

PE-Cy7 CD38 antibody (Becton Dickinson Code. 335790)

CD133/1 (AC133)-APC antibody (Miltenyi, Code.130-098-829)

・qPCR 用 DNA 抽出試薬: SimplePrep[®] reagent for DNA (TaKaRa Code.9180)

・レンチウイルスプロウイルスコピー数測定試薬:

Lenti-X Provirus Quantitation Kit (TaKaRa Code.Z1239N)

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time) (TaKaRa Code.6167)

2-2. 主な使用機器

- ・バイオハザード対策用キャビネット (HITACHI, SCV-1307ECIAB3)
- ・CO₂ インキュベーター (Thermo, Forma Direct Heat CO₂ incubator)
- ・遠心機 (TOMY, AX-321)
- ・遠心機 (TOMY, LX-121)
- ・微量遠心機 (TOMY, MX-200)
- ・蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX71)
- ・Flow Cytometer (Becton Dickinson, BD FACSCantoII flow cytometer)
- ・FCM 解析用ソフトウェア (Becton Dickinson, FACSDiva)
- ・Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, TP800)
- ・マルチシェイカー (EYELA, MULTI SHAKER MMS)

3. 方法と結果

3-1. KG-1a 細胞株の培養

10cm Non-tissue culture treatment dish で培養を行なった。KG-1a 細胞株は浮遊細胞のため、培養細胞懸濁液を回収し、遠心分離 (500×g, 5min) により上清を除いた後、10%FBS 添加 RPMI-1640 培地にて再懸濁を行い、細胞数の測定を行った。その後、適当な細胞濃度となるように、10%FBS 添加 RPMI-1640 培地で希釈し、培養を行った。以降、同様に継代し、培養を続けた。遺伝子導入に使用する KG-1a 細胞株は、検討に先立ち、各培地 (X-VIVO10、CellGro-SCGM、GT-T551、および GT-T-RetroIII 培地) にて、1 週間段階的 (20%、60%、100%) に馴化培養を行った後に使用した。

3-2. 生物由来原料非含有培養用培地による遺伝子導入効率の比較評価

生物由来原料基準を満たす培地を用いた遺伝子導入効率の比較評価

3-2-1. CD34 発現細胞株 (KG-1a 細胞株) を用いた遺伝子導入効率評価

【方法】

本検討では、X-VIVO10、CellGro-SCGM、GT-T551 培地および生物由来原料非含有培地としてヒトトランスフェリンを含まない GT-T-RetroIII 培地を使用し比較検討を行った。GT-T-RetroIII 培地は硫酸ストレプトマイシンを終濃度 50µg/ml となるように添加し、以降の試験に使用した。

RetroNectin[®]コーティングプレート (24 well plate) に、希釈したレンチウイルスベクター溶液 (×100 倍) を 1ml/well で添加し、マルチシェイカーにて 4℃ で 16 時間振盪を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製した (RBV-LTS 法)。振盪終了後、1.5% HSA/生理食塩水で 3 回洗浄を行い、遺伝子導入に使用するまで 4℃ で保管した。また、RN コーティングプレートに希釈したレンチウイルスベクター溶液 (×100 倍) を 1ml/well で添加し、32℃、2000×g で 2 時間遠心を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製し、1.5% HSA/生理食塩水で 3 回洗浄を行い、遺伝子導入に使用するまで 4℃ で保管した (RBV-spin 法)。

遺伝子導入時には、上記4種類の培地に加え、GT-T-RetroIII 培地に Insulin Solution を10 μ g/ml で添加した培地 (GT-T-RetroIII+Insulin 培地)を用いた。

遺伝子導入は、RBV-LTS 法、RBV-spin 法により作製したレンチウイルス結合プレートに0.4 \times 10⁶cells/ml の濃度に調整した KG-1a 細胞を1ml/well で添加し、静置により遺伝子導入を行った (RBV-LTS 法、RBV-spin (-) 法)。これに加えて、RBV-spin 法により作製したレンチウイルス結合プレートを用いて、遺伝子導入時 (細胞添加直後) に32 $^{\circ}$ C、1000 \times g で10分間遠心を行うことで、遺伝子導入を実施した (RBV-spin (+) 法)。また、RetroNectin[®]コーティングプレートに、希釈したレンチウイルスベクター溶液 (\times 50 倍) と KG-1a 細胞 (0.8 \times 10⁶ cells/ml) を前述の遺伝子導入法と総細胞量およびウイルス量は等しくなるように混和し、静置により感染を行った (Supernatant 法)。

遺伝子導入48時間後に生物由来原料非含有培地による細胞増殖への影響を検討するため、細胞数の測定を行った。その後、一部の培養細胞を回収し、Flow Cytometry により ZsGreen 陽性細胞率の解析を行った。また、遺伝子導入効率を培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数を測定することにより評価を行った。

【結果】

KG-1a 細胞株の各培地への馴化培養後の細胞形態を添付データ 5-1 に示す。KG-1a 細胞株の馴化培養による明らかな細胞形態の変化は認められなかった。また、遺伝子導入48時間後の培養細胞数の細胞数測定を行った結果、X-VIVO および GT-T551 培地で高い値を示した (添付データ 5-2)。ZsGreen 発現細胞率の測定結果より、遺伝子導入効率は GT-T-RetroIII、GT-T551 培地で、他の培地条件に比べて高い値を示した (添付データ 5-3 及び 5-4)。また、レンチウイルスのプロウイルスコピー数を測定した結果においても、GT-T-RetroIII 培地で高い遺伝子導入効率が認められた (添付データ 5-5)。

3-2-2. ヒト由来 CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入効率評価

【方法】

RetroNectin[®]コーティングプレート (24 well plate) に希釈したレンチウイルスベクター溶液 (\times 50 倍) を1ml/well で添加し、32 $^{\circ}$ C、2000 \times g で2時間遠心を行うことで、レンチウイルス結合プレートを作製し、1.5% HSA/生理食塩水で3回洗浄を行い、遺伝子導入に使用するまで4 $^{\circ}$ C で保管した (RBV-spin 法)。

ヒト由来 CD34 陽性細胞は、細胞播種前に Flow Cytometry による免疫表現型解析を行った。その後、細胞をサイトカイン添加 X-VIVO10 培地、CellGro-SCGM 培地、GT-T-RetroIII 培地、GT-T-RetroIII+Insulin 培地、及び GT-T551 培地 (SCF 300ng/ml、TPO 100ng/ml、Flt3-L 300ng/ml、IL-3 60ng/ml) にて24時間培養を行った。RBV-spin 法により作製したレンチウイルス結合プレートにサイトカイン刺激培養細胞 (0.3 \times 10⁶ cells) を1ml/well で播種し、RBV-spin (-) 法により遺伝子導入を行った。遺伝子導入48時間後に培養細胞数の測定を行った後、培養細胞の一部を回収し、Flow Cytometry により免疫表現型解析 (CD34、CD133、CD38、CD90) 及び ZsGreen 陽性細胞率の解析を行った。また、遺伝子導入効率を培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数を測定することにより評価を行った。

【結果】

ヒト由来 CD34 陽性細胞の Day0 細胞播種時、サイトカイン刺激培養後、及び遺伝子導入48時間後の細胞形態及び ZsGreen 蛍光顕微鏡像を添付データ 5-6、5-7 及び 5-8 に示す。培養細胞の各培地間での明らかな細胞形態の差は認められなかった (添付データ 5-7 及び 5-8)。遺伝子導入48時間後の細胞数の測定結果より、総細胞増殖倍率は CellGro-SCGM 及び GT-T-RetroIII 培地で高い値を示した (添付データ 5-9)。ヒト由来 CD34 陽性細胞の凍結融解直後の免疫表現型解析結果を添付データ 5-10 に示す。遺伝子導入48時間後の培養細胞の免疫表現型解析結果より、CD34、CD90、CD133 陽性細胞率及び CD38 陰性細胞率は、CellGro-SCGM 培地でわずかに高かった

(添付データ 5-11)。CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率については、条件間で明らかな差は認められなかった(添付データ 5-12)。また、ZsGreen 発現細胞の FCM 解析より、GT-T-RetroIII 培地及び GT-T551 培地で遺伝子導入効率はわずかに高い値を示した(添付データ 5-13)。また、ZsGreen 発現細胞中の CD34+CD38-CD133+細胞率及び CD34+CD90+CD133+細胞率も、条件間で明らかな差は認められなかった(添付データ 5-14)。レンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果において、GT-T-RetroIII 培地で高い値を示した(添付データ 5-15)。

3-3. Flow Cytometry 解析

3-3-1. ZsGreen 発現細胞率解析

BD FACSCanto II フローサイトメーターにより細胞の ZsGreen 発現細胞率を計測した。

- 1) 各細胞の、FSC-A (前方散乱光: 細胞の大きさを反映) と SSC-A (側方散乱光: 細胞の内部構造の複雑さを反映) により二次元展開した。
- 2) 細胞集団を枠で囲んで領域を設定し、更に設定領域の細胞について GFP-A (計測波長 515-545 nm) で ZsGreen の蛍光波長 520 nm を検出し、FSC-A と ZsGreen の蛍光強度により二次元展開した。非遺伝子導入 KG-1a 細胞をコントロールとして ZsGreen 陽性領域を設定した。

3-3-2. 免疫表現型解析

BD FACSCanto II フローサイトメーターにより回収細胞中の CD34、CD38、CD90、CD133、及び ZsGreen 発現細胞率を計測した。

- 1) 1 サンプルあたり約 1×10^5 cells を回収し FACS Buffer (0.5% BSA/PBS) 1ml で、洗浄後、下記条件で抗体染色を行った。抗体反応を 4℃、30 分間、暗所で行った後、FACS Buffer 1ml にて 2 度洗浄を行った。

Set1		Set2	
抗体	液量	抗体	液量
(ZsGreen)	—	(ZsGreen)	—
CD34-PerCP	2 µl	CD34-PerCP	2 µl
CD38-PECy7	1 µl	CD90-PECy7	1 µl
CD133-APC	1 µl	CD133-APC	1 µl
FACS Buffer	6 µl	FACS Buffer	6 µl
Total	10 µl	Total	10 µl

- 2) 各種細胞浮遊液をフローサイトメーターにアプライし、FSC-A (前方散乱光: 細胞の大きさを反映) と SSC-A (側方散乱光: 細胞の内部構造の複雑さを反映) により二次元展開した。
- 3) 細胞集団を枠で囲んで設定し、更に設定領域の細胞について GFP-A で ZsGreen の蛍光極大波長 505 nm を検出した。PerCP-A では、PerCP-human CD34 (8G12) antibody の蛍光極大波長 678nm を測定した。PE-Cy7-A では、PE-Cy7 CD38 antibody 及び PE-Cy7 mouse anti-human CD90 antibody の蛍光極大波長 785nm を測定した。APC-A では、CD133/1 (AC133)-APC antibody の蛍光極大波長 660nm を測定した。CD34、CD38、CD90、CD133 と ZsGreen の蛍光強度によりヒストグラムで展開し、各陽性細胞比率を算出した。
- 4) FSC-A と SSC-A にて二次元展開して設定した領域の細胞について CD34 及び CD38 又は CD90 の蛍光強度で二次元展開し、CD34 及び CD38 陰性細胞又は CD90 陽性細胞を枠で囲んで設定した後、さらにこの設定領域の細胞について、CD133 についてヒストグラムで展開し、CD34+ CD38-CD133+ 細胞率又は CD34+

CD90+CD133+細胞率を算出した。ZsGreen 陽性細胞中の CD34+ CD38-CD133+細胞率又は CD34+ CD90+CD133+細胞率も同様に算出した。

3-4. レンチウイルスベクターによる遺伝子導入細胞中のプロウイルスコピー数測定

リアルタイム RT-PCR 解析

凍結保存細胞 (1×10^5 cells) からリアルタイム RT-PCR 用に SimplePrep[®] reagent for DNA を用いて付属のプロトコールに従いゲノム DNA を抽出した後、これを用いてリアルタイム PCR を実施した。Lenti-X Provirus Quantitation Kit のプロトコールに従い実施した。なお、この測定においては、検量線をレンチウイルスとヒト IFN γ (インターフェロン γ) それぞれの最適領域が 1 コピークローニングされた DNA control を用いて 2 種類 (レンチウイルスとヒト IFN γ) により作成し、試料ゲノム DNA 中のレンチウイルスとヒト IFN γ の定量を行った。ヒト IFN γ の PCR 増幅には、Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time) のプライマーを使用した。ヒト IFN γ は染色体中に 1 コピーであることから、レンチウイルスプロウイルスコピー数を相対的に定量した。リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて行い、試料中のプロウイルスコピー数の定量を行った。

・PCR 産物増幅曲線 (Primary Curve)

サイクル数を X 軸に、蛍光強度を Y 軸にプロットしたグラフ。

・二次微分曲線 (2nd Derivative)

PCR 産物増幅曲線の蛍光強度を 2 回微分したグラフ。

二次微分曲線 (2nd Derivative) から算出した Ct 値を X 軸に DNA control 量を Y 軸にプロットしてレンチウイルスとヒト IFN γ の検量線を作成した。この検量線より以下の方法で、レンチウイルスのプロウイルスコピー数を算出した。

レンチウイルス用検量線およびヒト IFN γ 用検量線から、サンプルのレンチウイルスコピーとヒト IFN γ の濃度を算出
プロウイルスコピー数 = (サンプルのレンチウイルスコピー濃度 / サンプルのヒト IFN γ 濃度) \times 2 *

*: 正常細胞は常染色体が 2 倍体なので、2 を掛ける

4. 納品物

・本作業報告書 1 部

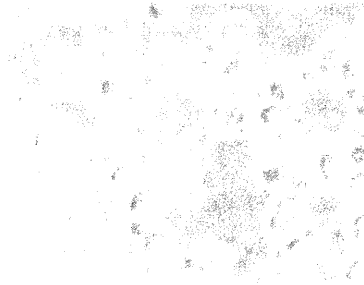
5. 添付データ

生物由来原料非含有培養用培地による遺伝子導入効率の比較評価

CD34 発現細胞株 (KG-1a 細胞株) を用いた遺伝子導入効率評価

5-1. KG-1a 細胞株の生物由来原料非含有培養用培地(100%)への馴化培養の様子

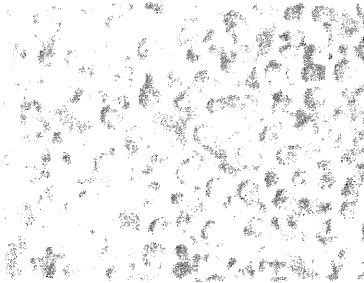
10%FBS 含有 RPMI-1640 培地



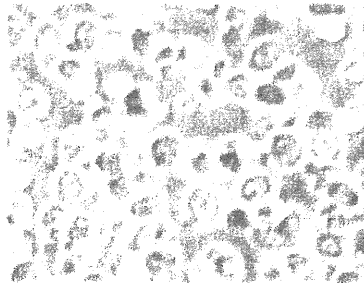
X-VIVO 培地



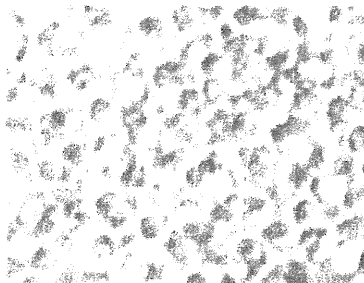
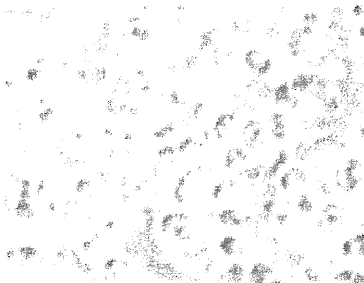
CellGro-SCGM 培地



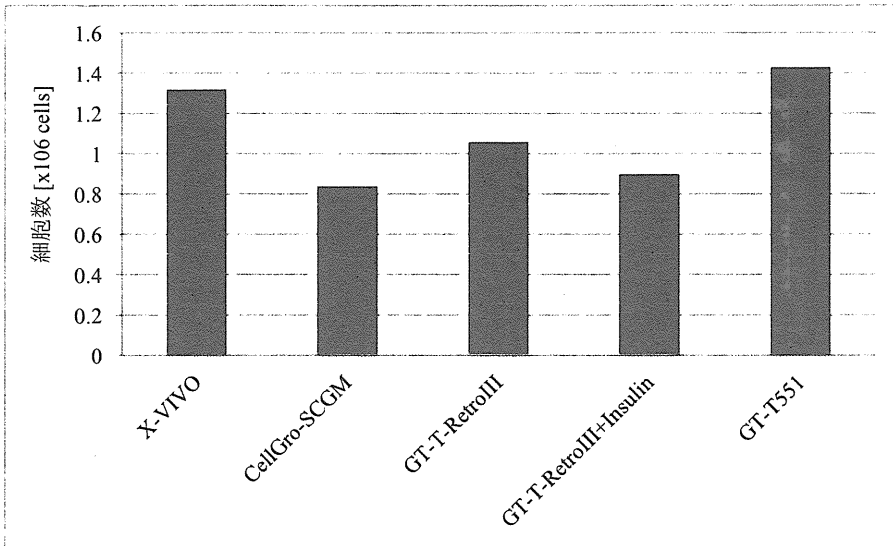
GT-T-RetroIII 培地



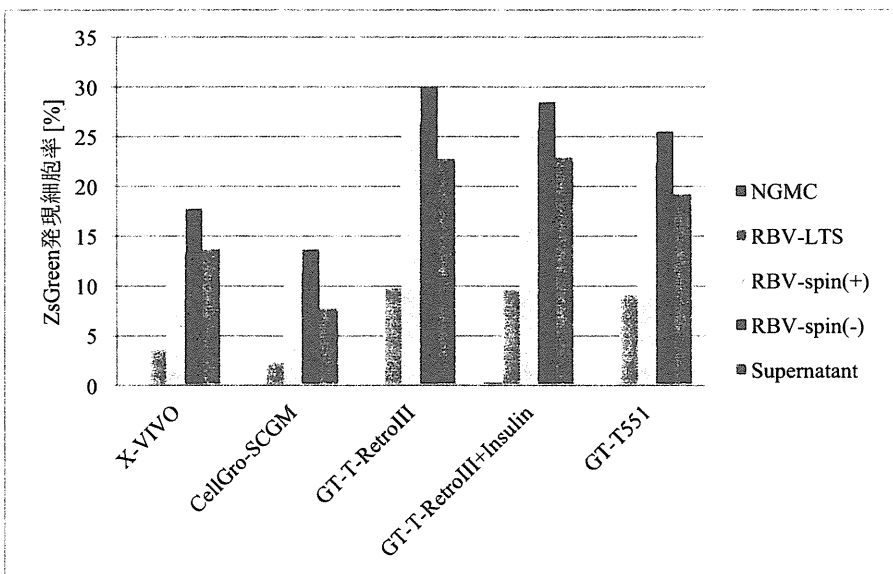
GT-T551 培地



5-2. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞数測定結果



5-3. 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



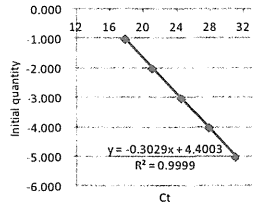
5-4. 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞の ZsGreen 発現細胞率

培地	ZsGreen 発現細胞率 [%]				
	NGMC	RBV-LTS	RBV-spin (+)	RBV-spin (-)	Supernatant
X-VIVO10	0.1	3.65	13.25	17.8	13.75
CellGro-SCGM	0.1	2.35	11.3	13.7	7.8
GT-T-RetroIII	0.1	9.75	26.35	29.9	22.8
GT-T-RetroIII+Insulin	0.3	9.65	25.75	28.5	22.95
GT-T551	0.1	9.1	22.3	25.55	19.3

5-5 遺伝子導入 48 時間後の 培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果

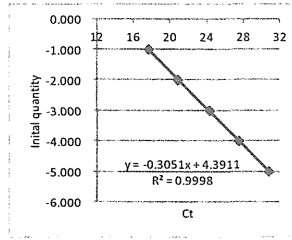
IFN γ standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.88	17.83
	1.E-02	-2.000	21.05	21.11
	1.E-03	-3.000	24.5	24.48
	1.E-04	-4.000	27.93	27.66
	1.E-05	-5.000	31.32	30.64
SLOPE				-0.3029
INTERCEPT				4.400
A.E. value				0.234
RSQ				0.9999



Lentivirus copy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.75	17.68
	1.E-02	-2.000	20.9	20.86
	1.E-03	-3.000	24.4	24.26
	1.E-04	-4.000	27.4	27.57
	1.E-05	-5.000	30.78	30.75
SLOPE				-0.3051
INTERCEPT				4.391
A.E. value				0.235
RSQ				0.9998

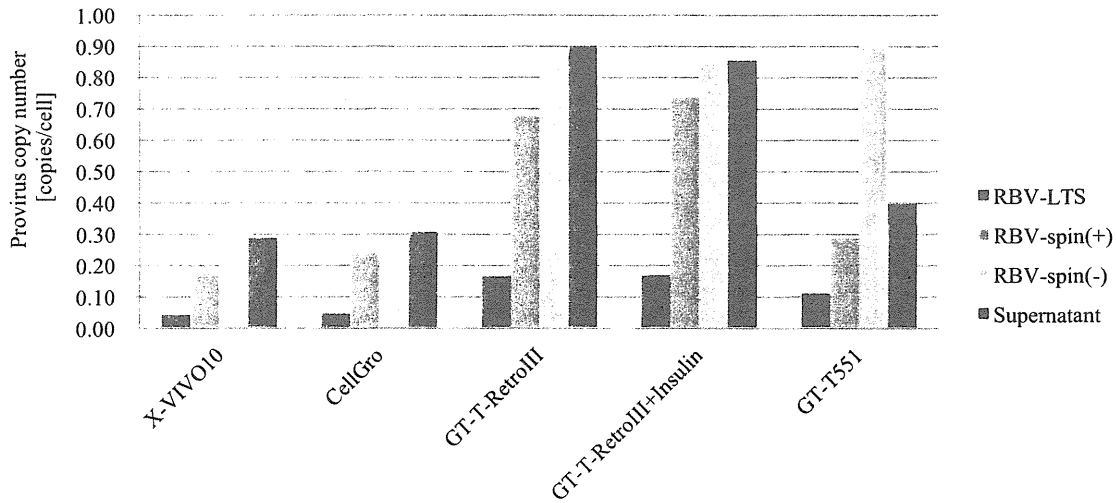


サンプルのIFN γ 濃度

遺伝子導入法	培地	Ct(SDM)	Average Ct	Genome Std	
NGMC	X-VIVO10	20.89	20.86	20.88	1.20.E-02
	CellGro	22.84	22.79	22.82	3.09.E-03
	GT-T-RetroIII	23.51	23.49	23.50	1.92.E-03
	GT-T-RetroIII+Insulin	23.05	23.2	23.13	2.49.E-03
	GT-T551	22.57	22.61	22.59	3.62.E-03
RBV-LTS	X-VIVO10	20.69	20.88	20.79	1.27.E-02
	CellGro	21.45	21.45	21.45	8.02.E-03
	GT-T-RetroIII	21.7	21.72	21.71	6.69.E-03
	GT-T-RetroIII+Insulin	21.85	21.94	21.90	5.88.E-03
	GT-T551	21.7	21.74	21.72	6.64.E-03
RBV-spin(+)	X-VIVO10	20.79	20.82	20.81	1.26.E-02
	CellGro	22.42	22.45	22.44	4.03.E-03
	GT-T-RetroIII	22.38	22.47	22.43	4.06.E-03
	GT-T-RetroIII+Insulin	21.47	21.47	21.47	7.91.E-03
	GT-T551	20.69	20.61	20.65	1.40.E-02
RBV-spin(-)	X-VIVO10	20.97	20.89	20.93	1.15.E-02
	CellGro	21.93	21.9	21.92	5.80.E-03
	GT-T-RetroIII	21.51	21.56	21.54	7.56.E-03
	GT-T-RetroIII+Insulin	21.47	21.44	21.46	7.99.E-03
	GT-T551	23.79	23.67	23.73	1.63.E-03
Supernatant	X-VIVO10	20.83	20.7	20.77	1.29.E-02
	CellGro	22.02	22.01	22.02	5.41.E-03
	GT-T-RetroIII	21.73	21.65	21.69	6.78.E-03
	GT-T-RetroIII+Insulin	21.34	21.35	21.35	8.63.E-03
	GT-T551	20.73	20.84	20.79	1.27.E-02

サンプルのLentivirus copy濃度

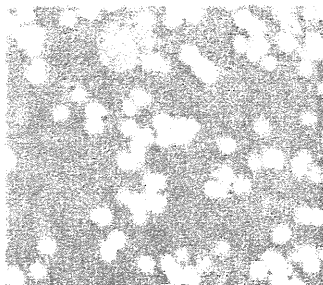
遺伝子導入法	培地	Ct(SDM)	Average Ct	Genome Std(new)	Provirus copy#	
NGMC	X-VIVO10	34.3	34.13	34.22	8.98.E-07	0.00
	CellGro	36.72	34.56	35.64	3.30.E-07	0.00
	GT-T-RetroIII	36.2	31.78	33.99	1.05.E-06	0.00
	GT-T-RetroIII+Insulin	35.84	35.19	35.52	3.60.E-07	0.00
	GT-T551	34.86	36.74	35.80	2.95.E-07	0.00
RBV-LTS	X-VIVO10	26.05	26.03	26.04	2.80.E-04	0.04
	CellGro	26.6	26.5	26.55	1.96.E-04	0.05
	GT-T-RetroIII	25.04	25.07	25.06	5.59.E-04	0.17
	GT-T-RetroIII+Insulin	25.25	25.19	25.22	4.98.E-04	0.17
	GT-T551	25.64	25.62	25.63	3.74.E-04	0.11
RBV-spin(+)	X-VIVO10	24.11	24.07	24.09	1.10.E-03	0.18
	CellGro	25.28	25.22	25.25	4.88.E-04	0.24
	GT-T-RetroIII	23.78	23.77	23.78	1.37.E-03	0.68
	GT-T-RetroIII+Insulin	22.73	22.68	22.71	2.91.E-03	0.74
	GT-T551	23.23	23.22	23.23	2.02.E-03	0.29
RBV-spin(-)	X-VIVO10	23.25	23.17	23.21	2.04.E-03	0.35
	CellGro	24.56	24.48	24.52	8.15.E-04	0.28
	GT-T-RetroIII	22.45	22.59	22.52	3.32.E-03	0.88
	GT-T-RetroIII+Insulin	22.47	22.47	22.47	3.44.E-03	0.86
	GT-T551	24.66	24.65	24.66	7.41.E-04	0.91
Supernatant	X-VIVO10	23.3	23.37	23.34	1.87.E-03	0.29
	CellGro	24.42	24.55	24.49	8.35.E-04	0.31
	GT-T-RetroIII	22.62	22.65	22.64	3.06.E-03	0.90
	GT-T-RetroIII+Insulin	22.33	22.41	22.37	3.69.E-03	0.86
	GT-T551	22.89	22.9	22.90	2.55.E-03	0.40



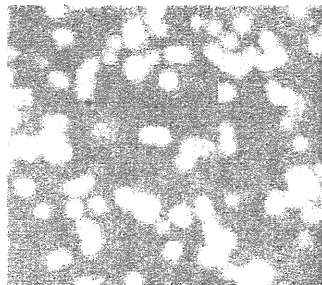
ヒト由来 CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入効率評価

5-6. ヒト由来 CD34 陽性の Day0 細胞播種時の細胞形態写真

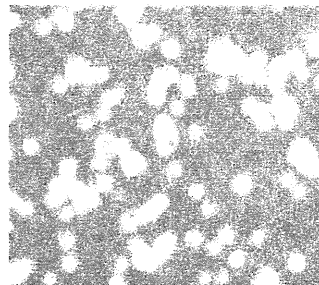
X-VIVO10 培地



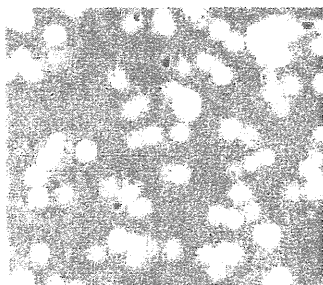
CellGro-SCGM 培地



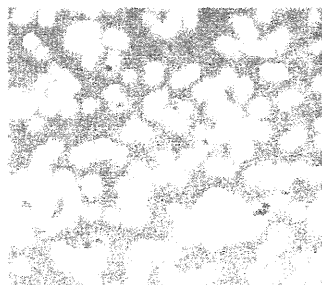
GT-T-RetroIII 培地



GT-T-RetroIII+Insulin 培地

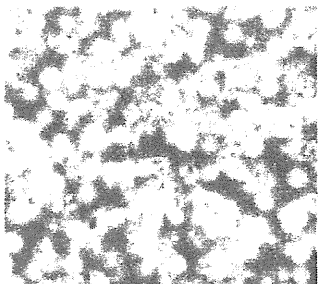


GT-T551 培地

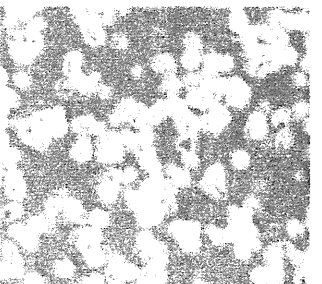


5-7. ヒト由来 CD34 陽性の Day1 サイトカイン刺激 24 時間後の細胞形態写真

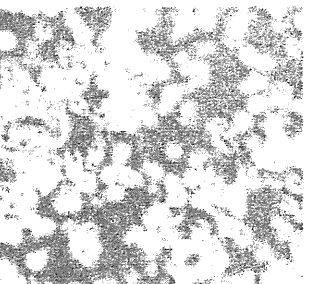
X-VIVO10 培地



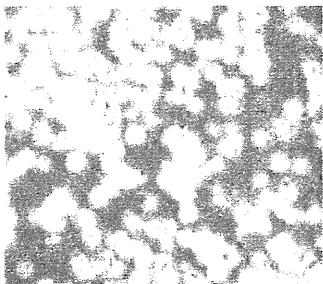
CellGro-SCGM 培地



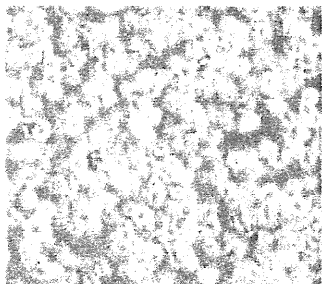
GT-T-RetroIII 培地



GT-T-RetroIII+Insulin 培地

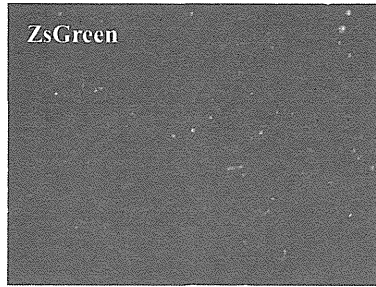
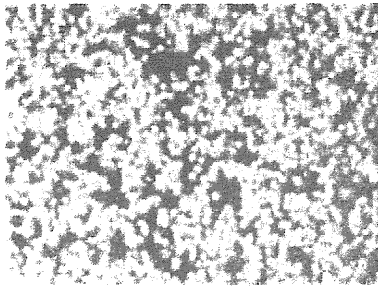


GT-T551 培地

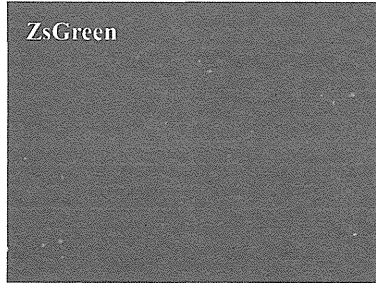
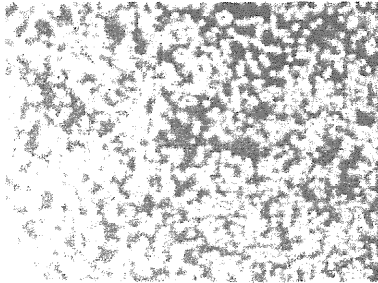


5-8. ヒト由来 CD34 陽性細胞の遺伝子導入 48 時間後の細胞形態及び ZsGreen 蛍光顕微鏡像

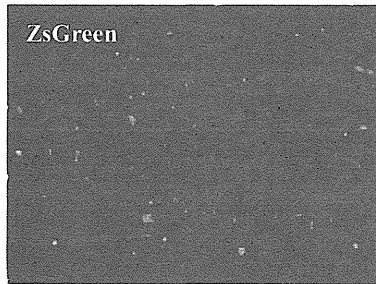
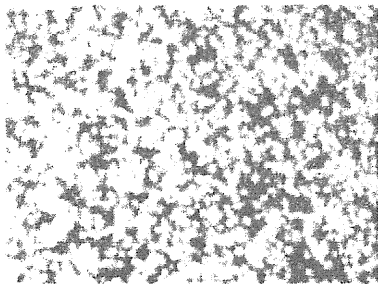
X-VIVO10 培地



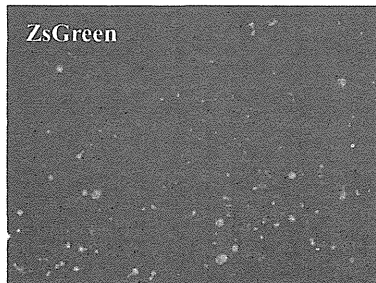
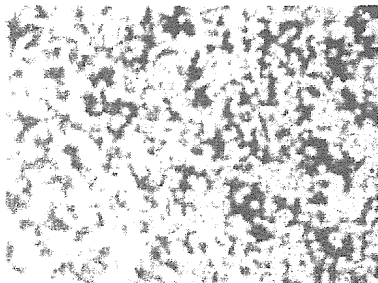
CellGro-SCGM 培地



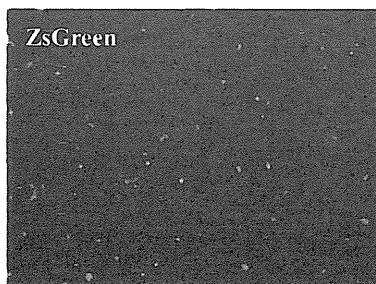
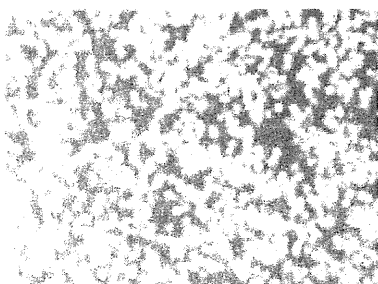
GT-T-RetroIII 培地



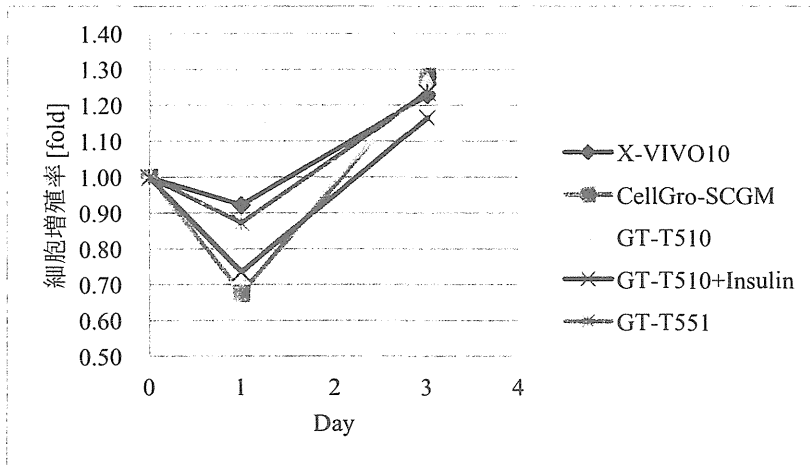
GT-T-RetroIII+Insulin 培地



GT-T551 培地



5-9. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の増殖率

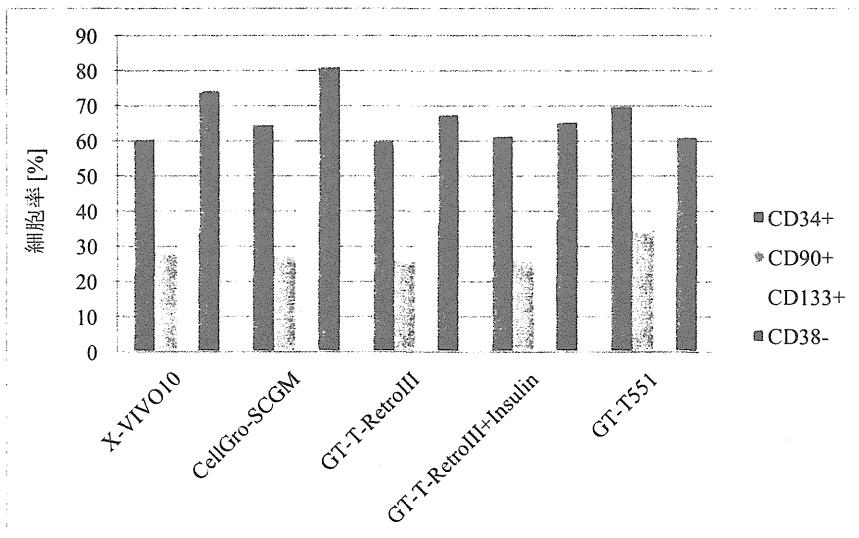


5-10. 細胞播種前のヒト由来 CD34 陽性細胞の免疫表現型解析

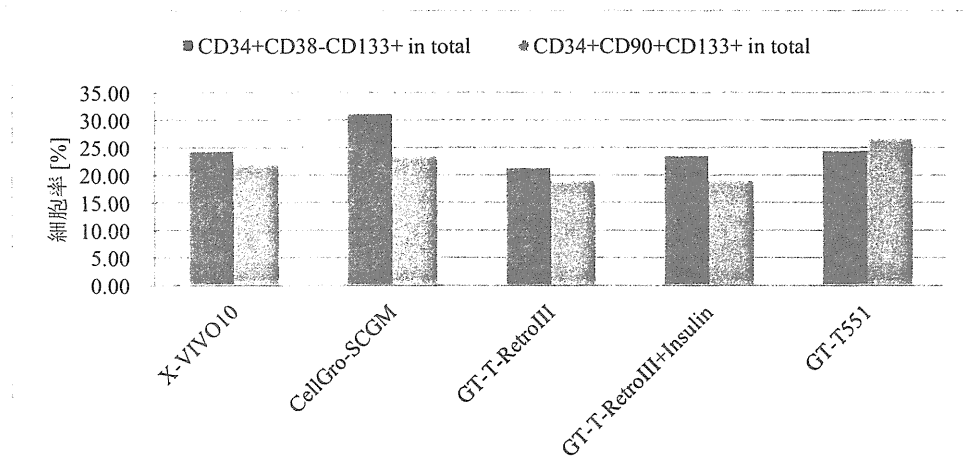
細胞表面マーカー	細胞率 [%]
CD34+	99.2
CD38-	0.2
CD90+	38.2
CD133+	44.4
CD34+CD38-CD133+	0.2
CD34+CD90+CD133+	25.2

5-11. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の免疫表現型解析

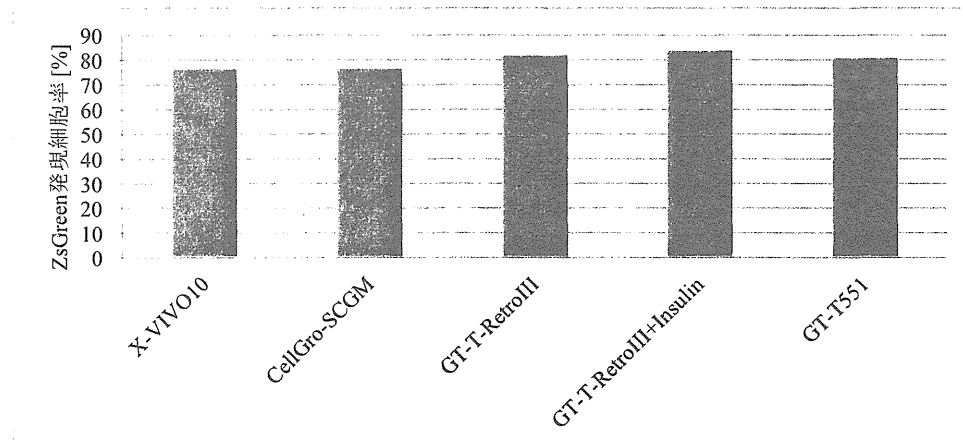
CD34、CD90、CD133 陽性細胞率及び CD38 陰性細胞率



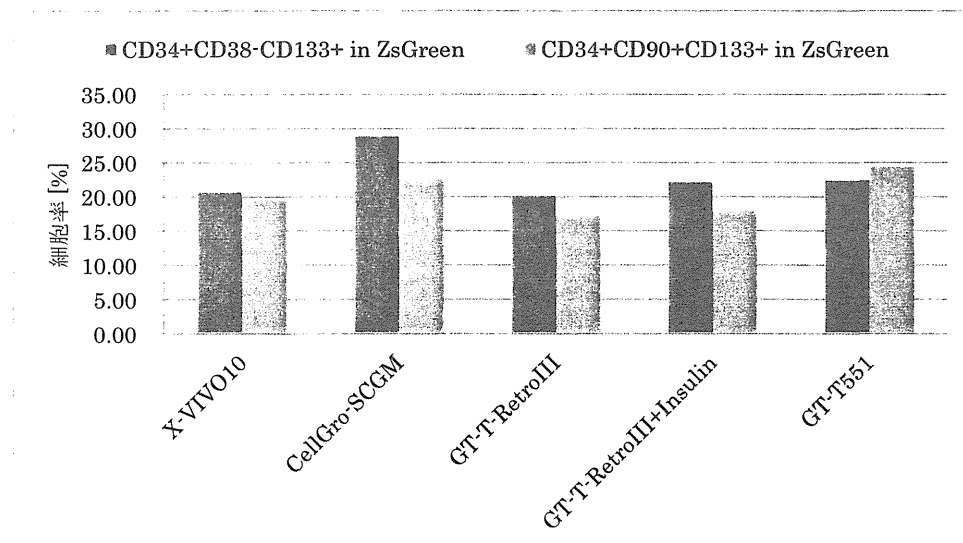
5-12. 培養細胞中の CD34+CD90+CD133+細胞率及び CD34+CD38-CD133+細胞率



5-13. 遺伝子導入 48 時間後の培養細胞の ZsGreen 発現細胞率



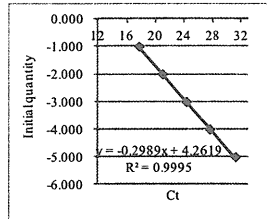
5-14. ZsGreen 発現細胞中の CD34+CD38-CD133+及び CD34+CD90+CD133+細胞率



5-15. 培養細胞中のレンチウイルスのプロウイルスコピー数測定結果

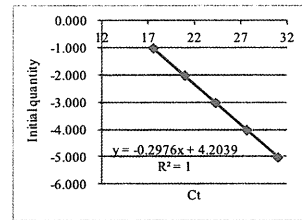
IFN γ standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.67	17.7
	1.E-02	-2.000	20.93	20.92
	1.E-03	-3.000	24.26	24.29
	1.E-04	-4.000	27.48	27.48
	1.E-05	-5.000	31.26	31
SLOPE				-0.2989
INTERCEPT				4.262
A.E. value				0.230
RSQ				0.9995



Lentivirus copy standard curve

Sample ID	ng	Log(10)	Ct(SDM)	Average
Std Plasmid	1.E-01	-1.000	17.38	17.57
	1.E-02	-2.000	20.97	20.78
	1.E-03	-3.000	24.18	24.22
	1.E-04	-4.000	27.53	27.59
	1.E-05	-5.000	30.73	31.14
SLOPE				-0.2976
INTERCEPT				4.204
A.E. value				0.229
RSQ				1.0000

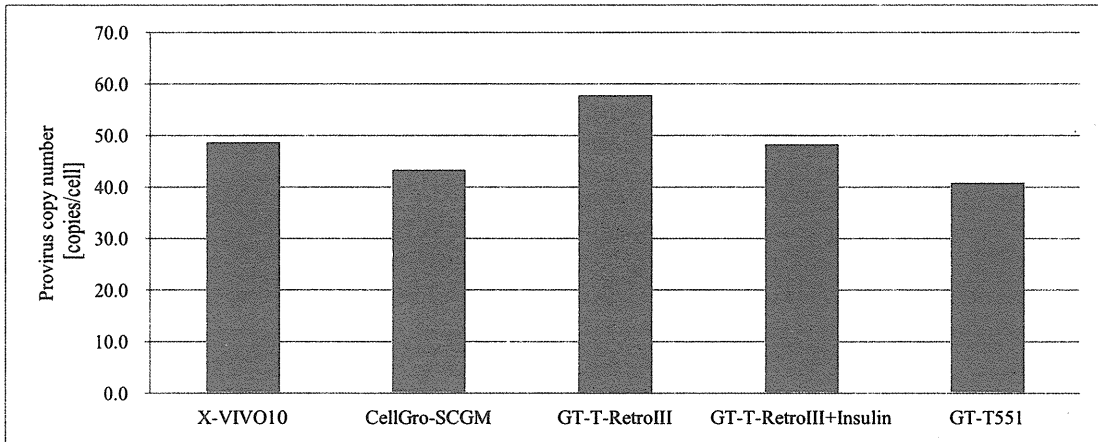


サンプルのIFN γ 濃度

培地	Ct(SDM)	Average Ct	calculated Log(10)
X-VIVO10	25.07	25.13	25.10
CellGro-SCGM	25.49	25.42	25.46
GT-T-RetroIII	25.6	25.61	25.61
GT-T-RetroIII+Insulin	25.13	25.15	25.14
GT-T551	24.79	24.84	24.82
NGMC	23.89	23.93	23.91

サンプルのLentivirus copy濃度

培地	Ct(SDM)	Average Ct	calculated Log(10)	Provirus copy
X-VIVO10	20.35	20.36	20.36	1.40.E-02
CellGro-SCGM	20.91	20.85	20.88	9.79.E-03
GT-T-RetroIII	20.61	20.61	20.61	1.18.E-02
GT-T-RetroIII+Insulin	20.37	20.44	20.41	1.36.E-02
GT-T551	20.31	20.34	20.33	1.43.E-02
NGMC	32.73	33.49	33.11	2.25.E-06



以上

IV. 班会議 プログラム・議事録

厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業
「国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備」

平成 25 年度班会議プログラム

日 時：平成 25 年 10 月 21 日（火）12 時～16 時

場 所：国立成育医療センター研究所 2 階セミナールーム

1. 研究代表者挨拶 国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部 小野寺雅史
2. 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課 小倉加恵子課長補佐 ご挨拶
3. 報 告
 - 1) 本研究会の体制及び方向性の説明 小野寺雅史
 - 2) 原発性免疫不全症の遺伝子治療 内山 徹
 - 3) ライソゾーム病の遺伝子治療の現状 大橋 十也
 - 4) 閉鎖系培養システムを用いた造血幹細胞への遺伝子導入法 山元 茉莉
 - 5) SureSelect DNA キャプチャー法によるベクター挿入部位の網羅的同定の試み 中林 一彦
 - 6) 原発性免疫不全症に対する新生児マススクリーニングのパイロット研究方法に関して 今井 耕輔
 - 7) 遺伝子治療対象代謝性疾患に対するスクリーニング法の開発 奥山 虎之
 - 8) 北海道免疫不全症患者データベース（PIDH）の構築と集計結果について 有賀 正
 - 9) 遺伝子治療におけるデータ管理（仮題） 瀧本 哲也
 - 10) 臨床研究中核病院の機能と遺伝子治療の推進 藤本純一郎
4. その他
5. 事務連絡

締め切り 会計書類：2 月 25 日（火） 研究報告書：1 月 31 日（金）

厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

「国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備」

平成 25 年度第 1 回班会議 議事録

1. 日時：平成 25 (2013) 年 10 月 21 日 (火) 12:00～16:30
2. 場所：国立成育医療センター研究所 2 階セミナールーム
3. 出席者：
研究代表者： 小野寺雅史 (国立成育医療センター成育遺伝研究部 部長)
研究分担者： 奥山 虎之 (国立成育医療センター臨床検査部 部長)
内山 徹 (国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 室長)
中林 一彦 国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 室長
藤本純一郎 (国立成育医療研究センター臨床研究センター センター長)
瀧本 哲也 (国立成育医療センター研究所臨床研究センター臨床研究推進室 室長)
今井 耕輔 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 小児・周産期地域医療学
講座 寄附講座准教授)
布井 博之 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児学分野 教授)
有賀 正 (北海道大学大学院研究科小児科学分野 教授)
衛藤 義勝 (財団法人脳神経疾患研究所 先端医療研究センター&遺伝病治療研究所
センター長・研究所長)
大橋 十也 (東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA医学研究所
遺伝子治療研究部 センター長・教授)
研究協力者： 小須賀基通 (国立成育医療研究センター臨床検査部 医長)
山元 末利 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 研究員)
渡辺 信之 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 研究員)
橋井 晶子 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 事務)
来 賓 小倉加恵子課長補佐 (厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課)

4. 審議内容

小倉課長補佐の挨拶後より、

- 1) 研究代表者の小野寺よりこれまでの流れと今回の方向性が示され、遺伝子治療を治験として行っていく体制整備が必要との旨が示された。
 - 2) 布井より、現在、遺伝子治療を希望している慢性肉芽腫症の患者状況が説明された。
 - 3) 内山より、原発性免疫不全症に対する遺伝子治療臨床研究の現状と方向性が説明された。
 - 4) 大橋より、先天性代謝性疾患に対する遺伝子治療臨床研究の現状と方向性が説明された。
 - 5) 山元より、造血幹細胞への遺伝子導入に必要となる遺伝子導入法の概要が示された。
 - 6) 中林より、次世代シーケンサにより網羅的ベクター挿入部位の解析と原発性免疫不全症に対するエクソーム解析法が示された。
 - 7) 今井より、原発性免疫不全症に対する新生児マススクリーニングの導入の仕方が示された。
 - 8) 奥山より、先天性代謝性疾患に対する新生児マススクリーニングの現状とその方向性が示された。
 - 9) 有賀より、北海道における免疫不全症患者のデータベース (PIDH) についての説明があった。
 - 10) 瀧本より、治験に向けたデータ管理法についての概要が示された
 - 11) 藤本より、成育医療研究センターにおける臨床研究中核病院構想が紹介された。
- 上記に関して時間を超過する程の熱心の討論が行われ、当班の今後の方向性が確認された。

5. 事務連絡

締め切りに関しては、会計書類が2月25日、報告書が1月31日を予定している。

以上

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

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	発表誌名	巻	ページ	出版年
Takeda K, Nakazawa Y, Komuro H, Yamamoto M, Shoji K, Morita K, Miyairi I, Katsuta T, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M	Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon g in a patient with dominant partial interferong.	Clinical Immunology	151	25-28	2014
Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H.	Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells.	Cell	154	1112-1126	2013
Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y, Ema H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M, Yamaguchi T, Onodera M, Nakauchi H.	Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method.	BBRC	435	586-591	2013
Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Oana S, Harayama S, Yasui K, Oh-ishi T, Onodera M	Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven inflammatory cytokine production in chronic granulomatous disease.	Clinical Immunology	147	122-128	2013
Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Uchiyama M, Wong WF, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S.	The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells.	Int Immunol.			in press
Kitazawa H, Moriya K, Niizuma H, Kawano K, Saito-Nanjo Y, Uchiyama T, Rikiishi T, Sasahara Y, Sakamoto O, Setoguchi Y, Kure S.	Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations.	Eur J Pediatr.	172	953-957	2013
Watanabe Y, Sasahara Y, Satoh M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Suzuki N, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, ... Uchiyama T, et al.	A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study.	Eur J Haematol.	91	242-248	2013
Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, et al.	Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector.	PLoS One	8	e71594	2013

Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, <u>Eto Y</u> , Crawford BE, Brown JR, <u>Ohashi T</u> .	Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice.	Mol Genet Metab.	111	139-146	2013
Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, <u>Ohashi T</u> , Suda T, Ohteki T.	Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder.	Blood	12	3267-3273	2013
Dairaku T, Iwamoto T, Minami M, Endo M, <u>Ohashi T</u> . <u>Eto Y</u> .	A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease.	Mol Genet Metab.	111	193-196	2014
Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, <u>Ohashi T</u> , Ida H, <u>Eto Y</u> .	The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear.	Mol Genet Metab.	110	401-404	2013
Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, <u>Ohashi T</u> , Okano HJ, Nakanishi M, <u>Eto Y</u> .	Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp).	Mol Genet Metab.	2109	386-389	2013
Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, <u>Nakabayashi K</u> , Hata K, Kosaki K	Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation.	Am J Med Genet A			in press
右田 王介 中林 一彦 秦 健一郎	特集 遺伝子検査による早期診断 次世代シーケンサーとは	周産期医学	Vol.44 No. 2		in press
Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, <u>Nakabayashi K</u> , Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M.	De novo Frameshift Mutation in Fibroblast Growth Factor 8 in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency.	Horm Res Paediatr.			in press
Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, <u>Ohmori S</u>	Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analysis of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism.	Biol Pharm Bull	36	292-298	2013
Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, <u>Ohmori S</u> , Nagata K	Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.	Drug Metab Pharmacokin	28	250-259	2013

Jiang R, Yamaori S, <u>Ohmori S</u> , Yamamoto I, Watanabe K	Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19.	Drug Met ab Pharm acokin	28	332-338	2013
Kusafuka Y, Kurita H, Sakurai S, Suzuki S, Nakanishi Y, Katsuyama Y, <u>Ohmori S</u>	Effect of single dose extended-release oral azithromycin on anticoagulation status in arfarinized patients.	Oral Surg Oral Med Oral Path ol Oral Ra diol	115	148-151	2013
Tanaka N, Horiuchi A, Nakayama Y, Katsuyama Y, Isobe M, Aoyama T, Tanaka E, <u>Ohmori S</u>	Safety and effectiveness of low-dose propofol esophagogastroduodenoscopy in Child A and B cirrhotic patients.	Dig Dis Sci	58	1383-1389	2013
Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, <u>Nonoyama S</u> , Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S.	Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line.	PLoS One.	9	e86106	2014
Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, <u>Nonoyama S</u> .	Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells.	J Clin Allergy Immunol.			in press
Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, <u>Nonoyama S</u> .	Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles.	J Allergy Clin Immunol.	131	1437-1440	2013
Kakiuchi S, <u>Nonoyama S</u> , Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, et al.	Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1.	J. Clin. Microbiol.	51	356-359	2013
Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, <u>Nonoyama S</u> , Ohya Y, Saito H, Matsumoto K.	Factors Associated with Steroid Phobia in Caregivers of Children with Atopic Dermatitis.	Pediatr Dermatol.	30	29-35	2013
Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, <u>Nonoyama S</u> , Ohya Y, Saito H, Matsumoto K.	Salivary Cortisol Response to Stress in Young Children with Atopic Dermatitis.	Pediatr Dermatol.	30	17-22	2013

Bousfiha A, Jeddane L, Ailal F, Al-Herz, Conley M.E., Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco J.L., Geha R.S., Hammarström L, Nonoyama S, et al.	A Phenotypic Approach for IUIS PID Classification and Diagnosis: Guidelines for Clinicians at the Bedside.	J Clin Immunol.	33	1078-1087	2013
Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, et al.	Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia	Pediatr Blood Cancer	60	836-841	2013
今井耕輔	TREC,KRECによる原発性免疫不全症のスクリーニング	小児内科	45	1148-1151	2013
今井耕輔	新生児スクリーニングによる原発性免疫不全症の診断	小児科臨床	66	1025-1032	2013
Okuyama T, Yotsumoto J, Funato Y	Survey of second-trimester maternal serum screening in Japan.	J Obstet Gynaecol Res.	39	942-947	2013
Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M.	Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings.	Mol Genet Metab.	108	172-177	2013
Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, et al.	The novel SLCO2A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype.	Br J Dermatol.			in press
後藤由紀、柿島裕樹、藤直子、渡辺靖、小関満、松林守、木田和宏、小須賀基通、奥山虎之	ポンペ病を対象とした新生児マススクリーニングの運用	日本マススクリーニング学会誌	23	251-55	2013
Ariga T	A possible turning point in the hematopoietic stem cell gene therapy for primary immunodeficiency diseases?; lentiviral vectors could take the place of retroviral vectors.	Expert Rev. Clin. Immunol.	11	1015-1018	2013
Ichikawa M, Arai Y, Haruta M, Furukawa S, Ariga T, Kajii T, Kaneko Y.	Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor.	Gene, Chromosome & Cancer	52	274-286	2013
Okura Y, Takezaki S, Yamazaki Y, Yamada M, Kobayashi I, Ariga T.	Rapid progression to pulmonary arterial hypertension crisis associated with mixed connective tissue disease in an 11-year-old girl.	Eur J Pediatr	172	1263-1265	2013