

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発

所 属 国立小児病院小児医療研究センター
研 究 者 藤本 純一郎

分担研究者

- (1) 慶應義塾大学医学部 山田 健人
- (2) 東京理科大学生命科学研究所 穂積 信道
- (3) エスエス製薬株式会社中央研究所 草野 浩二

要 旨

巨核球での遺伝子発現に有用な gpV および gpIIb 遺伝子プロモーターによるベクターを作成した。ヒト血管新生モデル Hu-Bone-SCID マウスを用いて、VEGF/Flt-1 系と Angiopoietin/Tek 系が血管新生に重要であることを示した。新規の細胞接着分子(POEM)の遺伝子は a8b1 インテグリンと結合することを明らかにした。

1. 研究目的

ヒト造血組織を構成する細胞、特に、巨核球、血管、間質細胞および骨に着目し、その成熟制御法開発を通じて医薬品等の開発および再生医学への応用を図ることを目的とする。

2. 研究方法

1) マウス・ヒト造血細胞培養法

マウス骨髄細胞ならびにヒト骨髄細胞からの B リンパ球あるいは巨核球誘導培養実験は以下のごとく行った。マウス骨髄細胞は 8 週齢の B6 メスマウス大腿骨より採取し、マウス骨髄由来間質細胞株 MS5 上で培養した。また、一部の実験ではこの培養系にマウス IL-7 を添加して培養を行った。巨核球の誘導はトロンボポイエチン (TPO) 添加培養を基本とした。ヒト骨髄細胞は、造血幹細胞を豊富に含むヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を購入して使用した。B リンパ球ならびに巨核球の誘導はマウスと同様に行った。培養後の細胞の成熟度ならびに細胞系統判定は、ギムザ染色による形態観察ならびにフローサイトメーターによる細胞マーカー解析によって行った。

2) 巨核球特異的発現ベクター作成と発現実験

マウス gpV 遺伝子の 5' 上流域の 500bp をマウス gpV プロモーターとし、これに Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を結合させた(pGPVP-EGFP)。また、この発現ベクターの両端にウニ由来インスレーター (独立行政法人・農業生物資源研究所、安江 博博士から分与) を組み込んだベクターIns-GPVp-EGFP を作成した。いずれのベクターも薬剤選択マーカーである neo 耐性遺伝子を保有している。また、すでに報告されている塩基配列情報に基づき、ヒト gpIIb 遺伝子の 5' 上流領域を PCR 増幅して単離しヒト gpIIb プロモーターとし(GPIIbp-EGFP)、同様に GFP 遺伝子を組み込んだ。これらのベクターの活性検討は、各種のヒトならびにマウス細胞株あるいは TPO 添加により得られたマウス巨核球へのリポフェクションによる導入と蛍光顕微鏡観察あるいはフローサイトメーター観察で行った。

3) Hu-Bone SCID マウス作成と血管新生モデル作成

米国 Jackson 研究所 Schultz 博士より供与された NOD/SCID マウス皮下へ、前処置なしでヒト骨組織（海綿骨部分）を移植することで Hu-Bone SCID マウスを作成した。生着したヒト骨内に乳癌手術材料あるいはヒト癌培養細胞株（乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ）を移植し経時的に観察した。一部の実験では、ヒト骨および同系マウス骨を複数個同時に移植し転移実験に使用した。腫瘍内に伸展する血管の由来については、マウス抗ヒト CD31, 34, HLA-class I モノクローナル抗体および抗 FactorVIII ポリクローナル抗体を用いた。

上記 Hu-Bone SCID マウスを用いた腫瘍血管新生系において血管新生に重要な 2 つのシグナル伝達系、すなわち、VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) とその受容体 Flt-1 および Angiopoietin とその受容体 Tek の役割について検討した。VEGF 受容体 Flt-1 細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子(Flt-1-Fc) および angiopoietin-1 受容体 Tek の細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc、いずれも熊本大学須田年生博士より供与) の発現ベクターを導入したヒト癌培養細胞株（乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ）を Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植し増殖様式を検討した。また、8Gy 放射線照射したヒト骨を移植した Hu-Bone SCID マウスへ、小児バーキット型白血病細胞株 Raji を静注し、その後、白血病細胞浸潤と血管新生について解析した。ヒト間質細胞の機能については、血管への分化能を解析するため、GFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子(neor)を保有するレトロウイルスベクター(MBAE-EGFP)および neor を欠く MSGFP レトロウイルスベクターを作成した。常法に従いウイルスを作成後、ヒト間質細胞に感染させ Hu-Bone SCID マウスに移植した。細胞の生着と分布は、蛍光顕微鏡観察および抗 GFP 抗体反応によって行った。

4) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

細胞外基質(Extra Cellular Matrix, ECM)や細胞膜レセプター、Notch 等の分子に頻繁に検出される EGF 様リピート配列をプライマーとして使用し、骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1:MC3T3)の cDNA ライブラリーから遺伝子を単離し塩基配列を決定した。新規遺伝子を Preosteoblast Epidermal Growth Factor-like Repeat with MAM Domain: POEM と名付け、完全長 cDNA を単離した。POEM のマウス胎児における発現を *in situ*Hybridization で解析した。また、Notch の骨形成における機能を検討するため、細胞質内ドメインのみから成る活性型 Notch-IC を持つアデノウイルスベクターを作製し、ヒト間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal Stem Cell: HMSC, Osiris Inc. から購入した) への導入を試みた。

3. 研究成果

1) B リンパ球および巨核球の誘導培養

マウス骨髄細胞およびヒト CD34 陽性骨髄細胞から MS5 との共培養ならびに IL-7 添加培養により B リンパ球成熟誘導培養を作成した。マウスについては、MS5 のみで sIgM⁻, B220⁺, Ly-51⁻の pro-B 細胞の誘導を、MS5 と IL-7 添加で sIgM⁻, B220⁺, Ly-51⁺の表面形質を有する Pre-B 細胞の誘導に成功した。ヒト B リンパ球については、MS5 のみでは少数の B リンパ球が誘導できるのみで多くはマクロファージ等の骨髄球系細胞であった。ただ、IL-7 添加を併用すると sIgM⁻, CD10⁺, CD19⁺の形質を持つ B 前駆細胞の誘導が可能であった。

CD34 陽性ヒト骨髄細胞への TPO 添加培養を 1 週間行った結果、CD41 ならびに CD42 陽性巨核球の出現を見た。ギムザ染色でも多核を有する大型細胞の存在を確認した。一方、CD34 陽性細胞の培養を MS5 上、TPO 添加条件で行ったところ、細胞マーカーならびに形態学的に認識される巨核球の出現頻度は大幅に減少した。

2) 巨核球特異的発現ベクター作成と発現

pGPVP-EGFP が成熟巨核球特異的発現を示すことはすでに報告をしている。本年度は、pGPVP-EGFP を用いてトランスジェニックマウス作成を試みたが、遺伝子導入マウスは得られたものの発現を示す個体は得られなかった。そこで、gpV プロモーターの作用効率の向上を目指してインスレーター導入を試みた。インスレーター遺伝子を両端に導入した Ins-GPVp-EGFP は、ヒト巨核芽球の性質を有する HEL で GPVp-EGFP と同等の発現活性を発揮することが明らかとなった。また、マウス骨髄細胞から TPO で成熟誘導した巨核球でも GFP 発現が明瞭に確認された。ヒト gpIIb 遺伝子 5' 上流の 1,230 塩基対を PCR 増幅し、塩基配列を決定後ヒト gpIIb プロモーターとした。これに GFP 遺伝子を結合させた GPIIbp-EGFP をヒト HEL 細胞に導入しフローサイトメーター解析を行ったところ GFP 緑色蛍光を示す細胞集団を認めることができた。一方、gpIIb プロモーターを逆向きに GFP 遺伝子と結合した GPIIbp-EGFP-R は HEL 細胞ではまったく活性を示さなかった。マウス巨核芽球性白血病由来株 C2 においても GPIIbp-EGFP は活性を示すことが判明した。TPO で誘導したマウス骨髄巨核球での GPIIbp-EGFP の発現活性を上記と同様に解析した結果、巨核球に明瞭に GFP 発現が見られることを蛍光顕微鏡で確認した。

3) Hu-Bone SCID マウス作成と血管新生モデル作成

NOD/SCID マウス皮下へ、ヒト骨組織を移植後、4~6 ヶ月において、皮下移植骨は生着し、ヒト骨芽細胞、破骨細胞が観察された。その骨髄腔には、3 系統のヒト造血細胞とその前駆細胞、さらに T、B リンパ球の存在が認められ、マウス血清中には 6 ヶ月にわたりヒト免疫グロブリンが検出された。次に移植骨をマウス皮膚とともに採取し、皮下組織側から観察すると、移植骨を中心に放射状に血管の新生が認められた。そこでこれらの血管について、免疫組織学的に観察したところ、移植骨骨髄内では、ほとんど全ての血管がヒト由来であり、その内皮細胞はヒト CD31, 34, HLA-class I が陽性であった。さらに移植骨周囲のマウス皮下組織においても、ヒト血管の新生が観察され、抗 Factor VIII 抗体のみと反応するマウスの血管と共存していた。移植骨から離れて存在したヒト血管は、移植骨辺縁から最長約 18mm であった。

この Hu-Bone SCID マウス皮下移植骨内へ、原発巣より採取した乳癌細胞あるいはヒト癌培養細胞株（乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ）を移植すると、いずれの癌細胞を移植した場合にも、その腫瘍血管はヒト由来であった。この腫瘍では、移植した腫瘍が 1cm 程度までは、その腫瘍血管は全てヒト由来であり、腫瘍内にはマウス由来の腫瘍血管はほとんど認められなかった。腫瘍が 2cm 以上になると腫瘍の辺縁にはマウス由来の腫瘍血管が見られるようになり、ヒト腫瘍血管と混在するようになる。一方、ヒト骨を移植しないで、これらのヒト癌細胞を移植した場合には、腫瘍血管はヒト由来ではなく、マウス由来であった。これは、もともと乳癌原発巣から癌組織を移植した場合でも、マウス由来の腫瘍血管しか認められなかったことから、原発巣に含まれていたヒト血管内皮細胞や間質からは、腫瘍血管は新生することはできないが、移植したヒト骨組織に含まれている内皮細胞あるいは間質からは、腫瘍血管を新生させることができることを意味する。またヒト癌由来培養細胞株でも、この方法でヒト腫瘍血管新生が認められたことは、このアッセイ系が多くの種類の癌や肉腫に適応可能であることを推測させる。

ヒト骨を NOD/SCID マウス皮下に独立に 2 ヶ所に、さらに同系統マウスの大腿骨を 1 ヶ所に、計 3 個の骨を別々の切開により離して移植した。さらにヒト骨の片方へ、乳癌原発巣および骨転移巣から採取した癌組織を移植し、他の骨への転移について、経時的に観察した。その結果、骨転移巣から採取した乳癌を移植した場合にのみ、全ての症例で、もう一方のヒト移植骨への転移が認められたが、マウス移植骨への転移は、遅い時期にごく一部で見られたのみであった。この時、ヒト骨へ移植した腫瘍では、その血管がヒト由来であり、マウス骨へ移植した腫瘍では、マウス由来の血管が観察された。この結果は、ヒト血管あるいは間質が存在した上で、癌細胞に転移能力がある場合に骨転移が起こることを示唆している。一方、ヒト癌由来培

養細胞株を同様に片方のヒト骨へ移植したが、試みた全ての細胞株において、他方のヒト骨への転移は認められなかった。これらのことは、骨転移をきたした乳癌細胞には、血行性骨転移をする能力がある一方、原発巣の癌細胞には、この系で見ると遠隔転移をする能力がないことを示し、生体内における癌細胞の生物学的性格を表現していると思われた。また他方の骨へ転移した場合、あるいは遅い時期にマウス移植骨へ転移が認められた場合でも、マウスの全身の正常な骨への転移は認められなかった。これは、遅い時期にごく一部で見られたマウス移植骨への転移は、異所性にマウス骨を移植したことによる肉芽組織の形成や血管新生が、ヒト癌の転移を惹起した可能性が考えられる。

ヒト癌培養細胞株（乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ）へ、血管内皮細胞増殖因子 VEGF 受容体 Flt-1 細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Flt-1-Fc) および angiopoietin-1 受容体 Tek の細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc) の発現ベクターを導入し、安定発現細胞株を得た。これらのクローンと対照クローン（ネオマイシン耐性遺伝子のみ導入）を Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植したところ、腫瘍移植後 21 日目における腫瘍の重量は、対照群に比して、Flt-1-Fc および Tek-Fc 導入群では、1/4 から 1/20 に減少した。これらの腫瘍血管の密度の減少は、Flt-1-Fc 導入群でより顕著であったが、Tek-Fc 導入群では、Flt-1-Fc 導入群では認められない腫瘍血管の形態異常（不整、血管腔の大型化）が見られた。これらの結果は、VEGF/Flt-1 と Angiopoietin/Tek のシグナル伝達系がいずれも腫瘍血管新生に重要であるとともに、その役割は異なることを示唆する。

放射線照射(8Gy)したヒト骨を移植した Hu-Bone SCID マウスへ、小児バーキット型白血病細胞株 Raji を静注した。その結果、2~3 週後に移植骨骨髓内に Raji 細胞の浸潤が認められ、その後、約 5~7 日間でマウスは下半身麻痺が出現し、さらに 3~5 日後に死亡した。そこで Raji 細胞移植 3 週目に移植骨、マウス造血組織（骨髓、脾臓、末梢血）を採取し、組織学的ならびにフローサイトメーターで Raji 細胞の浸潤について解析したところ、Raji 細胞は移植骨骨髓およびマウス大腿骨骨髓での細胞の 85~95% を占め、脾臓、末梢血にも浸潤を示した。この時、Raji 細胞非静注群を陰性対照として、移植骨髄における血管密度を算出したところ、移植骨ドナーに関らず、Raji 細胞静注群での移植骨では、CD34 陽性のヒト血管密度の有意な増加が全例に認められた。またこの Raji 細胞では、VEGF165,181、Angiopoietin-1、Angiopoietin like factor の恒常的な mRNA 発現が検出された。このことはヒト白血病細胞が骨髓へ浸潤する時、少なくとも白血病細胞から血管増殖を促進する増殖因子群が発現し、固形腫瘍と同様に「腫瘍血管」を新生させている可能性が推測された。

ヒト骨髓より初代培養したストローマ細胞を用いて、腫瘍間質および腫瘍血管の生体内再構築を試みた。初代培養ストローマ細胞へ高効率に遺伝子導入可能なレトロウイルスベクターを作成し、マーカー遺伝子を導入後、本モデルマウスへ移植した。その結果、ヒト・ストローマ細胞は、腫瘍間質に取り込まれるのみならず、腫瘍血管内皮をも再構成することが判明した。ヒト・ストローマ細胞への遺伝子導入を試み、MBAE-EGFP については、 5.8×10^7 /pfu のウイルス力価を得た。MSGFP は neor が含まれていないため、セルソーターによる高力価のパッケージング細胞のスクリーニングを行い、さらに初代ヒト・ストローマ細胞へ感染させた。感染後、2-4 週後にフローサイトメーターによる感染効率の確認を行った。その結果、G418 選択培養した MBAE-EGFP の場合は 98% 以上陽性であったが、MSGFP は選択培養がないにもかかわらず、最高 95% の導入効率を示し、感染 6 週後にも 50-70% が陽性となった。次に、これらの遺伝子導入ストローマ細胞を Hu-Bone SCID マウスへ静注あるいは移植骨内へ直接移植したところ、4-8 週後において移植骨内に GFP 陽性ヒト・ストローマ細胞が観察され、一部は内皮細胞へ分化した。

4) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

EGF 様リピート構造を指標として、骨芽細胞様細胞株より新規遺伝子 POEM の単離に成功した。POEM

は561個のアミノ酸残基より成り、N末端にはシグナル配列を持つ分泌性蛋白質と考えられ、N-glycosylation site, RGD, MAM ドメインが存在する。EGF 様リピート配列はN末端側に見出された。POEM 遺伝子の機能解析を目的としてマウス胎発生期における発現パターンを解析した結果、胎生 16.5 日の尿管の上皮細胞で強い発現が観察された。副甲状腺、甲状腺、エナメル上皮、骨芽細胞、蝸牛管でも発現が確認された。また骨格筋の広い部分に渡って発現が見られた。脳においては松果体、中脳、で発現がみられた。脾臓、肝臓、胸腺、卵巣、血管内皮細胞、軟骨、脊椎では明らかな発現は観察されなかった。EGF リピートを有する分子の多くはリピートが細胞外あるいは細胞膜に存在する。POEM の存在部位を確認するため POEM-Fc 融合蛋白分子を作製し、その遺伝子を COS-7、MC3T3 細胞に導入した。両方のトランスフェクタントにおいてこの誘導タンパクは ECM 分画に見出された。培養上清中には殆どみられず細胞上に接着して存在していた。POEM は細胞への極めて強い接着活性を有することが判明したため、種々の突然変異体を作製し細胞接着ドメインを探索した。MAM ドメインを持たない突然変異体は接着活性を失うことが分かった。またさらなる研究の結果から、アポトーシスの回避、細胞接着には RGD 配列も関与していることが示された。RGD 配列は a8b1 インテグリンの結合モチーフであることが知られている。a8 インテグリンは MC3T3 で発現しており、発現強度は骨芽細胞の分化が進行するにつれ現弱する。この発現パターンは POEM と類似している。これらの事から我々は POEM は a8b1 インテグリンのリガンドではないかと疑った。POEM はマウス胎児の腎臓で強い発現がみられるが、a8b1 アルカリフォスファターゼアッセイによる実験結果とも一致している。a8 を遺伝子導入した K562 細胞を用いて一連の Adhesion 実験を行った。その結果 POEM は a8b1 のリガンドであることが確認され、POEM は腎臓、脳、骨芽細胞の分化に重要な機能を有することが示唆された。

形態形成分子 (Notch) は細胞分化に深く関わっていることが知られている。この分子が間葉系細胞分化への関与を示唆する報告はあるが、骨形成における機能は不明である。我々は Notch の骨芽細胞分化における機能を明らかにする目的で MC3T3 細胞における発現を検討した。この細胞は細胞密度が上昇すると骨芽細胞に分化する。Notch は培養の初期に強く発現しているが、骨芽細胞分化の進行に伴い低下することが分かった。そこで活性型 Notch1-IC を持つアデノウイルスベクターを MC3T3 細胞に導入したところ骨芽細胞分化、石灰化の亢進が観察された。MC3T3 は既に骨芽細胞分化にコミットしているが、C3H10T1/2 培養条件により骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋原細胞に分化する Notch/アデノウイルスベクターを C3H10T1/2 に導入したところ、骨芽細胞分化のマーカーである Alkaline phosphatase (ALP) 発現が強陽性となったが、軟骨細胞、脂肪細胞への分化は認められなかった。次に Notch-IC の HMSC に対する影響を検討した。この細胞は培養条件により骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化する。Notch-IC/アデノウイルスベクターを導入したところ、感染後5日以内に ALP 強陽性となり、Dexamethason, Ascorbic Acid, β -glycerol phosphate 添加により3週間後には強度のミネラル化が誘導された。これらの結果から Notch 分子は積極的に間葉系幹細胞に働き、骨芽細胞分化を誘導するシグナルを伝達することが示唆された。

4. 考 察

造血細胞維持法の基礎となる造血前駆細胞からの成熟誘導培養系を B リンパ球および巨核球について検討した。B リンパ球については、間質細胞 MS5 と IL-7 を用いてヒトおよびマウスで確立することができた。マウスでは、MS5 のみで Pro-B 細胞の誘導が可能なのは従来から報告されていたが、ヒトでは MS5 のみでは非リンパ球誘導が優位となるため有用な方法ではなかった。ただ、IL-7 添加により未分化な形質を有する B 前駆細胞は多数誘導できることが判明した。これらの細胞が Pre-B 細胞か Pro-B 細胞かは、他のマーカーを併用して確認する必要があるものの、未分化なヒト B リンパ球の大量調整には有効な方法であると考えられる。巨核球については、造血幹細胞を含むヒト CD34 陽性骨髄細胞からの成熟誘導培養を試みた。TPO

によって巨核球が効率よく誘導できることはすでに報告されており、本年度の成果はそれを確認することができた。ただ、MS5を併用した場合に巨核球の誘導が抑制される結果は興味深い。MS5上でTPO添加培養の場合は、Bリンパ球誘導実験と同様に少数のBリンパ球ならびにマクロファージを含む骨髄球系細胞の誘導が主体であった。すなわち、これらの結果から考えると今回使用したMS5はBリンパ球およびマクロファージ等の骨髄球系細胞の成熟誘導を主として支持する特徴を有すると考えられる。逆の言い方をすると、巨核球の強力な誘導因子であるTPOの作用を抑制するほどの巨核球系成熟抑制シグナルを出していることになる。MS5はマウス由来細胞であるため、ヒト造血細胞へも作用しうる種を超えた共通分子が存在する可能性を示している。このような分子基盤の解明は、自由度の高い造血制御法の開発に重要な情報を与えると予想される。

巨核球に特異的に発現する遺伝子のプロモーター活性を応用した外部遺伝子発現法の開発を目指した。候補遺伝子としてgpVならびにgpIIbを選び、そのプロモーター領域によるベクター開発を試みているところである。マウスgpVプロモーターは500bp長であるが、細胞株ならびに正常細胞では細胞系統特異的、成熟段階特異的発現を示すことはすでに報告している(Sato, N, et al, Exp-Hematol, 2000;28:802-14)。ただ、このプロモーターは個体、すなわちトランスジェニックマウスでは機能しないことが判明した。そこで、外来性遺伝子がゲノムに組み込まれた際にポジション効果を抑制すると考えられているインスレーターの導入を計画した。インスレーターを組み込んだマウスgpVプロモーターは細胞株および正常骨髄細胞で十分に機能を発揮することを確認することができた。現在、このベクターを用いたトランスジェニックマウスを作成中であり来年度はこのマウスの解析に移る。血小板gpIIb分子は、gpVと同様に巨核球得意分子だがその発現時期が異なる。すなわち、gpVは成熟巨核球の段階から血小板まで発現する。一方、gpIIbはより未分化な巨核芽球の段階から血小板に至るまで発現を認める。すなわち、gpIIbとgpVの発現特性を利用すれば巨核球成熟で異なる分化段階で任意の外来性遺伝子を発現させることが可能となる。本年度、ヒトgpIIb遺伝子プロモーターを単離し発現ベクターを作成したが、遺伝子導入実験から興味深い結果が得られた。まず、ヒトgpIIb遺伝子プロモーターはヒト巨核球系細胞株ならびにマウス骨髄細胞由来巨核球で良好な発現を示した。一方、マウス巨核芽球C2でもヒトgpIIb遺伝子プロモーターの活性が認められた。このC2細胞は、マウスgpVプロモーターが殆ど作用しないことをすでに報告しているが、ヒトgpIIb遺伝子プロモーターの活性が検出されたことはC2細胞が未分化な巨核芽球の特性を維持していることを示す重要な所見である。細胞マーカー解析でもC2細胞がHEL細胞よりも未分化な形質を保持していることが示されるため、ここで明らかにしたプロモーターの活性特性は細胞の成熟度を正確に反映する結果と考えられる点で重要である。来年度は、このgpIIbプロモーターを用いたトランスジェニックマウス作成についても開発を開始する。

腫瘍の増殖・浸潤・転移においては、血管新生や間質との相互作用が重要である。これまでに、免疫不全マウスへのヒト癌の移植による疾患モデルが活用されてきた。しかしこのモデルでは、腫瘍血管や間質がマウス由来であり、さらに再現性の高い転移モデルを作成することが、困難であった。本研究により、NOD/SCID(non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency)マウスへのヒト骨組織およびヒト癌細胞・白血病細胞の移植によるヒト腫瘍血管新生モデルと浸潤・転移モデルが確立された。本モデルを用いることで、ヒト腫瘍血管新生の分子機構の中で、特にVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)受容体とAngiopoietin受容体の2つのシグナル伝達系の重要性と意味の一端が明らかにされ、その阻害による新たな治療法の可能性が示された。この生体内ヒト血管再構築系は、今後、標準化を経ることで、新薬や新たな治療法の前臨床試験に役立つことを期待したい。

骨芽細胞様細胞株(MC3T3)から新規の細胞接着分子(POEM)をコードする遺伝子をクローニングした。一連の実験からこの分子のレセプターはa8b1インテグリンであることが確認された。この分子は腎臓、神経

系、骨形成に重要な機能を有することが示唆された。また、形態形成分子である Notch が骨芽細胞分化、骨形成に重要な機能を発揮することが初めて明らかにされた。ヒト間質細胞への Notch 遺伝子の導入は骨形成を促進することが分かり、将来骨粗鬆症などに対する細胞療法の可能性が示唆された。

5. まとめ

1) マウス骨髄細胞から MS5 間質細胞ならびに IL-7 を用いて、Pro-B 細胞および Pre-B 細胞を成熟させる培養系を確立した。CD34 陽性ヒト骨髄細胞から、MS5 細胞と IL-7 を用いて B 前駆細胞を誘導できる培養系を確立した。また、ヒト成熟巨核球を誘導培養する実験系を確立したが、MS5 細胞との共培養を加えると巨核球誘導が抑制されることが判明し、巨核球成熟の抑制シグナルの存在が示唆された。

2) マウス gpV 遺伝子プロモーターはヒト細胞株ならびに正常マウス骨髄細胞で巨核球特異的な発現活性を認めたが、トランスジェニックマウスでは活性を示さなかった。そこで、マウス gpV 遺伝子プロモーターにインスレーターを結合したベクターは、細胞株および正常骨髄細胞で巨核球特異的な発現活性を示した。ヒト gpIIb 遺伝子プロモーターは細胞株および正常骨髄細胞で巨核球特異的な発現活性を示した。また、未分化なマウス C2 巨核芽球性細胞株でも発現活性を認めた。

3) Hu-Bone-SCID マウスを用いたヒト血管新生モデルを作成した。この動物にヒト癌細胞・組織を移植した場合、腫瘍血管がヒト由来であることが判明した。また、これらの系がヒト腫瘍の骨転移モデルとしても有用であることが判明した。Hu-Bone-SCID マウスにおけるヒト血管新生での機能分子解析の結果、VEGF/Flt-1 系と Angiopoietin/Tek 系のいずれもが重要であることが判明した。

4) 新規の細胞接着分子(POEM)をコードする遺伝子を単離したが、この分子のレセプターは a8b1 インテグリンであることが確認された。また、形態形成分子である Notch が骨芽細胞分化、骨形成に重要な機能を発揮することが初めて明らかにした。

6. 研究発表

1) Fujita T, Yamada T, Hashiguchi A, Fukushima S, Fujimoto J, and Hata J. Augmentation of megakaryocytopoiesis by the hematopoietic microenvironment of human granulocyte colony-stimulating factor transgenic mice. *Exp-Hematol*, 29 : 1010-8 (2001).

2) Kitamura K, Nagao M, Yamada T, Sugana M, Hata J, Watanabe S. Dioxins in bile in relation to those in the human liver and blood. *J Toxicological Sciences*. 26(5):327-336 (2001)

3) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S. Specific accumulation and elimination kinetics of tris (4-chlorophenyl)methane, tris (4-chlorophenyl)methanol and other persistent organochlorines in humans from Japan. *Environmental Health Perspectives* 109(9):927-935 (2001)

4) Shinoda K, Nakamura Y, Matsushita K, Shimoda K, Okita H, Fukuma M, Yamada T, Oguchi Y, Hata J, Umezawa A. Light-induced apoptosis is accelerated in transgenic retina overexpressing human EAT/mcl-1, an antiapoptotic bcl-2-related gene. *British Journal of Ophthalmology* 85:1237-1243 (2001)

5) Muto A, Kizaki M, Kawamura C, Matsushita H, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Yamato K, Ito M, Ueyama Y, Ikeda Y. A novel differentiation -inducing therapy for acute promyelocytic leukemia with a combination of arsenic trioxide and GM-CSF. *Leukemia* 15:1176-1184 (2001)

6) Nishikai K, Shimada A, Iwanaga S, Yamada S, Ishii T, Maruyama H, Saruta T. Progression of cardiac dysfunction in a case of mitochondrial diabetes. *Diabetes Care* 24(5):960-961 (2001)

7) Morimura, N., Tezuka, Y., Watanabe, N., Yasuda, M., Miyatani, S., Hozumi, N. and Tezuka, K.

Molecular cloning of POEM: A novel adhesion molecule that interacts with $\alpha 8 \beta 1$ integrin. *J. Biol. Chem.* 276: 42172-42181 (2001).

8) Tezuka, K., Yasuda, M., Watanabe, N., Kuroda, K., Miyatani, S. and Hozumi, N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J. Bone Miner. Res.* 17: 231-239 (2002).

9) Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K, Du W, Hata J, Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. *Experimental Cellular Research* 2002 (in press)

10) Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ohta T, Takeuchi T, Hata J, Kadowaki T, Koyasu S Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to intestinal parasites in *Pik3rl* deficient mice. *Nature Immunology* 3(3):295-304, 2002.

11) Taketo YAMADA, Nobumichi HOZUMI, Toshio SUDA, Wenlin DU, Akinori HASHIGUCHI, Kensuke KONDOH, Yuchen HAN, and Jun-ichi HATA In Vivo Model for Human Tumor Angiogenesis. The Keystone Symposium, (Banff, Canada), pp137, February 2002

12) 山田健人、穂積信道、杜ぶん林、橋口明典、須田年生、秦 順一 in vivo ヒト腫瘍血管新生モデルとその分子機構 第 60 回日本癌学会総会 (横浜) 2001 年 9 月

13) 杜ぶん林、山田健人、橋口明典、穂積信道、Robert Hawley、秦 順一 ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた遺伝子治療法の開発: Hu-Bone SCID マウスを用いて 第 90 回日本病理学会総会、2001 年 4 月 (東京)

7. 知的所有権の取得状況

該当なし。

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社