

厚生労働科学研究費補助金

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	24
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	33
------------------------	----

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
総合研究報告書

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。我々が以前作製した C3H10T1/2 分化誘導系が間葉系幹細胞 (MSC) モデルとして有用かどうか探るために、網羅的遺伝子発現解析を行った。親株の 10T1/2、前脂肪細胞株 A54、筋芽細胞株 (M1601) でそれぞれ特異的な遺伝子の発現が確認され、C3H10T1/2 分化誘導系は間葉系幹細胞 (MSC) 及び、そこから分化した細胞のモデル細胞株として利用できる可能性を示唆した。次に、モデル細胞株では明らかに出来なかった MSC による免疫抑制の分子機構を解明するため、マウスの骨髄由来 MSC を樹立し、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発見した。この Stat5 のリン酸化を抑える因子として、NO (nitric oxide) の関与を調べたところ、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 NO 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。最後に、この免疫抑制物質 NO がどういう刺激で MSC から産生されるのかを調べた。Th1/Th2 分化との関係を調べていくうち、インターフェロン- γ が重要であることが明らかとなった。しかし、インターフェロン- γ 単独では NO は産生されず、インターフェロン- γ と frageline, TNF- α , もしくは IL-1 β の存在下で NO が産生されることを見いだした。阻害実験からこれらのリガンドの共通の下流シグナルとして、NF- κ B の重要性が強く示唆された。施設内生命倫理委員会の承認を得た臨床研究 (課題名「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性 GVHD に対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」) については、6 名の重症 GVHD 患者で MSC の培養を行い、その中の一例において MSC を実際に投与した。MSC 投与に伴う副作用は認められなかった。MSC 治療後に、GVHD 症状の軽快傾向と大腸内視鏡所見の改善が認められた。しかし、2 回の MSC 治療によっても GVHD は完全には軽快しなかった。MSC 投与法の工夫が必要と考えられた。次に、MSC による生着促進に関しては、C3H10T1/2 分化誘導系 [親株、前脂肪細胞株 (A54)、筋芽細胞株 (M1601)] を用い、関与する分子の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、親株の 10T1/2 では Dlk, Wnt-5 α という分化抑制因子の発現が確認された。A54 では SFC, SDF-1, angiopoietin-1 などの発現亢進が見られた。筋芽細胞株 M1601 では MyoD, α -actin, troponin T2 など筋肉・心筋に関係する遺伝子の発現が確認された。以上のことから、前脂肪細胞株 (A54) は造血支持能力が他の細胞株に比べて高いと考えられ、MSC の造血支持の分子機構も同様である可能性が示唆された。さらに、MSC 由来の間質細胞が造血細胞と協調して造血に適した微小環境を形成すると予想し、A54 細胞と造血幹細胞の相互作用がもたらす遺伝子発現プロファイルの変化を解析し

た。造血幹細胞との共培養によって A54 では Notch リガンド (Jagged 1・Dl13) をはじめとする多くの遺伝子の発現が上昇していた。これに対応して造血幹細胞側では Notch やその下流遺伝子の発現が上昇しており、両者の相互作用によって、造血に必須な Notch シグナル系が活性化していることが示唆された。前臨床研究としては、平成 17 年度 (初年度)、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でを行い、造血幹細胞の生着が促進されること (約 5 倍) を示す、1 頭目のデータを得た。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。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、ヒツジの系でも共移植の効果が示唆された。平成 19 年度はサルの系に戻って、別のサル (2 頭目) で実験を行なった。移植後の末梢血単核球を調べたところ、約 2% が遺伝子標識された移植細胞由来であった。そのうち単独移植群由来の細胞はほとんど検出されず、大部分は共移植群由来であったことから、共移植すると生着がよいことが再度示された。

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。そこで、臨床用 SAG (細胞増殖用キメラ遺伝子) の構成成分を全てヒト化し、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。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、骨髄内移植と MSC 共移植の併用による生着率向上をサルの系で調べる一方、SAG をレンチウイルスベクターであるサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターに搭載した。また、レトロウイルスベクターの問題点である宿主ゲノムの傷害性の可能性について検討するためプロウイルスの挿入位置の同定法を確立した。

分担研究者

久米 晃啓

自治医科大学医学部

准教授

花園 豊

自治医科大学医学部

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。そこで初代培養の MSC を用いて免疫抑制のメカニズムの解明を試みた。また、サルやヒツ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。尚、前者については、造血幹細胞と MSC または MSC 由来細胞との相互作用が造血作用に及ぼす影響についても、遺伝子発現レベルで解析した。

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。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 の場合、治療用遺伝子には重症複合免疫不全症のような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。まず、全てのコンポーネントをヒト化した臨床用 SAG を搭載したベクターを構築し、in vitro での細胞増幅効果を評価した。次いで、CGD モデルマウスにおいて in vivo の細胞増幅効果を解析した。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。

その他、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 (平成 18 年度)、レンチウイルスベクターである SIV ベクター (平成 19 年) に SAG を搭載し、細胞増殖を誘導できるか検討した。さらに SIV ベクターの遺伝子挿入サイトの同定法を改良し、実際にヒト細胞株を用い挿入サイトの検討を行った。

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) : A54 と M1601 は、C3H10T1/2 細胞株を DNA メチル化阻害薬 (5-アザシチジン) で処理することにより、以前、樹立した細胞株である。それぞれ A54 は脂肪細胞に、M1601 は筋管様に分化させることが出来る。親株である C3H 10T1/2、その亜株である A54 と M1601 の mRNA を調整し、それをもとに cDNA を作成し、それからビオチン標識した RNA を作成し、これをプローブとして、DNA チップにハイブリダイゼーションさせた。それぞれの細胞株で特異的に (2 倍以上) 亢進している遺伝子を特定し、リアルタイム RT-PCR でその結果を確認した。

マウス骨髄由来の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-サイミジンの取込みも

しくは CFSE 染色で測定した。NO 合成酵素阻害薬として、L-NAME もしくは NMMA を使用した。NO 合成酵素のノックアウトマウスから MSC を樹立し、それをを用いた解析を行った。NF- κ b の阻害薬として Bay-11 を使用した。インターフェロン- γ の阻害には中和抗体を使用した。

2) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究 (小澤): ステロイド抵抗性の難治性急性 GVHD 患者が現れた場合、患者のインフォームドコンセントを得た上で臨床研究を実施することとした。臨床用 MSC については、必要性が予測された段階で、インフォームドコンセントを得た血縁者から骨髄の提供を受け、自治医科大学の臨床用細胞プロセッシング室において作成した。MSC の一回の投与量は、 1×10^6 cells/kg とした。

3) MSC の造血支持作用の分子メカニズムの解明 (小澤、久米): MSC モデル細胞株として C3H マウス由来 10T1/2 細胞、および 10T1/2 を分化誘導して得られた前脂肪細胞株 A54 および筋芽細胞株 M1601 を用いた。親株 10T1/2・A54・M1601 の発現プロファイリングにより、造血支持能に関わる候補遺伝子を同定した。引き続いて、造血細胞と支持細胞が共培養による直接接触を通して互いに及ぼす影響について検討した。発現プロファイリングで造血に関わる候補遺伝子をリストアップし、定量的 PCR (Q-PCR) で確認した。

4) 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):

i) サルを用いた検討: 移植する造血幹細胞としてサル CD34⁺細胞を用いた。共移植する骨髄間質細胞は、サル骨髄血中の付着性単核球を用いた。CD34⁺細胞は、後の移植実験のために二等分した。二等分した造血幹細胞 (CD34⁺細胞) をそれぞれ異なるレトロウイルスベクター (G1Na と LNL6) を用いて遺伝子標識した。レシピエントのサルには、あらかじめ全身放射線照射 (1, 100 cGy 分 2) またはブスルファン (8 mg/kg を 1 回) 投与によって移植前処置を施行した。サル自家移植の系で、

同一個体の左右別々にヘミ移植を行った (個体差の影響を排除するため)。すなわち、右側には造血幹細胞 (レトロウイルスベクターで標識済) と骨髄間質細胞を骨髄内に直接、共移植した。左側にはコントロールとして造血幹細胞 (別のレトロウイルスベクターで標識済み) のみを骨髄内に移植した (研究協力者: 医薬基盤研究所 霊長類医学科学研究センター 揚山直英・柴田宏昭 両氏)。移植後の造血について、レトロウイルスベクター標識を指標にして、共移植群と単独移植群のどちらに由来するかを判定した。具体的には、末梢血単核球から DNA を抽出し、G1Na と LNL6 を判別する定量 PCR を行った。または、左右の長管骨から中立である腸骨から採取した骨髄細胞のコロニーアッセイを行い、各コロニーに対して G1Na と LNL6 を判別する PCR を行った。

ii) ヒツジを用いた検討: サルを用いた検討では、サル骨髄由来 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 (カニクイザルの) 骨髄由来間質細胞を用いたが、これはサル実験と同じである。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、成体の骨髄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 准教授, 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)

5) 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 治療に最適化した完全ヒト化 SAG の構築 : 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) 遺伝子を作製した。接合部分に僅かな違いのある数種のキメラ遺伝子をレトロウイルスベクターに搭載し、サイトカイン依存性細胞株あるいは骨髄細胞に遺伝し導入して細胞増幅効果を比較した。

ii) 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 : 上記実験でマウス顆粒球単球系前駆細胞を最も効率よく増幅した SAG を選定し、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 (X-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-CGD 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、エリスロポエチン (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。

iii) 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。

iv) 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。

v) 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 (EpoRMpl) 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。

vi) SAG を搭載した第 2 世代 SIV ベクター (SIV-EPOR-Mpl) を構築し、その働きは IL-3 依存性プロ B 細胞株で確認した。SIV ベクタープロウイルス挿入サイトについては、LAM-PCR 変法で挿入位置付近の配列を単離し、大腸菌にクローニングした。これら DNA 配列を解読し、インターネット上のプラストサイトに情報を入力し、挿入サイトを決定した。

(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[®]に従って行った。霊長類医学科学研究センターでのサルの実験は、霊長類医学科学研究センター「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) モデル細胞株の解析、及び、MSC の免疫抑制作用の分子メカニズムの解明 :

i) モデル細胞株である C3H10T1/2 分化誘導系を用いた解析 : 親株である 10T1/2 細胞株では 105 個の遺伝子が特異的に発現亢進していた。Dlk, Wnt-5a という分化抑制因子の発現亢進が認められ、10T1/2 の未分化維持に関与している可能性が示唆された。

A54 では 201 個の遺伝子が特異的に発現亢進し

ていた。その中に Stem cell factor, Stromal derived factor-1 など造血支持に関わる遺伝子があった。Angiopoietin-1 は chip 上には載っていないが、A54 で特異的に発現が亢進していることをリアルタイム RT-PCR と蛋白レベルで確認した。これらの造血因子の発現亢進は、A54 の脂肪分化とともに消失し、前脂肪細胞という分化段階に特異的なものであった。造血支持能を造血細胞との共培養系で見たところ、3つの細胞株のうち A54 のみで cobble stone appearance が認められ、実際に A54 が最も高い造血支持能をもっていることが示唆された。また、TGF- β_2 という免疫抑制因子の発現が認められた。

亜株の筋芽細胞株 (M1601) では 137 個の遺伝子が特異的に発現亢進していた。予想された通りに、MyoD, alpha-actin, Troponin T2 など筋肉、心筋細胞に関与する遺伝子の発現が亢進していた。

ii) 初代培養系 MSC を用いた免疫抑制機構の解明：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 時間後には T 細胞内 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、NO が上流の候補となった。MSC と T 細胞の共培養の上清中の NO を測定すると、大量に産生されていることがわかった。NO 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、ウエスタンブロット法を用いて調べた。共培養後に二つの細胞群に付着性を利用して分離し、NO 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 には発現していないことも確認された。

NO の関与を証明するために、NO 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た。さらに、Stat5 のリン酸化も回復し、こちらも NO が関与していることが証明された。

最後に、NO 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、このことから NO が関与していることが証明された。

iii) MSC による免疫抑制物質 NO の産生メカニズムの解明：Th1/Th2 に及ぼす MSC の影響を調べていくと、MSC は Th1 分化条件では T 細胞の増殖を良く抑制するが、Th2 分化条件では T 細胞の増殖抑制が弱いことがわかった。NO の産生を比べてみると、Th1 でより大量に産生されていた。つまり、このことは Th1 への分化条件 (IL-12, 抗 IL-4 抗体) が NO 産生に都合が良く、Th2 分化条件 (抗インターフェロン- γ 抗体、IL-4) はその産生に都合が良くないことを示している。われわれは Th2 分化条件が NO の産生を阻害しているとの仮説を立て、検証した。結果、IFN- γ の中和抗体が NO 産生を強く抑制することがわかり、その重要性が明らかとなった。

しかし IFN- γ でいくら MSC を刺激しても NO は産生されなかった。何らかの他因子が必要であることは明らかであった。調べていくと frageline, TNF- α , もしくは IL-1 β との併用である場合に限り NO の産生が確認された。

この3つはすべてNF- κ Bを活性化するリガンドである。NF- κ Bが重要であるという仮説のもとに特異的阻害薬Bay-11を使用したところ、mRNAでも蛋白レベルでもiNOS(NO合成酵素)の誘導低下が確認された。

2) 難治性急性GVHDに対するMSCによる治療の臨床研究：ステロイド抵抗性の難治性急性GVHD患者6例において、血縁者から骨髄の提供を受け、自治医科大学の臨床用細胞プロセッシング室においてMSCを培養した。その中の一例においてMSCを実際にGVHD治療目的に投与した。MSC投与に伴う副作用は認められなかった。MSC治療後に、GVHD症状の軽快傾向と大腸内視鏡所見の改善が認められた。しかし、2回のMSC治療によってもGVHDは完全には軽快しなかった。

3) MSCの造血支持作用の分子メカニズムの解明：造血支持能をテストした10T1/2細胞・A54細胞・M1601細胞はC3Hマウス(H-2k)由来である。これらと共培養する造血幹細胞(HSC)としては、C54BL/6マウス(H-2b)骨髄細胞から抗体ビーズで分取したLin陰性Sca-1陽性細胞を用いた。共培養によりHSCのcobblestone形成能や造血コロニー形成能が増大したのはA54のみであり、10T1/2とM1601は造血支持能をもたなかった。A54をさらに脂肪細胞まで分化させると造血支持能は失われ、分化段階に依存すると考えられた。トランスウェルで隔てて培養した場合は、A54細胞に造血支持能はなく、細胞間の直接接触が必要と考えられた。

同様の共培養の後、H-2k細胞とH-2b細胞を抗体ビーズで分取し、全RNAを抽出して遺伝子発現プロファイルを共培養前と比較した(Filgen)。A54において、共培養の前後でハウスキーピング遺伝子の発現が変化していなかったのに対し、約350の遺伝子が2倍以上の増減を示した。発現量に変化した遺伝子のうち、造血への関与が示唆されるものについてQ-PCRを行い、BMP-6とNotchリガンドであるJagged1・D113の発現が共培養

後に上昇していることを確認した。A54をリンパ球や分化したLin陽性細胞と共培養してもこれら遺伝子の発現増強はみられず、未分化なHSCとの相互作用による特異的変化と考えられる。

一方、HSC側においては、Notch遺伝子とその下流に位置するHes-1遺伝子の発現が共培養後に上昇していた。

4) 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：

i)サルを用いた検討：平成17年度と平成19年度に各1頭のサルの移植実験を実施した(計2頭)。その結果、1頭目では、移植後のコロニーアッセイによって、共移植群が単独移植群に比べて約5倍の生着効率を示した。2頭目では、移植後の末梢血単核球を調べたところ、約2%が遺伝子標識された移植細胞由来であったが、そのうち単独移植群由来の細胞はほとんど検出されず、大部分は共移植群由来であったことから、共移植すると生着がよいことが示された。いずれのサルにおいても造血幹細胞(CD34⁺細胞)をMSC(骨髄間質細胞)と共移植した場合、造血細胞の生着がよりよい傾向が観察されたことになる。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と考えられる。

ii)ヒツジを用いた検討：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MSCと共移植した1例のみであり、ヒツジの系でもMSCの生着促進効果が示唆された。

5) 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：In vitroで検討したSAGの中で最も強力だったのが

EpoR-Mpl で、骨髄細胞 10 万個から 400 個近いコロニーを生ぜしめた。EpoR 全長や EpoR-GcR のバリエーションはいずれも 100 個余のコロニーを誘導し、その強度はほぼ同等と考えられたが、その中では EpoR と GcR の間に 2 アミノ酸 (KL) を挟んだもの (Version 2) が最も多数のコロニーを作らせた。そこで、本 SAG を搭載した CGD 治療用ベクター (MT/gp91iresSAG) 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。

さらに EPOR-Mpl をレンチウイルスの SIV ベク

ターへ搭載し、 10^8 vg/ml 程度の生産が確認できた。SIV ベクターの遺伝子挿入位置の解析法を確立するため、SIV-EGFP を感染させたヒト細胞株で SIV ベクターに最適化した LAM-PCR を行った。その結果、組み込み箇所が判明できたのは 52 クローンであり (重複 2 箇所)、22 箇所 (44%) がイントロン内で、28 箇所 (56%) が遺伝子外に挿入されていた。

D. 考察

1) モデル細胞株の解析、及び、MSC の免疫抑制作用の分子メカニズムの解明: モデル細胞株の網羅的遺伝子発現解析でいくつかの興味深い遺伝子発現を確認した。Dlk の強制発現実験では A54 の分化は抑制されなかったが、発現亢進している 10T1/2 細胞株では何らかの分化抑制作用を発揮している可能性が考えられた。A54 細胞株での造血因子の発現は前脂肪細胞特異的で、脂肪分化とともに消失したため、再生不良性貧血の脂肪髄などの病態を説明している可能性が考えられた。造血因子の発現と免疫抑制因子 TGF- β_2 の発現は A54 細胞株が前脂肪細胞でありながら、MSC の特徴を保っている可能性を示していると考えられた。

これまでに報告されている MSC と関連のある免疫抑制因子としては、TGF- β 、PGE $_2$ 、indoleamine-2,3-dioxygenase などが知られている。今回我々が発見した NO とこれらの因子との比較実験では、PGE $_2$ が NO 同様、その関与が裏付けされたが、TGF- β 、indoleamine-2,3-dioxygenase の関与は証明できなかった。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。

MSC がどういった刺激を受けて NO を産生するのか全く報告がない。われわれはインターフェロンが重要であることを見つけたが、これは活性化 T 細胞の存在が不可欠であった、以前の結果と良く合致する。もう一つ必要なリガンドは同定でき

なかったが、その下流に NF- κ B があることが推察された。また、Th1/Th2 で NO の産生量が違うのは興味深い知見であると考えられた。

2) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究: ステロイド抵抗性の難治性急性 GVHD 患者一例において、血縁者由来 MSC による GVHD 治療がある程度奏効した。但し、有効性を高めるには、MSC 投与方法のさらなる工夫が今後は必要と考えられた。

3) MSC の造血支持作用の分子メカニズムの解明: 造血支持能を獲得した MSC 由来間質細胞と未分化な造血細胞との直接接触により、相互に Notch シグナル系のリガンドと受容体の発現が促進される、正のフィードバックループの存在が示唆される。今後さらに他のシグナル系を明らかにするなど、造血細胞と支持細胞相互作用の全体像を明らかにすべく、解析を進める必要がある。

4) 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: 本研究事業では、サルを用いた遺伝子標識研究を計画し、2頭実施した。その結果、いずれのサルにおいても、造血幹細胞を MSC と共移植した場合、造血細胞の生着はよい傾向が観察された。

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、ヒツジ胎仔への子宮内移植も行なった。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、共移植の効果が示唆された。

サルとヒツジを用いた実験から、MSC を造血細胞とともに骨髄内へ直接移植すると、造血細胞の生着を高められることが分かった。MSC の共移植による造血細胞の生着促進効果を大型動物で検証した例はあまりなく、貴重な成果が得られたと

言える。

造血幹細胞移植を受ける患者では、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望まれている。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ている。これらは、MSC を造血細胞と共に移植することによって実現できるかもしれない。

造血幹細胞移植後の造血回復に関しては、造血幹細胞の体外増幅やサイトカイン投与による造血回復の促進など、主にドナー細胞の観点から研究が進められている。これに対して、レシピエントの骨髄微小環境の観点から造血幹細胞の生着促進を図る本研究はユニークであり、今後もいっそうの進展を図りたい。

5) 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、特異性の高い増幅が得られ、安全性は高いと考えられる。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。また、レンチウイルスベクターに EPOR-Mpl を搭載し、さらに SIV ベクターがホストのゲノムに挿入されるサイト

解析の方法を確立したことは、安全性の確認に大いに有用であると思われる。

E. 結論

・ 我々が用いた C3H10T1/2 分化誘導系の MSC モデル細胞株は、少なくとも一部、MSC の機能の分子機構と相同性を持っていると考えられ、今後 MSC の研究に応用できる可能性が示唆された。実際、A54 前脂肪細胞株は造血支持能に関与すると考えられる因子の発現が亢進していた。また、免疫抑制因子の TGF- β_2 も発現が亢進していた。間葉系幹細胞の造血支持、免疫抑制の分子機構の一部と相関している可能性が考えられた。

・ MSC の免疫抑制メカニズムの一つとして、NO が関与していることを証明した。MSC から NO 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。

・ MSC が免疫抑制因子 NO を産生するメカニズムを調べ、インターフェロン- γ と NF- κ B が重要であることを証明した。C3H10T1/2 分化誘導系の MSC モデル細胞株も NO を産生していることが明らかとなった。

・ 難治性急性 GVHD の一例に対して血縁者由来の MSC による治療を行い、その安全性と有効性が示唆された。

・ これまで造血に必須と言われてきた Notch シグナル系が、造血細胞と支持細胞との直接接触により活性化されていることを明らかにした。

・ サルとヒツジを用いた実験から、MSC を造血細胞と共に骨髄内へ直接移植すると、造血細胞の生着を高められることを示した。

・ 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 MSC 共移植と骨髄内移植により生着の促進を確認した

・ 遺伝傷害性のない RNA ベクターである SeV と造血幹細胞に高い導入効率を示すレンチウイルス (SIV) ベクター-SAG (EpoRMpl) 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。さらに SIV ベクターによる遺伝子挿入サイトの解析を行った。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Furuyama, K., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J. Cell. Biochem.* (in press)
- 2) Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., and Kume, A.: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* 30(3): 121-127, 2008.
- 3) Okada, T. and Ozawa, K.: Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front. Biosci.* 13: 1887-1891, 2008.
- 4) Urabe, M., Obara, Y., Ito, T., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: Targeted insertion of transgene into a specific site on chromosome 19 by using adeno-associated virus integration machinery. In, *Progress in Gene Therapy, Vol. 3, Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy.*

- (ed. by Bertolotti, R. and Ozawa, K.), World Scientific Publishing Co., pp.19-46, 2008.
- 5) Uchida, M., Kirito, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Activation of FKHRL1 plays an important role in protecting erythroid cells from erythropoietin deprivation-induced apoptosis in a human erythropoietin-dependent leukemia cell line, UT-7/EPO. *Int. J. Hematol.* 86(4): 315-324, 2007.
 - 6) Kikuchi, S., Nagai, T., Kunitama, M., Kirito, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci.* 98: 1949-1958, 2007.
 - 7) Tarumoto, T., Imagawa, S., Kobayashi, M., Hirayama, A., Ozawa, K., Nagasawa, T.: L-arginine administration reverses anemia associated with renal disease. *Int. J. Hematol.* 86: 126-129, 2007.
 - 8) Miyoshi, T., Nagai, T., Kikuchi, S., Ohmine, K., Nakamura, M., Hanafusa, T., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib. *Exp. Hematol.* 35: 1358-1365, 2007.
 - 9) Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: E2F-6 suppresses growth-associated apoptosis of human hematopoietic progenitor cells by counteracting proapoptotic activity of E2F-1. *Stem Cells* 25: 2439-2447, 2007.
 - 10) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Transforming activity of purinergic receptor P2Y₆, G protein coupled, revealed by retroviral expression screening. *Leuk. Lymphoma.* 48: 978-986, 2007.
 - 11) Fujiwara, S., Muroi, K., Kikuchi, S., Kawano-Yamamoto, C., Matsuyama, T., Mori, M., Nagai, T., Akutsu, M., and Ozawa, K.: Development of streptococcus meningitis and Epstein-Barr virus reactivation after non-T-cell-depleted human leukocyte antigen-haploidentical peripheral blood stem cell transplantation based on fetomaternal microchimerism. *Leuk. Lymphoma* 48: 640-642, 2007.
 - 12) 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.
 - 13) Oh, I., Ozaki, K., Sato, K., Meguro, A., Tatara, R., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K.: Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 956-962, 2007.
 - 14) 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.
 - 15) Ozaki, K., Sato, K., Oh, I., Meguro, A., Tatara, R., Muroi, K., and Ozawa, K.: Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int. J. Hematol.* 86: 5-7, 2007.
 - 16) 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.
- 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choin Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K., and Mano, H.: Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1256-1262, 2005.
 - 23) Fujishiro, J., Takeda, S., Takeno, Y., Takeuchi, K., Ogata, Y., Takahashi, M., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Okada, T., Ozawa, K., Hashizume, K., and Kobayashi, E.: Gene transfer to the rat kidney *in vivo* and *ex vivo* using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 1385-1391, 2005.
 - 24) Ishii, H., Inageta, T., Mimori, K., Saito, T., Sasaki, H., Isobe, M., Mori, M., Croce, C.M., Huebner, K., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9655-9660, 2005.
 - 25) Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Miyoshi, T., Ohmine, K., Toshima, M., Miyazato, A., Takatoku, M., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N., and Ozawa, K.: Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation. *Med. Sci. Monit.* 11: CR91-94, 2005.
 - 26) Inoue, H., Ohsawa, I., Murakami, T., Kimura, A., Hakamata, Y., Sato, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okada, T., Ozawa, K., Francis, J., Leone, P., and Kobayashi, E.: Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 288-295, 2005.
 - 27) Inukai, T., Inaba, T., Dang, J., Kuribara, R., Ozawa, K., Miyajima, A., Wu, W., Look, A.T.,

- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Akashi, K., Kagami, K., Goi, K., Sugita, K., and Nakazawa, S.: TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down regulating expression of the common b chain of cytokine receptors. *Blood* 105: 4437-4444, 2005.
- 28) Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., and Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum.* 52: 164-170, 2005.
- 29) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16:474-480, 2008.
- 30) Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and 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.
- 31) Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K., Xiao, S.: Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp. Mol. Med.* 39: 170-175, 2007.
- 32) Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., Tominaga, S.: Soluble ST2 blocks IL-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* 282: 26369-26380, 2007.
- 33) Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50:531-536, 2007.
- 34) Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101:734-741, 2007.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) Liu Y, Okada T, Sheykholeslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K, Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol. Ther.* 12: 725-732, 2005
- 40) Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther.* 16: 1212-1218, 2005
- 41) Tanaka, Y., Nakamura, S., Shibata, H., Kishi, Y., Ikeda, T., Masuda, S., Sasaki, K., Abe, T., Hayashi, S., Kitano, Y., Nagao, Y., Hanazono, Y.: Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. *Stem Cells Dev.* in press.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) Asano, T., Shibata, H., and Hanazono, Y.: Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol. Biol.* 329: 295-303, 2006.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ono, F., Ogawa, H., Nagashima, N., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Terao, K.: Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp. Anim.* 54: 421-428, 2005.
- 48) 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.
- 49) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, 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.
- 50) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K, Hanazono Y: Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells.

- Transplantation 79: 32-37, 2005.
- 51) Yoshida K, Yonemitsu Y, Tanaka S, Yoshida S, Shibata S, Kondo H, Okano S, Ishikawa F, Akashi K, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K. In vivo repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by temperature-sensitive mutant of recombinant Sendai viral vector. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 361: 811-6.
- 52) Nagase T, Matsumoto D, Nagase M, Yoshimura K, Shigeura T, Inoue M, Hasegawa M, Yamagishi M, 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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.
- 57) Yoshizaki, M., Hironaka, T., Iwasaki, H., Ban, H., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., and Inoue, M.: Naked Sendavirus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J. Gene Med.* 28: 1151-1159, 2006.
- 58) 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.
- 59) 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 myoneuropathic metabolic syndrome in severe hindlimb ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290: 1484-1492, 2006.
2. 学会発表
- 1) 久米晃啓、松下卓、小倉剛、小澤敬也 : 自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療. 第110回日本小児科学会小児科学会学術集会、2007. 4. 20、京都。(日児誌 111 : 220, 2007)
- 2) Urabe, M., Mizukami, H., Bakker, A., Kume, A., Hermens, W., Ozawa, K.: Generation of more

- infectious type 1 AAV vectors in insect cells. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.5.31, Seattle, WA, USA. (Mol. Ther. 15 Suppl. 1: S34-35, 2007)
- 3) Kume, A., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Okada, T., Ozawa, K.: Long-term efficacy of a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007. 5. 31, Seattle, WA, USA. (Mol. Ther. 15 Suppl. 1:S43, 2007)
 - 4) Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., Ozawa, K.: AAV vector-mediated sustained expression of prostacyclin synthase ameliorates obesity in Zucker fatty rats. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.1, Seattle, WA, USA. (Mol. Ther. 15 Suppl. 1:S136-137, 2007)
 - 5) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for tumor-tracking and therapeutic gene amplification as systemic suicide cancer gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (Mol. Ther. 15 Suppl. 1: S292-293, 2007)
 - 6) Mizukami, H., Ishiwata, A., Ono, F., Takano, J., Fujimoto, K., Mimuro, J., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K.: Seropositivity against AAV serotype 1, 8 and 9 in cynomolgus monkey colonies. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007.6.2, Seattle, WA, USA. (Mol. Ther. 15 Suppl. 1:S320, 2007)
 - 7) Kume, A., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Okada, T., Ozawa, K.: Efficient and stable liver transduction by a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋. (Abstract #004)
 - 8) Urabe, M., Mizukami, H., Bakker, A., Kume, A., Hermens, W., Ozawa, K.: Production of more potent type 1 adeno-associated virus vectors in insect cells. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋. (Abstract #010)
 - 9) Horiuchi, Y., Otsu, M., Kiyokawa, N., Migita, O., Li, X.-K., Onodera, M., Kume, A., Okuyama, T., Fujimoto, J., Nakauchi, H., Kuratsuji, T.: Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋. (Abstract #20)
 - 10) Mizukami, H., Ishiwata, A., Ono, F., Takano, J., Fujimoto, K., Mimuro, J., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K.: Prevalence of neutralizing antibody against AAV serotypes 1, 8 and 9 in Cynomolgus monkey colonies. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋. (Abstract #27)
 - 11) Mizukami, H., Muramatsu, S., Ono, F., Mimuro, J., Sakata, Y., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., Noakano, I., Ozawa, K.: Safety of intracranial AAV vector injection in Cynomolgus monkeys. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.28、名古屋. (Abstract #30)
 - 12) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Matsushita, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Tumor tracking and therapeutic gene amplification by using retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of suicide cancer therapy. 第 13 回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋. (Abstract #91)
 - 13) Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Nakata, M.,

- Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sakata, Y., Yada, T., Shimada, K., Ozawa, K.: Sustained expression of prostacyclin synthase by an intramuscular injection of an AAV vector attenuates obesity in Zucker fatty rats. 第13回日本遺伝子治療学会、2007.6.30、名古屋。(Abstract #92)
- 14) Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for reinforcement of systemic suicide cancer gene therapy. 第66回日本癌学会学術総会、200.10.3、横浜。(P-444, Program p106)
- 15) Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: A gene therapy approach against lymph node metastasis using sVEFR3 in uterine body cancer. 第66回日本癌学会学術総会、2007.10.4、横浜。(P-949, Program p170)
- 16) Shibata, H. and Hanazono, Y.: A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation, Beijing, China, September 21-24, 2007. (abstracts p. 358)
- 17) Kishi, Y., Inoue, M., Shibata, H., Tanaka, Y., Sasaki, K., Ikeda, T., Hasegawa, M., and Hanazono, Y.: Pharmacological control of Sendai viral transgene expression in cynomolgus embryonic stem cells. The Japan Society of Gene Therapy the 13th Annual Meeting, Nagoya, June 28-30, 2007. (abstracts p. 90)
- 18) Tanaka, Y., Nakamura, S., Shibata, H., Kishi, Y., Ikeda, T., Sasaki, K., Abe, T., Hayashi, S., Nagao, Y., Kitano, Y., and Hanazono, Y.: Long-term macroscopic engraftment of cynomolgus tissues in sheep after in utero transplantation of cynomolgus ES cells. International Society for Stem Cell Research 5th Annual Meeting, Cairns, Australia, June 17-20, 2007. (abstracts p. 311)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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