

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791026

研究課題名(和文) 造血幹細胞のソースの違いに由来する幹細胞 Quality に関する研究

研究課題名(英文) IN VIVO COMPARISON OF THE STEMNESS ABILITY AMONG CD34<sup>+</sup> CELLS DERIVED FROM CORD BLOOD, BONE MARROW, PERIPHERAL BLOOD USING NOD/SCID x IL-2R<sup>-null</sup> (NOG) MICE

研究代表者

堀内 保臣 (HORIUCHI YASUOMI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・研究員

研究者番号：80443125

研究成果の概要(和文)：NOG マウスを用いた移植実験の結果より、臍帯血、骨髄、末梢血由来 CD 34 陽性細胞の順で幹細胞としてのソースの優位性が示された。ただし遺伝子治療に関しては臍帯血を使う可能性は極めて低いため、骨髄を利用することが良いと思われる。また、この知見は造血幹細胞移植を行う際のソースの選択にも有用な情報を与えられられる。

研究成果の概要(英文)：haemopoietic system rebuilding was expensive by umbilical cord blood, bone marrow, order of the peripheral blood. One's umbilical cord blood is not stored in many cases. Therefore, I think that bone marrow is useful for the source of the gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,700,000	510,000	2,210,000
22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：分子生物学、細胞工学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：造血幹細胞、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム医学の進歩により、様々な疾患の原因となる遺伝子異常の解明が進んでいるが、特に、ヒトゲノムの解読が終了したことから今後その傾向は一層加速されると考えられる。一方、現在までに様々な遺伝子治療法の開発が試みられてきたが、その成果については大部分が懐疑的であった。しかし、近年の幹細胞生物学の進歩や遺伝子導入ベクターの改良により、遺伝子治療は先天的遺伝子異

常に起因する小児難治性疾患の有望な治療法として急速に再認識されつつある。現在、正常遺伝子の導入を目的とした遺伝子治療の戦略としては、自家造血幹細胞を採取して遺伝子導入した後に患者に再移植する方法がもっとも一般的であるが、この方法は、特に先天免疫不全症等の血液系細胞の機能欠損に対する本質的な治療法となり得るものである。実際に、これまで遺伝子治療として明らかな成果が達成されたのは、adenosine deaminase (ADA) 欠損症、X-SCID、慢性肉芽腫症などの

限られた疾患のみであり、そのいずれもが血液系細胞の機能欠損に起因する先天免疫不全症である。造血幹細胞を用いた遺伝子治療が成功するためには、遺伝子導入を受けて再移植された造血幹細胞（あるいは前駆細胞）から、治療の対象となる成熟血球が生涯に渡って供給されることが必要である。しかし、通常の骨髄移植とは異なり、遺伝子治療の場合には、造血幹細胞を分取してから再移植するまでに遺伝子導入操作のため *ex vivo* で数日間培養を行う必要があり、再移植時に治療上必要な造血系再構築能が維持されていることが治療の成否を大きく左右することになる。特にレトロウイルスベクターを用いる治療では、遺伝子導入操作中に幹細胞が細胞分裂を繰り返すことが高い遺伝子導入効率を得るための必須条件となる。従って、治療に用いる造血幹細胞の多分化能、つまり“幹細胞としての quality”や、遺伝子導入操作中に幹細胞の増殖を誘導しながら同時に多分化能を維持するための培養法（特に添加するサイトカインの組み合わせ）の選択が非常に重要となる。

## 2. 研究の目的

造血幹細胞の採取の方法としては、患者自身の骨髄あるいは G-CSF 投与後の末梢血から磁気ビーズにより CD34 陽性細胞を分離する方法がある。将来的には、生下時にあらかじめ臍帯血を保存し、その後 CD34 陽性細胞を分離して遺伝子治療に用いることも可能になると考えられる。これに関して、同じ CD34 陽性細胞といっても、同一の細胞集団ではなく、供給源の違いによってその幹細胞としての“quality”には差があることが予想される。例えば、骨髄から直接採取してきた CD34 陽性細胞の中には真の“造血幹細胞”が含まれるものと期待される。一方、G-CSF で誘導した末梢血 CD34 陽性細胞や、臍帯血 CD34 陽性細胞の中には、全ての血球系を長期に渡って再構築可能な細胞の集団が含まれていることはこれまでの臨床実績から立証されているものの、これらの細胞の中に多分化能を維持した“全能性造血幹細胞”が含まれているかどうかは確認されたわけではない。実際に、これまでに行われてきた先天異常に対する骨髄移植療法の治療成績が、疾患と用いた CD34 陽性細胞の source によって大きく異なる結果であることは、それぞれ由来の異なる CD34 陽性細胞が、それぞれ異なる“幹細胞としての quality”を有することを示唆している。他方、X-CGD では顆粒球が、ADA 欠損症では T-リンパ球が、X-SCID では T-および B-リンパ球が治療の対象となっており、それぞれの疾患で再構築が必要とされる血球系統が異なっている。そのため、必ずしも“全能性造血幹細胞”

に遺伝子を導入して移植することが必須ではなく、必要とされる系統の前駆細胞が存在すれば、十分な治療効果が得られる可能性がある。逆に幹細胞の採取の面からみた場合、骨髄から十分な CD34 陽性細胞を分離するためには患者自身に相当の負担がかかるため、特に年少児が対象となる先天免疫不全症では実施にあたって相当の困難が伴うことが予想される。その点、G-CSF で誘導した末梢血 CD34 陽性細胞の方が比較的容易に採取可能である。また、自己臍帯血の利用が可能であれば、CD34 陽性細胞採取に際して患者への身体的負担は全くかからない。以上の点について総合的に考えると、必ずしも骨髄由来の CD34 陽性が最善の選択とは言えず、各由来の CD34 陽性細胞に対して遺伝子導入のための培養法を加味した“幹細胞としての quality”を厳密に評価し、疾患ごとの適性を充分評価する必要がある。しかし、実際にはこのような“幹細胞 quality”の評価や比較は充分には行われていないのが現状である。その理由としては、これまで幹細胞の“quality”を評価可能な *in vivo* の系がなかったことも一因と考えられる。これに対して、最近開発された NOD/Shi-scid, IL-2RgKO (NOG) マウスは、従来ヒト型化モデルとして用いられてきた免疫不全マウスに比較して、ヒト組織の生着、再構築能が格段にすぐれている。例えば、ヒト造血細胞移植の場合、従来の NOD/SCID マウスでは単球系+Bリンパ球しか再構築されなかったのに対し、NOG マウスではほぼすべての系統の血球系が再構築されることが報告されている。従って、NOG マウスはヒト造血幹細胞の多能性を評価するのに最適の *in vivo* モデルであると考えられる。そこで本研究では、NOG マウスへの移植系を用いて、遺伝子治療への使用を前提とした、造血幹細胞の“quality”の評価、比較を行い、それぞれの疾患に対する造血幹細胞の source や遺伝子導入法（特にサイトカインカクテル）の選択に際して科学的な根拠をもたらす基礎実験データを得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* での評価

1) 骨髄、2) G-CSF 投与後の末梢血、3) 臍帯血、それぞれに由来する CD34 陽性細胞を A) SCF+ FLT-3L+ TPO+ IL6+IL6R と B) SCF+ FLT-3L+ TPO+ IL3 の2つのサイトカインカクテルで5日間培養し、以下の検討を行う。  
① 培養の前後で、幹細胞マーカー、および分化マーカー等の発現状況について、免疫細胞染色を行い、フローサイトメトリーで解析し、幹細胞としての質を評価する。(ii) コロニーアッセイを行い、BFU-E, CFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM 等の各コロニー数をカウントする。

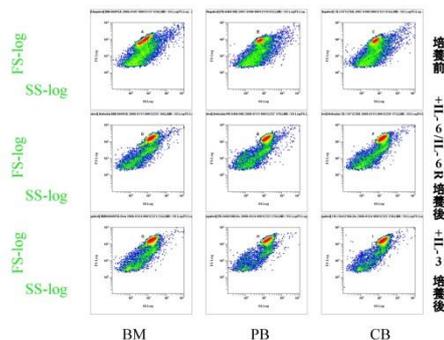
②NOG マウスを用いた in vivo での評価  
同様に、3 種類の source の CD34 陽性細胞を、  
培養しない素の状態 NOG マウスに移植、3  
ヶ月後に尾静脈から末梢血を採取してヒト血  
球の生着を確認後、6 ヶ月後にマウスを処理  
して、末梢血、脾臓、骨髄中のヒト血液細胞  
の数と分画についてフローサイトメトリーを  
用いて解析する。

以上の解析は、1 回の検討に、1) 骨髄、2)  
G-CSF 投与後の末梢血、3) 臍帯血、それぞ  
れに由来する CD34 陽性細胞をそれぞれ 1 検体  
ずつ使用し解析する。

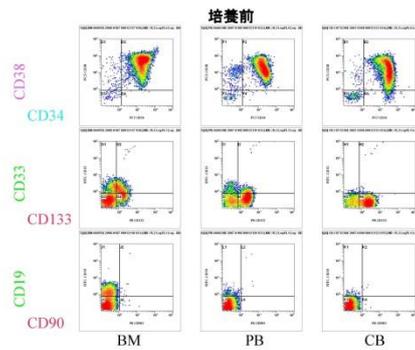
#### 4. 研究成果

骨髄、末梢血、臍帯血、それぞれに由来する  
CD34+細胞について、その性状、特に Stemness  
についての比較を行った。用いた細胞は凍結  
状態で市販されている骨髄、末梢血、臍帯血、  
各由来の CD34+細胞を使用した。まず、解凍  
直後、SCF, TPO, Flt3ligand +IL-6/IL-6R カク  
テル 5日培養したもの、SCF, TPO, Flt3ligand  
+IL-3 カクテル 5日培養したものについて FCM  
を用いて表面マーカーの発現について検討を  
行いました。

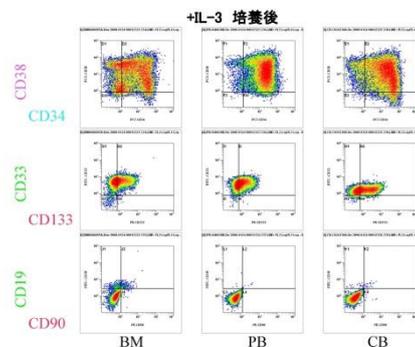
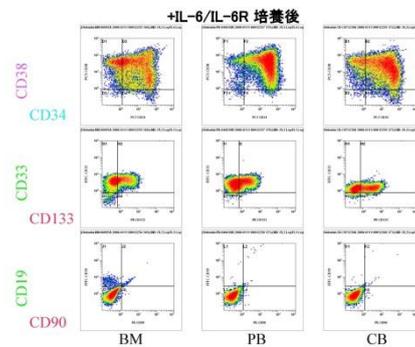
培養前の末梢血と臍帯血は非常にそろった  
状態の細胞集団であるのに対し、骨髄では比  
較的バラエティにとんだ集団であることが  
分かりました。



各ソースいずれの細胞もサイトカインカクテルで培養  
すると培養前の細胞集団に比較して変化して  
いることがわかった。マーカーを使ってどの  
ような細胞集団なのか詳しく調べたのが次の  
図です。



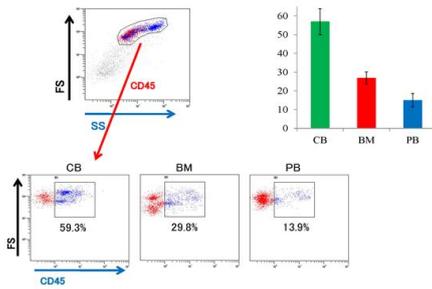
末梢血、臍帯血由来の細胞が比較的そろっ  
ているのに対し、骨髄由来の細胞は CD 1 9  
が弱陽性など若干分化している細胞も含まれ  
ていることがわかります。



SCF, TPO, FL, IL6, sIL6R のサイトカインカク  
テル、SCF, TPO, FL, IL3 のサイトカインカク  
テルいずれのソースにおいても、大部分の細胞  
が CD33 となっていることから、CD34+細胞の  
骨髄球系細胞への分化誘導が進んでしまっ  
ていることが示唆されます。

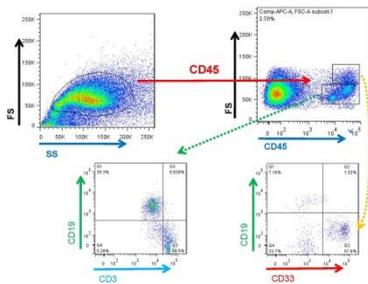
次に、未培養の CD34 陽性細胞を造血幹細胞  
として NOG マウスに移植し Stemness の検討を  
行いました。用いた造血幹細胞は LONZA 社  
から購入したものを使用しました。2.5Gy の X  
線照射後、CD34 陽性細胞を 1 匹あたり  $2.5 \times 10^5$   
個の細胞を静脈内注射し、移植後 6 カ月  
目で詳しい解析を行いました。

### 移植後6カ月目のマウス骨髄中、ヒト血液細胞



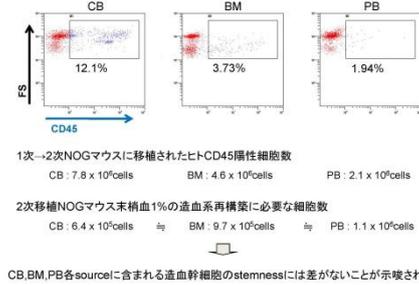
移植後 6 ヶ月目にマウスを解剖し、その骨髄中のヒト造血細胞を確認しました。まず FACS で FS と SS で展開して、ヒト造血細胞のマーカである CD45 陽性細胞をヒト細胞として検討すると、臍帯血では 59.3%、骨髄では 29.8%、末梢血では 13.9% のヒト造血細胞が認められました。右上のグラフは各 CD34 陽性細胞移植マウス 3 匹ずつのヒト CD45 陽性細胞の割合をグラフにまとめたものになります。この結果から臍帯血が最もヒト血液細胞の割合が高いことがわかります。よって臍帯血由来 CD34 陽性細胞がもっとも造血再構築能が高いことが示唆されました

### ヒト CD45+ 細胞の FACS による分化解析



次に多分化能を FACS を用いて確認したところ T 細胞のマーカである CD3、B 細胞のマーカである CD19、顆粒球のマーカである CD33 すべての lineage の細胞が確認できました。以上の結果から、これら CD34 陽性細胞はマウス骨髄において 6 カ月の長期にわたり生着していることがわかり、stemness を有する幹細胞が存在することが示唆されました。また T 細胞、B 細胞、顆粒球細胞への分化にソースによる大きな違いは認められませんでした。

### 2次移植後6カ月目のマウス骨髄中のヒト血液細胞



1次→2次NOGマウスに移植されたヒトCD45陽性細胞数  
 CB :  $7.8 \times 10^6$  cells    BM :  $4.6 \times 10^6$  cells    PB :  $2.1 \times 10^6$  cells  
 2次移植NOGマウス末梢血1%の造血系再構築に必要な細胞数  
 CB :  $6.4 \times 10^6$  cells    BM :  $9.7 \times 10^6$  cells    PB :  $1.1 \times 10^6$  cells  
 CB, BM, PB各sourceに含まれる造血幹細胞のstemnessには差がないことが示唆される。

さらに、各 CD34 細胞の stemness 能を確認するために、移植したマウスから骨髄を回収し、新たな NOG マウスへの 2 次移植を行いました。方法としては 1 次移植のマウスから骨髄を回収し、その全量に対する 10 分の 9 を新たな NOG マウスに移植し、6 カ月後に解析を行っております。1 次移植で得られた各 CD34 陽性細胞由来の細胞は、移植された 2 次移植マウスの骨髄中においてもヒト CD45 陽性細胞として確認できました。この結果より、いずれのソースも 1 年の長期にわたり造血を維持できることがわかりました。また、1 次→2 次 NOG マウスに移植された際の、ヒト CD45 陽性細胞数から、2 次移植 NOG マウス末梢血 1% の造血系再構築に必要な細胞数を求めると各ソースの必要細胞数が 2 倍未満とほぼ同じ必要細胞数を示すことから、各ソースに含まれる造血幹細胞がもつ stemness 能は差がないことが示唆されました

結果をまとめます。  
 骨髄、末梢血、臍帯血、各由来 CD34+ 細胞について NOG マウスの系で 1 年にわたり解析を行いました。  
 1、これら CD34 陽性細胞中にはマウス骨髄中で 1 年にわたり生着する細胞が存在することがわかった。  
 2、これら CD34 陽性細胞中には T 細胞、B 細胞、顆粒球に分化できる能力を有する細胞が存在することが分かった。  
 3、1 次、2 次移植の結果から臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植されたマウスでは他の二つに比べ最もキメリズムが高いことが分かった。  
 4、しかし、1 次、2 次移植の結果から各々の CD34 陽性細胞の造血再構築能に大きな差を認めないことから、この差は含まれる幹細胞の数の違いによると思われた。

以上の結果から臍帯血、骨髄、末梢血由来 CD34 陽性細胞の順で幹細胞としてのソースの優位性が示されました。ただし遺伝子治療に関しては臍帯血を使う可能性は極めて低いため、骨髄を利用することが良いと思われます。

また、今回の結果から造血幹細胞移植を行う際のソースの選択にも有用な知見が得られたと考えられます。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

堀内保臣

A study about stem cell Quality coming from the difference of the source of the blood making stem cell

第16回日本遺伝子治療学会

平成22年7月1日～3日

栃木県総合文化センター

堀内保臣

Kinetics and effect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy

第15回日本遺伝子治療学会

平成21年7月9日～11日

大阪大学コンベンションセンター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

堀内 保臣 (HORIUCHI YASUOMI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・研究員

研究者番号: 80443125

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: