

200807011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進 研究事業

新規センダイウイルスペクターを用いた

臍帯血幹細胞増幅法の開発

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 花園 豊

平成 21 年 (2009 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進 研究事業

新規センダイウイルスベクターを用いた

臍帯血幹細胞増幅法の開発

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 花園 豊

平成 21 年 (2009 年) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

新規センドライウイルスベクターを用いた臍帯血幹細胞増幅法の開発

花園 豊 ----- 2

II. 分担研究報告

HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターの製造法に
関する研究

井上 誠 ----- 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 14

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 16

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告

新規センダイウイルスベクターを用いた臍帯血幹細胞増幅法の開発

主任研究者

花園 豊（自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部・教授）

研究要旨

目的：臍帯血造血幹細胞の増幅技術を確立する。

方法：造血幹細胞の増幅能が明らかな HoxB4 遺伝子を搭載し、本遺伝子を必要な期間だけ発現した後は消滅する新しい概念のウイルスベクターを開発する。

期待される成果：「期間限定発現」ベクターは、遺伝毒性のない細胞質型 RNA ベクターであるセンダイウイルスベクターの改良によって実現できる。本法の有効性と安全性がサルやヒツジを用いて明らかになる。HoxB4 は、ES 細胞や iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する作用も持つので、本法は ES 細胞・iPS 細胞を利用する将来の骨髄移植代替治療にそのまま応用可能である。

当該年度の成果：HoxB4 搭載 P 欠損型 SeV ベクターの有効性を安全性について、大型動物（ヒツジ）を用いて期待のもてる結果が得られた。

(1) HoxB4 搭載 P 欠損型 SeV ベクターを作製し、それによるヒト臍帯血幹細胞の増幅効果（3.5 倍）を大型動物（ヒツジ）in vivo で確認した。

(2) HoxB4 搭載 P 欠損型 SeV ベクターの安全性を大型動物（ヒツジ）in vivo で確認した。今のところ腫瘍形成はない（4 頭中 0 頭）。レトロウイルスベクターで HoxB4 遺伝子を導入した場合、サル 2 頭中 1 頭、イヌ 2 頭中 2 頭で白血病が発症していることに比べ、P 遺伝子欠損型 SeV ベクターは格段に安全性が高いと考えられた。

全体（平成 18, 19, 20 年度）の成果：(1) 一過性の期間限定発現を可能にする P 欠損型 SeV ベクターを開発し、その大量生産に成功した。

(2) SeV ベクターの薬剤による除去技術を開発し、安全性のいっそうの向上を可能にした。

(3) サルやヒツジ胎子を用いる有効性・安全性の評価系を確立した。ベクターの安全性評価をマウスに比べてよりの確に行なうことができる。

(4) HoxB4 搭載 P 欠損型 SeV ベクターによるサル ES 細胞の造血分化促進効果、およびヒト臍帯血造血前駆細胞の増殖促進効果を in vitro で確認した。さらに、ヒト臍帯血幹細胞の増幅効果（3.5 倍）を大型動物（ヒツジ）in vivo で確認した。

(5) HoxB4 搭載 P 欠損型 SeV ベクター安全性を大型動物（ヒツジ）in vivo で確認した。今のところ腫瘍の発生等、副作用は認められていない。

A. 研究目的

造血幹細胞の増幅に必要な遺伝子を必要な期間のみ発現するウイルスベクター（「期間限定発現」ベクター）を用いて、臍帯血造血幹細胞の増幅技術を確立する。

現在、臍帯血移植は小児だけでなく成人に対しても普及しつつある。しかし、HLA が適合し十分な細胞数を有する臍帯血は少なく、移植後の生着不全が問題である。サイトカインを用いた臍帯血幹細胞の増幅は臨床応用段階にあるが、多大な費用を要する。また、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子操作技術による造血幹細胞の増幅も試みられているが、発癌が問題となっている。このため、安価で安全な臍帯血増幅法の確立が望まれる。

本研究では、造血幹細胞の増幅能が明確な HoxB4 遺伝子を搭載し、本遺伝子を必要な期間だけ発現した後は消滅する新しい概念のウイルスベクターである「期間限定発現」ベクターを開発する。それは、遺伝毒性のない細胞質型 RNA ベクターであるセンダイウイルス (SeV) ベクターの改良によって実現する。本ベクターの使用後、細胞の移植時にはベクターウイルスが消失しているため、安全性が高い。しかも、高価なサイトカインを用いないため、低コストを達成できる。

今回の方法で安全かつ効率のよい臍帯血幹細胞の増幅が可能となれば、少ない細胞数の臍帯血であっても、使用前に増幅させ、臨床応用が可能となる。さらに、体外での血液細胞の分化法が確立され

ば、十分に増やした臍帯血幹細胞から赤血球や血小板を作製する道が開け、輸血製剤の新たなソースになりうる。現在ボランティアに依存しているドナーの不足問題を解消できる可能性がある。この場合、肝炎ウイルスや HIV ウイルスのみでなく、未知のウイルス感染の問題なども回避できる。

しかも HoxB4 は、ES 細胞あるいは iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する作用も持つので、本法は ES 細胞・iPS 細胞を利用する将来の骨髄移植代替治療にそのまま応用可能である。

本法の有効性と安全性をサルまたはヒツジを用いた動物実験を通して明らかにしたい。

B. 研究方法

(1) ベクター：本研究で用いる SeV ベクターは、分担研究者の井上誠 博士（ディナベック株式会社）が作製した（分担報告を参照）。ベクターの感染実験は、自治医科大学内の P2 実験施設で実施した。

(2) 細胞

(a) ヒト臍帯血：自治医科大学付属病院において試料提供者から提供された臍帯血から CD34⁺細胞を単離し保存して利用した。または、理研からヒト臍帯血を購入した。

(b) サル臍帯血：霊長類医科学研究センターにて妊娠サルを確保し、分娩、臍帯血採取を行い凍結保存した。研究協力者：霊長類医科学研究センター 揚山直英、

柴田宏昭 両研究員。

(c) サル ES 細胞：サル（カニクイザル）ES 細胞（CMK6）は、京都大学 中辻憲夫 教授、田辺三菱製薬株式会社 近藤 靖 主任研究員から供与された。サル ES 細胞を至適条件下（OP9 フィーダー細胞上、各種サイトカイン存在下）で培養し、ES 細胞由来造血細胞を得た。

(3) 移植：移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能が未成立（妊娠 1/3 期前後）のカニクイザル胎仔またはヒツジ胎仔をレシピエントとした。移植後、満期帝王切開を行い、生まれたサル新生仔またはヒツジ新生仔における移植由来の造血キメラ率、および腫瘍形成の有無を調べた。移植由来の造血キメラ率は、移植したサル ES 細胞由来 CFU（colony-forming unit）が全 CFU に占める割合で示した。

サル実験協力者：霊長類医学研究センター揚山直英、柴田宏昭 両研究員。

ヒツジ実験協力者：宇都宮大学農学部付属農場 長尾慶和 准教授。

(4) 倫理面への配慮

(a) ヒト臍帯血利用：本研究では、自治医科大学付属病院で試料提供者から提供された臍帯血を利用したが、その採取・利用にあたって、試料提供者に対する身体的危害および不利益がないことを説明し、試料提供者から書面でインフォームド・コンセントを得た。提供された試料は、連結不能の匿名化を行い、個人

情報の特定を不可能にしている。また、理研から購入したヒト臍帯血も利用した。

臍帯血の採取および研究利用に関しては、実験実施機関から以下のとおり承認が得られている。

・古川雄祐申請「造血幹細胞の増殖・分化のメカニズムの解明と再生医療への応用」自治医科大学 平成 19 年 12 月 4 日承認（第 07-38 号）

(b) 組換え DNA 実験：実験実施機関から以下の通り承認が得られている。

・花園豊申請「幹細胞を利用する再生医療の基盤技術の開発」自治医科大学 平成 20 年 10 月 2 日承認（08-26）

・花園豊申請「幹細胞治療法のサルを用いた有用性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 17 年 4 月 1 日承認（DNA-070）

・井上誠申請「幹細胞への遺伝子導入用センダイウイルスベクターの構築と解析」ディナベック株式会社 平成 16 年 12 月 10 日承認

・井上誠申請「幹細胞への遺伝子導入用センダイウイルスベクターの大量製造と解析」ディナベック株式会社 平成 18 年 12 月 15 日承認

・長尾慶和申請「緑色蛍光タンパク質遺伝子（GFP）を組み込んだサル ES 細胞を in vitro で造血系へ初期分化させ、この細胞を妊娠ヒツジ子宮内の胎子の肝臓内へ外科的に移植する」宇都宮大学 平成 17 年 7 月 27 日承認

(c) 動物実験倫理：サルを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「サルを用いた幹細胞治療法の開発」自治医科大学 平成 20 年 4 月 1 日承認 (No. 0815)

・花園豊申請「幹細胞を用いた治療法の有効性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 20 年 6 月 13 日承認 (DS20-21)

ヒツジを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「ヒツジを利用する幹細胞の分化技術の解析」自治医科大学 平成 20 年 4 月 1 日承認 (No. 0816)

マウスを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「幹細胞の増殖・分化の解析」自治医科大学 平成 20 年 4 月 1 日承認 (No. 0814)

C. 研究結果

(1) 動物種によって異なる安全性評価系の結果

未分化の ES/iPS 細胞は奇形腫を作る性質がある。それを治療用に分化誘導しても、どうしても未分化のままの細胞が残存する。これが実際に奇形腫を作るリスクはどの位あるのだろうか？ 本研究では、このリスクをサルで評価した。腫瘍形成リスク等の安全性に関しては、我々はサルの子宮内胎仔への細胞移植の系を採用した。

未分化のままのサル ES 細胞を、サル胎仔に移植すると、免疫不全マウスの場合と同様、全例（3 頭中 3 頭）で奇形腫を

作らせることができた。なるほどヌードマウスのような使い方ができるわけである。

この系を使って、こんどは、GFP を標識したサル ES 細胞を造血細胞へと分化させて、それをサル胎仔へ移植した。生まれたサルの新生仔の体内で移植細胞の運命について GFP を標識にして追跡した。

有効性という点では、移植した ES 細胞由来の造血キメラ率は 4-5%で、マウスの 80-100%に比べると、まだまだ改善が必要なが分かった。さらに重要なことは、サルに移植後、全例（3 頭中 3 頭）で腫瘍が出来てしまったことである。移植後の奇形腫形成のリスクは非常に高いと言わざるをえない。

しかし、造血分化後、SSEA-4 という未分化表面マーカーを目印にして、未分化細胞を除去して移植すると、造血キメラ率を損なうことなく、腫瘍形成は完全に予防できた（7 頭中 0 頭）。未分化細胞を除去することによって、安全性はかなり確保できると考えられた。

さらに平成 20 年度には、安全性評価に関して新たに注意すべき結果が得られた。この奇形腫形成実験を、動物種を変えてマウスを使って行なうと、非常に異なる結果が得られたのである。

未分化 ES 細胞を NOD/SCID マウスに移植した場合、予想通り奇形腫を全例で作った。しかし、サル胎仔で奇形腫を作ったのと全く同じ造血分化細胞を移植すると、5 匹中 2 匹で奇形腫を作ったにすぎなかった。しかも、出来た腫瘍は体表か

らは認められず、移植5ヶ月後に解剖して分かるくらい小さかった。一方、T細胞もB細胞もNK細胞も欠損させたNOGマウス(実験中央研究所から購入)の場合は、サル胎仔と同様、造血分化細胞を移植しても全例で奇形腫を作った。

移植後の部位を免疫染色してみると、確かにNKが残存するNOD/SCIDでは、移植後、早期にNK細胞、樹状細胞、マクロファージの浸潤が見られ移植細胞が排除されてしまうことがわかった。免疫不全マウスでも立派な免疫拒絶反応が起きるといことになる。もっともNOGマウスを使えばこの拒絶は避けられることも分かった。

(2) 大型動物を用いた HoxB4 遺伝子搭載 P 欠損型 SeV ベクターの有効性と安全性の評価

マウス実験から HoxB4 の造血幹細胞の増幅効果、およびES細胞・iPS細胞の造血分化促進効果が示されている。大型動物における検証は、今までにサルとイヌを用いたものがアメリカで実施されて、やはり同様の有効性が示されているものの、サル2頭中1頭、イヌ2頭中2頭で白血病が発症したと報告されている。この際、HoxB4 遺伝子導入にレトロウイルスベクターを利用している。我々はレトロウイルスベクターの代りに P 欠損型 SeV ベクターを利用したわけだが、その有効性と安全性について非常に興味を持たれるところであった。今回の実験では、移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、

動物胎仔への移植を行なった。ヒツジの結果が揃ってきたので(平成21年3月現在)、報告する。

有効性に関しては、生後のヒツジで1%キメラを得るのに必要な移植細胞数で評価した。HoxB4 有りの場合、 3.3×10^5 個の細胞が必要だったのに対して、HoxB4 無しの対照群では 11.6×10^5 個の細胞が必要であった。すなわち、HoxB4 無しの場合に比べて HoxB4 有りの場合は、移植する細胞数が3.5分の1ですむことから、造血幹細胞は3.5倍に増幅できたことになる。

安全性に関しては、サル2頭中1頭、イヌ2頭中2頭で発症した白血病は、いまのところヒツジ4頭中で1頭も発症していない。

なお、ヒツジ実験に用いたヒト臍帯血は、理研の臍帯血バンクから購入したものである。

D. 考察

臍帯血に含まれている造血幹細胞の増幅法としては、以下の2つの方法がある。

(1) サイトカインを用いる増幅: 京都大学の中畑教授らは SCF, TPO, FL, IL-6/sIL-6R という4種のサイトカインを用いて、臍帯血に含まれる造血幹細胞を30倍に増殖させることに成功し、これを用いた臨床研究を計画している。

(2) 遺伝子を用いる増幅: 遺伝子を用いた造血幹細胞の増幅も種々行われている。HoxB4, STAT5, MDR, Bmi-1 などがある。特に HoxB4 は、造血幹細胞の増幅に

有効であることが多くの研究者によって示されている。

本研究では、造血幹細胞の増幅効果が明らかな HoxB4 遺伝子を利用した。HoxB4 は、ES 細胞や iPS 細胞の造血分化を促進する効果も知られており、造血幹細胞だけではなく、ES 細胞・iPS 細胞を利用する骨髓移植代替治療への応用も可能である。

遺伝子導入には、国産の SeV ベクターを利用した。SeV ベクターは造血幹細胞や造血前駆細胞に効率よく遺伝子導入することができる。しかも、SeV ベクターを用いると、サル ES 細胞に対して効率よく外来遺伝子を導入できることがわかった。さらに、SeV ベクターは、ヒトへの病原性がなく、DNA を介さない細胞質型 RNA ベクターである。したがって、レトロウイルスベクターで問題になる挿入変異や相同組換えによる変異ウイルス産生といった心配がない。

HoxB4 遺伝子は、転写因子であり短期間の作用により造血幹細胞に対する高い増幅効果をもつ一方、発現が持続することによる白血病発症が高率に起こることが大型動物（サル・イヌ）を用いたアメリカの実験で報告されており、一過性の発現が求められる。そのため「期間限定発現」ベクターを開発し利用した。すなわち「P 欠損型 SeV ベクター」である。P 遺伝子は RNA ポリメラーゼをコードし SeV の転写・複製を可能にするが、P 欠損型であればウイルスの自己複製は不能になり、遺伝子発現は初回取込みの P 蛋

白質の活性に限定され、HoxB4 を発現後、細胞が分裂・増幅すると、ウイルスは希釈消失する。造血幹細胞への効率的な遺伝子導入と、細胞傷害のない一過性の遺伝子発現は、P 欠損型 SeV ベクターのみで達成できる画期的な技術である。

P 欠損型 SeV ベクターで導入した HoxB4 は、通常型（F 欠損型）の場合と異なり、急速に発現量が低下することを示した。また、導入した HoxB4 は核内で発現することを、GFP をつなげた（fusion した）HoxB4 を使って確認した。さらに、P 欠損型 SeV ベクターで HoxB4 導入すると、たった 1 回の導入で、サル ES 細胞の造血分化が 3-4 倍に促進されることがわかり、期待通りの性能をもっていた。

さらに薬剤による SeV ベクターの除去技術を開発した。リバビリンの薬理濃度を培養中に添加し続けることによって、SeV ベクターの除去が可能だった。一方、世界でもっともよく使われている、ES 細胞用の無血清培地（KSR）があるが、この KSR を用いると、SeV ベクターを PCR 陰性になるまで完全に除去できることもわかった。

さて、本ベクターを臍帯血造血幹細胞や ES 細胞へ利用するにあたって、その有用性と安全性を評価するにはどのような方法が望ましいか？ HoxB4 遺伝子による白血病発症は、マウスを用いた実験では示されず、サルやイヌといった大型動物を用いた実験から初めて明らかにされた。このことから、大型動物を用いた

安全性や有効性の評価が強く求められる。そもそも HoxB4 遺伝子導入に由来する白血病が、マウスの実験では全く確認されなかったのはなぜだろうか？ いろいろな理由が考えられると思うが、一つの大事な理由は造血のスケールの違いであろう。たとえば、マウスが一生（2年間）かけて作る赤血球を、ヒトはたった一日で作っている。血球生産のスケールから言うと、マウスの一生はヒトの1日分に過ぎない。これではマウス10匹を一生2年間追跡しても、ヒトの10日分にしかない。これが、マウス実験から腫瘍を検出しづらい理由の一つと思われる。やはりサイズや寿命は重要である。大型動物を利用する実験の必要な所以である。

本研究でヒツジを使った実験結果から、P欠損型SeVベクターを用いて臍帯血CD3幹細胞にHoxB4遺伝子を導入すると、造血幹細胞は3.5倍に増幅できた。これは、サルやイヌを用いたアメリカの研究にほぼ合致する成績である。安全性に関しては、アメリカの研究ではサル2頭中1頭、イヌ2頭中2頭で白血病が発症したことが報告されている。一方、P欠損型SeVベクターを用いた我々の実験では、今のところヒツジ4頭中で1頭も発症していない。さらに頭数を増やして長期に観察していく必要があるものの、当初の期待通り、有効性に関しても安全性に関しても、非常に希望のもてる結果が得られたことは喜ばしい。

E. 結論

(1) 一過性の期間限定発現を可能にするP欠損型SeVベクターを開発し、その大量生産に成功した。

(2) SeVベクターの薬剤による除去技術を開発し、安全性のいっそうの向上を可能にした。

(3) サルやヒツジ胎仔を用いる有効性・安全性の評価系を確立した。ベクターの安全性評価をマウスに比べてよりの確に行なうことができる。

(4) HoxB4搭載P欠損型SeVベクターの有効性に関しては、in vitroでサルES細胞の造血分化促進効果を確認した。さらに、大型動物（ヒツジ）in vivoでヒト臍帯血幹細胞の増幅効果（3.5倍）を確認した。

(5) HoxB4搭載P欠損型SeVベクターの安全性に関しては、大型動物（ヒツジ）in vivoで評価した。レトロウイルスベクターでHoxB4遺伝子を導入した場合に起きた白血病発症のような腫瘍の発生は、今のところ全く認められていない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Nagao, Y., Abe, T., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Sasaki, K., Kitano, Y., Hayashi, S., Hanazono, Y. Improved efficacy and safety of in utero cell transplantation in sheep using an

- ultrasound-guided method. Cloning Stem Cells in press.
2. Tanaka, Y., Ikeda, T., Kishi, Y., Masuda, S., Shibata, H., Takeuchi, K., Komura, M., Iwanaka, T., Muramatsu, S., Kondo, Y., Takahashi, K., Yamanaka, S., **Hanazono, Y.** ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. Cell Transplant. in press.
 3. Kishi, Y., Tanaka, Y., Shibata, H., Nakamura, S., Takeuchi, K., Masuda, S., Ikeda, T., Muramatsu, S., **Hanazono, Y.** Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of non-human primate ES cells into immunodeficient mice. Cell Transplant. 2008; 17(9): 1095-1102.
 4. Kishi, Y., Inoue, M., Tanaka, Y., Shibata, H., Masuda, S., Ikeda, T., Hasegawa, M., **Hanazono, Y.** Knockout Serum Replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells. Cloning and Stem Cells 2008 Sep; 10(3): 307-312.
 5. **Hanazono, Y.** Stem cell research using monkeys. Rinsho Ketsueki 2008 Apr; 49(4): 240-246.
 6. 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. 2008 April 2; 17(2): 367-382.
 7. **花園豊** : 大型動物を用いたサル ES 細胞の移植実験. 再生医療へ進む最先端の幹細胞研究 (山中伸也, 中内啓光編) 実験医学増刊号 p.118-124, 2008.
 8. **花園豊** : サルを用いた幹細胞研究. 臨床血液 49: 240-246, 2008.
 9. **花園豊** : iPS 細胞利用の有効性と安全性の評価. 幹細胞の分化誘導と応用, (株)エヌ・ティー・エス, p.469-477, 2008.
 10. **花園豊** : ヒツジを用いたサル組織産生法. バイオインダストリー 25: 76-80, 2008.
 11. **花園豊** : ES/iPS 細胞を利用する治療の有効性と安全性—サルの例から考える. ファルマシア 44: 1053-1057, 2008.
 12. **花園豊** : iPS 細胞利用の有効性・安全性評価. クリニシアン 56; 27-32, 2009.
 13. **花園豊** : iPS 細胞利用の有効性・安全性評価. 臨床検査 印刷中.
- 学会発表**
1. 池田たま子, 田中裕次郎, 後藤典子, 岸友紀子, 増田茂夫, 高橋和利, 山中伸也, **花園豊** : ES 細胞における ERas の新たな作用機構. 第 6 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2008 年 5 月 16-17 日. (抄録集 p.45)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

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

HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターの製造法に関する研究

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社 研究開発部長

研究要旨

HoxB4 遺伝子を搭載する P 遺伝子欠失型センドライウイルス (SeV/ Δ P) ベクターの大量製造法の改良と最適化を行い、GMP 対応ベクター製造へ適用可能な大量製造法を確立した。パッケージング細胞の再クローニングを行い生産性の高い細胞を選択し、製造時の培養条件および精製方法について最終的な最適化を行った。最適化した製造条件を用いて、HoxB4 遺伝子を搭載した SeV/ Δ P、有効性確認のためのコントロールベクターとしての搭載遺伝子無しの SeV/ Δ P、および GFP 遺伝子を搭載した SeV/ Δ P ベクターの大量製造を行い、評価用に提供した。

A. 研究目的

センドライウイルス (SeV) ベクターは、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA ベクターであり、その全生活環において DNA への変換がなく、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で、自前の RNA ポリメラーゼ (P および L 蛋白質) を利用して行われる。すなわち、治療用遺伝子を核内に挿入し染色体遺伝子に組み込むことなく、細胞質において直接発現することができる特徴があり、「細胞質型 RNA ベクター」と呼ばれている。また、SeV ベクターは、ほとんどの哺乳類細胞に存在する、糖鎖のシアル酸を受容体として認識し、他のベクターでは遺伝子導入が困難な、ES 細胞あるいは造血幹細胞へも効率的に遺伝子導入が可能である。

これらの有効な性質を利用し、さらに

ES 細胞あるいは造血幹細胞の *ex vivo* での細胞増殖あるいは分化シグナルを一時的に活性化することを目的として、SeV のポリメラーゼ小サブユニットである P 遺伝子を欠失した P 遺伝子欠失型 SeV ベクター (SeV/ Δ P) を構築し、実際に転写遺伝子 (HoxB4) を搭載した SeV/ Δ P ベクターを調製することに成功している。当該ベクターについて、GMP 対応ベクター製造へ適用可能な大量製造法について最適化し、製造法を完成することを目的とした。即ちパッケージング細胞の再調整から実施し、また製造方法・精製方法の最適化を行い、生産性の向上を図った。実際に、ベクターの大量製造を実施し、有効性・安全性確認のためのベクターを大量に提供した。

B. 研究方法

(1) パッケージング細胞のクローニング

サル腎由来細胞株である LLC-MK₂ 細胞に P 遺伝子搭載発現プラスミドをトランスフェクションした細胞について、再度限外希釈によるクローニングを行った。P 蛋白質の発現量を指標としてスクリーニングし、最終的には P 遺伝子欠失型 SeV (SeV/ΔP) の生産性で評価した。

(2) ベクター製造条件の最適化

ベクターの感染・感染細胞の培養と培地の回収時期、培養上清フィルターろ過による細胞残渣除去、洗浄・溶出および濃縮等の条件検討に加え、カラムクロマトグラフィーにおける樹脂種類、カラムへのサンプルロード時の pH などの詳細な検討を行った。

(3) ベクター大量生産・精製

最適化した製造方法をベースに、評価用の HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ΔP (SeV¹⁸-HoxB4/ΔP) および 2 種の SeV/ΔP コントロールベクターの大量製造を行った。

(4) 製造ベクターの品質検査

力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定し、実施した。

(倫理面への配慮)

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒトへの病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、非常に安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使

用するベクターは、ウイルスの転写複製に必要なポリメラーゼ小サブユニット P 蛋白質遺伝子を欠失した非増殖型のベクター (SeV/ΔP) を用いているため、理論的にも実験的にも増殖性あるいは伝播性がないことが証明されている。この様に実験動物および環境等に与える影響は最小限にとどまる。なお、当分担研究では動物等への投与実験は厳選して限定されるものとし、その際には動物愛護の基準に従うものとする。

C. 研究結果

(1) パッケージング細胞のクローニング

限外希釈によるクローニングの結果、取得した 83 クローンについて評価を行い、P 蛋白質発現量が高い、clone 9, 50, 67 および 72 を選択した。この 4 種について、SeV/ΔP の生産性を比較し、最も生産性が高かったクローン「P4C#5A clone72」を選択した。この細胞を banking し、「P4C#5A clone72 BANK (1.0x10⁷ cells/ml) 081006」として保存した。

(2) ベクター製造条件の最適化

カラムクロマトグラフィーにおける樹脂種類については、樹脂径を含めた検討を行い、最適な樹脂を選択した。また、SeV/ΔP は他のタイプの SeV ベクターに比較して、樹脂への吸着が弱く、回収率の低下を来していた。従って、カラムへのサンプルロード時の pH について、検討し回収率の最も高かった pH を選択した。

(3) SeV/ΔP ベクターの製造と QC

下記、3 種 5 ロットのベクターについて、大量製造を実施した。

1) ベクター: SeV¹⁸-HoxB4/ΔP (2 ロット)

【ロット番号: dP(Flag-hHoxB4)004】

力価：3.6 x10⁻⁹ CIU/ml (0.2mL x25本)

【ロット番号：dP(Flag-hHoxB4)005】

力価：3.3 x10⁻⁹ CIU/ml (0.2mL x20本)

2) empty ベクター：SeV/ΔP (null) (2ロット)

【ロット番号：dP001】

力価：2.7 x10⁻⁸ CIU/ml (0.2mL x25本)

【ロット番号：dP002】

力価：1.6 x10⁻⁸ CIU/ml (0.2mL x25本)

3) GFP 遺伝子搭載ベクターSeV¹⁸⁺GFP/ΔP

【ロット番号：dP(GFP)002】

力価：6.7 x10⁻⁷ CIU/ml (0.2mL x40本)

何れのベクターについても、無菌試験・エンドトキシン試験、各種ウイルス混入否定試験に適合し、製造法として確立していることを確認した。これらのベクターについて、有効性試験に供した。

D. 考察

パッケージング細胞の再クローニングを行い生産性の高い細胞を選択し、製造時の培養条件および精製方法について最終的な最適化を行った。最適化した製造条件を用いて、HOXB4 遺伝子を搭載したSeV/ΔP、有効性確認のためのコントロールベクターとしての搭載遺伝子無しのSeV/ΔP、および GFP 遺伝子を搭載したSeV/ΔP ベクターの大量製造を行い、評価用に提供した。

E. 結論

HOXB4 遺伝子を搭載する P 遺伝子欠失

型センドライウイルス (SeV/ΔP) ベクターについて GMP 対応ベクター製造へ適用可能な大量製造法を確立した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

- 1) Kishi Y, **Inoue M**, Tanaka Y, Shibata H, Masuda S, Ikeda T, Hasegawa M, **Hanazono Y**. Knockout serum replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells. Cloning Stem Cells. 2008;10(3):307-12.
- 2) Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Tanaka S, Kondo H, Okano S, Kohno R, Miyazaki M, **Inoue M**, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. J Gene Med. 2008;10(2):165-176.
- 3) Kinoh H, **Inoue M**. New cancer therapy using genetically-engineered oncolytic Sendai virus vector. Front Biosci. 2008 ;13:2327-2334.

H. 知的財産権の出願・登録状況

2007-127421：非複製型パラミクソウイルス科ウイルスベクター

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
花園豊	iPS 細胞利用の有効性と安全性の評価.	出版社による編集	幹細胞の分化誘導と応用	(株) エヌ・ティー・エス	東京	2008	469-477

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagao, Y., Abe, T., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Sasaki, K., Kitano, Y., Hayashi, S., Hanazono, Y.	Improved efficacy and safety of in utero cell transplantation in sheep using an ultrasound-guided method.	Cloning Stem Cells		印刷中	2009
Tanaka, Y., Ikeda, T., Kishi, Y., Masuda, S., Shibata, H., Takeuchi, K., Komura, M., Iwanaka, T., Muramatsu, S., Kondo, Y., Takahashi, K., Yamanaka, S., Hanazono, Y.	ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis.	Cell Transplant.		印刷中	2009
Kishi, Y., Tanaka, Y., Shibata, H., Nakamura, S., Takeuchi, K., Masuda, S., Ikeda, T., Muramatsu, S., Hanazono, Y.	Variation in the incidence of teratomas after the transplantation of non-human primate ES cells into immunodeficient mice.	Cell Transplant.	17	1095-11-2	2008

Kishi, Y., Inoue, M., Tanaka, Y., Shibata, H., Masuda, S., Ikeda, T., Hasegawa, M., Hanazono, Y.	Knockout Serum Replacement (KSR) has a suppressive effect on Sendai virus-mediated transduction of cynomolgus ES cells.	Cloning and Stem Cells	10	307-312	2008
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.	17	367-382	2008
花園豊	サルを用いた幹細胞研究.	臨床血液	49	240-246	2008
花園豊	ヒツジを用いたサル組織産生法.	バイオインダストリー	25	76-80	2008
花園豊	ES/iPS 細胞を利用する治療の有効性と安全性—サルの例から考える.	ファルマシア	44	1053-1057	2008
花園豊	iPS 細胞利用の有効性・安全性評価.	臨床検査		印刷中	
Murakami, Y., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Tanaka, S., Kondo, H., Okano, S., Kohno, R., Miyazaki, M., Inoue, M. , Hasegawa, M., Ishibashi, T., Sueishi, K.	Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes.	J. Gene Med.	10	165-176	2008
Kinoh, H., Inoue, M.	New cancer therapy using genetically-engineered oncolytic Sendai virus vector.	Front. Biosci.	13	2327-2334	2008

研究成果の刊行物・別刷

Variation in the Incidence of Teratomas After the Transplantation of Nonhuman Primate ES Cells Into Immunodeficient Mice

Yukiko Kishi,* Yujiro Tanaka,* Hiroaki Shibata,*§ Shinichiro Nakamura,¶ Koichi Takeuchi,‡ Shigeo Masuda,* Tamako Ikeda,* Shin-ichi Muramatsu,† and Yutaka Hanazono*

*Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan

†Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan

‡Department of Anatomy, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan

§Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki 305-0843, Japan

¶The Corporation for Production and Research of Laboratory Primates, Ibaraki 300-2658, Japan

Embryonic stem (ES) cells have the ability to generate teratomas when transplanted into immunodeficient mice, but conditions affecting the generation remain to be elucidated. Nonhuman primate cynomolgus ES cells were transplanted into immunodeficient mice under different conditions; the number of transplanted cells, physical state (clumps or single dissociated cells), transplant site, differentiation state, and immunological state of recipient mice were all varied. The tumorigenicity was then evaluated. When cynomolgus ES cells were transplanted as clumps into the lower limb muscle in either nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) or NOD/SCID/ γ^c (NOG) mice, teratomas developed in all the animals transplanted with 1×10^6 or more cells, but were not observed in any mouse transplanted with 1×10^5 cells. However, when the cells were transplanted as dissociated cells, the number of cells necessary for teratomas to form in all mice increased to 5×10^5 . When the clump cells were injected subcutaneously (instead of intramuscularly), the number also increased to 5×10^5 . When cynomolgus ES cell-derived progenitor cells (1×10^6), which included residual pluripotent cells, were transplanted into the lower limb muscle of NOG or NOD/SCID mice, the incidence of teratomas differed between the strains; teratomas developed in five of five NOG mice but in only two of five NOD/SCID mice. The incidence of teratomas varied substantially depending on the transplanted cells and recipient mice. Thus, considerable care must be taken as to tumorigenicity.

Key words: Nonhuman primate embryonic stem cells; NOD/SCID mouse; NOG mouse; Teratoma

INTRODUCTION

Human embryonic stem (ES) cells are established by propagating cell clumps from the inner cell mass of blastocysts developed from fertilized ova (18,24). Because they are pluripotent and can proliferate indefinitely, their application to regenerative medicine is anticipated (6, 10). When ES cells are transplanted into immunodeficient hosts, they form teratomas that contain three germ layer cells. This teratoma-forming ability is a reflection of the pluripotency of ES cells.

However, the development of teratomas posttransplant poses a serious obstacle to the clinical application of ES cells. The safety of human ES cell-derived progenitor preparations is usually assessed with an *in vivo* assay to see if tumors form after the injection of cells

into immunodeficient mice. However, innate immunity is present even in so-called immunodeficient mice, and innate immune responses against ES cell-derived tumors might be more rigorous in such a xenogeneic (human-to-mouse) setting than in allotransplanted animals, resulting in a failure to detect tumorigenesis in xenotransplantation models.

Indeed, we have shown that the incidence with which tumors were formed by cynomolgus ES cell-derived progenitor cells was much higher in the allogeneic (cynomolgus-to-cynomolgus) setting than in the xenogeneic (cynomolgus-to-immunodeficient mice and cynomolgus-to-fetal sheep) setting (2,19,20,23). Therefore, conventional teratoma-forming assays using mice or other xenogeneic animals might underestimate the tumorigenicity of human ES cell-derived progenitor preparations.

Received December 14, 2007; final acceptance May 5, 2008.

Address correspondence to Yutaka Hanazono, M.D., Ph.D., Professor, Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Tel: +81-285-58-7451; Fax: +81-285-44-5205; E-mail: hanazono@jichi.ac.jp

However, a systematic study regarding human or nonhuman primate ES cell-derived teratomas in mice has not been performed. Here we show that the incidence of teratomas varied substantially and was affected by factors relating to both the transplanted cells and recipient mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six- to 8-week-old nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan) and 6- to 8-week-old NOD/SCID/ γ_c^{null} (NOG) mice were purchased from the Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japan). All mice were housed at no more than five per cage with 12:12-h light/dark cycles and free access to standard rodent chow and water. All procedures of animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Jichi Medical University.

ES Cell Culture and Transplantation

A cynomolgus macaque ES cell line (CMK6) and a subline expressing GFP (CMK6G) were maintained on a feeder layer of mitomycin C (Kyowa, Tokyo, Japan)-treated mouse (BALB/c, Clea) embryonic fibroblasts, as described previously (21,22). The mouse bone marrow stromal cell line OP9 was maintained in α -minimum essential medium (Invitrogen, Rockville, MD, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum, as previously described (13).

Cultured ES cells were treated with 0.1% collagenase type IV (Invitrogen) for 10 min at 37°C. The resultant cell clumps were further incubated in 2.5% trypsin for 5 min at 37°C and then subjected to pipetting to become single cells. Clumps of cells or single dissociated cells (10^3 to 10^6 cells per site) were injected into the indicated sites of NOD/SCID or NOG mice using 23-gauge needles.

ES Cell-Derived Progenitor Preparation

To prepare cynomolgus ES cell-derived progenitors, ES cells were induced to differentiate into hematopoietic (20) or neural precursor cells (14). For hematopoietic differentiation, ES cells were seeded onto mitomycin C-treated confluent OP9 cell layers in culture dishes in Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 16% fetal bovine serum, 5×10^{-6} M hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 20 ng/ml recombinant human vascular endothelial growth factor (R&D, Minneapolis, MN, USA). During the differentiation, media were changed every 2–3 days. After 6 days of culture, cells were collected with a micropipetter, washed with phosphate-buffered saline (PBS, Sigma),

resuspended in 1×10^3 to $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ of 0.1% bovine serum albumin/PBS, and used for transplantation.

For neural differentiation, clusters of undifferentiated cynomolgus ES cells were transferred to nonadhesive bacteriological dishes in astrocyte-conditioned medium (ACM) under free-floating conditions (14) supplemented with 20 ng/ml recombinant human fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and 20 ng/ml recombinant epidermal growth factor (EGF) (both from R&D). The clusters were cultured for 10 days, giving rise to floating neural stem spheres (NSSs), composed of plenty of neural stem cells (NSCs). Then, the NSSs were plated onto Matrigel-coated dishes (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and cultivated for up to 10 days in Neurobasal medium supplemented with 2% B-27 (both from Invitrogen), 20 ng/ml FGF-2, and 20 ng/ml EGF. Subsequent culture of NSSs formed circular clusters of cells, from which many nestin-positive NSCs migrated, and these cells were used for transplantation.

Flow Cytometry

The expression of stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA-4), an undifferentiated marker of cynomolgus ES cells (21), was analyzed on a FACS Calibur (BD Pharmingen, CA, USA) using CellQuest software (BD Pharmingen). For staining SSEA-4, ES cells were incubated with an anti-SSEA-4 antibody (MC-813-70; Chemicon, Temecula, CA, USA) conjugated with Alexa Fluor 647 monoclonal antibody (Invitrogen). Cocultured BALB/c feeder cells could be distinguished from cynomolgus ES cells by using phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse H-2K^b (SF1-1.1; BD Pharmingen), which does not react to cynomolgus cells but does react to BALB/c cells.

Immunohistochemistry

All mice were euthanized at 12 weeks posttransplant unless otherwise indicated. Tumors and transplant sites were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 day at 4°C. Tissues were embedded in OCT compound (Sakura, CA, USA) and sectioned at 10 μm on a cryostat. Sections were blocked and incubated with rat anti-mouse CD45R/B220 (CL8990AP; Cedarlane, Ontario, Canada), rat anti-mouse F4/80 (BM8; BMA, Augst, Switzerland), or rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1; BD Pharmingen) for 1 h at room temperature. In NOD/SCID and NOG mice, B cells are absent and thus CD45R/B220-positive cells should be plasmacytoid dendritic cells (5) or active NK cells (3). To detect primary antibodies, slides were incubated with Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (Invitrogen) for 45 min at room temperature. Stained sections were analyzed with a confocal laser scanning microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity assay of mouse spleen cells was performed as described previously (27). Briefly, spleen