

200923003A-B

厚生労働科学研究費補助金  
子ども家庭総合研究事業

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞  
治療法の開発と臨床応用に関する研究

(H19-子ども一般-003)

平成19年度～21年度 総合研究報告書

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野寺 雅史

平成22年(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
子ども家庭総合研究事業

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞  
治療法の開発と臨床応用に関する研究

(H19-子ども-一般-003)

平成19年度～21年度 総合研究報告書

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野寺 雅史

平成22年(2010)年 3月

目 次

■総合研究報告 (平成 19 年度～21 年度)	研究代表者 小野寺 雅史	… 3
■平成 21 年度総括・分担研究報告		
I. 総括研究報告	研究代表者 小野寺 雅史	… 15
II. 研究分担報告		
1. 遺伝子治療臨床研究に必要な予備実験の実施	清河 信敬	… 21
2. 先天異常症に対する遺伝子・細胞治療法の開発と臨床応用における 遺伝子検出システムの確立に関する研究	梨井 康	… 24
3. ライソゾーム病に対する肝細胞遺伝子治療の可能性について	奥山 虎之	… 30
4. フローサイトメトリー法による CGD 病型診断	小林 信一	… 33
5. 遺伝子治療臨床研究における倫理性に関する検討	掛江 直子	… 38
6. 炎症性腸疾患を合併した X-連鎖慢性肉芽腫症に対する臍帯血移植実施の経験	有賀 正	… 40
7. 日本の慢性肉芽腫症の死亡原因の検討	布井 博幸	… 44
8. 挿入発癌リスクフリー非組込み型ベクター用組織特異的プロモータの検討	久米 晃啓	… 48
9. 先天性免疫不全症の遺伝子・細胞治療における移植細胞の 生着制御に関する研究	大津 真	… 50
10. 遺伝子治療臨床研究実施に関する法律、契約、対外交渉の実施	藤本純一郎	… 53
11. 慢性肉芽腫症に対する幹細胞遺伝子治療に関する研究	岡田真由美	… 55
12. レトロウイルスベクターの挿入部位が周囲遺伝子に与える影響	小野寺雅史	… 58
III. 資料		
1) 遺伝子治療臨床研究実施計画書		
2) 同意書・同意説明書		
3) 生物多様性評価書		
4) 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の実績一覧		
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		
V. 研究成果の刊行物・別刷		

平成 21 年度

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)

総括研究報告書

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療の開発と臨床応用に関する研究  
(H19-子ども一般-003)

主任研究者 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部部长

研究要旨

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療の開発とその臨床応用に向け、対象疾患を原発性免疫不全症の中で最も頻度が高い慢性肉芽腫症(CGD)とし、患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療の安全性、有効性の評価に関する前臨床研究と実際の遺伝子治療臨床研究に向けた実施計画書の作成ならびに実施体制の構築を行った。

前臨床研究としては、① ヒト造血幹細胞への遺伝子導入に関わる因子の検討、② 慢性肉芽腫症の原因遺伝子である *cybb* ならびに転写産物 *gp91<sup>phox</sup>* の宿主に対する抗原性の検討、③ ウイルスベクター挿入による白血病発症機序の解明、④ 非染色体挿入ベクター アデノ随伴ウイルスベクターの組織特異的プロモーターの解析、⑤ 先天性代謝異常症のライソゾーム病に対する肝細胞移植の有効性・安全性の検討、などを行った。

臨床的研究としては、① 炎症性腸炎を併発した CGD 症例に対する臍帯血を用いた造血幹細胞移植の報告、② 我が国で行われた CGD に対する造血幹細胞移植での死因の解析、③ Flow cytometry を用いた活性酸素測定による病型診断の検討、④ 現在までの諸外国における CGD 遺伝子治療臨床研究の情報収集、⑤ 遺伝子治療臨床研究の実施計画書の作成、⑥ 遺伝子治療の倫理性の検討、⑦ 国立成育医療センター内の遺伝子導入室の整備と国内の実施体制の構築、などを行った。

分担研究者・所属機関・職名

清河信敬

国立成育医療センター発生分化研究部・部長

梨井康

国立成育医療 C 移植免疫研究室・室長

奥山虎之

国立成育医療 C 臨床検査部・部長

小林 信一

国立成育医療 C 膠原病感染症科・医長

掛江直子

国立成育医療 C 成育保健政策科学研究室・室長

有賀正

北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授

布井博幸

宮崎大学医学部生殖発達学講座小児科分野・教授

久米晃啓

自治医科大学准教授

大津真

東京大学医科学研究所・助手

藤本純一郎

国立成育医療 C 研究所・副所長

岡田真由美

都立東大和療育センター小児科・医師

A. 研究目的

小児難治性疾患の多くは遺伝子異常が直接疾患の発症に結びつく単一遺伝病であり、逆にこれら原因遺伝子の機能を解析することで新たな治療法が開発できる疾患でもある。遺伝子治療は、疾患の治療に遺伝子を用いる方法であるが、この点から遺伝子治療は開発当初より原発性免疫不全症など小児難治性疾患に対する有効な治療と考えられ、欧米を中心に複数の疾患に対し、根治療法とよべる程の治療成績を上げている。ただ、我が国においても遺伝子治療は行われているものの、その土台を支えるインフラは十分に整備されておらず、その実施に際しては欧米の研究機関、企業に頼らざるをえない状況になっている。

これらの点を鑑み、本研究では原発性免疫不全症の中で最も頻度の高い慢性肉芽腫症(CGD)に対する造血幹細胞遺伝子治療を行うことで、我が国における小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療の実施体制を構築することにある。本年度も研究内容を遺伝子治療の安全性、有効性の評価に関する前臨床研究と実際の造血幹細胞遺伝子治療実施に向けた臨床研究を行った。

## B. 研究方法と結果

### 1. 前臨床的研究

1) 造血幹細胞への遺伝子導入に関するインテグリンの関与と至適サイトカインの選定(清河):

造血幹細胞遺伝子治療において、標的細胞となる CD34 陽性細胞の未熟性を維持しながら高効率で治療遺伝子を導入することが必要となるが、今回、遺伝子導入効率を増加させるフィブロネクチン(レトロネクチン、タカラバイオ社)の作用機序をインテグリンの発現を介して検討し、これらインテグリンの発現を増加させるサイトカインの選定を行った。

臍帯血等から分離・回収した CD34 陽性細胞のインテグリンの発現量を解析したところ、回収時(静止期)における VLA4、VLA5 の発現は低値であったが、サイトカインの刺激によりその発現は増加した。また、抗体を用いた阻害実験から、これら VLA4、VLA5 が協調して遺伝子導入に関与していることが示され、また、stem cell factor (SCF) と TPO の組み合わせが最もこれらインテグリンの発現が増強させることがわかった。よって、遺伝子導入の際の培養において SCF、TPO の添加が必須であることが示された。

2) 慢性肉芽腫症における遺伝子導入細胞の骨髄生着能の検討(大津)

今回の遺伝子治療において CGD の原因遺伝子である *cybb* 遺伝子を導入した患者造血幹細胞を、再度、患者に投与することとなるが、この *cybb* 遺伝子導入(gp91phox 発現)造血幹細胞が患者体内で排除されず、骨髄造血能を再構築できるかを、*cybb* 遺伝子欠損マウス(CGDKO マウス)を用いて検討した。

半致死量の放射線照射した CGDKO マウスに正常マウス骨髄細胞と CGDKO マウス骨髄細胞を移植したところ、骨髄再建能の関してこの両者に有意な差を認めなかった。このことは、*cybb* 遺伝子発現造血幹細胞が CGDKO マウス体内で排除されないことを意味し、遺伝子治療臨床研究で見られる遺伝子導入細胞の消失に免疫系が関与している可能性は低いことを示唆している。ただ、レトロウイルスベクターを用いて *cybb* 遺伝子を導入した CGDKO マウスの骨髄細胞は、その活性酸素能に関し一定の閾値をもって陽性群と陰性群に分かれ、*cybb* 遺伝子の発現量が単純に活性酸素能と相関しないことが示された。このことは、レトロウイルスベクターを用いて *cybb* 遺伝子を導入する場合、比較的強めのプロモーターを用いて、その発現を誘導する必要があることがわかった。

3) 抗ヒト gp91phox 抗体に対する ELISA プレートの作成(梨井)

CGD 患者では、*cybb* 遺伝子の転写産物である gp91phox が完全に欠損している場合があり、このような患者に対し *cybb* 遺伝子導入細胞を投与した場合、患者体内で gp91phox に対する抗体あるいは細胞傷害性 T 細胞を誘導する可能性がある。ただ、血清中の抗 gp91phox 抗体を検出する ELISA 法が確立されていないため、その詳細は不明である。今回、抗 gp91phox 抗体を検出する ELISA プレートの作製を試みた。

抗原としての gp91phox は GST との fusion protein (GST-GP91) としてカイコ蛹を用いて作製した。抗原検出に用いた抗体は anti-gp91-phox (CL5) antibody (SANTA CRUZ) であり、この抗体を 96 well プレートに固層化し、ELISA プレートを作製した。今後は、健康人および患者検体を用いて血清中の抗 gp91phox 抗体を測定する予定である。

4) 治療ベクターの染色体挿入が近傍遺伝子の発現に与える影響の解析(小野寺)

遺伝子治療において、治療ベクターの染色体挿入による造血系異常の発症が大きな問題となっているが、本研究では、染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有する遺伝子改変マウスより発症したリンパ腫を解析することで、ベクター挿入による腫瘍発症機序を解析した。

発症したリンパ腫は IgM、B220、CD5 陽性の B リンパ腫で、ベクター挿入部位近傍遺伝子のドーパミン受容体 3 (D3) 遺伝子がリンパ腫において高発現していた。ただ、この D3 遺伝子を正常骨髄細胞に導入させてもリンパ腫は発症せず、同細胞に抗アポトーシス遺伝子の Bcl-xL 遺伝子を共発現させたときのみリンパ腫は発症した。このことから、遺伝子治療臨床研究で見られる腫瘍発症の機序は、単にベクター挿入による近傍遺伝子の発現異常によるものではなく、これら変化に伴う他の遺伝子異常が second hit として作用する必要があることが示唆された。

5) 染色体非組み込み型ベクター用組織特異的プロモーターの検討(久米)

遺伝子治療臨床研究において、染色体挿入ベクターによる造血系異常の発症が問題となっているが、今回、染色体の挿入によらず導入遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を用い、AAV における至適組織プロモーターを骨格筋を標的に解析した。

筋特異的プロモーターとして筋クレアチンキナ



ーゼ(MCK)プロモーターを用い、対照としてサイトメガロウイルスプロモーター(CMV)を用いた。これらプロモーターの下流にヒト凝固第 IX 因子(FIX)遺伝子を挿入し、これら遺伝子を発現する AAV ベクターをマウス後肢筋に投与したところ、遺伝子発現等に関して、両者に有意な差を認めなかった。このため、AAV ベクターの至適組織プロモーターを、再度、検討する必要があることがわかった。

## 6) 先天性代謝異常症への肝細胞遺伝子治療の可能性の検討(奥山)

ライソゾーム病に対する遺伝子・細胞治療法を確立するため、ライソゾーム病の一つであるムコ多糖類モデルラットに対する肝臓移植の有効性を移植後の代謝動態を解析することで評価した。

MPR ラットは *arsb* 遺伝子に一塩基が挿入していることで正常アシルスルファターゼ  $\beta$  が欠損し、ヒトムコ多糖症 VI 型と同様、尿中ウロン酸の高値、顔貌異常、関節拘縮、骨病変をきたすラットである。この生後 3 ヶ月の MPR ラットに同月齢の正常ラット肝臓を移植し、その後の尿中ウロン酸及び各臓器のアシルスルファターゼ  $\beta$  酵素を測定した。その結果、移植後の尿中ウロン酸値は著しく減少し、肝臓のアシルスルファターゼ  $\beta$  活性値は正常ラットとほぼ同程度となった。ただ、脳、脾臓、腎臓のアシルスルファターゼ  $\beta$  活性は低値のままであったことから、移植肝臓から分泌されたアシルスルファターゼ  $\beta$  は罹患ラットの各臓器に十分に取込まれないか、血中への酵素分泌が不十分であったかが示唆された。

## 2. 臨床的研究

### 1) 炎症性腸炎を併発した X 連鎖慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植の有効性の検討(有賀)

CGD に対する根治療法として HLA が一致した造血幹細胞移植が上げられるが、移植時に重症感染症を罹患しているなど必ずしも幹細胞移植が適応とならない症例がある。今回、重度の炎症性腸炎を併発した X 連鎖 CGD 症例に対し造血幹細胞移植を行い、その安全性及び有効性を検討した。

症例は 1 年以上の重度の炎症性腸炎を併発している 9 歳の X-CGD 症例で、一座不一致の臍帯血を用いて幹細胞移植を行った。前処置として BU、CY、ALG を用い、GVHD 予防として CsA + mPL の投与を行った。移植した CD34 陽性細胞は、 $1.1 \times 10^5/\text{kg}$  と少量であったが、移植細胞の生着(好中球  $> 500/\mu\text{l}$ )は day21 までに認められ、100%ドナー型であることが確認された。興味ある

ことに炎症性腸炎は前処置を行った段階から改善傾向が認められた。急性 GVHD は stage III であり、MTX の投与によってコントロールされた。移植後 2 年を経た現在も重度の感染症はなく、炎症性腸炎も認めない。これら結果から、重度の感染症の場合は、移植自体の危険性が増し、容易に幹細胞移植を行うことが出来ないが、炎症性腸炎の場合は、その発症機序に免疫系が関与している可能性もあり、強力な前処置が逆に免疫系を抑え、症状を軽減した可能性が示唆された。

### 2) 慢性肉芽腫症造血幹細胞移植における死因の検討(布井)

前述のように、CGD の根治療法は HLA 一致造血幹細胞移植であるが、CGD の場合、T 細胞など患者の免疫系が比較的正常に保たれていることが多く、移植に際して強力な前処置が必要となる。ただ、この強力な前処置は重度の感染症に罹患している患者にとっては極めて侵襲的であり、時に移植関連の死亡原因ともなる。本研究では、我が国で行われた造血幹細胞移植において死亡した症例の死因を検討した。

対象は食細胞機能研究会に登録された移植例 34 例であり、調査票を用いて解析した。死亡例は初回移植で 6 名、拒絶例での再移植で 1 名の合計 7 名で、うち 2 名は生着不全、4 名は移植片生着にもかかわらず感染症により死亡した。残り 1 名は移植後 5 年目に横紋筋肉種にて亡くなっている。死亡例は全て 15 歳以下であり、生着不全の原因として潜在的な感染症の存在、HLA 不一致、直前までの IFN- $\gamma$  投与が考えられた。生着後の死因としては、二次性腫瘍発症(横紋筋肉種)、肝中心静脈閉塞(VOD)、移植関連微小血管障害(TMA)、間質性肺炎、多臓器不全などが考えられた。

### 3) Flowcytometry を用いた慢性肉芽腫症の病型診断(小林)

CGD は、現在、遺伝子解析から 5 型に分類されているが、特に gp91phox 欠損型や p22phox 欠損型は、他の遺伝子の欠損型より重症化しやすい。これら異なる病型の CGD を患者末梢血細胞を用いた flowcytometry にて鑑別できるかを検討した。

PMA にて刺激した患者末梢血細胞の活性酸素能を、DHR を用いた flowcytometry にて解析したところ、gp91phox 及び p22phox 欠損型では DHR 還元により蛍光を発する細胞集団は全く確認されなかったが、細胞内因子である p67phox、p47phox 欠損型では軽度であるが蛍光を発する

細胞集団を確認することができた。これらのことから、p67phox、p47phox 欠損型ではある程度、DHRを還元する能力があることが示され、患者末梢血細胞を用いた flowcytometry にて病型を分類できることが示された。

#### 4) 諸外国の慢性肉芽腫症遺伝子治療の現状 (岡田・小野寺)

現在まで CGD に対し造血幹細胞遺伝子治療を行っている研究者より遺伝子治療臨床研究の情報を入手した。それによると、米国の Malech 博士 (NIH) らは 3 名の患者に対して遺伝子治療を行い、2 名の患者において肝膿瘍や肺膿瘍などの難治性感染症の治癒を確認している (Blood 115: 783-791, 2010)。英国の Thrasher 博士 (英国) らは 4 名の患者に対して遺伝子治療を行い、2 名の患者で治療効果を確認している。ドイツの Grez 博士らは 4 名の患者に対して遺伝子治療を行い、全例で治療効果を確認している。また、Kim 博士 (韓国) らは 2 名の患者に遺伝子治療を行っている。有害事象に関しては、ドイツの症例で monosomy 7 を伴う MDS を発症しており、その原因として使用したレトロウイルスベクター (SFFV 由来ベクター) が関与していると報告している (Nat Med 16: 198-204, 2010)。

#### 5) NIH・国立アレルギー感染症研究所との共同研究 (小野寺)

NIH 国立アレルギー感染症研究所の Harry L. Malech 博士の開発した MFSGsp91 ベクターの quality control (QC) に関する書類を入手し、主任研究者である Elizabeth Kang 博士と実際のプロトコルの比較検討を行った。米国 NIH では、CGD に対して 1995 年から MFGS ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を行っており、2006 年以降の遺伝子治療臨床研究では、遺伝子導入細胞の生着のための骨髄間隙をつくるために体重あたり 10mg の busulfan を投与するプロトコルに変更し、現在まで 3 名中 2 名の患者において重症感染症の改善を見ている。国立成育医療センターでの遺伝子治療では、Malech 博士らが使用している MFGS ベクターを使用する予定である。

#### 6) X-CGD 遺伝子治療臨床研究実施計画書等の作成 (藤本、岡田、小野寺)

X-CGD 遺伝子治療臨床研究の実施に必要な「遺伝子実施計画書」、「患者説明書・同意書」、ならびに遺伝子組換え生物等の使用等の規程による生物の多様性の確保に関する法律に基づく「第一種使用規程承認申請書」を作成し、平成 22

年 1 月 22 日に国立成育医療センターの政策医療企画課に提出し、実施に向けた審議が開始された。

本研究開始当初は、ドイツ Grez 博士らとの共同研究のもと SFFV 由来の SFgp91 を使用する予定であったが、前述のように遺伝子治療を受けた患者において MDS のような造血系異常を発症したため、現在までこのような造血系異常を発症していない Malech 博士らの MFGS ベクターを治療ベクターとし、このベクターを用いた実施計画書 (資料 1) と同意書 (資料 2) ならびに遺伝子組換え生物等の使用等の規程による生物の多様性の確保に関する法律に基づく「第一種使用規程承認申請書」 (資料 3) を作成した。

#### 7) 実施に向けた準備 (藤本、掛江)

遺伝子治療臨床研究の実施に向け以下の準備を進めてきた。

##### ・遺伝子導入室

昨年までに研究所内に遺伝子治療専用の培養室を整備し、バイオハザード、インキュベータ、遠心器等を備えるクラス 1 万程度の培養室、前室、器材等保管スペース等を設置した。本年度は、CD34 陽性細胞分取装置を始め、フローサイトメトリー、ディープフリーザー、液体窒素タンク等の機器整備を進め、必要な機器はすべて揃った。

##### ・遺伝子治療倫理委員会

国立成育医療センターにはすでに遺伝子治療倫理委員会が設置済みであるが、今般、委員の任期が終了することを考慮し、委員の選考を実施し委嘱を完了した。なお、委員会の構成は「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に従った。

#### 8) 倫理面への配慮

アンケート調査等に関しては、連結可能な匿名化による管理を行い、個人情報保護法を遵守し、また、一般研究にあつては臨床研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守した。動物実験に関しては、3R の原則を遵守し、動物愛護に心がけ、遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え実験等の規則に関わる法律、省令、告示を遵守した。また、実際の遺伝子治療臨床研究の実施に関しては、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」 (文部科学省、厚生労働省) に基づき、準備を進めている。

## C. 考察

1990 年 ADA 欠損症に対して始まった遺伝子治療は、2000 年の X 連鎖重症複合免疫不全症



に対する trial より実質的な臨床成果を示すようになり、その後の ADA 欠損症、CGD、ウイスコット・アルドヒッチ症候群 (WAS) に対しても有効な治療成績を上げるに至った。特に、2010 年、代謝異常により脱随症状を呈する副腎白質ジストロフィー (ALD) に対する遺伝子治療に至っては、これまで原発性免疫不全症に限られていた造血幹細胞遺伝子治療の有効性を神経系、代謝系疾患まで拡張した感があり、今後、サラセミナなどの血液系疾患を含め、その対象疾患は拡大していくと思われる。

ただ、実際の造血幹細胞遺伝子治療の実施状況を鑑みると、その大多数は欧米を中心に行われたものであり、我が国で行われたものは 2004 年の ADA 欠損症のみである。これは、単に我が国の遺伝子治療に関する技術の後れを意味するのではなく、遺伝子治療を支える全体のインフラが欠如していることも意味しており、その意味で、今回の CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療が、国立成育医療センターが中心となり、実際に免疫不全症を診察している多くの臨床医や遺伝子治療学、血液学、免疫学、遺伝学を専門とする医師や研究者が一堂に会して行うことを考えると、その意義は極めて大きい。そして、本研究においては、単に CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療を行うだけでなく、そこから得られた技術、情報を基に遺伝子治療実施のためのネットワークを構築することも目標の一つとなっている。

当初の計画ではドイツ Grez 博士らのウイルスを使用する予定であったが、治療を受けた患者において造血系異常の発生という重篤な有害事象を発生した。このため、当初より作成していた実施計画の大幅な変更を余儀なくされたが、NIH の Malech 博士らとの共同研究の機会を得、現時点まで造血系異常という有害事象を発生していないウイルスベクターを入手することができ、それに基づいて実施計画書を改訂して、平成 22 年 1 月 22 日に当センターの政策医療課に提出した。今後、実施計画書は当センター内の遺伝子治療審査委員会にて審議され、了承後は厚生労働省・厚生科学審議会・遺伝子治療臨床研究作業委員会に審議の場が移り、最終的な了承を厚生労働大臣より得た後に造血幹細胞遺伝子治療を開始したと考えている。

今年も遺伝子治療臨床研究の実施に向け、複数の研究を併行して行ったが、特に重要なのはベクター挿入部位近傍遺伝子の発現異常により発生したリンパ腫の解析であろう。現在、レトロウイルスベクターの染色体挿入による白血病の発症が周知されているが、レトロウイルスベクター単独

の染色体挿入によって白血病が発生するかは不明である。今回、染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有するマウスにおいて発生したリンパ腫はその原因としてプロウイルスがドーパミン受容体 3 (D3) に挿入することで D3 が異常に発現したことが考えられた。ただ、正常骨髄に D3 を強制発現させてもリンパ腫は発生せず、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-xL を共発現させることでリンパ腫は発生した。このことは、レトロウイルスの挿入だけで白血病等の造血系腫瘍が発生するのではなく、固形腫瘍と同様、D3 の高発現が引き金となってなんからの増殖誘導がおこり、その結果、second hit としての他の遺伝子異常が生じた可能性が考えられた。現時点で、何が second hit として作用しているかは不明であるが、リンパ腫の microarray の結果から細胞周期に関与する複数の遺伝子の発現増加が確認されていることから、D3 と細胞周期に関与する遺伝子の異常から今回の腫瘍が発生したと推論できた。逆にこの結果は、現在、レトロウイルスベクターより安全と考えられているレンチウイルスも染色体挿入ベクターであることから腫瘍発症の危険性は回避できず、十分な注意のもと遺伝子治療を行わなければならないことを示唆している。

また、臨床的研究において重要な研究は、重篤な炎症性腸炎を呈した慢性肉芽腫症患者への造血幹細胞移植の報告であろう。CGD における炎症性腸炎の発症機序は不明な点が多いが、現在、その発症原因は単に腸管における感染症の遷延ではなく、T 細胞を含めた自然、獲得両免疫系が関与していると考えられている。特に、IDO-キヌレリン系が関与する DC-T 細胞系の異常が考えられており、また、一部の免疫不全症で見られる炎症性腸炎に抗 TNF $\alpha$  抗体が有効であることから、その発症の機序に免疫系が強く関与していることが示唆されている。今回、移植に際して使用した強力な免疫抑制剤 (ATG) より炎症性腸炎が回復したことを考えると、炎症性腸炎を伴う CGD に対する幹細胞移植は積極的に行うべきものであり、その結果から免疫不全に伴う炎症性腸炎の発症機序が解明される可能性がある。

最近、今回の共同研究者である Malech 博士のグループから CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の結果が学術雑誌に報告された (Blood 115: 783-791, 2010)。それによると、治療を受けた患者において肝膿瘍あるいは肺膿瘍の治癒が観察され、1 例では 4 年を越えた現在でも末梢血中に 1% 程度に遺伝子導入細胞を確認している。逆に、異なるベクターを用いて遺伝子治療を行ったドイツ Grez 博士からも造血系異常 (MDS) のメカニズム

が報告された(Nat Med 16: 198-204, 2010)。それによると、使用した SFFV の 5'LTR 領域にある promoter/ enhancer の promoter 領域にメチル化が起り、治療遺伝子である *cybb* 遺伝子の発現は消失したが、enhancer 領域にはメチル化が起らなかったため、挿入部位近傍の MDS1 の活性化が継続して起り、腫瘍が発症したとした。これらのことを総合的に考えると、造血幹細胞遺伝子の安全性・危険性は、使用するベクター、培養条件、染色体の挿入したプロウイルス数とその場所、さらには治療を受ける患者の状態に大きく左右され、一元的にその危険性を判断することは困難であり、最終的には、患者の risk/ benefit balance を十分に勘案して遺伝子治療を実施していくことが重要であり、そこから得られた臨床結果の積み重ねが新たな治療法の開発に結びつくと考えられた。

#### D. 結論

小児難治性先天異常症の根治的治療法としての幹細胞遺伝子細胞療法に関し、慢性肉芽腫症をその対象疾患として、前臨床研究及び臨床研究を行った。その結果、

##### 1. 基礎的研究として

標的となるヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の確立、慢性肉芽腫症造血幹細胞の特性の解明、抗 gp91phox 抗体検出系の道筋、ベクター挿入部位近傍遺伝子の発現異常による造血系への影響、などの知見が得られた。

##### 2. 臨床研究として

CGD に関する造血幹細胞移植に関する情報、国立成育医療センターを含む我が国の CGD に関する状況、諸外国の CGD に対する遺伝子治療臨床研究の情報、などが得られた。

今後はこれらの情報を基に、Malech 博士より供与される MFSGS ベクターを用いた CGD に対する遺伝子治療臨床研究を行う予定である。

#### E. 健康危険情報

ドイツ・フランクフルト大学の Grez 博士が開発し、ドイツ、スイスで行われた 4 例の SF71gp91 ベクターによる慢性肉芽腫症遺伝子治療において、2 例に 7-モノソミーの染色体異常を伴った骨髄異形成症候群が発症し(昨年、厚生労働省母子保健課及び厚生科学課健康危機管理室へ文書で報告)、その他の 2 例においても造血系異常は認めないが単クローン性の細胞増殖を認めている(Grez 博士からの私信)。

#### F. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

遺伝子治療臨床研究に必要な予備実験の実施

研究分担者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： レトロネクチンを用いたヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入において、インテグリンの発現誘導が必須であること、この導入系においてヒトCD34陽性細胞にインテグリンの発現を誘導し、十分なレトロウイルスベクターの導入効率を維持するためには、SCFとTPOの2者のサイトカインの組合せが重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

多くの小児遺伝性疾患はいまだ有効な治療手段に乏しい難治性疾患である。原発性免疫不全症候群や先天代謝異常症の一部では、酵素補充療法や造血幹細胞移植のような高度先駆の治療法が開発され、その有用性が報告されているが、治療自体の副作用によって死に至る場合もあり、より安全な治療法の開発が必要である。一方、これまで停滞気味であった遺伝子治療法は、幹細胞生物学の進歩や遺伝子導入用ベクターの改良により、小児難治性疾患の有望な治療法として急速に再認識されつつある。しかも、遺伝子治療法は、基本的に自家骨髄移植であることからアロ造血幹細胞移植に伴う重篤なリスクやドナー選択の問題を回避できる点で、安全性が高い治療法と考えられる。また、酵素補充療法に伴う頻回の通院などの煩雑さや膨大な医療費の支出を回避することが可能であり、経済的なメリットも大きい。しかし、わが国において幹細胞遺伝子治療の臨床研究が可能な小児医療施設はほとんど皆無であり、小児医療を担当するナショナルセンターとして国立成育医療センターがその機能を果たすことが期待されている。

本研究では、成育医療センターを中心とした遺伝子治療臨床研究体制を整備し、難治性小児先天性疾患治療の現状を劇的に改善するための研究の一環として、特に慢性肉芽腫症（CGD）を対象とした遺伝子治療実施を目指した前臨床試験の施行と、フォローアップに必要な検査技術の確立を目的とする。また、幹細胞遺伝子細胞治療法全般に応用可能な、効率的な遺伝子導入法の検討や造血幹細胞の生物特性解析等の基盤研

究を合わせて実施する。

レトロウイルスは、標的細胞が分裂する過程でそのゲノム遺伝子に自己のゲノム遺伝子を組み込ませることによって感染するため、同ウイルスをベクターとして利用する遺伝子導入では、ウイルスが標的となる細胞に対して効率的に結合するとともに、標的細胞が細胞周期に入っていることが必要条件となるが、現状では、造血幹細胞を試験管内で、未分化性を保ったまま増幅させることは困難である。そこで、本研究では、造血幹細胞の未分化性を最大限維持しつつ、その増殖をうながし、かつ、効率的にウイルスを吸着させるための培養条件について検討を行っている。

昨年度までに、骨髄、臍帯血、末梢血の3つのソースに由来するCD34陽性細胞の造血幹細胞/前駆細胞の細胞特性について、表面抗原の観点からみた場合にそれぞれ異なった特徴を有することを明らかにし、レトロネクチンを用いたヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入において、インテグリンの機能が必須であることを確認した。今年度は、上記レトロウイルスベクターの導入系において、ヒトCD34陽性細胞にインテグリンの発現を誘導してウイルスベクターの導入効率を維持するために必須のサイトカインカクテルについての検討を行った。

B. 研究方法

CD34陽性細胞は、米国Lonza社からインフォームドコンセントを得た上で市販されている骨髄、臍帯血、G-CSFによって誘導した末梢血由来の分離精製済みのもの、および東京臍帯血バンクから提供された臍帯血

(倫理審査承認済み)よりマグネットビーズ法(MACS Magnetic Cell Separation System, Miltenyl Biotec社)により分離したものをを用いた。

Green Fluorescence Protein(GFP)遺伝子導入用ウイルスは、パッケージング細胞の培養上清を回収して、フィルターをかけた上で使用した。gp91遺伝子導入用のレトロウイルスベクターは、調製済みのものをドイツEufets社から購入して用いた。ウイルス感染の方法としては、標的細胞へのウイルス吸着促進のため、遺伝子改変ファイブロンネクチン(レトロネクチン)コート培養プレートへウイルスを固層化させる方法を用いた。CD34陽性細胞については、融解あるいは分離後、ただちにサイトカインカクテル(SCF, TPO, FLT3L, IL6+sIL6Rの5者併用、あるいはこれらの様々な組合せ)添加無血清培地で培養を開始、48時間の前培養の後、72時間ウイルスを感染させた。

コロニーアッセイは、レトロウイルス感染後のCD34陽性細胞をサイトカイン添加メチルセルロース培地Methocult<sup>TM</sup> GF+H4435 (Stem Cell Technologies Inc.)に播種して行い、1-2週間の間に、単一コロニーを、パスツールピペットを用いて回収し、常法によってゲノムDNAを抽出した。また、21日後に50細胞以上のコロニー数を算定した。

GFP導入用ベクターの感染効率はフローサイトメトリーを用いて測定した。gp91導入用ベクターの感染効率は、ウイルス骨格の部分とgp91のcDNA内の塩基配列から設計したプライマーを用いたゲノムPCRで検討した。

インテグリンおよび細胞表面抗原の発現は、蛍光標識した各抗原に対する特異抗体を用いてフローサイトメトリーによって解析した。

### C. 研究結果

現在、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法には、組み換えレトロネクチンが必須のウイルス導入補助剤として用いられている。レトロネクチンは、レトロウイルスを吸着するとともに、インテグリンとの結合によってヒト細胞とも接着するため、ウイルスの感染効率を高めると考えられているが、ヒトCD34陽性細胞における実際の作用については明らかではない。昨年度までの検討で、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞に対するGFP遺伝子発現用レトロウイルスベクター導入について、レトロネクチンが存在しないと、ほとんど導入されないことを明

らかにしたが、今年度は、これをさらにコロニーアッセイによって確認した。

一方、昨年度までに、分離直後のCD34陽性細胞ではVLA4、VLA5いずれも発現が非常に弱いものの、サイトカインカクテル添加培養の間にその発現が著しく増強すること、レトロネクチン存在下では、発現増強したインテグリンのうち特にVLA4の発現がダウンレギュレーションされること、この導入系に対して、インテグリンとフィブロネクチンの結合を阻害する作用をもつ抗VLA-4抗体、および抗VLA-5抗体、を添加することによって導入率が優位に低下し、かつ両者を同時に添加することで協調的な抑制作用が認められることを明らかにした。そこで今年度は、CD34陽性細胞にインテグリンの発現を誘導するのに必須のサイトカインの組み合わせについて検討した。

SCF, TPO, FLT3Lの単独投与およびIL6+sIL6R投与によってCD34陽性細胞にGFP遺伝子導入用レトロウイルスの導入を行なったところ、全5者併用との比較では、それぞれインテグリンの発現やウイルス導入効率は著しく低かったが、4種類のサイトカインの中ではSCFとTPOが比較的高い水準を示した。そこで、4種類のサイトカインの種々の組合せについて検討した結果、SCFとTPOの組合せによって、全5者併用とほぼ同等のインテグリンの発現とウイルスの導入効率が得られることが明らかとなった。

### D. 考察

現在、レトロウイルスを用いた造血幹細胞への遺伝子導入における誘導培養では、SCF, TPO, FLT3Lに、IL6+sIL6Rを加えた5者併用、あるいはIL-3を加えた4者併用のサイトカインカクテルが一般的に用いられている。しかし、昨年度までの検討で明らかにしてきたように、これらのサイトカインカクテルでは、大部分の造血幹細胞が骨髄系細胞へ分化誘導されてしまう。これに対して、今回の検討によって、造血幹細胞にインテグリンの発現を誘導し、十分なレトロウイルスの導入効率を得るためには、上記のサイトカインのうちSCFとTPOの2者で充分であることが明らかとなった。これまでの検討で、FLT3LやIL-3は特に骨髄系細胞への分化誘導作用が強いことが明らかになっており、これらのサイトカインを使用せずに遺伝子導入を行なうことが可能であれば、造血幹細胞をより未分化な状態で維持したまま目的遺伝子を導入して患者に移植することが可能と考えられる。

## E. 結論

レトロネクチンを用いたヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入において、インテグリンの機能が必須であることが確認され、今後SCFとTPOの2者併用を中心とした新たなサイトカインカクテルの組合せを検討することによって、造血幹細胞の未分化性を維持しつつ、より効率的にインテグリンの発現を誘導し、高いレトロウイルスベクター導入効率達成できる遺伝子導入法の確立が期待される。

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N. Kinetics and Effect of Integrin Expression on Human CD34(+) Cells during Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy. Hum Gene Ther. 2009 Jul;20(7):777-83.

2) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. Immunology. 2009 Nov;128(3):405-19.

### 2. 学会発表

1) Kiyokawa N, Onda K, Imadome K-I, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Morio T, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12月2日-4日, 2009.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他



分担研究報告書

先天異常症に対する遺伝子・細胞治療法の開発と臨床応用  
における遺伝子検出システムの確立に関する研究

分担研究者 梨井 康  
国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部 移植免疫研究室

研究要旨: GP91 抗体の検出に必要とされる GP91 fusion protein を作成した。これを抗原として、市販 GP91 抗体との反応を検討した結果、良好な反応が確認できた。また、GP91 抗体濃度として 1ng/mL まで検出が可能となった。今回の反応条件を用いることでヒト血清中 GP91 抗体の高感度検出の可能性が示唆された。

A. 研究目的

欧州を中心に遺伝子治療が実施されていた X 染色体連鎖性慢性肉芽腫症 (XCGD) 患者において、遺伝子導入細胞と活性酸素産生能細胞の乖離が治療後の重要な問題とされている。CGD 患者は、GP91 遺伝子欠損による好中球の機能が障害されているが、T、B、樹状細胞を含めた他の免疫細胞が機能しているため、導入遺伝子により発現された GP91 蛋白質に対する特異的な抗体が出来、GP91 蛋白質発現細胞の排除によるものの可能性が否定できない。

昨年度の分担研究では、検出抗原として、GP91 蛋白質の細胞外ドメイン 2 つのリコンビナントタンパク質 #2 (124-169)、#3 (226-261) の作成ができたが、回収率の悪さ、不溶化の問題等があった。本年度の研究は、その結果を踏まえて、His タグから GST タグに作り換えて、より大きいタンパク質の作成を試みた。また、出来た GST-GP91 fusion protein を抗原として使い、GP91 抗体診断用 ELISA キットの構築を行った。

B. 研究方法

1) GP91 fusion protein の作成

GST タグのタンパク質発現ベクターを構築し、遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹より、そのタンパク質の発現を確認後、生産、精製、クオリティーチェックを行った。

2) GP91 fusion protein と抗体との反応確認

血清中の GP91 抗体を検出するための基礎検討として、GP91-GST fusion protein を用いたマイクロプレート ELISA による市販 2 種類の抗 GP91 抗体 (SANTA CRUZ 社製 Anti-gp91-phox (CL5) antibody (Code. Sc-130549) : Anti gp91 (CL5) ; MBL 社製 Anti Flavocytochrome b558 (Code. D162-3) : Anti Flav) との反応を試みた。GP91 fusion protein と抗体との反応性について確認した。

3) Anti GST 抗体固相マイクロプレート作製

プレートコーティング用 Anti GST 抗体溶液 (GE Healthcare 社製

Code. 27-4577-01) を CB 溶液に加えて 5  $\mu$ g/mL に希釈した後、マイクロプレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注した。冷蔵で一晩静置した後、洗浄液で 3 回洗浄後に、PBS-BSA 溶液 200  $\mu$ L を各ウェルに分注し冷蔵保存、測定時に PBS-BSA 溶液を除き使用した。

#### 4) ELISA 測定系の構築

Anti GST 抗体固相マイクロプレートに、PBST で 10, 100, 1000ng/mL に希釈した GP91 タンパク溶液を 100  $\mu$ L ずつ分注した。25°C で 1 時間反応後、洗浄液で 5 回洗浄した。PBST で 200ng/mL に希釈した Anti GP91 抗体溶液を各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注し、25°C で 1 時間反応後、洗浄液で 5 回洗浄した。Anti Mouse HRP (Anti Mouse immunoglobulin antibody - HRP conjugate MP bio 社製 Cat. 5554) 溶液 (10,000 倍希釈) を各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注した。25°C で 1 時間反応後、洗浄液で 5 回洗浄した。酵素基質溶液を 100  $\mu$ L ずつ加え、25°C で 10 分間反応した。反応停止液を 100  $\mu$ L ずつ加え、マイクロプレートリーダーで主波長 450nm、副波長 630nm における吸光度を測定した。

上記 ELISA 測定系を用いて、Anti GST 抗体のマイクロプレートへの固相濃度、GP91 fusion protein、Anti GP91 抗体反応時間、濃度による反応への影響及び GP91 抗体検出感度等について検討を行った。

### C. 研究成果

#### 1) 発現ベクター構築

タンパク質発現ベクターを構築するために、GP91 protein の 3 種類の細胞外ドメインのうちの #2 (124-169) を選択し、GST タグを用いて、図 1 で示したタンパク質発現用ベクターを構築した。

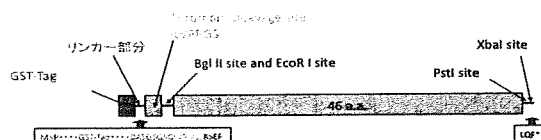


図 1. タンパク質発現ベクター

#### 2) タンパク質の生産および精製

遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹を、磨砕・可溶化処理後に超遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分を分離し、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで、目的のタンパク質の量や質の確認を行った。その結果、図 2 で示したように、SDS-PAGE (CBB染色) および抗GST抗体によるウェスタンブロットで結果、目的のバンドと推測されるものが確認できた。Hisタグと違って、そのほとんどが可溶性画分から検出された。

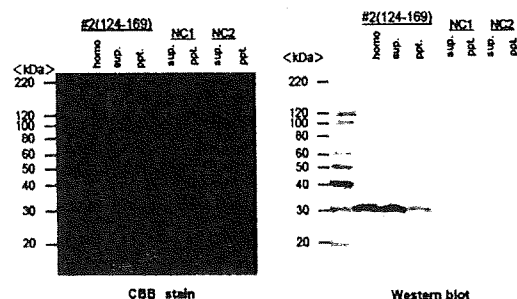


図 2. カイコ蛹磨砕物でタンパク質の確認

生産できた GP91 fusion protein をニッケルカラムにて精製を行った。精製後、SDS-PAGE およびウェスタンブロットでタンパク質の量と質を確認したところ、図3で示したように、lane4の目的タンパク質が高純度で精製されていることが確認できた。

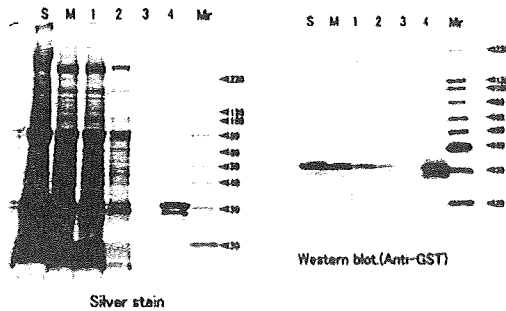


図3. 精製タンパク質の確認

### 3) GP91 fusion protein と市販抗 GP91 抗体との反応確認

GP91 fusion protein を 100, 1000ng/mL の濃度で調製し、ELISA 測定方法にて2種類の市販抗体 (Anti gp91(CL5)および Anti Flav) と GP91 fusion protein との反応性を確認した結果、図4で示したように、SANTA CRUZ 社製の Anti gp91(CL5)抗体は良好な結合を示したが、MBL 社製の Anti Flav 抗体は反応を認めなかった。以下の検討において、SANTA CRUZ 社製 Anti gp91(CL5)抗体を用いて評価を行うこととした。

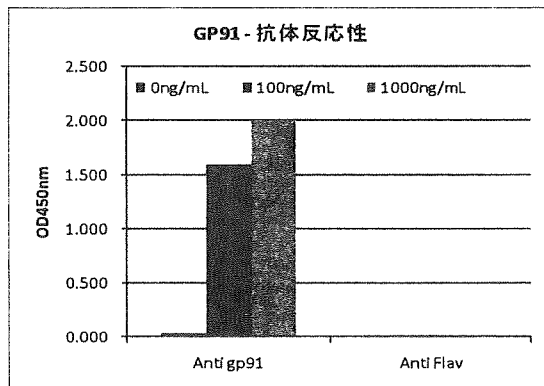


図4. 作成した抗原と市販抗 GP91 抗体の反応性

### 4) Anti GST 抗体のマイクロプレートへの固相濃度による影響

Anti GST 抗体 固相マイクロプレート作製において抗体濃度を 1.25, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  として影響を比較した。図5で示したように、固相抗体濃度として5  $\mu\text{g/mL}$  以上で、ほぼ一定の吸光度を示した。

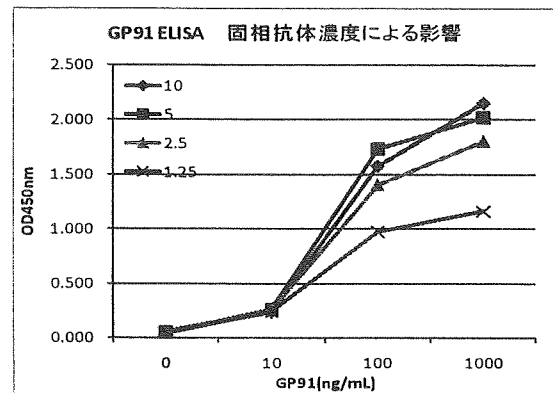


図5. ELISA 固相抗体濃度による影響

### 5) GP91 fusion protein 反応時間による影響

ELISA 測定方法にて GP91 fusion protein 反応時間を 30, 60, 120 分間とした場合の影響を比較した。GP91 fusion protein の反応時間について比較した結果、30分~120分で徐々に吸光度の上昇が認められた。60分(1時間)で十分な吸光度が得られていることが分かった(図6)。

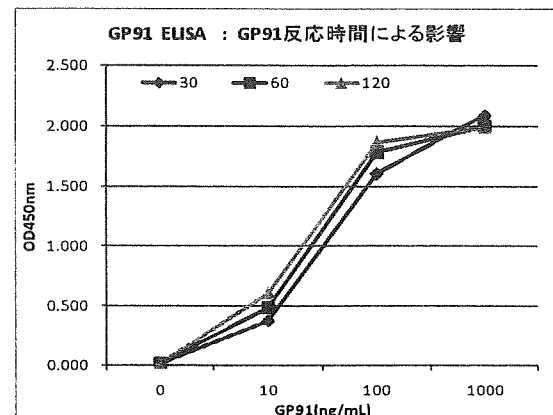


図 6 . GP91 反応時間による影響

6) Anti GP91 抗体反応時間による影響

ELISA 測定方法にて Anti GP91 抗体反応時間を 30, 60, 120 間とした場合の影響を比較した。Anti GP91 抗体の反応時間について比較した結果、30 分~120 分で徐々に吸光度の上昇が認められた。60 分 (1 時間) で十分な吸光度が得られている (図 7)。

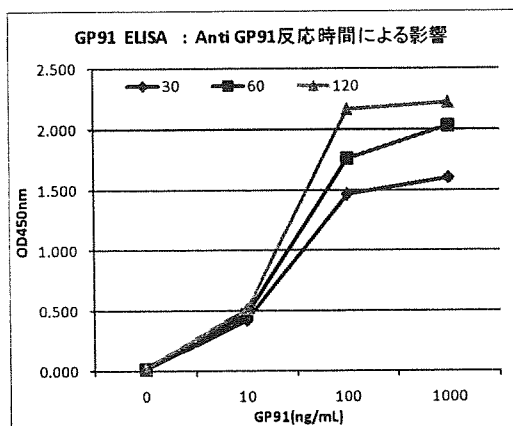


図 7 . 抗 GP91 抗体反応時間による影響

7) Anti GP91 抗体濃度による影響

ELISA 測定方法にて Anti GP91 抗体濃度を 125, 250, 500, 1000ng/mL とした場合の影響を比較した。図 8 で示したように、Anti GP91 濃度として 125ng/mL においても十分な吸光度が得られた。

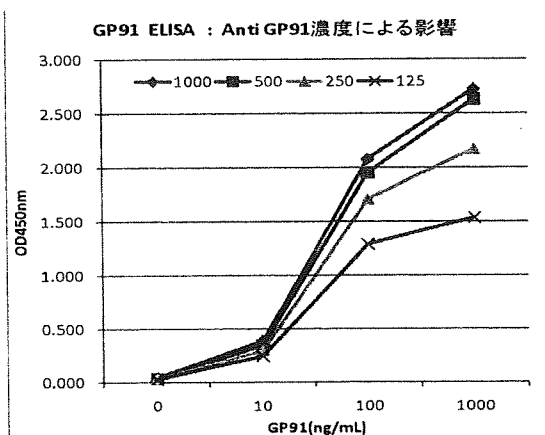


図 8 . 抗 GP91 抗体濃度による影響

8) GP91 抗体検出感度の検討

ELISA 測定方法にて固相する GP91 fusion protein 濃度を 100, 1000ng/mL の 2 種類とし、Anti GP91 抗体濃度について 0.78 ~ 800ng/mL の範囲で測定を行い検出感度について比較した。GP91 抗体として 1ng/mL までの検出が可能であることが示された (図 9)。

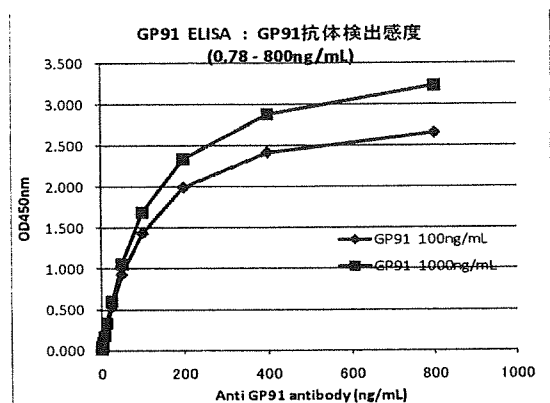
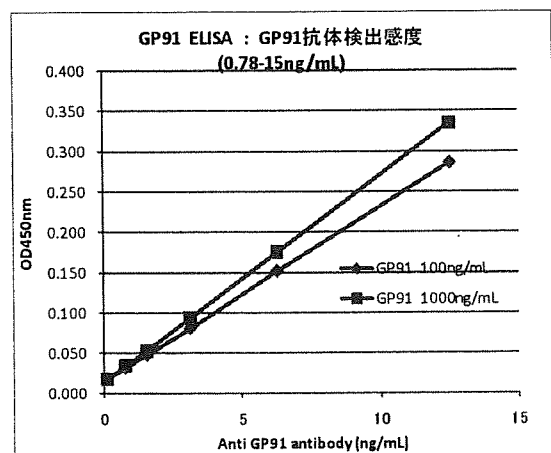


図 9 . GP91 抗体検出感度

また、固相する GP91 fusion protein 濃度を 100ng/mL と 1000ng/mL で比較した場合、GP91 抗体が高濃度において 1000ng/mL で吸光度が高くなるがどちらも傾きはゆるやかで定量性は変わらないと判断した (図 10)。



## 図 10. GP91 抗体検出感度

### D. 考察

CGD 患者の遺伝子治療後導入遺伝子により発現された GP91 蛋白質に対する特異的な抗体を検出する手段がないため、本研究では GP91 蛋白質細胞外のドメインの一部を抗原として作成して、ELISA にて GP91 蛋白質に対する特異的な抗体の簡便な検出方法の開発を試みた。

昨年度の研究で、作成した 2 つ GP91 蛋白質細胞外のドメインのリコンビナントタンパク質は、比較的高純度で精製することができたが、回収率は悪かった。また、不溶化の問題が残っているため、今回 GST タグに換え、同じ遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹発現系にて、GST-GP91 融合タンパク質を作成した。カイコ蛹を磨砕・可溶化処理後に超遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分を分離してから、目的のタンパク質の量や質の確認したところ、前回の His-GP91 融合タンパク質と違って、そのほとんどが可溶性画分であった。

精製できた GST-GP91 fusion protein を用いて、抗原として使えるかどうかを評価した。まず、GP91 抗体の検出に必要とされる GP91 fusion protein と市販 GP91 抗体 (CloneCL5) との反応を検討した。この抗体は GP91 タンパク質 135-147 の部分を抗原として、マウスに免疫して作られたモノクロー抗体で、我々の抗原部分 (124-169) と合致しているため、良好な反応が確認された。また、ELISA 測定系を用いて、抗 GST 抗体のマイクロプレートへの固相濃度、GP91 fusion protein、抗 GP91 抗体反応時

間、濃度による反応への影響及び GP91 抗体検出感度等について検討した結果、GP91 抗体濃度として 1ng/mL まで検出が可能であった。よって、本研究で作成した GST-GP91 fusion protein は抗原および今回の反応条件を用いることでヒト血清中の GP91 抗体の高感度検出の可能性が示唆された。

遺伝子導入細胞と活性酸素産生能細胞の乖離が遺伝子幹細胞療法における重要な問題とされている。本研究の成果は、今後遺伝子治療を受けた患者のみならず、骨髄移植後患者の幹細胞の永久生着による根治治療法成績の向上、遺伝子医療の確立および発展に資するものである。

### E. 結論

本研究で精製した GP91 fusion protein を用いて、抗原として使えるかどうかを適正評価した。GP91 抗体の検出に必要とされる GP91 fusion protein と市販 GP91 抗体との反応を検討した結果、良好な反応が確認された。また、GP91 抗体濃度として 1ng/mL まで検出が可能であり、今回の反応条件を用いることでヒト血清中の GP91 抗体の高感度検出の可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表:

1) Morita M, Fujino M, Jiang GP, Kitazawa Y, Xie L, Azuma M, Yagita H, Nagao S, Sugioka A, Kurosawa Y, Takahara S, Fung J, Qian S, Lu L, Li X-K. PD1/B7-H1 interaction

contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. *Am J Transplant* 10:40-46; 2010.

2) Kitazawa Y, Fujino M, Li X-K\*, Xie L, Ichimaru N, Okumi M, Nonomura N, Tsujimura A, Isaka Y, Kimura H, Hunig T, Takahara S. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. *Cell Transplant* 18(5): 627-37; 2009. (\*Corresponding author)

3) Xie L, Li X-K\*, Funeshima-Fuji N, Kimura H, Matsumoto Y, Isaka Y, Takahara S. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. *Int Immunopharmacol.* 9(5): 575-81; 2009. (\*Corresponding author)

4) Pan XC, Deng YB, Sugawara Y, Makuuchi M, Okabe M, Ochiya T, Sugiura W, Kitazawa Y, Fuji N, Li X-K, Miyamoto M, Kimura H. Immunological behavior of enhanced green fluorescent protein (EGFP) as a minor histocompatibility antigen with a special reference to skin isograft

and specific regulation of local graft-versus-host reaction (GvHR). *Immunol Lett.* 123(2): 103-13; 2009.

5) Tsuji A.B, Morita M, Li X-K\*, Sogawa C, Sudo H, Sugyo A, Fujino M, Sugioka A, Koizumi M, Saga T. 18F-FDG PET for the Semiquantitative Evaluation of Acute Allograft Rejection and the Immunosuppression Therapy Efficacy in Liver Transplantation Rat Models. *J Nucl Med* 50(5): 827-30; 2009. (\*Corresponding author).

6) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Xie L, Kimura H, Takahara S, Ezaki T, Zhu BT, Li X-K. Prolongation of rat major histocompatibility complex-compatible cardiac allograft survival during pregnancy. *J Heart Lung Transplant* 28(2): 176-82; 2009.

2. 学会発表：  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他