

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 移植医療研究分野)

**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 - 25年度 総合研究報告書

研究代表者 田代 克久

平成26(2014)年4月

目 次

I . 総合研究報告書

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 ----- 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 ----- 14

III . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

総合研究報告書

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目指し研究を行った。その結果、以下の知見を得た。

1. 種々のアデノウイルスベクターを用いてヒト CD34 陽性細胞 (ドナー細胞) への遺伝子導入効率を検討し、遺伝子工学的に CD46 を認識するよう改変したアデノウイルスベクターが高效率に外来遺伝子を導入可能であることを明らかにした。さらに、抗アポトーシス遺伝子の導入が、ドナー細胞の機能増強に有効であることを明らかにした。
2. サイトカイン G-CSF と抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) を併用投与したマウスに GFP 発現骨髄細胞を移植したところ、放射線非照射条件にも関わらず、GFP 発現細胞がレシピエントマウス骨髄へ生着することを明らかにした。すなわち、G-CSF と 5-FU の併用投与がレシピエントの骨髄環境の改変に有効であることを明らかにした。
3. G-CSF と 5-FU を投与した免疫不全マウスへ抗アポトーシス遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を移入したが、その移植効率は極めて低く、移植条件のさらなる改良が必要であることが示された。

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
野中昭希 大阪大学大学院薬学研究科

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)上記のレシピエントの改変とドナー細胞の改変を併用した新規造血幹細胞移植法の開発を目指す。

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

B. 研究方法

B-1. Adベクターの作製

本研究で用いた 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。なお、ファイバー蛋白質を遺伝子工学的に改良した改良型 Ad ベクターも作製した。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従った。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 を用いて測定した。

B-2. ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Lonza 社) は、添付のサプリメントと 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 を用いて培養した。96 well ラウンドボトムプレートへ各 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、2 日おきに培地交換した。遺伝子導入後の細胞数は、ヌクレオカウンターにて計測した。

B-3. ヒト CD34 陽性細胞の移植とキメリズム解析

Ad ベクターにて遺伝子導入したヒト CD34 陽性細胞を 2 日間培養し、その後、3Gy の X 線を照射した免疫不全マウス (Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}マウス) へ移植した。4 ヶ月後、免疫不全マウスの末梢血を回収し、ヒト CD45 陽性細胞の割合を解析することでキメリズムを評価した。

B-4. コロニーアッセイ

血液前駆細胞数はメチルセルロースを含むコロニーアッセイ用培地 (Stem Cell Technologies) を用いて解析した。

B-5. フローサイトメトリー解析

細胞を回収し、蛍光標識 (FITC、PE、APC、PECy7、PerCP-Cy5.5 等) またはビオチン標識した抗体にて染色した。ビオチン標識した細胞はさらに蛍光標識したストレプトアビジンを反応させた。染色した細胞は LSR Fortessa にて解析した。細胞を単離する場合は FACS Aria を用いた。

B-6. マウスへの Ad ベクター投与

C57BL/6 マウスまたは Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}マウスへ 1×10^{10} vector particles (vp)、あるいは 1×10^9 infectious unit (ifu) の Ad ベクターを投与した。

B-7. 繊維芽細胞コロニー形成法

Ad ベクターを投与したマウス大腿骨より、非血液細胞 (CD45⁻Ter119⁻細胞) を単離し、 1×10^5 個/well (6 well プレート) で播種した。培地は、添付のサプリメントを加えた MesenCult mouse

MSC Basal Media を用いた。ギムザ染色により形成されたコロニーを染色し、顕微鏡下でコロニー数を計数した。

B-8. Homing Assay

Ad ベクターを投与したマウスに GFP トランスジェニック (TG) マウス由来骨髄細胞を移入し、その 16 時間後にレシピエント骨髄中の GFP 発現細胞の割合を解析した。

B-9. サイトカインと 5FU を併用投与したマウスへの移植

Ad ベクターを C57BL/6 マウスへ投与し、その 3 日後に 5-フルオロウラシル (5-FU)、または PBS を腹腔投与した。5-FU を投与して 2 日後に GFP TG マウス由来骨髄細胞を移入し、移植 4-16 週間後のキメリズムを解析した。また、5-FU 投与 2 日後に各マウスの骨髄細胞を回収してコロニーアッセイも行った。

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

C-1. ドナー細胞の機能増強法の開発

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。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る場合が多いが、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可能性が考えられる。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

イパ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 2)。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。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。

そこで次に機能遺伝子 (Bcl-x1-FNK (FNK)、Tie2、NF-Ya) を発現する F35 型 Ad ベクターを複製し、ヒト CD34 陽性細胞の *in vitro*、*in vivo* における機能を評価した。FNK は抗アポトーシス遺伝子、Tie2 は造血幹細胞の骨髄への生着に関わる遺伝子、NF-Ya は造血幹細胞の増殖に関わる遺伝子である。まず、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を解析した結果、いずれのベクターも 60~70% の遺伝子導入効率であった (データ略)。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 3)。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 3)。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 4)。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。そこで次に FNK 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 5)。したがって、抗アポトーシス遺伝子の導入は、ドナー細胞の機能増強に極めて有効であることが明らかとなった。

C-2. サイトカインを用いたレシピエント骨髄の改変法の開発

レシピエント骨髄の改変法として骨髄動員作用を有するサイトカインに着目した。そこでまず、G-CSF あるいは VEGF を発現する Ad ベクター (Ad-G-CSF、Ad-VEGF) を投与し、血液細胞の動態の解析を行った。まず、Ad-G-CSF をマウスへ投与したところ、造血幹細胞を含む血液前駆細胞が末梢組織へ動員していることを確認した (図 6a)。しかし、G-CSF 投与による骨髄中の血液前駆細胞数は減少していなかった (図 6b)。したがって、G-CSF 投与により血液前駆細胞の増殖と動員が誘導されていると考えられた。

上記の検討の過程で、G-CSF 投与マウスの末梢血中では、VEGF の濃度が上昇していることを見出した。そこで次に VEGF についても同様の検討を行った。その結果、VEGF 投与マウスの血液前駆細胞は、末梢血では増加する一方で、骨髄では減少していた (図 6c, 6d)。したがって、VEGF は造血幹細胞等を含む血液前駆細胞を末梢組織へ動員する作用を有していることが示された。VEGF による造血幹細胞・血液前駆細胞の動員機構は不明であるため、本研究ではその解明も試みた。最近の研究から骨髄中の間葉系幹細胞が造血幹細胞のニッチ細胞として機能していることが明らかになりつつある。そこで、VEGF 投与時の骨髄間葉系幹細胞に着目し、検討を進めた。ベクター投与したマウスの骨髄中の間葉系幹細胞数を FACS にて解析したところ、VEGF 過剰発現により間葉系幹細胞数の減少が観察された (図 7a)。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 7b)。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 7c)。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。その結果、間葉系幹細胞は、

VEGFR2 は発現してなかったが、VEGFR1 を発現していたことから (図 8a)、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 (データ略)。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 8b)。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 TG 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 9)。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。

これまでの検討から G-CSF と VEGF の両サイトカインが造血幹細胞の動員作用を有していることが確認できたが、VEGF はニッチ細胞数を減少させるため不向きであることが考えられた。そこで、次に G-CSF 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。本検討では、ドナー細胞として GFP TG マウス由来骨髄細胞を用いた。また、G-CSF 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 G-CSF 投与後に抗がん剤 5-FU を投与する群も加えた。実際、G-CSF と 5-FU を併用投与することにより、骨髄中の血液前駆細胞が激減することも確認できた (図 10)。本条件において、GFP TG マウス由来骨髄細胞を移植し、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。その結果、G-CSF 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、G-CSF 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された (図 11a, 11b)。なお、G-CSF 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 11c)。以上の結果から、G-CSF と 5-FU の併用投与がレシピエント骨髄環境の改変に有効であることが示された。

C-2. ドナー細胞とレシピエントの双方を改変した移植法の開発

次にヒト CD34 陽性細胞の移植系においても G-CSF と 5-FU の併用投与と処置が有効であるか否か検討した。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 12)。

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的とし、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研究を行った。

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。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。また、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。また、*in vivo* における生着率も抗アポトーシス遺伝子の導入により増強されることが示された。*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ること、そして *in vivo* への移植時には移植によるストレス等で細胞死が誘導されている可能性があることから、抗アポトーシス遺伝子はこの細胞死を抑制していることが予想される。抗アポトーシス遺伝子の導入がドナー細胞の機能増強に有効であることを明らかにしたが、機能増強した細胞でも移植効率は 15% 程度であり、十分とはいえない。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ため、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。

本研究ではレシピエント改変法としてサイトカインに着目し、GCSF と VEGF について研究を

進めてきた。VEGF については、造血幹細胞動員作用のみならず、造血幹細胞のニッチ細胞である間葉系幹細胞の動態も制御することを明らかにした。しかし、ホーミングアッセイの結果からも明らかのように、VEGF は骨髄間葉系幹細胞 (ニッチ細胞) 数を減少させてしまうため、ドナー細胞の生着率が減少してしまうことが考えられた。したがって、レシピエント改変法としては VEGF は不向きであると考えられた。GCSF を投与したマウスの骨髄では造血幹細胞画分である cKit-positive Sca-1-positive Lineage marker-negative (KSL) 細胞数が増加していた。詳細なメカニズムは不明であるが、GCSF には造血幹細胞の動員作用だけでなく、増殖促進作用があることが推察される。なお、本研究では解析していないが、GCSF 投与マウスの骨髄では、間葉系幹細胞が増加しているという報告があり、そのために造血幹細胞数が増加している可能性も考えられた。

本研究では、GCSF 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。GCSF 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、GCSF 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。しかし、Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-} マウスへ GCSF と 5-FU を併用投与した場合、C57BL/6 マウスと同じ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。また、本研究課題では、ドナー造血幹細胞としてヒト CD34 陽性細胞を用いたが、マウスの造血幹細胞をドナー細胞として用いることでより正確に有効性を検証できる可能性がある。現時点では、Ad ベクターを用いてマウス造血幹細胞への効率的な遺伝子導入は達成できていないため、マウス造血幹細胞を用いた検討も進めていくことで、本研究課題で提示するような、ドナーとレシピエントの双方改変した新規造血幹細胞移植

法開発に関する新しい知見が得られるものと予想されるため、今後の検討課題としていきたい。

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ることを明らかにした。また、抗アポトーシス遺伝子の導入が、ドナー造血幹細胞の機能増強に有効であることを明らかにした。

2. G-CSF と 5-FU の併用投与がレシピエント骨髄環境の改変に有効であることを明らかにした。すなわち、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。

3. 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、実験系の異なる改良が必要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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)

9. 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)

2. 学会発表

1. 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 iPSC 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

2. 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

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

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. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江 - 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

12. 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

13. 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

14. 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

15. Tomoko Yamaguchi, Misae Nishijima, Yasutaka Yamanaka, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, 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

16. 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

17. 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

18. 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

19. 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

20. 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

21. 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

22. 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

23. 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

G. 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

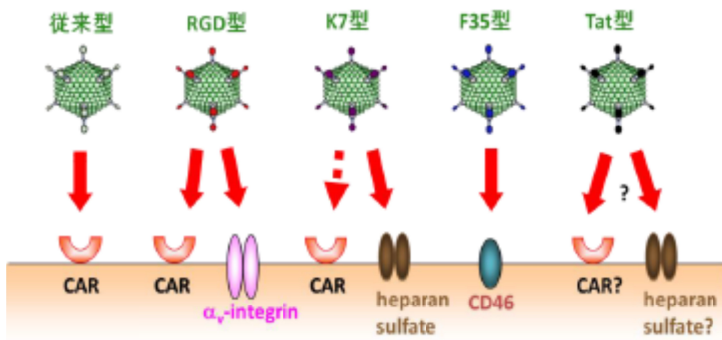


図1 改良型Adベクターの遺伝子導入特性
 通常の実験で用いられている従来型Adベクターは、細胞表面上の受容体CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor) を認識して感染する。一方、改良型AdベクターはCARだけでなく、その他の分子を認識して細胞へ感染することが可能なベクターである。RGD型：インテグリンを認識する。K7型：ヘパラン硫酸を認識する。F35型：CD46を認識する。Tat型：ヘパラン硫酸を認識するという報告はなされているが、詳細なメカニズムは不明。

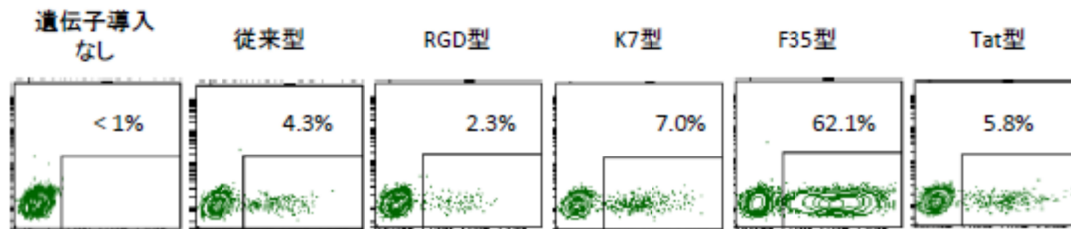


図2 CD34陽性細胞への遺伝子導入

ヒトCD34陽性細胞に対してGFPを発現する種々の改良型Adベクターを1,000VP/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。3回の実験の平均値をグラフ内に記入した。

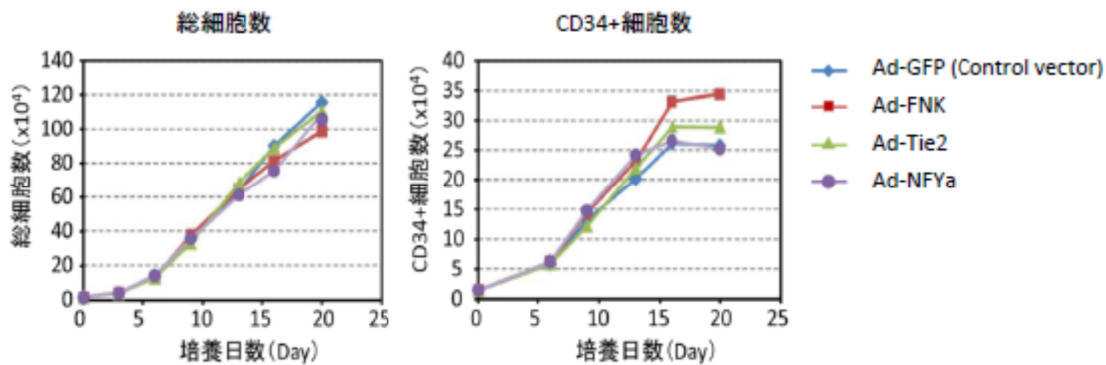


図3 機能遺伝子導入後の細胞数の変動解析

機能遺伝子を発現する各種Adベクター、ならびにコントロールベクターをヒトCD34陽性細胞へ作用させた。その後、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。

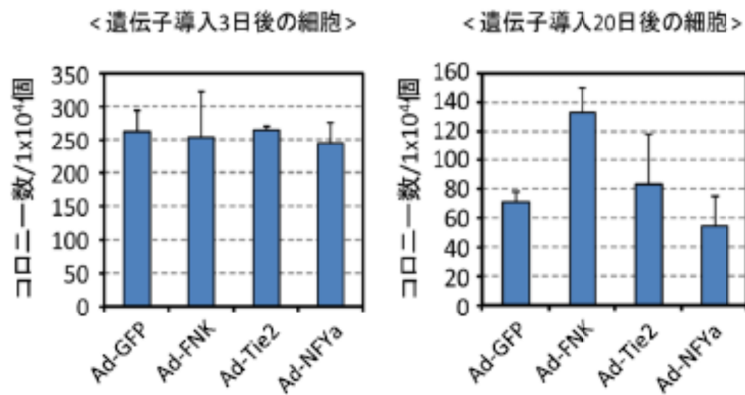


図4 機能遺伝子導入細胞のコロニー形成能の解析

機能遺伝子を発現する各種Adベクター、ならびにコントロールベクターをヒトCD34陽性細胞へ作用させた。遺伝子導入3日後、または20日後にコロニーアッセイを行った。

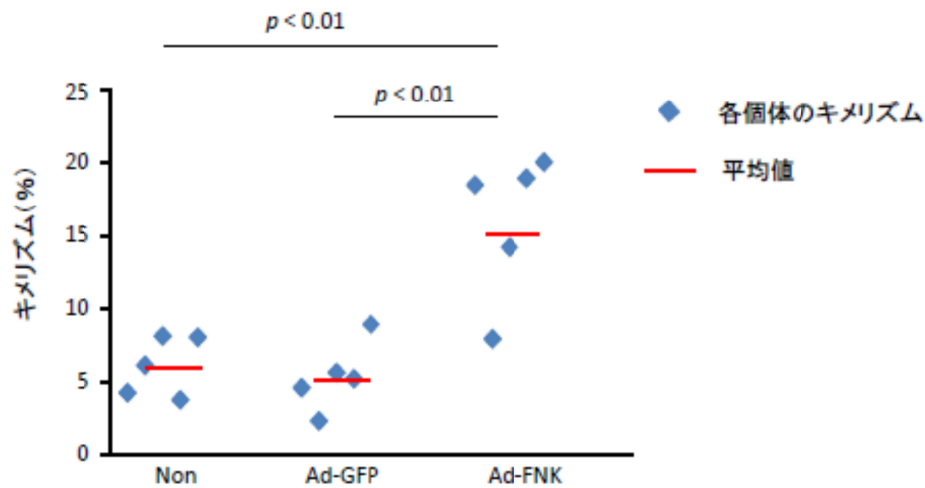


図5 ヒトCD34陽性細胞を移植した免疫不全マウスのキメリズム解析

3GyのX線を照射した免疫不全マウス(Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}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。

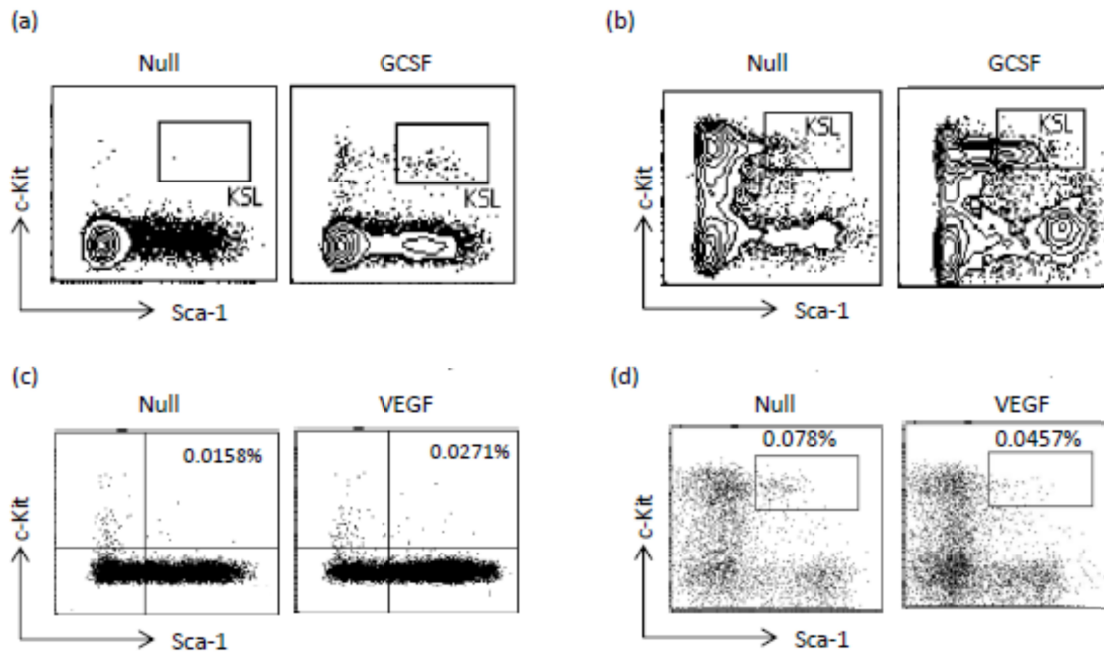


図6 サイトカイン発現Adベクター投与マウスの末梢血ならびに骨髄における造血幹細胞画分の解析
 C57BL/6マウスに(a, b)Ad-G-CSF、あるいは(c, d)Ad-VEGFを投与し、その5日後の末梢血細胞と骨髄細胞を回収した。また、外来遺伝子を搭載していないAdベクター、Ad-Nullをコントロールとして投与した。投与5日後、造血幹細胞を含める細胞画分(c-Kit+Sca-1+Lineage-細胞)をフローサイトメーターで解析した。(a, c)末梢血細胞 (b, d)骨髄細胞

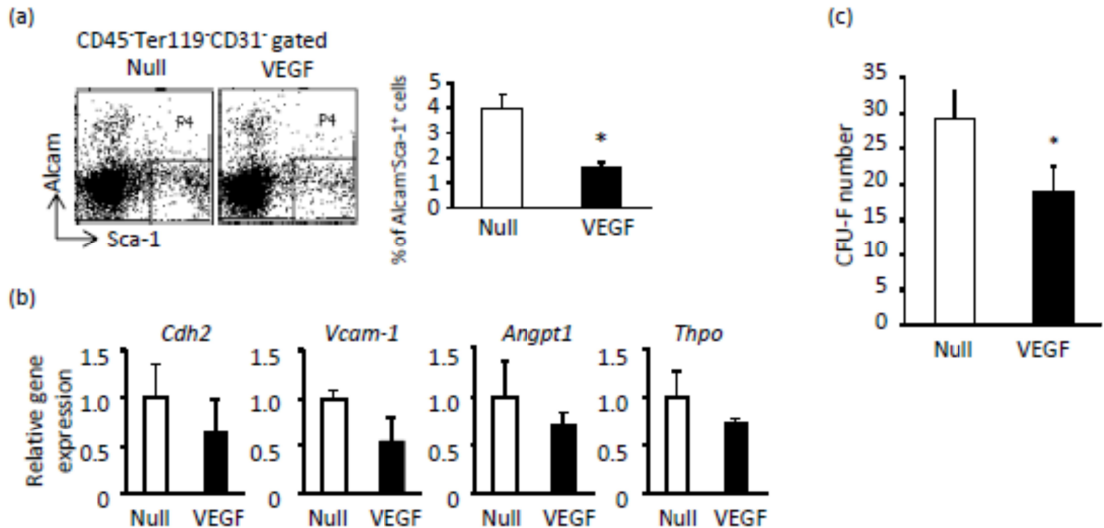


図7 VEGF投与マウスの骨髄間葉系幹細胞の解析
 (a) Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与したマウスの大腿骨を回収し、FACSにより骨髄間葉系幹細胞が含まれる画分(CD45-Ter119-細胞)を単離し、(b) RT-PCR法にて造血幹細胞の生着に関連する遺伝子の発現を解析した。また、(c) CFU-Fアッセイにより、間葉系幹細胞数を定量した。* $p < 0.05$

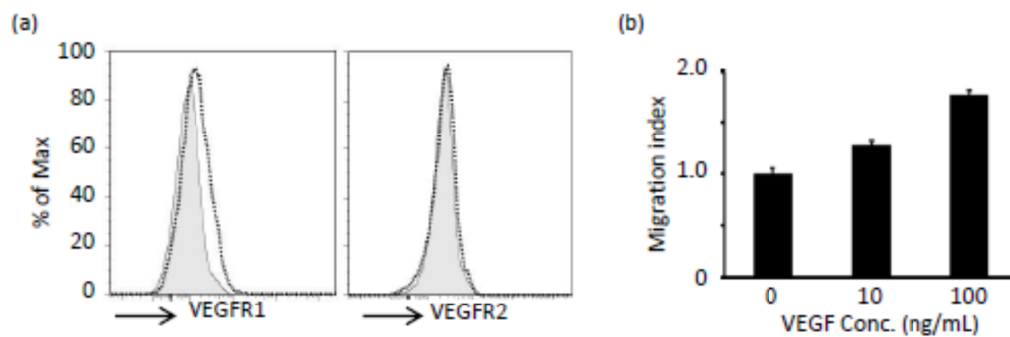


図8 骨髄間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能の解析

(a) In vitroで増幅させた間葉系幹細胞におけるVEGF受容体の発現をFACSにて解析した。点線が特異的な抗体を作用させたときの結果である。(b)トランスウェルチャンパーを用いて、間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能を評価した。

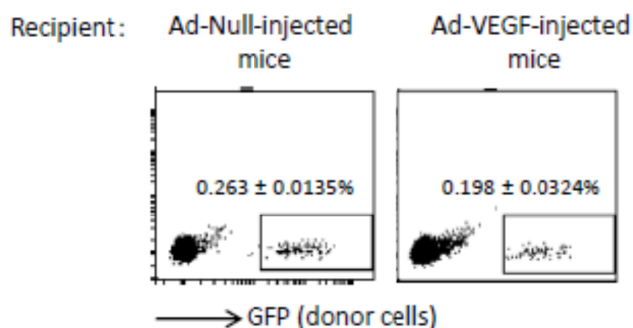


図9 ホーミングアッセイ

Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与したマウスへ、GFP発現骨髄細胞を移植した。移植16時間後に骨髄細胞を回収し、骨髄へ生着したドナー細胞をFACSにより解析した。

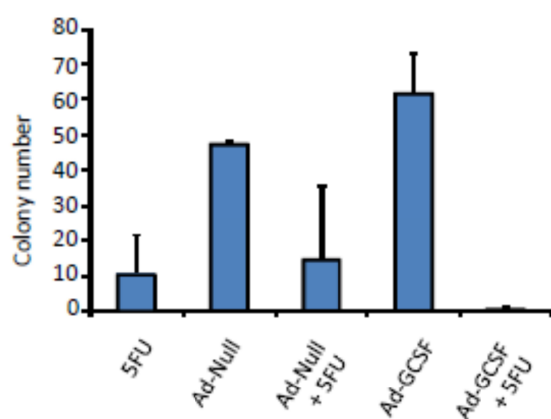


図10 種々の条件下におけるマウス骨髄中の血液前駆細胞数の解析

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。

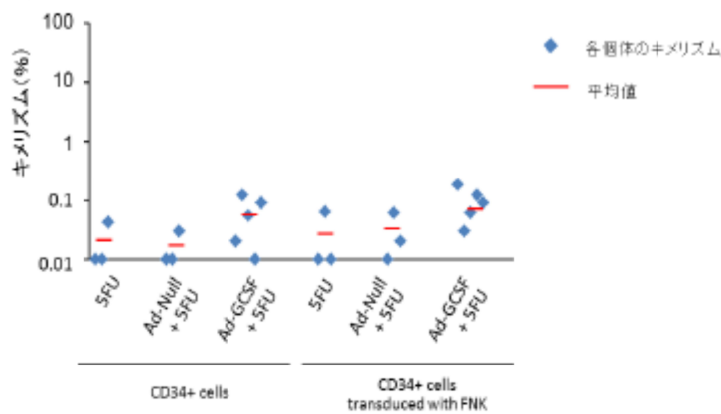
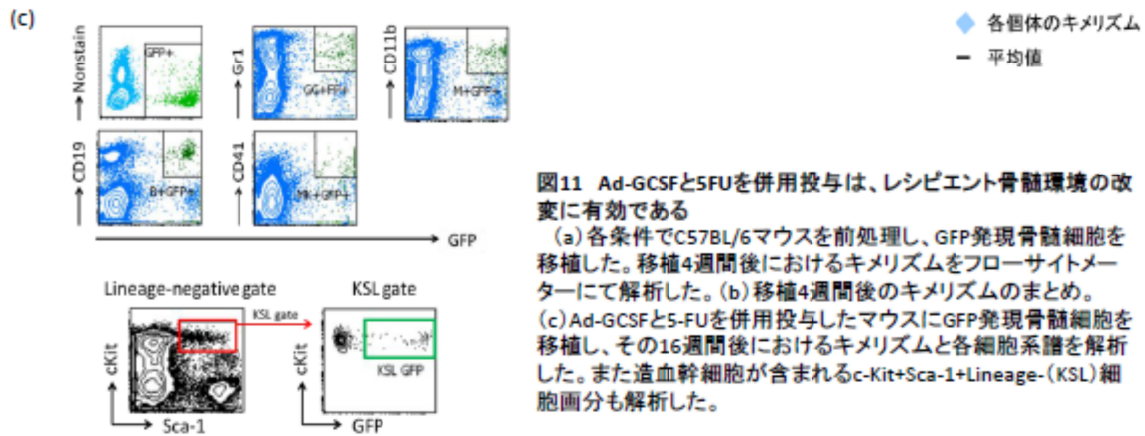
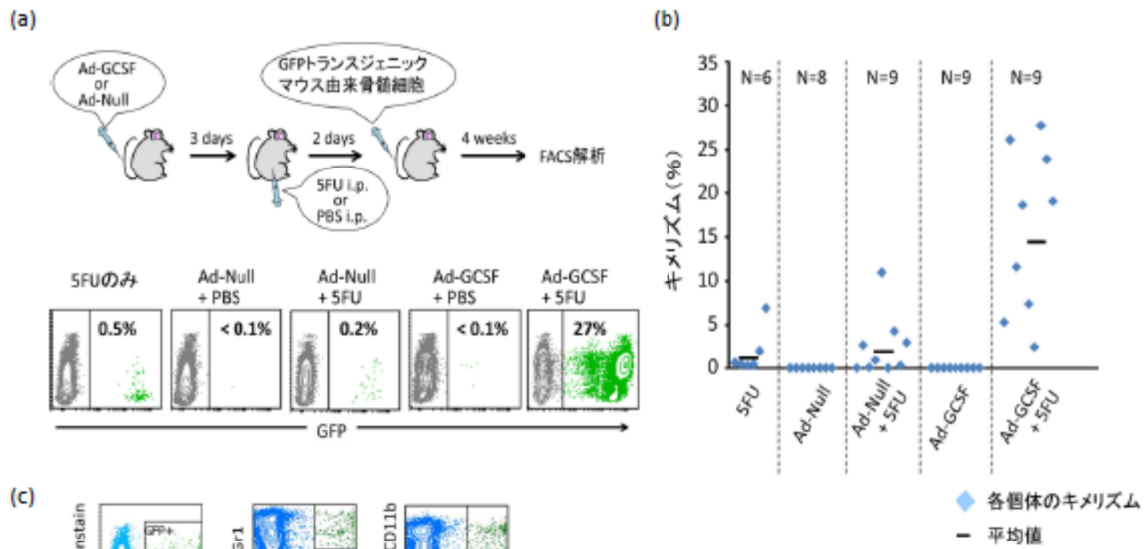


図12 サイトカインにて前処理した免疫不全マウスへのヒトCD34陽性細胞の移植
免疫不全マウスにAd-NullまたはAd-GCSFを投与し、その3日後に75mg/kgの5-FUを腹腔投与した。その2日後に遺伝子導入したCD34陽性細胞あるいは遺伝子導入していないCD34陽性細胞を移植した。移植1ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45の発現を指標にキメリズムを評価した。

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.	Optimization of adenovirus vectors for transduction in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	<i>Yakugaku Zasshi.</i>	131	1333-1338	2011
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.	<i>Clin Cancer Res.</i>	17	2807-2818	2011
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	<i>PLoS ONE</i>	6	e21780	2011
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.	<i>Stem Cell Res.</i>	8	300-311	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
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., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F.,	Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction.	<i>J. Hepatol.</i>	57	628-636	2012
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
Tashiro K.*, Nonaka A.*, Hirata N., Yamaguchi T., Mizuguchi H., Kawabata K. (*equally contributed)	Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow.	<i>Stem Cells Dev.</i>			印刷中

