

Fig. 3. Chemotactic activity of rat MSCs. (A) Preferential accumulation of rat MSCs at tumor sites. The liver tumor of luciferase-expressing RCN-H4 rat colon cancer cells [67] was formed in F344 nude rats (left panel). A representative tumor-derived luminescence image 25 days after tumor inoculation using IVIS™ (Xenogen). After Dil labeling (Invitrogen, Eugene, OR), fluorescent-labeled MSCs (4×10^6) were intravenously injected into the portal vein of tumor-bearing rats, and Dil-labeled MSCs were detected under a 594-nm excitation light 4 days after the MSC portal injection (middle panel). Right panel: counterstaining with eosin. Original magnification $\times 40$. (B) RT-PCR analysis of chemokines and their receptors in rat MSCs. GAPDH represents an internal control. (C) Chemotactic assay of rat MSCs. The supernatant that cultured RCN-H4 cells (1×10^5) for 24 h in a medium with 0.1% fetal calf serum (FCS) was used as the tumor CM for the transwell chamber assay (1 ml/well; 8- μ m pore size). After MSCs or fibroblasts (5×10^3) were plated into the upper chamber (0.3 ml) and incubated for 20 h, transmigrated cells were stained with Calcein AM (Invitrogen) and fixed with 60% methanol. Mean transmigrated cells from 5 random fields/conditions are shown. *, $p < 0.05$ (Student's *t*-test). (D) Enhanced migration of rat MSCs by tumor CM. Rat MSCs (1×10^5) were plated and scratched using a pipet. Cell motility was evaluated within 24 h. Cells were stained with Calcein AM (Invitrogen).

During fetal development, as well as in the adult stage, MSCs circulate in the bloodstream to settle down emerging sites of hematopoiesis through CXCR4 [32,55]. Therefore, the CXCL12/CXCR4 axis should be a cue for the migration of MSCs. For example, with regard to the preferential accumulation of MSCs at tumor sites, a global gene expression analysis by Menon et al. [56] demonstrated that CXCL12 expression was enhanced in rat MSCs that were exposed to tumor cell conditioned medium (CM) (4.25 fold increase). CXCR4 was constitutively expressed by MSCs (Fig. 4A). As a consequence, Menon et al. [56] reported that increased CXCL12 production by MSCs acts in an autocrine fashion and is required for migratory responses to tumor sites. In support of this evidence, a classical transwell chamber assay demonstrated that tumor cell CM substantially contains chemotactic factor(s) to MSCs (Fig. 4B). The tumor cell CM was also capable of

enhancing random migration of MSCs (Fig. 4C). This evidence strongly supports the notion that CXCL12 serves, at least, as an important chemotactic factor for the migration of MSCs.

It is generally believed that CXCL12 (SDF-1) mediates many disparate processes via a single cell surface receptor known as CXCR4. However, Burns et al. [57] have recently reported that an alternate receptor, CXCR7, binds with high affinity to CXCL12. Unlike many other chemokine receptors, ligand activation of CXCR7 does not sufficiently induce migration in tumor cell lines, whereas it provides cells with a growth and survival advantage and increased adhesion properties. As shown in Figs. 4A,D, CXCR7 was constitutively expressed by rat MSCs, and even the use of CXCR4-specific antagonist AMD3100 [58] could not completely block the chemotactic migration of MSCs that were exposed to tumor

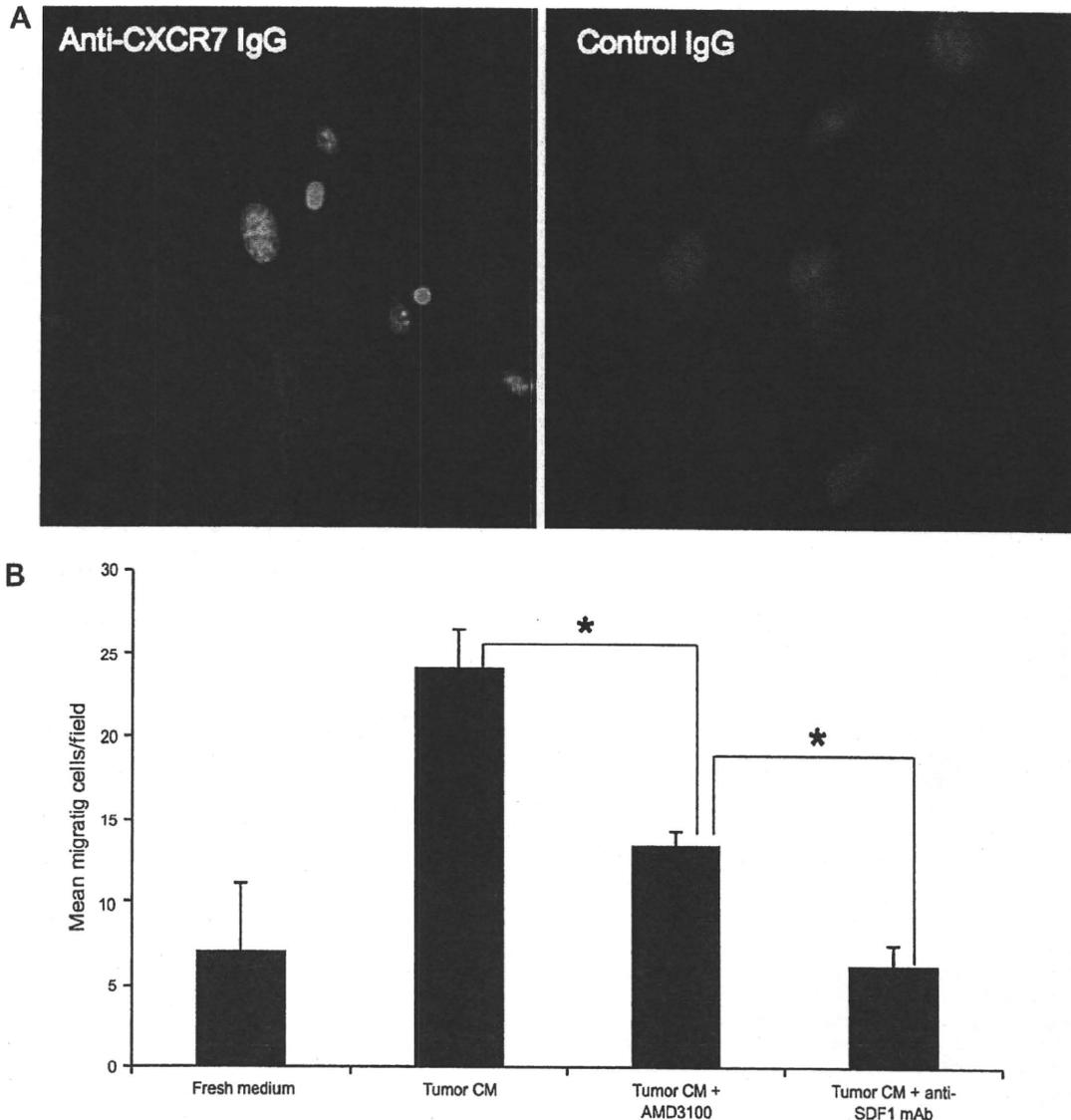


Fig. 4. CXCR7 expression in rat MSCs. (A) Immunostaining of rat MSCs using anti-CXCR7 antibody (#LS-A1893; MBL, Nagoya, Japan). Right panel: control IgG staining. Nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (B) Blockade of the CXCL12/CXCR4 axis in rat MSCs. Trans-well chamber assay in Fig. 3C was conducted in the presence of AMD3100 (final 100 μ M; Sigma-Aldrich) or anti-SDF-1 monoclonal antibody (final 5 μ g/ml; R&D systems, Minneapolis, MN). Mean transigrated cells from 5 random fields/conditions are shown. *, $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

cell CM (Fig. 4E). Anti-SDF-1 (CXCL12) neutralization antibodies [59] showed a sufficient blockage of the migration. An inhibitory difference between AMD3100 and Anti-SDF-1 antibodies appears to represent CXCR7-mediated migration in rat MSCs. Although the cell type difference may be considered in this event, it is likely that CXCR7 also plays a crucial role for cellular trafficking of MSCs in processes associated with tumors and tissue repair.

4. Conclusion

Cell transplantation strategies have emerged as a potential approach to restore form and function to damaged tissues, and to thwart the progression of cancer. While transplanted

MSCs that produce various differentiated cell types are responsible for generating tissues, it is most important to unequivocally identify and track the transplanted cells in the host over the study period. Systemic delivery of manipulated MSCs indeed provides a feasible therapeutic approach for cell therapy. However, to minimize unexpected complications in clinical settings, it is better to employ a more selective strategy for tissue-specific targeting. For example, a catheter-based delivery method potentially allows for organ-selective gene transfer in animal models, including the pig [60–63]. Therefore, based on our data (Fig. 3), an intra-arterial delivery of MSCs through a catheter may be a feasible and selective method for delivery towards target sites (Fig. 5).

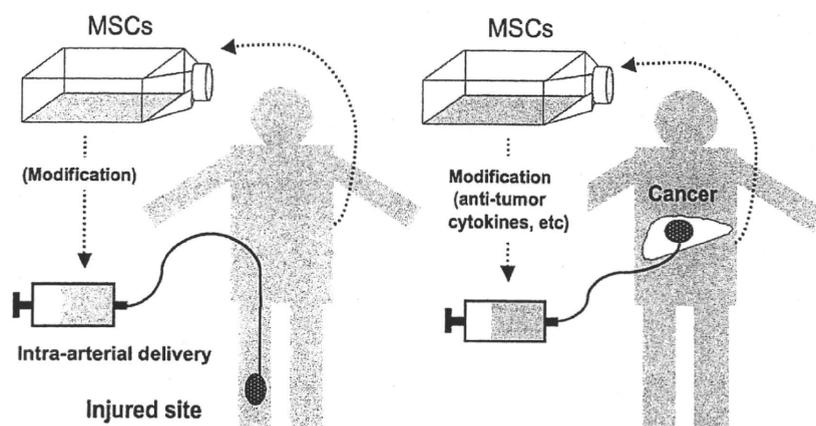


Fig. 5. Catheter-based selective tissue delivery of MSCs. Based on observations that MSCs can be delivered to a target tissue through an artery, experimental results described in the text explain possible clinical applications in which a catheter-based intra-arterial delivery of MSCs may facilitate selective tissue repair (A) or cancer targeting (B). In the case of cancer therapy, MSCs may need appropriate modifications with exogenous gene expression (e.g., interferon- β) [36].

MSCs can be isolated from different tissues other than bone marrow, and have been isolated from adipose tissue, liver, tendons, synovial membrane, amniotic fluid, placenta, umbilical cord and teeth [16,18,19,64]. However, the best cellular source for a particular use remains unknown, and even the appropriate culture conditions for the best differentiation of MSCs requires investigation. Since the therapeutic potential of MSCs is expected to be extremely high, cellular fate after the *in vivo* transfer of MSCs needs to be extensively investigated. Synergized with modern advances in optical imaging, the photogenic rat system provides innovative tools and a new platform on which to further our understanding of matters concerning stem cell biology. Spatio-temporal information gleaned from use of the rat system should accelerate the development of therapeutic strategies for human diseases. For additional readings on the use of bone marrow transplantation for autoimmunity, we refer the reader to the companion papers published in this special issue [68–78].

Acknowledgments

We wish to thank all personnel in the Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School. This study was supported by grants to E.K. from the Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation program of the Japan Health Science Foundation (2004–2006), and the “High-Tech Research Center” Project for Private Universities: Matching fund subsidy, and the COE program from MEXT HAITEKU (2003–2007). The transgenic rat embryos are available from the Health Science Research Resources Bank (hsrrb@osa.jhsf.or.jp), National Bio Resource Project for the Rat (nbrprat@anim.med.kyoto-u.ac.jp), or Comparative Medicine Center and Research Animal Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, MO 65211, USA (Dr. John K. Critser: critserj@missouri.edu).

References

- [1] Murakami T, Kobayashi E. Color-engineered rats and luminescent LacZ imaging: a new platform to visualize biological processes. *J Biomed Opt* 2005;10(4):1204:1–10.
- [2] Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, et al. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 2000;24:23–5.
- [3] Hallbergson AF, Gnatenco C, Peterson DA. Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair. *J Clin Invest* 2003;112:1128–33.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
- [5] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10711–6.
- [6] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282–6.
- [7] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775–9.
- [8] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779–82.
- [9] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364–70.
- [10] Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11917–23.
- [11] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9–20.
- [12] Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211:27–35.
- [13] Contag CH, Bachmann MH. Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:235–60.
- [14] Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003;300:87–91.

- [15] Hoffman RM. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer* 2005;10:796–806.
- [16] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71–4.
- [17] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105:829–41.
- [18] Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006;174:249–82.
- [19] Sethe S, Scutt A, Stolz A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006;5:91–116.
- [20] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83–92.
- [21] Mendelow B, Grobicki D, de la Hunt M, Katz J, Metz J. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. *Br J Haematol* 1980;46:15–22.
- [22] Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocyte and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992;102:314–51.
- [23] Rickard D, Sullivan T, Shenker B, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994;161:218–28.
- [24] Herbertson A, Aubin J. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone* 1997;21:491–500.
- [25] Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:570–85.
- [26] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875–84.
- [27] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2000;97:3213–8.
- [28] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001;19:219–25.
- [29] Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004;103:1662–8.
- [30] DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107:275–81.
- [31] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 2004;29:1971–9.
- [32] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004;104:2643–5.
- [33] Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 2004;22:415–27.
- [34] Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:586–91.
- [35] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreoff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603–8.
- [36] Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1593–603.
- [37] Wakitani S, Saito T, Caplan A. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18:1417–26.
- [38] Ferrari G, Cuaella G, Angelia D, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–30.
- [39] Dezawa M, Ishikawa M, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 2005;309:314–7.
- [40] Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003;53:697–702.
- [41] Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005;68:1940–3.
- [42] Sampaoleai M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pallegriano MA, et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003;301:487–92.
- [43] Sampaoleai M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;444:574–9.
- [44] Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005;65:3307–18.
- [45] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650–9.
- [46] Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2001;4:325–37.
- [47] Kuniyasu H, Abbruzzese JL, Cleary KR, Fidler IJ. Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:681–5.
- [48] Murphy PM, Baggolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145–76.
- [49] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121–7.
- [50] Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002;16:1–4.
- [51] Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptor and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci* 2004;36:71–8.
- [52] Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283:845–8.
- [53] Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50–6.
- [54] Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62:1832–7.
- [55] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396–402.
- [56] Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin YS, Koneru M, et al. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells* 2007;25:520–8.
- [57] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 2006;203:2201–13.
- [58] De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:581–7.

- [59] Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta1 integrin. *Cancer Res* 2003;63:6751–7.
- [60] Takeda S, Takahashi M, Sado Y, Takeuchi K, Hakamata Y, Shimizu H, et al. Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1–5 vectors in vitro and in vivo. *Nephron Exp Nephrol* 2004;96:119–26.
- [61] Fujishiro J, Takeda S, Takeno Y, Takeuchi K, Ogata Y, Takahashi M, et al. Gene transfer to the rat kidney in vivo and ex vivo using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1385–91.
- [62] Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 2006;13:1696–702.
- [63] Haga J, Wakabayashi G, Shimazu M, Tanabe M, Takahara T, Azuma T, et al. In vivo visualization and portally repeated transplantation of bone marrow cells in rats with liver damage. *Stem Cells Dev* 2007;16:319–28.
- [64] Bianco P, Gheron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1663–8.
- [65] Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. Firefly rats as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 2006;81:1179–84.
- [66] Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, et al. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ and GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:289–96.
- [67] Osawa I, Murakami T, Uemoto S, Kobayashi E. In vivo luminescent imaging of cyclosporine A-mediated cancer progression in rats. *Transplantation* 2006;81:1558–67.
- [68] Abraham N, Li M, Vanella L, Peterson S, Ikehara S, Asprinio D. Bone marrow stem cell transplant into intra-bone cavity prevent Type 2 diabetes: role of heme oxygenase-adiponectin. *J Autoimmunity* 2008;30:128–35.
- [69] Boren EJ, Cheema GS, Naguwa SM, Ansari AA, Gershwin ME. The emergence of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in rheumatic diseases. *J Autoimmunity* 2007;30(1–2):90–8.
- [70] Burt R, Craig R, Cohen B, Suffit R, Barr W. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: What have we learned? *J Autoimmunity* 2008;30:116–20.
- [71] Deane S, Meyers F, Gershwin M. On reversing the persistence of memory: Hematopoietic stem cell transplant for autoimmune disease in the first ten years. *J Autoimmunity* 2007;2008(30):180–96.
- [72] Gershwin ME. Bone marrow transplantation, refractory autoimmunity and the contributions of Susumu Ikehara. *J Autoimmunity* 2008;30:105–7.
- [73] Ikehara S. Innovative BMT method for intractable diseases. *Immunol Res* 2007;38(1–3):251–60.
- [74] Marmont A. Will hematopoietic stem cell transplantation cure human autoimmune diseases? *J Autoimmunity* 2008;30:145–50.
- [75] Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmunity* 2008;30:121–7.
- [76] Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, et al. Hunt for pluripotent stem cell – regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmunity* 2008;30:151–62.
- [77] Rezvani A, Storb R. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Autoimmunity* 2008;30:172–9.
- [78] Sonoda Y. Immunophenotype and functional characteristics of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: the significance of the intra-bone marrow injection. *J Autoimmunity* 2008;30:136–44.

2. ラットを基盤とした *in vivo* バイオイメージング

村上 孝, 小林英司

われわれは、これまで医療技術を模倣できる動物資源に注目し、体サイズの大きいラットを用いた臓器移植研究を行ってきた。特に、移植された細胞系譜の運命を追跡するため、genetic marker probeを広範な組織に発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作製してきた。数年の歳月をかけて構築した「color-engineered rat」システムでは、蛍光と発光の双方のレポーターシステムを利用することが可能であり、生体内における移植細胞の挙動について詳細な分析を行うことができる。本稿では、われわれが行ってきた「ラット」を基盤とした研究とそのイメージングの利用について概説する。

はじめに

ヒトゲノム情報を含む先端医学の成果は、マウスやラットなどのゲノム情報と比較され、それぞれ臓器固有の発生や分化機構の解明に大きく貢献している。

[キーワード&略語]

トランスジェニックラット, 臓器移植, 動物資源, 生体内イメージング

CsA : cyclosporine A (シクロスポリンA)

CXCR4 : CXC chemokine receptor 4 (CXCケモカイン受容体4)

DSG : 15-deoxyspergualin (デオキシスパーガリン)

ES細胞 : embryonic stem cells

GFP : green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)

Luc : luciferase (ルシフェラーゼ)

MSC : mesenchymal stem cell (間葉系幹細胞)

SDF-1 α : stromal-derived factor 1 alpha (ストロマ細胞由来因子1 α)

Tg : transgenic (トランスジェニック)

さらに、GFPの特徴や簡便な利用性をきっかけに、生きた細胞をリアルタイムに観察できるバイオプローブの開発や細胞や小動物を生きた状態で観察できるバイオイメージング技術が大きく進歩している。現代の医生物学研究では、機能分子の挙動が生きた細胞や実験動物個体内での生体内イメージング情報として捉えられようとしている。

われわれの研究の出発点は臓器移植^{*1}にあり、「移植された臓器や組織がどのような運命をたどるのか」、また「移植臓器の生着をいかに延長させることができるか」が焦点であった。心臓や肝臓などの実質臓器を安定して顕微鏡下手術 (マイクロサージェリー) によ

※1 臓器移植

移植片 (臓器・組織: ドナー) がレシピエント (移植を受ける側) に受け入れられるか否かは遺伝的な近縁度に左右される。「同種同系」では拒絶反応は起こらず、「同種異系」もしくは「異種」移植の際に拒絶反応が生じる。免疫学的な拒絶反応の程度は主要組織適合性複合 (major histocompatibility complex: MHC) 抗原の差異に依存する。

in vivo bio-imaging using the rat

Takashi Murakami/Eiji Kobayashi : Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University (自治医科大学分子病態治療研究センター臓器置換研究部)

表 color-engineered rat

ラットの系統	プロモーター	マーカー
Wistar	CAGGS ^{a)}	GFP ^{b)}
Lewis	CAGGS	GFP
Lewis	Albumin	GFP
Dark Agouty	CAGGS	LacZ (β -ガラクトシダーゼ)
Lewis	ROSA26	LacZ (β -ガラクトシダーゼ)
Wistar	Albumin	DsRed2 ^{c)}
Wistar	CAGGS	DsRed2, GFP (Cre/loxPシステム)
Lewis	ROSA26	ルシフェラーゼ ^{d)}
Lewis	ROSA26	DsRed単量体

a) cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin promoter, b) green fluorescent protein (*Aequorea victoria*), c) DsRed (*Discosoma*), d) luciferase from the firefly (*Photinus pyralis*)

り移植できる実験動物のサイズは「ラット」にある¹⁾。ラットは、マウスと比べて体サイズが10倍も大きいため、特定部位へのカテーテル挿入など、臨床医学で利用される種々の技術を応用することができる。われわれは、実際の医療応用への視点から「医療技術を模倣できる動物資源」に注目し、移植・再生医療のためのモデル動物開発を行ってきた。本稿では、われわれがこれまで行ってきた蛍光・発光ラットのモデルとバイオイメージングを用いた研究の例を紹介したい。

1 蛍光タンパク質を発現する トランスジェニックラット・システム

実験動物としての歴史では、マウスよりもラットの方が早く医学研究に応用されてきた背景があり、特に薬理学や脳神経科学の分野におけるラットの実験データは現在の臨床医学・薬学研究の礎となっている¹⁾。ラットにトランスジェニック技術が応用されたのはマウスに遅れること約10年、1990年代ははじめになる^{2) 3)}。これまでトランスジェニック (Tg) ラットの作製では、受精卵膜がマウスのものに比べて脆弱なため、その作製効率が悪いとされていた。しかし、高度なマイクロインジェクション技術が安定して行われるようになり、現在では高率に遺伝子導入個体を得ることができるようになってきている。発現されるcDNAの性質に依存するものの、1匹のTgラットを得るためには少なくとも100個の受精卵にマイクロインジェクションする必要がある。また、広範な組織に発現可能

なプロモーターを有するベクターが用いられても、組込まれた染色体の位置やコピー数などの要素によって、発現する臓器や発現量も異なる性質がある。したがって、広い用途でのTgラットのライン化は必ずしも容易ではない。

生きた細胞を励起光下で観察できるGFPは、細胞動態観察のみならず細胞内タンパク質の挙動を観察する『biological light probe』として現代のバイオサイエンスを支える重要なアイテムになっている⁴⁾。赤橙色や青色などの蛍光タンパク質との組み合わせにより、細胞機能を「色分け」することができる。傷害を受けた組織の機能的回復を目指す再生医学研究では、移植した細胞や組織の運命を追跡する研究は応用的な医療技術への方向性を決める重要な律速段階となる。したがって、細胞機能を「色分け」し、移植細胞が機能回復にどのように関与するか評価できるシステムはきわめて重要な意味をもつ。生体イメージング技術が著しく発展した結果、応用的なバイオ研究を目指す研究者にとっては、種々のバイオプローブをもつトランスジェニックラットの利用価値は高く、移植された細胞や組織の動態を『光』として追跡することが可能である。臓器移植研究への必要性からはじまった「color-engineered rat」(表)の開発も進み、9種類が再生医学を含むさまざまな研究分野に利用されている。

われわれの作製したCAG/GFP-LEW Tgラットは中枢神経系などで輝度が強く、神経前駆細胞を用いた

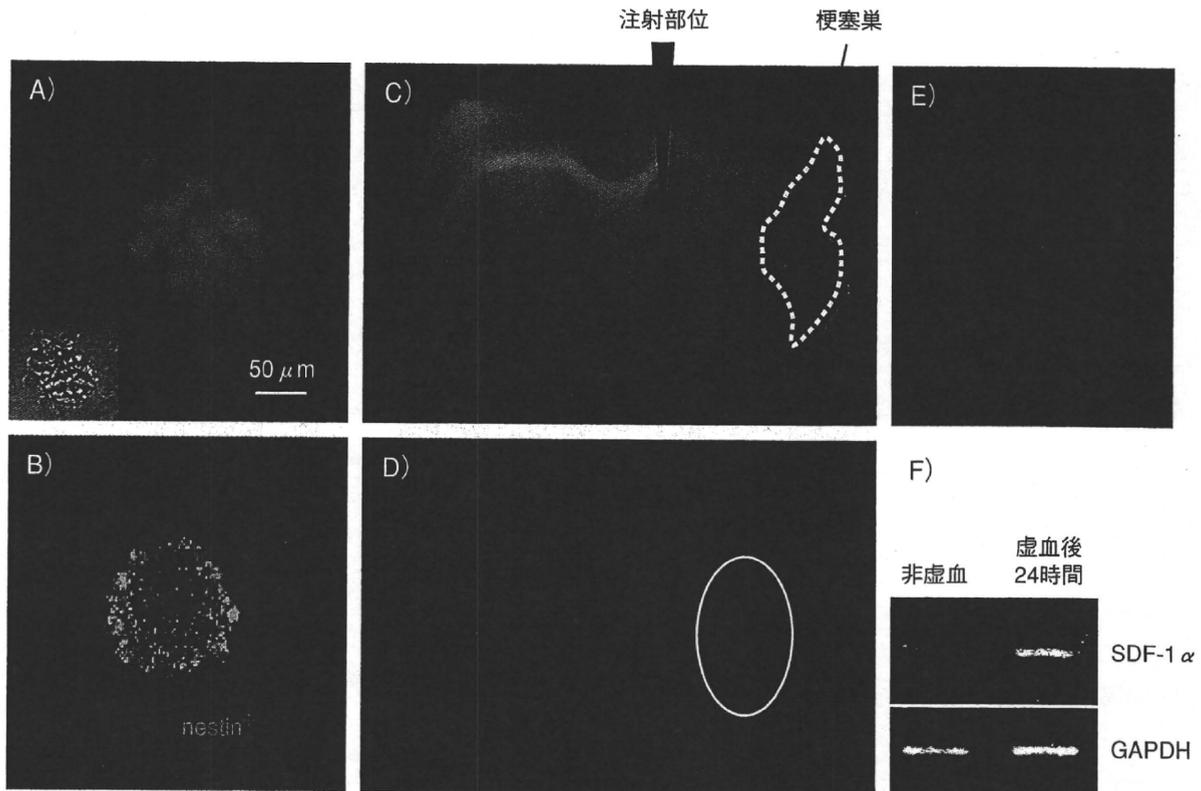


図1 GFP-Tgラットを用いた神経前駆細胞の動態

A) CAG/GFP-LEW Tgラット (胎生14.5日) から分離・作製した神経前駆細胞集塊 (20日間培養). 489nmの励起光下でGFPの蛍光が観察される. B) 神経前駆細胞集塊におけるCXCR4 (赤) とnestin (緑) の発現. C) ラットに実験的脳梗塞を作製し, 5日後にGFP⁺神経前駆細胞を定位脳手術的に脳室内に注入した際の模式図. D) C標本を489nmの励起光下での観察. 梗塞部位にGFP⁺神経前駆細胞が集積 (注入後28日目). E) Dの拡大画像. F) 梗塞部位 (24時間後) におけるSDF-1 α のRT-PCR解析. CXCR4のリガンドであるSDF-1 α の発現が増加 (文献1, 5より転載)

再生医学研究に応用されている^{5)~7)}. 例えば, 胎生14.5日から作製した神経前駆細胞は, 脳質内に投与すると実験的脳梗塞部位に集積する性質がある (図1). この主な細胞集積にはケモカイン受容体であるCXCR4やスフィンゴシン1-リン酸 (sphingosin-1-phosphate: S1P) 受容体の関与を示唆する結果が得られている^{1) 8)}. これらの受容体は7回膜貫通G-タンパク質結合型受容体として, 走化性, 細胞運動, 細胞接着などを活性化することができる.

また, われわれは肝特異的にDsRed2 (赤橙色) を発現するラット⁹⁾ やCre/loxP (DsRed2/GFP) Tgラットなども開発している¹⁰⁾. アルブミンプロモーターで作動するAlb-DsRed2 Tgラットから骨髓細胞を採取し, 肝傷害を加えたラットに門脈投与すると, 骨髓細胞が傷害肝内でアルブミン産生細胞に変化している様子が観察される (図2 A~C). また, Cre/loxP

(DsRed2/GFP) ダブルレポーターラットでは, 下肢移植による筋肉の融合により, GFPの発現が観察することができる (図2 D~G). しかし, このような蛍光タンパク質を用いた個体内での細胞・組織動態が観察できるようになるまでには, 特定の生物現象が時間的に決定されている必要がある.

2 ダブルTgラット作製とその応用

前述の蛍光タンパク質の検出には励起光源を必要とするが, 発光タンパク質の「光」を指標に評価する系がある. 例えば, ホタル由来のルシフェラーゼは, 高感度で組織透過性と定量性に優れた光 (フォトン) を発生し, 目的とする細胞や組織における遺伝子発現をリアルタイムに追跡することを可能にする. 生体を透過する最適な光 (600nm) が得られるルミネセンス法は検出感度と定量性の点で非常に有利である. この発

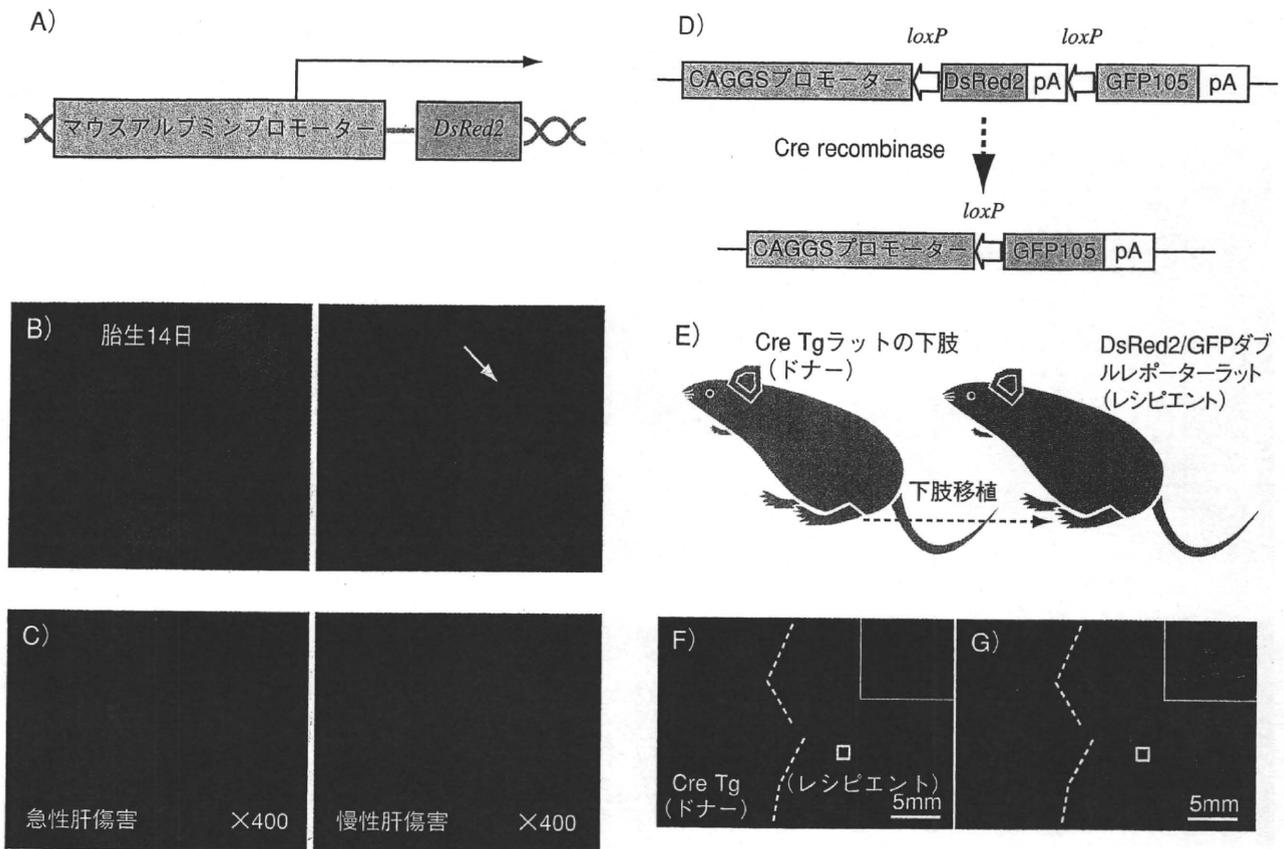


図2 Alb-DsRed2 Tg ラットと Cre/loxP (DsRed2/GFP) によるダブルレポーターラット

A) Alb-DsRed2 Tg ラットはマウスアルブミンプロモーター下でDsRed2を肝特異的に発現する。B) DsRed2の肝特異的発現は胎生14日から観察される。右図は560nmの励起光下でDsRed2の蛍光を観察(矢印は肝臓)。C) 四塩化炭素による肝傷害ラットにAlb-DsRed2 Tg ラットの骨髄細胞を門脈内投与した。急性肝傷害と比較すると慢性肝傷害では骨髄細胞細胞由来するDsRed陽性アルブミン産生細胞が増数する(投与後60日目で約60倍)。D) DsRed2/GFPによるダブルレポーターの模式図。Creの作用によりDsRed2が除去され、GFPが発現する。E) Cre-Tgラットの左下肢(ドナー)をDsRed2/GFPによるダブルレポーターラット(レシピエント)に移植する際の模式図。F) 移植直後ではDsRed2の蛍光が観察される。点線は境界を示す。G) 移植4週間後では筋肉が融合し(Creが作用)、レシピエントとの融合部でGFPの蛍光が観察される。点線は境界を示す(文献1より転載)

光原理に基づく場合は生体に「基質」を投与することで細胞内エネルギー(ATP)に依存した光を捕捉することができ、細胞生存と共役した画像イメージが得られる。すなわち、個体内における特徴的な生物現象をフォトン数により定量的に観察ができる。また、生体に与える侵襲も最小限であるため、再生移植治療モデルの長期的な観察に優れている。このような視点から開発されたのが、基質(ルシフェリン)存在下で全身が発光するルシフェラーゼ-Tgラットである(図3A, B)¹¹⁾。

骨髄に由来する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は、その分化能に加え、分離・培養が容易であるため、再生医療への応用が期待されている。

さらに、投与されたMSCは種々の傷害臓器(腫瘍部位を含む)に蓄積する性質があり、その利点を活かした研究が行われている¹²⁾。この利点は、ES細胞(embryonic stem cell)の利用とは異なり、繰り返しMSCを用いても奇形種を発生しないことがあげられる^{13) 14)}。

このような再生医療への応用を試験する目的では、ルシフェラーゼ-Tgラットを起点としたバイオプローブの組み合わせはさまざまな再生医学研究に重要な情報をもたらす。例えば、ルシフェラーゼ-TgラットとLacZ-Tgラットを交配したhemizygous-double Tgラットは「時間-空間的解析」が可能な系といえる。すなわち、この系ではルシフェラーゼ発光とβ-gal染

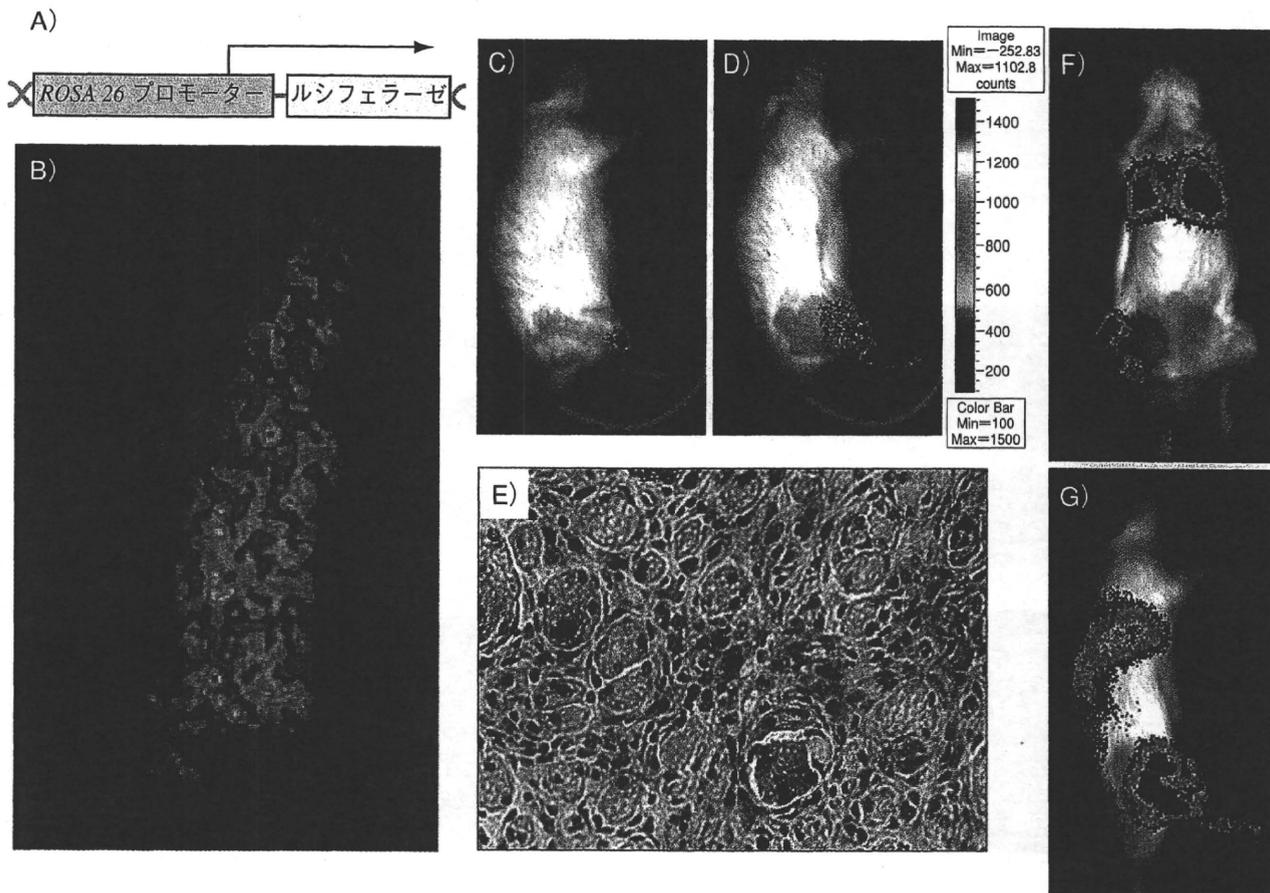


図3 ルシフェラーゼ/LacZ-ダブルTgラットに由来する間葉性幹細胞の傷害部位への集積 **MOVIE**
 A) ホタル・ルシフェラーゼはROSA26プロモーター下で作動する。B) D-ルシフェリン（基質）存在下で全身がルシフェラーゼ発光するROSA26/Luc-LEW Tgラット（生後7日目）。Photon Imager（Biospace Lab社）によるリアルタイム画像解析。C) D) ラット下肢筋をcardiotoxinで傷害し、24時間後にルシフェラーゼ/LacZ-ダブルTgラットに由来するMSC（ 1×10^6 個）を筋肉内（C）もしくは大腿動脈経由（D）で接種した。大腿動脈経由のMSC投与により傷害された下肢筋肉に強いルシフェラーゼ発光が観察される。ルシフェラーゼ発光はIVIS® Imaging System（Xenogen社）によって解析した。E) D)における組織標本（MSC接種後10日目）を β -gal染色（400倍）。F) 同様にラット下肢筋をcardiotoxinで傷害し、やや大量のMSC（ 2.4×10^6 個）を大腿動脈経由で接種した。傷害された下肢筋肉へのMSC集積とともに、末梢毛細血管を通過したMSCは、再循環し一過性に肺に蓄積する（接種後30分の画像）。G) F)の側面画像（文献12より転載）

色が可能となる¹²⁾。ラット下肢筋肉をcardiotoxinで傷害し、上記のダブルTgラット由来のMSCを局所注射し、局部でのMSCの存在は観察されるものの、傷害を受けた下肢筋肉全体をカバーする程のものではなかった（図3 C）。対照的に、ラット下肢を支配する大腿動脈経由でカテーテル法を用いてMSCを導入すると、効率よく下肢全体にMSCを供給することができた（図3 D, E）¹²⁾。これらの結果は、MSCのような幹細胞を臓器特異的に移植する手段として経動脈的供給が優れていることを示唆している。その一方で、過剰のMSCは末梢毛細血管を通過し、再循環し一過

性に肺に蓄積する実験結果も明らかになり（図3 F, G）、医療応用においてはMSC投与による副作用（肺塞栓）の発現に配慮すべきであることが示唆された。

3 ラット大腸がんの生体内イメージング

腫瘍細胞動態の個体内での可視化は、1990年代のがん研究の中で重要な課題の1つであった。特に、がん転移を実験的に評価するためには、「転移」という事象の性格から、「モデル動物」での評価が不可欠である。現在、がん細胞に遺伝子として安定に導入されたバイオプローブ（GFPやルシフェラーゼ）の蛍光や

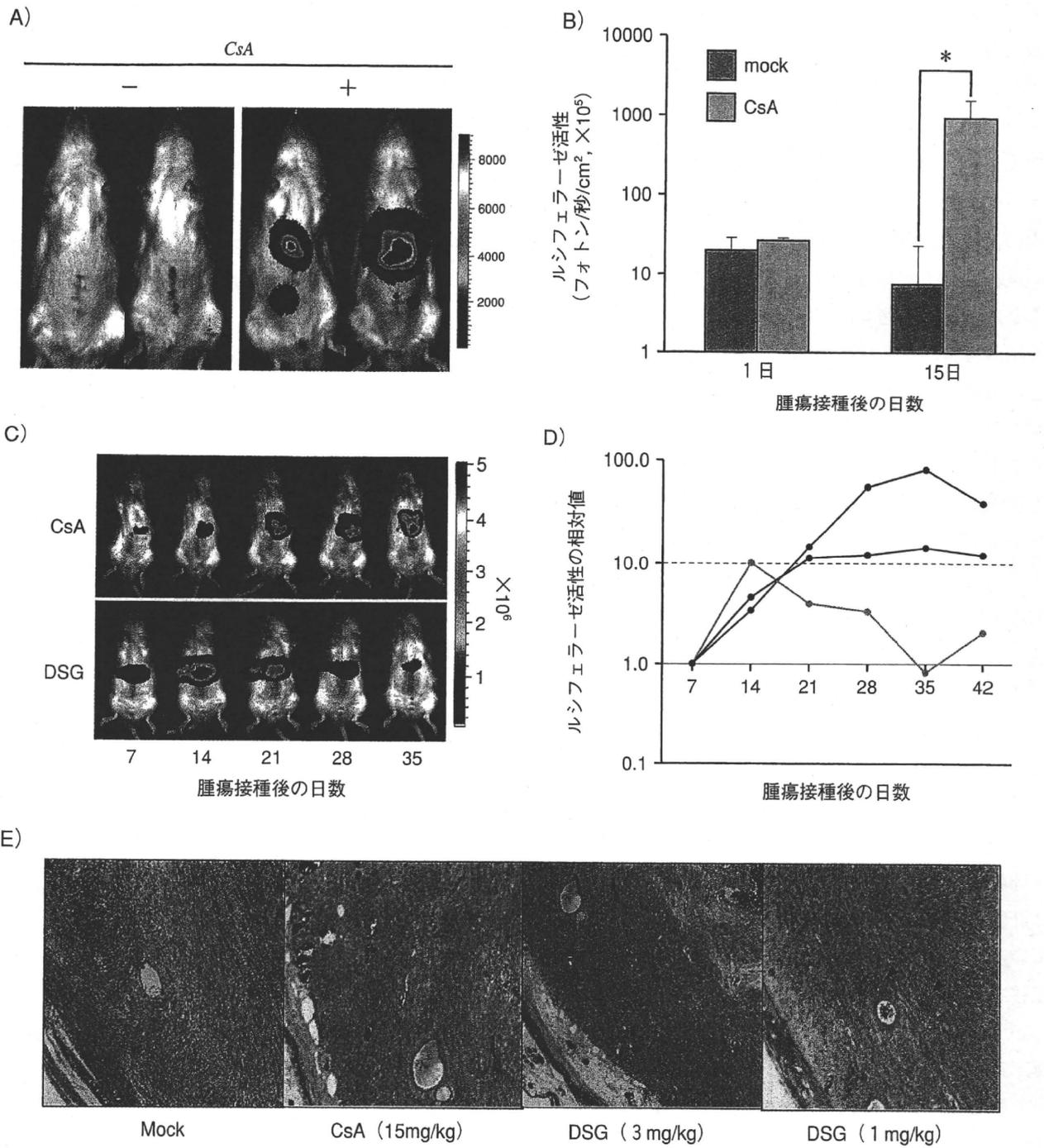


図4 CsAによるラット大腸がん細胞の進展とその制御

A) CsA (15mg/kg/day) 存在下におけるRCN-H4-Luc大腸がん細胞の進展様式。CsA存在下では顕著な腫瘍由来のルシフェラーゼ発光が観察される。B) Aにおけるルシフェラーゼ活性の定量化。IVIS® Imaging System (Xenogen社)による解析。C) F344ラットにRCN-H4-Luc大腸がん細胞を門脈内に接種し、Lewisラットの心臓を異所性に頸部に移植。CsA (15mg/kg/day) もしくはDSG (3 mg/kg/day) 投与によりRCN-H4-Luc細胞の動態をルシフェラーゼ発光にてモニターした。D) Cにおけるルシフェラーゼ発光を相対値として示した結果。●: CsA, ○: Mock, ▲: DSG. (各群n=5)。E) 移植後42日目における移植心の病理組織像。CsA (15mg/kg/day) もしくはDSG (3 mg/kg/day) では心筋組織へのリンパ球浸潤は観察されない。DSG (1 mg/kg/day) では軽度のリンパ球浸潤が観察される (▲) (文献19より転載)

発光を小動物の体内で追跡する方法は非常に魅力的な手段となっている^{15) 16)}。われわれの研究室では、がんの生体内イメージングには後者のルシフェラーゼをプローブとした系を用いている。

例えば、F344由来ラット大腸がん細胞株にルシフェラーゼを組み込んだRCN-H4-Luc細胞¹⁷⁾をラット門脈内に注射し、転移性肝がんモデルを作製すると、がんの進展の様子が基質を投与するだけで容易に観察することができる(図4)。このラットモデルの特徴は、がん細胞接種直後から1週間にかけてルシフェラーゼ活性は低値を示し、2週間以降やルシフェラーゼ活性が上昇するものの、急激な腫瘍進展には至らないことである。しかし、60日以降になって腫瘍進展がみられる個体が出現しはじめることから、肝臓に接種されたRCN-H4-Luc細胞のほとんどは死滅するものの、わずかに残存する細胞は休眠状態になる。そこで、がん休眠を解除する非特異的免疫抑制薬サイクロスポリンA (CsA, 15mg/kg/day)を投与すると、約2週間ですべての担癌ラットで著しいルシフェラーゼ活性の上昇(約100倍)が観察された(図4B)。興味深いことに、肝臓以外に腸管膜リンパ節にも顕著なルシフェラーゼ活性が描出され(図4A)、組織学的にもリンパ節転移を確認することができた。さらに進行すると肺転移を来す。したがって、RCN-H4-Luc細胞は肝臓において休眠状態になるユニークな特徴をもっているとともに、CsAはがん休眠状態を解除し、遠隔転移を促進することをイメージング手法で解析することができた。

臨床における臓器移植では、CsAやFK506などに代表されるカルシニューリンインヒビターが免疫学的拒絶反応をコントロールできる「key drug」である。しかしながら、宿主の免疫抑制による*de novo*発がん、あるいは潜在しているがん細胞の増殖を促進することが強く懸念されている¹⁸⁾。そこで、CsAで促進されるがん進展モデルにおいて、がんの進展を制御しながら異系(allogeneic)ラットに由来する移植心臓^{*2}

※2 ラット異所性心移植

簡便性と機能評価(心拍動)の点で、免疫抑制剤の評価、新規の免疫抑制法、臓器保存法の開発などに用いられる。ドナー心をレシピエントラットの頸部に移植する方法。カフを用いる方法や血管縫合を行う方法(手縫い)などがある。

の生着延長を図る実験を行った。図4C、Dに示すように、CsAの連続投与によりRCN-H4-Luc細胞に由来する光子数は増加していくものの、免疫抑制効果と抗腫瘍効果を併せもつ15-deoxyspergualin (DSG)を用いると腫瘍由来の光子数は減少していく¹⁹⁾。実際、移植心の拍動を維持しながら拒絶反応を抑制していることが組織学的にも示されている(図4E)。これらの結果は、モデル動物を用いたルシフェラーゼ・イメージングは種々の治療評価系として有効に作用することを示唆するものであり、抗体医薬を含めた新規化合物の個体にスクリーニングや創薬研究の促進に応用されるものと考えられる。

おわりに

バイオプローブを用いた細胞レベルでの研究は、これまで観察されてきた生物現象を分子間同士の相互作用を「光」として捉えることにも成功している²⁰⁾。しかしながら、生体内で起こる複雑な事象を試験管内での実験結果や細胞培養系のみで捉えることでは決して十分とはいえない。革新的なイメージング技術の進歩によって、細胞の運命を生きた個体内で追跡しうる優れた方法が利用できるようになった現在では、分子動態を生きた個体内の細胞挙動として機能的に捉えることが必要になりつつある。現在のイメージングに用いられる実験モデル動物はマウスが主であるが、研究の方向性によってはわれわれのように「ラット」を主に用いることもできる。特に、再生医学研究やがん転移に限らず、生命現象の中には生きた個体内でしか観察できない事象も多い。細胞治療を基盤とした再生医学研究におけるラットのバイオイメージングはユニークな系といえる。われわれが開発してきたTgラットやモデル系が広く生命科学の分野において有効利用され、革新的な研究に貢献できれば幸いである。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金「政策創薬等総合研究事業」、「エイズ対策研究事業」及び「創薬基盤推進研究事業(生物資源研究)」によって成されたものである。また、本研究にご協力・ご助言していただいた諸先生方、並びに臓器置換研究部の教室員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Murakami, T. & Kobayashi, E. : J. Biomed. Opt., 10 : 1-10, 2005
- 2) Hammer, R. E. et al. : Cell, 63 : 1099-1112, 1990
- 3) Mullins, J. J. et al. : Nature, 344 : 541-544, 1990
- 4) Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G. H. : Science, 300 : 87-91, 2003
- 5) Inoue, H. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 329 : 289-296, 2005
- 6) Mothe, A. J. et al. : J. Histochem. Cytochem., 53 : 1215-1226, 2005
- 7) Francis, J. S. et al. : Exp. Neurol., 205 : 177-189, 2007
- 8) Kimura, A. et al. : Stem Cells, 25 : 115-124, 2007
- 9) Sato, Y. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 311 : 478-481, 2003
- 10) Sato, Y. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 319 : 1197-1202, 2004
- 11) Hakamata, Y. et al. : Transplantation, 81 : 1179-1184, 2006
- 12) Hara, M. et al. : J. Autoimmun., 30 : 163-171, 2008
- 13) Park, I. H. et al. : Nature, 451 : 141-146, 2008
- 14) Poh, K. K. et al. : Int. J. Cardiol., 117 : 360-364, 2007
- 15) Hoffman, R. M. : Nat. Rev. Cancer., 5 : 796-806, 2005
- 16) Negrin, R. S. & Contag, C. H. : Nat. Rev. Immunol., 6 : 484-490, 2006
- 17) Ohsawa, I. et al. : Transplantation, 81 : 1558-1567, 2006
- 18) Buell, J. F. et al. : Transplantation, 80 : S254-264, 2005
- 19) Ohsawa, I. et al. : Transplantation, 84 : 424-428, 2007
- 20) Ozawa, T. : Anal. Chim. Acta., 556 : 58-68, 2006

<筆頭著者プロフィール>

村上 孝：自治医科大学分子病態治療研究センター（臓器置換研究部）准教授。1992年群馬大学医学部卒業。'97年東京大学大学院医学系研究科修了（吉田光昭教授），博士（医学）。日本学術振興会特別研究員（がん），自治医科大学助手（皮膚科），米国立がん研究所留学を経て2003年より現所属（小林英司教授）講師，'07年より現職。in vitroからin vivo研究に拡張できるイメージング用の細胞資源を充実させることが当面の目標。

臓器組織再生を目指した細胞・幹細胞移植研究の動向

村上 孝・小林英司*

review article

Transplantation Now

Perspective of the stem cell therapy for organ and tissue regeneration

人工多能性幹細胞や体性幹細胞を用いたさまざまな細胞系譜への分化誘導は、臓器移植の基盤技術と相まって有望な再生療法と考えられている。筆者らは、移植された細胞系譜の運命を追跡するため、genetic marker probeを広範な組織に発現するトランスジェニック・ラットを作製し、“color-engineered rat system”を構築した。このシステムでは、生体内における移植細胞の挙動について詳細な分析を行うことができるため、移植・再生医学研究に有用な動物資源となる。特に、“発光”と“蛍光”に基づく光学的レポーターシステムにより、細胞・組織の可視化技法は再生医学研究の探索・発展に不可欠な要素となる。

Takashi Murakami・Eiji Kobayashi*

key words : トランスジェニック・ラット, 間葉性幹細胞, バイオイメージング

ヒトゲノム科学の進展は、ヒトの病態解明や新しい診断・治療方法に大きな変革をもたらしている。これらのゲノム情報は、マウスやラットのゲノム情報と比較され、それぞれ臓器固有の発生や分化機構の解明に貢献している。

このような臓器の発生・分化機構の理解に基づいた傷害臓器の再生医療技術の確立は、21世紀における先端医学研究の重要な課題となっている。特に、体性幹細胞を用いたさまざまな細胞系譜への分化誘導は、細胞・臓器移植の基盤技術と相まって安全で有望な再生医療の方法と考えられている。

ヒト臓器の発生・分化機構の理解に基づいた再生医療技術を考案し開発することは、現在の“再生医学研究”の中心であろう。しかし、筆者らは、実際の医療応用への視点から“医療技術を模倣できる動物資源”に注目し、移植・再生医療のためのモデル動物開発を行ってきた。本稿では、筆者らがこれまで行ってきた“color-engineered rat system”について紹介し、最新の組織・臓器

再生を目指す研究動向について述べる。

蛍光蛋白質を発現する
トランスジェニック・ラット・システム

実験動物としてのラットは、マウスとくらべて体サイズが10倍も大きいいため、心臓や肝臓などの臓器移植や特定部位へのカテーテル挿入など、臨床医学で利用される種々の技術を応用することができる。実験動物の歴史では、マウスよりもラットのほうが早く医学研究に応用されてきた背景があり、特に薬理学や脳神経科学の分野におけるラットの実験データは、現在の臨床医学・薬学の礎となっている。

1980年代に大きく進歩した組み換えDNA技術により、単離した特定遺伝子(cDNA)をマウス受精卵に導入・発現させることが可能になり、トランスジェニック(Tg)・マウスが誕生した¹⁾。その後、マウス胚性幹細胞(ES細胞)における相同組み換え技術を利用した遺伝子破壊が可能になり、さまざまな遺伝子欠損マウスが誕生し、現在の医学研究においてマウスが席卷している。ラットにTg技術が応用されたのはマウスに遅れること

*Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University 自治医科大学分子病態治療研究センター臓器置換研究部

約10年、1990年代はじめになる^{2,3)}。

1990年代後半になると、発光クラゲに由来する green fluorescent protein (GFP) の利用が普及しはじめ、GFPを全身性に発現する GFP-Tg マウスが報告された⁴⁾。生きた細胞を励起光下で観察できる GFP は、細胞動態観察のみならず細胞内蛋白質の挙動を観察する“biological light probe”として、現代のバイオサイエンスを支える重要なアイテムになっている。赤橙色や青色などの種々の蛍光蛋白質との組み合わせにより、細胞機能を“色分け”することができる。

傷害を受けた組織の機能的回復は、現在の再生医学研究が目指す究極のゴールである。特定の機能を担う細胞を調製し、移植する方法が最も単純な手段である。とりわけ、移植した細胞や組織の運命を追跡することは、応用的な医療技術への方向性を決める重要な律速段階となるため、細胞機能を“色分け”し、移植細胞が機能回復にどのように関与するか評価できるシステムはきわめて重要な意味を持つ。

近年の光学的技術の進歩により、生体イメージング技術も著しく発展した。その結果、応用的なバイオ研究を目指す研究者にとって、種々のバイオプローブを持つトランスジェニック・ラットの利用価値は高く、移植された細胞や組織の動態を“光”として追跡できるようになった。

臓器移植研究にはじまった筆者らのトランスジェニック・ラット開発も、約10種類におよび(表1)、再生医学を含む種々の研究目的に利用されている。

ダブル・トランスジェニック・ラット作製とその応用

GFP は LacZ と並ぶ細胞マーカーの代表である。LacZ-Tg ラットの組織は β -gal 染色による組織学標本作製による評価にすぐれているが、GFP-Tg ラットは染色操作が不要であり、リンパ球等ではフローサイトメトリー解析などの細胞単位での評価にも威力を発揮する^{5,6)}。そのほかにも筆者らは、肝特異的に DsRed (赤橙色) を発現す

表1 Color-engineered rat colonies

Rat strain	Promoter	Marker
Wistar	CAGGS ^{*1)}	GFP ^{*2)}
Lewis	CAGGS	GFP
Lewis	Albumin	GFP
Dark Agouty	CAGGS	LacZ (β -galactosidase)
Lewis	ROSA26	LacZ (β -galactosidase)
Wistar	Albumin	DsRed2 ^{*3)}
Wistar	CAGGS	DsRed2, GFP (in Cre/LoxP system)
Lewis	ROSA26	Luciferase ^{*4)}
Fischer 344 ^{*5)}	CAGGS	GFP
Lewis	ROSA26	DsRed monomer

^{*1)}cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter. ^{*2)}green fluorescent protein (*Aequorea victoria*). ^{*3)}DsRed (*Discosoma*). ^{*4)}luciferase from the firefly (*Photinus pyralis*). ^{*5)}This line was developed by Dr. Takahiro Ochiya (National Cancer Center Res.)

るラットや Cre/LoxP (DsRed2/GFP) ラットなども開発している⁷⁾。

このような蛍光蛋白質の検出には励起光源を必要とするが、発光蛋白質の“光”を指標に評価する系もある。たとえば、ホタル由来のルシフェラーゼは、高感度で組織透過性と定量性にすぐれる光を発生し、目的とする細胞や組織における遺伝子発現をリアルタイムに追跡することを可能にする。生体を透過する最適な光(波長 600 nm)が得られるルミネセンス法は、検出感度と定量性の点で非常に有利である。この発光原理に基づく場合は、生体に“基質”を投与することで細胞内エネルギー(ATP)に依存した光を捕捉し、細胞生存と共役した画像イメージが得られる。すなわち、個体内における特徴的な生物現象を光学的に定量的に観察することができ、生体に与える身襲も最小限であるため、再生移植治療モデルの長期的な観察にすぐれている。このような視点から開発されたのが、基質(ルシフェリン)存在下で全身が発光するルシフェラーゼ-Tg ラットである⁸⁾。

幹細胞の医療への応用性

受精後間もない胚から樹立される ES 細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であ

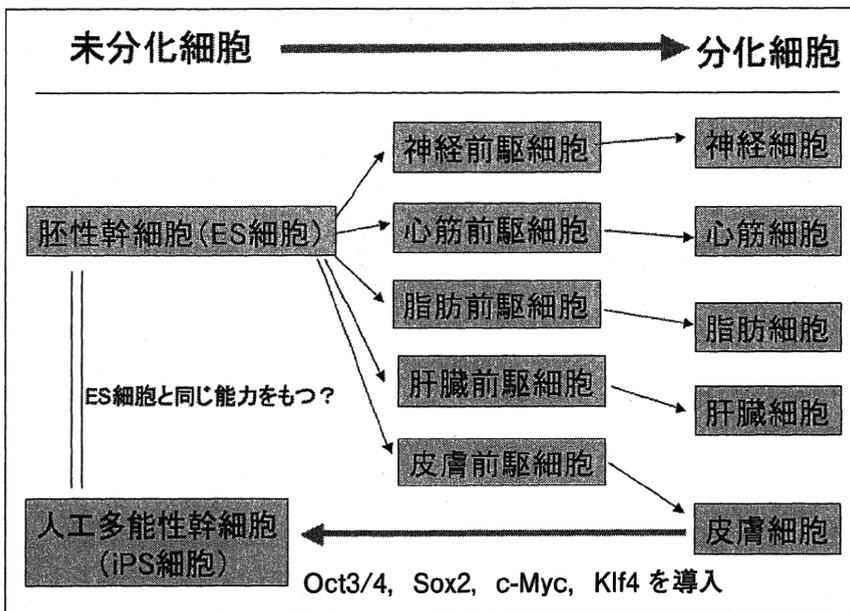


図1
胚性幹細胞 (ES 細胞) と
人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)

受精後間もない胚から樹立されるES細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能である。iPS細胞は体細胞(皮膚線維芽細胞など)にOct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4を導入することにより、形態や増殖能がES細胞と類似した分化多能性を獲得する。

り、細胞移植療法の資源として大きな期待が寄せられている(図1)。しかし、ヒト胚利用に対する倫理的な反対意見も根強く、慎重な運用が求められている。もし体細胞からES細胞に類似した多能性幹細胞を直接に樹立することができれば、胚の利用や臓器移植後の拒絶反応を回避することが可能となる。

山中らの研究チームは、マウス体細胞に四つの因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)をレトロウイルスベクターで導入することにより、形態や増殖能がES細胞と類似し、分化多能性も持った人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)の樹立に成功した⁹⁾。そのiPS細胞を受精卵に戻すことにより、iPS細胞がマウスの全身の細胞に正常に分化し、いわゆるキメラマウスが誕生する。さらに、iPS細胞は生殖細胞にも分化し、次世代では、全身がiPS細胞に由来するマウスも正常に誕生することも示されている¹⁰⁾。

同様の実験系を応用し、ヒト成人皮膚に由来する体細胞に、マウスと同じ四つの因子をレトロウイルスベクターで導入したところ、ヒトES細胞の培養条件下ではヒトiPS細胞を樹立することが示された¹¹⁾。そのヒトiPS細胞は形態や増殖能、遺伝子発現パターンまでもヒトES細胞と類似している。さらに、このヒトiPS細胞は、神経、心筋、軟骨、脂肪細胞、腸管様内胚葉組織など、

さまざまな細胞へと分化することができる。したがって、脊髄損傷や心不全などの患者体細胞からiPS細胞を誘導し、さらに神経細胞や心筋細胞を分化させることにより、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現を目指した研究が大きく展開されようとしている¹²⁾。

iPS細胞の革新的技術が世界を席卷しているが、医療応用に向けた安全性を確保するための研究が急務である。期待の高いiPS細胞の研究も、元来はES細胞研究を基盤に発展してきたものである。したがって、ヒトES細胞の分化制御が充分ではない場合、奇形種が発生することも考えられ、まだ充分な研究が必要と思われる。その一方で、細胞資源の安全性を考慮し、体性幹細胞を医療に応用しようとする研究も盛んに行われている。特に、骨髄に由来する幹細胞が注目されている。

骨髄細胞は造血液性幹細胞と間葉性幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)に分類される^{13,14)}(図2)。後者のMSCは骨、軟骨、脂肪、筋肉、などへの多分化能^{15~20)}に加え、試料の分離・培養が容易であるため、再生医療への応用が期待されている(表2)。さらに、投与されたMSCには免疫調節作用²¹⁾や種々の傷害臓器(腫瘍発生部位を含む)に集積する性質^{22~26)}があり、その特徴を活かした研究も行われている。

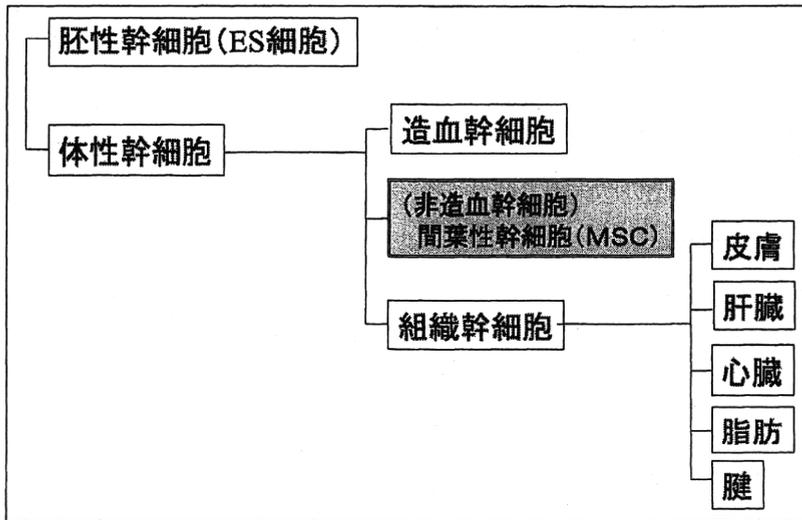


図2 幹細胞の分類と間葉性幹細胞の位置付け

表2 骨髄由来間葉性幹細胞の特徴

- 非造血系細胞
造血細胞の支持細胞として働く
- 線維芽細胞用でシャーレに接着性を持つ
- 自己増殖可能
- 種々の細胞への分化が可能
たとえば、軟骨、骨、脂肪など
- 免疫学的特殊性
MHCクラスIは表出するが、クラスII陰性免疫調整能がある
- 遺伝子操作の必要がない(遺伝子操作も可能)

移植する手段として、カテーテル法を組み合わせた経動脈的供給がすぐれていることを示唆している(図4)。その一方で、過剰のMSCは末梢毛細血管を通過し、再循環し一過性に肺に蓄積する事象も存在し、医療応用においてはMSC投与による副作用(肺塞栓)の発現にも注意する必要がある²⁷⁾。

バイオイメーjingを用いた
移植再生医学研究の展望

このような再生医療への応用を試験する目的では、ルシフェラーゼ-Tgラットを起点としたバイオプローブの組み合わせはさまざまな再生医学研究に重要な情報をもたらす。たとえば、ルシフェラーゼ-TgラットとLacZ-Tgラットを交配したhemizygous-double Tgラットは“時間-空間的解析”が可能な系といえる。すなわち、この系ではルシフェラーゼ発光とβ-gal染色が可能となる²⁷⁾。

ラット下肢筋肉をcardiotoxinで傷害し、上記のダブルTgラット由来のMSCを局所注射しても、局部での発光は得られるものの、傷害を受けた下肢筋肉全体をカバーする発光は得られない。しかし、ラット下肢を支配する大腿動脈経由でMSCを導入すると、効率よく下肢全体に渡ってMSCを供給することができる(図3)²⁷⁾。これらの結果は、MSCのような幹細胞を臓器特異的に

バイオプローブを用いた細胞レベルでの研究は、これまで観察されてきた生物現象を分子間同士の間相互作用を“光”として捉えることにも成功している²⁸⁾。しかしながら、生体内で起こる複雑な事象を試験管内での実験結果や細胞培養系のみで捉えることでは決して充分とはいえない。

革新的なイメージング技術の進歩によって、細胞の運命を生きた個体内で追跡しうるすぐれた方法が利用できるようになった現在では、分子動態を生きた個体内の細胞挙動として機能的に捉えることが必要になりつつある。再生医学研究に限らず、生命現象のなかには生きた個体内でしか観察できない事象も多い。とりわけ、細胞治療を基盤とした再生医学研究でのバイオイメーjing技法の価値はきわめて高いといえる。

その意味において、筆者らが開発してきたTgラットが広く生命科学の分野における有効な細胞

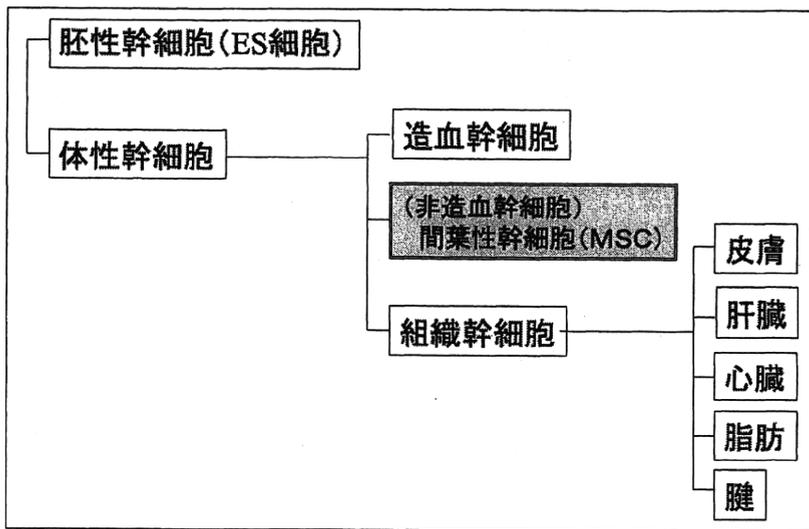


図2
幹細胞の分類と間葉性幹細胞の
位置付け

表2 骨髄由来間葉性幹細胞の特徴

- 非造血系細胞
造血細胞の支持細胞として働く
- 線維芽細胞用でシャーレに接着性を持つ
- 自己増殖可能
- 種々の細胞への分化が可能
たとえば、軟骨、骨、脂肪など
- 免疫学的特殊性
MHCクラスIは表出するが、クラスII陰性免疫調整能がある
- 遺伝子操作の必要がない(遺伝子操作も可能)

このような再生医療への応用を試験する目的では、ルシフェラーゼ-Tgラットを起点としたバイオプローブの組み合わせはさまざまな再生医学研究に重要な情報をもたらす。たとえば、ルシフェラーゼ-TgラットとLacZ-Tgラットを交配したhemizygous-double Tgラットは“時間-空間的解析”が可能な系といえる。すなわち、この系ではルシフェラーゼ発光とβ-gal染色が可能となる²⁷⁾。

ラット下肢筋肉をcardiotoxinで傷害し、上記のダブルTgラット由来のMSCを局所注射しても、局部での発光は得られるものの、傷害を受けた下肢筋肉全体をカバーする発光は得られない。しかし、ラット下肢を支配する大腿動脈経由でMSCを導入すると、効率よく下肢全体に渡ってMSCを供給することができる(図3)²⁷⁾。これらの結果は、MSCのような幹細胞を臓器特異的に

移植する手段として、カテーテル法を組み合わせた経動脈的供給がすぐれていることを示唆している(図4)。その一方で、過剰のMSCは末梢毛細血管を通過し、再循環し一過性に肺に蓄積する事象も存在し、医療応用においてはMSC投与による副作用(肺塞栓)の発現にも注意する必要がある²⁷⁾。

バイオイメージングを用いた
移植再生医学研究の展望

バイオプローブを用いた細胞レベルでの研究は、これまで観察されてきた生物現象を分子間同士の相互作用を“光”として捉えることにも成功している²⁸⁾。しかしながら、生体内で起こる複雑な事象を試験管内での実験結果や細胞培養系のみで捉えることでは決して充分とはいえない。

革新的なイメージング技術の進歩によって、細胞の運命を生きた個体内で追跡しうるすぐれた方法が利用できるようになった現在では、分子動態を生きた個体内の細胞挙動として機能的に捉えることが必要になりつつある。再生医学研究に限らず、生命現象のなかには生きた個体内でしか観察できない事象も多い。とりわけ、細胞治療を基盤とした再生医学研究でのバイオイメージング技法の価値はきわめて高いといえる。

その意味において、筆者らが開発してきたTgラットが広く生命科学の分野における有効な細胞

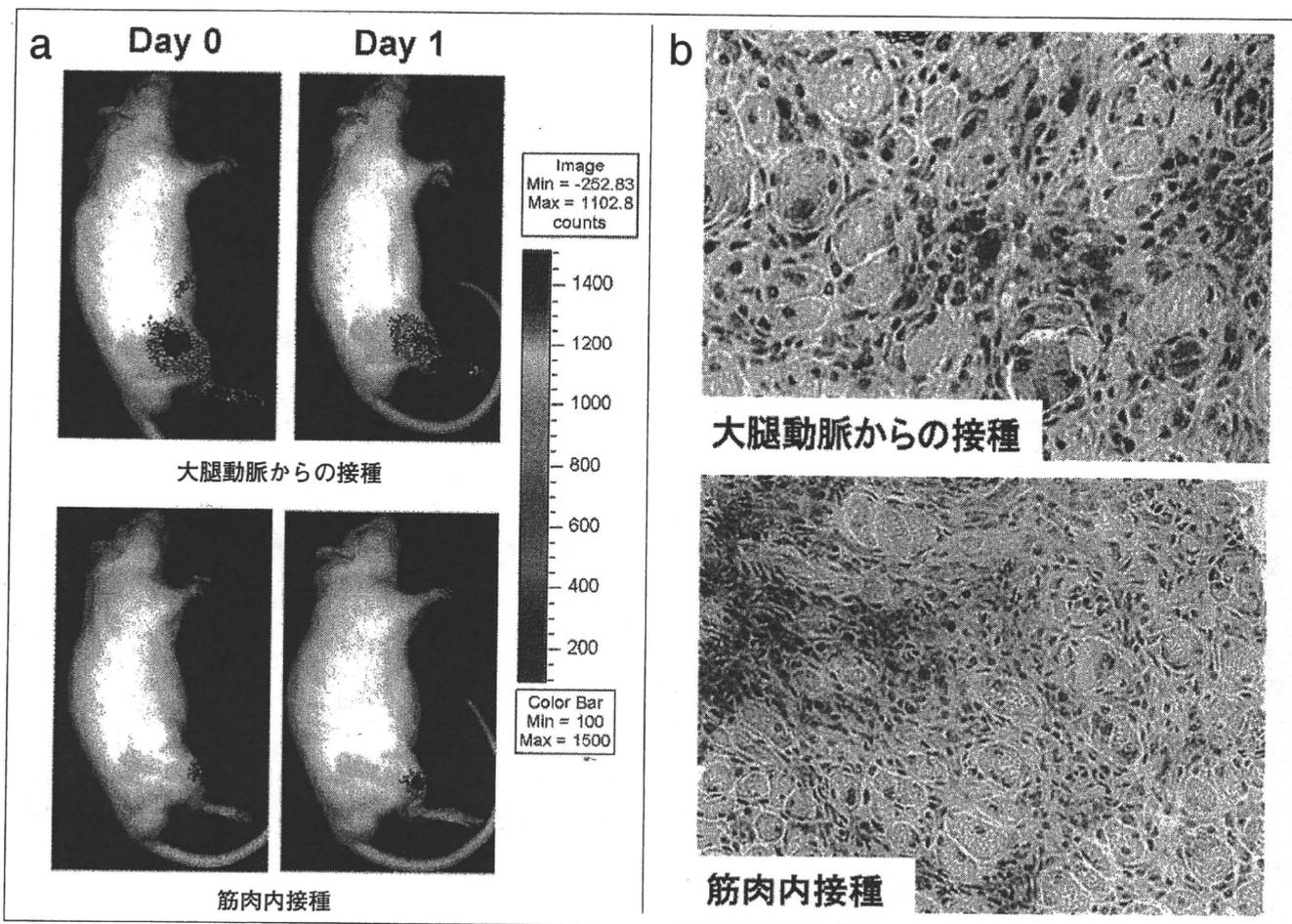


図3 ルシフェラーゼ/LacZ-ダブル・トランスジェニック・ラットに由来する
間葉性幹細胞(MSC)の傷害部位への集積

a: ラット下肢筋を cardiotoxin で傷害し, 24 時間後にルシフェラーゼ/LacZ-ダブル・トランスジェニック・ラットに由来する MSC(1×10^6 個)を大腿動脈(上段)もしくは筋肉内(下段)に接種した. 大腿動脈経由の MSC 投与により傷害された下肢筋肉に強いルシフェラーゼ活性が観察される.

b: a における個体の組織標本(MSC 接種後 10 日目)を β -gal 染色した(400 倍).

(Hara M et al.: J Autoimmun 30: 163-171, 2008²⁷⁾より)

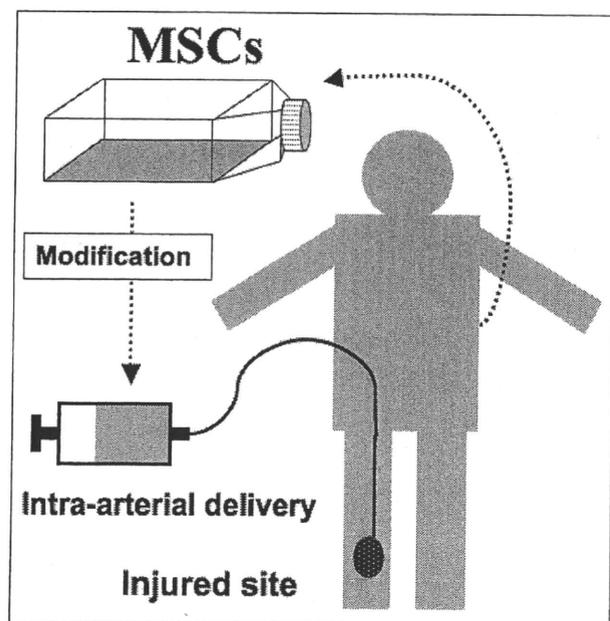


図4
骨髄由来間葉性幹細胞(MSC)を用いた
組織選択的治療のモデル

骨髄細胞を分離・培養し, MSCを純化する. 治療用 MSCは傷害部位を標的として, カテーテルを用いて経動脈的に投与する. 一部の MSCは凍結保存し, 繰り返し治療に用いることもできる.

(Hara M et al.: J Autoimmun 30: 163-171, 2008²⁷⁾より)

ソースとして利用され、革新的な研究に貢献できれば幸いである。

文 献

- 1) Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ et al.: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 7380-7384, 1980.
- 2) Hammer RE, Maika SD, Richardson JA et al.: Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63 : 1099-1112, 1990.
- 3) Mullins JJ, Peters J, Ganten D: Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344 : 541-544, 1990.
- 4) Okabe M, Ikawa M, Kominami K et al.: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407 : 313-319, 1997.
- 5) Inoue H, Ohsawa I, Murakami T et al.: Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 329 : 288-295, 2005.
- 6) Murakami T, Kobayashi E: Color-engineered rats and luminescent LacZ imaging: a new platform to visualize biological processes. *J Biomed Opt* 10 : 41204 (1-10), 2005.
- 7) Sato Y, Endo H, Ajiki T, Hakamata Y, Okada T, Murakami T, Kobayashi E: Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 319 : 1197-1202, 2004.
- 8) Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E: "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term *in vivo* bioluminescent imaging. *Transplantation* 81 : 1179-1184, 2006.
- 9) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5) : 861-872, 2007.
- 10) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 (7151) : 313-317, 2007.
- 11) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4) : 663-676, 2006.
- 12) Yamanaka S: Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1 : 39-49, 2007.
- 13) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 : 71-74, 1997.
- 14) Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM: The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105 : 829-841, 2001.
- 15) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147, 1999.
- 16) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10711-10716, 1999.
- 17) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R et al.: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6 : 1282-1286, 2000.
- 18) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290 : 1775-1779, 2000.
- 19) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKechercher SR: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290 : 1779-1782, 2000.
- 20) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61 : 364-370, 2000.
- 21) Le Blanc K, Ringden O: Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 18 : 586-591, 2006.
- 22) Satake K, Lou J, Lenke LG: Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 29 : 1971-1979, 2004.
- 23) Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al.: A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104 : 2643-2645, 2004.
- 24) Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS: Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 22 : 415-427, 2004.
- 25) Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62 : 3603-3608, 2002.
- 26) Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN et al.: Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1593-1603, 2004.
- 27) Hara M, Murakami T, Kobayashi E: *In vivo* bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 30 : 163-171, 2008.
- 28) Ozawa T: Designing split reporter proteins for analytical tools. *Anal Chim Acta* 556 : 58-68, 2006.