

分担研究報告書

## サルを用いた造血系再生

分担研究者 寺尾恵治（国立感染症研究所・筑波霊長類センター）

研究協力者 柴田宏昭（国立感染症研究所・協力研究員）

### 研究要旨

カニクイザルの ES 細胞から造血前駆細胞への *in vitro* 分化誘導系を確立し、分化誘導された細胞に占める前駆細胞の割合を調査するとともに、前駆細胞に対する同種免疫応答の程度をリンパ球混合培養での幼若化反応（MLR）で評価した。GFP で標識したカニクイザル ES 細胞（CMK6/G）を MMC 処理した OP9 細胞をフィーダーとして種々のサイトカイン存在下で 6 日間培養した細胞の半数以上が未分化マーカー（SSEA4）を発現していた。SSEA4 を指標として分化した造血前駆細胞を FACS により精製したが、純度は 90%弱であった。一方、未分化の ES 細胞と分化誘導した細胞を刺激細胞とし、正常カニクイザル末梢単核球を反応細胞とした MLR では、未分化 ES 細胞に対する反応はほとんど見られなかったが、分化誘導した細胞に対しては幼若化反応が認められた。

以上の結果から、1) 今回用いた培養系では造血前駆細胞への分化誘導が十分でないこと、2) 未分化マーカーを指標とした **Negative selection** では未分化な ES 細胞の除去が不完全であること、3) 分化誘導した細胞に対しては同種免疫応答が誘導されることが明らかとなった。

キーワード：カニクイザル、ES 細胞、造血前駆細胞、MLR

### A. 研究目的

ES 細胞を用いた細胞治療、再生医療技術の開発では、体外で分化誘導した組織前駆細胞を移植し、体内微小環境を利用して最終分化させる戦略が基本となる。そのためには、より高率に組織細胞へ分化させる体外分化誘導系の開発と同時に、分化誘導した細胞に対する宿主の免疫応答を評価しておく必要がある。本研究では、カニクイザ

ルを用いて造血系の再生モデルを確立することを最終目的としている。今年度は、カニクイザルの ES 細胞から造血前駆細胞への体外分化誘導を試み、1) 分化誘導された細胞中に存在する未分化 ES 細胞の割合から誘導系の完成度を評価するとともに、2) 分化誘導した細胞に対する宿主免疫反応を未分化 ES 細胞および分化誘導細胞を刺激細胞としたリンパ球混合培養反応（MLR）の程度で評価することを目的とした。

## B. 材料と方法

### 1) カニクイザル ES 細胞から造血前駆細胞への分化誘導:

GFP 遺伝子導入カニクイザル ES 細胞 (CMK6/G) はマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) をフィーダーとして ES 培地で継代培養した。

継代培養 ES 細胞を 0.25%trypsin で処理し、剥離した細胞を OP9 細胞をフィーダーとしたフラスコに移し、以下の培地で 6 日間培養した。

#### 分化誘導培地 (IMDM 基礎培地)

- 8% house serum
- 8% FCS
- 5x10<sup>-6</sup>M hydrocortisone
- 20ng/mL BMP-4
- 20ng/mL SCF
- 20ng/mL IL-3
- 10ng/mL IL-6
- 20ng/mL VEGF
- 20ng/mL G-CSF
- 10ng/mL Flt3 ligand
- 2U/mL EPO

### 2) 分化誘導した細胞の FACS 解析:

培養 6 日目に 0.25%trypsin 処理して剥離した細胞を PE-anti-SSEA4 抗体で染色後 FACS 解析した。未分化 ES 細胞および分化誘導した細胞を PE 標識した anti-HLA ABC、anti-HLA DR、anti-CD34、anti-c-Kit、anti-CD31 で染色し、GFP 陽性細胞での表面抗原の発現を FACS で解析した。分化させた造血前駆細胞の精製は PE-anti-SSEA4 で分化細胞を染色した後、GFP+/SSEA4- 細胞集団を FACS でソートした。

### 3) 未分化 ES 細胞および分化誘導細胞を刺激細胞としたリンパ球混合培養:

未分化 ES 細胞および分化誘導した細胞に 6,000R の X 線を照射したものを刺激細胞とした。2 頭の正常な雄カニクイザル末梢血から分離した単核球を反応細胞とした。リンパ球混合培養は刺激細胞、反応細胞ともに  $2 \times 10^6$  /ml の細胞濃度で 10%FCS-RPMI 培地に浮遊させ、平底 96 穴プレートに 100ul ずつ分注した。細胞混合液を CO<sub>2</sub> 培養器中で 6 日間培養した後、1uCi/10ul/well の TdR を添加した。TdR 添加後さらに一日培養し、培養 7 日目に細胞を回収し、細胞内に取り込まれた TdR 量を測定した。

## C. 結果及び考察

図 1 はカニクイザル ES 細胞 (図左) から造血前駆細胞に分化誘導した細胞 (図右) での未分化マーカー (SSEA4) の発現を示す。未分化な細胞は霊長類の ES 細胞に特徴的な円形コロニーの形態を示すが、分化誘導した細胞では円形コロニーの形態が失われている。GFP 陽性のカニクイザル ES 細胞に由来する細胞集団での SSEA4 発現細胞の割合は、未分化な ES 細胞ではほぼ 100% であった。一方、分化細胞においても  $22/(22+13)=63\%$  の細胞が SSEA4 を発現していた。SSEA4 は分化誘導開始直後に消失する未分化マーカーとして知られており、各種サイトカイン添加培地で 6 日間培養した細胞に発現している可能性はきわめて低いと推測していたが、同様な実験を数回繰り返しても今回用いた分化誘導法では培養 6 日目の細胞の 50% 以上に SSEA4 の発現を確認している。培養を 18 日間継続した細胞では SSEA4 を発現している細胞がほとんど消失することも確認していることから、

今回用いた分化誘導法では、培養 6 日目で SSEA4 を発現している未分化な ES 細胞が比較的高頻度に残存している可能性が高い。

分化誘導した細胞集団に残存している未分化 ES 細胞は、移植後にテラトーマ形成のリスクを生じる。移植によるテラトーマ形成のリスクを低下させるためには、分化誘導した細胞集団から未分化 ES 細胞を可能な限り除去する必要がある。図 2 は SSEA4 を指標として、未分化 ES 細胞を FACS を用いた negative selection で除去した結果を示す。GFP+/SSEA4-細胞の割合は増加するが、純度は 90%以下であった。一般に細胞の純化では Negative selection に比較して Positive selection の方がより高純度で精製できるとされているので、今後は分化誘導した造血前駆細胞に発現する初期分化マーカーを特定し、初期分化マーカーを用いた Positive selection による精製システムを開発する必要がある。

初期分化マーカーの検索を目的として、未分化 ES 細胞と分化誘導した細胞に発現している表面抗原を解析した結果を図 3 に示す。HLA-ABC の発現は ES 細胞、分化細胞ともに予想以上に低いものであった。一方、HLA-DR、c-Kit、CD31 は両者ともにほとんど発現が認められなかった。CD34 は未分化 ES 細胞にはほとんど発現していないが、分化誘導した細胞の約半数に発現が認められ、造血前駆細胞への誘導が生じていることが確認された。

体外で分化誘導した ES 細胞を移植する戦略では、宿主の免疫応答の制御が重要な課題となるが、これまでのところ、霊長類の ES 細胞または分化誘導細胞に対する同種免疫応答を解析した報告はほとんど無い。今回はリンパ球混合培養反応 (MLR) を用

いて、ES 細胞および分化誘導細胞に対する同種免疫応答の程度を評価した。図 4 はその結果を示したものであるが、2 頭の正常カニクイザル (Cy1、Cy2) の末梢リンパ球は未分化なカニクイザル ES 細胞 (CMK6) にはほとんど反応しない。一方、分化誘導した細胞 (Dif CMK6) に対しては 2 頭とも幼若化反応が生じている。このことから、未分化 ES 細胞に比較して分化誘導した細胞は同種免疫応答を惹起する可能性が高いと判断される。一方で MLR は同種組織適合性抗原 (MHC、特に MHC クラス II 抗原) を標的とする反応と解されており、分化誘導の過程で MHC の発現上昇が生じた結果、MLR 反応が生じる可能性が最も妥当である。しかしながら、図 3 に示すように、MHC class-I、II の発現はいずれも未分化 ES 細胞に比べて分化誘導した細胞の方が低い。図 3 と図 4 の矛盾については、今回の結果だけでは考察不能であるが、今後培養条件を変えて詳細に解析する必要がある。

#### D. 結論

GFP で標識したカニクイザル ES 細胞 (CMK6/G) を種々のサイトカイン存在下で 6 日間培養した細胞集団の半数以上が未分化マーカー (SSEA4) を発現していた。SSEA4 を指標として分化した造血前駆細胞を FACS により精製したが、純度は 90%弱であった。一方、未分化 ES 細胞と分化誘導した細胞を刺激細胞として正常カニクイザル末梢単核球を反応細胞とした MLR では、未分化 ES 細胞に対する反応はほとんど見られなかったが、分化誘導した細胞に対しては幼若化反応が認められ、同種抗原に対する免疫応答が生じる可能性が示唆された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Mar 28;303(1):170-176.

Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (*Macaca mulata*). *J Clin Apheresis.* 2003;18(1):26-31.

Kirii Y, Inoue T, Yoshino K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand. *J Immunol Methods.* 2003 Jul 1;278(1-2):201-209.

Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.* 2003 Sep;61(1):3-12.

Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y. Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation.* 2003 Oct

15;76(7):1061-1067.

Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med.* 2004 Jan;6(1):22-31.

### 2. 学会発表

Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano K, Suzuki Y, Torii R, Terao K, and Ozawa K. ENGRAFTMENT AND TERATOMA FORMATION AFTER ALLOGENEIC IN UTERO TRANSPLANTATION OF NONHUMAN PRIMATE EMBRYONIC STEM CELLS. The 1st International Society for Stem Cell Research (ISSCR). June 8 to 11, 2003, Washington DC.

Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Ookawara S, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. ENGRAFTMENT AND TERATOMA FORMATION AFTER ALLOGENEIC IN UTERO TRANSPLANTATION OF GENE-MODIFIED PRIMATE EMBRYONIC STEM CELLS. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo

Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Ueda K, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Ookawara S, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, and Hanazono Y. TRANSPLANTATION AND IN VIVO FOLLOW-

UP OF LENTIVIRALLY TRANSDUCED CD34<sup>+</sup> CELLS IN A NONHUMAN PRIMATE MYOCARDIAL INFARCTION MODEL. 同上

Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima N, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara S, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. A Novel Method of Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Without Conditioning: The Intra-Bone Marrow Transplantation With the Selective Amplifier Gene in Primates. 同上

Yonemitsu Y, Terao K, Ono F, Kuwahara T, Iida A, Hara H, Iwasaki H, Hasegawa M and Sueishi K. Preclinical Safety Study (Acute Toxicity and Biodistribution) for Intramuscular Administration of F-Defective, Non-Transmissible Recombinant Sendai Virus Vector Expressing Human FGF-2 Using Non-Human Primate. 同上

Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Ageyama N, Kume A, Terao K, Ozawa K

and Hasegawa M. Expansion of Gene-modified Hematopoietic Cells by Second Generation Selective Amplifier Genes (SAGs) in the Secondary Transplanted Mice. 同上

吉岡徹、揚山直英、柴田宏昭、安隆則、上田享司、竹内公一、松井圭司、山本啓二、田畑寿晃、上田泰次、長谷川護、大河原重雄、寺尾恵治、島田和幸、池田宇一、小澤敬也、花園豊 自己CD34<sup>+</sup>細胞移植による血管新生療法：霊長類心筋梗塞モデルを用いた遺伝子標識研究 第65回日本血液学会、8月25日～31日、2003年、大阪。

上田享司、花園豊、柴田宏昭、揚山直英、長島建之、田畑寿晃、上田泰次、久米晃啓、池原進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也、霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療法の開発：選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法による移植前処置の回避。第65回日本血液学会、8月25日～31日、2003年、大阪。

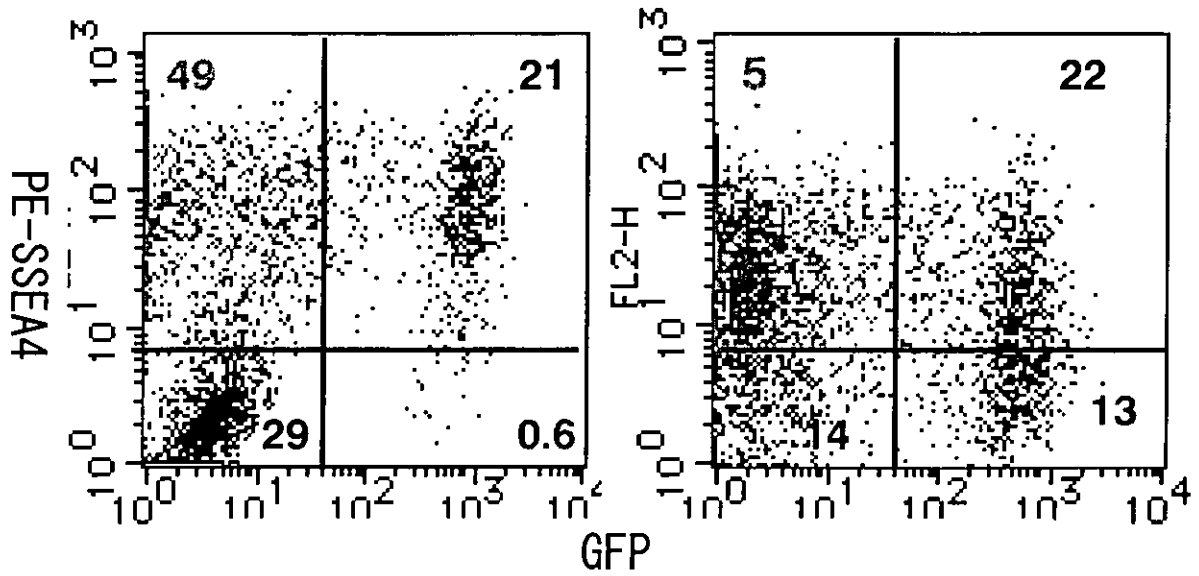
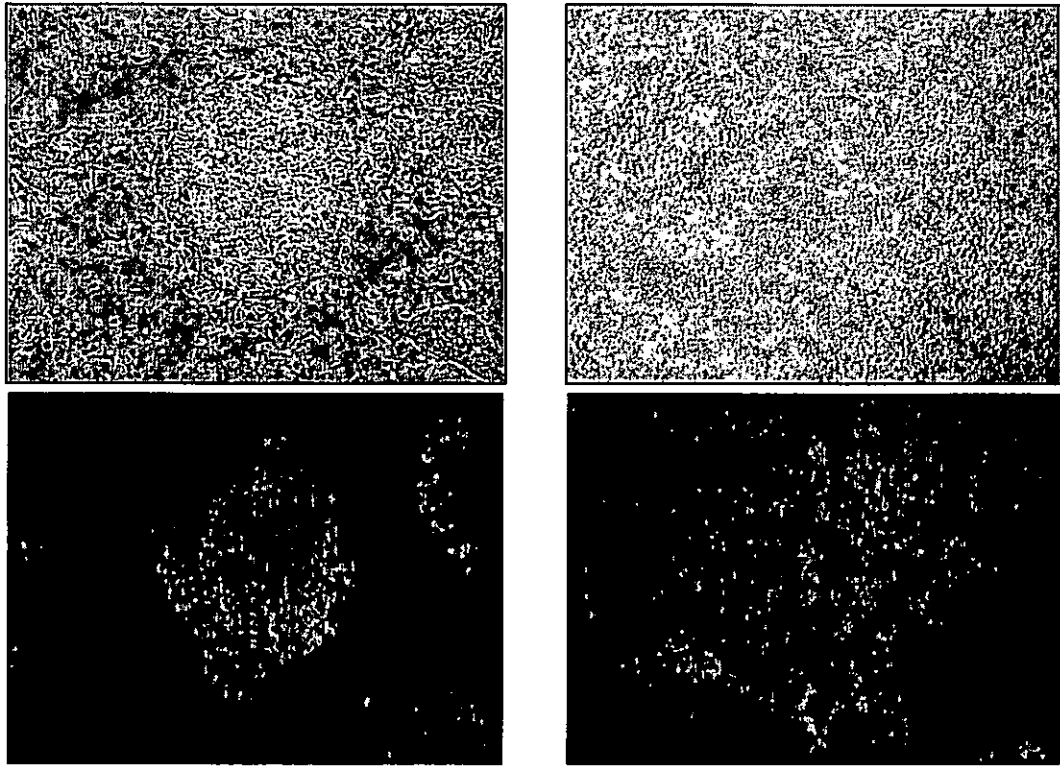


図 1 : サル ES 細胞から分化誘導した血液細胞での未分化マーカー (SSEA4) 発現

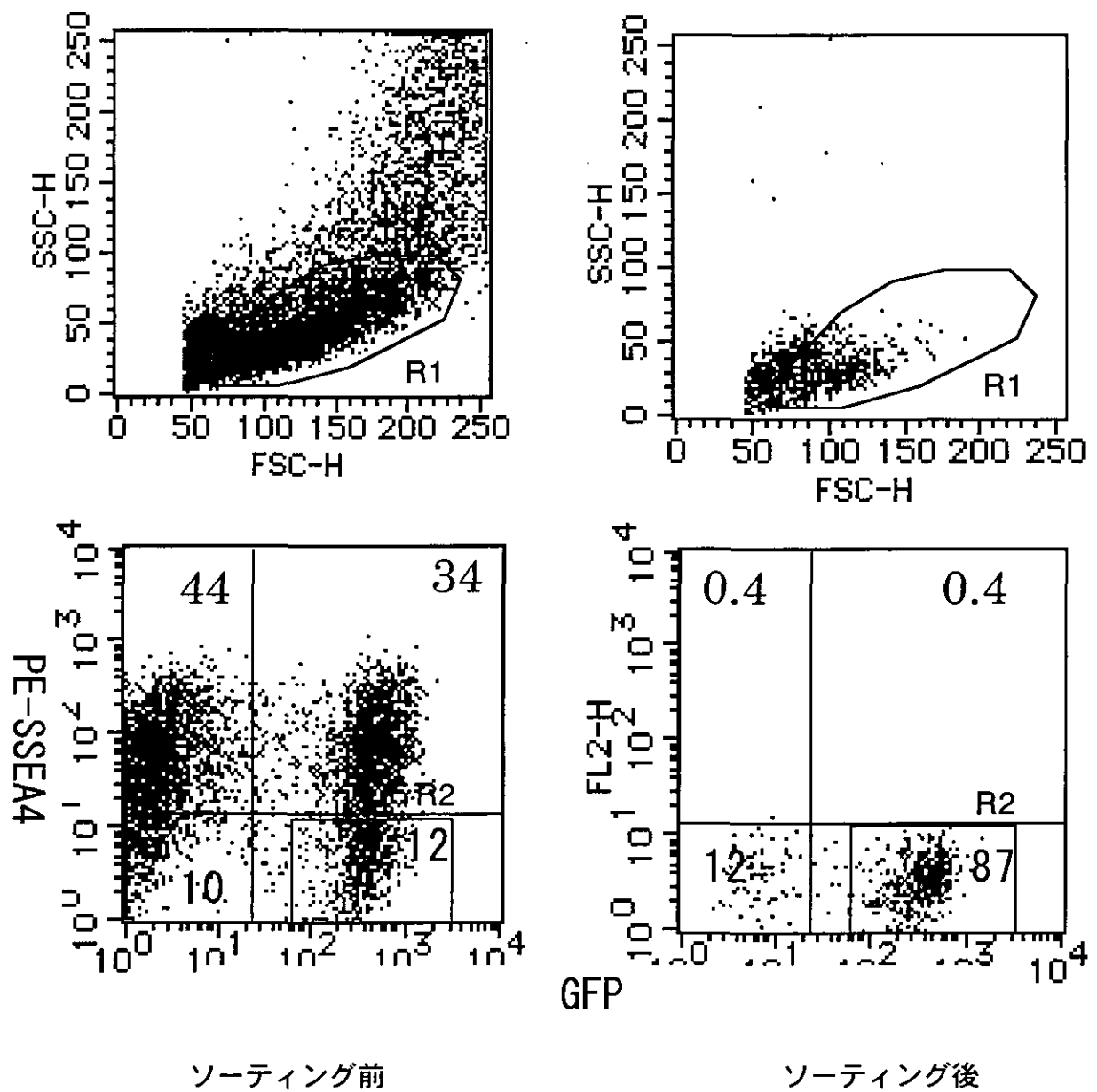


図 2 : FACS を用いたサル ES 細胞から分化誘導した血液細胞精製  
 -未分化マーカー (SSEA4) 発現を指標とした Negative Selection-

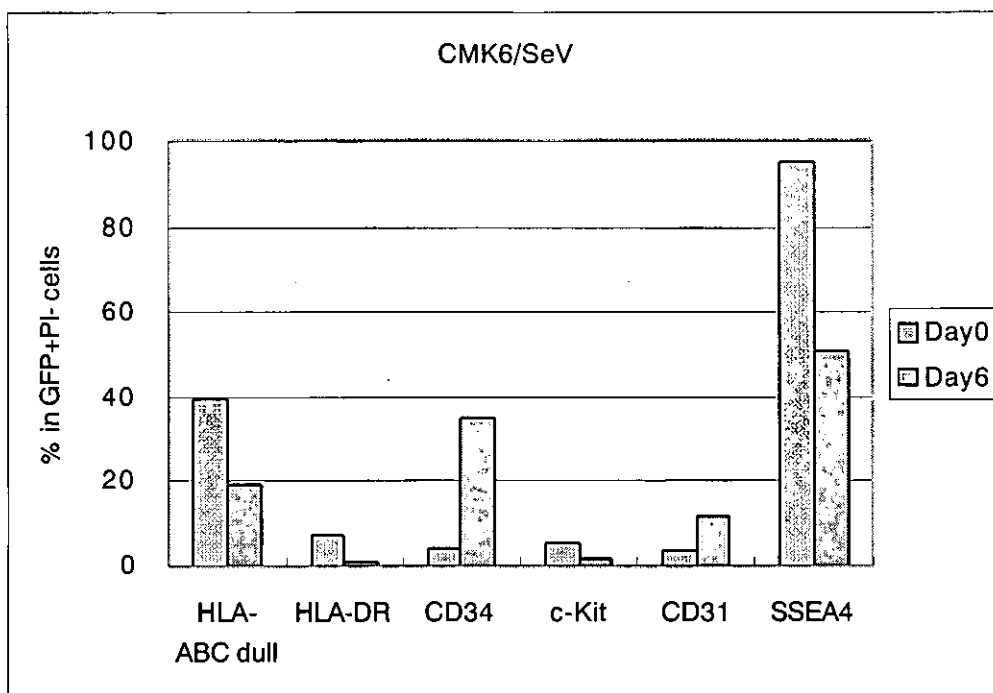


図 3 : サル ES 細胞および分化誘導した血液細胞における表面抗原の発現

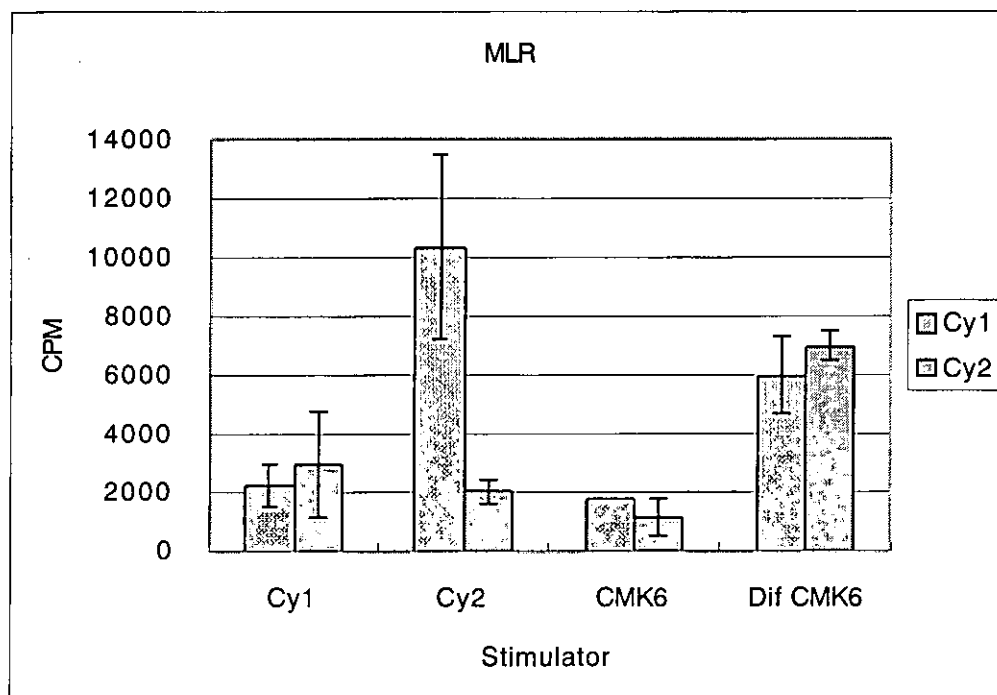


図 4 : サル ES 細胞および分化誘導した血液細胞に対する MLR



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara, T., <u>Kume, A.</u> , <u>Hanazono, Y.</u> , Mizukami, H., Okada, T., Tsurumi, H., Moriwaki, H., Ueda, Y., Hasegawa, M., and <u>Ozawa, K.</u> :	Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene	Gene Ther.		in press	2004
Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hanazono, Y.</u> , <u>Kume, A.</u> , Shibata, H., Ageyama, N., <u>Terao, K.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hasegawa, M.</u>	In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch	J. Gene Med.	6	22-31	2004.
Xu, R., <u>Kume, A.</u> , <u>Hanazono, Y.</u> , Matsuda, K.M., Ueda, Y., Hasegawa, M., Takaku, F., and <u>Ozawa, K.</u>	G-CSF receptor-mediated STAT3 activation and granulocyte differentiation in 32D cells.	Gene Ther. Mol. Biol.	7	167-172	2003
Itoh, A., Okada, T., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H., <u>Kume, A.</u> , Takatoku, M., Komatsu, N., <u>Hanazono, Y.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells	J. Gene Med.	5	929-940	2003
Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., <u>Nakano, I.</u> , Kobayashi, E., Hasegawa, M., <u>Ozawa, K.</u> , Nakatsuji, N., and Shimada, K.	Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells	J. Gene Med.	5	921-928	2003
Asano, T., Ageyama, N., Takeuchi, K., Momoeda, M., Kitano, Y., Sasaki, K., Ueda, Y., Suzuki, Y., Kondo, Y., Torii, R., <u>Hasegawa, M.</u> , Ookawara, S., Harii, K., <u>Terao, K.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hanazono, Y.</u>	Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells	Transplantation	76	1061-1067	2003

Shibata, H., <u>Hanazono, Y.</u> , Ageyama, N., Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , Yoshikawa, Y., and <u>Teruo, K.</u>	Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> ): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies	Am. J. Primatol.	61	3-12	2003
Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration	J. Gen. Virol.	84	2127-2132	2003
Kametaka, M., Kume, A., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera	Cancer Sci.	94	639-643	2003
Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hanazono, Y.</u> , <u>Kume, A.</u> , Shibata, H., Ageyama, N., <u>Teruo, K.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hasegawa, M.</u>	New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion	Biochem. Biophys. Res. Commun.	303	170-176	2003
<u>Kume, A.</u> , Koremoto, M., Xu, R., Okada, T., Mizukami, H., <u>Hanazono, Y.</u> , <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene	J. Gene Med.	5	175-181	2003
Ageyama, N., Kimikawa, M., Eguchi, K., Ono, F., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and <u>Teruo, K.</u>	Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys ( <i>Macaca mulata</i> )	J. Clin. Apheresis	18(1)	26-31	2003
Kirii, Y., Inoue, T., Yoshino, K., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and <u>Teruo, K.</u>	Molecular cloning, functional characterization, and enzyme- linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand	J Immunol Methods.	278	201-209	2003
Hanazono, Y., Asano, T., Ueda, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors	Trends Cardiovas. Med.	13	106-110	2003

20030399

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。