

200807011B

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 18～20 年度 総合研究報告書

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 18～20 年度 総合研究報告書

主任研究者 花園 豊

平成 21 年 (2009 年) 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

花園 豊 ----- 2

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

## 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：**臍帯血幹細胞の増幅技術を確立する。

**方法：**(1)導入遺伝子：本研究では、造血幹細胞の増幅効果が明らかな HoxB4 遺伝子を用いる。しかも HoxB4 は、ES/iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する作用を併せ持ち、応用範囲が広い。

(2)ベクター：遺伝子の導入には国産のセンダイウイルス (SeV) ベクターを利用する。SeV ベクターは、ヒトへの病原性がない。しかも、DNA を一切介さない細胞質型 RNA ベクターなので挿入変異の心配がない。

(3)期間限定発現：HoxB4 遺伝子は短期間作用すれば造血幹細胞の増幅効果をもつことに着目して、「期間限定発現」を可能にする「P 欠損型 SeV ベクター」を開発する。P 遺伝子は SeV の自己複製を可能にするが、P 欠損型を作製すれば自己複製は不能になり、遺伝子導入細胞の分裂・増幅に伴いベクターは希釈消失する。P 欠損型を用いれば、患者に移植する時点でベクターは事実上、移植細胞から失われており、安全性を確保できる。

(4)大型動物実験：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する。

**特色・独創的な点・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 SeV 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/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。

**平成 18 年度の成果：**(1) P 欠損型センダイウイルス (SeV) ベクターの作製のためには、欠損した P 遺伝子をトランスに供給するパッケージング細胞の作出が必須である。その作出に成功し、HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターの作製が可能になった。

(2) サル ES 細胞に 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した (数日以内でほぼ消失)。P 欠損型 SeV ベクターによって、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。

**平成 19 年度の成果：**(1) HoxB4 遺伝子を搭載する P 遺伝子欠損型 SeV ベクターの大量

製造法を確立した。培養上清容量 2L スケールでの大量生産について、ベクターの初期感染、培養上清の回収、カラムクロマトグラフィーによる精製、濃縮について、それぞれの条件を検討することによって、高タイター（高力価）での調製が可能な大量生産・精製方法の確立に成功した。

(2) 目的遺伝子を導入後、SeV ベクターを薬剤で除去できるかどうかを検討した。C 型肝炎の治療で用いられる抗 RNA ウィルス薬のリバビリンを、生体投与可能な薬理濃度で培養中に添加し続けることによって、SeV ベクター（通常型）の完全除去が可能だった。また、KSR (ES 細胞の無血清培地) を添加しても、ベクターの完全除去が可能であった。SeV ベクターは、不要になったら薬剤によっても除去可能なベクターであり、P 欠損型の使用と併せて安全性をいっそう高めることができる。

(3) サル胎仔やヒツジ胎仔を用いる有効性と安全性の評価系を確立した。胎仔を用いたのは、移植細胞に対する免疫拒絶を避けるためだが、この系では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。

**平成 20 年度の成果：**(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 ベクターを作製し、そ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らかでない 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

(a) P 蛋白質発現パッケージング細胞の作出：サル腎由来細胞株である LLC-MK<sub>2</sub> 細胞に P 遺伝子を搭載した Cre

リコンビナーゼ誘導型プラスミド (pCALNdLw) をトランスフェクトし、P 蛋白質発現誘導後、発現の高い細胞株を選択した。

(b) ベクターの構築 (再構成)：上記パッケージング細胞を用いて、HoxB4 遺伝子搭載 P 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター (SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ΔP) を構築した。HoxB4 遺伝子を SeV cDNA (pSeV/ΔP) の NP 遺伝子上流に挿入し、発現量を出来るだけ確保するベクターデザインとした。ベクターの再構成は T7 RNA ポリメラーゼでドライブして調製した。この時、T7 の供給はプラスミドでトランスにて行い、ワクシニアを使用しない系で実施した。また同時に、マーカー遺伝子である GFP、および luciferase 遺伝子搭載ベクター (それぞれ、SeV<sup>18+</sup>GFP/ΔP, SeV<sup>18+</sup>luci/ΔP) についてもベクター再構成を実施した。

(c) ベクター大量生産・精製：サル腎由来細胞株である LLC-MK<sub>2</sub> 細胞に P 遺伝子搭載発現プラスミドをトランスフェクトし調製した「P 蛋白質発現パッケージング細胞株」を利用し、HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ΔP (SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ΔP) の大量生産法を検討した。

T225 フラスコ 36 枚を用い、ベクターの感染・感染細胞の培養と培地の回収、培養上清フィルターろ過による細胞残渣除去、カラムクロマトグラフィー条件、洗浄・溶出および濃縮等の条件検討を行った。

(d) 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。

### (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<sup>+</sup>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：霊長類医科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：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/ $\Delta$ P）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無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。

本研究で実施した組換え DNA 実験は、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) ベクターの作製

(a) SeV/ $\Delta$ P の調製・生産：HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ $\Delta$ P ベクター

(SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ $\Delta$ P) について、ベクター再構成を実施し、ベクタークローニング、大量生産・精製を行った。今回、発現量のより高い細胞の取得に成功し、高タイターで生産することが可能になった。最終的には、PBS 溶液に置換し、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を実施し、*in vivo* 試験に十分使用可能なクオリティーでのベクター調製に成功した。また、コントロールベクターとしての GFP 遺伝子搭載ベクター (SeV<sup>18+</sup>GFP/ $\Delta$ P) および luciferase 遺伝子搭載ベクター (SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ P) を構築し、大量生産を実施した。

### (b) SeV/ $\Delta$ P の QC

ベクター：SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ $\Delta$ P

力価： $4.9 \times 10^8$  CIU/ml

無菌試験(TG 培地/SCD 培地)：適合

マイコプラズマ否定試験(PCR 法)：適合

エンドトキシン試験：3.84EU/ml 未満

タンパク質濃度：225.585  $\mu$ g/ml

電気泳動：単一バンド

(c) SeV/ $\Delta$ P の基本性能評価：対照細胞である LLC-MK<sub>2</sub> 細胞に、SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ P および SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ F を MOI=1, 5, 10 で遺伝子導入を行い、遺伝子導入 1 日目から 5 日目まで細胞を回収し、luciferase 活性を測定した。遺伝子導入 1 日目から 2 日目については、SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ P の発現は SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ F の発現の少数%を維持しているが、経時的に減少し、5 日目にはその 1/100 に減少し、一過的な期間限定発現であることが確認された。

また SeV に起因する細胞傷害が顕著に出易い CV-1 細胞に、SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ P および SeV<sup>18+</sup>luci/ $\Delta$ F を MOI=1, 5, 10 で遺伝子導入を行い、経時的に培養上清を回収し、細胞傷害の指標である LDH 活性を測定し



た。SeV<sup>18+</sup>luci/ΔF は遺伝子導入3日目から細胞傷害を示したが、SeV<sup>18+</sup>luci/ΔP の場合は導入5日目でもほとんど細胞傷害性を示さなかった。

SeV/ΔP の構築のためには、P 蛋白強発現細胞が必要であるが、より高い発現を示すパッケージング細胞を作成し、高タイターでの調製が可能になった。構築した SeV/ΔP は、遺伝子導入初期のみ SeV/ΔF の数%の発現を示し、経時的にみると早期に減弱した。更に細胞傷害性がほとんどなく、「期間限定」発現ベクターとしての基本性能が確認された。

## (2) ベクター大量生産・精製

(a) ベクター大量生産：HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ΔP (SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ΔP) の大量生産法を検討した。2リッターレベルでの生産法として、T225 フラスコ 36 枚を用い、ベクターの感染・感染細胞の培養と培地の回収、培養上清フィルターによる細胞残渣除去、カラムクロマトグラフィーによる濃縮の条件検討を行った。電気泳動で単一ピークでの回収・精製が可能であった。

## (b) 2リッターレベル生産 SeV/ΔP の QC

ベクター：SeV<sup>18+</sup>HoxB4/ΔP

力価： $2.2 \times 10^9$  CIU/ml

無菌試験(TG 培地/SCD 培地)：適合

マイコプラズマ否定試験(PCR 法)：適合

エンドトキシン試験：0.96EU/ml 未満

タンパク質濃度：2604.455 μg/ml

終濃度(タイター)が  $1 \times 10^9$  CIU/ml を越えて調製できており、QC 実施結果から見ても、GMP レベル製造への応用可能であると判断される。

## (3) 臍帯血細胞と ES 細胞

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<sup>+</sup>細胞を単離し保存した。しかし、臨床用臍帯血バンクへの提供が優先され、本研究への提供が必ずしも十分得られないことが問題点として挙げられていた。また、サル臍帯血に関しては、妊娠サルを確保し、分娩、臍帯血採取を行い凍結保存した。しかし、自然分娩下では臍帯血の採取は困難なため、帝王切開にて胎仔を娩出し、臍帯血を採取した。問題点として、この方法は非常に手間・費用がかかることが挙げられる。

以上の理由によってヒト・サル臍帯血細胞は利用可能量が限られる。その上、個体差による試料のロット差が大きいため、HoxB4 遺伝子導入の有効性を *in vitro* で比較・評価するためにヒト・サル臍帯血細胞の使用は必ずしも適切ではないことが分かった。そこで以下の通り、株化細胞であるサル ES 細胞を利用して、SeV ベクターの *in vitro* の有効性の評価系を評価した。

## (4) サル ES 細胞への遺伝子導入

通常型(F 欠損型)の SeV ベクターを用いると、サル ES 細胞に対して効率よく GFP 遺伝子を導入できた。1回のみの感染で2日後には約60%の細胞が GFP 蛍光を発した。これは、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率に匹敵するか、それを上回る。通常型 SeV ベクターはそれ自身が自己複製能をもつので、細胞分裂によってベクターが希釈されることなく、GFP の発現は感染後数ヶ月以上におたって安定していた。しかも、SeV ベクターは ES 細胞の三胚葉分化能を損わず、成熟細胞に分化した後も導入遺伝子の発現は衰えることがなかった。

次に、HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損

型 SeV ベクターを作製し (図 1), このベクターでサル ES 細胞への遺伝子導入を試みた。P 欠損型 SeV ベクターの場合、通常型に比べて導入遺伝子コピー数は 1%未満にとどまった。幸い、HoxB4 はこの程度の発現量でも十分機能すると予想されるが、導入遺伝子によっては、遺伝子導入回数を増やすなどによって導入遺伝子コピー数を上げる工夫が必要になる。

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した。導入した HoxB4 は核内で発現することを、GFP 遺伝子をつなげた HoxB4 を使って確認した。さらに、P 欠損型 SeV ベクターによって、たった 1 回の HoxB4 遺伝子導入で (MOI = 10), 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。

#### (5) SeV ベクター除去法の開発

SeV ベクターで目的遺伝子を導入後、SeV ベクターと導入遺伝子を薬剤で除去できるかどうかを検討した。C 型肝炎の治療などで用いられる抗 RNA ウイルス薬のリバビリンを、生体投与可能な薬理濃度で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。また、KSR という、ES 細胞の無血清培地を添加すると、ベクターの除去が可能であった。SeV ベクターは、幹細胞に効率よく安定に遺伝子導入できる上に、不要になったら薬剤によって除去可能なベクターであり、P 欠損型の使用と併せて安全性をいっそう高めることができる。

#### (6) 安全性の評価系の開発

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? 平成 19 年度までに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うことになる。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。

#### (7) 大型動物を用いた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、 $3.3 \times 10^5$ 個の細胞が必要だったのに対して、HoxB4無しの対照群では $11.6 \times 10^5$ 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細胞を利用する骨髄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 を導入すると、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 日分にしかならない。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

ば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. *臨床検査* in press.
  13. 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.
  14. Yoshida, K., Yonemitsu, Y., Tanaka, S., Yoshida, S., Shibata, S., Kondo, H., Okano, S., Ishikawa, F., Akashi, K., Inoue, M., Hasegawa, M., Sueishi, K. In vivo repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by temperature-sensitive mutant of recombinant Sendai viral vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 361(3): 811-816.
  15. Nagase, T., Matsumoto, D., Nagase, M., Yoshimura, K., Shigeura, T., Inoue, M., Hasegawa, M., Yamagishi, M., Machida, M. Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis. *J. Craniofac. Surg.* 2007; 18(1): 49-53.
  16. 井上誠：センダイウイルスベクターを利用したワクチン技術の開. *Drug Delivery System.* 2007; 22(6): 636-642.
  17. Shibata, H., Ageyama, N., Tanaka, Y., Kishi, Y., Sasaki, K., Nakamura, S., Muramatsu, S., Hayashi, S., Kitano, Y., Terao, K., Hanazono, Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells* 2006; 24: 1450-1457.
  18. Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M., Ozawa, K., Terao, K. Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Vet. Med. Sci.* 2006; 68: 507-510.
  19. Asano, T., Shibata, H., Hanazono, Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol. Biol.* 2006; 329: 295-303.
  20. Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K., Hanazono, Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol. Biol.* 2006; 329: 459-467.
  21. 花園豊：ヒツジでつくる移植用血液—ES 細胞利用の未来—. *ピオフィリア* 2: 27-31, 2006.
  22. 花園豊：ES 細胞のゲノム操作. *ゲノム医学* 6: 249-253, 2006.
  23. Nagai, Y., Kato, A., Inoue, M. [Establishment and progress of Sendai virus engineering] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2006; 51(1): 27-37.
  24. Yoshizaki, M., Hironaka, T., Iwasaki, H., Ban, H., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai,

Y., Hasegawa, M., **Inoue, M.** Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J. Gene Med.* 2006; 8(9): 1151-1159.

#### 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, 山中伸弥, **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)
2. 増田茂夫, 熊野恵城, 李碩瑛, 坂田麻実子, 中原史雄, 横山泰久, 鈴木隆浩, **花園豊**, 夏苺英昭, 富田泰輔, 岩坪威, 小川誠司, 黒川峰夫, 千葉滋: Notch シグナル亢進による白血病発症機構に基づいた in vivo 抗腫瘍効果の解析. 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.27)
3. Shibata, H., **Hanazono, Y.**: A nonhuman primate model for hematopoietic transplantation with ES cells. 11th Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division and 12th Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow Transplantation, Beijing, China, September 21-24, 2007. (abstracts p. 358)
4. Kishi, Y., Inoue, M., Shibata, H., Tanaka, Y., Sasaki, K., Ikeda, T., Hasegawa, M., **Hanazono, Y.**: Pharmacological control of Sendai viral transgene expression in cynomolgus embryonic stem cells. The Japan Society of Gene Therapy the 13th Annual Meeting, Nagoya, June 28-30, 2007. (abstracts p. 90)
5. Tanaka, Y., Nakamura, S., Shibata, H., Kishi, Y., Ikeda, T., Sasaki, K., Abe, T., Hayashi, S., Nagao, Y., Kitano, Y., **Hanazono, Y.**: Long-term macroscopic engraftment of cynomolgus tissues in sheep after in utero transplantation of cynomolgus ES cells. International Society for Stem Cell Research 5th Annual Meeting, Cairns, Australia, June 17-20, 2007. (abstracts p. 311)
6. 田中裕次郎, 岸友紀子, 池田たま子, 阿部朋之, 長尾慶和, 林聡, 北野良博, **花園豊**: サルの奇形腫をもつヒツジの作製: 動物工場の実現に向けて. 第 10 回日本異種移植研究会, 東京, 2007 年 3 月 10 日. (抄録集 p.23)
7. 田中裕次郎, 中村紳一朗, 岸友紀子, 池田たま子, 柴田宏昭, 佐々木京子, 阿部朋行, 林聡, 北野良博, 長尾慶和, **花園豊**: 異種大型動物におけるサル ES 細胞移植後の長期肉眼的生着. 第 5 回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 2007 年 5 月 17-19 日. (抄録集 p.16)
8. 阿部朋行, 田中裕次郎, 林聡, 北野良博, **花園豊**, 長尾慶和: ヒツジにおける骨髄抑制を誘導するための busulfan 至適投与量の検討. 第 144 回日本獣医学会, 酪農学園大学, 北海道大, 2007 年 9 月 2-4 日. (抄録集 p.143)
9. **花園豊**, 田中裕次郎, 中村紳一朗, 岸友紀子, 池田たま子, 柴田宏昭, 佐々木京子, 阿部朋行, 林聡, 北野良博, 長尾慶和: サル ES 細胞由来の肉眼的組織をもつヒツジの作製. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 2007 年 10 月 11-13 日. (抄録集 p.210)
10. 阿部朋行, 田中裕次郎, 林聡, 北野

良博，花園豊，長尾慶和：サル ES 細胞の生着および分化誘導に及ぼすヒツジ胎子日齢の影響。第 100 回日本繁殖生物学会，東京，2007 年 10 月 20-22 日。（抄録集 j120）

11. Kishi, Y., Inoue, M., Tanaka, Y., Ikeda, T., Shibata, H., Hasegawa, M., **Hanazono, Y.** Eradication of the Sendai virus vector genome in primate embryonic stem cells by Knockout Serum Replacement (KSR). The Japan Society of Gene Therapy the 12th Annual Meeting, Tokyo, August 24-26, 2006. (abstract p. 41)
12. 田中裕次郎，池田たま子，岸友紀子，柴田宏昭，佐々木京子，阿部朋行，林聡，長尾慶和，北野良博，**花園豊**：ES 細胞を使って移植用血液をヒツジに作らせる方法の開発。第 9 回日本異種移植研究会，栃木，2006 年 3 月 4 日。（抄録集 p. 17）
13. **花園豊**，岸友紀子，田中裕次郎，池田たま子，柴田宏昭，村松慎一，揚山直英，林聡，北野良博，阿部朋之，長尾慶和，寺尾恵治：ES 細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究。第 4 回幹細胞シンポジウム，東京，2006 年 5 月 19-20 日。（抄録集 p. 42）

#### 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., <b>Hanazono, Y.</b>	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., <b>Hanazono, Y.</b>	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., <b>Hanazono, Y.</b>	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., <b>Inoue, M.</b> , 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., <b>Inoue, M.</b>	New cancer therapy using genetically-engineered oncolytic Sendai virus vector.	Front. Biosci.	13	2327-2334	2008
Yoshida, K., Yonemitsu, Y., Tanaka, S., Yoshida, S., Shibata, S., Kondo, H., Okano, S., Ishikawa, F., Akashi, K., <b>Inoue, M.</b> , Hasegawa, M., Sueishi, K.	In vivo repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by temperature-sensitive mutant of recombinant Sendai viral vector.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	361	811-816	2007
Nagase, T., Matsumoto, D., Nagase, M., Yoshimura, K., Shigeura, T., <b>Inoue, M.</b> , Hasegawa, M., Yamagishi, M., Machida, M.	Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis.	J. Craniofac. Surg.	18	49-53	2007
Kanzaki, S., Shiotani, A., <b>Inoue, M.</b> , Hasegawa, M., Ogawa, K.	Sendai virus vector-mediated transgene expression in the cochlea in vivo.	Audiology Neurotology	12	119-126	2007
井上 誠	センダイウイルスベクターを利用したワクチン技術の開発.	Drug Delivery System	22	636-642	2007
Shibata, H., Ageyama, N., Tanaka, Y., Kishi, Y., Sasaki, K., Nakamura, S., Muramatsu, S., Hayashi, S., Kitano, Y., Terao, K., <b>Hanazono, Y.</b>	Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting.	Stem Cells	24	1450-1457	2006

Ageyama, N., <b>Hanazono, Y.</b> , Shibata, H., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M., Ozawa, K., Terao, K.	Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	J. Vet. Med. Sci.	68	507-510	2006
Asano, T., Shibata, H., <b>Hanazono, Y.</b>	Use of SIV vectors for simian ES cells.	Methods Mol. Biol.	329	295-303	2006
Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K., <b>Hanazono, Y.</b>	In vivo tumor formation from primate ES cells.	Methods Mol. Biol.	329	459-467	2006
Nagai, Y., Kato, A., <b>Inoue, M.</b>	Establishment and progress of Sendai virus engineering.	蛋白質核酸酵素	51	27-37	2006
Yoshizaki, M., Hironaka, T., Iwasaki, H., Ban, H., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., <b>Inoue, M.</b>	Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity.	J Gene Med.	8	1151-1159	2006
花園豊	ES細胞のゲノム操作.	ゲノム医学	6	249-253	2006