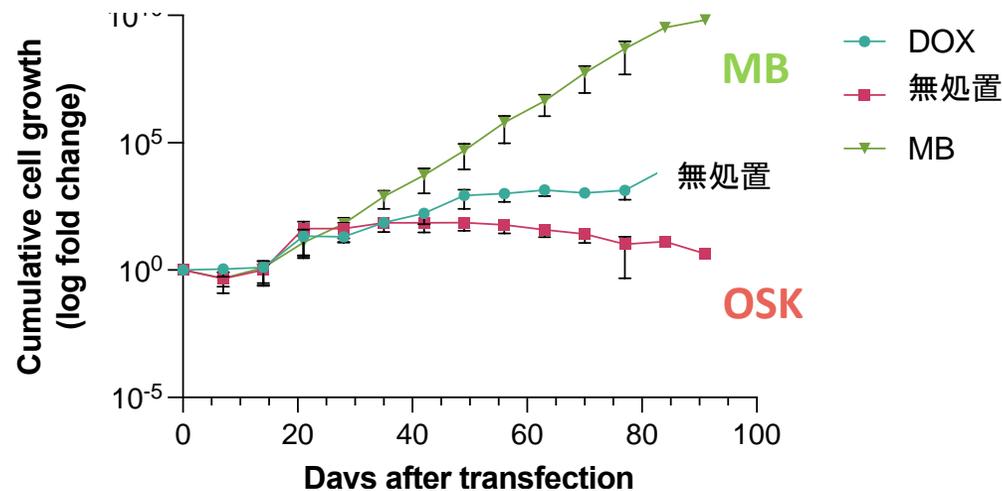
一過性部分リプログラミング (OCT4/SOX2/KLF4) と 前駆細胞リプログラミング (c-MYC/BMI1) の比較



幹細胞に戻った比率



幹細胞の絶対数

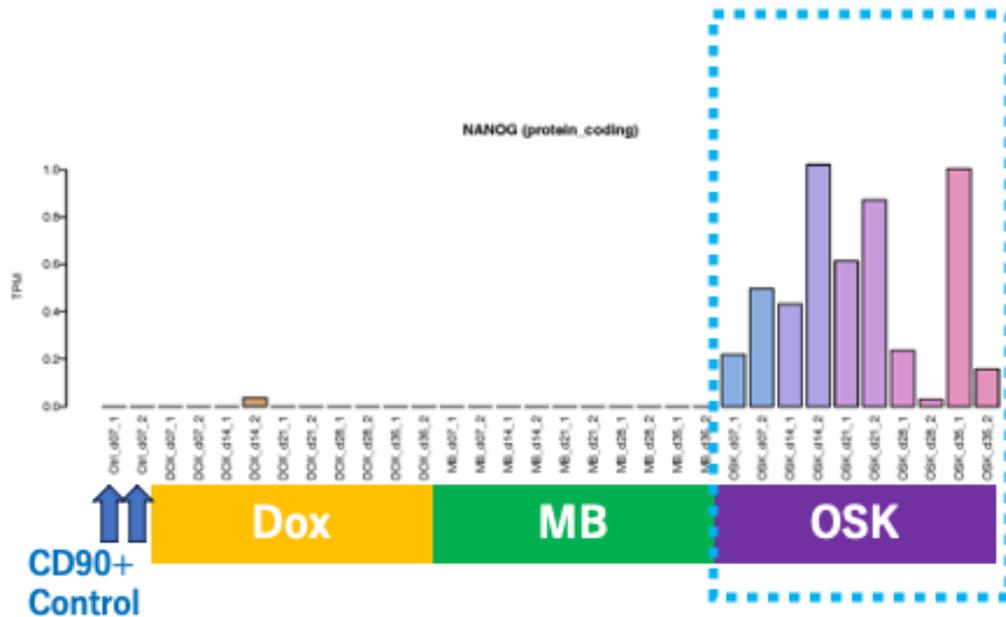


OSKでは、間葉系幹細胞への若返りが不完全、増殖しない

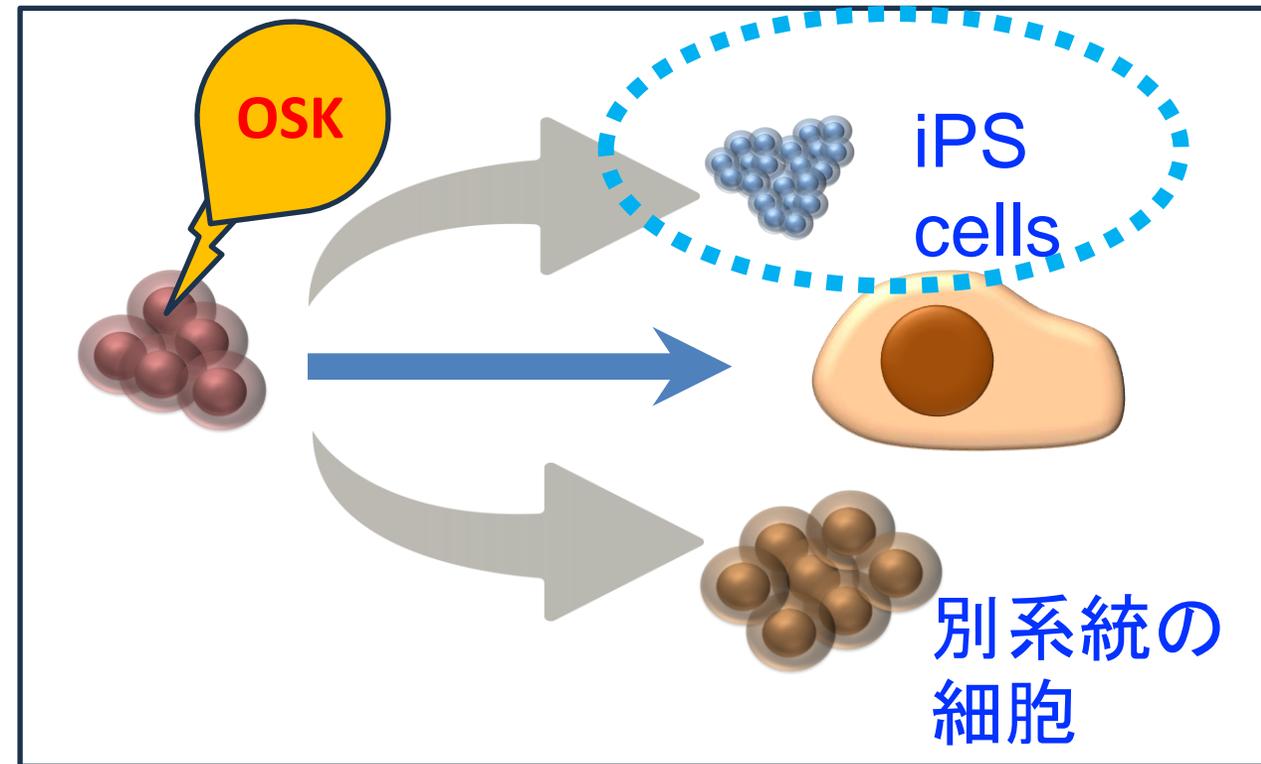
MBでは、間葉系幹細胞への若返りが完全、老化耐性獲得し増殖し続ける

一過性部分リプログラミング (OCT4/SOX2/KLF4) では 別系統の細胞が出現する

NANOG (多能性幹細胞のマーカ)
遺伝子の異常発現



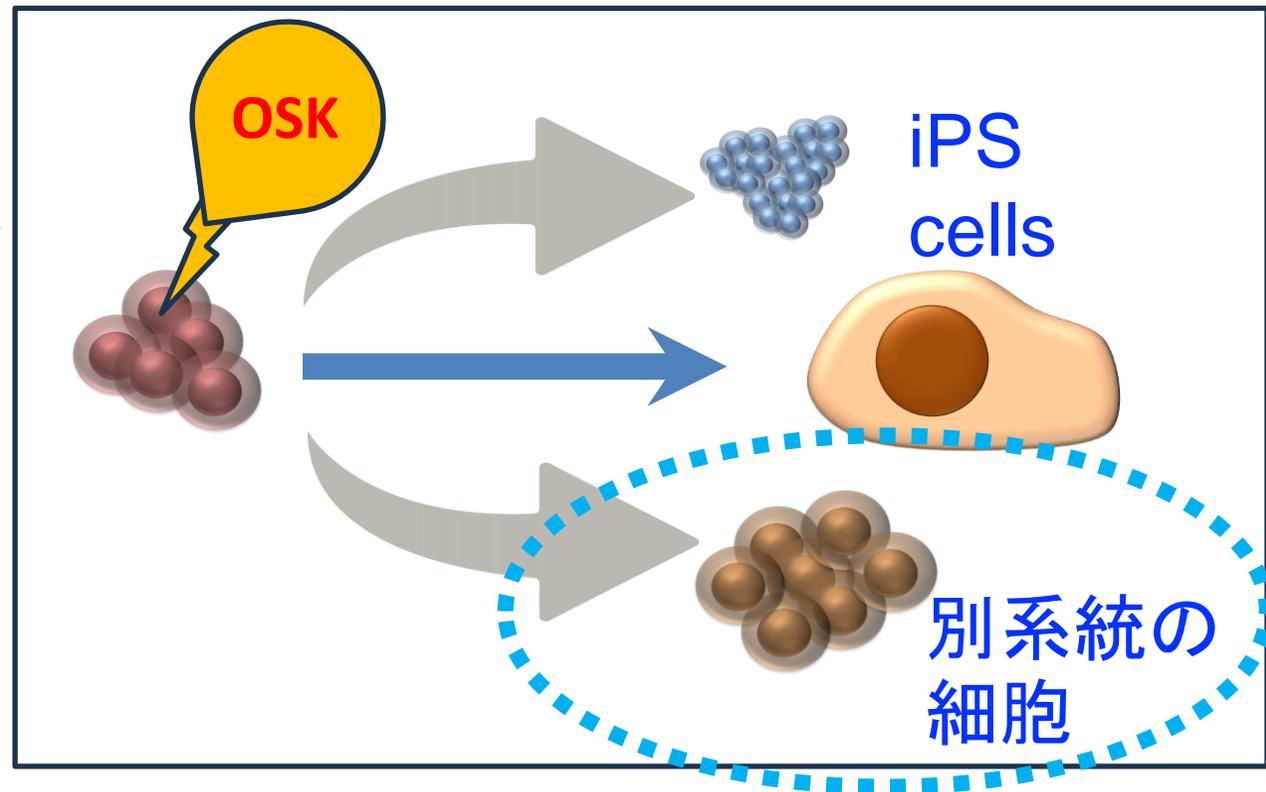
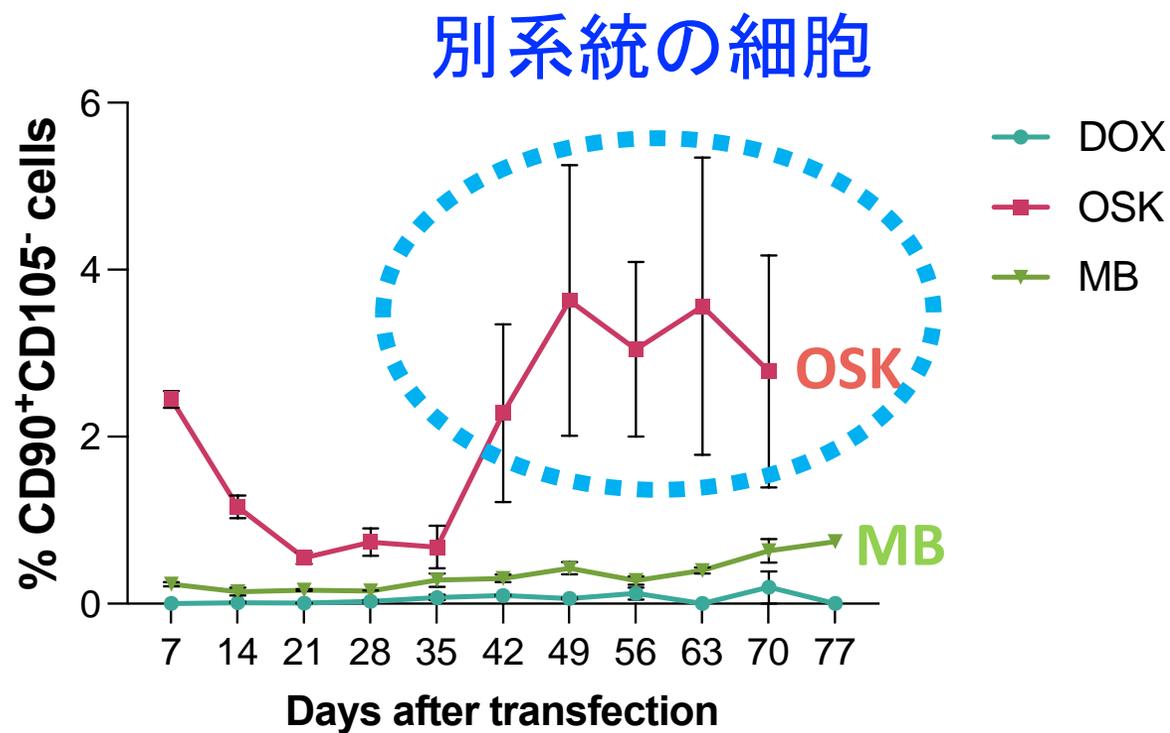
OSK; OCT4/SOX2/KLF4



OSKでは、多能性幹細胞 (iPS細胞など) のマーカーが上昇するが、
MBでは、上昇しない (系統が維持される)

過性部分リプログラミング (OCT4/SOX2/KLF4) では 別系統の細胞が出現する

OSK; OCT4/SOX2/KLF4



OSKでは、別系統の細胞が出現するが、
MBでは、出現しない(系統が維持される)

一過性部分リプログラミング (OCT4/SOX2/KLF4) と 前駆細胞リプログラミング (c-MYC/BMI1) の比較

山中 (OSK) 因子による 部分リプログラミング

- 山中 (OSK) 因子は万能細胞を誘導する**細胞万能化因子**
- **オリジナル細胞の特性を失いやすい**
(Roux A. Cell Syst 2022)



- 元細胞の性質**不安定**
- 大量培養**不可**
- iPS細胞化のリスク**有り**

MB(X)因子による 前駆細胞リプログラミング

- MB (MYC/BMI1)因子は、幹細胞や前駆細胞などの増殖の高い細胞で発現している因子
- **オリジナル細胞の系列は保持される**



- 元細胞の性質**安定保持**
- 大量培養**可**
- iPS細胞化のリスク**なし**

本日の内容

- ✓ 背景; 前駆細胞リプログラミングとは？
- ✓ 従来技術の問題点-1
- ✓ 従来技術の問題点-2
- ✓ 想定される用途
- ✓ 実用化に向けた課題
- ✓ 共同研究について

想定される用途

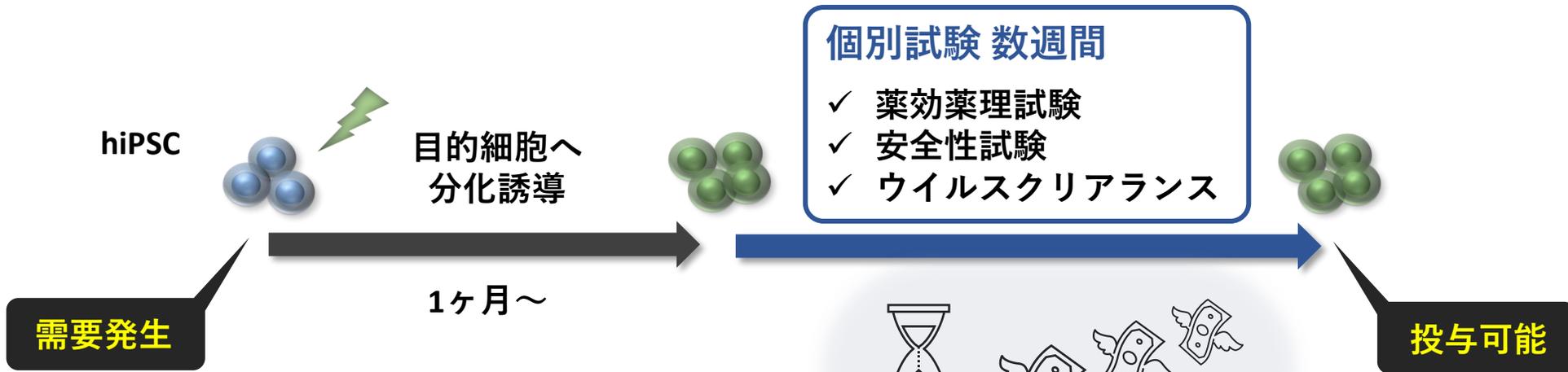
- 本技術により多種類の他家移植用細胞の安定供給が可能となる。
- 上記以外に、各種細胞からのエクソソームなどの培養上清も供給可能。
- 創薬スクリーニングツールとして活用できる
- また、抗老化薬開発にも繋がる。

具体例

- ・白血病などに対する移植用の造血幹細胞増幅システム(人工骨髄)
- ・椎骨不安定症、難治性骨折に対する骨・軟骨再生療法
- ・細胞上清を用いた創傷治癒薬開発
- ・動脈硬化抑制薬剤開発ツール

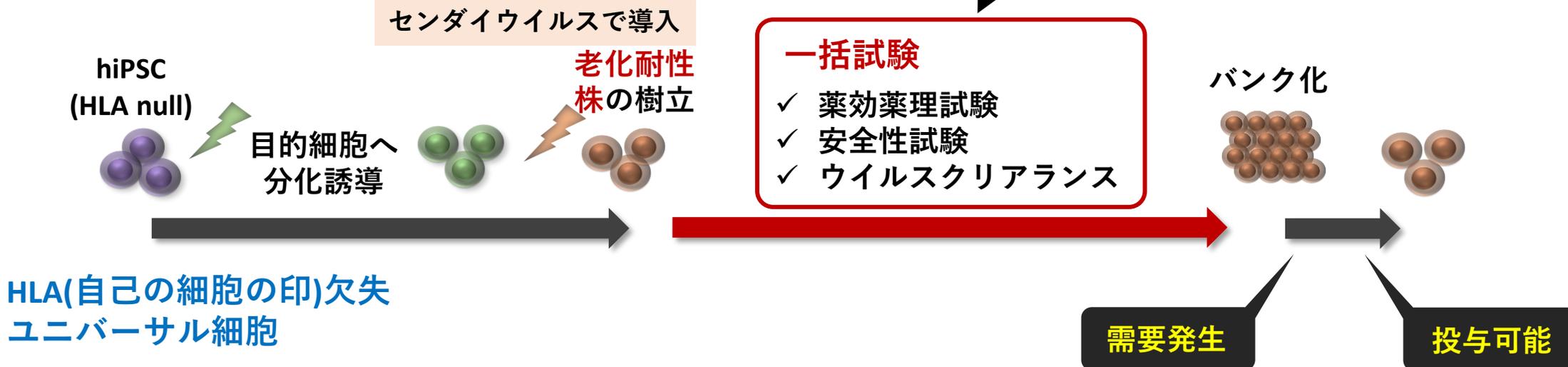
産業化に向けた質の高い細胞の安定供給

従来法

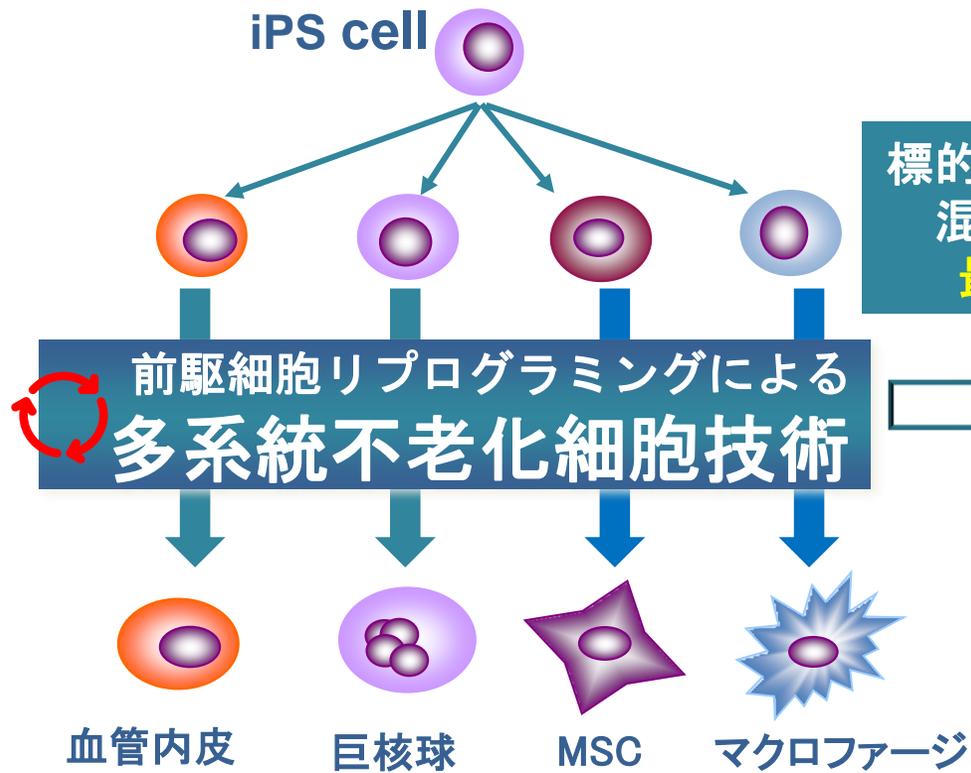


時間・費用の削減

新法 (前駆細胞リプログラミング)



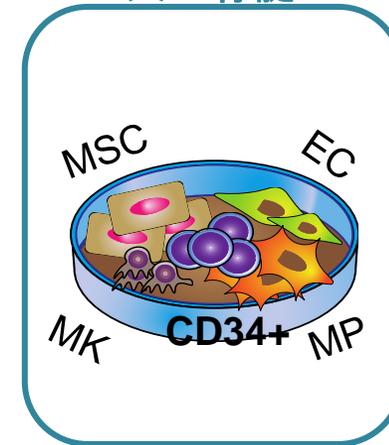
老化耐性細胞による再生、創薬開発研究



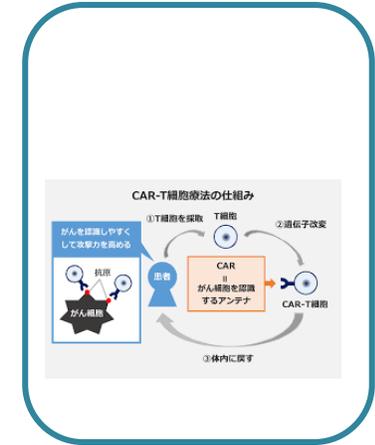
標的臓器毎に
混合比率
最適化

進めている研究

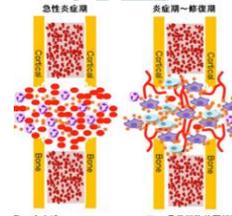
ヒト造血幹細胞増幅用
人工骨髄



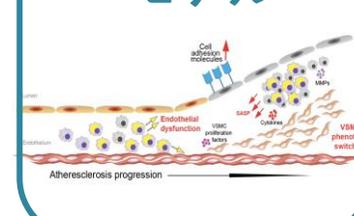
CAR細胞



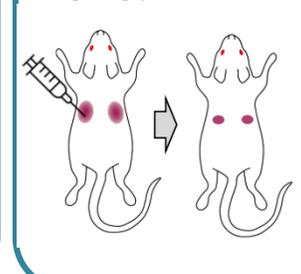
骨・軟骨
再生



動脈硬化
モデル

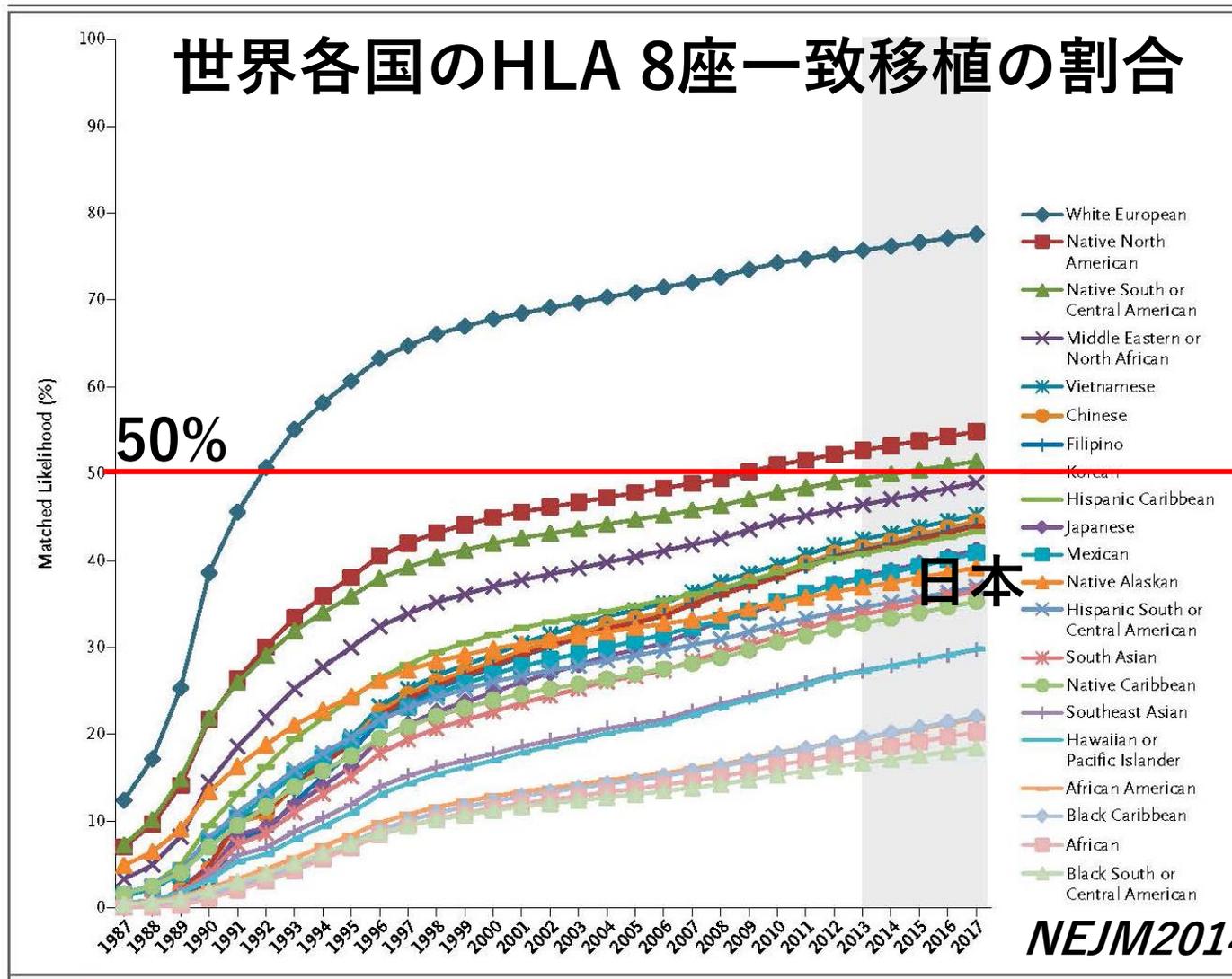


創傷治癒



特願2022-212691:『細胞分化度の調節方法』

造血幹細胞移植医療はドナー不足

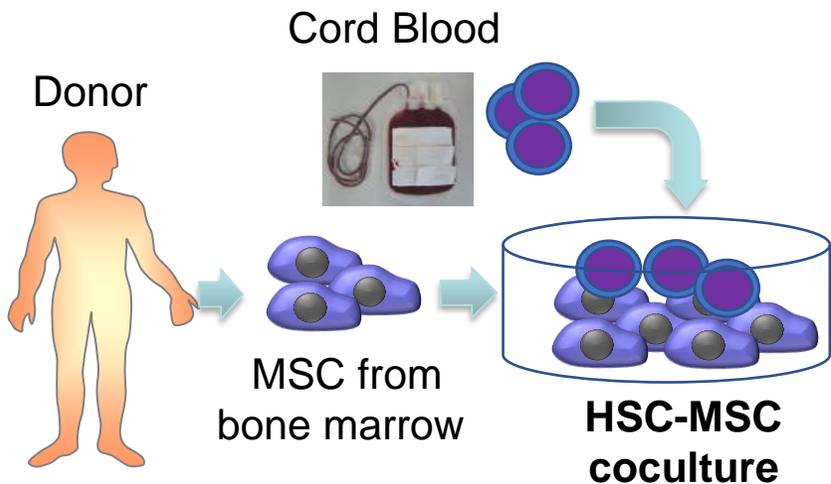


HLA-haplo identical (半合致) 移植の登場
(2012~)により、ドナー不足は大幅に軽減したが、依然ドナー確保が困難な症例が存在する

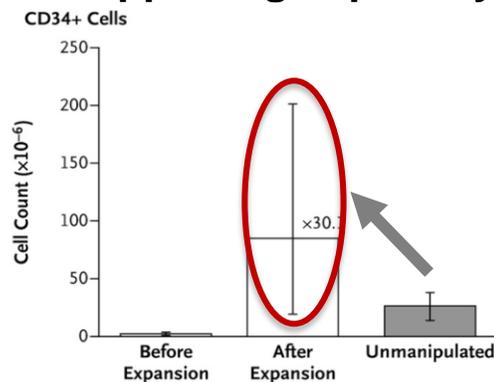
Figure 2. Likelihood of Finding an 8/8 HLA Match by Year End, Based on Current Donor Availability and with Recruitment Trends Extended to 2017.

Projected match likelihoods for 2013 through 2017 (shaded area) were calculated on the basis of anticipated recruitment growth of 9% cumulatively each year.

従来法;ドナー依存の造血支持細胞供給



Huge variation of supporting capability



De Lima et al., NEJM 2012

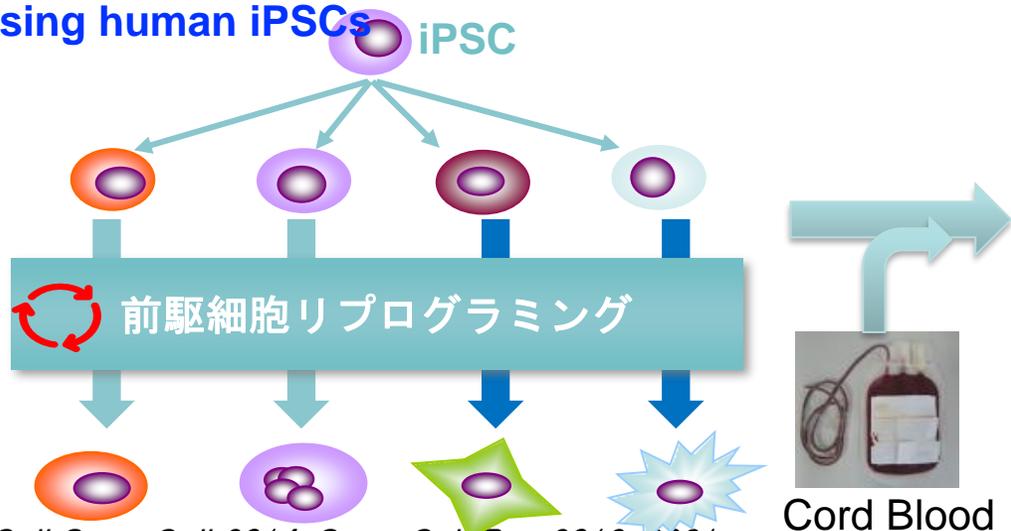
ヒト初代細胞による造血幹細胞サポート

- 造血支持細胞は有限増殖
- ドナーに依存する不安定供給
- ドナーによる不均一な質
- 採取時に強い侵襲 (採取不可細胞もあり)

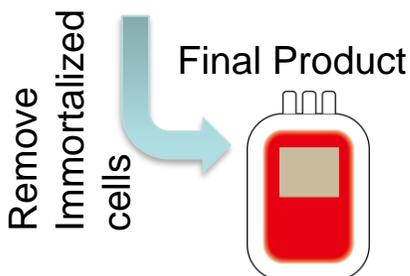
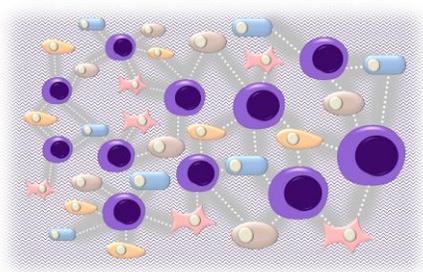
造血支持細胞の不安定供給

本提案の戦略;ヒトiPS細胞由来多系統老化耐性細胞による人工骨髄

Donor independent system using human iPSCs



人工骨髄



iPSC由来細胞による人工骨髄

- 造血支持細胞は無限増殖
- ドナーに非依存
- 均一で質の高い細胞を半永久的に安定供給
- 遺伝子改変も可能

質の良い造血支持細胞の安定供給

混合造血支持細胞によるヒト造血幹・前駆細胞増幅（人工骨髄）

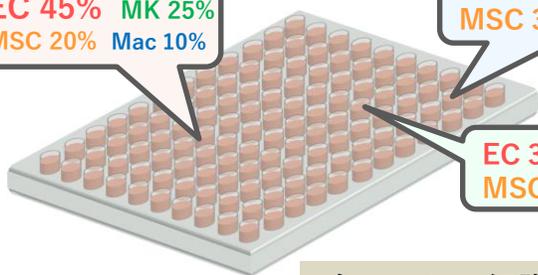
造血支持細胞の最適な混合比率を決定

不死化造血支持細胞は事前に増殖抑制処置を行う

EC 45% MK 25%
MSC 20% Mac 10%

EC 20% MK 10%
MSC 30% Mac 40%

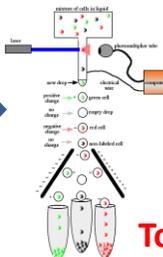
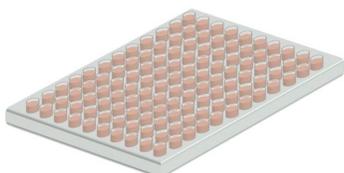
EC 30% MK 25%
MSC 30% Mac 15%



各ニッチ細胞を多段階に混合し、造血幹細胞との共培養で増幅を比較

1週間培養

Cantoll HTS FACSによるハイスループット解析

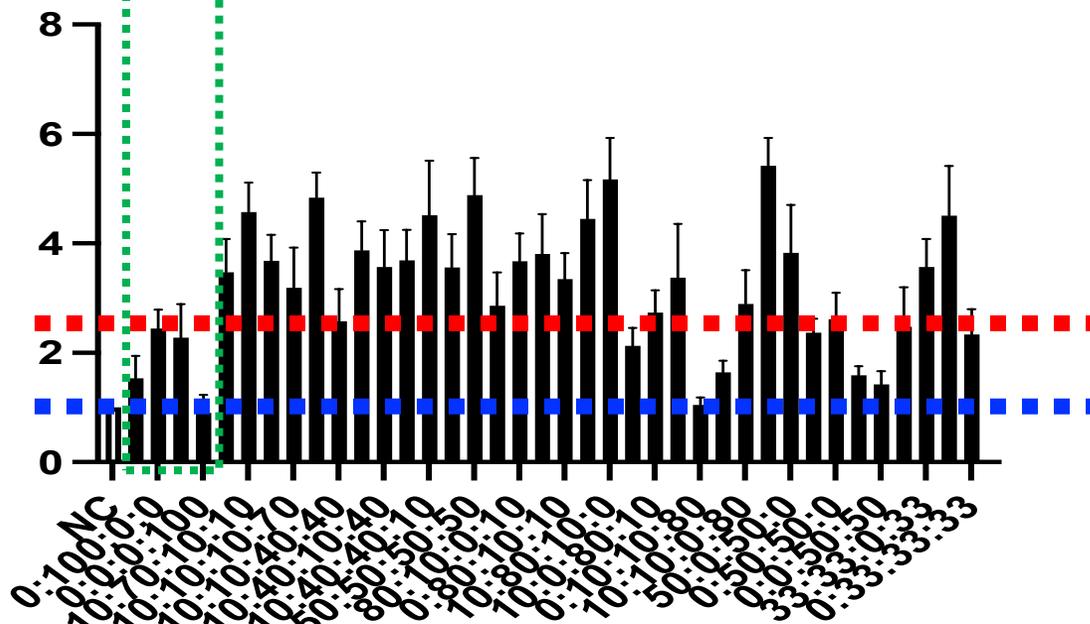


96well plate 1時間で自動解析

Top 10条件で移植実験

単独種
共培養

造血幹細胞数



.... サイトカインのみ
(コントロール)

..... 単独種との共培養
で最も高い増幅レベル

複数の造血支持細胞混合により、
単独種よりも
ヒト臍帯血由来造血幹・前駆細胞が増幅

実用化に向けた課題

- 現在、レンチウイルスベクターを用いた細胞株まで開発済み。
⇒創薬開発や上清を用いた治療には良いが、細胞療法のソースとして安全性が不十分
- 安全性確保のためには、今後ゲノムに組み込まれないベクター（センダイウイルスなど）での老化耐性獲得が必要。
- 他家移植（他人への移植）可能なユニバーサル細胞をつくるためHLA（Human Leukocyte Antigen、自己の細胞の印）を欠失した細胞株が必要
- 安全性、造腫瘍性評価のため、今後、経時的にゲノム安定性、核型解析、in vivo腫瘍実験が必要。

様々な問題点

時効性の問題

個別にウイルスクリアランス試験、薬効薬理、安全性試験



コストの問題

〈例〉 自家iPS細胞血小板
800万円/Pack
CAR-T細胞 3,000万円/回



超高齢社会による

- ✓ ドナー不足
- ✓ 医療費の増大



従来の自家細胞ソース



低コストの実現
即時投与可

不老化技術

安全な導入法

(Sendai virus, mRNA)

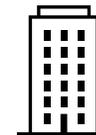


低免疫原性

(HLA null)



ユニバーサル細胞を用いた他家治療用細胞バンク



他家移植用ユニバーサル株のバンク化により、
低コスト化し、即時投与可能な細胞療法を確立する

企業への期待

再生医療(細胞療法)

再生医療の3要素

- 細胞
- 足場
- 成長因子

足場技術を持つ、企業との共同研究を希望。
特に整形外科領域、創傷治癒領域

創薬開発研究

独自の低分子化合物やスクリーニング技術を持つ企業との共同研究を希望。
特に、抗動脈硬化薬、抗骨粗鬆症薬など。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は様々な細胞の大量供給が可能のため、コストダウン、品質安定性が望める。再生医療製品、創薬開発ツールなどを提供することで企業に貢献できると考えている。
- 様々な臨床グループと共同研究を実施しており、専門領域の医師の意見を聞ける。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導、担当者の学位取得。

本技術に関する知的財産権

発明の名称	出願番号 特許番号	発明者	出願人	出願日
巨核球前駆細胞又は巨核球細胞の製造方法	国際出願番号： PCT/JP2020/039162（出願日： 2020年10月16日） 国際公開番号： WO2021/075568	高山直也、中村壮、江藤浩之、他	国立大学法人千葉大学 国立大学法人京都大学	2019/10/17
骨髄系共通前駆細胞(CMP)又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法	国際出願番号： PCT/JP2022//026341（出願日： 2022年6月30日） 国際公開番号： WO2023/277153	高山直也、中村壮、江藤浩之、他	国立大学法人千葉大学 国立大学法人京都大学	2021/6/30
細胞分化度の調節方法	特願2022-212691 国際出願準備中	高山直也, Sudip Kumar Paul, 中村壮	国立大学法人千葉大学 国立大学法人京都大学	2022年12月28日
造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖を促進する方法	特願2023-170962	高山直也, Maria Alejandra Kanashir	国立大学法人千葉大学	

産学連携の経歴

- 2016年-2018年 メガカリオン社と共同研究実施
- その他、現在1社と共同研究実施中

お問い合わせ先

国立大学法人千葉大学
未来医療教育研究機構

Tel & Fax: 043-226-2832
e-mail: mirai-shien@chiba-u.jp

Appendix

Achievements (Papers)

1. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 111(11):5298-5306, 2008. Takayama et al. (8人中1番目)
2. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 207(13):2817-30, 2010 Takayama et al. (16人中1番目) 【雑誌表紙に選出】
3. Takayama N, Eto K. Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Oct;69(20):3419-28. (2人中1番目)
4. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014 Apr 3;14(4):535-48 Nakamura and Takayama et al. (18人中2番目) 学振特別研究員 【雑誌表紙に選出】
5. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Report.* 2013 Dec 5;1(6):499-508 Hirose and Takayama et al. (16人中2番目) 責任著者、学振特別研究員
6. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest.* 2013 Sep 3;123(9):3802-14. Hirata and Takayama et al. (14人中2番目) 責任著者、若手B研究
7. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science.* 2016 Jan 8;351(6269):aab2116. Notta F, Dick JE, and Takayama N, (14人中3番目)
8. The transition from quiescent to activated states in human hematopoietic stem cells is governed by dynamic 3D genome reorganization. *Cell Stem Cell.* 2021 Mar 4;28(3):488-501.e10. doi: 10.1016/j.stem.2020.11.001. Epub 2020 Nov 25. Takayama et al. (23人中1番目) 学振海外特別研究員、上原海外留学助成、基盤C
9. Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2021 Dec 14;16(12):2861-2870. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.11.001. Epub 2021 Dec 2. Sone M, Nakamura S, and Takayama N. (18人中18番目) 最終著者、責任著者、AMED技術開発個別課題