

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21790922

研究課題名（和文） 霊長類モデルを用いた間葉系幹細胞共移植による造血幹細胞ニッチ創出と生着促進効果

研究課題名（英文） Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates

研究代表者

増田 茂夫 (MASUDA SHIGEO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10396749

研究成果の概要（和文）：

これまでマウス造血幹細胞移植の系で間葉系幹細胞（MSC）共移植による造血幹細胞（HSC）の生着促進効果が報告されてきた。今回われわれは霊長類自家移植モデルを用いて骨髓内移植（iBMT）におけるMSC共移植の効果を検証した（ $n=3$ ）。移植後 day 39-46 に骨髓のコロニーPCRを施行した結果、共移植群由来のCFUが（単独移植群由来に比べて）明らかに高かった（4.4倍、6.0倍、1.6倍）。移植後 day 28以降、白血球数が2500-3000/ μl へと回復し、その約2%が標識されており（移植細胞由来）、その大半が共移植群由来であった。また共移植群由来細胞は（移植部位とは）反対側の骨髓へ遊走・生着したことが認められた。以上、カニクイザルの自家骨髓内移植の系で解析した結果、MSC共移植群で造血細胞の生着率が高まることが示された。この効果はMSCの骨芽細胞分化を経ていわゆるosteoblastic nicheが創出されたことに因ると推察される。

研究成果の概要（英文）：

Hematopoietic stem cells (HSCs) reside in the osteoblastic niche, which consists of osteoblasts derived from mesenchymal stem cells (MSCs). Here, using nonhuman primates, we investigated the effects of cotransplantation with MSCs on the engraftment of genetically marked CD34⁺ cells after autologous intra-bone marrow transplantation (iBMT). In three cynomolgus monkeys, CD34⁺ cells transplanted with MSCs engrafted 4.4-, 6.0-, and 1.6-times more efficiently than CD34⁺ cells alone, as assessed by bone marrow (BM) colony PCR. In addition, virtually all of the marked cells detected in the peripheral blood (PB) were derived from the cotransplantation aliquots. Notably, colony-forming units (CFUs) derived from the cotransplantation aliquots were frequently detected in BM, distant from the injection site. Thus, cotransplantation with MSCs would improve the efficacy of transplantation of gene-modified HSCs in primates, with enhanced engraftment in BM as well as increased chimerism in PB through migration and homing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：霊長類・サル・造血幹細胞・間葉系幹細胞・骨髓内移植・ニッチ・生着

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は骨芽細胞性ニッチや血管性ニッチなどの造血ニッチに存在することが示されてきた。骨芽細胞性ニッチは間葉性幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) 由来の骨髄中の骨芽細胞により形成される。放射線照射や化学療法剤投与のような前処置は造血幹細胞移植で必要だが、逆に骨芽細胞性ニッチを破壊して生着を遅らせる可能性がある。仮に MSC を共移植することで骨芽細胞性ニッチを創出できれば、造血幹細胞の生着率は向上するだろう。しかしながら MSC は経血管的に投与されても骨髄にホーミングして生着することが難しいことが知られている。一方、造血幹細胞を直接骨髄内に移植 (intra-bone marrow transplantation; iBMT) すると、生着率は血管内移植に比べて向上することが示されている。マウス実験では MSC 共移植によって造血幹細胞の生着が改善すること (iBMT にて) が報告された。

2. 研究の目的

今回我々は霊長類モデルを用いて iBMT における MSC 共移植の効果を検証した。

3. 研究の方法

カニクイザル自家移植の系で実験を行った ($n = 3$)。まず自家の造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) と MSC (骨髄ストローマ細胞) を分離・回収した。造血幹細胞は 2 等分してそれぞれ別のレトロウイルスベクター (G1Na または LNL6) で標識した。前処置として TBI 施行またはブスルフェクス (BU) 静注の上、同一個体内でヘミ骨髄内移植を施行した。すなわち右側 (右上腕骨・右大腿骨) には造血幹細胞と MSC の共移植、左側 (左上腕骨・左大腿骨) には造血幹細胞の単独移植をそれぞれ施行した。ヘミ移植を行うことによって同一個体内の左右で結果を比較可能であり、個体間のデータのバラツキを考慮する必要がないことが利点である。評価は中立の腸骨骨髄・末梢血のほか、四肢骨髄で行った。生着後、二つの標識を区別する PCR を施行し、両群の生着への貢献度を定量した。

4. 研究成果

●結果：

1 頭目は移植後 day46 に腸骨骨髄のコロニー PCR を施行した結果、共移植群由来の CFU が 48% (22/46)、単独移植群由来の CFU が 11% (5/46) と、共移植群で明らかに高かった (4.4 倍)。

2 頭目は移植後 day28 以降、白血球数が 2500-3000/ μl へと回復し、その約 2% が標識されており (移植細胞由来)、その大半が共移植群由来であった。3 頭目も末梢血の大半が

共移植群由来であった。

また移植後 day39 の四肢骨髄のコロニー PCR を施行した結果、共移植群由来の CFU が明らかに多く (2 頭目では 6 倍、3 頭目では 1.6 倍)、2 頭目・3 頭目ともに反対側骨髄への遊走・生着が認められた。

●考察：

マウス実験の以前の報告では、共移植された MSC は (1) 細胞間の接着 (共局在) や、(2) 分泌する液性因子 (SDF-1 など)、によって造血を支持していることが示された。我々の系では (1) に関しては LacZ 標識した MSC を共移植したが、発現や免疫応答などの問題のためか検出困難であった。(2) に関しては MSC からの分化途上の pre-adipocyte で SCF, SDF-1, angiopoietin-1 (Ang-1) の発現が亢進していることが以前報告されていたが、我々のサル系では予想に反して逆の傾向を認めた。このことは、造血幹細胞単独移植群の生着不全の結果、造血支持サイトカイン発現を up-regulate させるような代償機構が働いた可能性が推測された。

造血幹細胞の遊走・生着能に関しては、体外培養後に喪失することが報告されてきた。しかしながら我々の結果では、MSC 共移植を併用することによって体外標識造血幹細胞が反対側の骨髄へ遊走していたことから、移植された MSC によって造血幹細胞の遊走・生着能が回復することが示唆された。さらには MSC 効果は骨髄よりは末梢血のほうで顕著であったことから、MSC は造血細胞の mobilization の段階に作用していることが想定された。

●結論：

カニクイザルの自家骨髄内移植の系で解析した結果、MSC 共移植群で造血細胞の生着率が高まることが示された。この効果は MSC の骨芽細胞分化を経ていわゆる osteoblastic niche が創出されたことに因ると推察される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. [Masuda S](#), Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. *Exp Hematol.* 37(10): 1250-1257, 2009. 査読有り
2. [Masuda S](#), Hanazono Y. Induced pluripotent stem cells in long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 364(2):

- 181-182, 2011. 査読有り
3. Masuda S. NK-cell and B-cell deficiency with a thymic mass. *N Engl J Med.* In press. 査読有り
 4. Masuda S. Leukemic stem cell gene expression signature and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA.* 305(11): 1094-1095, 2011. 査読有り
 5. Abe T, Masuda S, Ban H, Hayashi S, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y. *Ex vivo* expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing *HoxB4* assessed by sheep in utero transplantation. *Exp Hematol.* 39(1):47-54, 2011. 査読有り
 6. Masuda S, Abe T, Hayashi S, Tanaka Y, Ban H, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y. Busulfan conditioning in sheep *in utero* transplantation confers engraftment potential on human hematopoietic stem cells as efficiently as *HoxB4* transduction. *Blood.* 116(22): 693a, 2010. 査読無し
 7. Tanaka Y, Masuda S, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y. Intravascular route is not superior to an intraperitoneal route for in utero transplantation of human hematopoietic stem cells and engraftment in sheep. *Transplantation.* 90(4): 462-463, 2010. 査読有り
 8. Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. *Cancer Sci.* 100(12): 2444-2450, 2009. 査読有り
 9. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional natural killer cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of interleukin-15. *J Immunol.* 182(10): 6168-6178, 2009. 査読有り
 10. Tanaka Y, Ikeda T, Kishi Y, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S, Hanazono Y.

ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant.* 18(4): 381-389, 2009. 査読有り

[学会発表] (計10件)

1. 増田茂夫, 造血幹細胞移植における間葉系幹細胞共移植療法の開発(霊長類モデルを用いて), 第36回冲中記念成人病研究所研究報告会, 2011年3月5日, 東京(虎の門病院)
2. 増田茂夫, 大型動物を用いた iPS 細胞研究(招待講演), 第2回 滋賀医科大学サルンポジウム, 2010年2月22日, 滋賀(滋賀医科大学)
3. 増田茂夫, Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. (YIA受賞口演), 第9回 日本再生医療学会総会, 2010年3月18-19日, 広島(広島国際会議場)
4. Masuda S, IMPROVED ENGRAFTMENT OF GENE-MODIFIED HSC AFTER CO-TRANSPLANTATION WITH MSC IN NON-HUMAN PRIMATES. 第15回 日本遺伝子治療学会学術集会, 2009年7月9-11日, 大阪(阪大コンベンションセンター)
5. Masuda S, Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 7th International Society for Stem Cell Research: Annual Meeting, 2009年7月8-11日, スペイン(バルセロナ)
6. Masuda S, Co-transplantation of MSCs improves the engraftment of HSCs in nonhuman primates. 第7回 幹細胞シンポジウム, 2009年5月15-16日, 東京(泉ガーデンギャラリー)
7. 増田茂夫, 間葉系幹細胞(MSC)共移植による造血幹細胞の生着促進効果 -霊長類モデルを用いて-, 協和発酵キリン 第10回 細胞移植・遺伝子治療セミナー, 2009年5月14日, 栃木(宇都宮東武ホテルグランデ)
8. 増田茂夫, 霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進効果, 第7回 自治医科大学シンポジウム, 2008年8月30日, 栃木(自治医大)
9. 増田茂夫, 霊長類モデルにおける間葉系幹細胞の共移植による造血幹細胞の生着促進効果, 第70回 日本血液学会総会, 2008年10月10日~12日, 京都(国立京都国際会館)
10. Masuda S, Co-transplantation of MSC improves the engraftment of HSC after auto-iBMT in non-human primates. 第50回 米国血液学会総会 (ASH), 2008年12月6日~9日, アメリカ合衆国(サンフランシスコ)

[その他]
ホームページ等
http://netplus.nikkei.co.jp/ssbiz/_techno/_te090414.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 茂夫 (MASUDA SHIGEO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10396749