

平成16年度厚生労働科学研究 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
小澤班会議 (平成17年2月19日)

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

担当課題

- 慢性肉芽腫症遺伝子治療に対する選択的増幅遺伝子の応用
→SNU/MiroMedとの合同ミーティングにて
- 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

2

現在の造血幹細胞移植

- 幹細胞ソース ≒ 同種 (アロ)
 - 骨髄
 - 末梢血幹細胞
 - 臍帯血
- 問題点 ≒ アロ移植に由来
 - ドナー不足
 - 生着不全
 - GVHD
 - 感染症

3

ドナープールの拡大

- 幹細胞・前駆細胞の増幅
- サイトカイン
- 支持細胞との共培養
- 選択的増幅遺伝子
- 新たな幹細胞ソース開拓
 - ES細胞
 - 自己の非造血組織

4

系列の壁を越えた細胞ソース

- 組織幹細胞の可塑性
 - 神経幹細胞
 - 間葉系幹細胞
 - 骨格筋幹細胞
- 分化を司るマスター遺伝子
 - *pdx1* → 膵島細胞
 - *msx1* → 筋脱分化

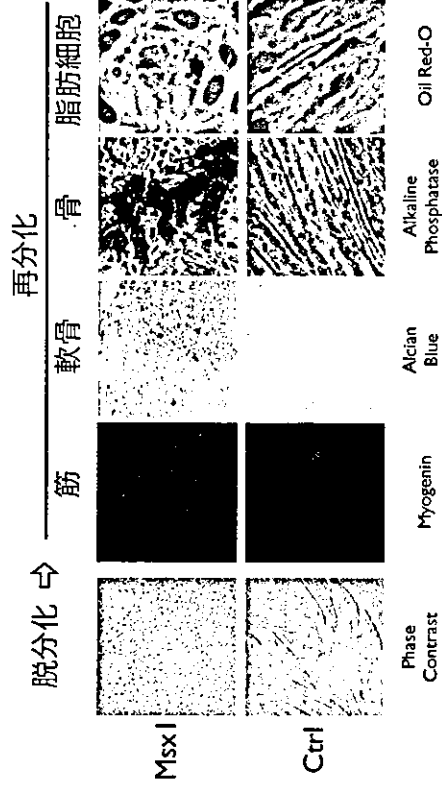
5

Msx1

- ホメオボックスドメインをもつ転写因子
 - MyoDの発現を阻害し分化を抑制
 - イモリ再生芽・マウス肢形成末端で発現
 - C2C12筋細胞における一過性強制発現実験
(Odelberg et al, Cell 103:1099, 2000)
- 筋分化マーカーの発現抑制
筋管細胞が分裂、単核細胞に
さらに筋・骨・軟骨・脂肪細胞に再分化

6

Msx1による脱分化と再分化



7

Msx1 → 生体内でも筋脱分化？

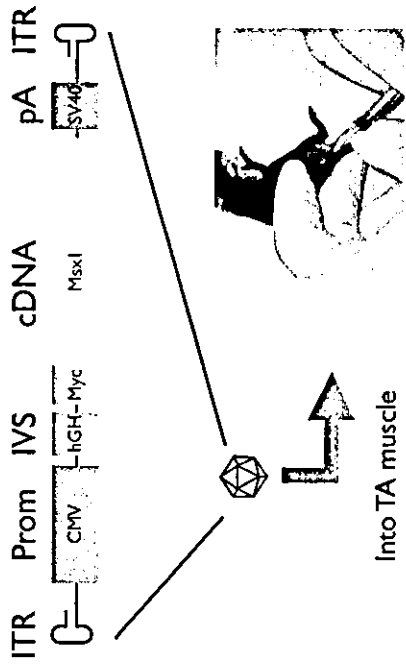
- 必要条件
 - 筋肉に効率よく遺伝子導入できる
 - 一過性（染色体に組み込まれない）
 - 細胞毒性がない
 - 再分化能を損なわない



アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター
(千葉大学・遠藤剛博士との共同研究)

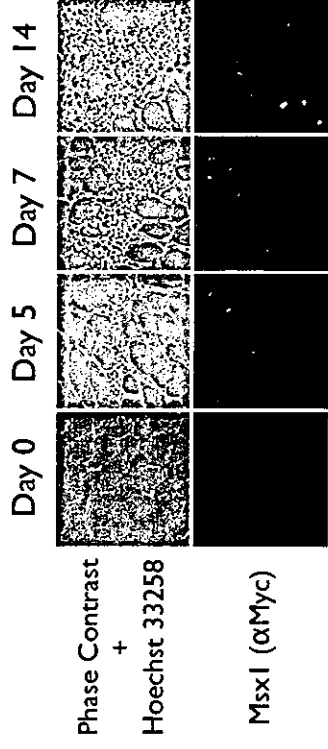
8

AAV5/Msx1



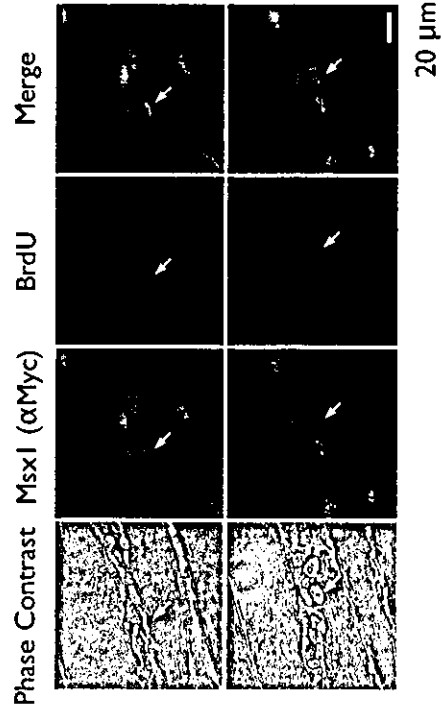
9

AAV5/Msx1筋注後の細胞分裂



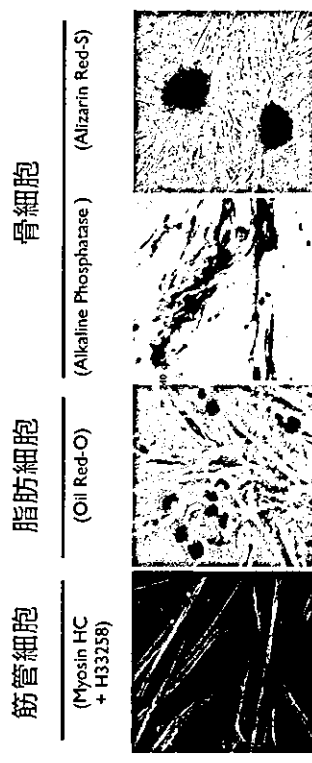
10

AAV5/Msx1筋注後の細胞分裂



11

間葉系各系列への再分化



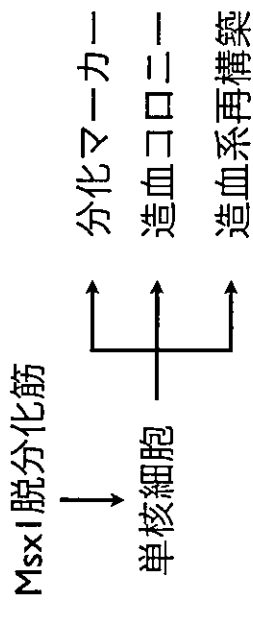
12

単核細胞の由来

- 分化した筋細胞が脱分化・増殖
- 間葉系幹細胞が増殖
- 衛星細胞が増殖

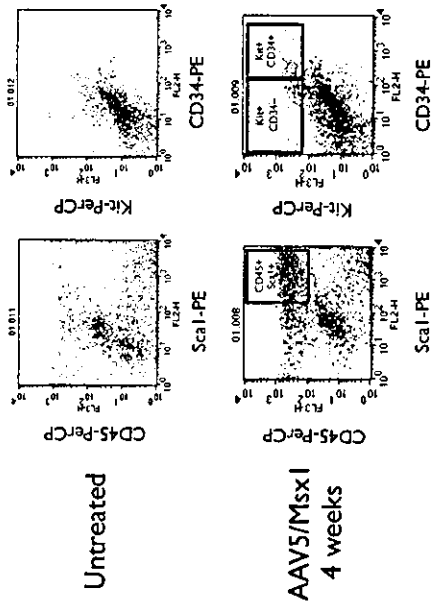
13

Msx1脱分化筋由来の細胞は
間葉系以外にも分化する？



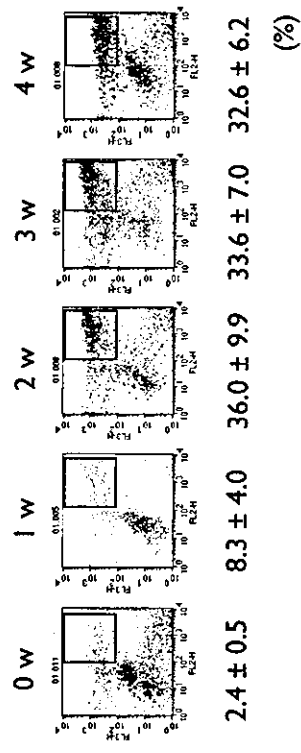
14

脱分化筋由来単核細胞の分化マーカー



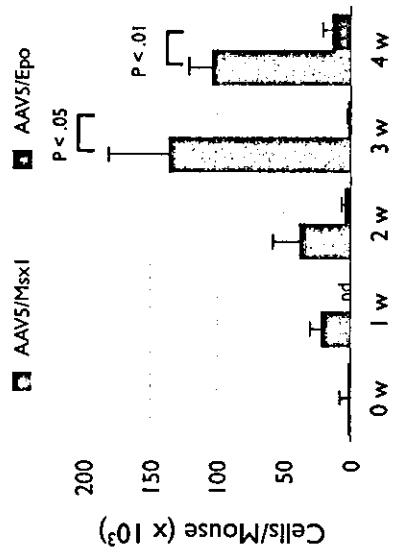
15

CD45+Sca1+細胞の増加

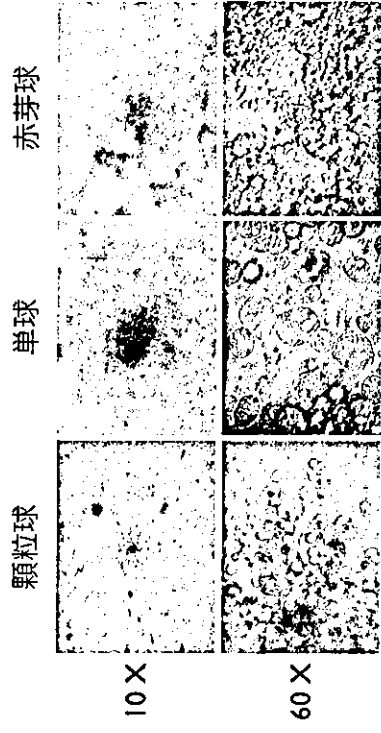


16

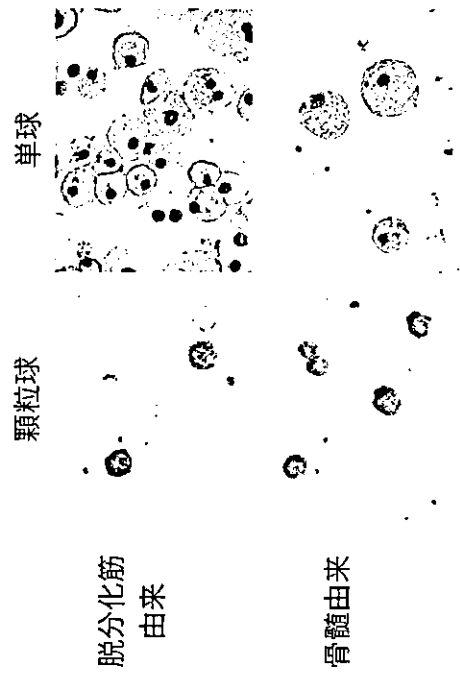
CD45+Sca1+細胞の増加



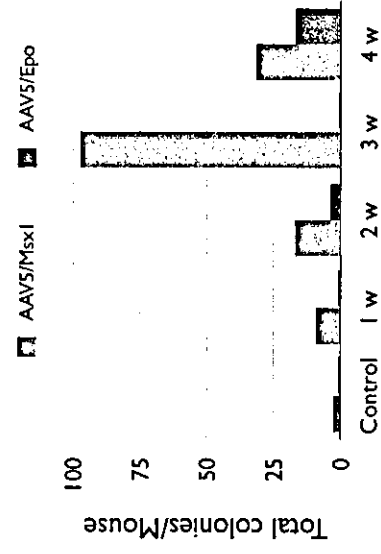
脱分化筋由来細胞のコロニー形成能



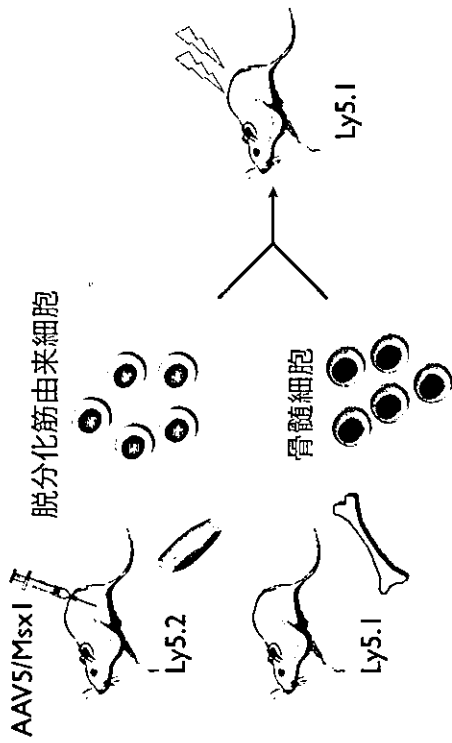
コロニー形成細胞の形態



造血前駆細胞の増加



造血系再構築実験



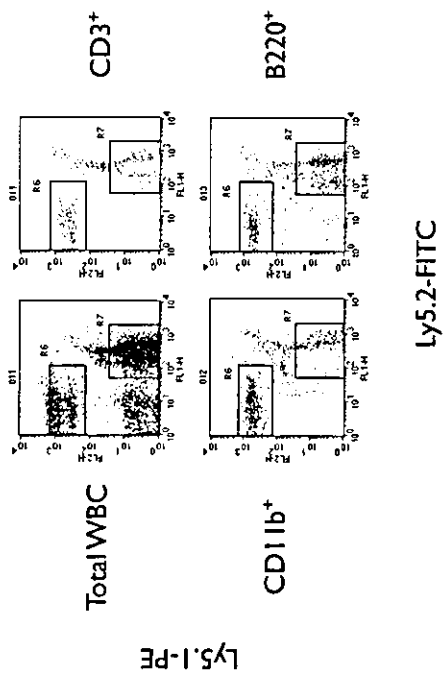
21

一次移植後の造血系再構築



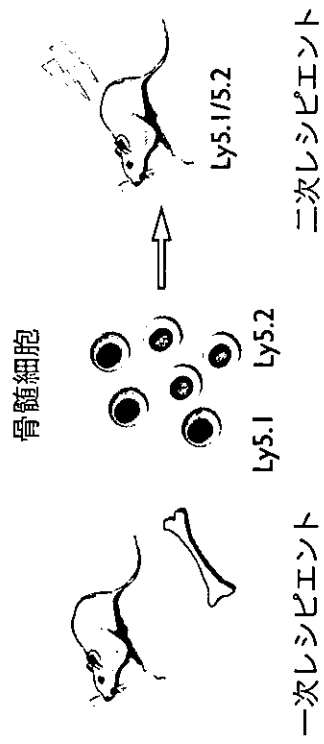
22

各血球系列への寄与 (9ヶ月)



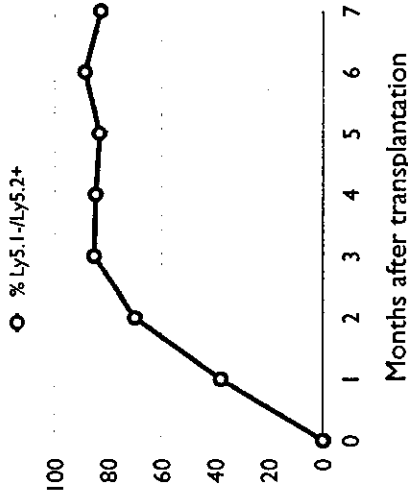
23

二次移植



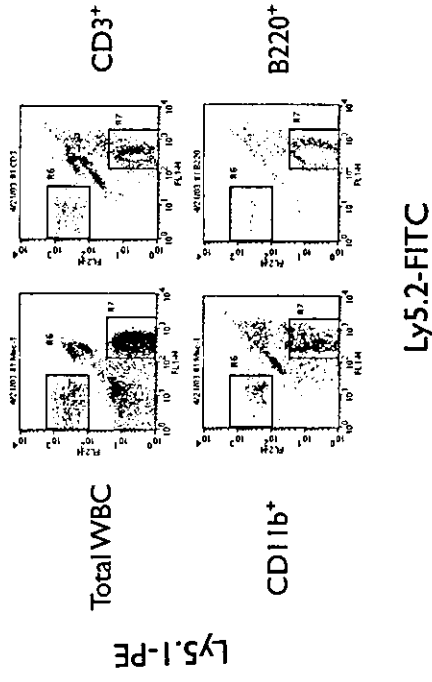
24

二次移植



25

各血球系列への寄与 (7ヶ月)



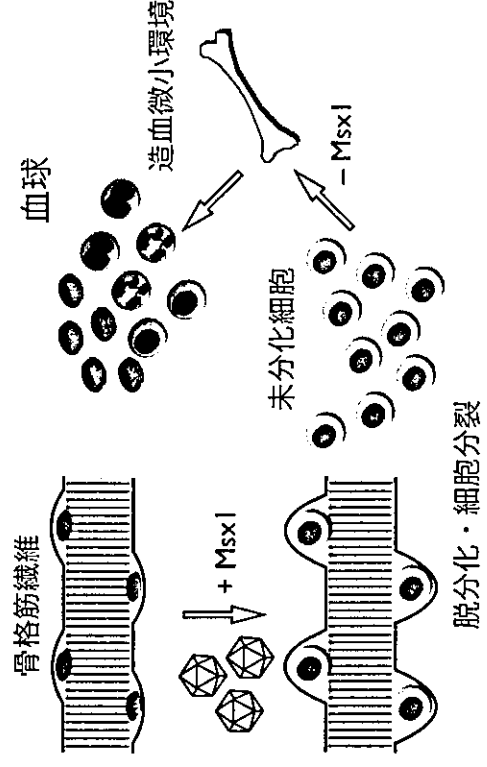
26

まとめ

- AAVベクターを用いてマウス骨格筋にMsx1遺伝子を導入し、著明な単核細胞の増加をみた
- 得られた単核細胞は in vitro にて間葉系各細胞系列に分化した
- 得られた単核細胞の約1/3は未熟な造血系細胞の表現型を示した (Sca1⁺/CD45⁺)
- Msx1遺伝子導入により骨格筋組織中の造血前駆細胞・幹細胞が増加した
- Msx1の一過性強制発現により、筋肉が新たな造血幹細胞ソースとなる可能性が示された

27

Msx1による筋脱分化と造血系への再分化



28

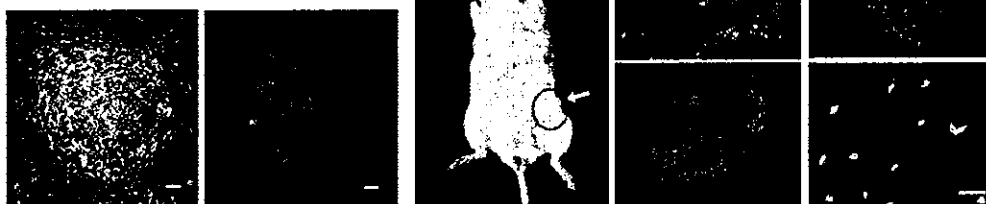
サルES細胞の遺伝子操作と移植



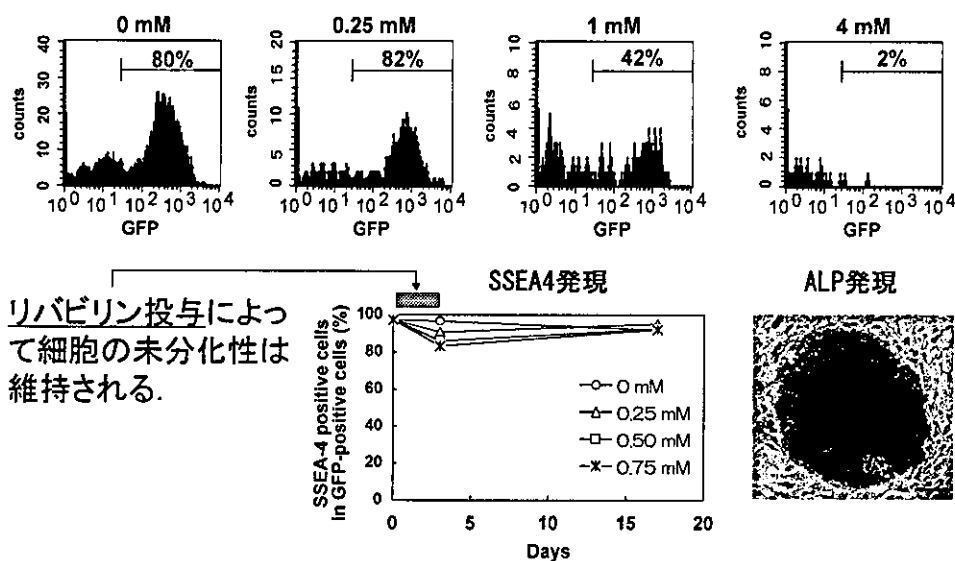
サルES細胞への効率よい遺伝子導入法の開発

アデノウイルスベクター	< 20%
アデノ随伴ウイルスベクター	< 20%
レトロウイルスベクター	< 20%
HIVベクター	< 20%
SIVベクター	> 50% (Asano <i>et al.</i> Mol Ther 2002)
センダイウイルスベクター	> 50% (Sasaki <i>et al.</i> Gene Ther 2005)

センダイウイルスベクター
によるGFP遺伝子導入



リバビリンによる導入遺伝子の発現抑制



まとめ その1

- センダイウイルス (SeV) ベクターによるサルES細胞への遺伝子導入法はすぐれている。
- 薬剤による導入遺伝子発現の調節の可能性
- SIVベクターとSeVベクターはどちらもRNAウイルスベクターだが対照的な特徴をもつ。

SIV Vector

Integrating, Non-replicating Vector

SeV Vector

Non-integrating, Replicating Vector

実施中のサルES細胞の移植による造血再構築実験 — 骨髓バンクに代わるドナーソースをめざして —

異種移植

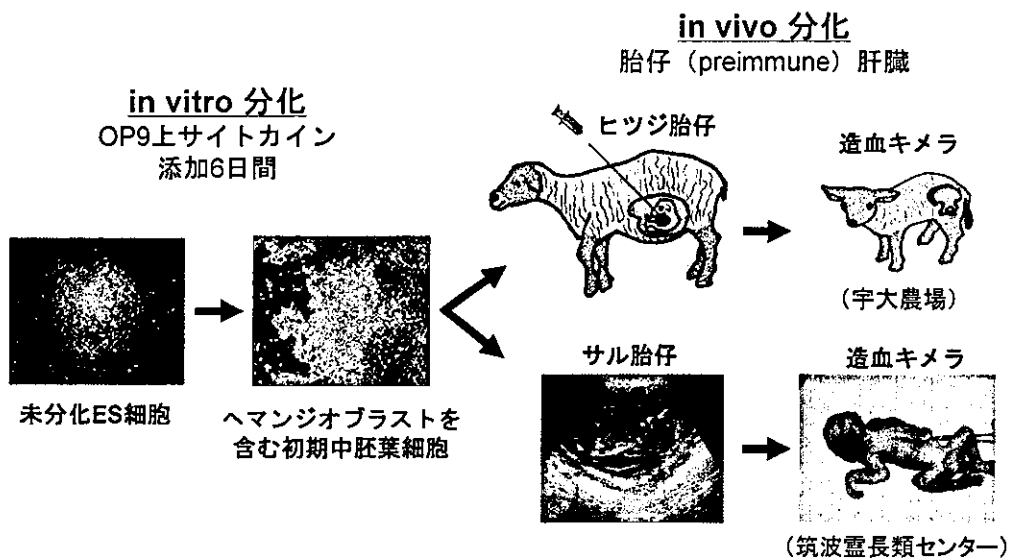
- ・免疫不全マウス：造血系再構築の基礎検討
- ・ヒツジ胎仔：「動物工場」をめざす研究

(Sasaki *et al.* Transplantation 2005)

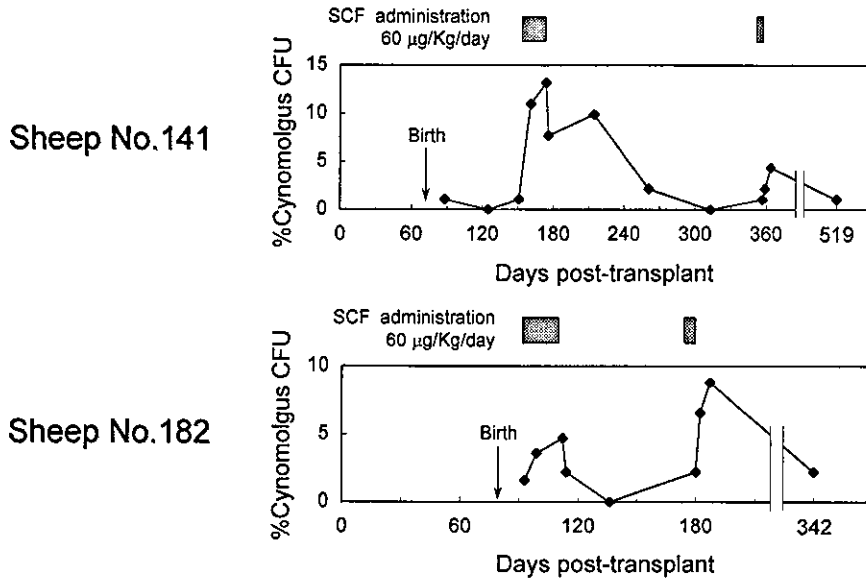
同種移植

- ・サル胎仔：臨床により近い条件で有効性と安全性を評価する

培養ES細胞（ヘマンジオブラスト）の 子宮内移植（ヒツジとサル）

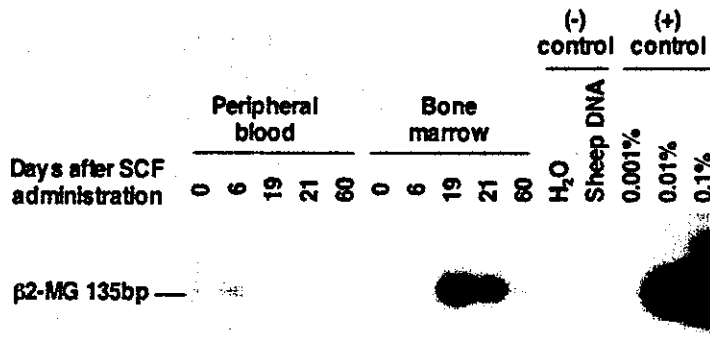


サル/ヒツジ造血キメラ (造血前駆細胞)



末梢血にサルの成熟血液細胞は
ほとんど出てこない

PCR-サザンブロッティング法



(ヒトCD34⁺細胞を移植した場合も末梢血には出てこない)

まとめ その2

- ✓ 初期中胚葉（含ヘマンジオブラスト）に分化させた ES細胞をヒツジの胎仔肝臓に移植すると，生後の造血系を一部再構築できた。
- ✓ しかし，末梢のキメラ率は低く，これを高めるための工夫が必要である。

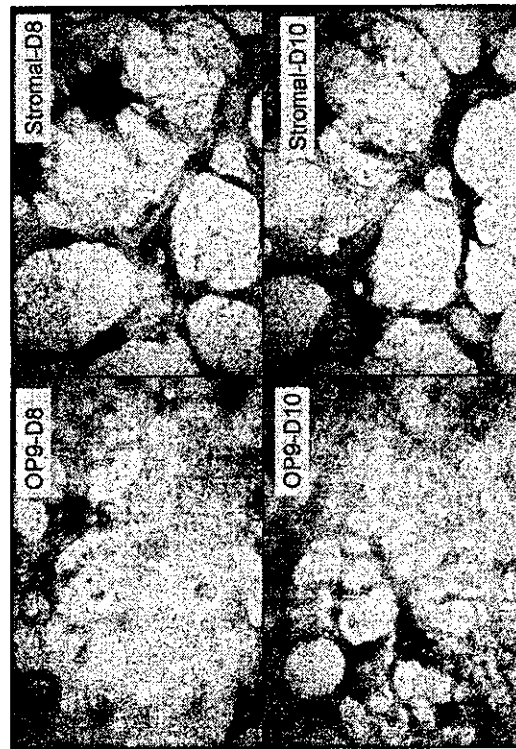
preimmuneといってもやはり相応の免疫排除？

（異種移植だから）ニッチとの相性がよくない？

厚生労働科学研究費補助金 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

1. カルES細胞を用いたin vitro造血細胞（初期中胚葉系細胞）への分化誘導
一異なったFeeder細胞での比較と今後の課題一
2. 同種体内微小環境を利用した造血系再生法の開発

国立癌研究所・東京医学実験用霊長類センター 寺島 重治



課題1：カルES細胞から初期中胚葉系細胞への分化誘導におけるFeeder細胞の検討

方法：

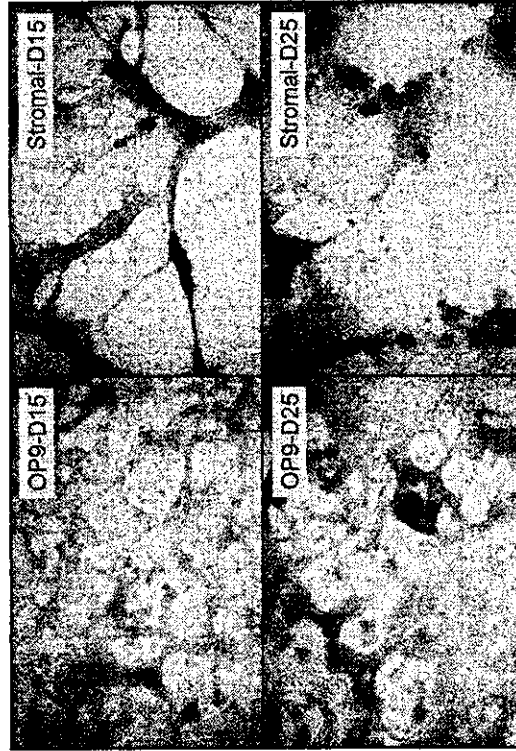
カニクイザルES細胞（CMK6/G）を

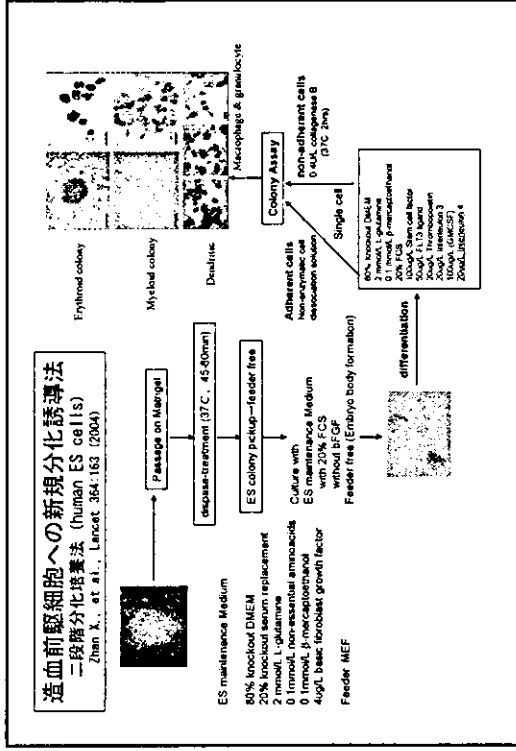
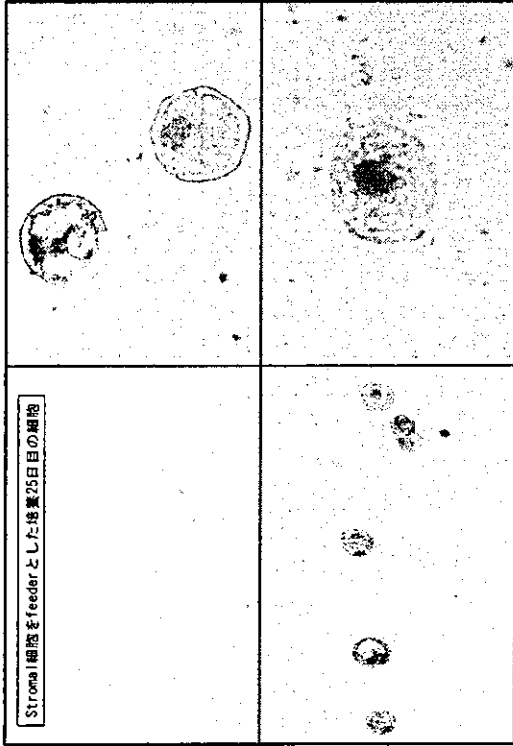
- 1) OP-9細胞
- 2) カニクイザル骨髓由来ストローマ細胞

をFeederとして

SCF、BMP-4、VEGF、Flt-3L、IL-3、IL-6、G-CSF、EPO存在下で
25日間培養

コロニー形態および分化誘導される細胞の形態を比較した



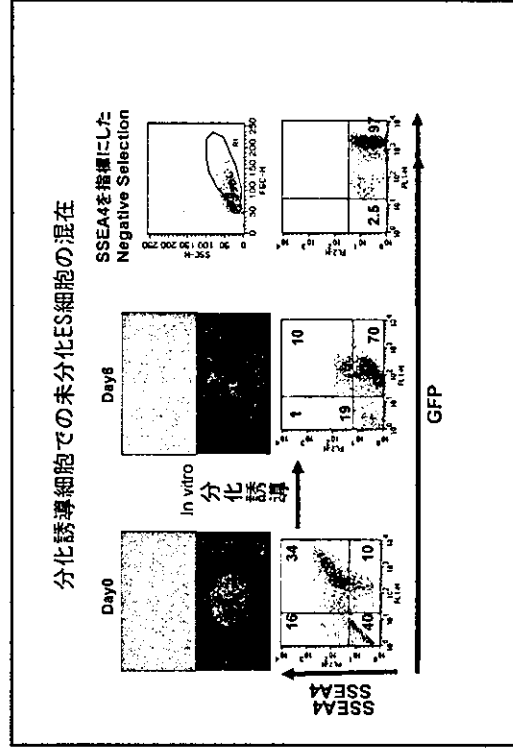


課題2：同種体内微小環境を利用したES細胞からの造血系の最終分化確認

目的：ES細胞から初期中胚葉系細胞に分化誘導した細胞を、免疫野が低く、生着スペースの狭大という利点のあるlitra (limeter)の同種胎児胚に移植し、最終分化能を確認する。

実験1：分化誘導した全細胞を移植した場合

結果：移植3ヶ月後帝王切開。ES由来造血キメラは2.5% (CFUベース) だったが、全例 (3/3) で脾臓 (テラトーマ) の形成確認



結果：SSEA4を指標としてネガティブ・セレクションした分化誘導細胞の移植では全例（6例）でテラトーマ（腫瘍）の発生は認められなかった。



サル胎仔へのES細胞同種移植実験のサマリー

移植細胞	動物番号	SSEA4の除去の有無	胎仔当りの移植細胞数 ($\times 10^6$)	ES由来の造血キメラ率 (CFU)	胚腫形成の有無
未分化ES細胞	#4	-	3.90	ND	+
	#8-1	-	0.16	ND	+
	#8-2	-	0.21	ND	+
	#5	-	10.00		+
	#6-1	-	46.00	死産	+
	#6-2	-	46.00	4.7% (4/85)	+
Day 6 中胚葉分化ES細胞	#7	+	0.16	3.2% (2/62)	-
	#10	+	1.40		-
	#11*	+	0.17	2.3% (2/86)	-
	#12*	+	0.31	4.1% (3/73)	-
	#13*	+	0.31	胎盤早期剥離による死産	-
	#14	+	0.75		-

* 早期移植 (< d50/d165)

まとめ

- 1) 鼠草類ES細胞を用いた造血系の再生では、in vitroでの中胚葉系細胞への効率的な分化誘導が不可欠であるが、安定した誘導技術を確立する必要がある。
- 2) in vitroで分化誘導した細胞には未分化なES細胞が混入しており、同種移植によりテラトーマ形成のリスクが生じる。
- 3) 未分化マーカーであるSSEA4を指標としたネガティブ・セレクションにより、分化誘導した細胞からテラトーマ形成能を有する未分化ES細胞を除去することが可能である。
- 4) 分化誘導したES細胞の同種移植により効率的な造血系再生を表現させるためにはポジティブ・セレクションにより造血前駆細胞の精化法の開発が必要。

平成16年度厚生労働科学研究補助金（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

第二世代選択的増幅遺伝子と骨髄内移植の 組み合わ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

上田 泰次、長谷川 護

ディナベック株式会社



Problems in Hematopoietic Stem Cells Gene Therapy

Safety: Adverse effects caused by vector integration site

Improvement of vectors

Development of the safety device

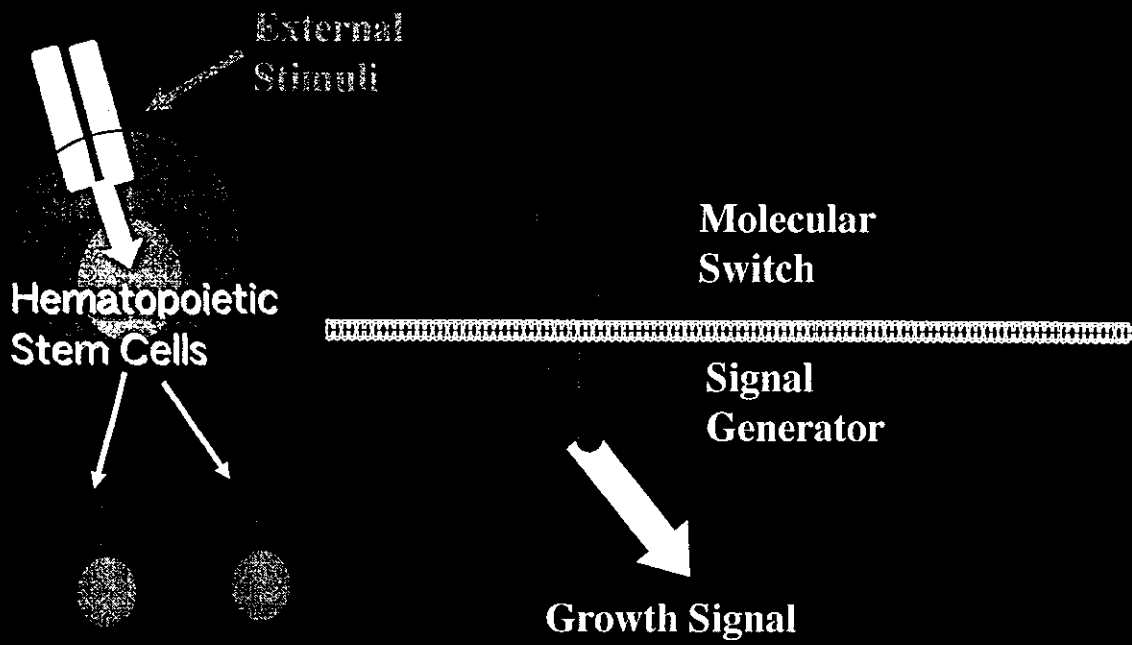
Efficacy: Low gene transfer efficiency to the HSC

Mini-transplantation with conditioning

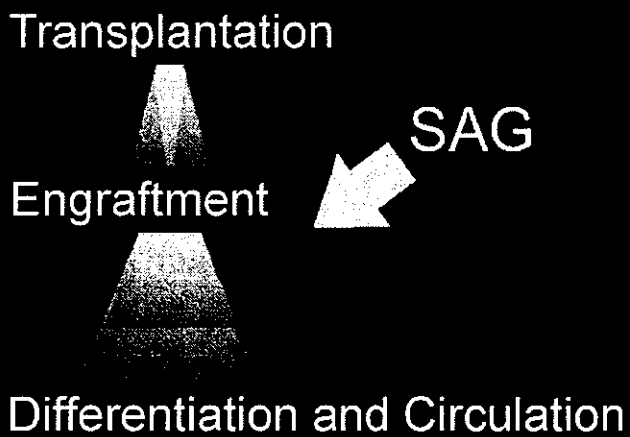
Combinational use of SAG and BMR without
conditioning



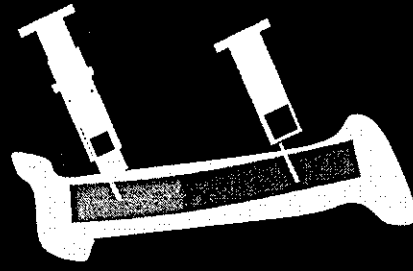
Concept and Mechanism of SAG



Importance of Engraftment of the Transduced Cells with SAG



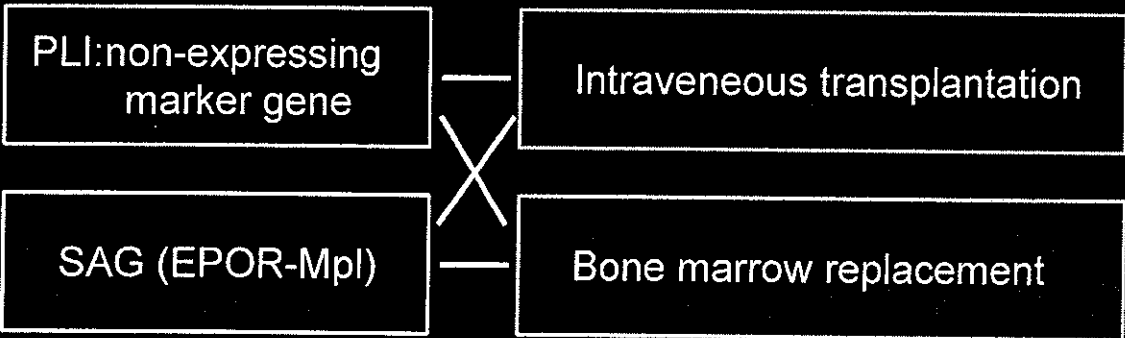
Bone Marrow Replacement (BMR)



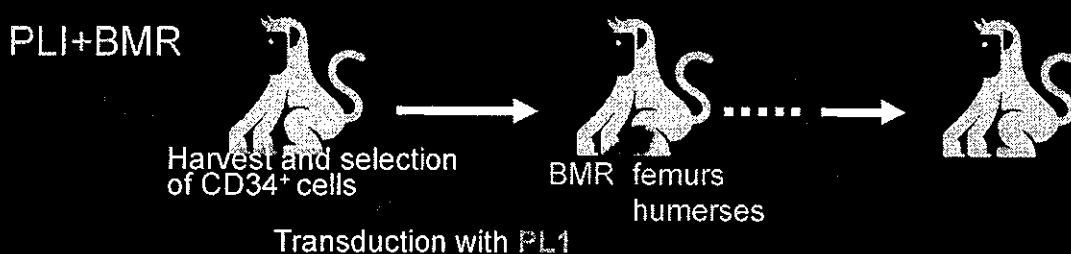
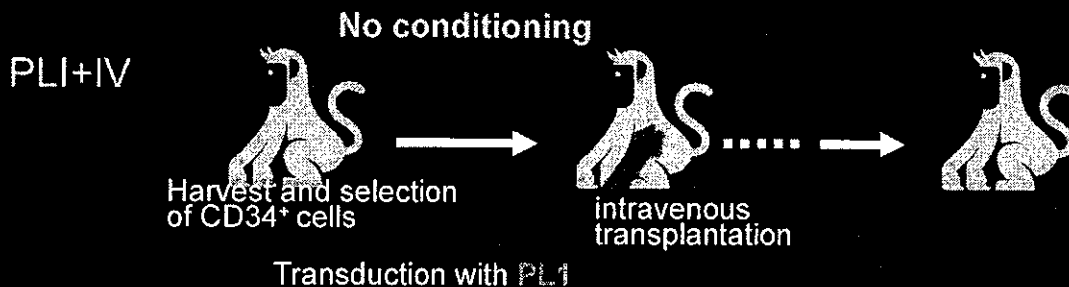
Study Design of Non-Human Primate BMT

Transduced Gene

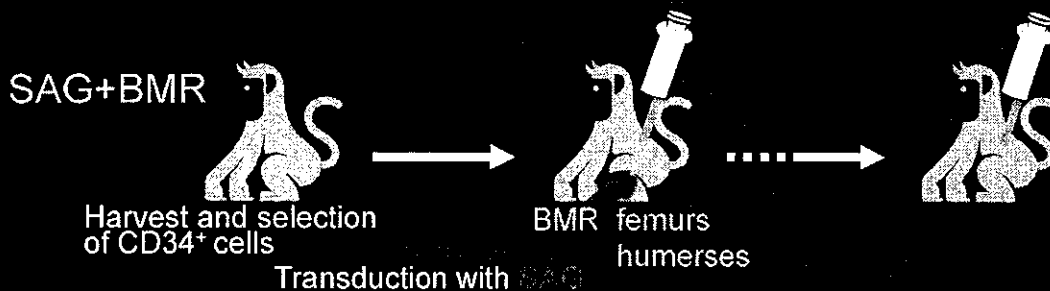
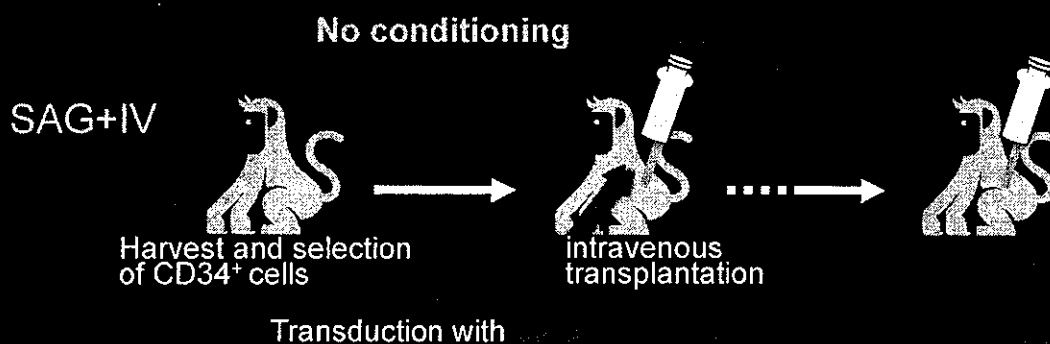
Transplanting Method



Schema of Marking Studies

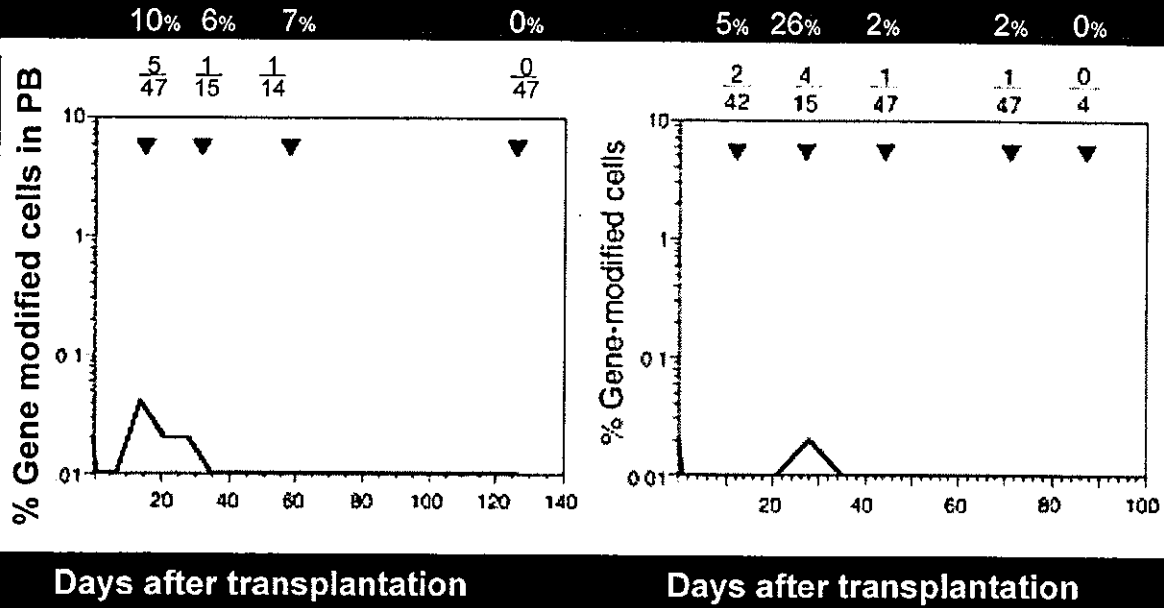


Schema of Marking Studies



PLI+IV:Low Level at PB

% Gene modified CFU in BM



PLI+BMR:Long Preservation in BM and Low Circulating in PB

% Gene modified CFU in BM

