

際の移植率について解析を行った。なお、今回の検討では、レシピエント骨髄の空きニッチを保持するために、X線照射は行わずに移植を行った。移植20週間後に骨髄細胞を回収して移植効率を解析した結果、Ad-CXCL12投与マウスでは、Ad-Luc投与群と比較し、レシピエント骨髄にGFP陽性のドナー細胞が生着していることが明らかとなった。一方、コントロール群ではGFP陽性細胞は検出できなかった (Figure 1)。したがって、Ad-CXCL12投与により形成された造血幹細胞ニッチに外来ドナー細胞が生着下ことが推察される。しかし、その移植効率は極めて低く、GFP陽性細胞の割合は骨髄細胞中の0.06%であった (Table 1)。したがって、CXCL12を発現させただけでは移植率の向上は困難であることが示唆された。

### C-2. VEGFによる骨髄動員作用

骨髄動員作用を有する因子として、CXCL12の以外に、VEGFやStem Cell Factor (SCF)、Angiopoietin-1 (Ang-1)等が知られている。昨年度、Ad-VEGFをマウスへ投与することにより、血漿VEGF濃度が著明に増加することを示した。そこで本年度では、Ad-VEGF投与マウスにおける血液細胞の動態について検討した。Ad-VEGF投与5日後に骨髄細胞および末梢血単核細胞 (PBMC)数を測定したところ、Ad-VEGF投与マウスはコントロールであるAd-null投与マウスと比較し、骨髄細胞数が有意に減少するとともにPBMC数が有意に増加することが明らかとなった (Figure 2)。これ

までにAd-CXCL12投与マウスの骨髄では、造血幹細胞を含む画分であるc-kt+Sca-1+Lineage- (KSL)細胞数が減少することを明らかにしている。そこでVEGFも同様の作用を有しているか否か検討した。その結果、VEGF投与マウスにおいてもKSL細胞は有意に減少することが明らかとなった (Figure 3A, 3B)。さらにコロニーアッセイにより骨髄細胞およびPBMCにおける血液前駆細胞数を解析した結果、造血幹細胞や血液前駆細胞が形成するCFU-GEMM/CFU-Mixが骨髄細胞中において減少する一方で、PBMCにおいては有意に増加していた (Figure 3C)。以上の結果から、マウス生体内において血中VEGF濃度が上昇することにより、骨髄から造血幹細胞を含む血液前駆細胞が遊離し、末梢血へ動員されることが示された。また、Ad-VEGF投与マウスの末梢血中にはFlt-1 (VEGFR1)陽性細胞が増加していた (Figure 4)。Ad-CXCL12投与マウスにおいてはFlt-1陽性細胞の増加はみとめられないことから(データ略)、VEGFとCXCL12では動員する細胞の種類が異なっていることが示唆された。

### C-3. マウスES細胞、iPS細胞から血液細胞への誘導

多能性幹細胞であるES、iPS細胞から誘導した血液細胞は、細胞組織加工医薬品のモデル細胞として利用可能であると考えられる。また、生体から樹立可能なiPS細胞由来の血液細胞は移植におけるドナー細胞となり得るため、iPS細胞から誘導した血液

細胞を用いることにより、多様な *in vivo* 免疫原性評価系の構築に繋がると考えられる。そこで本年度はマウス ES、iPS 細胞から血液細胞を誘導することを試みた。なお、これまでは HoxB4 遺伝子を ES 細胞へ恒常的に発現させることにより造血幹細胞を含む血液前駆細胞の誘導が行われてきたが、この遺伝子導入法では外来遺伝子が染色体に挿入されるために医療応用には適していない。そこで本研究ではまず、一過性の遺伝子発現を示す Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を導入し、血液前駆細胞への分化誘導が可能かどうか検討した。まず、誘導した血液細胞数を計測したところ、HoxB4 遺伝子の導入によりその細胞数が有意に増加していることが明らかとなった (Figure 5A)。また、HoxB4 遺伝子導入細胞では、CD45 や c-kit、Sca-1 を発現する細胞も効率良く誘導できていることが示された (Figure 5B)。さらに、得られた細胞中の血液前駆細胞数をコロニーアッセイにより解析した結果、HoxB4 遺伝子導入群では、CFU-GEMM 数が有意に増加していることが明らかとなった (Figure 5C)。したがって、Ad ベクターを用いて ES、iPS 細胞へ HoxB4 遺伝子を導入することにより、効率良く造血幹細胞・血液前駆細胞を誘導可能であることが示された。

#### D. 考察

ヒト血液系を有するキメラマウスを作製して細胞組織加工医薬品などの医薬品の *in vivo* における免疫原性を評価するには、ま

ず、外来造血幹細胞をマウスの骨髄ニッチに高効率に生着させる技術の確立が必須である。本研究では Ad ベクターを用いて造血幹細胞の生存・増殖・生着に重要である CXCL12 や VEGF などのサイトカインをマウスの生体内で発現させることにより、マウスの造血幹細胞を骨髄から遊離させ、外来造血幹細胞の生着率を向上させることを目的としている。

昨年度までに Ad-CXCL12 をマウスに投与することにより、造血幹細胞などの未熟な細胞を含む血液細胞が骨髄から遊離することを示した。そこで本年度では Ad-CXCL12 投与後に外来骨髄細胞を移植した場合の移植率について検討を行った。その結果、Ad-Luc 投与後に骨髄細胞を移植した群においては、外来造血幹細胞がほとんど生着しなかったのに対し、Ad-CXCL12 投与後に移植した群においては約半数のマウスにおいて生着がみとめられた (Table 1)。したがって、Ad-CXCL12 投与したマウスの骨髄では造血幹細胞の空きニッチが形成され、その結果、外来造血幹細胞が生着したものと考えられる。しかしながら、Ad-CXCL12 投与マウスにおける移植率 (キメリズム) は 0.06% と極めて低いものであったため、Ad-CXCL12 の単独投与では生着率向上は困難であることが推察される。今回は骨髄微小環境を維持するために X 線照射を行っていないことから、レシピエントマウスの血液細胞が残っており、そのために移植率が低くなったものと考えられる。したがって、Ad-CXCL12 投与した後に、さらに抗がん剤を投与することにより、骨髄

から遊離したレシピエントの血液細胞を死滅させ、その後外来造血幹細胞を移植することで、生着率の向上に繋がることを期待される。

本年度はさらに、VEGF 発現 Ad ベクターをマウス生体へ投与した際の血液細胞の動態についても解析を進めた。その結果、CXCL12 と同様に、骨髄から造血幹細胞を含む血液細胞が遊離し、末梢血へ動員されることが明らかとなった (Figure 2, 3)。したがって、CXCL12 と同様に、VEGF は骨髄の造血幹細胞ニッチを形成させるのに有用であることと考えられる。また、Ad-VEGF 投与時には、Ad-CXCL12 投与時とは異なり、Flt-1 陽性細胞が末梢血において増加することが示された (Figure 4)。Flt-1 陽性細胞中には骨髄再構築能を有する造血幹細胞も含まれていることが過去に報告されている (Hattori K. et al., 2002 Nat. Med.)。したがって、Ad-VEGF 投与により末梢血へ動員される Flk-1 陽性細胞中にも造血幹細胞が含まれている可能性もあるため、今後、移植実験を行い、確認する必要がある。また、上述のように Ad-CXCL12 の単独投与では移植率を向上させることが困難であるため、今後、Ad-CXCL12 と Ad-VEGF の共投与時の血液細胞の動態を解析するとともに、Ad-CXCL12 と Ad-VEGF を共投与したマウスに外来造血幹細胞を移植することにより、生着率が向上するか否か検討する必要がある。

本年度はさらに、ES、iPS 細胞由来血液細胞を細胞組織加工医薬品のモデルとして使用するため、ES、iPS 細胞から血液細胞

への分化誘導法の開発も試みた。その結果、造血系サイトカインを作用させる従来の誘導法と比較し、Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を一過性に導入することにより、効率良く血液細胞を誘導可能であることが明らかとなった (Figure 5)。今後、実際に医薬品のモデルとなるか否か、移植することにより明らかになると思われる。

## E. 結論

移植効率は低かったものの CXCL12 発現 Ad ベクターをマウスに投与した後に、外来骨髄細胞を移植することにより、レシピエントへ生着することが示された。今後、VEGF を含むその他のサイトカインや抗がん剤と併用する等、移植条件を最適化することにより、ヒト血液細胞を有するマウスの高効率作製法の開発に繋がるものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.*, **12**, 501-507 (2010)

2. Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T.,

Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther.* **19**, 400-407 (2011).

3. Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Liver Stem Cells: Methods and Protocols*, Humana Press, USA (part of the Springer publishing group), in press.

4. 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、*薬学雑誌*、130、1527-1534 (2010)

## 2. 学会発表

1. 野中昭希、田代克久、山口朋子、西川恵三、水口裕之、川端健二; 生体内 VEGF 過剰発現による造血幹細胞の動員効果、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日 (口頭発表)

2. 田代克久、大森美幸、櫻井文教、山口朋子、西川恵三、川端健二、水口裕之、HoxB4 遺伝子の一過性発現によるマウス ES/iPS 細胞から血液細胞への分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日 (ポスター発表)

3. 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、

2011 年 3 月 1 日-2 日 招待講演

4. 川端健二、高効率遺伝子導入法によるヒト iPS 細胞の肝分化誘導法の開発、スーパー特区フォーラム in 大阪、大阪、2011 年 1 月 26 日 招待講演

5. Katsuhisa Tashiro, Miyuki Omori, Tomoko Yamaguchi, Keizo Nishikawa, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Induction of hematopoietic differentiation from mouse embryonic and induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、2010 年 12 月 7-10 日 (ポスター発表)

6. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之、幹細胞の分化誘導系におけるアデノウイルスベクターの有用性、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪、2010 年 10 月 30 日 (口頭発表)

7. 川端健二、iPS 細胞の分化誘導系を用いた創薬への可能性、第 89 回彩都バイオサイエンスセミナー、大阪、2010 年 10 月 14 日 招待講演

8. 川端健二、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の高効率分化誘導法、遺伝子デリバリー研究会第 10 回夏期セミナー、滋賀、2010 年 9 月 1-2 日 招待講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

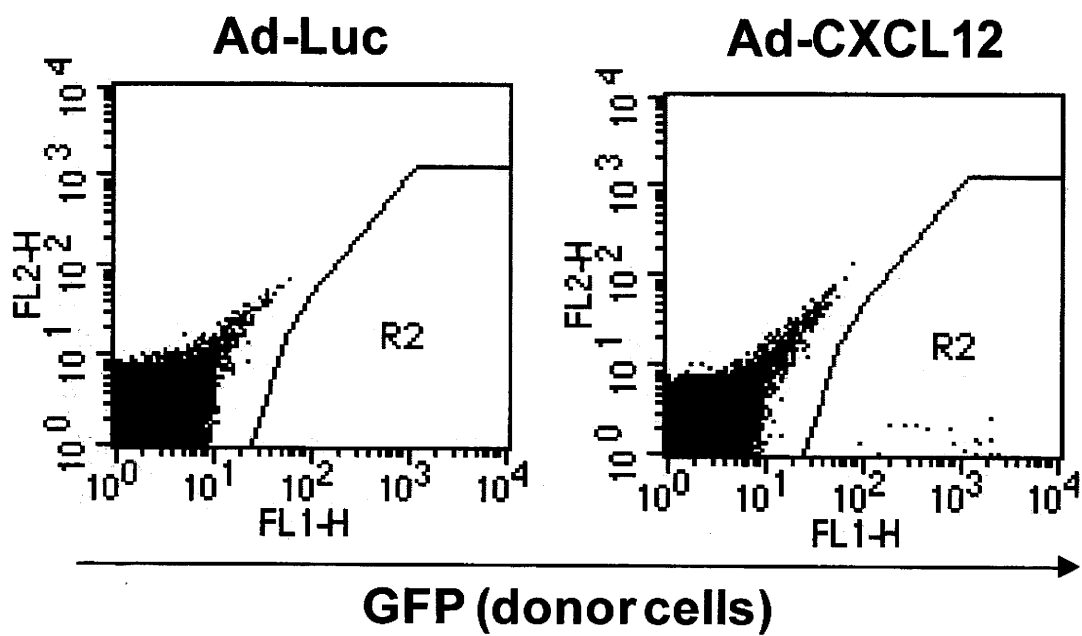
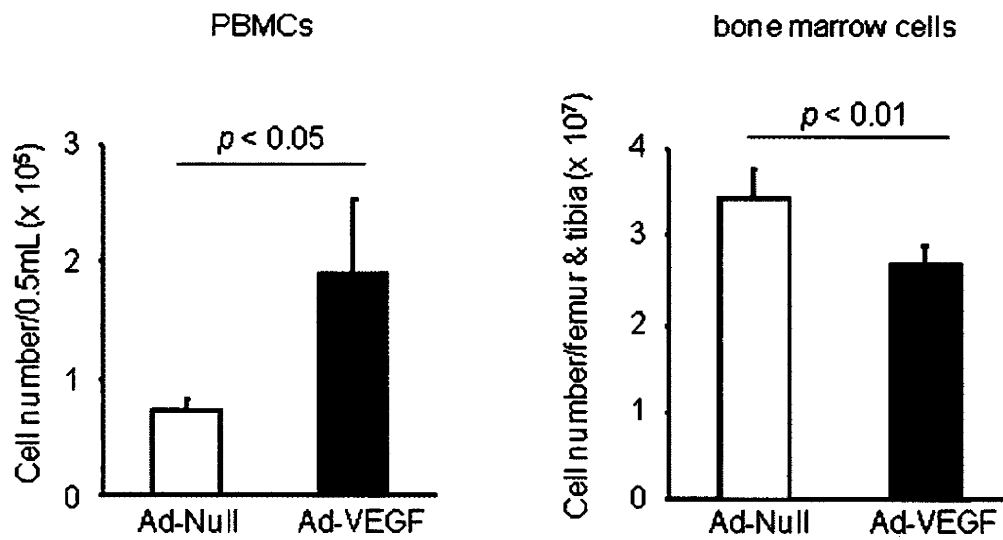


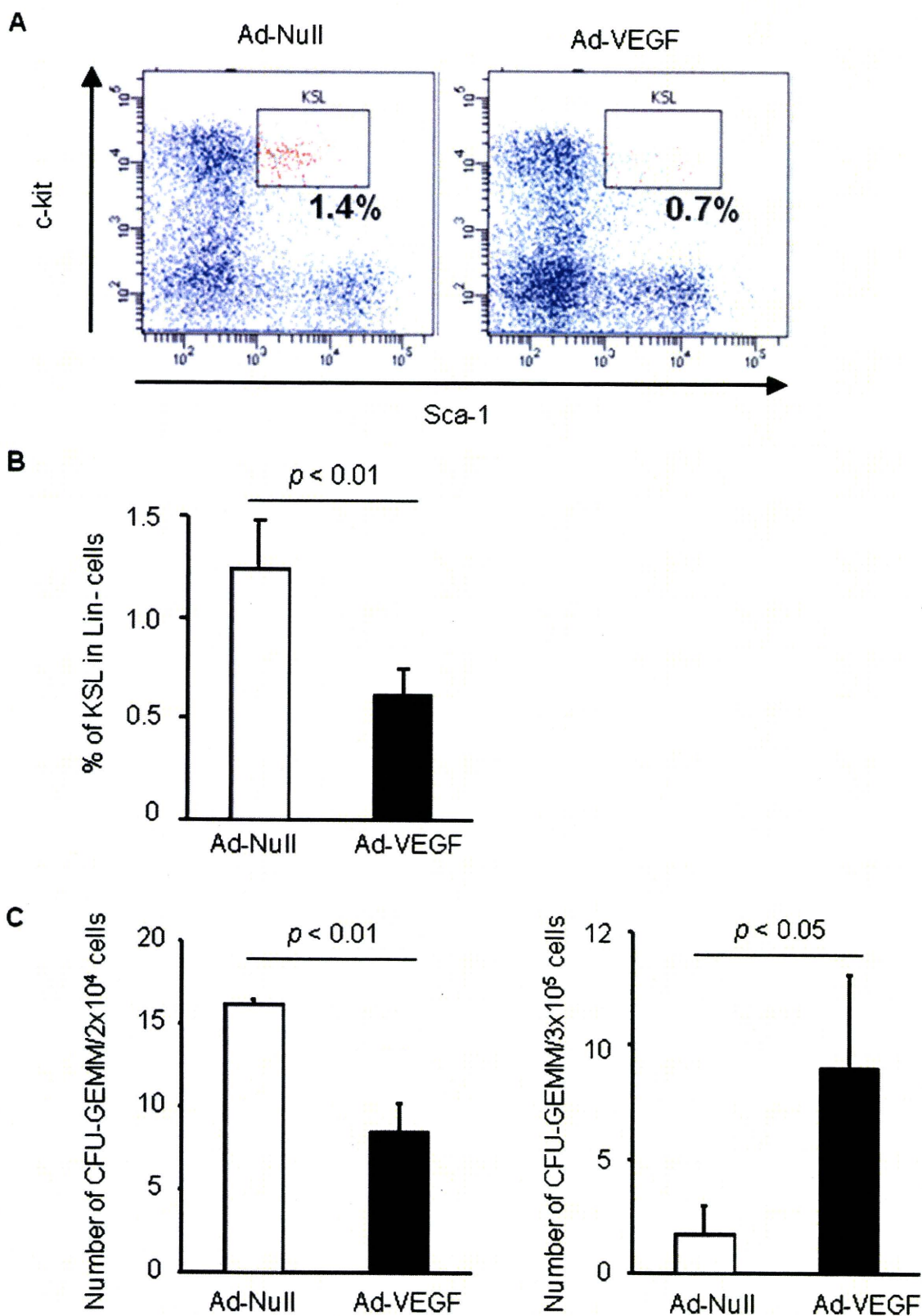
Fig. 1 GFP-expressing cells in bone marrow cells derived from Ad-CXCL12-injected mice before transplantation.

Table 1 Summary of transplantation study

	The number of mice which donor cells were detected	Chimerism
Ad-Luc	0/8	0%
Ad-CXCL12	7/12	0.06%



**Fig.2** Cell number of PBMCs and bone marrow cells 5 days after intravenous injection of Ad-CXCL12.



**Fig.3** Effect of VEGF on hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.

(C) left, bone marrow cells; right, PBMCs.



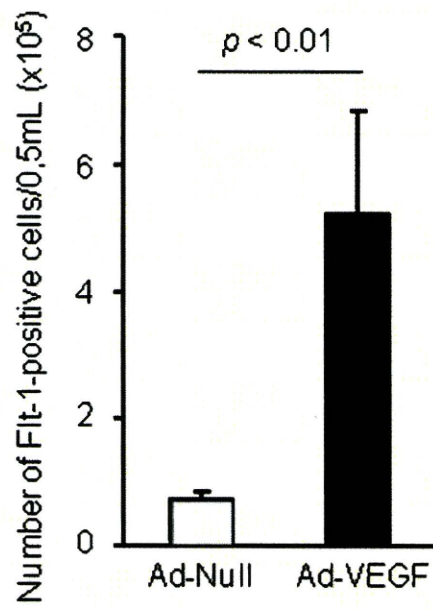
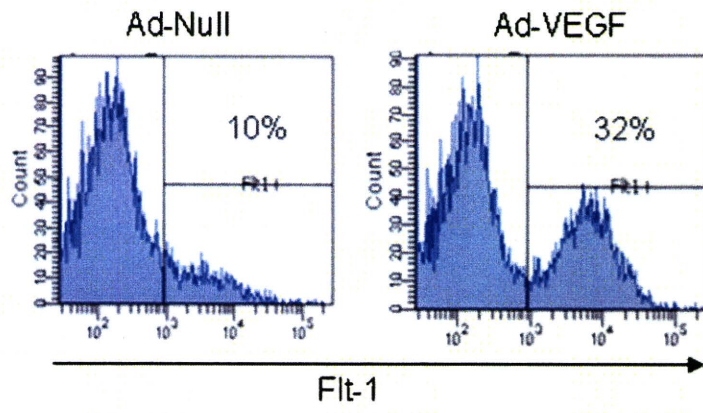


Fig.4 Elevation of FIt-1-positive cells in PBMCs in Ad-VEGF-injected mice.

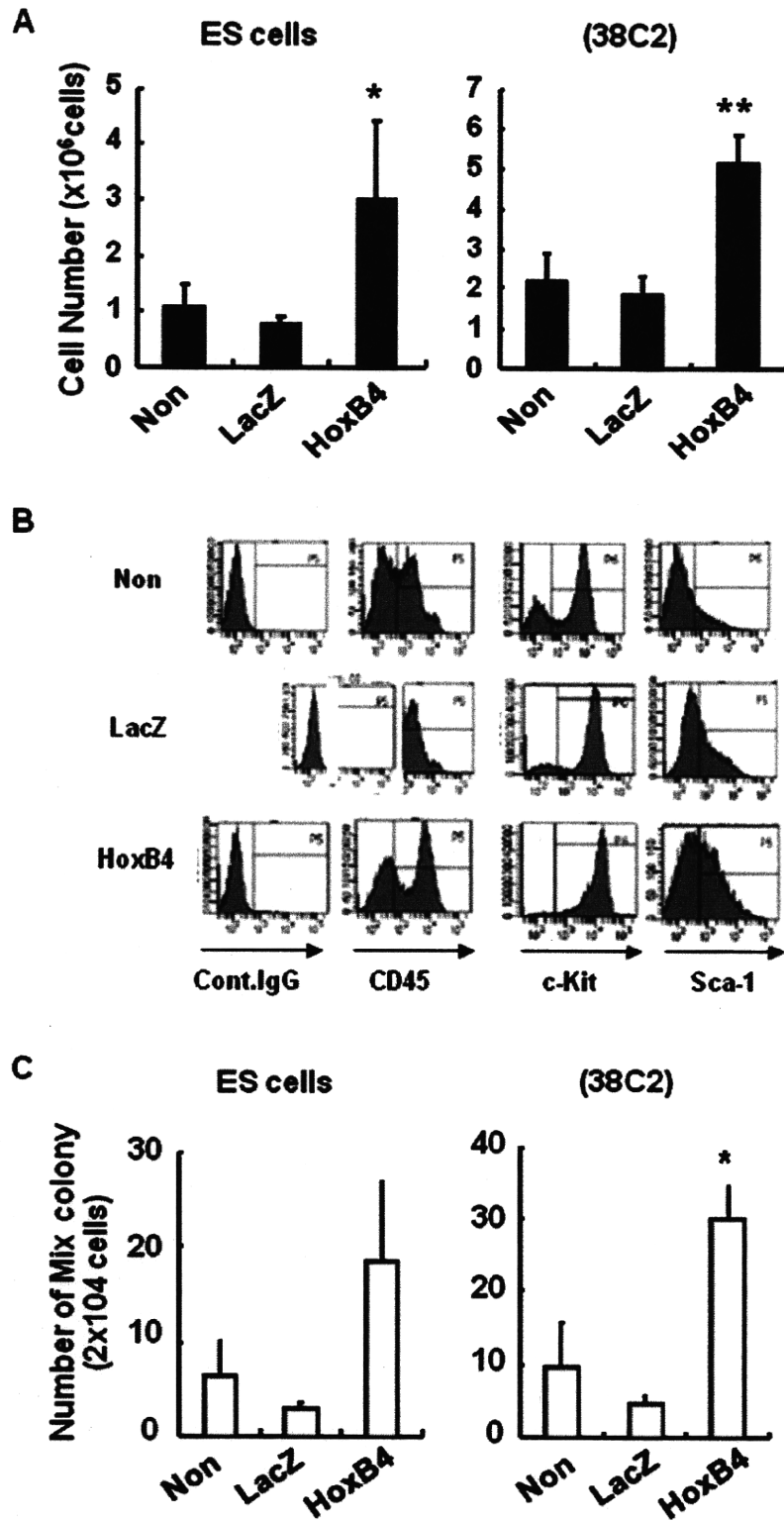


Fig. 5 Transient HoxB4 transduction augments the generation of hematopoietic cells from mouse ES and iPS cells.

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品等の品質評価技術の開発に関する研究

研究分担者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

研究要旨

ヒト間葉系幹細胞（hMSC）は心筋梗塞等の虚血性疾患に対して修復効果を示し、有力な新規治療ツールの一つとして期待されている。従来、hMSCの虚血組織保護・再生作用の機序についてはhMSCの組織細胞への分化によるものと考えられてきたが、近年ではhMSCから分泌されるサイトカインの役割が重要視されており、修復効果の一つである治療的血管新生についても密接に関与することが示唆されている。従って、hMSCを虚血性疾患に対する細胞・組織利用医薬品と考えた場合、ドナーの差やロット差によりサイトカイン分泌能に大きな差が生じることは、hMSCによる治療効果に影響を及ぼす可能性があり、品質管理上の問題となると考えられる。本研究では、虚血条件下におけるhMSCのサイトカイン分泌プロファイリングおよび複数ロットのhMSCにおけるサイトカイン分泌能の差を検討し、虚血後のサイトカイン分泌能予測因子について同定を試みた。DNAマイクロアレイを用い、54,613種類のcDNA配列（Probe Set）について虚血前の遺伝子発現量と虚血後のVEGF応答の相関を検討し、正の相関（ $p < 0.01$ ）を示す遺伝子17種（VSR1～17）を同定した。虚血時のVEGF応答性と相関するVSR遺伝子は、hMSCの虚血組織保護効果予測因子として有用である可能性があり、これらの遺伝子発現量をhMSCの虚血部位における治療効果予測マーカーとすることにより、hMSCの一定の治療効果を担保するための品質管理法が開発されることが期待される。

研究協力者

安田 智  
国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部 主任研究官

佐藤 光利  
東邦大学大学院薬学研究科  
薬物安全性学教室 准教授

吾月 遥  
東邦大学大学院薬学研究科  
薬物安全性学教室 修士2年

## A. 研究目的

ヒト骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell: hMSC) という 2 種の体性幹細胞が存在する。前者は骨髄中で自己複製しながら血球前駆細胞を産生する。骨髄中の造血幹細胞の維持には骨髄ストローマ細胞が必要である。骨髄ストローマ細胞は複雑な三次元網目構造を形成しており、造血幹細胞はその構造の中で未分化状態を維持したり分化したりしている。骨髄ストローマ細胞の一部の細胞集団は、培養条件によって骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞へと分化することから、間葉系幹細胞と呼ばれている。間葉系幹細胞については、その造血支持能に注目し、hMSC 併用移植による移植後造血系再構築促進効果が検討されている。また、骨再生・軟骨再生を目的とした再生医療に用いる細胞の供給源としても期待され、さらに、hMSC の免疫抑制能と炎症・組織障害部位への集積性に着目した移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や虚血性心疾患・末梢動脈疾患の治療に関する研究が活発化しており、有効性を示唆する報告も多い。

しかしながら、こうした hMSC の有効性に関する報告に関しては、その機序が必ずしも明らかではなく、従ってリスク評価に限界がある点が問題である。すなわち、hMSC を細胞・組織加工製品ないしその原材料として利用する場合には、可能な限り作用機序の解明を行い、有効性/安全性評価ないし品質評価のための細胞特性指標を同定することが重要である。たとえば、虚血性疾患の治療を目的とし、虚血部位に hMSC を投与し組織保護・再生等の治療効

果が認められる報告は数多いが、その機序については不明なことが多い。

hMSC の虚血性疾患に対する作用機序については、虚血部位に移動した hMSC が組織へと組み込まれ、組織細胞へと分化するためであると従来考えられてきた。しかし近年、1) 移植後の hMSC の分化割合が低い、2) hMSC の培養上清やサイトカインの直接投与によっても同様の効果が得られるなどの報告から、局所あるいは遠くに存在する目標部位に対してサイトカインを放出することで治療効果に貢献していることも示唆されている。hMSC からのサイトカイン分泌の役割が注目されており、中でも、修復効果の一つとして知られる治療的血管新生については、サイトカインの関与が大きいと考えられている。しかし、hMSC による虚血性組織の修復についての実態はまだ明らかになっておらず、虚血性疾患に対するその有効性を理解するためには、投与された細胞が置かれるストレスの多い環境下での細胞の挙動を理解することが重要となる。

そこで本研究では、*in vitro* で擬似的に再現した虚血条件下において hMSC を培養し、同時に通常条件で培養したものと比較を行うことで、虚血ストレスに対する hMSC の応答性を検討した。中でも血管新生関連因子に着目し、虚血条件下において特異的に分泌増加する血管新生関連サイトカインを探索し、遺伝子発現量が有意に増加したサイトカインに対して、さらに ELISA を実施し、実際の分泌量を含めた検討を行うことで、虚血ストレス下における hMSC の血管新生関連サイトカインに対する分泌プロファイリングを試みた。

hMSC を虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品と考えた場合には、ドナーの差やロット差によって製品の力価、あるいは力価に反映され得る生理活性物質の分泌能に大きな差が生じることが品質管理上の課題となり得る。加齢により hMSC の染色体上に変化が生じることが報告されており、この変化が細胞の生理的機能に影響を与え、潜在的に hMSC による細胞治療の効果を制限することも懸念される。成長因子や薬剤の併用、遺伝子導入などにより、hMSC の機能を高める試みも数多く行われているが、いずれにしても移植後に十分な治療効果を得るためには、使用される hMSC がどの程度の修復能力を持つかを予め知ることが重要であり、hMSC による効果を予測するためには、目的に則した幹細胞の特性解析指標が必要であると考えられる。

そこで本研究では、血管新生関連サイトカイン分泌能を予測するための指標を同定する目的で、まず、複数ロットの hMSC を同一条件下において培養し、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差に対する検討を試みた。次に、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差は、hMSC の虚血前における何らかの遺伝子発現量の差に関連するという仮説を立て、虚血前における遺伝子発現量と虚血条件下のサイトカイン分泌との相関関係を統計学的に解析し、hMSC の虚血環境における血管新生関連サイトカイン分泌能と相関する遺伝子を探索・同定した。

## **B. 研究方法**

### **B-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現変化**

#### **B-1-1 使用細胞および細胞培養**

骨髄由来 hMSC は、Lonza 社より入手した。各ロットの年齢・性別・人種に関する情報は表 1 の通り。

虚血条件下における hMSC の血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC (継代数 9 (PS#9)) を  $1 \times 10^4$  cells/well となるよう 96 穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza] に MSCGM SingleQuots [Lonza] を加えて調整した基本培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 80% コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の 96 穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、表 2 に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養し、Total RNA を抽出した。6 つのロット (A, B, C, F, G, H) について、同様の実験を行った。

#### **B-1-2 培養細胞からの Total RNA の抽出**

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN]、BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し、QIAGEN 社のマニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は NanoDrop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80°C にて冷凍保存した。

#### **B-1-3 虚血後における血管新生関連遺伝子**

## 発現量の測定

血管新生関連遺伝子発現量を網羅的に解析するために、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors [SA Biosciences, cat# PAHS-072] を用いた。測定した遺伝子は表3の通りである。

各ロットについて RNeasy Mini Kit [QIAGEN] を用いてサンプルを濃縮し、Total RNA が 1 $\mu$ g/10 $\mu$ L となるよう調整した後、SA Biosciences 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成した。

次いで、合成した cDNA を用いて同マニュアルに従い溶液を調整後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] にて RT-PCR を行い、各サイクルについてリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は表4の通りである。

クオリティーコントロールとして、上記のサイクリングプログラム後すぐに融解曲線プログラムを実行し、プレート上の各ウェルの PCR 産物に対して融解曲線を作成した。融解曲線の温度微分曲線において、80 $^{\circ}$ C 以上に出現するピークが 1 つだけであることを指標に PCR 産物の特異性を確認した。

検出された PCR シグナルからベースラインを設定し、これをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct : Threshold Cycle) を算出し、Ct 値 > 35 の遺伝子については発現がないものとみなした。各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては

$\beta$ -actin,  $\beta$ 2-microglobulin、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1、Ribosomal protein L13a の発現量を測定した。

データの正規化には、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis [SA Biosciences, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>] を使用した。

## B-1-4 統計解析

統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] を用いて、コントロール群および虚血群に対する Paired t-test により検定を行い、有意水準を危険率 1%未満 ( $p < 0.01$ ) として評価した。RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array は多変量解析 (multivariate index assay) の一種と考えられ、84 種の因子についての検定を同時に行う。そこで、期待擬陽性数を下げる目的で、有意水準は一般的な「危険率 5%未満 ( $p < 0.05$ )」よりも厳密にした。

## B-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化

### B-2-1 使用細胞および細胞培養

虚血条件下における hMSC の血管新生関連サイトカイン分泌変化を検討する目的で、B-1-1 と同様に hMSC (PS#9) を 96 穴細胞培養プレート上で培養後、さらに通常条件または擬似的虚血条件下で 24 時間培養し、培養上清を回収した。回収した上清サンプルは -80 $^{\circ}$ C にて冷凍保存した。

### B-2-2 虚血後における血管新生関連サイトカイン分泌量の測定

虚血後において遺伝子発現に有意な上昇

が見られた 5 種類のサイトカインについて、実際の分泌量およびその変化率を検討するために、Quantikine ELISA Kit [R&D] を用いて B-1-1 で回収した培養上清中の VEGF 濃度を測定した。測定は、R&D 社のマニュアルに従って行った。使用した ELISA Kit は表 5 の通りである。

### **B-2-3 統計解析**

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

血管新生関連サイトカインの濃度データについては Two-way ANOVA を行い、有意差が認められた場合には、多群比較の post-hoc test として Student-Newman-Keul test を行った。

血管新生関連サイトカインの濃度変化率は、虚血群の濃度とコントロール群の濃度という 2 つの独立変数の比である。すなわち、各濃度の対数を新たな独立変数とすれば、濃度変化率の対数はこれら 2 つの新しい独立変数の差で表わされる。一般に、2 つの独立変数の差の平均値は各独立変数の平均値の差として求められる。また、2 つの独立変数の差の標準偏差は、各独立変数の標準偏差の平方和の平方根として求められ、2 つの独立変数の差の自由度は各独立変数の自由度 (標本数-1) の和となる。これらをもとに、One-way ANOVA を行うことにより、血管新生関連因子の濃度変化率のロット間の差を評価した。有意水準は危険率 5%未満 ( $p < 0.05$ ) とした。

### **B-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能**

#### **と相関する遺伝子の探索**

#### **B-3-1 虚血前遺伝子発現量と虚血後 VEGF 分泌の相関関係の評価**

虚血後において有意なロット差が認められた VEGF 分泌に対して、VEGF 分泌能を予測する因子となり得る遺伝子を探索するために、6 ロットの hMSC における虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 分泌について相関関係を検討した。

虚血前の遺伝子発現量は、本研究で用いた 6 ロットの hMSC (PS#7 および PS#9) と GeneChip HG-U133Plus2.0 [Affymetrix (54,613 Probe Sets, 41,080 Reference Sequence Transcripts)] を用いて筆者の所属する研究室で過去に測定されたデータを利用した。このデータは hMSC の Total RNA から Affymetrix 社の Two-cycle プロトコルならびにハイブリダイゼーションの定法に従って遺伝子発現シグナルを取得し、これを GCOS ソフトウェア [Affymetrix] を用いて解析したものである。現在、データは米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースである Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録されている (Series# GSE7637, Sample# GSM184654-GSM184665)。なお、データの正規化には内部標準 Probe Set リストである MSK ファイル [Affymetrix] を用い、目標強度 (target intensity) は 10,000 としてある。この GeneChip データに次に示すフィルターをかけ、虚血後の VEGF 分泌量または変化率と相関のある遺伝子を抽出した。ここで抽出された遺伝子を、便宜上 VEGF 分泌能予測候補遺伝子 (VSR 遺伝

子：VEGF Secretion Related Candidate Gene) と名づけた。

・フィルター①

GeneChip HG-U133Plus2.0 における各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、「発現があるもの：P (Present)」、「発現があるかわからないもの：M (Marginal)」あるいは「発現がないもの：A (Absent)」として判定がなされる。6 ロットのうち半数以上 (つまり 3 ロット以上) で P と判定された Probe Set については、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に 6 ロットのうち P 判定されたものが 2 ロット以下の場合、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子の発現はないと判断した。

発現が見られる Probe Set については次のフィルターをかけ、発現が見られない Probe Set は棄却した。

・フィルター②

細胞特性指標の大切な要件の一つにシグナル/ノイズ比が大きいことが挙げられる。逆に細胞特性指標候補のロット間のばらつきが小さいことは、シグナル/ノイズ比が低くなることを意味することから避けるべきと考えられる。そこで、発現量データのロット間のばらつきが十分に大きい遺伝子を抽出する目的で、各ロットにおける発現量 (シグナル) の平均値の最低値と最高値の比が 3.0 倍以上ある Probe Set については次のフィルターをかけ、差が 3.0 倍より小さいものは棄却した。

・フィルター③

PS#7 または PS#9 における各 Probe Set の発現量と、治療効果をより直接的に反映すると考えられる PS#9 の hMSC における虚血後の VEGF 分泌量または変化率との間でスピアマンの順位相関係数を算出した。有意水準は危険率 1% 未満 ( $p < 0.01$ ) で評価し、以下 4 つの組み合わせ全てにおいて有意な正の相関がある Probe Set を抽出した。

① PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量

② PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率

③ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量

④ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率

スピアマンの順位相関係数および有意確率 ( $p$  値) の算出は、群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、Microsoft Excel [Microsoft] を用いて行った。

また、虚血後の VEGF 分泌におけるロット差が、単なる細胞数の増加によるものではないことを確認するために、CyQUNANT Cell Proliferation Assay Kit [Invitrogen] を用いて、虚血 24 時間後の hMSC の生存率 (=虚血群の細胞数/コントロール群の細胞数=虚血抵抗性) を測定し、同様に各 Probe Set の発現量との間のスピアマンの順位相関係数を算出し、 $p < 0.01$  で評価した。

### B-3-2 統計解析



群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

#### (倫理面への配慮)

Lonza 社の hMSC はヒト由来細胞であるが、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。このため国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程に倫理審査該当品目とはならなかった。

### C. 研究結果

#### C-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養後に回収した hMSC より Total RNA を抽出し、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array によって血管新生関連遺伝子の発現量を測定することで、コントロール群および虚血群における発現量を比較し、虚血後において有意に上昇するサイトカイン遺伝子を検討した。

RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors により 84 種の血管新生関連遺伝子の発現量を検討したところ、虚血後における hMSC では、レプチン (Leptin)、血管内皮細胞成長因子 A (VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A、以降 VEGF と省略する)、胎盤成長因子 (PlGF : Placental Growth Factor)、アンジオゲニン (Angiogenin)、 $\beta$ 1 型形質転換成長因子 (TGF- $\beta$ 1 : Transforming Growth Factor-beta1) の遺伝子発現に有意な上昇

が認められた (図 1~6)。

#### C-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化

虚血後の hMSC において遺伝子発現に有意な上昇が認められたレプチン、VEGF、PlGF、アンジオゲニン、TGF- $\beta$ 1 の 5 種類のサイトカインについて、通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した培養上清中の濃度を測定することで、hMSC から実際に分泌されるサイトカイン濃度を検討した。

レプチンは、虚血群においてロット F およびロット H で分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれのレプチン濃度は 11.3 pg/mL (ロット F)、8.9 pg/mL (ロット H) であった。他の 4 ロットにおいては有意な差は認められなかった (図 7, 8)。

VEGF は、虚血群において全ロットで分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれの VEGF 濃度は、1489 pg/mL (ロット A)、994 pg/mL (ロット B)、1780 pg/mL (ロット C)、1355 pg/mL (ロット F)、817 pg/mL (ロット G)、1410 pg/mL (ロット H) であった。また、各ロットにおける VEGF 分泌量および分泌変化率には有意なロット差が見られた (図 9, 10)。

PlGF は、コントロール群および虚血群における有意な差がないか、あるいはコントロール群での増加が見られる結果となった (図 11)。

アンジオゲニンおよび TGF- $\beta$ 1 については検出限界未満であった。それぞれの検出限界濃度は、6.0 pg/mL (アンジオゲニン)、

4.6 pg/mL (TGF- $\beta$ 1) であった。

### C-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索

虚血後の VEGF 分泌について有意なロット差が見られたことから、①PS#9 における遺伝子発現量と虚血時の VEGF 分泌量、②PS#9 における遺伝子発現量と虚血による VEGF 分泌変化率、③PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血時の VEGF 分泌量、④PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血による VEGF 分泌変化率、これら 4 つの組み合わせについてスピアマンの順位相関係数とその有意確率を算出し、hMSC における VEGF 分泌能と相関する遺伝子を探索した。

その結果、全ての組み合わせにおいて有意な相関が認められた Probe Set が 22 個検出された。このうち、VSR6、VSR8、VSR15 は 2 つの Probe Set、VSR9 は 3 つの Probe Set が重複してコードする遺伝子であり、検出された遺伝子は全部で 17 個であった (表 6, 7)。

一方、VSR12、VSR16、VSR17 を除く 14 遺伝子は、虚血下における生存率 (= 虚血抵抗性) に対しては、有意な負の相関を示した (表 8)。

## **D. 考察**

### D-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現変化

虚血環境下での MSC による血管新生や組織修復には、MSC から分泌されるサイトカインが関与していると言われている。これらの生理的過程において特定のサイトカ

インを持続的に分泌するには、転写レベルでの調節が必要である可能性が高い。そこで本研究では、コントロール群および虚血群における血管新生関連遺伝子発現量を比較することで、虚血後の hMSC において有意に発現が上昇するサイトカイン類の遺伝子を同定することを試みた。

PCR Array を用いた遺伝子発現変化に対する検討では、6 ロット全てにおいて遺伝子発現が上昇していたサイトカイン遺伝子は 5 種類であり、虚血環境下での hMSC による血管新生や組織修復には、hMSC から分泌されるレプチン、VEGF、PIGF、アンジオゲニン、TGF- $\beta$ 1 のこれら 5 種類のサイトカインが、寄与している可能性があると考えられる。

虚血条件下において遺伝子発現が上昇する機序の一つとして、低酸素誘導因子 (HIF-1 : Hypoxia-inducible factor-1) の関与が考えられる。HIF-1 は、通常酸素環境下においては分解されやすく、その機能が抑制されている状態であることが知られている。しかし、HIF-1 を分解する酵素は酸素濃度依存的に働くため、低酸素状態では分解が抑制され、HIF-1 の発現が上昇する。HIF-1 は核内へと移行し、低酸素応答性領域 (HRE : Hypoxia Responsive Element) に結合することで、遺伝子の転写調節に関与すると考えられている。HRE の配列としては 5'-RCGTG-3'が知られているが、この配列は Leptin、VEGF、PIGF、Angiogenin の mRNA の上流にも存在する。また、HIF-1 により発現が誘導されるとの報告もあることから、これら 4 種類の遺伝子については HIF-1 を介した機序により、遺伝子発現上昇が見られたと考えられる。

ただし、遺伝子発現変化が大きいものであっても、Ct 値が大きいものに関しては遺伝子発現量が少ないと考えられ、また遺伝子発現量はサイトカイン分泌と必ずしも相関しない可能性も残されている。つまり、hMSC からのサイトカイン分泌量を知るには、遺伝子発現量からの検討のみでは不十分と考えられる。従って、有意な発現上昇が見られたサイトカイン遺伝子については、実際のサイトカイン分泌量を検討する必要があると考えられる。そこで次に、虚血条件下における hMSC のサイトカイン分泌変化に関する検討を行った。

#### D-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化

虚血後の hMSC において遺伝子発現に有意な上昇が見られた 5 種類のサイトカインの内、分泌量および分泌変化率にも有意な増加が認められたものは VEGF とレプチンの 2 種類であった。

PIGF、アンジオゲニン、TGF- $\beta$ 1 に関しては、虚血群での遺伝子発現の上昇が見られたにも関わらず、実際のサイトカイン分泌においては有意な増加は認められなかった。その理由としては、遺伝子発現の上昇に遅れてサイトカイン分泌が起こることから、24 時間の培養時間では十分な分泌量を得られなかった可能性、あるいは代償的に分泌を抑制する何らかの機序が存在する可能性が考えられる。

RT-PCR では Ct 値が比較的低かった TGF- $\beta$ 1 が、ELISA では検出出来なかった原因としては以下の可能性も考えられる。TGF- $\beta$  は一般的な分泌タンパク質と同様にプレ-プロ構造で生合成され、分泌された

プロタンパク質は分子内で切断されることで活性型 TGF- $\beta$  が完成する。一方、プロタンパク質の N 末端側が除去されない場合は、Latency Associated Protein (LAP) が活性型 TGF- $\beta$  をマスクする潜在型として存在する。つまり、TGF- $\beta$  は生合成されただけでは活性が生じず、LAP を除去することで初めてその活性が現れることになる。本研究で用いた ELISA 系では潜在型 TGF- $\beta$  は検出出来ないとされており、産生された多くの TGF- $\beta$  が潜在型であったために ELISA では検出出来なかった可能性もある。

体内における血中濃度は、レプチンがおよそ 1,000~60,000pg/mL (1~60ng/mL)、VEGF がおよそ 200~1,100 pg/mL とされることから、今回のモデル系において生理的レベルに相当する分泌が得られたのは VEGF のみであると考えられる。このことから、VEGF は虚血刺激によって hMSC から分泌され、生理的効果を発揮する主要なサイトカインの一つであることが示唆される。VEGF については様々なアイソフォームが存在することも知られており、今回用いた ELISA では、そのうち VEGF<sub>165</sub> が測定の対象であった。VEGF<sub>165</sub> は比較的優れた効果を持つことが報告されているが、VEGF 遺伝子の発現上昇は他の VEGF アイソフォームの分泌にも影響すると考えられるため、これらの分泌量についてはさらなる検討が必要とされる。また、生体内の局所においてはより低いサイトカイン濃度であっても生理活性を及ぼす可能性があると考えられるため、今回の実験系においては低い分泌レベルであったレプチンをはじめ、他のサイトカインの役割についてはさらな

る検討が必要と考えられる。

一方、虚血時の hMSC による VEGF 分泌には、その量および変化率に有意なロット差が認められた。hMSC を虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品として考えた場合、ロット間における VEGF 分泌能の差は、投与された部位における hMSC の血管新生等の生理・薬理作用に影響を及ぼす可能性がある。移植後に十分な治療効果を得るためには、投与される細胞がどの程度の修復能力を持つかを予め知ることが重要であり、hMSC のサイトカイン分泌能および虚血環境応答性を評価するための指標が必要であると考えられる。虚血後の VEGF 分泌能の差は、全てのロットを同一条件下にて培養した結果より認められたものであることから、ロット間における VEGF 分泌能の差は培養前、つまりは hMSC の虚血前における何らかの遺伝子発現量の差に関連する考えられた。そこでこの仮説に基づき、虚血前における遺伝子発現量と虚血条件下のサイトカイン分泌との相関関係を検討し、虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索を行った。

### D-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索

虚血前の遺伝子発現量について解析を行い、虚血後の VEGF 分泌と相関する遺伝子を解析した結果、表 6 に示す 17 個の遺伝子 (VSR 遺伝子) が同定された。虚血前遺伝子発現量と虚血後 VEGF 分泌の相関関係の評価に関しては、いくつかのフィルターを利用した。

まず、遺伝子の発現が見られる Probe Set を選択することを目的として、フィルター

①をかけた。続いて、ロット間でのばらつきが小さい場合、信頼性の高い相関関係が得られにくくなる傾向が高くなることから、発現量にロット間でのばらつきが大きい遺伝子を抽出するために、フィルター②をかけた。さらに、フィルター③としてスピアマンの順位相関係数を算出し、PS#7 および PS#9 に共通して虚血後の VEGF 分泌量および虚血による VEGF 分泌変化率に有意な正の相関を持つ遺伝子を選び出した。相関係数として順位相関を選択した理由は、hMSC の虚血前における特定の遺伝子発現が虚血後の VEGF 分泌に影響する場合、虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 分泌は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためである。

hMSC を細胞・組織利用医薬品と考える場合、「虚血後の VEGF 分泌量」はその薬効・力価の尺度となり得ると考えられる。一方、「虚血による VEGF 分泌変化率」は治療反応性・虚血部位選択性の尺度となり得ると考えられる。また、PS#7 および PS#9 での VSR 遺伝子の発現量が、ともに PS#9 の細胞虚血後の VEGF 分泌量および虚血による VEGF 分泌変化率と有意に相関することから、VSR 遺伝子の発現量と VEGF の虚血応答との相関は、継代によるアーチファクトではなく、継代操作に拘わらず引き継がれる細胞固有の性質と考えられる。また、VSR12、VSR16、VSR17 を除く遺伝子は虚血抵抗性に関しては逆に有意な負の相関を示し、生存している細胞が少ないほど、VEGF 分泌は上昇する結果となった。このことより、VEGF の分泌上昇は単なる細胞数の増加によるものではないことと、むしろ虚血ストレスの影響を受けやすい hMSC