

## 特集【ここまで来た再生医療】

## 骨髄幹細胞を用いた細胞遺伝子治療

再生医学の臨床応用に向けて

右田 真<sup>1,2</sup> 早川 潤<sup>1,2</sup> 早川 真理<sup>1</sup>  
 深沢 隆治<sup>1</sup> 福永 慶隆<sup>1</sup> 島田 隆<sup>1,2</sup>  
 日本医科大学小児科学教室<sup>1</sup>, 生化学第2教室<sup>2</sup>

Cell-mediated Gene Therapy Using Bone Marrow  
 Derived Cells Towards Regenerative Medicine

Makoto Migita<sup>1,2</sup>, Jun Hayakawa<sup>1,2</sup>, Mari Hayashida<sup>1</sup>, Ryuji Fukazawa<sup>1</sup>,  
 Yoshitaka Fukunaga<sup>1</sup> and Takashi Shimada<sup>1,2</sup>

Departments of <sup>1</sup> Pediatrics, and <sup>2</sup> Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

## 要 旨

骨髄には多分化能と自己複製能をもつ造血幹細胞が存在し白血球, 赤血球, 血小板といった血球細胞への増殖, 分化が営まれている。また, 以前から骨髄には血液系細胞以外の細胞の存在が知られ, 骨髄間質細胞や支持細胞(ストローマ細胞)などと呼ばれてきた。骨髄間質細胞は血液系細胞の増殖分化を維持するために種々の細胞増殖因子を分泌する役割を担っていることが推測されていた。実際に培養実験によって骨髄に含まれる細胞の中に骨細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞へ分化しうる細胞が含まれることが証明された。我々もマウスの実験系において, レトロウイルスベクターを用いて Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子でマキングした骨髄細胞を脳内に直接注入したところ, 一部の細胞がグリア細胞に分化することを確認した<sup>1</sup>。これらの結果は骨髄中には造血幹細胞以外にも種々の細胞に分化する能力を有する細胞が含ることを示すものであり, これらの細胞は今日 間葉系幹細胞と呼ばれて再生医療の担い手として期待されるようになった。

そこで我々は, 骨髄幹細胞の多能性を系統的に研究するために, GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を正常マウスに移植し骨髄細胞のみ GFP 陽性のモデルマウスをまず作成し<sup>2</sup>, そして再生治療における骨髄由来細胞の役割および骨髄中の間葉系細胞をキャリアーとした遺伝子治療の可能性について検討した。

## 1. 骨髄 GFP 陽性モデルマウスの作製

骨髄細胞の多能性を検討するための実験系として,

Nakano らの実験系<sup>1</sup>をはじめとして, これまでのものは移植する前にある種のマーカーを遺伝子導入するなど人為的に操作する実験系が多かった。そこで我々は骨髄細胞の多能性を系統的に解明するため, GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を正常マウス (C 57 Black 6/Ly 5.2) に移植し, 骨髄細胞だけを GFP 陽性細胞に置き換えたモデルマウスを作成した。移植 2 日前に細胞周期にある細胞を殺すために 5 FU をドナー GFP マウスに投与し, 移植当日に GFP 陽性骨髄単核球を採取した。レシピエントには移植当日に致死量 (10 Gy) の放射線照射を施行し, GFP 陽性骨髄単核球  $4 \times 10^6$  個を経静脈的に移植した。移植 5 週後に FACS を用いて移植マウスを評価したところ, 骨髄 (図 1 A-C), 末梢血, 胸腺, 脾臓ともほぼ完全に GFP 陽性細胞により置き換わっていた。Dexter 法により樹立した間葉系細胞も GFP トランスジェニックマウスと同様に GFP 陽性であることを確認した (図 1 D)。

## 2. 種々の疾患の再生治療における骨髄由来細胞の役割

このモデルマウスに心筋虚血, 脳虚血, 小腸切除術, ハブ毒による腎炎, Streptozotocine による膵臓  $\beta$  細胞障害など, 人為的侵襲を加えて病変を作ること, 病変部への細胞浸潤と治療過程における骨髄細胞由来の GFP 陽性細胞を観察し組織再生における骨髄細胞の関与を検討した。

## (a) 心筋虚血モデル

骨髄細胞の心筋への分化転換を調べるため心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞モデルマウスは左冠動脈を結紮することで作製した。その病変部位に急性期には GFP 陽性骨髄由来細胞が浸潤するのを確認し, 1 カ月後には同部位で GFP 陽性細胞が形態学的に心筋に分化することを確認した。また, デスミン, トロポ

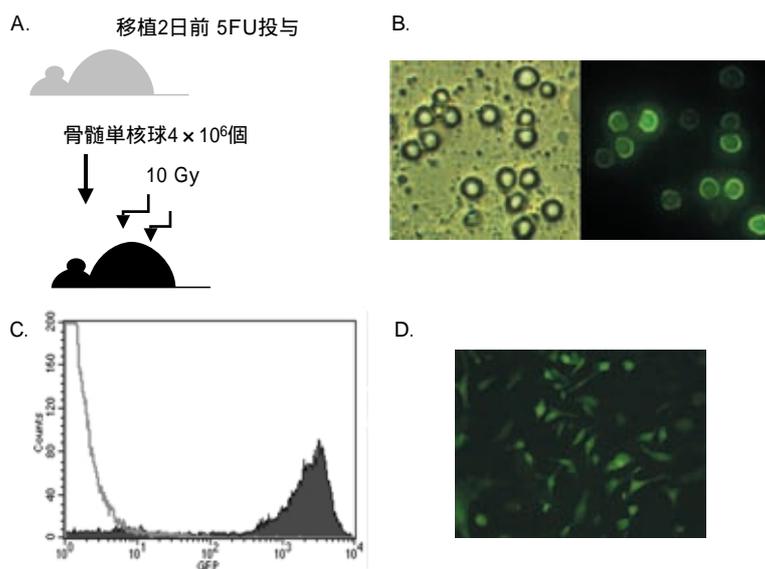


図1 GFP陽性骨髄細胞を有するモデルマウスの作成

A. 移植2日前に細胞周期にある細胞を殺すため、5FUをドナーGFPマウスに投与し、移植当日にGFP陽性骨髄単核球を採取して、レシピエントには移植当日に10Gyの放射線照射を施行し、GFP陽性骨髄単核球 $4 \times 10^6$ 個を経静脈的に移植した。B. 移植5週後の骨髄単核球の明視野と蛍光視野所見。C. 骨髄単核球のフローサイトメトリ検査。D. Dexter法により樹立した間葉系細胞。GFPトランスジェニックマウスの骨髄幹細胞が移植されたC57BL/6マウスの骨髄に生着しほとんど全ての細胞がGFP陽性を示した。間葉系細胞もGFPトランスジェニックマウスと同様にGFP陽性であった。

ニン抗体を用いて組織特異的免疫染色を行い、多重焦点顕微鏡で観察したところ、そのGFP陽性細胞の部位に一致して心筋が特異的に染色された。さらにこの分化は心筋梗塞病変周囲を中心に確認された(図2)。

#### (b) 脳梗塞モデル

脳に内在する神経細胞やグリア細胞の放射線による障害を最小限にとどめ、しかも骨髄細胞がGFP陽性細胞に置き換えたモデルマウスを作成するための至適照射量を検討した。そして体部照射を10Gyと頭部に対する照射量を5Gyに減らすことにより、脳への影響が最も少ない骨髄GFP陽性マウスを作製した<sup>4</sup>。このモデルマウスにナイロン糸を総頸動脈から内頸動脈へ挿入することにより中大脳動脈の閉塞を行った。右中大脳動脈閉塞モデルでは骨髄由来GFP細胞が脳虚血後12時間後より虚血中心部に集積し、24時間後からは周辺領域にも浸潤していた。集積したGFP陽性細胞はほとんどが、Iba1陽性のmicroglia/macrophageであり、神経細胞への分化は認められなかった。浸潤したmicroglia/macrophageは梗塞巣のみならず、移行部、周辺部にも及んでいた。さらに、細胞浸潤したこれらの細胞は浸潤部位により形態が異なり梗塞中心部では貪食細胞の形態をなしてしていた。このことは、脳における障害の再生治療に骨髄由来の細胞がmicroglia/macrophageとして機能的に関与することを直接的に示したものである(図3)。

#### (c) 小腸切除再吻合モデル

移植マウスの胃幽門部から10cmの小腸を切除して端端吻合し、術後経時的に縫合部位周辺を免疫染色し評価した。術後3,7日目では吻合部に沿ってGFP陽性細胞が血管外に浸潤し、その大部分がCD45+, F4/80+の血球系細胞であった。一方、術後30日目では粘膜層には紡錐形の細胞が認められ、免疫染色で一部のGFP陽性細胞が腸管の平滑筋に分化していた。さらに縫合部位からmRNAを採取しDNAチップを用いて、遺伝子発現を経時的に検討したところ、VEGF受容体、ACE, GM-CSF, E/K cadherinなどの組織修復に関与すると思われる遺伝子の発現の変化を認めた。以上の結果より腸管の創傷治療に骨髄由来細胞が関与し一部は腸管平滑筋に分化することを確認した<sup>2</sup>。

#### (d) ハブ毒による腎炎モデル

腎臓は肝臓などに比し再生能が乏しいと考えられてきたが、最近、実験腎炎の回復過程で骨髄由来の細胞がメサングウム細胞に分化したことが報告された。我々はモデルマウスにハブ毒を静注し腎炎を作製して糸球体の修復過程における骨髄細胞の関与を病理組織学的に検討した。骨髄由来のGFP陽性細胞は内皮細胞のマーカーであるトロンボモジュリンで二重染色されるものが少数認められ、電顕的検索でも内皮細胞に分化したものと考えられた。骨髄由来の内皮細胞が糸球体の修復に由来の内皮細胞が関与しているとしてもごくわずかであり、組織修復に関与するのは主にその

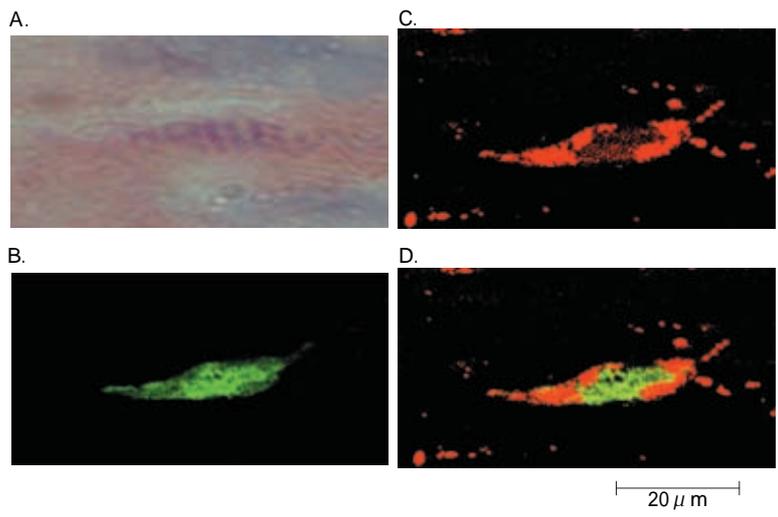


図2 心筋虚血モデル

左冠動脈を結紮した心筋梗塞モデルマウス。

A. PTH 染色 B. GFP 蛍光所見 C. 抗αトロポニン抗体による組織特異的免疫 D. 多重焦点顕微鏡による B.C. の overlay 所見

心筋虚血部位に急性期に GFP 陽性骨髄細胞が浸潤し、一カ月後には同部位が GFP 陽性細胞で形態学的に心筋に分化することを確認した。

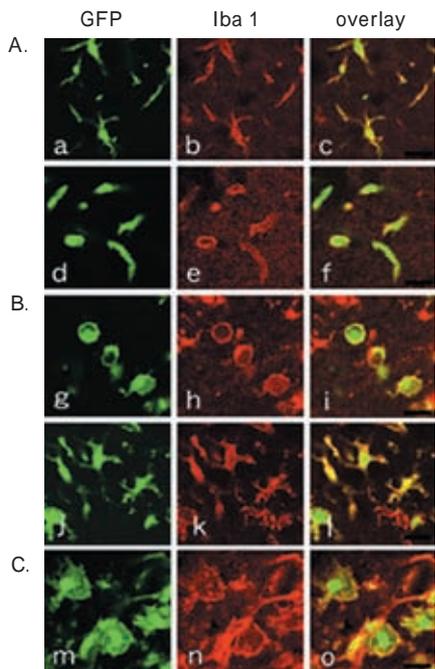
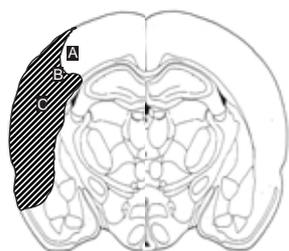


図3 脳虚血モデル

右中大脳動脈を閉塞したモデルマウス

A. 梗塞周辺部 B. 移行部 C. 梗塞中心部

GFP 陽性細胞はほとんどが、Iba 1 陽性の microglia/macrophage であった。浸潤した microglia/macrophage は梗塞巣のみならず、移行部、周辺部にも及び、細胞浸潤した GFP 陽性細胞は浸潤部位により形態が異なり梗塞中心部では貪食細胞への形態変化を認めた。

組織に局在する内皮細胞で骨髄由来細胞単独での組織修復は難しいと考えられ、過去の報告とは異なるものであった<sup>6</sup>。

#### (e) Streptozotocine による膵臓β細胞障害モデル

骨髄細胞の膵臓インスリン産生β細胞への分化転換を調べるために、骨髄GFP陽性マウスの膵臓を蛍光顕微鏡を用いて検索したところ、GFP陽性細胞は認められるものの免疫染色では、それらに細胞におけるインスリンの産生はみられなかった。さらに、膵臓障害モデルとして streptozotocine (30, 50 mg/kg, 5日連続静注) 投与を施行したが、インスリン産生能を有するGFP陽性細胞は認められなかった<sup>7</sup>。

### 3. 骨髄間葉系細胞を用いた細胞遺伝子治療

骨髄細胞の多分化能は骨髄間質細胞の中に含まれる間葉系幹細胞がその主役であると考えられ、現在までに間葉系幹細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、血管内皮細胞のみならず、中枢神経細胞、胚葉を越えて内胚葉由来の肝細胞にも分化したとの報告もある。細胞移植による治療は骨髄移植、肝臓移植が臨床応用されているが、後者は前者に比べドナーに対する負担や危険にやや問題がある。また、ES細胞(胚幹細胞)はヒトのすべての細胞になる可能性を有し注目されているが、その取り扱いには技術的にも倫理的にも解決すべき点は多い。そこで骨髄細胞に含まれる幹細胞を利用して組織再生、治療を促進する新たな方法として骨髄中の多能性幹細胞をキャリアーとした細胞遺伝子治療を検討している。Dexterの方法で培養、樹立したC57 Black 6/Ly 5.2由来の細胞にレトロウイルスベクターを用いてGFP遺伝子を導入した。FACSを用いて検討したところ80%以上の高い導入効率を示した。

このマーキングした骨髄間葉系細胞 $1 \times 10^4$ を左冠動脈結紮術後に半致死量放射線照射したマウスに移植した。移植2週後にGFP陽性細胞は梗塞心に集中し一部の細胞ではサルコメア構造、トロポニン<sup>+</sup>の発現を認めしたが、他の組織ではGFP陽性細胞は認められず、PCR法でもGFP遺伝子は検出されなかった。このマーキングした間葉系細胞は白血球系細胞同様に組織障害部位を認識し障害部位に特異的に細胞浸潤した。このことは一度 *ex vivo* で培養した間葉系細胞を用いて障害組織をターゲティングした細胞遺伝子治療の可能性を示すものであり、現在その有用性を検討している。

### 結 語

病変部への細胞浸潤と治療過程における骨髄細胞由来のGFP陽性細胞を観察し組織再生治療における骨髄細胞の関与を検討したところ、骨髄細胞の役割は(a)心筋、腸管や既に報告されているように血管系のように細胞分化により組織再生そのものに関与する場

合と(b)脳硬塞、腎炎、膵臓β細胞障害のように病変部に対して細胞浸潤することにより組織の再生治療に関与する可能性があることを明らかにした。骨髄間質細胞はなにも処理しなければ脂肪細胞および骨芽細胞、および軟骨芽細胞に分化していく。最近の研究により骨髄に含まれる幹細胞から標的とする細胞への分化を促進する蛋白やその蛋白を発現する遺伝子が解明されはじめている。ビタミンDを投与すると骨芽細胞に分化するなど、培養条件によって分化誘導が可能である。実際の臨床で再生医療に応用するためには、完全に分化形質を誘導しなければならない。もし骨髄幹細胞を特殊な培養条件や遺伝子導入することにより目的とする細胞に分化させたり、治療を促進される蛋白を発現させることが可能となればより効率的な治療再生が実現する。後半の実験系では間葉系細胞を用いた細胞遺伝子治療の可能性を検討した。まず間葉系細胞を *in vitro* で培養してレトロウイルスベクターを用いてGFP遺伝子を導入したところ高い導入効率を示した。このマーキングした間葉系細胞が白血球系細胞同様に組織障害部位を認識し障害部位に特異的に細胞浸潤すること(生体の組織ターゲティング)を確認した。これらの結果は組織の再生、治療に対する骨髄幹細胞の多能性を示すとともに骨髄中に含まれる多能性幹細胞をキャリアーとした細胞遺伝子治療の可能性を示唆するものと思われる。

### 文 献

1. Nakano K, Migita M, Mochizuki H, Shimada T: Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 2001; 71: 1735-1740.
2. Hayakawa J, Migita M, Ueda T, Shimada T, Fukunaga Y: Generation of a chimeric mouse reconstituted with green fluorescent protein-positive bone marrow cells; a useful model for studying the behavior of bone marrow cells in regeneration *in vivo*. *Int J Hematol* 2003; 77: 456-462.
3. Kuramochi Y, Fukazawa R, Migita M, Hayakawa J, Hayasida M, Uchikoba Y, Fukumi D, Shimada T, Ogawa S: Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice. *Pediatr Res* 2003; 54: 319-325.
4. Furuya T, Tanaka R, Mochizuki H, Urabe T, Hayakawa H, Yamada M, Hayakawa J, Migita M, Shimada T, Mizuno Y: Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders. *Neuroreport* 2003; 14: 629-631.
5. Tanaka R, Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T: Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 2003; 117: 531-539.
6. Hayashida M, Ishizaki M, Migita M, Hayakawa J, Murakami M, Shimada T, Fukuda Y, Fukunaga Y: Role of bone marrow cells in healing process in a mouse model with experimental nephritis. submitted
7. JB Choi, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, Migita M, Shimada T, Kawamori R, Watada H: Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta-cells. *Diabetologia*, in press