

200832045A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

間葉系幹細胞を利用した新しい
造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 21 (2009) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

間葉系幹細胞を利用した新しい
造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

間葉系幹細胞を利用した新しい造血幹細胞移植技術の 開発に関する研究	1
小澤 敬也	

II. 分担研究報告

1. 間葉系幹細胞による GVHD 抑制機構の解析	6
尾崎 勝俊	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	12
-----------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総括研究報告書

間葉系幹細胞を利用した新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

研究代表者 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: mesenchymal stem cell) には造血支持作用以外に、近年になって免疫抑制作用があることが明らかにされ、その臨床応用 (MSC を用いた細胞治療) として、同種造血幹細胞移植後のステロイド不応性の重症急性移植片対宿主病 (acute GVHD) に対する治療効果が期待されている。本研究は MSC の免疫抑制能に関する基礎研究を行い、造血幹細胞移植への MSC の臨床応用の安全性を高めるのが目的である。以前、我々はマウスの MSC を解析し、NO (nitric oxide) が抑制因子として重要であることを報告した。また、NO の産生には IFN- γ と TNF- α が必要であることを報告した。ヒトでも NO は重要な働きをしていると考えられるが、マウスに比べてヒトでは遥かに産生量が少ないことが示唆された。また、MSC の産生するヒアルロン酸が NO の産生を促していると考えられたが、これは様々な実験から否定的であった。次に、IL-21 が GVHD を増強する証拠を得ており、IL-21 のデコイ受容体を強制発現した MSC を作製し、その遺伝子修飾 MSC の投与により GVHD 局所で IL-21 デコイ受容体を発現して IL-21 の作用を阻害するという実験を開始している。レトロウイルスベクターでは MSC で十分な発現が得られなかったため、今後はアデノウイルスベクターによりその発現を高め、治療応用への可能性を検討していく予定である。ヒト間葉系幹細胞バンクについては、これまでに 31 症例から樹立を行った。ステロイド抵抗性 acute GVHD に対する MSC 投与の臨床研究に関しては、当大学の倫理委員会で承認を受けており、2007 年に 1 例投与しているが、その後も症例を増やすべく準備を進めている。今年度は 2 症例で MSC を培養して準備したが、いずれも GVHD の重症度が投与基準に至らず、投与は行わなかった。

研究分担者

尾崎 勝俊
自治医科大学医学部
講師

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。欧米で行われた第二相臨床研究の成績が報告されており、MSC をステロイド抵抗性 GVHD の細胞療法として使用した場合、約 7 割の奏効率が得られている。本研究は日本での臨床投与のエビデンス

を集めることと、その作用機序を明らかにすることの二つを目指している。この両輪で進めていくことにより、より安全な MSC の投与方法などを明らかにしていくことが可能になると考えられる。

B. 研究方法

1) ヒアルロン酸の産生を ELISA で測定した。T 細胞のヒアルロニダーゼの発現を RT-PCR で確認した。MSC に様々な分子量のヒアルロン酸と IFN- γ を加えて、どの分子量のヒアルロン酸が NO を産生させるのか調べた。

2) IL-21 のデコイ受容体は PCR を使って作成し、pMX-IRES-GFP というレトロウイルスベクターに挿入した。発現は FACS とウエスタンブロッティングで確認した。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク：自治医大倫理委員会の承認後、同意を得られた患者から間葉系幹細胞を樹立した。それぞれの細胞において、免疫抑制能をサイミジンアッセイで、NO の産生を NO アッセイキットで測定した。

4) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究：治療用 MSC のソースとなる骨髓液は、当大学の倫理委員会の審査を経て対象患者の血縁者（4 親等以内）から提供を受けた。骨髓液を 10ml 採取し、臨床用細胞プロセッシング室にて MSC の分離と培養を無菌的に行った。即ち、単核球分離、赤血球溶血後、 1.0×10^6 cells/ml の細胞密度で 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。これまでの基礎的検討で凍結保存操作による MSC のバイアビリティの低下はごく僅かであった。この培養条件では、 $100 \times 20\text{mm}$ 細胞培養プラスチックディッシュ（培養面積約 78.5cm^2 ）を用いて、培養開始後 5-7 日後にディッシュに付着する

線維芽細胞様のコロニー形成を認め、約 10 日間でコンフルエントに到達し、細胞数は約 1.0×10^7 cells 以上となった。患者体重あたり 1×10^6 /kg で投与するのに十分な数まで増やし、投与までに期間がある場合は、自己末梢血幹細胞の保存に準じ細胞凍害保護液（CP-1（極東製薬工業））と 25%ヒトアルブミン（日本赤十字）を用いて凍結保存した。安全を担保するために凍結保存直前に培養上清の細菌培養、真菌培養、を施行し、 β -D glucan、endotoxin、cytomegalovirus、EB virus、mycoplasma、および細胞の染色体を検査し、陰性および正常であることを投与前に確認した。細胞数は 1.0×10^6 cells/kg、輸注速度はシリンジポンプを用いて 4ml/min とした。Osiris 社の臨床研究では細胞濃度を 2.5×10^6 cells/kg に設定しており、本研究でもそれを踏襲している。レシピエントの体重を 50kg とした場合、輸注投与量は約 20ml となり、投与時間は 5 分間である。これまでの検討から細胞は表面抗原の CD45、CD11c が陰性で、CD90、CD73 (SH3) を高発現していることを確認している。また分化誘導培地にてこれらの細胞が脂肪細胞及び骨芽細胞へと ex vivo にて形態学的に変化し、それぞれ Oil red O 染色、Alkaline Phosphatase 染色にびまん性に陽性で多分化能を有していることが確認されている。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験では、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。ヒトの細胞を用いた実験は、自治医大倫理委員会の承認を得て、その計画に基づいて行った。

ヒトに関しては大学倫理委員会の承認を経て、提供者から文書での同意を得て、骨髓液を採取している。その内容は臨床プロトコル

ルとして大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) 研究センターに登録し、公表済みである。

B. 研究結果

1) 間葉系幹細胞がヒアルロン酸を産生していること、T細胞がヒアルロニダーゼを発現していること、高分子ではなく低分子ヒアルロン酸と IFN- γ 存在下で MSC が NO を産生することなどを見出した。ここまでは仮説通りであったが、様々な実験を重ねていくと、この現象はある特定の低分子ヒアルロン酸製品に限定されており、NO 産生には製品に混入していたエンドトキシンが関与していたことが判明した。

2) IL-21 のデコイ受容体を作成した。この受容体は細胞内ドメインを欠失しており、リガンドは結合するもののシグナルを伝達できない。これを発現するレトロウイルスベクターを作成し、MSC に感染させた。残念ながら十分な発現を得られなかったため、現在、アデノウイルスベクターを作成している。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立と NO 産生能：ヒト骨髄から間葉系幹細胞を樹立し、様々な年齢層のものをそろえるべく症例を集積中である。現在までに 31 症例分を集めた。その内訳は、正常骨髄 10 例、造血不全 4 例、急性白血病 7 例、骨髄増殖性疾患 5 例、その他 5 例となっている。NO の産生に関しては、マウスと異なり通常のアッセイでは産生が確認できなかった。高感度の NO 測定法を試み、NO 合成酵素の蛋白レベルでの産生なども調べる予定である。

4) 2006 年からこれまでに計 8 名の MSC を準備した。実際に使用に至ったのは 2007 年の

1 例のみである。本年度は 2 症例で MSC を事前に準備したが、ステロイド抵抗性の難治例とはならず、投与されるに至らなかった。

D. 考察

1) T 細胞由来のヒアルロニダーゼが間葉系幹細胞由来の高分子ヒアルロン酸を分解し、生成された低分子ヒアルロン酸と T 細胞由来の IFN- γ の両者が MSC に作用して NO を産生するという機序が想定されたが、今回の実験結果から、ある特定の低分子ヒアルロン酸製品に混入していたエンドトキシンが NO 産生に関与していたものと考えられた。これまでの多くの報告がこの製品を使用しており、結果の解釈には注意が必要である。

2) IL-21 のデコイ受容体を含むレトロウイルスベクターを作製した。293 細胞では強力な発現を得られたものの、MSC では十分な発現が得られなかった。感染効率の問題と、発現効率の問題と二つが考えられた。今後は、アデノウイルスベクターを用いて研究を進めていく計画である。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクと NO 産生：長期培養していると細胞増殖が止まり、安定した解析が困難であることがわかった。NO 産生は現時点ではほとんど認められないが、測定感度以下の低レベルの産生は否定できない。また、マウスでは NO が中心的な働きをしているが、ヒトでは何が中心的な因子なのか、今後調べる必要がある。これまでに報告されている MSC と関連のある免疫抑制因子としては、TGF- β 、PGE₂、indoleamine-2,3-dioxygenase などが知られており、これらが候補になると考えられる。

4) GVHD の重症例が最近は少なく、MSC 投与

に至る症例が 2007 年の 1 例のみとなっている。しかし、MSC 治療の有効性が確認された場合は、GVHD の発症リスクの高い移植も可能になることが期待される。

E. 結論

- ・当初考えられた低分子ヒアルロン酸と MSC からの NO 産生との関係は否定的であることが様々な実験から示された。
- ・MSC は線維芽細胞と異なり、レトロウイルスベクターでは IL-21 デコイ受容体の高発現を得られなかったため、アデノウイルスベクターを作製中である。
- ・ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 31 症例から樹立を行った。
- ・ヒト MSC では NO が中心的役割を果たしていない可能性が示唆された。
- ・難治性（ステロイド抵抗性）acute GVHD の患者数が限られており、2 症例で MSC を準備したが、投与までには至らなかった。

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) Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* 2008;30(3):121-127.
- 2) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K: Bortezomib overcomes cell

adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene.* 2009; 28(2): 231-242.

- 3) Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K: Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric analysis of bone marrow blastic cell phenotypes. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50(2): 290-293.
- 4) 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* 10: 368-74, 2008.
- 5) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, 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: 474-80, 2008.
- 6) Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther.* 16(3): 383-91, 2009.

- 7) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. J. Gene Med. (in press)

第70回日本血液学会総会、京都(臨床血液
Vol.49(9):279)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特になし。

2. 学会発表

- 1) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Tatara R, Leonard WJ, Sato K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

2008 Annual Meeting of ASH at San Francisco, CA (Blood 2008;112(11): 453a)

- 2) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Sato K, Tatara R, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

第67回日本癌学会学術総会、名古屋 (O-181, Program p87)

- 3) 尾崎 勝俊、翁 家国、目黒 明子、畑中 恵子、松 春子、多々良 礼音、佐藤 一也、室井 一男、小澤 敬也：
GVL効果を維持しながらGVHDを抑制する方法の開発；IL-21はGVHDに重要であるがGVL効果には関与しない
第70回日本血液学会総会、京都(臨床血液
Vol.49(9):213)

- 4) 松 春子、尾崎 勝俊、目黒 明子、畑中 恵子、多々良 礼音、翁 家国、佐藤 一也、森 政樹、室井 一男、永井 正、小澤 敬也；急性GVHD診断の補助検査：granzyme B およびperforin 細胞内染色の有用性

Ⅱ. 分担研究報告

間葉系幹細胞による GVHD 抑制機構の解析

研究分担者 尾崎 勝俊 自治医科大学医学部 講師

研究要旨 間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) には造血支持作用以外に、近年になって免疫抑制作用があることが明らかにされ、その臨床応用 (MSC を用いた細胞治療) として、同種造血幹細胞移植後のステロイド不応性の重症急性移植片対宿主病 (acute GVHD) に対する治療効果が期待されている。本研究は MSC の免疫抑制能に関する基礎研究を行い、造血幹細胞移植への MSC の臨床応用の安全性を高めるのが目的である。以前、我々はマウスの MSC を解析し、nitric oxide が抑制因子として重要であることを報告した。また、NO の産生には IFN- γ と TNF- α が必要であることを報告した。ヒトでも nitric oxide は重要な働きをしていると考えられたが、マウスに比べてヒトでは遥かに産生量が少ないことが示唆された。また、MSC の産生するヒアルロン酸が NO の産生を促していると考えられたが、こちらは様々な実験から否定的であった。IL-21 が GVHD を促進する証拠を得ており、IL-21 のデコイ受容体を作成し、MSC に強制発現することで炎症部位に運んでもらおうという戦略をとっている。レトロウイルスを介して MSC に発現させたものの十分な発現が得られなかったため、今後はアデノウイルスを作成しその発現を高め、治療応用への可能性を検討していく予定である。

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。欧米で行われた臨床研究 Phase II の成績が報告されており、MSC をステロイド抵抗性 GVHD の細胞療法として使用した場合、約 7 割の奏効率が得られ

た。しかしながらその作用機序は未だ明らかではない。そこで本研究では、MSC による細胞療法の科学的基盤を明らかにすることを目的としている。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。

B. 研究方法

- 1) ヒアルロン酸の産生を ELISA で測定した。T 細胞のヒアルロニダーゼの発現を RT-PCR で確認した。MSC に様々な分子量のヒアルロン酸と IFN- γ を加えて、どの分子量のヒアルロン酸が NO を産生させるのか調べた。
- 2) IL-21 のデコイ受容体は PCR を使って作成

し、pMX-IRES-GFP というレトロウイルスベクターに挿入した。発現は FACS とウエスタンブロットングで確認した。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク：自治医大倫理委員会の承認後、同意を得られた患者から間葉系幹細胞を樹立した。それぞれの細胞において、免疫抑制能をサイミジンアッセイで、NO の産生を NO アッセイキットで測定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、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。ヒトの細胞を用いた実験は、自治医大倫理委員会の承認を得て、その計画に基づいて行った。

B. 研究結果

1) 間葉系幹細胞がヒアルロン酸を産生していること、T細胞がヒアルロニダーゼを発現していること、高分子ではなく低分子ヒアルロン酸と IFN- γ 存在下で MSC が NO を産生すること、などを見出した。ここまでは仮説通りであったが、様々な実験を重ねていくと、この現象はある特定の低分子ヒアルロン酸製品に限定されており、NO 産生には製品に混入していたエンドトキシンが関与していたことが判明した。

2) IL-21 のデコイ受容体を作成した。この受容体は細胞内ドメインを欠失しており、リガンドは結合するもののシグナルを伝達できない。これを発現するレトロウイルスベクターを作成し、MSC に感染させた。残念ながら十分な発現を得られなかったため、現在、アデノウイルスベクターを作成している。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立と NO 産生

能：ヒト骨髄から間葉系幹細胞を樹立し、様々な年齢層のものをそろえるべく症例を集積中である。現在までに 31 症例分を集めた。その内訳は、正常骨髄 10 例、造血不全 4 例、急性白血病 7 例、骨髄増殖性疾患 5 例、その他 5 例となっている。NO の産生に関しては、マウスと異なり通常のアッセイでは産生が確認できなかった。高感度の NO 測定法を試み、NO 合成酵素の蛋白レベルでの産生なども調べる予定である。

D. 考察

1) T 細胞由来のヒアルロニダーゼが間葉系幹細胞由来の高分子ヒアルロン酸を分解し、生成された低分子ヒアルロン酸と T 細胞由来の IFN- γ の両者が MSC に作用して NO を産生するという機序が想定されたが、今回の実験結果から、ある特定の低分子ヒアルロン酸製品に混入していたエンドトキシンが NO 産生に関与していたものと考えられた。これまでの多くの報告がこの製品を使用しており、結果の解釈には注意が必要である。

2) IL-21 のデコイ受容体を含むレトロウイルスベクターを作製した。293 細胞では強力な発現を得られたものの、MSC では十分な発現が得られなかった。感染効率の問題と、発現効率の問題と二つが考えられた。今後は、アデノウイルスベクターを用いて研究を進めていく計画である。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクと NO 産生：長期培養していると細胞増殖が止まり、安定した解析が困難であることがわかった。NO 産生は現時点ではほとんど認められないが、測定感度以下の低レベルの産生は否定できない。また、マウスでは NO が中心的な働きをしているが、ヒトでは何が中心的な因子なのか、

今後調べる必要がある。これまでに報告されている MSC と関連のある免疫抑制因子としては、TGF- β 、PGE₂、indoleamine-2,3-dioxygenase などが知られており、これらが候補になると考えられる。

E. 結論

- ・当初考えられた低分子ヒアルロン酸と MSC からの NO 産生との関係は否定的であることが様々な実験から示された。
- ・MSC は線維芽細胞と異なり、レトロウイルスベクターでは IL-21 デコイ受容体の高発現を得られなかったため、アデノウイルスベクターを作製中である。
- ・ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 31 症例から樹立を行った。
- ・ヒト MSC では NO が中心的役割を果たしていない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* 2008; 30(3): 121-127.
- 2) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K: Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene.* 2009; 28(2):

231-242.

- 3) Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K: Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric analysis of bone marrow blastic cell phenotypes. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50(2): 290-293.

2. 学会発表

- 1) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Tatara R, Leonard WJ, Sato K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

2008 Annual Meeting of ASH at San Francisco, CA, (Blood 2008; 112(11): 453a)

- 2) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Sato K, Tatara R, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

第67回日本癌学会学術総会、名古屋 (O-181, Program p87)

- 3) 尾崎 勝俊、翁 家、目黒 明子、畑中 恵子、松 春子、多々良 礼音、佐藤 一也、室井 一男、小澤 敬也: GVL効果を維持しながらGVHDを抑制する方法の開発; IL-21はGVHDに重要であるがGVL効果には関与しない

第70回日本血液学会総会、京都(臨床血液 Vol.49(9):213)

- 4) 松 春子、尾崎 勝俊、目黒 明子、畑中 恵子、多々良 礼音、翁 家、佐藤 一也、森 政樹、室井 一男、永

井 正、小澤 敬也；急性GVHD診断の
補助検査：granzyme B およびperforin 細胞
内染色の有用性
第70回日本血液学会総会、京都(臨床血液
Vol.49(9):279)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
<u>Ozawa K</u> , Sato K, Oh I, <u>Ozaki K</u> , Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A	Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs).	J. Autoimmun.	30(3)	121-127	2008
Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, <u>Ozaki K</u> , Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, <u>Ozawa K</u>	Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma.	Oncogene.	28(2)	231-242	2009
Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, <u>Ozaki K</u> , Nagai T, <u>Ozawa K</u>	Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric analysis of bone marrow blastic cell phenotypes.	Leuk. Lymphoma	50(2)	290-293	2009
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, <u>Ozawa K</u>	Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats.	J. Gene Med.	10	368-374	2008

Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholeslami K, Nomoto T, Muramatsu SI, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, <u>Ozawa K</u>	Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea.	Mol. Ther.	16	474-480	2008
Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura K, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, <u>Ozawa, K</u>	Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat.	Gene Ther.	16(3)	383-391	2009
Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, <u>Ozawa, K</u>	Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy.	J. Gene Med.			in press

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(主なもの)



Review

Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)

Keiyo Ozawa^{a,b,*}, Kazuya Sato^a, Iekuni Oh^a, Katsutoshi Ozaki^a, Ryosuke Uchibori^b,
 Yoko Obara^{a,b}, Yuji Kikuchi^{a,b}, Takayuki Ito^b, Takashi Okada^{b,1}, Masashi Urabe^b,
 Hiroaki Mizukami^b, Akihiro Kume^b

^a Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan

^b Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered to be a promising platform for cell and gene therapy for a variety of diseases. First, in the field of hematopoietic stem cell transplantation, there are two applications of MSCs: 1) the improvement of stem cell engrafting and the acceleration of hematopoietic reconstitution based on the hematopoiesis-supporting ability; and 2) the treatment of severe graft-versus-host disease (GVHD) based on the immunomodulatory ability. Regarding the immunosuppressive ability, we found that nitric oxide (NO) is involved in the MSC-mediated suppression of T cell proliferation. Second, tumor-bearing nude mice were injected with luciferase-expressing MSCs. An *in vivo* imaging analysis showed the significant accumulation of the MSCs at the site of tumors. The findings suggest that MSCs can be utilized to target metastatic tumors and to deliver anti-cancer molecules locally. As the third application, MSCs may be utilized as a cellular vehicle for protein-supplement gene therapy. When long-term transgene expression is needed, a therapeutic gene should be introduced with a minimal risk of insertional mutagenesis. To this end, site-specific integration into the AAVS1 locus on the chromosome 19 (19q13.4) by using the integration machinery of adeno-associated virus (AAV) would be particularly valuable. There will be wide-ranging applications of MSCs to frontier medical treatments in the near future.
 © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cancer gene therapy; GVHD; Mesenchymal stem cells; Site-specific integration; Tumor targeting

1. Introduction

In bone marrow, there are different types of tissue stem cells (adult stem cells); i.e. hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs account for a small population of cells in bone marrow as a non-hematopoietic component with the capacity to differentiate into a variety of cell lineages, including adipocytes, osteocytes, chondrocytes, muscles, and stromal cells [1]. Recent studies demonstrated that MSCs are capable of supporting hematopoiesis and of

regulating immune response [2]. In addition, since MSCs can be readily isolated and expanded *in vitro*, they are expected to be a source of cell therapy. Interestingly, MSCs have the ability to accumulate at the site of: i) tissue/organ damage; ii) inflammation; and iii) cancer when administered *in vivo*. Therefore, MSCs can be utilized for: i) regenerative therapy; ii) treatment of graft-versus-host disease (GVHD) and Crohn disease; and iii) platform of cancer gene therapy (targeted delivery of anti-cancer agents). Another unique feature of MSCs is little or low immunogenicity due to the lack of expression of co-stimulatory molecules. This phenomenon makes it possible to administer MSCs without HLA matching for cell therapy. A single lot of expanded MSCs from one healthy donor can be utilized for treatment of many patients. Although clinical applications of MSCs have been conducted for the suppression of severe acute GVHD in allogeneic stem cell transplantation [3,4] and for regenerative therapy [5,6], molecular mechanisms underlying the biological effects of

* Corresponding author. Jichi Medical University, Division of Hematology, Department of Medicine, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi, 329-0498, Japan. Tel.: +81 285 58 7353; fax: +81 285 44 5258.

E-mail address: kozawa@ms2.jichi.ac.jp (K. Ozawa).

¹ Present address: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

MSCs remains obscure. Finding key molecules for differentiation, immunosuppression, and hematopoietic support of MSCs would be valuable for further augmenting the efficacy of MSCs in a wide range of clinical applications. In this regard, development of the technology for genetic manipulation of MSCs is also important research project. Site-specific integration of a therapeutic gene into a safe locus in the genome should be investigated from the safety standpoint.

2. Microarray analysis of genes responsible for differentiation of mesenchymal stem cells

Genes regulating the differentiation of MSCs remain obscure and it is technically difficult to do high-throughput analysis using primary MSCs, because such cells contain heterogeneous populations. To overcome the problems related to the heterogeneity of primary MSCs, we utilized MSC-like cell lines. It has been shown that 10T1/2 cells, derived from C3H mouse embryo cells, differentiate into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes with a treatment of 5-azacytidine. We previously established two sub-lines from 10T1/2, designated as A54 for a preadipocyte cell line and M1601 for a myoblast cell line [7]. Under appropriate culture conditions, A54 and M1601 cells terminally differentiate into adipocytes and myotubes, respectively, while parental 10T1/2 cells remain undifferentiated under the same culture conditions. Therefore, 10T1/2 cells can be utilized as a model of MSCs, and A54 and M1601 are used as committed mesenchymal progenitors. Gene expression profiles of these cell lines were compared by microarray analysis before and after differentiation.

Each of parent 10T1/2, A54, and M1601 cell lines showed a distinctive and unique gene expression profile despite morphological similarity (Fig. 1) [8]. Parental 10T1/2 cells

had 105 elevated genes including ones encoding Activin, Dlk, Nov, Grb10, p15, and many functionally unknown molecules. Dlk and Nov are known to be involved in Notch signaling pathway and were reported to have the ability to inhibit differentiation into adipocytes and osteoblasts [9]. In preadipocyte A54 cells, 201 genes were up-regulated, including genes known to be involved in adipocyte differentiation such as genes encoding C/EBP α , C/EBP δ , PPAR- γ , PAI-1, and Frizzled-1 [10]. Myoblasts M1601 cells showed 137 up-regulated genes, including ones related to skeletal muscle differentiation such as genes encoding MyoD, MLC1F, α -skeletal actin, myosin heavy chain, and myosin light chain [11] as well as genes related to cardiac muscle differentiation such as genes encoding α -cardiac actin, cardiac troponin C, and troponin T2 [12].

Previous studies have shown that preadipocytes have a higher ability to support hematopoiesis than other kinds of stromal cell components *in vitro* [12,13]. 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. Since Ang-1 was reported to be indispensable for the self-renewal of hematopoietic stem cells [14], we performed real-time PCR analysis of Ang-1 along with SCF, SDF-1, CEBP- δ , IGF-1, and CXCL-1. The expression of these genes was highest in A54 cells among the three cell lines. Moreover, protein expression of Ang-1 was only detected in A54 among three cell lines and the level of this protein decreased after adipocyte differentiation.

To examine the effects of these three lines on hematopoiesis, we co-cultured mouse hematopoietic stem cell fraction with these three stromal cell lines. The cells in Lin(-)Sca-1(+) fraction were plated on 10T1/2, A54, or M1601 cells.

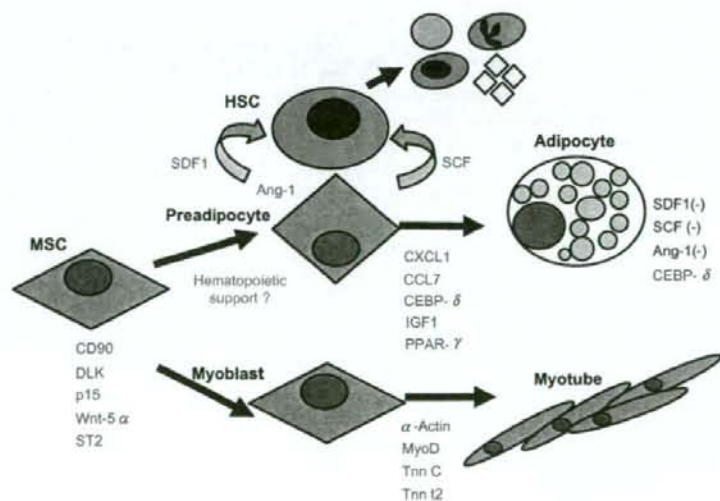


Fig. 1. Proposed model for the hierarchy of the bone marrow stromal system [8].