

20020422

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療研究事業

遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 島田 隆

平成15（2003）年4月

目次

I. 総括研究報告	
遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
III. 主な刊行物・別刷り	15

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
総括研究報告書

遺伝子導入技術を使った細胞・遺伝子の特異的修復法に関する研究

主任研究者 島田隆 日本医科大学第二生化学教室教授
高度先端医療技術開発センター・遺伝子治療研究部門

研究要旨

遺伝子導入技術の開発・改良を進めるとともに、新たに多能性幹細胞を遺伝子治療の標的細胞とする可能性について検討している。我々の研究室では遺伝子異常の修復による遺伝子病の治療を最終目標として、長期組込型のウイルスベクター（HIV、AAV）の開発を行ってきた。本研究課題では更に目標を具体化するため、①遺伝子導入技術の開発、②多能性幹細胞の研究、③遺伝子修復技術の開発、の三つの課題について研究をすすめている。①での具体的な成果としては、安全で高率の HIV ベクター産生系を確立した。非分裂細胞の染色体への遺伝子組み込みが可能な HIV ベクターの応用として、X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)、眼内新生血管病、慢性関節リウマチ、白血病、多発性骨髄腫(MM)などの動物モデルに対する遺伝子治療実験を行い有用性を示した。神経系細胞、筋肉細胞、肝臓細胞への高率な遺伝子導入が可能な AAV ベクターの応用として異染性ロイコジストロフィー (MLD)、Fabry 病の遺伝病ノックアウトマウスや膵臓癌のモデルハムスターに対する遺伝子治療実験を行い有用性を示した。特に Fabry マウスの実験では生化学的及び組織学的異常をほぼ完全に治療できることを明らかにし、注目されている。②では GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移植したキメラマウスを作製し、骨髄細胞の多能性を研究する実験系を確立した。このキメラマウスを用い、心筋、脳組織、腎臓、小腸、膵臓の再生過程における骨髄幹細胞の関与を明らかにした。③に関しては、M13 ファージの LacZ 遺伝子の修復を指標とする *in vitro* のミスマッチ修復アッセイ系を確立した。M13 ファージに標的部位に相補的なオリゴヌクレオチドと HeLa 細胞抽出液を反応させることで約 1/1000 の効率で塩基置換が起こることを確認した。

A. 研究目的

遺伝子導入技術の開発・改良を進めるとともに、組織幹細胞を標的とする遺伝子病の治療法を確立することを目標としている。遺伝子治療は、遺伝子の異常の修復を目的とする「遺伝子の治療」と、遺伝子を薬剤として投与する「遺伝子を使った治療」の二つの方向で発展してきている。「遺伝子の治療」は現時点では先天性免疫不全症の治療でしか成功していないが、将来的には遺伝子病の唯一の原因療法として、ますます重要になってくると考えられる。一方、「遺伝子を使った治療」は、癌や生活習慣病などの幅広い疾患に対する応用が開始されており、今後重要な治療法の選択肢の一つとなると考えられる。我々の研究室では、

これまで長期組込型のウイルスベクター（HIV、AAV）を開発し、各種疾患に対する臨床応用の可能性を検討してきた。本研究では、更に「遺伝子の治療」を行うための基盤技術の整備を行う。具体的には、①遺伝子導入技術の開発、②多能性幹細胞の研究、③遺伝子修復技術の開発、の三つの課題について研究をすすめる。①では、ウイルスベクターの改良に加え、ハイブリッドベクターや非ウイルス合成ベクターの研究を進める。更に、安全性や効率の点で不可欠と考えられている細胞ターゲティング技術の確立を目指す。これらベクターの開発改良と平行して現有のベクターを使って有効性が期待できる遺伝子治療の前臨床研究を進める。②では、遺伝子病の治療のための重要な標的細胞と考えられる、患者自身の骨髄中多能性幹細胞の分化能や遺伝子

導入効率の検討を行う。③では、幹細胞の治療を行うために、遺伝子変異を起こさない遺伝子導入法の開発、及びミスマッチ修復技術を応用した遺伝子操作技術の基礎的研究を推進する。これらの研究により患者本人の幹細胞の遺伝子を修復することができるようになれば、究極の遺伝子治療である「遺伝子の治療」による遺伝子病の治療が可能になると考えている。

B. 研究方法

<遺伝子導入技術の開発と応用>

1) HIV ベクターの改良及び遺伝子治療への応用

パッケージングプラスミド及びベクタープラスミドを改良し、更に濃縮法を改善することにより安全でしかも高力価の HIV ベクターを調製した。

新生血管抑制因子 (angiostatin、endostatin、Flt-1、FLK-KDR) を組み込んだ HIV ベクターを作製し、様々な新生血管病モデルに対する有用性を検討した。新生児マウスを高濃度酸素に暴露させることで眼内新生血管病モデルマウスを作製した。コラーゲン及び不完全アジュバンドを投与することで慢性間接リウマチモデルを作製した。SCID マウスに Namalwa 細胞或いは ARH77 細胞を移植して悪性リンパ腫モデル及び多発性骨髄腫 (MM) モデルとした。

ヒト XLA の原因遺伝子である Btk 遺伝子の変異をもつ自然発症の xid 免疫不全マウスを対象に、オンコレトロウイルスベクターと HIV ベクターの比較を行った。

2) AAV ベクターの改良及び遺伝子治療への応用 (Fabry 病の遺伝子治療)

AAV ベクターが神経組織や筋肉組織に高率に感染し長期間発現できることを利用して、異染性ロイコジストロフィー (MLD) 及び Fabry 病のノックアウトモデルマウスの治療実験を行った。

<多能性幹細胞の研究>

移植時期や移植条件を検討することで骨髄細胞のほぼ 100% を GFP 陽性細胞で置換させたキメラマウスを作製した。

組織の修復過程における骨髄細胞の関与を検証するため、左冠状動脈を結紮することで心筋梗塞モデルを作製した。又、中大脳動脈を閉塞させて脳梗塞モデルを作製した。腎炎モデルはハブ毒を静注して作製した。

<遺伝子修復技術の開発>

各種オリゴヌクレオチドを作製し二本鎖 DNA との相互作用をゲルシフトアッセイ、制限酵素感受性試験で検討した。LacZ 遺伝子をもつ m13 ファージ DNA を利用した *in vitro* でのミスマッチ修復アッセイ系を確立した。

(倫理面への配慮)

現時点では直接ヒトを対象とした研究は行っていない。動物実験については日本医科大学実験動物倫理委員会の許可を得ている。本研究課題で目指している患者自身の骨髄中多能性幹細胞を標的とする遺伝子治療は、germline 細胞や ES 細胞と比べ倫理的問題は少ない。骨髄採取は手技として確立しており、患者への負担も比較的軽度である。遺伝子を修復した患者自身の骨髄多能性幹細胞を使った遺伝子治療は安全性の点でも倫理性の点でも極めて優れた方法であると考えている。

C. 研究結果

<遺伝子導入技術の開発と応用>

1) HIV ベクター

HIV ベクターの応用として血管新生抑制因子遺伝子を組み込んだベクターを作製し、新生血管病モデルに対する有用性を検討した。眼内新生血管モデルマウスの硝子体内へ HIV ベクターを直接投与することで 90% 以上のマウスで眼内血管新生の有意な抑制効果が認められた。関節炎モデルの実験では HIV ベクターの膝関節内投与により滑膜の肥厚や炎症性肉芽組織 (パンヌス) の形成が著明に抑制された。更に遠位足関節での炎症反応の抑制も認められた。これらの結果は関節炎の形成に血管新生が強く関与していることを示唆している。HIV ベクターを使ったこれら生活習慣病の治療を将来

的に行うべくベクターの安全性の改善を引き続き行っている。

悪性リンパ腫モデルマウスではHIVベクターを筋肉内に投与することにより血中内の新生血管抑制因子が上昇し、腫瘍サイズの縮小、生存期間の延長が認められた。MMモデルマウスでは約70%の効率で遺伝子導入された造血幹細胞を移植したことにより、白血病細胞の減少、IgMの減少、生存期間の著明な延長が認められた。これらの結果は抗血管新生遺伝子治療が血液系悪性腫瘍の治療法としても有望であることを示している。

ヒト XLA の原因遺伝子である Btk 遺伝子の変異をもつ自然発症の xid 免疫不全マウスを対象に、オンコレトロウイルスベクターと HIV ベクターの比較を行った。HIV ベクターにより 90%以上の効率で造血幹細胞への Btk 遺伝子の導入が可能であった。遺伝子導入細胞の移植により B 細胞の分化はほぼ正常化したにもかかわらず、免疫グロブリンの上昇は見られなかった。この結果は、免疫機能の改善には単純な Btk 遺伝子の発現だけでは不十分であり、Btk 遺伝子の発現調節や他の遺伝子の必要性を示唆している。

2) AAV ベクター (Fabry 病の遺伝子治療)

Fabryマウスに対してはAAVベクターにより筋肉内で欠損酵素(α-ガラクトシダーゼ)を発現させ全身に供給する酵素補充療法の可能性を検討した。AAVベクターの一回投与により血中の酵素活性は正常の約30%に上昇し、各組織でも10-20%の酵素活性が認められた。酵素活性の上昇に伴い組織内に蓄積していた脂質の著明な減少が認められ、治療後25週では正常値にまで改善していた。更に免疫組織学的検討及び、電子顕微鏡による検討においても蓄積した脂質の除去及びそれに伴う形態学的改善が認められた。AAVベクターの筋肉内注射は血友病の遺伝子治療において安全性が確認されている。AAVベクターによるFabry病の遺伝子治療は現時点では最も有効性が期待できる治療法と考えており臨床応用を始める準備を行っている。

<多能性幹細胞の研究>

骨髄中の多能性幹細胞の有用性を検討するため、GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を GFP 陰性の通常のマウスに移植したキメラマウスを作製した。移植時期や移植条件を検討することで骨髄細胞のほぼ100%を GFP 陽性細胞で置換させることに成功した。キメラマウスで炎症反応や梗塞を起こすと、その修復機転において多くの GFP 陽性細胞が関与していることが明らかになった。心筋梗塞後の治癒過程において GFP 陽性細胞が desmine 或いは troponin 陽性筋肉細胞に、脳梗塞後の脳組織では ibal 陽性のマイクログリアに、腎炎後の修復過程では thrombomodulin 陽性の血管内皮細胞に分化することが確認された。このキメラマウスは多能性幹細胞の研究を行ううえで重要な実験系になると考えられる。又、これらの実験結果から骨髄中の多能性幹細胞をキャリアーとする遺伝子治療の可能性が示された。

<遺伝子修復技術の開発>

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではクローンにして10%以上(1/10,000塩基対以上)の頻度で変異が導入されていることが明らかになった。癌抑制遺伝子や幹細胞を使った遺伝子治療ではレトロウイルスによる変異頻度を考慮する必要がある。変異導入機構の解明とともに、変異頻度の低いベクターの開発を進めている。

導入されてしまった遺伝子変異を修復する技術としてオリゴヌクレオチドとミスマッチ修復酵素系を使った方法の開発を行っている。DNA テンプレートと一塩基ミスマッチをもつ各種オリゴヌクレオチドとの結合をゲルシフトアッセイ、制限酵素の感受性、ミスマッチ特異的結合蛋白質 (MutSa) との相互作用の点から検討した。又、M13 ファージの LacZ 遺伝子の修復を指標とした *in vitro* のミスマッチ修復アッセイ系を確立した。この実験系では、単純な直線状オリゴヌクレオチドが最も効率良くテンプレートとハイブリッドを形成し、ミスマッチ修復系による塩基置換が約 1/1000 の効率で起こることが明らかになった。

D. 考察

遺伝子治療が開始されてから 10 年が経過し、一部の疾患では有効性が報告されているが、同時に遺伝子治療技術の問題点も明らかになっている。今後、遺伝子治療を進展させていくためには、遺伝子導入技術の開発・改良だけでなく、標的細胞や遺伝子の操作技術の革新的進歩が必要である。これまで遺伝子治療は遺伝子異常の修復を目的とする「遺伝子の治療」と、遺伝子を薬剤として使う「遺伝子を使った治療」の二つの方向で発展してきた。「遺伝子の治療」は現時点では先天性免疫不全症の治療でしか成功していないが、将来的には遺伝子病の究極の治療法として、ますます重要になってくると考えられる。遺伝子の治療を行うためには、現在のような正常遺伝子を導入するだけでなく、異常遺伝子を積極的に治療する必要がある。又、germline 細胞や ES 細胞の治療は倫理的に問題があるが、各組織の幹細胞は遺伝子の治療のための理想的な標的細胞になると考えられる。患者自身の多能性幹細胞の遺伝子修復が可能になれば、倫理性や安全性の問題が一気に解決され、ほとんど全ての遺伝子病の治療ができるようになると考えられる。

一方、「遺伝子を使った治療」は、癌や生活習慣病などの幅広い疾患に対する応用が開始されており、今後重要な治療法の選択肢の一つとなると考えられる。遺伝子による治療では基本的に *in vivo* で行われるため、標的細胞だけを治療できる細胞ターゲティング技術が不可欠である。細胞ターゲティングが実用化され、ベクターの全身投与による治療が安全に行えるようになれば、遺伝子治療の適応範囲は飛躍的に広がる事が期待できる。

HIV ベクターの応用として血管新生抑制因子遺伝子を組み込んだベクターを作製し、新生血管病モデルに対する有用性を検討した。眼内新生血管モデルマウスの硝子体内へ HIV ベクターを直接投与することで 90%以上のマウスで眼内血管新生の有意な抑制効果が認められた。失明原因のトップである糖尿病網膜症や加齢性黄斑症等の眼内血管新生病治療法の重要な選択肢になる事が期待される。

今回使用した眼内新生血管モデルは相対的低酸素により急激に新生血管が生じ、新生血管が最大になるのは酸素暴露から戻して 5 日目から 7 日目である。HIV ベクター由来のアンギオスタチンが発現するのに遺伝子導入してから 2 日程度かかるので、タンパクとして存在し、実際効き始めるのは酸素投与後 3 日目から 5 日目である。もし最初からタンパクとしてアンギオスタチンが存在していればさらに血管新生は抑制されたと考えられる。

臨床的に加齢性黄斑症や糖尿病網膜症を考えると今回のモデルと異なり、発症から緩徐に進行する。血管新生抑制は腫瘍の抑制において注目されているが、血管新生という観点から見ると腫瘍では新生するスピードが速く、抑制されにくい、進行に時間のかかる眼内新生血管病こそ適応の高い疾患であると考えられる。

抗新生血管作用を持つ蛋白製剤を直接投与することも考えられるが、眼内は網膜血管柵が存在し血中からの薬剤移行率は低い。また点眼薬も眼内へほとんど移行しない。眼内に蛋白製剤を頻回に投与することは現実的に感染症の問題があり不可能である。これらの問題を考えあわせると、持続的に発現可能な遺伝子治療は理想的な治療法であり、抗新生血管を狙った遺伝子治療は将来の失明防止への非常に有力な選択肢になると考えられる。

血管新生抑制遺伝子治療はコラーゲンにより誘導された関節炎の治療でも効果を発揮した。これまでも炎症性疾患特にリウマチ性疾患の発症には血管新生が強く関与していることが報告されてきた。動物モデルで蛋白療法が試みられたが蛋白質の半減期の問題や適当なデリバリーシステムがないため臨床応用は困難であった。アデノウイルスベクターを使った遺伝子治療実験は試みられたが発現期間は数週間に限定されており、又アデノウイルスベクターそのものに細胞毒性、起炎症作用があるためその評価は難しい。HIV ベクターによる抗新生血管療法は長期に渡り抗新生血管因子を間接内で発現させることが可能であり慢性関節リウマチの治療法として適していると考えられる。我々は最近 AAV ベクターを使って同様の実験を行い、治療効果を認めてい

る。実際の臨床応用に際しては安全性の優れた AAV ベクターが望ましいと思われる。

抗血管新生療法はもともと固形腫瘍の治療法として開発されたものであるが、今回の実験では血液系疾患である悪性リンパ腫や多発性骨髄腫でも劇的な効果が認められた。これらの疾患の治療薬としてサリドマイドが注目されているがその主要な作用機序は血管新生抑制であると考えられている。多発性骨髄腫は重篤で有効な治療法のない疾患であり Risk/Benefit の観点からは HIV ベクターの使用も考慮される対象疾患であると考えられる。

これまでのレトロウイルスベクターでは難しかった造血幹細胞への遺伝子導入が HIV ベクターにより可能になった、その応用として X 連鎖無ガンマグロブリン血症の幹細胞治療を試みた。治療マウスは、移植後 30 週まで長期にわたり、脾臓単核細胞中に導入遺伝子が安定して存在し、導入遺伝子の発現も確認された。表現型では、脾臓の成熟 B 細胞までの分化は改善したが、血清 IgM、IgG3 値は上昇せず免疫応答も改善しなかった。その原因として、個々の造血幹細胞が免疫グロブリン分泌細胞まで分化するために、移植した造血幹細胞の 1 細胞当たりの導入遺伝子の発現量が低かった可能性が考えられる。また、キメラマウスでは表現型が全て完治したことから、Btk 遺伝子の発現量は B 細胞分化の各 stage で調節される必要があるのかもしれない。今回導入遺伝子の内部プロモーターとして用いた MSCV promoter では stage とは無関係に持続的遺伝子発現が起きたと考えられる。最後に、同一の Btk 遺伝子異常をもつヒト XLA 症例の重症度が異なるという報告があり、B 細胞分化の過程に、Btk 遺伝子以外の遺伝子が関与している可能性があると思われる。

今回、我々が作製した VSV-G HIV vector は、マウス造血幹細胞に対して、94%と非常に効率良く遺伝子導入が可能であり、移植後 30 週間という長期にわたって安定して導入遺伝子の発現が確認できた。このことから、HIV ベクターは造血幹細胞を用いた遺伝子治療にとって、非常に有用な tool であることが示された。しかし、Btk 遺伝子異常が原因である免疫不全症の遺伝子治療

実験では、疾患特有の問題点も多く、結果として表現型は部分的にしか改善しなかった。

HIV ベクターも含めたレトロウイルスベクターは安全性の確保が大きな課題である。産生系の改良により HIV ベクターから病原性ウイルスが出現する可能性は考えられなくなった。しかしフランスで最近報告された挿入変異による発癌の問題や、我々が明らかにしたレトロウイルスゲノムの不安定性などはレトロウイルス本来の性質に起因する問題であり、その解決法が今後の重要な研究課題になると考えられる。

これらの問題を一挙に解決できる方法として、遺伝子の挿入ではなく、遺伝子変異を直接修復する遺伝子修復技術が注目されている。これまで検討されてきた相同組み換えによる方法や我々が研究を進めている mismatch 修復系を応用した方法はいずれも未だ多くの基礎研究が必要であるが、究極の遺伝子治療技術として期待される。

我々の課題では①遺伝子導入技術の開発、②多能性幹細胞の研究、③遺伝子修復技術の開発、の三つの課題について研究をすすめている。これらの研究成果をもとに、患者自身の幹細胞の遺伝子異常を修復して遺伝子病を治療する新しい方法論の確立を目指したい。

E. 結論

安全で高率の HIV ベクター産生系を確立した。眼内新生血管病、慢性関節リウマチ、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫のモデルマウスを対象に、HIV ベクターによる抗新生血管遺伝子治療の有効性を示した。X 連鎖無ガンマグロブリン血症モデルマウスを対象に HIV ベクターによる造血幹細胞遺伝子治療実験を行った。AAV ベクターによる異染性ロイコジストロフィー及び Fabry 病の遺伝子治療に成功した。GFP 陽性骨髄細胞をもつキメラマウスを用いて組織修復過程における骨髄幹細胞の関与を検討した。in vitro での mismatch 修復アッセイ系を確立し、オリゴヌクレオチドによる遺伝子変換の可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Orimo, H., Goseki-Sone, M., Inoue, M., Tsubakio, Y., Sakiyama, T., and Shimada, T. (2002) Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Metab.*, 20: 28-33
- 2) Watanabe, A., Kawabata, Y., Okada, O., Tanabe, N., Kimura, H., Hatamaochi, A., Shinkai, H., Sakai, N., Shimada, T., Hiroshima, K., Kuriyama, T. (2002) Ehlers-Danlos syndrome type IV with few extrathoracic findings: a newly recognized point mutation in the COL3A1 gene. *Eur. Respir. J.* 19:195-198
- 3) Migita M., Hamada, H., Fujimura, J., Watanabe, A., Shimada, T., Fukunaga, Y. Glucocerebrosidase level in the cerebrospinal fluid during enzymereplacement therapy -unsuccessful treatment to the neurological abnormality of type 2 Gaucher disease-. *Eur. J. Paed.* (in press)
- 4) Inokuchi, K., Yamaguchi, H., Hanawa, H., Tanosaki, S., Nakamura, K., Tarusawa, M., Miyake, K., Shimada, T. (2002) Loss of DCC gene expression is of prognostic importance in acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Res.* 8:1882-1888
- 5) Igarashi, T., Miyake, K., Kato, K., Watanabe, A., Ishizaki, M., Ohara, K., and Shimada, T. (2003) Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther.* 10:219-226
- 6) Igarashi, T., Miyake, K., Suzuki, N., Kato, K., Takahashi, H., Ohara, K., and Shimada, T. (2002) New strategy for *in vivo* transgene expression in corneal epithelial progenitor cells. *Current Eye Res.* 24:46-50
- 7) Takahashi, H., Hirai, Y., Migita, M., Seino, Y., Fukuda, Y., Sakuraba, H., Kase, R., Kobayashi, T., Hashimoto, Y., and Shimada, T. Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:13777-13782
- 8) Orimo, H., et al. (2002) G317D mutation in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with childhood hypophosphatasia in a German family. *J. Inherited Metabolic Disease*, in press
- 9) Mochizuki, H., Hayakawa, H., Migita, M., Shimada, T., Masyuki, M., Mizuno, Y. (2002) Anti-apoptotic therapy for Parkinson's disease: overexpression of an apf-1-dominant-negative inhibitor can block MPTP toxicity. *Mapping the Program of Alzheimer's and Parkinson's Disease.* (edited by Mizuno et al.) p.469-472, Kluwer Academic Publishers
- 10) Mochizuki, H., Miura, M., Shimada, T., Mizuno, Y. (2002) Adeno-associated virus mediated antiapoptotic gene delivery: *in vivo* gene therapy for neurological disorders. *Methods* 28: 248-252
- 11) Tanaka, R., Komine-Kobayashi, M., Mochizuki, H., Yamada, M., Furuya, T., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y., Urabe, T. Migration of EGFP expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience*, in press
- 12) Inokuchi, K., Inami, M., Nakayama, K., Tamura, H., Shimada, T., and Dan, K. Simultaneous novel BCR-ABL gene mutation and increased expression of BCR-ABL mRNA caused clinical resistance in a double Ph-positive acute biphenotypic leukemia. Submitted

- 13) Inokuchi, K., Dan, K., Takatori, M., Takahuji, H., Uchida, N., Inami, M., Honda, H., Hirai, H., Shimada, T. Novel transgenic mice expressing P230 Bcr/Able developed myeloproliferative disorder: Longer disease latency, thrombocytosis and mild leukocytosis. in press
 - 14) Migita, M., Uchikoba, Y., Oriomo, H., Shimada, T., Matsumoto, T., Hayakawa, J., Fujino, O., Saitoh, M., Fukunaga, Y. Genetic diagnosis of Werdnig-Hoffmann disease-A problem for application to prenatal diagnosis. J. Nippon Med. Sch. in press
 - 15) Migita, M., Shimada, T., Hayakawa, J., Morita, T., Fukunaga, Y. Home treatment with enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Pediatr. Int.* in press.
 - 16) Sugiyama, O., Oriomo, H., Suzuki, S., Yamashita, K., Ito, H., Shimada, T. Bone formation following transplantation of genetically modified primary bone marrow stromal cells. *J. Orthop. Res.* in press
 - 17) Furuya, T., Tanaka, R., Urabe, T., Hayakawa, J., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y., and Mochizuki, H. Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders. *NeuroReport* in press
 - 18) 島田隆：遺伝子治療の理念と方法。（わかりやすいゲノム・再生医療の基礎・現状・展望）*medicina* 39:398-400 (2002)
 - 19) 五十嵐勉、島田隆、大原國俊：遺伝子治療の基礎と眼疾患への応用。あたらしい眼科。19: 1185-1196 (2002)
 - 20) 渡邊淳、島田隆：遺伝子診断からみた未病。Progress in Medicine 22: 19-122(2002)
 - 21) 早川潤、右田真、島田隆、福永慶隆：骨髄幹細胞の多能性と再生医療への応用。小児科。8: 1056-1061(2002)
2. 学会発表
 - 1) Igarashi T., Miyake K., Kato M., Kato K., Suzuki N., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: HIV Vector Mediated Expression of Angiostatin Efficiently Inhibits Neovascularization in a Murine Proliferative Retinopathy Model. The Association for Rresearch in Vision and Ophthalmology (Florida) 2002. 5.
 - 2) Miyake, K., Suzuki, N., Shimada, T.: Lentiviral Mediated Systemic Antiangiogenic Gene Therapy of Non-Hodgkin Lymphoma. The 5th Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy (Boston) 2002. 6.
 - 3) Suzuki, N., Miyake, K., Shimada, T.: A Novel Transfection-Free Packaging Strategy of HIV Vector Using a CHO Based Packaging Cell Line and an Adenovirus Based Expression Vectors. The 5th Annual Meeting of The American Society of Gene Therapy (Boston) 2002. 6.
 - 4) Kato K., Miyake K., Suzuki N., Okabe M., Igarashi T., Nagashima M., Yoshino. S, Shimada S.: HIV Vector-Mediated Gene Transfer of Angiostatin Inhibits Synovial Cell Proliferation and Angiogenesis of Collagen Induced Mouse Model. American society of gene therapy (Boston) 2002.6.
 - 5) Noro, T., Miyake, K., Suzuki, N., Uchida, E., Yamazaki, Y., Shimada, T.: AAV Mediated Systemic Anti-angiogenic Gene Therapy for Pancreatic Cancer Metastases. American Society of Gene Therapy 5th Annual Meeting (Boston) 2002. 6.
 - 6) Takahashi, H., Hirai, Y., Seino, Y., Sakuraba, H., Kase, R., Hashimoto, Y., Shimada, T.: Adeno-associated Virus Vector Mediated Muscle Directed Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease. American Society of Gene Therapy (Boston) 2002. 6.
 - 7) Shimada, T.: 7th international symposium on mucopolysaccharide

- and related diseases, 3rd scientific lysosomal storage disorders congress (Paris) 2002. 6.
- 8) Shimada, T.: Targeted gene transfer by recombinant viral vectors. 2002 ICH Gene Therapy Workshop (Vienna, VA) 2002, 9.
 - 9) Shimada, T.: AAV mediated gene therapy for lysosomal storage diseases. International Symposium on the the Current Status of Gene Therapy (Seoul, Korea) 2002, 10.
 - 10) Igarashi T., Miyake M., Kato M., Hayakawa J., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Bone marrow cells differentiated into neuron and glia in the mouse retina. The international society for eye research congress(Geneva) 2002.10.
 - 11) Igarashi T., Miyake K., Kato K., Kato M., Kurai K., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. European society of gene therapy. (Antibes, France)2002.10
 - 12) Kurai T., Igarashi T., Kato M., Noro T., Miyake K., Ogawa K., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Adeno-associated virus mediated systemic delivery of endostatin inhibits retinal angiogenesis without affecting growth and development of newborn mice. Adeno-associated virus mediated systemic delivery of endostatin inhibits retinal angiogenesis without affecting growth and development of newborn mice. European society of gene therapy. (Antibes, France)2002.10.
 - 13) Hiranuma T., Watanabe A., Kinoshita H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Matsukura M., Miike T., Shimada T.:Vascular smooth muscle specific gene expression in vivo by the fiber-modified adenovirus vector. 52nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Baltimore) 2002.10
 - 14) Miyake, K., Inokuchi, K., Suzuki, N., Shimada, T.: Suppression of Granulocytosis and Thrombocytosis by Systemic Antiangiogenic Gene Therapy for Myeloproliferative Disorders Induced by P230 Bcr-Abl in Transgenic Mice. The 44th Annual Meeting of The American Society of Hematology (Philadelphia) 2002. 12.
 - 15) Miyake, K., Suzuki, N., Okabe, M., Shimada, T.: Comparative Evaluation of the Systemic Antiangiogenic Gene Therapy by Lentiviral Mediated Stem Cell Gene Transfer in a Mouse Model of Multiple Myeloma. The 44th Annual Meeting of The American Society of Hematology (Philadelphia) 2002. 12.
 - 16) Tanabe, H., Miyake, K., Shimada, T.:Expression of Bruton's Tyrosine Kinase in Hematopoietic Stem Cells Was Not Sufficient for Restore Immunoglobulin Concentration in X-Linked Immunodeficient Mice. 44th Annual Meeting of The American Society of Hematology (Philadelphia) 2002. 12.
 - 17) Igarashi T., Kurai T., Hayakawa J., Kato M., Kawabata K., Miyake K., Ishizaki M., Takahashi H., Ohara K., Shimada T.: Circulating bone marrow cells migrated into the retinal tissue of the newborn mice and differentiated into retinal cells. American Society of Hematology(Philadelphia) 2002.12.
 - 18) 早川潤、右田真、島田隆、福永慶隆：GFP+骨髄幹細胞と間葉系幹細胞を持つ2種類のキメラマウスの作成・間葉幹細胞の多能性の解明に向けて。第105回日本小児科学会総会(名古屋)2002.4.
 - 19) 早川潤、右田真、林田真理、倉持雪穂、島田隆、福永慶隆：GFP陽性骨髄細胞のモデルマウスの作製～骨髄細胞の多能性の解明に向けて～。第一回日本再生医学学会総会(京都)2002.4.
 - 20) 五十嵐勉、三宅弘一、加藤美穂、加藤興、鈴木紀子、高橋浩、大原國俊、島田隆：HIVベクターを使った網膜新生血管に対する遺伝子治療。第106回日本眼

- 科学会総会 (仙台) 2002.5.
- 21) 渡辺淳、平井幸彦、浅野ありさ、島田隆：医学部における臨床遺伝教育の必要性－医学部学生のアンケート結果を通して－第26回日本遺伝カウンセリング学会 (長崎) 2002.5.
 - 22) 島田隆、渡辺淳、右田真、浅野ありさ、渡辺裕子、鈴木由美、千葉弘子：日本医科大学附属病院遺伝外来の現状.第26回日本遺伝カウンセリング学会 (長崎) 2002.5
 - 23) 鈴木由美、渡辺裕子、千葉弘子、右田真、林瑞成、折茂英生、浅野ありさ、渡辺淳、島田隆：Werdnig-Hoffmann 病の出生前診断に対する遺伝カウンセリングにおける看護職の役割.第26回日本遺伝カウンセリング学会 (長崎) 2002.5
 - 24) 三宅弘一、鈴木紀子、島田隆：血管新生抑制物質による悪性リンパ腫の遺伝子治療の検討. 第65回日本血液学会、第45回日本臨床血液学会 (横浜) 2002.
 - 25) Miyake, K., Suzuki, N., Shimada, T.: Suppression of Tumor Growth by Lentiviral Mediated Systemic Antiangiogenic Gene Therapy in Non-Hodgkin Lymphoma. The 8th Annual Meeting of The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2002. 7.
 - 26) Miyake, K., Suzuki, N., Shimada, T.: A Novel Packaging System of HIV Vectors Using CHO Based Stable Packaging Cell Line and Adenovirus Based Expression Vectors. The 8th Annual Meeting of The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2002. 7.
 - 27) Takahashi, H., Hirai, Y., Seino, Y., Hashimoto, Y., Sakuraba, H., Shimada, T. Development of AAV vector mediated enzyme replacement therapy for Fabry disease: echocardiographic evaluation of gene therapy of Fabry mice. The 8th Annual Meeting of The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2002. 7.
 - 28) Noro, T., Miyake, K., Suzuki, N., Uchida, E., Yamazaki, Y., Shimada, T. Suppression of liver metastases by intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus vector expressing endostatin in golden hamster model of pancreatic cancer. The 8th annual meeting The japan society of gene therapy (Tokyo) 2002. 7
 - 29) 早川 潤、右田 真、島田 隆、福永慶隆：骨髄生着における Dextran sulfate 及び SDF-1 の役割－臍帯血移植の適応拡大に向けて－第64回日本血液学会総会 (横浜) 2002.9.
 - 30) 渡辺裕子、鈴木由美、千葉弘子、浅野ありさ、右田真、渡辺淳、島田隆：日本医科大学付属病院遺伝外来における看護師の役割 現状と課題.第1回日本遺伝看護研究会総会 (松本) 2002.9
 - 31) 鈴木由美、渡辺淳、川瀬里衣子、島義雄、島田隆：羊水検査でマーカー染色体が発見された夫婦への遺伝カウンセリング. 第1回日本遺伝看護研究会総会 (松本) 2002.9
 - 32) 渡辺淳、平井幸彦、浅野ありさ、島田隆：日本医科大学における臨床遺伝教育の必要性－医学部2年生のアンケート結果を通して－.第70回日本医科大学医学会総会 (東京) 2002.9
 - 33) 島田隆、渡辺淳、浅野ありさ、右田真、渡辺裕子、鈴木由美、千葉弘子 日本医科大学付属病院遺伝外来の現状. 第70回日本医科大学医学会総会 (東京) 2002.9
 - 34) 高橋啓、平井幸彦、清野精彦、橋本康弘、桜庭均、島田隆 Adeno-associated Virus Vector Mediated Muscle Directed Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease. 生化学会 (京都) 2002.10
 - 35) 高橋啓、平井幸彦、清野精彦、橋本康弘、桜庭均、島田隆 Fabry 病遺伝子治療の検討：心臓超音波検査、組織学的評価による治療効果の判定先天代謝異常学会 (神戸) 2002.11
 - 36) 久安早苗、木下裕康、足立久美、平井幸彦、島田隆：AAV-TATRep78 蛋白質を用いた AAV ベクターの産生系及び遺伝子の部位特異的組込法の開発 第25回日本分子生物学会年会 (横浜) 2002.12.
 - 37) 早川 潤、右田 真、林田 真理、加藤

善史, 島田 隆、福永慶隆 GFP+骨髄移植モデルを用いた腸管再生における骨髄細胞の動態第一回日本再生医学学会総会 (神戸) 2003.3.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Mochizuki, H., Hayakawa, H., Migita, M., Shimada, T., Masyuki, M., Mizuno, Y	Anti-apoptotic therapy for Parkinson's disease: overexpression of an apf-1-dominant-negative inhibitor can block MPTP toxicity.	(edited by Mizuno et al.)	Mapping the Program of Alzheimer's and Parkinson's Disease.	Kluwer Academic Publishers		2001	p351-363

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Orimo, H., et al.	Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia.	J. Bone Miner. Metab.	20	28-33	2002
Watanabe, A., et al.	Ehlers-Danlos syndrome type IV with few extrathoracic findings: a newly recognized point mutation in the COL3A1 gene.	Eur. Respir. J.	19	195-198	2002
Migita M. et al.	Glucocerebrosidase level in the cerebrospinal fluid during enzymereplacement therapy -unsuccessful treatment to the neurological abnormality of type 2 Gaucher disease-	Eur. J. Paed. (in press)			2002
Inokuchi, K., et al.	Loss of DCC gene expression is of prognostic importance in acute myelogenous leukemia.	Clinical Cancer Res.	8	1882-1888	2002
Igarashi, T., et al.	Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model.	Gene Ther	10	219-226	2003
Igarashi, T., et al.	New strategy for in vivo transgene expression in corneal epithelial progenitor cells.	Current Eye Res.	24	46-50	2002
Takahashi, H., et al.	Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	99	13777-13782	2002
Orimo, H., et al.	G317D mutation in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with childhood hypophosphatasia in a German family.	J. Inherited Metabolic Disease, in press			2003
Mochizuki, H., et al.	Adeno-associated virus mediated antiapoptotic gene delivery: in vivo gene therapy for neurological disorders	Methods	28	248-252	2002
Tanaka, R., et al.	Migration of EGFP expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia.	Neuroscience, in press			2003
Inokuchi, K., et al.	Novel transgenic mice expressing P230 Bcr/Able developed	Blood, in press			2002

	myeloproliferative disorder: Longer disease latency, thrombocytosis and mild leukocytosis. in press				
Migita, M., et al.	Genetic diagnosis of Werdnig-Hoffmann disease-A problem for application to prenatal diagnosis-.	J. Nippon Med. Sch. in press			2003
島田隆	遺伝子治療の理念と方法. (わかりやすいゲノム・再生医療の基礎・現状・展望)	medicina	39 8- 40 0	39	2002
五十嵐勉、島田隆、大原國俊	遺伝子治療の基礎と眼疾患への応用.	あたらしい眼科.	19	1185-1 196	2002
渡邊淳、島田隆	遺伝子診断からみた未病	Progress in Medicine	22	19-122	2002
早川 潤、右田 真、島田隆、福永慶隆	骨髄幹細胞の多能性と再生医療への応用.	小児科.	8	1056-1 061	2002

20020422

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.11-P.13の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。