

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

(収載論文 10 冊)

## 7. HGF

## 急性／劇症肝炎

高橋知之 TAKAHASHI Tomoyuki

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門, 同 大学医学部 創薬再生医療学講座

小賤健一郎 KOSAI Ken-ichiro

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門, 同 大学医学部 小児科学講座

**1** 急性・劇症肝炎とHGF

肝炎ウイルスの感染で生じる急性肝炎は、わが国だけでも毎年約20万人の発症がみられる。急性肝炎の多くは予後良好であるが、安静、栄養補給で自然治癒を待つ以外に、病気の本体を根本的に治療（つまり病気の進展を止め、治癒再生を促進）する医薬はいまだなく、1～2%の患者は劇症肝炎へと進行してしまう。劇症肝炎は、急激な広範性肝細胞死（肝炎ウイルスによる急性肝炎が最多の成因だが、薬剤性肝炎、自己免疫性肝炎などの急性肝障害もある）によって、肝性脳症をはじめとする肝不全症状が短期間（8週間以内）に生じる予後不良の難治性疾患であり、わが国での年間の発症数は約1,000人と推定されている。劇症肝炎の根幹の病態は急激に生じる（亜）広範性肝細胞死であるが、現在の内科的治療法は、全身管理、合併症対策、人工肝補助という対症療法にすぎないため、その救命率も依然30～40%（亜急性型では10～20%）と予後不良であり、諸外国では肝移植が唯一の効果的治療法とされている。つまり、劇症肝炎、またその前段階の急性肝炎やその他の急性肝障害に対して、これらの病気の本態である肝細胞死の進展を阻止する根治医薬の開発は、先端医学の最重要課題の一つである。

さてHGF (hepatocyte growth factor) は、肝再生の本体の因子として1984年に単離され、1989年にクローニングされた。血清HGF値は、健常者に比べ、急性肝炎や慢性肝炎患者では約2倍、劇症肝炎患者では約60倍の上昇がみられ、血清HGF値の上昇は肝性脳症の発症や死亡率の増加と正の相関がみられることから、予後判定の有用なマーカーとして臨床で利用されている。HGFが血清中で上昇している肝炎ほど予後が悪いという現象は一見矛盾しているかのように見える、また特に血清HGF値が上昇している劇症肝炎患者に外因性のリコンビナントHGFを投与し

でも何ら効果がないのではないか、という疑問も生じるかもしれない。しかし、この現象は実は、肝細胞消失に対する生体適応反応としてのHGFの産生増加と、肝細胞の障害、細胞死によるHGFクリアランスの減少を反映しているものである。さらに、劇症肝炎患者の血清中で上昇しているHGFは、必ずしも活性をもつ二本鎖HGFだけではなく、むしろ一本鎖の不活性型HGFや、生理活性はないが受容体結合能をもち活性型のHGFを阻害し得る断片化したHGFを多分に検出していることが示されている。よって、急性肝炎、急性肝障害、劇症肝炎において、活性を阻害するこのような不活性化HGFに競合し得るだけの多量の活性型HGFを人為的に補うことで、本来の生理的効果を回復するという治療法は、明確な理論的根拠をもつものである。

## II 急性・劇症肝炎に対するHGFの治療効果とそのメカニズム

HGFの治療因子としての可能性は、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) や  $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) による薬剤性肝障害の動物モデルにて、まず確認された。一方、臨床的には発症頻度も多くより重要なのは、急性肝炎、劇症肝炎に対する治療薬の開発であるが、これに関しては筆者らがその治療効果・作用と分子メカニズムを明らかにしてきた。

さて、ウイルス学的、免疫学的研究に加え、1990年代にはアポトーシスの分子機構の研究が進み、急性肝炎、劇症肝炎も、その発症、進展の分子機構がより明らかとなってきた<sup>1) 2)</sup>。肝炎ウイルスは肝細胞に特異的に感染し、肝細胞内で増殖するが、ウイルス蛋白自体で細胞を障害する溶解性ウイルスとは異なり、その肝細胞障害の主な機序は細胞性免疫を介した肝細胞アポトーシスの誘導である。つまり、肝炎ウイルス抗原を表出する肝細胞に、活性化された細胞傷害性T細胞 (キラー細胞) が結合し、キラー細胞に表出したFasリガンドが肝細胞のFasに結合することにより、肝細胞内にはアポトーシスのシグナル伝達が起こる。その後、炎症細胞が浸潤し、活性化したマクロファージから出されるTNF (tumor necrosis factor) - $\alpha$  などの複合因子が肝炎をより進展させる。このように、急性肝炎というのは元来、ウイルスを駆除するための生体防御の免疫反応ではあろうが、それが病的に過剰かつ急激に進展すると、不可逆性の劇症肝炎に陥るものと考えられる<sup>1) 2)</sup>。

まず筆者らは、急性肝炎の最初に起こる病変で、劇症肝炎の進展に必須の病態でもあるFas誘導の肝細胞アポトーシスに対するHGFの治療作用を調べるため、以下のようにFas誘導の劇症肝炎に対するHGFの治療作用を検討した<sup>1)</sup>。Fasリガンドと同様にFas受容体に対してアゴニスティックな作用を有する抗Fas抗体 (Jo-2) をマウスへ投与すると、急激な広範性肝細胞アポトーシスによる劇症肝炎が生じる。抗Fas抗体投与後、6時間には血清GPTは約7,000 IU/L、8時間後には15,000 IU/Lまで急激に上昇し、肝組織像でも6時間後に門脈域周辺に出現した肝細胞アポトーシスは8時間後には肝小葉全体に広がり、20時間以内に80%のマウスが肝不全により死亡する。これに対して、抗Fas抗体投与の、6時間前、30分前、3時間後の計3回、リコンビナントHGFを腹腔内投与したマウスでは、血清GPT上昇、肝細胞のアポトーシスがほぼ完全に抑えられ、

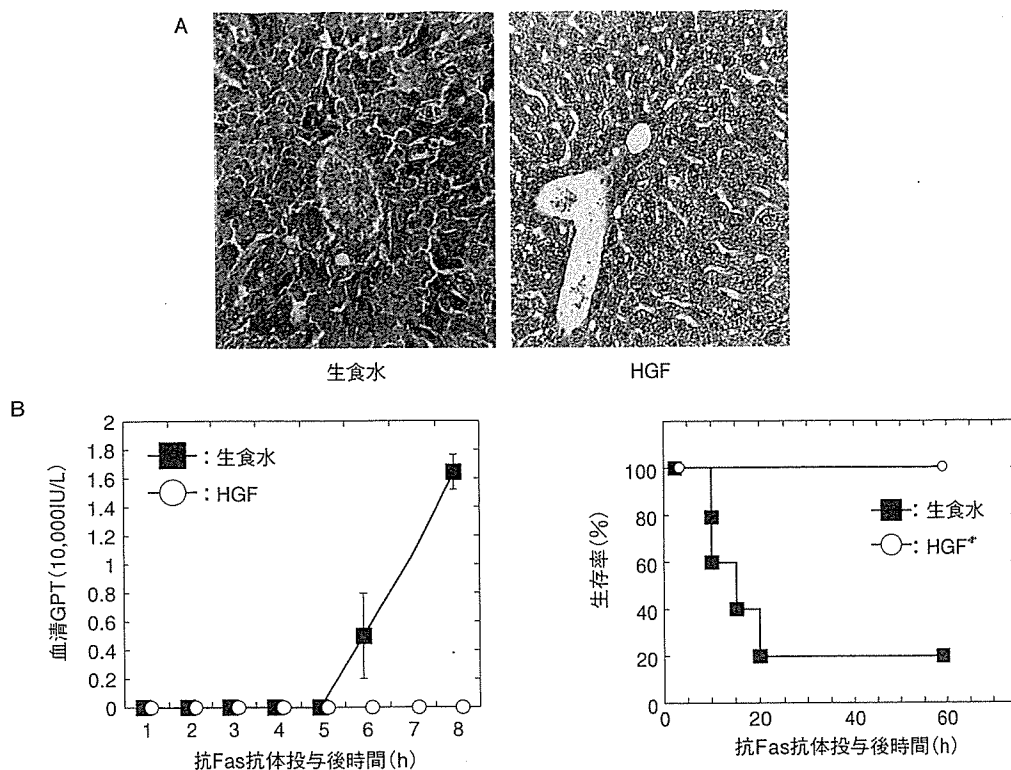


図1 HGFによる劇症肝炎の発症防止・治療効果

A: 抗Fas抗体投与後24時間における肝組織像

B: 抗Fas抗体投与後の血清GPT値と生存率

(文献1より引用)

全マウスが生存した<sup>1)</sup> (図1)。この結果より、HGFは、Fas誘導の肝細胞アポトーシス、劇症肝炎の発症を阻止できることが、まず明らかとなった。

さて前述のように、ヒトの劇症肝炎の原因は、肝炎ウイルス以外にも薬剤や原因不明のものもあり、またその劇症肝炎への進展の病態も、Fas誘導の劇症肝炎マウスモデルよりさらに複雑になると思われる。そこで筆者らは、TNF- $\alpha$ やその他の複合因子が関与し、ヒトの病態を反映するモデルとして広く用いられてきたエンドトキシン誘導劇症肝炎モデルマウスで、さらにHGFの治療作用を検討した<sup>2)</sup>。このモデルは、細菌細胞壁成分のリポポリサッカライド (LPS) が肝マクロファージのクッパー細胞を活性化し、種々のサイトカイン放出を誘導することによって、肝細胞死を引き起こすものである。さらに、LPSと併せてその感受性を高めるD-ガラクトサミン (GalN) をマウスの腹腔内に投与すると、その5時間後より血清GPT値の急激な上昇が認められ、肝組織でも6時間後には70%以上の肝細胞が細胞死に陥り、8時間以内に全マウスが肝不全によって死亡する。一方、LPS+GalN投与前後に計3回、HGFを腹腔内投与したマウスでは、血清GPT値の上昇、肝細胞アポトーシス、広範囲の肝細胞死が強力に抑制され、75%ものマウスが生存した<sup>2)</sup>。このようにHGFの治療作用は、ヒト病態を反映した複合因子による劇症肝

7. HGF

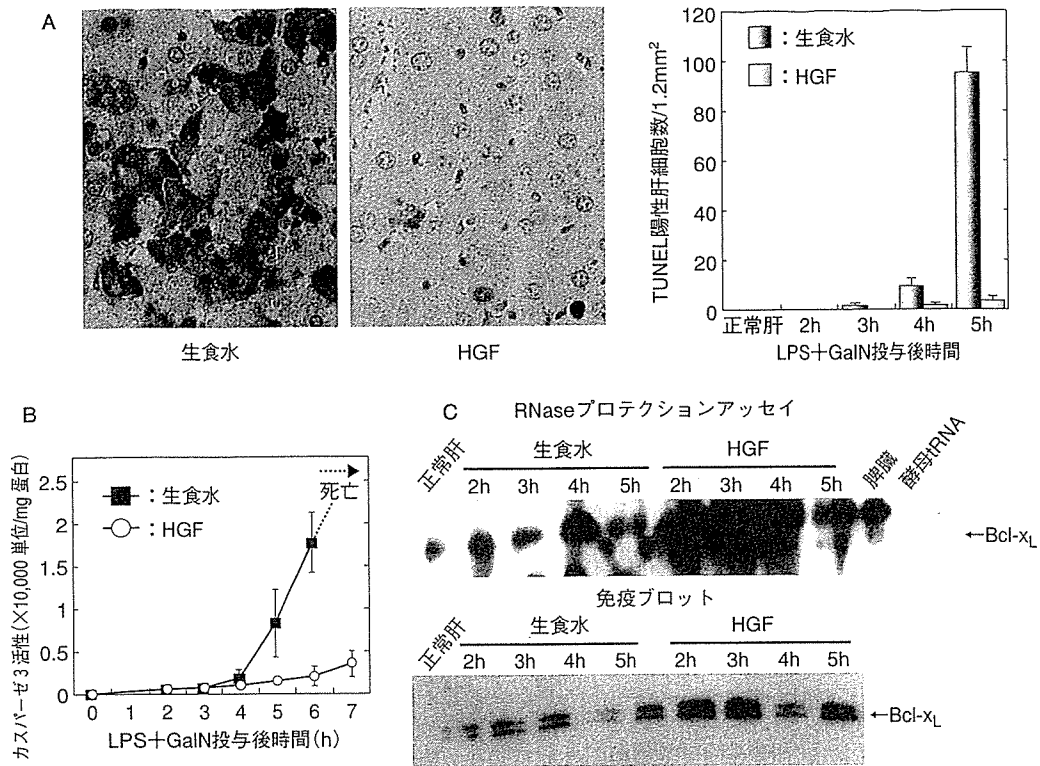


図2 HGFによる抗アポトーシス作用

A: LPS+GalN投与後5時間における肝TUNEL組織像とTUNEL陽性肝細胞数

B: LPS+GalN劇症肝炎モデルマウスに対するHGF投与による肝カスパーゼ3の活性変動

C: LPS+GalN劇症肝炎モデルマウスに対するHGF投与によるBcl-x<sub>L</sub>発現誘導

(文献2より引用)

炎モデルでも、しかも肝障害発症から3~4時間以内に肝不全によって100%死亡するというヒトの劇症肝炎とは比べ物にならないほど急激で重篤な劇症肝炎モデルでも、明確に証明された。

それではこの治療作用、分子メカニズムはいかなるものであろうか。筆者らは以下の事実から、HGFは肝細胞への強力な抗アポトーシス活性を賦与することにより、急性・劇症肝炎の病態の主因である肝細胞アポトーシスを阻止して、治療作用を生じているということを示している。まず、HGFは初代培養肝細胞に直接作用し、抗Fas抗体とアクチノマイシンDによって誘導される肝細胞アポトーシスを阻害した<sup>1)</sup>。また、HGFは抗Fas抗体投与による純粋な*in vivo*アポトーシス誘導系のモデルと同様に、エンドトキシンモデルにおいても、TUNEL陽性肝細胞の出現、DNA断片化を強力に抑制していた<sup>2)</sup> (図2)。さらに、Fas誘導、エンドトキシン誘導の両*in vivo*モデルの肝臓において、アポトーシスシグナルの下流に位置するカスパーゼ3の活性の急激な上昇が、HGF投与のマウス肝臓では強力に抑制されていた<sup>1) 2)</sup>。さらに、HGFは同モデルの肝臓に、抗アポトーシス分子のBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現を著明に誘導していた<sup>1) 2)</sup>。よってHGFは、肝細胞に直接作用し、Bcl-x<sub>L</sub>の発現誘導を介してカスパーゼ3の上流でアポトーシスのシグナル伝達を阻止し、抗アポトーシス活性を賦与しているものと考えられる。

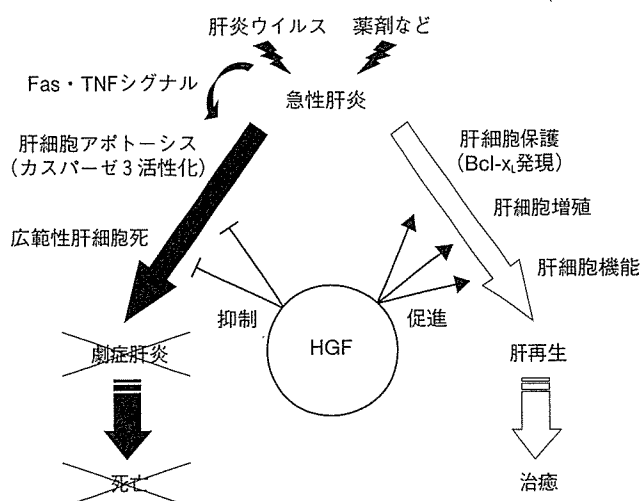


図3 HGFによる肝炎治療メカニズムの模式図

### III HGFを治療因子として用いる利点や今後の展望

上記の劇症肝炎マウスモデルでは、肝障害の発症から肝不全死までの全経過が2～3時間とあまりにも急激であるという実験の制約上、HGFの前投与も行った。しかし、実際のヒトの劇症肝炎患者では、急性肝炎や急性肝障害の発症から、不可逆的な肝不全に進行、死亡するまでに数日～数週間はかかるものである。よって、急性肝炎の発症後の初期にHGFを投与することは十分可能で、その段階で残存肝細胞は保護され、それ以上の肝障害の進行、劇症肝炎の発症が阻止されることが十分期待される。また、HGFは元来、肝再生の本体の因子としてクローニングされたように、同時に傷害後の残存肝細胞に働き、肝再生を強力に促進する<sup>3)</sup>。また、HGFはアルブミンや血液凝固・線溶系関連蛋白質の合成促進作用ももち、これもさらなる治療効果として期待される。このように、HGFは急性・劇症肝炎の病気の本体である肝細胞死を強力に阻止（病気の進展を阻止）し、また同時に肝傷害後の肝再生を強力に誘導（病気の治癒を促進）するという、まさに急性・劇症肝炎に対する理想的な根治医薬になるものと考えられる（図3）。よって、急性肝炎、薬剤性肝障害、劇症肝炎にしろ、肝障害を見つけた段階で、とにかくHGFを投与することで、これらの急性の肝疾患は治療できる（病気を止めて治癒する）ものと考えられる。

さて、その投与方法であるが、生体内に静脈経由で全身投与されたHGFは、主に肝臓で補足され、血中からは速やかに（数分で）消失してしまう。よって、このような急性・劇症肝炎の患者には、速攻性のあるリコンビナントHGFを、静脈経由（全身投与）で反復投与や持続点滴することが有用であると思われる。しかも、HGFは動物に有効量HGFを長期間投与しても副作用がみられないだけでなく、むしろ腎臓、肺、中枢神経、心臓に対しても組織保護・治癒作用をもつことが示されている。さらに筆者らは、安全性の面で潜在的に心配される問題で、またトランス

## 7. HGF

ジェニックマウスの検討では相反する結果が出ていた，肝癌に対するHGFの効果について検証し，HGF医薬は肝癌を抑制（増殖抑制とアポトーシス誘導）するという治療作用を示している<sup>4)</sup>。この点から，予後が悪い亜急性肝炎への応用や，劇症肝炎の合併症である多臓器障害の抑制などの目的には，より長期の安定した治療濃度が得られる遺伝子治療がより有用な治療手技となる可能性もあり，筆者らもその研究を進めている<sup>3) 4)</sup>。

近年，さまざまな臓器，疾患に対し，再生医学の研究が盛んである。生後は自律再生能を消失してしまう多くの臓器の疾患の治療においては，増殖因子療法はある程度の治療効果がみられても，すでに障害され失われた組織は再生できない以上，なかなか根治にまでは至らない場合も多い。このため筆者らも，そのような臓器の代表である中枢神経や心臓に対しては，増殖因子療法に併せて，ヒトES（胚性幹）細胞などによる再建医学（細胞移植療法）の開発も進めている<sup>5)</sup>。しかし，究極の再生療法というのは，本来生体に備わっている自然の再生能力を賦活化することで病的状態を正常化することであり，その点で生後も再生能を保持する肝臓に対しては，HGFを中心とした増殖因子による「生体内再生療法」にこそ魅力を感じ，これこそが理想の再生療法と考えている。

本稿で述べたように，急性・劇症肝炎に対する医薬としてのHGFの有用性は，研究レベルでは十分に実証されているように思われる。本医薬は，少なくとも急性肝炎，その他の急性肝障害の患者には応用され得るものであるため，わが国だけでも毎年数十万人の新規患者が対象になるものと推察される。「急性肝障害にはHGFという特効薬があるから怖くない」，「劇症肝炎は過去の病気（HGFがあるから急性肝炎から進展することはない）」という時代が，一刻も早く来る日を筆者らも強く願っている。

本稿で紹介したFas誘導劇症肝炎<sup>1)</sup>，エンドトキシン誘導劇症肝炎<sup>2)</sup>の研究は，大阪大学大学院医学系研究科・中村敏一教授，松本邦夫先生との共同研究として行ったものです。

### ●文 献

- 1) Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, et al : Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244 : 683-690, 1998
- 2) Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, et al : Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 30 : 151-159, 1999
- 3) Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT, et al : Retrovirus-mediated *in vivo* gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 9 : 1293-1301, 1998
- 4) Yuge K, Takahashi T, Nagano S, et al : Adenoviral gene transduction of hepatocyte growth factor elicits inhibitory effects for hepatoma. *Int J Oncol* 27 : 77-85, 2005
- 5) 高橋知之，藤原久義，國貞隆弘，他：ES細胞の心筋分化と再生医学への技術開発。最新医学60：1688-1694, 2005

第54回 全日本鍼灸学会学術大会 (福岡)

教育講演

## 遺伝子治療と再生医学

小賤 健一郎

久留米大学高次脳疾患研究所 遺伝子治療再生医学部門

## 要 旨

遺伝子を治療道具として使う遺伝子治療は、臨床試験が世界中で進んでいます。実際の医療手技は、遺伝子導入ベクターを注射するだけというように一般医療と近く、癌など、一部は一般医薬品に近いといわれています。一方、近年話題の再生医学には二種類あり、まず元来の生体の再生能を利用し、再生誘導物質を投与して生体内で障害した臓器を再生・治療するという理想的な治療法があります。さらに近年開発が期待されているのは、多分化能と無限増殖能を持つES (胚性幹) 細胞などから、体外で目的の細胞を創って細胞移植するという、臓器移植に代わる治療法です。また骨髄細胞移植を用いた再生医学は、科学的メカニズムには疑問もありますが、臨床応用もなされています。このような先端医療開発や臨床応用も、西洋、東洋の医学と連携し、全人的な医療を目指している点で、実は鍼灸学と同じ目標を共有しています。

キーワード：遺伝子治療、癌、再生医学、HGF (肝細胞増殖因子)、肝炎、ES (胚性幹) 細胞、クローン技術、骨髄細胞

## I. はじめに

過分なご紹介をいただきありがとうございます。本日はこのような機会を与えて頂きましたこと、大会長の田山先生ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。遺伝子治療と再生医学ということでお話をさせていただきますが、先生方とは離れているようでかなり共通の目的を共有していることを一番わかっていただきたいと思います。

では、さっそく始めさせていただきます。遺伝子治療はだいたい1990年代くらいから一つの学問として確立した比較的新しい学問ですが、実際臨床にも応用されています。どういう特徴があるかといいますと、一つはバイオテクノロジーが基

盤となっているということです。もう一つは、最近よく新聞などにも書かれていますが、トランスレーショナルリサーチというもので、これは基礎研究成果をできるだけ具体的に患者さんについて実際に臨床研究をさせていただくことが必要だということです。従って、比較的臨床に近い分野だと思います。また、生命倫理の問題も重要です。さらに実際にこういう研究を臨床の場に持つていくには、知的財産として確保して、ベンチャー企業を作るなり、大きな企業と連携したりする必要があると思っています。以上を踏まえて、前半は遺伝子治療、後半は再生医学について、話を致します。

〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67 番地

Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute for Brain Diseases, Kurume University, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan

E-mail: kosai@med.kurume-u.ac.jp



## II. 遺伝子治療について

### 1. 遺伝子と遺伝子治療

まず、遺伝子はどんなものかということについて、簡単におさらいさせていただきます。人の身体にあるすべての臓器は細胞からなっています。細胞は、遺伝情報を持つ核と細胞質に分けられます。核の中をみていくと、もちろんご存知の通り染色体があります。人間の場合44本の常染色体と、XYか、XXのいずれかの性染色体があります。染色体は1本の長い紐のようなもので、これを糸にしますと、ここから何十kmも伸びるような長いものです。そこにDNAの場合では、A(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)という、たった4つの塩基の組み合わせによって遺伝子は構成されています。また、「DNA=遺伝子」ではなくて、実際はDNAのわずか数%という部分が遺伝子である、つまり核の中にある長い糸の中の数%が遺伝子であるということです。では、遺伝子とは何かといえますと、我々の生命現象の源はタンパク質で、身体を作るのもそうですし、いろいろな作用もタンパク質の働きで成り立っているわけですが、そのタンパク質を作る設計図が書かれている部分を遺伝子といいます。ゲノムプロジェクトという人間の身体の遺伝子の配列を全部読んでいくプロジェクトが終わってわかったことは、人間の遺伝子は当初10万と思われていたのがたかだか3万ぐらいしかなく、ネズミとあまり変わらないということです。遺伝子以外の、関係ない残りの90%くらいの配列の中に何か我々の高度な暗号が隠されているだろうといわれていますが、本日の話は遺伝子に限って、つまりタンパク質を作る暗号が載っている遺伝子についてのお話をいたします。

では、遺伝子治療とは何か。これには2つの解釈があります(図1)。一般の方は「遺伝子を変えてしまうような治療」ではないかと、恐ろしい印象を受けられるようですが、現実には我々がやっていますのは、「遺伝子を道具として使った治療」です。一部の病気では将来的に遺伝子自身を治すこともできるかもしれませんが、今の遺伝子治療はまだ遺伝子を道具として使う、つまり薬に近い感覚です。遺伝子を治療するのであれば遺伝子に

図1 遺伝子治療とは何か?

究極的には「遺伝子の治療」  
現在は「遺伝子を用いた治療」

病気	病因	導入遺伝子
先天疾患	先天的な遺伝子異常による蛋白の欠損	欠損遺伝子
癌	様々な遺伝子異常による細胞の無秩序な増殖	癌を殺したり、免疫を誘導する遺伝子
後天性疾患	遺伝子の直接関与は少ない	治療目的の遺伝子(目的の蛋白を生体内で産生)

図1 遺伝子治療とは何か?

原因があるような先天性の疾患しか治せませんが、道具として使えば、癌、心臓の病気やインフルエンザ感染症などにも遺伝子治療が使えるということです。つまり遺伝子を、普通の薬と同じように使うということです。

代表的な先天性の病気では、遺伝子が1つおかしくなっていることによって必要なタンパク質が1つできないわけですから、それに正常な遺伝子を1つ入れてやればいいわけです。ところが癌の場合は、いろいろな遺伝子が身体の中でメチャクチャになっています。それを1つ1つ修復するには「遺伝子の治療」では不可能なのですが、遺伝子を薬として用いれば、癌を殺したり、あるいは身体の免疫を高めて癌を殺したりすることができます。感染症の場合では、例えば、ウイルスの遺伝子の一部を身体に入れることで、身体の中でウイルスのタンパク質を使って抗体を作らせるとか、いろいろなアイデアで遺伝子を道具として使う治療法を開発できる可能性があります。

### 2. 遺伝子治療の歴史(図2)

簡単に遺伝子治療の歴史を振り返りますと、1950年代にDNAが二重鎖であるという発見がありました。そのあと科学研究が積み重ねられて、実際に臨床で応用されるようになってきたということですが、80年代に功を焦った米国の研究者が、科学的進歩が追いつかないうちに、それも自分の国ではできないので、イタリアやイスラエルという国で患者さんにいきなり応用したという歴史があります。もちろん科学的基盤がないので、これは

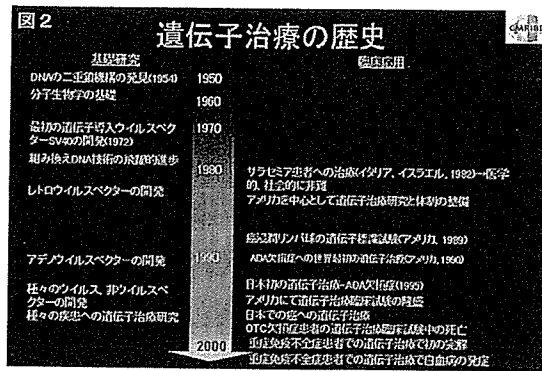


図2 遺伝子治療の歴史

効果も成さず、医学的にも社会的にも非難されました。ただ米国がすごいのは、ここで反省してきちんとやらなければならないということで、研究ももちろんですが、体制を整えなおしたということです。1990年代にそれが花開いて、1990年に最初の遺伝子治療が行われています。その後は日本でも遺伝子治療が行われています。このように1990年代は遺伝子治療の研究が割と盛んになって、実際患者さんにも応用され、今まで数千人から1万人近い患者さんに臨床試験が行われています。遺伝子治療の一般医薬化、つまり遺伝子製剤として売り出されて、一般の医療に入ってくるのも、そんなに遠い話ではないだろうと言われていました。

遺伝子治療で、これは実は特殊な例なのですが、1例死亡が出て、「遺伝子治療は危ない」という社会的風潮になったことがありました。しかしその翌年には、全然治療法がないといわれていた、一つの遺伝子がおかしくなることによって身体の免疫が全然ない患者さんで、遺伝子治療の最初の成功、寛解の朗報がありました。つまりこの患者さん方は、生まれて一生無菌室で過ごさねばならないか、または無菌室にいたとしても免疫がないため1~2か月で感染症によって死んでしまうということ余儀無くされるわけですが、その患者さん方に1回遺伝子治療ただけで、緩解したという非常に喜ばしいニュースでした。ところが、それからまた1、2年しますと、そういう患者さんに、遺伝子治療後の白血病が発症するという予想もしないことが起こりました。先ほど、トランス

レーショナルリサーチといいましたが、これは十分な基礎研究はもちろん重要ですが、それでも人間の英知が及ばないところがありますので、実際患者さんで臨床試験をやらせていただいて、そこでまた新たな発見を得て、それを基礎研究に応用していくというものです。

### 3. 遺伝子治療の方法

どういうふうにして身体の中に遺伝子を入れるかといういいますと、二つの方法がありますが、一つは元々身体から、例えば肝臓なら肝臓の一部をとってきて、培養皿の上でその細胞をバラバラにして、治療する遺伝子を入れて、身体に戻すという方法があります。しかし考えて見ますと、肝臓を切り取ってくるわけですから、手術侵襲があるうえ、非常にお金もかかります。それこそ臓器移植をするようなものですから、多くの患者さんを治療する一般医療となるのは難しいということです。今はもう一つの In vivo法という直接薬のように癌に向かって注射したり、あるいは血液に静脈注射したりすることによって、臓器に遺伝子を入れるという方法が用いられています。一般の医学と近い感覚です。

実際にどうやって遺伝子を入れるかというと、多くの場合我々はウイルスを使います。ウイルスは、遺伝子とタンパク質のみを持っていて、細胞を持たないので生命ではないわけですが、しかし、我々の身体を利用しています。どういうことかと申しますと、ウイルスは鉤のようなカギを持っていて、我々の細胞をこじ開けて、自分の遺伝子を我々の細胞の核の中に入れることができるという機能を持っています。我々の身体は、核の中にある遺伝子があれば、これがウイルスの遺伝子か自分の遺伝子かわからないので、ウイルスのためにタンパク質を作らせてあげて、ウイルスを身体の中でどんどん作り出してしまふことになります。それならば、今度は我々がこのウイルスの性質を、遺伝子治療に利用させてもらおうというわけです。具体的には、これにはバイオテクノロジーの技術がいるわけですが、ウイルスの遺伝子を取り除いて自分の治療したい遺伝子に載せかえると、ウイルスは我々の細胞の中に治療する遺伝子を入れて

くれます。この場合ウイルスの設計図（遺伝子）は書かれていないので、ウイルスのタンパク質は作りません。このように身体の細胞中に遺伝子を運ぶものをベクター呼んでいますが、多くはウイルスを遺伝子学的に組み替えをすることによって、おこなっています。このようにウイルスをうまく利用して治療に用いますが、実際の臨床の現場ではウイルスの液が入ったものを注射するだけです。一般の医療に近いというわけです。

#### 4. 癌に対する遺伝子治療

実際の臨床応用は、その8割方は癌に対して行われてきたので、まず癌の遺伝子治療について簡単に例を挙げて説明させていただきます。今までの西洋医学における手術や一般的な療法はもちろん今後も必要な医療なのですが、症例によっては限界もあります。遺伝子治療のいいところは何かというと、割合自由に、機能がわかっている遺伝子（設計図）を身体に入れてやるので、自分が欲しい効果が得られることです。つまり、どちらかというデジタル的な考えだと思います。例えば、癌細胞だけが死ぬような遺伝子を見つけると、それを癌細胞に入れてやればいい。あるいは、免疫を誘導して、癌を異物とみなして殺していくというようなアプローチもできます。今回はこのうち、免疫を誘導する例のお話させていただきます（図3）。私は先生方に近い考え方であると先に申しましたが、それは究極的にはどんな治療にしても、生体内の力を賦活化させてやるというのが、一番理想的な治療法だと思っているからです。例えば、インターロイキン2という物質があります。これはT細胞、B細胞といった、免疫の元となる細胞を増殖させるのに必須の因子です。そういうタンパク質を入れれば、どんどん免疫を賦活化して、癌を殺せるのではないかというアイデアは昔からあったわけです。しかし、タンパク質としてこういう物質を入れようと、動物ではいい結果を出せますが、実際ヒトでやるとなかなか良い効果を示さなかったというのが今までの結果でした。何故かというとタンパク質はその物質の半減期のため、身体の中で数分間でなくなるので注射では効果が出ず、その場合に持続点滴で入れようとしても、実

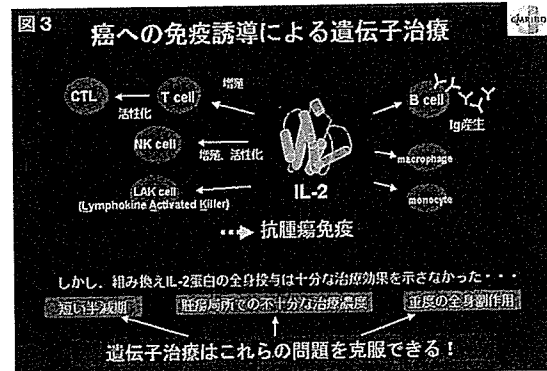


図3 癌への免疫誘導による遺伝子治療

際に癌には十分な治療濃度がいかないのに、その一方で全身のいろんな臓器に副作用が出ます。つまり遺伝子治療では、この問題を克服できるのではないかということです。

具体的にどうするかということですが、骨肉腫の例を出させていただきます。骨肉腫というのは子供に多い癌で、整形外科の先生に聞きますと、治療法はかなり進歩し、腫瘍を一部だけ取ることもできるし、足を保存できる場合も多いのですが、やはり多くの例では足を切断し、また切断後も肺転移することがあります。もちろん既存の治療法も有用なのですが、遺伝子治療がいいのはどういふところかということ、遺伝子を癌細胞に直接注射して、癌細胞に免疫の元となるインターロイキン2という設計図（遺伝子）を入れると、癌細胞自身がこういう免疫を誘導するような物質を作り、全身にはそういう物質は流れないので副作用はできません。一方、癌細胞の中ではそういう高濃度の物質が出るので、免疫細胞が癌の近くで活性化されて、その免疫を誘導することによってこの癌を全部殺してしまうことができます。つまり身体の免疫を賦活化する遺伝子を薬としてうまく使うということになります。これが良いところは、身体の免疫が癌を異物だと認識してくれますと、今度は遠隔部の癌も治してしまうことができるということです。

これは動物実験の結果ですが、癌がいっぱい皮膚の下にあり、青いのが癌で活き活きしているのですが、治療した後はスカスカになり、この写真ではピンクに見えているところです。癌が全部死

んでしまっているのです。実際は局所しか治療していないのですが、肺にいっぱい転移があるような癌でも、動物実験では、癌が治ってしまい、綺麗になるという結果が出ています。もちろんすべての例が治るわけではなく、あくまでも動物実験の結果ではありますが、しかしこの結果からは、より臨床に近い、一回注射をするだけで、身体の免疫を賦活化して治療するという戦略ができるということを示唆しています。他にもいろいろな戦略があるのですが、この免疫の遺伝子治療は臨床試験が数多く行われていますので、一般医療としても、これから現実化してくると思います。それでも、癌の根治はすべてができるわけではありません。その最大の原因は、先ほど言ったように、注射してもウイルスが増殖しないようにしているので、液体が入ったところには確かに遺伝子が入って免疫を賦活化しますが、結局、遺伝子は全部の癌には入れることはできません。従って、いろいろな遺伝子を細工して他の癌にも治療効果を及ぼすような、あるいは根本的に全部の癌に遺伝子を入れ、癌を殺すような方法を開発する必要があるということです。このことから、「ウイルスを改造することによって癌だけを認識し、正常には何も影響を及ぼさない人工ウイルスが作れないか」という取り組みを、今我々ならびに世界の研究所がやっています(図4)。我々は特に、風邪の一

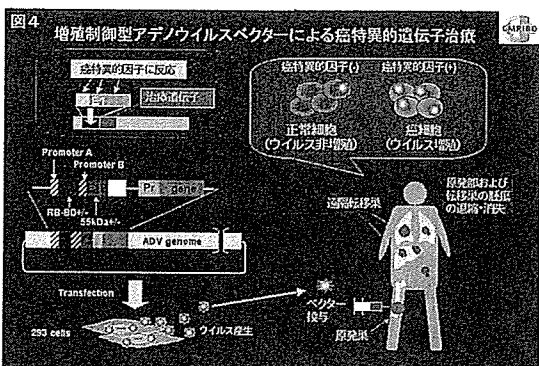


図4 増殖制御型アデノウイルスベクターによる癌特異的遺伝子治療

学的に作り変えて、癌だけ殺していくような人工アデノウイルスを作ろうとしています。つまり、癌だけで出ているような物質に反応してウイルスが増えていくような仕組みを作り、本当に癌だけ

が増えていくウイルスを作り上げようとしているところです。将来的に、正常では全く増殖しないが、癌ではどんどん増殖して癌細胞のみを殺していく、このような人工ウイルスが完成しますと、一回それをどこかに注射するだけで身体中に広がり、癌だけを見つけて殺してしまうことができます。我々はこういう治療法の開発を目指していますし、一部アメリカではそのような研究の臨床試験も始まっています。

### Ⅲ. 再生医学

#### 1. 再生医学とは(図5)

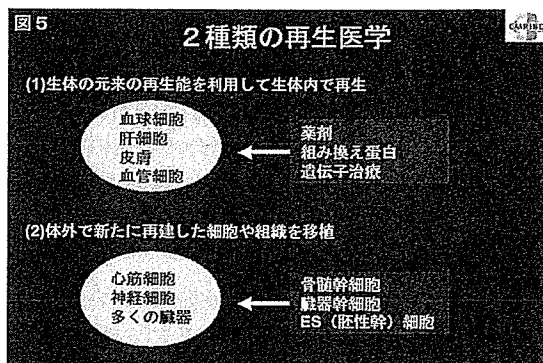


図5 2種類の再生医学

再生医学に関しましてはここ2~3年話題になり、新聞でもよく出てくるものかと思えます。簡単にどういうものかといいますと、発生学というのは昔からある学問ですが、それは受精した段階から、次には胎児ができ、身体の臓器が作られていくわけですが、それがどういうメカニズムでできるのかを研究する学問です。つまり体内で臓器ができてくる場合と、生後に臓器が再生するのは同じ様なメカニズムがあるだろうから、そのメカニズムを利用して身体、臓器を再生させようという治療法の研究です。例えば、肝臓がやられた場合は肝臓が再生するような薬を何か投与する、あるいは遺伝子薬を投与する、というような医療です。これは生体内に元々ある再生能力を利用して行う治療ということで、こういうものができると究極の再生医療(第一の再生医学)となりますが、ただ残念ながら全ての臓器や疾患でうまくいくとは限りません。何故なら、すべての臓器が再生す

る能力を持っているとは限らないからです。そこで、今話題になっているのがES（胚性幹）細胞です。ES細胞は、身体の子宮の中で、受精後5日目くらいの受精卵の中に含まれているのですが、すべての細胞の元となる細胞と考えて良いかと思えます。だから、これから心臓になるものもあれば肝臓になるものもある、つまりすべての細胞になりえる源となる細胞がここに含まれています。よってそれを取り出して、培養皿の上で自分が望むような細胞を作って、それを「臓器」移植の代わりに「細胞」移植することによって、病気を治療するという医療です。さらに将来的にはもちろん、「組織」や「臓器」を作ればよりいいのですが、そこまではなかなか簡単にできるものではないので、まずはES細胞から「細胞」を作って、心臓の一部が病気で欠けている場合は心臓の細胞を入れてやる、というのが第二の再生医学であります。

## 2. 第一の再生医学

まず、理想的な第一の再生医学について話します（図6）。肝炎という病気があります。肝炎が

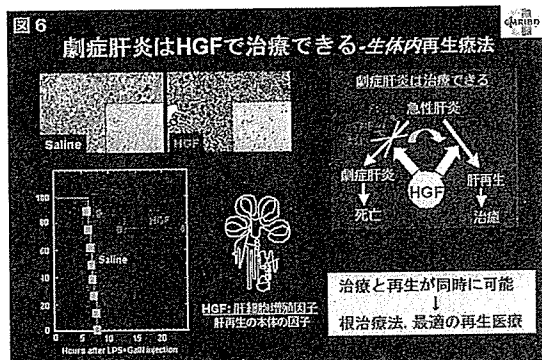


図6 劇症肝炎はHGFで治療できる-生体内再生療法

起こるメカニズムはだいたい解かっていて、生体は肝炎ウイルスが感染した肝細胞を異物として認識し、除外してくれるのですが、それが行き過ぎると肝臓全部を免疫が殺していくということになってしまい、これが現在治療法のない劇症肝炎の原因です。これには治療法はないのですが、私共が研究しているHGF（肝細胞増殖因子）は、肝臓を作るための、一番の大元となる再生誘導物質です。HGFは大阪大学の中村先生が見つげられた

のですが、こういう物質を注射しますと、これはネズミの例ですが、肝臓を作っている10%以上の肝細胞を人工的に増殖させることができます。またネズミの実験ですが、劇症肝炎で肝臓がなくなってしまうような物質を入れますと、7時間くらいでマウスは死んでいくのですが、このHGFを注射しますと、肝再生を誘導するだけではなくて、さらにこの病気自体を止める働きがあります。つまり、肝炎がひどくなるとそれが劇症肝炎になって肝細胞の70%が死んでしまいます。それに対して今は治療法がないのですが、こういう再生するような物質を見つけてこれを入れますと、注射をするだけで病気が止まって、どんどん肝臓が再生していくことが可能になります。

こういう治療法ができるかと最適だと思うのですが、すべての臓器に応用できるわけではありません。何故かということ、遺伝子治療の技術を使っているいろいろな物質を注射して心臓病を治せないかということ、岐阜大の循環器内科との共同研究でやってまいりましたので、その結果を交えてお話致します。心筋梗塞の動物モデルに、先ほどのHGFなどの物質（遺伝子）を入れますと、肝臓の場合はうまく再生誘導ができたわけですが、元来生後は再生する能力がない心臓では、確かに病気は少し良くなりましたが、完全に心臓が蘇ってくるというわけではありませんでした。こういう治療法は、確かに有効ではあるのですが、肝臓での完治を期待できるほどの成果は、心臓では再現できません。考えて見ますと、輸血とか生体肝移植とかは、血液や肝臓の一部を他人にあげても、自分の臓器は元に戻るからできるのであり、これとは対照的に心臓の場合は、一度障害されたら元に戻らないわけですので、心臓の生体移植などできないわけです。脳もそうです。従って脳梗塞や心筋梗塞で一度組織がやられると治らないため、頭の病気、心臓の病気は癌と並んで、いまだ3大死因であるのです。心臓病には、根本的には今の西洋医学では「心臓」移植しかなかったのですが、「細胞」移植でもいいだろうというのが、最近の研究でわかってきています。つまり、あるマウスの心臓からとってきた心筋細胞を別のマウスに入れるという実験で確認されているのですが、バラ

バラにした心筋細胞を、心臓の死んでいるところに注射をすると、移植した心筋細胞がその心臓にくっついて治るということが確認されています。従って、多大な手術侵襲があり、また生命倫理、高額な費用、ドナー不足の問題などで、なかなか(特にわが国では)うまくいかない臓器移植に代り、「細胞」移植でいいのであれば、かなりこれらの問題が解決できるというわけです。後の問題は、「それでは心筋細胞をどこから持ってくるか」ということですが、人から人へ持ってくるわけにはいかないの、これを解決するのがもう一つの再生医学というわけで、ここでES細胞が出てきます。つまり第1の再生医学というのは、薬とか、いろいろな方法で、これは先生方のご研究と通じるかもしれませんが、生体内に元々ある再生能を賦活化して、病気を治療するというものです。しかしそれではうまくいかない場合、臓器移植に代わって細胞から望む細胞を作って、それを移植するという方法が第二の再生医学なのです。

3. ES細胞と第二の再生医学 (図7)

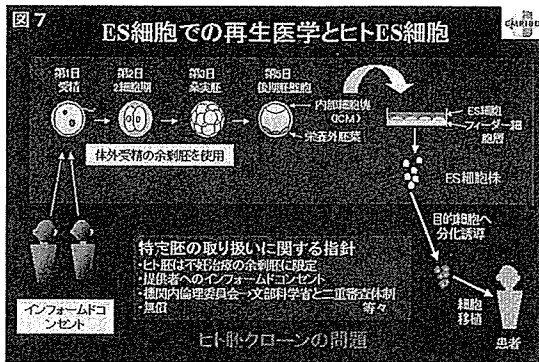


図7 ES細胞での再生医学とヒトES細胞

ES細胞について簡単にお話をします。ES細胞はマウスにもヒトにもあるのですが、体外受精した後に、1日置くと2つに細胞分裂して、桑実胚になります。マウスでは3日、ヒトでは5日ぐらいですが、こういうふうな2つの構造物が表われ、この塊を顕微鏡下に切り取って取り出し、特殊な条件下で培養皿で培養を繰り返すと、ES細胞を得ることができます。つまり、ここの部分にすべての臓器の源になる細胞であるES細胞があるの

です。このES細胞をまた別のマウスの子宮に戻しますと、つまり例えば、Aの遺伝子を持つES細胞を作ってBというマウスの子宮に入れると、Aという遺伝子を持つマウスが生まれてくることから、このES細胞の全能性が証明できます。またこの全能性のため、ヒトのES細胞の場合は子宮に戻すとクローン人間ができる可能性があるということで、生命倫理の問題がでてくるわけです。またES細胞の全能性を証明するもう一例として、マウスの皮膚にES細胞を植えつけますと、そこからいろいろな臓器ができてきます。しかし、子宮の中でおこなうような正常のコントロールが効いていませんので、その皮膚に歯ができたり、骨ができたり、心臓ができてりするわけです。このように臓器移植に代り、体外でES細胞を使って望む心臓細胞とか神経細胞とかを作って、それを移植するというのが、今よく騒がれている再生医療です。

我々もこのような研究をやっています、実際テクニック的にはいろいろな方法があるのですが、心臓を作る場合は、胚様体という塊を作ると、後日に心臓が一部できてきます。あるいは、別の細胞の上で共培養すると心臓ができるとか、いろいろなテクニックを使います。私どもは、ヒトES細胞を使用する研究の認可を受けてやっていますが、培養皿の上で確かに心臓が拍動するような塊をヒトES細胞から作ることができました。次に、これを細胞移植として治療に用いるには、目的の心臓細胞のみを単離してくることが必要で、そのため、ES細胞自体に遺伝子工学的な細工をして、心臓になった場合は光を出すようにします。その上で、ある機械を通した時に蛍光を当てると、心臓になったES細胞だけ緑に光るため、この機械で細胞を取り分けます。ES細胞から心臓を作って、今言った方法で光らせて取ってきたES細胞がこれなのですが、このように一個になっても、やはり拍動する能力を持っており、明らかに心臓の能力を持っている細胞といえます。つまり現段階では、こういう細胞を作ることができる、というところまでできています。

では次に、心臓になる前の細胞を取れないかということで、我々はそういう方法の開発も試みて

いますので、簡単に紹介します。もちろん先ほどから言っていますように、医療という観点から、心臓移植の代わりに心筋細胞を作って移植に用いたりするのも重要ですが、それだけでなく、研究の方でもこの技術は有用で、つまり目的の細胞一個一個を取ってきて、その中の全ての3万個の遺伝子がどんなふうに動いているかということを見ることが出来ます。つまり、どういう遺伝子が、その目的の細胞で多く出てくるのかをみることで、ここからまた新しい遺伝子を見つけたり、あるいはどういう遺伝子が働いて細胞ができていくのかということが分ってきます。このように心臓を作って、移植治療に用い、また一方では研究にも用いるということを、再生医学研究では行っています。今よく新聞などで騒がれている再生医学というのは、実際にはこういう研究が中心となっています。

#### 4. ES細胞の治療への応用

ES細胞を用いた治療については、今はまだその段階ではなく、やっと目的の細胞を体外で作って、これを単離して取れるという段階にすぎないため、今後具体的になっていくと思われれます。ES細胞の取り扱いについては、法律で決まっています、「特定胚の取り扱いに関する指針」というのが文部科学省から出ています。ヒトの胚というのは、ここでは受精卵のことです。さて、不妊治療をする場合には体外で受精させた受精卵は、凍結して保存しておきます。それをお母さんに戻すのですが、例えば10個できた場合に、3個戻してうまくお子さんができると、いらなくなった7個の凍結受精卵は、今までは廃棄されていたわけです。それを廃棄せずに、もちろんちゃんとインフォームドコンセントをして合意を得た場合、ES細胞を作るのにその凍結受精卵を使うことができます。もちろん誰もがやりたいといっただけではなく、まず機関内の倫理委員会で厳しい審査を受けて合格して、その後、文部科学省の専門委員会でさらに厳しく審査されるという二重の審査を受けなければならない、きちんとした目的に沿って、しかも実験を遂行する能力もあり、生命倫理もしっかり理解している場合にのみ、研究が許可されます。もちろん、無償でやらないといけ

ないということになっています。我々も、2年前に日本では8番目に認可していただき、ヒトES細胞の研究をやってまいりました。日本では、「ES細胞を作る目的のためだけに体外受精をしてはいけない」ということになっていますので、先ほど言いましたように、インフォームドコンセントをして、元来は捨て去られる運命にあった凍結された受精卵を利用させていただいています。

さて、ヒト受精卵もマウスの場合と基本的には同じで、培養皿の上で受精卵を培養しますと、マウスは3日くらいだったのですが、ヒトの場合は生命の時間というものが長いので、5日で胚盤胞ができてきて、それを切り取りますと、同じ様にヒトES細胞ができます。ところで、マウスES細胞は、早くに発見され技術が確立され、この10~20年に様々な研究に応用されてきたわけですが、その一方、ヒトではまさかそれほど簡単には、ES細胞はできるとは誰も思っていませんでした。ところが、1998年に、アメリカで実際、ヒトのES細胞ができたということが報告され、一躍、「再生医学は現実のものとなり得る」ということになり、この数年、脚光を浴びるようになったというわけです。このように「夢物語だったヒトのES細胞が実際できた」、「割とそれが簡単にできる」ということが明らかになり、それはつまり、一方では、「これは大変だ」ということになり、法律なども実はここ数年でできたもので、急速に体制が整ってきたのです。研究、技術的な面からは、マウスでの実験を踏まえて、ヒトでも心臓細胞をES細胞から作れることが示せていますので、将来的には細胞移植治療なども、可能性がでてきたということです。ただ、その前にはもちろん倫理的問題について、種々の議論を行い、ちゃんとした審査を得てから臨床応用が可能となるのはいうまでもありません。

#### 5. クローン技術とその応用

もう一つ説明しようと思ったのが、クローンの技術です。ヒトのクローン人間とかよく言いますが、クローン人間とクローン技術は少し違います。「あるヒトの細胞の核を別のヒトの細胞に入れ替える」というのが、クローン技術です。先ほど言

いましたように、ES細胞はあるヒトから取られるものですから、他人のES細胞から細胞を作って別の患者さんに移植することになります。この場合は他人の細胞ですので、当然、拒絶が出ますので、現在の臓器移植と同様に免疫抑制剤とか使わなければならないという問題が生じます。これを解決する手段がES細胞にはあり、それがクローン技術です。つまり、クローン技術をES細胞を作る元となる卵子に用いると、患者自身の遺伝子を持ったES細胞が作られることとなり、つまり患者自身の遺伝子を持った目的の細胞が作り出せることとなります。例えば、今は受精卵を使わなくても、お母さんの卵子を刺激することによって強制的に分割させて、ES細胞を作ることもできますので、Aというお母さんの卵子を頂いて、それから核を除いて、Bという患者さんの皮膚などの細胞から核を取ってきて、卵子の核だけを入れ替えます。そうすると核の中に生命の遺伝情報があるので、この卵子からできたES細胞は、自分(Bさん)のES細胞になるわけです。この卵を別の人の子宮の中に入れて、クローン人間ができてしまうため生命倫理の問題はここでも重要ですが、ただ、クローン技術というのはクローン人間作りとは異なることはご理解頂きたいと思います。つまり、再生医学では、培養皿の上でクローン技術を用いるということです。間違ったやり方をしてしまうと、クローン人間などということも可能となるため、当初日本ではクローン技術の胚への応用もやってはいけないということでしたが、最近では本邦でもクローン技術を使う方向に意見が集約されているようです。

さらに、生まれつき遺伝子に病気があるような患者さんの場合についても、培養皿の上のほうが遺伝子治療はよりやりやすく、遺伝子の修復も割と簡単にできる可能性があります。これも夢物語であろうと思われたのですが、1~2年前マウスの実験では、既にできてしまいました。

以上、ES細胞による、再生医学を説明いたしました。さて、このようにこの分野の研究は、どんどん進歩していますが、臨床応用はいきなりやっていいわけではなくて、いろいろな生命倫理の問題もあります。ただし、それほど夢の治療ではな

くなっていますし、また、生命科学の研究材料としてもES細胞は有用ということです。

#### 6. 骨髄を用いた治療とRETT症候群に対する治療の試み

次に話題の骨髄について簡単に説明させていただきます。数年前から、例えば骨から肝臓ができるとか、骨から神経ができるという報告が相次ぎました。例えば、血管が詰まった病気に血管を移植するのではなくて、自分の骨髄を取ってきて細胞を移植すると、これが血管に変わって治るのではないかということで、久留米大の循環器内科の先生方が開発されています。実際に太い血管ができるわけではなさそうですが、臨床での結果はいいということで、話題になっていました。ただし、科学的には本当なのか、つまり、血液になるはずの骨髄が、神経になるとか血管になると、つまりそれは分化が変わってしまうということなので、そのあたりで議論がありました。また、「どうも2つの細胞が融合しているのを見ているだけではないか」ということも最近言われています。従って、二つの全然違う細胞が、単に一つにくっついてるのを見ているだけではないかということで、科学的にはまだ真偽のほどは不確かですが、この骨髄療法は、自分の組織を使うことができるため、臨床応用の大きな可能性を残しています。このように人間の体の中はいろいろな予想もしなかったことがどんどん起こってきて、大きなポテンシャルを秘めているということが分ると思います。もう少し研究が進むと、骨髄細胞を用いて、本当にいい再生医療ができるのかもしれない。

最後に紹介するのは、私どもが今やっている脳の研究で、RETT症候群という疾患に対する研究です。先天病の一つなのですが、遺伝子治療の技術を使って定位脳手術で遺伝子を入れることで病気を治療するという研究をやっています。遺伝子を変えて作ったモデルマウスでは、患者さんと同様に動きが悪いのですが、遺伝子治療、つまり頭に針を刺して遺伝子を入れると、完全ではないですが動きが戻るということで、脳の研究にも応用しています。自傷行為とって、自分で自分を傷つける症状や、イライラするような症状も治まると



いうことも効果としてみられ、こういう脳の研究も心臓の研究とあわせてやっています。脳も心臓と並んで、なかなか再生しないので、ES細胞や遺伝子治療の技術は有用だと思います。

#### IV. おわりに (図8)

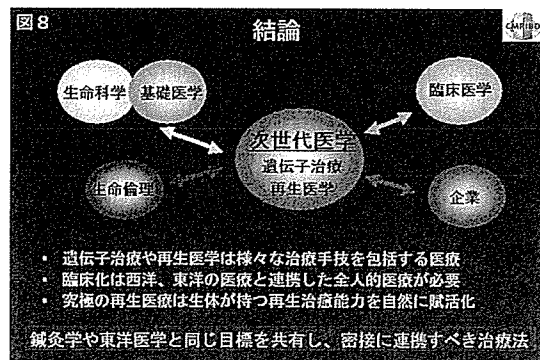


図8 結論

我々が研究しているのは、何と名づけていいかわかりませんが、遺伝子治療学とか再生医学とかいう新しい学問なのですが、決して突飛なものではないし、単なる生命科学の研究に終止するものではないので、臨床医学、あるいは先生方のような東洋医学とも、密接に関連しています。また、究極の目標は、先生方と一緒にです。患者さんを良く見るということと、また、生体はいろいろな能力を持っていますので、それを賦活化するような医療をするということですので、同じ目標をもっていると思っています。我々の特長は、遺伝子を単に使った治療、あるいは再生を目指した治療ということだけであり、今までの医療と、その目標は全く一緒だと思います。また臨床化の際には、

それこそ西洋、東洋の今までの医学と連携して、全人的な医療が必要だと思います。それは患者さん自身に対してもそうですが、医療というものを作り上げていく上でも、そうした視点をなくすと、単なる生物学で終わってしまうと思っております。私たちが考えている以上に、人間の身体はいろいろなポテンシャル秘めているということを、研究を通じて学んできました。究極の再生医療というのは、先ほど肝臓で示したように、できることなら複雑なES細胞とか使わずに、最終的には何か賦活化する方法があって、自分の再生能力、あるいは遺伝子治療の癌でもそうですが、元来の免疫を誘導することによって癌を殺すとか、身体のポテンシャルを最大限引き出せるようなことができれば究極の医療だと思います、それを目指してやっています。今日お話ししたことは先生方と違うような学問かと思われるかもしれませんが、決してそうではなくて、先生方の東洋医学、鍼灸医学と同じ目標を共有しているということをご理解いただければと思いますし、別に独立した学問ではなくて、今までの学問と一緒に、臨床とも基礎とも密接に連携すべき治療法だと思っています。私自身も最初ご紹介いただいたように、岐阜大学に行ったときには東洋医学講座におられた私の先生（その先生は元々癌研究の西洋医学的な研究、分子生物学をやられていたのですが、それだけでは駄目だということで東洋医学を目指されていた先生ですが）に非常に共鳴致しまして、また、私自信の身内も鍼灸をやっていますので、今後とも先生方にご指導いただいて、一緒に何か研究ならびに臨床をやらせていただければと願っています。ご清聴ありがとうございました。

THE 54th ANNUAL MEETING (FUKUOKA)

Educational Lecture

## Gene Therapy and Regenerative Medicine

KOSAI Ken-ichiro

Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine,  
Cognitive and Molecular Research Institute for Brain Diseases, Kurume University

### Abstract

Clinical trials of gene therapy have been extensively performed in the world. Actual methods in many types of clinical gene therapy are simply injections of gene transfer vectors and are thus similar to conventional treatments; some of clinical gene medicine may be realized in general practices in near future. On the other hand, regenerative medicine is classified to two types. One is an induction of tissue regeneration within a body using a certain stimulator. The organs to which this strategy can be applied are limited although this type is an ideal treatment. The other is a reconstructive cell transplantation therapy using pluripotent embryonic stem (ES) cells, which may potentially replace current organ transplantation. Clinical trials of regenerative medicine using bone marrow cells have been performed although their scientific mechanism remains controversial. Importantly, the development and the clinical application of these innovative therapies should proceed with the same aims toward the same goals as acupuncture and moxibustion; i.e., they should also have a close relationship with the Western and the Oriental medicine and the same values of the medical treatment for the whole man.

*Zen Nippon Shinkyu Gakkai Zasshi (Journal of the Japan Society of Acupuncture and Moxibustion: JJSAM), 2006; 56(1): 16-26.*

Key words: Gene therapy, Cancer, Regenerative medicine, HGF (Hepatocyte growth factor), Hepatitis, ES (Embryonic stem) cell, Clone technology, Bone marrow cell

# Identification and Isolation of Embryonic Stem Cell-Derived Target Cells by Adenoviral Conditional Targeting

Tomoyuki Takahashi,<sup>1,2,3</sup> Takao Kawai,<sup>3,4</sup> Hiroaki Ushikoshi,<sup>3,4</sup> Satoshi Nagano,<sup>1,3</sup>  
Hatsue Oshika,<sup>3,4</sup> Makoto Inoue,<sup>5</sup> Takahiro Kunisada,<sup>6</sup> Genzou Takemura,<sup>4</sup>  
Hisayoshi Fujiwara,<sup>4</sup> and Ken-ichiro Kosai<sup>1,3,7,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases,

<sup>2</sup>Department of Advanced Therapeutics and Regenerative Medicine, and

<sup>7</sup>Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan

<sup>3</sup>Department of Gene Therapy and Regenerative Medicine, School of Medicine, <sup>4</sup>Division of Cardiology, Respiratory, and Nephrology,  
<sup>6</sup>Division of Regeneration of Organ and Tissue Development, Regeneration, and Advanced Medical Science, Graduate School of Medicine,  
Gifu University, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500-8705, Japan

<sup>5</sup>Laboratory of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

<sup>8</sup>Department of Structural Cell Biology, Neuro-musculoskeletal Disorder, Advanced Therapeutics Course, Kagoshima University Graduate School of Medical and  
Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed at the Department of Structural Cell Biology, Neuro-musculoskeletal Disorder, Advanced  
Therapeutics Course, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan.  
Fax: +81 9 265 9721. E-mail: kosai@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp.

Available online 14 August 2006

The technical limitations of isolating target cells have restricted the utility of pluripotent embryonic stem (ES) cells. For example, early cardiac (i.e., precontractile) cells have not been isolated from ES cells. Here, we find that direct expression of reporter genes under cell-specific promoters—the currently available strategy for isolating cells lacking cell-specific surface markers—is ineffective for isolating progenitor cells. This was due to the weak activity of cell-specific promoters, particularly in ES cells at early stages. We show that adenoviral conditional targeting efficiently isolates viable ES cell-derived target cells without harmful effects. In this strategy, we employ the  $\alpha$ -myosin heavy chain and Nkx2.5 promoter to visualize and purify efficiently differentiated and primitive cells of the cardiac lineage, respectively. While the former cells predominantly expressed sarcomeric proteins and maintained contractile function, the latter demonstrated neither of these features, but rather exhibited expression patterns characteristic of a mixture of primitive cells and cardiomyocytes. Interestingly, smooth muscle actin was predominantly expressed in the latter cells, and both functionally known and unknown genes were systematically identified, demonstrating the benefits of this system. Thus, our method facilitates molecular and cellular studies of development and ES cell-derived cell therapy.

**Key Words:** embryonic stem cell, adenoviral vector

## INTRODUCTION

Pluripotent embryonic stem (ES) cells show great potential in elucidating the mechanisms of development and differentiation in various tissues by *in vitro* cell culture and at the molecular level, as well as providing a source for donor cells in cell transplantation therapy [1,2]. However, the successful use of ES cells is currently hindered by difficulties in identifying and isolating pure target cells under viable conditions, particularly when isolating cells that lack cell-specific surface antigens. The

only available strategy for the isolation of such cells is to generate ES cell lines that stably express a reporter gene under the transcriptional control of a cell-specific promoter [1,2]. However, this strategy is clearly imperfect for obtaining target cells, since the number of cell types that have been isolated is far lower than the number of known, tissue-specific promoters. In particular, progenitor and/or immature cells that do not possess specific cell-surface antigens are not efficiently isolated from ES cells by conventional methodologies.

For example, the technical limitations of isolating ES cell-derived cardiomyocytes hampers the utility of these cells in cell transplantation therapy and *in vitro* developmental studies, although cardiac differentiation of ES cells is currently inducible *in vitro* [2,3]. Both issues might be resolved if cardiac cells in different stages could be more easily visualized under viable conditions; such marked cells could feasibly be isolated by a cell sorter. Only four types of ES cell-derived cardiac cells have been isolated using either cardiomyocyte-specific sarcomeric myofilament promoters (i.e.,  $\alpha$  cardiac actin,  $\alpha$ MHC, or myosin light chain-2v), to drive a particular reporter gene directly [4–6], or the knock-in of a reporter gene downstream of the transcriptional regulatory elements of the Nkx2.5 gene [7]. Both the former and the latter isolated cells were contracting and differentiated cardiomyocytes, although Nkx2.5 is a mouse homeobox gene and the first gene expressed in the developing heart [8–10]. Earlier cells in the cardiac lineage, e.g., precontractile cells, have not been isolated; indeed, the current methods have thus far proven insufficient at isolating most cell types.

Here, we report both a method that visualizes and efficiently purifies ES cell-derived target cells and the isolation of two types of precontractile and contractile cells of the cardiac lineage.

## RESULTS

### Ineffectiveness of the Conventional Methods and the Development of Adenoviral Conditional Targeting

To isolate specific cells at the earliest stages of the cardiac lineage, we first generated 13 ES clones stably transfected with an expression vector encoding the cDNA for enhanced green fluorescent protein (EGFP) downstream of the Nkx2.5 promoter. Unexpectedly, none of the stably transfected ES cells expressed sufficient levels of EGFP for visualization by fluorescence microscopy or flow cytometry (data not shown), although both the cardiac differentiation of the ES cells [3] and endogenous Nkx2.5 expression were confirmed (Figs. 3A and 3B). This discrepancy was due to the weak activity of the Nkx2.5 promoter, a problem that is characteristic of many tissue-specific promoters (Fig. 2C; discussed below). Thus, the

available strategy is not only time consuming and labor intensive, but also ineffective at isolating certain cell types, since it is critically dependent upon the strength of individual promoters.

To circumvent these limitations, we developed a method to provide reliably distinct visualization and pure isolation of all types of ES cell-derived target cells, all without the time-consuming and laborious nature of the available methods (Fig. 1A). This method uses two DNA constructs: the regulatory unit expressing the Cre recombinase under the transcriptional control of a cell-specific promoter and a switching-expression unit that under normal conditions expresses an upstream *neo* gene but not a reporter gene. The latter unit constitutively expresses the second EGFP gene under a ubiquitously strong promoter—either the CMV promoter (cytomegalovirus immediate-early gene enhancer and promoter) or the CA promoter (cytomegalovirus immediate-early gene enhancer and chicken  $\beta$ -actin promoter)—only in a specific cell type after the activation of a cell-specific promoter in the former unit. Even when the expression level of Cre was extremely low, this situation led to the excision of the first *neo* gene, which was flanked by a pair of *loxP* sites (Fig. 1).

Another characteristic of the strategy is the use of adenoviral vectors, which have not yet been used in *in vitro* ES cell studies. Our trials using a retroviral vector in which the transgene was integrated into a chromosome led not only to lower gene transduction efficiency than that achieved with an adenoviral vector, but also to unstable gene expression in ES cells (data not shown), in accordance with previous reports [11,12]. In contrast, adenoviral vectors readily achieved high gene transduction efficiency [91.8 and 95.3% at m.o.i. of 15 and 30, respectively; this is higher than in most types of somatic cells (between  $\leq 0.1$  and 95%, with an average of 55% at an m.o.i. of 30) [13–18]]. Adenoviral vectors also facilitated stable transgene expression in ES cells, most likely due to the episomal nature of the transduced gene (Fig. 1F). Switching expression from the upstream *neo* gene to the downstream EGFP gene in the LE-ES cells (ES cells that were stably transfected with the switching-expression DNA construct) occurred efficiently after

**FIG. 1.** The efficacy of adenoviral conditional targeting in ES cells. (A) Schematic representation of this system. Efficient transduction and sequential stable expression of transgenes in ES cells are achieved by a single infection with adenoviral vectors during *in vitro* differentiation. Cre-*loxP* recombination occurs only in target cells, which are distinctly visualized by fluorescence microscopy and sorted by a flow cytometer maintaining viable conditions. UA-Promoter, a ubiquitously strong and constitutively active promoter; CS-Promoter, a cell-specific promoter; closed triangle, *loxP* sequence; closed square, polyadenylation signal. (B–E) The effectiveness and the cytotoxicity of adenoviral gene transduction and Cre-*loxP* recombination in LE-ES cells were analyzed by (B, C, top) fluorescence microscopy, (C, bottom) WST-8 assay, (D) RT-PCR, and (E) Western blotting 2 days after infection with a regulatory adenoviral vector. Scale bars, 50  $\mu$ m (B). PC, positive control (each plasmid DNA); NC, negative control (no template). (F) Undifferentiated D3 ES cells without feeder cells (top), undifferentiated R1 ES cells with feeder cells (middle), and D3 ES cells undergoing differentiation after the formation of EBs (bottom) showed high adenoviral gene transduction efficiencies. (G) No significant effects of adenoviral gene transduction on the cell cycle were detectable in ES cells. (Left) Undifferentiated ES cells, cultured with LIF, were infected with Ad.CMV-LacZ at the indicated m.o.i. Twenty-four hours later, the ES cells were dissociated and stained with propidium iodide (PI), followed by flow-cytometric analysis. (Right) ES cells were cultured without LIF in suspension for 3 days, followed by the attachment of the EBs to the dish and 24 h of culturing. Flow-cytometric analysis was performed 24 h following adenoviral infection in the same manner. The percentage of the cells in each phase of the cell cycle is quantified to the right.