

- 23 Maekawa TL ,Takahashi TA ,Fujihara M et al. A novel gene (drad-1) expressed in hematopoiesis-supporting stromal cell lines, ST2, PA6 and A54 preadipocytes: use of mRNA differential display. *Stem Cells* 1997;15:334-339.
- 24 Mazini L ,Wunder E ,Sovalat H et al. Mature accessory cells influence long-term growth of human hematopoietic progenitors on a murine stromal cell feeder layer. *Stem Cells* 1998;16:404-412.
- 25 Shim WS, Jiang S, Wong P et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:481-488.
- 26 Dorheim MA ,Sullivan M ,Dandapani V et al. Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 1993;154:317-328.
- 27 Nakano T ,Kodama H ,Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 1996;272:722-724.
- 28 Hong JH, Hwang ES, McManus MT et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005 ;309:1074-1078.
- 29 Hayakawa M, Yanagisawa K, Aoki S et al. T-helper type 2 cell-specific expression of the ST2 gene is regulated by transcription factor GATA-3. *Biochim Biophys Acta* 2005;1728:53-64.
- 30 Leung BP, Xu D, Culshaw S et al. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 2004 ;173:145-150.
- 31 Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11474-11479.
- 32 Shim WS, Jiang S, Wong P et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:481-488.
- 33 Nagaya N, Kangawa K, Itoh T et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-1135.

Table 1. Up-regulated genes in 10T1/2, A54, and M1601. Genes specifically up-regulated in 10T1/2 (A), A54 (B), and M1601 (C) are represented on the table. Functionally unknown genes were excluded from original data to simplify the lists. Information of “Common name” and “Description” was obtained from Microarray Suite version-5.0 (Affymetrix).

Table 1A. Genes specifically up-regulated in 10T1/2

Genbank ID	Common name	Description
U69137	Cdh10	cadherin 10
AF100778	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2
AW120746	Scoc	short coiled coil protein
AI845934	Ebna1bp2	EBNA1 binding protein 2
AI854020	Cdo1	cysteine dioxygenase 1, cytosolic
AF059567	Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
X69619	Activin	inhibin beta-A
Y09257	nov	nephroblastoma overexpressed gene
Z12171	dIk	delta-like 1 homolog (Drosophila)
AF002718	IF1	ATPase inhibitor
AI839950	Fhl1	four and a half LIM domains 1
AB017697	TLP21	TATA box binding protein-like 1
AI849615	Gas5	growth arrest specific 5
AI853375	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2
AB021228	mt3-mmp	matrix metalloproteinase 16
D13695	ST2	interleukin 1 receptor-like 1
M28845	Krox-24	early growth response 1
X90875	FXR1	fragile X mental retardation gene 1, autosomal homolog
M89798	Wnt-5a	wingless-related MMTV integration site 5A
AF004666	NCX1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1
AF044336	Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
M12379	Thy-1.2 (CD90.2)	thymus cell antigen 1, theta
X60367	CRBP1	Retinol binding protein 1, cellular
AF022072	Grb10	Growth factor receptor bound protein 10

Table 1B. Genes specifically up-regulated in A54

Genbank ID	Common name	Description
U49513	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
X61800	c /ebp delta	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
J04596	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
X70058	CCL7;MCP-3	chemokine (C-C motif) ligand 7
M62362	mc/EBP	Mouse CAATT/enhancer binding protein gene
AF002719	SLPI	secretory leukocyte protease inhibitor
X79199	Tna	tetranectin (plasminogen binding protein)
AV139913	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
AF004874	Ltbp2	latent transforming growth factor beta binding protein 2
X56848	BMP-4	bone morphogenetic protein 4
AF054623	frizzled-1	frizzled homolog 1, (Drosophila)
X57413	TGF-beta2	transforming growth factor, beta 2
U27267	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
U88566	Sfrp1	secreted frizzled-related sequence protein 1
M62362	mc/EPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
X83202	11beta-HSD1A	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
AF011450	Col15a1	procollagen, type XV
M57647	SCF	kit ligand
U49915	adipoQ	adipocyte complement related protein
U10374	Pparg	Peroxisome proliferators-activated receptor gamma
X04480	Igf1	insulin-like growth factor 1
M64086	PAI-1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor
L19932	beta ig-h3	transforming growth factor, beta induced, 68 kDa
U60091	TAP2-cas	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)

Table 1C. Genes specifically up-regulated in M1601

Genbank ID	Common name	Description
U21301	Merk	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase
L48989	Tnnt3	troponin T3, skeletal, fast
U77943	Mylpf; Mlc2; MLC-2	myosin light chain
M25944	Car2; CAlI; Car-2;	carbonic anhydrase 2
M14537	Chrb1	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1
Z38015	DM-PK	dystrophia myotonica kinase, B15
AF000236	Cmkor1	chemokine orphan receptor 1
AV362816	Star	steroidogenic acute regulatory protein
AV324706	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1
AV248455	Chrng	cholinergic receptor, nicotinic, gamma polypeptide
M74753	Myh3	myosin, heavy polypeptide 3
M18879	MyoD	myogenic differentiation 1
AA726223	Adam19	actin, alpha, cardiac
D26532	Runx1	runt related transcription factor 1
X67140	Atp2a1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting,
U73620	Vegfc; VEGF-C	vascular endothelial growth factor C
D88689	Fit1	FMS-like tyrosine kinase 1
AF041847	Crap; Alrp; CARP	cardiac responsive adriamycin protein
AF042487	Kcnn4	potassium conductance calcium-activated channel
AF045801	Cktsf1b1	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1
M12347	alpha-actin	actin, alpha 1, skeletal muscle
Z80112	Icr-1	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
X13945	Cardiac troponin T	troponin T2, cardiac
AB017270	Troponin C	troponinC, cardiac/slow skeletal

Figure legends

Figure 1. Gene expression profiles of 10T1/2, A54, and M1601 cell lines.

Hierarchical clustering analysis of selected genes based on their expression pattern in 10T1/2 and 10T1/2 derived cell lines was performed and the results are shown as a dendrogram. The relative signal intensity was calculated and color-coded, as indicated on the right. Each row corresponds to a single gene.

Figure 2. Up-regulated genes in 10T1/2 cell line. Total RNA was extracted independent from the microarray experiments and cDNA was synthesized. The cDNA was subjected to real-time PCR with specific primers for p15 (A), Wnt-5a (B), Dlk (C), CrbpI (D), Fhl1 (E), ST2 (F), or b-actin. The mRNA level of these molecules was normalized on the basis of b-actin mRNA.

Figure 3. Enforced Dlk expression in A54 cells did not inhibit terminal differentiation into adipocyte. (A) GFP expression of A54 cells transfected with hDlk-IRES-GFP (B) FACS analysis for expression of hDlk in A54 cells transfected with hDlk-IRES-GFP. Adipocyte differentiation among parental A54 cells (C), A54 cells transfected with control IRES-GFP (D), and A54 cells transfected with hDlk-IRES-GFP (E).

Fig 4. Up-regulated genes in preadipocyte A54 cell line. Total RNA was isolated from A54 cells, and expression levels of SCF, SDF-1, Ang-1, chemokine (C-X-C motif) ligand-1 (CXCL-1), and adipogenic markers such as insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and CCAAT/enhancer binding protein-d (C/EBP-d) were evaluated using real-time PCR. The mRNA level of these molecules was normalized on the basis of b-actin mRNA.

Fig 5. Ang-1 expression in preadipocyte A54 cells

(A) The level of Ang-1 mRNA in A54 cells was similar to that in OP9 stromal cells, which is a well-characterized stromal cell line supporting survival of hematopoietic stem cell (26). (B) Western blot analysis of Ang-1 protein expression among 10T1/2, A54, M1601, and A54 cells differentiated into adipocytes.

Fig 6. Formation of hematopoietic cell colony on 10T1/2, A54, and M1601 cells. (A) Experimental procedure, (B-E) 10T1/2, A54, and M1601 were co-cultured with mouse hematopoietic stem cell fraction for 6 days. Formation of hematopoietic cell colony was evaluated by phase-contrast microscopic analysis.

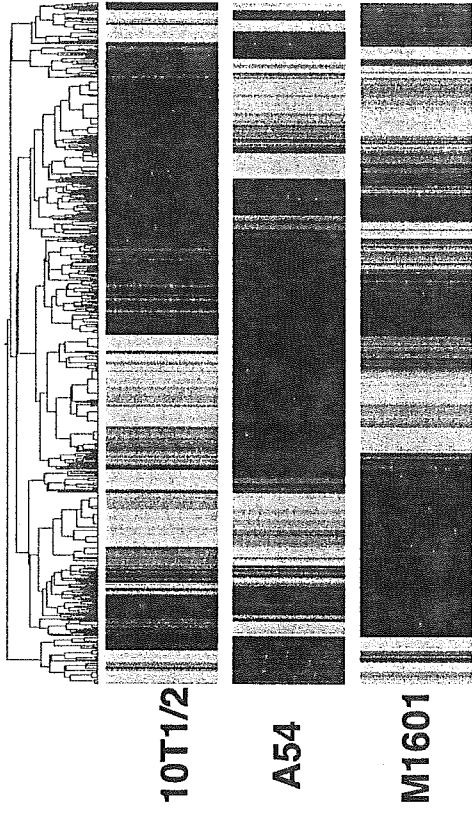
Fig 7. Expression levels of SCF, SDF-1, and Ang-1 in A54 cells during adipocyte differentiation. The changes in the levels of SCF, SDF-1, Ang-1, and CEBP-d mRNA in A54 cells during adipocyte differentiation were monitored by real-time PCR. The expression levels were normalized on the basis of those of b-actin.

Fig 8. Up-regulated genes in M1601

Expression levels of cardiac troponin C and cardiac troponin T2 were determined by RT real-time PCR.

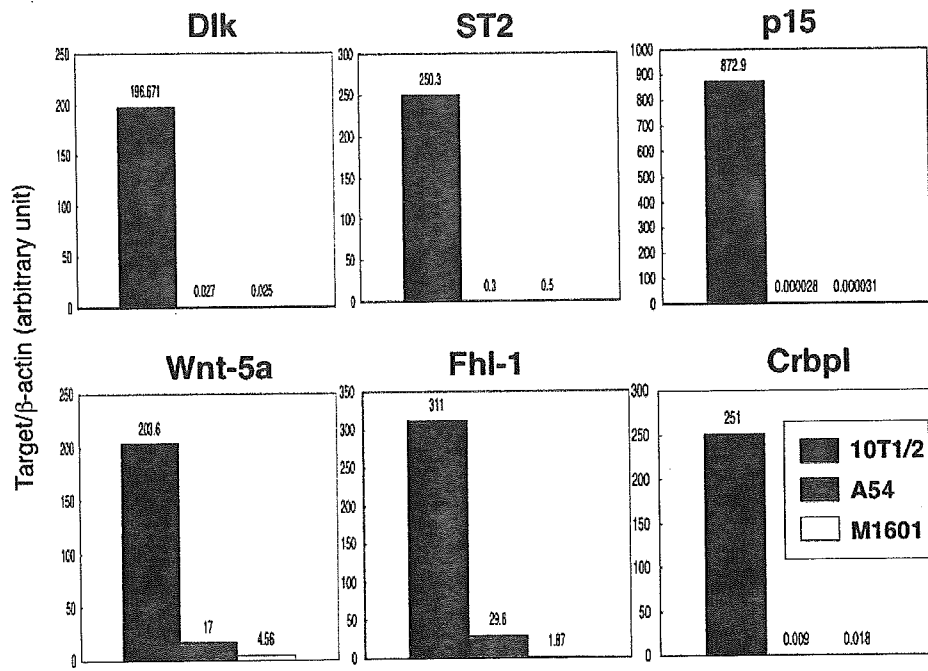
Fig 9. Proposed model for hierarchy of bone marrow stromal system

Schematic relationship among MSCs, preadipocytes, and myoblasts and the up-regulated genes in each cell. CD90, Dlk, Wnt-5a and ST2 were up-regulated in 10T1/2. The up-regulated genes in A54, SCF, SDF-1, and Ang-1 were suppressed after adipocyte differentiation. α -Actin, MyoD, Troponin C and Troponin T2 were up-regulated in M1601.

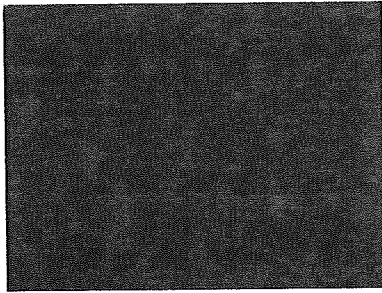


Relative expression level

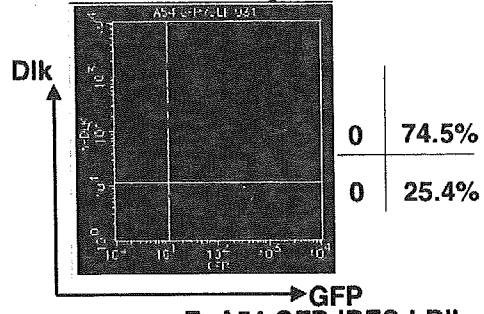
5.0
3.0
2.0
1.0
0.5
0.0



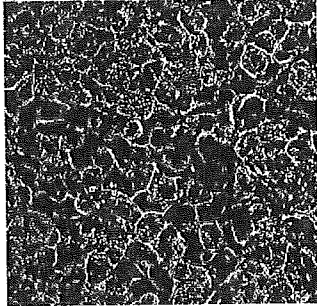
A. A54 GFP-IRES-hDlk



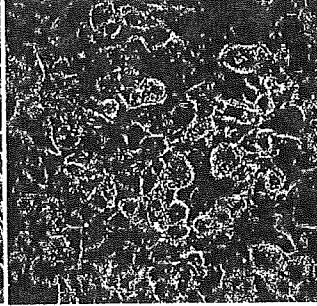
B. FACS analysis



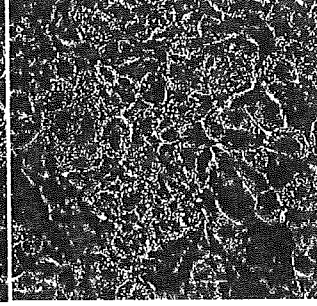
C. A54

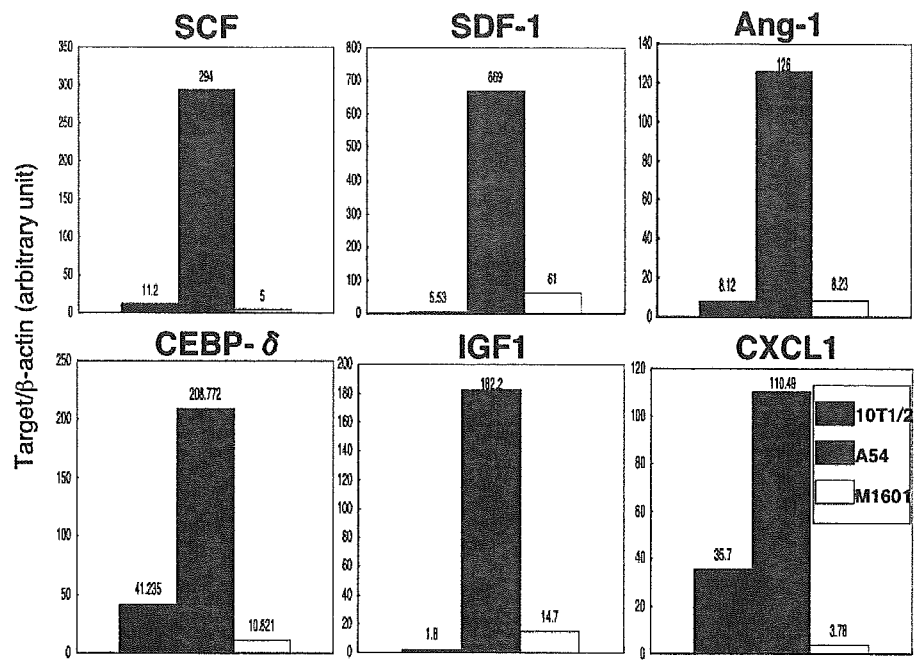


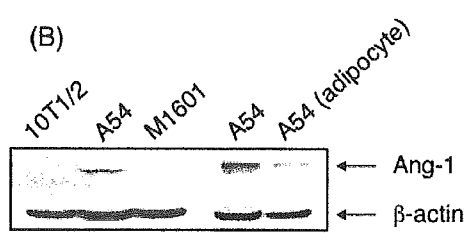
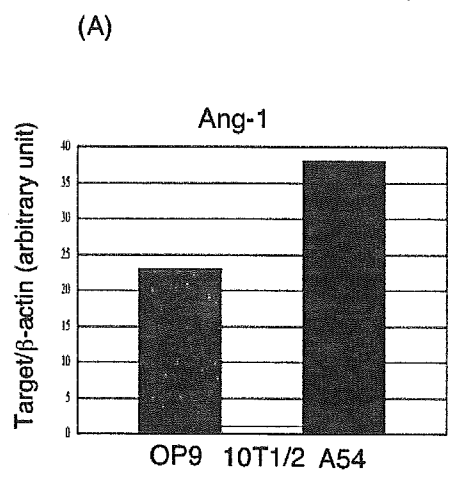
D. A54 GFP

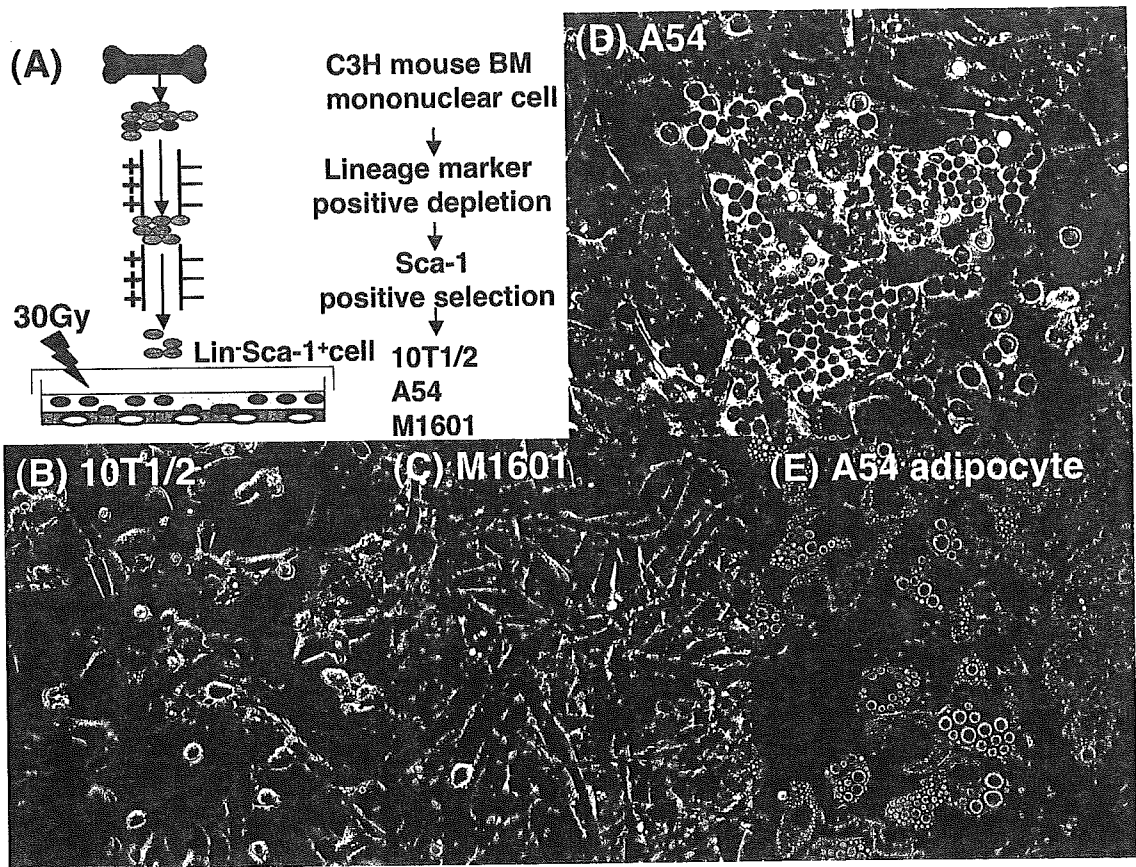


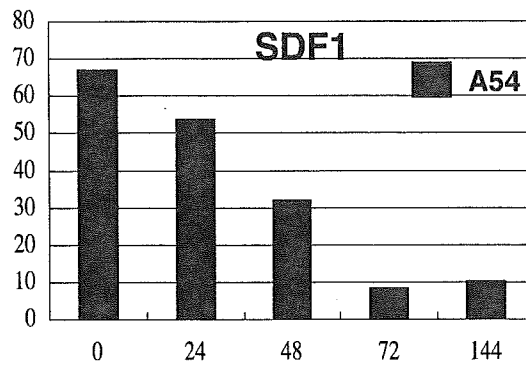
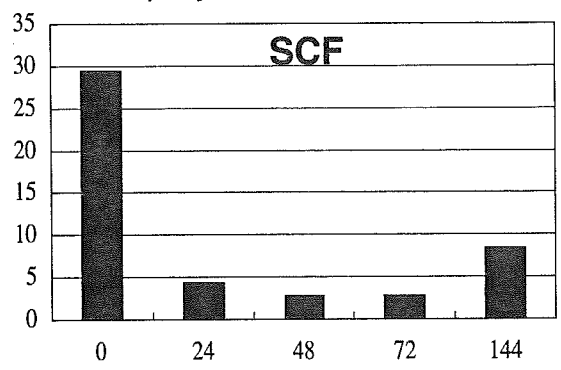
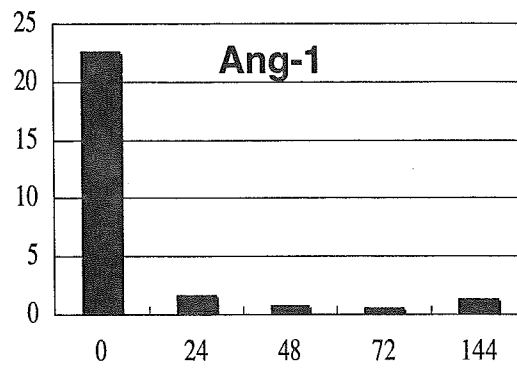
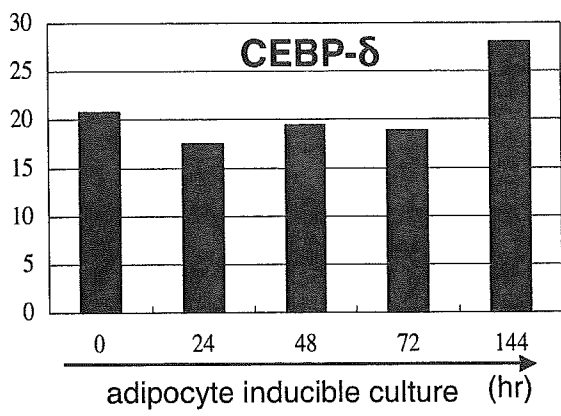
E. A54 GFP-IRES-hDlk

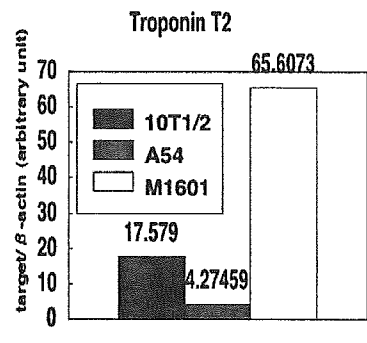
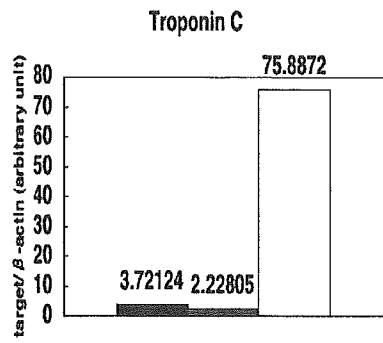


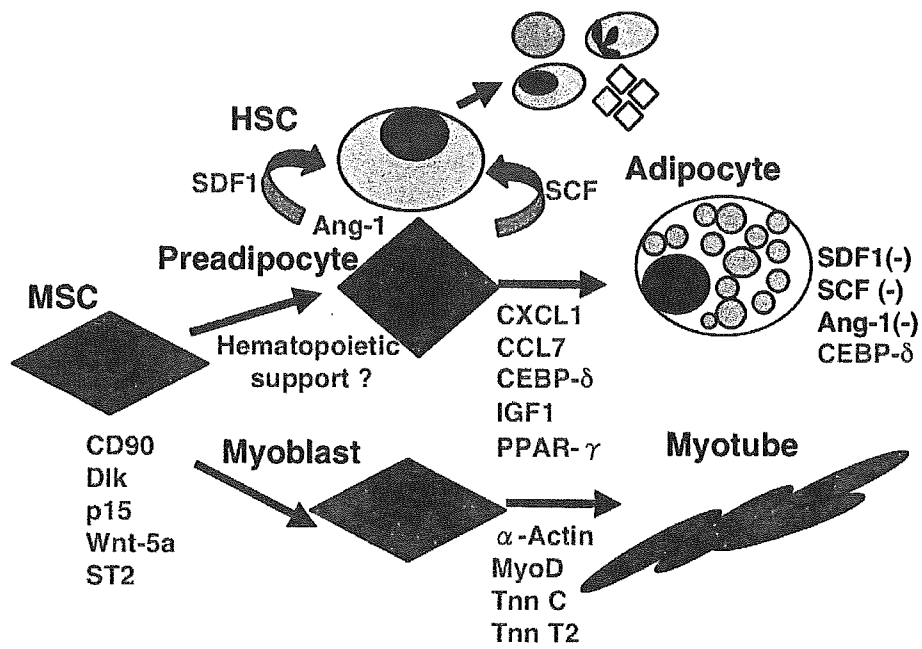












(資料 2)

班會議 議事録

ヒトゲノム再生医療等研究事業（再生分野）

平成 17 年度 班会議 議事録

日時 平成 18 年 3 月 3 日（金）

場所 自治医科大学研修センター第 2 / 3 研修室

研究課題名：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

開会の挨拶

小澤（主任研究者）より研究組織の構成、各研究者の研究について概略説明があった。

各研究者の成果発表

- 1) 小澤からマウス C3H10T1/2 分化誘導系（間葉系幹細胞のモデル）を用いた遺伝子の網羅的発現解析の結果が示された。10T1/2 には分化抑制因子である Dlk という蛋白質が、A54 では SCF, SDF-1 などの造血因子が、M1601 では筋肉関連遺伝子の発現が亢進していた。A54 では TGF- β_2 の発現が亢進しており、免疫抑制に関与している可能性が示唆された。また、マウスの GVHD モデルに細胞療法として、間葉系幹細胞、もしくはモデル細胞株を投与方法を試みたが、一定の効果は現時点では見られていないとの報告があった。
- 2) 花園、長谷川らからサルの骨髄移植の系で、間葉系幹細胞（骨髄からの付着細胞）を用いた場合と、用いなかった場合が示された。CD34 陽性細胞を遺伝子でマーキングし、骨髄内に直接移植する方法を用いた。移植後、骨髄細胞のコロニーの何割に、感染させたマーキング遺伝子があるかを比較すると、間葉系幹細胞の存在下で感染コロニーの数が増加していた。このことは間葉系幹細胞が存在すると、CD34 陽性細胞の生着が促進される可能性を示唆している。また、選択的増幅遺伝子を利用することで、サルの系でも移植細胞を体内で増幅することが可能であったことが示された。
- 3) 久米から慢性肉芽腫症の遺伝子治療に向けて、選択的増幅遺伝子を利

用した造血系細胞の体内増幅に関する報告があった。様々なキメラ遺伝子での増幅効果を比較し、最適なキメラを求めたが、各キメラ間での大きな違いは見られなかった。しかしその中でも Ver2 が高い増幅能を示したので、マウスの系でこのキメラ遺伝子を用いた実験の結果が示された。Epo を 2 回投与することにより、非投与群に比べて、より高い治療効果を得たとの結果であった。

総合討論

小澤より、なぜマウスの系では間葉系幹細胞を用いた治療がうまくいかないのかとの問題定義があり、投与方法など改良の余地があるのではないかということが議論された。

小澤より、間葉系幹細胞の臨床応用に向けて、自治医科大学倫理委員会に臨床研究計画書が提出されることに関して報告があった。難治性 GVHD の治療として、間葉系幹細胞を投与する方向で検討しているとのことであった。

小澤より、来年度は免疫抑制の機序を解明していきたいとの計画が語られた。

花園、長谷川らより、平成 17 年度は 1 頭の結果であり、平成 18 年度は頭数を増やし、今回の実験結果を確かめていきたいとの計画が語られた。また、選択的増幅遺伝子も同時に利用することで、さらに導入した遺伝子の効果を上げていくとの計画が語られた。

久米より、今後、遺伝子導入効率をより高め、持続型（ペグエリスロポイエチン）の Epo を使うなどの工夫が必要とのコメントがあった。また、臨床ではドイツのグループが慢性肉芽腫症の人の治療に成功しており、日本でも準備を進めているとの報告があった。

造血幹細胞を利用した慢性肉芽腫症の治療法開発

分担研究者 久米 晃啓（自治医科大学医学部助教授）

研究要旨

造血幹細胞遺伝子治療の効果を改善することを目的として、遺伝子導入細胞増幅システム（「選択的増幅遺伝子」）の改良と評価を行った。システムの中核をなす、細胞増殖用キメラ分子の構成成分をすべてヒト化し、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。

A. 研究目的

造血幹細胞移植は体性幹細胞を用いる再生医療の代表であり、これをベースとして造血幹細胞遺伝子治療の技術開発に取り組んでいる。幹細胞遺伝子治療の成否は、患者の体内で遺伝子導入細胞をある程度以上に増やせるかにかかっている。その典型として、X連鎖重症複合免疫不全症では、治療用遺伝子自体の強力な細胞増殖促進作用により治療に成功した。一方では、そのことがベクター挿入変異を契機とした発がんを助長した可能性がある。そこで我々は造血幹細胞移植の安全性と治療効果向上のため、対象疾患に応じて必要な細胞集団を随意制御する技術を開発している。その中核となるのが、薬剤反応性分子スイッチと細胞増殖因子受容体とのキメラ分子であり、これをコードする人工遺伝子を（選択的増幅遺伝子；SAG）と名付けて、改良を重ねている。

本課題で扱う慢性肉芽腫症（CGD）において

は、同種造血幹細胞移植に伴うリスクが大きく、患者本人の造血幹細胞を用いる遺伝子治療法の確立が切望されている。CGDの治療用遺伝子には細胞増殖促進作用が無く、SAGの併用により治療効果の改善が期待される。

B. 研究方法

今回検討したSAGはエリスロポエチン（Epo）に反応する第二世代で、これをCGD治療の標的となる骨髓球系細胞に合わせて改変した。Epo受容体（EpoR）細胞外部分と顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体（GcR）細胞内部分からなるキメラ受容体（EpoR-GcR）を構築するにあたり、両者の接合部を少しずつずらしたものを多数作製した。これらSAGとX連鎖性CGD（X-CGD）の治療用遺伝子であるgp91遺伝子を搭載するレトロウイルスベクターを作製した。臨床応用を想定して搭載遺伝子の全コンポーネントはヒト由来とし、ベクター骨格は韓国で臨床試験に使用さ