

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590447

研究課題名（和文） 効率のよい骨髄内骨髄移植の方法の開発と悪性腫瘍の治療や再生医療への応用

研究課題名（英文） Development of efficient bone marrow transplantation and its application for treatment of malignant tumor or regeneration therapy

研究代表者

足立 靖（ADACHI YASUSHI）

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10268336

研究成果の概要（和文）：

骨髄内骨髄移植に際し、ドナー骨髄細胞をマグネット・ビーズでコートし、投与に際し、投与するレシピエントの骨周囲に強力な永久磁石をセットすることで、より多くのドナー骨髄細胞をレシピエントの骨髄内に留めることが可能であった。その結果、ドナーの造血促進が生じ、より効率よく骨髄移植を行うことが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

Intra-bone marrow-bone-marrow transplantation (IBM-BMT) is more efficient method for bone marrow transplantation than conventional intra-venous bone marrow transplantation (BMT). In this study, we used magnet-beads and a magnet for IBM-BMT. First, we coated donor bone marrow cells (BMCs) with magnet-beads. Next, we transplanted the donor BMCs into the recipient bone marrow of the tibia. A powerful magnet was circumferentially set around the bone when the donor BMCs were injected into the bone. IBM-BMT with magnet-beads and a magnet showed rapid hematopoiesis of donor BMCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1100,000	330,000	1430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2200,000	660,000	2860,000

研究分野医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：疾患モデル動物、骨髄内骨髄移植、マグネット・ビーズ、

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植は、通常、ドナー骨髄細胞をレシピエントの静脈内に投与し、それが血流に乗り、レシピエントの骨髄に達し、生着する。レシピエントの骨髄に達するまでに、肺や肝にトラップされ、骨髄に達することができないドナー骨髄細胞もあると考えられている。これに対して、関西医科大学 池原は、ドナー骨髄細胞をレシピエントの骨髄内に直接注入する、骨髄内骨髄移植法 (Intra-bone marrow-bone marrow transplantation) を開

発した。この方法では、従来の静脈内投与と比較して、ドナー骨髄細胞からの造血の促進が認められ、前処置の軽減も可能であった。ところが、骨髄には、血管が豊富であるので、投与したドナー骨髄細胞の一部は末梢血中に漏れ出ることが明らかとなった。

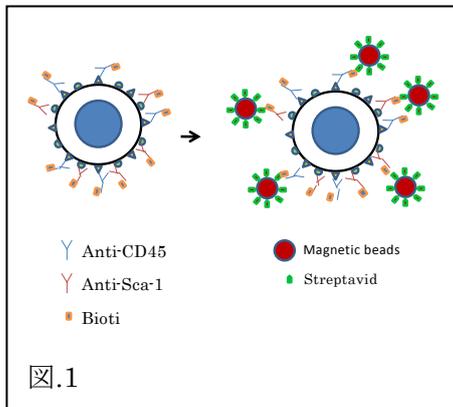
2. 研究の目的

骨髄内骨髄移植は、前述のように、従来の静脈内投与による骨髄移植と比較して効率の良い骨髄移植法であるが、ドナー骨髄細胞

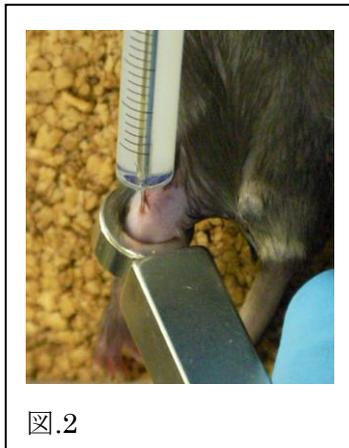
の末梢への漏出を抑制することにより、より効率良く骨髄移植を行うことが出来ると考えられる。今回の研究は、マグネット・ビーズとマグネットを用いて、より多くのドナー骨髄細胞をレシピエントの骨髄内にとどめ、末梢への漏出を抑制することにより、骨髄内骨髄移植をより効率良く行うことが目的である。

3. 研究の方法

ドナー骨髄細胞に、マグネットをコートする方法としては、まず、ビオチンラベル抗CD45抗体、ビオチンラベル抗Sca-1抗体をドナー骨髄細胞に反応させ、次いで、アビジンをコートしたマグネット・ビーズを、ビオチンラベル抗CD45抗体、ビオチンラベル抗Sca-1抗体と反応させることにより、ドナー骨髄細胞にマグネット・ビーズをコートする(図1)。



これを、前日に放射線照射を行ったレシピエントマウスの骨髄内に注入する。この時に、投与するレシピエントのマウスの骨周囲に強力な永久磁石をセットする場合としない場合で比較検討を行った。永久磁石をセットする場合には、骨髄細胞注入後も磁石は30分程度そのままに固定した(図2)。

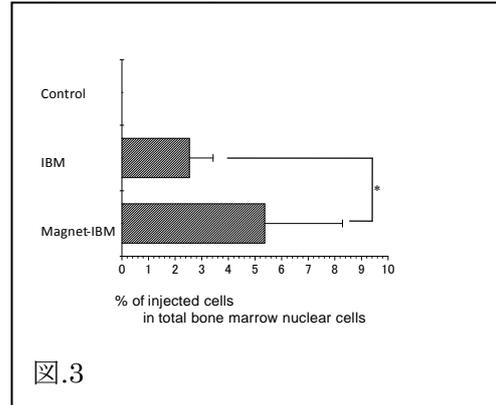


永久磁石を用いた場合と用いない場合で、Colony forming unit of spleen (CFU-S),

1ヶ月後の末梢血中でのドナー骨髄細胞の割合などで比較検討した。

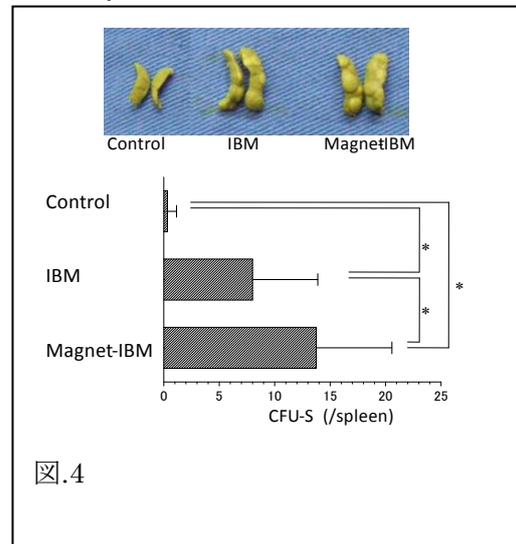
4. 研究成果

まず、マグネットとマグネット・ビーズを用いることで、実際に、ドナー骨髄細胞をより多くレシピエントの骨髄内に保持することが可能かどうかを検討した(図.3)。図3に示すように、永久磁石を用いなかった場合(IBM)と比較して、マグネット・ビーズと永久磁石を用いた場合(Magnet-IBM)には、より多くのドナー骨髄細胞がレシピエントの骨髄内に留まっていた。



次に、この効果が、実際に造血に寄与しているかどうかに関して検討を加えた。

まず、day 12 CFU-S を検討した。その結果、図4に示すように、マグネット・ビーズとマグネットを用いた群では、より造血が促進されていた。



さらに、長期における効果を検討した。すなわち、移植一ヶ月後の末梢血中におけるドナー由来白血球の割合に関して検討を加えた。図5に示すように、8Gy放射線照射の前処置では、一ヶ月後の末梢血中には、ドナー骨髄由来細胞が大部分で、IBM群とMagnet-IBM群間において差は認められな

ったが、前処置として、7Gy の放射線照射を行った場合には、有意な差を持って Magnet-IBM 群では、IBM 群よりも多くのドナー由来細胞が認められた。

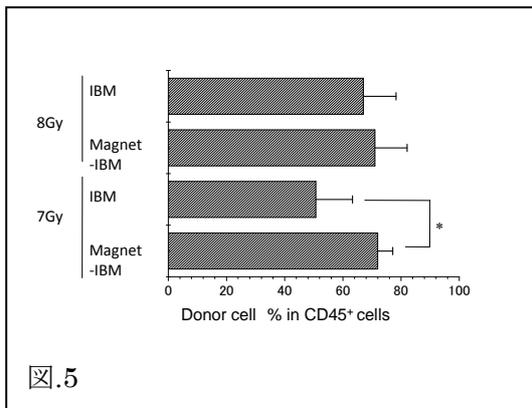


図.5

以上の結果から、マグネット・ビーズとマグネットを用いた骨髄内骨髄移植法は、通常の骨髄内骨髄移植よりも、より多くのドナー骨髄細胞をレシピエントの骨髄内に留めることが可能であり、その結果として、ドナー骨髄細胞からの造血の促進が認められると考えられた。

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 15 件)

- ① 効率の良い骨髄移植法の開発とその応用—動物モデルを用いた研究の重要性—
足立 靖、沖垣光彦、杉原 昭、越路みのり、小柳津治樹、池袋一哉、富田 実、南野桂三、鈴木康弘、張 玉明、金田浩由紀、岩崎真佳、小池保志、中野景司、向出裕美、重松明男、小池直子、石 明、矢内誠司、今井雄二郎、嶋 千絵子、下智比古、池原 進. 公立豊岡病院紀要(査読有). No. 23, 39-45, Mar. 2012.
- ② Shimo T, Adachi Y, Umezawa K, Okigaki M, Takaya J, Taniuchi S, Ikehara S, Kaneko K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) can suppress tumour necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-injected mice, resulting in rescuing mice from death

in vivo. Clin Exp Immunol. (査読有)

2011 vol.166, No. 2, 299-306, 2011.

- ③ Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Che J, Adachi Y, Kishita E, Yamaguchi S, Ikeda K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Matsubara H. Early Inflammatory Reactions in Atherosclerosis Are Induced by Tyrosine Kinase Proline-Rich Tyrosine Kinase/Reactive Oxygen Species-Mediated Release of Tumor Necrosis Factor- α and Subsequent Activation of the p21Cip1/Ets-1/p300 System. Arterioscler Thromb Vasc Biol. (査読有) vol.31, No. 5, 1084-92, 2011.
- ④ Shi M, Adachi Y, Cui Y, Li M, Lian Z, Zhang Y, Yanai S, Shima C, Imai Y, Ikehara S. Combination of intra-bone marrow-bone marrow transplantation and subcutaneous donor splenocyte injection diminishes risk of GVHD and enhances survival rate. Stem Cells Dev. (査読有) vol. 20, No. 5, 759-68, 2011.
- ⑤ Che J, Okigaki M, Takahashi T, Katsume A, Adachi Y, Yamaguchi S, Matsunaga S, Takeda M, Matsui A, Kishita E, Ikeda K, Yamada H, Matsubara H. Endothelial FGF receptor signaling accelerates atherosclerosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. (査読有) Vol. 300, No. 1, H154-61, 2011.
- ⑥ Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, Sonomura K, Adachi Y, Shibuya M, Shirayama T, Tanda S, Hatta T, Sasaki S, Mori Y, Matsubara H. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca²⁺ channel to

- maintain endothelial integrity. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) Vol.107, No. 45, 19308-13, 2011.
- ⑦ Shigematsu A, Shi M, Okigaki M, Adachi Y, Koike N, Che J, Iwasaki M, Matsubara H, Imamura M, Ikehara S. Signaling from Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Immature Hematopoietic Cells Facilitates Donor Hematopoiesis after Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation. Stem Cells Dev. (査読有) vol. 19, No. 11, 1679-86, 2010.
- ⑧ Kaplamadzhiev DB, Hisha H, Adachi Y, Ikehara S, Tonchev AB, Boneva NB, Pyko IV, Kikuchi M, Nakaya M, Wakayama T, Iseki S, Yamashima T. Bone marrow-derived stromal cells can express neuronal markers by DHA/GPR40 signaling. Biosci Trends. (査読有) vol. 4, No. 3, 119-29, 2010.
- ⑨ Shima C, Adachi Y, Shi M, Imai Y, Okigaki M, Yanai S, Takahashi K Ikehara S. Combination Method of Magnetic Beads and Magnet Helps Sustain Number of Donor Bone Marrow Cells after Intra-Bone Marrow Injection, Resulting in Rapid Hemopoietic Recovery. Bone Marrow Transplant. (査読) vol. 45, No. 6, 993-9, 2010.
- ⑩ Yanai S, Adachi Y, Shi M, Shigematsu A, Shima C, Imai Y, Kwon AH, Ikehara S. Adult bone marrow cells can differentiate into hemopoietic cells and endothelial cells but not into other lineage cells in normal growth and normal life. Int J Hematol. (査読有) vol. 91, 213-8, 2010.
- ⑪ Imai Y, Adachi Y, Shi M, Shima C, Yanai S, Okigaki M, Yamashima T, Kaneko K, Ikehara S. Caspase Inhibitor, ZVAD-fmk, Facilitates Engraftment of Donor Hematopoietic Stem Cells in Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation. Stem Cells Dev. (査読有) vol. 19, 461-8, 2010.
- ⑫ Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, Adachi Y, Wate R, Zhang J, Nakano S, Kusaka H, Ikehara S. Intra-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, a model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. (査読有) vol. 1296, 216-24, 2009.
- ⑬ Tokuyama Y, Adachi Y, Minamino K, Shintaku H, Okigaki M, Hayashi K, Kitajima A, Takaki T, Koike N, Shima C, Imai Y, Shi M, Yanai S, Ikehara S. Abnormal distribution of dendritic cells in (NZWxBXSB)F1 mice. Autoimmunity. (査読有) vol. 42, 399-405, 2009.
- ⑭ Yanai S, Adachi Y, Fujisawa JI, Jiang SW, Okigaki M, Shi M, Shima C, Imai Y, Kwon AH, Ikehara S. Anti-tumor effects of fusion Cells of type 1 dendritic cells and tumor cells (Meth A) using Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope (HVJ-E). Int J Oncol. (査読有) vol. 35, 249-255, 2009.
- ⑮ Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honsho S, Katsume A, Kishita E, Jishan C, Kurihara T, Adachi Y, Mansukhani A, Kobara M, Matoba Y, Tatsumi T, Matsubara H. Endothelium-targeted overexpression

of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* (査読有) vol. 46, No. 5, 663-73, 2009.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 足立 靖、嶋 千絵子、南野桂三、石 明、高橋寛二、池原 進. より効率的な骨髄内骨髄移植法の開発 -マグネット・ビーズを用いて-. 第 11 回 日本再生医療学会総会. 横浜(パシフィコ横浜) 2012 年 6 月 12 日-14 日
- ② 石 明、嶋 千絵子、足立 靖、南野桂三、高橋寛二、池原 進. マグネット・ビーズを用いた骨髄内骨髄移植法. 第 101 回 日本病理学会総会 東京 (京王プラザホテル) 2012 年 4 月 26 日-28 日
- ③ 足立 靖、下 智比古、梅澤一夫、金子一成、池原 進. LPS 投与マウスにおける DHMEQ(NF- κ B inhibitor)の効果. 第 101 回 日本病理学会総会 東京 (京王プラザホテル) 2012 年 4 月 26 日-28 日
- ④ Fujitaka K, Iwasaki M, Sato D, Park H, Enoki C, Koyanagi M, Minato N, Otani H, Nishikawa M, Adachi Y, Ikehara S, Zeiher AM, Dimmeler S, Iwasaka T. Heparin mobilizes multipotent human mesoangioblasts. American Heart Association (AHA) scientific sessions 2011, Orland, Florida, USA (Orange Country Convention Center) 2011 年 11 月 12-16 日
- ⑤ 下智比古、高屋淳二、谷内昇一郎、足立 靖、金子一成. エンドトキシンショックにおける NF- κ B 阻害剤の有用性: マウスを用いた検討 第 114 回 日本小児科学会総会・学術集会 東京 (グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール、グランドプリンスホテル高輪) 2011 年 8 月 12-14 日
- ⑥ Shimo T, Adachi Y, Kimata T, Umezawa K, Ikehara S, Kaneko K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel inhibitor for NF- κ B, ameliorates proteinuria in murine puromycin-aminonucleoside-induced nephrosis. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. Fukuoka, Japan (福岡国際会議場) 2011 年 6 月 2 日-4 日
- ⑦ 嶋千絵子、足立 靖、南野桂三、池原 進、高橋寛二 網膜虚血再灌流モデルに対する G-CSF の効果」 第 115 回 日本眼科学会総会 東京 東京国際フォーラム 2011 年 5 月 12-15 日
- ⑧ 足立 靖、今井雄一郎、石 明、池原 進. アポトーシス阻害薬 Z-VAD-fmk を用いた効率のよい骨髄内骨髄移植法. 第 100 回 日本病理学会学術集会. 横浜 (パシフィコ横浜) . 2011 年 4 月 28 日-30 日
- ⑨ 石 明、足立 靖、池原 進. 骨髄内骨髄移植と皮下 donor lymphocyte infusion の組み合わせ効果. 第 99 回 日本病理学会総会 東京 京王プラザ 2010 年 4 月 27 日-29 日
- ⑩ 保坂直樹、高木孝士、足立 靖、池原 進. 胸腺移植を併用した骨髄内骨髄移植の悪性腫瘍に対する効果: 胎生、新生仔、成体期の胸腺と造血幹細胞の比較. 第 99 回 日本病理学会総会 東京 京王プラザ 2010 年 4 月 27 日-29 日
- ⑪ 足立 靖、石 明、池原 進. 特別シンポジウム より効率的な骨髄内骨髄移植の検討—コラーゲン・ゲル或いはマグネット・ビーズを用いて. 第 45 回 日本移

植学会. (東京) 2009年9月16日-18日

- ⑫ 足立 靖、石 明、矢内勢司、嶋 千絵子、今井雄一郎、池原 進 Tie2 発現細胞特異的に FGF レセプター-2 を発現させたトランスジェニックマウスにおける造血系細胞の解析 第98回 日本病理学会総会 京都 (京都国際会議場) 2009年5月1日-3日
- ⑬ 嶋 千絵子、足立 靖、石 明、矢内勢司、今井雄一郎、高橋寛二、池原 進 骨髄由来樹状細胞の骨髄内投与による抗腫瘍効果の検討 第98回 日本病理学会総会 京都 (京都国際会議場) 2009年5月1日-3日
- ⑭ 矢内勢司、足立 靖、石 明、嶋 千絵子、今井雄一郎、池原 進 樹状細胞とマウス線維肉腫との融合細胞を用いた抗腫瘍効果の検討 第98回 日本病理学会総会 京都 (京都国際会議場) 2009年5月1日-3日
- ⑮ 石 明、足立 靖、矢内勢司、嶋 千絵子、今井雄一郎、池原 進 骨髄内骨髄移植法におけるコラーゲン・ゲルの有用性 第98回 日本病理学会総会 京都 (京都国際会議場) 2009年5月1日-3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 靖 (ADACHI YASUSHI)
関西医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10268336

(2) 研究分担者 該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

南野桂三 (MINAMINO KEIZO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：40509585