

厚生労働科学研究費補助金

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 20 (2008) 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	

II. 分担研究報告

1. 間葉系幹細胞による移植造血幹細胞生着促進機構の解析 -----	11
久米 晃啓	
2. 大型動物を用いた前臨床研究 -----	15
花園 豊	
3. 選択的増幅遺伝子の造血幹細胞治療への応用研究 -----	20
長谷川 護	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

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

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に応用することにより、移植片対宿主病 (GVHD) の予防・治療、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る。本研究は MSC に関する基盤研究を実施し、造血幹細胞移植療法への MSC の臨床応用を推進するのが狙いである。MSC の有用性 (GVHD 抑制と生着促進) が確認されれば、長期的には、i) ドナーとレシピエントの HLA を完全に一致させなくても移植が可能になるため、骨髄バンクのドナープール拡大が不要になる、ii) 成人への臍帯血移植を安心して行えるようになる、と考えられる。平成 19 年度は、前年度われわれが明らかにした新しい免疫抑制物質 NO (Nitric Oxide) がどういう刺激で MSC から産生されるのかを中心に調べた。Th1/Th2 分化との関係を調べていくうち、インターフェロン- γ が重要であることが明らかとなった。しかし、インターフェロン- γ 単独では産生されず、インターフェロン- γ と frageline, TNF- α , もしくは IL-1 β の存在下で NO が産生されることが判明した。阻害実験から NF- κ B の関与が強く示唆された。施設内生命倫理委員会の承認を得た臨床研究（課題名「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性 GVHD に対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」）については、6 名の重症 GVHD 患者で MSC の培養を行い、その中の一例において MSC を実際に投与した。MSC 投与に伴う副作用は認められなかった。MSC 治療後に、GVHD 症状の軽快傾向と大腸内視鏡所見の改善が認められた。しかし、2 回の MSC 治療によっても GVHD は完全には軽快しなかった。MSC 投与法の工夫が必要と考えられた。次に、MSC による生着促進に関しては、平成 19 年度は造血支持能をもつ MSC 由来脂肪前駆細胞株と造血幹細胞との相互作用がもたらす遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。造血幹細胞との共培養によって脂肪前駆細胞では Notch リガンド (Jagged 1・D113) をはじめとする多くの遺伝子の発現が上昇していた。これに対応して造血幹細胞側では Notch やその下流遺伝子の発現が上昇しており、両者の相互作用によって、造血に必須な Notch シグナル系が活性化されていることが示唆された。また、これまで造血細胞を MSC と共移植する実験をサルおよびヒツジの系で行い、造血細胞の生着が促進されることを示すデータを得た。平成 19 年度は引き続き、別のサルを使って MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果が再現された。

もう一つのプロジェクトは、造血幹細胞移植技術をさらに高度化する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。平成 19 年度は、SAG をレンチウイルスベクターであるサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターに搭載した。また、レトロウイルスベクターの問題点であるホストゲノムの傷害性の可能性について検討するため、プロウイルスの挿入位置の同定法を確立した。

分担研究者

久米 晃啓

自治医科大学医学部

准教授

花園 豊

自治医科大学医学部

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肝細胞 (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 を造血幹細胞移植に応用することにより、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と共に、我が国における MSC の造血幹細胞移植へ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。これまでにも MSC の造血支持能力と免疫抑制能力が示唆されているが、その分子機構はほとんど解明されていない。尚、前者については、平成

19 年度の新規研究として、造血幹細胞と MSC または MSC 由来細胞との相互作用が造血作用に及ぼす影響について、遺伝子発現レベルで解析した。さらに、前臨床研究としては、平成 19 年度は骨髄内移植、MSC 共移植の二者併用実験を再度実施し、遺伝子導入移植細胞の生着促進効果を確認した。

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した。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 19 年度は、造血幹細胞に感染効率の高いとされるレンチウイルスベクターである SIV ベクターに SAG を搭載した。さらにそのプロウイルスの挿入サイトを同定する方法を確立し、実際に挿入サイトの解析を行った。

B. 研究方法

1) MSC から産生される免疫抑制物質 NO (Nitric Oxide) の産生メカニズムの解明 (小澤): マウス骨髄由来の付着細胞を継代していくことにより MSC を得た。T 細胞は主にマウスの脾臓細胞を用いた。T 細胞増殖因子として抗 CD3/CD28 ビーズを用いた。T 細胞の増殖はトリチウム-サイミジンの取込みで測定した。NO 合成酵素阻害薬として、NMMA を使用した。NF- κ b の阻害薬として Bay-11 を使用した。インターフェロン- γ の阻害には中和抗体を使用した。

2) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究 (小澤): ステロイド抵抗性の難治性急性 GVHD 患者が現れた場合、患者のインフォームドコンセントを得た上で臨床研究を実施することとした。臨床用 MSC については、必要性が予測

された段階で、インフォームドコンセントを得た血縁者から骨髄の提供を受け、自治医科大学の臨床用細胞プロセッシング室において作成した。MSCの一回の投与量は、 1×10^6 cells/kgとした。

3) MSCの造血支持作用の分子メカニズムの解明(久米)：平成17年度の検討では、MSC細胞株C3H10T1/2およびこれに由来する細胞株の発現プロファイリングにより、造血支持能に関わる候補遺伝子を同定した。平成19年度は、造血細胞と支持細胞が直接接触を通して互いに及ぼす影響について検討した。発現プロファイリングで造血に関わる候補遺伝子をリストアップし、定量的PCR(Q-PCR)で確認した。

4) MSCによる移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討(花園、長谷川)：平成19年度は、主にサルの系で検討を行った。移植する造血幹細胞としてサルCD34⁺細胞を用いた。共移植する骨髄間質細胞は、サル骨髄血中の付着性単核球を用いた。CD34⁺細胞は、後の移植実験のために二等分した。二等分した造血幹細胞(CD34⁺細胞)をそれぞれ異なるレトロウイルスベクター(G1NaとLNL6)を用いて遺伝子標識した。レシピエントのサルには、ブスルファン(8 mg/kg)を1回静注する移植前処置を施行した。サル自家移植の系で、同一個体の左右別々にヘミ移植を行った(個体差の影響を排除するため)。すなわち、右側には造血幹細胞(LNL6で標識)と骨髄間質細胞を骨髄内に直接共移植した。左側にはコントロールとして造血幹細胞(G1Naで標識)のみを骨髄内に移植した(研究協力者：医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 揚山直英・柴田宏昭両氏)。移植後の造血について、共移植群(LNL6標識)と単独移植群(G1Na標識)のどちらに由来するか判定した。具体的には、末梢血単核球からDNAを抽出し、G1NaとLNL6を判別するPCRを行った。

5) 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(花園、長谷

川)：

i) SAG(EPOR-Mp1)のSIVベクターへの搭載については、EPOR-Mp1遺伝子を組み込んだプラスミドとヘルパープラスミドとの共導入によってSIVベクターを生産した。またこれをBaF3細胞に感染させ機能確認をした。

ii) SIV-EGFPをヒト細胞株ARPE-19に感染させ、改良したLAMPCRを行った。即ち、SIVベクター用に設計したアニーリングプライマーを用い挿入サイトの塩基配列を同定した。

(倫理面への配慮)

マウスおよびヒツジを用いた実験(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程に従って行った。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。

B. 研究結果

1) MSCによる免疫抑制物質NOの産生メカニズムの解明：平成18年度の研究でMSC自身がNOを産生すること、産生にはT細胞の活性化が不可欠であること、NOによってMSCによるT細胞増殖抑制効果のかなりの部分を説明できることを明らかにした。平成19年度はこのNO産生のメカニズムを探った。

Th1/Th2に及ぼすMSCの影響を調べていくと、MSCはTh1分化条件ではT細胞の増殖を良く抑制するが、Th2分化条件ではT細胞の増殖抑制が弱いことがわかった。NOの産生を比べてみると、Th1でより大量のNOが産生されていた。つまり、このことはTh1への分化条件(IL-12, 抗IL-4抗体)はNO産生に都合が良く、Th2分化条件(抗インターフェロン- γ 抗体, IL-4)はNO産生に都合が良くないことを示している。われわれはTh2分化条件がNOの産生を阻害しているとの仮説を

立て、検証した。その結果、インターフェロン γ の中和抗体がNO産生を強く抑制することがわかり、その重要性が明らかとなった。

しかし、インターフェロン γ 単独刺激ではMSCからNOは産生されなかった。何らかの他因子が必要であることは明らかであった。調べていくと、frageline, TNF- α , もしくはIL-1 β との併用である場合に限りNOの産生が確認された。

この3つはすべてNF- κ Bを活性化するリガンドである。NF- κ Bが重要であるという仮説のもとに特異的阻害薬Bay-11を使用したところ、mRNAでも蛋白レベルでも阻害約の存在下でiNOS (NO合成酵素)の誘導低下が確認された。

2) 難治性急性GVHDに対するMSCによる治療の臨床研究：ステロイド抵抗性の難治性急性GVHD患者6例において、血縁者から骨髓の提供を受け、自治医科大学の臨床用細胞プロセッシング室においてMSCを培養した。その中の一例においてMSCを実際にGVHD治療目的に投与した。MSC投与に伴う副作用は認められなかった。MSC治療後に、GVHD症状の軽快傾向と大腸内視鏡所見の改善が認められた。しかし、2回のMSC治療によってもGVHDは完全には軽快しなかった。

3) MSCの造血支持作用の分子メカニズムの解明：MSCモデル細胞株としてC3Hマウス(H-2k)由来10T1/2細胞、および10T1/2由来の脂肪前駆細胞株A54細胞および筋芽細胞株M1601細胞を用いた。造血幹細胞(HSC)としては、C54BL/6マウス(H-2b)骨髓細胞から抗体ビーズで分取したLin陰性Sca-1陽性細胞を用いた。共培養によりHSCのcobblestone形成能や造血コロニー形成能が増大したのはA54のみであり、10T1/2親株とM1601は造血支持能をもたなかった。A54をさらに脂肪細胞まで分化させると造血支持能は失われ、分化段階に依存すると考えられた。トランスウェルで隔てて培養した場合は、A54細胞に造血支持能はなく、細胞間の直接接触が必要と考えられた。

同様の共培養の後、H-2k細胞とH-2b細胞を抗体ビーズで分取し、全RNAを抽出して遺伝子発現プロファイルを共培養前と比較した(Filgen)。A54において、共培養の前後でハウスキーピング遺伝子の発現が変化していなかったのに対し、約350の遺伝子が2倍以上の増減を示した。発現量が増加した遺伝子のうち、造血への関与が示唆されるものについてQ-PCRを行い、BMP-6とNotchリガンドであるJagged 1・D113の発現が共培養後に上昇していることを確認した。A54をリンパ球や分化したLin陽性細胞と共培養してもこれら遺伝子の発現増強はみられず、未分化なHSCとの相互作用による特異的変化と考えられる。

一方、HSC側においては、Notch遺伝子とその下流に位置するHes-1遺伝子の発現が共培養後に上昇していた。

4) MSCによる移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討：初年度(平成17年度)、造血幹細胞をMSCと共に直接骨髓内へ移植する実験をサルの系で行い、造血幹細胞の生着が促進されること(約5倍)を示す1頭目のデータを得た。しかし、サル実験は多くの費用と人手がかかり、結論を引き出すのに必要な数の実験を行うのは容易でない。そこで平成18年度は、別の大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて、MSC共移植による造血細胞の生着促進効果を検討した。MSCを共移植した1頭のヒツジのみでサル造血細胞の生着が認められ、ヒツジの系でも共移植の効果が示唆された。

本年度(平成19年度)は、2頭目のサル移植実験を実施した。前年実施した1頭目では、共移植群のCD34⁺細胞をG1Naベクターで標識し、単独移植群のCD34⁺細胞をLNL6ベクターで標識した。今回の2頭目は、ベクターによるバイアスを除外するために、使用ベクターをスイッチした。すなわち、共移植群のCD34⁺細胞をLNL6ベクターで標識し、単独移植群のCD34⁺細胞をG1Naベクターで

標識した。また、今回の実験では、レシピエントのサルに対する移植前処置法を、全身放射線照射からブスルファン投与に変更した。全身放射線照射は、腸炎を引き起こし、長期間の下痢に悩まされ、1頭目のサルはそれが原因で死亡している。その点を踏まえて、今回は前処置をブスルファン投与に切り替えたが、放射線照射の場合と同等の骨髄抑制をもたらしながら、下痢などなく、全身状態は放射線照射後に比べてはるかに良好だった。移植後の末梢血単核球を調べたところ、約2%が遺伝子標識された移植細胞由来であった。そのうち、単独移植群由来の細胞はほとんど検出されず、共移植すると生着がよいことが再現された。

5) 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: SAG を SIV ベクターに搭載し、BaF3 に感染させ EPO 依存的増殖能を付与できることを確認した。さらに SIV のプロウイルス挿入サイトを同定し、同定した 50 クローンのうち 44% がイントロン内、56% が遺伝子外領域に組み込まれていた。

D. 考察

- 1) MSC による免疫抑制物質 NO の産生メカニズムの解明: MSC がどういった刺激を受けて NO を産生するのか全く報告がない。われわれはインターフェロンが重要であることを見つけたが、これは活性化 T 細胞の存在が不可欠であった、前年度の結果と良く合致する。もう一つ必要なリガンドは同定できなかったが、その下流に NF- κ B があることが強く推察された。Th1/Th2 で NO の産生量が違うのは興味深い知見であると考えられた。
- 2) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究: ステロイド抵抗性の難治性急性 GVHD 患者一例において、血縁者由来 MSC による GVHD 治療がある程度奏効した。但し、有効性を高めるには、MSC 投与方法のさらなる工夫が今後は必要と考えられた。
- 3) MSC の造血支持作用の分子メカニズムの解

明: 造血支持能を獲得した MSC 由来間質細胞と未分化な造血細胞との直接接触により、相互に Notch シグナル系のリガンドと受容体の発現が促進される、正のフィードバックループの存在が示唆される。今後さらに他のシグナル系を明らかにするなど、造血細胞と支持細胞相互作用の全体像を明らかにすべく、解析を進める必要がある。

4) MSC による移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討: 造血幹細胞移植治療において、前処置後、MSC を共移植することにより、骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着を促進できる可能性をサルとヒツジの系で示した。MSC の共移植による造血細胞の生着促進効果を大型動物で検証した例はあまりなく、貴重な成果が得られたと言える。

MSC の共移植によって造血細胞の生着が促進される理由としては、MSC 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) が創出されたことが考えられる。

造血幹細胞移植を受ける患者では、化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が望まれている。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれている。これらは、MSC を造血細胞と共に移植することによって実現できるかもしれない。

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、レシピエントの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、今後もいっそうの進展を図りたい。

- 5) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血幹

細胞の体内増幅法に関する開発研究：SIV ベクターへの搭載は、CD34 陽性細胞への遺伝子導入の高さを期待したものの、SIV のプロウイルス挿入サイト同定方法を確立したことにより、遺伝毒性の軽減の検討に役立つ。

E. 結論

・ MSC の免疫抑制機序の一つとして、NO が関与しているが、本年度はその産生のメカニズムを調べ、インターフェロン γ と NF- κ B が重要であることを証明した。

・ 難治性急性 GVHD の一例に対して血縁者由来の MSC による治療を行い、その安全性と有効性が示唆された。

・ これまで造血に必須と言われてきた Notch シグナル系が、造血細胞と支持細胞との直接接触により活性化されていることを明らかにした。

・ サルやヒツジを用いた実験から、MSC を造血細胞とともに骨髄内へ直接移植すると、造血細胞の生着を高められることが示された。

・ 遺伝傷害性のない RNA ベクターである SeV に SAG (EpoRMp1) を搭載し、造血幹細胞遺伝子治療への利用の可能性について調べた。

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) Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Furuyama, K., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J. Cell. Biochem.* (in press)
- 2) Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., and Kume, A.: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* 30(3): 121-127, 2008.

- 3) Okada, T. and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 13: 1887-1891, 2008.
- 4) Urabe, M., Obara, Y., Ito, T., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Targeted insertion of transgene into a specific site on chromosome 19 by using adeno-associated virus integration machinery. In, *Progress in Gene Therapy, Vol. 3, Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy.* (ed. by, Bertolotti, R. and Ozawa, K.), World Scientific Publishing Co., pp.19-46, 2008.
- 5) Uchida, M., Kirito, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Activation of FKHRL1 plays an important role in protecting erythroid cells from erythropoietin deprivation-induced apoptosis in a human erythropoietin-dependent leukemia cell line, UT-7/EPO. *Int. J. Hematol.* 86(4): 315-324, 2007.
- 6) Kikuchi, S., Nagai, T., Kunitama, M., Kirito, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci.* 98: 1949-1958, 2007.
- 7) Tarumoto, T., Imagawa, S., Kobayashi, M., Hirayama, A., Ozawa, K., Nagasawa, T.: L-arginine administration reverses anemia associated with renal disease. *Int. J. Hematol.* 86: 126-129, 2007.
- 8) Miyoshi, T., Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Nakamura, M., Hanafusa, T., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR,

- resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib. *Exp. Hematol.* 35: 1358-1365, 2007.
- 9) Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: E2F-6 suppresses growth-associated apoptosis of human hematopoietic progenitor cells by counteracting proapoptotic activity of E2F-1. *Stem Cells* 25: 2439-2447, 2007.
 - 10) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G protein coupled, revealed by retroviral expression screening. *Leuk. Lymphoma.* 48: 978-986, 2007.
 - 11) Fujiwara, S., Muroi, K., Kikuchi, S., Kawano-Yamamoto, C., Matsuyama, T., Mori, M., Nagai, T., Akutsu, M., and Ozawa, K.: Development of streptococcus meningitis and Epstein-Barr virus reactivation after non-T-cell-depleted human leukocyte antigen-haploidentical peripheral blood stem cell transplantation based on fetomaternal microchimerism. *Leuk. Lymphoma* 48: 640-642, 2007.
 - 12) Oh, I., Ozaki, K., Miyazato, A., Sato, K., Meguro, A., Muroi, K., Nagai, T., Mano, H., and Ozawa, K.: Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA microarray analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytotherapy* 9: 80-90, 2007.
 - 13) Oh, I., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tatara, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K.: Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 956-962, 2007.
 - 14) Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228-234, 2007.
 - 15) Ozaki, K., Sato, K., Oh, I., Meguro, A., Tatara, R., Muroi, K., and Ozawa, K.: Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int. J. Hematol.* 86: 5-7, 2007.
 - 16) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* 16:474-480, 2008.
 - 17) Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int. J. Mol. Med.* 19: 75-9, 2007.
 - 18) Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K., Xiao, S.: Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp. Mol. Med.* 39: 170-175, 2007.
 - 19) Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., Tominaga, S.: Soluble ST2 blocks IL-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* 282: 26369-26380, 2007.
 - 20) Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50:531-536, 2007.

- 21) Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101:734-741, 2007.
- 22) Tanaka, Y., Nakamura, S., Shibata, H., Kishi, Y., Ikeda, T., Masuda, S., Sasaki, K., Abe, T., Hayashi, S., Kitano, Y., Nagao, Y., Hanazono, Y.: Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. *Stem Cells Dev.* in press.
- 23) Yoshida K, Yonemitsu Y, Tanaka S, Yoshida S, Shibata S, Kondo H, Okano S, Ishikawa F, Akashi K, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K. In vivo repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by temperature-sensitive mutant of recombinant Sendai viral vector. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 361: 811-6.
- 24) Nagase T, Matsumoto D, Nagase M, Yoshimura K, Shigeura T, Inoue M, Hasegawa M, Yamagishi M, Machida M. Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis: a preliminary report. *J. Craniofac. Surg.* 2007 18:49-53.
- 2) Urabe, M., Mizukami, H., Bakker, A., Kume, A., Hermens, W., Ozawa, K.: Generation of more infectious type 1 AAV vectors in insect cells. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.5.31, Seattle, WA, USA. (*Mol. Ther.* 15 Suppl. 1: S34-35, 2007)
- 3) Kume, A., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Okada, T., Ozawa, K.: Long-term efficacy of a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007. 5. 31, Seattle, WA, USA. (*Mol. Ther.* 15 Suppl. 1:S43, 2007)
- 4) Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., Ozawa, K.: AAV vector-mediated sustained expression of prostacyclin synthase ameliorates obesity in Zucker fatty rats. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.1, Seattle, WA, USA. (*Mol. Ther.* 15 Suppl. 1:S136-137, 2007)
- 5) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for tumor-tracking and therapeutic gene amplification as systemic suicide cancer gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (*Mol. Ther.* 15 Suppl. 1: S292-293, 2007)
- 6) Mizukami, H., Ishiwata, A., Ono, F., Takano, J., Fujimoto, K., Mimuro, J., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K.: Seropositivity against AAV serotype 1, 8 and 9 in cynomolgus monkey colonies. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (*Mol. Ther.* 15 Suppl. 1:S320, 2007)

2. 学会発表

- 1) 久米晃啓、松下卓、小倉剛、小澤敬也：自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療。第110回日本小児科学会小児科学会学術集会、2007.4.20、京都。(日児誌 111 : 220, 2007)

- 7) Kume, A., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Okada, T., Ozawa, K.: Efficient and stable liver transduction by a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #004)
- 8) Urabe, M., Mizukami, H., Bakker, A., Kume, A., Hermens, W., Ozawa, K.: Production of more potent type 1 adeno-associated virus vectors in insect cells. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #010)
- 9) Horiuchi, Y., Otsu, M., Kiyokawa, N., Migita, O., Li, X.-K., Onodera, M., Kume, A., Okuyama, T., Fujimoto, J., Nakauchi, H., Kuratsuji, T.: Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #20)
- 10) Mizukami, H., Ishiwata, A., Ono, F., Takano, J., Fujimoto, K., Mimuro, J., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K.: Prevalence of neutralizing antibody against AAV serotypes 1, 8 and 9 in Cynomolgus monkey colonies. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #27)
- 11) Mizukami, H., Muramatsu, S., Ono, F., Mimuro, J., Sakata, Y., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Noakano, I., Ozawa, K.: Safety of intracranial AAV vector injection in Cynomolgus monkeys. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #30)
- 12) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Tumor tracking and therapeutic gene amplification by using retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer therapy. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋。(Abstract #91)
- 13) Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., Ozawa, K.: Sustained expression of prostacyclin synthase by an intramuscular injection of an AAV vector attenuates obesity in Zucker fatty rats. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋。(Abstract #92)
- 14) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of systemic suicide cancer gene therapy. 第66回日本癌学会学術総会、200.10.3、横浜。(P-444, Program p106)
- 15) Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: A gene therapy approach against lymph node metastasis using sVEFR3 in uterine body cancer. 第66回日本癌学会学術総会、2007.10.4、横浜。(P-949, Program p170)
- 16) Shibata, H. and Hanazono, Y.: A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation, Beijing, China, September 21-24, 2007. (abstracts p. 358)
- 17) Kishi, Y., Inoue, M., Shibata, H., Tanaka, Y., Sasaki, K., Ikeda, T., Hasegawa, M., and Hanazono, Y.: Pharmacological control of Sendai viral transgene expression in cynomolgus embryonic stem cells. The Japan Society of Gene Therapy the 13th Annual Meeting, Nagoya, June 28-30, 2007. (abstracts p. 90)
- 18) Tanaka, Y., Nakamura, S., Shibata, H., Kishi, Y., Ikeda, T., Sasaki, K., Abe, T., Hayashi, S., Nagao, Y., Kitano, Y., and Hanazono, Y.:

Long-term macroscopic engraftment of cynomolgus tissues in sheep after in utero transplantation of cynomolgus ES cells. International Society for Stem Cell Research 5th Annual Meeting, Cairns, Australia, June 17-20, 2007. (abstracts p. 311)

Lentivirus Vector (SIVagm) in the Target Cells. The 14th Annual Congress of the ESGCT Athens, Greece, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特になし。

- 19) 田中裕次郎, 岸友紀子, 池田たま子, 阿部朋之, 長尾慶和, 林聡, 北野良博, 花園豊: サルの奇形腫をもつヒツジの作製: 動物工場の実現に向けて. 第10回日本異種移植研究会, 東京, 2007年3月10日. (抄録集 p. 23)
- 20) 田中裕次郎, 中村紳一朗, 岸友紀子, 池田たま子, 柴田宏昭, 佐々木京子, 阿部朋行, 林聡, 北野良博, 長尾慶和, 花園豊: 異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着. 第5回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 2007年5月17-19日. (抄録集 p. 16)
- 21) 阿部朋行, 田中裕次郎, 林聡, 北野良博, 花園豊, 長尾慶和: ヒツジにおける骨髄抑制を誘導するための busulfan 至適投与量の検討. 第144回日本獣医学会, 酪農学園大学, 北海道大麻, 2007年9月2-4日. (抄録集 p. 143)
- 22) 花園豊, 田中裕次郎, 中村紳一朗, 岸友紀子, 池田たま子, 柴田宏昭, 佐々木京子, 阿部朋行, 林聡, 北野良博, 長尾慶和: サル ES 細胞由来の肉眼的組織をもつヒツジの作製. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 2007年10月11-13日. (抄録集 p. 210)
- 23) 阿部朋行, 田中裕次郎, 林聡, 北野良博, 花園豊, 長尾慶和: サル ES 細胞の生着および分化誘導に及ぼすヒツジ胎子日齢の影響. 第100回日本繁殖生物学会, 東京, 2007年10月20-22日. (抄録集 j120)
- 24) Tabata T, Mitomo K, Hasegawa M, et al. Retinitis Pigmentosa Gene Therapy: Characterization of the Integration Sites of Simian

II. 分担研究報告

分担研究報告書

間葉系幹細胞による移植造血幹細胞生着促進機構の解析

分担研究者 久米 晃啓（自治医科大学医学部准教授）

研究要旨

造血幹細胞（HSC）の同種移植において、間葉系幹細胞（MSC）の同時移植が生着改善をもたらすとして注目されている。そこで、その分子機構解明の一端として、造血支持能をもつ MSC 由来脂肪前駆細胞株（A54）と、HSC との相互作用がもたらす遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。HSC との共培養によって A54 では Notch リガンド（Jagged 1・D113）をはじめとする多くの遺伝子の発現が上昇していた。これに対応して HSC では Notch やその下流遺伝子の発現が上昇しており、両者の相互作用によって、造血に必須な Notch シグナル系が活性化されていることが示唆された。

A. 研究目的

難治性白血病や原発性免疫不全症に対して行われる造血幹細胞（HSC:hematopoietic stem cell）移植は、体性幹細胞を用いる再生医療として最もよく確立された治療法である。しかしながら現時点でも、完全一致ドナー確保の困難さ、グラフトの生着不全や遅延、移植片対宿主病など解決すべき問題は多い。間葉系幹細胞（MSC:mesenchymal stem cell）を同種造血幹細胞移植に応用することにより、造血幹細胞の生着促進効果と移植片対宿主病の抑制効果が期待できるが、本研究では前者について解析を行った。その分子機構を明らかにすることにより、造血幹細胞自身の生着力を直接高めるだけでなく、移植の前処置などによりダメージを受ける造血微小環境を再建して、間接的にも生着促進を図ることが可能になる。

B. 研究方法

MSC モデル細胞株として C3H マウス（H-2k）由来 10T1/2 細胞、および 10T1/2 由来の脂肪

前駆細胞株 A54 細胞および筋芽細胞株 M1601 細胞を用いた。HSC としては、C54BL/6 マウス（H-2b）骨髄細胞から抗体ビーズで分取した Lin 陰性 Sca-1 陽性細胞を用いた。

HSC と放射線照射（30Gy）した MSC を 5 日間共培養し、cobblestone area を数えたのち造血コロニーアッセイを行った。同様の共培養の後、H-2k 細胞と H-2b 細胞を抗体ビーズで分取し、全 RNA を抽出して遺伝子発現プロファイルを共培養前と比較した（Filgen）。共培養の前後で 2 倍以上の増減を示したもののうち、造血に関与していると考えられる遺伝子については定量的 PCR（Q-PCR）で発現量の変化を確認した（ABI PRISM7900HT）。MSC と HSC が直接接触しない共培養系として、トランスウェルにて両者を隔てて培養後、上記と同様の解析をした。

（倫理面への配慮）

動物実験は、自治医科大学倫理委員会において当該研究の承認を受けた上で、動物愛護に関する学内ガイドラインに沿って遂行した。

C. 研究結果

1) 脂肪前駆細胞との共培養による造血幹細胞/前駆細胞の増幅： 共培養により HSC の cobblestone 形成能や造血コロニー形成能が増大したのは A54 のみであり、10T1/2 親株と M1601 は造血支持能をもたなかった。A54 をさらに脂肪細胞まで分化させると造血支持能は失われ、分化段階に依存すると考えられた。

トランスウェルで隔てて培養した場合は、A54 細胞に造血支持能はなく、細胞間の直接接触が必要と考えられた。

2) 共培養による MSC 遺伝子発現の変化： A54 細胞の発現プロファイルを HSC との共培養前後で比較した。ハウスキーピング遺伝子の発現が共培養前後で変化していなかったのに対し、約 350 の遺伝子が共培養前後で 2 倍以上の増減を示した。発現が上昇していたものうち、造血への関与が示唆される遺伝子について Q-PCR で発現を確認したところ、BMP-6 および Notch リガンドである Jagged 1・D11 3 の upregulation を確認した。A54 をリンパ球や Lin 陽性細胞と共培養した場合はこれら遺伝子の発現は上昇せず、HSC との特異的相互作用によると考えられた。

3) 共培養による HSC 遺伝子発現の変化： A54 との共培養により、HSC における Notch 受容体、および Notch シグナル系下流に位置する Hes-1 遺伝子の発現が上昇していた。

D. 考察

これまで、Notch シグナルが造血幹細胞の分化・増殖に必須であり、Notch リガンドである Jagged 1 は骨髓微小環境をつくるストロマ細胞や骨が細胞で発現していることは知られていた。本研究は、造血細胞と間質細胞の相互作用によって Notch と Notch リガンドの発現上昇がおり、この正のフィードバックが HSC の増殖に重要な働きをしていることを示

す。従って、同種造血幹細胞移植に際して Notch リガンドを投与したり、Notch シグナルの上流で働いているとされる Wnt シグナル系を制御することにより、ドナー細胞の生着促進が図れる可能性がある。

E. 結論

造血幹細胞と間質細胞との細胞間相互作用によって、造血に必須な Notch シグナル系が活性化されていることを示した。さらなる解析により、同種造血幹細胞移植の効率改善に役立つ知見が期待できる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Liu Y, Okada T, Nomoto T, Ke X, Kume A, Ozawa K, Xiao S: Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp Mol Med* 39:170-175, 2007.

2) Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S: Soluble ST2 blocks IL-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282:26369-26380, 2007.

3) Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Sakata Y, Shimada K, Ozawa K: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50:531-536, 2007.

4) Ito T, Okada T, Miyashita H, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K:

Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101:734-741, 2007.

5) Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu SI, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* 16:474-480, 2008.

6) Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, Nomoto T, Hojo Y, Shimpo M, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med*, in press.

2. 学会発表

1) 久米晃啓、松下卓、小倉剛、小澤敬也：自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療。第110回日本小児科学会小児科学会学術集会、2007.4.20、京都。(日児誌111:220, 2007)

2) Urabe M, Mizukami H, Bakker A, Kume A, Hermens W, Ozawa K: Generation of more infectious type 1 AAV vectors in insect cells. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.5.31, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 15 Suppl 1:S34-35, 2007)

3) Kume A, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Long-term efficacy of a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. The 10th

Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.5.31, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 15 Suppl 1:S43, 2007)

4) Ito T, Okada T, Mimuro J, Nakata M, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Sakata Y, Yada T, Shimada K, Ozawa K: AAV vector-mediated sustained expression of prostacyclin synthase ameliorates obesity in Zucker fatty rats. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.1, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 15 Suppl 1:S136-137, 2007)

5) Uchibori R, Okada T, Ito T, Matsushita T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for tumor-tracking and therapeutic gene amplification as systemic suicide cancer gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 15 Suppl 1:S292-293, 2007)

6) Mizukami H, Ishiwata A, Ono F, Takano J, Fujimoto K, Mimuro J, Urabe M, Kume A, Terao K, Sakata Y, Ozawa K: Seropositivity against AAV serotype 1, 8 and 9 in cynomolgus monkey colonies. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 15 Suppl 1:S320, 2007)

7) Kume A, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Efficient and stable liver transduction by a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #004)

8) Urabe M, Mizukami H, Bakker A, Kume A, Hermens W, Ozawa K: Production of more

potent type 1 adeno-associated virus vectors in insect cells. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #010)

9) Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, Li X-K, Onodera M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Nakauchi H, Kuratsuji T: Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #20)

10) Mizukami H, Ishiwata A, Ono F, Takano J, Fujimoto K, Mimuro J, Urabe M, Kume A, Terao K, Sakata Y, Ozawa K: Prevalence of neutralizing antibody against AAV serotypes 1, 8 and 9 in Cynomolgus monkey colonies. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #27)

11) Mizukami H, Muramatsu S, Ono F, Mimuro J, Sakata Y, Urabe M, Kume A, Terao K, Noakano I, Ozawa K: Safety of intracranial AAV vector injection in Cynomolgus monkeys. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋。(Abstract #30)

12) Uchibori R, Okada T, Ito T, Matsushita T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Tumor tracking and therapeutic

gene amplification by using retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer therapy. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋。(Abstract #91)

13) Ito T, Okada T, Mimuro J, Nakata M, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Sakata Y, Yada T, Shimada K, Ozawa K: Sustained expression of prostacyclin synthase by an intramuscular injection of an AAV vector attenuates obesity in Zucker fatty rats. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋。(Abstract #92)

14) Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of systemic suicide cancer gene therapy. 第66回日本癌学会学術総会、2007.10.3、横浜。(P-444, Program p106)

15) Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: A gene therapy approach against lymph node metastasis using sVEFR3 in uterine body cancer. 第66回日本癌学会学術総会、2007.10.4、横浜。(P-949, Program p170)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
分担研究報告書

大型動物を用いた前臨床研究

分担研究者 花園 豊（自治医科大学医学部・教授）

研究要旨

目的：造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞（MSC）を共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。

必要性：造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

研究結果の概要：初年度（平成 17 年度）、造血幹細胞を MSC と共に直接骨髄内へ移植する実験をサルの系で行い、造血幹細胞の生着が促進されること（約 5 倍）を示す、1 頭目のデータを得た。しかし、サル実験は多くの費用と人手がかかり、結論を引き出すのに必要な数の実験を行うのは容易でない。そこで平成 18 年度は、別の大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて、MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果を検討した。MSC を共移植した 1 頭のヒツジのみでサル造血細胞の生着が認められ、ヒツジの系でも共移植の効果が示唆された。平成 19 年度はサルの系に戻って、別のサル（2 頭目）を使い、MSC 共移植によって造血細胞の生着が促進されることを再び示した。

A. 研究目的

造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

本研究では、造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）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。初年度の平成 17 年度は、このことを検証するためのサルの実験系を構築し、実際に 1 頭の移植実験を実施した。その結果、造血幹細胞（CD34⁺細胞）を MSC（骨髄間質細胞）と共移植した場合、造血幹細胞の生着がよりよい傾向が観察された（約 5 倍）。MSC 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。

平成 18 年度は、別の大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて、MSC 共移植による造血細胞の生

着促進効果を検討した。MSC を共移植した 1 頭のヒツジのみでサル造血細胞の生着が認められ、ヒツジの系でも共移植の効果が示唆された。本年度は、サルの実験に戻って別のサル 1 頭を使い、MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果を検証した。

B. 研究方法

(1) 移植用細胞の単離と遺伝子標識：骨髄間質細胞は、サル骨髄血中の付着性単核球を用いる。造血幹細胞としてサル CD34⁺細胞を用いる。CD34⁺細胞は、後の移植実験のために二等分した。二等分した造血幹細胞(CD34⁺細胞)をそれぞれ異なるレトロウイルスベクター (G1Na と LNL6)を用いて遺伝子標識した(図 1)。

(2) 骨髄内移植：レシピエントのサルに、あらかじめブスルファン (8 mg/kg を 2 回静注) を投与することによって移植前処置を施行した。サル自家移植の系で、同一個体の左右別々にヘミ移植 (hemi-transplantation) を行った (個体差の影響を排除するため)。すなわち、右側には造血幹細胞 (LNL6 で標識) と骨髄間質細胞を骨髄内に直接、共移植する。左側にはコントロールとして造血幹細胞 (G1Na で標識) のみを骨髄内に移植した。

(3) 移植後の評価：移植後の造血が、共移植群(LNL6 標識)と単独移植群(G1Na 標識)のどちらに由来するかを判定した。具体的には、末梢血単核球から DNA を抽出し、G1Na と LNL6 を判別する定量的 PCR を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験：組換え DNA 実験については、以下の通り承認が得られている。

・花園豊申請「幹細胞を利用する再生医療の基盤技術の開発」自治医科大学 平成 19 年 3 月 29 日承認 (06-21)

・花園豊申請「幹細胞治療法のサルを用いた有用性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 17 年 4 月 1 日承認 (DNA-070)

動物実験倫理：サルを用いる動物実験については、以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「サルを用いた幹細胞治療法の開発」自治医科大学 平成 19 年 3 月 30 日承認 (No.14)

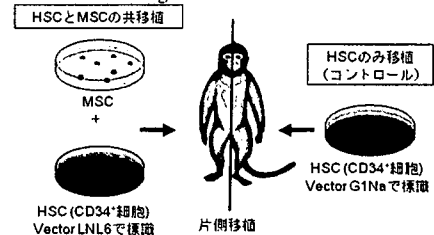
・花園豊申請「幹細胞を用いた治療法の有効性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 19 年 8 月 2 日承認 (DS19-32)

C. 研究結果

(1) 前処置法の検討：ブスルファンの至適用量を決定するための予備実験を行った。サルにブスルファン; 10 mg/kg (1 回静注) 投与を行ったところ、軽微な骨髄抑制しか認めなかった。次にブスルファン; 20 mg/kg (10 mg/kg を 2 回静注) 投与を行った結果、WBC; 900/ μ l の減少を認めるなど、十分な骨髄抑制効果を呈すると考えられた。以上を鑑み、本実験ではブスルファン; 16 mg/kg (8 mg/kg を 2 回静注) 投与を行うこととした。

2頭目のサルの評価

・ベクターのswitching



・前処置の変更：ブスルファン (Busulfex® injection) (8 + 8 mg/kg)

図 1 サルへの移植実験