

したことがあるが¹²⁾、そこではスペースの都合上、触れられなかった骨髓内移植法を紹介する¹³⁾。骨髓内移植とは、造血幹細胞を血管内ではなく骨髓内に直接注入することである¹⁴⁾。これによってたとえ前処置を行なわなくても造血幹細胞の移植後生着が期待できると考えられていた。

実際にサルに CD34⁺ 細胞を採取し、遺伝子を発現しない空のレトロウイルスで感染した上で、左右の上腕骨と大腿骨（計4ヶ所）の髓腔に直接注入した（骨髓内移植）。サルには放射線照射など前処置を施していない。移植後、腸骨のコロニーアッセイを行なったところ、前処置なしにもかかわらず、移植後1年以上にわたって遺伝子導入された造血前駆細胞（CFU）が2~30%の割合で検出され、まずまずの結果であった。しかし問題は、遺伝子導入細胞が末梢血に出現しなかったことである。末梢血では、遺伝子導入細胞はわずか0.1%にも満たなかった。つまり、骨髓内移植によって移植細胞は生着するものの、その体内増幅は極めて限定的と言える。

遺伝子導入細胞の体内増幅を図るためには、その細胞が、遺伝子非導入細胞に比べて増殖優位性を持たねばならない¹⁵⁾。このことは、1990年代後半の重症複合型免疫不全症（SCID）に対する造血幹細胞遺伝子治療の結果から示唆されたことである。すなわち、SCIDでは、導入遺伝子（共通 γ 鎖遺伝子）を発現する細胞が、それを発現しない細胞に比べて増殖優位性があるため、遺伝子導入細胞が体内で自然と増幅し治療効果を得た。そこで筆者らは、遺伝子導入細胞が薬剤誘導的に増殖優位性をもつシステムをサルに応用した（図2）¹⁶⁾。それが「選択的増幅遺伝子」である。この遺伝子は、エリスロポエチン（EPO）の細胞外領域と、c-mplの細胞内領域をつなげたキメラ分子で、EPOの刺激によってc-mplの増殖シグナルを細胞内に伝える。

筆者らは、サル造血幹細胞に選択的増幅遺伝子を導入した上で骨髓内移植を行なった¹³⁾。結果は期待した通りだった。移植後のサルにEPOを投与すると、末梢血中の遺伝子導入細胞は、0.1%未満から10%近くまで上昇

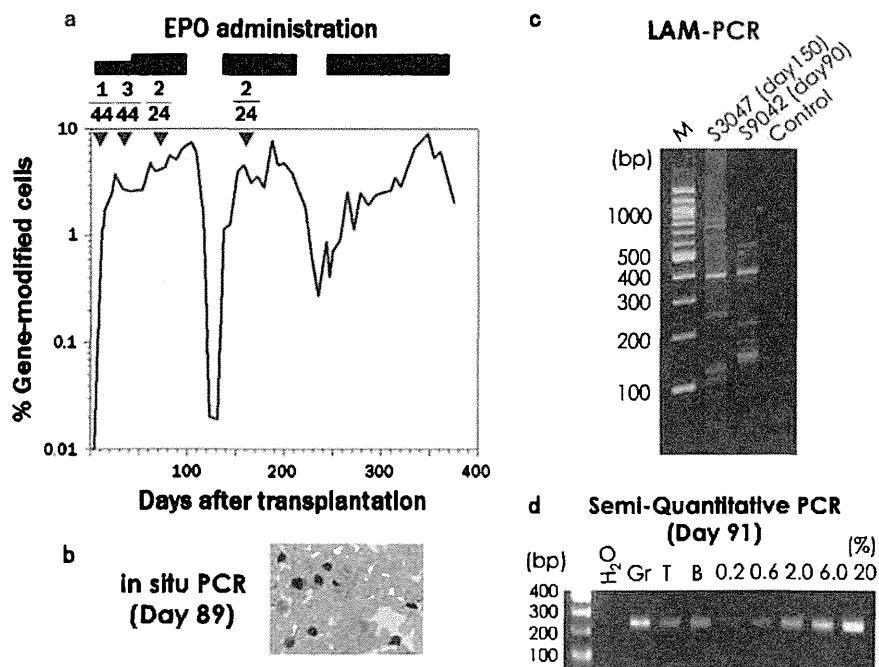


図2 骨髓内移植と選択的増幅遺伝子

サルを用いた実験。(a)造血幹細胞に「選択的増幅遺伝子」を導入して骨髓内移植（前処置無し）を行った。移植後のサルにエリスロポエチン（EPO、選択的増幅遺伝子の作動薬）を投与すると、末梢血中の遺伝子導入細胞は0.1%未満から10%近くまで上昇した。(b)移植後、*in situ* PCRで遺伝子導入細胞の存在を肉眼的に確認した。(c)LAM-PCRによって、遺伝子導入細胞は多クローン性であって、単クローン性の増殖ではないことを示した。LAM-PCRはlinear amplification-mediated PCRの略でレトロウイルスベクターのゲノム挿入部位の解析に利用される。(d)半定量PCRによって、顆粒球（Gr）・T細胞・B細胞等の多系統の血球における遺伝子導入を確認した。

した。これは「選択的増幅遺伝子」と「骨髄内移植法」の両技術の併用によるものであり、一方の技術のみでは実現できなかったことである。以上から、両者を併用することにより、前処置なしでも患者体内で移植した遺伝子導入細胞を臨床的有効水準まで増やすことが可能になるかもしれない。

4. 心筋梗塞に対する幹細胞治療

もう一つ、私どもが行なったサルを用いた幹細胞治療実験の例を示したい。それは、心筋梗塞に対する治療実験である(図3)。2001年、NIHのOrlicらのグループによって、マウス心筋梗塞モデルに骨髄 c-kit⁺ 幹細胞を移植した結果、移植細胞が内皮細胞や心筋細胞へと分化し、心機能の改善が認められたことがNature誌に報告され、臨床応用への期待が大きく膨らんだ¹⁷⁾。さっそく世界各地で、自家骨髄細胞を心筋梗塞局所に移植する治療が行われ、幸い大きな副作用もなく短期的には心機能改善効果が得られたが、Orlic自身は大型動物での検証が必要と論じていた¹⁸⁾。

一方、筆者らは、サルを使った心筋梗塞治療実験を行った¹⁹⁾。あらかじめサルからCD34⁺ 骨髄幹細胞を採取する。サルの心筋梗塞は、冠状動脈を結紮して人工的に作製した。梗塞周辺部位(10箇所)にCD34⁺ 細胞を移植した。CD34⁺ 細胞を注射したサルは、生食を注射したサルに比べて、心機能および局所血流量が有意に増加した。

移植細胞が本当に内皮や心筋に分化して治療効果を発揮したのだろうか? そのことを調べるため、移植細胞をあらかじめGFPで標識し、移植後、GFPを指標にして移植細胞の運命を調べた。その結果、移植細胞からは内皮も心筋細胞も出来てこないことがわかった。それではどうして効いたのか? CD34⁺ 骨髄幹細胞の*in vitro* 培養上清中には血管内皮増殖因子(VEGF)が大量に含まれていることがわかった。つまり、CD34⁺ 骨髄幹細胞はVEGFを分泌する。さらに、細胞を移植した心筋は、生食を注射した心筋に比べて、VEGF含有量が多い事がわかった。実際、毛細血管数を数えると、細胞を移植した心筋の方が、生食を注射した心筋に比べて多いこともわかった(図4)。これらの結果を踏まえると、移植細胞からのサイトカイン分泌が再生の原因ではないかといえる。心筋梗塞の幹細胞治療は確かに効くが、移植した細胞は「幹細胞」としてではなく「サイトカイン分泌細胞」として働いたのである。iPS細胞を利用する治療の場合も、その有効性や作用機序について、サルなど大型動物で検証が望ましい。

5. ヒツジを用いる造血再構築実験

筆者らは、ヒツジを用いてヒト造血幹細胞の長期造血再構築を行なっている。移植細胞の免疫拒絶を避けるためにヒツジ胎仔にヒトの造血幹細胞を移植して、生後1~8%の造血前駆細胞をもつヒツジを得ている。なぜヒツジか? ヒツジは流産しづらいことが理由の一つだ

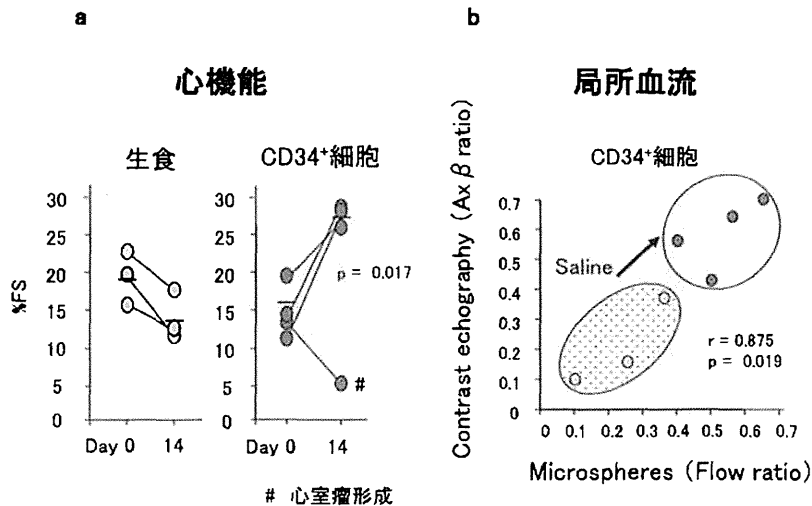


図3 造血幹細胞移植による心筋梗塞治療サルを用いた実験。CD34⁺細胞を心筋梗塞の局所に自家移植すると、心機能(a)および局所血流量(b)が有意に改善した。(a) %FSは心機能の指標である。(b) 局所血流量は、独立の二つの方法で評価し、その結果をそれぞれX軸とY軸にプロットした。

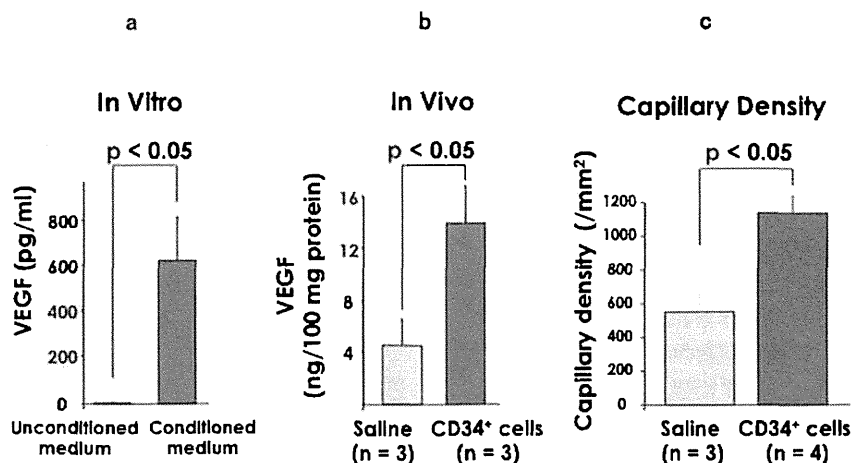


図4 造血幹細胞移植による心機能改善はサイトカイン効果サルを用いた実験。(a) 骨髄 CD34⁺細胞の培養上清中に血管内皮増殖因子 (VEGF) が大量に含まれる。(b) 細胞移植を受けた心筋は VEGF 含有量が多い。(c) 細胞移植を受けた心筋は毛細血管数が多い。したがって、移植細胞からのサイトカイン分泌が再生の原因といえる。

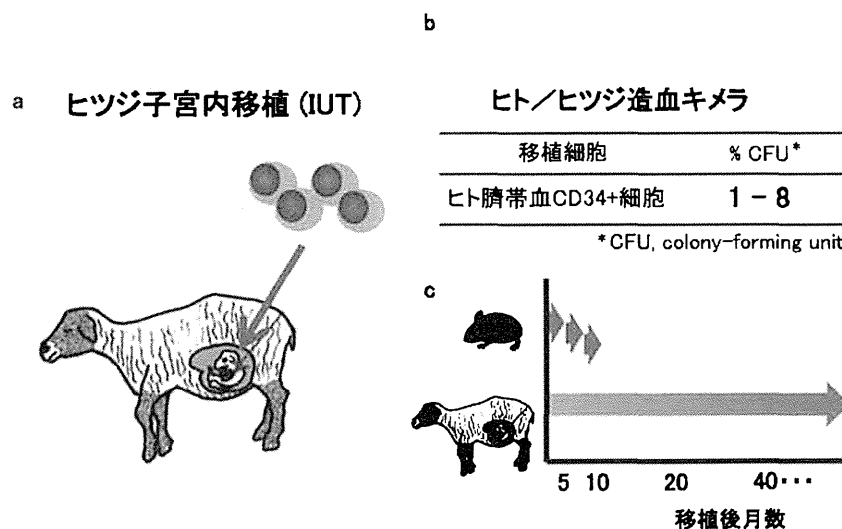


図5 ヒツジを用いるヒト造血再構築実験
ヒツジを用いた実験。(a) ヒト造血幹細胞をヒツジ胎仔に移植すると、生後、ヒト/ヒツジ造血キメラが得られる。IUT, intra-uterin transplantation, 子宮内移植。(b) そのヒツジの骨髄コロニー形成ユニット (CFU, colony-forming unit) でキメラ率 (ヒト/ヒツジ) を見ると1~8%である。(c) ヒツジ実験は、マウス実験に比べて長期間の観察が可能である。

が、そもそもヒツジはマウスよりサイズが大きく寿命も長いから、時空間的なスケールの大きな実験が可能になるからである。マウスでは三次移植まで行なっても観察期間は1年に満たないが、筆者らはヒツジ1頭で5年間にわたってヒト造血を観察した。

ヒツジ実験の一例を挙げる。筆者らはヒト造血幹細胞

の長期生着を図る上で、ヒツジに前処置を施すのと、造血幹細胞に HoxB4 遺伝子を導入して移植するのと、どちらが造血幹細胞の長期生着に有利かどうかを調べた^{20, 21)}。その結果、移植5ヶ月後では両群に差はないものの、移植16ヶ月後以降は、HoxB4 遺伝子導入群の方が生着効率が高かった (図5)。前処置は短期的な造血

再構築を促進するが、長期的な造血再構築にはあまり影響を与えない。こういったことは、マウスを用いた実験からは分らなかったことである。

6. 大型動物でマウス型の iPS 細胞を実現

今まで作製されたヒト iPS 細胞²²⁾は、プライム型 iPS 細胞と呼ばれ、マウス iPS 細胞 (ナイーブ型) と異なり初期状態を脱した細胞である²³⁾。すなわち既に分化が進み、ナイーブ型に比べて継代・分化誘導・相同組換え・凍結保存が難しい。ヒト iPS 細胞の安定なナイーブ化はこれまで報告がなく、その樹立が望まれる。筆者の研究室では、まずブタでナイーブ型の iPS 細胞の樹立を試みた²⁴⁾。ナイーブ型はキメラ形成能で特徴づけられる。我々のブタ iPS 細胞は、蛍光標識した上でブタ初期胚に注入すると、蛍光を発するキメラ胎仔を形成したことからナイーブ型か、少なくともそれに近い。今後、ナイーブ型のサル・ヒト iPS 細胞を樹立したいと考えている。

ヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導はまだ実現しておらず、血液学上の最も大きな課題の一つになっている。ただし、マウス ES/iPS 細胞では、HoxB4 遺伝子の導入によって造血幹細胞分化に成功した²⁵⁾。もしかすると、ヒト ES/iPS 細胞もナイーブ化すれば (すなわちマウス型に変えれば)、マウスと同様の方法でヒト ES/iPS 細胞から造血幹細胞への分化誘導も可能かもしれないと期待している。

7. おわりに

2012 年 10 月、山中伸弥教授のノーベル賞受賞が報じられた 3 日後には、iPS 細胞を実際に患者に移植したという誤報 (2012 年 10 月 11 日読売新聞) があって、一般にも「基礎研究」と「医療応用」の間には長い道のりがあることが伝わった。動物実験は必須である。新しい技術や機器の医療への応用には、マウスではなく大型動物でなければ有効性・安全性を検証できない場合も少なくない。本総説では、サルやヒツジといった大型動物を利用した幹細胞研究の自験例を紹介した。読者の方々に大型動物利用研究の必要性をご賢察いただければ、本総説の目的は達したと考える。

もちろん大型動物利用研究には制約が多い。専用の施設・設備、少なからぬ費用、さらには特殊技能の必要性から、データ収集は限定的にならざるを得ない。また、一般に大型動物では、マウスと違って近交系が存在しないので、動物の個体差という観点からマウスのような普遍性が得られづらい。もっとも、実験用ミニブタでは MHC の同定された近交系が利用可能になってきており、我々は近交系ブタを利用した移植・再生実験も進めている。これに関しては、将来、稿を改めることができ

ればと思う。

最後に、大型動物を用いた実験にあたっては動物愛護に対する十分な配慮が必要であることを記したい。また、施設は出来る限り集約化・オープン化し、実験に供する動物数は極力少なくしたい。

謝 辞

筆者は、サルの実験は基盤研霊長類医学研究センターで行なっている。ヒツジの実験は宇都宮大学農学部で行なっている。ブタの実験は本学 (自治医科大学) ピッグセンターで行なっている。この場を借りてご関係の方々に感謝する。

著者の COI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関して特に申告なし

文 献

- 1) Storb R, Edward Donnall Thomas (1920-2012). *Nature*. 2012; **491**: 334.
- 2) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; **318**: 1920-1923.
- 3) Haccin-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003; **348**: 255-256.
- 4) Haccin-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008; **118**: 3132-3142.
- 5) Abkowitz JL, Persik MT, Shelton GH, et al. Behavior of hematopoietic stem cells in a large animal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 2031-2035.
- 6) Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, et al. *Ex vivo* expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood*. 1998; **92**: 1131-1141.
- 7) Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, et al. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest*. 2007; **117**: 2233-2240.
- 8) Cartier N, Haccin-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. 2009; **326**: 818-823.
- 9) Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*. 2010; **363**: 1918-1927.
- 10) Rivière I, Dunbar CE, Sadelain M. Hematopoietic stem cell engineering at a crossroads. *Blood*. 2012; **119**: 1107-1116.
- 11) Heim DA, Hanazono Y, Giri N, et al. Introduction of a

- xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol Ther.* 2000; **1**: 533-544.
- 12) 花園豊. サルを用いた幹細胞研究. *臨血.* 2008; **49**: 240-246.
 - 13) Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, et al. High-level *in vivo* gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol Ther.* 2004; **10**: 469-477.
 - 14) Ikehara S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: a new strategy for treatment of stem cell disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; **1051**: 626-634.
 - 15) Neff T, Beard BC, Kiem HP. Survival of the fittest: *in vivo* selection and stem cell gene therapy. *Blood.* 2006; **107**: 1751-1760.
 - 16) Hanazono Y, Nagashima T, Takatoku M, et al. *In vivo* selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther.* 2002; **9**: 1055-1064.
 - 17) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; **410**: 701-705.
 - 18) Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2002; **91**: 1092-1102.
 - 19) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells.* 2005; **23**: 355-364.
 - 20) Abe T, Masuda S, Ban H, et al. *Ex vivo* expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation. *Exp Hematol.* 2011; **39**: 47-54.
 - 21) Abe T, Masuda S, Tanaka Y, et al. Maternal administration of busulfan before in utero transplantation of human hematopoietic stem cells enhances engraftments in sheep. *Exp Hematol.* 2012; **40**: 436-444.
 - 22) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; **131**: 861-872.
 - 23) Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell.* 2009; **4**: 487-492.
 - 24) Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, et al. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev.* 2013; **22**: 473-482.
 - 25) Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell.* 2002; **109**: 29-37.

