

平成22年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007年度～2009年度
 課題番号：19380175
 研究課題名（和文）犬における造血幹細胞を用いた自家骨髄移植療法の開発
 研究課題名（英文）Development of autologous bone marrow transplantation therapy using hematopoietic stem cells in dogs

研究代表者
 辻本 元（TSUJIMOTO HAJIME）
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：60163804

研究成果の概要（和文）：犬において多発するリンパ造血系腫瘍の治療法を進歩させるため、自家骨髄移植療法システムの開発を行った。骨髄細胞採取法、造血幹細胞単離法、およびその凍結保存法について最適条件を明らかにした。次に、抗がん治療時にも死滅しない造血幹細胞を遺伝子導入によって作製した。さらに、治療有効性を高感度に評価できる微小残存病変検出法を開発した。本研究により、きわめて良好な治療成績が得られる抗がん治療開発の基盤を提供することができた。

研究成果の概要（英文）：To advance antineoplastic therapies for lymphohematopoietic tumors that are common in dogs, we developed a series of systems for autologous bone marrow transplantation. Optimal conditions for bone marrow cell collection, hematopoietic cell separation, and their cryopreservation were obtained. Next, hematopoietic stem cells resistant to antineoplastic agents were generated by a gene transfer method. Finally, we developed a highly sensitive quantitative monitoring system of minimal residual disease to assess the treatment efficacy. The present study provided a basis for the development of antineoplastic therapies with excellent treatment outcomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：犬、化学療法、骨髄移植、CD34、造血幹細胞、リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

小動物臨床においてもヒト医学分野と同様に腫瘍性疾患の症例の増加が顕著であり、

また腫瘍症例に対する治療にあたっては集中的かつ総合的なアプローチが必要であることから、腫瘍診療の比重は益々増加してい

る。これら腫瘍性疾患のうち、内科領域において最も発生頻度が高く、臨床的に重要性の高い疾患は、リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫などを含むリンパ造血系腫瘍である。リンパ造血系腫瘍に対する治療の第一選択は抗癌剤を用いた化学療法である。とくに犬のリンパ腫に関しては、過去30年余りの間に化学療法に関する多数プロトコルが報告され、その治療成績は格段に向上した。とくに CHOP プロトコル（シクロフォスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾロンを組み合わせた多剤併用療法）の応用 (Greenlee *et al.*, 1990; Stone *et al.*, 1991) により生存期間の中央値が約12ヶ月まで延長した。しかし、その後これまで15年間にプロトコルの改変に関する研究が数多くなされているにもかかわらず、治療成績にはほとんど改善が見られず、生存期間の中央値約1年という壁が存在している。

2. 研究の目的

以上のような背景から、既存の化学療法をマイナーチェンジするだけでは、リンパ造血系腫瘍の治療成績を大幅に向上させることはできないものと考えられる。そこで、「造血幹細胞の単離とその自家骨髄移植療法への応用」をめざした本研究を立ち上げることとした。本研究は、リンパ造血系腫瘍症例において、造血幹細胞を単離してそれを自家骨髄移植することにより、化学療法時における骨髄抑制を回復させ、その治療成績を格段に向上させることを目的として企画したものである。

3. 研究の方法

(1) 骨髄灌流法の導入による骨髄細胞採取法の改良：7頭の実験用ビーグル犬を用い、上腕骨および大腿骨からの骨髄細胞採取において、既存の吸引法と今回新たに導入した骨髄灌流法を比較した。フローサイトメトリーを用い、混入した血液由来リンパ球とCD34⁺造血幹細胞の比率を比較した。また、メチルセルロースコロニー形成法により、骨髄由来コロニー数を比較した。

(2) CD34⁺造血幹細胞の単離法および凍結保存法の検討：犬の骨髄からCD34⁺造血幹細胞を単離するシステムとして、マウス抗イヌCD34モノクローナル抗体と磁気ビーズ標識抗マウスIgG抗体を用いた磁気ビーズソーティング法(MACS)を用いた(図1)。

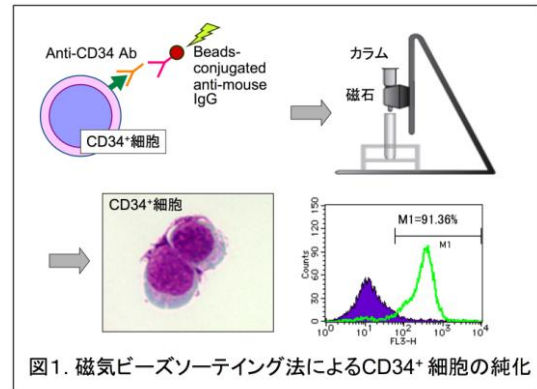


図1. 磁気ビーズソーティング法によるCD34⁺細胞の純化

得られたCD34⁺細胞の多分化能を証明するため、メチルセルロースコロニー形成法を用い、各種血球コロニーの形成能を検討した。CD34⁺細胞の移植への臨床応用を行うため、その凍結保存に最適な条件を検討した。凍結保存液として、一般的に用いられている10% DMSO添加牛胎子血清と5% DMSO、6% ヒドロキシエチルスターチおよび4% アルブミンを含む溶液を用いた。最長6ヵ月までの間において、細胞生存率および血球コロニー形成能を測定し、これら2種類の凍結保存液による凍結保存法を比較した。

(3) 犬のCD34陽性造血幹細胞へのABCBI (*mdr1*) 遺伝子導入による薬剤耐性誘導：HIVを骨格とした自己不活化型のレンチウイルスベクター(pWPXL)にイヌABCBI (*mdr1*) 遺伝子または蛍光マーカー(*GFP*) 遺伝子を挿入して遺伝子導入ベクターを作製し、これをVSV-GまたはRD114 Envを発現させた293Tパッケージング細胞に導入することによって組み換えレンチウイルス粒子を作製した。これら組み換えレンチウイルスを単離した犬のCD34陽性細胞に感染させた後、メチルセルロースコロニー形成法によってその多分化能を検討した。また、*mdr1* 遺伝子導入による薬剤耐性の評価のためにP糖蛋白(P-gp)の基質となる抗癌剤であるドキシソルビシンを添加したメチルセルロース培地コロニー形成法を行った。

(4) 犬のリンパ腫症例における微小残存病変(Minimal residual disease, MRD) 定量システムの開発：リンパ腫症例における化学療法の有効性を定量的に評価するため、MRD 定量システムの開発を行った。はじめに、犬のT細胞リンパ腫細胞株を用い、T細胞レセプター-g鎖(*TCRg*) 遺伝子をPCRによって増幅し、その再構成領域の塩基配列を解析した。その塩基配列をもとにクローン特異的なプライマーとプローブを作製し、リアルタイムPCR

による定量系を作製した。次に、この方法を用い、17頭の犬のリンパ腫症例における治療前、化学療法中、およびその終了時における末梢血液中の MRD レベルを測定した。また、化学療法終了時における MRD レベルと再発までの期間との間の相関を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄灌流法の導入による骨髄細胞採取法の改良 (図2) : 既存の吸引法を用いた場合、血液由来リンパ球の混入率は、CD3⁺CD4⁺細胞が 15.3 ± 7.6%、CD3⁺CD8⁺細胞が 9.2 ± 3.6%であった。これに対し、骨髄灌流法を用いた場合には、CD3⁺CD4⁺細胞 4.3 ± 2.7%、CD3⁺CD8⁺細胞 4.2 ± 2.3%と血液由来リンパ球の混入率が有意に低いことが明らかとなった。また、CD34⁺細胞比率は、吸引法 (4.2 ± 1.8) よりも骨髄灌流法 (5.5 ± 1.9) において有意に高かった。また、血球コロニー形成能に関しても、吸引法 (21.9 ± 7.8 コロニー/10⁵ cells) よりも骨髄灌流法 (63.7 ± 21.2/10⁵ cells) において有意に高かった。



図2. 灌流法による犬の骨髄細胞の採取

(2) CD34⁺造血幹細胞の単離法および凍結保存法の検討 : MACS により、犬の骨髄細胞中に含まれている CD34 陽性細胞を 90-95%の純度で単離することに成功した。また、これら CD34 陽性細胞はメチルセルロース培地血球コロニー形成法において、各種血球コロニーを形成することが示され、その多能性が確認された。さらに、その凍結保存に最適な条件を細胞生存率および血球コロニー形成能によって検討したところ、5% DMSO、6% ヒドロキシエチルスターチおよび 4% アルブミンを含む溶液を用いて凍結保存した場合、6ヶ月間にわたり 80-90%の細胞生存率および 70-80%の血球コロニー形成能が維持された。これらの値はこれまで標準的に用いられてきた 10% DMSO 添加牛胎子血清において得られた値よりも有意に高いことが示された。

(3) 犬の CD34⁺造血幹細胞への *ABCB1* (*mdr1*) 遺伝子導入による薬剤耐性誘導 (図3) : 犬の骨髄細胞から MACS によって 90%以上の純度を有する CD34⁺細胞を単離し、イヌ *ABCB1* 遺伝子または *GFP* 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させた。

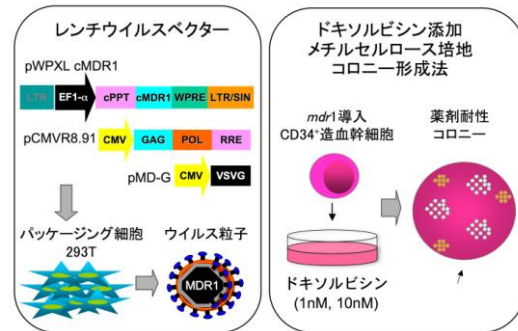


図3. CD34⁺造血幹細胞への *mdr1* 遺伝子導入

その結果、*ABCB1* 遺伝子導入細胞は P-gp を基質とする蛍光色素である Rhodamine123 を効率よく排出したことから、機能的な P-gp の発現が確認された。次に、メチルセルロースコロニー形成法を行ったところ、*ABCB1* 遺伝子導入 CD34⁺細胞は P-gp の基質となる抗癌剤 (ドキシソルビシン) 存在下で *GFP* 遺伝子導入細胞よりも有意に多い造血細胞コロニーを形成した。これらコロニーは、顆粒球系、マクロファージ系、赤芽球系からなっており、*ABCB1* 遺伝子導入が各種血球系統への分化を阻害しないことが示された。さらに、ドキシソルビシンの濃度依存性に P-gp 陽性細胞率が上昇することが示された。

(4) 犬のリンパ腫症例における微小残存病変 (Minimal residual disease, MRD) 定量システムの開発 (図4) :

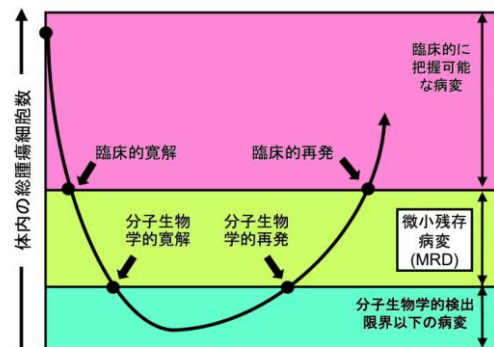


図4. 腫瘍の化学療法における微小残存病変(MRD)

TCR γ 遺伝子を増幅する定量システムは、プラスミド DNA とリンパ腫細胞株のいずれを用いた場合にも、10-100,000 コピーの間で直線性を示し、10,000 個の細胞のうち 1 個の細胞を検出できる感度を有していた。また、血漿中

MRD レベルは、寛解導入によって低下し、再発時の前に上昇することが示された。また、犬のリンパ腫に対する化学療法として標準的に用いられているウイスコンシン大学のプロトコル(UW-25)においては、MRD レベルは、治療開始4-7週後に最低値(<0.019-1.0 cells/ml)になり、そのレベルは治療終了時まで低いレベルで維持されていた(図5)。

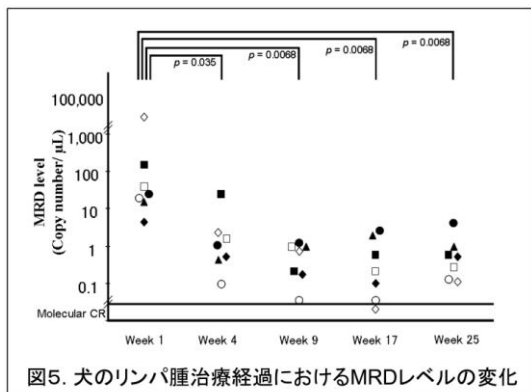


図5. 犬のリンパ腫治療経過におけるMRDレベルの変化

またUW-25 終了時におけるMRD レベルは、治療終了から再発までの期間と逆相関していることが明らかとなり(図6)、再発の予後因子として利用できることが示された。

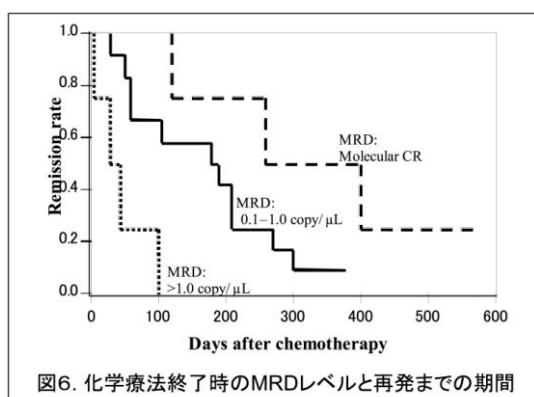


図6. 化学療法終了時のMRDレベルと再発までの期間

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (主要論文8件、総件数23件)

- ① Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 査読あり、印刷中(2010).
- ② Yamazaki, J., Takahashi, M., Setoguchi, A., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: A proof-of-concept pilot study.

J. Vet. Intern. Med. 査読あり、印刷中(2010).

- ③ Fukushima, K., Ohno, K., Goto-Koshino, Y., Uchida, K., Nomura, K., Takahashi, M., Nakashima, K., Fujino, Y. and Tsujimoto, H. Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読あり 71:1673-1676 (2009).

④ Yamazaki, J., Mizukami, T., Takizawa, K., Kuramitsu, M., Momose, H., Masumi, A., Ami, Y., Hasegawa, H., Hall, W.W., Tsujimoto, H., Hamaguchi, I. and Yamaguchi, K. Identification of cancer stem cells in a *Tax*-transgenic (*Tax*-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 査読あり 114:2709-2720 (2009).

⑤ Ide, K., Goto-Koshino, Y., Momoi, Y., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Quantitative analysis of mRNA transcripts of *Hox*, *SHH*, *PTCH*, *Wnt*, and *Fzd* genes in canine hematopoietic progenitor cells and various in vitro colonies differentiated from the cells. *J. Vet. Med. Sci.* 査読あり 71:69-77 (2009).

⑥ Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 査読あり 126:321-331 (2008).

⑦ Ide, K., Matsuura, S., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Investigation of various methods for the cryopreservation of canine bone marrow-derived CD34⁺ cells. *J. Vet. Med. Sci.* 査読あり 70:1211-1217 (2008).

⑧ Matsuura, S., Koto, H., Ide, K., Fujino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Induction of chemoresistance in a canine cultured cell line by retroviral transduction of the canine multidrug resistance 1 gene (*mdr1*). *Am. J. Vet. Res.* 査読あり 68:95-100 (2007).

[学会発表] (計8件)

- ① Tsujimoto, H., Molecular diagnosis and measurement of minimal residual disease

(MRD) in canine lymphoma. The 2nd Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations (FASAVA) Congress 2009, Nov. 4th, 2009, Bangkok, Thailand

② Tsujimoto, H., Molecular mechanism of drug resistance and its relation to the prognosis in canine lymphoma The 2nd Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations Congress 2009, Nov. 4th, 2009, Bangkok, Thailand

③ Sato, M. *et al.*, Elevation of minimal residual disease (MRD) in the peripheral blood prior to the clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. 29th Annual Conference of the Veterinary Cancer Society (VCS), Oct. 19th, 2009, Austin, Texas, U. S. A.

④ Sato, M. *et al.*, Comparison of cytoreductive efficacy among vincristine, cyclophosphamide and doxorubicine in dogs with lymphoma that received a multidrug chemotherapy protocol by mesuring minimal residual disease. The 19th Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine- Companion Animals (ECVIM-CA), Sept. 10th, 2009, Porto, Portugal

⑤ 佐藤雅彦ら、犬リンパ腫の微小残存病変定量によるウィスコンシン大学多剤併用プロトコール期間中に使用される各抗癌剤の効果比較、第5回日本獣医内科学アカデミー学術大会(JCVIM 2009)、2009年2月15日、東京

⑥ 山崎淳平ら、イヌのリンパ腫における微小残存病変についての研究、第69回日本血液学会総会、2007年10月12日、神奈川

⑦ 山崎淳平、リンパ腫症例における微小残存病変(MRD)定量でわかること、第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会(JCVIM 2007)、2007年8月11日、東京

⑧ Yamazaki, J. *et al.*, Quantification of minimal residual disease (MRD) in the peripheral blood of dogs with lymphoma treated with standard multidrug combination chemotherapy (UW-25).

The 25th American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum, Jun. 6th, 2007, Seattle, Washington, U. S. A.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医内科学教室ホームページ

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/naika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本 元 (TSUJIMOTO HAJIME)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60163804

(2) 研究分担者

大野 耕一 (OHNO KOICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90294660

藤野泰人 (FUJINO YASUHITO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70401180

後藤裕子 (GOTO YUKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：80436518