

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791259

研究課題名（和文）

再生不良性貧血動物に対する間葉系幹細胞移植治療モデルの確立

研究課題名（英文）

Establish of Mesenchymal stem cell transplantation therapy for aplastic anemia animal

研究代表者

鈴木 禎史 (SUZUKI SADAFUMI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70465003

研究成果の概要（和文）：

本研究では、造血支持細胞の異常で再生不良性貧血を呈する疾患マウスに正常な間葉系幹細胞を移植することで、造血微小環境（ニッチ）の再構築を起こさせる新規治療モデルの確立を行うことが目的である。まず、Sca-1 ノックアウトマウスの間葉系幹細胞の解析を行ったところ、老齢になるにつれてコロニー形成数に減少がみられた。そして、間葉系幹細胞の経静脈移植実験を行うのだが、生着率が低いという問題がある。しかし、移植前処置に放射線照射と Substance P 投与を行うと、個体差があるものの間葉系幹細胞の生着率の改善が確認された。

研究成果の概要（英文）：

In this experiment, the goal is to establish a new therapy model for aplastic anemia. Our theory is that the transplanted Mesenchymal stem cell to disease model mice can reconstitute the niche cell, which can cure aplastic anemia.

At first, I analyzed Mesenchymal stem cell of Sca-1 knock out mouse.

I observed decrease of colony number as they get older.

Next, I did an experiment on Mesenchymal stem cell transplantation, but there is a problem that engraftment ratio is very low.

However, though there are individual differences, I observed the improvement of engraftment ratio with irradiation and administering of Substance P before the transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学・幹細胞移植・間葉系幹細胞・造血幹細胞・貧血

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生不良性貧血

再生不良性貧血とは、骨髄での造血機能が低下し、血液の全ての成分が減少する特定疾患（難病）に指定されている病気である。再生不良性貧血患者に対する骨髄移植は 1972 年に最初の成功例が報告されて以来、現在では広く行われている治療法であるが、全ての症例に効果があるわけではない。骨髄移植の本質は「造血幹細胞の移植」なので、造血幹細胞の異常であれば骨髄移植で治療できるが、治療できない場合は造血幹細胞以外に原因があると考えられる。

(2) 間葉系幹細胞の造血支持能

現在までに、モデルマウスを用いた再生不良性貧血の解析が行われている。モデルマウスには遺伝的に貧血を発症するマウスとして、造血幹細胞の異常のため骨髄移植で治療できる W 系マウスと、骨髄移植を行っても症状を改善することができない SL 系マウスが存在する。骨髄移植を行っても症状が改善されない原因として、ニッチ（=造血微小環境）の造血支持細胞に異常があると示されている。ニッチとは幹細胞が多く存在し、自身の維持や自己複製を行っている場所である。ニッチには間葉系幹細胞由来の骨芽細胞からなるニッチと、間葉系幹細胞自身が構成細胞の一つとなるニッチが証明されている。また、Sca-1 ノックアウトマウスも貧血症状を起こすが、このマウスでは間葉系幹細胞の自己複製能の異常により、造血支持細胞の産生がされることによって貧血症状を呈すると報告されている。これらの知見より造血支持細胞が異常である貧血症状の場合は、造血支持細胞を構成していることが強く示唆されている間葉系幹細胞を移植す

ることでニッチが正常になり、造血幹細胞が定着できるようになって貧血症状が改善されるのではないかとということが考えられるため、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、先天的に再生不良性貧血症状を呈する疾患マウスの中でも造血幹細胞ではなく、造血支持細胞に異常のある SL/SLd マウス・Sca-1 ノックアウトマウスをレシピエントとして用い、フローサイトメーターで分離した間葉系幹細胞を用いて細胞移植を行う。それにより造血微小環境（ニッチ）の再構築を行い、造血支持能の獲得と貧血症状の改善を誘導し、再生不良性貧血の新規治療モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 貧血疾患モデルマウスの間葉系幹細胞の解析

申請者が確立した間葉系幹細胞分離系を用いて、貧血疾患モデルマウスの大腿骨から得た骨髄細胞の Sca-1 陽性、CD140a 陽性、CD45 陰性、Ter119 陰性の分画をフローサイトメトリーで分取して培養を行い、間葉系幹細胞の自己複製能や骨・軟骨・脂肪への分化能を調べた。

(2) 効率的な間葉系幹細胞の経静脈移植方法の確立

申請者が確立した方法で得られる間葉系幹細胞は従来法で得られる間葉系幹細胞とは異なり、ホーミング能力を有しているた

め経静脈移植が可能であるが、キメリズムが低いことが問題である。その理由として、間葉系幹細胞が放射線に抵抗性を持つため、移植前処置に行う放射線照射(10.5Gy)では死滅せずに生き残ってしまい、ドナー細胞が生着する場所がないことが原因と考えられる。そこで、前処置を放射線照射のみだけでなく薬剤を組み合わせることで、骨髄中の間葉系幹細胞ニッチを作り出す検討を行った。また、ドナー間葉系幹細胞は全身で緑色蛍光タンパクを発現する CAG-EGFP マウスから、ドナー造血幹細胞は移植後に血液キメリズムを計測できるように Ly5.1 マウスからフローサイトメトリーで分取し、前処置後に移植した。

放射線照射と抗ガン剤 5-FU 投与

前処置として、5-FU 投与のみ、放射線照射 1 日後 5-FU 投与、5-FU 投与 1 日後放射線照射の 3 群にそれぞれ移植実験を行い、骨髄細胞の解析を行った。

放射線照射と Substance P 投与

現在までの報告で、Substance P を投与すると CD29 陽性細胞が末梢血中に動員され、この細胞が間葉系幹細胞の表現系を示すことが証明されている。このことを利用して、レシピエントの骨髄中の間葉系幹細胞ニッチを作り出すことでドナー間葉系幹細胞の移植キメリズムを改善できると考え、まず、Substance P 投与後の血液細胞を解析して、間葉系幹細胞のマーカーを発現している細胞が存在するか確認する。確認できたマウスに放射線照射後移植を行い、骨髄細胞の解析を行った。

(3) 貧血疾患モデルマウスへの間葉系幹細胞の経静脈移植

間葉系幹細胞を移植することによって、骨髄移植だけでは治療できなかった貧血症状を改善することができるか検証するために、SL/SLd マウスや Sca-1 ノックアウトマウスに放射線照射、または Substance P 投与 1 日後放射線照射を行った後、間葉系幹細胞と造血幹細胞を静脈投与した。

4. 研究成果

(1) 貧血疾患モデルマウスの間葉系幹細胞の解析

まず、我々は造血支持細胞に異常を持つ SL/SLd マウスの間葉系幹細胞の解析を行ったところ、その自己複製能・分化能に異常がないことがわかった。造血支持細胞が造血幹細胞を維持するために必要な因子を発現することができないことが貧血症状の原因である。つぎに、Sca-1 ノックアウトマウスの解析を行った。老齢になるとコロニー形成数(CFU-F)の減少がみられた。つまり、自己複製能に異常がみられるようになったと考えられる。どちらのマウスも、正常な間葉系幹細胞を移植して生着させることができれば、貧血症状の改善や発症を防ぐことができるようになると思われる。

(2) 効率的な間葉系幹細胞の経静脈移植方法の確立

移植前処置に放射線照射のみだとドナー間葉系幹細胞の生着率が悪いので、放射線照射と 5-FU 投与の組み合わせを行い、移植実験を行ったが、生着率は放射線照射のみとほぼ変わらない 7%前後だった。次に、移植前処置に Substance P 投与を組み合わせると末梢血解析や移植実験を行った。Substance P 投与 24 時間後の末梢血をフローサイトメトリー

ーで解析すると、通常は存在しないSca-1 陽性、CD140a 陽性、CD45 陰性、Ter119 陰性の分画が約 0.8%確認することができた。48 時間後は約 0.2%まで減少した。これを参考にして、Substance P 投与後 24 時間以内に放射線照射を行い、移植実験を行い骨髄細胞の解析を行った。放射線照射のみと比べて、~20%まで生着率が改善されたマウスが存在した。個体差が大きく、Substance P を投与しても放射線照射のみの生着率より悪いマウスも存在した。

(3) 貧血疾患モデルマウスへの間葉系幹細胞の経静脈移植

SL/SLd マウスは 12 週齢、Sca-1 ノックアウトマウスは 60 週齢マウスをレシピエントとし、Substance P 投与 24 時間後放射線照射を行ったあと移植を行った。しかし、モデルマウスがほとんど生存しない結果となった。この実験では、通常 10.5Gy もの放射線を照射する。これより低い照射量だと、ドナー間葉系幹細胞がほとんど生着しないからである。ちなみに、WT マウスはこの条件でも約 80%は生存するが、疾患モデルマウスにとって照射量が高過ぎることが考えられるので、移植前処置の検討を行っていく。また、生存した WT マウスの末梢血を解析したところ血球マーカーである CD 4 5 を発現する GFP 陽性細胞を検出することができた。この細胞がどのような細胞か今後詳しく解析していく予定である。

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 2 件)

Niibe K, Kawamura Y, Araki D, Morikawa S, Miura K, Suzuki S, Shimmura S, Sunabori T, Mabuchi Y, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Purified Mesenchymal Stem Cells Are an Efficient Source for iPS Cell Induction. PLoS One. 査読有, 6(3), 2011

Lein L, Nagai Y, Mabuchi Y, Suzuki S, Morikawa S, Matsuzaki Y. Inhibition of Abcg2 transporter on primitive hematopoietic stem cells by All-trans retinoic acid increases sensitivity to anthracycline. Inflammation and Regeneration. 査読有, 32(2), 2010, 722-31

[その他]

ホームページ等

<http://www.okano-lab.com/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 禎史 (SUZUKI SADAFUMI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号 : 70465003