

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

造血系再生医療への応用を目的とした
増殖分化制御システムの開発研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

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

造血系再生医療への応用を目的とした
増殖分化制御システムの開発研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

造血系再生医療への応用を目的とした 増殖分化制御システムの開発研究 -----	1
小澤 敬也 (資料1) 班会議資料 (資料2) 第3回 CGD Gene Therapy Meeting 資料	

II. 分担研究報告

1. (1) 慢性肉芽腫症の治療法開発 (2) 体性幹細胞の分化転換実験 -----	9
久米 晃啓	
2. 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 -----	16
花園 豊	
3. 第二世代選択的増幅遺伝子の開発と 造血幹細胞への導入 -----	21
長谷川 護	
4. サルを用いた造血系再生 -----	24
寺尾 恵治	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	28
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	30
-----------------------	----

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）
総括研究報告書

造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 再生医療は、体性幹細胞あるいは ES 細胞を利用するアプローチに大別される。1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用：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において、エリスロポエチン (EPO) 反応型第二世代 SAG を利用することにより、修復造血系細胞を体内で選択的に増幅する技術の開発を進めた。このシステムを慢性肉芽腫症の幹細胞治療に応用するため、平成 16 年度は EPO 反応型 SAG を改良して完全にヒト化し、野生型 EPO 受容体に比肩する細胞増殖シグナルが得られることを確認した。また、霊長類のサルを用いた実験系で SAG システムと骨髓還流置換法 (BMR 法) を組み合わせた前臨床研究を引き続き行い、その有効性を確認した。2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発：骨格筋に脱分化誘導遺伝子 (Msx 1 転写因子遺伝子) を導入して一時的に作用させることにより、脱分化段階を経て、造血系再構築能を持った細胞に再分化させるという、全く新しい再生医療技術の開発に取り組んだ。平成 16 年度は、AAV ベクターで Msx1 遺伝子を一過性に発現させたマウス骨格筋の中に、造血系再構築能をもつ幹細胞が存在することを示した。後天性難治性造血器疾患において、患者自身の非造血系組織から正常造血系を再生することが可能になれば、画期的な治療法の開発に繋がるものと期待される。3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発：サル ES 細胞を用いた *in vitro* ならびに個体レベルの研究に関して、平成 16 年度は以下のテーマを実施した。(i) センダイウイルスベクター (SeV) によるサル ES 細胞の遺伝子操作法に関する研究を昨年度に引き続き実施し、SeV ベクターによって導入した GFP 遺伝子の発現は、抗ウイルス剤リバビリン添加によって調節できる可能性を示した。(ii) ヒツジをレシピエントとしたサル ES 細胞からの造血系再構築実験で、サルの造血を一部持つヒツジの作製に成功した。(iii) サル ES 細胞をサル胎児肝臓へ同種移植する技術の開発では、移植細胞の中から未分化マーカー (SSEA4) 陽性細胞を予め除去することにより、テラトーマ形成を抑制できることが判明した。4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発：造血幹細胞や ES 細胞の遺伝子操作に関して、安全性を高めるため、TVI 法の開発を進めた。具体的には、AAV の二つのコンポーネント (ITR 配列と Rep 蛋白質) を利用し、第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域に遺伝子を組み込ませる方法の応用開発を推進した。前年度に続き、TVI 法による遺伝子導入を容易にするためのアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製を試みた。また、骨髓ストローマ細胞由来の KM-102 細胞株への応用実験を行った。導入遺伝子と AAVS1 領域との junction DNA 配列の同定も行った。AAV の部位特異的組込み機構を利用した TVI 法は、再生医療に遺伝子操作を加えていく際に、安全性の観点から役に立つものと期待される。

分担研究者

久米 晃啓

自治医科大学医学部

助教授

花園 豊

自治医科大学医学部

助教授

長谷川 護

ディナベック株式会社

代表取締役社長

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

A. 研究目的

再生医療は体性幹細胞あるいはES細胞を利用するアプローチに大別される。前者の代表が造血幹細胞移植であるが、そこ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上げることが可能となる。本研究では、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において、第二世代EPO反応型選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) の利用により、修復造血系細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果の増強を図る技術を開発する。このシステムを慢性肉芽腫症の幹細胞治療に応用するため、第二世代SAGを改良・最適化し、疾患モデルマウスでの有効性を確認する。さらに、霊長類のサルでの有効性・安全性試験を行う。その成果に基づいて臨床プロトコルを策定し、数年以内の臨床研究実施を目指す。

体性幹細胞を利用するもう一つの研究テーマは、分化転換技術により非造血系組織から造血系を再生させるプロジェクトである。幹細胞の生理的可塑性は限定的であるため、遺伝子操作技術の応用が鍵となる。具体的には、筋肉で脱分化誘導遺伝子を一時的に作用させることにより、脱分化段階を経て、造血系再構築能を持った細胞に再分化させるという、全く新しい再生医療技術の開発に取り組む。後天性難治性造血器疾患において、ゲノムに異常の生じていない患者自身の非造血系組織から正常造血系を再生することが可能になれば、将来的には画期的な治療法に繋がるものと期待される。

ES細胞を利用する再生医療に関しては、ヒトへ

の応用展開を考慮し、霊長類のサルのES細胞を用いた個体レベルの研究を行う。この分野でも遺伝子操作技術は必須のツールであり、特にセンダイウイルスベクターの利用法を検討する。将来的には、ES細胞に分化制御遺伝子や特定の機能遺伝子を導入した再生医療法の開発に繋がる技術である。また、ヒツジやサルの体内微小環境を利用したサルES細胞の造血系分化について検討する。

尚、造血幹細胞やES細胞の遺伝子操作に関して、安全性を高めるため、染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発を進める。最近、造血幹細胞遺伝子治療で白血病の発生が深刻な問題となっており、このような基盤技術は重要な研究テーマとなっている。具体的には、アデノ随伴ウイルス (AAV) の性質を利用する方法である。AAVは細胞に感染すると第19番染色体のAAVS1領域(19q13.42)に特異的に組み込まれる傾向がある。この現象には、AAVのRep蛋白質とAAVゲノムの両末端にあるITR (inverted terminal repeat)の両者が必要である。ITR上のRep認識配列と相同な配列がAAVS1領域にも存在し、Repが双方に結合することによりAAVゲノムの特異的組込みが起きるものと想定されている。そこで、AAVの二つのコンポーネント (ITR配列とRep蛋白質) を利用し、第19番染色体長腕AAVS1領域に遺伝子を組み込ませるTVI法の応用開発を推進する。

B. 研究方法

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

EPO 反応型の第二世代 SAG [EPO 受容体細胞外領域と G-CSF 受容体または 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] について、サルの系で造血系再構築実験を行い、その有効性 (SAG 導入造血系細胞の EPO 投与に対する反応性) ならびに安全性を検討した。また、移植前処置 (全身放射線照射) の代わりに、骨髓還流置換法 (BMR: bone marrow replacement) (池原法) が有効かどうかをサルの系で引き続き検討した (花園、長谷川、寺尾)。

また、臨床応用を考慮し、ヒト EPO 受容体細胞外部分とヒト G-CSF 受容体細胞内部分を融合させた SAG に関して、より効率的なシグナル伝達を実現するため、その接合部構造の詳細な検討を行った (久米)。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発 (久米) :

骨格筋系細胞株を脱分化させる作用をもつ Msx1 に注目し、Msx1 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV/Msx1) を C57BL/6-Ly5.2 マウス前頸骨筋に注射し、経時的に筋組織から単核球を採取して C57BL/6-Ly5.1 マウス (コンジュニックマウス) の前頸骨筋に移植し、その後経時的に採血して、末梢血中の Ly5.2 細胞の割合を追跡することにより、造血系再構築能をもつ骨格筋由来細胞の出現頻度を検討した。また、長期観察後、第一次レシピエントの骨髄細胞を第二次レシピエント (Ly5.1/5.2 ヘテロ) に移植して、同様に第一次ドナー骨格筋由来細胞の割合を追跡した。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 (花園、寺尾) :

(i)サル ES 細胞の遺伝子操作技術に関しては、GFP 遺伝子を搭載した SeV ベクターを作製し、これをサル (カニクイザル) ES 細胞に感染させた。その後、抗ウイルス剤リバビリンの添加によって、GFP 発現量を調節できるかどうか検討した。

(ii)ヒツジへの移植実験では、サル ES 細胞を至適条件下 (OP9 フィーダー細胞上で各種サイトカイン添加) で培養し、ヘマンジオブラスト (造血細胞と血管内皮の元になる細胞) の段階まで予め分化させた。この分化段階の細胞の移植にあたっては、免疫拒絶を避けるため、免疫能獲得前 (妊娠 1/3 期前後) のヒツジ胎仔肝臓内にエコーガイド下で移植した (子宮内移植法)。満期で娩出し、生まれたヒツジにおけるサル ES 細胞由来の造血を調べた。

(iii)同様に分化誘導培地で培養したサル ES 細胞の、同種サル胎児の肝臓内への移植実験を行った。その際、培養 6 日目に回収した細胞をそのままエコーガイド下で 60-80 日齢のカニクイザル胎児に移植する実験と、培養 6 日目に回収した細胞を抗ヒト SSEA4 抗体 (PE-anti-SSEA4) で染色し、フローサイトメトリーにより精製した GFP⁺/SSEA4⁺細胞分画を 50-70 日齢の胎児の肝臓内に移植する実験の 2 群に分けた。移植後 85-100 日後に帝王切開により胎児を摘出し、主要臓器での ES 細胞由来組織を検索した。特に、ES 細胞移植後のテラトーマ形成の有無を調べた。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開

発 (小澤) :

AAVS1 領域への特異的組込み可能なアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製を試みた。Rep は少量でもアデノウイルスの増殖を抑制することから、発現は厳密に制御する必要があり、Cre-loxP システムを用いた。TK プロモーターと Rep 遺伝子の間に loxP 配列で挟んだ transgene カセット (ITR, CMV プロモーター、ブラストサイジン耐性遺伝子 bsr, IRES, CD8 遺伝子, ITR) を逆向きに挿入した (p32) (図 1)。このユニットでは更に Rep の leak を抑制するため CMV プロモーターからの mRNA が Rep の mRNA と相補的になり、アンチセンス RNA による発現抑制機構も備わっている。Cre 酵素により loxP 部位間での組換えが起こり、TK プロモーターの直後に Rep 遺伝子が配置され、切り出された transgene は Rep の作用で AAVS1 に組み込まれると予想できる。Cre によって Rep の発現が誘導されるか 293 細胞に Cre 発現プラスミド (pMCCre) とトランスフェクションして検討した。次に HeLa 細胞に transgene プラスミドと Cre 発現プラスミドをトランスフェクションし、ブラストサイジン S 存在下で培養を行い、コロニーを形成させ、genomic DNA のサザン解析により AAVS1 への組込み頻度を検討した。

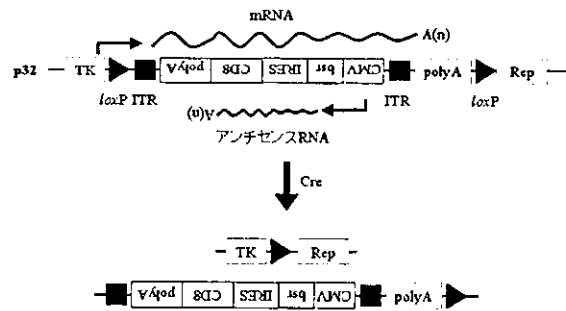


図1 Rep遺伝子の制御法

また、造血幹細胞への特異的遺伝子導入の前段階として、骨髄ストローマ由来の KM-102 細胞株の AAVS1 領域への GFP 遺伝子導入を実際に試み、導入効率、導入遺伝子の安定性などを検討した。AAVS1 領域に組み込ませる遺伝子として GFP-IRES-bsr を ITR で挟んだものを用いた。Rep 発現プラスミドと共に KM-102 にリポフェクションを行い、ブラストサイジン S で選択を行い、

single cell clone のサザン解析を行った。また、AAVS1 への組み込みが確認できたクローンでは、ITR と AAVS1 に設定したプライマーで PCR を行い、junction 配列の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験(自治医大)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。サルを用いる実験プロトコルは、国立感染症研究所の「動物実験委員会」において承認を受けている。また、SIVベクターを含め、サル個体を用いる組換えDNA実験(基準外組換えDNA実験)については、文部科学省 科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会 組換えDNA技術専門委員会の承認が得られている。

C. 研究結果

1) 選択的増幅遺伝子(SAG)を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

SAGシステムとBMR法の組み合わせに関しては、移植直後よりEPOを3期に分割して投与した結果、EPOの投与後に末梢血中の遺伝子導入効率が上昇し、例えば、移植後350日の時点では約9%に達した。一方、EPO投与中断後は、導入遺伝子陽性率が直前の値の1/100から1/10に低下した。

EPO 刺激時は、in situ PCR でも導入遺伝子陽性細胞が数%程度確認され、また、分画した細胞のPCR解析では、T細胞、B細胞、好中球いずれも導入遺伝子陽性細胞が増幅されていた。さらに、LAM-PCR ではこの増幅がポリクローナルであることが明らかになった。

次に、SAG 導入細胞を中心静脈から移植したサルでは、移植2日後には末梢血中に1.2%の導入効率が確認されたものの、移植7日後には検出限界以下に低下し、その後も回復がなかった。

MTレトロウイルスベクターにgp91遺伝子(慢性肉芽腫症の治療用遺伝子)とSAG(EPOR全長、EPOR-GcRキメラ数種、EPOR-Mp1キメラ)を搭載し、これらの組み換えレトロウイルスをサイトカイン依存性Ba/F3細胞・M07e細胞に感染させたところ、いずれもEPO依存性に増殖するようになった。増殖シグナルは、EPOR-Mp1キメラが最強

であったが、EPORとEPOR-GcRキメラ数種はいずれも同レベルの増殖シグナルを伝えた。X-CGDマウス骨髄細胞を用いたコロニーアッセイでは、EPOで誘導されるコロニー数はEPOR-Mp1遺伝子を導入した場合が最大で(骨髄細胞 10^5 個当たり約300個)、EPORとEPOR-GcRキメラ遺伝子を導入した場合はほぼ同数のコロニー(骨髄細胞 10^5 個当たり100-150個)が出来た。これらEPO反応性のコロニーは全てが活性酸素産生能を有しており、治療用gp91遺伝子が働いていることを確認した。

平成17年2月19日には、班会議(資料1)に引き続き、ソウル国立大学およびViroMed社との共同研究に向けた会議(第3回CGD Gene Therapy Meeting)を開催し、各グループの進捗状況を発表すると共に、今後の方針について議論した(資料2)。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発:

AAV/msx1投与後の前頸骨筋から採取した単核球を移植したレシピエント(Ly5.1)において、ドナータイプ(Ly5.2)の細胞が生着したものが数匹出現した。中でも、AAV/msx1注射4週後の筋肉由来の細胞を移植した1匹は、キメリズム50-60%にて長期間推移し、ドナータイプの細胞はTリンパ球・Bリンパ球・顆粒球単球いずれの系列にも均等に分化していた。移植9ヶ月後に、この第一次レシピエントの骨髄細胞を第二次レシピエントマウス(Ly5.1/5.2ヘテロ)に移植したところ、約80%の高いキメリズムが持続した(観察期間7ヶ月)。このマウスにおいても、もとのドナータイプ(Ly5.2)の細胞は、Tリンパ球・Bリンパ球・顆粒球単球にほぼ均等に分化していた。

3) 霊長類ES細胞からの造血系再生技術の開発:

(i)サルES細胞の遺伝子操作技術の開発では、SeVベクターでGFP遺伝子導入後のサルES細胞にリバビリンを添加したところ、リバビリン濃度依存性にGFPの発現が減少した。リバビリン4mMの投与ではGFPの発現がほぼ完全に抑制されたものの、投与後の細胞の継代培養は不可能であった。一方、低濃度(0.5-0.75mM)のリバビリン投与ではGFPの発現をおよそ半減させることができた。この濃度の場合にはリバビリン投与後も細胞の継代が可能であったが、GFP発現抑制は一過性でリ

バビリン投与終了後、発現レベルは元に戻った。(ii)ヒツジにおけるサル ES 細胞由来の血液産生では、未分化 ES 細胞を移植すると奇形腫を作ってしまうので、まず試験管内で中胚葉細胞に分化させた。ここには血液細胞や内皮の元になるヘマンジオブラストが含まれている。移植部位としては、ヒツジ胎仔の肝臓を選択した。その微小環境を利用して、ヘマンジオブラストから造血幹細胞を誘導しようという狙いである。

ヒツジが生まれるとサル由来の造血を観察した。サル由来の造血はコロニーアッセイ法によって判定した。各コロニーから DNA を抽出し、サルに特異的な配列に対する PCR (コロニーPCR) を行った。4頭のヒツジが生まれたが、いずれも約1%のサル/ヒツジ造血キメラになっていた。2年後の現在、サル/ヒツジ造血キメラは依然として維持されており、ヒツジの体内でサルの造血幹細胞が出来たことを強く示唆している。これらのキメラヒツジに対して、ヒツジには効かないがサルには効くヒトの造血因子 (ヒト SCF) でサルの造血を選択的に刺激する実験を行い、骨髄の造血キメラ率を10%前後まで上げることに成功した。ただし、末梢血のキメラ率は依然として低い (0.1%以下) という問題が残った。尚、腫瘍の発生は認められなかった。

(iii)サル ES 細胞の同種サルの胎児肝臓への移植技術の開発では、GFP 標識したカニクイザル ES 細胞 (CMK6/G) を MMC 処理した OP9 細胞をフィーダーとして種々のサイトカイン存在下で6日間培養したところ、60-80%の細胞が未分化マーカー (SSEA4) 陰性となった。これらの細胞をエコーガイド下で60-80日齢のカニクイザル胎児肝臓内に移植した結果、臍帯血・肝臓・脾臓・胸腺などの臓器に0.2-1.1%のキメラ率で ES 細胞由来と思われる GFP 陽性細胞 (これらの細胞と周囲の細胞とで形態学的な差は認められなかった) が検出され、さらに骨髄 CFU あたり4%前後のキメラ率が確認できたが、全例でテラトーマの形成が認められた。次に、*in vitro* で同様に分化誘導した細胞から未分化マーカー-SSEA4 陽性細胞を FACS 法によるネガティブ・セレクションで除去し、純化した GFP⁺/SSEA4⁻細胞を50-70日齢の胎児肝臓内に移植した結果、全例でテラトーマの形成は認められず、CFU あたりのキメラ率は平均3.2%であった。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開発:

アデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製に向けては、まず、293細胞に p32 と pMCCre をトランスフェクションし Rep の発現をウエスタン解析した。Cre を共発現させたときにのみ Rep が発現することが確認できた。p32 と pMCCre を HeLa 細胞にコトランスフェクションして得られた薬剤耐性クローンの genomic DNA をサザン解析した。最初に AAVS1 特異的プローブと反応させ、プローブを剥がした後、transgene プローブと反応させた。両者のプローブに共に反応するバンドが認められれば AAVS1 領域に transgene が組み込まれたと判断した。得られた7クローンのうち、2クローンで AAVS1 に transgene が組み込まれていた。p32 を用いてハイブリッドベクターの作製を試みたところ、力価は 10^3 /ml と通常の組換えアデノウイルスより著しく低かった。

KM-102 細胞への部位特異的組込みの検討では、Rep 発現プラスミドと transgene プラスミドをリポフェクションし、ブラストサイジン S 存在下で培養し、耐性クローンを得た。それらのサザン解析から、8個中3個のクローンで AAVS1 特異的組込みが認められた。3個のクローンから AAVS1 と transgene の junction の配列を試みたところ、2クローンで junction の同定ができた。また AAVS1 領域に遺伝子導入できた3クローンでは、6ヶ月の培養後も GFP の発現が確認でき、導入遺伝子が安定に維持されていることが分かった。

D. 考察

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

SAG と BMR の組み合わせで末梢血中の遺伝子導入効率が約9%に上昇したが、SAG のみでは末梢血中の遺伝子導入効率はほとんど検出されなかった。従って、非骨髄抑制条件の下では骨髄還流置換法によって、始めて SAG が効果を発揮できる細胞環境に達することができたと考えられる。

MT ベクターは、レトロウイルス蛋白質コード領域を全て削除してあるため、自己複製可能なウイルスが出現する可能性が最も低い。また、組み込み可能な遺伝子サイズが最も大きく、治療用遺伝子と SAG を同時に組み込む本課題の系に適している。以上の理由から、今後臨床グレードのベ

クターを作製するにあたっては、MT をベースに開発を進めていく予定である。組み込む SAG として、EPOR-GcR キメラは野生型 EPOR と同等の増殖シグナルを伝えた。GcR 下流のシグナル系は、CGD 治療の標的となる顆粒球単球系分化という点では最も生理的であり、安全性も高いと考えられる。EPOR と GcR の接合部構造については、免疫原性という点からもさらに検討する予定である。

尚、SAG プロジェクトをさらに効率的に推進するため、韓国の研究グループとの共同研究を今後も継続していく予定である。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発 :

Mx1 遺伝子を一過性に発現させた骨格筋から得られた単核細胞のうち、少なくとも一部は *in vivo* 造血系再構築能をもつことが示唆された。これらの単核細胞が真に脱分化筋由来か否かについて、さらに厳密な検証を進めている。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 :

(i)サル ES 細胞の遺伝子操作技術の開発では、安全性の観点からゲノムに組み込まれない SeV ベクターの検討を引き続き行った。本年度は、抗ウイルス剤のリバビリンによって SeV ベクターの転写・複製を抑制し、導入した遺伝子の発現を調節可能かどうか検討した。リバビリンは 1972 年に合成されたプリンヌクレオシドアナログで、ウイルスの複製・蛋白合成・RNA ポリメラーゼを阻害することにより、幅広い抗ウイルス活性を示すとされる。我が国でも C 型慢性肝炎の治療薬としてインターフェロンとの併用投与が承認されている薬剤である。SeV ベクターで導入した遺伝子の発現を抗ウイルス剤によって調節するという試みは、全く新しいアプローチである。

高濃度のリバビリン投与では細胞毒性が強く、サル ES 細胞の生存および増殖を妨げる原因となった。しかし、このときフィーダー細胞の方も強い細胞障害を受けていることが観察された。したがって、サル ES 細胞の生存および増殖を妨げたのは、リバビリンのサル ES 細胞に対する直接毒性だけが原因とはいえない。いずれにせよ、薬剤投与による遺伝子発現調節を実用化するには、今後、より毒性の低い化合物を模索する必要がある。(ii)ヒト ES 細胞株が 1998 年に発表されて以来、医療への応用をめざし、ES 細胞を分化させる技術が競って開発されている。この手の研究はもっ

ぱら試験管内 (*in vitro*) で行われてきた。しかし、一般的に発生初期に出現する細胞 (神経、心筋、卵黄嚢造血細胞など) は、ES 細胞からの *in vitro* 分化が比較的容易だが、造血幹細胞・肝臓細胞・膵臓 β 細胞のように発生の後期に「場」から誘導的に出現する細胞については、ES 細胞からの *in vitro* 分化は難しい。そこで、ヒツジ胎仔の体内微小環境を利用して ES 細胞から造血系を再構築することを試みた。これまでの実験では、生まれたキメラヒツジでは、末梢血のサル/ヒツジキメラ率が低いという問題が残った。この解決が今後の最大の課題である。

(iii)サル ES 細胞の移植技術の開発では、今回用いた *in vitro* 分化誘導系では胎児でテラトーマ形成能を有する SSEA4 陽性細胞が残存すること、SSEA4 陽性細胞を除去した場合にはテラトーマ形成が認められなかったことから、SSEA4 は臨床的な未分化マーカーであると考えられる。

ES 細胞を用いた再生医療戦略では *in vitro*、*ex vivo* で目的とする細胞を効率的に分化誘導する技術と、分化誘導した細胞の移植によるテラトーマ形成などのリスクを取り除くことが重要である。今回得られた GFP⁺/SSEA4⁻細胞移植の結果は、霊長類で初めて ES 細胞の Clinical stemness marker を実証した結果であり、今後の ES 細胞を用いた再生医療技術の開発において重要な知見となる。一方、今回採用した *in vitro* 分化誘導系は、少なくともテラトーマ形成能を有する未分化細胞が混在すると言う意味で不完全なシステムであり、今後より効率的にヘマンジオブラストが誘導できる培養システムの開発が必要である。細胞表面抗原を利用して細胞を純化する方法には、今回用いた未分化マーカーを指標としたネガティブセレクションと初期分化マーカーを指標としたポジティブセレクションとの二つの方法がある。初期分化マーカー陽性細胞の純度という観点からは、ポジティブセレクションがはるかに優れている。GFP⁺/SSEA4⁻細胞集団には当然ヘマンジオブラスト以外の細胞も含まれており、これが移植後のキメラ率が低い要因とも考えられる。今後は効率的な分化誘導系を開発すると同時に、ヘマンジオブラストに特異的な初期分化マーカーを確立し、効率的で安全な造血系再生技術の開発を行うことが重要である。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開

発：

AAVS1 特異的に治療用遺伝子を導入するためのアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製では、Rep の発現を厳密に制御するため Cre-loxP で Rep の発現を調節し、更に制御を確実なものにするため、アンチセンス RNA で二重に cryptic な Rep の発現を抑制するようにした。トランスフェクションの実験では、Cre 依存的に Rep の発現が誘導され、HeLa 細胞のサザン解析から AAVS1 領域へ transgene が組み込まれていることが確認された。しかしながら、組換えアデノウイルスの作製を試みたところ、力価が著しく低く、さらなる改良が必要と考えられた。

骨髄ストローマ細胞由来の細胞株 KM-102 を用いた応用実験では、AAVS1 領域に外来遺伝子を組み込ませることができた。このことは骨髄間葉系幹細胞、造血幹細胞等に同手法を応用することが可能であることを示唆している。

E. 結論

・SAG プロジェクトに関しては、サル系の BMR 法との組み合わせを試みたところ、1 年以上に亘って、EPO 刺激で末梢血細胞の 9% まで導入遺伝子陽性細胞を増幅することができた。

・慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の臨床応用を目指して、SAG 構築の最適化を図った。
・骨格筋組織の人為的分化転換に関する研究では、脱分化遺伝子 (*Msx1*) を一過性に働かせることにより、非造血系組織から造血系を再構築しうる可能性が示された。

・SeV ベクターによって導入した GFP 遺伝子の発現は、抗ウイルス剤リバビリン添加によって調節できる可能性が示された。しかし、サル ES 細胞に対する毒性も観察され、その軽減に向けて更なる検討が必要である。

・試験管内でサル ES 細胞を初期中胚葉細胞 (ヘマンジオブラスト) に分化させてからヒツジ胎仔肝臓に移植すると、まだ効率の点で問題が残るが、サルの造血を一部有するキメラヒツジが誕生した。

・カニクイザル ES 細胞を分化誘導条件下で培養した後、全ての細胞をサル胎児肝臓内に移植すると、全例でテラトーマの形成が認められた。そこで、GFP⁺/SSEA4⁻細胞を精製して移植を行ったところ、テラトーマの形成は認められなかった。この

結果は霊長類 ES 細胞の臨床的未分化マーカーを特定した初めての結果であり、ES 細胞を用いた再生医療技術開発に重要な情報である。

・AAV の組み込み機序を利用した AAVS1 領域特異的遺伝子導入法 (TVI 法) の基盤技術開発をさらに推進すると共に、間葉系幹細胞への応用を目指し、骨髄ストローマ細胞由来の KM-102 を用いてスタートした。TVI 法は、再生医療に必要な造血幹細胞や ES 細胞の遺伝子操作を行う上で、安全性の観点から役に立つものと期待される。

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) Asano T, Shibata H, Hanazono Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. In, Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.

2) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. In, Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.

3) Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics. 2005 Mar 3; in press.

4) Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., Terao, K., Shimada, K., Ikeda, U., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. Stem Cells 23: 355-364, 2005.

5) Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, H., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. Transplantation 79: 32-37, 2005.

6) Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y.,

- Muramatsu, S., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther.* 12: 203-210, 2005.
- 7) Ueda, K., Hanazono, Y., Ageyama, N., Shibata, H., Ogata, S., Ueda, Y., Tabata, T., Ikehara, S., Taniwaki, M., Hasegawa, M., Terao, K., and Ozawa, K.: Method - Intra-bone marrow transplantation of hematopoietic stem cells in non-human primates: long-term engraftment without conditioning. *Gene Ther. Reg* 2: 207-218, 2004
- 8) Ueda, K., Hanazono, Y., Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Ogata, S., Tabata, T., Nagashima, T., Takatoku, M., Kume, A., Ikehara, S., Taniwaki, M., Terao, K., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol. Ther.* 10: 469-477, 2004.
- 9) Hara, T., Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., Tsurumi, H., Moriwaki, H., Ueda, Y., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther.* 11: 1370-1377, 2004.
- 10) Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Ozawa, K., and Hasegawa, M.: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J. Gene Med.* 6: 22-31, 2004.
- 11) Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Ozawa K: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol Biotechnol* 27:7-14, 2004
- 12) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol.* 2004 Feb;33(1):34-37.
- 13) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A, Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 2004 Jun;56(3):155-163.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 発明の名称：A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal
出願番号：60/483,357号
発明者：長谷川護
PCT 国際出願済み
国際出願番号：PCT/JP2004/009370 (2004/6/25)
国際公開番号：WO2005/000890 (2005/1/6)

(資料 1) 班會議資料

平成 16 年度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）
造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究

[班会議]

日時：平成 17 年 2 月 19 日（土）午後 1 時半～3 時
場所：自治医科大学研修センター 1 階中研修室 2、3

プログラム

13：30～13：35

主任研究者挨拶 自治医科大学・内科学講座血液学部門、遺伝子治療研究部 小澤 敬也

13：35～13：45

染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発

自治医科大学・遺伝子治療研究部 ○ト部 匡司、小澤 敬也

13：45～13：55

骨格筋への脱分化遺伝子導入による新規造血幹細胞ソース開拓

自治医科大学・遺伝子治療研究部 ○久米 晃啓、信吉 正治、小澤 敬也

13：55～14：05

サル ES 細胞の遺伝子操作と移植

自治医科大学・再生医学研究部 ○花園 豊

14：05～14：15

サル ES 細胞から血液細胞への分化誘導

国立感染症研究所・筑波霊長類センター ○寺尾 恵治

14：15～14：25

第二世代選択的増幅遺伝子と骨髄内移植の組合せによる非ヒト霊長類末梢における高遺伝子導入効率の実現

ディナベック株式会社 ○上田 泰次、長谷川 護

14：25～15：00

総合討論 - SAG プロジェクトに関する今後の方針

主任研究者 小澤 敬也

事務局：〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1

自治医科大学・分子病態治療研究センター—遺伝子治療研究部（高田 明美）

TEL (0285) 58-5258 FAX (0285) 44-8675

平成 16 年度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）

「造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究」班会議 議事録

日時： 平成 17 年 2 月 19 日（土）午後 1 時半～3 時

場所： 自治医科大学研修センター第 2・3 研修室

参加者： 自治医科大学 遺伝子治療研究部

小澤敬也、久米晃啓、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、松下卓、
信吉正治、松田真理

再生医学研究部

花園豊、柴田宏明

血液学部門

高德正昭、岡田真由美

ディナベック株式会社

上田泰次

筑波霊長類センター

寺尾恵治

1. 主任研究者挨拶

自治医科大学・内科学講座血液学部門、遺伝子治療研究部 小澤敬也

本研究班は、平成 12-14 年度厚生労働科学研究（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」をうけて平成 15 年度にスタートした。厚生労働科学研究は通常 3 年を 1 クールとするが、本研究は平成 12 年度から 5 年間の集中事業であるミレニアムプロジェクトの一環としての性格上、今年度が 2 年目であるが最終年度となる。本日発表の研究成果をさらに発展させるべく、平成 17 年度から新たな研究計画を申請しているので、班員諸氏の協力を仰ぎたい。

2. 研究成果発表

(1) 「染色体部位特異的遺伝子組み込み法の開発」

自治医科大学・遺伝子治療研究部 卜部匡司、小澤敬也

(分担項目「部位特異的遺伝子組み込み法の開発」)

フランスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療において、ベクター挿入変異によって白血病が発症したことから明らかなように、染色体中の安全な領域にベクターを組み込む技術の開発は必須である。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは近年血友病の遺伝子治療などに用いられているが、その元になった野生型 AAV は、自身の Rep 蛋白を用いて第 19 番染色体長腕の AAVS1 領域に選択的にゲノムを組み込む。AAVS1 領域は Mbs85 遺伝子の中にあるため、AAV ゲノムの組み込みによってこの遺伝子の活性は失われると予測されるが、細胞機能に与える影響などについては詳しく解析されていない。我々は、Rep 蛋白による AAVS1 領域への遺伝子組み込みメカニズムと宿主細胞に与える影響について研究し、部位特異的遺伝子組み込み技術を実用化して遺伝子治療の安全性向上に役立てたいと考えている。

本年度はヒト骨髄ストロマ由来 KM-102 細胞株に対してリポフェクション法にてマーカー遺伝子と Rep 遺伝子を同時に導入した際の、AAVS1 領域への部位特異的組み込み効率と細胞への影響を解析した。マーカー遺伝子を発現する KM-102 トランスフェクタントの

うち、サザン法により解析した8クローン中3クローンでAAVS1領域に遺伝子が組み込まれていることを確認した。造血系再生医療の新しいプラットフォームとして期待されている骨髄間葉系細胞について、実用レベルで部位特異的組み込みができることが示されたことにより、今後の研究展開が期待される。これら3クローンにおけるMbs85遺伝子発現量は、KM-102細胞親株やAAVS1領域以外の部位に遺伝子が組み込まれたクローンの半量ないしそれ以下に低下していた。Mbs85遺伝子の機能は詳しくわかっていないが、その発現レベルの低下に伴う影響については、今後注意深く解析する必要がある。

(2) 「骨格筋への脱分化遺伝子導入による新規造血幹細胞ソース開拓」

自治医科大学・遺伝子治療研究部 久米晃啓、信吉正治、小澤敬也

(分担項目：(i)「慢性肉芽腫症の治療法開発、(ii)体性幹細胞の分化転換実験」)

分担項目(i)については、班会議に続くソウル大-ViroMedとの共同研究ミーティングにて詳しく発表する。二点のみ要約として、ViroMed社が開発したMTベクターはX連鎖型慢性肉芽腫症(X-CGD)の遺伝子治療用として優れていることと、エリスロポエチン(Epo)反応型選択的増幅遺伝子(SAG)の細胞内部分として顆粒球コロニー刺激因子受容体(GcR)を用いても野生型EpoRとほぼ同等の増殖シグナル強度が得られることを報告した。

分担項目(ii)の研究目的は、現在の造血幹細胞移植における最大の問題点であるドナー不足の解消である。すなわち、自己の非造血組織に分化抑制遺伝子を一過性に導入して未分化状態に戻し、その後造血系に分化誘導することを目指す。マウスC2C12細胞(筋管細胞に分化誘導可能な間葉系細胞株)にMsx1転写因子遺伝子を導入して未分化状態に戻し、その後筋肉・骨・軟骨・脂肪細胞に誘導できることは既に報告されている。千葉大学の遠藤剛博士との共同研究で、Msx1発現用AAVベクターをマウス前脛骨筋に注射すると、多数の単核細胞が出現し、これらは試験管内で骨・軟骨・脂肪細胞に分化することが見出された。今回我々は、これら単核細胞の約1/3は未熟な血球系細胞の特徴であるCD45+/Sca1+の表現系を示し、血球コロニー形成能を有する上、長期にわたる造血系再構築能をもつことも明らかにした。以上の結果は、Msx1遺伝子強制発現により筋細胞の脱分化が促され、その一部は血球系への転換も可能であることを示唆する。

(3) 「サルES細胞の遺伝子操作と移植」

自治医科大学・再生医学研究部 花園豊

(分担項目「霊長類ES細胞からの造血系再生技術の開発」)

先に、レンチウイルスの一つであるサル免疫不全症ウイルス(SIV)由来のベクターがサル胚性幹細胞(ES細胞)細胞に効率よく遺伝子を導入できることを報告した。今回、センドライウイルス(SeV)由来のベクターもサルES細胞に効率よく遺伝子導入できる上、抗ウイルス剤リバビリンが導入遺伝子の発現を抑制することを見出した。SIV・SeVともにES細胞の遺伝子操作における重要なツールとなるであろう。

現在培養維持可能な細胞のうち最も広範な分化ポテンシャルをもつのはES細胞であり、これは体外受精卵から樹立できる。不妊治療に用いられる一方で毎年廃棄される受精卵の数からすると、これらをもとにES細胞バンクを作ることも可能であり、再生医療のための究極の細胞ソースとも言える。その可能性を探るため、サルES細胞を試験管内で初期中胚葉ないし血球系に分化誘導してヒツジ胎仔に移植して(異種移植)解析した。娩出したサル/ヒツジ造血キメラにおいて、骨髄中の造血前駆細胞レベルでは約1%がサル由来であり、ヒトstem cell factorで刺激するとその割合は約10%まで増加した。しかし末梢血中に現れるサル由来血球の割合は低く(0.01%以下)、これを高めるためにはさらなる工

夫が必要である。

(4) 「サル ES 細胞から血液細胞への分化誘導」

国立感染症研究所・筑波霊長類センター 寺尾恵治

(分担項目「サルを用いた造血系再生実験」)

サル ES 細胞を中胚葉へ初期分化させサルに移植する同種移植の系を用い、造血幹細胞ドナーソースとしての ES 細胞の可能性を検討している。

試験管内でサル ES 細胞を中胚葉へ初期分化させてそのままサル胎仔に移植した場合、骨髄中造血前駆細胞レベルでの ES 由来キメラ率は 2-5%だったが、分析した 3 個体全例に奇形腫の発生をみた。奇形腫の発生元は混在している未分化 ES 細胞と考え、初期分化誘導した細胞から SSEA4 抗原陽性の未分化細胞を除去してサル胎仔に移植したところ、ES 由来造血前駆細胞の割合は同様 (2-4%) であり、腫瘍形成は認められなかった。今後、末梢血レベルでのキメラ率について解析する予定である。

(5) 「第二世代選択的増幅遺伝子と骨髄内移植の組合せによる非ヒト霊長類末梢における高遺伝子導入効率の実現」

ディナベック株式会社 上田泰次、長谷川護

(分担項目「第二世代選択的増幅遺伝子の開発と造血幹細胞への導入」)

Epo 反応型 SAG (第二世代 SAG) は、ことに細胞内部分にトロンボポエチン受容体 (Mpl) を用いた場合、有意な細胞増幅効果を発揮しうる。ただし実際の臨床的效果を期待するには、輸注した SAG 導入細胞の生着を促し、Epo 刺激前にある程度のレベルにまで高めておく必要がある。その方策として、関西医大の池原教授らが開発した骨髄腔内への直接注入法 (BMR) が有望である。本年度はサルの自家骨髄二重マーキング法により、SAG と BMR 単独、および両者併用の相乗効果について検討した。

サル骨髄より採取した CD34 陽性細胞を二分し、それぞれ SAG ベクターまたは対照ベクターで標識した上、静注または BMR にて移植した。造血系再建後、Epo 投与により SAG 標識細胞がどの程度増幅されるか解析した。対照ベクター標識細胞を静注した場合、前駆細胞・末梢血ともに標識細胞の割合は極めて低く、しかも短期間で消失した。同じ細胞を BMR で移植した場合、骨髄中の前駆細胞レベルでは長期にわたり標識細胞が検出されたが、末梢血中には殆ど出てこなかった。一方、SAG 標識細胞を BMR で移植した場合には骨髄中・末梢血中に標識細胞が長期間存在し、しかも Epo 刺激に反応して末梢血中のキメラ率は 10% 近くまで増加した。この SAG 標識細胞は顆粒球・T リンパ球・B リンパ球全ての分画において認められ、多クローンの幹細胞・前駆細胞に由来することが分かった。以上から第二世代 SAG と BMR の併用により、実用レベルの遺伝子導入細胞キメラ率を達成しうると考えられる。

3. 総合討論：SAG プロジェクトに関する今後の方針

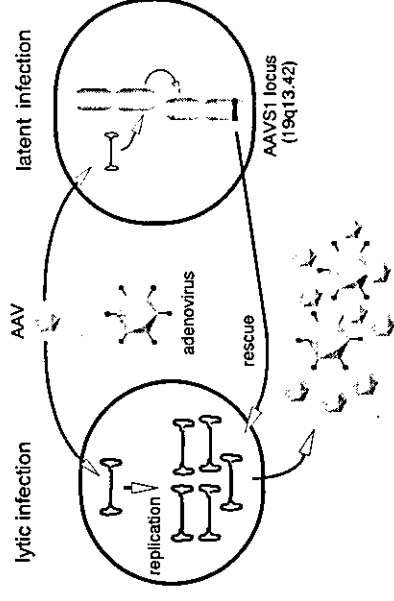
第二世代 SAG は、ステロイド受容体を分子スイッチとして用いる第一世代 SAG に比べ、Epo と EpoR の結合が自然な形でキメラ受容体の細胞内部分を活性化するため、増殖シグナル伝達の効率が改善した。キメラ受容体の細胞内部分としては、増殖シグナル強度の点では Mpl が最強であるが、Mpl 突然変異による腫瘍化の危険性や、対象疾患である CGD が顆粒球単球系に限局した疾患であることを考慮すると、GcR が妥当であろう。今後はヒト骨髄または臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて増幅効果を確認し、臨床グレードに準ずるベクターを作製してサルを用いた実験が必要になる。

BMR が遺伝子導入細胞の生着を促進することは長谷川らの報告でも裏付けられたが、治

療レベルの遺伝子導入細胞を末梢に動員するには、やはり SAG の併用に期待がもたれる。一方、昨年発表されたドイツでの X-CGD 遺伝子治療の 2 例は、軽い前処置を加えただけで、これまでの常識を遙かに上回るレベルの遺伝子導入細胞が末梢に現れ、しかも約 1 年続いている。さらに症例を重ねた場合もこのような好成績が得られるのか、より長期間の経過はどのように推移するのかなど、注意深く見守る必要がある。その上で、実際の X-CGD 遺伝子治療では BMR・SAG・前処置をどのように選択し組み合わせていくか検討していく。

この班会議に引き続くソウル大学-ViroMed とのミーティングでは、韓国サイドでの X-CGD 遺伝子治療開始に向けた進捗状況が報告される予定である。彼らはまず治療用 gp91 遺伝子のみを搭載したベクターで臨床試験を開始するため、臨床グレードのベクター作製を海外のベンチャー企業に発注済みとのことである。前処置をどうするかなどについて、その場でも検討することになる。

Life Cycle of Adeno-Associated Virus (AAV)

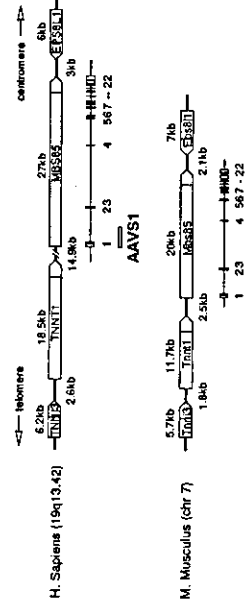


染色体部位特異的組込み法の開発

骨髓ストローマ細胞株でのAAVS1領域への
遺伝子導入の試み

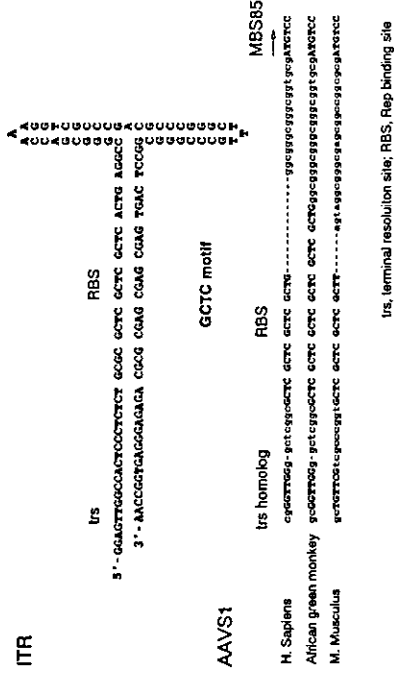
自治医大遺伝子治療研究部
卜部 匡司、小澤 敬也

Genetic Organization of The Region Surrounding The AAVS1 Locus



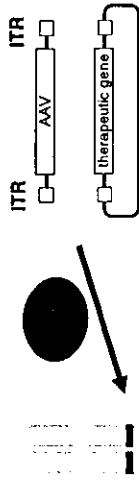
TNNT1, cardiac troponin T; TNNT1, slow skeletal troponin T; MBS85, myosin binding subunit 85; EP3BL1, epidermal growth factor receptor pathway substrate B like protein 1

Comparison of ITR and AAVS1 Sequences



Its, terminal resolution site; RBS, Rep binding site

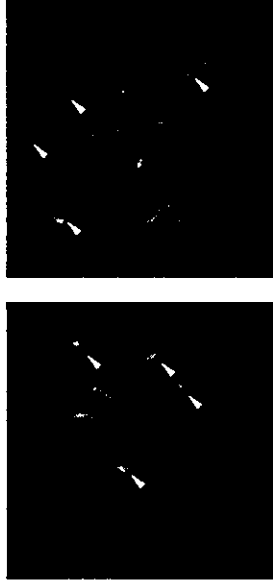
Site-Specific Integration Mediated by Rep Protein



AAVS1 locus

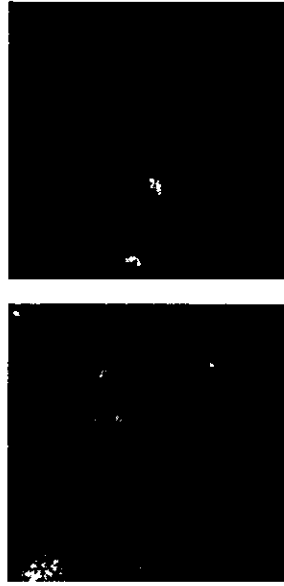
Any DNA Linked to ITR Can Be Targeted to AAVS1

FISH Analysis of 293 Cell Clones with Neo Gene Integrated into AAVS1



Arrows, Neo signal
Arrowheads, chr 19

FISH Analysis of K562 Cell Clones with Neo Gene Integrated into AAVS1



Arrows, Neo signal
Arrowheads, chr 19

方法

ヒト骨髓ストローマ細胞由来株KM-102にリポフェクションにより下記プラスミドを導入する。

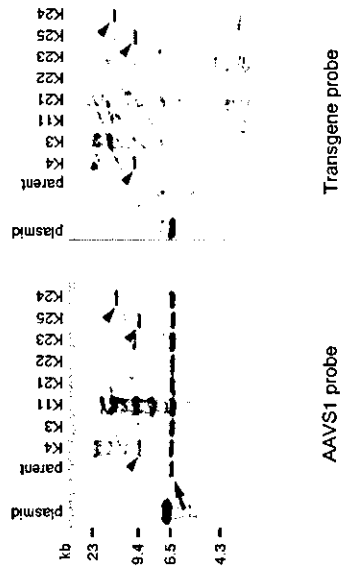


プラスミドサイジンS存在下でsingle cell clonesを拾い、サザン解析でAAVS1領域にGFP遺伝子が組み込まれているか検討する。

PCRによりAAVS1組込み部位を決定する。

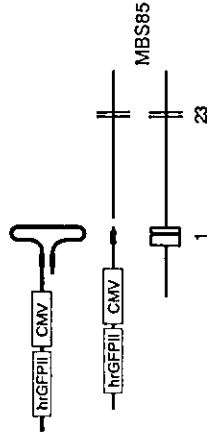
AAVS1領域への遺伝子導入に伴うMBS85の発現への影響をmRNAの定量により解析する。

Southern Blot Analysis of KM-102 Cell Clones

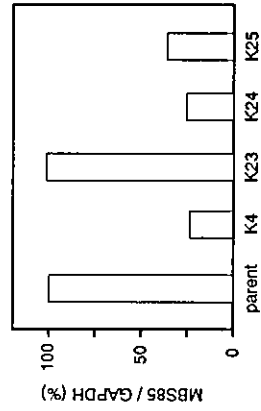


Analysis of Junction Sequence Amplified from Clone K25

ITR TCCTCTGCGCGCTGCTGCTGCTCACTGATGAGCGCGCGGACGAAAGSTGCGCCGACGCCCGG
 junction TCCTCTGCGCGCTGCTGCTGCTCACTGATGAGCGCGCGGACGAAAGSTGCGCCGACGCCCGG
 AAVS1 CAGCCCTATGCTGACATCCCGTCCAGTCCCGCTTACCCTTACCCTTCCGACATCCCGCTCAG



Quantification of MBS85 mRNA by Real Time PCR



まとめ

- AAVの組込み機構を利用し、骨髄ストローマ細胞由来のKM-102細胞でも AAVS1領域に遺伝子を導入できることが確認できた。
- サザン解析でAAVS1にGFP遺伝子が組み込まれていると考えられる3クローンではMBS85のmRNAが減少している。
- MBS85の機能は詳しくは分かっていないが、その発現レベルの低下に伴う影響は今後注意深く解析する必要がある。
- 染色体部位特異的遺伝子導入技術は安全性の観点から、遺伝子治療、再生医療での遺伝子操作に役立つと期待される。