

Fig.35 N結合型糖鎖合成経路と無血清培地及びHS添加培地で培養したHL60RG膜画分由来糖鎖の比較定量解析

分担・研究報告書

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究

分担研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト 主任研究員

本研究は、ヒト造血幹細胞に対し、骨髄 niche への接着に関与する分子もしくは造血幹細胞のアポトーシスを防ぐ分子などを強制発現させることによって造血幹細胞の移植効率を向上させることを目的とする。本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターによる造血幹細胞への高効率遺伝子導入法の確立およびそれを用いた抗アポトーシス遺伝子の導入を試み、以下の結果を得た。

1. Subgroup B に属する 35 型 Ad ベクターは従来汎用されている 5 型 Ad ベクターと比較し、造血幹細胞を含む画分である骨髄由来ヒト CD34 陽性細胞に対し有意に高い遺伝子導入効率を示した。また外来遺伝子の発現をドライブするプロモーターとしては、CA プロモーター (cytomegarovirus 由来エンハンサーに chicken beta-actin プロモーターおよび chicken beta-actin イントロンを加えたプロモーター) が最も優れていた。
2. ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤を用いて、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率の改善を試みた。CD34 陽性細胞に 35 型 Ad ベクターを感染させるとともに、HDAC 阻害剤として FR901228 を 0.1ng/ml の濃度で作用させたところ、顕著な遺伝子発現効率の改善に成功した。
3. 35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入には、CD34 陽性細胞に発現した $\alpha v \beta 3$ インテグリンと 35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列との結合が重要であることが明らかとなった。
4. $\alpha v \beta 3$ インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合は、35 型 Ad ベクターの細胞表面への吸着や細胞内取り込みよりも細胞内在化後の輸送過程に関与していることが示唆された。
5. ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-xL の活性増強変異体である Bcl-FNK 遺伝子を導入・発現させることにより、CD34 陽性細胞に抗アポトーシス活性を付与することに成功した。
6. Bcl-FNK を遺伝子導入することにより、CD34 陽性細胞が一定期間培養後も分化能および自己増殖能を保持していることを見出した。
7. Bcl-FNK 遺伝子導入細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植したところ、移植細胞が骨髄に正着し分化していることを確認した。

A. 研究目的

造血幹細胞は、自己複製能ならびに多分化能を有していることから遺伝子治療の重

要な標的細胞であるとともに、再生医療・細胞治療の細胞ソースとしても大いに期待されている。造血幹細胞を用いた治療では、

造血幹細胞を一旦体外に取り出して遺伝子導入、もしくは培養・増殖させた後、患者に細胞を移植するといった治療法が用いられている。これまで X 連鎖重症複合免疫不全症や白血病などの難治性疾患に対し造血幹細胞を用いた治療の有効性が報告されているが、一方で造血幹細胞の移植効率が低いために十分な治療効果が得られていないことが明らかになってきた。造血幹細胞移植においては、造血幹細胞の液体培養時を始め、移植し骨髄に生着するまでの過程で様々なストレスを受けるとともに、移植後、骨髄まで十分な細胞数が到達・生着していないことが予想される。そこで本研究では、造血幹細胞への遺伝子導入に優れた 35 型アデノウイルス (Ad) ベクターを用いてヒト造血幹細胞に移植効率を向上させる分子 (骨髄 niche への生着を向上させるような分子など)、もしくはアポトーシスを防ぐ分子 (抗アポトーシス遺伝子) を強制発現させることによって、移植効率の向上が可能か否かを検討することを目的とする。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

5 型ならびに 35 型 Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ligation 法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 のマルチクローニングサイトに Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を挿入した pHMCMV-GFP を I-CeuI, PI-SceI で消化し、同酵素で消化した 5 型ならびに 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdHM4 および pAdMS4 と Ligation することにより、GFP 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVGFP および pAdMS4-CMVGFP を得た。作製したプラスミ

ドを PacI もしくは SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 293 細胞もしくは 35 型 E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで GFP 発現 5 型ベクター Ad5GFP ならびに 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価ならびに生物学的力価は Maizel らの方法、および鐘ヶ江らの方法に従い測定した。また、各種プロモーターの比較検討においては、pHMCMV5 のかわりに各種プロモーターを搭載したシャトルプラスミドを用いた。

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した 35 型 Ad ベクタープラスミドである pAdMS19、および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シャトルプラスミド pHM5.4 を AscI/EcoRI で処理したフラグメントと、同じく AscI/EcoRI で処理した 35 型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、PmeI/AscI/NheI/Bst1107I/Csp45I/PacI/NotI のマルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ SphI/Csp45I で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を Bst1107I と Csp45I で切断したフラグメント (35 型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を Bst1107I と Csp45I で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を PvuII/PstI 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近

をコードした合成オリゴ DNA (5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGA CTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAG AGAATTTTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3' , 5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTTCTCTCCTCTGA CCTCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCA ACTATGTTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'、アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を SphI と PvuII で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ I-CeuI/B1pI 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を SgrAI と PacI で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を SgrAI と PacI で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後に、pFS4-Ad35-9 を AscI/PacI で切断したものと Bst1107I で消化した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAG CGACTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAATT TCGGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3'

5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTTGACCTC TCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTA TGTTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'

Green fluorescence protein (GFP) 発現

35 型 Ad ベクターは以下のように作成した。pHMCAGFP を I-CeuI および PI-SceI 処理したフラグメントと、pAdMS18 を I-CeuI および PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 SbfI で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手) を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター Ad35RGE GFP および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクター Ad35・RGD GFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。

Cytomegalovirus enhancer/chicken -actin promoter (CA) プロモーターを含むシャトルプラスミド pHMCA5 のマルチクロニングサイトに抗アポトーシス遺伝子として Bcl-xL 遺伝子 (日本医科大学・太田成男先生より供与) を挿入した pHMCA-BclxL を I-CeuI, PI-SceI で消化し、同酵素で消化した 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS18 と Ligation することにより、Bcl-xL 発現ベクタープラスミド pAdMS18-BclxL を得た。作製したプラスミドを SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 35 型 E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで Bcl-xL 発現 35 型ベクター Ad35-BclxL を得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価ならびに生物学

的力価は Maizel らの方法に従い測定した。その他、Bcl-xL の活性増強変異体である Bcl-FNK (日本医科大学・太田成男先生より供与) 発現 35 型 Ad ベクターについても上記と同様に作製した。

B-2. 35 型 E1B 発現 293 細胞の作製

35 型 Ad の E1B-55K 遺伝子を含む 1911-3413 塩基からなるフラグメントは、35 型 Ad ゲノムの 1-7930 塩基からなるフラグメントを有するプラスミド pFS2-Ad35-1 を鋳型としてプライマー 1 (5'-GAT AAA TGG ATC CCG CAG AC-3') とプライマー 2 (5'-CCC AAT ACT CAC CTT AGT CAG-3') を用いて PCR を行い作製した。このフラグメントを pEF/myc/nuc (Invitrogen 社) のマルチクローニングサイトに挿入することで、pEF-Ad35E1B を作製した。このプラスミドを 293 細胞に Superfect を用いてトランスフェクションし、G418 (500 μ g/ml, Invitrogen 社) 存在下で培養することにより、35 型 Ad の E1B-55K タンパク安定発現 293 細胞を得た。

B-3. CD34 陽性細胞における Cocksackievirus and adenovirus receptor (CAR) ならびに CD46 の発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Cambrex 社) を抗ヒト CAR 抗体 (RmcB, Upstate Biotechnology 社) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識された抗マウス IgG 抗体 (Pharmingen 社) を含む staining buffer に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメ

ーター (FACScalibar flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて解析した。CD46 発現解析においては、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗 CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社) を用いて同様に解析した。

B-4. Ad ベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験

CD34 陽性細胞は、解凍後サイトカイン入り培地 (human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor; 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3; 20 ng/ml, human IL-6; 20 ng/ml, Stem Cell 社) に懸濁、16-18 時間培養した後、 1×10^4 cells/well となるよう 96 穴プレートに播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを作用させた。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

B-5. ヒストン脱アセチル化阻害剤による遺伝子発現効率の上昇

上記と同様に CD34 陽性細胞を調製、播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した CA プロモーターを搭載した GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させた。同時にヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDAC 阻害剤) として FR901228 (アステラス製薬より供与)、および CAY10398 (Cayman 社) を各濃度で 6 時間作用させた。その後、細胞を回収・遠心して 35 型 Ad ベクターおよび HDAC 阻害剤を取り除いた後、再び細胞を培地に懸濁し培養した。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

B-6. ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞は解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell 社より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3; 20 ng/ml, human IL-6; 20 ng/ml) に懸濁し 12~18 時間培養した後、実験に使用した。CD34 陽性細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手) および anti-rat IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗・v・3 (LM609)、抗・v・5 (P1F6)、抗・5 (P1D6)、抗・1 (P4C10)、抗・2 インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗・4 インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗・6 インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

B-7. RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、4・C、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように

添加し、4・C、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37・C、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

B-8. 35 型 Ad ベクターのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への取り込み

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 3×10^4 cells/well で 48 穴プレートに播種し、Ad35GFP、Ad35RGEGFP および Ad35・RGDGFP を 6000 VP/cell で感染させ、37・C、3 時間培養後に細胞を回収した。細胞を冷 PBS で 5 回洗浄した後、35 型 Ad ベクターのゲノム DNA を含む total DNA を DNeasy Tissue Kit (キアゲン社より入手) を用いて回収した。DNA 量を picogreen (Invitrogen 社より入手) で測定した後、total DNA に含まれる Ad ゲノム DNA 量を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。測定条件は、25 ng サンプル DNA、0.5・M プライマーセット、0.16・M TaqMan probe、25・L Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社より入手) を含む最終容量 50・L の混合液を反応させ、95・C 15 秒、60・C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で定量した。また、プライマーおよび蛍光標識プローブは 35 型 Ad ベクターの pIX 領域に設定した。配列を以下に示す。

Ad35 pIX-forward ; 5' -TGG ATG GAA GAC CCG TTC AA-3'

Ad35 pIX-reverse ; 5' -CGT CCA AAG GTG AAG AAC TTA AAG T-3'

蛍光標識プローブ ; 5' -FAM-CGC CAA TTC TTC AAC GCT GAC CTA TGC-TAMRA-3'

35 型 Ad ベクターのスタンダードとしては 35 型 Ad ベクターのプラスミド pAdMS4 を用いた。

B-9. 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、4・C、30 分間インキュベートした。次に、抗インテグリン抗体を 50・g/mL で添加し、4・C、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37・C、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

B-10. 抗アポトーシス遺伝子の発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞は解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell 社より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3; 20 ng/ml, human IL-6; 20 ng/ml) に懸濁し 12~18 時間培養した後、実験に使用した。CD34 陽性細胞に対し、各種 35 型 Ad ベクターを 6000 VP/cell で作用させ、48 時間培養した後、細胞を回収した。細胞を Lysis buffer で溶解した後、遠心し上清を回収、タンパク濃度を定量した。10・g/lane で 12.5% アクリルアミドゲルを用いて泳動し、抗 Bcl-xL 抗体 (500 倍希釈、Trevigen 社より入手) を用いて定法に従い検出した。

B-11. 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の増殖に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。遺伝子導入より 2、4、6、8 日後、細胞を回収し、細胞数を Nucleocounter (Chemometec 社より入手) を用いて測定した。また、細胞数計測時に等量の新鮮培地を加えた。

B-12. 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の抗アポトーシス能に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。6 日間培養後、細胞を回収し、各濃度の Camptotecin (Sigma 社より入手) を含む培地で培養した。培養 48 時間後、生存率を Trypan blue exclusion assay を用いて測定した。

B-13. 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の分化能・増殖能に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000 VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用した。35 型 Ad ベクター作用 2 日および 8 日後、細胞を回収、洗浄した。細胞数を計測したのち、Methocult (H4344、Stemcell 社より入手) を用いて 2000 cells/dish で Colony assay を行った。細胞播種 14 日後、顕微鏡下コロニーを観察した。

B-14. 免疫不全マウスへの移植実験

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを 6000 VP/cell で 6 時間作用させたのち、計 48 時間培養した。細胞回収後、一回洗浄したのち、2.4Gy で放射線照射した NOG マウス

(NOD/Shi-scid, IL-2RgKO, 実験動物中央研究所より入手) に 1×10^5 cells を尾静脈より移植した。移植より 20 週後、マウスを解剖し骨髄、脾臓、胸腺、末梢血より血液細胞を回収した。細胞を溶血処理したのち、各種抗体で染色し各種細胞表面マーカーの発現を FACS Canto (BD Biosciences 社より入手) を用いて解析した。使用した抗体は以下の通りである。PE-Cy7 標識 anti-mouse CD45 (30-F11), FITC 標識 anti-human CD45 (HI30), APC 標識 anti-human CD3 (UCHT1), PE 標識 anti-human CD56 (MEM-188), PE 標識 anti-human CD19 (HIB19), APC 標識 anti-human CD10 (HI10a), APC 標識 anti-human CD33 (WM53), PE 標識 anti-human CD4 (RPA-T4), PE-Cy7 標識 anti-human CD8 (RPA-T8), APC 標識 anti-human CD34 (581), PE 標識 anti-human CD38 (HIT2)。

C. 研究結果

造血幹細胞への高効率な遺伝子導入は、遺伝子治療のみならず細胞治療・再生医療の発展において必要不可欠であると思われる。これまで、造血幹細胞への遺伝子導入ではレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターが用いられてきた。しかしながら、これらのベクターでは長期的な遺伝子発現が期待できる一方、ウイルスゲノムが細胞の染色体に組み込まれるため細胞が癌化する恐れがあること、遺伝子機能解析などの一過性の発現が望ましい場合には適さないことなどが問題となっている。そこで我々は遺伝子が染色体に組み込まれることなく遺伝子発現を示す Ad ベクター

によるヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法の開発を試みた。

Ad ベクターとしては、従来汎用されている 5 型 Ad ベクター、ならびに血液細胞に対し親和性を有する 35 型 Ad を基本骨格とした 35 型 Ad ベクターを用いた。5 型 Ad ベクターは受容体として coxsakievirus and adenovirus receptor (CAR) を、35 型 Ad ベクターは CD46 を認識することが報告されている (Fig. 1)。そこでまずヒト造血幹細胞を含む画分である骨髄由来 CD34 陽性細胞における CAR ならびに CD46 の発現を Flowcytometry にて検討した (Fig. 2)。その結果、5 型 Ad ベクターの受容体である CAR の発現はほとんど認められなかったものの、35 型 Ad ベクターの受容体である CD46 はほぼ全ての細胞が発現していた。

次に CD34 陽性細胞に対し、CMV プロモーターを搭載した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを加え、48 時間共培養した。その結果、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターと比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 3)。各 Ad ベクターを MOI (multiplicity of infection) 300 で作用させた場合では、5 型 Ad ベクターでは約 4.5% の細胞しか遺伝子発現を示さなかったのに対し、35 型 Ad ベクターでは約 59% もの細胞が遺伝子発現を示した。また平均蛍光強度においても、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターの約 10~60 倍高い値を示した。従って、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターよりもヒト造血幹細胞への優れた遺伝子導入用ベクターとなりうることを示された。

次に、CD34 陽性細胞においてどのプロモーターが最も優れているか検討するため、

各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製して遺伝子発現効率を比較検討した。用いたプロモーターとしては、以下の 6 種類である：the human elongation factor 1 · promoter (EF1 · promoter), the CMV immediate-early 1 gene enhancer/ · -actin promoter with · -actin intron (CA promoter), the CMV promoter/enhancer with the largest intron of CMV (intron A) (CMVi promoter), the mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK promoter), the murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTR) promoter (MSCV promoter)。これら各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターをヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に 6000VP/Cell で 6 時間のみ作用させたところ、EF1 · プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが他のプロモーターと比較し、高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 4)。特に CA プロモーターでは約 54% の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。以上の結果より、CD34 陽性細胞における遺伝子発現効率はプロモーターによって大きく異なり、今回調べたプロモーターの中では、CA プロモーターが最も活性が高いことが示された。

CA プロモーターを用いることで遺伝子発現効率の改善が認められたが、CD34 陽性細胞はほぼ全ての細胞が受容体である CD46 を発現しているにもかかわらず、遺伝子発現細胞の割合は 100% に到達していない。そこで遺伝子発現効率の更なる向上を目指して、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤存在下での遺伝子発現効率を測定した。HDAC 阻害剤は、内在性および外来遺伝子の

発現を転写レベルで増強することが知られている。ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、HDAC 阻害剤 (FR901228、CAY10398) および GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させたところ、HDAC 阻害剤非存在下においては、約 59% の細胞が遺伝子発現を示したのに対し、FR901228 濃度の増加とともに遺伝子発現効率の増大が観察され、FR901228 濃度 0.1ng/ml においては 71% の細胞が遺伝子発現を示した (Fig. 5B-E)。また、平均蛍光強度に関してはさらに顕著な改善が見られ、FR901228 濃度 0.1ng/ml では非存在下と比較し 3.5 倍の上昇が観察された。一方、もう一つの HDAC 阻害剤である CAY10398 では FR901228 の場合と比較し顕著な改善は認められなかった (Fig. 5F-H)。両薬物ともに 0.01-0.1ng/ml の範囲では、明らかな細胞毒性は観察されなかった。以上の結果より、HDAC 阻害剤を用いることによりヒト CD34 陽性細胞へ高効率な遺伝子導入が可能となった。

次にヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験に用いた Ad ベクターを Fig. 6 に示す。ヒト CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ および $\beta 2$ インテグリンがほぼ 100% の細胞で発現していた (Fig. 7)。また、発現レベルはやや低いものの 13% の細胞で $\alpha v \beta 3$ インテグリンが、2% の細胞で $\alpha v \beta 5$ インテグリンが発現していた。尚、CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現について 2 人のドナー由来の細胞を解析したが、どちらの細胞においても同程度の発現が得られた (data not shown)。

次に、35 型 Ad ペントンベース · RGD 配列

の感染への関与について検討するために、RGDペプチドによる35型Adベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、インテグリンに結合しないRGEペプチド作用群と比較して、RGDペプチド存在下では濃度依存的に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig. 8)。RGDペプチド200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下で43%まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35型Adベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でもRGD配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

さらにペントンベースのRGD配列の関与について検討するため、35型Adベクターのペントンベースに存在するRGDモチーフをRGEに置換 (Ad35RGEGFP)、または欠損 (Ad35・RGDGFP) させた35型Adベクターを作製し、通常の35型Adベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の35型Adベクターと比較して、Ad35RGEGFPおよびAd35・RGDGFPのいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれAd35GFPの20%または17%まで遺伝子発現量が低下した (Fig. 9)。従って、前節のRGDペプチドを用いた35型Adベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35型Adベクターによる遺伝子導入にペントンベース・RGD配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

次に、ペントンベース・RGD配列改変35型Adベクターの細胞内取り込み量をReal-time PCRを用いて測定した。RGD配列改変35型Adベクターの細胞内ベクターコ

ピー数は従来の35型Adベクターと比較して、Ad35RGEGFPおよびAd35・RGDGFPともに有意な差は認められなかった (Fig. 10)。さらにCD34陽性細胞の細胞表面への結合量に関しても差は見られなかった (Fig. 11)。以上の結果から、ペントンベース・RGD配列改変による遺伝子発現量の低下は、35型Adベクターの細胞表面接着や細胞内取り込み過程ではなく、それ以降の細胞内輸送が妨げられたことに起因していることが示唆された。

さらに35型AdベクターによるCD34陽性細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて35型Adベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、抗 $\alpha v \beta 3$ インテグリン抗体存在下でコントロールIgG作用群と比較して59%まで遺伝子導入効率が低下した (Fig. 12)。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、35型Adベクターによるヒト骨髄由来CD34陽性細胞への遺伝子導入に $\alpha v \beta 3$ インテグリンが関与していることが示された。

次に、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞に抗アポトーシス遺伝子であるBcl-xLおよびその活性増強変異体であるBcl-FNK発現35型Adベクター (Ad35-BclxL、Ad35-BclFNK) を作用させ、その発現をWestern Blotにて検討したところ、Ad35-BclxLおよびAd35-BclFNKを作用させた細胞ではその発現が認められた (Fig. 13)。一方、何もベクターを作用させていない細胞およびGFP発現35型Adベクター (Ad35-GFP) を作用させた細胞ではBcl-xLの発現は見られなかった。

次に、Bcl-xL および Bcl-FNK の発現が CD34 陽性細胞の増殖に与える影響について検討した。遺伝子導入後、経時的に細胞数を計測したところ、どの群においても著差なく細胞が増殖することが示された (Fig. 14)。しかしながら、Ad35-BclxL および Ad35-BclFNK を作用させた群においては、mock ならびに Ad35-GFP 作用群と比較すると若干増殖速度が遅かった。

さらに Bcl-xL および Bcl-FNK の発現により細胞が抗アポトーシス能を獲得するかどうか検討するため、トポソイメラーゼ I 阻害剤である Camptotecin 存在下において培養した。その結果、Camptotecin 10 μ M 存在下において Mock ならびに Ad35-GFP 作用群においてはそれぞれ 57%、75% の生存率であったのに対し、Ad35-BclFNK 作用群では 88% の生存率を示した (Fig. 15)。従って CD34 陽性細胞に対し Bcl-FNK を発現させることにより、抗アポトーシス能を獲得することが示された。

次に Bcl-xL および Bcl-FNK の発現が細胞の分化・増殖に与える影響について明らかにするため、コロニーアッセイを用いて遺伝子導入細胞のコロニー形成能について検討した。その結果、遺伝子導入 2 日後の細胞ではどの群においても同程度のコロニー形成が観察されたが、遺伝子導入 8 日後の細胞をコロニーアッセイにかけたところ、Ad35-BclFNK 作用群においては他群と比較し、有意に高いコロニー形成能を示した (Fig. 16)。一方で、Ad35-BclxL 作用群においては有意な差は認められなかった。以上の結果より、Bcl-xL の活性増強体である Bcl-FNK を強制発現させることにより、CD34 陽性細胞の分化能・増殖能が一定期間液体

培養後も維持されることが示唆された。

そこで、Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を、放射線照射した NOG マウスに移植し正着するかどうか検討した。移植 20 週後に末梢血、骨髄、胸腺、脾臓に含まれるヒト由来の血液細胞を解析したところ、末梢血、胸腺、脾臓においてはヒト由来の細胞は検出されなかったものの、骨髄では少ないながらも (1% 以下) ヒト CD45 陽性細胞が検出され、CD34 陽性細胞が正着していることが示唆された (Fig. 17)。さらに各種抗体を用いて解析したところ、CD19/CD10 陽性細胞および CD33 陽性細胞が検出されたことから (Fig. 17)、B 細胞および Myeloid 細胞に分化していることが示唆された。なお、T 細胞 (CD3 陽性細胞) および造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) は検出されなかった。

D. 健康危険情報

該当事項なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1. Murakami S., Sakurai F., Kawabata K., Okada N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mizuguchi H. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Ther.* 14; 1525-33 (2007).

2. Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Adenovirus vectors composed of subgroup

B adenoviruses. *Curr. Gene Ther.*, 7; 229-38 (2007).

3. Sakurai F., Akitomo K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. *Gene Ther.* 14; 912-9 (2007).

4. 水口裕之; アデノウイルスベクター開発の最前線、*バイオテクノロジージャーナル*, 7(2)、168-173 (2007)

5. 川端健二・櫻井文教・水口裕之; 改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー、*Drug Delivery System*, 22(2)、148-154 (2007)

6. 櫻井文教; ウイルスベクター、*Drug Delivery System*, 22(2)、154 (2007)

7. 水口裕之、櫻井文教、川端健二; カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター、*遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノDDS*, 235-242 (2007)

8. Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Crucial role of the short consensus repeats 1 and 2 of human CD46 on infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J. Control. Release.*, 113; 271-278 (2006)

9. Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene*

Ther., 13; 1118-1126 (2006)

10. Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Characterization of adenovirus serotype 35 vectors using genetically modified animals and nonhuman primates. *Yakugaku Zasshi*. 126, 1013-1019 (2006)

11. 櫻井文教・水口裕之; 新しいアデノウイルスベクターの開発、*バイオサイエンスとインダストリー*, 64(5)、11-16 (2006)

2. 学会発表

1. 櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、早川堯夫、水口裕之 The crucial role of penton base RGD motifs in adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. 第66回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007年10月3-5日

2. 櫻井文教、村上さや香、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之 35型アデノウイルスベクター感染におけるインテグリンの関与 第7回遺伝子・デリバリー研究会 (東京) 2007年5月17日

3. 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之; 35型アデノウイルスベクター遺伝子導入機構の解明—インテグリンの関与に関する検討—; 第2回創剤フォーラム若手発表討論会 (京都); 2006年10月13-14日

4. Fuminori Sakurai, Kimiyo Akitomo, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi; DOWNREGULATION OF CD46 BY ADENOVIRUS SEROTYPE 35

VECTORS; 第12回日本遺伝子治療学会
(東京) ; 2006年8月24-26日

5. Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus Serotype 35 Vector-mediated Gene Transfer into Human and Mouse Hematopoietic Progenitors; The first FIP-APSTJ joint workshop on gene delivery (Sapporo) ; 2006年7月10-12日

6. 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、早川堯夫、水口裕之 ; 35型アデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入における $\beta 1$ インテグリンの関与に関する検討 ; 第21回日本DDS学会(東京) ; 2006年7月7-8日

7. Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction in mouse hematopoietic stem cells isolated from human CD46-transgenic mice; 9th Annal Meeting of American Society of Gene Therapy ; 2006年6月 (Bartimore, USA)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

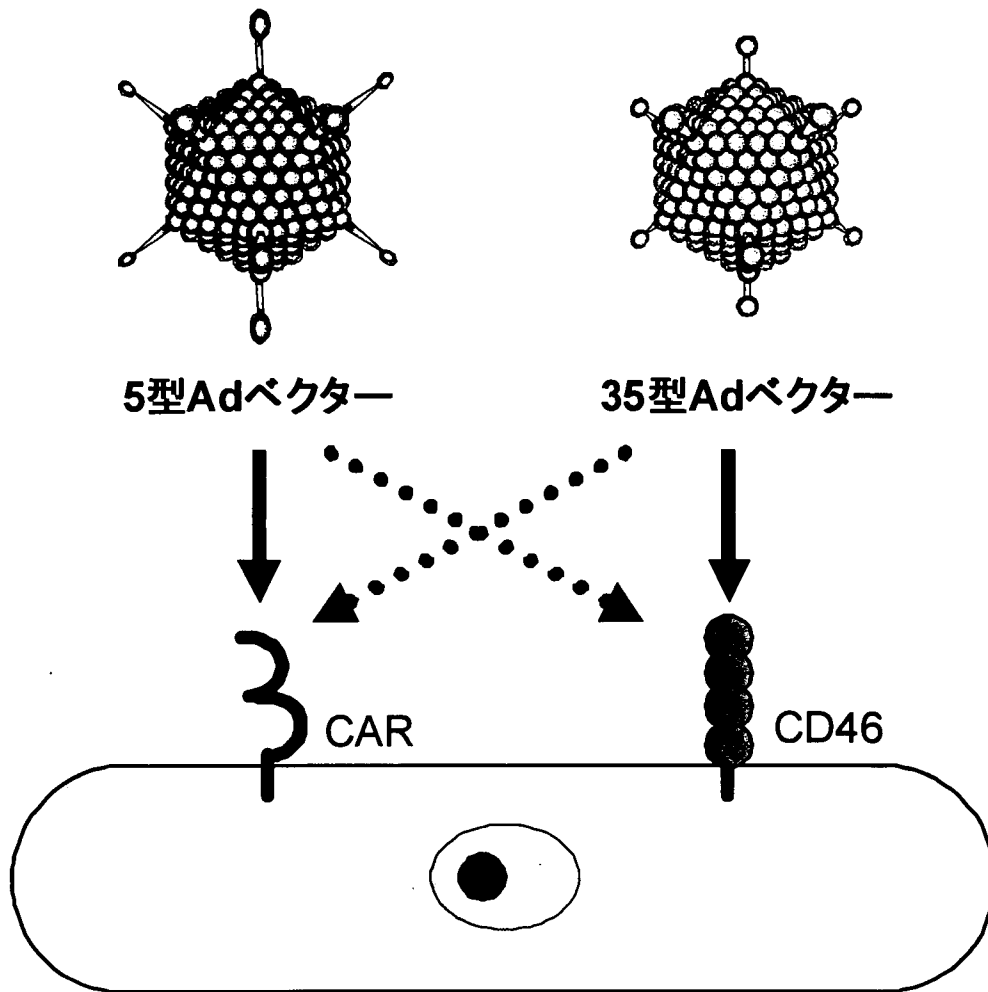
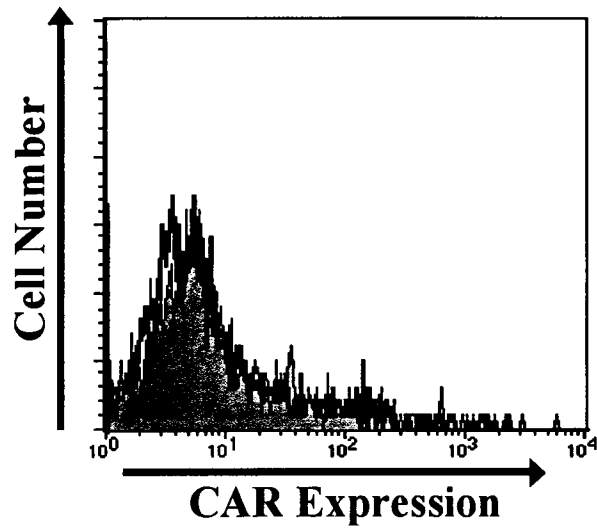


Fig.1 Diagram of interaction between Ad vectors and receptors. Ad serotype 5 vectors (subgroup C) recognize coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR), in contrast, Ad serotype 35 vectors (subgroup B) utilized human CD46 for infection.

(A)



(B)

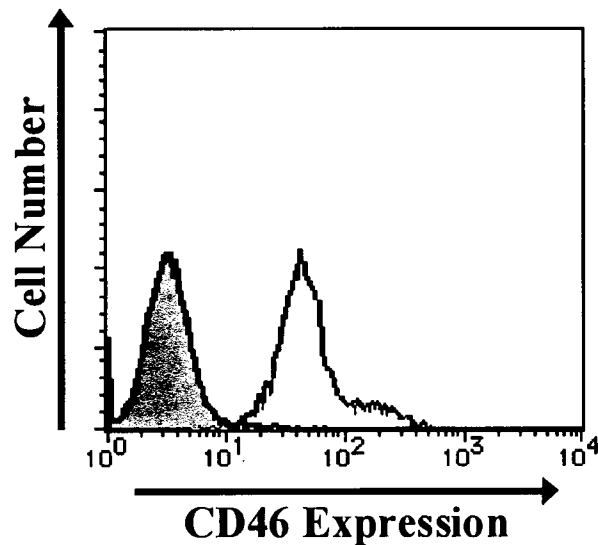


Fig. 2 Expression of Ad receptors on human bone-marrow $CD34^+$ cells. (A) coxsachievirus and adenovirus receptor (CAR) (a receptor for Ad5), (B) CD46 (a receptor for Ad35). The cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD46 antibody for measurement of CD46. For analysis of CAR expression, the cells were treated anti-CAR antibody. After a 1-hr incubation, cells were washed and resuspended in a staining buffer containing phycoerythrin (PE)-labeled anti-mouse IgG antibody. After a 1-hr incubation, the cells were subjected to flowcytomteric analysis. As a negative control, the cells were incubated with an irrelevant antibody (shaded histogram).

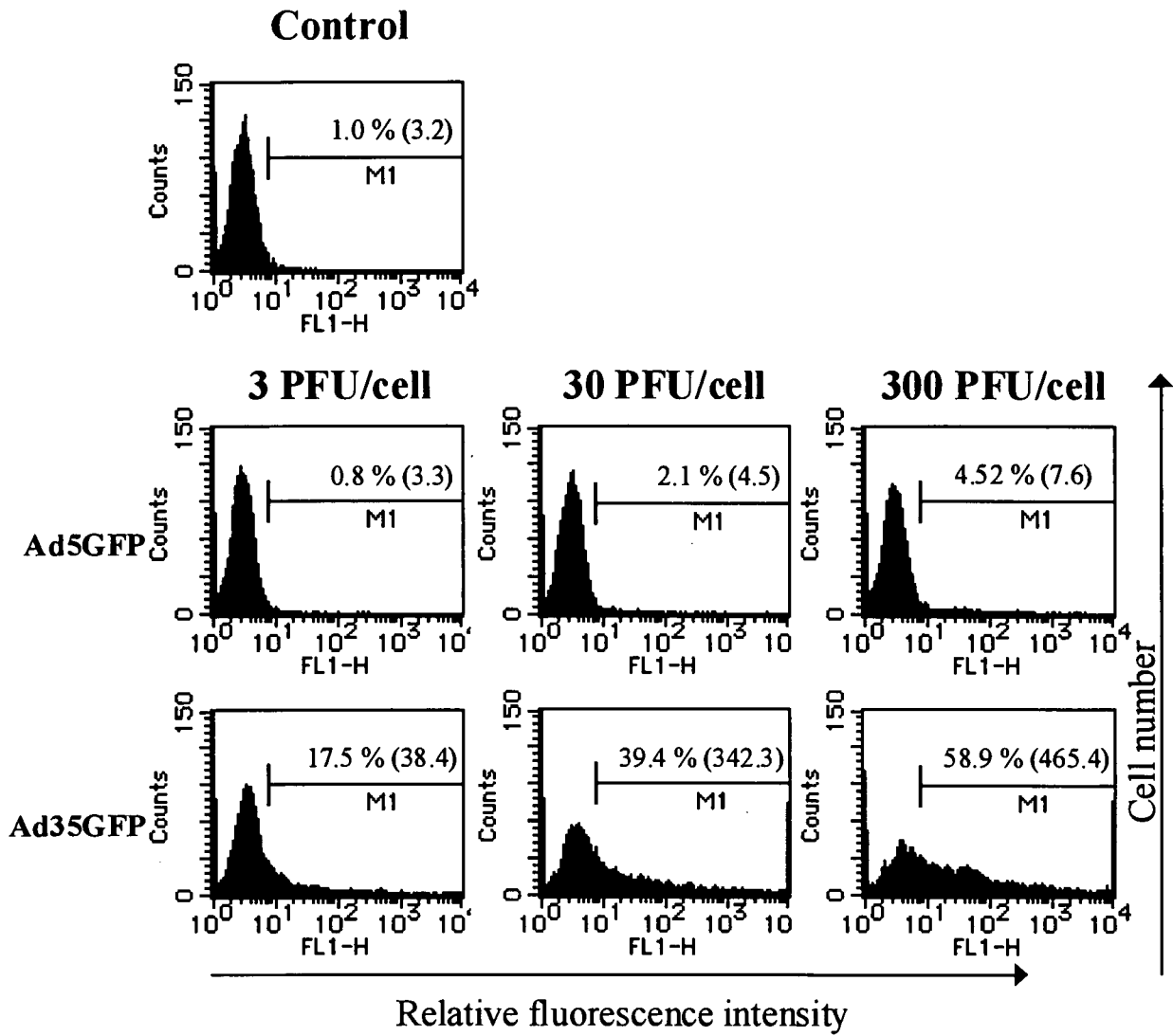


Fig. 3 GFP expression in human CD34⁺ cells transduced with Ad5GFP and Ad35GFP. Human CD34⁺ cells were suspended in the medium containing the cytokine cocktail (3×10^5 cells/ml). The cells were seeded into a 96-well plate (1×10^4 cells/well), and equal volumes of the Ad vectors were applied to the cells 16-18 hrs after seeding. Forty-eight hour later, GFP expression in the cells were measured by flow cytometry.

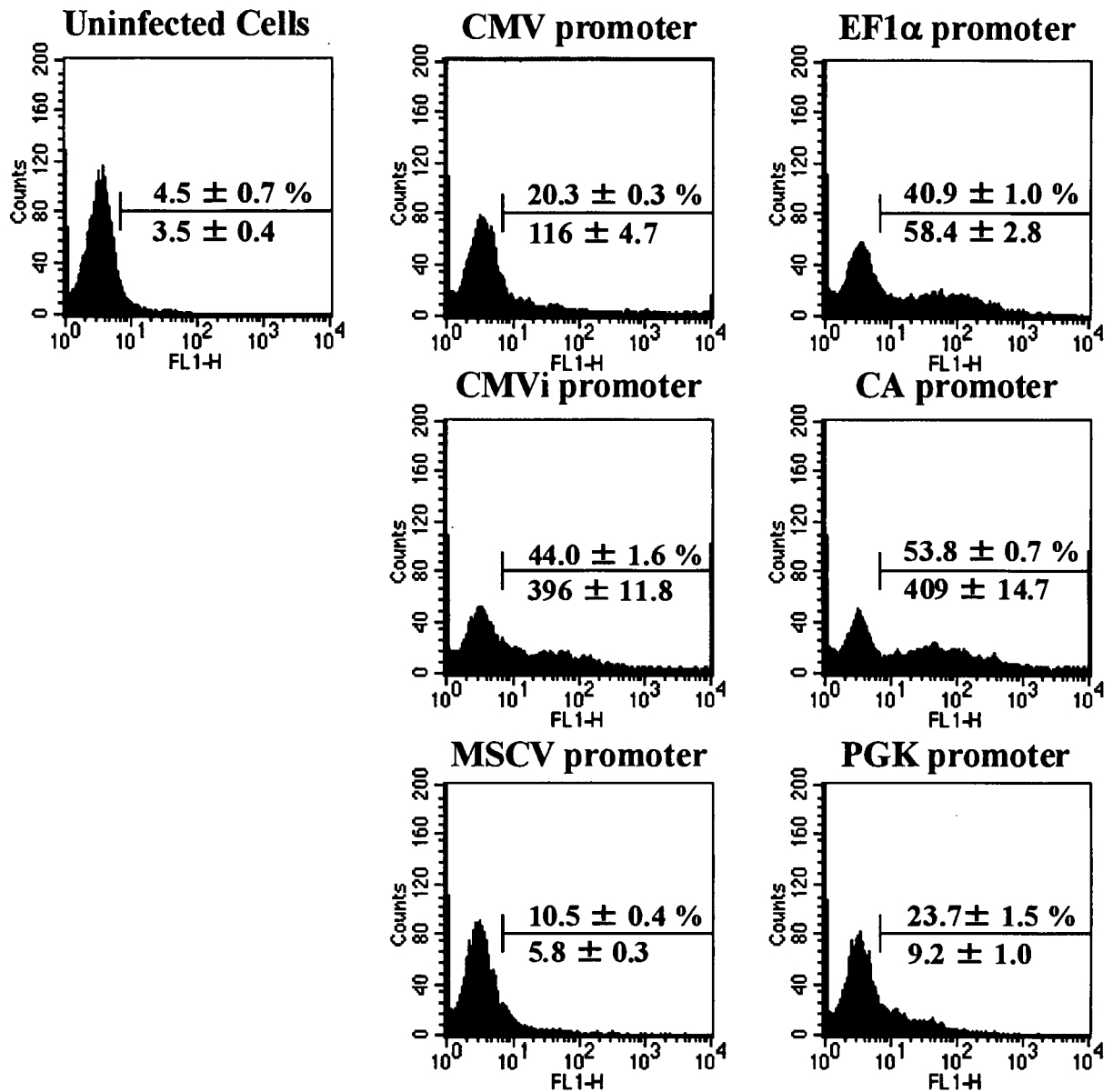


Fig. 4 Comparison of promoter activities in human bone marrow CD34⁺ cells transduced with Ad35 vectors. The results are shown as a percentage of GFP-positive cells (upper) and the mean fluorescence intensity (MFI) (lower) in the panel. The CD34⁺ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hrs, washed, and resuspended in medium. Forty-eight hours later, GFP expression was measured by flow cytometry. All data represent the means \pm S.D. of three experiments.

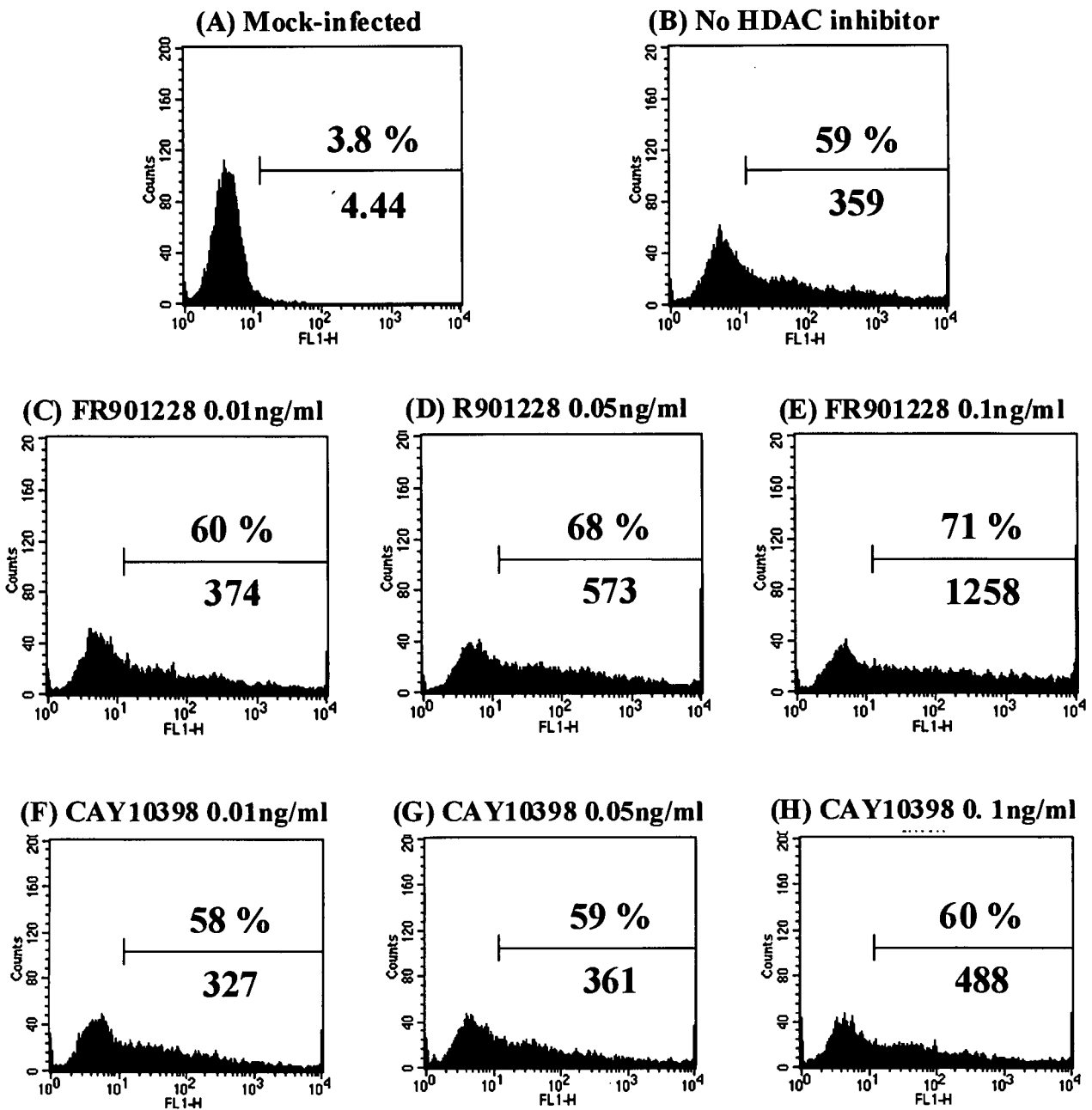
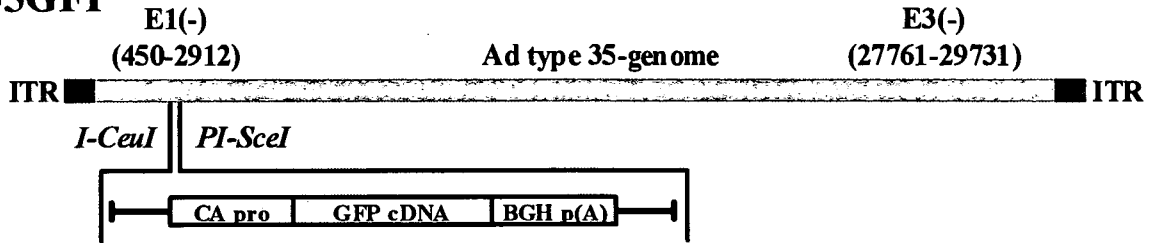
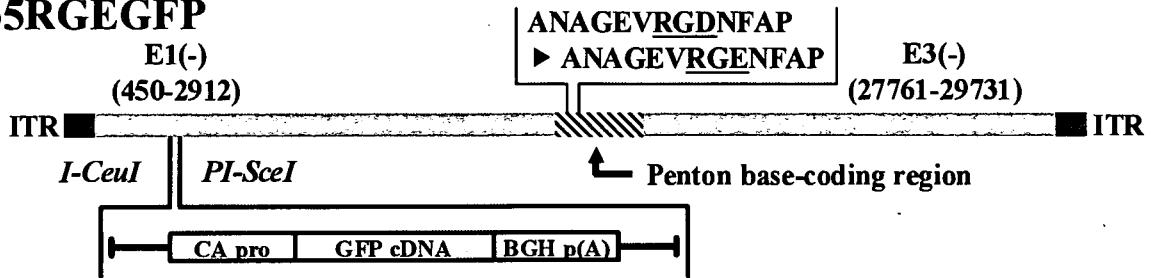


Fig. 5 Effect of treatment with HDAC inhibitors on the transduction of human bone-marrow CD34⁺ cells. The results are shown as a percentage of GFP-positive cells (upper) and the mean fluorescence intensity (MFI) (lower) in the panel. The CD34⁺ cells were incubated with HDAC inhibitors at the indicated concentrations and Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hrs, washed, and resuspended in medium. Forty-eight hours later, GFP expression was measured by flow cytometry.

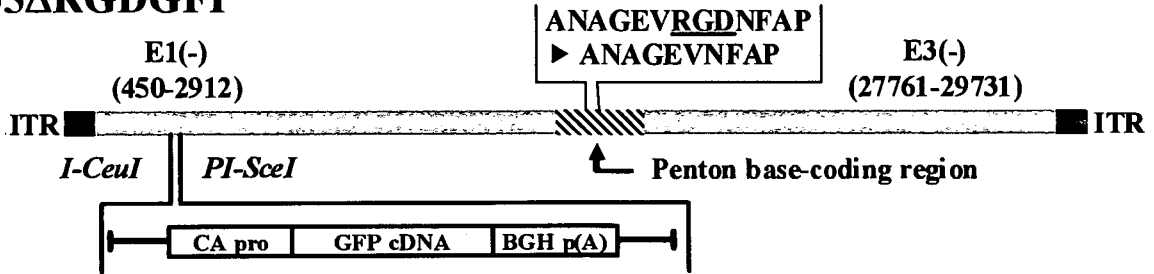
Ad35GFP



Ad35RGEGFP



Ad35ΔRGDGFP



CA promotor; β -actin promoter/CMV enhancer

Fig. 6 Schematic representation of adenovirus used in this study

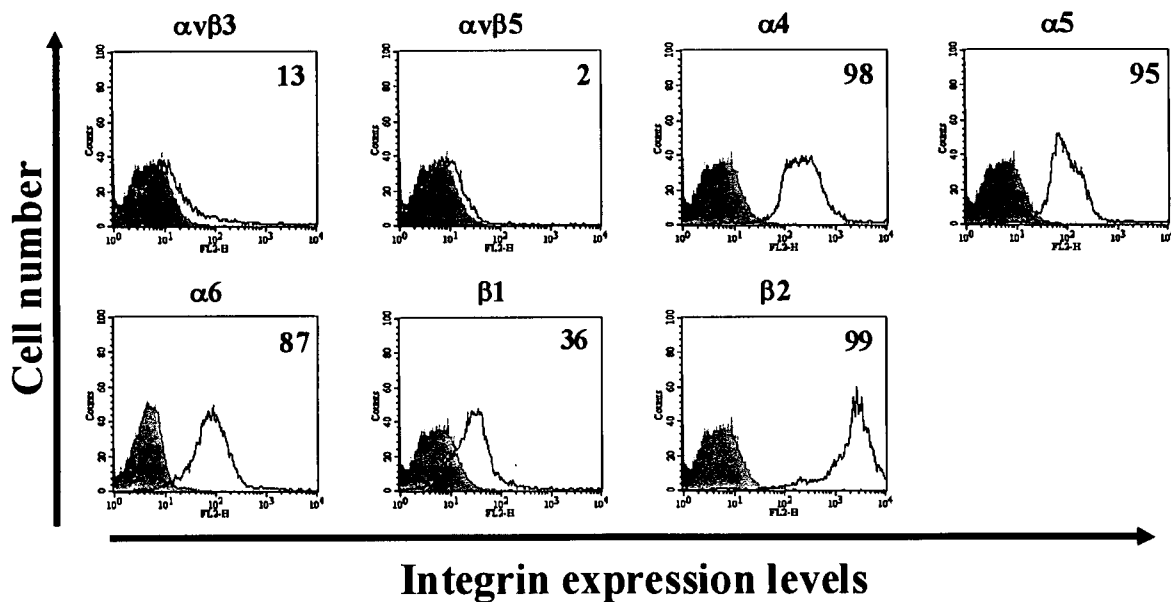


Fig. 7 Flow cytometric profiles of integrin expression on human bone marrow-derived CD34⁺ cells. The cells were stained with anti-integrin antibodies, followed by a PE-labeled secondary antibody, and subsequently analyzed by a flow cytometer (thick line). As a negative control, the cells were incubated with isotype control antibody (shaded histogram). Percentage of positive cells is shown by number in upper right-hand corner of each profile.

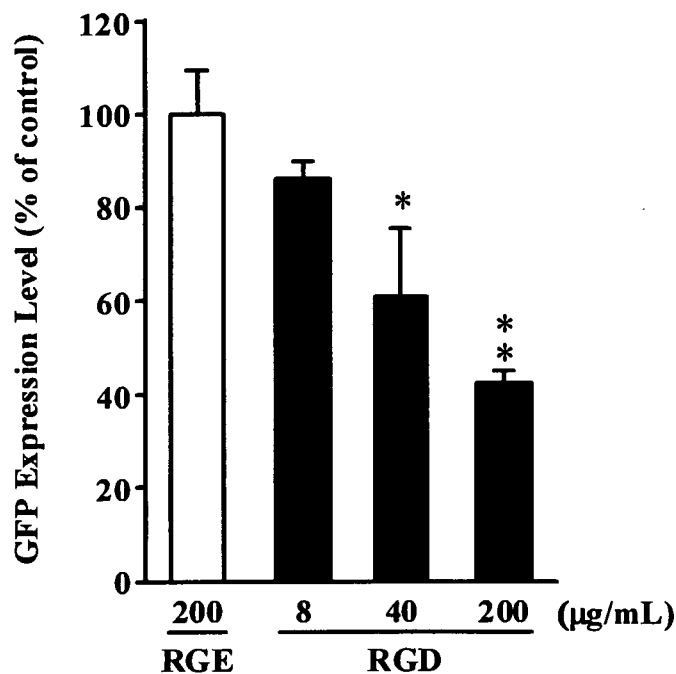


Fig. 8 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by RGD synthetic peptides. Human CD34⁺ cells were incubated with RGD synthetic peptides at the indicated concentrations at 4 °C for 1 h prior to the addition of Ad35GFP, and then left for 3 h at 37 °C. Samples were then washed, resuspended in a fresh medium, and incubated at 37 °C. GFP expression levels were measured 48 h after transduction by flow cytometry. The data were normalized to the GFP expression levels (MFI) in human CD34⁺ cells in the presence of control RGE peptides. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=3) *P < 0.05, **P < 0.001 for comparison with the cells pretreated with control RGE peptides.