

201126044A

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

ドナーとレシピエントの双方を改変した、
骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 田代 克久

平成24（2012）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

ドナーとレシピエントの双方を改変した、
骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 田代 克久

平成24（2012）年4月

目 次

I. 総括研究報告

ドナーとレシピエントの双方を改変した、骨髄非破壊的新規造血幹細胞

移植法の開発基盤研究 ----- 1

研究代表者 独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト 研究員
田代 克久

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

総括研究報告書

ドナーとレシピエントの双方を改変した、
骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

研究代表者 田代 克久

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト 研究員

本研究は、造血幹細胞の移植効率の向上を目指して、遺伝子導入技術を駆使したドナー細胞の機能改変技術の開発、ならびにサイトカインを用いたレシピエント骨髄環境制御法の開発を試みる。本年度はドナー細胞の改変に適した遺伝子導入用ベクターの最適化を行うとともに、サイトカインを投与したマウスの骨髄細胞・末梢血細胞の動態の解析を行い、以下の知見を得た。

1. ヒト CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入には、ヒト CD46 を認識するファイバー蛋白質を有した改良型アデノウイルスベクターが適していた。
2. G-CSF または VEGF をマウス体内で過剰発現させることにより末梢血中に造血幹細胞を含む血液前駆細胞が増加していた。またこれと並行して、骨髄内では未熟な血液細胞数の減少を確認した。
3. G-CSF と VEGF の両方のサイトカインをマウス体内で過剰発現させることにより、それぞれを単独投与した場合と比較し、末梢血中で未熟な血液細胞数が有意に増加することを見出した。

研究協力者

水口裕之 （独）医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

川端健二 （独）医薬基盤研究所

野中昭希 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

造血幹細胞が有する自己複製能や多分化能を利用した医療が骨髄移植・造血幹細胞移植であり、白血病・骨髄腫・リンパ腫等の造血系腫瘍、免疫不全、造血障害の根治療法として推進されてきた。造血幹細胞移植のドナー細胞としては、従来から用いられている骨髄細胞に加え、最近ではドナー

への負担が軽減された状態で回収可能な末梢血幹細胞や臍帯血造血幹細胞が利用されている。我が国においては、これまでに40,000例以上の造血幹細胞移植が実施されている（1991年～2009年：造血細胞移植学会 平成22年度 全国調査報告書）。このように多くの疾患に対して良好な成績を収めているが、現状では高齢者や合併症を発症している患者に対する適応例は少ない。それは全身放射線照射や大量のアルキル化剤投与といった移植前処理が移植を受けるレシピエントへの負担が大きいためである。また、造血幹細胞は正常時、造血幹細胞ニッチ（niche：本来の居場所）とよばれる骨髓微小環境に存在しているが、この前処理により造血幹細胞ニッチが破壊されていることも推察される。そのため、骨髓非破壊的な造血幹細胞移植法が開発されれば上記の問題を解決できると考えられる。一方、骨髓非破壊状態では、骨髓に多くの血液細胞が残存しているために、移植したドナー造血幹細胞の生着効率の低下が懸念される。したがって、造血幹細胞移植の適応を拡大するには、骨髓非破壊的、かつ高生着効率を実現する新規造血幹細胞移植法の開発が必要不可欠となる。

G-CSF 等のある種のサイトカイン／ケモカインは、骨髓の造血幹細胞を末梢血中へ

遊離（動員）する作用を有している。これらの蛋白質の投与により、重篤な骨髓損傷を伴わずに造血幹細胞を骨髓から動員可能であると考えられたため、このような蛋白質はレシピエント骨髓内環境の制御分子として有用であると考えた。そこで本研究では、ドナー造血幹細胞に機能改変を施すとともに、レシピエント骨髓環境を操作することで、骨髓非破壊的新規造血幹細胞移植法の基盤技術構築を目指すこととした。具体的には、（1）アデノウイルス（Ad）ベクターを用いて種々のサイトカインをマウス全身で発現させることにより、造血幹細胞を効率良く骨髓から動員させる手法、つまり、「ニッチを新たに創り出す方法」を開発するとともに、（2）Adベクターを用いた遺伝子導入により機能を増強した造血幹細胞の作製を行う。そして（3）これらを併用することで新規造血幹細胞移植法を開発を試みることとした。本年度は、ドナー造血幹細胞（ヒト CD34 陽性細胞）への遺伝子導入に適した Adベクターの最適化と、サイトカイン発現 Adベクター投与時の骨髓動員作用について検討した。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

G-CSF 発現 Ad ベクター、VEGF 発現 Ad ベクター、GFP 発現 Ad ベクターは、当研究室にて開発された improved in vitro ligation 法により作製した。サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターおよびイントロン A を含むシャトルプラスミドのマルチクローニングサイトに invivogen 社から購入したヒト G-CSF cDNA または PCR 法にて増幅させたマウス VEGF cDNA を挿入し、pHMCMV-G-CSF、pHMCMV-VEGF を作製した。また CMV エンハンサーと Chicken β アクチンプロモーターのハイブリッドプロモーター (CA プロモーター) を有するシャトルプラスミドに GFP cDNA (Clontech 社) を挿入し、pHMCA-GFP を作製した。これを I-CeuI および PI-SceI で消化し、同酵素で消化した Ad ベクタープラスミドとライゲーションすることにより、G-CSF 発現 Ad ベクタープラスミド pAd-G-CSF、VEGF 発現 Ad ベクタープラスミド pAd-VEGF、GFP 発現 Ad ベクタープラスミド pAd-GFP を得た。なお、GFP 発現 Ad ベクタープラスミドを作製する際には、pHMCA-GFP を通常の Ad ベクタープラスミドだけでなく、ファイバー蛋白質を遺伝子工学的に改変した、改良型 Ad ベクター

プラスミドへも挿入し、pAdRGD-GFP、pAdK7-GFP、pAdF35-GFP、pAdTAT-GFP を得た。作製したプラスミドを PacI で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることで G-CSF 発現 Ad ベクター Ad-G-CSF、VEGF 発現 Ad ベクター Ad-VEGF、GFP 発現 Ad ベクター Ad-GFP、AdRGD-GFP、AdK7-GFP、AdF35-GFP、AdTAT-GFP を得た。また、外来遺伝子を発現しない Ad ベクター Ad-Null をコントロールベクターとして用いた。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従い測定し、生物学的力価は AdenoX Rapid Titer Kit (Clontech 社) を用いて測定した。

B-2. ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入

ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞 (Lonza 社) は添付のサプリメントを加えた StemPro34 Medium (invitrogen 社) 中で解凍した。その後の培養には、サプリメントと L-グルタミン (2 mM、invitrogen 社)、サイトカイン (100 ng/mL human SCF、100 ng/mL human Flt3-ligand、20 ng/mL human IL-3、20 ng/mL human IL-6 (全て Peprotech 社)) を含む StemPro34 Medium を用いた。96 well ラウンドボトムプレートへ各 GFP 発現 Ad ベクタ

一と混合した 1×10^4 個のヒト CD34 陽性細胞を播種し、37°C で 90 分培養した。その後、培地を 100 μ L ずつ加えて 2 日間培養し、フローサイトメーターにて GFP 発現細胞の計測を行った。

B-3. マウスへの Ad ベクター投与

C57BL/6 マウスの尾静脈内に、1 匹あたり 1×10^{10} VP (vector particles) または 1×10^9 ifu (infectious unit) の Ad-G-CSF、Ad-VEGF、Ad-Null を投与した。投与 5 日後、末梢血、脾臓、骨髓を回収して以降の実験に用いた。血漿中のサイトカイン濃度は Quantikine ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて測定した。

B-4. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析

Ad ベクター投与後に摘出した各組織中の生細胞数は NucleoCounter (ChemoMetec 社) を用いて測定した。その後、fluorescein isothiocyanate (FITC)、phycoerythrin (PE)、Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-Cy5.5、allophycocyanin (APC)、PE-Cy7、Biotin で標識した各抗体と反応させた。用いた抗体は、抗 B220 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 CD3 抗体、抗 Ter119 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗 c-kit 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗

CD34 抗体、抗 Flt3 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Alcam 抗体、抗 CD31 抗体であり、eBiosciences 社、BD Bioscience 社、R&D Systems 社より入手した。また、2 次抗体として Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-Cy5.5 標識ストレプトアビジン (eBioscience 社) を使用した。染色した細胞のうち、7-amino actinomycin D (eBioscience 社) 陽性の死細胞を解析から除去して LSRFortessa (BD Bioscience 社) にて解析した。

B-5. In vitro コロニーアッセイ

Ad ベクター投与後の細胞をコロニーアッセイ用培地 Methocult (M3434、Stem cell technologies 社) に播種した。なお、末梢血単核細胞 (PBMC) ならびに脾臓細胞は 1×10^6 cells/mL、骨髓細胞 4×10^4 cells/mL の濃度で播種した。細胞播種 14 日後、顕微鏡下でコロニーを計測した。

B-6. 線維芽細胞コロニー形成法 (Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay)

Ad ベクター投与後の骨髓細胞を FITC 標識した抗 CD45 抗体ならびに抗 Ter119 抗体で染色し、FACS Aria (BD Bioscience 社) にて CD45⁺Ter119⁻の骨髓ストローマ細胞を

単離した。その後、6 ウェルプレートの 1 ウェルに 1×10^5 個の細胞を播種し、14 日間培養した。培地は MesenCult mouse MSC Basal Medium 40 ml (Stem cell technologies 社) に MesenCult mouse MSC Stimulatory Supplements 10 ml (Stem cell technologies 社) と抗生物質を加えたものを使用した。形成されたコロニーをメタノールで固定後、ギムザ染色を行い、顕微鏡下で形態学的に識別し CFU-F 数を計数・観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所・組換え DNA 実験委員会および動物実験倫理委員会の承認を得たのちに行った。なお本研究において使用したヒト CD34 陽性細胞はメーカーから購入した細胞である。

C. 研究結果

C-1. Ad ベクターを用いたヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入

造血幹細胞の生着効率向上法の一つとして、造血幹細胞の機能を増強させるという手法がとられている。一般的に造血幹細胞や血液前駆細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが利用されている。しかしながら、これらのベクター系では宿主の染色体に外来遺伝子が挿入されるためにガン化の危険性があることや、外来遺伝子が恒常的に発現し続けることによる分化への影響が懸念される。そこで本研究では、一過性かつ高効率に外来遺伝子を細胞へ導入可能な Ad ベクターを用いた遺伝子導入法の確立を試みた。

我々の研究室ではこれまでに種々の改良型 Ad ベクターの開発に成功している(図 1)。そこで種々の改良型 Ad ベクターを用いてヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を評価した。その結果、アデノウイルスのファイバー領域をサブタイプの異なるアデノウイルス (35 型 ; サブグループ B) に置換した F35 型 Ad ベクターを用いることにより、ヒト CD34 陽性細胞へ効率良く遺伝子導入できることが明らかとなった(図 2a)。一方、その他の Ad ベクターを使用した場合にはほとんど遺伝子導入ができなかった。

また GFP 発現細胞数は Ad ベクターの量依存的に増加し、3,000 vector particle (VP) /cell の濃度では 70%以上のヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入を実現することに成功した(図 2b)。以上の結果から、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入には F35 型の Ad ベクターが適していることが明らかとなった。

C-2. サイトカイン発現 Ad ベクターの投与による血液細胞の動態解析

健常成体において造血幹細胞は骨芽細胞等が形成するニッチとよばれる骨髓微小環境に存在し、その機能を維持している。一方、癌化学療法時等の骨髓抑制状態が引き起こされた場合、種々のサイトカインやケモカインが産生され、造血幹細胞は末梢組織に遊離されてくることが知られており、この現象は骨髓動員とよばれる。骨髓動員には種々のサイトカインや接着分子が関与しており、これらのバランスにより造血幹細胞が骨髓に留まるのか、あるいは末梢に遊離するのかが決まると考えられる。

本研究では、Ad ベクターを用いてサイトカインをマウス生体に高発現させることにより、血液細胞、特に未熟な血液細胞の動態にどのような影響がみとめられるのかについて検討を行った。なお、本研究では CMV プロモーターにイントロン A を付与

したプロモーター (CMV イントロン A) の下流にサイトカイン遺伝子を挿入した Ad ベクターを用いた。CMV イントロン A プロモーターは、従来の CMV プロモーターに比べ数倍から十数倍の活性を有し、CAG プロモーターと同等以上の活性を有することを我々の研究室では確認している。まず G-CSF 発現 Ad ベクター (Ad-G-CSF) をマウスに尾静脈内投与し、各組織における細胞数を測定した。その結果、コントロールベクター (Ad-Null) と比較し、Ad-G-CSF を投与したマウスでは末梢血の細胞数ならびに脾臓の細胞数が有意に増加していた (図 3a)。また骨髓細胞数は減少傾向であった (データ略)。次にフローサイトメーターを用いて、末梢血中の骨髓球系細胞 ($\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞) や造血幹細胞を含む画分と定義されている $\text{c-kit}^+\text{Sca-1}^+$ lineage⁻ (KSL) 細胞数を測定した。その結果、G-CSF 投与マウスの末梢血中では骨髓球系細胞や、KSL 細胞数が有意に増加していることが明らかとなった (図 3b, 3c)。また、骨髓においても KSL 細胞数を測定した結果、G-CSF 投与マウスでは著大な増加がみとめられた (図 4a)。最近の研究から KSL 画分の細胞は、その分化の段階により、さらに細分化されることが報告されている。すなわち、KSL 画分中には長期にわたって自己

複製能を有する未分化な造血幹細胞 (Long term-HSC (LT-HSC))、自己複製能に限界を有する造血幹細胞 (Short term-HSC (ST-HSC))、そして自己複製能はないが多分化能を有する多能性血液前駆細胞 (Multi-potent progenitor (MPP)) が含まれている。これらの細胞は、CD34 と Flt3 という 2 つの表面抗原の発現により、KSLCD34-Flt3⁻ (= LT-HSC)、KSLCD34+Flt3⁻ (= ST-HSC)、KSLCD34+Flt3⁺ (= MPP) として区別することが可能である。そこで最も未熟な細胞であるマウス骨髓中の KSLCD34⁺Flt3⁻ 細胞を測定したところ、Ad-G-CSF 投与マウスでは有意に減少していることが示された (図 4b)。また、フローサイトメーターによる表面抗原解析だけでなく、コロニーアッセイによっても末梢血中で未熟な血液細胞数が増加していることも確認された (図 4c)。以上の結果から、G-CSF を投与することにより末梢組織で造血幹細胞を含む血液前駆細胞が増加し、骨髓中ではそれらの細胞が減少していることが示され、Ad-G-CSF 投与マウスの骨髓では空きニッチが創製されていることが示唆された。

本研究では次に、VEGF 発現 Ad ベクターを作製し、同様の検討を行うこととした。VEGF は脈管形成・血管新生に関与する分

子として広く知られているサイトカインである。その一方で血液細胞の分化・増殖に重要であることや造血幹細胞の生存・増殖に関与していることが知られており、血管系だけでなく、血液系においても重要な役割を果たしている。また、本研究での検討において、Ad-G-CSF を投与したマウスの末梢血中で VEGF 濃度が上昇するという知見も得られていることから、VEGF が造血幹細胞の動員に関与していると考え検討を進めた。

Ad-VEGF の投与量を最適化するため、マウス 1 匹あたり 0.3×10^8 infectious unit (ifu)、 1×10^9 ifu、 3×10^9 ifu の各濃度の Ad-VEGF を投与し、その 5 日後における血漿中 VEGF 濃度を測定した。その結果、ベクター投与量依存的に血中 VEGF 濃度が上昇することが分かった (図 5a)。しかし、最大投与量の 3×10^9 ifu を投与したマウスでは、原因は不明だが、全てのマウスの死亡を確認した (データ略)。また、コントロールベクターである Ad-Null を 1×10^9 ifu 投与したマウスでは血漿中 VEGF 濃度はウイルス非投与マウスの VEGF 濃度と同程度であり、Ad ベクターによる VEGF 産生への影響はみとめられなかった (図 5b)。 1×10^9 ifu の Ad-VEGF を投与したマウスの末梢血 VEGF 濃度は、Ad-Null 投与群と比較して有意に上

昇することが確認できたことから、以後の検討では、マウス 1 匹あたり 1×10^9 ifu の Ad-VEGF を投与することとした。次に Ad ベクターによる VEGF の過剰発現により骨髓細胞が動員されているか否かを調べるため、まず Ad-VEGF 投与 5 日後における骨髓総細胞数の測定を行った。その結果、コントロール Ad ベクターである Ad-Null 投与群と比較して、Ad-VEGF 投与群では骨髓総細胞数の有意な減少が観察された (図 6a)。フローサイトメトリーによる解析から、骨髓では骨髓球系細胞数が VEGF の過剰発現により有意に減少していることが示された (図 6b)。以上の結果から、マウス体内での VEGF の過剰発現は骨髓細胞の動態に影響を与えることが示された。

次に、VEGF による造血幹細胞の動態への影響を検討するため、ベクター投与後の KSL 画分を解析した結果、Ad-VEGF 投与群では Ad-Null 群と比較して、骨髓内の KSL 画分の細胞が有意に減少していた (図 7a)。また、G-CSF 投与時と同様に CD34 と Flt3 の抗体を用いて KSL 細胞をさらに詳細に解析した結果、VEGF 投与マウスでは KSL CD34⁻Flt3⁻、KSLCD34⁻Flt3⁺、KSLCD34⁺Flt3⁺ の全ての細胞が減少していた (図 7b)。特に、最も未分化な細胞である KSLCD34⁻Flt3⁻ 細胞が有意に減少していた (図 7b)。また、

コロニーアッセイ法においても Ad-VEGF 投与マウスの骨髄では多分化能を有する血液前駆細胞 (CFU-Mix) 数の減少がみとめられたことから (図 7c)、VEGF の過剰発現は骨髄中の骨髓球系細胞だけでなく、造血幹細胞を含む未熟な血液前駆細胞の減少を誘導することが示された。

次に Ad-Null または Ad-VEGF 投与時の末梢血ならびに脾臓細胞の動態を解析することにより、VEGF の骨髓動員作用の評価を行った。まず、各ベクター投与後の末梢血細胞数ならびに脾臓細胞数を計測した結果、Null 群と比較し、VEGF 群の末梢血においては総細胞数が有意に増加していた。また、VEGF 群では脾臓細胞数も、若干の増加傾向がみとめられた (図 8a、8b)。そこで次に、Gr-1⁺CD11b-1⁺の骨髓球系細胞数を解析したところ、末梢血および脾臓ではこれらの細胞の増加が観察された (図 9a)。また、VEGF 投与マウスの脾臓では KSL 細胞も有意に増加していた (図 9b)。さらに、コロニーアッセイにより、末梢血および脾臓中に含まれる血液前駆細胞数を定量した結果、Null 群と比較して VEGF 群で、末梢血中、脾臓中いずれにおいても有意に CFU-Mix 数が増加していることが分かった (図 9c)。したがって、VEGF をマウス体内で過剰発現することにより、骨髓内では骨髓球系細胞

や造血幹細胞を含む血液前駆細胞は減少する一方で、末梢組織ではこれらの細胞が増加することが明らかとなった。すなわち、VEGF は造血幹細胞等を含む骨髓細胞を骨髓から末梢組織へと動員する作用を有していることが示された。

C-3. VEGF 発現 Ad ベクターの投与時の骨髓ストローマ細胞の解析

Ad-VEGF 投与マウスの骨髄では造血幹細胞が減少していることが示されたが、そのメカニズムは不明である。造血幹細胞は通常時、骨髓内で造血幹細胞ニッチに支持されているため、VEGF が造血幹細胞ニッチに影響を与えた結果、造血幹細胞の動員が生じているのではないかと考えた。近年、骨髓中の骨芽細胞や血管内皮細胞、間葉系幹細胞がニッチ細胞として機能するとの報告が相次いでいるが、造血幹細胞がどの細胞と相互作用しているのかは未だに不明な点が多い。本研究では、近年、造血幹細胞ニッチとして中心的な働きを果たすことが明らかとなった間葉系幹細胞に着目し、検討を進めた。Ad-Null または Ad-VEGF を投与したマウスの骨髄中における間葉系幹細胞 (CD45⁻Ter119⁻CD31⁻Alcam⁺sca-1⁺) の割合をフローサイトメトリーにより解析したところ、VEGF 投与マウスの骨髄での間葉系

幹細胞の割合が有意に減少していることを見出した（図 10a）。また、線維芽細胞コロニー形成法（CFU-F アッセイ）からも、Ad-VEGF を投与したマウスの骨髄中ではコロニー形成能を有する未分化な骨髄ストローマ細胞数が減少していることが明らかとなった（図 10b）。以上の結果から、VEGF はニッチ細胞を制御して造血幹細胞の動員を誘導している可能性が示唆された。

C-4. VEGF 発現 Ad ベクターの投与時の骨髄ストローマ細胞の解析

これまでの結果から、G-CSF と VEGF、どちらも強力な造血幹細胞動員因子であることが明らかとなった。しかし、どちらの分子が造血幹細胞動員作用に優れているか不明である。そこで、次に G-CSF と VEGF の動員作用、そしてそれらを同時に投与したときの動員作用の比較を行った。各ベクター投与 5 日後の末梢血細胞を用いてコロニーアッセイを行った結果、Ad-Null 投与群と比較して、VEGF 投与群では末梢血細胞中の CFU-Mix 数の増加がみとめられたものの、G-CSF 投与群の CFU-Mix 数の 4 分の 1 程度であった（図 11）。したがって、G-CSF は VEGF よりも優れた骨髄動員作用を有していることが示された。しかしながら、非常に興味深いことに VEGF を G-CSF と共投

与することにより、末梢血中の CFU-Mix 数が G-CSF を単独で投与した際の約 4.6 倍に上昇していた（図 11）。以上の結果から、VEGF 単独では G-CSF の HSC 動員作用に劣るものの、VEGF は G-CSF の動員作用を増強する分子であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、骨髓非破壊的な新規造血幹細胞移植法の開発を目指し、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いて種々のサイトカインをマウス全身で発現させることにより、造血幹細胞を効率良く骨髓から動員させる手法、つまり、「ニッチを新たに創り出す方法」の開発、そして Ad ベクターを用いた遺伝子導入により機能増強型造血幹細胞の作製法の開発を行うこととした。そして本年度は、ヒト造血幹細胞への高効率遺伝子導入を可能にする Ad ベクターの最適化と、サイトカイン発現 Ad ベクターを用いた骨髓動員作用について検討を行った。

本研究においてヒト造血幹細胞を含むヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入には F35 型 Ad ベクターが最適であることが明らかとなった。一方、F35 型 Ad ベクター以外の改良型 Ad ベクターでは従来型と同等の遺伝子発現効率であった。以前我々が作製した Tat 型 Ad ベクターは、ヒト血液細胞株において高い遺伝発現効率を示したため、ヒト CD34 陽性細胞においても高効率に外来遺伝子を導入できるものと期待していたが、その活性は従来型よりやや高いという結果であった。Tat ペプチドの細胞膜透過メカニズムについて未だに不明な点が多いため詳細な解析は困難であるが、細胞株と初代培

養細胞では受容体として機能する分子の発現量、または発現パターンが異なっている可能性が考えられる。

F35 型 Ad ベクターは、ほぼ全てのヒト細胞で発現している CD46 を認識するため、効率的な遺伝子導入につながったものと考えられる。ただし、我々は、今回用いたヒト CD34 陽性細胞の全ての細胞が CD46 を発現していることを確認しているものの全ての細胞において GFP の発現はみとめられなかった。今回、3000 VP/cell の濃度以上で F35 型 Ad ベクターを作用させた場合、細胞死がみとめられたことから、これ以上の濃度で Ad ベクターを作用させることは困難である。遺伝子発現効率の更なる改善には、プロモーターの改良等も必要である可能性が考えられるが、今後はこの条件にて機能遺伝子を導入する予定である。

本研究では G-CSF 発現 Ad ベクターを作製し、その骨髓動員作用について解析した。G-CSF は末梢血への造血幹細胞動員因子として臨床でも使用されている分子であるが、投与時の骨髓環境について詳細に解析した報告は乏しい。本研究では G-CSF を過剰発現させたマウスをレシピエントとして利用することを計画しているため、G-CSF 投与マウスの末梢血細胞だけでなく骨髓細胞についても解析を行った。その結果、末梢血

においては予想通り未熟な血液細胞が多数検出され、強力な骨髄動員因子であることが確認された。一方で骨髄細胞においては、造血幹細胞が含まれる画分である KSL 細胞の増加がみとめられた。G-CSF には造血幹細胞動員作用のほかに、血液前駆細胞の分化・増殖に関与することが報告されているため、G-CSF 投与により骨髄内造血幹細胞の分化・増殖が亢進し、さらに MPP などの分化の進んだ血液前駆細胞が増殖したために KSL 細胞数の増加に繋がったものと推察される。

本研究では G-CSF だけでなく、VEGF についても骨髄動員作用を評価した。VEGF 発現 Ad ベクターを投与したマウスの骨髄ならびに末梢組織（末梢血および脾臓）を解析した結果、コントロール Ad ベクターである Ad-Null を投与したマウスと比較し、骨髄では細胞数が減少し、末梢組織では増加していた。また、動員された細胞中には、Gr-1⁺Mac-1⁺の骨髄球系細胞だけでなく、造血幹細胞を含む血液前駆細胞（CFU-Mix）が存在していたことから、生体内で VEGF を過剰発現させることによりミエロイド系細胞や造血幹細胞を含む骨髄細胞が末梢組織へ動員されたことが示された。これまでに、マウス体内における VEGF の骨髄動員作用を解析した例があり、VEGF は造血幹

細胞を含む血液前駆細胞の動員を誘導するという本研究と同内容の報告と、VEGF は HSC の動員に関与しないという、相反した報告があり、議論が分かれていた。前者は本研究と同様に VEGF 遺伝子の過剰発現により機能の解析を実施しているが、後者は遺伝子組換え VEGF タンパク質の *in vivo* 投与によりその機能を解析している。VEGF タンパク質の *in vivo* における半減期は 30 分程度であることが報告されており、血中 VEGF 濃度が十分に上昇していないことが相反する結果となった原因である可能性が高い。したがって、本研究のように高濃度の VEGF を末梢血中に循環可能な遺伝子発現系が VEGF の骨髄動員作用を正しく評価していると考えられることから、VEGF は造血幹細胞や血液前駆細胞を末梢血へ動員する作用を有していると結論付けた。

これまでに、VEGF を発現させた場合や遺伝子組換え VEGF タンパク質を投与した場合の末梢血細胞について主に解析されていたが、骨髄中の HSC の動態については詳細な検討はなされていない。そこで、骨髄中 KSL 細胞を解析したところ、Ad-VEGF 投与マウスでは KSL 細胞が有意に減少しており、KSL 細胞の中でも KSLCD34⁺Flt3⁺の MPP と KSLCD34⁻Flt3⁻の造血幹細胞（LT-HSC）の減少がみとめられた。特に長

期骨髓再構築能を有した造血幹細胞である LT-HSC が有意に減少するという本結果は、VEGF が LT-HSC が選択的に作用していることを示唆しており、大変興味深い。したがって、VEGF は未熟な時期の造血幹細胞に作用する分子であると考えられるため、より効率的な造血幹細胞動員因子となりえる可能性が示された。以上の結果より、Ad ベクターを用いて血中 VEGF 濃度を上昇させることにより、骨髓中の骨髓球系細胞や造血幹細胞を含む血液前駆細胞が末梢組織（末梢血や脾臓）へと動員することが示され、特に長期骨髓再構築能をもつ LT-HSC に選択的に作用することが示唆された。

本研究ではさらに、VEGF の過剰発現により造血幹細胞が減少するメカニズムについても検討を行った。正常時、造血幹細胞は骨髓中の微小環境に保持されているため、VEGF はこの骨髓微小環境の状態を変化させることで造血幹細胞の動員を促しているものと考えた。なお、臨床でも使用されている強力な造血幹細胞動員因子である G-CSF についてはその動員メカニズム解明に向けた研究がなされており、骨髓中のサイトカイン濃度等に異常が生じることにより骨髓動員が誘導されることが報告されている。本研究では、VEGF 投与時のニッチ細胞に着目し、その動態を解析した。近年

ニッチ研究において最も注目を集めている間葉系幹細胞の動態を解析したところ、Ad-VEGF 投与マウスの骨髓では間葉系幹細胞画分の細胞が有意に減少していることが明らかとなった。VEGF がどのように作用して骨髓中の間葉系幹細胞の動態を制御しているのかは今後の検討課題ではあるが、本結果は、VEGF がニッチ細胞を介して造血幹細胞動員を促すという新しい概念を導くものであるため非常に興味深い知見であると思われる。しかしながら、サイトカイン投与マウスをレシピエントとして造血幹細胞移植を実施するという本研究のアプローチを考えると、造血幹細胞を支持するニッチ細胞数がサイトカイン投与により減少することは望ましいことではない。ニッチ細胞として機能している間葉系幹細胞が VEGF により減少しているのか否か、詳細な検討が必要である。

また、本年度は G-CSF と VEGF の造血幹細胞動員作用の比較を行った。その結果、G-CSF の方が VEGF よりも優れた骨髓動員作用を有していることが確認された。一方、VEGF を G-CSF と同時に投与することで、G-CSF 単独投与時の骨髓動員作用が約 4 倍増強されることを見出した。メカニズムは不明であるが、G-CSF と VEGF、それぞれの造血幹細胞動員メカニズムが異なるため

に増強されている可能性もある。共投与による造血幹細胞動員メカニズムを解明するには、まず G-CSF や VEGF の単独投与によるメカニズムを明らかにする必要があるだろう。なお、これまでに SCF や Flt3-ligand も G-CSF と併用することで造血幹細胞動員を促進することが報告されているため、どのようなサイトカインの組み合わせが優れた造血幹細胞動員を示すかは今後の重要な研究課題である。ただし、サイトカインの大量投与は重篤な副作用を引き起こす可能性もあり、その点も考慮した検討を進める必要があると思われる。いずれにせよ、本研究課題においては VEGF と G-CSF を同時に投与することで効率的な造血幹細胞動員を示すことを明らかにできた。すなわち、G-CSF と VEGF を同時投与した際には、骨髓中では造血幹細胞の空きニッチが作製されている可能性を意味している。来年度は、骨切片等を作製することにより空きニッチが創製されていることを確認するとともに、サイトカイン投与マウスをレシピエントマウスとして、移植実験を実施していく予定である。

E. 結論

1. ヒト CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入には、ヒト CD46 を認識するファイバー蛋白質を有する改良型アデノウイルスベクターが適していた。

2. G-CSF または VEGF をマウス体内で過剰発現させることにより末梢血中に造血幹細胞を含む血液前駆細胞が増加していた。

またこれと並行して、骨髄内では未熟な血液細胞数の減少を確認した。

3. G-CSF と VEGF の両方のサイトカインをマウス体内で過剰発現させることにより、それぞれを単独投与した場合と比較し、末梢血中で未熟な血液細胞数が有意に増加することを見出した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H.; Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., *Stem Cell Res.*, **8**, 300-311, 2012

2. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Efficient and Directive Generation of Two Distinct Endoderm Lineages from Human ESCs and iPSCs by Differentiation Stage-Specific SOX17 Transduction, *PLoS ONE*, **6**, e21780, 2011

3. Sugio K., Sakurai F., Katayama K., Tashiro K., Matsui H., Kawabata K., Kawase A., Iwaki M., Hayakawa T., Fujiwara T., Mizuguchi H.; Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences., *Clin Cancer Res.*, **17**, 2807-2818, 2011

4. Tashiro K.; Optimization of adenovirus vectors for transduction in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells., *Yakugaku Zasshi.*, **131**, 1333-1338, 2011

2. 学会発表

1. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之: 3次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分

化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、
札幌、2012 年 3 月 28-31 日

2. 森 大輔、櫻井文教、清水かほり、立花
雅史、田代克久、川端健二、水口裕之：ア
デノウイルスベクターに 対する免疫応答
が繰り返し投与による遺伝子導 入に与え
る影響に関する検討、日本薬学会第 132 年
会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

3. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro,
Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji
Kawabata: Differentiation of mature mast cells
from mouse induced pluripotent stem cells、第
40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年
11 月 27-29 日

4. Katsuhisa Tashiro, Tomoko Yamaguchi,
Kenji Kawabata, Satoshi Takaki, Hiroyuki
Mizuguchi: Enhanced hematopoietic
differentiation from mouse embryonic stem
cells and induced pluripotent stem cells by
inhibition of an adaptor protein, Lnk.、第 40 回
日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11
月 27-29 日

5. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕
之：幹細胞への高効率遺伝子導入技術を利用
した分化誘導法の開発、第 61 回日本薬学

会近畿支部総会・大会、神戸、2011 年 10
月 22 日

6. 野中昭希、田代克久、山口朋子、水口裕
之、川端健二：造血幹細胞動員における
VEGF の機能解析、第 61 回日本薬学会近畿
支部総会・大会、神戸、2011 年 10 月 22 日

7. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕
之、川端健二：免疫毒性評価系の構築に向
けた iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化
誘導法の確立、第 61 回日本薬学会近畿支部
総会・大会、神戸、2011 年 10 月 22 日

H. 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

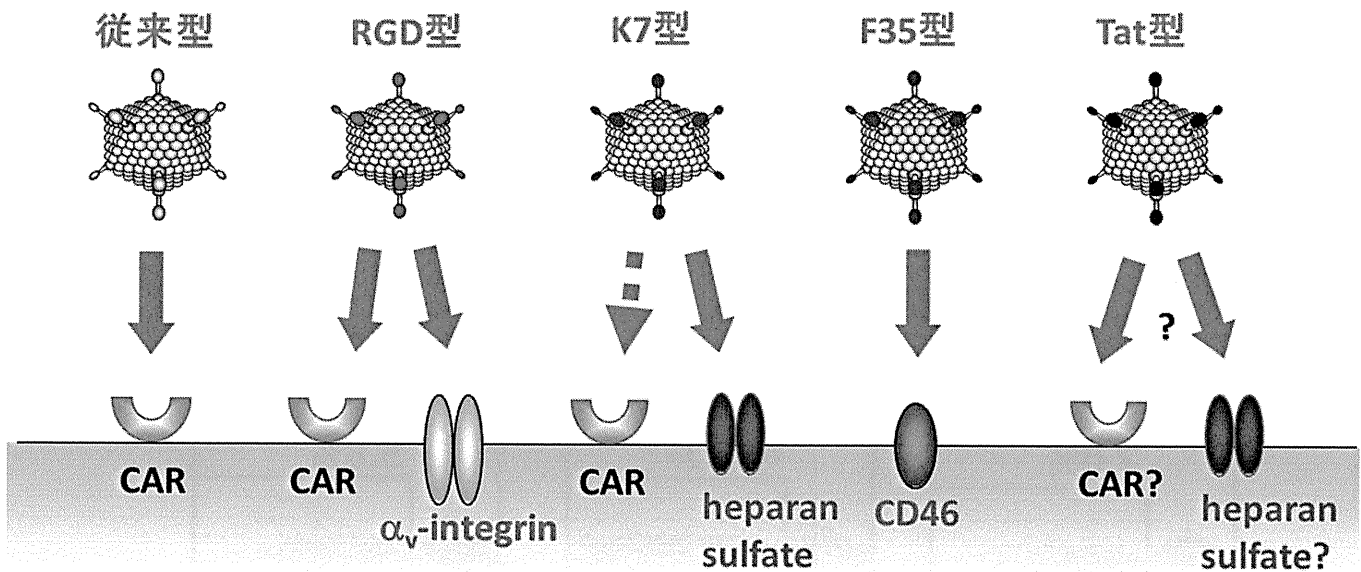


図1 改良型Adベクターの遺伝子導入特性

通常の実験で用いられている従来型Adベクターは、細胞表面上の受容体CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor) を認識して感染する。一方、改良型AdベクターはCARだけでなく、その他の分子を認識して細胞へ感染することが可能なベクターである。RGD型：インテグリンを認識する。K7型：ヘパラン硫酸を認識する。F35型：CD46を認識する。Tat型：ヘパラン硫酸を認識するという報告はなされているが、詳細なメカニズムは不明。