

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08727

研究課題名(和文)再賦活化骨髄間葉系幹細胞を利用した人工骨髄グラフトの開発

研究課題名(英文) Development of artificial bone marrow graft using revitalized bone marrow mesenchymal stem cells.

研究代表者

中原 史雄 (Nakahara, Fumio)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80581181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、培養骨髄間葉系幹細胞(MSC)に5つの遺伝子を強制発現することで、in vitroで造血幹細胞を維持・増殖させる能力を再び有するようになった再賦活化骨髄間葉系幹細胞(rMSC)を開発し、報告した。このrMSCはin vitroで造血幹細胞を増やすためには非常に強力なプラットフォームとなるが、rMSCをマウスに移植した場合にはin vivoでの着生は認められなかった。そこで、このrMSCに各種遺伝子を追加導入して、細胞の増殖能・生存能力などの機能を調べ、候補遺伝子を複数見出した。そのうち、有力な候補遺伝子を導入することで改良型rMSCを作成することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、培養骨髄間葉系幹細胞(MSC)に5つの遺伝子を強制発現することで、in vitroで造血幹細胞を維持・増殖させる能力を再び有するようになった再賦活化骨髄間葉系幹細胞(rMSC)を開発し、報告した。さらに本研究により、再賦活化骨髄間葉系幹細胞(rMSC)が生体内でも機能出来るように改良する方法の一つを見出すことが出来た。これにより、将来的に人工骨髄などを開発する際の重要なヒントを得られた。人工骨髄の開発は人類にとって造血器疾患治療の際に非常に有用かつ重要な治療手段となることから、本研究成果は高い学術的意義や社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：The investigator has created revitalized mesenchymal stem cells (rMSCs) that have regained the ability to maintain and proliferate hematopoietic stem cells in vitro by over expressing five genes in cultured bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). Although rMSCs provide a very powerful platform for expanding hematopoietic stem cells in vitro, no engraftment was observed in vivo when rMSCs were transplanted into mice. Therefore, various genes were additionally over expressed in the rMSCs, and functions such as cell proliferation and survival ability were investigated, and multiple candidate genes were discovered. Eventually, they were able to create improved rMSCs by introducing a promising candidate gene.

研究分野：造血幹細胞学

キーワード：間葉系幹細胞 造血幹細胞 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血病や骨髄異形成症候群などの造血疾患を中心とした各種疾患に対して、骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血幹細胞移植による造血幹細胞移植治療が行われ、非常に大きな治療効果を上げている。しかしながら、移植片の造血幹細胞の数が不十分であったために造血幹細胞の生着が遅れ、生着不全に陥ってしまうケースが認められている。生着不全の場合には、正常血球の回復が得られないために感染症等を併発し非常に危険な状態となってしまうため、移植した造血幹細胞の生着が移植後早期に得られるかが患者の回復の鍵を握っている。一方、白血病などに対する繰り返しの化学療法・放射線照射などにより骨髄内微小環境が破壊されてしまったために、造血幹細胞移植を行っても生着を得られないケースもあり、そのような患者にとっては造血幹細胞移植後の生着を得られるように骨髄内微小環境を修復させる治療が希求されているが、現在の医学では未だ実現していない。

骨髄内の MSC は造血幹細胞に特異的な微小環境(hematopoietic stem cell niche)を形成することで、造血幹細胞の機能維持や増殖における中心的な働きをしていることがこれまで知られており、骨髄 MSC の中でも Nestin 陽性細胞、Leptin receptor 陽性細胞、Cxcl12 を高発現する細網細胞(CAR 細胞)などが骨髄微小環境形成に重要な働きをしていることがこれまで報告されている。これらの細胞は Cxcl12, Scf, Vcam1, Angpt1 といった niche factor と呼ばれる各種遺伝子を高発現しており、そのことが造血幹細胞の機能維持や増殖を可能にさせていると考えられている。一方、これらの骨髄 MSC は sphere forming assay と呼ばれる特殊な条件の培養によって短期間の培養は可能なものの、長期の培養は困難であることに加え、骨髄 MSC を一旦骨髄から外に取り出して培養した場合には各種 niche factor の発現レベルは培養前と比較して極めて低くなることが知られている。これまでも多くの研究者が造血幹細胞を維持する機能を保持した状態での骨髄 MSC の *in vitro* 培養を目指してきたが世界的にも未だ実現していないのが現状であった。

上記の背景をもとに、「骨髄内の微小環境を骨髄外(培養下)で再現し、移植前に造血幹細胞を増やしてから患者に移植することはできないだろうか」と申請者は考えるようになり、5つの遺伝子(Klf7, Ostf1, Xbp1, Irf3, Irf7)を培養 MSC に導入することで、*in vitro* において骨髄内の環境に近い微小環境を提供し、造血幹細胞を機能を維持したまま増殖させることを可能にさせる再賦活化 MSC(revitalized MSC : rMSC)の作成に成功し報告した(Nakahara et al. Nature Cell Biology 2019)。この rMSC は *in vitro* で造血幹細胞を増やすためには非常に強力なプラットフォームとなるが、rMSC をマウスに移植した場合には *in vivo* での生着は認められなかった。rMSC を使用した再生医療を実現するためには、生体内で長期生存させられるように rMSC を改良することが必要であると本研究申請者は考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的として、まずこの rMSC が生体内で生着・生存できるように rMSC を改良し、微小環境が破壊されたマウス骨髄に対して改良型 rMSC を移植し、骨髄微小環境を再構築することを目指した。次に、改良型 rMSC をハイドロキシアパタイト人工骨内に植え付け増殖させることで人工的な骨髄微小環境グラフトを作成し、これを人工臓器のように移植して通常の骨髄とは別に新たな骨髄を作ることによって強力な化学療法 + 骨髄移植後の骨髄生着を早期に得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 改良型 revitalized MSC 移植による *in vivo* での骨髄微小環境の再構築

本研究の第1段階として、繰り返しの化学療法・放射線療法や原病の悪化等により微小環境が破壊された骨髄に対して revitalized MSC を移植し、骨髄微小環境を再構築することを目指した。これによりこれまで移植後の生着が得られなかった難治症例であっても、その微小環境を改善・再構築することにより、移植後の生着を得られるという非常に新規かつ大きな治療効果を実現させることが可能となる。revitalized MSC を改良して *in vivo* で生着・生存を得るための方法として、revitalized MSC の培養時に必要な増殖因子遺伝子、もしくは revitalized MSC の生着を促進する遺伝子や分化抑制遺伝子など各種遺伝子を revitalized MSC に追加導入することで、移植後に生着する能力を付与した「改良型 rMSC」を作成した。

(2) 人工臓器として移植可能な人工骨髄グラフトの開発

第2段階として、*in vivo* で生着・生存出来るようにした「改良型 revitalized MSC」をハイドロキシアパタイト人工骨内に植え付け増殖させることで人工的な骨髄微小環境を作り、これを人工臓器のように移植して通常の骨髄とは別に新たな骨髄を作るという全く新しい治療につなげることを目指した。まず *in vitro* において「改良型 rMSC」を培養 dish から回収し細胞懸濁液を作成し、これに多孔構造を有するハイドロキシアパタイト人工骨を漬けて数日間培養す

る。すると改良型 rMSC が生着した人工骨髄グラフトが出来上がる。このグラフトを皮下、もしくは血流が豊富な部位に移植することで、*in vivo*において血管新生を得たのち、造血幹細胞が生着することを目指した。これにより強力な化学療法 + 骨髄移植後であっても骨髄生着を早期に得ることを可能にし、移植後の造血不全に伴う感染・出血などを予防し、有意に致死率を改善させ、強力に白血病治療をすることが可能となる。

4. 研究成果

骨髄間葉系幹細胞(MSC: mesenchymal stem cell)は造血幹細胞に特異的な微小環境を骨髄内で形成し、造血幹細胞の機能維持・増殖における中心的な働きをしている。申請者は、培養 MSC に5つの遺伝子(*Klf7*, *Ostf1*, *Xbp1*, *Irf3*, *Irf7*)を強制発現することで、*in vitro*で造血幹細胞を維持・増殖させる能力を再び有するようになった賦活化骨髄 MSC (revitalized MSC: rMSC)を開発し、報告した。

この rMSC は *in vitro*で造血幹細胞を増やすためには非常に強力なプラットフォームとなるが rMSC をマウスに移植した場合には *in vivo*での生着は認められなかった。そこで、この rMSC が生体内で生着・生存できるように rMSC を改良することを目指した。マウス体内における生存延長を可能とする各種遺伝子を rMSC に追加導入して、細胞の増殖能・生存能力などの機能を調べ比較検討することで、最も機能の高い改良型 rMSC 候補細胞に絞り込み、改良型 rMSC を作成することが出来た。

この改良型 rMSC を人工骨(cube ossicle)とともに培養して人工骨内に細胞が住み着くようにした後に、マウスの皮下に植え付けて、数週間はマウス体内で細胞が生存出来ることを確認することができた。さらにこの人工骨を解析すると、改良型 rMSC を植え付けた人工骨においてより多くの造血幹細胞(HSC)が生着していることが認められ、改良型 rMSC の機能を示すことが出来た(図1、図2)。

図1

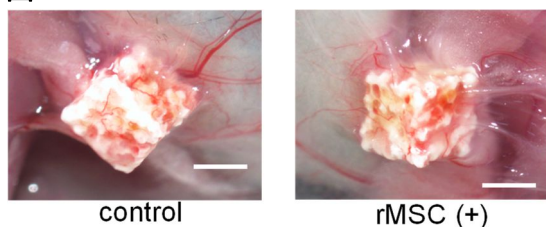
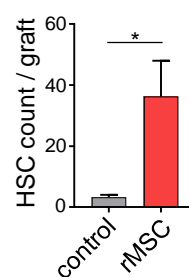
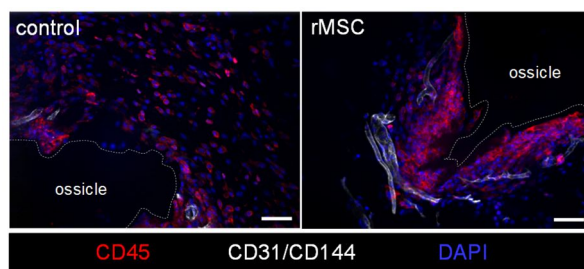


図2



さらに、人工骨の免疫染色にでも造血系細胞が生着していることを確認出来た(図3)。

図3



以上のように、*in vivo*で生着・生存出来るようにした「改良型 revitalized MSC」を作成し、これをハイドロキシアパタイト人工骨内に植え付け増殖させることで人工的な骨髄微小環境を作ることが出来た。

研究者は、本細胞のさらなる改良を継続しており、より長期に生体内で生存が可能で、さらにより効率的に HSC を維持できる改良型細胞の開発を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Pinho S, Wei Q, Maryanovich M, Zhang D, Balandran JC, Pierce H, Nakahara F, Di Staulo A, Bartholdy BA, Xu J, Borger DK, Verma A, Frenette PS	4. 巻 Mar;24(3)
2. 論文標題 VCAM1 confers innate immune tolerance on haematopoietic and leukaemic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 290-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-022-00849-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中原 史雄
2. 発表標題 骨髄微小環境再構築能を有するrevitalized MSCによる造血プラットフォームの開発
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------