

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82502

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893331

研究課題名(和文) ヒト間葉系幹細胞共移植によるヒト造血幹細胞への放射線障害評価マウスモデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of the radiotoxicity evaluation mouse model for hematopoietic stem cells derived to human stem cells co-transplantation

研究代表者

滝澤 和也 (Takizawa, Kazuya)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・研究員

研究者番号：20739388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト造血幹細胞(HSC)への放射線障害をヒト間葉系幹細胞(MSC)がもたらす防護効果の視点から評価するため、新しいヒト化マウスモデルの構築を試みた。超免疫不全マウス(NOG)の骨髄内にHSCとMSCを直接共移植することにより、マウスにおけるヒトの骨髄内造血環境の再構築を行った。移植後8週目から12週目では末梢血中でのヒト造血細胞を確認することは難しかったが、全採血、及び各組織の解析結果から、既に肝臓、脾臓、骨髄などの組織において多様なヒト造血細胞、間質細胞の生着が認められた。今後、このヒト化マウスを用いることでヒトHSCに対する放射線障害をin vivoで多面的に解析できる可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a novel humanized mouse model to evaluate radiation damage in human hematopoietic stem cells (HSCs) from the viewpoint of the protection effect of a human mesenchymal stem cells (MSCs). Human HSCs and MSCs were co-transplanted directly intra-bone marrow of hyper immunodeficiency mouse (NOG) to reconstitute the human hematopoietic environment in the mouse model. Various human hematopoietic cells and stromal cells were recognized in liver, spleen, bone marrow and WBCs by flowcytometrical and immunohistochemical analyses, however human hematopoietic cells were difficult to be detected in the peripheral blood at 12th week from the 8th week after the transplantation. Here, we presented a possibility that radiation-induced damage to human HSCs can be analyzed multilaterally in vivo by using our humanized mouse model in the future.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：間葉系幹細胞 造血幹細胞 放射線障害 ヒト化マウス エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

高線量の放射線による身体への影響として、暴露された組織においてDNA 損傷に伴う細胞死(アポトーシス)により、皮膚障害や骨髄における造血障害、小腸上皮の変性などの急性障害が生じることが知られている。これら放射線が人体に及ぼす影響について、これまで多くの動物モデルを用いた解析が行われた。しかし、ヒトとヒト以外の動物種では放射線による障害性や修復能力に差があるため、動物モデルで得られた知見は必ずしもヒトに適用できないという問題があった。

近年、NOD/Scid,IL2R null(NOG: Ito M et al., Blood 100:3175-82,2002. またはNSG: Shultz et al., J Immunol 174: 6477-6489, 2005)マウス等の超免疫不全マウスの登場により、ヒト細胞の生着効率が大きく改善し、ヒト生体内における病原体の感染や疾患発症モデルとして多岐にわたる利用が可能となった。中でもNOG マウスは放射線処理による移植前処置を行わなくとも、ヒト造血幹細胞が生着することが知られており(Watanabe et al., J Virol 81: 13259-13264, 2007)、放射線障害に伴う生体反応を解析するためのモデルとして期待された。しかしヒト造血幹細胞のみを尾静脈、もしくは腹腔内から移植する系では、低線量の放射線であってもヒト造血幹細胞は著しく減少し、放射線障害から回復する過程を継続的に評価することができなかった(Wang et al., Int J Rad Biol 89: 132-137, 2013)。

本来、ヒト骨髄では間質細胞などの複数の支持細胞から構成される微小環境が形成され、造血幹細胞を様々なストレス要因から保護するとともに、造血幹細胞の幹細胞性を維持していると考えられている(Wilson et al., Nat Rev Immunol 6: 93-106, 2006)。そこで、我々はヒト造血幹細胞とヒト間葉系幹細胞をNOG マウスの骨髄内に直接共移植することでヒト骨髄微小環境をマウス内に構築し、個体レベルでヒト造血幹細胞に対する放射線の影響を解析することを考案した。

また我々の研究グループでは、間葉系幹細胞から放出される液性因子の中からエキソソームと呼ばれる小胞に着目し、これが放射線照射した培養細胞のアポトーシスを抑制することを見いだした。また、被ばくした細胞では、エキソソームの取り込みが高まることも明らかにしている(Hazawa et al., BBRC : 2014)。これらの結果からエキソソームが生体内においても放射線障害を軽減する効果を発揮する可能性は高い。しかし、このエキソソームによってもたらされる、マウス細胞とヒト細胞間での分子相互作用と、本来のヒト細胞同士の分子相互作用では、作用機序そのものが大きく異なる可能性が懸念される。その観

点からも、実際にヒト生体内で行われている反応により近く、個体レベルでの解析を行える、本研究のヒト化マウスモデルが最も適していると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、放射線による造血幹細胞への障害をMSCがもたらす防護効果の視点から評価するためのヒト化マウスモデルを構築し、その効果を細胞、組織、および個体レベルで複合的に評価することを目的とする。更に、造血幹細胞、および間葉系幹細胞の細胞間コミュニケーションに注目し、エキソソームを中心とした液性因子による放射線障害保護効果の作用機序を解析することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞、および造血幹細胞の調整

ヒト骨髄単核細胞(BM-MNCs、ロンザジャパン株式会社より購入)中に存在するCD34陽性造血幹細胞、およびCD271陽性間葉系幹細胞を表面抗体と磁気ビーズを用いて精製した。回収された細胞は表面マーカーをもとにフローサイトメーター(FCM)により純度を確認するとともに、造血幹細胞はコロニーアッセイで分化能力を評価することで品質管理を行った。また精製した間葉系幹細胞は培養プレート上に播種し、表面に接着後増殖してきたものだけを継代培養して増幅した。しかしながら骨髄単核細胞から得られる間葉系幹細胞は造血幹細胞と同様に少数でしかいないため、実験に必要な細胞数を確保するために時間を要した。そこで別途、ロンザジャパン株式会社よりシングルドナーのヒト骨髄間葉系幹細胞を購入し、同時に増幅することとした。

(2) ヒト化マウスの作製

調整したヒト骨髄由来の造血幹細胞($1 \sim 5 \times 10^4$)と間葉系幹細胞($5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$)を混合した状態で、前処置として1Gyの線を照射したNOG マウス下肢大腿骨髄内へ移植した。移植したヒト細胞の生着は約4週間毎に末梢血中のヒトCD45陽性細胞をFCMにより測定することで確認した。更に、各組織へのヒト細胞の浸潤は各ヒト抗体を用いたFCM解析と免疫組織化学により解析した。ヒト血液細胞の解析にはCD34、CD38:造血幹細胞、CD45:白血球細胞、CD3:T細胞、CD19:B細胞、CD4、CD8:免疫T細胞、CD11b:単球・マクロファージ、CD14:単球などを用い、間葉系幹細胞の解析にはCD29、CD106、CD166、CD105、CD44、CD90、CD73、CD31、Sca-1などを用いた。また、ヒト細胞の組織内局在を確認するため、抗ヒトnucleoli抗体を使用した。

移植後18週目までに末梢血リンパ球細胞の10%以上をヒトCD45陽性細胞が占めることが確認されたマウスを、ヒト造血細胞の生

着が成功したヒト化マウス (IBMI-huNOG) として選別し、放射線照射実験に用いることとした。

(3) 間葉系幹細胞由来エキソソームの濃縮と回収

あらかじめ超遠心によりエキソソームを除去した血清成分を用いて調整した増殖培地を使用して、間葉系幹細胞培養72時間目の培養上清からエキソソームを回収した。濃縮には遠心機と精製カラム (exoEasy Maxi Kit、株式会社キアゲン) を用いた。

(4) 間葉系幹細胞の機能解析

移植実験と平行して間葉系幹細胞の放射線障害に対する防護効果を *in vitro* で検討するための系を準備した。

間葉系幹細胞培養 48 時間目の培養上清を用いてヒトサイトカイン抗体アレイ (ab133998、Abcam) を行い、放射線障害防護効果の作用機序となりうる液性因子の発現を確認した。

高線量 (12Gy) の γ 線を照射したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を対象に、Transwell を用いた間葉系幹細胞との非接触型共培養を行った。培養 48 時間後にトリパンブルー染色による死細胞数と Annexin V Assay Kits (Enzo Life Sciences) を用いたアポトーシス細胞数の推移から、放射線障害により誘導される細胞死を抑制する効果を評価した。

(5) 間葉系幹細胞由来エキソソームの放射線障害保護効果の評価

in vitro において間葉系幹細胞の造血幹細胞に対する放射線障害防護効果を検討するため、CD34 陽性造血幹細胞へ 4Gy の γ 線照射を行い、間葉系幹細胞の培養上清から精製したエキソソーム 50 μ g/ml を培養液中に添加することで造血幹細胞への影響が認められるかを、コロニーアッセイ (MethoCult H4435 Enriched、株式会社ベリタス) を用いて検討した。コロニー数は培養 7 日目と 14 日目に計測した。

(6) huNOG マウスにおける放射線照射後の造血幹細胞への影響解析 (継続中)

骨髄内におけるヒト造血幹細胞への放射線の影響を評価するため、huNOG に全身照射で 0~4Gy の γ 線照射を行う。また、特定の組織障害を対照とする場合にはより高線量を局所照射により実施する。骨髄については、2 週間毎に末梢血中のヒト白血球数を測定し、15 週目までの生存率とヒト血液細胞のキメリズムを記録して造血障害からの回復程度を評価する。同時に、放射線によるヒト造血幹細胞 (CD34⁺、CD38⁻) へのダメージを解析するためソーティングにより分取し、コロニーアッセイによる分化能の評価と、発現遺伝子解析によるパスウェイ解析などを行う。骨髄、肺、胸腺、リンパ節、脾臓、皮膚、小

腸上皮などの組織を採取し、病理組織解析により放射線障害の程度を評価する。また、必要に応じて BrdU や H2AX などの細胞染色を行い、アポトーシス抑制や DNA 損傷の修復など放射線応答性の分子機序の活性を調査する。これらの解析結果を総合して放射線障害を評価する。

4. 研究成果

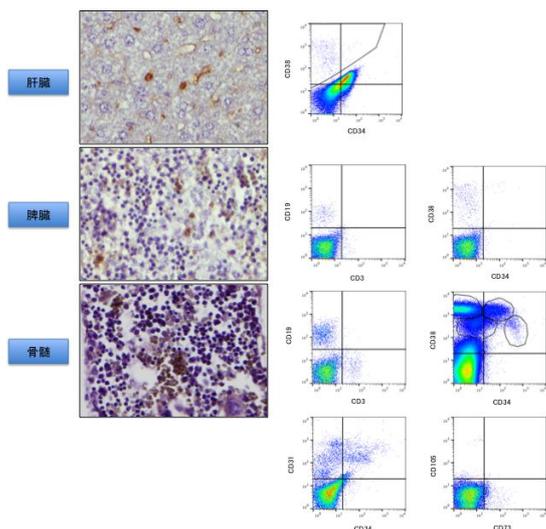
(1) IBMI-huNOG マウスの作製

ヒト骨髄単核細胞から精製した造血幹細胞と間葉系幹細胞を NOG マウスの下肢大腿骨内に移植し、末梢血中のヒト血液細胞を FCM 解析により測定することでマウス骨髄内でのヒト造血の成否を確認した。直接骨髄内へ細胞を注入することから、尾静脈からの移植に比べて早期にヒト造血が成立するものと予想していたが、期待に反して移植後 12 週目を過ぎても末梢血中のヒト血液細胞のキメリズムは上がってこなかった。そこで、何匹かのマウスをサンプリング調査したところ、末梢血中にヒト血液細胞が認められない個体であっても、全採血、および肝臓、脾臓、骨髄内には多様なヒト細胞が存在していることを発見した (図 1)。

FCM 解析の結果からは、肝臓中に僅か (0.1%以下) ではあるが CD34 陰性/CD38 陽性 (Mid~High) が存在することを確認した。そこでヒト nucleoli に対する免疫組織染色を行い局在する細胞を観察すると、明らかに肝細胞とは異なる小型の細胞が類洞に沿って散見された。細胞数が少ないことから血流に乗って流入した細胞の可能性が高いと考えられる。脾臓においては 1%前後の割合で CD19 陽性細胞を認めた。またやはり 1~2%程度の CD34 陰性/CD38 陽性 (Mid~High) 集団と 0.05%の CD34 陽性/CD38 陽性集団が存在した。免疫組織染色では脾柱や中心動脈周辺に、はっきりとした陽性細胞が多いという像が得られた。一方、骨髄中にはヒト細胞が多く存在し、11.7%の CD19 陽性細胞と 2.43%の CD3 陽性細胞が認められた。更に、CD34 と CD38 により展開すると 11.7%の CD34 陰性/CD38 陽性 (High)、1.59%の CD34 陽性 (Mid)/CD38 陽性 (High)、2.45%の CD34 陰性 (または Low) /CD38 陽性 (mid)、0.16%の CD34 陽性 (Low) /CD38 陽性 (mid) から成る 4 つの細胞集団が現れた。これらの集団は階層化された造血幹細胞を示している様に見える。FCM 解析に用いた大腿骨、脛骨、および骨盤は細胞を移植した下肢とは反対側であることから、移植した造血幹細胞が遊走し、生着したものと考えられる。実際、免疫組織染色では多くの陽性細胞が密集した塊を形成している像が観察された。更に、骨髄の内骨膜に接している細胞についても確認するため、骨を破碎し、コラゲナーゼ処理を行って、細胞を回収した。FCM による解析の結果、12%近い CD31 陽性細胞を認めた。また極めて少数であるが 0.048%の CD105 陽性集団と 0.63%の CD73 陽性細胞集

団が存在した。しかし2つの細胞集団は重複することはなく、典型的な間葉系幹細胞の表現型を持つ細胞は認められなかった。

これまでの結果から、骨髄内でのヒト造血は既に始まっており、他の組織への細胞の遊走も認められた。そこで、残りのNOGマウスを用いて研究を継続し、本研究の計画に沿って、huNOGマウスにおける放射線照射後の造血幹細胞への影響解析を行っていく予定である。



(図1) IBMI-huNOGマウスの解析

(2) 間葉系幹細胞の機能解析

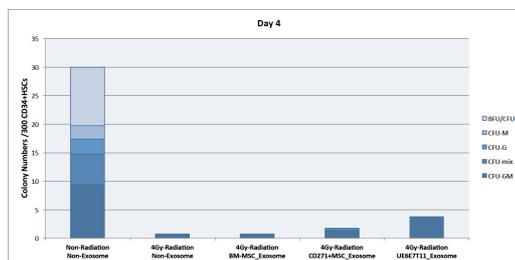
はじめにサイトカイン抗体アレイによって骨髄由来間葉系幹細胞が発現する液性因子の大まかなプロファイリングを行った。結果は過去の論文等により多くの報告がなされている通り、MCP-1, OPG, TIMP-1, TIMP-2, IL-6, IL-8, MIG, GRO, VEGF, BDNF, Angiogeninといった、骨や脂肪、軟骨の分化誘導に関わる因子や、液性免疫の制御、細胞の走化性誘導、サイトカイン産生誘導、血管新生の制御、などの多様な機能的液性因子を産生する細胞あることが確認された。

そこで次に、放射線照射したHUVECとの共培養法を用いて、間葉系幹細胞が放射線障害による細胞死を抑制する効果を持つかを検証した。その結果、骨髄由来の間葉系幹細胞では有意な効果は認められなかった。一方で、骨髄間葉系幹細胞の不死化細胞株(UE6E7T11)においては共培養および培養液添加のいずれにおいても比較的顕著な細胞死抑制効果が認められていることから、以後、この細胞株をポジティブコントロールとして置き、移植に用いる間葉系細胞の機能評価を行うこととした。

(3) 間葉系幹細胞由来エキソソームの造血幹細胞に対する放射線障害保護効果

間葉系幹細胞由来のエキソソームが造血幹細胞に対する放射線障害防護効果を持つ

かどうか、コロニーアッセイを用いて検討した。4Gyの線照射は培養液中の造血幹細胞にとって致命的な線量であるため、形成されるコロニー数が極めて少なく有意差を出ることが出来ていないが、培養7日目(図2)、および14日目にエキソソームを添加した培地で形成されるコロニー数は、エキソソームを添加しないものよりも多かった。また、14日目にはエキソソームを添加しないものでは、細胞が衰弱し、コロニーは消えてしまったが、エキソソームを添加したものではコロニーの半数は維持されていた。より適切な条件設定が必要であるが、間葉系幹細胞由来のエキソソームが造血幹細胞に対する放射線障害を軽減させている可能性を示唆するものであった。



(図2) 線照射した造血幹細胞によるコロニーアッセイ

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4件)

1. Hiyoshi M, Okuma K, Tateyama S, Takizawa K, Saito M, Kuramitsu M, Araki K, Morishita K, Okada S, Yamamoto N, Biragyn A, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Furin-dependent CCL17-fused recombinant toxin controls HTLV-1 infection by targeting and eliminating infected CCR4-expressing cells in vitro and in vivo. *Retrovirology*. 2015 Aug 20;12:73. doi:10.1186/s12977-015-0199-8. (査読あり)
2. Momose H, Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Masumi A, Araki K, Furuhashi K, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Establishment of a new quality control and vaccine safety test for influenza vaccines and adjuvants using gene expression profiling. *PLoS One*. 2015 Apr 24;10(4): e0124392. doi: 10.1371/journal.pone.0124392. eCollection 2015. (査読あり)
3. Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugam Watanabe T, Hamaguchi I. Identification of TL-Om1, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR

for human T-lymphotropic virus 1. J Clin Microbiol. 2015 Feb;53(2):587-96. doi: 10.1128/JCM. 02254-14. Epub 2014 Dec 10. (査読あり)

4. Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. PLoS One. 2014 Jul 10;9 (7): e101835. doi:10.1371/journal.pone.0101835. eCollection 2014. (査読あり)

[学会発表](計 6件)

1. 安田 武嗣、香川 亘、荻 朋男、齋藤 健吾、加藤 宝光、鈴木 健祐、堂前 直、滝澤 和也、早乙女(中邑)愛、中沢 由華、Matthew D. Genet、宇井 彩子、花岡 文雄、菅澤 薫、岡安 隆一、Penny A. Jeggo、胡桃坂 仁志、田嶋 克史、ヒト RAD52 のアセチル化を介した相同組換えにおけるアセチル化および脱アセチル化酵素の新規機能の解明、第 38 回日本分子生物学会年会、兵庫、2015 年 12 月
2. 栗林 和華子、水上 拓郎、滝澤 和也、菅田 謙治、倉光 球、野島 清子、百瀬 暖佳、浅田 善久、岩間 厚志、松岡 雅雄、浜口 功、The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL model mice. 第 77 回日本血液学会学術集会、石川、2015 年 10 月
3. 富山 健一、田嶋 克史、イスラム ラフィクル、小原 千寿香、後藤 孝也、滝澤 和也、安田 武嗣、羽澤 勝治、Cell protection signaling pathway of brain-derived neurotrophic factor against γ -irradiation induced cell death in rat intestinal epithelial cells (IEC-6), 15th International Congress of Radiation Research, 京都、2015 年 5 月
4. 栗林 和華子、水上 拓郎、滝澤 和也、倉光 球、浅田 善久、岩間 厚志、松岡 雅雄、浜口 功、ATL モデルマウスにおけるがん幹細胞の c-kit-SCF の機能解析、第 25 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2015 年 5 月
5. 小原 千寿香、富山 健一、イスラム ラフィクル、滝澤 和也、安田 武嗣、後藤 孝也、田嶋 克史、2 つの異なる培養基材で培養したマウス骨髄由来間葉系幹細胞における血管新生能に関する検討、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
6. 栗林 和華子、水上 拓郎、滝澤 和也、倉光 球、浅田 善久、岩間 厚志、松岡 雅雄、浜口 功、Identification and characterization of cancer stem cell in an HBZ

transgenic mouse model of ATL. 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪、2014 年 10 月

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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
滝澤 和也 (Takizawa, Kazuya)
国立研究開発法人 放射線医学総合研究所
緊急被ばく医療研究センター・研究員
研究者番号：20739388

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：