

## 造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための増殖分化制御システムの開発と応用

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨** 造血幹細胞移植をベースとした細胞治療法の可能性を拓げるため、造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、修復細胞の体内増幅のための増殖制御遺伝子〔選択的増幅遺伝子（SAG: selective amplifier gene）〕の開発を行った。これは、造血因子受容体の増殖シグナルを利用するもので、その活性を制御する分子スイッチとして、エストロゲン受容体やタモキシフェン受容体を用いたもの（第一世代 SAG）、さらに効率を改善するためにエリスロポエチン（EPO）受容体細胞外ドメインを用いたもの（第二世代 SAG 用）を作製した。マウスや霊長類のサルを用いて、この SAG システムが実際に機能することを個体レベルで確認した。さらに、移植前処置に代わる方法として、骨髄還流置換法が有効であることを示した。また、疾患モデルマウス（慢性肉芽腫症モデル）の系では、治療用遺伝子と第一世代 SAG を組み合わせた治療実験を行い、SAG システムの効果を確認した。一方、造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）に関しては、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させる技術の開発が鍵になる。そのためのプロトタイプの分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 $\alpha$  遺伝子を用いた。この場合、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化制御遺伝子を取り外す必要があり、Cre/loxP システムを応用した細胞制御遺伝子ゲノム着脱システム（ゲノムへの組込みと取り外し）の新規開発を進めた。Cre リコンビナーゼを一過性に発現させるためには、アデノウイルスベクターを用いることとし、未分化造血系細胞へ効率よく感染させるためのアダプター分子の開発を行った。この技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。本研究は、機能不全に陥った造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。その他、CD34 陽性細胞の採取・純化・移植に関する技術の確立や、対象疾患の診断技術に関する研究を行い、今後の臨床展開に備えた。

### 分担研究者

峯石 真

国立がんセンター 中央病院

医 長

山下 孝之

東京大学医科学研究所

助教授

寺尾 恵治

国立感染症研究所筑波霊長類センター

センター長

長谷川 護

ディナベック研究所

所 長

### A. 研究目的

細胞治療は今後大きな発展が期待される重要な医療技術の一つとして位置付けられる。その中で、造血幹細胞移植は最も先行している細胞治療であるが、そこにさらに細胞制御技術を絡ませることにより、臨床応用の可能性を一段と拓げることが可能となる。例えば、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、増殖制御遺伝子を利用することにより、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果のより一層の増強を図ることができる。この場合、体内での増幅効率を制御するための信頼性の高い分子スイッチ機構を付けておく必要がある。また一方、重要課題として従来

活発な研究が行われてきている造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）に関しては、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させるテクノロジーの開発が鍵になると考えられる。そのための新しいタイプの細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発を行った。この場合、体外増幅培養の期間中に限定してこの制御遺伝子を働かせる工夫が必要であり、理想的には、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化制御遺伝子を取り外すことができるようにするのが望ましい。そこで、細胞制御遺伝子ゲノム着脱システム（ゲノムへの組み込みと取り外し）の開発を試みた。このような先端技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。将来的には、量的制限のある臍帯血幹細胞移植の成人患者への適応拡大、さらには自己造血幹細胞の保存（バンキング）システムへの応用に繋がっていく魅力的な技術である。

以上、造血幹細胞移植の周辺技術として種々のタイプの増殖分化制御遺伝子の開拓を推進し、数年以内にその臨床応用を図るのが本研究の主な目的であり、造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。その他、大量のヒト CD34 陽性細胞の採取・純化および移植技術の確立や、対象となる疾患 [慢性肉芽腫症・ファンconi貧血 (FA) など] の診断技術に関する研究を並行して進め、本研究の臨床展開を図りやすい環境を整備する。

## B. 研究方法

### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発

#### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発（小澤、長谷川、寺尾）：

第一世代のエストロゲン（あるいはタモキシフェン）反応型選択的増幅遺伝子（SAG: selective amplifier gene）（GcR-ER あるいは GcR-TmR: 変異型 G-CSF 受容体とエストロゲン受容体あるいはタモキシフェン受容体のホルモン結合領域との融合蛋白質をコードする遺伝子）を組み込んだ造血幹細胞の移植実験を実施し、個体レベルでの検討を行った。マウスの系では、SAG とマーカー遺伝子（GFP 遺伝子）をレトロウイルスベクターで導入した骨髓細胞を致死量放射線照射マウスに移植して造血系を再構築し、その後、タ

モキシフェン投与により末梢血中のマーカー遺伝子導入細胞の比率をフローサイトメトリー法により検討した。さらに、カニクイザルの造血幹細胞自家移植の系でも、SAG の有用性を同様に調べた。移植法は、カニクイザルから骨髓血を採取し、CD34 陽性細胞を単離し、全身放射線照射を行ったサルに自家移植した。また、より厳密な解析を行うため、移植細胞の半分を非発現ベクターで遺伝子導入し、混合して移植し、SAG を導入したポピュレーションだけが刺激に反応するかどうか検討した。さらに、エストロゲン刺激で遺伝子導入細胞の増幅が見られたサルについては、inverse PCR 法／塩基配列決定によって、造血系再構築に寄与したクローンの経時的解析を行った

次に、より強力な増幅効果をもつ第二世代 SAG を新たに開発するため、エリスロポエチン受容体（EPOR）の細胞外領域／膜貫通領域を分子スイッチに利用した EPOR 反応型 SAG（EPOR-GcR, EPOR-Mpl 遺伝子）を構築した。この第二世代 SAG の機能を調べるために、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に導入して EPOR 刺激による増殖刺激作用を調べた。次に、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて、EPOR 刺激による増幅効果と分化特性を、液体培養、コロニーアッセイ及びフローサイトメトリーにより検討した。さらに、マウスの造血系再構築実験でその有効性を検討した。解析用マーカーとしては、ミトコンドリア局在黄色蛍光タンパク質（mtYFP）を用いた。EPORmpl-ires-YFP 遺伝子、あるいはコントロールとして YFP 遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを骨髓細胞に *in vitro* で感染させ、放射線照射マウスに移植した。移植後 6 週目と 10 週目に、マウス EPOR (rmEPOR) を 1 週間投与した。マウス末梢血における遺伝子導入細胞の比率はフローサイトメーターにより解析した。さらに、霊長類のサルを用いた実験も平行して開始した。

また、臨床応用を考慮し、移植前処置としての骨髓廃絶を行わない自家移植が可能かどうかサルの系で検討した。即ち、より侵襲性の低い骨髓採取・移植法である＜骨髓還流置換法（Bone Marrow Replacement, BMR）＞（池原法）の応用である。全身麻酔下で大腿骨もしくは上腕骨の両端を露出させ、長骨両端に穿刺針を留置した。穿刺針の近位端と遠

位端にシリンジを取りつけ、髄腔内を陰圧に保つように遠位端のシリンジを吸引しながら、近位端のシリンジから滅菌 PBS を還流させ、骨髓採取を行った。長骨への細胞移植は、細胞浮遊液を充填したシリンジを骨髓遠位端に取り付け、近位端に取り付けたシリンジに陰圧をかけ、髄腔内に細胞を移植した。移植後、2-8週間隔で腸骨より骨髓を採取し、造血系コロニーアッセイを行い、導入遺伝子の検出をリアルタイム PCR 法にて行った。

その他、G<sub>0</sub> 期にある造血幹細胞への遺伝子導入にはレンチウイルスベクターが適していると思われるが、非病原性のサル免疫不全ウイルス (SIVagm) に由来するベクターの利用を検討した。方法は、サル CD34 陽性細胞に SIV ベクターで GFP 遺伝子を導入し、その効率を調べた。尚、SIV ベクターを用いた霊長類の実験計画は、国立感染症研究所および文部科学省 (基準外組換え DNA 実験) から既に承認を受けている。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験 (小澤) :

X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 遺伝子治療臨床研究が成功した要因を検討するため、コモンガンマ鎖ノックアウトマウス (X-SCID マウス) をベースにして樹立した Ly5.1/Ly5.2 コンジェニックマウスを用いて骨髓移植実験を行った。野生型 Ly5.2 マウスの骨髓細胞を  $10^5 \cdot 10^6 \cdot 10^7$  個ずつ前処置なしの野生型 Ly5.1 マウスならびに X-SCID/Ly5.1 マウスに移植し、白血球キメリズムの推移を観察した。

次に、正常コモンガンマ鎖遺伝子導入による X-SCID マウスの造血幹細胞遺伝子治療実験を行った。血球系において長期間高発現が期待できるシスエレメントを組み合わせたレトロウイルスベクター骨格 (MGK) を構築し、これに正常コモンガンマ鎖遺伝子と GFP 遺伝子を組み込んだ。致死量放射線照射 X-SCID レシピエントに遺伝子導入骨髓細胞を移植し、造血系再構築過程を解析した。

SAG を利用した造血幹細胞修復治療のモデル実験としては、gp91 遺伝子ノックアウトにより作製された X 連鎖慢性肉芽腫症モデルマウス (X-CGD マウス: 好中球など食細胞が活性酸素を産生できない) を用い、エストロゲン反応型第一世代 SAG の *in vivo* 細胞増幅効果を解析した。即ち、X-CGD マウスの骨

髄細胞に GcR-ER・gp91 両遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、造血能を破壊した X-CGD レシピエントに移植した。造血系再構築後、半数の移植個体にエストロゲンを 4 週毎に 6 回投与した。また、エストロゲン非投与群では、同じ観察期間終了後にエストロゲン投与による反応性の確認を行った。

3) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発 (小澤) :

分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体  $\alpha$  遺伝子 (RARE) を用いた。この分化制御遺伝子のゲノムからの取り外しには Cre/loxP システムを応用した。即ち、体外培養で造血幹細胞を増やす間は分化抑制遺伝子を働かせ、その後で Cre リコンビナーゼを発現させて分化抑制遺伝子を取り外すという戦略である。まず、loxP に挟まれた RARE 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを構築した。基本コンセプトの確認には、G-CSF 依存性分化能を示す 32D 細胞に導入し、細胞分化が抑制されるかどうか検討した。さらに、この細胞に Cre リコンビナーゼ遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、RARE 遺伝子が 32D 細胞のゲノムから除去されるかどうか、また細胞分化能が回復するかどうかを検討した。

次に、Cre の発現は一過性であることが望ましいため、新たにアデノウイルスベクター (Ad) の利用を検討した。特に、造血系細胞への遺伝子導入効率を高めるため、Ad ベクターと造血幹細胞を架橋するアダプター分子 [CAR-SCF: アデノウイルス受容体 (CAR) の細胞外領域と SCF 細胞外領域の融合蛋白質] の開発を行った。細胞株で有効性をまず確認し、次に臍帯血および骨髓由来の CD34 陽性細胞を用いて感染効率の改善が得られるかどうか検討した。

2. 臨床応用に向けた準備 (峯石、山下、小澤) :

ヒト造血幹細胞の採取法に関して、G-CSF 投与後の末梢血から大量の生着可能な CD34 陽性細胞を効率よく分離する細胞処理技術を確認し、移植後の造血回復・免疫回復を確認した。これまでにこのような移植法を用いて移植した患者の移植成績を追究した。

また、FA の病態を分子レベルで明らかに

し、これら新しい知見に基づいた分子診断法を開発するため、個々の患者の病態を検討した。特に、FA 蛋白が形成する分子経路の機構の解析と、日本人患者における遺伝子変異の検索を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、動物倫理面(動物愛護上の配慮など)を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。筑波霊長類センターでのサルの実験は、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。臨床研究における末梢血幹細胞採取および CD34 陽性細胞純化は、当該施設の倫理委員会またはそれに準ずる組織によって認可されたプロトコールに拠った。遺伝子解析などを実施する場合は、被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除すると共に、インフォームドコンセントをきちんと取得した。

### C. 研究結果

#### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発

##### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発:

GFP 遺伝子を SAG と共に導入した骨髄細胞で造血系を再構築したマウスでは、タモキシフェン投与により末梢血中の GFP 陽性細胞の比率が有意に増加した。同様の結果は、二次移植を行ったマウスでも得られた。

次に、カニクイザルの造血幹細胞自家移植の系で、SAG システムを同様に検討した。最初のサルでは、移植後、内因性エストロゲンに反応して 40%前後の造血前駆細胞 (CFU-C) にマーカー遺伝子が検出された。移植半年後、そのような CFU-C は 5%まで低下したためエストロゲンの投与を開始した。その結果、マーカー遺伝子陽性 CFU-C が再び増加し、約 30%になった。その後の実験では、骨髄 CD34 陽性細胞を二分し、一方は SAG 発現レトロウイルスベクターで遺伝子導入を行い、もう一方は非発現ベクターで遺伝子導入を行い、両者を同時に自家移植した。移植 3-6 ヶ月後、エストロゲンまたはタモキシフェンを投与したところ、末梢血中の SAG 導入細胞が 10 倍前後に増加した (<0.1%から 1%)。一方、非発現ベクターで遺伝子導入した細胞には変化がみられなかった。尚、SAG システムに

よる増幅効果は一時的であった。

第一世代 SAG を用いて CFU の増幅が得られたカニクイザルで、体内増幅した CFU のクローン解析 (inverse PCR 法/塩基配列決定) を行ったところ、14 個の独立クローンが得られた。この結果より、SAG による増幅システムでは、サル体内で複数のクローンに由来する造血系前駆細胞が増幅したことを確認することができた。

尚、移植を受けたサルは最長で 2 年以上経過するが、その間、SAG による白血病または骨髄増殖性疾患等の発生やその他の重大な副作用は認められていない。

第二世代の EPO 反応型 SAG (EPOR-GcR, EPOR-Mpl 遺伝子) については、Ba/F3 細胞に導入して調べたところ、EPO 依存性増殖能の獲得が認められた。そして、狙い通り、第一世代のタモキシフェン反応型 SAG と比較して増殖刺激活性がより強力であることが示された。次に、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いた検討では、EPOR-Mpl 遺伝子を導入した場合に、液体培養系において最も顕著な細胞増殖が認められた。さらに、増殖した細胞の c-Kit 陽性率も、EPOR-Mpl 遺伝子の場合が最も高い値を維持していた。コロニーアッセイにおいても EPO 刺激によるコロニー形成能は EPOR-Mpl 導入細胞が最も高かった。マウスを用いた個体レベルの実験では、EPORmpl-ires-YFP 発現レトロウイルスベクター、あるいは YFP 発現ベクターで遺伝子導入した骨髄細胞を移植した。これらのマウスをそれぞれ 2 群に分け、一方に rmEPO を投与し、他方は rmEPO 非投与群として飼育した。その結果、EPORmpl-ires-YFP 遺伝子導入マウスでは rmEPO に反応して、投与 1-2 週後に末梢血中の YFP 陽性細胞の比率が有意に上昇した。これに対し、EPO 非投与群では YFP 陽性細胞の比率の上昇は見られなかった。コントロールマウスである YFP 遺伝子のみを導入したマウスでは、rmEPO の有無に関わらず、YFP 陽性細胞の比率は変動しなかった。また、EPORmpl-ires-YFP を導入した細胞を移植したマウスの骨髄を採取し、別の放射線照射マウスに二次移植したところ、rmEPO に対する反応が軽度ではあるが観察された。尚、遺伝子導入したマウスに白血病発症などの異常は観察されなかった。第二世代 SAG に関するサルを用いた実験は、現在、実施中であ

る。

骨髓還流置換法による移植法の検討では、一端から圧をかけ陽圧で他端から流出させる方法（陽圧法）と、一端から吸引し髄腔内を陰圧にして他端から流入させる方法（陰圧法）がある。陽圧法では、血栓塞栓症などを誘発する危険性があるが、今回、髄圧モニター装置を用いて術中の髄圧を常時モニターしながら、陰圧法で骨髓採取（還流）、細胞移植（置換）の両方を行う方法を確立した。また、この方法では、移植後2週目には導入遺伝子陽性前駆細胞が移植部位と異なる腸骨内に検出され、移植細胞が比較的短時間に骨髓内を移動することが判明した。

SIV ベクターを用いたサル CD34 陽性細胞への GFP 遺伝子の導入では、CD34 陽性細胞の約 50%、CFU の約 30% が GFP 陽性になった。また、レトロウイルスベクターで4日を要した遺伝子導入が、SIV ベクターを用いれば1日で同等の結果が得られた。

## 2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験：

骨髓移植実験で、野生型ドナー細胞 (Ly5.2) は野生型レシピエント (Ly5.1) には生着できず、 $10^7$  個移植した場合でも 1% 以下の白血球キメリズムしか示さなかった。しかし、同じ骨髓細胞が X-SCID レシピエントにはよく生着した。すなわち、移植後5ヶ月における全白血球キメリズムは、 $10^5$  個移植群で  $11 \pm 10\%$ 、 $10^6$  個移植群で  $54 \pm 10\%$ 、 $10^7$  個移植群で  $75 \pm 7\%$  であった。これを白血球リネエジごとに詳しく解析したところ、ドナー由来細胞の中でも、X-SCID レシピエントによく生着するのはリンパ球に限られることが判明した。リンパ球の絶対数についても、移植前にはほとんど存在しなかったものが、 $10^5$  個移植群で正常の  $13 \pm 7\%$ 、 $10^6$  個移植群で  $35 \pm 11\%$ 、 $10^7$  個移植群で  $73 \pm 8\%$  (リンパ球サブセットごとにみると 50-100%) にまで回復した。

X-SCID マウスの造血幹細胞修復治療実験では、致死量放射線照射 X-SCID レシピエントに遺伝子導入骨髓細胞を移植すると、造血系再構築に伴い良好なリンパ系再構築が得られた。次に、ヒトでの臨床研究と同様に、前処置を施さない X-SCID レシピエントに遺伝子導入細胞を移植して経過を観察した。移植後1ヶ月の時点で、遺伝子導入リンパ球 (GFP 陽性) がレシピエント体内で順調にふ

えつつあるが、顆粒球・単球リネエジにおいては遺伝子導入細胞がほとんど認められなかった。

X-CGD マウスの造血系修復治療実験では、GcR-ER・gp91 両遺伝子を導入した骨髓細胞で造血系を再構築したマウスにおいて、半数の個体にエストロゲンを投与した。その結果、エストロゲン投与群では初回から2週以内に活性酸素産生好中球が  $11 \pm 4\%$  から  $32 \pm 36\%$  に増加したのに対し、対照群では  $8 \pm 2\%$  から  $4 \pm 4\%$  に低下した。その後の反復投与期間中、対照群の活性酸素産生好中球の割合は 5% 以下と低値で推移したが、エストロゲン投与群ではおおむね 20% 以上を維持し、20週以上にわたり有意差を持続した。6回の投与後、12週あけて先の対照群にエストロゲンを投与したところ、活性酸素産生好中球は  $5 \pm 5\%$  から  $37 \pm 4\%$  へと増加し、第一世代 (GcR-ER 遺伝子) を用いた細胞増幅効果を再確認した。

## 3) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

1oxP 配列に挟まれた RARE 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入した 32D 細胞について解析したところ、そのような細胞では親株と異なり、G-CSF 存在下でも分化せずに増幅するようになった。次に、この細胞に Cre リコンビナーゼ遺伝子をレトロウイルスベクターで導入したところ、G-CSF による分化能を回復した。その際、RARE 遺伝子が 32D 細胞のゲノムから除去されたことは PCR 法で確認できた。

造血幹細胞で Cre を一過性に発現させる方法についても検討を進めた。Ad ベクターの造血幹細胞への感染効率を改善するアダプター分子として、CAR-SCF を作成した。これは Ad ベクターと未分化造血系細胞を架橋する分子である。SCF 受容体 (c-Kit) を比較的多く発現しているヒト白血病細胞株 UT-7 を用いてその有効性を検討したところ、アダプター分子の添加によって GFP 発現アデノウイルスベクターの遺伝子導入効率が約 20% から 80% に上昇した。また、GFP 陽性細胞の GFP 発現レベルも有意に高くなった。ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞への eGFP 発現 Ad ベクター遺伝子導入においては、Ad 架橋蛋

白質 CAR-SCF を培養液に添加することで、eGFP 陽性率は  $9.8 \pm 3.7\%$  から  $17.5 \pm 2.5\%$  に改善され、骨髄由来 CD34 陽性細胞でも同様の効果が得られた。

## 2. 臨床応用に向けた準備：

大量幹細胞採取と、磁気ビーズ法を用いた臨床グレードの純化技術を安定して行うことができた。純化後の CD34 細胞の純度は 94 パーセント以上、CD34 細胞の回収率は 70% 以上であった。純化操作によって幹細胞の生着力は損なわれなかった。また、弱い前処置によって CD34 陽性細胞を移植する方法を検討した。

FA 蛋白が形成する分子経路の検討では、核局在シグナル(NLS)と FANCG 結合領域を持つ FANCA 蛋白 N 末領域の機能を明らかにするため、種々の変異体を解析した。その結果、安定な FA 複合体の形成は FANCD2 活性化に促進的に働くが、必須ではなく、FANCA の核移行とリン酸化が重要な役割を果たすことが示唆された。26 例の FA 患者で FANCA 遺伝子の塩基配列を決定し、10 例で病的変異を見出した。この中で 2546delC (888X) や 1303C>T (Arg435Cys) が日本人に特徴的な変異として見出された。また、非血縁 10 家系において FANCG 両アリルの変異を同定した。いずれの変異も固有の haplotype と完全に関連しており、各々が共通の祖先に由来する founder 変異であることが示された。

## D. 考察

### 1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発

#### 1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発：

SAG を利用することにより、機能修復した造血系細胞を体内で選択的に増幅させることが可能であることを、マウス及びカニクイザルの系で示した。但し、増幅効果が持続しないことから、増幅は主に造血前駆細胞レベルで生じているものと考えられた。但し、慢性肉芽腫症を対象とする場合は、感染症などの必要時にのみ顆粒球を増幅させるだけでも臨床的には充分価値があると考えられる。

第一世代のエストロゲンあるいはタモキシフェン反応型 SAG に関しては、有効性という点で、サルで充分安定した増幅効果は得られなかった。そこで、EPO 反応型の第二

世代 SAG を開発した。このシステムでは、分子スイッチ部分を細胞外に配置することにより、細胞内で発生する増殖シグナルがスムーズに核に伝達されることが考えられること、また SAG に由来するキメラ分子全体の 3 次構造がリガンド結合により自然な形で変化すると想定され、より強力な増殖シグナルを誘発できるものと推定した。実際に、*in vitro* のデータでは、増幅効率が明らかに改善し、また、Mpl の増殖シグナルは EPOR あるいは GcR よりも未分化造血系細胞の増幅により適しているものと考えられた。

第二世代 SAG を用いたマウス個体レベルの実験では、EPO の投与は重篤な副作用もなく、第一世代の場合のエストロゲンあるいはタモキシフェンに比べて臨床応用に適していると考えている。現在、サルを用いた前臨床研究として、第一世代 SAG を凌ぐ増幅効果が狙い通り得られるかどうか、検討を進めている。また、SAG システムによって増幅された遺伝子導入細胞が多クローン性であることを、第一世代 SAG を用いたサルの実験系で確認した。即ち、単一クローンの非特異的変動によるものでないことが確認された。

移植法に関しては、安全で確実な骨髄還流置換法を確立したが、この方法を採用することにより、移植前処置を行わないで済む見通しが立った。非腫瘍性疾患を対象とした細胞移植／遺伝子治療を行う上で重要な基盤技術になるものと期待される。尚、前処置を行わない骨髄内移植法で移植した遺伝子導入細胞を、SAG システムでさらに増幅できるかどうか、サルを用いて検討を開始している。

造血幹細胞への遺伝子導入法については、これまでの実験ではレトロウイルスベクターを用いてきた。一方、レンチウイルスベクターは、その感染に際して細胞分裂を必要としないというユニークな特徴がある。造血幹細胞は分裂頻度が低いうえ、分裂させると容易に分化してしまうため、細胞分裂を起こさずに遺伝子導入できるレンチウイルスベクターの開発が新しい方法として期待されている。尚、一般的には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をベースにしたものが用いられている。しかし、HIV-1 はヒトに対して強い病原性がある点が懸念される。ところが、同じ霊長類レンチウイルスでも、アフリカミドリザル由来のもの (SIVagm : Simian

Immunodeficiency Virus African green monkey) は自然宿主に対して病原性がない。しかも、HIV-1 とは遺伝学的にかなり離れている。したがって、SIVagm ベクターが HIV-1 と組換えを起こして新種ウイルスを作り出す可能性は低く、安全性が高いものと想定されている。

## 2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験：

X-SCID マウスへの正常骨髄細胞の移植実験では、正常なコモンガンマ鎖遺伝子を持つリンパ球が X-SCID 個体において選択的な増殖優位性をもち、この疾患では少数の正常化した造血幹細胞でもリンパ系を再構築できることを示唆している。X-SCID マウスを用いた造血幹細胞遺伝子治療実験でも、正常コモンガンマ鎖遺伝子を獲得したリンパ球のみ選択的な増殖優位性を発揮してリンパ系を再構成し、骨髄移植実験と同様の結果が得られた。

X-SCID の場合と異なり、X-CGD においては、治療用遺伝子 (gp91 遺伝子) そのものによる増殖優位性賦与は期待できない。実際、これまで行われた X-CGD 遺伝子治療の第一相臨床研究では、前処置なしで遺伝子導入細胞の自家移植が行われたが、患者末梢血中には一過性にごく少数の活性酸素産生細胞が出現しただけで、長期の生着には至らなかった。そこでこのような疾患に対しては、治療用遺伝子と共に SAG を同時に造血幹細胞に組み込んで、必要時に誘導剤を投与して遺伝子導入細胞の体内増幅を図る方法を考案した。そこで、GcR-ER キメラ分子と gp91 を同時に発現するレトロウイルスベクターを構築し、X-CGD マウスの骨髄細胞に遺伝子導入し、コンジェニック X-CGD レシピエントに移植した。エストロゲン刺激に反応して遺伝子導入好中球が早期に増加したことは、GcR のシグナルが主に顆粒球・単球系前駆細胞の増殖を促すことを示唆している。したがって、GcR-ER は慢性肉芽腫症など、このリニエージを冒す疾患の遺伝子治療の効果増強に適している。一方、他のリニエージまたはより未熟な造血前駆細胞/幹細胞を増幅するためには、それに適するシグナルを発する造血因子受容体を探索する必要がある。そこで、c-Mpl のシグナルをエリスロポエチンで制御する第二世代 SAG について、X-CGD マウスを用いて *in vivo* 実験を開始した。予備実験で

は、やはり効果が認められている。

## 3) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

細胞株 (32D) を用いた検討では狙い通りの効果が得られ、コンセプト自体は有効であることが確認できた。Cre リコンビナーゼ遺伝子を一過性に働かせる方法については Ad ベクターが適しており、そのための技術開発を行った。即ち、Ad ベクターの造血細胞への吸着を仲介するアダプター分子を開発し、従来は困難であった未分化造血系細胞への Ad ベクターによる遺伝子導入を可能とした。

今後、新鮮骨髄細胞やヒト臍帯血細胞を用いた系において、造血幹細胞レベルの未分化細胞でもこのストラテジーが働くかどうか調べるのが重要である。ヒト造血幹細胞の体外増幅培養の期間だけ分化抑制遺伝子を働かせ、移植時にはその遺伝子を取り外す方法が確立できれば、その意義は大きい。また、このシステムは造血幹細胞以外の細胞を増幅させる場合にも応用が可能であり、再生医療のための基本テクノロジーに発展していく可能性を秘めている。

## 2. 臨床応用に向けた準備：

抗 CD34 抗体-免疫磁気ビーズ法によって、従来よりも優れた純度、回収率で CD34 陽性細胞を安定して純化することができた。

FA に関する病態解析や診断法の開発は、この疾患に対する新しい治療法を開発していく上で重要であり、貴重な知見が蓄積されてきたと考えている。

## E. 結論

造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。前者では、選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用し、移植した造血幹細胞の体内での増幅が可能かどうかマウスや霊長類のサル系を用いて検討し、少なくとも前駆細胞レベルでの増幅を確認した。今後、第二世代 EPO 反応型 SAG の臨床応用に向けた開発研究に力を入れていく計画である。尚、最初の対象疾患と想定している慢性肉芽腫症の疾患モデルマウスの系でも、SAG システムの効果が認められた。また、骨髄還流置換法という移植前処置に代わる方法を確立した。その他、将来的な遺伝子導入法として、SIV

ベクターの評価を行った。一方、造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）の場合は、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させる必要があり、そのための細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発を推進した。プロトタイプの分化抑制遺伝子としては、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 $\alpha$ 遺伝子を用いた。さらに、不要となった分化制御遺伝子を取り外すために、Cre/loxP システムを応用した細胞制御遺伝子ゲノム着脱システム（ゲノムへの組込みと取り外し）の新規開発を行った。

その他、臨床応用のための基盤技術として、免疫磁気ビーズ法による CD34 陽性細胞純化法を行い、臨床的に有用なレベルの造血幹細胞の純化を短時間に施行可能とした。この方法は臨床的遺伝子導入の標的細胞を準備するのに有用である。また、FA の分子病態の解析、日本人 FA 患者の遺伝子解析を行った。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Ozawa, K., and Hasegawa, M.: New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 170-176, 2003.

2) Kume, A., Koremoto, M., Xu, R., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J. Gene Med.* 5: 175-181, 2003.

3) Kami, M., Hamaki, T., Miyakoshi, S., Murashige, N., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., Taniguchi, S., Hirai, H., Ozawa, K., and Kasai, M.: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.* 120: 304-309, 2003.

4) Komatsu, N., Watanabe, T., Uchida, M., Mori, M., Kirito, K., Kikuchi, S., Liu, Q., Tauchi, T., Miyazawa, K., Endo, H., Nagai,

T., and Ozawa, K.: A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. *J. Biol. Chem.* 278: 6411-6419, 2003.

5) Kume, A., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K., Ozawa, K., and Takaku, F.: Lymphoid reconstitution in X-linked severe combined immunodeficient mice by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Japan Acad.* 78, Ser.B: 211-216, 2002.

6) Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ohto, K., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Donahue, R.E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: Safe and efficient methods of autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical research in cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 52: 445-451, 2002.

7) Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., and Ozawa, K.: Selective expansion of transduced cells for hematopoietic stem cell gene therapy. *Int. J. Hematol.* 76: 299-304, 2002.

8) Hanazono, Y., Terao, K., Shibata, H., Nagashima, T., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Kato, I., Kume, A., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: Introduction of the green fluorescent protein gene into hematopoietic stem cells results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates. *J. Gene Med.* 4: 470-477, 2002.

9) Asano, T., Hanazono, Y., Ueda, Y., Muramatsu, S., Kume, A., Suemori, H., Suzuki, Y., Kondo, Y., Harii, K., Hasegawa, M., Nakatsuji, N., and Ozawa, K.: Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol. Ther.* 6: 162-168, 2002.

10) Hanazono, Y., Nagashima, T., Takatoku, M., Shibata, H., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Dunbar, C.E., Kume, A., Terao, K., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther.* 9: 1055-1064, 2002.

11) Kume, A., Koremoto, M., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K., and Ozawa, K.: Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients. *Bone Marrow Transplant.* 30: 113-118, 2002.



- 12) Kirito, K., Osawa, M., Morita, H., Shimizu, R., Yamamoto, M., Oda, A., Fujita, H., Tanaka, M., Nakajima, K., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood* 99: 3220-3227, 2002.
- 13) Otsuki, T., Nagashima, T., Komatsu, N., Kirito, K., Furukawa, Y., Kobayashi, S., Liu, J.M., and Ozawa, K.: Phosphorylation of Fanconi anemia protein, FANCA, is regulated by Akt kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 628-634, 2002.
- 14) Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 99: 102-110, 2002.
- 15) Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol-3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.* 277: 8329-8337, 2002.
- 16) Kishino, K., Muroi, K., Kawano, C., Obata, T., Sugano, N., Nakagi, Y., Nagashima, T., Watari, K., Iwamoto, S., and Ozawa, K.: Evaluation of engraftment by ABO genotypic analysis of erythroid burst-forming units after bone marrow transplantation. *Leuk. Res.* 26: 13-17, 2002.
- 17) Ohtsuki, T., Furukawa, Y., Ikeda, K., Endo, H., Yamashita, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Ozawa, K., and Liu, J.M.: Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2651-2660, 2001.
- 18) Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 39012-39020, 2001.
- 19) Muramatsu, M., Hanazono, Y., Ogasawara, Y., Okada, T., Mizukami, H., Kume, A., Mizoguchi, H., and Ozawa, K.: Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 891-896, 2001.
- 20) Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98: 422-427, 2001.
- 21) Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and Ozawa, K.: Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* 73: 469-475, 2001.
- 22) Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes. Regulation of cell cycling as a downstream molecule of thrombopoietin signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 15082-15089, 2001.
- 23) Hanazono, Y., Terao, K., and Ozawa, K.: Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* 19: 12-23, 2001.
- 24) Uchida, M., Kirito, K., Shimizu, R., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of mitogen-activated protein kinases, Erk1 and Erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: A possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int. J. Hematol.* 73: 78-83, 2001.
- 25) Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K., and Inaba, T.: Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 21: 854-864, 2001.
- 26) Tarumoto, T., Imagawa, S., Ohmine, K., Nagai, T., Higuchi, M., Imai, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., and Ozawa, K.: N(G)-monomethyl-L-arginine inhibits erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2. *Blood* 96: 1716-1722, 2000.
- 27) Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., Momoi, M., Miura, Y., Ozawa, K., and

- Komatsu, N.: A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96: 941-949, 2000.
- 28) Muroi, K., Tarumoto, T., Akioka, T., Kirito, K., Nagai, T., Izumi, T., Nakamura, M., Hatake, K., Hakomori, S., Miura, Y., and Ozawa, K.: Sialyl-Tn- and neuron-specific enolase positive minimally differentiated erythroleukemia. *Intern. Med.* 39: 843-846, 2000.
- 29) Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. *J. Biol. Chem.* 275: 24945-24952, 2000.
- 30) Kume, A., Xu, R., Ueda, Y., Urabe, M., and Ozawa, K.: Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes. *Gene Ther.* 7: 1193-1199, 2000.
- 31) Hanazono, Y., Dunbar, C.E., Donahue, R.E., Kato, I., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Kume, A., Terao, K., and Ozawa, K.: Basic studies toward hematopoietic stem cell gene therapy. In: *Cell Therapy* (ed. by Ikeda, Y., Hata, J., Koyasu, S., Kawakami, Y., Hattori, Y.), Springer-Verlag, Tokyo, p.159-169, 2000.
- 32) Muroi, K., Suzuki, T., Amemiya, Y., Yoshida, M., Kawano, C., Kuribara, R., Otsuki, T., Izumi, T., Tomizuka, H., Komatsu, N., Imagawa, S., Hatake, K., Miura, Y., and Ozawa, K.: Autologous peripheral blood stem cell transplantation for adults with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a pilot study. *Leukemia Lymphoma* 38: 103-111, 2000.
- 33) Ozawa, K., Xu, R., Matsuda, K.M., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Hanazono, Y., and Kume, A.: Development of selective amplifier genes for hematopoietic stem cell gene therapy. *Proceeding of the International Workshop "Stem Cell Biology and Cellular and Molecular Treatment"*, pp. 135-140, 2000.
- 34) Saito, T., Kanda, Y., Kami, M., Kato, K., Shoji, N., Kanai, S., Ohnishi, T., Kawano, Y., Nakai, K., Ogasawara, T., Matsubara, H., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 8:1014-1020, 2002.
- 35) Takebe, N., Zhao, S.C., Adhikari, D., Mineishi, S., Banerjee, D., Sadelain, M., Hilton, J., Colvin, M., and Bertino, J.R.: Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene. *Mol. Ther.* 3:88-96, 2001.
- 36) Suenaga, K., Kanda, Y., Niiya, H., Nakai, K., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Takeuchi, T., Tanosaki, R., Makimoto, A., Miyawaki, S., Ohnishi, T., Kanai, S., Tobinai, K., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Successful application of non myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp. Hematol.* 29: 639-642, 2001.
- 37) Saito, T., Nakamura, F., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Reduced intensity regimen for a second mismatched transplant. *Haematologica* 86: 780-781, 2001.
- 38) Niiya, H., Kanda, Y., Saito, T., Ohnishi, T., Kanai, S., Kaano, Y., Kamijo, K., Iizuka, A., Yakushijin, K., Ueda, K., Chizuka, A., Iijima, K., Ohnishi, M., Nakai, K., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Early full donor myeloid chimerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. *Haematologica* 86: 1071-1074, 2001.
- 39) Mineishi, S., Saito, T., Kanda, Y., Tanosaki, R., Tobinai, K., Takaue, Y.: Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. *Jpn J Clin Oncol.* 31: 43-45, 2001.
- 40) Watanabe, T., Mineishi, S., Kawano, Y., Takaue, Y.: Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells. *Leuk. Lymphoma* 37: 487-496, 2000.

- 41) Yamashita, T. and Nakahata, T.: Current Knowledge on the Pathophysiology of Fanconi Anemia: From Genes to Phenotypes. Int J Hematol (in press)
- 42) Adachi D, Oda T, Yagasaki H, Nakasato K, Taniguchi T, D'Andrea AD, Asano S, Yamashita T.: Heterogenous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants. Hum. Mol. Genet. 11:3125-3134, 2002.
- 43) Yagasaki, H., Adachi, D., Oda, T., Garcia Higuera, I., Tetteh, N., D'Andrea, A.D., Futaki, M., Asano, S., and Yamashita, T.: A cytoplasmic serine protein kinase binds and may regulate the Fanconi anemia protein FANCA. Blood 98: 3650-3657, 2001.
- 44) Oda, T., Muramatsu, M.A., Isogai, T., Masuho, Y., Asano, S., and Yamashita, T.: HSH2: a novel SH2 domain-containing adapter protein involved in tyrosine kinase signaling in hematopoietic cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16: 1078-1086, 2001.
- 45) Yamashita, T. and Nakahata, T.: Current knowledge on the pathophysiology of Fanconi anemia: from genes to phenotypes. Int. J. Hematol. 74: 33-41, 2001.
- 46) Ageyama, N., Shibata, H., Narita, H., Hanari, K., Khono, A., Ono, F., Yoshikawa, Y. and Terao, K.: Specific gravity of whole blood and total blood volume in nonhuman primates. Contemporary Top. Lab. Animal Sci., 40: 33 35, 2001.
- 47) Osada, N., Hida, M., Tanuma, R., Iseki, K., Hirata, M., Suto, Y., Hirai, M., Terao, K., Suzuki, Y., Sugano, S. and Hashimoto, K: Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosome. Gene 275: 31-37, 2001.
- 48) Futaki, M., Yamashita, T., Yagasaki, H., Toda, T., Yabe, M., Kato, S., Asano, S., and Nakahata, T.: The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. Blood. 95: 1493-1498, 2000.
- 49) Murayama, Y. Terao, K., and Inoue Murayama, M.: Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. Hum. Immunol. 61: 474-485, 2000.
- 50) Nakajima, T., Nakamaru, K., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M.: Development of novel nonpathogenic simian immunodeficiency virus vector carrying dual gene expression system. Hum. Gene Ther. 11: 1863 1874, 2000.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 「選択的増殖性を付与する遺伝子」  
出願日 1996. 03. 05  
出願番号 特願平 9-531668  
公開番号 W097/32971  
発明者：小澤敬也、坂田恒昭、伊藤克久、上田泰次、長島建之、長谷川護
- 2) 「2 遺伝子を発現するベクター (SIV)」  
出願日 1999. 6. 22  
出願番号 特願平 11-175646  
公開番号 W000/78987  
発明者：中島俊洋、中丸健治、長谷川護、速水正憲、井戸栄治
- 3) 「ヘマグルチニン活性を有するシュードタイプレトロウィルスベクター」  
出願日 2000. 6. 1  
出願番号 特願 2000-169090  
発明者：長谷川護、米満吉和、中島俊洋、榊原裕幸、中丸健治、飯田章博、小林雅典、上田泰次
- 4) 「可逆的遺伝子導入ベクター」  
出願日：2001 年 7 月 5 日  
出願番号：特願 2001-205236  
発明者：伊藤章、花園豊、小澤敬也  
“Vector for Reversible Gene Integration”  
出願国：アメリカ  
出願日：2002 年 7 月 3 日  
発明者：伊藤章、花園豊、小澤敬也
- 5) 「アデノウイルス吸着架橋剤」  
出願日：2001 年 10 月 16 日  
出願番号：特願 2001-317766  
発明者：伊藤章、花園豊、岡田尚巳、小澤敬也  
出願国：アメリカ  
出願番号：No. 10/270555  
発明者：伊藤章、花園豊、岡田尚巳、小澤敬也