

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 vivo* における機能評価を行った。また、サイトカインを投与した免疫不全マウスへのヒト CD34 陽性細胞の移植を行い、以下の結果を得た。

1. 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、免疫不全マウスへの移植効率が向上することを明らかにした。
2. G-CSF を投与した免疫不全マウスへ、ドナー細胞を移植したがその移植効率は極めて低く、移植条件の改良が必要であることが示唆された。

研究協力者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所

平田信恵 (独) 医薬基盤研究所

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

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。

A. 研究目的

造血幹細胞移植の骨髄は、種々の造血障害の根治療法として推進されてきた。しかし、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

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。

ヒト CD34 陽性細胞へ抗アポトーシス遺伝子を導入し、*in vivo* における機能(移植率)を評価した。

サイトカインを投与した免疫不全マウスへのヒト CD34 陽性細胞の移植を行った。

B. 研究方法

B-1. 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 ずつ加えた。機能増強型抗アポトーシス遺伝子 Bcl-xl-FNK を発現する Ad ベクター、Ad-FNK と Green fluorescent protein (GFP) を発現するコントロール Ad ベクター、Ad-GFP は、昨年度作製したものをを用いた。

B-2. ヒト CD34 陽性細胞の移植とキメリズム解析

ヒト CD34 陽性細胞へ Ad-FNK あるいは Ad-GFP を作用させ、2 日間培養した。その後、3Gy の X 線を照射した免疫不全マウス (Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-} マウス) の尾静脈から、遺伝子導入していない CD34 陽性細胞あるいは Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を移入した。4 ヶ月後、免疫不全マウスの末梢血を回収し、ヒト CD45 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析することにより移植効率を評価した。

B-3. サイトカイン・5FU を併用投与したマウス骨髄細胞のコロニーアッセイ

C57BL/6 マウスの尾静脈内に免疫不全マ

ウスへの尾静脈内に、1 匹あたり 1×10^{10} vector particles (VP) の Ad-GCSF、あるいは Ad-Null を投与した。各 Ad ベクターは昨年度までに作成したものをを用いた。そして Ad ベクターを投与して 3 日後に 5-フルオロウラシル (5-FU) あるいは PBS を腹腔投与した。5-FU を投与して 2 日後に各マウスの骨髄細胞を回収し、Methocult M3434 培地 (Stem Cell Technologies) を用いてコロニーアッセイを行った。

B-4. 免疫不全マウスへのサイトカイン・5FU の併用投与と CD34 陽性細胞の移植

免疫不全マウスへの尾静脈内に、1 匹あたり 1×10^{10} VP の Ad-GCSF、あるいは Ad-Null を投与した。ベクター投与 3 日後に 5-FU を腹腔投与し、さらに 5-FU を投与して 2 日後に、 1×10^5 個 CD34 陽性細胞を尾静脈から移植した。

(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

前年度までの研究により、CD34 陽性細胞への遺伝子導入に適した Ad ベクターを決定した。さらに、最適化した Ad ベクターを用いて抗アポトーシス遺伝子 (FNK) を導入したヒト CD34 陽性細胞は、コントロール遺伝子 (GFP) を導入した細胞と比較し、*in vitro* において分化能を保持しながら長期間 (約 20 日) 増殖可能であることを明らかにした。そこで本年度は、抗アポトーシス遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を免疫不全マウスへ移植し、その移植効率を評価することとした。遺伝子導入していない CD34 陽性細胞、GFP 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞、FNK 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を 3Gy の X 線を照射した免疫不全マウスへ移入し、その 4 ヶ月後に末梢血におけるヒト CD45 陽性細胞の割合を解析した。その結果、遺伝子導入していない CD34 陽性細胞、GFP 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を移植したマウスの CD45 陽性細胞の割合は 5% 前後であったのに対し、FNK を導入した細胞の場合には約 15% まで増加していた (図 1)。したがって、CD34 陽性細胞への抗アポトーシス遺伝子を導入は、*in vivo* における機能の増強にも極めて有効であることが明らかとなった。

昨年度までに、サイトカイン G-CSF と抗がん剤 5-FU を併用投与がレシピエントの改変法として有効であることを明らかにした。すなわち、G-CSF と 5-FU の併用投与という移植前処理により、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造血幹細胞が生着することを示した。そこで本年度はまず、この前処理条件下での骨髄中の血液前駆細胞の割合をコロニーアッセイにて解析した (図 2)。その結果、Ad-G-CSF

のみを投与したマウスの骨髄では、コントロールである Ad-Null を投与したマウス骨髄と同程度の血液前駆細胞が含まれていることが明らかとなった。5-FU を投与したマウスでは、いずれの群も血液前駆細胞数は大きく低下していたが、特に、Ad-G-CSF と 5-FU を併用投与したマウス骨髄中の血液前駆細胞は激減していることが確認された。したがって、本前処理法は、骨髄改変には有効であることが示唆された。

そこで次にヒト CD34 陽性細胞の移植系においても G-CSF と 5-FU の併用投与処置が有効であるか否か検討することとした。まず、免疫不全マウスにおいても G-CSF 投与により骨髄動員が誘導されるかどうか検討したところ、末梢組織へ造血幹細胞・血液前駆細胞が動員されることを確認した (データ略)。そこで免疫不全マウスに対して G-CSF と 5-FU を投与したところ、C57BL/6 マウスとは異なり、全例が死亡した。一方、Ad-Null と 5-FU を投与したマウスでは死亡は観察されなかった。そのため、5-FU の濃度をこれまでの半量 (75 mg/kg) にして再度検討を進めたところ、G-CSF と 5-FU 投与マウスにおいても生存していた。そこで本条件で CD34 陽性細胞の移植を実施した。その結果、全ての群において CD45 陽性細胞の割合は 1% 以下であり、極めて移植効率は低いものであった。なお、遺伝子導入を行った CD34 陽性細胞についても G-CSF と 5-FU 投与したマウスへの移植実験を実施したが、キメリズムは依然として低いものであった (図 3)。

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。

昨年度の結果をうけ、本年度は抗アポトーシス遺伝子を CD34 陽性細胞へ導入し、*in vivo* における機能を評価した。その結果、抗アポトーシス遺伝子を導入した CD34 陽性細胞のキメリズムはコントロール群と比較すると有意に高くなることが明らかとなり、CD34 陽性細胞のアポトーシスの障害が移植効率の向上に有効であることが示された。ただし、抗アポトーシス遺伝子を導入した場合でも移植効率は 15%程度であり、十分とは言い難い。これまでにヒト細胞の移植系においては種々の免疫不全マウスが用いられており、*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-}マウスについてもその有用性はみとめられている。しかし、ヒト造血幹細胞移植の実験系においては *NOD/SCID/Il2rg*^{-/-}マウス (NOG マウス)の方が、*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-}マウスよりも移植効率が高いことが報告されている。したがって、NOG マウスをレシピエントとして用いることでより移植効率が改善されるものと期待される。

Rag2^{-/-}*Il2rg*^{-/-}マウスへ GCSF と 5-FU を併用投与した場合、これまでの条件では全例死亡した。コントロールベクターである Ad-Null と 5-FU を併用投与した場合には生存していたことから、免疫不全マウスと C57BL/6 の 5-FU に対する感受性の違いだ

けでは説明することができない。細胞増殖が盛んな細胞に対して 5-FU は作用するため、免疫不全マウスの場合、C57BL/6 マウスよりも造血幹細胞動員ならびに増殖・分化が顕著に誘導されており、そのために 5-FU の感受性が増して死亡した可能性もある。5-FU の投与量を半量にすることで死亡は回避可能であったが、その条件では、ヒト CD34 陽性細胞の移植効率は極めて低いものであった。本研究課題で目的としていた手法を確立するには、上述のマウス系統の検討と同時に、GCSF や 5-FU の投与量を厳密に決定する必要があると思われる。

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* だけでなく、*in vivo* における機能も増強可能であることが明らかとなった。
2. サイトカインを投与した免疫不全マウスへ CD34 陽性細胞の移植については、実験系の更なる改良が必要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K.*, Nonaka A.*, Hirata N., Yamaguchi T., Mizuguchi H., Kawabata K.; Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow., *Stem Cells Dev.*, in press (*equally

contributed)

皮細胞への分化誘導法の確立、第 63 回近畿支部総会・大会、大阪、2013 年 10 月 12 日

2. 学会発表

1. 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二：膜蛋白質 CAR の発現を指標にした Flk1 発現血液・心筋前駆細胞の分離、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27 日-30 日
2. 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二：In vitro 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27 日-30 日
3. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata : Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling、第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉、2013 年 12 月 11-13 日
4. 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二：膜蛋白質 CAR は Flk1 発現血液前駆細胞と心筋前駆細胞の分離マーカーである、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日
5. 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二：マスト細胞の成熟化に関する新規因子の同定、第 63 回近畿支部総会・大会、大阪、2013 年 10 月 12 日
6. 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二：血液脳関門モデルの構築を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内
7. Shuichi Kuno, Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Katsuhisa Tashiro, Masashi Tachibana, Naoya Matsumura, Soonih Kim, Tsuyoshi Yokoi, Hiroyuki Mizuguchi : Development of mice possessing human CYP3A4 activity by intravenous administration of a novel adenovirus vector expressing human CYP3A4、第 28 回日本薬物動態学会年会、東京、2013 年 10 月 9-11 日
8. Katsuhisa Tashiro, Nobue Hirata, Tomoko Yamaguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata : IDENTIFICATION OF AN ADHESION MOLECULE FOR ISOLATION OF HEMATOPOIETIC CELLS AND CARDIAC CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, USA, June, 2013
9. Tomoko Yamaguchi, Misae Nishijima, Yasutaka Yamanaka, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchia, Kenji Kawabata : PROMOTION OF HELPER T CELL DIFFERENTIATION FROM MOUSE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY ThPOK TRANSDUCTION, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, USA, June, 2013
10. Maiko Higuchi, Norihisa Furukawa, Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Masashi Tachibana , Fuminori Sakurai, and Hiroyuki Mizuguchi,

DIRECT INDUCTION OF HEPATIC
PROGENITOR-LIKE CELLS FROM
MOUSE FIBROBLASTS BY
REPROGRAMMING FACTORS,
International Society for Stem Cell Research
11th Annual Meeting, Boston, USA, June,
2013

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

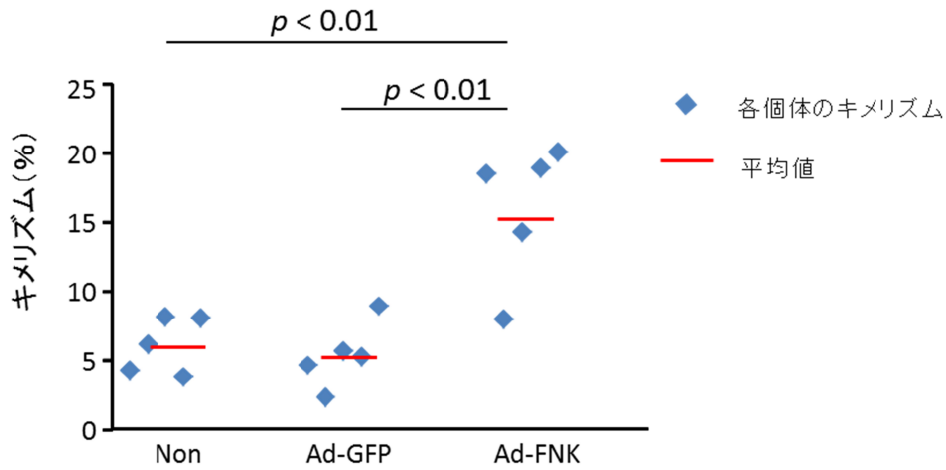


図1 ヒトCD34陽性細胞を移植した免疫不全マウスのキメリズム解析

3GyのX線を照射した免疫不全マウスへ、3,000 vp/cellの濃度でAdベクターを作用させたCD34陽性細胞を移植した。また、コントロールとして、遺伝子導入していないヒトCD34陽性細胞も移植した。移植4ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45を発現するドナー細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。

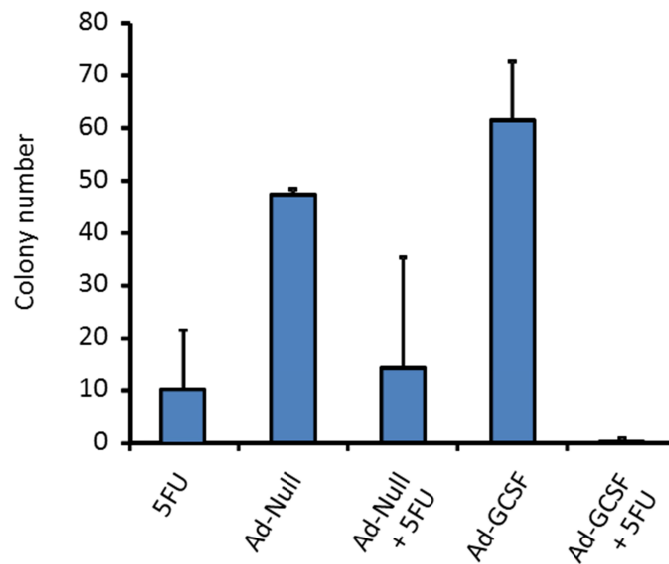


図2 種々の条件下におけるマウス骨髄中の血液前駆細胞数の解析

Adベクター(Ad-NullまたはAd-GCSF)を投与し、その3日後に抗がん剤5-FUを150mg/kgの量で腹腔内へ投与した。その2日後にマウス骨髄細胞を回収し、コロニーアッセイを行った。

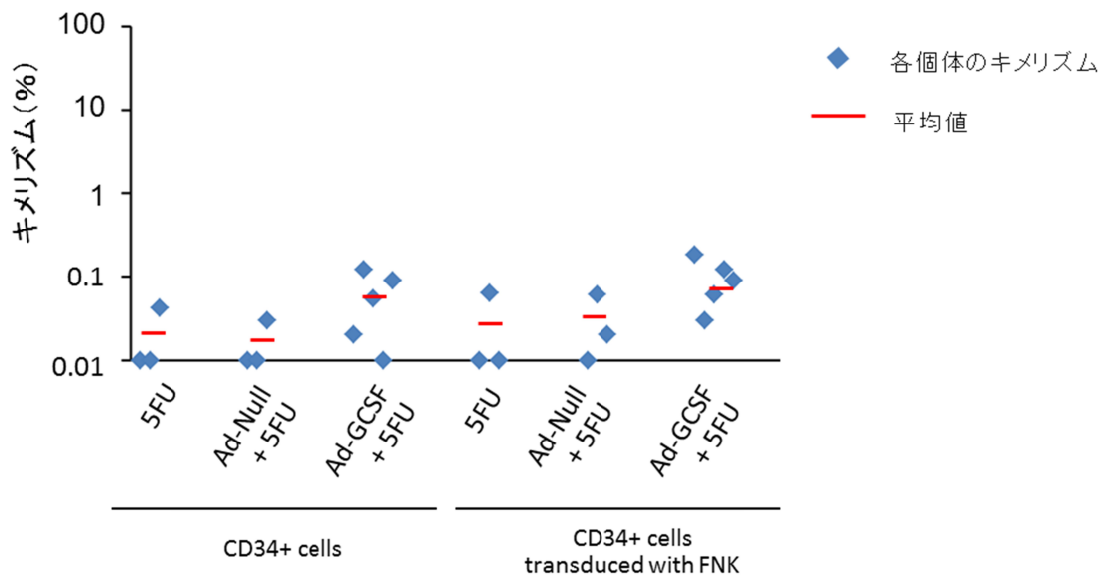


図3 サイトカインにて前処理した免疫不全マウスへのヒトCD34陽性細胞の移植
 免疫不全マウスにAd-NullまたはAd-GCSFを投与し、その3日後に75mg/kgの5-FUを腹腔投与した。その2日後に遺伝子導入したCD34陽性細胞あるいは遺伝子導入していないCD34陽性細胞を移植した。移植1ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45の発現を指標にキメリズムを評価した。