

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

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の
高度化・安全性向上に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の 高度化・安全性向上に関する研究 -----	1
小澤 敬也	

(資料1) 班会議 議事録 -----	9
---------------------	---

II. 分担研究報告

1. 造血幹細胞を利用した慢性肉芽腫症の治療法開発 -----	11
久米 晃啓	

2. 大型動物を用いた前臨床研究 -----	17
花園 豊	

3. 選択的増幅遺伝子の造血幹細胞治療への応用研究 -----	23
長谷川 護	

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 -----	32
-----------------------	----

間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の高度化・安全性向上に関する研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 間葉系幹細胞（MSC）を同種造血幹細胞移植に応用することにより、移植片対宿主病（GVHD）の予防・治療、及び移植後の造血回復の促進（特に、臍帯血移植の場合に有用）が得られ、移植療法の安全性向上が期待される。本研究は MSC に関する基盤研究を実施し、造血幹細胞移植療法への MSC の臨床応用を推進するのが狙いである。MSC の有用性（GVHD 抑制と生着促進）が確認されれば、長期的には、i) ドナーとレシピエントの HLA を完全に一致させなくても移植が可能になるため、骨髄バンクのドナープール拡大が不要になる、ii) 成人への臍帯血移植を安心して行えるようになる、と考えられる。平成 18 年度は、マウスの骨髄由来 MSC を樹立し、その分化能、細胞表面マーカーから今までに報告されている MSC と矛盾しないことを確認した。さらに、MSC による免疫抑制の分子機構を解明するため、MSC と T 細胞を共培養し、T 細胞側の変化を調べた。MSC 存在下では T 細胞内の Stat5 のリン酸化が抑制されることを突き止めた。Stat5 はこれまでに T 細胞の増殖に不可欠と報告されており、この抑制が T 細胞の増殖を抑制している一つの要因と考えられた。次に、Stat5 のリン酸化を抑える因子として、nitric oxide の関与を調べた。阻害実験、ノックアウトマウスを用いた実験から、MSC が産生する nitric oxide が Stat5 のリン酸化を抑え、T 細胞の増殖を抑えていることを証明した。次に、MSC による生着促進に関しては、平成 17 年度、造血幹細胞を MSC と共に直接骨髄内へ移植する実験をサル系で行い、造血幹細胞の生着が促進されることを示す予備的データを得た。しかし、サル実験は多くの費用と人手がかかり、結論を引き出すのに必要な数の実験を行うのは容易でない。そこで平成 18 年度は、別の大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて、MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果を検討した。今のところ MSC を共移植した 1 頭のヒツジのみでサル造血細胞の生着が認められている。

もう一つのプロジェクトは、造血幹細胞移植技術をさらに高度化する造血幹細胞遺伝子治療開発研究で、これまで開発を進めてきている選択的増幅遺伝子（SAG）技術の実用化研究を推進した。SAG は、薬剤に反応して細胞増殖を促すキメラ受容体をコードする細胞制御遺伝子で、本研究ではヒトエリスロポエチン受容体（EpoR）細胞外部分とヒト G-CSF 受容体（GcR）細胞内部分からなるキメラ受容体（EpoR-GcR）遺伝子を用いた。SAG 技術を応用する最初の対象疾患としては、慢性肉芽腫症（CGD）を念頭に置き、近い将来の臨床研究の実現を目指す。平成 18 年度は、構成成分をすべてヒト化して接続部分の微調整を行った細胞増殖用キメラ分子について、慢性肉芽腫症モデルマウスを用いて生体内増幅の実験を引き続き行い、目的とする細胞系列において遺伝子導入細胞を増幅できることを示した。また、遺伝子導入細胞の生着を促進するため、安全に施行できる前処置の方法について検討した。尚、SAG と骨髄内移植と MSC 共移植の三者併用実験については、平成 17 年度に樹立した SAG 搭載レトロウイルスベクターの生産クローンと別の SAG（EpoR-GcR）ベクター生産細胞の樹立を平成 18 年度に開始した。この樹立を待って平成 19 年度は、サルを用いた前臨床研究として 2 種の SAG の比較を行う予定である。一方、レトロウイルスベクターの問題点であるホストゲノムの傷害性を回避するため、細胞質ベクターであるセンダイウイルスベクターに SAG を搭載し、その造血幹細胞遺伝子治療への利用の可能性を検討した。

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

A. 研究目的

造血幹細胞移植は既にほぼ確立された医療技術であるが、移植片対宿主病 (GVHD) や移植後再発は依然として大きな問題であり、また最近急速に広まりつつある臍帯血移植の場合は、生着不全のリスクを抱えている。そこで、移植技術のさらなる向上により、その安全性を確保することは、極めて重要な課題となっている。このような観点から免疫抑制活性と造血支持能を有すると考えられる間葉系肝細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) の利用が注目されている。欧米では既に臨床研究がスタートしており、MSC を造血幹細胞移植時に併用することにより、GVHD の抑制/治療効果と移植後造血回復の促進効果が得られる可能性が指摘されている。そこで本研究では、その科学的基盤を明らかにすることにより、研究終了時までには我が国における MSC 併用造血幹細胞移植の臨床応用実現を図る。MSC の有用性 (GVHD 抑制と生着促進) が確認されれば、ドナーとレシピエントの HLA を一致させなくても移植できる可能性が出てくるため、長期的目標としては、i) 骨髄バンクのドナープール拡大の必要性をなくすこと、ii) 成人への臍帯血移植を安心して行えるようにすること、が挙げられる。これまでも MSC の造血支持能力と免疫抑制能力が示唆されているが、その分子機構はほとんど解明されていない。平成 18 年度は、初代培養の MSC を用いて免疫抑

制のメカニズムの解明を試みた。また、サルやヒトジを用いた造血幹細胞移植モデル実験において、前処置後、造血系細胞と共に MSC を含む骨髄間質細胞を直接造血部位へ移植することにより骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を図ることが可能かどうか検討した。

もう一つのプロジェクトは、造血幹細胞移植技術をベースとした高度化研究としての造血幹細胞遺伝子治療開発研究で、これまで開発を進めてきている選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) 技術の実用化研究を推進する。この再生医療関連技術は、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する治療法において、SAG の働きにより修復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ものである。平成 18 年度は、臨床用 SAG (全てのコンポーネントをヒト化) を搭載したベクターについて、慢性肉芽腫症モデルマウスにおける細胞増幅効果の評価を継続した。併せて、遺伝子導入細胞の生着を促進するため、安全に施行できる前処置の方法について検討した。

また、平成 19 年度以降に実施を予定している、SAG システム、骨髄内移植、MSC 共移植の三者併用実験と、さらに効果の高い SAG および安全性の高い SAG の比較を行うための準備を進めた。一方、ホストの細胞の遺伝子傷害を回避するため細胞質ベクターであるセンダイ (SeV) ウイルスベクターに SAG を搭載し、細胞増殖を誘導できるか検討した。

B. 研究方法

1) MSC の免疫抑制作用の分子メカニズムの解明 (小澤):

マウスの骨髄から細胞を取り出し、付着細胞を継代していくことにより MSC を得た。T 細胞は主にマウスの脾臓細胞を用いた。T 細胞増殖因子として、コンカナバリン A もしくは抗 CD3/CD28 ビーズを用いた。T 細胞の増殖はトリチウム-サイ

ミジンで測定した。Nitric oxide 合成酵素阻害薬として、L-NAME を使用した。Nitric oxide 合成酵素のノックアウトマウスから MSC を樹立し、それを用いた解析を行った。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討 (花園、長谷川) :

平成 17 年度のサルを用いた検討では、サル骨髓由来 CD34⁺細胞を移植用造血細胞として用いた。しかし、サルの CD34⁺細胞は、量が限られる上、個体ごとのロット差が大きいことから、MSC の有無で生着効率を比較する平成 18 年度のヒツジ実験には、サル ES 細胞由来の造血細胞を用いた。ES 細胞は株化細胞であり均一で量を確保しやすいからである。また、共移植する MSC として、同種の (カニクイザルの) 骨髓由来間質細胞を用いたが、これは昨年度と同じである。サル ES 由来造血細胞と MSC をヒツジ胎仔の肝臓内に移植した。この時期の胎仔は肝臓が造血器官であり、胎仔の肝臓内移植が、成体の骨髓内移植に相当すると考えたからである。移植後、満期で娩出し、生まれたヒツジにおけるサル ES 細胞由来の造血をコロニー-PCR で調べた。造血キメラ率は、サル ES 由来 CFU (colony-forming unit) が全 CFU に占める割合で示した。ヒツジの飼育や手術は宇都宮大学農学部附属農場で行なった。(研究協力者: 宇都宮大学農学部長尾慶和 助教授, 国立成育医療センター外科 北野良博 博士, 同 周産期診療科 林 聡 博士)

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究 (久米、花園、長谷川) :

i) CGD モデルマウスを用いた遺伝子導入細胞の体内増幅実験: Epo 受容体 (EpoR) 細胞外部分と顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体 (GcR) 細胞内部分からなるキメラ受容体 (EpoR-GcR) は、臨床応用を想定して全コンポーネントをヒト由来とし、両者の接合部を少しずつずらしたもののなかから、マウス顆粒球単球系前駆細胞を最も効率

よく増幅したもの (EpoR-GcR version 2) を選定した。この SAG を、韓国で CGD 遺伝子治療臨床試験に使用されている MT/gp91 レトロウイルスベクター (gp91 は X 連鎖型 CGD の治療用遺伝子; 共同研究相手の ViroMed 社より供与) に組み込んだ (MT/gp91iresSAG)。MT/gp91iresSAG ベクターを用いて X 連鎖型 CGD モデルマウスの骨髓細胞に遺伝子導入し、同系マウスに移植して、Epo 刺激 (10 単位皮下注連続 5 日間を 1 クール) により遺伝子導入細胞の体内増幅が可能であるか検討した。遺伝子導入効率の算定には、末梢血顆粒球の活性酸素産生能を、ジヒドロローダミン-123 (DHR) 還元能を指標としてフローサイトメトリーで測定した。

ii) 遺伝子導入細胞の生着を促進する前処置の検討: 副作用等の観点から、前処置は最小限にとどめることが望ましいため、近年臨床で用いられているブスルファンの有用性を検討した。

8mg/kg、16mg/kg、50mg/kg のブスルファンを野生型 C57BL/6 マウス (Ly5.2) に腹腔内投与し、2 日後に Ly5.1 コンジュニックマウスから新鮮骨髓細胞 6×10^6 個を移植した。経時的に採血して、フローサイトメトリーにて生着率を追跡した。

iii) SAG ベクター高力価生産株の樹立: 安全性の高い SAG (EpoRGcR) の機能確認をサルでの前臨床研究で行うために、SAG 搭載レトロウイルスベクター生産株の樹立に着手した。

iv) ベクターからホストを癌化に導く遺伝傷害性を除くために、DNA 相を経ない RNA ベクターである SeV に SAG (EpoRMp1) を搭載し、IL-3 依存細胞である Ba/F3 に感染させ、Epo 依存的に増殖するか調べた。同様に、Epo 依存的増幅がヒト臍帯 CD34 陽性細胞で起こるかどうかを調べた。

(倫理面への配慮)

マウスおよびヒツジを用いた実験 (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程に従って行った。霊長類医科学研究センターでのサルの実験は、霊

長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。サル細胞及びサル個体を用いる組換え DNA 実験については、自治医科大学および医薬基盤研究所の承認を受けた。

B. 研究結果

1) MSC の免疫抑制作用の分子メカニズムの解明：

これまでの報告通り、樹立した初代培養の MSC は CD44, Sca-1 が陽性で、CD45, Mac-1 が陰性であった。また、アルカリフォスファターゼ活性のある細胞に分化すること、脂肪滴を持った細胞に分化することから、骨芽細胞、脂肪細胞に分化したと考えられた。T 細胞の増殖抑制効果は著明で MSC の量依存的に抑制効果が増強した。T 細胞が分裂を始める前の段階、24 時間後の IFN- γ , IL-2 の産生を比べると、IL-2 の量は MSC の存在に関わらず一定であったが、IFN- γ は MSC の存在下で産生量が減少した。T 細胞の活性化マーカーを調べると、MSC の存在に関わらず活性化されていることが分かった。

48 時間後に T 細胞の蛋白解析をウエスタンブロット法により行ってみると、Stat5 のリン酸化が抑制されていることが判明した。Stat5 のリン酸化を抑制する機序を調べていく過程で、nitric oxide が候補となった。Nitric oxide は T 細胞の増殖を抑制することが知られており、Stat5 のリン酸化も抑制することが知られていたからである。

MSC と T 細胞の共培養の上清中の nitric oxide を測定すると、大量に産生されていることを発見した。Nitric oxide は MSC の量依存的に増加し、MSC のみ、T 細胞のみでは産生されず、活性化した T 細胞と MSC の共培養でのみ、その産生が確認された。

次に T 細胞、MSC のどちらが産生しているのかを突き止めるために、ウエスタンブロット法を用いた。共培養後に二つの細胞群に付着性を利用し

て分離し、nitric oxide 合成酵素の発現を調べたところ、共培養後の MSC のみで誘導されていることが明らかとなった。共培養前の MSC は発現していないことも確認された。

Nitric oxide の経時的産生をみると、24 時間後辺りから産生が開始され、以後少なくとも 3 日間は産生が持続することが分かった。

Transwell と呼ばれる膜で T 細胞と MSC の接触を遮った場合、抑制効果の減弱と nitric oxide の産生の減少が認められた。

ここまでの研究で nitric oxide が MSC から産生されること、活性化 T 細胞が必要であることなどが明らかとなった。Nitric oxide の関与を証明するために、nitric oxide 合成酵素阻害剤を用いた。この阻害剤を加えると、T 細胞の増殖が回復し、確かに nitric oxide が関与していることが証明された。さらに、Stat5 のリン酸化も回復し、こちらも nitric oxide が関与していることが証明された。

最後に、nitric oxide 合成酵素のノックアウトマウスから MSC を樹立し、その T 細胞増殖抑制効果を調べた。予想通り、抑制効果が減弱しており、nitric oxide が関与していることがこの系でも証明された。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討：

これまでに、ES 由来造血細胞の単独移植 5 例、MSC との共移植 6 例を実施した。うち、流産が前者では 3 例、後者では 1 例あった。そのため、解析に供することのできたヒツジは、ES 由来造血細胞単独移植 5 例中 2 例、MSC 共移植 6 例中 5 例であった。解析できた MSC 共移植 5 例中 1 例のみで 1% の造血キメラを認めた。今のところ、造血キメラを認めたのはこの 1 例のみである。MSC 非使用例 (ES 由来造血細胞の単独移植例) は造血キメラが得られなかったが、流産が多く、そもそも解析できたものが 2 例しかない。したがって、MSC の生着促進効果については、まだはっきり結

論づけられない。

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究 :

MT/gp91iresSAG ベクターを用いて X-CGD マウスの骨髄細胞に EpoR-GcR (Version 2) 遺伝子を導入し、同系マウスに移植して造血系を再構築した。レシピエントを 2 群に分け (Epo 投与群と非投与群)、機能回復顆粒球の割合を追跡した。Epo 投与群では第 1 クールの刺激にて $0.99 \pm 0.13\%$ から $3.88 \pm 0.83\%$ ($P=0.0061$)、第 2 クールの刺激にて $1.48 \pm 1.08\%$ から $4.26 \pm 1.24\%$ ($P=0.0654$) へとそれぞれ上昇した。一方、Epo 非投与群 (対照群) においては、第 1 クールは $1.57 \pm 0.69\%$ から $2.29 \pm 1.49\%$ ($P=0.4747$)、第 2 クールは $0.61 \pm 0.35\%$ から $1.37 \pm 1.49\%$ ($P=0.2916$) と、いずれも有意な変化は見られなかった。第 2 クール刺激後の Epo 投与群の値は非投与群に比べて有意に高く ($P=0.0174$)、SAG による細胞増幅効果が現れた。

ブスルファン前処置によるドナー細胞生着促進効果は、その投与量に依存していた。すなわち、移植 3 ヶ月後のレシピエント末梢血中ドナー細胞の比率は、8mg/kg 群が $1.7 \pm 1.0\%$ 、16mg/kg 群が $13.8 \pm 7.1\%$ 、50mg/kg 群が $92.2 \pm 1.2\%$ であった。

SAG (EpoRGcR) 搭載ベクター生産細胞に関しては、まだ 10^6 以下の粒子力価しかなく、さらなる調製が必要である。SeV ベクターに搭載した SAG はマウス細胞株 Ba/F3 を Epo 依存的に増殖させた。しかし、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は増幅できず、レトロウイルスベクターとの機能差を確認した。SeV ベクターの発現持続性、細胞に対する非傷害性の確認はできた。

D. 考察

1) MSC の免疫抑制作用の分子メカニズムの解明 :

これまでに報告されている抑制因子としては、

TGF- β , PGE₂, indoleamine-2,3-dioxygenase などがある。今回我々が発見した nitric oxide とこれらの因子との比較実験では、PGE₂ は nitric oxide 同様、その関与が示されたが、TGF- β , indoleamine-2,3-dioxygenase は関与を証明できなかった。これらの矛盾は使用している MSC の種が違うことにあるのかもしれない。

2) MSC による移植細胞の生着促進効果に関する大型動物を用いた検討 :

本研究事業の初年度にあたる平成 17 年度は、サルを用いた遺伝子標識研究を計画し、1 頭実施した。その結果、造血幹細胞を MSC と共移植した場合、造血幹細胞の生着は約 5 倍よい傾向が観察された。まだ例数は 1 頭で予備的結果にすぎない。しかし、サルへの移植実験は費用と手間がかかり、多数例を実施するのは容易ではない。他の動物への移植も考える必要がある。マウスを使った実験結果は、そのサイズの故か、ヒトまで外挿できないことが多い。ヒトは単にマウスを大きくしただけではない。大型動物を用いる実験が必要な所以である。そこで平成 18 年度はヒツジ胎仔への子宮内移植を行なった。

胎仔への移植実験には 3 つの大きなメリットがある。まず、胎仔は、特に第 1 トリメスターの胎仔は、免疫学的に未成熟であり、たとえ異種の細胞を移植しても拒絶されることなく生着し、免疫抑制がいないこと、第 2 は、胎仔は日に日に大きくなるため、生着のためのスペースが自然に生まれ、移植前処置がいないこと、そして第 3 は、子宮内はそもそも無菌環境なので、移植前後の無菌管理がいないことが挙げられる。この系を用いて、MSC による移植細胞の生着促進効果を検討した。今のところ生後のヒツジで、移植したサル ES 由来造血細胞の生着が認められたのは、MSC を共移植した 1 頭のみである。今後、サルまたはヒツジの症例数を増やし、MSC の生着促進効果を明らかにしたい。

3) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血掲

載棒の体内増幅法に関する開発研究：

疾患モデルマウスの骨髄細胞に、改良型 SAG (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を導入することにより、CGD 治療の標的である顆粒球系細胞を増幅できることが示された。GcR シグナルによる細胞増幅効果はそれほど強力なものではなかったが、ブスルファン前処置などを併用してドナー細胞の生着を促進してやることによって、大型動物でもその効果が期待できる。

また、造血幹細胞と MSC との骨髄内共移植に、SAG システムを組み合わせれば、さらに有効性が向上する可能性がある。

SeV ベクターへの搭載は、持続性、毒性の低さから幹細胞遺伝子治療への可能性はあるが、CD34 陽性細胞を増幅しない理由の解明と、改変型 SeV ベクターの検討が必要である。

E. 結論

・ MSC の免疫抑制メカニズムの一つとして、nitric oxide が関与していることを証明した。MSC から nitric oxide が産生され、T 細胞内の Stat5 などの活性化が抑えられ、最終的に細胞増殖が抑制されていることが示唆された。マクロファージでは同様のメカニズムが報告されているが、MSC でも同じメカニズムが働いていることを証明した。

・ サルを用いた実験から、MSC を造血幹細胞とともに骨髄内へ直接移植すると、造血幹細胞の生着を高めることを示す予備的データが得られた (平成 17 年度)。しかし、サルへの移植実験は費用と手間がかかり、*n* 数を増やすのは容易ではない。平成 18 年度は、大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果の検討を行なった。

・ 改良型選択的増幅遺伝子 (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を治療用遺伝子と共に標的細胞に導入することにより、慢性肉芽腫症遺伝子治療の

効果を増強しうる。

・ MSC 共移植、骨髄内移植、SAG システムの三者併用前臨床研究、および EpoR-Mpl と EpoR-GcR の機能比較をサルで実施する準備を進めた。

・ 遺伝傷害性のない RNA ベクターである SeV に SAG (EpoRmp1) を搭載し、造血幹細胞遺伝子治療への利用の可能性について調べた。

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) Oh, I., Ozaki, K., Miyazato, A., Sato, K., Meguro, A., Muroi, K., Nagai, T., Mano, H., and Ozawa, K.: Screening of genes responsible for differentiation of mouse mesenchymal stromal cells by DNA microarray analysis of C3H10T1/2 and C3H10T1/2-derived cell lines. *Cytherapy* 9: 80-90, 2007.
- 2) Oh, I., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tatara, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K.: Interferon- γ and NF- κ B mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 956-962, 2007.
- 3) Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228-234, 2007.
- 4) Nakata, M., Okada, T., Ozawa, K., and Yada, T.: Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 1046-1051, 2007.
- 5) Zhang, Y., Wang, C., Mizukami, H., Itoh, H.,

- Kusama, M., Ozawa, K., and Jinbu, Y.: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 25: 417-423, 2006.
- 6) Ozaki, K., Hishiya, A., Hatanaka, K., Nakajima, H., Wang, G., Hwu, P., Kitamura, T., Ozawa, K., Leonard, W.J., and Nosaka, T.: Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Hematol.* 84: 224-230, 2006.
- 7) Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Miyoshi, T., Tatara, R., Meguro, A., Fujiwara, S., Obara, Y., Oh, I., Kikuchi, S., Sato, K., Matsuyama, T., Toshima, M., Ohmine, K., Ozaki, K., Takatoku, M., Mori, M., Nagai, T., and Ozawa, K.: Pleocytosis after hemopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* 47: 1613-1617, 2006.
- 8) Kawano-Yamamoto, C., Muroi, K., Nagatsuka, Y., Higuchi, M., Kikuchi, S., Nagai, T., Hakomori, S.I., and Ozawa, K.: Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: Phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis. *Leuk. Res.* 30: 829-839, 2006.
- 9) Ohmori, T., Mimuro, J., Takano, K., Madoiwa, S., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Niimura, M., Mitomo, K., Tabata, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Iba promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J.* 20: E769-E779, 2006.
- 10) Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol. Ther.* 13: 738-746, 2006.
- 11) Urabe, M., Xin, K.Q., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol. Ther.* 13: 823-828, 2006.
- 12) Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., and Ozawa, K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J. Gene Med.* 8: 990-997, 2006.
- 13) Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., and Ozawa, K.: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 17: 921-928, 2006.
- 14) Shibata, H., Ageyama, N., Tanaka, Y., Kishi, Y., Sasaki, K., Nakamura, S., Muramatsu, S., Hayashi, S., Kitano, Y., Terao, K., and Hanazono, Y.: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* 24: 1450-1457, 2006.
- 15) Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Terao, K.: Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Vet. Med.* 68: 507-510, 2006.

- 16) Asano, T., Shibata, H., and Hanazono, Y.: Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol. Biol.* 329: 295-303, 2006.
- 17) Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K., and Hanazono, Y.: In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol. Biol.* 329: 459-467, 2006.
- 18) Yoneyama, Y., Ueda, Y., Akutsu, Y., Matsunaga, A., Shimada, H., Kato, T., Kubota-Akizawa, M., Okano, S., Shibata, S., Sueishi, K., Hasegawa, M., Ochiai, T., and Yonemitsu, Y.: Development of immunostimulatory virotherapy using non-transmissible Sendai virus-activated dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 129-135, 2007.
- 19) Kanzaki, S., Shiotani, A., Inoue, M., Hasegawa, M., and Ogawa, K.: Sendai virus vector-mediated transgene expression in the cochlea in vivo. *Audiol. Neurootol.* 12: 119-126, 2007.
- 20) Nagase, T., Matsumoto, D., Nagase, M., Yoshimura, K., Shigeura, T., Inoue, M., Hasegawa, M., Yamagishi, M., and Machida, M.: Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis: a preliminary report. *J. Craniofac. Surg.* 18: 49-53, 2007.
- 21) Shibata, S., Okano, S., Yonemitsu, Y., Onimaru, M., Sata, S., Nagata-Takeshita, H., Inoue, M., Shu, T., Hasegawa, M., Moroi, Y., Furue, M., and Sueishi, K.: Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN- β gene. *J. Immunol.* 177: 3564-3576, 2006.
- 22) Fujita S, Eguchi A, Okabe, J., Harada, A., Sasaki, K., Ogiwara, N., Inoue, Y., Ito, T., Matsuda, H., Kataoka, K., Kato, A., Hasegawa, M., and Nakanishi, M.: Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1728-1734, 2006.
- 23) Yoshizaki, M., Hironaka, T., Iwasaki, H., Ban, H., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., and Inoue, M.: Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J. Gene Med.* 28: 1151-1159, 2006.
- 24) Griesenbach, U., Boyton, R.J., Somerton, L., Garcia, S.E., Ferrari, S., Owaki, T., Ya-Fen, Z., Geddes, D.M., Hasegawa, M., Altmann, D.M., and Alton, E.W.F.W.: Effect of tolerance induction to immunodominant T-cell epitopes of Sendai virus on gene expression following repeat administration to lung. *Gene Ther.* 13: 449-456, 2006.
- 25) Kaneko, K., Yonemitsu, Y., Fujii, T., Onimaru, M., Jin, C.H., Inoue, M., Hasegawa, M., Onohara, T., Maehara, Y., and Sueishi, K.: A free radical scavenger but not FGF-2-mediated angiogenic therapy rescues myonephropathic metabolic syndrome in severe hindlimb ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290: 1484-1492, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特になし。

(資料 1)

班会議 議事録

ヒトゲノム再生医療等研究事業（再生分野）

平成 18 年度 班会議 議事録

日時 平成 19 年 2 月 3 日（土）

場所 自治医科大学研修センター第 2 / 3 研修室

研究課題名：間葉系幹細胞を利用した造血幹細胞移植技術の高度化安全性向上に関する研究

開会の挨拶

小澤（主任研究者）より研究組織の構成、各研究者の研究について概略説明があった。

各研究者の成果発表

- 1) 小澤から、マウス間葉系幹細胞初代培養による研究結果が示された。T 細胞の増殖を抑制するメカニズムとして、間葉系幹細胞からの NO（一酸化窒素）の産生、それによる stat5 の活性化の抑制、を見出したことが報告された。このメカニズムは間葉系幹細胞においては、今までに報告されておらず、注目に値するとの報告であった。また、マウスの GVHD モデルに細胞療法として初代培養間葉系幹細胞を投与する方法を試みたが、治療効果は現時点では明瞭でないとの報告があった。また、ヒト間葉系幹細胞を用いた GVHD 治療の臨床試験は準備を終了しているものの、登録症例が現時点ではまだないことが報告された。
- 2) 久米から慢性肉芽腫症の遺伝子治療に向けて、選択的増幅遺伝子を利用した造血系細胞の体内増幅に関する報告があった。前処置の検討をマウスでおこなった結果が報告された。それによると、マウスではブスルファンの量はヒトの体重換算式より多めに必要であることがわかった。また、外国の臨床試験のデータから発現を落とさない工夫が必要であることが示唆されたため、インスレーター（区域外からの干渉をなくし、発現を安定化する）で挟む工夫を検討中であることが紹介された。
- 3) 花園からヒツジの子宮内移植の系で、間葉系幹細胞（骨髄からの付着細胞）を用いた場合と、用いなかった場合との結果が示された。全部で 12

頭を使用した実験であったものの、流産が不可抗力的に起きたこと、造血コロニーでのキメラ率が低かったことから、評価は困難であった。今後はサルで、間葉系幹細胞、選択的遺伝子増幅、骨髄内移植法の三つを用いることにより、安全な移植を模索する方向性が示された。

- 4) 長谷川から選択的増幅遺伝子を利用した造血系細胞の体内増幅に関する報告があった。センダイウイルスは標的細胞のゲノムに挿入されないため、レトロウイルスよりも安全と考えられたため、今回、センダイウイルスとレトロウイルスの効果を比較した。ヒトの臍帯血にレトロウイルスもしくはセンダイウイルスを用いて、選択的増幅遺伝子を導入し CD34 細胞を増幅できるかどうか検討した。残念ながら、センダイウイルスでは CD34 細胞を増幅できなかった。

総合討論

小澤より、マウスの系で間葉系幹細胞を用いた治療の前臨床研究を進めるにあたって、さらに考慮すべき工夫についてコメントがあった。また、これに関連して外国の臨床試験での間葉系幹細胞のソースに関する質疑があったが、血縁と非血縁の両者が用いられていることが説明された。

久米より、ドイツのグループが慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究に成功したと思われたものの、その後発現が低下したことが問題点として挙げられた。現在、日本では成育医療センター、韓国では ViroMed 社が臨床試験の準備を進めていることが紹介された。

花園の発表に関して小澤より、ヒツジを用いたことと、サルの ES 細胞から誘導した造血系細胞をヒトの造血幹細胞の代わりに使用したことについて、質疑があった。ヒツジはサルよりも格段に扱いやすいこと、ヒトの造血幹細胞はソースに限りがあることなどが、理由として挙げられた。花園より次年度はサルを用いる予定であることが発表された。

長谷川の発表に関して、可能ならば、細胞内ドメインが Mpl と GSCFR との比較を実施してほしいとの要望があった。

造血幹細胞を利用した慢性肉芽腫症の治療法開発

分担研究者 久米 晃啓（自治医科大学医学部助教授）

研究要旨

造血幹細胞遺伝子治療の効果を改善することを目的として、改良型遺伝子導入細胞増幅システム（「選択的増幅遺伝子」）の評価を行った。構成成分をすべてヒト化して接続部分の微調整を行った細胞増殖用キメラ分子について、慢性肉芽腫症モデルマウスを用いて生体内増幅の実験を行い、目的とする細胞系列において遺伝子導入細胞を増幅できることを示した。また、遺伝子導入細胞の生着を促進するため、安全に施行できる前処置の方法について検討した。

A. 研究目的

難治性白血病や原発性免疫不全症に対して行われる造血幹細胞移植は、体性幹細胞を用いる再生医療として最もよく確立された治療法である。造血幹細胞遺伝子治療は、この造血幹細胞移植をベースにして移植細胞に新たな機能を賦与する治療法であり、我々はその技術開発に取り組んでいる。幹細胞遺伝子治療の成否の鍵の一つは、遺伝子導入細胞を患者体内で治療レベル以上に増やせるかである。その典型として、X連鎖重症複合免疫不全症では、治療用遺伝子自体に強力な細胞増殖促進作用があり、大部分の例で治療に成功した。反面、そのことがベクター挿入変異を契機とした発がんを助長した可能性がある。そこで我々は造血幹細胞移植の安全性と治療効果向上のため、対象疾患に応じて必要な細胞集団を随意制御する技術を開発している。その中核となるのが、薬剤反応性分子スイッチと細

胞増殖因子受容体とのキメラ分子であり、これをコードする人工遺伝子を（選択的増幅遺伝子；SAG）と名付けて、改良を重ねている。

本課題で扱う慢性肉芽腫症（CGD）においては、同種造血幹細胞移植に伴うリスクが大きく、患者本人の造血幹細胞を用いる遺伝子治療法の確立が切望されている。CGDの治療用遺伝子には細胞増殖促進作用が無く、SAGの併用により治療効果の改善が期待される。

B. 研究方法

現在改良を加えているSAGはエリスロポエチン（Epo）に反応する第二世代で、これをCGD治療の標的となる骨髓球系細胞に合わせて改変した。臨床応用を想定して、Epo受容体（EpoR）細胞外部分と顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体（GcR）細胞内部分からなるキメラ受容体（EpoR-GcR）の全コンポーネントはヒト由来とし、両者の接合部を少しず

つずらしたもののなかから、マウス顆粒球単球系前駆細胞を最も効率よく増幅したものの (EpoR-GcR version 2) を、韓国で CGD 遺伝子治療臨床試験に使用されている MT/gp91 レトロウイルスベクター (gp91 は X 連鎖型 CGD の治療用遺伝子; 共同研究相手の ViroMed 社より供与) に組み込んだ (MT/gp91iresSAG)。

MT/gp91iresSAG ベクターを用いて X 連鎖型 CGD モデルマウスの骨髄細胞に遺伝子導入し、同系マウスに移植して、Epo 刺激 (10 単位皮下注連続 5 日間を 1 クール) により遺伝子導入細胞の体内増幅が可能であるか検討した。遺伝子導入効率の算定には、末梢血顆粒球の活性酸素産生能を、ジヒドロローダミン-123 (DHR) 還元能を指標としてフローサイトメトリーで測定した。

同系マウスを用いた骨髄再構成実験においては、ドナー骨髄を確実に生着させるため、従来レシピエントマウスに致死量放射線を照射してから移植するのが一般的だった。副作用の観点からは、このような前処置は最小限にとどめることが望ましいため、近年臨床で用いられているブスルファン[®]の有用性を検討した。8mg/kg、16mg/kg、50mg/kg のブスルファンを野生型 C57BL/6 マウス (Ly5.2) に腹腔内投与し、2 日後に Ly5.1 コンジェニックマウスから新鮮骨髄細胞 6×10^6 個を移植した。経時的に採血して、フローサイトメトリーにて生着率を追跡した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、自治医科大学倫理委員会において当該研究の承認を受けた上で、動物愛護に関する学内ガイドラインに沿って遂行した。

C. 研究結果

MT/gp91iresSAG ベクターを用いて X-CGD マウスの骨髄細胞に EpoR-GcR (Version 2) 遺伝子を導入し、同系マウスに移植して造血系を再構築した。レシピエントを 2 群に分け (Epo 投与群と非投与群)、機能回復顆粒球の割合を追跡した。Epo 投与群では第 1 クールの刺激にて $0.99 \pm 0.13\%$ から $3.88 \pm 0.83\%$ ($P=0.0061$)、第 2 クールの刺激にて $1.48 \pm 1.08\%$ から $4.26 \pm 1.24\%$ ($P=0.0654$) へとそれぞれ上昇した。一方、Epo 非投与群 (対照群) においては、第 1 クールは $1.57 \pm 0.69\%$ から $2.29 \pm 1.49\%$ ($P=0.4747$)、第 2 クールは $0.61 \pm 0.35\%$ から $1.37 \pm 1.49\%$ ($P=0.2916$) と、いずれも有意な変化は見られなかった。第 2 クール刺激後の Epo 投与群の値は非投与群に比べて有意に高く ($P=0.0174$)、SAG による細胞増幅効果が表れた。

ブスルファン前処置によるドナー細胞生着促進効果は、その投与量に依存していた。すなわち、移植 3 ヶ月後のレシピエント末梢血中ドナー細胞の比率は、8mg/kg 群が $1.7 \pm 1.0\%$ 、16mg/kg 群が $13.8 \pm 7.1\%$ 、50mg/kg 群が $92.2 \pm 1.2\%$ であった。

D. 考察

疾患モデルマウスの骨髄細胞に、改良型 SAG (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を導入することにより、CGD 治療の標的である骨髄球系細胞を増幅できることが示された。GcR シグナルによる細胞増幅効果はそれほど強力なものではなかったが、ブスルファン前処置などを併用してドナー細胞の生着を促進してやることによって、大型動物でもその効果が期待で

きる。

E. 結論

改良型選択的増幅遺伝子 (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を治療用遺伝子とともに標的細胞に導入することにより、慢性肉芽腫症遺伝子治療の効果を増強しうる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E, Ozawa K: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* 13:738-746, 2006
2. Urabe M, Xin K-Q, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus type vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* 13:823-828, 2006
4. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* 8:990-997, 2006
5. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K:

Adipose Tissue as a Novel Target for In Vivo Gene Transfer by Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Hum Gene Ther* 17:921-928, 2006

6. Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120:278-284, 2006

7. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble *flt-1* gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19:75-79, 2007

2. 学会発表

1. 久米晃啓, 小倉剛, 水上浩明, 松下卓, 小澤敬也: 新規アデノ随伴ウイルスベクターを用いたフェニルケトン尿症遺伝子治療. 第109回日本小児科学会小児科学会学術集会, 2006. 4. 22, 金沢 (日児誌 110:190, 2006)
2. 小倉剛, 水上浩明, 濱田洋実, 吉川裕之, 小澤敬也, 久米晃啓: AAV8型ベクターを用いたフェニルケトン尿症に対する新生仔遺伝子治療-maternal PKU 予防の戦略. 第58回日本産婦人科学会総会・学術講演会, 2006. 4. 24, 横浜 (日産婦誌 58:699, 2006)
3. Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Ono F, Matsushita T, Okada T, Urabe M, Kume A, Terao K, Sakata Y, Ozawa K: AAV8-mediated

- transgene expression in mice and non-human primates. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.1, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S3, 2006)
4. Sarukawa M, Okada T, Yoshioka T, Ito T, Nomoto T, Mizukami H, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Prevention of cardiac remodeling and heart failure in Dahl-salt sensitive rats by AAV vector-mediated interleukin-10 expression. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.1, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S12, 2006)
5. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Episomal AAV vector genome in the histone-associated chromatin form is capable of superior transcription with HDAC inhibitor. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.1, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S45, 2006)
6. Kume A, Ogura T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Sustained correction of hyperphenylalaninemia in female *pahenu2* mouse by a self-complementary adeno associated virus vector. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.1, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S87, 2006)
7. Nobuyoshi m, Kume A, Matsushita T, Mizukami H, Okada T, Urabe M, Ohgoshi Y, Endo T, Ozawa K: AAV vector-mediated *Mx1* gene transfer induces hematopoietic stem/progenitor cells in skeletal muscle. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.1, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S131, 2006)
8. Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Nonaka-Sarukawa M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Yamamoto K, Shimada K, Ozawa K: In vivo gene transfer in prostacyclin synthase by using AAV vector prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension and pulmonary vasoconstriction in rats. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.3, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S333, 2006)
9. Urabe M, Xin K-Q, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K, Ozawa K: Removal of empty particles from type 1 adeno-associated virus vector stocks by ion-exchange chromatography potentiates transgene expression. The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2006.6.4, Baltimore, MD, USA. (Mol Ther 13 Suppl 1:S427, 2006)
10. Urabe M, Xin K-Q, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okada T, Ozawa K: Chromatographic separation of type I adeno-associated virus vector from empty particles potentiates its transgene expression. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.24, 東京 (Abstract #015)

11. Mizukami H, mimuro J, Ishiwata A, Ono F, Matsushita T, Okada T, Urabe M, Kume A, Terao K, Sakata Y, Ozawa K: Utility of AAV serotype-based vectors in mice and non-human primates. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.25, 東京 (Abstract #050)
12. Takano K, Mimuro J, Mizukami H, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Niimura M, Okada T, Ohmori T, Madoiwa S, Sugo T, Kume A, Ozawa K, Sakata Y: Endothelial cell specific expression of human factor IX gene driven by the enhanced PAI-1 promoter in mice using AAV1 vectors. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.25, 東京 (Abstract #051)
13. Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Sugo T, Madoiwa S, Okada T, Kume A, Ozawa K, Sakata Y: Liver-directed gene therapy for haemophilia A with adeno-associated virus (AAV) vectors carrying the B domain-deleted factor VIII gene. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.25, 東京 (Abstract #052)
15. Kume A, Matsuda M, Ueda Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe m, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K: Evaluation of erythropoietin-responsive selective cell amplifier in a mouse model of X-linked chronic granulomatous disease. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.25, 東京 (Abstract #053)
16. Kume A, Ogura T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Complete normalization of hyperphenylalaninemia in female Pahenu2 mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.26, 東京 (Abstract #008)
17. Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Nonaka-sarukawa M, Mizukami H, Kume A, Yamamoto K, Takahashi M, Ikeda U, Sakata Y, Shimada K, Ozawa K: Prevention of rat pulmonary hypertention by adeno-associated virus vector-mediated prostacyclin synthase expression. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.26, 東京 (Abstract #063)
18. Sarukawa M, Okada T, Yoshioka T, Ito T, Nomoto T, Mizukami H, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: AAV vector-mediated interleukin-10 expression upregulates HO-1 to prevent hypertension in Dahl-salt sensitive rats. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.26, 東京 (Abstract #064)
19. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Nonaka-sarukawa M, Ito T, Yuhe L, Matsushita T, Urabe M, Mizukami H, kume A, Ozawa K: The histone-associated chromatin form is involved in the improved rAAV-mediated transduction by HDAC inhibitor. 第12回日本遺伝子治療学会, 2006.8.26, 東京 (Abstract #082)
20. Uchibori R, Okada T, Onodera M, Matsushita T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Development of the vector-producing tumor-targeting cells for improved suicide cancer gene therapy. 第

- 12 回日本遺伝子治療学会, 2006. 8. 26, 東京 (Abstract #083)
21. Kume A, Ogura T, Mizukami H, Matsushita T, Urabe M, Okada T, Ozawa K: *In vivo* imaging of adeno-associated virus vector distribution following neonatal gene transfer. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2006. 9. 15, Chiba. (J Inher Metab Dis 29 Suppl 1:29, 2006)
22. 水上浩明, 岡田尚巳, 卜部匡司, 久米晃啓, 小澤敬也: 各種血清型に由来する AAV ベクターの効果-マウス及び霊長類を用いた検討. 第 65 回日本癌学会学術総会, 2005. 9. 30, 横浜. (第 65 回日本癌学会総会記事 p429)
23. 内堀亮介, 岡田尚巳, 卜部匡司, 水上浩明, 久米晃啓, 小澤敬也: ベクター産生型腫瘍標的細胞を用いた治療遺伝子増幅と病巣イメージング. 第 65 回日本癌学会学術総会, 2005. 9. 30, 横浜. (第 65 回日本癌学会総会記事 p503)
24. 久米晃啓: 肝酵素欠損症に対する遺伝子治療の基礎的検討. 日本人類遺伝学会第 51 回大会, 2006. 10. 18, 米子 (抄録集 p117)
25. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病 B 遺伝子治療における AAV ベクターの有用性. 第 68 回日本血液学会総会, 2006. 10. 7, 福岡 (プログラム・抄録集 p342)
26. 卜部匡司, 島田勝, 中倉貴代, 水上浩明, 久米晃啓, Kotin Robert, 小澤敬也: キャプシド蛋白質 VP1 の分シス増加によるアデノ随伴ウイルスベクターの感染性の増強. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会, 2006. 11. 19, 名古屋. (プログラム・抄録集 p174)
27. 水上浩明, 岡田尚巳, 卜部匡司, 久米晃啓, 小澤敬也: 各種血清型 AAV ベクターの効果-マウス及び霊長類を用いた検討. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会, 2006. 11. 20, 名古屋. (プログラム・抄録集 p396)
28. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 各種血清型に由来する AAV ベクターのマウス及び霊長類における効果. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006. 12. 6, 名古屋. (プログラム・要旨集 p215)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) 特になし。

大型動物を用いた前臨床研究

分担研究者 花園 豊（自治医科大学・助教授）

研究要旨

目的：造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞（MSC）を共移植することにより、骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を図る。

必要性：造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

平成18年度の成果：サル実験は多くの費用と人手がかかり、結論を引き出すのに必要な n 数を得るのは容易でない。そこで本年度は、別の大型動物実験として実施の比較的容易な、ヒツジ胎仔への移植実験系を用いて、MSC 共移植による造血細胞の生着促進効果を検討した。今のところ MSC を共移植した1頭のヒツジのみでサル造血細胞の生着が認められている。

A. 研究目的

造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

本研究では、造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）を含む骨髄間質細胞を直接骨髄内へ移植することにより、骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を図る。初年度の平成17年度（昨

年度）は、このことを検証するためのサルの実験系を構築し、実際に1頭の移植実験を実施した。その結果、造血幹細胞（CD34⁺細胞）をMSC（骨髄間質細胞）と共移植した場合、造血幹細胞の生着がよりよい傾向が観察された（約5倍）。MSCを骨髄内に直接移植すれば、骨髄内でMSCから骨芽細胞が分化し、造血幹細胞のニッチ（niche）が創出され、造血幹細胞の生着が促進されたのではないかと考えられる。そう考えた根拠は以下の通りである。

・放射線照射を受けたレシピエントマウスでは、造血幹細胞のニッチは放射線照射により破壊されており、移植された造血幹細胞の骨髄への生着が低下している（Plett *et al.* Blood 2002; 100: