

筋ジストロフィー症のための造血細胞を用いた
筋再生療法に向けた基盤技術の開発

14370246

平成14年度～平成15年度 科学研究費補助金
(基盤研究(B)(2))



平成16年3月1日

研究代表者 平家俊男
(京都大学医学研究科発達小児科学)

科研

2003

181

筋ジストロフィー症に対する根本的治療法は存在せず、その転帰は不幸な経過をたどる。ジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子治療の試みがなされているが、全身の筋細胞に効率よく遺伝子を恒常的に発現させるには大きな困難を伴う。近年、白血病、原発性免疫不全症などの難治製疾患に対して、造血幹細胞移植が根本的治療法として確立された。移植を受けた患者を詳細に検討すると、ドナー由来の細胞が造血細胞ばかりでなく、血管内皮細胞や肝細胞として生着していることが確認された。従来より、骨髄中には造血幹細胞のみでなく、筋細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等に分化し得る間葉系幹細胞が存在することが知られている。マウスにおいては造血幹細胞移植により、筋ジストロフィー症モデルマウスにおいて筋細胞に分化するとの報告がなされている。そのため、骨髄には生体内の多くの組織を形成する基となる組織幹細胞が存在すると考えられるようになり、血液疾患ばかりでなく、筋疾患に対しても根本的治療法となるのではないかと期待が持たれている。しかし、このような多様な分化パターンに対して各々対応する幹細胞が存在するのか、あるいは造血幹細胞が転換分化するのか明らかではない。また、筋ジストロフィー症モデルマウスの移植においては、筋組織の再生のためには、放射線照射、薬物投与などによる筋障害の発症を誘導することが必要である。さらに、筋細胞分化におけるキメラ率も低い。このため、骨髄細胞を筋疾患に対する治療に応用するためには、筋細胞に特異的に分化する幹細胞の同定、全身の筋組織への特異的生着、組織障害を伴わない効率よい筋細胞への分化、の過程を明らかにする必要がある。本研究においては、マウス骨髄細胞、ヒト臍帯血を用い、様々な分画の細胞群を用いて、*in vitro*, *in vivo* の系において筋細胞へ特異的に分化する細胞の同定を試みることを目的とした。

目 次

はしがき

研究組織

交付決定額

研究成果の概要

研究発表

(1) 学会誌等

(2) 口答発表

(3) 出版物

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

研究組織

研究代表者：平家俊男（京都大学大学院医学研究科発達小児科学助教授）

研究分担者：依藤亨（京都大学大学院医学研究科発達小児科学講師）

研究分担者：足立壮一（京都大学大学院医学研究科発達小児科学助手）

交付決定額（配分金）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	6,600	0	6,600
平成15年度	6,100	0	6,100
総計	12,700	0	12,700

研究発表

(1) 学会誌等

1. Heike, T., and Nakahata, T.: Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1592:313-312, 2002.
2. Ito, M., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Hiramatsu, H., Heike, T., Nakahata, T.: NOD/SCID gnull mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*

100:3175-3182, 2002.

3. Hiramatsu, H., Nishikomori, R., Heike, T., Ito, M., Kobayashi, K., Katamura, K. and Nakahata, T. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/ γ_c^{null} mice model *Blood* 102:873-880, 2003.
4. Yoshimoto, M., Shinohara, T., Heike, T., Shiota, M., Kanatsu-Shinohara, M., Nakahata, T.: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicated the presence of a niche *Exp Hematol* 31:733-740, 2003.
5. Mitsui, T. Watanabe, s., Taniguchi Y., Hanada, S., Ebihara, Y., Sato, T., Heike, T., Mitsuyama, M., Nakahata, T, Tsuji, K. Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor-transgenic mice *Blood* 101:2990-2995, 2003
6. Kambe N, Hiramatsu H, Shimonaka M, Fujino H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Ueyama Y, Matsuyoshi N, Miyachi Y and Nakahata T: Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood* 103:860-867, 2004
7. Heike T and Nakahata T : Stem cell plasticity in hematopoietic system *Int J Hematol* 79:7-14, 2004.
8. Nishikomori,R., Akutagawa, H., Maruyama, K., Nakata-Hizume, M., Ohmori, K., Mizuno, A., Yasumi, T., Kusunoki, T., Heike, T., and Nakahata, T. : X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development/or survival *Blood in press*
9. Xu, Y., Arai, H., Sano, H., Murayama, T., Yoshimoto, M., Heike, T., Nakahata, T., Nishikawa, S., Kita, T. and Yokode, M.: Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology in press*
10. Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M., Shiota, M., Suemori, H., Luo, H.Y, Ch.ui, D.H.K., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N., and Nakahata, T.: Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro *Development in press*
11. Yasumi, T.:Differential requirement of the CD40-CD154 costimulatory pathway during T helper cell promoting by CD8alpha+ and CD8alpha- murine dendritic cell subsets *J. Immunol. in press*

(2) 口頭発表

1. H. Hiramatsu, M Ito, K Kobayashi, Y ueyama, T. Heike, T Nakahata: A novel assay system for human lympho-hematopoiesis using NOD/SCID/common gamma chain null (NOD/SCID/gC null) mouse. The 29th world congress of the Internal Society of Hematology, 2002
2. M. Yoshimoto, T. Heike, T. Nakahata: Hematopoietic stem cells can differentiate into skeletal muscle. The 44th annual meeting of the American Society of Hematology, 2002.
3. H Hiramatsu, T Heike, K Katamura, M Ito, Y Ueyama, T Nakahata: Differential and functional maturation of human lymphocytes from hematopoietic stem cells in NOD/SCID/gcnull mouse. The 44th annual meeting of the American Society of

Hematology, 2002.

4. M. Yoshimoto, T. Heike, T. Nakahata: Direct visualization of kinetics of transplanted hematopoietic stem cells in intact organs. The 44th annual meeting of the American Society of Hematology, 2002.
5. 吉本桃子、平家俊男、中畑龍俊：血液幹細胞の骨格筋における可視的・経時的変遷 平成14年 第1回日本再生医療学会総会
6. 吉本桃子、平家俊男、中畑龍俊：骨格筋における造血幹細胞の動態 平成14年9月12—15日 第64回日本血液学会
7. 平松英文、西小森隆太、平家俊男、山上義人、伊藤守、中畑龍俊：NOD.SCID/gcnuu マウスモデルにおけるヒト造血及び免疫系再構築の検討 平成14年9月12—15日 第64回日本血液学会
8. 中畑龍俊、平松英文、平家俊男、伊藤守：NOD/SCID/gcnull マウスを使ったヒト免疫系の再構築の検討 平成14年11月18日 第22回日本血液幹細胞シンポジウム
9. 吉本桃子、塩田光隆、平家俊男、中畑龍俊：骨格筋における移植造血幹細胞の動態 平成15年2月8日 第18回近畿幹細胞移植懇話会
10. 平家俊男：臨床応用に向けたヒト造血幹細胞の体外増幅 平成15年2月21日 第1回京大臨床心血管再生研究会
11. 梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、末盛博文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊：カニクイザル ES 細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導 平成15年3月11日・12日 第2回日本再生医療学会総会 神戸
12. 梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、中畑龍俊：カニクイザル ES 細胞を用いた血液細胞分化誘導の試み 平成15年4月25、26、27日 第106回日本小児科学会学術集会
13. 吉本桃子、塩田光隆、平家俊男、中畑龍俊：骨格筋における移植造血幹細胞の動態 平成15年2月8日 第18回近畿幹細胞移植懇話会
14. 梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、中畑龍俊、鳥居隆三、末盛博文、中辻憲夫：カニクイザル ES 細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導 第1回幹細胞シンポジウム 2003年5月29日
15. 西川光郎、長尾研二、萩原哲也、太田貴之、平家俊男、中畑龍俊：AGM 由来ストローマ細胞を用いた造血幹細胞の増幅と造血支持因子の分子解析 第1回幹細胞シンポジウム 2003年5月29日
16. 長尾研二、太田貴之、水谷悟、平家俊男、中畑龍俊、西川光郎：AGM 由来ストローマ細胞からの造血幹細胞支持因子の探索 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28~31日
17. 梅田雄嗣、平家俊男、末盛博文、藤野寿典、塩田光彦、吉本桃子、平松英文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊：霊長類 ES 細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28~31日
18. 鈴木秀文、伊藤仁也、田中宏和、渋谷和憲、河合弘行、菅谷信二、平家俊男、金倉讓、中畑龍俊：サイトカインを用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の体外増幅培養に関する基礎的研究 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28~31日
19. 梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、塩田光隆、藤野辞典、末盛博文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊：霊長類 ES 細胞からの血管前駆細胞の分化誘導と血管再生医療への応用 第24回日本炎症・再生医学会 平成15年11月26、2

7日 京都

20. 伊藤仁也、渋谷和憲、井出陽一、後藤真澄美、鈴木秀文、平家俊男、前川平、金倉譲、中畑龍俊：Ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験（その3）：NOD/SCID 移植モデルにおける評価 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19、20日 東京
21. 伊藤仁也、井出陽一、菊池泰子、後藤真澄美、渋谷和憲、鈴木秀文、丸山京子、平家俊男、前川平、金倉譲、中畑龍俊：Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞の非臨床試験（その1）：閉鎖系培養法を用いた Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞の製造 増幅細胞の形態学的特徴、および増幅細胞が分泌するサイトカイン類の測定 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19、20日 東京
22. 鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝、田中宏和、渋谷和憲、後藤真澄美、逢坂淳、平家俊男、前川平、金倉譲、中畑龍俊：Ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験（その1）：閉鎖系培養法を用いた Ex vivo 増幅臍帯血の製造 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19、20日 東京

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果の概要

近年、造血幹細胞移植を受けた個体において、骨格筋を含む様々な組織に、ドナー由来の細胞が分化することが示された。この現象は、骨髄組織において、1) 造血組織の枠を超えて様々な組織に分化し得る幹細胞が存在する、2) 造血幹細胞が造血組織の枠を超えて分化し得る可塑性を有する、という2つの可能性を示唆する。一方、組織の枠を超えた分化は、レシピエントの組織細胞とドナーの造血細胞との融合により生じるとの報告もある。骨格筋再生の機構において、上記の3種類の機構のうち、どの機構が主となる再生機構を担うのか明らかではない。今回我々は、GFPトランスジェニックマウスに由来する造血幹細胞分画を用いて、放射線照射マウスや、c-kit 遺伝子の変異を有し幹細胞が減少する W/W マウスに移植し、骨格筋再生過程における役割について検討した。さらに、骨髄に存在する非血球細胞より、骨格筋細胞に分化する細胞の同定を試みた。

1. 骨髄造血幹細胞から筋肉分化に関する検討

方法

【細胞】GFP トランスジェニック (Tg) マウス (C57BL/6) の骨髓細胞を脛骨、腓骨から採取。ビオチン化一次抗体 (CD3、CD45R/B220、Mac-1、Gr-1、Ter119、全て PharMingen (PM) 社) を反応させ、auto MACS (Miltenyi Biotec 社) にて lineage 陰性 (Lin-) 細胞を採取。次に Lin-細胞を Sca1-PE 抗体と c-kit-APC 抗体 (共に PM 社) に反応させ、FACS Vantage (Becton Dickinson (BD) 社) にて c-kit 陽性 Sca1 陽性 Lin 陰性 (KSL) 細胞を採取。

【移植】GFP Tg マウス由来の $1-5 \times 10^3$ KSL 細胞を WT (C57BL/6) 由来の 2×10^5 骨髓細胞と共に、9.0Gy 全身照射した WT 或いは mdx (C57BL/10) 成人マウスの尾静脈より静脈注射。日齢 0-3 の W/W^v マウス (C57BL/6) の場合は非照射で前顔面静脈より注射。

免疫染色、Single cell culture (単繊維培養)を用いて解析した。

結果

【WT】GFP Tg マウス由来 KSL 細胞 (CD45 陽性を確認) を致死量照射した WT マウスに移植し、蛍光顕微鏡及び免疫染色にて GFP 陽性細胞を観察した。移植後 3 日目には GFP 陽性筋繊維は検出されなかった。移植後 10 日目と 20 日目では肋間筋、大腿四頭筋、腹壁筋、外眼筋等の全身筋組織にて GFP 陽性筋繊維が観察された (図 1-A)。横断面では様々な大きさの筋繊維が存在し、その中心に核が局在していた。それら筋繊維はクラスターを形成する傾向にあった。筋組織内の総核数に対する GFP 陽性細胞の比率はこれまでの報告より多く、5-20%であった。移植後 30 日以降は GFP 陽性筋繊維は観察されなかったが、いくつかの GFP 陽性単核球がラミニン直下に検出された。W/W^v マウスへの移植群ではどの時期においても GFP 陽性筋繊維は全く検出されなかったが、移植後 30 日目にいくつかの GFP 陽性単核球がラミニン直下に存在していた。WT 及び W/W^v マウスとも移植後 6 ヶ月の単繊維培養では筋繊維の増殖を認め、ALP で染色される GFP 陽性筋繊維が存在した。更に nested PCR により GFP DNA を検出した。移植後 30 日以内の早期では単繊維培養からの筋繊維の増殖は認めなかった。

【mdx】GFP Tg マウス由来 KSL 細胞を致死量照射した mdx マウスに移植し蛍光顕微鏡及び免疫染色にて GFP 陽性細胞を観察した。移植後 3 ヶ月と 6 ヶ月の両方において、GFP 陽性筋繊維が全身の筋組織において観察された。これらは ALP 染色により GFP 陽性である事を確認した。ラミニン陽性の筋繊維も一部に検出された。

2. 骨髓間質細胞からの筋肉分化に関する検討

方法

4週齢の C3H/He 雌マウスの骨髓細胞から lineage (CD4、CD8a、Mac1、B220、Gr-1、Ter119、全て PM 社) 陰性細胞を採取し、20%FCS/IMDM (Sigma 社) にて培養し、sub-confluent になった時点で継代。これを繰り返してある程度均一な細胞が得られた時点で直接分化群と浮遊培養群に分けた。直接分化群は confluent になった時点で 5-azacytidine (5-aza、Sigma 社) 5 μ M/2%FCS/IMDM に変更。24 時間後に 2%FCS/IMDM に変更し 2 週間培養した。浮遊細胞群は低接着性条件にて浮遊培養させ sphere を形成 (図 2-B) した後再び平面培養に戻し、confluent になった時点で 5-aza で同様に筋肉分化を誘導した。その後ミオシン (zymed 社)、デスミン (sigma 社)、ミオジェニン (DAKO 社) を一次抗体とし免疫染色 (Cy3、JIR 社) を行った。又、sphere 形成後の細胞の表面抗原を FACS Caliber (BD 社) で解析した。

結果

直接分化群では一度も筋管細胞を得る事はなかった。浮遊細胞群では筋管細胞様に変化する細胞を得た。これらはミオシン、デスミン、ミオジェニンが陽性であった。sphere を形成した細胞は CD45、CD34 陰性で、Sca1、CD105、 β 1 インテグリン、CD44、VE カドヘリン (全て PM 社) が陽性であった。

骨髓組織は、造血細胞の基となる造血幹細胞と、造血幹細胞の生存、増幅、分化を支持する微少環境を形成するストローマ細胞から成る。さらに、ストローマ細胞には、脂肪細胞、軟骨細胞、筋肉細胞などの分化し得る間葉系幹細胞が含まれることが近年の研究で明らかとなった。この分類に従うと、骨格筋は間葉系幹細胞より増殖分化する。しかし、間葉系幹細胞よりの骨格筋への分化効率は低く、造血細胞移植による骨格筋再生への寄与度については検討の余地を残している。今回我々は、まず従来造血幹細胞と分類されている lin-細胞分画を移植することにより、筋肉再生機構について解析した。レシピエントマウスとして放射線照射を行った正常マウス、c-kit 遺伝子に変異を有し造血幹細胞の数的減少をきたす W/W マウスを用いて検討したところ、移植後早期において、GFP 陽性の骨格筋が多数観察され、移植造血幹細胞の骨格筋への分化が示唆された。GFP 陽性筋肉は長期の観察では認められなくなるが、single fiber culture において GFP 陽性の筋芽細胞が同定され、骨格筋幹細胞に分化し得ることも観察された。この結果は、従来造血幹細胞として捉えられていた lin-細胞分画には、造血幹細胞活性とともに、骨格筋へと分化し得る細胞分画を含むことを意味する。今後、この分画が、造血細胞、骨格筋細胞に分化し得るより未熟な

幹細胞に相当するのか、造血幹細胞としての可塑性あるいは transdifferentiation として捕らえるのか、さらなる検討が必要である。さらに、mdx マウスにおいて同様の移植を行ったところ、移植後早期、後期にわたって GFP 陽性骨格筋が多数観察された。生体において組織への幹細胞生着には、標的とする組織の障害の存在が必要とされている。Mdx マウスにおいて観察された現象は、障害、再生を繰り返している mdx マウスの骨格筋においては、移植造血幹細胞の生着、骨格筋への分化を促進する分子学的機構が存在することが考えられ、この観点よりの検索も必要と考えられる。一方、近年、骨髄より血球系マーカーを有しない多分化幹細胞 (MAPC) の同定が報告された。我々も同様の多能を有する細胞の同定を試み、様々な体性幹細胞の作成に用いられている sphere 法を応用することにより、骨格筋への分化能を有する細胞の同定を行った。現在、この細胞の生体内における幹細胞活性を検討中である。我々の結果は、造血組織の中のどの細胞群が主として骨格筋再生に主として寄与するかという問題に、結論をもたらしていない。今後、mdx マウス等を用いて、筋ジストロフィー症の治療には有効な細胞群の同定、および生着部位である障害骨格筋の分子学的機構について、検討を進めていく必要がある。