

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための  
増殖分化制御システムの開発と応用

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成13（2001）年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための増殖分化制御システムの開発と応用 -----	1
小澤 敬也	

## II. 分担研究報告書

1. 造血幹細胞の採取・純化に関する研究 -----	8
峯石 真	
2. 造血障害の病態解析 -----	9
山下 孝之	
3. カニクイザルを用いた前臨床研究 -----	10
寺尾 恵治	
4. 細胞増殖分化制御遺伝子の開発 -----	18
長谷川 護	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27
-----------------------	----

総括 研究 報告 書

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための増殖分化制御システムの開発と応用

主任 研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部教授

研究要旨 造血幹細胞移植をベースとした細胞治療法の可能性を拡げるため、造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。まず、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、増殖制御遺伝子（選択的増幅遺伝子）を利用し、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅を誘導する方法を検討した。これは、造血因子受容体の増殖シグナルを利用するもので、その活性をコントロールする分子スイッチとしてエストロゲン受容体やタモキシフェン受容体を用いる。平成12年度は、マウスや霊長類のサルを用いて、このストラテジーが実際に機能するかどうか個体レベルで検討した。また一方、造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）に関しては、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させるテクノロジーの開発が鍵になると考えられる。そのための新しいタイプの細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発を推進した。プロトタイプ分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 $\alpha$ 遺伝子を用いた。この場合、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化制御遺伝子を取り外す必要があり、Cre/loxPシステムを応用した細胞制御遺伝子着脱システム（ゲノムへの組込みと取り外し）の新規開発を行った。この技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。本研究は、機能不全に陥った造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。

分担研究者

峯石 真  
国立がんセンター 中央病院  
医 長  
山下 孝之  
東京大学医科学研究所  
助教授  
寺尾 恵治  
国立感染症研究所筑波霊長類センター  
室 長  
長谷川 護  
ディナベック研究所所長  
所 長

A. 研究目的

細胞治療は今後大きな発展が期待される重要な医療技術の一つとして位置付けられる。その中で、造血幹細胞移植は最も先行している細胞治療であるが、そこにさらに細胞制御技術を絡ませることにより、臨床応用の可能性を一段と拡げることが可能となる。例えば、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、増殖制御遺伝子を利用することにより、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果のより一層の増強を図るこ

とができる。この場合、体内での増幅効率を制御するための信頼性の高い分子スイッチ機構を付けておく必要がある。また一方、重要課題として従来より活発な研究が行われてきている造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）に関しては、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させるテクノロジーの開発が鍵になると考えられる。そのための新しいタイプの細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発を推進した。この場合、体外増幅培養の期間中に限定してこの制御遺伝子を働かせる工夫が必要であり、理想的には、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化制御遺伝子を取り外すことができるようにするのが望ましい。そこで、細胞制御遺伝子着脱システム（ゲノムへの組み込みと取り外し）の新規開発を行った。このような先端技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。将来的には、量的制限のある臍帯血幹細胞移植の成人患者への適応拡大、さらには自己造血幹細胞の保存（バンキング）システムへの応用に繋がっていく魅力的な技術である。

また、臨床展開への準備として、造血幹細胞を臨床レベルで大量に採取・純化する方法の開発を進めた。造血障害をきたす疾患としては、Fanconi貧血（FA）の病態を分子レベルで明らかにし、新しい知見に基づいた分子診断法の開発と、個々の患者の病態の解明を行った。

以上、造血幹細胞移植の周辺技術として種々のタイプの増殖分化制御遺伝子の開拓を推進し、数年以内にその臨床応用を図るのが本研究の目的であり、造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。

## B. 研究方法

### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発：

#### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内

増幅法の開発：

従来開発を進めてきている選択的増幅遺伝子（G-CSF受容体のリガンド結合領域を除いた部分とエストロゲン受容体あるいはタモキシフェン受容体のホルモン結合領域の融合蛋白質をコードする遺伝子）を組み込んだ造血幹細胞の移植実験を実施し、個体レベルでの検討を行った。マウスの系では、選択的増幅遺伝子とマーカー遺伝子（GFP遺伝子）をレトロウイルスベクターで導入した骨髓細胞を致死量放射線照射後に移植することにより造血系を再構築し、その後、タモキシフェン投与により末梢血中のマーカー遺伝子導入細胞の比率をフローサイトメトリー法により検討した。さらに、カニクイザルの造血幹細胞自家移植の系でも、選択的増幅遺伝子の有用性を同様に調べた。移植法は、カニクイザルから骨髓血を採取し、CD34陽性細胞を単離し、全身放射線照射を行ったサルに自家移植した。尚、CD34陽性細胞には、レトロウイルスベクターを用いて予めGFP遺伝子と選択的増幅遺伝子を導入した。この際、新しいベクター（テナガザル白血病ウイルスのエンベロープで置換したレトロウイルスベクター）の導入、遺伝子導入条件の工夫（Flt-3リガンドやレトロネクチンの使用）などを試みた。移植後は、末梢血白血球のフローサイトメトリー法とPCR法による解析だけでなく、コロニーPCR法により、造血前駆細胞レベルでのマーカー遺伝子陽性率の検討を行った。

#### 2) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 $\alpha$ 遺伝子（RARE）を用いた。この分化制御遺伝子のゲノムからの取り外しにはCre/loxPシステムを応用した。即ち、体外培養で造血幹細胞を増やす間は分化抑制遺伝子を働かせ、その後でCreリコンビナー

ゼを発現させて分化抑制遺伝子を取り外すというストラテジーである。まず、loxPに挟まれたRARE遺伝子が発現するレトロウイルスベクターを構築した。次に、G-CSF依存性分化能を示す32D細胞に導入し、細胞分化が抑制されるかどうか検討した。さらに、この細胞にCreリコンビナーゼ遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、RARE遺伝子が32D細胞のゲノムから除去されるかどうか、PCR法で検討した。

## 2. 臨床応用に向けた準備：

ヒト造血幹細胞の採取法に関して、大量末梢血幹細胞採取及びそこからCD34陽性細胞純化技術の検討を行った。移植片のCD34陽性細胞数、CD3陽性細胞数、CD34細胞の純度などの指標と臨床経過の相関を検討した。

当面の臨床研究の対象となる疾患（FAなど）に関する研究では、これまで発見されている6つのFA遺伝子について、蛋白質解析や遺伝子導入後の表現型補正による異常検出法の開発を行った。また、患者検体でFANCA遺伝子の解析を行った。

### （倫理面への配慮）

マウスを用いた実験では、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。筑波霊長類センターでのサルの実験は、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、臨床研究における末梢血幹細胞採取およびCD34陽性細胞純化は、当該施設の倫理委員会またはそれに準ずる組織によって認可されたプロトコールに拠った。

## C. 研究結果

### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発：

#### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内

#### 増幅法の開発：

GFP遺伝子を選択的増幅遺伝子と共に導入した骨髓細胞で造血系を再構築したマウスでは、タモキシフェン投与により末梢血中のGFP陽性細胞の比率が有意に増加した。但し、増幅効果は長期間は持続しなかった。

次に、カニクイザルの造血幹細胞自家移植の系で、選択的増幅遺伝子の有用性を同様に検討した。最初のサルでは、移植後、内因性エストロゲンに反応して40%前後の造血前駆細胞（CFU-C）にマーカー遺伝子が検出された。移植半年後、そのようなCFU-Cは5%まで低下したためエストロゲンの投与を開始した。その結果、マーカー遺伝子陽性CFU-Cが再び増加し、約30%になった。その後の実験では、骨髓CD34陽性細胞を二分し、一方は選択的増幅遺伝子が発現するレトロウイルスベクターで遺伝子導入を行い、もう一方は非発現ベクターで遺伝子導入を行い、両者を同時に自家移植した。移植3-6ヶ月後、エストロゲンまたはタモキシフェンを投与したところ、末梢血中の選択的増幅遺伝子導入細胞が10倍前後に増加した（<0.1%から1%）。一方、非発現ベクターで遺伝子導入した細胞には変化がみられなかった。尚、カニクイザルの系でも選択的増幅遺伝子による増幅効果は一時的であった。

#### 2) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

loxP配列に挟まれたRARE遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した32D細胞について解析したところ、そのような細胞では親株と異なり、G-CSF存在下でも分化せずに増幅するようになった。次に、この細胞にCreリコンビナーゼ遺伝子を導入したところ、G-CSFによる分化能を回復した。その際、RARE遺伝子が32D細胞のゲノムから除去されたことはPCR法で確認できた。

## 2. 臨床応用に向けた準備：

動員と採取を繰り返すことにより幹細胞の体内増幅ともいふべき大量幹細胞採取と、磁気ビーズ法を用いた臨床グレードの純化技術を安定して行うことができた。純化後のCD34細胞の純度は94パーセント以上、CD34細胞の回収率は70%以上であった。純化操作によって幹細胞の生着力は損なわれなかった。

FA患者の末梢血T細胞を用いた細胞周期の解析では、G2期の延長がFAの細胞表現型として特徴的であり、診断に有用と考えられた。26例のFA患者でFANCA遺伝子の塩基配列を決定し、10例で病的変異を見出した。この中で2546delC (888X)や1303C>T (Arg435Cys)が日本人に特徴的な変異として見出された。さらに、正常FANCA遺伝子をレトロウイルスベクターで患者細胞に導入し、細胞周期の異常の補正によりA群であることを診断した。最近、他のほぼ全てのFA蛋白質の複合体に依存して、FANCD2がユビキチン化を受けることがFA分子経路の作用に必須であることが示された。患者細胞を用いたFANCD2のユビキチン化の測定が新しい診断法となりうることが判明した。

## D. 考察

### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発：

#### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発：

本研究において、選択的増幅遺伝子を利用することにより、機能修復した造血系細胞を体内で選択的に増幅させることが可能であることを、マウス及びカニクイザルの系で示した。但し、現在のシステムではまだ不完全であり、造血前駆細胞レベルでの増幅は可能であるものの、造血幹細胞レベルでの増幅効果についてはまだ確認できていない。さらに長期的観察を行うと共に、エストロゲンないしタモキシフェンによる

繰り返し刺激が必要かもしれない。今後の検討課題としては、オンコウイルス由来のレトロウイルスベクターの代わりにレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞レベルでの遺伝子導入効率の改善を図ること、造血幹細胞レベルでより発現効率の高いプロモーターを用いることなどが挙げられる。但し、増幅効果が一時的であっても、慢性肉芽腫症などを対象とする場合は、感染症などの必要時にのみ顆粒球を増幅させるだけでも臨床的には充分価値があると考えられる。

#### 2) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

今回は細胞株 (32D) を用いた検討であるが、狙い通りの効果が得られ、コンセプト自体は有効であることが確認できた。今後の課題としては、Creリコンビナーゼ遺伝子を一過性に働かせる方法をさらに工夫する必要があり、種々の方法を検討している。また、新鮮骨髄細胞やヒト臍帯血幹細胞を用いた系でもこのストラテジーが働くかどうか調べるのが、次のステップとして重要である。ヒト造血幹細胞の体外増幅培養の期間だけ分化抑制遺伝子を働かせ、移植時にはその遺伝子を取り外す方法が確立できれば、その意義は大きい。また、このシステムは造血幹細胞以外の細胞を増幅させる場合にも応用が可能であり、再生医療のための基本テクノロジーに発展していく可能性を秘めている。今後さらにシステムの改良を進めていく計画である。

## 2. 臨床応用に向けた準備：

抗CD34抗体-免疫磁気ビーズ法によって、従来よりも優れた純度、回収率でCD34陽性細胞を安定して純化することができた。採取を繰り返すことにより採取総細胞数を増やすことは比較的容易に可能であった。

FAに関する病態解析や診断法の開発は、こ

の疾患に対する新しい治療法を開発していく上で極めて重要であり、貴重な手がかりが得られるものと考えている。

#### E. 結論

造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。前者では、増殖制御遺伝子（選択的増幅遺伝子）を利用し、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅が可能かどうかマウスや霊長類のサル系の系を用いて検討し、少なくとも前駆細胞レベルでの増幅を確認した。一方、造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）の場合は、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させる必要があり、そのための細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発を推進した。プロトタイプの分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 $\alpha$ 遺伝子を用いた。さらに、不要となった分化制御遺伝子を取り外すために、Cre/loxPシステムを応用した細胞制御遺伝子着脱システム（ゲノムへの組み込みと取り外し）の新規開発を行った。

その他、臨床的に有用なスケールでの造血幹細胞の大量採取・純化法を確立した。FAの遺伝子診断では、単一の方法では困難であり、いくつかの方法を組み合わせる必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hanazono, Y., Terao, K., and Ozawa, K.: Gene transfer into non-human primate hematopoietic stem cells: implications for gene

therapy. *Stem Cells* (in press)

2) Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes and regulates cell cycling as a downstream molecule of TPO signaling. *J. Biol. Chem.* (in press)

3) Uchida, M., Kirito, K., Shimizu, R., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of mitogen-activated protein kinases, Erk1 and Erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: A possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int. J. Hematol.* 73: 78-83, 2001.

4) Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K., and Inaba, T.: Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 21: 854-864, 2001.

5) Tarumoto, T., Imagawa, S., Ohmine, K., Nagai, T., Higuchi, M., Imai, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., and Ozawa, K.: N(G)-monomethyl-L-arginine inhibits erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2. *Blood* 96: 1716-1722, 2000.

6) Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., Momoi, M., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A member of Forkhead family transcription factor, FKHRL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction.

Blood 96: 941-949, 2000.

7) Muroi, K., Tarumoto, T., Akioka, T., Kirito, K., Nagai, T., Izumi, T., Nakamura, M., Hatake, K., Hakomori, S., Miura, Y., and Ozawa, K.: Sialyl-Tn- and neuron-specific enolase-positive minimally differentiated erythroleukemia. *Intern. Med.* 39: 843-846, 2000.

8) Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. *J. Biol. Chem.* 275: 24945-24952, 2000.

9) Kume, A., Xu, R., Ueda, Y., Urabe, M., and Ozawa, K.: Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther.* 7: 1193-1199, 2000.

10) Hanazono, Y., Dunbar, C.E., Donahue, R.E., Kato, I., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., and Ozawa, K.: Basic studies toward hematopoietic stem cell gene therapy. In *Cell Therapy* (ed. by Ikeda, Y., Hata, J., Koyasu, S., Kawakami, Y., Hattori, Y.), Springer-Verlag, Tokyo, p.159-169, 2000.

11) Muroi, K., Suzuki, T., Amemiya, Y., Yoshida, M., Kawano, C., Kuribara, R., Otsuki, T., Izumi, T., Tomizuka, H., Komatsu, N., Imagawa, S., Hatake, K., Miura, Y., and Ozawa, K.: Autologous peripheral blood stem cell transplantation for adults with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a pilot study. *Leukemia Lymphoma* 38: 103-111, 2000.

12) Ozawa, K., Xu, R., Matsuda, K.M., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Hanazono, Y., and Kume, A.: Development of selective amplifier genes for hematopoietic stem

cell gene therapy. *Proceeding of the International Workshop "Stem Cell Biology and Cellular and Molecular Treatment"*, pp. 135-140, 2000.

13) Suenaga, K., Kanda, Y., Niiya, H., Nakai, K., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Takeuchi, T., Tanosaki, R., Makimoto, A., Miyawaki, S., Ohnishi, T., Kanai, S., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* (in press)

14) Matsubara, H., Makimoto, A., Takayama, J., Higa, T., Saito, T., Tanosaki, R., Mineishi, S., Ohira, M., and Takaue, Y.: Suggested clinical benefits of the use of peripheral blood stem cells over bone marrow in allogeneic transplantation settings for the treatment of childhood leukemia *Jpn. J. Clin. Oncol.* (in press)

15) Mineishi, S., Saito, T., Kanda, Y., Tanosaki, R., Tobinai, K., Takaue, Y.: Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. *Jpn J Clin Oncol.* 31: 43-45, 2001.

16) Watanabe, T., Mineishi, S., Kawano, Y., Takaue, Y.: Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells. *Leuk. Lymphoma* 37: 487-496, 2000.

17) Yamashita, T. and Nakahata, T.: Current Knowledge on the Pathophysiology of Fanconi Anemia: From Genes to Phenotypes. *Int J Hematol* (in press)

18) Futaki, M., Yamashita, T., Yagasaki, H., Toda, T., Yabe, M., Kato, S., Asano, S., and Nakahata, T.: The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients.



Blood. 95: 1493-1498, 2000.

19) Murayama, Y. Terao, K., and Inoue-Murayama, M.: Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. Hum. Immunol. 61: 474-485, 2000.

20) Nakajima, T., Nakamaru, K., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M.: Development of novel nonpathogenic simian immunodeficiency virus vector carrying dual gene expression system. Hum. Gene Ther. 11: 1863-1874, 2000.

榑原 裕幸、中丸 健治、飯田 章博、  
小林 雅典、上田 泰次、  
未公開

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 出願日 1996.03.05

特許の名称「選択的増殖性を付与する遺伝子」  
特定の細胞を外部刺激により選択的に増殖させる技術を提供する。

出願番号 特願平9-531668

公開番号 WO97/32971

発明者 小澤 敬也 坂田 恒昭 伊藤 克久  
上田 泰次 長島 建之 長谷川 護

審査請求中

##### 2. 出願日 1999.6.22

特許の名称「2遺伝子を発現するベクター（SIV）」

出願番号 特願平11-175646

特願平11-175646

公開番号WO00/78987

発明者 中島 俊洋、中丸 健治、長谷川 護、  
速水 正憲、井戸 栄治

審査請求中

##### 3. 出願日 2000.6.1

特許の名称「ヘマグルチニン活性を有する  
シュードタイプレトロウィルスベクター」

出願番号 特願2000-169090

出願済み

発明者 長谷川 護、米満 吉和、中島 俊洋、

厚生科学研究費補助金厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

造血幹細胞の採取・純化に関する研究

分担研究者 峯石 真

国立がんセンター中央病院特殊病棟部 造血幹細胞移植病棟医長

研究要旨 安全に大量の末梢血幹細胞を採取し CD34 陽性細胞純化を行なう方法を検討し、臨床レベルにおいて有用な方法を開発した。

**A. 研究目的** 造血幹細胞への遺伝子導入のためそのターゲットとなる造血幹細胞を臨床レベルで大量に採取・純化する方法を開発する。

**B. 研究方法** ドナーより G-CSF 投与によって、あるいは血液腫瘍の患者において化学療法後の回復期に G-CSF を用いて大量末梢血幹細胞を採取し臨床的規模の CD34 陽性細胞の純化を行った。移植片の CD34 陽性細胞数、CD3 陽性細胞数、CD34 細胞の純度などの指標と臨床経過の相関を検討した。

(倫理面への配慮) 末梢血幹細胞採取および CD34 陽性細胞純化は施設の倫理委員会またはそれに準ずる組織によって認可されたプロトコールに拠った。

**C. 研究結果** 大量採取・純化(純化後で  $6 \times 10^6$  CD34 cells/kg 以上)を安定して行なうことができた。純化後の CD34 陽性細胞の純度は 94 パーセント以上、回収率は 70% 以上であった。純化操作によっても幹細胞の生着力は損なわれなかった。

**D. 考察** 抗 CD34 抗体-免疫磁気ピーズ法によって、これまでに用いられた他の方法よりも優れた純度、回収率で CD34

陽性細胞を安定して純化することができた。採取を繰り返すことにより採取総細胞数を増やすことは比較的容易に可能であった。

**E. 結論** 臨床的に有用なスケールでの造血幹細胞の大量採取・純化法を確立した。

**F. 健康危険情報** この方法により特に通常の造血幹細胞の採取に伴うより以上の有害事象や不都合は観察されていない。

**G. 研究論文**

1. Watanabe T, Mineishi S, Kawano Y, Takaue Y. Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells. *Leukemia and Lymphoma* 2000, 37:487-496.
2. Mineishi S, Saito T, Kanda Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y: Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. *Jpn J Clin Oncol.* 2001;31:43-45.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
特になし

## 造血障害の病態解析

分担研究者 山下孝之 東京大学医科学研究所（ゲノム情報応用診断）助教授

**研究要旨** Fanconi 貧血(FA)は、骨髄機能不全に続発する骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病と細胞の染色体不安定性を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。遺伝的に異なる 8 群(A-G 群)に分類され、このうち 6 遺伝子(*FANCA* など)が同定された。これらの分子は相互作用しつつ、特に造血幹細胞のゲノム安定性に必要な分子経路を形成する。私達は、このような最新の FA の分子病態に関する知見に基づいて、日本人患者における病態を明らかにすることを目的としている。本年度は特に、蛋白解析や遺伝子導入後の表現型補正による遺伝子異常検出法を進展させた。また、日本人患者検体で *FANCA* 遺伝子の特徴的な変異を見出した。さらに、*FANCD2* のユビキチン化の解析が新しい診断法になりうる可能性を示した。

### A. 研究目的

FA の病態を分子レベルで明らかにし、これら新しい知見に基づいた分子診断法を開発し、個々の患者の病態を明らかにする。

### B. 研究方法

- (1)FA 蛋白が形成する分子経路の機構を解析する。
- (2)患者細胞における表現型、蛋白、遺伝子の解析により個々の患者の病態を明らかにする。

### C. 研究結果と考察

(1)FA 患者の末梢血 T 細胞を用いた細胞周期の解析により G2 期の延長が FA の細胞表現型として特徴的であり、診断に有用と考えられる。(2)FA 患者細胞の蛋白の解析では *FANCA* と *FANCG* が共に減少するケースが多く、いずれに異常があるのか判断が困難である。(3)26 例の FA 患者で *FANCA* 遺伝子の塩基配列を決定し、10 例で病的変異を見出した。この中で 2546delC (888X)や 1303C>T (Arg435Cys)が日本人に特徴的な変異として見出された。しかし、変異の検出率は低い。(4)正常 *FANCA* をレトロウイルスで患者細胞に導入し、細胞周期の異常の補正により A 群であることを診断した。今後、他の遺伝子についても同様の方法を確立することが必要である。(5)最近、他のほぼすべての FA 蛋白の複合体に依存して、*FANCD2* がユビキチン化を受けることが FA 分子経路の作用に必須であることが示された。患者細胞を用いて *FANCD2* のユビキチン化の

測定が新しい診断法となりうることが判明した。

### D. 結論

FA の遺伝子異常の診断は、単一の方法では困難であり、いくつかの方法の組み合わせが必要である。また、分子病態に関する知見から新しい診断法が開発できる可能性が期待される。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

1. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, and Nakahata T.: The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene *FANCC* is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood*. 2000 ;95:1493-1498.
2. Yamashita T and Nakahata T.: Current Knowledge on the Pathophysiology of Fanconi Anemia: From Genes to Phenotypes. *Int J Hematol* (in press)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1.特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

# カニクイザルを用いた骨髄幹細胞自家移植技術の開発

分担研究者 寺尾恵治（国立感染症研究所・筑波霊長類センター）

## 研究要旨

治療遺伝子および分化制御遺伝子を導入した骨髄幹細胞移植による細胞治療の安全性と有効性を評価する目的で、カニクイザルを用いた骨髄幹細胞自家移植技術の開発と、サル CD34<sup>+</sup>遺伝子の解析を行った。若齢（3～5 歳齢）カニクイザルから骨髄穿刺法により採取した骨髄細胞を抗ヒト CD34 抗体結合磁気ビーズで処理し CD34 陽性細胞を単離した。精製 CD34 陽性細胞にマウスレトロウイルスベクターで GFP 遺伝子を導入し、1,000～1,100 cGy の X 線を照射したサルに自家移植した。今年度は採取骨髄細胞の増量を目的としたサイトカインによるプライミング方法と、X 線照射の影響で生じる移植後の血球減少や臓器出血に対応する集中治療での臨床対応について検討した。その結果、 $2 \times 10^6/\text{Kg}$  以上の CD34<sup>+</sup>細胞を回収するプライミング方法を確立するとともに、集中治療での中心静脈栄養管理、サイトカイン投与、輸液、輸血等の臨床対応法を確立した。これにより、カニクイザルでの骨髄幹細胞自家移植技術が開発できたと判断した。また、カニクイザルの CD34 遺伝子をクローニングし、発現ベクターで遺伝子導入した Cos7 細胞で CD34 抗原の発現を確認した。これにより、サル CD34 陽性細胞を単離するための抗体作成準備が完了した。

**キーワード：**カニクイザル、ウイルスベクター、骨髄幹細胞

## A. 研究目的

本プロジェクトでは造血機能障害疾患の新規治療法として、種々の治療遺伝子や細胞分化制御遺伝子を導入した骨髄幹細胞移植による細胞治療のプロトコルを作成することを目的としている。そのためには、プロトコルの安全性と有効性とを前臨床試験としてヒトに近縁な霊長類を用いて評価しておく必要がある。この目的のため、今年度はカニクイザルを用いて骨髄幹細胞の自家移植技術を開発するとともに、移植後の分化制御遺伝子の機能発現を調査するための条件検討を行った。さらに、カニクイザルの CD34 陽性細胞を単離精製するためのモノクローナル抗体の作成を目的として、カニクイザルの CD34 遺伝子のクローニングと発現ベクターへの組み込みを試みた。

## B. 材料と方法

### 1) カニクイザルの骨髄幹細胞精製法の検討：

SIV、SRV/D、HBV、STLV の各種ウイルスに対する抗体陰性の 3～5 歳齢のカニクイザルに G-CSF および SCF を併用したプライミングでの投与量を調査する目的で、3 種の異なった量のサイトカインを 5 日間連続で投与した。プライミング後、腸骨から 40～50ml の骨髄を骨髄穿刺法で採取し、溶血処理により骨髄細胞を回収した。骨髄細胞から抗ヒト CD34 抗体結合磁気ビーズを用いて CD34 陽性細胞を精製した。CD34 陽性細胞に定法によりマウスレトロウイルスを基本とした 4 種類のレトロベクター（MGirL22Y、DMG、DMSG、PL II）を導入した。プライミング条件、ベクター導入条件を検討する目的で、総回収骨髄細胞数、CD34 陽性細胞数、CFU 数を比較した。

## 2) カニクイザルを用いた骨髄幹細胞自家移植法の検討:

中心静脈にカニューレを挿入したカニクイザルに 1,100 cGy の X 線を 550 cGy/日で 2 日連続照射した。照射直後にレトロウイルスベクターで標識遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を静脈内投与により移植した。移植後 1 ヶ月間は集中治療室 (ICU) 管理とし、中心静脈栄養管理を行った。さらに、3 回/週の間隔で採血し、血球数、血小板数、CRP の測定を行い、貧血などの症状が疑われた場合には G-CSF 投与、自家血または同種血液の輸血および補液をおこなった。白血球数が 1000/ $\mu$ l に、血小板数が 50,000/ $\mu$ l に回復した時点をも骨髄抑制からの回復時期と判断した。

### 3) カニクイザルの CD34 遺伝子の解析:

カニクイザルの骨髄細胞から定法に従って mRNA を抽出した。ヒト、マウス、イヌの CD34 の遺伝子配列から保存性の高いフレームワークの外側の配列に対するプライマーを設計し、RT-PCR での増幅を行った。得られた PCR 産物を direct-sequence し、ヒト CD34 の塩基配列と比較した。PCR で増幅したサル CD34 遺伝子をプラスミドベクター (pcDNA3.1(-)) に組み込み、大腸菌でプラスミド plasmid DNA を増幅させた。プラスミド DNA を Cos7 細胞に形質導入し、サル CD34 と交叉する抗ヒト CD34 抗体を用いて形質転換した Cos 細胞でのサル CD34 抗原の発現を確認した。

## C. 結果及び考察

### 1) カニクイザルの骨髄幹細胞精製法の検討:

表 1 に種々条件でプライミングした場合の骨髄総細胞数、精製 CD34 陽性細胞数、CFU 数を比較した結果を示す。回収細胞数には著しい個体差が認められるが、G-CSF と SCF を併用したプライミングを実施した個体で回収細胞数が増加する傾向が認められた。さらにプライミング

でのサイトカイン投与量と回収細胞数との間には明確な相関が認められなかったことから、プライミング条件として G-CSF と SCF のそれぞれ 50 $\mu$ g/Kg 量を 5 日間連続投与する方法が至適と判断した。

精製 CD34 陽性細胞に 4 種類のレトロベクターを用いて標識遺伝子 (GFP) を導入し、全身 X 線照射したサルに自家移植した。自家移植後の導入遺伝子の発現と発現持続期間については共同研究者から報告される。

### 2) カニクイザルを用いた骨髄幹細胞自家移植法の検討:

骨髄幹細胞の自家移植を行った個体では移植後 X 線照射の影響で血球数、血小板数の著しい減少が生じる。表 1 に示す個体では最低白血球数の平均が 646/ $\mu$ l であり、回復指標である 1,000/ $\mu$ l に回復するまで平均で 11 日かかった。また最低血小板数の平均は 65,154/ $\mu$ l であり、回復指標である 50,000/ $\mu$ l を上回ったが、一部の個体では平均 15 日の回復期間が必要であった。血球数減少、臓器出血に対応する集中治療期間には中心静脈栄養管理と平行して週 3 回の採血、体温測定、外部保定検診を行い、血算、血清生化学検査、体温の値、また、固体の状態 (下痢、脱水の具合、食欲、吐気) などから随時対症的な処置 (輸血、抗生物質投与、輸液薬剤の選択、輸液速度の変更、給餌方法および給餌物の変更、その他様々な投薬および処置) を行った。処置開始条件としては、1) 末梢血 Hb 濃度が 7g/dl を下回った場合には、全血輸血を行う。2) 末梢血血小板数が 70,000/ $\mu$ l を下回った場合には、2,000~4,000 cGy の X 線を照射した濃厚血小板溶液もしくは全血の輸血を行う。3) 39 $^{\circ}$ C 以上の発熱と CRP の上昇が認められた場合は、血中細菌培養を行い、細菌を同定すると共に、感受性試験を行い、適応抗生物質を選択投与する。4) 末梢血白血球数が 1,000/ $\mu$ l を下回ったら G-

CSF(10µg/kg)の投与を開始し、5000/µlを上回った時点で中止する。これらの処置により、挿入カニューレが引き抜かれた事故が生じた1例をのぞき全てのサルが正常に回復した。このことから、カニクイザルを用いた造血幹細胞自家移植技術が確立できたと判断した。

### 3) カニクイザルの CD34 遺伝子の解析:

これまでカニクイザルの CD34 と交叉反応性を示すヒト抗体をスクリーニングして、入手可能な抗体が一種類 (Clone563) であることが判明している。この抗体で精製されるカニクイザル CD34 陽性細胞には前述した移植実験とコロニーアッセイの結果から見て多分化能を有する骨髓幹細胞および前駆細胞が含まれていると判断できるが、より未分化な幹細胞の精製に用いる抗体作成を目的として、今年度はカニクイザルの CD34 遺伝子の解析を行った。

図1はクローニングしたカニクイザル CD34 遺伝子から推測される CD34 抗原のアミノ酸配列をヒトのそれと比較した結果である。図に示すようにカニクイザル CD34 抗原のアミノ酸配列はヒトと 91.2%の相同性を示した。

図2はカニクイザル CD34 遺伝子を挿入した発現ベクターで形質転換した Cos7 細胞でのサル CD34 抗原の発現を FACS で解析したものである。サル CD34 と交叉反応するヒト CD34 抗体で陽性に染まる細胞が確認できたことから、カニクイザル CD34 遺伝子のクローニングと発現ベクターへの組み込みが成功したと判断できる。今後はベクターを遺伝子銃でマウスに免疫し、カニクイザルの CD34 を識別するモノクローナル抗体の作成を試みる予定である。

## D. 結論

治療遺伝子および分化制御遺伝子を導入した骨髓幹細胞移植による細胞治療の安全性と有効性を評価する目的で、カニクイザルを用いた骨

髄幹細胞自家移植技術の開発とサル CD34 遺伝子の解析を行った。今年度は以下の成績を得た。

1) 採取骨髓量、回収 CD34 陽性細胞数の増量を目的としたサイトカインによるプライミング条件を確立した。

2) 骨髓幹細胞移植後の集中治療技術を確立し、遺伝子導入細胞の移植実験を行った。

3) カニクイザルの CD34 抗原をコードする遺伝子をクローニングし、発現ベクターによる Cos 細胞での遺伝子発現を確認した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

MURAYAMA, Y., TERAO, K. and INOUE-MURAYAMA, M. (2000), Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. HUMAN IMMUNOLOGY, 61: 474-485.

NAKAJIMA, T., NAKAMARU, K., IDO, E., TERAO, K., HAYAMI, M. and HASEGAWA, M. (2000) Development of novel nonpathogenic simian immunodeficiency virus vector carrying dual gene expression system. HUMAN GENE THERAPY, 11: 1863-1874.

肥田宗友、鈴木 譲、菅野純夫、橋本雄之、寺尾恵治、早坂郁夫、平井百樹 (2000)、霊長類の完全長 cDNA ライブラリーの作成と解析、霊長類研究、16:95-110

KASAI, F., TAKAHASHI, E., KOYAMA, K., TERAO, K., SUTO, Y., TOKUNAGA, K., NAKAMURA, Y. and HIRAI, M. (2000)

Comparative FISH mapping of the ancestral fusion point of human chromosome 2. CHROMOSOME RESEARCH 8:727-735

HANAZONO, Y., TERAO, K. and OZAWA, K. (2001) Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implication for gene therapy. STEM CELLS, 19: 12-23

HANAZONO, Y., DUNBAR, C.E., DONAHUE, R.E., KATO, I., UEDA, Y., HASEGAWA, M., URABE, M., KUME, A., TERAO, K. and OZAWA, K. (2000) Basic studies toward hematopoietic stem cell gene therapy. pp. 159-169, in Y.Ikeda, J.Hata, S.Koyasu, Y.Kawakami and Y.Hattori [eds] CELL THERAPY, Springer, New York.

寺尾恵治 (2001)、霊長類を用いた遺伝子治療研究の最前線、pp146-155、谷憲三郎、浅野茂隆編「新臨床医のための分子医学シリーズ「遺伝子治療の新展開-ベクター開発と臨床応用の最前線-」羊土社、東京

## 2. 学会発表

花園豊、揚山直英、柴田宏昭、長島建之、上田泰次、久米晃啓、加藤郁之進、長谷川護、寺尾恵治、小澤 敬也、カニクイザルを用いた造血幹細胞モデル実験系の樹立、第 62 回日本血液学会、2000 年 3 月 16-18 日、福岡

寺尾恵治、桐井康行、柴田宏昭、吉野公一郎、カニクイザル FasL 遺伝子のクローニング、リコンビナント FasL 発現系および FasL 測定系の開発、第 47 回日本実験動物学会、2000 年 5 月、徳島

Hanazono, Y., Wu, T., Agricola, B., Shibata, H., Ageyama, N., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Kato, I., Kume, A., Donahue, R., Ozawa, K., Dunbart, C., and Terao, K. In vitro discrepancy of carrying the GFP gene between progenitors and circulating cells after macaque monkey hematopoietic stem cell transduction and autologous transplantation. The 3rd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 31-June 4, 2000, Denver, Colorado.

Ueda, Y., Nakamaru, K., Nakajima, T., Shibata, H., Ageyama, N., Fujiki, Y., Ido, E., Terao, K.,

Nakauchi, H., Hayami, M., and Hasegawa, M. Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentiviral vector based on SIVagm. The 3rd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 31- June 4, 2000, Denver, Colorado.

Nakajima, T., Nakamaru, K., Yonemitsu, Y., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M. An advanced self-inactivating lentiviral vector based on SIVagm carrying a novel dual gene expression system. The 3rd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 31-June 4, 2000, Denver, Colorado.

吉川泰弘、河村晴次、寺尾恵治、加藤賢三、小野文子、早坂郁夫、霊長類を用いた遺伝子治療の評価システム、第 16 回日本霊長類学会、2000 年 7 月、名古屋

Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shen, Y., Kawasaki, K., Ono, F., Matsumura, M., Mizukami, H., Kume, A., Nagatsu, L., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Terao, K., Nakano, I., and Ozawa, K. Functional Recovery in a primate model of Parkinson's Disease after triple transduction of adeno-associate virus vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo.

Kobayashi, M., Nakajima, T., Nakamaru, K., Iida, A., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M. An advanced self-inactivating vector designed from SIVagm equipped with a novel dual gene expression system. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo,

Ueda, Y., Nakamaru, K., Nakajima, T., Iida, A., Shibata, H., Ageyama, N., Fujiki, Y., Ido, E., Terao, K., Nakauchi, H., Hayami, M., and Hasegawa, M.

Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentivirus vector based on SIVagm. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo.

Shibata, H., Hanazono, Y., Nagashima, T., Ageyama, N., Ueda, Y., Kume, A., Kato, I., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Terao, K. Efficient in vitro transduction of cynomolgus monkey hematopoietic progenitor cells with retroviral vectors. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo.

Hanazono, Y., Wu, T., Shibata, H., Nagashima, T., Ageyama, N., Ueda, Y., Kume, A., Agricola, B., Kato, I., Hasegawa, M., Donahue, R.E., Terao, K., Dunbar, C.E., and Ozawa, K. In vivo genetic marking study of rhesus and cynomolgus monkey hematopoietic stem cells with GFP-expressing retroviral vectors. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo.

Ageyama, N., Hanazono, Y., Ono, F., Shibata, H., Donahue, R.E., Ozawa, K., and Terao, K. Establishment of the cynomolgus monkey autologous hematopoietic stem cells (HSC) transplantation as a preclinical model for HSC gene therapy. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, July 27-29, 2000, Tokyo.

花園 豊、長島建之、柴田宏昭、揚山直英、浅野隆之、上田泰次、久米晃啓、加藤郁之進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也、GFP 発現レトロウイルスベクターを用いたカニクイザル造血幹細胞遺伝子標識の研究、第 59 回日本癌学会、2000 年 10 月 4-6 日、横浜

揚山直英、花園 豊、柴田宏昭、羽成光二、成田勇人、鴻野あや子、小野文子、小澤敬也、吉川泰弘、寺尾恵治、体外循環装置を用いたカニクイザルにおける末梢血幹細胞採取法の確立、

第 130 回日本獣医学会、2000 年 10 月 7-9 日、大阪

白倉雅之、福村正之、加藤賢三、根岸隆之、寺尾恵治、長谷川護、吉川泰弘、センダイウイルズベクターのカニクイザル由来初代培養細胞への感染性、第 130 回日本獣医学会、2000 年 10 月 7-9 日、大阪

川崎勝義、池口邦彦、村松慎一、静岡奈美、山海 直、寺尾恵治、小山高正、吉川泰弘  
パーキンソン病症状の治療効果判定における動画像差分処理の応用、第 30 回日本神経精神薬理学会、2000 年 10 月 25-27 日、仙台

肥田宗友、鈴木 穰、坂手龍一、菅野純夫、橋本雄之、寺尾恵治、早坂郁夫、平井百樹  
霊長類の完全長 cDNA ライブラリーの作製と cDNA 配列によるヒト、チンパンジー、カニクイザルの比較解析、第 54 回日本人類学会、2000 年 11 月 3-5 日、東京

村松慎一、藤本健一、池口邦彦、沈 楊、小野文子、川崎勝義、水上浩明、久米晃啓、一瀬 宏、永津郁子、松村 賢、永津俊治、寺尾恵治、中野今治、小澤啓也、AAV ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療、MPTP モデルサルでの前臨床試験、第 7 回遺伝子治療研究会ワークショップ、2000 年 11 月、東京

Hanazono, Y., Nagashima, T., Shibata, H., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Kume, A., Terao, K., Hasegawa, M., and Ozawa, K. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by the selective amplifier gene in a nonhuman primate model. 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco.

花園 豊、長島建之、柴田宏昭、揚山直英、浅野隆之、上田泰次、久米晃啓、寺尾恵治、長谷川護、小澤敬也、霊長類モデルを用いた遺伝子導入造血細胞の体内選択的増幅法の開発、



第 23 回日本造血細胞移植学会、2000 年 12 月 8-9  
日、京都

揚山直英、花園 豊、柴田宏昭、長島建之、  
浅野隆之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、寺

尾恵治、カニクイザル造血幹細胞の自家移植法  
の確立、第 23 回日本造血細胞移植学会、2000  
年 12 月 8-9 日、京都

表1：骨髓穿刺法による回収骨髄細胞数、CD34陽性細胞数、CFU数、使用ベクター、in vitro遺伝子導入効率

Experiments	Monkey BW (Kg)	Priming	BM Harvest		CD34+ cells (in millions)	CFU			Transduction Vector	Transduction Efficiency(%)
			(in billions)	(in millions)		Before selection	After selection	Recovery (%)		
BMT-1	2.3	non	1.10	NA	NA	NA	NA	non		
BMT-2	2.4	non	1.00	3.3	0.28*	0.10*	36	non		
BMT-3	2.3	non	0.83	9.7	1.06	0.69	65	MGirl22Y	20	
BMT-4	2.3	G-CFS 100ug/Kg SCF 200ug/Kg	2.99	37.5	9.95	6.00	60	DMG	13	
BMT-5	2.1	G-CFS 10ug/Kg SCF 50ug/Kg	1.20	17.0	2.71	1.19	44	DMSG	37	
BMT-6	2.5	G-CFS 10ug/Kg SCF 50ug/Kg	1.10	7.0	2.04	1.05	51	DMSG	ND	
BMT-7	2.5	G-CFS 100ug/Kg SCF 200ug/Kg	1.57	18.4	5.12	1.90	37	DMSG&PL II	ND	
BMT-8	2.3	G-CFS 50ug/Kg SCF 50ug/Kg	2.16	16.7	5.54	3.01	54	DMSG&PL II	DMSG: 1 PL II: 3	
BMT-9	2.5	G-CFS 50ug/Kg SCF 50ug/Kg	2.19	10.4	2.60	1.25	48	DMSG&PL II	DMSG: 4.7 PL II: 1.6	
BMT-10	3.3	G-CFS 50ug/Kg SCF 50ug/Kg	2.21	45.0	5.00	3.83	77	DMSG&PL II	DMSG: 19 PL II: 42	
BMT-11	2.7	G-CFS 50ug/Kg SCF 50ug/Kg	2.81	38.4	4.65	3.84	83	DMSG&PL II	DMSG: 45.9 PL II: 37	
BMT-12	3.2	G-CFS 50ug/Kg SCF 50ug/Kg	1.02	11.3	0.54	0.73	135	DMSG&PL II	DMSG: 8.4 PL II: 7.7	

\* in millions

	10	20	30	40	50		
Cynomolgus	1	MLVRRGARAG	PGMPRGWTAL	CLLSLLPSGF	TSANNTSTVT	PKSSTQGTF	50
HumanCD34	1	MLVRRGARAG	PRMPRGWTAL	CLLSLLPSGF	MSLDNNGTAT	PELPTQGTFS	50
	60	70	80	90	100		
Cynomolgus	51	TVSTNVSQYE	TAIPSTLGST	SPHPVSQHG	EATTNITETT	VKFTSTSGIT	100
HumanCD34	51	NVSTNVSQYE	TTTPSTLGST	SLHPVSQHG	EATTNITETT	VKFTSTSVIT	100
	110	120	130	140	150		
Cynomolgus	101	SVYGTNNSV	QSQTSVITTV	FTTPANISTP	ETTLKSSLS	GNVSDLSTTS	150
HumanCD34	101	SVYGTNNSV	QSQTSVISTV	FTTPANVSTP	ETTLKPSLS	GNVSDLSTTS	150
	160	170	180	190	200		
Cynomolgus	151	TSLATSPTDP	YTSSPPIPSV	IKTEIKCSGI	KEVCLTQGC	LEQNETSSCA	200
HumanCD34	151	TSLATSPTKP	YTSSPILSD	IKAEIKCSGI	REVCLTQGC	LEQNKTS	200
	210	220	230	240	250		
Cynomolgus	201	EFRKDRGEDL	ARVLCGEEQA	DADAGAQICS	LLLAQSEVRP	QCLLLVLANR	250
HumanCD34	201	EFRKDRGEGL	ARVLCGEEQA	DADAGAQC	LLLAQSEVRP	QCLLLVLANR	250
	260	270	280	290	300		
Cynomolgus	251	TEISSKLQLM	KKHQSDLRKL	GILGFTEQDV	ASHQYSRRT	LIALVTSGTL	300
HumanCD34	251	TEISSKLQLM	KKHQSDLKKL	GILDFTEQDV	ASHQYSQKT	LIALVTSGAL	300
	310	320	330	340	350		
Cynomolgus	301	LAVLGITGYF	LMNRRSWSPT	GERLGEDPYY	TENGGGQYS	SGPGTSPEAQ	350
HumanCD34	301	LAVLGITGYF	LMNRRSWSPT	GERLGEDPYY	TENGGGQYS	SGPGTSPEAQ	350
	360	370	380	390	400		
Cynomolgus	351	GKASVNRGAQ	ENGTGQATSR	NGHSARQHV	ADTEL*.....	.....	400
HumanCD34	351	GKASVNRGAQ	ENGTGQATSR	NGHSARQHV	ADTEL*.....	.....	400

図 1 : カニクイザルとヒトの CD34 抗原のアミノ酸配列

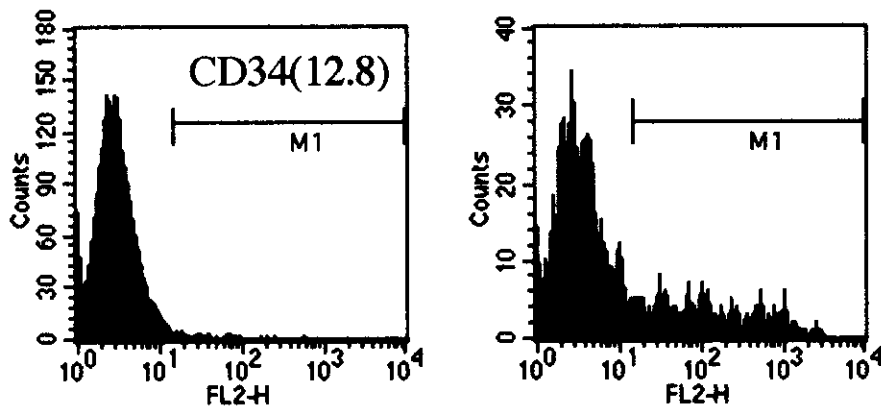


図 2 : カニクイザル CD34 遺伝子を導入した Cos7 細胞での抗原発現  
 左図 : 陰性コントロール      右図 : 陽性コントロール

分担研究報告書

細胞増殖分化制御遺伝子の開発

分担研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所取締役研究所長

研究要旨 造血幹細胞を標的として効率よく遺伝子導入された細胞を増幅するため、選択的増幅遺伝子(SAG)を開発した。遺伝子が導入された細胞を選択的に増幅することで、従来までの課題であった造血幹細胞への遺伝子導入効率の不十分を補おうというものである。構造としては造血幹細胞増幅に係わる G-CSF 受容体等の増殖シグナル発信部とそれを制御するエストロゲン受容体等のホルモン結合領域からなる分子スイッチからなるものである。今年度はこれまでに開発してきた造血幹細胞増幅シグナルの発信源となる G-CSF 受容体に代えて、巨核球刺激因子(TPO)受容体(mpl)を用いその効果を調べた結果、mpl 型の SAG は霊長類 (カニクイザル) の CD34 陽性細胞を効率よく増殖させることが明らかになった。またこれまでに開発した、G-CSF 受容体型 SAG を、カニクイザルの造血幹細胞自家移植系に用いて、体内での選択的増幅効果について調べた結果、複数個体で遺伝子導入細胞が刺激因子依存的に増幅したことが明らかになった。特にそのうちの一端は従来 5-10% 程度の導入率である前駆細胞を 20-30%まで高めることに成功した。

A. 研究目的

近年、神経、筋肉、消化器など多くの組織でその構成細胞の根源となる幹細胞が成人個体においても存在することが明らかになってきた。こういった器官や組織の一部の細胞の異常による疾患を治療するため、幹細胞を元に組織器官を再生させるという治療が考案されている。造血組織では、古くから幹細胞の存在が知られておりその純化研究も進んできた。最近では、造血幹細胞から他の幹細胞への分化転換が起こることも明らかにされ、他の組織の再生治療にも利用されつつある。こうしたなかで、先天性、あるいは難治性血液疾患の根治のため造血幹細胞を標的とした

遺伝子治療研究も精力的に行われているが、幹細胞への遺伝子導入効率が障壁となっている。レトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入法も添加するサイトカインの選定やフィブロネクチン誘導体を用いた改良により幹細胞への遺伝子導入効率が上がったもののまだ実用レベルには達していなかった。1999 年フランスで X 染色体性重症免疫不全症の遺伝子治療に成功したという報告があったが、用いた手法は従来のものと大きな差違はなく、成功した要因は導入した治療遺伝子である共通  $\gamma$  鎖遺伝子が、導入細胞に対して増殖優位性を付与したという点であると考えられている。その結果、遺伝子導入細胞が選択的に増