

201229034A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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24年度 総括研究報告書

研究代表者 田代 克久

平成25（2013）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 ----- 16

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

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、機能遺伝子を導入したドナー細胞（ヒト CD34 陽性細胞）の *in vitro* における細胞増殖活性および分化能を評価した。また、サイトカイン投与マウスにおける造血幹細胞動員機構の解明を試みるとともに、サイトカイン投与マウスをレシピエントとしてドナー細胞を移植した際の生着率を評価し、以下の知見を得た。

1. ヒト CD34 陽性細胞へ抗アポトーシス遺伝子を導入することにより、コントロールと比較し、長期的な増殖能が維持されていることを明らかにし、さらにそれらの細胞が未分化性を保持していることが示唆された。
2. VEGF をマウスへ過剰発現させた際の造血幹細胞動員機構の一つとして、骨髄間葉系幹細胞数が減少していることを見出した。しかし、ニッチ細胞として知られている間葉系幹細胞数が減少するため、VEGF 投与マウスをレシピエントとした場合、ドナー細胞の生着率が低下することが示唆された。
3. G-CSF 投与マウスをレシピエントとして、GFP マウス由来骨髄細胞を移植したが、生着はみとめられなかった。しかし、G-CSF を投与し、さらに抗がん剤 5-FU を投与することで、放射線非照射条件においても GFP を発現するドナー細胞が生着することが明らかとなった。

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

平田信恵 （独）医薬基盤研究所

A. 研究目的

造血幹細胞の骨髄への移入を本質とする骨髄移植や臍帯血移植は、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。が、高齢者や合併症をもった患者（レシピエント）へ適応例は少ない。それは、全身放射線照射や大量のアルキル化剤の投与といった移植前処理が、レシピエントに対して大きな負担となっているためである。また、この前処理によりレシピエント骨髄の造血幹細胞ニッチ（niche：本来の居場所）が破壊されていることも推察される。そのため、上記の問題を克服するには、骨髄非破壊的な造血幹細胞移植法の開発が必要不可欠で

ある。一方、骨髄非破壊状態では骨髄に多くの血液細胞が残存しているためドナー造血幹細胞の生着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拡大には、骨髄非破壊的、かつ高生着を可能とする造血幹細胞移植法の開発が重要である。

G-CSF 等のある種のサイトカイン/ケモカインは、骨髄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、重篤な骨髄損傷を伴わずに造血幹細胞を骨髄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髄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、レシピエント骨髄環境を操作することで、骨髄非破壊の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髄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) 機能増強した造血幹細胞をサイトカインで前処理したマウスへ移植し、キメリズムや生着率を評価する。今年度は主に、以下の研究を実施した。

- ① 機能遺伝子を発現する Ad ベクターを作製してヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入を行い、その後の増殖に与える影響を解析した。
- ② VEGF 発現 Ad ベクター投与マウスの骨髄において、造血幹細胞が減少するメカニズムの解明を試みた。
- ③ GFP マウス由来骨髄細胞（ドナー細胞）を、G-CSF 発現 Ad ベクター投与マウス（レシピエント）へ移植することで、ドナー細胞がレシピエントへ生着するか否か検討した。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

各種機能遺伝子を発現する 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。まず、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) を有するプラスミド pHMCA5 に、internal ribosome entry site (IRES) と GFP 挿入したシャトルプラスミド pHMCA5-IG を作製した。その後、pHMCA5-IG にラット FNK (活性増強型抗アポトーシス遺伝子)、ヒト Tie2、ヒト NF-Ya の cDNA をそれぞれ搭載した pHMCA5-FNK-IG、pHMCA5-Tie2-IG、pHMCA5-NFYa-IG を作製した。これらのプラスミドおよび機能遺伝子を搭載していないプラスミド pHMCA5-IG を I-CeuI および PI-SceI で消化し、同酵素で消化した ファイバー35 型の 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、FNK、Tie2、NFYa、GFP を発現する Ad ベクタープラスミドを得た。Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることで FNK、Tie2、NFYa、GFP をそれぞれ発現するファイバー35 型の Ad ベクター、AdF35-FNK-IG、AdF35-Tie2-IG、AdF35-NFYa-IG、AdF35-IG を得た。また、G-CSF 発現 Ad ベクター、VEGF 発現 Ad ベクター、外来遺伝子を発現しない Ad ベクター Ad-Null は昨年度作製したのを用いた。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. K562 細胞への遺伝子導入と機能遺伝子の発現確認

K562 細胞は 10%血清と抗生物質を含む RPMI1640 培地中で培養した。12 well プレートの 1 well へ 1×10^5 個の K562 細胞を播種し、その翌日に機能遺伝子を発現する Ad ベクターを 1,000 vector particle (VP) /cell

の濃度で作用させた。2 日後、細胞を回収して機能遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

B-3. ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入

ヒト骨髄由来 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機能遺伝子を発現する Ad ベクターならびにと混合した 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。長期培養する際には、3 日おきに一部、細胞数を計数し (B-4 参照)、残りの細胞は培地交換を行った。

B-4. 遺伝子導入 CD34 陽性細胞の細胞数計測・FACS 解析

機能遺伝子を導入したヒト CD34 陽性細胞の一部を細胞数計測に使用した。細胞数は血球計算盤もしくはヌクレオカウンターで計測した。また、回収した細胞を APC 標識抗ヒト CD34 抗体にて染色し、フローサイトメーターにて総細胞中の CD34 陽性細胞の割合を解析した。その後、得られた総細胞数、ならびに CD34 陽性細胞の割合をもとに、CD34 陽性細胞数を測定した。

B-5. In vitro コロニーアッセイ

Ad ベクター作用後の CD34 陽性細胞をヒトのコロニーアッセイ用培地 Methocult (H4435、Stem cell technologies 社) に播種し、14 日後に顕微鏡下でコロニー数を計測した。

B-6. 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、あるいは 1×10^9 ifu (infectious unit) の Ad-GCSF、Ad-VEGF、Ad-Null を投与した。投与 5 日後、末梢血、骨髄細胞を回収して以降の実験に用いた。

B-7. 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)、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 CD45 抗体、抗 Alcam 抗体、抗 CD31 抗体であり、抗 CD51 抗体、抗 PDGFR α 抗体、抗 VEGFR1 抗体、抗 VEGFR2 抗体、抗 CD41 抗体、抗 CD19 抗体であり、eBiosciences 社、BD Bioscience 社、Biolegend 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-8. 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髄細胞を 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⁻の骨髄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。

B-9. Homing assay

Ad-VEGF もしくは Ad-Null 投与 5 日後に、マウス 1 匹あたり 1×10^7 個の健常 GFP トランスジェニックマウス由来回収骨髄細胞を尾静脈投与した。投与 16 時間後に、各マウスから骨髄細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて骨髄中 GFP 発現細胞の割合を解析した。

B-10. Migration assay

24well にインサートをセットし、DMEM 500 μ l を添加した。37°C 条件下で 20-30 分間インキュベート後、DMEM を除去し、インサートに骨髄ストローマ細胞 (1.0×10^5 cells / 200 μ l of DMEM) を播種し、培養プレートには、各濃度の VEGF を含む DMEM 750 μ l を添加した。6 時間後、綿棒にてフィルター上面の細胞を除去し、100% メタノールで細胞を固定した。その後、ギムザ染色にて染色された細胞を顕微鏡下で観察し、1 視野辺りの細胞数を計測した。

B-11. Ad-GCSF 投与マウスへの GFP 発現骨髄細胞の移植

Ad-Null または Ad-GCSF を投与し、その 3 日後に 5-フルオロウラシル (5-FU) または 150mg/kg、または PBS を腹腔内投与した。コントロールとして、ベクター非投与マウスへも 5-FU を投与した。5-FU を投与して 2 日後に GFP トランスジェニックマウスから骨髄細胞を回収した。回収した GFP 発現骨髄細胞 (1×10^7 個) をそれぞれのマウスの尾静脈から移入した。移植 4~16 週間後に末梢血または骨髄細胞を回収し、キメリズムをフローサイトメーターにて解析した。

(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

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。昨年度、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にした。そこで本年度は各種機能遺伝子を搭載した F35 型 Ad ベクターを作製し、CD34 陽性細胞へ発現させたときの *in vitro* の機能について解析を進めた。機能遺伝子として、抗アポトーシス遺伝子の活性増強体である Bcl-x1-FNK (FNK)、骨髄での生着に関与している Tie2、造血幹細胞の増殖に寄与している NF-Ya を選択した。なお、これらのベクターは遺伝子導入効率評価を目的として、機能遺伝子と GFP を同時に発現可能なベクターを作製した (図 1)。

まず、K562 細胞を用いて作製した Ad ベクターが目的の遺伝子を発現しているかどうか検討を行った。各種 Ad ベクターを K562 細胞へ作用させた結果、いずれの細胞も搭載した遺伝子の発現が観察されたことから、作製した Ad ベクターが機能的であることが確認された (図 2)。

次にヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を解析した。その結果、昨年度の結果と同様に、いずれのベクターも 60~70% の遺伝子導入効率であった (図 3a)。そこでこれらのベクターを CD34 陽性細胞へ作用させた際の *in vitro* における細胞増殖と分化能について解析を進めた。細胞増殖に与える影響を検討した結果、FNK 導入群においてわずかな細胞数の減少が観察されたが、著差はみとめられなかった (図 3b 左)。CD34 陽性細胞数に関しても遺伝子導入 10 日目まで変化はみとめられなかったものの、遺伝子導入 15 日目以降においても FNK 群で

はCD34陽性細胞数の増加が観察された(図3b右)。また、遺伝子導入3日後、ならびに20日後の分化能をコロニーアッセイ法にて評価した。その結果、遺伝子導入3日後ではいずれの遺伝子を導入した細胞においても同等のコロニー数であった。一方、遺伝子導入20日後においては、コントロール群と比較し、FNK群ではコロニー数の増加が観察された(図3c)。以上の結果から、抗アポトーシス遺伝子をヒトCD34陽性細胞へ導入することにより、*in vitro*において長期的に増殖能・分化能を維持できることが明らかとなった。

C-2. VEGF発現Adベクターの投与時の血液前駆細胞動員機構の解析

昨年度、サイトカイン投与によるレシピエント骨髄の改変を目的として、VEGF発現ベクターを作製し、マウスへ投与したところ、骨髄における造血幹細胞/血液前駆細胞数が有意に低下していることを確認した。そこで本年度は、そのメカニズム解明に向け研究を行った。

造血幹細胞は通常時、骨髄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、骨髄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4a)。また、その他の間葉系幹細胞マーカーでも解析を行ったところ、CD45⁺/Ter119⁻/Sca-1⁺/PDGFR α ⁺とCD45⁺/lineage抗原⁻/CD31⁻

Sca-1⁺/CD51⁺の間葉系幹細胞においても同様の減少が観察された(図4b, 4c)。また、Ad-VEGF投与マウスの骨髄ストローマ細胞においては、Angiopoietin-1やVCAM-1等の間葉系幹細胞が多量に産生している分子の発現が著名に減少していたため、Ad-VEGF投与による間葉系幹細胞の減少が示唆された(図4d)。次に増殖能力のある間葉系幹細胞を定量する方法である、線維芽細胞コロニー形成法(CFU-F assay)により、間葉系幹細胞数を定量した。その結果、Ad-VEGF投与マウスの骨髄においてはCFU-F数、つまり間葉系幹細胞数が有意に減少していた(図4e)。以上の結果から、生体でのVEGF過剰発現により間葉系幹細胞が骨髄内で減少することが判明した。そこで次に、Ad-VEGF投与時に間葉系幹細胞が減少するメカニズムを調べることにした。まず、VEGFが間葉系幹細胞に直接作用しているか否か調べるため、VEGFの受容体の発現をフローサイトメトリーにより解析した。本研究で使用しているVEGFに結合する受容体のうち、今回はVEGFR1(別名Flt-1)とVEGFR2(別名Flk-1)の発現を解析したところ、間葉系幹細胞はいずれの受容体も発現していることが明らかとなり(図5a)、VEGFは直接間葉系幹細胞に作用していることが示唆された。しかし、予想に反し、Ad-VEGFを投与しても骨髄内のVEGF濃度は上昇していなかった(図5b)。したがって、Adベクター由来のVEGFが直接骨髄内間葉系幹細胞へ作用していないことが示唆された。ただし、この結果は末梢血VEGF濃度と骨髄内VEGF濃度に大きな勾配が生じていることを意味しており、この濃度勾配により間葉系幹細胞が末梢組織へ遊走している可能性が考えられた。そこで次に*in vitro*で増幅した骨髄ストローマ細胞を用いてトランズウェル遊走アッセイを行った。その結果、VEGFは間葉系幹細胞に対して強い遊走作用を有していることが示された(図5c)。したがって、Ad-VEGFをマウスへ投与した際にも骨髄内の間葉系幹細胞もVEGFの濃度勾配により末梢組織へ

と遊走していることが示唆された。そこで最後に、ホーミングアッセイを行うことにより実際にマウス骨髄において機能している間葉系幹細胞が減少していることかどうかを検討した。Ad-Null または Ad-VEGF を投与したマウスへ GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を移入し、その 16 時間後にレシピエントマウス骨髄中の GFP 陽性細胞数を解析することにより生着率を評価した。その結果、Ad-VEGF 投与マウスをレシピエントとした場合、ドナー細胞 (GFP 陽性細胞) の生着率は減少することが示された (図 6)。以上の結果から、Ad-VEGF 投与マウスでは、骨髄において間葉系幹細胞数が減少していることが示され、VEGF は間葉系幹細胞の動態を制御する分子であることが明らかとなったが、サイトカイン投与マウスをレシピエントとして移植効率の向上を目指す本研究課題に対しては、VEGF の使用は不適切であることが示唆された。

C-3. GCSF 投与マウスをレシピエントとした骨髄移植

昨年度の解析から、GCSF は VEGF と比較し、骨髄中の造血幹細胞を含む血液前駆細胞を効率的に末梢組織へ動員する作用を有していることを確認した。そこで本年度は GCSF 発現 Ad ベクターを投与して骨髄環境を操作したレシピエントマウスへドナー細胞を移植し、移植が成立するか否か検討することとした。

本年度は、サイトカインによる骨髄改変が移植に有効かどうか検証するため、ドナー細胞は GFP トランスジェニックマウス由来骨髄細胞、レシピエントは野生型の C57BL/6 マウスを用いた。GCSF 投与により骨髄より遊離したレシピエント由来の細胞が再度骨髄へ移入する可能性が高いため、今回は GCSF 投与後に抗がん剤 5-FU を投与する群も加えて検討を行った (図 7a, 7b)。移植 4 週間後にレシピエントマウスの末梢血を回収し、キメリズムを解析したところ、GCSF と 5-FU を投与したマウスをレシピエ

ントとした場合、GFP を発現するドナー細胞が末梢血中で 10~30% 観察された。一方、5-FU のみを投与したマウス、ならびに Ad-Null と 5-FU を投与したマウス (Ad-Null+5FU 群) においては、~4% 程度のキメリズムであったことから、GCSF と 5FU にて移植前処理を行ったレシピエントにはドナー細胞が生着していることが示唆された (図 7a, 7b)。なお、GCSF のみを投与したマウスをレシピエントとしてドナー細胞を移入したマウスにおいては、ドナー細胞はほとんど検出されなかった。次に、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞が生着しているかどうか検証するため、移植 16 週間後におけるキメリズムを解析したところ、キメリズムは移植 4 週間後より減少していたが、ドナー細胞が末梢血中で検出された。また、レシピエントマウスの骨髄細胞を回収し、詳細な解析を進めた結果、造血幹細胞画分である KSL 画分や各細胞系譜の細胞においても GFP 発現ドナー細胞は検出されたことから、放射線非照射条件である本移植法において、分化能を有する造血幹細胞がレシピエントへ生着していることが示された (図 8)。

D. 考察

本研究では、骨髄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髄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目指している。

本年度は、機能遺伝子を搭載した AdF35 型ベクターをヒト CD34 陽性細胞へ作用させ、*in vitro* における増殖と分化に対する影響を検討したところ、抗アポトーシス遺伝子を導入した際に、分化能を保持しつつ長期的に CD34 陽性細胞を増幅できることが明らかとなった。どのようなメカニズムで抗アポトーシス遺伝子導入時に CD34 陽性細胞が増幅されているのかは明らかではないが、*in vitro* での増殖する際には活性酸素が生じその結果細胞死が誘導されている可能性が考えられ、抗アポトーシス遺伝子はこの細胞死を抑制している可能性が考えられる。また、本年度は *in vitro* における解析のみであったが、機能遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を免疫不全マウスへ移入し、*in vivo* での生着率にどのような影響を及ぼすか、今後検討を進める予定である。

造血幹細胞は骨髄中の骨芽細胞や血管内皮細胞、間葉系幹細胞等の種々のニッチ細胞に支持されて生存している。そこ本年度は VEGF 投与時の造血幹細胞動員メカニズムの解明を目指し、VEGF 投与時の間葉系幹細胞の動態について解析を行った。その結果、VEGF 投与マウスの骨髄では間葉系幹細胞数が減少していること、そして間葉系幹細胞は VEGF の濃度依存的に遊走能が亢進することを見出した。したがって、VEGF 投与時にはニッチ細胞である間葉系幹細胞が減少したことにより造血幹細胞が末梢組織へ動員したものと推察された。また、VEGF 投与マウスにおけるニッチ細胞の減少は、その後のドナー細胞移植効率に影響を及ぼすことが懸念されたため、

ホーミングアッセイを実施したところ、ドナー骨髄細胞のレシピエント骨髄への生着率が減少していた。したがって、本研究課題の目標達成には VEGF は不適切であることが示唆された。今後、VEGF についても 5-FU を併用投与したマウスをレシピエントとして移植実験を行うことで、ドナー細胞の生着に与える影響を検証する必要があると考えられる。

また、本年度は G-CSF と 5-FU を併用投与したマウスをレシピエントとすることにより、放射線非照射条件においても移植が成立することを世界に先駆けて示した。G-CSF のみを投与したマウス、または 5-FU のみを投与したマウスにおいてはドナー細胞の生着率が低かったことから、G-CSF と 5-FU の併用が移植前処理法として有効であることが示された。来年度は、ドナー細胞としてヒト CD34 陽性細胞、レシピエントとしては免疫不全マウス (Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウスまたは NOD/SCID/γc^{-/-}マウス) を用いて検討を進め、サイトカイン投与マウスをレシピエントとしてヒト造血幹細胞が生着するか否か検討を進める予定である。

E. 結論

1. ヒト CD34 陽性細胞へ抗アポトーシス遺伝子を導入することで、in vitro における増殖能・分化能を長期間維持できることを明らかにした。

2. VEGF 投与マウスの骨髄では間葉系幹細胞数が減少しており、そのために造血幹細胞の動員が誘導されていることが示唆された。

3. G-CSF と 5-FU を併用投与したマウスをレシピエントとすることにより、放射線非照射条件においても長期骨髄再構築能を有するドナー造血幹細胞が生着することを世界に先駆けて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K., Omori M.*, Kawabata K., Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H.; Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation., *Stem Cells Dev.*, **21**, 3381-3390, 2012 (*equally contributed)

2. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction., *J. Hepatol.*, **57**, 628-636, 2012

3. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets., *Biomaterials*, **33**, 4526-4534, 2012

4. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α Transduction. *Mol. Ther.*, **20**, 127-137, 2012

2. 学会発表

1. 田代克久、大森美幸、川端健二、平田信恵、山口朋子、櫻井文教、高木智、水口裕之：アダプター蛋白質 Lnk の抑制はマウス ES/iPS 細胞から血液前駆細胞への分化を促進する；日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

2. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二：マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発；日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

3. 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用；第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日

4. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二：マスト細胞の成熟化に関与する新規液性因子の同定；第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日

5. Yasuhito Nagamoto, Katsuhisa Tashiro, Kazuo Takayama, Kazuo Ohashi, Kenji Kawabata, Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, & Hiroyuki Mizuguchi, Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

6. Katsuhisa Tashiro, Aki nonaka, Tomoko

Yamaguchi, Mizuguchi Hiroyuki, Kenji Kawabata. Mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by vascular endothelial growth factor is mediated by reduction of mesenchymal stromal cells in bone marrow., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

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

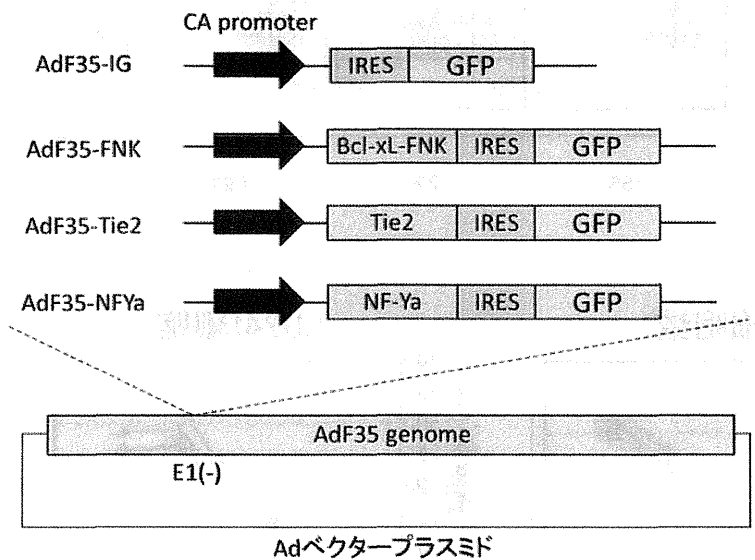


図1 機能遺伝子を発現するF35型Adベクター Bcl-xL-FNK: ラットBcl-xL遺伝子の活性増強変異型

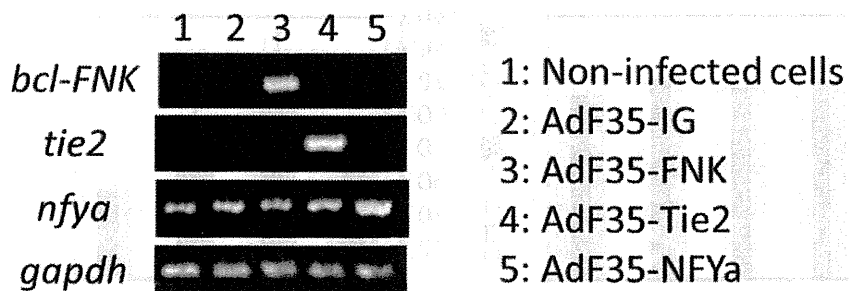


図2 K562細胞を用いた機能遺伝子発現確認
 各AdベクターをK562細胞へ1,000 vector particle (VP)/cellの濃度で作用させた。2日後にRNAを回収し、機能遺伝子の発現をRT-PCR法にて解析した。

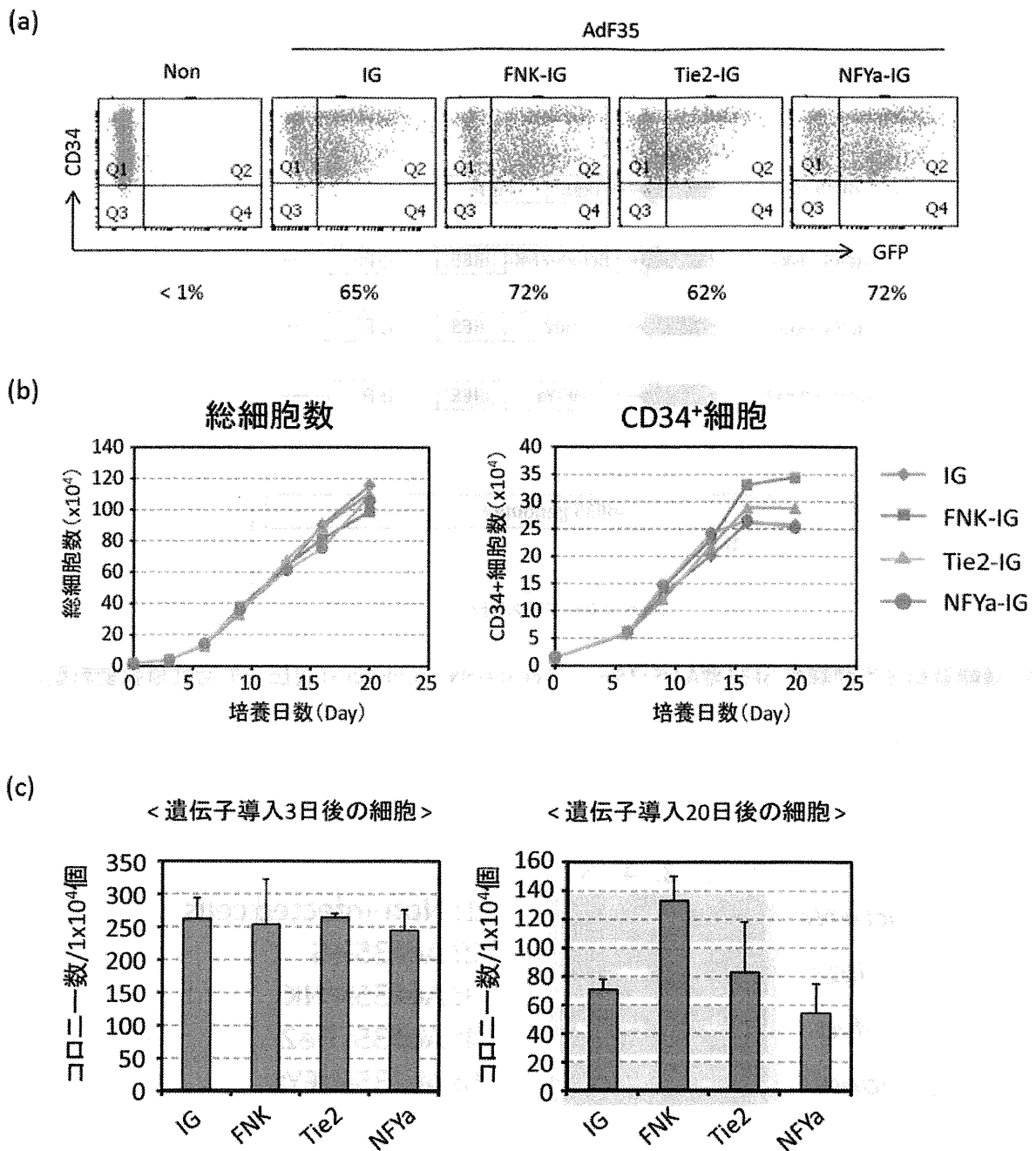


図3 機能遺伝子導入後の細胞増殖

- (a) 各Adベクターを $3,000\text{VP}/\text{cell}$ の濃度で作用させ、2日後にフローサイトメーターにてGFP発現細胞の割合は測定した。
- (b) 各Adベクターを作用後、3-4日おきに細胞数を計測した。また、フローサイトメーターにてCD34陽性細胞数の割合を解析し、総細胞数をもとにCD34⁺細胞数を算出した。
- (c) 各Adベクターを作用させ、3日後または20日後にコロニーアッセイを行った。

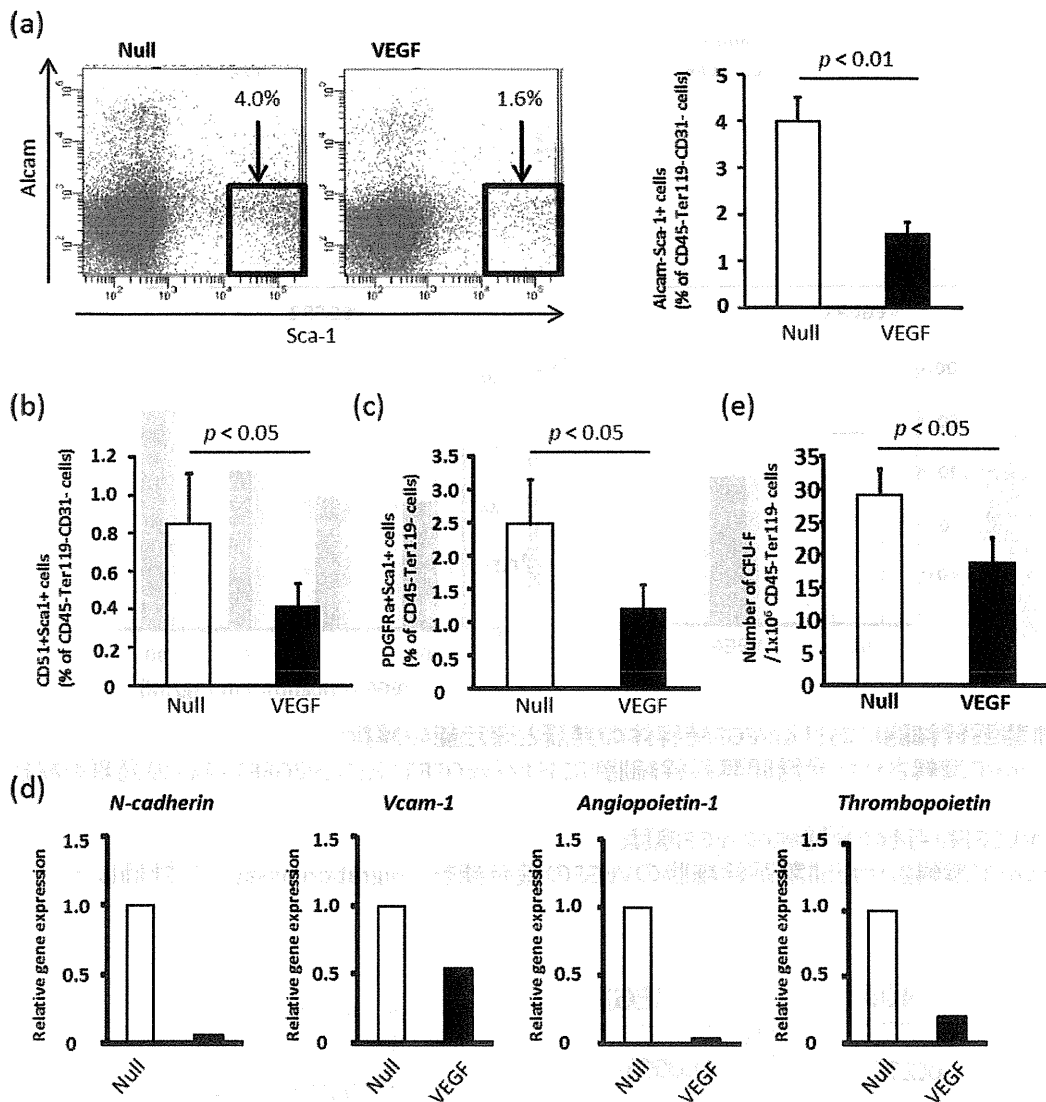


図4 Ad-VEGF投与マウスの骨髄間葉系幹細胞の解析

(a-c) マウスへAd-VEGFまたはAd-Null(コントロールベクター)を投与し、その5日後に間葉系幹細胞画分を解析した。a; CD45-Ter119-CD31-Sca1+Alcam-, b; CD45-Ter119-CD31-Sca1+CD51+, c; CD45-Ter119-Sca1+PDGFR α +

(d) Adベクター投与後の骨髄中非血液細胞(CD45-Ter119-CD31-細胞)を回収し、ニッチ細胞が発現する各種遺伝子の発現解析を行った。

(e) Adベクター投与後に骨髄中非血液細胞を回収し、CFU-Fアッセイを行った。

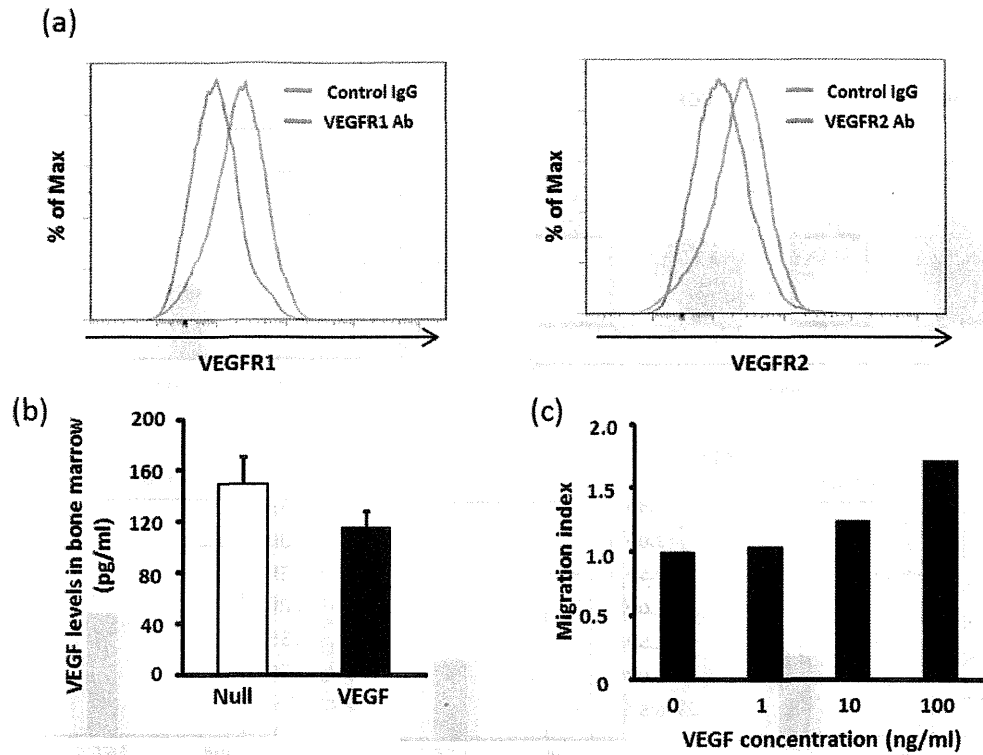


図5 間葉系幹細胞におけるVEGF受容体の発現と遊走能の解析

- (a) In vitroで増幅させた骨髄間葉系幹細胞におけるVEGFR1(左)とVEGFR2(右)の発現を解析した。
- (b) Ad-VEGF投与後の骨髄中のVEGF濃度
- (c) In vitroで増幅させた間葉系幹細胞のVEGFの遊走能を、migration assayにて評価した。

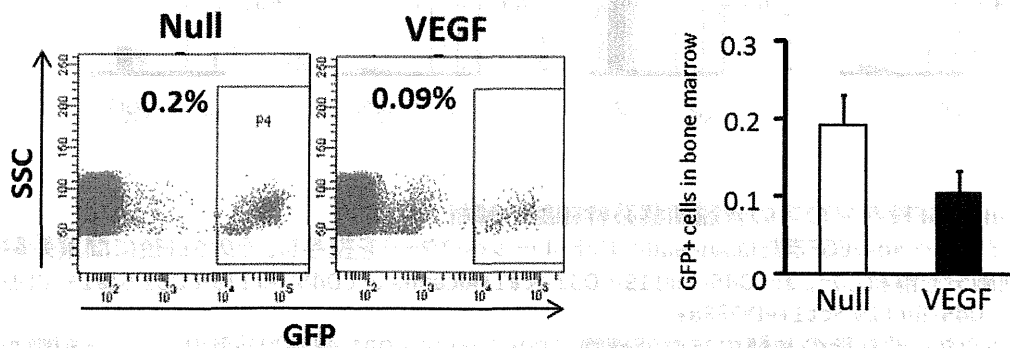


図6 Ad-VEGF投与マウスをレシピエントとしたホーミングアッセイ

Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与し、5日後にGFPTランスジェニック由来骨髄細胞を移植した。移植16時間後に、レシピエントマウス骨髄におけるGFP発現細胞の割合をフローサイトメーターにて解析した。

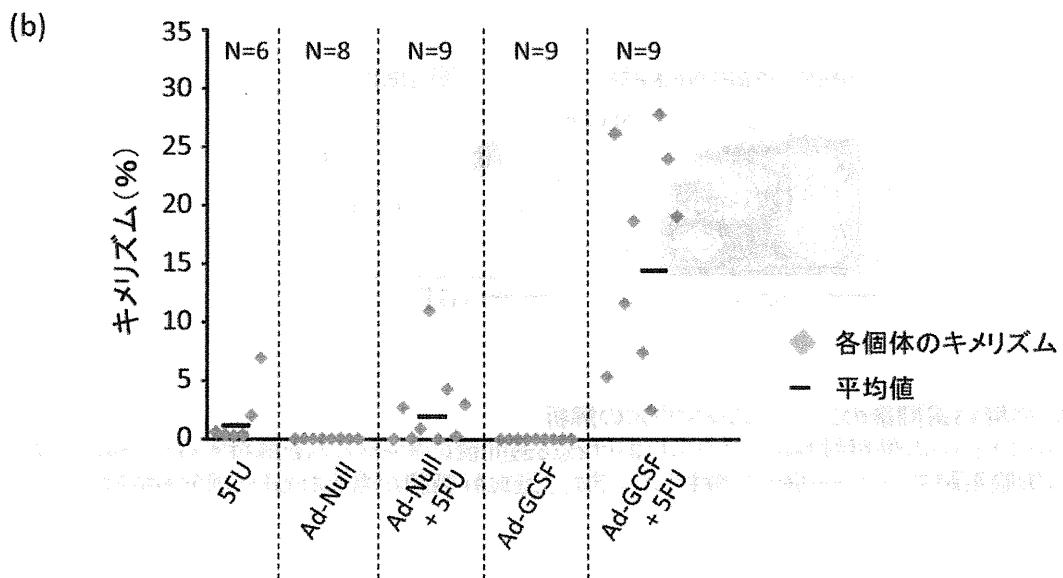
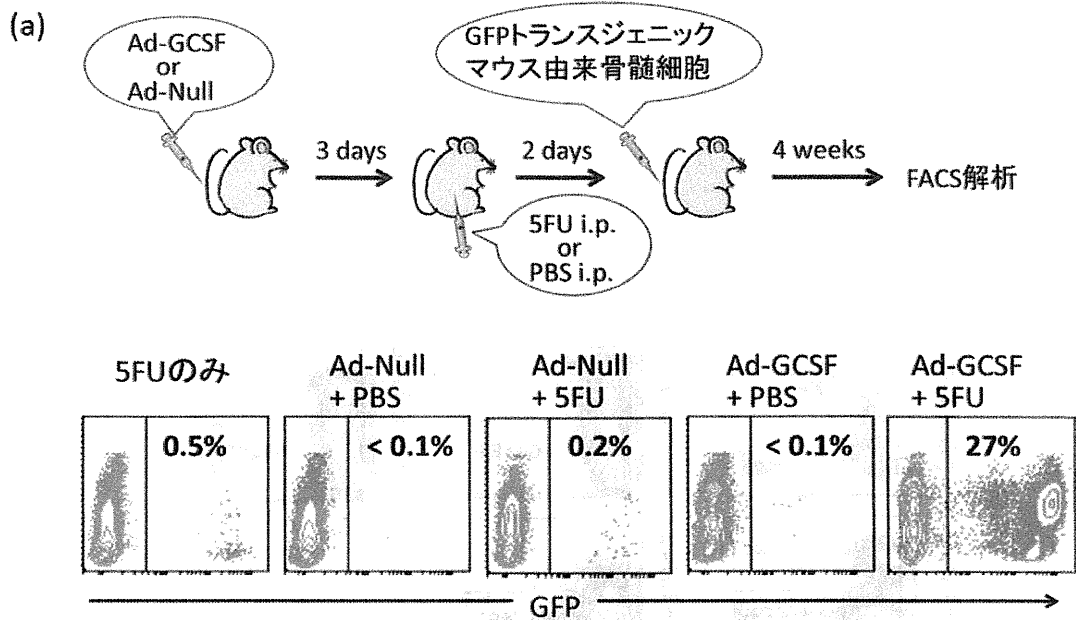


図7 Ad-GCSFと5FUを併用投与したマウスはドナー細胞の生着率が向上する。

(a) 各条件でC57BL/6マウスを前処理し、GFP発現骨髄細胞を移植した。移植4週間後におけるキメリズムをフローサイトメーターにて解析した。

(b) 移植4週間後のキメリズムのまとめ

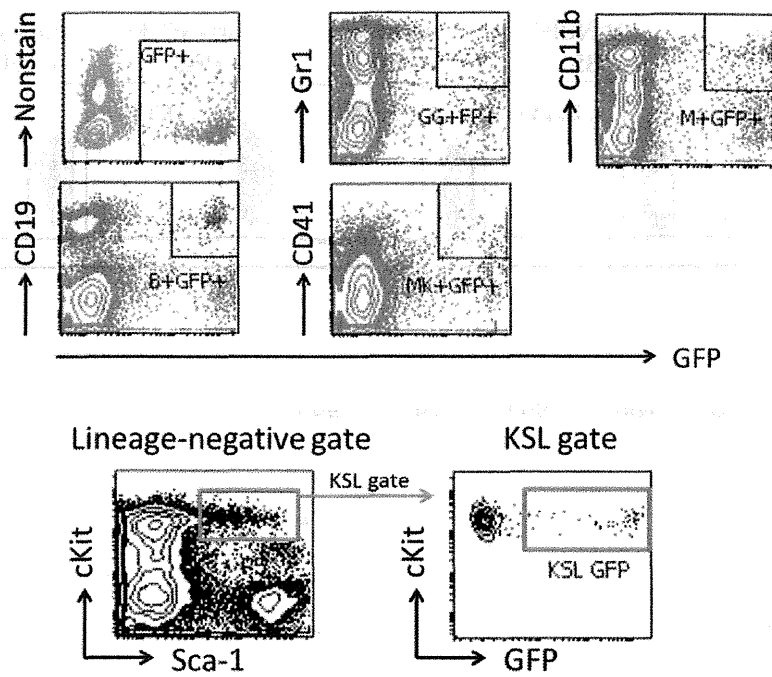


図8 移植16週間後のレシピエントマウスの解析

Ad-GCSFと5-FUの併用投与したマウスにおける16週間後のキメリズムを解析するとともに、それぞれの細胞系譜マーカーも併せて解析した。また、造血幹細胞が含まれるKSL画分も解析した。

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
Tashiro K.*, Omori M.*, Kawabata K., Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H. (*equally contributed)	Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation	<i>Stem Cells Dev.</i>	21	3381-3390	2012
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction.	<i>J. Hepatol.</i>	57	628-636	2012
Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets.	<i>Biomaterials.</i>	33	4526-4534	2012
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α Transduction.	<i>Mol. Ther.</i>	20	127-137	2012

Inhibition of Lnk in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Hematopoietic Cell Generation

Katsuhisa Tashiro,^{1,*} Miyuki Omori,^{1,2,*} Kenji Kawabata,^{1,3} Nobue Hirata,¹ Tomoko Yamaguchi,¹ Fuminori Sakurai,² Satoshi Takaki,⁴ and Hiroyuki Mizuguchi^{1,2,5}

Embryonic stem (ES) cell- and induced pluripotent stem (iPS) cell-derived hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are considered as an unlimited source for HSPC transplantation. However, production of immature hematopoietic cells, especially HSPCs, from ES and iPS cells has been challenging. The adaptor protein Lnk has been shown to negatively regulate HSPC function via the inhibition of thrombopoietin (TPO) and stem cell factor signaling, and Lnk-deficient HSPCs show an enhanced self-renewal and repopulation capacity. In this study, we examined the role of Lnk on the hematopoietic differentiation from mouse ES and iPS cells by the inhibition of Lnk using a dominant-negative mutant of the Lnk (*DN-Lnk*) gene. We generated mouse ES and iPS cells stably expressing a DN-Lnk, and found that enforced expression of a DN-Lnk in ES and iPS cells led to an enhanced generation of Flk-1-positive mesodermal cells, thereby could increase in the expression of hematopoietic transcription factors, including *Scl* and *Runx1*. We also showed that the number of both total hematopoietic cells and immature hematopoietic cells with colony-forming potential in DN-Lnk-expressing cells was significantly increased in comparison with that in control cells. Furthermore, Lnk inhibition by the overexpression of the *DN-Lnk* gene augmented the TPO-induced phosphorylation of Erk1/2 and Akt, indicating the enhanced sensitivity to TPO. Adenovirus vector-mediated transient *DN-Lnk* gene expression in ES and iPS cells could also increase the hematopoietic cell production. Our data clearly showed that the inhibition of Lnk in ES and iPS cells could result in the efficient generation and expansion of hematopoietic cells.

Introduction

SINCE EMBRYONIC STEM (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells can self-renew indefinitely and differentiate into all types of cells in the 3 germ layers, they are expected to have clinical applications in cell-based therapies [1–4]. For instance, ES cell- and iPS cell-derived hematopoietic cells are considered as an alternative source of adult hematopoietic cells for the treatment of hematological disorders and malignancies. Many groups have reported the differentiation of ES and iPS cells into mature hematopoietic cells, including erythrocytes, myeloid cells, and lymphoid cells [5–10]. However, previous reports have described the generation of only small numbers of mature hematopoietic cells, probably as a result of inefficient generation and expansion of immature hematopoietic cells derived from pluripotent stem cells. Therefore, the use of ES cell- and iPS cell-derived hematopoietic cells as a cell source for therapeutic applications de-

pends on the efficient production of hematopoietic cells, especially immature hematopoietic cells, from pluripotent stem cells.

Recently, inhibitors of differentiation (*ID*) genes, which are negative regulators of E proteins (E2A, HEB, and E2-2) [11], were shown to negatively regulate the hematopoietic differentiation in ES and iPS cells [12]. The same study also showed that the suppression of the *ID* genes, *ID1* and *ID3* increased the number of ES and iPS cell-derived hematopoietic progenitor cells [12]. These data indicate that negative regulators play an important role in the hematopoietic differentiation process in ES and iPS cells, and that manipulation of the expression of negative regulators would be an effective strategy for the efficient generation of hematopoietic cells from ES and iPS cells.

An adaptor protein Lnk/SH2B3 (hereafter referred to Lnk) is shown to negatively regulate the thrombopoietin (TPO) and stem cell factor (SCF) signaling, both of which are crucial

¹Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan.

²Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan.

³Laboratory of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan.

⁴Department of Immune Regulation, National Center for Global Health and Medicine, Research Institute, Tokyo, Japan.

⁵The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka, Japan.

*These two authors contributed equally to this work.

cytokine-signaling pathways involved in hematopoietic stem cell (HSC) self-renewal, since Lnk-deficient HSCs exhibit an augmented response to TPO and SCF stimulation, and thereby Lnk-deficient mice show the marked HSC expansion in the bone marrow [13–16]. In addition, Lnk is highly expressed in immature hematopoietic cells, particularly in HSCs [17], in contrast to ID genes, which are ubiquitously expressed in many tissues [11,18]. Therefore, we speculated that an inhibition of Lnk function in ES and iPS cells would lead to the efficient generation and expansion of immature hematopoietic cells. In the present study, we investigated the effects of Lnk inhibition on the hematopoietic differentiation of mouse ES and iPS cells, and we found that a suppression of Lnk function by the enforced expression of a dominant-negative mutant of the Lnk (*DN-Lnk*) gene in ES and iPS cells resulted in an increase in the number of both mesodermal cells with hematopoietic differentiation potential and immature hematopoietic cells. These findings indicate that the suppression of the Lnk would be useful for the efficient generation and expansion of ES cell- and iPS cell-derived hematopoietic cells.

Materials and Methods

Plasmid construction and adenovirus vectors

pEF-IRESneo, which contains internal ribosome entry sites (IRES) and a neomycin-resistant gene (*Neo*) downstream of the human elongation factor (EF)-1 α promoter, was constructed by replacing the cytomegalovirus (CMV) promoter of pIRESneo (Clontech) with the EF-1 α promoter, which is derived from pEF/myc/nuc (Invitrogen). Mouse DN-Lnk cDNA, derived from pMY-DN-Lnk [19], was inserted into pEFIRESneo, resulting in pEF-DNLnk-IRESneo. Adenovirus (Ad) vectors were constructed by an improved in vitro ligation method [20,21]. Mouse DN-Lnk cDNA was inserted into pHMCA5 [22], which contains the CMV enhancer/ β -actin promoter with an β -actin intron (CA) promoter (a kind gift from Dr. J. Miyazaki, Osaka University) [23], resulting in pHMCA5-DN-Lnk. pHMCA5-DN-Lnk was digested with *I-CeuI*/*PI-SceI* and ligated into *I-CeuI*/*PI-SceI*-digested pAdHM4 [20], resulting in pAd-DN-Lnk. Ad-DN-Lnk and Ad-DsRed were generated and purified as described previously [24]. The CA promoter-driven β -galactosidase (LacZ)-expressing Ad vector, Ad-LacZ, and the CA promoter-driven DsRed-expressing Ad vector, Ad-DsRed, were generated previously [24,25]. The vector particle (VP) titer was determined using a spectrophotometric method [26].

Cell culture

The mouse ES cell line, BRC6 (Riken Bioresource Center), and the mouse iPS cell line, 38C2 (a kind gift from Dr. S. Yamanaka, Kyoto University) [27], were used in this study. DN-Lnk- or *Neo*-expressing mouse ES and iPS cell lines were generated as follows. The pEF-IRESneo and pEF-DNLnk-IRESneo were linearized and were then electroporated into mouse ES cells and iPS cells by using Gene Pulser Xcell (250 V, 500 μ F; Bio-Rad Laboratory). pEF-IRESneo- or pEF-DNLnk-IRESneo-transfected ES cells and iPS cells were cultured in an ES cell medium containing 100 μ g/mL G418 (for ES cells) or 200 μ g/mL G418 (for iPS cells) for 10–14 days, and G418-resistant colonies were picked up and expanded.

The expression of DN-Lnk was confirmed by conventional reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). Mouse ES cells, iPS cells, and *Neo*- or DN-Lnk-expressing mouse ES and iPS cells were cultured in a leukemia inhibitory factor-containing ES cell medium (Millipore) on mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) [28]. OP9 stromal cells were cultured in an α -minimum essential medium (α -MEM; Sigma) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and non-essential amino acid (Invitrogen).

In vitro hematopoietic differentiation

For embryoid body (EB) differentiation, mouse ES and iPS cells were trypsinized and collected in an EB medium (EBM) containing the Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako) supplemented with 15% FBS, non-essential amino acids (Millipore), penicillin/streptomycin (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, and 100 μ M β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque), and they were plated on a culture dish for 30 min to allow the MEFs to adhere. Nonadherent cells were collected and plated on a round-bottom Lipidure-coated 96-well plate (Nunc) at 3×10^3 cells (ES cells) or 1×10^3 (iPS cells) cells per well. On day 5, half of the medium was exchanged for fresh EBM. EBs were collected on day 7, and a single-cell suspension was prepared by the use of trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid. The EB-derived cells (4×10^5 cells) were plated on OP9 stromal cells in the wells of a 6-well plate and were then cultured with an OP9 medium containing recombinant hematopoietic cytokines [100 ng/mL mouse SCF, 100 ng/mL human Flt3-ligand, 20 ng/mL mouse TPO, 5 ng/mL mouse interleukin (IL)-3, and 5 ng/mL human IL-6] to induce and expand the hematopoietic cells. In the case of DN-Lnk transduction using the Ad vector, EB-derived cells were transduced with Ad-LacZ or Ad-DN-Lnk at 3,000 VP/cell for 1.5 h in a 15-mL tube before the transduced EB-derived cells plating on OP9 cells. Hematopoietic cells were collected as described previously [25]. In brief, the floating and loosely attached cells were collected by pipetting and were transferred to 15-mL tubes. The adherent hematopoietic cells were harvested by trypsin treatment, and were then incubated in a tissue culture dish for 30–60 min to eliminate the OP9 stromal cells. Floating cells were collected as hematopoietic cells and transferred to the same 15-mL tubes. These hematopoietic cells were kept on ice for further analysis.

Flow cytometry

The following primary monoclonal antibodies (Abs), conjugated with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, or allophycocyanin, were used for flow cytometric analysis: anti-CD45 (30-F11; eBioscience), anti-CD11b (M1/70; eBioscience), anti-Sca-1 (D7; eBioscience), anti-Ter119 (Ter-119; eBioscience), anti-CD34 (RAM34; eBioscience), anti-CXCR4 (2B11; BD Bioscience), anti-Gr-1 (RB6-8C5; eBioscience), anti-c-Kit (ACK2 or 2B8; eBioscience), and anti-CD41 (MWRReg30; BD Bioscience). Purified rat anti-mouse c-Mpl/TPOR monoclonal Ab was obtained from IBL. Cells (1×10^5 – 5×10^5) were incubated with monoclonal Abs at 4°C for 30 min and washed twice with a staining buffer (phosphate-buffered saline/2% FBS). For detection of Mpl/TPOR, Dylight649-conjugated goat anti-rat IgG (BioLegend)