

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤敬也

平成15(2003)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. 造血幹細胞の純化技術の確立	8
峯石 真	
2. 造血障害の病態解析	10
山下 孝之	
3. サルを用いた骨髄移植モデルの作成	11
寺尾 恵治	
4. 細胞増殖分化制御遺伝子の開発	19
長谷川 護	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------	----

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。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（SAG: selective amplifier gene）〕の開発を進めた。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、その活性を制御する分子スイッチとして、従来のステロイド受容体ホルモン結合ドメイン（第一世代 SAG 用）以外に、エリスロポエチン（EPO）受容体細胞外ドメイン（第二世代 SAG 用）の評価を行った。本年度は、マウスの系で、EPO 反応型第二世代 SAG の有効性と安全性を確認した。カニクイザルを用いた実験では、第一世代 SAG で増幅した造血系前駆細胞が複数のクローンから構成されることを明らかにした。さらに、移植前処置に代わる方法として、骨髄還流置換法が有用であることを、サルで明らかにした。また、疾患モデルマウス（慢性肉芽腫症モデル）の系では、治療用遺伝子と第一世代 SAG を組み合わせた治療実験を行い、SAG システムの効果を確認した。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技術の開発が鍵になる。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ゲノム着脱システム（ゲノムへの組込みと取り外し）の新規開発を進めた。特に、アデノウイルスベクターを未分化造血系細胞へ効率よく感染させるためのアダプター分子の評価を行った。その他、CD34 陽性細胞の採取・純化・移植に関する技術の確立や、対象疾患の診断技術に関する研究を行い、今後の臨床展開に備えた。

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

センター長

長谷川 護

ディナベック研究所

所 長

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、

A. 研究目的

細胞治療は今後大きな発展が期待される

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行っている。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、細胞制御遺伝子ゲノム着脱システム（ゲノムへの組込みと取り外し）の開発を行っている。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。

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発を推進し、数年以内にその臨床応用を図るのが本研究の主な目的であり、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。その他、大量のヒト CD34 陽性細胞の採取・純化および移植技術の確立や、対象となる疾患〔慢性肉芽腫症・ファンコニ貧血（FA）など〕の診断技術に関する研究を並行して進め、本研究の臨床展開を図りやすい環境を整備する。

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（小澤、長谷川、寺尾）：

第一世代のエストロゲン反応型選択的増幅遺伝子（SAG: selective amplifier gene）

（GcR-ER：変異型 G-CSF 受容体とエストロゲン受容体ホルモン結合領域の融合蛋白質をコードする遺伝子）以外に、新規に開発したエリスロポエチン（EPO）反応型 SAG [EPO 受容体細胞外領域と Mpl 受容体の細胞内領域の融合蛋白質をコードする遺伝子（EPORMpl 遺伝子）：第二世代 SAG] について、マウスの造血系再構築実験でその有効性を検討した。尚、解析用マーカーとして、ミトコンドリア局在黄色蛍光タンパク質（mtYFP）を用いた。マウスを用いた個体レベ

ルの実験では、EPORMpl-ires-YFP 遺伝子、あるいはコントロールとして YFP 遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを骨髄細胞に *in vitro* で感染させた。その後、放射線照射マウスに尾静脈から移植した。移植後 6 週目から 1 週間マウス EPO（rmEPO）を投与した。さらに 10 週後に再び 1 週間 rmEPO を投与した。マウス末梢血における遺伝子導入細胞の比率はフローサイトメーターにより解析した。また、二次移植を行い、同様の解析を行った。さらに、霊長類のサルを用いた実験も平行して開始した。

第一世代の SAG を用いて遺伝子導入を行い、エストロゲン刺激で遺伝子導入細胞の増幅が見られたサルについては、inverse PCR 法によって、造血系再構築に寄与したクローンの経時的解析を行った。即ち、SAG システムによって明らかに遺伝子導入細胞の増加が認められた時期（移植後 1、2、10、11 ヶ月）の骨髄細胞からコロニーを作り、個々のコロニーから DNA を抽出した。レトロウイルスベクターの特異的配列（LTR 配列）を指標にして inverse PCR を行い、レトロウイルスベクターの挿入部位をクローン化し、その塩基配列を決定した。

また、臨床応用を考慮し、移植前処置としての骨髄廃絶を行わない自家移植が可能かどうかサルの系で検討した。即ち、より侵襲性の低い骨髄採取・移植法である＜骨髄還流置換法（Bone Marrow Replacement, BMR）＞（池原法）の応用である。3～5 歳の雄カニクイザル 3 頭を用い、全身麻酔下で大腿骨もしくは上腕骨の両端を露出させ、長骨両端に穿刺針を留置した。穿刺針の近位端に PBS を入れた 20ml シリンジ、遠位端に骨髄採取用 20ml シリンジを取り付け、髓腔内を陰圧に保つように遠位端のシリンジを吸引しながら、近位端のシリンジから滅菌 PBS を還流させ、50ml を還流したところで採取を終了した。長骨への細胞の移植は、1ml の細胞浮遊液を充填した 2.5ml シリンジを骨髄遠位端に取り付け、近位端に取り付けた空のシリンジに陰圧をかけ、髓腔内に細胞を移植した。移植後、2～8 週間隔で腸骨より骨髄を採取し、造血系コロニーアッセイを行い、導入遺伝子の検出をリアルタイム PCR 法にて行った。

その他、G₀ 期にある造血幹細胞への遺伝

子導入にはレンチウイルスベクターが適していると思われるが、非病原性のサル免疫不全ウイルス (SIVagm) に由来するベクターの利用を検討した。方法は、サル CD34 陽性細胞に SIV ベクターで GFP 遺伝子を導入し、その効率を調べた。尚、SIV ベクターを用いた霊長類の実験計画は、国立感染症研究所および文部科学省 (基準外組換え DNA 実験) から既に承認を受けている。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験 (小澤) :

造血幹細胞修復治療のモデル実験として、gp91 遺伝子ノックアウトにより作製された X 連鎖慢性肉芽腫症モデルマウス (X-CGD マウス : 好中球など食細胞が活性酸素を産生できない) を用い、エストロゲン反応型第一世代 SAG の *in vivo* 細胞増幅効果を解析した。即ち、X-CGD マウスの骨髄細胞に GcR-ER・gp91 両遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、造血能を破壊した X-CGD レシピエントに移植した。造血系再構築後、半数の移植個体にエストロゲンを 4 週毎に 6 回投与した。また、エストロゲン非投与群では、同じ観察期間終了後にエストロゲン投与による反応性を確認した。

3) 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 (小澤) :

造血細胞において、Cre/loxP を応用した分化制御システムとそれに必要な一過性遺伝子導入システムの開発を行った。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 (ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 α 遺伝子など) を働かせ、その後 Cre リコンビナーゼを一過性に発現させてこの遺伝子を取り外す方法を開発中である。前年度には、一過性に Cre を発現させるアデノウイルス (Ad) ベクターと造血幹細胞とを架橋するアダプター分子 [CAR-SCR : アデノウイルス受容体 (CAR) の細胞外領域と SCF 細胞外領域の融合蛋白質] を開発し、細胞株を用いて検討したが、本年度は臍帯血および骨髄由来の CD34 陽性細胞を用いて感染効率の検討を行った。

2. 臨床応用に向けた準備 (峯石、山下、小澤) :

ヒト造血幹細胞の採取法に関して、G-CSF 投与後の末梢血から大量の生着可能な CD34

陽性細胞を効率よく分離する細胞処理技術を確認し、移植後の造血回復・免疫回復を確認した。これまでにこのような移植法を用いて移植した患者の移植成績を追究した。

また、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するため、個々の患者の病態を検討した。特に、FA 蛋白が形成する分子経路の機構の解析と、日本人患者における遺伝子変異の検索を行った。

(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。遺伝子解析などの臨床研究を実施する場合は、被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除すると共に、インフォームドコンセントをきちんと取得した。

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 : EPORmpl-ires-YFP 発現レトロウイルスベクター、あるいは YFP 発現ベクターで遺伝子導入した骨髄細胞の移植により、YFP 陽性細胞を末梢血に認めるマウスが得られた。これらのマウスをそれぞれ 2 群に分け、一方に rmEPO を投与し、他方は rmEPO 非投与群として飼育した。その結果、EPORmpl-ires-YFP 遺伝子導入マウスでは rmEPO に反応して、投与 1~2 週後に末梢血中の YFP 陽性細胞の比率が有意に上昇した。これに対し、EPO 非投与群では YFP 陽性細胞の比率の上昇は見られなかった。コントロールマウスである YFP 遺伝子のみを導入したマウスでは、rmEPO の有無に関わらず、YFP 陽性細胞の比率は変動しなかった。また、EPORmpl-ires-YFP を導入した細胞を移植したマウスの骨髄を採取し、別の放射線照射マウスに二次移植したところ、rmEPO に対する反応が軽度ではあるが観察された。尚、遺伝子導入したマウスに白血病発症などの異常は観察されなかった。第二世代 SAG に関するサルを用いた実験は、

現在、実施中である。

第一世代 SAG を用いて造血系前駆細胞 (CFU) の増幅が得られたカニクイザルでは、移植後 1、2 ヶ月で 50%に迫る高い遺伝子マーキングレベルが得られた。内因性のエストロゲンに反応したと思われる。しかし、その後漸減し 6 ヶ月目に 5%となった。そこで SAG の分子スイッチをオンにするエストロゲンを投与したところ、移植後 10、11 ヶ月目にはマーキングレベルが再び 30%まで上昇し、サル体内で遺伝子導入細胞が選択的に増幅したことを確認した。そこで、体内で増幅した CFU のクローン解析 (inverse PCR 法/塩基配列決定) を行ったところ、14 個の独立クローンが得られた。この結果より、SAG による増幅システムでは、サル体内で複数のクローンに由来する造血系前駆細胞が増幅したことを確認することができた。

骨髓還流置換法による移植法の検討では、一端から圧をかけ陽圧で他端から流出させる方法 (陽圧法) と、一端から吸引し髄腔内を陰圧にして他端から流入させる方法 (陰圧法) がある。陽圧法では、血栓塞栓症などを誘発する危険性があるが、今回、髄圧モニター装置を用いて術中の髄圧を常時モニターしながら、陰圧法で骨髓採取 (還流)、細胞移植 (置換) の両方を行う方法を確立した。また、この方法では、移植後 2 週目には導入遺伝子陽性前駆細胞が移植部位と異なる腸骨内に検出され、移植細胞が比較的短時間に骨髓内を移動することが判明した。

SIV ベクターを用いたサル CD34 陽性細胞への GFP 遺伝子の導入では、CD34 陽性細胞の約 50%、CFU の約 30%が GFP 陽性になった。また、レトロウイルスベクターで 4 日を要した遺伝子導入が、SIV ベクターを用いれば 1 日で同等の結果が得られた。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験 :

GcR-ER・gp91 両遺伝子を導入した骨髓細胞で造血系を再構築した X-CGD マウスにおいて、半数の個体にエストロゲンを投与した。その結果、エストロゲン投与群では初回から 2 週以内に活性酸素産生好中球が $11 \pm 4\%$ から $32 \pm 36\%$ に増加したのに対し、対照群では $8 \pm 2\%$ から $4 \pm 4\%$ に低下した。その後の反復投与期間中、対照群の活性酸素産

生好中球の割合は 5%以下と低値で推移したが、エストロゲン投与群ではおおむね 20%以上を維持し、20 週以上にわたり有意差を持続した。6 回の投与後、12 週あけて先の対照群にエストロゲンを投与したところ、活性酸素産生好中球は $5 \pm 5\%$ から $37 \pm 4\%$ へと増加し、第一世代 (GcR-ER 遺伝子) を用いた細胞増幅効果を再確認した。

3) 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 :

Cre/loxP 法による細胞分化制御遺伝子のゲノム着脱システムを確立するため、造血幹細胞で Cre を一過性に発現させる方法について検討を進めた。ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞への eGFP 発現 Ad ベクター遺伝子導入において、前年度に開発した Ad 架橋蛋白質 CAR-SCF を培養液に添加することで、eGFP 陽性率は $9.8 \pm 3.7\%$ から $17.5 \pm 2.5\%$ に改善され、骨髓由来 CD34 陽性細胞でも同様の効果が得られた。

2. 臨床応用に向けた準備 :

大量末梢血幹細胞採取・純化 (純化後で 6×10^6 CD34 cells/kg 以上) を安定して行なうことができた。純化後の CD34 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。純化操作によっても幹細胞の生着力は保持された。

FA 蛋白が形成する分子経路の検討では、核局在シグナル (NLS) と FANCG 結合領域を持つ FANCA 蛋白 N 末領域の機能を明らかにするため、種々の変異体を解析した。その結果、安定な FA 複合体の形成は FANCD2 活性化に促進的に働くが、必須ではなく、FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たすことが示唆された。日本人患者における遺伝子変異の検索では、非血縁 10 家系において FANCG 両アリルの変異を同定した。いずれの変異も固有の haplotype と完全に関連しており、各々が共通の祖先に由来する founder 変異であることが示された。

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 :

第二世代 SAG が効率的に働くことがマウスの系で確認できた。EPO の投与は重篤な

副作用もなく、安全に行うことができた。第一世代の場合のエストロゲンあるいはタモキシフェンに比べて、使いやすい誘導剤であるという感触が得られ、臨床応用も適しているものと考えている。現在、サルを用いた前臨床研究として、第一世代 SAG を凌ぐ増幅効果が得られるかどうか、検討を進めている。また、SAG システムによって増幅された遺伝子導入細胞が多クローン性であることを、第一世代 SAG を用いたサルの実験系で確認した。即ち、単一クローンの非特異的変動によるものでないことが確認された。

移植法に関しては、安全で確実な骨髓還流置換法を確立したが、この方法を採用することにより、移植前処置を行わないで済む見通しが立った。非腫瘍性疾患を対象とした細胞移植/遺伝子治療を行う上で重要な基盤技術になるものと期待される。尚、前処置を行わない骨髓内移植法で移植した遺伝子導入細胞を、SAG システムでさらに増幅できるかどうか、サルを用いて検討を開始している。

造血幹細胞への遺伝子導入法については、これまでの実験ではレトロウイルスベクターを用いてきた。一方、レンチウイルスベクターは、その感染に際して細胞分裂を必要としないというユニークな特徴がある。造血幹細胞は分裂頻度が低いうえ、分裂させると容易に分化してしまうため、細胞分裂を起こさずに遺伝子導入できるレンチウイルスベクターはきわめて有望である。実際、サル CD34 陽性細胞に対してレンチウイルスベクターを用いると、レトロウイルスベクターよりはるかに短時間で同程度の遺伝子導入が可能であり、培養期間が短く済む分だけ造血幹細胞の生着能や分化能を損なわずに遺伝子導入できる可能性が示された。尚、一般的には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をベースにしたものが用いられている。しかし、HIV-1 はヒトに対して強い病原性がある点が懸念される。ところが、同じ霊長類レンチウイルスでも、アフリカミドリザル由来のもの (SIVagm: Simian Immunodeficiency Virus African green monkey) は自然宿主に対して病原性がない。しかも、HIV-1 とは遺伝学的にかなり離れている。したがって、SIVagm ベクターが

HIV-1 と組換えを起こして新種ウイルスを作り出す可能性は低く、安全性が高いものと想定される。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験:

疾患モデル動物 (X-CGD マウス) を用いた細胞治療実験で第一世代 SAG システムの有用性を検討したが、エストロゲン刺激に反応して遺伝子導入好中球が早期に増加したことは、GcR のシグナルが主に顆粒球・単球系前駆細胞の増殖を促すことを示唆している。したがって、GcR-ER は慢性肉芽腫症など、このリニエージを冒す疾患の遺伝子治療の効果増強に適している。一方、他のリニエージまたはより未熟な造血前駆細胞/幹細胞を増幅するためには、それに適するシグナルを発する造血因子受容体を探索する必要がある。そこで、c-Mpl のシグナルをエリスロポエチンで制御する第二世代 SAG について、X-CGD マウスを用いて *in vivo* 実験を開始した。予備実験では、やはり効果が認められている。

3) 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:

Cre/loxP を応用した分化制御システムと CAR-SCF による一過性遺伝子導入システムの組み合わせを検討している。造血細胞で一過性の遺伝子発現が必要な場合には、染色体に組み込まれない Ad ベクターが適している。我々は Ad ベクターの造血細胞への吸着を仲介するアダプター分子を開発し、従来は困難であった未分化造血系細胞への Ad ベクターによる遺伝子導入を可能とした。造血幹細胞を利用した細胞治療を推進するため、これらのシステムを応用した CD34 陽性細胞体外増幅法の実用化が待たれる。また、このような体外増幅システムは、造血幹細胞以外の細胞への応用も考えられ、将来的には広汎な発展が期待される。

2. 臨床応用に向けた準備:

免疫磁気ビーズ法は CD34 陽性細胞純化の実用的な方法である。純化の手順も簡略であり短時間で施行可能であり純化された CD34 陽性細胞の純度、回収率とも従来の方法を上回っている。

FA に関しては、分子病態の解析が進み、また、日本人 FA 患者の遺伝子解析を行った。重要な知見が蓄積されてきたと考えている。

E. 結論

遺伝子導入造血系細胞の体内増幅に関しては、EPO 反応型第二世代 SAG の評価を進め、マウスを用いた個体レベルの実験で、その有効性と安全性が確認された。慢性肉芽腫症の疾患モデルマウスの治療への応用でも、SAG システム（今回は第一世代のもの）の効果が認められた。臨床応用を図るには、さらに霊長類のサルで有効性と安全性を評価する必要がある、その実験を進めている。また、骨髄還流置換法という移植前処置に代わる方法を確認した。その他、将来的な遺伝子導入法として、SIV ベクターの評価を行った。

造血幹細胞の体外増幅に必要な遺伝子操作テクノロジーに関しても、基盤技術の開発を着実に進めた。

その他、臨床応用のための基盤技術として、免疫磁気ビーズ法による CD34 陽性細胞純化法を行い、臨床的に有用なレベルの造血幹細胞の純化を短時間に施行可能とした。この方法は臨床的遺伝子導入の標的細胞を準備するのに有用である。また、FA の分子病態の解析、日本人 FA 患者の遺伝子解析を行った。

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) Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Ozawa, K., and Hasegawa, M.: New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 170-176, 2003.
- 2) Kume, A., Koremoto, M., Xu, R., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J. Gene Med.* 5: 175-181, 2003.
- 3) Kami, M., Hamaki, T., Miyakoshi, S., Murashige, N., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., Taniguchi, S., Hirai, H., Ozawa, K., and Kasai, M.: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J.*

Haematol. 120: 304-309, 2003.

- 4) Komatsu, N., Watanabe, T., Uchida, M., Mori, M., Kirito, K., Kikuchi, S., Liu, Q., Tsuchi, T., Miyazawa, K., Endo, H., Nagai, T., and Ozawa, K.: A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. *J. Biol. Chem.* 278: 6411-6419, 2003.
- 5) Kume, A., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K., Ozawa, K., and Takaku, F.: Lymphoid reconstitution in X-linked severe combined immunodeficient mice by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Japan Acad.* 78, Ser.B: 211-216, 2002.
- 6) Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ohto, K., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Donahue, R.E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: Safe and efficient methods of autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical research in cynomolgus monkeys. *Comp. Med.* 52: 445-451, 2002.
- 7) Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., and Ozawa, K.: Selective expansion of transduced cells for hematopoietic stem cell gene therapy. *Int. J. Hematol.* 76: 299-304, 2002.
- 8) Hanazono, Y., Terao, K., Shibata, H., Nagashima, T., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Kato, I., Kume, A., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: Introduction of the green fluorescent protein gene into hematopoietic stem cells results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates. *J. Gene Med.* 4: 470-477, 2002.
- 9) Asano, T., Hanazono, Y., Ueda, Y., Muramatsu, S., Kume, A., Suemori, H., Suzuki, Y., Kondo, Y., Harii, K., Hasegawa, M., Nakatsuji, N., and Ozawa, K.: Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol. Ther.* 6: 162-168, 2002.
- 10) Hanazono, Y., Nagashima, T., Takatoku, M., Shibata, H., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Dunbar, C.E., Kume, A., Terao, K., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther.* 9: 1055-1064, 2002.
- 11) Kume, A., Koremoto, M., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K.,

- and Ozawa, K.: Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients. *Bone Marrow Transplant.* 30: 113-118, 2002.
- 12) Kirito, K., Osawa, M., Morita, H., Shimizu, R., Yamamoto, M., Oda, A., Fujita, H., Tanaka, M., Nakajima, K., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood* 99: 3220-3227, 2002.
- 13) Otsuki, T., Nagashima, T., Komatsu, N., Kirito, K., Furukawa, Y., Kobayashi, S., Liu, J.M., and Ozawa, K.: Phosphorylation of Fanconi anemia protein, FANCA, is regulated by Akt kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 628-634, 2002.
- 14) Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 99: 102-110, 2002.
- 15) Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol-3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.* 277: 8329-8337, 2002.
- 16) Saito T, Kanda Y, Kami M, Kato K, Shoji N, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Nakai K, Ogasawara T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Takaue Y, and Mineishi S.: Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 8:1014-1020, 2002.
- 17) Adachi D, Oda T, Yagasaki H, Nakasato K, Taniguchi T, D'Andrea AD, Asano S, Yamashita T: Heterogenous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. *Hum Mol. Genet.* 11:3125-3134, 2002.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 「選択的増殖性を付与する遺伝子」
出願日 1996.03.05
出願番号 特願平9-531668
公開番号 W097/32971
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
2. 「2遺伝子を発現するベクター (SIV)」
出願日 1999.6.22
出願番号 特願平11-175646
公開番号 W000/78987
発明者：中島俊洋、中丸健治、長谷川護、速水正憲、井戸栄治
3. 「ヘマグルチニン活性を有するシールドタイプレトロウィルスベクター」
出願日 2000.6.1
出願番号 特願2000-169090
発明者：長谷川護、米満吉和、中島俊洋、榊原裕幸、中丸健治、飯田章博、小林雅典、上田泰次
4. 「可逆的遺伝子導入ベクター」
出願日：2001年7月5日
発明者：伊藤章、花園豊、小澤敬也
“Vector for Reversible Gene Integration”
出願国：アメリカ
出願日：2002年7月3日
発明者：伊藤章、花園豊、小澤敬也
5. 「アデノウイルス吸着架橋剤」
出願日：2001年10月16日
発明者：伊藤章、花園豊、岡田尚巳、小澤敬也
出願国：アメリカ
出願番号：仮出願中
発明者：伊藤章、花園豊、岡田尚巳、小澤敬也

造血幹細胞の純化技術の確立

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 動員・採取を繰り返すことによって体内での幹細胞増幅ともい
うべき大量末梢血幹細胞採取を行い免疫磁気ビーズの付いた抗 CD34 モノ
クローナル抗体を用いて無菌操作のもとに CD34 陽性細胞を高い純度と高
い効率で純化する。ついでこの細胞を患者に移植し臨床経過を追跡する。
この研究により末梢血幹細胞からの CD34 陽性細胞の臨床規模での純化技
術と CD34 陽性細胞の移植法が確立され、遺伝子導入された細胞の移植を
行なう技術の準備が整った。

A. 研究目的

造血細胞遺伝子治療のターゲットとしての幹細胞の純化は遺伝子導入効率を上げる
うえで欠かせない。ここでは臨床的な幹細胞遺伝子治療の前段階として実用可能な大
量 CD34 陽性細胞採取・純化および移植の技術を確立することを目的とする。

B 研究方法

動員・採取を繰り返すことによって体内での幹細胞増幅ともい
うべき大量末梢血幹細胞採取を行い免疫磁気ビーズの付いた抗
CD34 モノクローナル抗体を用いて無菌操作のもとに高い純度と高い効率で純化した。
ついでこの細胞を患者に移植し臨床経過を追跡した。また、これまでにこのような移
植法を用いて移植した患者の移植成績を追跡した。

(倫理面への配慮)

この移植においては当施設の IRB で認
可されたプロトコルを用い、事前に充分
に説明し同意書に署名を頂いた。

C. 研究結果

大量末梢血幹細胞採取・純化(純化後で
 6×10^6 CD34cells/kg 以上) を安定して行
なうことができた。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
っても幹細胞の生着力は保持された。合併
症としては感染症がもっとも重篤になりや
すく、特に再移植の例、重篤感染症合併の
既往がある例では要注意である。

D. 考察

免疫磁気ビーズ法は CD34 純化の実用的
な方法である。純化の手順も簡略であり短
時間で施行可能であり純化された CD34 細

胞の純度、回収率とも従来の方法を上回る。

E. 結論

免疫磁気ビーズ法による CD34 陽性細胞純化法は臨床的に有用なレベルの造血幹細胞の純化を短時間に施行可能とした。この方法は臨床的遺伝子導入の標的細胞を準備するのに有用である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Saito T, Kanda Y, Kami M, Kato K, Shoji N, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Nakai K, Ogasawara T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Takaue Y, and Mineishi S: Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. Clin. Cancer Res 8:1014-1020, 2002

2) Mineishi S, Kanda Y, Saito T, Nakai K, Makimoto A, Kami M, Tanosaki R, Wakasugi H, Tobinai K, and Takaue Y: Impact of GVHD in reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for patients with hematological malignancies. Br. J. Haematol. (in press)

H. 知的財産権の出願状況

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)は常染色体劣性遺伝性の造血疾患で、白血病への高率な進行、固形癌や先天奇形の合併、染色体不安定性を特徴とする。遺伝的に 8 群(A-G)に分類され、7つの遺伝子が同定されている。現在の FA 分子経路モデルでは、FANCA/C/E/F/G を含む核内複合体に依存した FANCD2 の活性化がゲノム安定化に重要な役割を果たすとされる。我々が行った FANCA の種々の変異体を用いた解析の結果は、FANCD2 の活性化にとって、FA 蛋白の安定な複合体の形成は促進的に働くが必須ではなく、これと独立して FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たすことを示唆する。また、日本人 FA の 10 家系(約 20%)が G 群に属し、FANCG 変異アレルの大部分が 2 種類の founder 変異であることを見出した。

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)日本人患者における遺伝子変異を明らかにする。
(倫理面への配慮) 遺伝子解析では、インフォームドコンセントを得て行った。

C 研究結果と考察

- (1)核局在シグナル(NLS)と FANCG 結合領域を持つ FANCA 蛋白 N 末領域の機能を明らかにするために、種々の変異体を解析したところ、L25P, LL25/26AA は、FA 蛋白複合体形成を強く障害されたが、核に移行し、FANCD2 活性化を中等度誘導し、MMC 感受性を補正した。その他の変異体は核移行と併行して、FANCD2 を活性化した。安定な FA 複合体の形成は FANCD2 活性化に促進的に働くが、必須ではなく、FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たすことが示唆された。
- (2)非血縁 10 家系において FANCG 両アレルの変異を同定した。全 20 変異アレルのうち、IVS3+1G>C が 13 (65%)、1066C>T が 5(25%)アレルを占めた。いずれの変異も固有の haplotype と完全に関連

しており、各々が共通の祖先に由来する founder 変異であることが示された。

D 結論

- (1) FA 分子経路の活性化に FA 蛋白の安定な複合体の形成は必須ではなく、これと独立して FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たしている。
- (2) 日本人 FA 患者の約 20%が G 群に属し、その 90%の変異アレルがふたつの founder 変異に占められた。

E 健康危険情報

特になし。

F 研究発表

- [1] Adachi D, Oda T, Yagasaki H, Nakasato K, Tamiguchi T, D'Andrea AD, Asano S, Yamashita T. Heterogenous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. Hum Mol Genet. 11.3125-3134, 2002
- [2] Yagasaki H, Oda T, Adachi D, Nakajuma T, Nakahata T, Asano S, Yamashita T. Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese population Hum Mutat (in press)

G 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

サルを用いた骨髄移植モデルの作成

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 センター長

研究要旨

本研究では造血幹細胞を標的とした遺伝子治療プロトコルの安全性と有効性をカニクイザルを用いて評価することを最終目的としている。今年度は、患者の負担の少ない骨髄採取・移植技術として期待されている骨髄還流置換（Bone Marrow Replacement; BMR）技術のカニクイザルに応用するためのプロトコルの確立と、本法の有効性を移植した細胞の定着率から評価した。さらに、カニクイザルの造血幹細胞の表面マーカーである CD34 抗原を特異的に検出する抗体の作成を試み以下の結果を得た。

1) カニクイザルの四肢長骨の両端に穿刺し、一端から吸引して髄腔内を陰圧に保ちつつ他方から燐酸緩衝液を流入させることで、末梢血の混入のない良質の骨髄細胞が回収できた。骨髄移植時には、一端からの吸引で陰圧となった髄腔内に一端から遺伝子導入細胞を流入させる方法で骨髄置換させた。還流置換中に髄腔内圧をモニターすることにより、血管内への骨髄細胞の漏出が防止できることから、本法を用いることで血栓塞栓症等の防止が可能となった。

2) 造血前駆細胞中の導入遺伝子陽性コロニーの比率を指標として、骨髄還流置換法で移植した遺伝子導入細胞の骨髄内定着率を評価した。四肢長骨に移植した細胞は移植後 14 日には腸骨内に検出され、比較的早期に移植細胞が骨髄内を移動することが判明した。さらに、最長 8 ヶ月にわたり腸骨骨髄内の造血前駆細胞の 10～20%に導入遺伝子が検出された。このことから、本法が X 線照射などの骨髄廃絶処理を必要としない負荷の少ない優れた骨髄移植法であると判断できる。

3) クローニングしたカニクイザルの CD34 遺伝子は大腸菌で発現させて作成した組換えタンパクをアジュバントと伴にウサギに 6～7 回免疫し、カニクイザルの CD34 抗原を特異的に認識するポリクローナル抗体の作成に成功した。本抗体は、カニクイザル骨髄細胞の 1%前後と反応することから、より特異性の高い抗体と考えられる。

A. 研究目的

本研究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の安全性と有効性を霊長類を用いて評価することを目的としている。最近、より侵襲性の低い骨髄採取・移植法として「骨髄還流置換法（Bone Marrow Replacement, BMR）が報

告された。この方法は骨髄採取時に腸骨穿刺法で生じる末梢血の混入を防止するとともに、細胞移植時に骨髄廃絶処理をしないで骨髄内に移植スペースが確保できる利点を有する。今年度は、カニクイザルを対象とした「骨髄還流弛緩法」技術を開発し、移植細胞の定着率から本法の有効性評価をおこなうことを目的とした。さらに、カニクイザルの骨髄幹細胞の表面マーカー

一である CD34 抗原を特異的に認識する抗体の作成も目的とした。

B. 研究方法

1) カニクイザルを用いた骨髓還流置換技術の開発:

3~5 歳の雄カニクイザル 3 頭を用いた。全身麻酔下で大腿骨もしくは上腕骨の両端を露出させ骨膜を剥離した後、長骨両端に骨用ドリルで穿孔し穿孔針を留置した。穿孔針の近位端に PBS を入れた 20ml シリンジ、遠位端に骨髓採取用 20ml シリンジを取り付け、髓腔内を陰圧に保つように遠位端のシリンジを吸引しながら、近位端のシリンジから滅菌 PBS を還流させ、50ml を還流したところで採取を終了した。

長骨への細胞の移植は、1ml の細胞浮遊液を充填した 2.5ml シリンジを骨髓遠位端に取り付け、近位端に取り付けた空のシリンジに陰圧をかけ、末梢血流にリークしないよう髓腔内に細胞を移植した。移植後、各腸骨の穿孔孔をボーンワックスで閉鎖した後、剥離した筋層、皮膚を縫合した。動物の覚醒を確認し、抗生物質、痛み止め（ブトルファノール；0.02mg/kg）の投与を術後 3 日間おこなった。

2) BMR で移植した遺伝子導入細胞の検出:

BMR で遺伝子導入細胞を移植した後、2~8 週間隔で腸骨より 10ml の骨髓を採取し、細胞分離後定法に従ってコロニーアッセイをおこなった。コロニーを形成した造血前駆細胞中の導入遺伝子陽性コロニーは、各コロニーから調整した DNA を用いて、選択的増幅遺伝子 (SAG) 特異的プライマーによるリアルタイム PCR で判定した。

3) カニクイザル CD34 に対するポリクローナル抗体の作成:

カニクイザル CD34 遺伝子の 3'末端にヒスチ

ジンータグ配列を付加し、pcDNA3.1(-)発現ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌を液体培養後に回収し、超音波破碎した。破碎液を熱変性後 HiTrap Chelating HP カラムにアプライし、ヒスチジンータグ融合タンパク質を溶出した。溶出タンパクを透析後、SDS-PAGE で純度を確認した。

精製カニクイザル CD34 ペプチド 600mg を完全アジュバントと混合したものを、ウサギの背部皮内 10 カ所に分けて投与した。免疫は 2 から 4 週間隔で 6 回以上おこなった。

初回免疫後 3、4、5 週目に 1ml 採血し、抗体の有無をカニクイザル CD34 を発現させた COS 細胞を標的とするフローサイトメトリーで確認した。

C. 研究結果及び考察

図 1 に今回検討した骨髓還流置換法の概要を示す。長骨両端の穿孔部分から骨髓還流をおこなう場合には 2 種類の方法がある。一端から圧をかけ陽圧で他端から流出させる方法（陽圧法）と、一端から吸引し髓腔内を陰圧にして他端から流入させる方法（陰圧法）である。陽圧法では、髓圧を陽圧にすることにより骨髓細胞や間質系細胞が末梢血管内に漏出し、血栓塞栓症などを誘発する危険性がある。事実、骨髓内に造影剤を入れて陽圧法で骨髓を採取した場合には、造影剤の血管内漏出が認められる（図 2）。今回確立した方法は、髓圧モニター装置を用いて術中の髓圧を常時モニターしながら（図 3）、陰圧法で骨髓採取（還流）、細胞移植（置換）の両方をおこなうことにより、より安全で確実な還流置換ができる利点を有する。

骨髓移植では、移植細胞の骨髓内における定着スペースを確保するため、X 線照射などの骨髓廃絶処理を必要とし、患者の負担も著しかった。今回カニクイザルで確立した BMR は還流

により確保した骨髄内のスペースに細胞を移入することが可能なため、より負担の少ない技術といえる。この方法の有効性については、移植した細胞が骨髄内を移動し、定着することを確認するとともに、移植細胞の定着期間を確認しておく必要がある。図4は3頭のカニクイザルでBMRにより四肢長骨に遺伝子導入細胞を移植し、腸骨内の造血前駆細胞中の遺伝子陽性細胞の比率を2~8週間間隔で調査した結果である。図に示すように、移植後2週目には遺伝子陽性前駆細胞が腸骨内に検出され、移植細胞が比較的短時間に骨髄内を移動することが判る。

腸骨内の遺伝子導入前駆細胞の比率は、最長8ヶ月にわたり10~20%と高く、この値はX線照射で骨髄廃絶したサルでの移植効率と遜色ない。これらのことから、今回確立したBMR法がX線照射などの骨髄廃絶処理を必要としない負荷の少ない優れた骨髄移植法であると判断できる。

大腸菌で発現させたカニクイザルCD34ペプチドで免疫したウサギ血清を用いて、CD34発現COS細胞を染色した結果を図5に示す。図に示すように、陽性コントロールとして用いたカニクイザルと交叉する抗ヒトCD34抗体(Clone563)では、53%の細胞が陽性となったが、免疫ウサギ血清では16%が陽性であった。Clone563はマカク属サルのCD34と交叉反応性を示す現時点で入手可能な唯一のモノクローナル抗体であるが、カニクイザル骨髄細胞の20~30%と反応することから、その特異性に不安があった。今回作成したウサギ抗体はカニクイザル骨髄細胞の1%前後と反応すること(結果略)から、造血幹・前駆細胞に対する特異性の点でclone563抗体よりも優れた抗体と考えられる。現在このポリクローナル抗体で精製した骨髄細胞についてコロニーアッセイで特異性と有用性を調査中である。

D. 結論

骨髄廃絶処理を必要としない、骨髄還流置換法(Bone Marrow Replacement; BMR)をカニクイザルに適用する技術を確立した。これにより、末梢血の混入のない良質な骨髄の採取と、安全な移植法が確立できた。また、BMRで移植した遺伝子導入細胞は比較的短時間で骨髄内を移動し、移植後8ヶ月にわたって、骨髄中の造血前駆細胞の10~20%を占めることから、有効な骨髄移植法と評価される。

大腸菌で発現させたカニクイザルのCD34抗原をウサギに頻回免疫し、カニクイザルCD34発現COS細胞およびカニクイザル骨髄細胞と反応する抗体の作成に成功した。この抗体は、陽性率から見てこれまで使用してきたclone563抗体よりも特異性の点で優れていると判断された。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Osada,N., Hida,M., Kusuda,J., Tanuma,R., Hirata,M., Hirai,M., Teruo,K., Suzuki,Y., Sugano,S., Hashimoto,K. Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain. *Genome Biology*, 2002;3(1): Research 0006.1-0006.5

Hanazono,Y., Nagashima,T., Asano,T., Shibata,H., Ageyama,N., Ueda,Y., Dunbar CE, Kume,A., Teruo,K., Hasegawa,M. Ozawa,K. In vitro selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Therapy*, 2002, 9:1055-1064.

Hanazono,Y., Teruo,K., Shibata,H., Nagashima,T., Ageyama,N., Asano,T., Ueda,Y., Kato,I., Kume,A., Hasegawa,M. Ozawa,K. Introduction of the GFP gene into hematopoietic stem cells in primate results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow

progenitors and peripheral blood cells. JOURNAL
J Gene Med, 2002, 4: 470-477.

Ageyama,N., Hanazono,Y., Shibata,H.,
Ohto,K., Ono,F., Nagashima,T., Ueda,Y.,
Donahue,RE., Hasegawa,M., Ozawa,K.,
Yoshikawa,Y., Terao,K. Safe and efficient methods
for cynomolgus monkey autologous hematopoietic
stem cell transplantation for biomedical research.
Comp Med, 2002, 52: 445-451.

Inoue-Murayama,M., Adachi,S., Mishima,N.,
Mitani,H., Takenaka,O., Terao,K., Hayasaka,I.,
Murayama,U. Variation of variable number of
tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region
of primate dopamine transporter genes that affects
reporter gene expression. Neurosci Letter, 2002,
34(3):206-210.

Osada,N., Hida,M., Kusuda,J., Tanuma,R.,
Hirai,M., Terao,K., Sugano,S., Hashimoto,K.
Cynomolgus monkey testicular cDNA library for
discovery of novel human cDNAs in the human
genome sequence. BMC GENOMICS. 2002, 3:36-
46.

Ageyama,N., Kimikawa,M., Eguchi,K., Ono,F.,
Shibata,H., Yoshikawa,Y., Terao,K. Development of
efficient leukapheresis procedure in rhesus monkeys
(*Macaca mulata*). -Clinical application to a human
infants- J Clin Apheresis, 2003, in press.

2. 学会発表

Nagashima,T., Ueda,Y., Hanazono,Y.,
Kume,A., Shibata,H., Ageyama,N.,
Komatsu,N., Terao,K., Ozawa,K.,
Hasegawa,M. In vivo expansion of gene-
modified hematopoietic cells with a novel
selective amplifier gene consisting of the
erythropoietin receptor and MPL genes., The
5th Annual Meeting of the American Society of
Gene Therapy, June 5-9, 2002, Boston

Yonemitsu,Y., Terao,K., Ono,F.,
Kawahara,T., Iida,A., Hara,H., Iwasaki,H.,
Hasegawa,M., Sueishi,K., Preclinical safety
study for intramuscular administration of F-
defective, non-transmissible recombinant
sendai virus vector using non-human primate:
Toward a clinical study for 'integrated'

therapeutic angiogenesis to treat subjects
with critical limb ischemia. The 5th Annual
Meeting of the American Society of Gene
Therapy, June 5-9, 2002, Boston

小澤敬也、村松慎一、王立軍、池口邦彦、
藤本健一、岡田尚巳、水上浩明、寺尾恵治、中
野今治、AAV ベクターを用いたパーキンソン病
の遺伝子治療、シンポジウム「中枢神経系再生
のストラテジー」第 45 回日本神経化学会大会、
7 月 17 日～19 日、2002、札幌

Nagashima,T., Ueda,Y., Hanazono,Y.,
Shibata,H., Ageyama,N., Komatsu,N.,
Terao,K., Ozawa,K Hasegawa,M. Second
generation selective amplifire genes for
efficient in vivo expansion of gene modified
hematopoietic cells. The 8th Annual
Meeting of the Japanese Society of Gene
Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

Takatoku,M. Hanazono,Y.
Nagashima,T., Shibata,H., Ageyama,N.,
Ueda,Y., Kume,A., Dunbar,CE. Terao,K.
Hasegawa,M. Ozawa,K. Clonal Insertation
analysis of gene-modified hematopoietic cells
after hematopoietic reconstitution with
retrovirally-transduced CD34+ cells in
nonhuman primates. The 8th Annual Meeting
of the Japanese Society of Gene Therapy, July
18 - 20, 2002, Tokyo.

Yonemitsu,Y. Terao,K. Ono,F.
Kawahara,T. Iida,A., Hara,H., Iwasaki,H.,
Hasegawa,M. Sueishi,K. A preclinical safety
study for intramuscular administration of F-
defective, non-transmissible recombinant
Sendai virus vector using non-human
primates. The 8th Annual Meeting of the
Japanese Society of Gene Therapy, July 18 -
20, 2002, Tokyo.

柴田宏昭、棚林 清、揚山直英、吉川泰弘、
寺尾恵治、カニクイザル骨髄中の造血幹・前駆
細胞の同定、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-
21

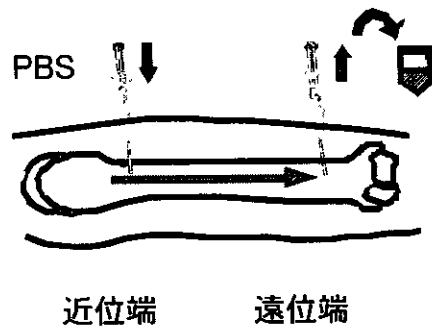
成田勇人、小野文子、鴻野あや子、羽成光
二、揚山直英、大藤圭子、村松慎一、池口邦彦、
藤本健一、中野今治、寺尾恵治、カニクイザル
を用いたパーキンソン病モデルの作出、第 18 回
日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京
揚山直英、花園 豊、小野文子、柴田宏昭、

長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、吉川泰弘、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 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

上腕骨（採取時）

大腿骨（移植時）



細胞浮遊液

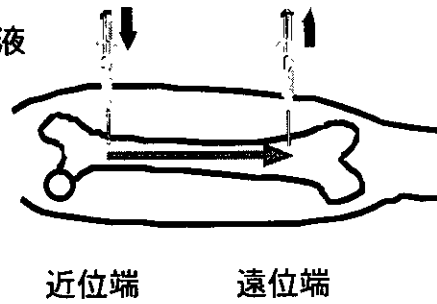


図 1：骨髓還流置換法での穿刺部位と骨髓採取時、細胞移植時の操作



造影剤還流前

造影剤還流後

(血管内漏出)

図 2：陽圧還流時の血管内への骨髓の流入（造影剤還流）

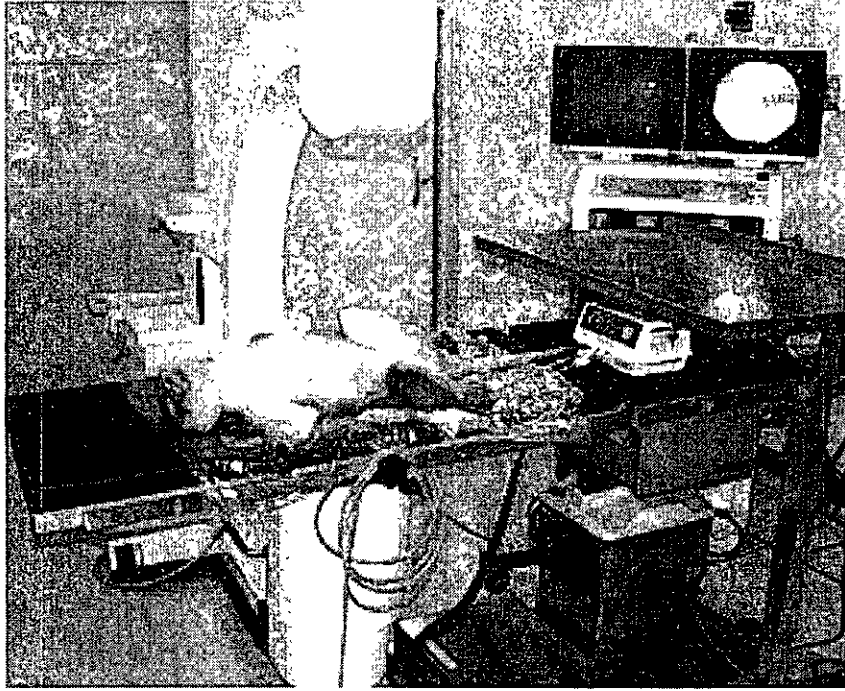


図 3 : カニクイザルを用いた骨髄還流置換

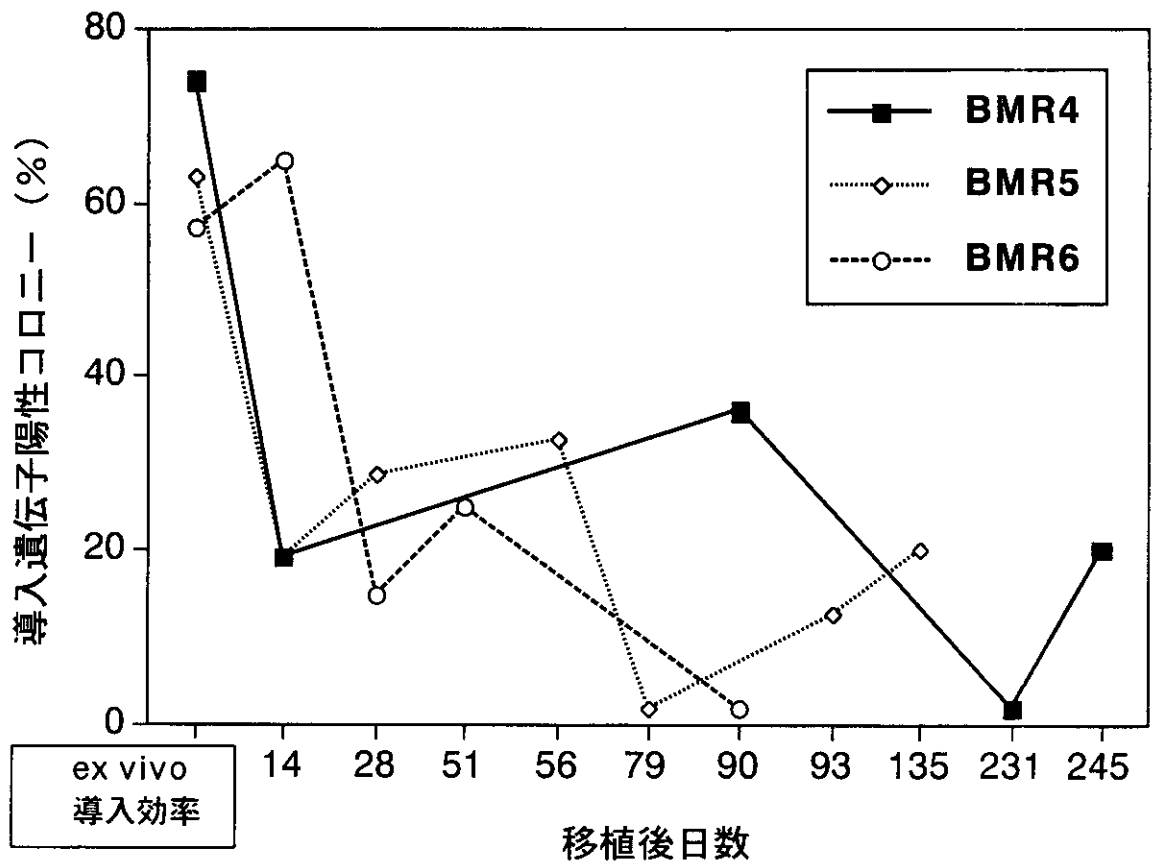
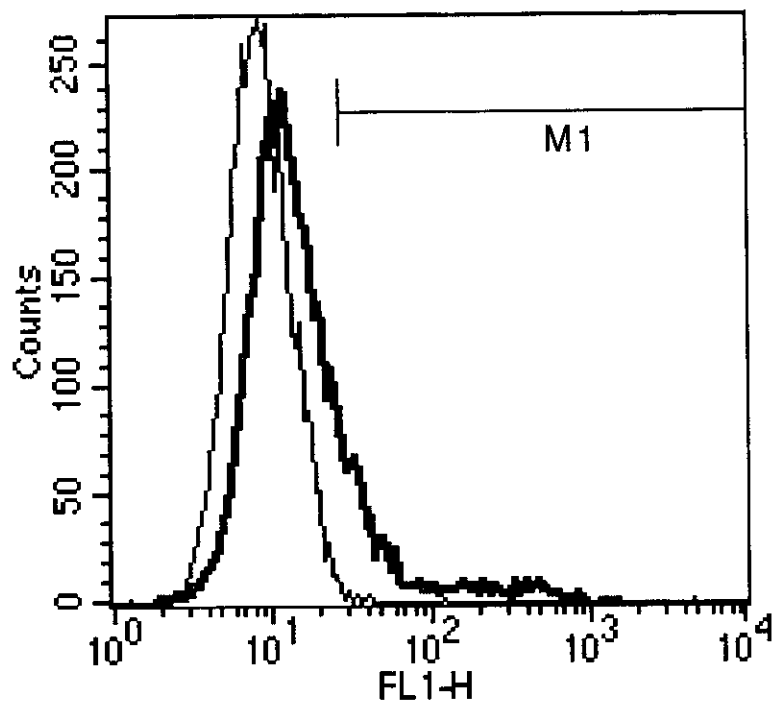


図 4 : BMR で移植した遺伝子導入造血前駆細胞の比率の継時的変化

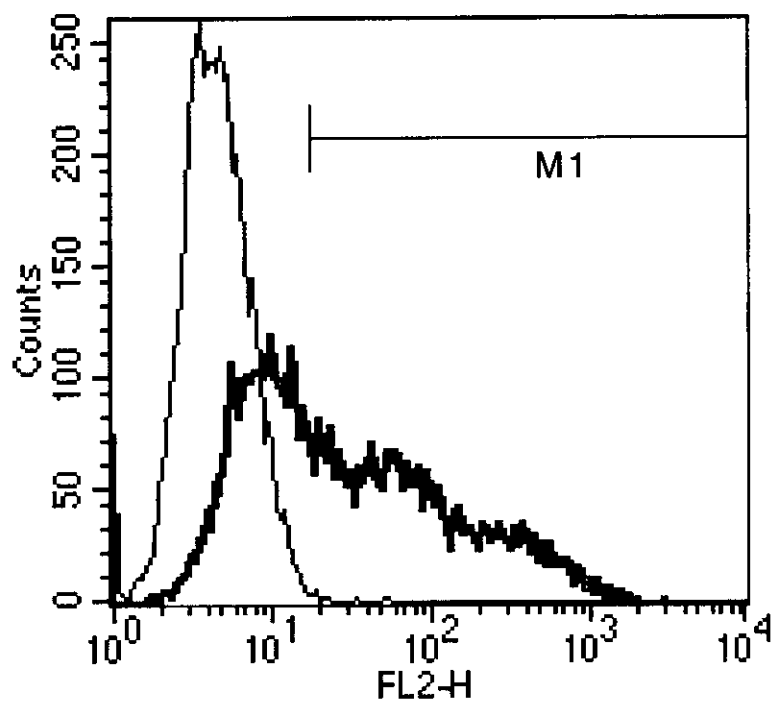


免疫ウサギ血清

細線：非発現 COS7

太線：CyCD34 発現 COS7

CD34 陽性率 (M1) 16%



抗ヒト CD34 (clone563)

CD34 陽性率 (M1) 53%

図5：カニクイザル CD34 抗原で免疫したウサギ血清の特異性