

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の  
高度化・安全性向上に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 18 (2006) 年 4 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の 高度化・安全性向上に関する研究 -----	1
--	---

小澤 敬也

(資料1) 投稿中の論文

(資料2) 班会議 議事録

## II. 分担研究報告

1. 造血幹細胞を利用した慢性肉芽腫症の治療法開発 -----	7
---------------------------------	---

久米 晃啓

2. 霊長類のサルを用いた前臨床研究 -----	13
--------------------------	----

花園 豊

3. 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の 体内増幅法に関する開発研究 -----	18
--	----

長谷川 護

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	22
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25
-----------------------	----

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の高度化・安全性向上に関する研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 間葉系幹細胞（MSC）を同種造血幹細胞移植の際に併用することにより、移植片対宿主病（GVHD）の抑制、及び移植後の造血回復の促進（特に、臍帯血移植の場合に有用）が得られ、移植療法の安全性向上が期待されている。本研究で MSC の機能に関する科学的基盤を明らかにし、その知見に基づいてより効果的な治療プロトコルを策定することにより、我が国における MSC 併用造血幹細胞移植の臨床応用実現を図るのが狙いである。MSC の有用性（GVHD 抑制と生着促進）が確認できれば、ドナーとレシピエントの HLA を一致させなくても移植できる可能性が出てくるため、長期的目標としては、i) 骨髄バンクのドナープール拡大の必要性をなくすこと、ii) 成人への臍帯血移植を安心して行えるようにすること、が挙げられる。平成 17 年度は、既に樹立に成功している C3H10T1/2 分化誘導系 [親株、前脂肪細胞株 (A54)、筋芽細胞株 (M1601)] を MSC のモデルとして用い、関与する分子の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、親株の 10T1/2 では Dlk, Wnt-5 $\alpha$  という分化抑制因子の発現が確認された。A54 では SCF, SDF-1, angiopoietin-1 などの発現亢進が見られた。筋芽細胞株 M1601 では MyoD,  $\alpha$ -actin, troponin T2 など筋肉・心筋に関係する遺伝子の発現が確認された。以上のことから、前脂肪細胞株 (A54) は造血支持能力が他の細胞株に比べて高いと考えられ、MSC の造血支持の分子機構も同様である可能性が示唆された。また、A54 細胞株は免疫抑制作用のある TGF- $\beta_2$  を高発現しており、これが間葉系幹細胞の免疫抑制に関与している可能性が示された。以上、C3H10T1/2 分化誘導系の MSC のモデル細胞株としての有用性が示唆された。次に、造血幹細胞移植治療において、前処置後、造血系細胞を MSC と共に直接骨髄内へ移植する実験をサル系で行い、造血幹細胞の生着が促進されることを示す予備的データが得られた。

もう一つのプロジェクトは、造血幹細胞移植技術をベースとした高度化研究としての造血幹細胞遺伝子治療開発研究で、これまで開発を進めてきている選択的増幅遺伝子（SAG）技術の実用化研究を推進した。SAG は、薬剤に反応して細胞増殖を促すキメラ受容体をコードする細胞制御遺伝子で、本研究ではヒトエリスロポエチン受容体 (EpoR) 細胞外部分とヒト G-CSF 受容体 (GcR) 細胞内部分からなるキメラ受容体 (EpoR-GcR) 遺伝子を用いた。SAG 技術を応用する最初の対象疾患としては、慢性肉芽腫症 (CGD) を念頭に置き、近い将来の臨床研究の実現を目指す。平成 17 年度は、臨床用 SAG (細胞増殖用キメラ遺伝子) の構成成分を全てヒト化し、接続部分の微調整を行った後、慢性肉芽腫症モデルマウスを用いて生体内増幅の実験を行い、目的とする細胞系列において遺伝子導入細胞を増幅できることを示した。尚、SAG と骨髄内移植と MSC 共移植の三者併用実験については、SAG 搭載レトロウイルスベクターの生産クローンを樹立し、サルを用いた前臨床研究の準備を進めた。

## 分担研究者

久米 晃啓

自治医科大学医学部

助教授

花園 豊

自治医科大学医学部

助教授

長谷川 護

ディナベック株式会社

代表取締役社長

## A. 研究目的

造血幹細胞移植は既にほぼ確立された医療技術であるが、移植片対宿主病 (GVHD) や移植後再発は依然として大きな問題であり、また最近急速に広まりつつある臍帯血移植の場合は、生着不全のリスクを抱えている。そこで、移植技術のさらなる向上により、その安全性を確保することは、極めて重要な課題となっている。このような観点から、免疫抑制活性と造血支持能を有すると考えられる間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) の利用が注目されている。欧米では既に臨床研究がスタートしており、MSC を造血幹細胞移植時に併用することにより、GVHD の抑制/治療効果と移植後造血回復の促進効果が得られる可能性が指摘されている。そこで本研究では、その科学的基盤を明らかにすることにより、研究終了時までには我が国における MSC 併用造血幹細胞移植の臨床応用実現を図る。MSC の有用性 (GVHD 抑制と生着促進) が確認されれば、ドナーとレシピエントの HLA を一致させなくても移植できる可能性が出てくるため、長期的目標としては、i) 骨髄バンクのドナープール拡大の必要性をなくすこと、ii) 成人への臍帯血移植を安心して行えるようにすること、が挙げられる。平成 17 年度は、C3H10T1/2 分化誘導系を MSC のモデルとして用い、関与する分子の解析などを行った。また、サルを用いた造血幹細胞移植モデル実験において、前処置後、造血系細胞と共に MSC を含む骨髄間質細胞を直接骨髄内へ移植することにより骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を図ることが可能かどうか検討した。

もう一つのプロジェクトは、造血幹細胞移植技術をベースとした高度化研究としての造血幹細胞遺伝子治療開発研究で、これまで開発を進めてきている選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) 技術の実用化研究を推進する。この再生医療関連技術は、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する治療法において、SAG の働きにより修復細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果の増強を図るものである。平成 17 年度は、臨床用 SAG (全てのコンポーネントをヒト化) を搭載したベクターを構築し、その評価を行う。また、平成 18 年度以降に実施を予定している、SAG システム、骨髄内移植、MSC 共移植の三者併用実験のために、SAG ベクターの高力価生産細胞の樹立など、準備を進めた。

## B. 研究方法

1) C3H10T1/2 分化誘導系を MSC モデルとして利用する基礎研究-in vitro 解析による MSC 機能分子の探索 (小澤):

C3H10T1/2 の親株、それを DNA メチル化阻害薬 (5-アザシチジン) で処理することによって以前樹立した細胞株である前脂肪細胞株 (A54) と筋芽細胞株 (M1601)、及びそれぞれを分化誘導した脂肪細胞と筋管細胞の DNA chip 解析を行い、各細胞系列と分化段階に特徴的な候補遺伝子をスクリーニングした。その結果をリアルタイム PCR で検証し、免疫抑制と造血支持に関わると推定される分子群をリストアップした。D1k 遺伝子の細胞株における強制発現にはレトロウイルスベクターを用いた。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関するサルを用いた検討 (花園、長谷川):

MSC のソースとしては、サル骨髄血中の付着性細胞を用いた。骨髄 MSC および 2 群に分けた造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>細胞) をそれぞれ異なるレトロウイルスベクター (PLII, GINa, LNL6) を用いて遺伝子標識した (triple marking)。次に、全身放射線照射を予め行った後、同一個体の大腿骨左右別々に自家移植 (骨髄内移植法) した (個体差の影響を排除するための hemi-transplantation)。即ち、

片方に、造血幹細胞 (G1Na 標識) と骨髄 MSC (PLII 標識) を共移植した。対側には、コントロールとして造血幹細胞 (LNL6 標識) のみを単独移植した。その後、末梢血において、共移植群 (G1Na 標識) と単独移植群 (LNL6 標識) のどちらに由来する細胞が優勢であるか観察し、骨髄 MSC の共移植によって造血幹細胞の生着が促進されるかどうか、定量的に評価した。具体的には、腸骨から採取した骨髄細胞のコロニーアッセイを行い、各コロニーに対して G1Na と LNL6 を判別する PCR を行った。

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究 (久米、花園、長谷川) :

i) CGD 治療に最適化した完全ヒト化 SAG の構築 : SAG は、薬剤に反応して細胞増殖を促すキメラ受容体をコードする細胞制御遺伝子で、本研究ではヒトエリスロポエチン受容体 (EpoR) 細胞外部分とヒト G-CSF 受容体 (GcR) 細胞内部分からなるキメラ受容体 (EpoR-GcR) 遺伝子を作製した。接合部分に僅かな違いのある数種のキメラ遺伝子をレトロウイルスベクターに搭載し、サイトカイン依存性細胞株あるいは骨髄細胞に遺伝子導入して細胞増幅効果を比較した。

ii) CGD モデルマウスを用いた遺伝子導入細胞の体内増幅実験 : 上記実験で最も高い増幅効果を発揮した SAG と治療用遺伝子を搭載するレトロウイルスベクターを構築し、ヒト X 連鎖型 CGD (X-CGD) と同様の症状を示すモデルマウスの治療実験を行った。尚、ベクター骨格は韓国で臨床試験に使用される予定の MT (共同研究相手の ViroMed 社より供与) を用いた。生着後、レシピエントに Epo を投与し (10 単位皮下注連続 5 日間を 1 クール)、遺伝子導入細胞の増幅効果を検討した。遺伝子導入効率の算定には、末梢血顆粒球の活性酸素産生能を、ジヒドロローダミン-123 (DHR) 還元能を指標としてフローサイトメトリーで測定した。

iii) SAG ベクター高力価生産株の樹立 : SAG を用いるサルでの前臨床研究用に高力価の SAG 搭載レトロウイルスベクター生産株を樹立した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験 (自治医大) では、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。霊長類医科学研究センターでのサルの実験は、霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。サル細胞及びサル個体を用いる組換え DNA 実験については、自治医科大学および医薬基盤研究所の承認を受けた。

### C. 研究結果

1) C3H10T1/2 分化誘導系を MSC モデルとして利用する基礎研究-in vitro 解析による MSC 機能分子の探索 :

親株である 10T1/2 細胞株では  $10^5$  個の遺伝子が特異的に発現亢進していた。Dlk, Wnt-5 $\alpha$  という分化抑制因子の発現亢進が認められ、10T1/2 の未分化維持に関与している可能性が示唆された。Dlk は脂肪細胞の分化を抑制するという報告があったため、A54 に強制発現させたが、A54 の脂肪分化は抑制できなかった。A54 では 201 個の遺伝子が特異的に発現亢進していた。その中に SCF, SDF-1 など造血支持に関わる遺伝子があった。Angiopoietin-1 は chip 上には載っていなかったが、A54 で特異的に発現が亢進していることをリアルタイム RT-PCR と蛋白レベルで確認した。これらのサイトカインの発現亢進は、A54 の脂肪分化とともに消失し、前脂肪細胞という分化段階に特異的なものであった。造血支持能を造血細胞との共培養系で見たところ、3 つの細胞株の中で、A54 のみで cobble stone appearance が認められ、実際に A54 が最も高い造血支持能をもっていることが示唆された。また、TGF- $\beta_2$  という免疫抑制因子の発現が認められた。

亜株の筋芽細胞株 (M1601) では 137 個の遺伝子が特異的に発現亢進していた。予想された通りに、MyoD,  $\alpha$ -actin, Troponin T2 など、骨格筋細胞・心筋細胞に関係する遺伝子の発現が亢進していた。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関するサルを用いた検討 :

現在、1 頭目のサルの移植実験を終了し、

結果を解析中である。予備的な解析では、MSCを併用して移植した造血幹細胞の方が効率良く生着していることを示唆するデータが得られている。

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究:

今回検討した SAG の中で最も強力だったのが EpoR-Mpl で、骨髄細胞 10 万個から 400 個近いコロニーを生ぜしめた。EpoR 全長や EpoR-GcR のバリエーションはいずれも 100 個余のコロニーを誘導し、その強度はほぼ同等と考えられたが、その中では EpoR と GcR の間に 2 アミノ酸 (KL) を挟んだもの (Version 2) が最も多数のコロニーを作らせた。

EpoR-GcR (Version 2) 遺伝子を導入した X-CGD マウスの骨髄細胞を移植して造血系を再構築した同系マウスに Epo を投与して機能回復顆粒球の割合を測定したところ、第 1 クールの刺激にて  $1.0 \pm 0.1\%$  から  $3.9 \pm 0.8\%$  ( $P = 0.006$ )、第 2 クールの刺激にては  $1.5 \pm 1.1\%$  から  $3.2 \pm 2.2\%$  ( $P = 0.065$ ) へとそれぞれ上昇した。

SAG 搭載ベクター生産細胞に関しては、クローニングと感染を繰り返すことにより、 $10^7$  以上の粒子力価を生産するクローンが複数クローン得られた。また、SAG に IRES-YFP を接合させたベクター高力価生産細胞株も得られた。

#### D. 考察

1) C3H10T1/2 分化誘導系を MSC モデルとして利用する基礎研究-in vitro 解析による MSC 機能分子の探索: いくつかの興味深い遺伝子発現を確認した。Dlk の強制発現実験では A54 の分化は抑制されなかったが、発現亢進している 10T1/2 細胞株では何らかの分化抑制作用を発揮している可能性が考えられた。A54 細胞株での造血因子の発現は前脂肪細胞特異的で、脂肪分化とともに消失したため、再生不良性貧血の脂肪髄などの病態を説明している可能性が考えられた。造血因子の発現と免疫抑制因子 TGF- $\beta_2$  の発現は A54 細胞株が前脂肪細胞でありながら、MSC の形質を保っている可能性を示していると考えられた。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関するサルを用いた検討:

本年度は、サルを用いた遺伝子標識研究を計画し、1 頭実施した。その結果、造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>細胞) を MSC と共移植した場合、造血幹細胞の生着が良い傾向が観察された。骨髄間質細胞を骨髄内に直接移植すれば、骨髄内で MSC から骨芽細胞が分化し、造血幹細胞のニッチ (niche) が創出され、造血幹細胞の生着が促進されたのではないかと考えられる。造血幹細胞移植後の造血回復に関しては、造血幹細胞の体外増幅やサイトカイン投与による造血回復の促進など、主にドナー細胞の観点から研究が進められている。これに対して、骨髄微小環境の観点から造血幹細胞の生着促進を図る本研究はユニークといえ、一層の進展を図りたい。

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究:

疾患モデルマウスの骨髄細胞に、改良型 SAG (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を導入することにより、CGD 治療の標的である骨髄球系細胞を増幅できることが示された。GcR の細胞増殖シグナルは Mpl より弱いものの、特異性の高い増幅が得られ、安全性は高いと考えられる。

また、造血幹細胞と MSC との骨髄内共移植に、SAG システムを組み合わせれば、さらに有効性が向上する可能性がある。

#### E. 結論

・我々が用いた C3H10T1/2 分化誘導系の MSC モデル細胞株は、少なくとも一部、MSC の機能の分子機構と相同性を持っていると考えられ、今後 MSC の研究に応用できる可能性が示唆された。実際、A54 前脂肪細胞株は造血支持能に関与すると考えられる因子の発現が亢進していた。また、免疫抑制因子の TGF- $\beta_2$  も発現が亢進していた。間葉系幹細胞の造血支持、免疫抑制の分子機構の一部と相関している可能性が考えられた。

・サルを用いた実験から、造血幹細胞を骨髄 MSC と共に骨髄内へ直接移植すると、造血幹細胞の生着が高められることを示す予備的データが得られた。

・改良型選択的増幅遺伝子 (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を治療用遺伝子とともに標的細胞に導入することにより、慢性肉芽腫症遺伝子治療の効果を増強しうる。

・MSC 共移植、骨髄内移植、SAG システムの三者併用前臨床研究をサルで実施する準備を進めた。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choin Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K., and Mano, H.: Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1256-1262, 2005.

2) Fujishiro, J., Takeda, S., Takeno, Y., Takeuchi, K., Ogata, Y., Takahashi, M., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Okada, T., Ozawa, K., Hashizume, K., and Kobayashi, E.: Gene transfer to the rat kidney *in vivo* and *ex vivo* using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 1385-1391, 2005.

3) Ishii, H., Inageta, T., Mimori, K., Saito, T., Sasaki, H., Isobe, M., Mori, M., Croce, C.M., Huebner, K., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9655-9660, 2005.

4) Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., Terao, K., Shimada, K., Ikeda, U., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Repair of infarcted myocardium mediated by

transplanted bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 23: 355-364, 2005.

5) Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Miyoshi, T., Ohmine, K., Toshima, M., Miyazato, A., Takatoku, M., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation. *Med. Sci. Monit.* 11: CR91-94, 2005.

6) Inoue, H., Ohsawa, I., Murakami, T., Kimura, A., Hakamata, Y., Sato, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okada, T., Ozawa, K., Francis, J., Leone, P., and Kobayashi, E.: Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 288-295, 2005.

7) Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, H., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. *Transplantation* 79: 32-37, 2005.

8) Inukai, T., Inaba, T., Dang, J., Kuribara, R., Ozawa, K., Miyajima, A., Wu, W., Look, A.T., Arinobu, Y., Iwasaki, H., Akashi, K., Kagami, K., Goi, K., Sugita, K., and Nakazawa, S.: TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down regulating expression of the common b chain of cytokine receptors. *Blood* 105: 4437-4444, 2005.

9) Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., and Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor

- gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum.* 52: 164-170, 2005.
- 10) Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther.* 12: 203-210, 2005.
- 11) Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* (in press)
- 12) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* (in press)
- 13) Asano T, Shibata H, Hanazono Y: Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol Biol* 329: 295-303, 2005.
- 14) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol Biol* 329: 459-467, 2005.
- 15) Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima N, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim* 54: 421-428, 2005.
- 16) Griesenbach U, Boyton RJ, Somerton L, Garcia SE, Ferrari S, Owaki T, Ya-Fen Z, Geddes DM, Hasegawa M, Altmann DM, Alton EW. Effect of tolerance induction to immunodominant T-cell epitopes of Sendai virus on gene expression following repeat administration to lung. *Gene Ther.* 13: 449-56, 2006
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 発明の名称：  
A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal  
出願番号：60/483,357号  
発明者：長谷川護  
PCT 国際出願済み  
国際出願番号：PCT/JP2004/009370  
(2004/6/25)  
国際公開番号：W02005/000890  
(2005/1/6)



(資料 1)

投稿中の論文

**Genome-wide screening of genes responsible for differentiation by DNA  
microarray analysis among 10T1/2 and 10T1/2 derived cell lines, a mouse  
mesenchymal stem cell model**

Iekuni Oh,<sup>a</sup> Katsutoshi Ozaki,<sup>a</sup> Akira Miyazato,<sup>a</sup> Kazuya Sato,<sup>a</sup>  
Akiko Meguro,<sup>a</sup> Kazuo Muroi,<sup>c</sup> Tadashi Nagai,<sup>a</sup> Hiroyuki Mano,<sup>b</sup> Keiya Ozawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Hematology, Department of Medicine;

<sup>b</sup>Division of Functional Genomics, Center for Molecular Medicine;

<sup>c</sup>Division of Cell Transplantation and Transfusion;

Jichi Medical School, Tochigi, Japan

## **Abstract**

**The molecular mechanisms underlying the biological effects or differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) remain obscure. Screening up-regulated or down-regulated genes at different stages in differentiation is an important step to know the molecular mechanisms. In this study, 10T1/2 and two sub-lines, A54 (preadipocyte) and M1601 (myoblast), were used as a model of MSCs and downstream committed progenitors. We analyzed gene expression profiles of these three cell lines and found that Dlk (delta-like 1), Wnt-5a, and ST2 (interleukin-1 receptor-like 1) in 10T1/2, SCF (stem cell factor, c-kit ligand), SDF-1 (stromal derived factor-1), and Ang-1 (angiopoietin-1, tie-2 ligand) in A54, and cardiac muscle specific genes in M1601 were up-regulated. Overexpression of Dlk in A54 did not induce any changes on the differentiation. After differentiation into adipocytes, A54 lost both the expression of SCF, SDF-1, and Ang-1 and ability for supporting the formation of hematopoietic cell colony. Our results suggest that these three lines could be a useful tool for analyses of differentiation and function of mesenchymal stem cells and progenitor cells.**

## Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) account for a small population of cells in the bone marrow as a non-hematopoietic component with the capacity to differentiate into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes (1). As MSCs can be readily isolated and expanded *in vitro*, they are expected to be a source of regenerative therapy. Recent studies have demonstrated that MSCs are capable of supporting hematopoiesis and of regulating immune response (2,3,4,5). Although clinical applications of MSCs have been conducted for the suppression of graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation (6,7) and for the regenerative therapy (8,9), the molecular mechanism underlying the biological effects of MSCs remains obscure. Finding key molecules for differentiation, immunosuppression, and hematopoietic support of MSCs is crucial step to utilize MSCs for clinical applications.

It has been shown that 10T1/2 cells, derived from C3H mouse embryo cells, can be differentiated into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes with a treatment of 5-azacytidine (10). Some investigators used 10T1/2 cell line as a model of mouse MSCs (5, 6). We previously established two sub-lines from 10T1/2, designated as A54 for preadipocyte cell line and M1601 for myoblast cell line (11). Under appropriate conditions, A54 and M1601 cells can terminally differentiate into adipocytes and myotubes, respectively, while parental 10T1/2 cells remain undifferentiated under the same conditions (11).

Ang-1 is expressed on osteoblasts in the bone marrow niche, and Tie-2, the receptor for Ang-1, is expressed on vascular endothelium and hematopoietic stem cells (12). It has been suggested that the interaction between Ang-1 and Tie-2 is essential for cobble stone formation of hematopoietic stem cells *in vitro* (13). Activation of Tie-2 was reported to play a relevant role in the self-renewal of hematopoietic stem cells within the bone marrow niche (13). Other than osteoblasts, the distribution of Ang-1 expression in the bone marrow has not been clearly determined.

In the present study, 10T1/2 was used as a model of MSCs and A54 and M1601 were used as committed mesenchymal progenitors. Gene expression profiles were compared by DNA microarray and showed distinctive and unique pattern for each line. Here we show several molecules, which might be important for differentiation of MSCs.

## Materials and Methods

### *Cell lines and induction of terminal differentiation*

Parental 10T1/2 cell line was obtained from the Japanese Cancer Research Resources Bank and the two derived cell lines, A54 and M1601, were established as previously reported (11). The cell lines were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen, MD) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma, MO). Adipocyte differentiation of A54 was induced by a medium containing additional  $10^{-5}$  M insulin (Sigma) and  $10^{-6}$  M dexamethasone (Wako, Japan) for 7 days. Myotube differentiation of M1601 was induced by a medium containing 2% horse serum (GIBCO, NY) instead of fetal calf serum for 7 days.

### ***Oligonucleotide microarray***

Total RNA was extracted by RNeasy (QIAGEN, CA) and 10 mg of total RNA was subjected to cDNA synthesis primed with T7-(dT)<sub>24</sub> primer containing T7 promoter sequence. After second strand synthesis, *in vitro* transcription was performed to synthesize complementary RNA (cRNA) labelled with biotin. 15 mg of cRNA was hybridized onto Affymetrix Mouse Genome U74A version-2 GeneChip (Affymetrix, CA), which contains >6000 genes as targets, for 16 hours at 45°C. The hybridized chip was washed and stained with streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE) using the fluidics station. Signal intensity of fluorescence was captured by laser scanner and calculated by Microarray Suite version-5.0 (Affymetrix).

### ***Microarray data analysis***

GeneSpring software (Silicon Genetics, CA) was used for microarray data analysis. In order to remove noise, only transcripts more than 2-fold increase in relative intensity and those indicated as “present” by Microarray Suite version-5.0 (Affymetrix) were selected as up-regulated genes.

### ***Reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (RT real-time PCR)***

Total RNA was extracted from the cells independently from the microarray experiments and cDNA was synthesized using SuperScript<sup>®</sup> First-Strand synthesis kit (Invitrogen, MD). PCR was performed on prepared cDNAs using Quantitect<sup>®</sup> SYBR Green PCR kit (QIAGEN) according to the manufacture's instruction. The incorporation of the SYBR Green dye into the PCR products was monitored in real time with ABI Prism 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems, CA), resulting in the calculation of threshold cycle (C<sub>T</sub>) value, which determines the number of PCR cycle at which an exponential generation of PCR product begins. The C<sub>T</sub> values for b-actin were used as control to calculate the abundance of target transcripts relative to that of b-actin.

### ***Flow cytometric analysis***

PE-conjugated rat anti-mouse CD90.2 mAb was from BD Pharmingen. Rat anti-mouse Dlk mAb was gift from Dr. Atsushi Miyajima (The University of Tokyo). PE-conjugated goat anti-rat IgG was from (Cederlane, Ontario, Canada). Fc block (BD Pharmingen) was used to prevent non-specific binding of antibody to Fc receptors. Cells were stained with monoclonal antibodies for 30 minutes on ice. Flow cytometric analysis was performed on BD LSR (Becton Dickinson, CA) and collected data were analyzed with CELLQUEST software (Becton Dickinson).

### ***Retrovirus-mediated gene transduction***

A54 cells were infected with empty retroviral vector MSCV-IRES-EGFP or that encoding hDlk (MSCV-IRES-EGFP vector was a gift from Dr Kume A, Jichi Medical School, Japan) (14). Retrovirus vectors were transiently transfected into BOSC23 packaging cell line using Lipofectamine<sup>®</sup> and plus reagent (Invitrogen). Supernatants from BOSC23 were supplemented with 4mg/ml polybrene. Transduction into A54 cells was performed by centrifugation at 1080g for 40 minutes at 32°C and incubation at 37°C for 4hr.

#### ***Co-culture of mouse hematopoietic stem cell fraction with 10T1/2, A54, and M1601***

Bone marrow cells were obtained from 10-week-old C3H/HeN mouse femur by flashing method with PBS (Invitrogen, NY). Bone marrow suspensions were layered over 1.087g/ml Lympholyte-M (Cedarlane, Ontario) and centrifuged at 480xg for 30 min to obtain bone marrow mononuclear cells. These cells were magnetically labelled with a cocktail of biotinylated antibodies, “lineage markers”, including CD5, B220, CD11b, Gr-1, 7-4 and Ter119 antibodies and anti-biotin micro-beads (Miltenyi Biotec, CA). Magnetically labelled cells were depleted with AutoMACS (Miltenyi Biotec) according to the manufacture’s instructions. Subsequently, lineage negative fraction was magnetically labelled with anti-Sca-1 micro-beads (Miltenyi Biotec) and positively selected.  $2.4 \times 10^4$  Lin(-)Sca-1(+) cells were plated on  $2 \times 10^4$  10T1/2, A54, or M1601 cells in 12-well dish, and co-cultured for 6 days. Prior to co-cultivation, 10T1/2, A54, and M1601 cells were irradiated with 30 Gy to prevent excess proliferation. Hematopoietic cobble stone formation was evaluated by phase-contrast microscopy.

#### ***Western blot analysis***

Protein samples were extracted from 10T1/2, A54, M1601, and OP9 cells using NP-40 based cell lysis buffer. Equal amounts of protein (20 mg) were fractionated by SDS-PAGE. Following transfer onto the PVDF membrane (Invitrogen), blotted with an antibody to mouse Ang-1 (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, CA) or a monoclonal antibody to b-actin (1:5000, Sigma) followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin antibody (Amersham Biosciences, Sweden). Blots were visualized using West Pico chemiluminescent reagent (Pierce, IL) and X-ray film (Kodak, NY)

## **Results**

### **Terminal differentiation of 10T1/2 derived cells into adipocytes or myotubes**

Previously, we established two sub-lines, preadipocyte A54 and myoblast M1601, from a parental mouse embryo fibroblast cell line 10T1/2 by a treatment with 5-azacytidine (11). 10T1/2, A54, and M1601 exhibit similar morphology under maintenance condition. A54 and M1601 cells can be differentiated into adipocytes and myotubes, respectively, under appropriate conditions. While parental 10T1/2 cells maintain the same morphological phenotype under such conditions (Materials and Methods, 11).

### **Gene expression profiles of 10T1/2 and 10T1/2 derived cells**

We used these three cell lines as a model of MSCs and downstream progenitors and performed high-throughput gene analysis to screen important genes for the differentiation of MSCs. Total RNA from these three cell lines was subjected to biotinylation and hybridization with a GeneChip containing > 6000 genes (Affimetrix). Genes with transcripts of more than two fold higher in relative intensity than those in the other two cell lines were selected. Each of 10T1/2, A54, and M1601 cell lines showed a distinctive and unique gene expression profile despite morphological similarity (Fig. 1). Parental 10T1/2 cells had 105 elevated genes including *Activine*, *Dlk*, *Nov*, *Grb10*, *p15*, and many functionally unknown molecules (Table 1A). *Dlk* and *Nov* are known to be involved in Notch signaling pathway and were reported to have the ability to inhibit differentiation into adipocyte and osteoblast (15,16). In preadipocytes A54 cells, 201 genes were up-regulated, including genes known to be involved in adipocyte differentiation such as *C/EBPa*, *C/EBPd*, *PPAR-g*, *PAI-I*, and *Frizzled-1* (Table 1B) (17,18,19,20). Myoblasts M1601 cells showed 137 up-regulated genes, including ones related to skeletal muscle differentiation such as *MyoD*, *MLC1F*,  $\alpha$ -skeletal actin, myosin heavy chain, and myosin light chain (21, 22) as well as genes related to cardiac muscle differentiation such as  $\alpha$ -cardiac actin, cardiac troponin C, and troponin T2 (Table 1C) (23).

### **Real-time PCR analyses of selected genes from microarray experiment in parental 10T1/2 cells**

Next, we selected seven genes, *p15*, *Wnt-5a*, *Dlk*, *CrbpI*, *Fhl1*, *ST2*, and *CD90* as candidates for further analysis in 10T1/2 cells. These genes had more than 3-fold higher expression in 10T1/2 than in the other two cell lines according to microarray data. To confirm this, we performed RT real-time PCR. As shown in Fig. 2, the levels of transcripts of these genes in 10T1/2 cells were elevated. Up-regulation of *CD90* in 10T1/2 cells was confirmed by flow cytometric analysis (data not shown). Although the function of *CD90* in MSC is unclear, it may be useful to distinguish the immature mesenchymal stem cell from committed progenitors, as *CD90* was not detected in the other two cells. We chose to analyze *Dlk* gene further, as it is known to inhibit adipocyte and osteoblast differentiation (15). Retrovirus

vector containing human Dlk cDNA was transduced into A54 cells. A54 cells overexpressing Dlk showed no change in the adipocyte differentiation (Fig. 3). Further experiments are required to know the function of the up-regulated genes in 10T1/2.

### **SCF, SDF-1, and Ang-1 were up-regulated in preadipocyte A54 cells**

Previous studies have shown that preadipocytes have a higher ability to support hematopoiesis than other kinds of stromal cell components *in vitro* (23, 24). Our results of gene expression profile revealed up-regulation of critical cytokines for hematopoiesis such as SCF and SDF-1 in preadipocyte A54 cells. In addition, many chemokines, such as CXCL-1 and CCL-7, were also up-regulated (Table 1B). As Ang-1 was not on the GeneChip and Ang-1 was reported to be indispensable for the self-renewal of hematopoietic stem cells (13), we performed real-time PCR analysis of Ang-1 along with SCF, SDF-1, CEBP- $\delta$ , IGF-1, and CXCL-1. As shown in Fig. 4, the expression of these genes was highest in A54 cells among the three cell lines. The level of Ang-1 mRNA in A54 was similar to that in OP9, which is a well-characterized bone marrow stromal cell line (Fig. 5A). Moreover, protein expression of Ang-1 was only detected in A54 among three cell lines and the level of this protein apparently decreased after adipocyte differentiation (Fig. 5B).

### **Ability to form hematopoietic cell colony**

To see the effects of these three lines on hematopoietic cells, we co-cultured mouse hematopoietic stem cell fraction with these three cells. Figure 6A shows the experimental protocol. Lineage marker positive cells were depleted from bone marrow cells using Auto-MACS magnetic beads system, and thereafter Sca-1 positive cells were selected. The resulting Lin(-)Sca-1(+) fractions were plated on 10T1/2, A54, or M1601 cells in 12-well dish. After 6 days of co-culture, hematopoietic cell colony was observed only on the A54 cells (Fig. 6B, C, D). These results suggest that only A54 cells have the ability to support hematopoietic cell growth among three cell lines, consistent with the previous report (11). Hematopoietic cell colony could not be seen on the layer of the terminally differentiated A54 adipocyte (Fig. 6E), suggesting that preadipocyte A54 cells lose the ability for hematopoietic cell support after adipocyte differentiation. To understand the molecular mechanisms of this observation, we examined the expression levels of SCF, SDF-1, and Ang-1 during the adipocyte differentiation by RT real-time PCR. As shown in Fig 7, the expression levels of Ang-1 and SCF decreased immediately after the induction of adipocyte differentiation, and that of SDF-1 decreased gradually. In contrast to this, the level of adipocyte differentiation marker, CEBP- $\delta$ , was unchanged.

### **Up-regulated genes in M1601**

We confirmed up-regulation of cardiac troponin C and troponin T2 by RT real-time PCR (Fig. 8).



## Discussion

We used 10T1/2 and derived two cell lines as a model of MSCs and progenitors. Genes regulating the differentiation of MSCs remain obscure and it is technically difficult to do high-throughput analysis using primary MSCs, as MSCs may contain heterogeneous progenitors and the extent of differentiation in MSCs may be at a different level. To overcome the problems related to the heterogeneity of MSCs, we chose this system. As A54 and M1601 are derived from 10T1/2, all three cell lines have the same genetic background.

Up-regulation of *Dlk* in 10T1/2 cells was confirmed by microarray and RT real-time PCR. Although *Dlk* was reported to inhibit adipocyte and osteoblast differentiation (15), A54 overexpressing *Dlk* did differentiate into adipocyte. It is not surprising because that the other factor(s) may be required for the inhibition of differentiation.

Wnt-5a is a member of the Wnt family, which play essential role in regulating proliferation and differentiation (18). Our GeneChip data demonstrated that Wnt-5a was expressed in parental 10T1/2, and its' receptor Frizzled was up-regulated in the downstream progenitor, A54. MSCs might self-regulate their differentiation or proliferation in the bone marrow through Wnt-5a signaling system. The genes up-regulated in the parental 10T1/2 cells, p15, Wnt-5a, *Dlk*, *Crbpl*, *Fhl-1*, *ST2*, and *CD90* may be worth investigating further to find key molecules for undifferentiation.

SCF, SDF-1, and Ang-1 were exclusively up-regulated in A54 preadipocyte cell line, and this appeared to be consistent with the ability of A54 for hematopoietic support. Adipocyte differentiation down-regulated the expression of these genes and the ability for hematopoietic support. These results indicate that preadipocytes, one of committed progenitors may have relevant role in hematopoietic support, and the loss of this ability after the terminal adipocyte differentiation may be involved in a fatty change of bone marrow in aging or aplastic anemia. Ang-1 was reported to be essential for the self-renewal of hematopoietic stem cells, and to be expressed on osteoblasts in the bone marrow niche (13). Our results suggested preadipocytes, as well as osteoblasts, in the bone marrow could be Ang-1 producing cells. Preadipocyte was shown to be related to osteoblast (26), as mRNA of osteoblast specific genes, such as an osteocalcin, was detected in preadipocyte, consistent with a presence of common molecular pathway between osteoblast and preadipocyte differentiation. TAZ was reported as a key regulator of MSCs differentiation, which enhances the differentiation into osteoblasts through activation of *Runx2* and suppresses the differentiation into adipocytes through inhibition of *PPAR-g* (28).

M1601 expresses cardiac muscle specific genes, suggesting a possible plasticity of MSCs to differentiate into cardiac muscle cells. In this study, we did not analyze up-regulated genes in M1601 further. Human MSCs differentiate into cardiac muscle cells *in vitro* with a treatment of 5-azacytidine and a co-culture with primary mouse cardiac muscle cells (25). Recent study demonstrated that allogenic MSCs ameliorated cardiac function in a pig myocardial infarction model and a rat dilated cardiomyopathy model, suggesting MSCs have

the therapeutic potential for myocardial infarction and cardiomyopathy (31, 33).

As presented in Fig. 9, we hypothesized lineage and stage specific gene expression pattern in MSCs and committed progenitors. This transcriptional profile would enhance the understanding of the molecular mechanisms underlying the differentiation of MSCs into progenitors. Furthermore, we hypothesized that each progenitor has a unique function in bone marrow. Our analysis demonstrated a possible molecular mechanism of hematopoietic support by preadipocytes. Preadipocyte progenitors may be better than MSCs for hematopoietic engraftment in the setting of bone marrow transplantation.

Given that MSCs contains heterogeneous progenitors and each committed progenitor has a different function in bone marrow, the three cell lines analyzed here could be useful tools to characterize them.

## References

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- 2 Bensidhoum M, Chapel A, Francois S et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004;103:3313-3319.
- 3 Maitra B, Szekely E, Gjini K et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:597-604.
- 4 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood* 2005;106:1755-1761.
- 5 Djouad F, Plence P, Bony C et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837-3844.
- 6 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004;363:1439-1441.
- 7 Lazarus HM, Koc ON, Devine SM et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389-398.
- 8 Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-313.
- 9 Bang OY, Lee JS, Lee PH et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57:874-882.
- 10 Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979;17:771-779.
- 11 Nishikawa M, Ozawa K, Tojo A et al. Changes in hematopoiesis-supporting ability of C3H10T1/2 mouse embryo fibroblasts during differentiation. *Blood* 1993;81:1184-1192.

- 12 Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT et al. Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood* 2005;106:505-513.
- 13 Arai F, Hirao A, Ohmura M et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149-161.
- 14 Kume A, Xu R, Ueda Y et al. Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther* 2000;14:1193-1199.
- 15 Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dkk1/Pref-1. *J Bone Miner Res* 2004;19:841-852.
- 16 Sakamoto K, Yamaguchi S, Ando R et al. The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J Biol Chem* 2002;277:29399-29405.
- 17 Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;130:93-109.
- 18 Bennett CN, Ross SE, Longo KA et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:30998-31004.
- 19 Lijnen HR, Alessi MC, Van Hoef B et al. On the role of plasminogen activator inhibitor-1 in adipose tissue development and insulin resistance in mice. *J Thromb Haemost* 2005;3:1174-1179.
- 20 Kumar S, Leontovich A, Coenen MJ et al. Gene expression profiling of orbital adipose tissue from patients with Graves' ophthalmopathy: a potential role for secreted frizzled-related protein-1 in orbital adipogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4730-4735.
- 21 Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D et al. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 1989;58:823-831.
- 22 Cooper TA, Ordahl CP. A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 1984; 226:979-982.