

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。

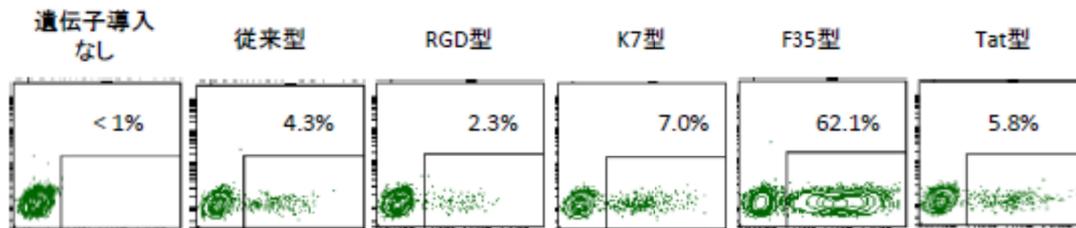


図2 CD34陽性細胞への遺伝子導入

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。

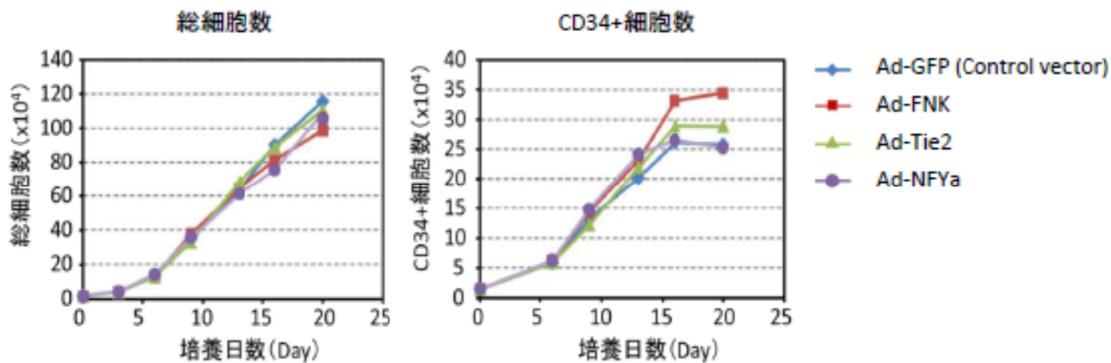


図3 機能遺伝子導入後の細胞数の変動解析

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。

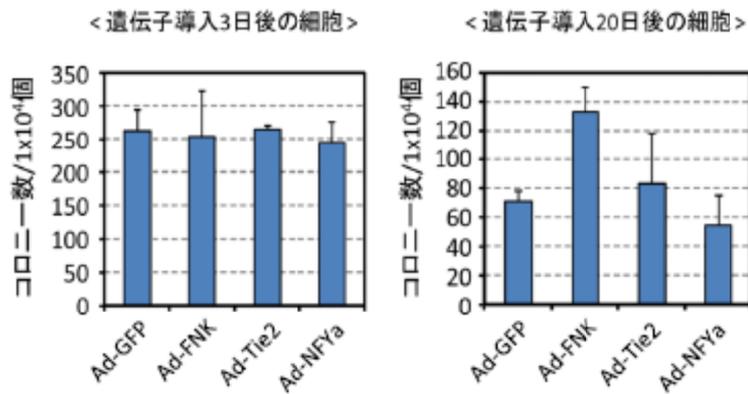


図4 機能遺伝子導入細胞のコロニー形成能の解析

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。

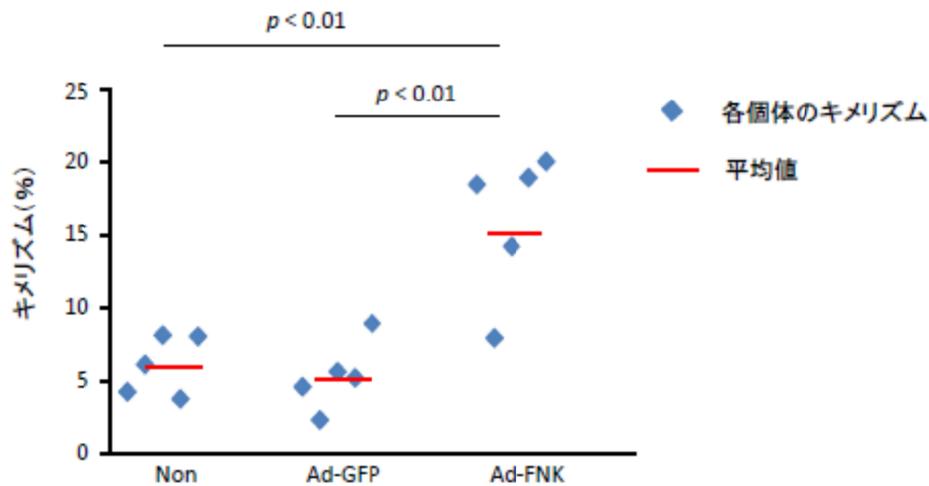


図5 ヒトCD34陽性細胞を移植した免疫不全マウスのキメリズム解析

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。

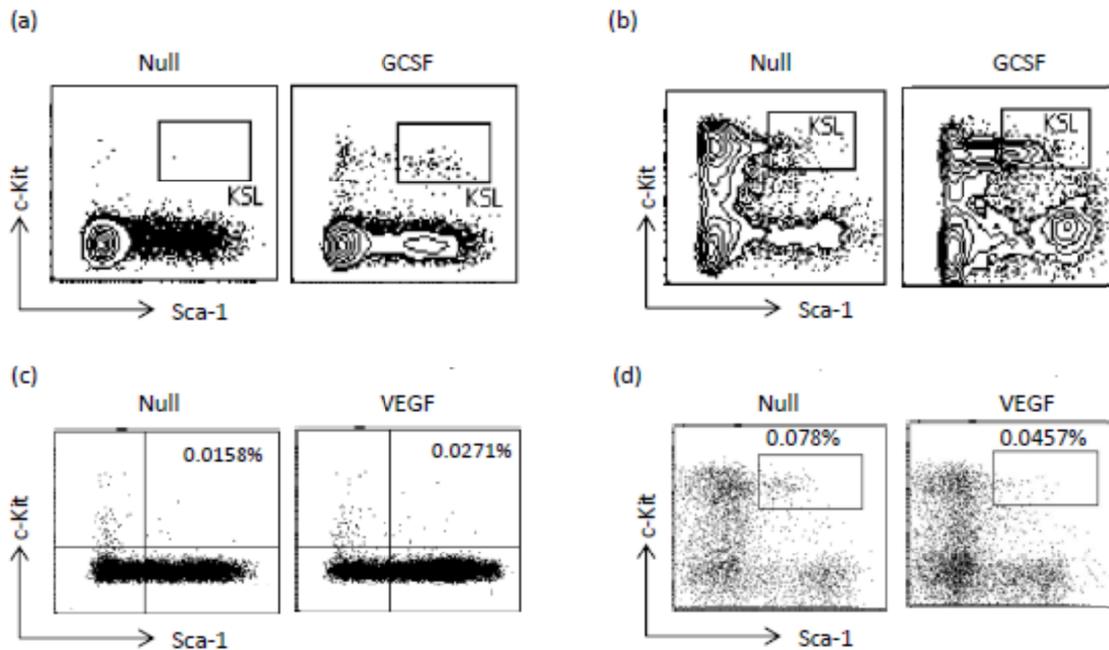


図6 サイトカイン発現Adベクター投与マウスの末梢血ならびに骨髄における造血幹細胞画分の解析
 C57BL/6マウスに(a, b)Ad-GCSF、あるいは(c, d)Ad-VEGFを投与し、その5日後の末梢血細胞と骨髄細胞を回収した。また、外来遺伝子を搭載していないAdベクター、Ad-Nullをコントロールとして投与した。投与5日後、造血幹細胞を含まれる細胞画分(c-Kit+Sca-1+Lineage-細胞)をフローサイトメーターで解析した。(a, c)末梢血細胞 (b, d)骨髄細胞

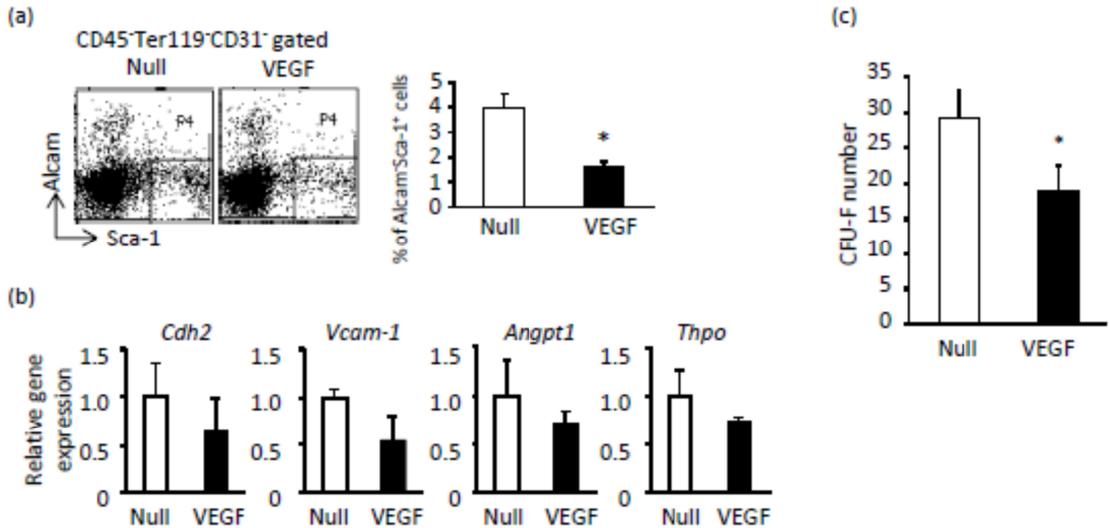


図7 VEGF投与マウスの骨髄間葉系幹細胞の解析
 (a) Ad-VEGFまたはAd-Nullを投与したマウスの大腿骨を回収し、FACSにより骨髄間葉系幹細胞が含まれる画分(CD45-Ter119-CD31-Alcam-Sca-1+細胞)を解析した。(b, c)ベクター投与後のマウス大腿骨から非血液細胞(CD45-Ter119-細胞)を単離し、(b)RT-PCR法にて造血幹細胞の生着に関連する遺伝子の発現を解析した。また、(c)CFU-Fアッセイにより、間葉系幹細胞数を定量した。* $p < 0.05$

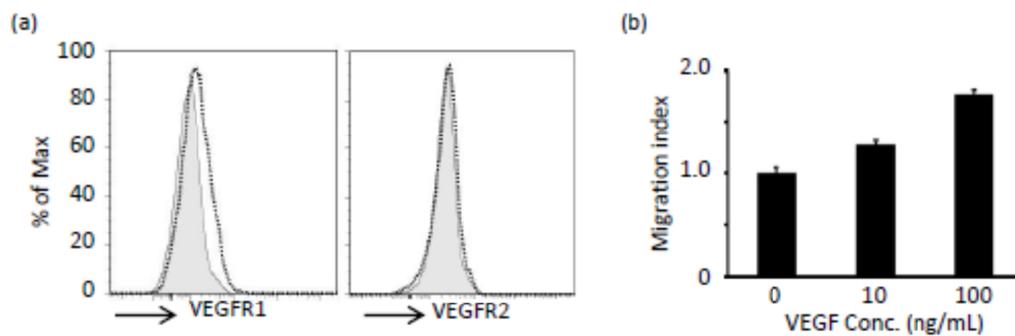


図8 骨髄間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能の解析

(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)トランスウェルチャンパーを用いて、間葉系幹細胞のVEGFに対する遊走能を評価した。

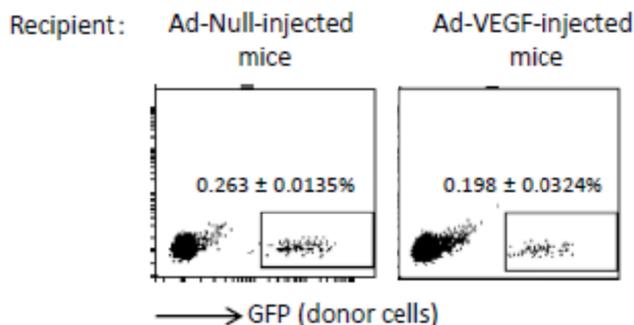


図9 ホーミングアッセイ

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。

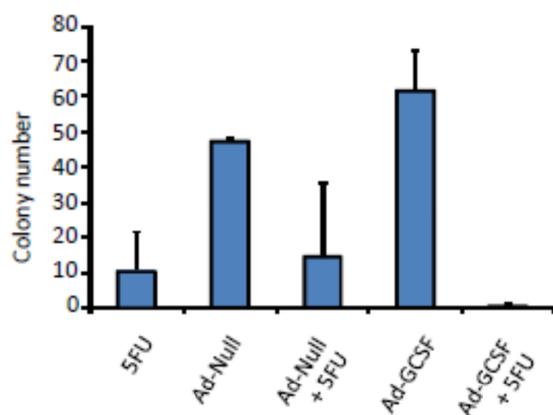


図10 種々の条件下におけるマウス骨髄中の血液前駆細胞数の解析

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。

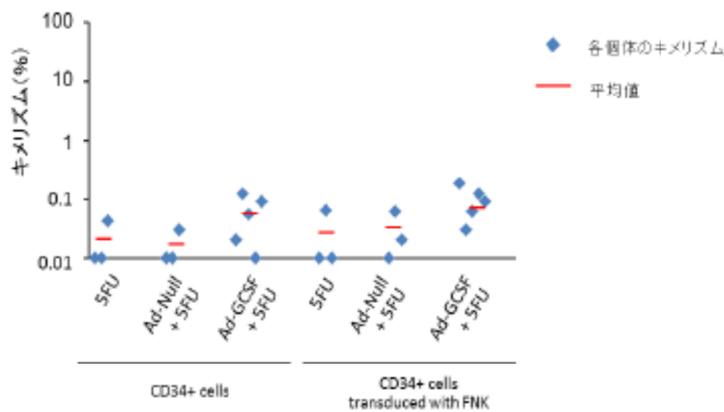
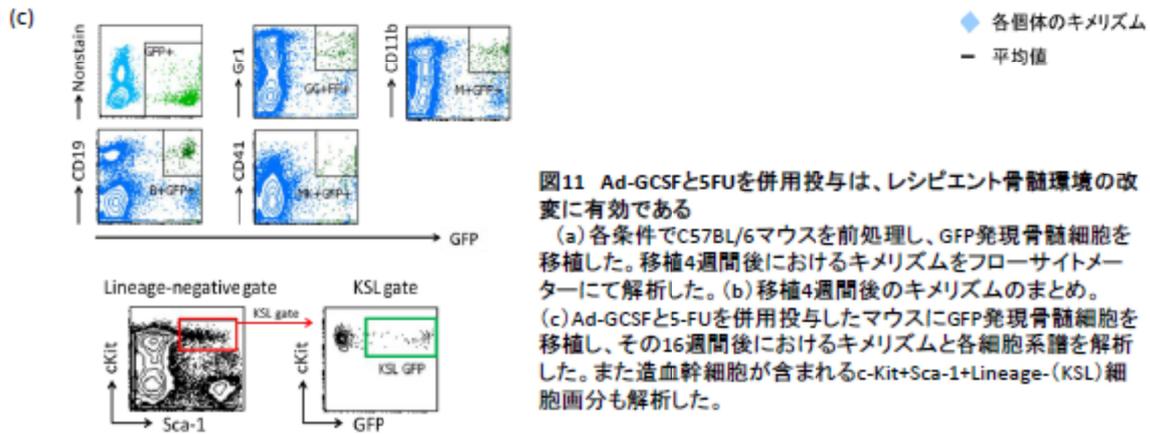
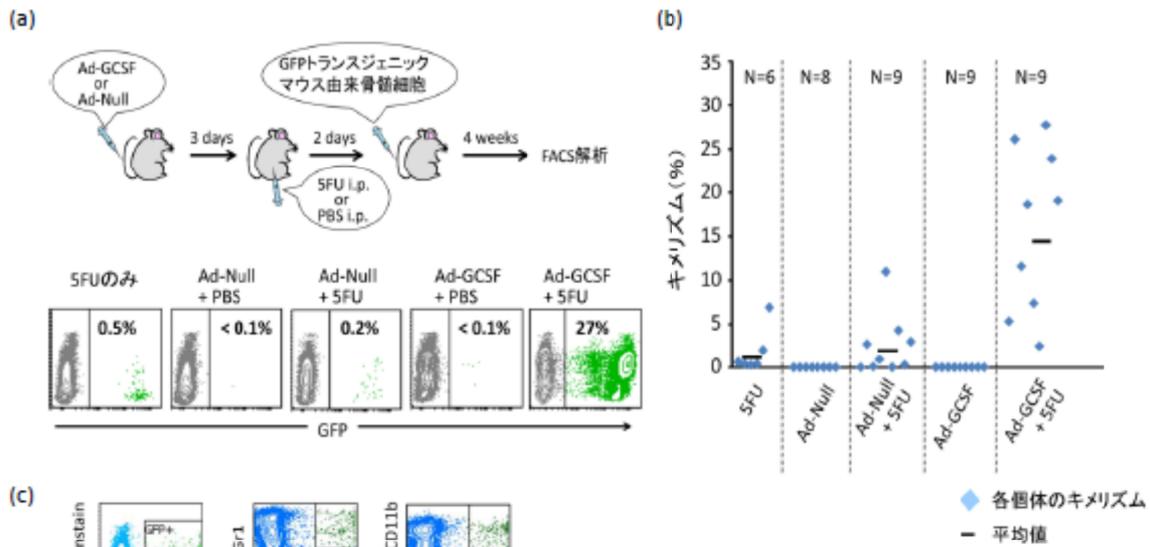


図12 サイトカインにて前処理した免疫不全マウスへのヒトCD34陽性細胞の移植
 免疫不全マウスにAd-NullまたはAd-GCSFを投与し、その3日後に75mg/kgの5-FUを腹腔投与した。その2日後に遺伝子導入したCD34陽性細胞あるいは遺伝子導入していないCD34陽性細胞を移植した。移植1ヶ月後に末梢血を回収し、ヒトCD45の発現を指標にキメリズムを評価した。