

200727005

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発

平成18年度・19年度 総合 研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発……………	1
押村 光雄	
II. 分担研究報告書	
1. Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターの構築とその機能評価……………	4
押村 光雄、香月 康宏、井上 敏昭、加藤 基伸、武谷 浩之	
2. 染色体ベクターレシピエント細胞としての間葉系幹細胞利用の安全性の検討…	7
落谷 孝広	
3. クラニアルウインドウ法を用いた人工染色体保持細胞の安全性確認……………	11
谷口 英樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	15

ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

HAC は細胞中で単一コピーの自律的な極小染色体として振る舞うベクターであり、染色体であるが故遺伝子導入サイズに制限がなく、ホストゲノムを破壊せず、Cre-LoxP 反応を利用しカセット方式で巨大遺伝子を容易に搭載できる。またベクターと名のつくとおりにあらゆる細胞に移入可能である。このような HAC ベクターの利点を生かし、持続的改善と患者の経済的・肉体的負担の大幅軽減をもたらす血友病治療法をマウスで検証する。それは Factor VIII 発現ユニット多コピーを HAC に搭載し、自己間葉系幹細胞及び皮膚線維芽細胞に導入、皮下移植するという最少数自己移植細胞による補充療法である。具体的には Factor VIII の cDNA を多数タンデムに HAC ベクター上に搭載し、ヒト間葉系幹細胞に導入し高効率発現システムを構築する。まずモデル系としてこれをマウス皮下に移植し、発現を定量化し、最少数の移植細胞による長期補充療法を検証する。さらにクラニアルウインドウ法にてリアルタイムで細胞生着のプロセス、細胞動態、Factor VIII の分泌動態を長期にわたり解析し、安全性・機能性を評価する。遺伝子導入した幹細胞を臓器に定着させる上での問題は、前処置として健常組織を切除・除去する必要があることである。我々が提案する方法は自己細胞（間葉系幹細胞）皮下移植であり、高効率発現系であるため、最少数の細胞を移植するだけで十分かつ持続的な補充効果が期待でき、健常組織を傷つけることを回避できる。我々の提案は患者にとって極めて非侵襲的かつ安全であり、経済的・肉体的負担を大幅に軽減できる新しい遺伝子治療法の確立を目指したモデル系である。

研究組織

主任研究者

押村 光雄 鳥取大学大学院 医学系研究科
機能再生医科学専攻 生体機能医工学
講座 遺伝子機能工学部門 教授

分担研究者

谷口 英樹 横浜市立大学大学院 医学研究科 教授
落谷 孝広 国立がんセンター研究所 がん転移研究
室 室長
香月 康宏 鳥取大学大学院 医学系研究科 機能再
生医科学専攻 生体機能医工学講座
遺伝子機能工学部門 助教
井上 敏昭 鳥取大学 医学部 生命科学科 分子細胞
生物学講座 ゲノム医工学分野 准教授
加藤 基伸 鳥取大学 医学部 生命科学科 分子細胞
生物学講座 ゲノム医工学分野 助教
武谷 浩之 鳥取大学 医学部 生命科学科 生体情報
機能学講座 病態生化学分野 准教授

A. 研究目的

血友病では組換え製剤の長期投与による苦痛や経済的負担の軽減のために遺伝子治療の有用性が指摘されてきた。そのためにウイルスベクターが Factor VIII, IX 遺伝子の導入に用いられてきたが、これらの因子は遺伝子サイズが大きく、全長 cDNA の搭載が困難であること、ホストゲノムへの挿入が避けられずがん化の懸念が払拭できないこと、投与の繰り返しによる中和抗体出現の問題があった。本研究では遺伝子導入サイズに上限がなく、ホストゲノムを破壊せず（がん化の懸念がない）安定に長期間保持される HAC ベクターの利点を生かし、Factor VIII の発現ユニットを多数搭載した HAC を構築し、安定で安全な高効率発現系を作ること、従来ベクターが抱える問題を克服する。遺伝子導入する細胞として、従来は自己血液幹細胞や肝幹細胞が主に用いられてきた。これらは万一副作用が発生した際に簡単には除去できないという欠点がある。一番大きな問題として導入幹細胞を生着させるためには、前処置として患者の健常細胞／組織を除去、切除することが必要となる。本研究では調製が容易な間葉系幹細胞に構築した HAC を導入し、さらにこれを皮下移植し定着させることで健常組織を損なうことを回避する。さらに HAC を使うことで細胞当たりの産生の飛躍的向上が実現でき、ごく少数の移植細胞

で因子を補充できること、不要の際には外科的に除去することができることも利点として挙げられる。本研究が目指す「HAC を搭載した極少数の自己細胞の移植による補充療法」は、肉体的にも経済的にも患者への負担が少ない治療法の確立という社会的要請にも十分応えることができるものと考えられる。

B. 研究方法

1. Factor VIII を高発現する機能性 HAC の構築と発現解析と長期間培養による発現安定性 (押村、加藤、井上、香月、武谷)

Factor VIII 発現ユニットを効率よく産生できるようにタンデムに 1, 2, 4, 8, 16 コピーつないだ HAC を構築する。プロモーターとしては間葉系幹細胞と肝細胞とで実績のある CAG プロモーターを用い、それぞれのユニットの発現を確保するためユニット間にインスレーター配列を置く。これらを CHO 細胞で構築し Factor VIII を安定に産生できるかどうかを選択薬剤不含培地で長期培養後、細胞培地上清を用いて発現レベルを調べる。

2. モデルマウスへ移植と発現の確認、治療効果の確認を行う (香月、武谷)

移植した細胞数と発現量の関連を明らかにし、目標値として設定している正常値の 2-4% (日常生活で出血のリスクを激減できるとされる値) を産生するために必要な条件を明らかにする。

3. 機能性 HAC のヒト間葉系幹細胞及び Factor VIII 欠損マウス由来 ntES 細胞への移入 (落谷、谷口、香月、武谷)

CHO 細胞から微小核融合法でヒト間葉系幹細胞と Factor VIII 欠損モデルマウス由来 ntES 細胞に構築 HAC を移入し HAC 保持細胞を取得する。FISH 解析で HAC が一コピーの独立した極小染色体として保持されていることを確認する。培養上清をもちいて、Factor VIII が発現されていること確認する。同じ目的で *in vitro* での継代数、凍結保存日数を変えたものも使い、移植細胞としての HAC 導入細胞の品質管理法の検討を行う。間葉系幹細胞と ntES 細胞についてはその *in vitro* での分化能、各種マーカーの発現を HAC 導入、非導入細胞で比較する。

4. クラニアルウインドウ (透明窓) 法での安全性評価実験 (谷口)

移植した細胞の動態をリアルタイムで長期観察し、定着プロセス (がん化しないことも含む)、血管組織の再構築能を評価する。

5. 肝細胞分化した間葉系幹細胞の Tumorigenicity アッセイ (落谷)

間葉系幹細胞の *in vitro* 肝細胞分化誘導後についての安全性を核型解析、軟寒天培地中でのコロニー形成能及びヌードマウスへの移植後造腫瘍性を

確認することで検証する。

6. ガンシクロビル投与による HAC 導入細胞排除の確認 (谷口、落谷)

HAC には自殺遺伝子 HSV-TK を搭載しており、万一排除する必要が生じた際にはガンシクロビル投与で選択的に死滅させられることを確認する。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目指とする。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト間葉系幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はそれぞれ CAMBREX 社、KURABO 社から研究用として販売されているものを購入、利用する。既に広く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片をマウス細胞に導入するものであり、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組換え DNA 実験 (P2 レベル) の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

Factor VIII cDNA を 1, 2, 4, 8, 16 コピー搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行った。染色体解析の結果、これら HAC は独立したミニ染色体として安定に保持されていた。これらの細胞クローンでは Factor VIII のコピー数依存的な発現、そしてクローンに寄らない均一な発現を確認でき、Factor VIII を安定に産生できるかどうかを選択薬剤不含培地で長期培養後も安定に発現していることがわかった。これらの細胞を血友病モデルマウスへ移植すると尻尾切断後の出血死を免れたことから 4 コピーの Factor VIII 保持細胞で十分治療効果を発揮することがわかった。またこれらの細胞から間葉系幹細胞及び ntES 細胞へ微小核融合法で HAC 移入したクローンにおいてはそれぞれ Factor VIII の発現が確認された。ntES 細胞を内胚葉系に分化誘導させると Factor VIII 発現レベルは上昇した。安全性評価のための系であるクラニアルウインドウ (透明窓) 法については、平成 18 年度はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とマウス間葉系前駆細胞株 (C3H10T1/2) を使い、コラーゲンゲル中で共培養した後、NOD/scid マウス頭部のクラニアルウインドウへ移植することにより、レシピエント側血流を伴った血管ネットワーク構造の再構成が可能であることを確認した。平成 19 年度はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト間葉系幹細胞 (hMSC)

を用いて同様に血管ネットワーク構造の再構成血管を確認した。

腫瘍性に関しては平成 18 年度に未分化な hMSC では造腫瘍性はないことを確認し、平成 19 年度は hMSC の肝細胞分化誘導後の安全性を調べたところ、核型はきわめて正常であり、コロニー形成能は認められず、皮下移植モデルでの造腫瘍性も確認されなかったことから、hMSC は本研究の目的に適した細胞であることがわかった。万が一に備え、細胞の排除ができるよう自殺遺伝子 HSV-TK および GFP 蛍光タンパク発現ユニットを搭載した HAC、及びこれらを導入した間葉系幹細胞を取得した。実際には自殺遺伝子を搭載した HAC を保持するガン細胞をガンシクロビルにより抑制することができた。クラニアルウインドウ法の確立と相まって実際の移植細胞である HAC 搭載間葉系幹細胞のクラニアルウインドウでの追跡、ガンシクロビルにより細胞排除の追跡が可能になった。

D. 考察

多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定した発現を保障するという HAC の特性が十分に生かされたと言え、予想通りの結果が得られていると言える。血友病の新規治療法としての HAC の将来的な利用に目処がついたと言える。

E. 結論

HAC を用いる血友病の新遺伝子治療法の開発は概ね予定通り進んだと言える。Factor VIII 搭載 HAC のミニ染色体としての挙動、長期間安定で均一な発現、コピー数依存的な発現が確認できた。またクラニアルウインドウ法についても技術開発は順調に進んだといえる。

今後も本研究でめざした新規血友病治療法を完成させ、HAC を用いた遺伝子治療において我が国が世界的リーダーとなるよう長期的な展望に立ち研究を進めたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Kazuki Y, Hoshiya H, Kai Y, Abe S, Takiguchi M, Osaki M, Kawazoe S, Katoh M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Kajitani N, Yoshino T, Shirayoshi Y, Ogura A, Shinohara T, Barrett JC, Oshimura M. : Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a

human artificial chromosome. *Gene Ther.* 15(8) 617-24 2008

Oshimura M, Katoh M. : Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells. *Reprod Biomed Online.* : 16(1) 57-69 2008

Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):43-50.

黒崎 創、押村光雄 : 「遺伝子・再生医療をめざしたヒト人工染色体」 *医学のあゆみ* 219, 227-8 (2006)。

任 鮮英、押村光雄 : 「遺伝子導入のためのヒト人工染色体ベクター」 *分子細胞医療* 5, 39-46 (2006)。

平塚正治、押村光雄 : 「遺伝子・再生医療のためのヒト人工染色体 (HAC) ベクター」 *再生医療* 5, 528-33 (2006)。

2. 学会発表：

血友病 A 型遺伝子治療を目指したヒト第 FVIII 因子発現 HAC ベクターの有用性の検討、黒崎創、平塚正治、香月康宏、今岡奈津子、石原千恵、武谷浩之、井上敏昭、押村光雄 第 7 回日本再生医療学会総会 (2008.03.13-14.名古屋)

Mitsuo Oshimura, Yasuhiro Kazuki, Motonobu Katoh, Masaharu Hiratsuka, Hiroyuki Kugoh, Toshiaki Inoue, Akihiro Kurimasa Chromosome engineering for gene function and gene delivery (2nd Congress of the International Cytogenetics and Genome Society, UK Canterbury 25th-29th June 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得

<申請中>

特願 2006-127372 : 内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター

[出願人] : 国立大学法人鳥取大学、有限会社 chromocenter

[発明者] : 押村 光雄、香月 康宏、松岡 隆之

[出願日] 2006 年 5 月 1 日

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターの構築とその機能評価

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

1-16 コピーの Factor VIII cDNA を搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行った。染色体解析の結果、これら HAC は独立したミニ染色体として安定に保持されていた。これらの細胞クローンでは Factor VIII のコピー数依存的な発現、そしてクローンに寄らない均一な発現を確認できた。これらのマルチコピー搭載 CHO 細胞は微小核融合法で HAC ベクターを移入するためのドナーとして利用でき、Factor VIII を発現する間葉系幹細胞、Factor VIII 欠損モデルマウス由来 ntES 細胞を取得できた。

分担研究者

香月 康宏	鳥取大学大学院	医学系研究科	機能再生医科学専攻	生体機能医工学講座	遺伝子機能工学部門 助教
井上 敏昭	鳥取大学	医学部	生命科学科	分子細胞生物学講座	ゲノム医工学分野 准教授
加藤 基伸	鳥取大学	医学部	生命科学科	分子細胞生物学講座	ゲノム医工学分野 助教
武谷 浩之	鳥取大学	医学部	生命科学科	生体情報機能学講座	病態生化学分野 准教授

A. 研究目的

Factor VIII に着目した血友病遺伝子治療は、すでに臨床実験が行われているが、残念ながら十分な成果を上げているとはいえない。例えば患者由来の線維芽細胞にプラスミドで Factor VIII を導入した場合、発現が一過性で消失する。レトロウイルスを静脈内投与する方法も行われつつあるが、リスクが伴う。非病原性レンチウイルスを用いた場合、クーパー細胞でのベクターの食食をいかに防ぐかが問題となっている。そもそもウイルスベクターでは搭載遺伝子サイズの問題があるため、ミニジーンが用いられている。

HAC を用いることで、安全性の問題が克服できるだけでなく、導入サイズに制限がないことは大きな利点となる。タンデムに多コピーつなぐことによる Factor VIII の高効率産生系の確立も HAC を用いてはじめて可能になる。すでに我々はインスレーター配列の利用により、プロモーターの活性を長期にわたって安定に維持できること、実際に発現ユニットのコピー数に応じて発現量が変化することを確認しており、本研究で目指す Factor VIII の高発現については、実現の可能性が非常に高い。平成 18 年度は Factor VIII cDNA を 1-4 コピー搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行い、平成 19 年度ではこのような Factor VIII 遺伝子をさらに多コピー化した血友病治療用人工染色体ベクターの構築を目指した。また得られた 4 コピー搭載 HAC ベクター

の有用性を、その Factor VIII 発現機能評価、とくにモデル動物移植での発現レベルについて調べることにより評価した。

B. 研究方法

HAC への Factor VIII 搭載について 1 から 16 コピーを CHO 細胞内で構築し、機能評価のため発現レベルを RT-PCR と培養上清を用いた ELISA 及び Clotting assay で検討した。さらに Factor VIII 発現 CHO 細胞を A 型血友病モデルマウスに移植後、Factor VIII の発現確認を Tail Clipping assay により調べた。細胞内で独立した染色体としてまた安定に保持される HAC ベクターではあるが、この CHO 細胞から産生される Factor VIII についても発現効果は安定であるかを調べた。

この CHO 細胞をドナーとした微小核融合法により Factor VIII cDNA を 4 コピー搭載した人工染色体を不死化した間葉系幹細胞へ導入した。Factor VIII 欠損モデルマウス由来線維芽細胞から ntES 細胞を作製し、これに Factor VIII 搭載 HAC ベクターを移入しクローンを取得した。クローンについては Factor VIII 発現確認と分化誘導確認を行った。

HAC に搭載するための PAC でのコンストラクションとさらにその元となるプラスミドレベルでのコンストラクションはそれぞれ井上と加藤が進めた。PAC から HAC への搭載と CHO からの微小核細胞融合法、マウスへの細胞移植は香月が行い、ntES の未分化評価と分化誘導は落谷との共同実験で行い、Factor VIII 発現定量は武谷が行った。染色体解析は

押村が直接行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目標とする。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト間葉系幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はそれぞれ CAMBREX 社、KURABO 社から研究用として販売されているものを購入、利用する。既に広く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片をマウス細胞に導入するものであり、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組換え DNA 実験 (P2 レベル) の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

Factor VIII 発現ユニットを効率よく産生できるようにタンデムに 1、2、4、8 及び 16 コピーつないだ HAC をそれぞれ CHO 細胞で構築した。取得したクローンではコピー数依存的な発現、そしてクローン間の違いに寄らない均一なレベルでの発現が確認できた。

空 HAC ベクターを保持する CHO 細胞移植後コントロールとしたとき Factor VIII を搭載した HAC ベクターを保持する CHO 細胞移植後はマウスでの尾切断後の出血死を免れたことから本研究で目指すストラテジーが有効であることを示すことができた。

またこの中から発現量が高いクローンを選び、Factor VIII を安定に産生できるかどうかを選択薬剤不含培地で長期培養後、細胞培地上清を用いて発現レベルを調べた。約 3 ヶ月間培養後のものでも選択薬剤を含んでいるか否かに関わらず、初期培養細胞に比べ全く劣らず Factor VIII を産生していることがわかった。さらにこれらの細胞はコルセミド処理により微小核を良く形成することから、構築した人工染色体ベクターを繊維芽細胞や間葉系幹細胞に導入するためのよいドナー細胞となることが分かった。

Factor VIII-HAC 保持 CHO クローンをドナーとして間葉系幹細胞へ Factor VIII 搭載 HAC を導入したところ、Factor VIII 機能性発現は CHO 細胞よりは劣るものの間葉系幹細胞でも確認することができた。Factor VIII-HAC を導入した ntES クローンについて、アルカリホスファターゼ染色と胚様体形成確認により、またクローンをヌードマウス及び Factor VIII-/-マウスへの皮下移植後テラトーマが形成されたことから、得られたクローンは未分化状態を保っていることがわかった。内胚葉系分化誘導

後、RT-PCR の結果からマーカーである HNF3b 遺伝子の発現が確認できた。また内胚葉分化の経過(時間)に依存して Factor VIII の発現が上昇している事がわかった。

D. 考察

モデルマウスへの移植結果から Factor VIII 発現 CHO 細胞は 4 copy を搭載するだけでもレスキューするには十分効果を発揮することがわかった。間葉系幹細胞及びモデルマウス由来 ntES においても多コピーの発現ユニットが搭載できた。このように Factor VIII 発現ユニット多コピーを HAC ベクターに搭載し幹細胞に導入、皮下移植するといった最小数自己移植細胞による補充療法の可能性が考えられ、これらの未分化細胞を肝臓へ分化、あるいは血小板を含む血液系へ分化誘導させたときに Factor VIII がどの程度発現するか、最低限必要なコピー数を知る上でも重要であると考えられる。

Factor VIII 発現 HAC ベクター保持細胞の長期培養により今回検討した CHO 細胞中で安定に HAC ベクターは維持され、薬剤フリーの条件でも発現が衰えないということは製剤としても有望な細胞であるといえる。Factor VIII 血液製剤に代わる遺伝子組換え VIII 因子製剤は、その特許を米国 BAXTER 社が保有しているが、高効率発現が可能で、細胞内で長期間 安定に維持される HAC ベクターを用いれば、日本独自の高品質・安全な VIII 因子製剤の特許化・実用化が期待できる。

E. 結論

本研究では期待通り多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定した発現を保障するという HAC の特性が十分に生かされたと言え、血友病の新規治療法としての HAC の将来的な利用に目処がついたと言える。HAC ベクターを用いる血友病の新遺伝子治療法の開発は概ね予定通り進んだと思われる。安定であり、コピー数依存的発現可能な Factor VIII 搭載 HAC ベクターを構築し、間葉系幹細胞への移入や皮下移植、効果と安全性の検証を進められた。

本研究ですすめた新規血友病治療法を今後さらに発展させ HAC ベクターを用いた遺伝子治療において我が国が世界的リーダーとなるよう長期的な展望に立ち研究を進めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Kazuki Y, Hoshiya H, Kai Y, Abe S, Takiguchi M, Osaki M, Kawazoe S, Katoh M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Kajitani N, Yoshino T, Shirayoshi Y, Ogura A,

Shinohara T, Barrett JC, Oshimura M. : Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome. Gene Ther. 15(8) 617-24 2008

Oshimura M, Katoh M.: Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells. Reprod Biomed Online. : 16(1) 57-69 2008

Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. Stem Cell Rev. 2006;2(1):43-50.

黒崎 創、押村光雄 : 「遺伝子・再生医療をめざしたヒト人工染色体」医学のあゆみ 219, 227-8 (2006)。

任 鮮英、押村光雄 : 「遺伝子導入のためのヒト人工染色体ベクター」分子細胞医療 5, 39-46 (2006)。

平塚正治、押村光雄 : 「遺伝子・再生医療のためのヒト人工染色体 (HAC) ベクター」再生医療 5, 528-33 (2006)。

2. 学会発表 :

血友病A型遺伝子治療を目指したヒト第VIII因子発現 HAC ベクターの有用性の検討、黒崎創、平塚正治、香月康宏、今岡奈津子、石原千恵、武谷浩之、井上敏昭、押村光雄 第7回日本再生医療学会総会 (2008.03.13-14.名古屋)

Mitsuo Oshimura, Yasuhiro Kazuki, Motonobu Katoh, Masaharu Hiratsuka, Hiroyuki Kugoh, Toshiaki Inoue, Akihiro Kurimasa Chromosome engineering for gene function and gene delivery (2nd Congress of the International Cytogenetics and Genome Society, UK Canterbury 25th-29th June 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得

<申請中>

特願 2006-127372 : 内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター

[出願人]: 国立大学法人鳥取大学、有限会社 chromocenter

[発明者]: 押村 光雄、香月 康宏、松岡 隆之

[出願日] 2006年5月1日

染色体ベクターレシピエント細胞としての間葉系幹細胞利用の安全性の検討

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

研究要旨

ヒト間葉系幹細胞に、Factor VIII, IX 発現ユニットを搭載する HAC ベクターを組み込み、その細胞の治療応用を図ることを最終目的として、間葉系幹細胞や分化した細胞の安全性を検討してきた。まず、ヒト間葉系幹細胞の培養レベルでの安全性を、継代ごとの染色体の安定性について検討した結果、無血清の特殊培地で培養した場合、継代数 7-8 代までは染色体数は安定に保たれることが判明した。ただし、継代数が増すにつれ、細胞の形態は扁平に変化する傾向が現れ、また倍加速度も低下した。またこれらの未分化の細胞をヌードマウスの皮下に移植した結果、現在のところ腫瘍形成等の変化は認められなかった。次に間葉系幹細胞を *vitro* で分化誘導することで、その細胞の染色体の安定性や軟寒天中での増殖能に変化が無いかどうかを検討した。その結果、35 日間での *in vitro* 肝細胞分化誘導後の染色体数は、97%の細胞が正常であった。また細胞の増殖能は、ほとんど失われており、軟寒天中でのコロニー形成能も無いことから、分化誘導後の細胞も、正常の細胞とかわりがなく、また増殖能等は完全に失っていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト人工染色体を組み込んだヒト間葉系幹細胞を患者自身の組織から作製し、それを移植することで新しい細胞移植治療の開発を行う。そのためには、間葉系幹細胞を患者の成体から安全に採取、分離、培養する方法の検討や、得られた細胞および内胚葉、肝細胞への分化誘導時における細胞の安定性を細胞レベルや動物個体レベルで検証しておく必要がある。

B. 研究方法

これまでに既に販売されているヒト間葉系幹細胞を培養し、それらは無血清特殊培地で培養し、継代ごとに細胞形態、細胞倍加時間、染色体数の観察を行い、継代細胞の安定性を確認する。さらに既に確立している方法で、*in vitro* での肝細胞への分化誘導を行い、人工染色体 Factor VIII が機能するための肝細胞としての環境が十分整った状態の細胞を用意し、その細胞増殖能や軟寒天培地でのコロニー形成の有無を確認する。また動物への移植によってもその造腫瘍性の無いことを確認する。

(倫理面への配慮)

実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分な倫理的配慮のもとに研究を遂行した。

C. 研究結果

ヒト間葉系幹細胞の培養レベルでの安全性を、継代ごとの染色体の安定性について検討した結果、無血清の特殊培地で培養した場合、継代数 7-8 代まで

は染色体数は安定に保たれることが判明した。ただし、継代数が増すにつれ、細胞の形態は扁平に変化する傾向が現れ、脂肪細胞への分化等も観察された。また倍加速度も低下した。またこれらの未分化の細胞をヌードマウスの皮下に移植した結果、継代数 5 の細胞を移植し 8 ヶ月を経過した 6 匹のマウスに腫瘍形成等の変化は認められなかった。以上の結果より、未分化の継代数の若い細胞であれば、腫瘍形成や染色体不安定化を招くことなく、安全であることが示唆された。

ヒト間葉系幹細胞に、FGF1, FGF4, HGF, OsM などの増殖因子を段階的に添加することにより、35 日間で肝細胞様の細胞へと分化誘導した。この細胞の肝細胞としての機能の検討は、アルブミン産生などの生物学的活性や、各種の肝特異的遺伝子発現解析等によって行い、高度の肝臓機能を有する細胞であることが明らかである。また、本研究の目的である、人工染色体を導入し、血液凝固に関連する因子を発現するか否かを検討するため、肝細胞に特異的に発現する転写因子の活性を RT-PCR により検討した結果、HNF3alpha, CEBP などの因子の十分な発現を認めた。さらにこの分化した細胞の安全性の確認のため、細胞増殖能を検討した結果、分化してから数日で、増殖能を失うことが判明した。またこの細胞を軟寒天培地に播種したが、コロニー形成能は認められなかった。動物の皮下移植モデルでの造腫瘍性も無かった。

D. 考察

ヒト間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞の機能を有する細胞に、Factor VIII を搭載した人工染色体を導入するための基盤研究が整った。この肝細胞の機能を有する細胞は、未分化な間葉系幹細胞と同様に、腫瘍化等の恐れは少なく、安全であることが確認できた。さらに、Factor VIII の発現に重要な因子である肝特異的転写因子の発現も確認出来た。

E. 結論

ヒト人工染色体を組み込んだ幹細胞を患者自身の組織から作製し、それを移植する新しい細胞移植治療の開発を行う上で、間葉系幹細胞は安定に培養することが可能であり、研究目的に適した細胞であることが判明した。またそれから分化誘導した肝細胞も安全であり、人工染色体のキャリアとして、機能することが期待出来る。

F. 健康危険情報

本研究では健康を害するようなウイルスや、薬物の使用は無いことから、健康危惧に関する問題は生じないと考える。

G. 研究発表

- 1) Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. "Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications. *Adv Exp Med Biol*. 585: 3-17, 2006.
- 2) Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49: 2948-2958, 2006.
- 3) Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J*. 20: 1484-1485, 2006.
- 4) Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev*. 20:1321-1330, 2006.
- 5) Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131: 14-29, 2006.
- 6) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov*. 2: 159-167, 2007.
- 7) Hanai K, Takeshita F, Honma K, Nagahara S, Maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann N Y Acad Sci*. 1082: 9-17, 2006.
- 8) Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, 28: 383-391, 2006.
- 9) Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*. 29: 541-548, 2006.
- 10) Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*. 66: 7532-7539, 2006.
- 11) Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis*. 27: 2497-2510, 2006.
- 12) Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 354: 841-845, 2007.
- 13) Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, *Eif2c2* (*Ago2*), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89:687-696, 2007
- 14) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007
- 15) Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007.
- 16) Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, Ochiya T. Plasticity of adult stem cells into liver. *Curr. Res. in Hepatol* 1:1-18, 2007.
- 17) Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng*. 14(2): 267-274, 2008.
- 18) Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem

cells. FEBS J. 275(6):1260-1273, 2008.

(和文)

Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Nakazawa Y, Nitani A, Terada S, Ochiya T, Ueno K.

[Advantages of culture models utilizing substrata made of TOSHI (tissue/organ sections for histopathology) or collagen vitrigel membrane and their application concept for drug development researches]

Yakugaku Zasshi. 128(1):51-60, 2008.

2. 学会発表

1) FASEB Liver Conference on Liver Growth, Development & Disease, (July 22-27 2006, Colorado, USA) Ochiya T. Title: Generation of hepatocytes from ES cells. 招待講演

2) The 5th Sino-Japan Joint Conference, (October 5-8 2006, Shanghai, China) Ochiya T. Title: Therapeutic potential of atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer. 招待講演

3) Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, (Oct 19-21, 2006, NY, USA) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Title: Atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer.

4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006 Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome profiling of hepatic differentiation from mesenchymal stem cell.

5) Gordon Research Conference-Molecular cell biology July 2-7, 2006, USA, Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome Analysis to Define the Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell.

6) 9th International Conference Drug and Gene-based Therapeutics, Agia Pelagia, island of Crete, Greece, September 2-8, 2006. Takeshita F, Ochiya T.: Efficient Small Interfering RNA delivery to metastatic tumors. 招待講演

7) International Genomic Imprinting Workshop 2006, Morita S, Fukasawa M, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in dicer 1-hypomorphic mice and EIF2C2 -deficient mice. (poster)

8) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S. "Optical imaging of RNAi Therapy" SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited

9) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T.

"MicroRNA expression profile to define mouse liver development" 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)

10) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. "CYP's metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells" The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)

11) Ochiya T. "RNAi-based anti-cancer strategy" 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited

12) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9. 2007 Seoul, Korea) invited

13) Takeshita F, Ochiya T. "MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells." 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada) invited

14) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. "Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies" 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)

(国内)

1) イメージング技術によるがん細胞の可視化と RNAi 治療評価系への応用、落谷孝広、第 1 回医療バイオワークショップ (2006.4.24 東京工業大学) 招待講演

2) ヒト幹細胞から分化した肝細胞、落谷孝広、第 13 回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム (2006.5.19 東京) 招待講演

3) Functional screening of the genes correlated with drug resistance in breast cancer using Atelocollagen-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Kazuki Nemoto, Jun Onodera, Yu Aso, Hiroshi Itoh, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第 20 回国際生化学・分子生物学学会 (2006.6.22 京都)

4) ステム細胞の肝細胞分化制御、落谷孝広、(シンポジウム) 第 13 回肝細胞研究会 (2006.7.1 旭川) 招待講演

5) アテロコラーゲン DDS による siRNA のがん治療モデル、落谷孝広、(シンポジウム) 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)

6) 転移性ヒト乳がん細胞に対する RNAi による治療効果の検討、竹下文隆、アグネスバナス、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)

7) アテロコラーゲン siRNA 導入技術による薬剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、西尾和人、加藤菊也、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)

- 8) アテロコラーゲン DDS で siRNA のがん治療は可能なのか、落谷孝広、バイオテクノロジージャパンセミナー (2006.11.13 東京) 招待講演
- 9) がん転移モデルの in vivo イメージング、落谷孝広 (シンポジウム) 第 23 回日本疾患モデル学会総会 (2006.11.30 群馬) 招待講演
- 10) アテロコラーゲン DDS による RNAi 創薬、落谷孝広 (セミナー) 第 27 回ヒューマンサイエンス総合セミナー (2007.1.23 東京) 招待講演
- 11) siRNA によるがん治療モデル: RNA 干渉による抗がん剤増感の試み、落谷孝広 (シンポジウム) 第 9 回癌治療増感研究シンポジウム (2007.2.11 奈良) 招待講演
- 12) Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. Shinobu Ueda, Takumi Teratani, Hiroyuki Tsuda, Takahiro Ochiya 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 13) Cancer Patients' Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Takahiro Ochiya 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
- 14) A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Kana Yanagihara, Satoshi Terada, Takahiro Ochiya 第 6 回国際動物実験代替法会議 (2007.8.21-25 東京)
- 15) マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる microRNA の同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 16) 画像イメージングと毒性病理学の接点、落谷孝広 (ワークショップ)、第 24 回日本毒性病理学会学術集会 (2007.2.6-7 名古屋)
- 17) 再生肝由来の切片担体を利用して ES 細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想、竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明、日本薬学会第 128 年会 (2008.3.26-28 横浜)
- 18) 間葉系幹細胞の肝細胞分化と肝疾患治療への応用の期待、落谷孝広、平成 19 年度再生医療等研究時成果発表会(2008.3.11,東京)

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中:「ヒト肝細胞様細胞及びその利用」特許出願番号 2005-042364
EPC 出願準備中

クラニアルウインドウ法を用いた人工染色体保持細胞の安全性確認

分担研究者 谷口 英樹 横浜市立大学大学院・医学研究科・教授

研究要旨

HAC ベクターは、ヒト培養細胞において安定に保持されることが確認されている。本研究は、HAC ベクター導入細胞の生体内における組織再構築能や安全性を確認すること、および HAC ベクターにより導入した遺伝子の生体内における長期発現を確認することを目的として、Factor VIII 遺伝子導入標的候補細胞であるマウスとヒトの間葉系幹細胞を用いた血管組織構造の再構成系の確立を試みた。その結果、クラニアルウインドウ法を用いてヒト間葉系幹細胞とヒト血管内皮細胞を細胞外マトリックスと共に移植することにより、生体内において長期間（マウスでは 150 日以上、ヒトでは 30 日以上）にわたり維持され得る血流を伴った血管網構造を再構成することの可能な *in vivo* 実験系を確立した。

A. 研究目的

Factor VIII 遺伝子を用いた血友病に対する遺伝子治療は、既に臨床試験が実施されているものの、十分な成果を挙げるには至っていない。すなわち、導入した Factor VIII 遺伝子の発現が一過性で消失してしまうことから、継続的な治療効果を得るには至っていない。

これらの問題点は、鳥取大学大学院医学研究科生体機能医工学講座（押村光雄教授）において開発中の HAC を用いることで、ウイルスベクターに起因する搭載遺伝子サイズの問題や安全性の問題を克服できる可能性がある。また、タンデムに多コピーつなぐことにより、Factor VIII の高効率産生系を確立することも HAC を用いてはじめて可能になる。押村らは、既にインスレーター配列の利用により、プロモーターの活性を長期にわたって安定に維持できること、実際に発現ユニットのコピー数に応じて発現量に変化することなどを確認しており、本研究で目指す Factor VIII 高発現系の構築についても実現可能性が非常に高いといえる。

本研究では、このような Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターが確立された際に問題となる、HAC 導入細胞の機能解析、特に生体内へ移植した後の組織再構築能と長期的な安全性についてクラニアルウインドウ法を用いて検討した。

B. 研究方法

血管ネットワーク再構築の基本的な手技は、小池らの方法に従った（Koike.N *et al.* Nature 2004, supplemental data）。ヒト血管内皮細胞（Human Umbilical Vascular Endothelial Cells : HUVEC）（Cambrex, U.S.A.）の培養は EGM2 付

属添加因子キット（Cambrex）を添加した EGM-2 培地を用いて、保障継代回数（5 回）以内の継代数で培養した。マウス間葉系前駆細胞株（C3H10T1/2）（Riken Bioresource Center Cell Bank ,Tsukuba, Japan）とヒト間葉系幹細胞（三光純薬、正常ヒト間葉系幹細胞：hMSC、製品番号：PT-2501）は、Basal Medium Eagle（GIBCO,U.S.A）にウシ胎児血清 FBS（JRH bioscience）を最終濃度 10% で加え Penicilin/Streptomycin（GIBCO）を 1% 添加したものをを用いて培養した。それぞれ 37°C / 5%CO₂ インキュベーター内で培養した。各々の細胞は標準的な方法でトリプシン処理を施し、細胞数を計測後、HUVEC は 0.8×10⁶ 個、マウスの C3H10T1/2 とヒト MSC は 0.2×10⁶ 個の細胞をそれぞれ用いて Rat Tail Collagen, Type I Gel（BD Biosciences,U.S.A）へ包埋した。包埋に用いたゲルは、コラーゲン最終濃度が 1.5 mg/ml になるように 25 mM HEPES buffered EGM-2 で希釈した後、Human Plasma Fibronectin（Sigma）を 90 μg/ml で添加し、pH7.4 へ調整したものを 1 ml 用いた。ゲルが固化したのち、EGM-2 培地を 1ml 上層添加し一昼夜インキュベーター内で培養した。包埋 24 時間後、あらかじめ作成しておいたクラニアルウインドウへ移植した。

クラニアルウインドウ作製は主に Yuan らの方法に従った。すなわち、NOD/scid マウス頭部皮膚を切開し、頭蓋骨表面の骨膜を除去した後、歯科用マイクロドリル（Fine Science Tools,U.S.A.）で円形を描きながら頭蓋骨を徐々に薄削した。硬膜を除去し出血が見られないことを確認した後、生理食塩水（Otsuka Pharmaceutical Co. ,Tokyo, Japan）で脳表面を満たし、特注円形スライドガラス（MATSUNAMI,Osaka, Japan）を表面に乗せ、接着剤により強固に封入し、クラニアルウインドウ

作成マウスとした。

移植後のライブ観察は、マウスを仰臥位固定し、倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した。PBSで10mg/mlに調整した FITC-Dextran (Molecular probes, U.S.A.) 及び Rhodamin-Dextran (Molecular probes) を尾静脈から注射し、血流を緑色および赤色に可視化することにより観察を行った。組織学的解析は、クラニアルウインドウ内の大脳組織と移植ゲルを共に摘出し、パラフィンおよび凍結包埋を作成し薄切した後、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色ならびに各種免疫染色を行い実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目指す。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト血管内皮細胞は CAMBREX 社から研究用として販売されているものを購入、利用した。ヒト間葉系幹細胞は三光純薬社から研究用として販売されているものを購入、利用した。本研究の実施にあたっては、動物実験委員会の承認を受けた後に実施し、実験動物の愛護については安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

平成 18 年度においては、小池らによりすでに報告されている生体内血管網再構築実験 (Koike.N *et al.* 2004) の再現性を確認するため、マウス間葉系前駆細胞である C3H10T1/2 を、平成 19 年度はヒト血管ネットワークの再構成を目指し、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた実験を行った。

移植したゲルの存在領域、すなわち脳表面と封入したカバーガラス間へ焦点を設定し観察を行ったところ、10T1/2 については移植後 16 日目以降において HUVEC と 10T1/2 により再構成された血流を伴う血管組織構造が観察された。これらは移植後 37 日目、さらには移植後 136 日目以降においても長期間安定して存在し続けることが確認された。また、HE 染色による組織学的解析を行った結果、移植後 28 日目及び移植後 150 日目の移植ゲル内において、管腔構造を形成する血管構造が確認された。再構築された血管組織構造の免疫染色法による解析では、再構成血管は血管内皮細胞が管腔構造を形成し、その周囲を血管壁細胞 (平滑筋細胞やペリサイト) が取り巻く適正な構造を有していることが判明した。すなわち、血管内皮細胞マーカーである Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) 陽性の血管内皮細胞と、その周囲に存在する平滑筋マーカーである α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) を発現した細胞により血管組織構造が再構成されていることが確認された。

hMSC を用いた実験では移植後 7 日目以降において HUVEC と hMSC により再構成された血流を伴う血管組織構造が観察された。これらは移植後 49 日目、さらには移植後 84 日目においても長期間安定して存在し続けることが確認された。宿主マウスの尾静脈より Rhodamin-Dextran を注入し再構成された血管ネットワークの血流観察を行った。移植後 7 日目において再構成された血管ネットワークの一部に血流があることが確認された。移植後 14 日目においては、移植後 7 日目よりも太い直径を有する血管ネットワークの再構成が確認され、血流を伴っていることが確認された。その後も、移植後 35 日目、移植後 49 日目、移植後 84 日目の観察時点の全てにおいて血流が確認された。これらの結果から、HUVEC と 10T1/2、HUVEC と hMSC のどちらの細胞を用いても再構成された血管組織構造は血流を伴って長期間維持されていることが判明した。

D. 考察

Factor VIII タンパク質の生体内供給を目的とした血友病治療用人工染色体ベクターが確立された場合には、それらを用いた遺伝子導入の標的細胞として血管組織構成細胞が第 1 候補となると考えられる。すなわち、Factor VIII タンパク質が産生され、それらが効率良く血流中に放出され全組織へ供給されていくためには、血管組織を構成する細胞への遺伝子導入に優位性があると考えられる。

血管は、主として血管内皮細胞と血管平滑筋細胞や周皮細胞などの間葉系細胞から構成されており、血管内皮細胞は血管内皮前駆細胞 (EPC) から分化派生し、血管平滑筋細胞や周皮細胞などは間葉系幹細胞から分化派生する。生体内 (患者内) において長期的に Factor VIII タンパク質が供給され続け、臨床的に有効な治療効果を得るためには、遺伝子導入した標的細胞から多くの遺伝子搭載細胞が増殖し、かつ、それらが長期的に維持される必要がある。これらの条件を満たすためには、高い増殖能・自己複製能・組織再構築能を兼ね備えた体性幹細胞の標的細胞としての利用が望ましいと考えられる。

このような観点から、平成 18 年度の研究において確立したヒト血管内皮細胞とマウス間葉系前駆細胞を用いた血管組織構造の再構築系を基盤として、平成 19 年度はヒト血管内皮細胞とヒト間葉系幹細胞を用いた完全なヒト型血管組織の再構築系を確立した。80 日以上 の長期間にわたり、血流を伴ったヒト血管組織 (血管網) 構造が維持され続けたことから、HAC 導入血管系幹/前駆細胞を用いた実験系へと発展させることが可能であることが確認されたといえる。

今後、HAC 導入ヒト間葉系幹細胞を用いたヒト型血管組織の再構成へと研究を進めていく予定である。これらの研究により HAC を用いる血友病に対

する新規遺伝子治療に関する基盤技術が開発され、臨床応用への重要なステップになると考えている。

E. 結論

本研究では、期待通りヒト血管内皮細胞とヒト間葉系幹細胞を用いたヒト血管組織（血管網）構造の再構築系が確立された。HAC 導入ヒト間葉系幹細胞の有効性や安全性を詳細に確認することができる生体内評価系に目処がついたことから、血友病の新規治療法としての HAC の将来的な利用に向けた研究が加速されると期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

1. Suzuki A, Sekiya S, Büscher D, Izpisua Belmonte JC, Taniguchi H: Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. *Development*. 2008 Mar 20; [Epub ahead of print]
2. Chiba T, Zhen YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H: Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation *Gastroenterology* 133(3):937-950 2007
3. Yamamoto Y, Togo S, Yun-wen Zheng, Kubota T, Taniguchi H, Shimada S : Adult rat hepatic bipotent progenitor cells remain dormant even after extensive hepatectomy. *Stem Cell Research* 15(3):422-429 2007
4. Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, Taniguchi H, Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T : Production of Functional Spermatids from Mouse Germline Stem Cells in Ectopically Reconstituted Seminiferous Tubules. *Biol Reprod*. 76(2):211-7 2007
5. Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, Taniguchi H : Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132(2):720-732 2007
6. Okamura A, Zheng Y W, Hirochika R, Tanaka J, Taniguchi H : In vitro reconstitution of hepatic tissue architectures with neonatal mouse liver cells using three-dimensional culture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7(2):721-5 2007
7. Zhao W, Hirose T, Ishikawa M, Oshima Y, Hirai S, Ohno S, Taniguchi H. Neonatal pancreatic cells redifferentiate into both neural and pancreatic lineages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352(1):84-90.2007
8. 谷口英樹: 肝臓における組織幹細胞と癌幹細胞 *病理と臨床* 2007:25(4) 331-336

9. 谷口英樹: 肝臓における癌幹細胞 (cancer stem cell) の同定 *Surgery Frontier* 2007:14(1)95-97
 10. 谷口英樹、大島祐二: 膵臓における組織幹細胞の分離・同定 *最新医学* 2006:61(7)28-34
 11. 谷口英樹: 腸管上皮におけるインスリン産生細胞の異所性誘導 *Diabetes Frontier* 2006:17(3)324-329
 12. 谷口英樹、鈴木淳史、千葉哲博: 肝臓における幹細胞研究の動向 *医学のあゆみ* 2006:217(5) 429-433
 13. 谷口英樹、千葉哲博: 固定臓器における組織幹細胞研究の重要性—幹細胞と癌の接点— *学術月報* 2006:59(4)
 14. 谷口英樹、千葉哲博、大島祐二: 肝臓・胆管・膵臓の発生学的な関連性 *肝胆膵* 2006:52(2) 167-172
 15. 中村英志、谷口英樹: ヒト由来幹細胞の創薬プロセスへの応用 <新連載> 最先端の医療とそれを支える基礎研究の現状と展望 *HAB NEWSLETTER* 2006:12(2) 14-16
- ### 2. 学会発表 :
1. 谷口英樹: 組織幹細胞を対象とした固形癌における発癌プロセスの再構成 第6回日本臨床腫瘍学会学術集会, シンポジウム, Mar.20-21,2008 福岡
 2. 谷口英樹: 肝幹細胞を対象とした腫瘍化プロセスの再構成 第7回日本再生医療学会学術集会, シンポジウム, Mar,13-14,2008 名古屋
 3. Taniguchi H.: Excessive Self-renewal of Hepatic Stem Cells Drives Cancer Initiation. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2008, Invited Speaker, Jan.24,2008 Kanazawa
 4. Taniguchi H.: Analysis of asymmetric cell division of pancreatic stem cells using time-lapse cell tracing system. *Cell Polarity* 2007, Dec.9-10,2007 Hayama
 5. 谷口英樹: The role of stem/progenitor cells in liver regeneration. 第37回日本創傷治癒学会、日韓合同シンポジウム、Dec.6-7,2007 横浜
 6. 谷口英樹、仲野晶、岡村愛、田中順三: 膵島創出へ向けた細胞操作技術の開発 第34回日本臓器保存生物医学会学術集会、シンポジウム、Nov.16-17,2007 札幌
 7. Taniguchi H.: Excessive self-renewal of hepatic:stem/progenitor cells drives cancer initiation. Indo-JSPS-CDB Joint Meeting, Oct.23-24,2007 Kobe
 8. Taniguchi H.: Excessive self-renewal of hepatic stem/progenitor cells derives cancer initiation. 2007 Soon Chun hyang Stem Cell Symposium,

- Invited Speaker, 15 Sep. 2007 Seoul
9. Hideki Taniguchi, Tetsuhiro Chiba: Excessive self-renewal of hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiations. 第66回日本癌学会学術総会、シンポジウム、Oct.3-5, 2007 横浜
 10. 谷口英樹: ヒト研究用モデル細胞としての幹細胞クローン 第25回日本ヒト細胞学会学術集会、シンポジウム、Aug.3-4,2007 東京
 11. 谷口英樹: 膵幹細胞の可視化による非対称分裂の解析 第17回日本サイトメトリー学会学術集会、シンポジウム、July 5-6,2007 東京
 12. 谷口英樹: 組織幹細胞と“がん幹細胞” 第19回日本肝胆膵外科学会・学術集会、ワークショップ、June 7-8,2007 横浜
 13. Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H: Hepatocellular transplantation contributes stable hepatic replacement included the reconstitution of bile ductules 日本分子生物学会2006フォーラム「分子生物学の未来」名古屋 Dec.6-8, 2006
 14. 谷口英樹: 外科領域への幹細胞生物学のインパクト 第33回日本臓器保存生物医学学会総会 シンポジウム Nov.23-24,2006 東京
 15. 千葉哲博、岩間厚志、谷口英樹: 肝幹/前駆細胞における自己複製メカニズムの解明 第10回日本肝臓学会大会 シンポジウム Oct.11-12,2006 札幌
 16. 千葉哲博、喜多かおる、鄭允文、横須賀 収、岩間厚志、谷口英樹: 肝幹/前駆細胞の自己複製機構と癌化過程の関連性の検証 第65回日本癌学会学術総会 Sep.28-30,2006 横浜
 17. 大島祐二、石川桃太郎、鈴木淳史、大河内信弘、谷口英樹: 膵管上皮特異的マーカーを用いた膵前駆細胞の分離とインスリン産生細胞への分化誘導 日本消化器外科学会定期学術総会 July 13-15,2006 横浜
 18. 谷口英樹: 肝幹細胞を対象とした腫瘍化プロセスの再構成 第13回肝細胞研究会 シンポジウム June30-July1,2006 旭川
 19. 千葉哲博、喜多かおる、鄭允文、横須賀収、税所宏光、岩間厚志、谷口英樹: ポリコム遺伝子 Bmi-1 は幹細胞を制御する 第42回日本肝臓学会総会 ワークショップ May 25-26,2006 京都
 20. 谷口英樹: 組織幹細胞を用いた眼科プロセスの再構成 第95回日本病理学会総会 シンポジウム Apr.30-May 2,2006 東京

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamada H, Li YC, Nishikawa M, <u>Oshimura M</u> , <u>Inoue T</u> .	Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell-type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion.	J Hum Genet.	53(5)	447-53	2008
Shitara S, Kakeda M, Nagata K, Hiratsuka M, Sano A, Osawa K, Okazaki A, <u>Katoh M</u> , <u>Kazuki Y</u> , <u>Oshimura M</u> , Tomizuka K.	Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector.	Biochem Biophys Res Commun.	369(3)	807-11	2008
<u>Kazuki Y</u> , Hoshiya H, Kai Y, Abe S, Takiguchi M, Osaki M, Kawazoe S, <u>Katoh M</u> , Kanatsu-Shinohara M, <u>Inoue K</u> , Kajitani N, Yoshino T, Shirayoshi Y, Ogura A, Shinohara T, Barrett JC, <u>Oshimura M</u> .	Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome.	Gene Ther.	15(8)	617-24	2008
<u>Oshimura M</u> , <u>Katoh M</u> .	Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells.	Reprod Biomed Online.	16(1)	57-69	2008
Nagahama Y, Ishimaru M, Osaki M, <u>Inoue T</u> , Maeda A, Nakada C, Moriyama M, Sato K, <u>Oshimura M</u> , Ito H.	Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1.	Cancer Sci.	99(1)	23-30	2008
Takehashi M, Kanatsu Shinohara M, Miki H, Lee J, <u>Kazuki Y</u> , <u>Inoue K</u> , Ogonuki N, Toyokuni S, <u>Oshimura M</u> , Ogura A, Shinohara T.	Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. Dev Biol.	Dev Biol.	312(1)	344-52	2007
Murakami K, <u>Oshimura M</u> , Kugoh H.	Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1.	J Hum Genet.	52(11)	926-33	2007
Osaki M, <u>Inoue T</u> , Yamaguchi S, Inaba A, Tokuyasu N, Jeang KT, <u>Oshimura M</u> , Ito H.	MAD1 (mitotic arrest deficiency 1) is a candidate for a tumor suppressor gene in human stomach.	Virchows Arch.	451(4)	771-9	2007

Itaba-Matsumoto N, Maegawa S, Yamagata H, Kondo I, <u>Oshimura M</u> , Nanba E.	Imprinting status of paternally imprinted DLX5 gene in Japanese patients with Rett syndrome.	Brain Dev.	29(8)	491-5	2007
Tomimatsu N, Tahimic CG, Otsuki A, Burma S, Fukuhara A, Sato K, Shiota G, <u>Oshimura M</u> , Chen DJ, Kurimasa A.	Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks.	J Biol Chem.	282(14)	10138-45	2007
<u>Inoue T</u> , Hiratsuka M, Osaki M, <u>Oshimura M</u> .	The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. Cell Cycle.	Cell Cycle.	6(9)	1011-8	2007
大林徹也、三ツ矢幸造、押村光雄	細胞分化とエピジェネティクス	臨床化学	36(4)	269-74	2007

Takeuchi T, <u>Ochiya T</u> , Takezawa T.	Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage.	Tissue Eng.	14(2)	267-274	2008
Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, <u>Hatada I</u> , Matsubara K, Kato T, <u>Ochiya T</u> .	A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells.	FEBS J.	275(6)	1260-1273	2008
Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Nakazawa Y, Nitani A, Terada S, <u>Ochiya T</u> , Ueno K.	Advantages of culture models utilizing substrata made of TOSHI (tissue/organ sections for histopathology) or collagen vitrigel membrane and their application concept for drug development researches.	Yakugaku Zasshi	128(1)	51-60	2008
Watanabe H, <u>Ochiya T</u> , Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K.	Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats.	Biochem Biophys Res Commun.	354	841-845	2007
Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, <u>Ochiya T</u> , Hatada I.	One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation.	Genomics	89(6)	687-696	2007
Banas A, Teratani T, Yamamoto Y,	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human	Hepatology	46(1)	219-228	2007

Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, <u>Ochiya T.</u>	hepatocytes.				
Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, <u>Ochiya T.</u>	Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies.	Dev Dyn.	236	3228-3241	2007
Yamamoto Y, Banas A, Kato T, <u>Ochiya T.</u>	Plasticity of adult stem cells into liver.	Curr. Res. in Hepatol.	1	1-18	2007
Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, <u>Ochiya T.</u>	Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications	Adv Exp Med Biol.	585	3-17	2006
Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, <u>Ochiya T,</u> Quinn G.	Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells.	Diabetologia	49	2948-2958	2006
Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation	FASEB J	20	1484-1485	2006
Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, <u>Ochiya T,</u> Kitabayashi I.	MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cell.	Genes Dev	20	1321-1330	2006
<u>Ochiya T,</u> Honma K, Takeshita F, Nagahara S.	Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology	Expert Opin. Drug Discov.	2	159-167	2007
Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, <u>Ochiya T.</u>	Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines.	Ann N Y Acad Sci.	1082	9-17	2006
Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, <u>Ochiya T,</u> Monden M, Kato K.	Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers	Int J Oncol	28	383-391	2006
Fujii T, Saito M, Iwasaki E, <u>Ochiya T,</u> Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M,	Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer.	Int J Oncol	29	541-548	2006

Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D.					
Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, <u>Ochiya</u> T.	A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination	Cancer Res.	66	7532-7539	2006
Takeshita F, <u>Ochiya T.</u>	Therapeutic potential of RNA interference against cancer	Cancer Sci.	97	689-696	2006
Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, <u>Ochiya T</u> , Hatada I,	Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice.	Cytogenet Genome Res.	113	138-143	2006
Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, <u>Ochiya</u> T, Tsuda H.	Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas.	Carcinogenesis	27	2497-2510	2006

Suzuki A, Sekiya S, Büscher D, Izpisua Belmonte JC, <u>Taniguchi H</u>	Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression.	Development	Epub ahead of print		2008
Chiba T, Zhen YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, <u>Taniguchi</u> <u>H</u>	Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation	Gastroenterology	133(3)	937-950	2007
Yamamoto Y, Togo S, Yun-wen Zheng, Kubota T, <u>Taniguchi</u> <u>H</u> , Shimada S	Adult rat hepatic bipotent progenitor cells remain dormant even after extensive hepatectomy.	Stem Cell Regeneration	15(3)	422-429	2007
Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, <u>Taniguchi</u> <u>H</u> , Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T	Production of Functional Spermatids from Mouse Germline Stem Cells in Ectopically Reconstituted Seminiferous Tubules.	Biol Reprod.	76(2)	211-7	2007
Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, <u>Taniguchi H</u>	Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting.	Gastroenterology	132(2)	720-732	2007