201322043B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業　移植医療研究分野）

ドナーとレシピエントの双方を改変した、
骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

平成２３－２５年度　総合研究報告書

研究代表者　田代　克久

平成２６（２０１４）年４月

目　　次

Ⅰ. 総合研究報告書
ドナーとレシピエントの双方を改変した、骨髄非破壊的新規造血幹細胞
移植法の開発基盤研究 -------------------------------- 1
研究代表者　独立行政法人医薬基盤研究所　幹細胞制御プロジェクト　研究員
田代　克久

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ------------------------------- 14

III. 研究成果の刊行物・別刷 ------------------------------- 17

厚生労働科学研究費補助金　難治性疾患等克服研究事業
（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業　移植医療研究分野）

総合研究報告書

ドナーとレシピエントの双方を改変した、骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

研究代表者　田代　克久
独立行政法人医薬基盤研究所　創薬基盤研究部　幹細胞制御プロジェクト　研究員

本研究は、造血幹細胞の移植効率の向上を目指して、遺伝子導入技術を駆使したドナー細胞の機能改変技術の開発、ならびにサイトカインを用いたレシピエント骨髄環境制御法の開発を目指し研究を行った。その結果、以下の知見を得た。

1．種々のアデノウイルスベクターを用いてヒト CD34 陽性細胞（ドナー細胞）への遺伝子導入効率を検討し、遺伝子工学的に CD46 を認識するよう改変したアデノウイルスベクターが高効率に外来遺伝子を導入可能であることを明らかにした。さらに、抗アポトーシス遺伝子の導入が、ドナー細胞の機能増強に有効であることを明らかにした。
2．サイトカイン GCSF と抗がん剤 5-フルオロウラシル（5-FU）を併用投与したマウスに GFP 発現骨髄細胞を移植したところ、放射線非照射条件にも関わらず、GFP 発現細胞がレシピエントマウス骨髄へ生着することを明らかにした。すなわち、GCSF と 5-FU の併用投与がレシピエントの骨髄環境の改変に有効であることを明らかにした。
3．G-CSF と 5-FU を投与した免疫不全マウスへ抗アポトーシス遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を移入したが、その移植効率は極めて低く、移植条件のさらなる改良が必要であることが示された。

研究協力者
川端健二　　（独）医薬基盤研究所

平田信恵　　（独）医薬基盤研究所

水口裕之　　（独）医薬基盤研究所
　　　　　　大阪大学大学院薬学研究科

野中昭希　　大阪大学大学院薬学研究科

A．研究目的

造血幹細胞移植の骨髄は、種々の造血障害の根治療法として推進されてきた。しかし、高齢者や合併症をもった患者（レシピエント）へ適応例は少ない。それは、全身放射線照射や大量のアルキル化剤の投与といった移植前処理が、レシピエントに対して大きな負担となっているためである。また、この前処理によりレシピエント骨髄の造血幹細胞ニッチ（niche：本来の居場所）が破壊されていることも推察される。そのため、上記の問題を克服するには、骨髄非破壊的な造血幹細胞移植法の開発が必要不可欠である。一方、骨髄非破壊状態では骨髄に多くの血液細胞が残存しているためドナー造血幹細胞の生着率の低下が懸念される。したがって、造血幹細胞移植の適応拡大には、骨髄非破壊的かつ高生着を可能とする造血幹細胞移植法の開発が重要である。

G-CSF 等のある種のサイトカイン／ケモカインは、骨髄の造血幹細胞を末梢血中へ遊離（動員）する作用を有している。これらの蛋白質の投与により、重篤な骨髄損傷を伴わずに造血幹細胞を骨髄から動員可能であると考えらたため、このような蛋白質はレシピエント骨髄内環境の制御分子として有用であると考えた。そこで本研究では、ドナー造血幹細胞に機能改変を施すとともに、レシピエント骨髄環境を操作することで、骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の基盤技術構築を目指すこととした。具体的には、（1）アデノウイルス（Ad）ベクターを用いて種々のサイトカインをマウス全身で発現させることにより、造血幹細胞を効率良く骨髄から動員させる手法、つまり、「ニッチを新たに創り出す方法」を開発するとともに、（2）Ad ベクターを用いた遺伝子導入により機能を増強した造血幹細胞の作製を行う。そして（3）上記のレシピエントの改変とドナー細胞の改変を併用した新規造血幹細胞移植法の開発を目指す。

B．研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

本研究で用いた Ad ベクターは、当研究室にて開発された improved in vitro ligation 法により作製

した。なお、ファイバー蛋白質を遺伝子工学的に改変した改良型 Ad ベクターも作製した。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従い測定し、生物学的力価は AdenoX Rapid Titer Kit を用いて測定した。

B-2. ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞（Lonza 社）は、添付のサプリメントと L-グルタミン（2 mM、invitrogen 社）、サイトカイン（100 ng/mL human SCF、100 ng/mL human Flt3-ligand、20 ng/mL human IL-3、20 ng/mL human IL-6（全て Peprotech 社））を含む StemPro34 Medium を用いて培養した。96 well ラウンドボトムプレートへ各 Ad ベクターと混合した 1 x 10^4 個のヒト CD34 陽性細胞を播種し、37℃で 90 分培養した。その後、培地を 100uL ずつ加え、2 日おきに培地交換した。遺伝子導入後の細胞数は、ヌクレオカウンターにて計測した。

B-3. ヒト CD34 陽性細胞の移植とキメリズム解析

Ad ベクターにて遺伝子導入したヒト CD34 陽性細胞を 2 日間培養し、その後、3Gy の X 線を照射した免疫不全マウス（Rag2$^{-/-}$ Il2rg$^{-/-}$マウス）へ移植した。4 ヶ月後、免疫不全マウスの末梢血を回収し、ヒト CD45 陽性細胞の割合を解析することでキメリズムを評価した。

B-4. コロニーアッセイ

血液前駆細胞数はメチルセルロースを含むコロニーアッセイ用培地（Stem Cell Technologies）を用いて解析した。

B-5. フローサイトメトリー解析

細胞を回収し、蛍光標識（FITC、PE、APC、PECy7、PerCP-Cy5.5 等）またはビオチン標識した抗体にて染色した。ビオチン標識した細胞はさらに蛍光標識したストレプトアビジンを反応させた。染色した細胞は LSR Fortessa にて解析した。細胞を単離する場合は FACSAria を用いた。

B-6. マウスへの Ad ベクター投与

C57BL/6 マウスまたは Rag2$^{-/-}$ Il2rg$^{-/-}$マウスへ 1 $\times 10^{10}$ vector particles（vp）、あるいは 1×10^9 infectious unit （ifu）の Ad ベクターを投与した。

B-7. 繊維芽細胞コロニー形成法

Ad ベクターを投与したマウス大腿骨より、非血液細胞（CD45$^-$Ter119$^-$細胞）を単離し、1×10^5 個/well（6 well プレート）で播種した。培地は、添付のサプリメントを加えた MesenCult mouse MSC Basal Media を用いた。ギムザ染色により形成されたコロニーを染色し、顕微鏡下でコロニー数を計数した。

B-8. Homing Assay

Ad ベクターを投与したマウスに GFP トランスジェニック（TG）マウス由来骨髄細胞を移入し、その 16 時間後にレシピエント骨髄中の GFP 発現細胞の割合を解析した。

B-9. サイトカインと 5FU を併用投与したマウスへの移植

Ad ベクターを C57BL/6 マウスへ投与し、その 3 日後に 5-フルオロウラシル（5-FU）、または PBS を腹腔投与した。5-FU を投与して 2 日後に GFP TG マウス由来骨髄細胞を移入し、移植 4-16 週間後のキメリズムを解析した。また、5-FU 投与 2 日後に各マウスの骨髄細胞を回収してコロニーアッセイも行った。

B-4. 免疫不全マウスへのサイトカイン・5FU の併用投与と CD34 陽性細胞の移植

免疫不全マウスへの尾静脈内に、1 匹あたり 1 $\times 10^{10}$ vp の Ad-GCSF、あるいは Ad-Null を投与した。ベクター投与 3 日後に 5-FU を腹腔投与し、さらに 5-FU を投与して 2 日後に、1 x 10^5 個 CD34 陽性細胞を尾静脈から移植した。

（倫理面への配慮）

本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所・組換え DNA 実験委員会および動物実験倫理委員会の承認を得たのちに行った。なお本研究において使用したヒト CD34 陽性細胞はメーカーから購入した細胞である。

C. 研究結果

C-1. ドナー細胞の機能増強法の開発

造血幹細胞の生着効率向上法の一つとして、造血幹細胞の機能を増強させるという手法がとられている。造血幹細胞や血液前駆細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが利用される場合が多いが、これらのベクター系では宿主の染色体に外来遺伝子が挿入されるためにガン化の可能性が考えられる。そこで本研究では、一過性かつ高効率に外来遺伝子を細胞へ導入可能な Ad ベクターを用いた遺伝子導入法の確立を試みた。我々の研究室ではこれまでに種々の改良型 Ad ベクターの開発に成功している（図 1）。そこで種々の改良型 Ad ベクターを用いてヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を評価した。その結果、アデノウイルスのファ

イバー領域をサブタイプの異なるアデノウイルス（35 型；サブグループ B）に置換した F35 型 Ad ベクターを用いることにより、ヒト CD34 陽性細胞へ効率良く遺伝子導入できることが明らかとなった（図 2）。一方、その他の Ad ベクターを使用した場合にはほとんど遺伝子導入ができなかった。以上の結果から、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入には F35 型の Ad ベクターが適していることが明らかとなった。

そこで次に機能遺伝子（Bcl-xl-FNK（FNK）、Tie2、NF-Ya）を発現する F35 型 Ad ベクターを作製し、ヒト CD34 陽性細胞の in vitro、in vivo における機能を評価した。FNK は抗アポトーシス遺伝子、Tie2 は造血幹細胞の骨髄への生着に関わる遺伝子、NF-Ya は造血幹細胞の増殖に関わる遺伝子である。まず、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率を解析した結果、いずれのベクターも 60～70%の遺伝子導入効率であった（データ略）。そこでこれらのベクターを CD34 陽性細胞へ作用させた際の in vitro における細胞増殖と分化能について解析を進めた。細胞増殖に与える影響を検討した結果、FNK 導入群においてわずかな細胞数の減少が観察されたが、著差はみとめられなかった（図 3）。CD34 陽性細胞数に関しても遺伝子導入 10 日目まで変化はみとめられなかったものの、遺伝子導入 15 日目以降においても FNK 群では CD34 陽性細胞数の増加が観察された（図 3）。また、遺伝子導入 3 日後、ならびに 20 日後の分化能をコロニーアッセイ法にて評価した。その結果、遺伝子導入 3 日後ではいずれの遺伝子を導入した細胞においても同等のコロニー数であった。一方、遺伝子導入 20 日後においては、コントロール群と比較し、FNK 群ではコロニー数の増加が観察された（図 4）。以上の結果から、抗アポトーシス遺伝子をヒト CD34 陽性細胞へ導入することにより、in vitro において長期的に増殖能・分化能を維持できることが明らかとなった。そこで次に FNK 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を免疫不全マウスへ移植し、その移植効率を評価した。遺伝子導入していない CD34 陽性細胞、GFP 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞、FNK 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を 3Gy の X 線を照射した免疫不全マウスへ移入し、その 4 ヶ月後に末梢血におけるヒト CD45 陽性細胞の割合を解析した結果、遺伝子導入していない CD34 陽性細胞、GFP 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を移植したマウスの CD45 陽性細胞の割合は 5%前後であったのに対し、FNK を導入した細胞の場合には約 15%まで増加していた（図 5）。したがって、抗アポトーシス遺伝子の導入は、ドナー細胞の機能増強に極めて有効であることが明らかとなった。

C-2. サイトカインを用いたレシピエント骨髄の改変法の開発

レシピエント骨髄の改変法として骨髄動員作用を有するサイトカインに着目した。そこでます、GCSF あるいは VEGF を発現する Ad ベクター（Ad-GCSF、Ad-VEGF）を投与し、血液細胞の動態の解析を行った。まず、Ad-GCSF をマウスへ投与したところ、造血幹細胞を含む血液前駆細胞が末梢組織へ動員していることを確認した（図 6a）。しかし、GCSF 投与による骨髄中の血液前駆細胞数は減少していなかった（図 6b）。したがって、GCSF 投与により血液前駆細胞の増殖と動員が誘導されていると考えられた。

上記の検討の過程で、GCSF 投与マウスの末梢血中では、VEGF の濃度が上昇していることを見出した。そこで次に VEGF についても同様の検討を行った。その結果、VEGF 投与マウスの血液前駆細胞は、末梢血では増加する一方で、骨髄では減少していた（図 6c, 6d）。したがって、VEGF は造血幹細胞等を含む血液前駆細胞を末梢組織へ動員する作用を有していることが示された。VEGF による造血幹細胞・血液前駆細胞の動員機構は不明であるため、本研究ではその解明も試みた。最近の研究から骨髄中の間葉系幹細胞が造血幹細胞のニッチ細胞として機能していることが明らかになりつつある。そこで、VEGF 投与時の骨髄間葉系幹細胞に着目し、検討を進めた。ベクター投与したマウスの骨髄中の間葉系幹細胞数を FACS にて解析したところ、VEGF 過剰発現により間葉系幹細胞数の減少が観察された（図 7a）。また、Ad-VEGF 投与マウスの骨髄ストローマ細胞においては、Angiopoietin-1 や VCAM-1 等の間葉系幹細胞が多量に産生している分子の発現が著名に減少していたため、Ad-VEGF 投与による間葉系幹細胞の減少が示唆された（図 7b）。次に増殖能力のある間葉系幹細胞を定量する方法である、線維芽細胞コロニー形成法（CFU-F assay）により、間葉系幹細胞数を定量した。その結果、Ad-VEGF 投与マウスの骨髄においては CFU-F 数、つまり間葉系幹細胞数が有意に減少していた（図 7c）。以上の結果から、生体での VEGF 過剰発現により間葉系幹細胞が骨髄内で減少することが判明した。そこで次に、Ad-VEGF 投与時に間葉系幹細胞が減少するメカニズムを調べることとした。まず、VEGF が間葉系幹細胞に直接作用しているか否か調べるため、VEGF の受容体の発現をフローサイトメトリーにより解析した。本研究で使用している VEGF に結合する受容体のうち、今回は VEGFR1（別名 Flt-1）と VEGFR2（別名 Flk-1）の発現を解析した。その結果、間葉系幹細胞は、

VEGFR2 は発現してなかったが、VEGFR1 を発現していたことから（図 8a）、VEGF は直接間葉系幹細胞に作用していることが示唆された。しかし、予想に反し、Ad-VEGF を投与しても骨髄内の VEGF 濃度は上昇していなかった（データ略）。したがって、Ad ベクター由来の VEGF が直接骨髄内間葉系幹細胞へ作用していないこと示唆された。ただし、この結果は末梢血 VEGF 濃度と骨髄内 VEGF 濃度に大きな勾配が生じていることを意味しており、この濃度勾配により間葉系幹細胞が末梢組織へ遊走している可能性が考えられた。そこで次に in vitro で増幅した骨髄ストローマ細胞を用いてトランズウェル遊走アッセイを行った。その結果、VEGF は間葉系幹細胞に対して強い遊走作用を有していることが示された（図 8b）。したがって、Ad-VEGF をマウスへ投与した際にも骨髄内の間葉系幹細胞も VEGF の濃度勾配により末梢組織へと遊走していることが示唆された。そこで最後に、ホーミングアッセイを行うことにより実際にマウス骨髄において機能している間葉系幹細胞が減少していることかどうかを検討した。Ad-Null または Ad-VEGF を投与したマウスへ GFP TG マウス由来の骨髄細胞を移入し、その 16 時間後にレシピエントマウス骨髄中の GFP 陽性細胞数を解析することにより生着率を評価した。その結果、Ad-VEGF 投与マウスをレシピエントとした場合、ドナー細胞（GFP 陽性細胞）の生着率は減少することが示された（図 9）。以上の結果から、Ad-VEGF 投与マウスでは、骨髄において間葉系幹細胞数が減少していることが示され、VEGF は間葉系幹細胞の動態を制御する分子であることが明らかとなったが、サイトカイン投与マウスをレシピエントとして移植効率の向上を目指す本研究課題に対しては、VEGF の使用は不適切であることが示唆された。

これまでの検討から GCSF と VEGF の両サイトカインが造血幹細胞の動員作用を有していることが確認できたが、VEGF はニッチ細胞数を減少させるため不向きであることが考えられた。そこで、次に GCSF 発現 Ad ベクターを投与して骨髄環境を操作したレシピエントマウスへドナー細胞を移植し、移植が成立するか否か検討することとした。本検討では、ドナー細胞として GFP TG マウス由来骨髄細胞を用いた。また、GCSF 投与により骨髄より遊離したレシピエント由来の細胞が再度骨髄へ移入する可能性が高いため、今回は GCSF 投与後に抗がん剤 5-FU を投与する群も加えた。実際、G-CSF と 5-FU を併用投与することにより、骨髄中の血液前駆細胞が激減することも確認できた（図 10）。本条件において、GFP TG マウス由来骨髄細胞を移植し、4 週間後にレシピエントマウスの末梢血を回収し、キメリズムを解析した。その結果、GCSF と 5-FU を投与したマウスをレシピエントとした場合、GFP を発現するドナー細胞が末梢血中で 10～30%観察された。一方、5-FU のみを投与したマウス、ならびに Ad-Null と 5-FU を投与したマウス（Ad-Null+5FU 群）においては、～4%程度のキメリズムであったことから、GCSF と 5FU にて移植前処理を行ったレシピエントにはドナー細胞が生着していることが示された（図 11a, 11b）。なお、GCSF のみを投与したマウスをレシピエントとしてドナー細胞を移入したマウスにおいては、ドナー細胞はほとんど検出されなかった。次に、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞が生着しているかどうか検証するため、移植 16 週間後におけるキメリズムを解析したところ、キメリズムは移植 4 週間後より減少していたが、ドナー細胞が末梢血中で検出された。また、レシピエントマウスの骨髄細胞を回収し、詳細な解析を進めた結果、造血幹細胞画分や各細胞系譜の細胞においても GFP 発現ドナー細胞は検出されたことから、放射線非照射条件である本移植法において、分化能を有する造血幹細胞がレシピエントへ生着していることが示された（図 11c）。以上の結果から、GCSF と 5-FU の併用投与がレシピエント骨髄環境の改変に有効であることが示された。

C-2. ドナー細胞とレシピエントの双方を改変した移植法の開発

次にヒト CD34 陽性細胞の移植系においても GCSF と 5-FU の併用投与処置が有効であるか否か検討した。まず、免疫不全マウスにおいても GCSF 投与により骨髄動員が誘導されるかどうか検討したところ、末梢組織へ造血幹細胞・血液前駆細胞が動員されることを確認した（データ略）。そこで免疫不全マウスに対して GCSF と 5-FU を投与したところ、C57BL/6 マウスとは異なり、全例が死亡した。一方、Ad-Null と 5-FU を投与したマウスでは死亡は観察されなかった。そのため、5-FU の濃度をこれまでの半量（75 mg/kg）にして再度検討を進めたところ、GCSF と 5-FU 投与マウスにおいても生存していた。そこで本条件で CD34 陽性細胞の移植を実施した。その結果、全ての群において CD45 陽性細胞の割合は 1%以下であり、極めて移植効率は低いものであった。なお、遺伝子導入を行った CD34 陽性細胞についても GCSF と 5-FU 投与したマウスへの移植実験を実施したが、キメリズムは依然として低いものであった（図 12）。

D. 考察

本研究では、骨髄非破壊的な新規造血幹細胞移植法の開発を目的とし、アデノウイルス（Ad）ベクターを用いて種々のサイトカインをマウス全身で発現させることにより、造血幹細胞を効率良く骨髄から動員させる手法、つまり、「ニッチを新たに創り出す方法」の開発、そしてAdベクターを用いた遺伝子導入により機能増強型造血幹細胞の作製法の開発を目指して研究を行った。

本研究においてヒト造血幹細胞を含むヒトCD34陽性細胞への遺伝子導入にはF35型Adベクターが最適であることが明らかとなった。F35型Adベクターは、ほぼ全てのヒト細胞で発現しているCD46を認識するため、効率的な遺伝子導入につながったものと考えられる。ただし、我々は、今回用いたヒトCD34陽性細胞の全ての細胞がCD46を発現していることを確認しているものの全ての細胞においてGFPの発現はみとめられなかった。今回、3000 VP/cellの濃度以上でF35型Adベクターを作用させた場合、細胞死がみとめられたことから、これ以上の濃度でAdベクターを作用させることは困難である。遺伝子発現効率の更なる改善には、プロモーターの改良等も必要である可能性が考えられる。また、機能遺伝子を搭載したAdF35型ベクターをヒトCD34陽性細胞へ作用させ、in vitroにおける増殖と分化に対する影響を検討したところ、抗アポトーシス遺伝子を導入した際に、分化能を保持しつつ長期的にCD34陽性細胞を増幅できることが明らかとなった。また、in vivoにおける生着率も抗アポトーシス遺伝子の導入により増強されることが示された。in vitroでの増殖する際には活性酸素が生じその結果細胞死が誘導されている可能性が考えられること、そしてin vivoへの移植時には移植によるストレス等で細胞死が誘導されている可能性があることから、抗アポトーシス遺伝子はこの細胞死を抑制していることが予想される。抗アポトーシス遺伝子の導入がドナー細胞の機能増強に有効であることを明らかにしたが、機能増強した細胞でも移植効率は15%程度であり、十分とは言い難い。これまでにヒト細胞の移植系においては種々の免疫不全マウスが用いられており、$Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$マウスについてもその有用性はみとめられている。しかし、ヒト造血幹細胞移植の実験系においてはNOD/SCID/$Il2rg^{-/-}$マウス（NOGマウス）の方が、$Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$マウスよりも移植効率が高いことが報告されているため、NOGマウスをレシピエントとして用いることでより移植効率が改善されるものと期待される。

本研究ではレシピエント改変法としてサイトカインに着目し、GCSFとVEGFについて研究を進めてきた。VEGFについては、造血幹細胞動員作用のみならず、造血幹細胞のニッチ細胞である間葉系幹細胞の動態も制御することを明らかにした。しかし、ホーミングアッセイの結果からも明らかなように、VEGFは骨髄間葉系幹細胞（ニッチ細胞）数を減少させてしまうため、ドナー細胞の生着率が減少してしまうことが考えられた。したがって、レシピエント改変法としてはVEGFは不向きであると考えられた。GCSFを投与したマウスの骨髄では造血幹細胞画分であるcKit-positive Sca-1-positive Lineage marker-negative（KSL）細胞数が増加していた。詳細なメカニズムは不明であるが、GCSFには造血幹細胞の動員作用だけでなく、増殖促進作用があることが推察される。なお、本研究では解析していないが、GCSF投与マウスの骨髄では、間葉系幹細胞が増加しているという報告があり、そのために造血幹細胞数が増加している可能性も考えられた。

本研究では、GCSFと5-FUを併用投与したマウスをレシピエントとすることにより、放射線非照射条件においても移植が成立することを世界に先駆けて示した。GCSFのみを投与したマウス、または5-FUのみを投与したマウスにおいてはドナー細胞の生着率が低かったことから、GCSFと5-FUの併用が移植前処理法として有効であることが示された。しかし、$Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$マウスへGCSFと5-FUを併用投与した場合、C57BL/6マウスと同じ条件では全例死亡した。コントロールベクターであるAd-Nullと5-FUを併用投与した場合には生存していたことから、免疫不全マウスとC57BL/6の5-FUに対する感受性の違いだけでは説明することができない。細胞増殖が盛んな細胞に対して5-FUは作用するため、免疫不全マウスの場合、C57BL/6マウスよりも造血幹細胞動員ならびに増殖・分化が顕著に誘導されており、そのために5-FUの感受性が増して死亡した可能性もある。5-FUの投与量を半量にすることで死亡は回避可能であったが、その条件では、ヒトCD34陽性細胞の移植効率は極めて低いものであった。本研究課題で目的としていた手法を確立するには、上述のマウス系統の検討と同時に、GCSFや5-FUの投与量を厳密に決定する必要があると思われる。また、本研究課題では、ドナー造血幹細胞としてヒトCD34陽性細胞を用いたが、マウスの造血幹細胞をドナー細胞として用いることでより正確に有効性を検証できる可能性がある。現時点では、Adベクターを用いてマウス造血幹細胞への効率的な遺伝子導入は達成できていないため、マウス造血幹細胞を用いた検討も進めていくことで、本研究課題で提示するような、ドナーとレシピエントの双方改変した新規造血幹細胞移植

法開発に関する新しい知見が得られるものと予想されるため、今後の検討課題としていきたい。

E. 結論

１．ヒト CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入には、ヒト CD46 を認識するファイバー蛋白質を有する改良型アデノウイルスベクターが適していることを明らかにした。また、抗アポトーシス遺伝子の導入が、ドナー造血幹細胞の機能増強に有効であることを明らかにした。

２．G-CSF と 5-FU の併用投与がレシピエント骨髄環境の改変に有効であることを明らかにした。すなわち、G-CSF と 5-FU を併用投与したマウスをレシピエントとすることにより、放射線非照射条件においても長期骨髄再構築能を有するドナー造血幹細胞が生着することを世界に先駆けて明らかにした。

３．サイトカインを投与した免疫不全マウスへ CD34 陽性細胞の移植については、実験系の更なる改良が必要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K.; Optimization of adenovirus vectors for transduction in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells., *Yakugaku Zasshi.*, **131**, 1333-1338, 2011

2. Sugio K., Sakurai F., Katayama K., Tashiro K., Matsui H., Kawabata K., Kawase A., Iwaki M., Hayakawa T., Fujiwara T., Mizuguchi H.; Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences., *Clin Cancer Res.*, **17**, 2807-2818, 2011

3. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Efficient and Directive Generation of Two Distinct Endoderm Lineages from Human ESCs and iPSCs by Differentiation Stage-Specific SOX17 Transduction, *PLoS ONE*, **6**, e21780, 2011

4. Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H.; Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., *Stem Cell Res.*, **8**, 300-311, 2012

5. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4α Transduction. *Mol. Ther.*, **20**, 127-137, 2012

6. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets., *Biomaterials*, **33**, 4526-4534, 2012

7. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.; Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α transduction., *J. Hepatol.*, **57**, 628-636, 2012

8. Tashiro K.*, Omori M.*, Kawabata K., Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H.; Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation., *Stem Cells Dev.*, **21**, 3381-3390, 2012 (*equally contributed)

9. Tashiro K.*, Nonaka A.*, Hirata N., Yamaguchi T., Mizuguchi H., Kawabata K.; Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow., *Stem Cells Dev.*, in press (*equally contributed)

2. 学会発表

1. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: 免疫毒性評価系の構築に向けた iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2011 年 10 月 22 日

2. 野中昭希、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 造血幹細胞動員における VEGF の機能解析、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2011 年 10 月 22 日

5. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之: 幹細胞への高効率遺伝子導入技術を利用した分化誘導法の開発、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2011 年 10 月 22 日

4. Katsuhisa Tashiro, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Satoshi Takaki, Hiroyuki Mizuguchi: Enhanced hematopoietic differentiation from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem

cells by inhibition of an adaptor protein, Lnk.、第 40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11 月 27-29 日

5. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mature mast cells from mouse induced pluripotent stem cells、第 40 回日本免疫学会学術集会、幕張、2011 年 11 月 27-29 日

6. 森　大輔、櫻井文教、清水かほり、立花雅史、田代克久、川端健二、水口裕之: アデノウイルスベクターに 対する免疫応答が繰り返し投与による遺伝子導 入に与える影響に関する検討、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

7. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之: 3 次元共培養法によるヒト ES･iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

8. Katsuhisa Tashiro, Aki nonaka, Tomoko Yamaguchi, Mizuguchi Hiroyuki, Kenji Kawabata: Mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by vascular endothelial growth factor is mediated by reduction of mesenchymal stromal cells in bone marrow., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

9. Yasuhito Nagamoto, Katsuhisa Tashiro, Kazuo Takayama, Kazuo Ohashi, Kenji Kawabata, Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

10. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関与する新規液性因子の同定; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日

11. 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江ー楠田美保、水口裕之: Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用; 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日

12. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

13. 田代克久、大森美幸、川端健二、平田信恵、山口朋子、櫻井文教、高木智、水口裕之: アダプター蛋白質 Lnk の抑制はマウス ES/iPS 細胞から血液前駆細胞への分化を促進する; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

14. Maiko Higuchi, Norihisa Furukawa, Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Masashi Tachibana , Fuminori Sakurai, and Hiroyuki Mizuguchi: Direct induction of hepatic progenitor-like cells from mouse fibroblasts by reprogramming factors, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, USA, June, 2013

15. Tomoko Yamaguchi, Misae Nishijima, Yasutaka Yamanaka, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Promotion of helper T cell differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by ThPOK transduction, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, USA, June, 2013

16. Katsuhisa Tashiro, Nobue Hirata, Tomoko Yamaguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Identification of an adhesion molecule for isolation of hematopoietic cells and cardiac cells from pluripotent stem cells, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, USA, June, 2013

17. Shuichi Kuno, Kahori Shimizu, Fuminori Sakurai, Katsuhisa Tashiro, Masashi Tachibana, Naoya Matsumura, Soonih Kim, Tsuyoshi Yokoi, Hiroyuki Mizuguchi: Development of mice possessing human CYP3A4 activity by intravenous administration of a novel adenovirus vector expressing human CYP3A4、第 28 回日本薬物動態学会年会、東京、2013 年 10 月 9-11 日

18. 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 血液脳関門モデルの構築を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立、第 63 回近畿支部総会・大会、大阪、2013 年 10 月 12 日

19. 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関与する新規因子の同定、第 63 回近畿支部総会・大会、大阪、2013 年 10 月 12 日

20. 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二: 膜蛋白質 CAR は Flk1 発現血液前駆細胞と心筋前駆細胞の分離マーカーである、第 36

回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日

21. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling、第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉、2013 年 12 月 11-13 日

22. 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: In vitro 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27 日-30 日

23. 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二: 膜蛋白質 CAR の発現を指標にした Flk1 発現血液・心筋前駆細胞の分離、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27 日-30 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当事項なし

2. 実用新案登録
該当事項なし

3. その他
該当事項なし

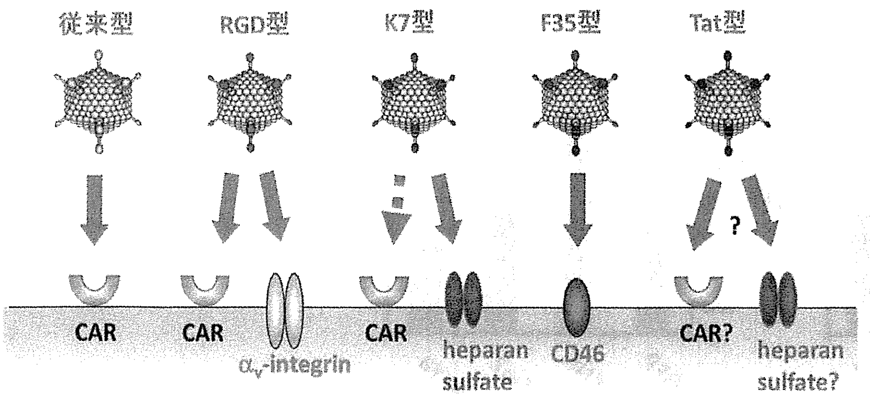


図1 改良型Adベクターの遺伝子導入特性
通常の実験で用いられている従来型Adベクターは、細胞表面上の受容体CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor)を認識して感染する。一方、改良型AdベクターはCARだけでなく、その他の分子を認識して細胞へ感染することが可能なベクターである。RGD型:インテグリンを認識する。K7型:ヘパラン硫酸を認識する。F35型:CD46を認識する。Tat型:ヘパラン硫酸を認識するという報告はなされているが、詳細なメカニズムは不明。

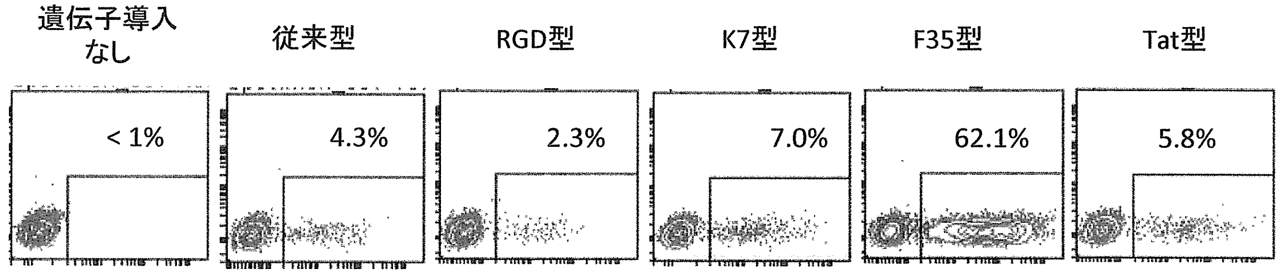


図2 CD34陽性細胞への遺伝子導入
ヒトCD34陽性細胞に対してGFPを発現する種々の改良型Adベクターを1,000VP/cellの濃度で作用させ、2日後にフローサイトメーターにてGFP発現細胞の割合は測定した。3回の実験の平均値をグラフ内に記入した。

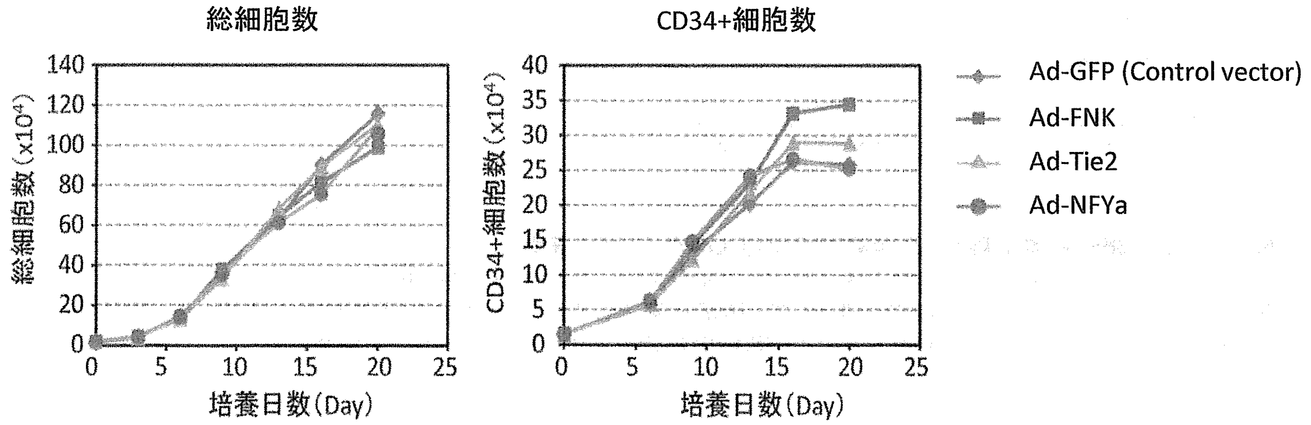


図3 機能遺伝子導入後の細胞数の変動解析
機能遺伝子を発現する各種Adベクター、ならびにコントロールベクターをヒトCD34陽性細胞へ作用させた。その後、3-4日おきに細胞数を計測した。また、フローサイトメーターにてCD34陽性細胞数の割合を解析し、総細胞数をもとにCD34⁺細胞数を算出した。

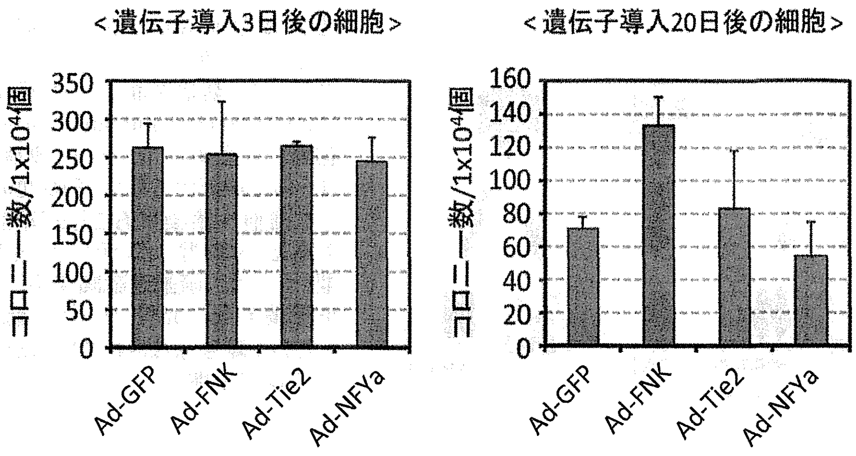


図4　機能遺伝子導入細胞のコロニー形成能の解析
機能遺伝子を発現する各種Adベクター、ならびにコントロールベクターをヒトCD34陽性細胞へ作用させた。遺伝子導入3日後、または20日後にコロニーアッセイを行った。

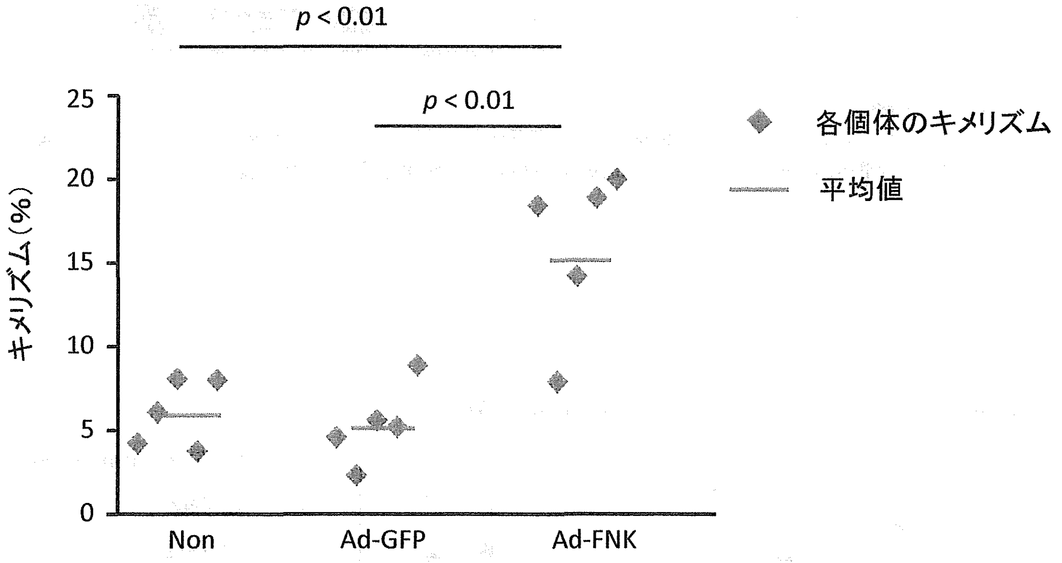


図5　ヒトCD34陽性細胞を移植した免疫不全マウスのキメリズム解析
3GyのX線を照射した免疫不全マウス($Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$マウス)へ、3,000 vp/cellの濃度でAdベクターを作用させたCD34陽性細胞を移植した。また、コントロールとして、遺伝子導入していないヒトCD34陽性細胞も移植した。移植4ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45を発現するドナー細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。

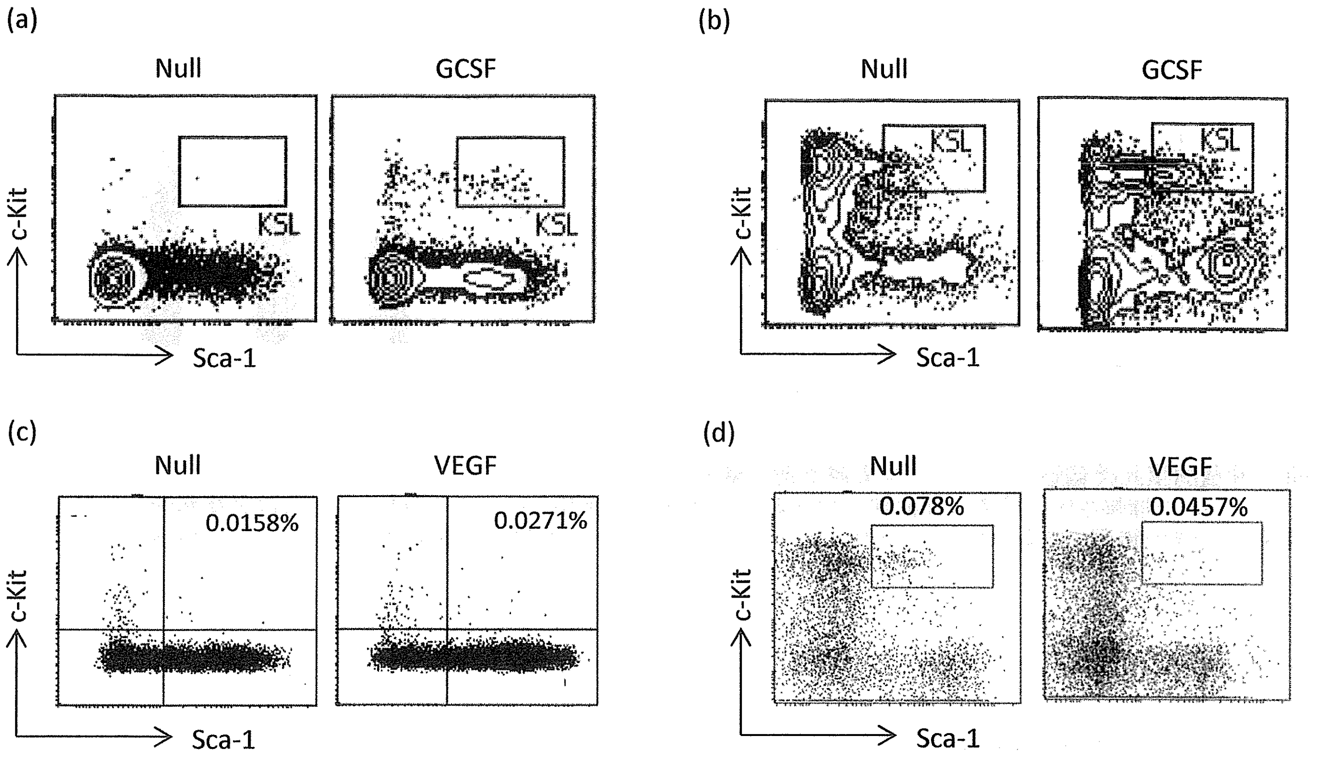


図6 サイトカイン発現Adベクター投与マウスの末梢血ならびに骨髄における造血幹細胞画分の解析
C57BL/6マウスに(a, b)Ad-GCSF、あるいは(c, d)Ad-VEGFを投与し、その5日後の末梢血細胞と骨髄細胞を回収した。また、外来遺伝子を搭載していないAdベクター、Ad-Nullをコントロールとして投与した。投与5日後、造血幹細胞を含まれる細胞画分(c-Kit+Sca-1+Lineage-細胞)をフローサイトメーターで解析した。(a, c)末梢血細胞 (b, d)骨髄細胞

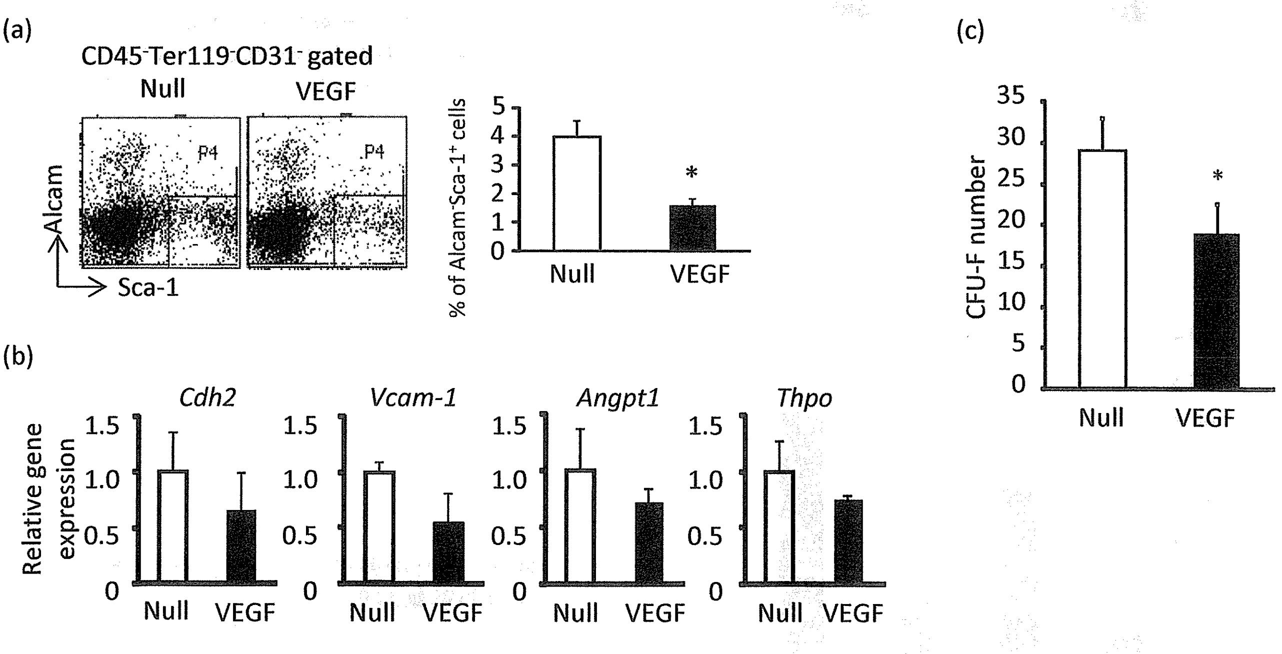


図7 VEGF投与マウスの骨髄間葉系幹細胞の解析
(a)Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与したマウスの大腿骨を回収し、FACSにより骨髄間葉系幹細胞が含まれる画分(CD45-Te119-CD31-Alcam-Sca-1+細胞)を解析した。(b, c)ベクター投与後のマウス大腿骨から非血液細胞(CD45-Ter119-細胞)を単離し、(b)RT-PCR法にて造血幹細胞の生着に関連する遺伝子の発現を解析した。また、(c)CFU-Fアッセイにより、間葉系幹細胞数を定量した。* $p < 0.05$

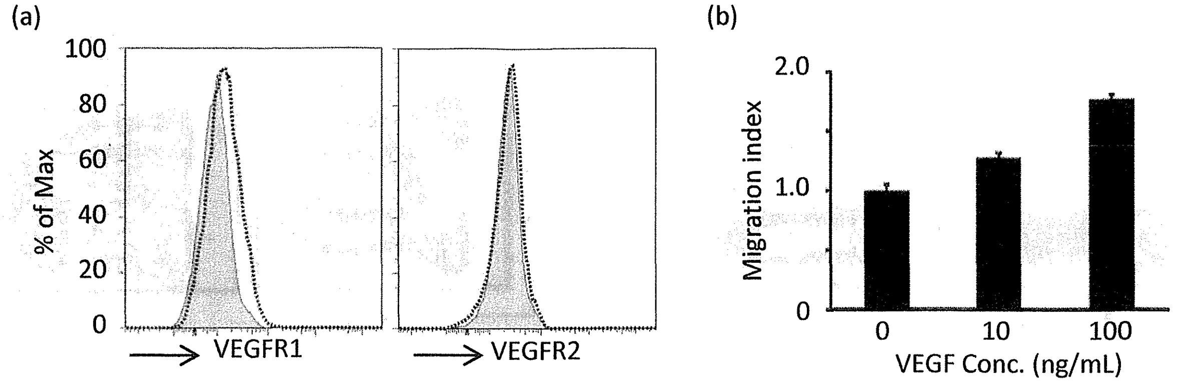


図8 骨髄間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能の解析

(a) In vitroで増幅させた間葉系幹細胞におけるVEGF受容体の発現をFACSにて解析した。点線が特異的な抗体を作用させたときの結果である。(b)トランズウェルチャンバーを用いて、間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能を評価した。

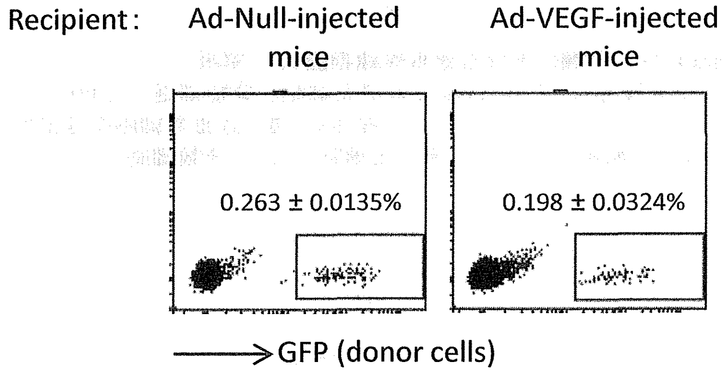


図9 ホーミングアッセイ

Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与したマウスへ、GFP発現骨髄細胞を移植した。移植16時間後に骨髄細胞を回収し、骨髄へ生着したドナー細胞をFACSにより解析した。

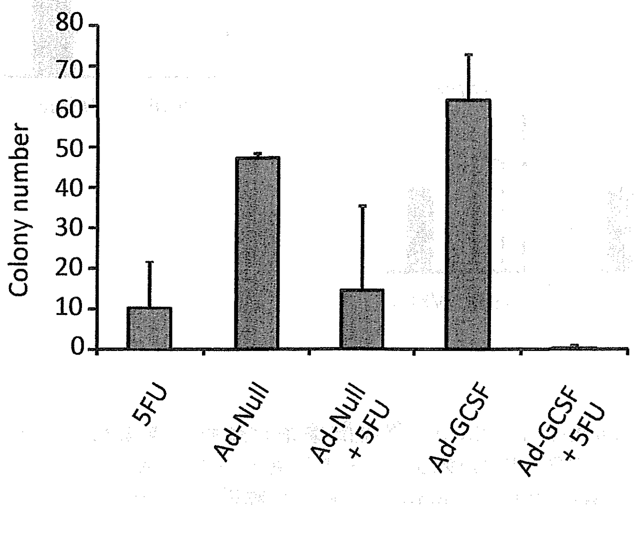
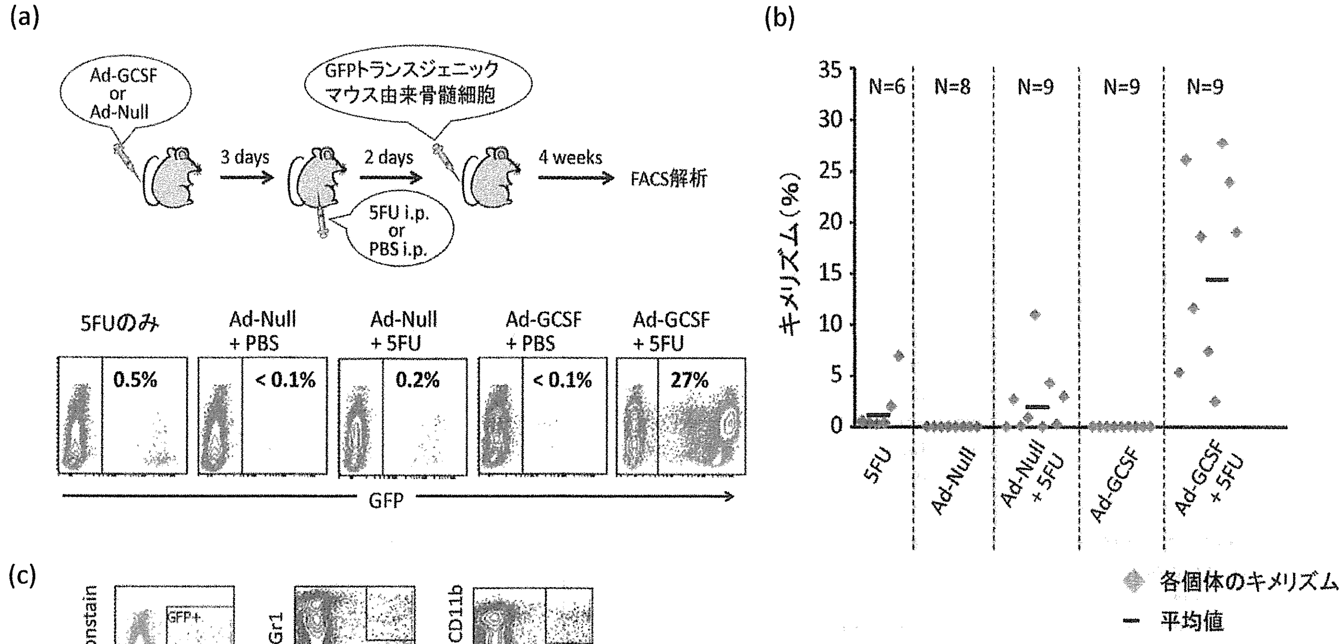


図10 種々の条件下におけるマウス骨髄中の血液前駆細胞数の解析

Adベクター(Ad-NullまたはAd-GCSF)を投与し、その3日後に抗がん剤5-FUを150mg/kgの量で腹腔内へ投与した。その2日後にマウス骨髄細胞を回収し、コロニーアッセイを行った。



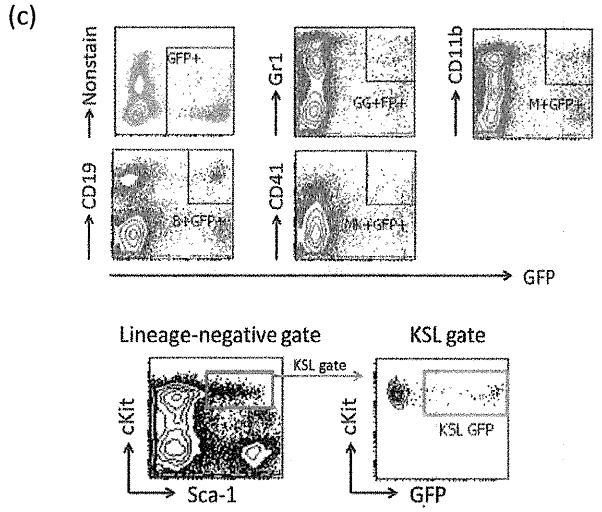


図11　Ad-GCSFと5FUを併用投与は、レシピエント骨髄環境の改変に有効である

（a）各条件でC57BL/6マウスを前処理し、GFP発現骨髄細胞を移植した。移植4週間後におけるキメリズムをフローサイトメーターにて解析した。（b）移植4週間後のキメリズムのまとめ。（c）Ad-GCSFと5-FUを併用投与したマウスにGFP発現骨髄細胞を移植し、その16週間後におけるキメリズムと各細胞系譜を解析した。また造血幹細胞が含まれるc-Kit+Sca-1+Lineage-（KSL）細胞画分も解析した。

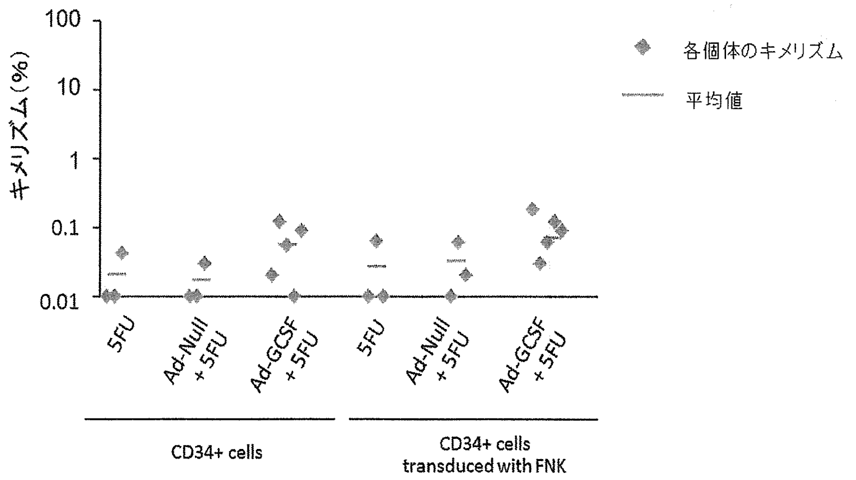


図12　サイトカインにて前処理した免疫不全マウスへのヒトCD34陽性細胞の移植

免疫不全マウスにAd-NullまたはAd-GCSFを投与し、その3日後に75mg/kgの5-FUを腹腔投与した。その2日後に遺伝子導入したCD34陽性細胞あるいは遺伝子導入していないCD34陽性細胞を移植した。移植1ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45の発現を指標にキメリズムを評価した。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tashiro K.	Optimization of adenovirus vectors for transduction in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	*Yakugaku Zasshi.*	**131**	1333-1338	2011
Sugio K., Sakurai F., Katayama K., Tashiro K., Matsui H., Kawabata K., Kawase A., Iwaki M., Hayakawa T., Fujiwara T., Mizuguchi H.	Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences.	*Clin Cancer Res.*	**17**	2807-2818	2011
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	Efficient and Directive Generation of Two Distinct Endoderm Lineages from Human ESCs and iPSCs by Differentiation Stage-Specific SOX17 Transduction	*PLoS ONE*	**6**	e21780	2011
Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H.	Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction.	*Stem Cell Res.*	**8**	300-311	2012
Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4α Transduction.	*Mol. Ther.*	**20**	127-137	2012
Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.	The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets.	*Biomaterials.*	**33**	4526-4534	2012

Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F.,	Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1α transduction.	*J. Hepatol.*	**57**	628-636	2012
Tashiro K.*, Omori M.*, Kawabata K., Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H. (*equally contributed)	Inhibition of Lnk in mouse induced pluripotent stem cells promotes hematopoietic cell generation	*Stem Cells Dev.*	**21**	3381-3390	2012
Tashiro K.*, Nonaka A.*, Hirata N., Yamaguchi T., Mizuguchi H., Kawabata K. (*equally contributed)	Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow.	*Stem Cells Dev.*			印刷中

YAKUGAKU ZASSHI 131(9) 1333—1338 (2011) © 2011 The Pharmaceutical Society of Japan

—Review—

アデノウイルスベクターを用いた ES, iPS 細胞への高効率遺伝子導入

田代克久

Optimization of Adenovirus Vectors for Transduction in Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells

Katsuhisa TASHIRO

Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received May 28, 2011)

Because embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells can differentiate into various types of cells *in vitro*, they are considered as a valuable model to understand the processes involved in the differentiation into functional cells as well as an unlimited source of cells for therapeutic applications. Efficient gene transduction method is one of the powerful tools for the basic researches and for differentiating ES and iPS cells into lineage-committed cells. Recently, we have developed an adenovirus (Ad) vector for efficient transduction into ES and iPS cells. We showed that Ad vectors containing the cytomegalovirus enhancer/β-actin promoter with β-actin intron (CA) promoter or the elongation factor (EF)-1α promoter were the appropriate for the transduction into ES and iPS cells. We also found that enforced expression of a *PPARγ* gene or a *Runx2* gene into mouse ES and iPS cells by an optimized Ad vector markedly augmented the differentiation of adipocytes or osteoblasts, respectively. Thus, a gene transfer technique using an Ad vector could be an advantage for the regulation of stem cell differentiation and could be applied to regenerative medicine based on ES and iPS cells.

Key words——gene transfer; adenovirus vector; embryonic stem cell; induced pluripotent stem cell; differentiation

1. はじめに

幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞であり，培養条件により *in vitro* で種々の細胞に分化可能であることから，再生医療や創薬研究等への医療応用が期待されている．医療応用が期待されている幹細胞として，受精卵（胚）から樹立された胚性幹（embryonic stem: ES）細胞[1,2]や生体に存在する間葉系幹細胞，[3] そして体細胞に 4 あるいは 3 種類の遺伝子（Oct-3/4, Sox2, Klf4,（c-Myc））を導入することにより作製された人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞[4,5]などが挙げられる．これらの幹細胞を医療へ応用するには，幹細胞から目的とする機能細胞を効率よく分化誘導する技術の確立が必須であるが，サイトカインや増殖因子等の液性因子のみを用いたこれまでの分化誘導法では，分化効率が十分とは言い難い．そこで，われわれは幹細胞へ分化関連遺伝子を導入することにより，機能細胞を高効率に誘導できるのではないかと考え研究を進めてきた．今回，ES 細胞，iPS 細胞へ高効率に遺伝子導入可能なアデノウイルス（Ad）ベクターを最適化するとともに，本 Ad ベクターを用いて機能遺伝子を導入した際の分化効率について評価したので，その結果を紹介する．[6-8)]

2. マウス ES, iPS 細胞への遺伝子導入

これまでマウス ES 細胞に対しては，エレクトロポレーション法やレトロウイルスベクターなどが外来遺伝子の導入法として汎用されてきた．[9-11] しかしこれらの方法では，導入遺伝子がランダムに染色体に組み込まれるだけでなく，細胞分化後も遺伝子発現が続き，細胞機能に影響を及ぼす可能性がある．医療への応用を考慮すると，一定の時期にのみ幹細胞に導入遺伝子を発現させて目的細胞へ分化させ，細胞分化完了後は導入遺伝子の発現が消失することが好ましい．すなわち，ES 細胞や iPS 細胞を含む幹細胞の分化誘導には，導入遺伝子を一過性に効率よく発現させるベクターが望まれる．この点，Ad ベクターは，遺伝子発現効率に優れているだけでなく，宿主染色体への遺伝子挿入を伴わないため，効率面及び安全面において“細胞分化の方向付け”を行う目的に適していると考えられる．そこで筆者らは，まず Ad ベクターを用いてマウス ES 細胞，iPS 細胞への遺伝子導入法の確立を行った．まず，プロモーターの異なる 4 種類（RSV, CMV, CA（β アクチンプロモーターと CMV エンハンサーからなるハイブリッドプロモーター），EF-1α）の β-ガラクトシダーゼ（LacZ）発現 Ad ベクターを調製した．マウス ES 細胞，iPS 細胞へ各種 Ad ベクターを 3000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させて LacZ 発現を解析した結果，従来の遺伝子導入実験で汎用されている RSV プロモーターや CMV プロモーターではほとんど LacZ の発現が検出されず，CA 及び EF-1α プロモーターを有する Ad ベクターを用いることにより極めて効率よく遺伝子導入できることが明らかとなった［Fig. 1 (A)］．[7,12]

次に Ad ベクターによる遺伝子導入がマウス iPS 細胞の多分化能に影響を与えるかどうかを検討した．Ad ベクターにより外来遺伝子（mCherry）を導入したマウス iPS 細胞を免疫不全マウスに皮下注射

独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト（〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8）
e-mail: tashiro@nibio.go.jp
本総説は，平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞（生物系薬学）の受賞を記念して記述したものである．

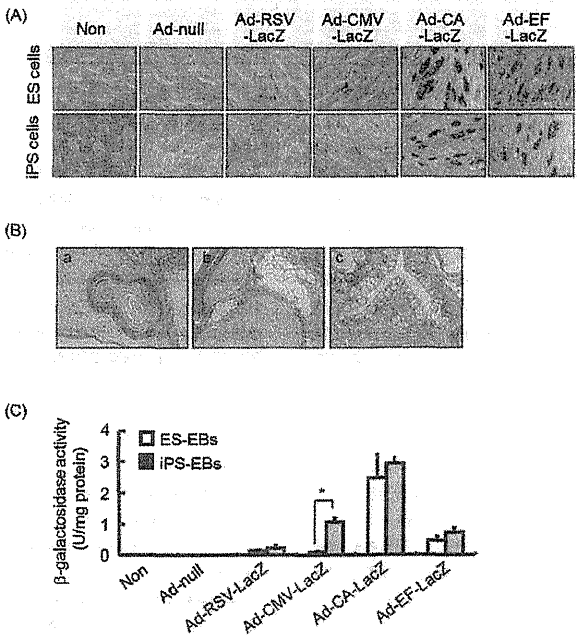


Fig. 1. Efficient Transgene Expression in Mouse ES and iPS Cells by an Ad Vector

(A) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with LacZ-expressing Ad vector at 3000 VP/cell for 1.5 h. On the following day, LacZ expression in the cells was detected by X-gal staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) Paraffin sections of the teratomas derived from Ad-CA-mCherry-treated iPS cells were prepared, and sections were stained with hematoxylin and eosin. a, ectoderm (epidermis); b, mesoderm (cartilage and adipocyte); c, endoderm (gut epithelium). (C) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with each Ad vector at 3000 VP/cell. After 48 h, β-galactosidase luminescence assay was carried out. Results shown were the mean of five independent experiments with indicated standard deviations.

し，形成させた奇形腫を解析した．その結果，Adベクターを作用させて形成した奇形腫は，皮膚（外胚葉），軟骨・脂肪（中胚葉）及び消化管様構造（内胚葉）などを含んでいたことから，多能性を保持していることが確認された［Fig. 1(B)］.[7] なお，マウスES細胞においても同様の結果が得られた．したがって，Adベクターはマウス ES, iPS 細胞の多分化能を妨げることなく，効率よく外来遺伝子を導入可能であることが示された．

マウスES細胞から目的の細胞へ分化させる場合，まず，胚様体（Embryoid body; EB）を形成させ，その後液性因子などを加えることにより目的細胞に分化させる手法が一般的である．そこで上述のLacZ発現Adベクターを用いて，ES-EB, iPS-EBへの遺伝子導入効率を評価した．その結果，ES-EB及びiPS-EBにおいてCAプロモーターを有するAdベクターを作用させた場合に最も高いLacZ発現が観察された［Fig. 1(C)］．以上の結果から，マウス ES, iPS 細胞，そしてこれらの細胞由来のEBへの遺伝子導入にはCAプロモーターを有するAdベクターが適していることが明らかとなった.[6,7]

3. 脂肪細胞，骨芽細胞への分化誘導

Adベクターを用いた遺伝子導入法が分化誘導系に応用可能か否か検討するため，機能遺伝子の導入を試みた．分化モデルとして ES, iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導を行うとともに，脂肪細胞分化に必須のPPARγ（peroxisome proliferator-activated receptory）遺伝子を ES, iPS 細胞へ導入することにより，脂肪細胞への分化効率が向上するかどうかを検討した．PPARγ遺伝子を ES, iPS 細胞へ導入し，脂肪細胞分化用の液性因子（インスリン等）中で培養することにより脂肪細胞への分化誘導を行った．その結果，液性因子のみを作用させる従来の誘導法では約40%の細胞が脂肪滴を蓄積していたのに対し，PPARγ遺伝子の導入と液性因子を併用した誘導法では，90%以上の細胞が脂肪滴を蓄積していた［Fig. 2(A)］.[6,7] すなわち，マウスES/iPS細胞から脂肪細胞への分化効率はAdベクターを用いたPPARγ遺伝子の導入により飛躍的に改善できることが示された．

次に，骨芽細胞への分化誘導系においても，Adベクターによる機能遺伝子の導入した際の分化効率について検討した．Adベクターを用いて ES, iPS 細胞へ骨芽細胞分化のマスター遺伝子であるRunx2（Runt-related transcription factor 2）遺伝子を導入し，βグリセロリン酸等の液性因子を含む培地中で培養した．骨芽細胞への分化効率を解析した結果，Runx2遺伝子を導入した ES, iPS 細胞は，液性因子のみで培養した細胞及びLacZ遺伝子（コントロール）を導入した細胞と比較し，石灰化した細胞が著明に増加していること明らかとなった［Fig. 2(B)］.[7] 以上の結果から，Adベクターを用いたRunx2遺伝子の導入により，骨芽細胞へ効率よく分化誘導可能であることが示された．

4. ヒト ES, iPS 細胞への遺伝子導入

ヒト ES, iPS 細胞は，アルカリフォスファターゼやOct-3/4, Nanogの発現など，マウス ES, iPS 細胞と同様の特徴を有する一方で，SSEA-4, TRA-1-60などの分子の発現や増殖速度，継代方法など，マウス ES, iPS 細胞との性質の違いも明らかとなっている．そこで，マウス ES, iPS 細胞で確立した遺伝子導入法がヒト ES, iPS 細胞においても応用可能か否か，LacZ発現Adベクターを用いて検討した．その結果，CA及びEF-1αプロモーターを有するAdベクターを作用させたヒト ES, iPS 細胞においてLacZの発現がコロニー全体でみとめられた［Fig. 3(A)］.[8] なお，ヒトiPS細胞のOct-3/4及びNanogの発現はAdベクターによる遺伝子導入後も維

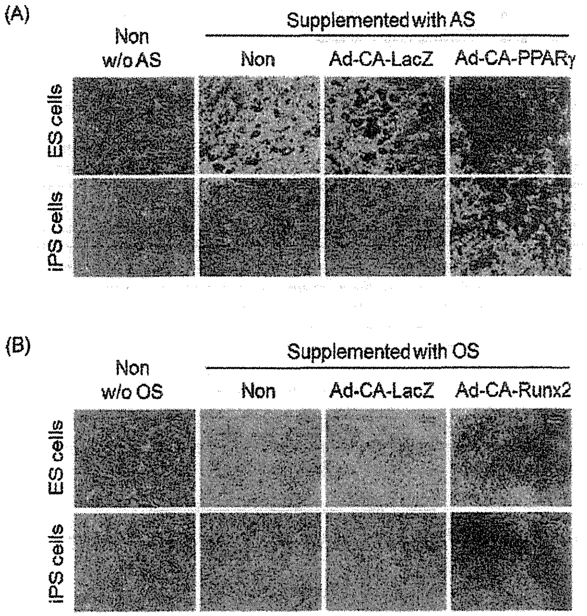


Fig. 2. Increased Adipocyte or Osteoblast Differentiation from Mouse ES and iPS Cells by Ad Vector-mediated *PPARγ* Gene or *Runx2* Gene Transduction

(A) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-CA-PPARγ. After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, ES-EBs and iPS-EBs were cultured for 15 d in the presence or absence of adipogenic supplements (AS). After cultivation, lipid accumulation was detected by oil red O staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-CA-Runx2, and were then cultured for 15 days with or without osteogenic supplements (OS). Matrix mineralization in the cells was detected by von Kossa staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. Abbreviation; w/o, without.

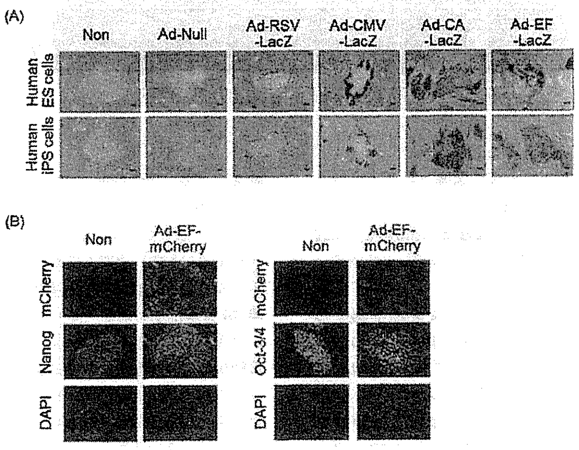


Fig. 3. Ad Vector Could Efficiently Transduce a Foreign Gene in Human ES and iPS Cells without Any Decrease in the Expression of Pluripotent Genes

(A) Human ES cells (KhES-1) and iPS cells (201B7) were passaged into culture plates in the presence of ROCK inhibitor, Y-27632. On the following day, they were transduced with LacZ-expressing Ad vectors containing various types of promoters at 3000 VP/cell for 1.5 h. Forty-eight hours later, X-gal staining was performed. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) Human ES cells and iPS cells were plated into culture plates using Y-27632. On the following day, they were transduced with Ad-EF-mCherry at 3000 VP/cell for 1.5 h. Two days later, the expression of Nanog (left) and Oct-3/4 (right) was detected by immunostaining.

持されていたことから，ヒト iPS 細胞は未分化を維持していることが示唆された［Fig. 3 (B)］.[8] したがって，マウス ES, iPS 細胞と同様に，ヒト ES, iPS 細胞への外来遺伝子の導入もプロモーターの選択が重要であること，そして CA 又は EF-1α プロモーターがヒト ES, iPS 細胞への遺伝子導入に適していることが明らかとなった.

5. おわりに

今回，筆者らは Ad ベクターを用いたマウス ES, iPS 細胞及びヒト ES, iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の確立に成功し，さらに，Ad ベクターを利用して分化関連遺伝子をマウス ES，iPS 細胞へ導入することにより特定の細胞へ効率よく分化誘導することに成功した．なお，異なる iPS 細胞株についても今回と同様の結果が得られており，最適化された Ad ベクターによる遺伝子導入法は種々の ES, iPS 細胞株に適用可能であることが示唆されている．現在，筆者らのグループでは Ad ベクターを用いた遺伝子導入技術を駆使して ES, iPS 細胞から他の細胞種への分化誘導も行っており，肝細胞様細胞[13]や血液細胞（未発表）を効率よく誘導することにも成功している．また，筆者らは Ad ベクターを用いて間葉系幹細胞，ヒト造血幹細胞への高効率遺伝子導入法も確立しており，これらの細胞を用いて医療応用を目指した研究を進めている.[14-16] 一過性発現を示す Ad ベクターを用いた ES, iPS 細胞を含む幹細胞への遺伝子導入技術は，幹細胞の分化誘導研究や再生医療研究において重要なツールになるものと考えられ，今後，ますますの応用が期待される.

謝辞　本稿で紹介した研究は，独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクトにて行われたものであり，多大なご協力を頂いた大阪大学大学院薬学研究科水口裕之教授（幹細胞制御プロジェクトチーフプロジェクトリーダー併任），幹細胞制御プロジェクトプロジェクトリーダー川端健二先生及び大阪大学大学院薬学研究科櫻井文教准教授を始めとする関係者の皆様に深く感謝いたします．また，マウス iPS 細胞，ヒト iPS 細胞をご供与頂きました京都大学山中伸弥教授，ヒト ES 細胞をご供与頂きました京都大学中辻憲夫教授に心より感謝いたします.

REFERENCES

1) Evans M. J., Kaufman M. H., *Nature*, **292**, 154–156 (1981).
2) Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M., *Science*, **282**, 1145–1147 (1998).
3) Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R., *Science*, **284**, 143–147 (1999).
4) Takahashi K., Yamanaka S., *Cell*, **126**, 663–676 (2006).
5) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
6) Tashiro K., Kawabata K., Sakurai H., Kurachi S., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H., *J. Gene Med.*, **10**, 498–507 (2008).
7) Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Stem Cells*, **27**, 1802–1811 (2009).
8) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Cell Reprogram*, **12**, 501–507 (2010).
9) Cherry S. R., Biniszkiewicz D., van Parijs L., Baltimore D., Jaenisch R., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7419–7426 (2000).
10) Kosaka Y., Kobayashi N., Fukazawa T., Totsugawa T., Maruyama M., Yong C., Arata T., Ikeda H., Kobayashi K., Ueda T., Kurabayashi Y., Tanaka N., *Artif. Organs*, **28**, 271–277 (2004).
11) Tompers D. M., Labosky P. A., *Stem Cells*, **22**, 243–249 (2004).
12) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **12**, 547–554 (2005).
13) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **19**, 400–407 (2011).
14) Mizuguchi H., Sasaki T., Kawabata K., Sakurai F., Hayakawa T., *Biochem. Biophys. Res.

Commun., **332**, 1101–1106 (2005).
15) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther*, **12**, 1424–1433 (2005).
16) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127–132 (2009).