

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390267
 研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の腫瘍集積性を利用した悪性リンパ腫に対する
 遺伝子治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of gene therapy for malignant lymphoma using
 mesenchymal stem cells with tumor-accumulating capacity
 研究代表者
 小澤 敬也（OZAWA KEIYA）
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号：30137707

研究成果の概要：

(1) 間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）の腫瘍集積性を応用した悪性リンパ腫に対する新規治療法の開発研究を行った。可溶性 TRAIL の腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導を利用した治療ストラテジーの有用性を見出した。

(2) MSC の腫瘍集積性を増強するために、腫瘍集積性の分子機構に関する検討を行った。TNF- α による接着分子の発現誘導、ならびに血管内皮細胞への接着性の亢進が MSC の腫瘍集積性に重要な役割を担っていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：悪性リンパ腫、間葉系幹細胞、腫瘍集積性、遺伝子治療、抗腫瘍性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来のMSCは、骨髄ストローマ細胞の構成成分に分化してだけでなく、脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞・筋細胞・腱などの中胚葉系の様々な組織に分化する能力を持った細胞として知られている。MSCの場合は、ES (embryonic stem) 細胞と違って倫理上の問題点が少なく、再生医療への応用という観点からはより現実的な研究対象となっている。例えば、心筋梗塞後の心筋組織修復を目的にMSCを障害部位局所に移植する臨床研究が試

みられており、関節症治療への応用を目指した研究も進んでいる。さらに、造血幹細胞移植領域では、MSCの免疫抑制作用を利用した移植片対宿主病（GVHD: graft-versus-host disease）の治療について、基礎並びに臨床研究が活発化してきている。このような再生医療やGVHD治療では、MSCが組織障害や炎症のある部位に集積していく性質を利用したものである。一方、MSCは癌病巣へ集積する性質があることも知られている。インターフェロン- β （IFN- β ）発現MSCの静脈注射が固形癌を移

植したヌードマウスの生存期間を延長させるとの観察が、米国の研究者により報告されている。このため、腫瘍局所に治療遺伝子を送達するための担体としてMSCを利用した、新しい腫瘍標的化療法の開発が期待されている。

悪性リンパ腫は急性白血病と並んで代表的な造血器腫瘍であるが、近年、益々増加傾向にある。悪性リンパ腫の病型分類や病期分類が確立され、新規治療薬としてrituximab（リツキサン）に代表される抗体医薬の臨床開発も進み、治療成績も次第に向上しつつある。しかしながら、再発・難治例も依然として多く、満足できる治療法が確立されているとは言いがたい。そこで、従来の化学療法・放射線療法・抗体療法とはコンセプトの全く異なる新しい治療法の開発が期待されている。例えば、様々な抗腫瘍性サイトカインの応用が考えられるが、全身投与の場合は、治療域では副作用の出現頻度が高く、ベネフィットが上回るとは言い難い。また、血中半減期が短いために、頻回投与を必要とするという問題点もある。そこで、全身性の副作用を極力減らすために局所で抗腫瘍性サイトカインを発現させ、局所で働かせるという腫瘍ターゲティングのテクノロジーが必要となる。また、頻回投与を避けるには、遺伝子の形で投与し、体内である程度の期間、持続的に発現させることが望ましい。このような観点から、MSCの腫瘍集積性というユニークな性質を悪性リンパ腫のサイトカイン療法に応用することを着想するに至り、本研究で動物実験により検討することを計画した。

2. 研究の目的

(1) MSCの腫瘍集積性を応用した悪性リンパ腫に対する新規治療法について、動物実験によりそのフィジビリティを探る。

(2) MSCの腫瘍集積性の分子機構について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄由来MSCの培養と遺伝子導入：ヒト骨髄由来MSCの培養系を構築し、細胞表面抗原の解析ならびに分化能の確認を行った。MSCの遺伝子導入法として、ファイバー改変型アデノウイルスベクター（ポリリジンに改変）を使用し、ベクターの作製は *In vitro* ライゲーション法で行った。GFP発現アデノウイルスベクターをMSCに感染させ、遺伝子導入効率をフローサイトメーターで解析した。

(2) リンパ腫細胞株を皮下移植した担癌ヌードマウスへのMSC投与実験：リンパ腫細胞株を皮下移植した担癌ヌードマウスにGFP

発現MSCを左心室腔内に投与した。MSCの腫瘍集積を確認するために抗GFP抗体を用いて腫瘍組織の免疫染色を行った。対照としてヒト胎児肺由来線維芽細胞（WI-38）を用いた実験を同様の方法で行った。

(3) リンパ腫細胞株に対する可溶性TRAILの増殖抑制効果の確認：リンパ腫細胞（U937、Daudi、Raji、SCC-3、SLVL）の培養系に可溶性TRAILを添加して、増殖抑制効果をXTT assay法で確認した。この増殖抑制効果を増強する目的で、ヒストン脱アセチル化阻害剤（HDAC inhibitor: HDACI）共存下での増殖抑制効果も併せて確認した。さらに、HDACIによるリンパ腫細胞のTRAIL受容体（DR4、DR5、DcR1、DcR2）の発現亢進を定量的PCRで確認した。

(4) 可溶性TRAIL発現アデノウイルスベクターの作製：LPSで刺激したリンパ腫細胞U937から可溶性TRAILとして細胞外ドメイン（114-281 aa）をRT-PCRで増幅した。さらに、可溶性TRAILのN末端側にヒトフィブリリン由来分泌シグナル配列（1-27 aa）、リン認識切断配列（90-97 aa）、およびイソロイシンジッパー配列を付与した発現カセットを作製した。このカセットをベクタープラスミドに *in vitro* ライゲーション法で挿入して可溶性TRAIL発現ファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製した。

(5) MSCの腫瘍集積性の分子機構に関する検討：増殖因子やケモカインに対するMSCとWI-38の遊走能を、トランスウェルを用いて *in vitro* で比較検討した。TNF- α で刺激したMSCと線維芽細胞の血管内皮細胞への接着性を比較した。TNF- α による刺激前後での接着分子の発現をRT-PCRとフローサイトメーターで比較した。発現亢進が認められた接着分子に対する抗体を使用して、血管内皮細胞への接着性が阻害されることを確認した。天然由来の小分子化合物であるパルテノライドを投与して、腫瘍局所におけるTNF- α 産生を低下させた担癌マウスを作製した。この担癌マウスの左心室腔内にルシフェラーゼ発現MSCを投与して、MSCの腫瘍集積性を生体イメージング装置IVISで経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) MSCを用いた悪性リンパ腫に対する新規治療法の開発：ヒト骨髄由来付着細胞をMSCとして用いた。MSCへの遺伝子導入法として、ファイバー改変型を使用した。この方法で、ヒトMSCへの遺伝子導入効率はほぼ100%を達成することができた。GFP発現MSCをリンパ腫モデルマウスの血管内に投与したところ、腫瘍組織切片中にMSCの存在を認め、腫瘍への集積が確認できた。MSCの対照としてWI-38を投与したが、腫瘍集積性は認

められなかった。ヒトリンパ腫細胞に対する可溶性 TRAIL の増殖抑制効果を確認するために、リンパ腫細胞の培養系に可溶性 TRAIL を添加して、増殖抑制効果を XTT assay 法で確認した。U937、Raji および SLVL では用量依存的な増殖抑制効果を確認した。この増殖抑制効果は、HDACI の併用で増強された。また、HDACI による TRAIL 受容体の発現亢進も認められた。さらに、可溶性 TRAIL 発現 MSC を作製するために、可溶性 TRAIL 発現アデノウイルスベクターを構築した。ヒト TRAIL の細胞外ドメインの N 末端側に、ヒトフィブリリン由来分泌シグナル配列、フリリン、イソロイシンジッパー配列を付与した発現カセットを作製した。イソロイシンジッパーは生理条件下における TRAIL の三量体形成を促進されることが報告されており、予備的な検討では、イソロイシンジッパーの付与により抗腫瘍活性が増強されることを確認している。このカセットをファイバー改変型 (ポリリジンに改変) アデノウイルスベクターに *in vitro* ライゲーション法で挿入した。リンパ腫モデルマウスの血管内に可溶性 TRAIL 発現 MSC を投与する遺伝子治療実験の準備を進めた。

(2) MSC の腫瘍集積性の分子機構に関する検討：増殖因子やケモカインに対する MSC と WI-38 の遊走能を、トランスウェルを用いて *in vitro* で比較検討したが、両者の遊走性に違いは認められなかった。しかし、担癌モデルマウス (ヒト大腸癌細胞 SW480 を皮下に接種したヌードマウス) に投与した MSC は腫瘍組織に集積し、WI-38 は集積しないという結果が得られた。MSC は腫瘍組織中で特に腫瘍血管が多く存在する間質領域に集積する傾向を認めた。そこで、血管内皮細胞への

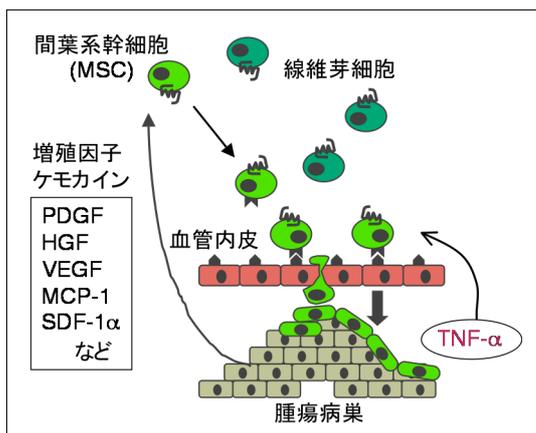


図 1. MSC の腫瘍集積性のメカニズムに関する想定モデル: MSC も線維芽細胞も種々のサイトカインにより遊走性が刺激されるが、MSC だけが血管内皮細胞に接着し、血管壁を通過して腫瘍病巣に到達する。また、腫瘍病巣近傍の細胞から産生される TNF- α が、MSC の血管内皮への接着に関与している。

接着性を検証したところ、TNF- α で刺激した

MSC では線維芽細胞と比較して内皮細胞への接着性が有意に亢進しており、この接着性は VCAM-1 や VLA-4 に対する抗体で部分的に阻害された。さらに、天然由来の小分子化合物であるパルテノライドを投与して、腫瘍局所における TNF- α 産生を低下させた担癌マウスを作製した。このマウスにルシフェラーゼ発現 MSC を左心室腔内から投与して腫瘍集積性を生体イメージング装置 IVIS で経時的に観察すると、パルテノライド投与群では、非投与群と比較して MSC の腫瘍集積性が抑制された。以上の結果から、TNF- α による接着分子の発現誘導、ならびに血管内皮細胞への接着性の亢進が MSC の腫瘍集積性に重要な役割を担っていると考えられる。

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 16 件)

1. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J. Gene Med.* 査読有 11: 373-381, 2009.
2. Hatano, K., Kikuchi, J., Takatoku, M., Shimizu, R., Wada, T., Ueda, M., Nobuyoshi, M., Oh, I., Sato, K., Suzuki, T., Ozaki, K., Mori, M., Nagai, T., Muroi, K., Kano, Y., Furukawa, Y., and Ozawa, K.: Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* 査読有 28(2): 231-242, 2009.
3. Fujiwara, S., Yamashita, Y., Nakamura, N., Choi, Y.L., Ueno, T., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Abe, M., Ozawa, K., and Mano, H.: High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays. *Leukemia* 査読有 22(10): 1891-1898, 2008.
4. Yoshida, K., Kirito, K., Yongzhen, H., Ozawa, K., Kaushansky, K., and Komatsu, N.: Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1 α levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Hematol.* 査読有 88(1): 43-51, 2008.

5. Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Furuyama, K., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J. Cell. Biochem.* 査読有 104(2): 680-691, 2008.
 6. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., and Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med.* 査読有 10(4): 368-374, 2008.
 7. Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., and Kume, A.: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* 査読無 30(3): 121-127, 2008.
 8. Okada, T. and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 査読無 13: 1887-1891, 2008.
 9. Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., and Kume, A.: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* 査読無 30(3):121-127, 2008
 10. Okada, T. and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 査読有 13: 1887-1891, 2008
 11. Ozaki, K., Sato, K., Oh, I., Meguro, A., Tatara, R., Muroi, K., and Ozawa, K.: Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int. J. Hematol.* 査読有 86: 5-7, 2007
 12. Kikuchi, S., Nagai, T., Kunitama, M., Kirito, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci.* 査読有 98:1949-1958, 2007
 13. Miyoshi, T., Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Nakamura, M., Hanafusa, T., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib. *Exp. Hematol.* 査読有 35:1358-1365, 2007
 14. Oh, I., Ozaki, K., Miyazato, A., Sato, K., Meguro, A., Muroi, K., Nagai, T., Mano, H., and Ozawa, K.: Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA microarray analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytotherapy* 査読有 9:80-90, 2007
 15. Oh, T., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tatara, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K.: Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 355:956-962, 2007
 16. Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: E2F-6 suppresses growth-associated apoptosis of human hematopoietic progenitor cells by counteracting proapoptotic activity of E2F-1. *Stem Cells* 査読有 25: 2439-2447, 2007
- [学会発表] (計 19 件)
1. Masuda, S. et al.: Co-transplantation of MSC Improves the Engraftment of HSC after Auto-iBMT in Non-Human Primates. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting, 2008.12.7, San Francisco
 2. Hatano, K. et al.: Bortezomib Overcomes Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance Via Down-regulation of VLA-4 Expression in Multiple Myeloma. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting, 2008.12.6. San Francisco
 3. Meguro, A. et al.: Blocking of IL-21 Signal Attenuates Graft-Versus-Host disease but Not Graft-Versus-Leukemia Effect in a Mouse model. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting, 2008.12.6, San Francisco
 4. 菊池 裕二、他: 間葉系幹細胞と造血幹細胞の相互作用の分子メカニズム, 第67回日本癌学会総会, 2008年10月29日, 名古屋
 5. 畑野 かおる、他: 多発性骨髄腫と

- 骨髄ストローマ細胞間相互作用が誘導する薬剤耐性における鍵分子の探索, 第67回日本癌学会総会, 2008年10月29日, 名古屋
6. 内堀 亮介、他: 間葉系幹細胞の腫瘍集積メカニズムにおける炎症性サイトカインの役割, 第67回日本癌学会総会, 2008年10月29日, 名古屋
 7. 目黒 明子、他: GVHDにおけるIL-21の役割, 第67回日本癌学会総会, 2008年10月28日, 名古屋
 8. 小原 陽子、他: AAVを利用した第19番染色体AAVS1領域特異的遺伝子組込み法: 遺伝子導入の発現期間に関する検討, 第70回日本血液学会総会, 2008年10月11日, 京都
 9. 菊池 裕二、他: 間葉系幹細胞と造血幹細胞の相互作用の分子メカニズム, 第70回日本血液学会総会, 2008年10月10日, 京都
 10. Obara, Y. et al.: Unexpected silencing of transgene integrated at AAVS1 locus using AAV machinery. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2008. 6. 13, Sapporo.
 11. 小澤 敬也: 骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療/遺伝子治療の開発, 第7回日本再生医療学会総会, 2008年3月14日, 名古屋
 12. Ozawa, K.: Molecular Mechanisms of Immunosuppressive Activity of MSCs (Mesenchymal Stem Cells), 第30回日本造血細胞移植学会総会, 2008年2月29日, 大阪
 13. Sato, K. et al.: Hyaluronidase and IFN-g from Activated T-cells are Key Mediators to Induce Immunosuppressive Activity of Mesenchymal Stem Cells. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, 2007. 12. 10, Atlanta
 14. Uchibori, R. et al.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for tumor tracking and therapeutic gene amplification in suicide cancer gene therapy. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting, 2007. 12. 9, Atlanta
 15. 佐藤 一也、他: 間葉系幹細胞におけるヒアルロン酸の役割, 日本血液学会日本臨床血液学会合同総会, 2007年10月12日, 横浜
 16. 内堀 亮介、他: ベクター産生型間葉系幹細胞の開発と自殺遺伝子療法への応用, 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3日, 横浜
 17. Uchibori, R. et al.: Tumor tracking and therapeutic gene amplification by using retroviral vector-producing Mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer gene therapy. The 13th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2007年6月30日, Nagoya
 18. Ozawa, K. et al.: MSC (mesenchymal stem cell)-based cell and gene therapy. 13th ISCT (International Society for Cellular Therapy) Annual Meeting, 2007. 6. 26, Sydney
 19. Uchibori, R. et al.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for tumor tracking and therapeutic gene amplification as systemic suicide cancer gene therapy. The 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 2007. 6月2, Seattle
- [図書] (計 1 件)
1. Urabe, M. et al.: World Scientific Publishing Co., Progress in Gene Therapy, Vol. 2, Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy. 2008, 19-46
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
小澤 敬也 (OZAWA KEIYA)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30137707
 - (2) 研究分担者
尾崎 勝俊 (OZAKI KATSUTOSHI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10286453
 - (3) 連携研究者
なし