

別添様式

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）事後評価資料

研究課題：造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究

課題番号：H15-再生-014

主任研究者：所属機関 自治医科大学

氏名 小澤敬也

分担研究者：所属機関 自治医科大学

氏名 久米晃啓

所属機関 自治医科大学

氏名 花園 豊

所属機関 ディナベック株式会社

氏名 長谷川護

所属機関 国立感染症研究所筑波霊長類センター

氏名 寺尾恵治

1. 研究目的

再生医療は体性幹細胞あるいはES細胞を利用するアプローチに大別される。前者の代表が造血幹細胞移植であるが、そこ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上げることが可能となる。本研究では、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において、第二世代選択的増幅遺伝子（SAG: selective amplifier gene）の利用により、修復造血系細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果の増強を図る技術を開発する。このシステムを慢性肉芽腫症の幹細胞治療に応用するため、第二世代SAGを改良・最適化し、疾患モデルマウスでの有効性を確認する。さらに、霊長類のサルでの有効性・安全性試験を行う。その成果に基づいて臨床プロトコルを策定し、数年以内の臨床研究実施を目指す。

体性幹細胞を利用するもう一つの研究テーマは、分化転換技術により非造血系組織から造血系を再生させるプロジェクトである。幹細胞の生理的可塑性は限定的であるため、遺伝子操作技術の応用が鍵となる。具体的には、筋肉で脱分化誘導遺伝子を一時的に作用させることにより、脱分化段階を経て、造血系再構築能を持った細胞に再分化させるという、全く新しい再生医療技術の開発に取り組む。後天性難治性造血器疾患において、ゲノムに異常の生じていない患者自身の非造血系組織から正常造血系を再生することが可能になれば、将来的には画期的な治療法に繋がるものと期待される。

ES細胞を利用する再生医療に関しては、ヒトへの応用展開を考慮し、霊長類のサルのES細胞を用いた個体レベルの研究を行う。この分野でも遺伝子操作技術は必須のツールであり、SIV（サル免

疫不全ウイルス）ベクターやセンダイウイルスベクターを利用し、体内追跡用マーカー遺伝子を導入したES細胞のサル体内での造血系への分化を検討する。将来的には、ES細胞に分化制御遺伝子や特定の機能遺伝子を導入した再生医療法の開発を行う。

尚、造血幹細胞やES細胞の遺伝子操作に関して、安全性を高めるため、染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発を進める。最近、造血幹細胞遺伝子治療で白血病の発生が深刻な問題となっており、このような基盤技術は重要な研究テーマとなっている。

2. 研究方法

1) 選択的増幅遺伝子（SAG）を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用（小澤、長谷川、寺尾）：EPO反応型の第二世代SAG [EPO受容体細胞外領域とMpl受容体の細胞内領域の融合蛋白質をコードする遺伝子] について、サルの系で造血系再構築実験を行い、その有効性（SAG導入造血系細胞のEPO投与に対する反応性）を検討した。また、応用研究では、疾患モデルマウスを用いた検討を行った。

i) 標識細胞の経静脈的移植実験：非翻訳遺伝子搭載レトロウイルスベクターPL1によって、末梢血CD34陽性細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入細胞は、伏在静脈より注入した。移植後、経時的に末梢血、骨髓血を採取し、リアルタイムPCRにて末梢血での導入効率、あるいはコロニーPCRにて骨髓CFUの遺伝子導入効率を求めた。

ii) SAG併用体内増幅実験（経静脈的移植）：EpoRMpl搭載レトロウイルスベクターを用いた末梢血CD34陽性細胞に遺伝子導入を行ない、

- 1)と同様に移植し、経時的にSAG検出用プライマーを用い遺伝子導入効率を求めた。
- iii) SAGと骨髓内移植法 (iBMT法) 併用実験における長期観察: 移植前処置 (全身放射線照射) の代わりに、骨髓還流置換法 (池原法) を行った。即ち、サルの大腿骨および上腕骨のそれぞれ両端に針を刺し、骨髓腔を洗浄した。その後、遺伝子導入CD34細胞を骨髓腔内に注入した。移植サルに対してEPOを投与し、末梢血中の遺伝子導入効率を求めた。
- iv) 疾患モデルでの治療実験として、X連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) モデルマウス (gp91遺伝子ノックアウトマウス) の骨髓細胞にヒトgp91遺伝子と第二世代SAG (EpoR^{Mpl}キメラ遺伝子) を同時に導入した。このドナー細胞を致死量放射線照射した同系マウスに移植し、活性酸素産生能を回復した顆粒球がEPO投与により増幅されるかをジヒドロローダミン-123還元法フローサイトメトリー (DHR法) にて追跡した。さらに、顆粒球単球系疾患であるCGDの治療に合わせて第二世代SAGを改良するため、Mplに替えてヒト顆粒球コロニー刺激因子受容体 (GcR) 細胞内部分をEpoRに融合させたキメラ分子を数種構築し、サイトカイン依存性細胞株およびマウス骨髓造血前駆細胞を用いて細胞増幅効率を検討した (久米)。
- 2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発 (久米) :
- 骨格筋系細胞株を脱分化させる作用をもつMsx1 転写因子発現用アデノ随伴ウイルスベクター (AAV/Msx1) をマウス骨格筋に注射し、経時的に筋組織を採取して分化マーカーの発現パターンを解析した。また、採取した筋組織から単核細胞を分離し、半固形培地にまいて造血コロニー形成能を測定するとともに、致死量放射線照射したコンジュニックマウスに移植して造血系再構築能を測定した。
- 3) 霊長類ES細胞からの造血系再生技術の開発 (花園、寺尾) :
- i) サルES細胞に関して、以下の基礎研究を行った。
- ・サルES細胞の安定的継代培養法を開発し、抗体アレイを用いた網羅的解析による霊長類ES細胞に特異的なstemness markerを検索した。
 - ・サルES細胞からin vitroで血液細胞を作り出す方法の基礎的検討として、骨髓CD34細胞を用いた分化誘導系を検討した。
 - ・サルES細胞、またはES細胞からin vitroで分化誘導した細胞を同種胎児に移植し、テラトーマ発生などのリスク評価および移植した細胞

の体内分化能を評価した。

- ii) サルES細胞の遺伝子操作技術: センダイウイルスベクター (SeV) を用いてサルES細胞にGFP 遺伝子を導入した。経時的にGFP の発現、ES細胞の分化能を調べた。SeV ベクターによって導入した GFP 遺伝子の発現を抗ウイルス剤であるリバビリン添加によって調節できないかどうかを検討した。
- iii) サルES細胞からの in vivo 造血再生: サルES細胞からサル体内で造血再構築をめざす実験を行った。移植後の細胞の運命を追跡できるように、GFP 遺伝子を恒常的に発現するサルES細胞を用いた。まず、サルES細胞を in vitro で6日間かけて初期中胚葉に分化させた。ここには造血や血管内皮の元になる、いわゆるヘマンジオブラストが含まれている。この細胞を、サル胎仔の肝臓内に移植した。移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能獲得前 (妊娠1/3期前後) のサル胎仔をレシピエントとした。その肝臓内にエコーガイド下で細胞を移植した。生後、ES細胞由来の造血が再構築されたかどうかを、GFPを指標にして評価した。
- 4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発 (小澤) :
- i) AAVの二つのコンポーネント (ITR配列とRep蛋白質) を利用し、第19番染色体長腕AAVS1領域に遺伝子を組み込ませる方法の応用開発を推進した。特に、Repを一過性に発現させるシステムの開発を行った。即ち、Cre-loxP法によりRepの発現を制御したAAVS1特異的遺伝子組込みプラスミドベクターを構築した。まず、HSV-tkプロモーターとRepとの間に、loxP配列で挟まれた転写終結シグナルを含むstuffer配列を挿入した。また、このstuffer配列にITR配列を連結したマーカー発現ユニットを逆向きに配置した。
- ii) TVI法の応用として、ヒト骨髓間質由来の細胞株KM102 (間葉系幹細胞のモデルとして用いた) のAAVS1領域にGFP遺伝子の導入を試みた。Rep発現プラスミドとGFP/ブラストサイジン耐性遺伝子をITR配列で挟んだプラスミドをトランスフェクションし、ブラストサイジン存在下で培養を行い、コロニーを形成させ、各々のクローンをサザン解析した。
- (倫理面への配慮)
- マウスを用いた実験 (自治医大) 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。

3. 研究結果

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

- i) 経静脈的に移植を行ったマーキング実験において、腸骨骨髓の遺伝子導入コロニー形成細胞は10-27%の高率で検出された。しかし、徐々にその割合が下がり、100日後前後で2%以下となった。また末梢血中の導入細胞の比率も、20-30日後には0.03%と低く、100日後には検出限界以下になった。
- ii) SAGを導入した細胞を経静脈的に移植した場合、EPOによる増殖刺激を行っても、導入遺伝子陽性細胞は検出限界以下(0.01%以下)であった。
- iii) SAG導入細胞をiBMT法で移植した場合、EPO投与に応じて末梢血中の遺伝子導入細胞が増加し、移植後約100日に7%を超える遺伝子導入効率を示した。その後EPO投与を中断したところ、導入効率は速やかに減少し0.02%となった。しかし、EPO再投与で導入効率は8%にまで再上昇した。3回目のEPO投与でも移植後約350日に8.9%に達した。一方、SAGを含まない遺伝子を導入した細胞を骨髓内に移植したサルでは、移植した箇所(四肢)と異なる部位(腸骨)から採取した骨髓中に遺伝子導入細胞が検出され、長期にわたり維持していることが示された。しかし、末梢血中の遺伝子導入細胞は0.1%以下と極めて低い値を示した。尚、EPO投与による多血症(瀉血を行った)以外の副作用は認められず、白血病などの遺伝子導入に基づく副作用は認められなかった。
- iv) gp91-EpoRMpl遺伝子導入細胞にて造血系を再構築したX-CGDマウスにEPOを反復投与する実験では、末梢血の機能回復顆粒球が増加した。活性酸素を産生する顆粒球の割合はEPO投与後有意に上昇して最高 $27.5 \pm 6.8\%$ ($n = 3$)となったが、非投与群では $8.4 \pm 3.1\%$ ($n = 3$)にとどまった ($p = .01$)。改良型SAG (EpoRGcR融合蛋白質遺伝子)を導入したBa/F3細胞とMo7e細胞はEPO依存性に増殖するようになり、その増殖曲線は野生型EpoR遺伝子を導入した場合と同等だった。マウス骨髓細胞を用いたコロニーアッセイにても同様の結果が得られた。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発:

AAV/Msx1 を注射したマウス前頸骨筋両側から回収された未分化な造血系細胞 (CD45⁺/Sca1⁺分

画) は、前値 $0.4 \pm 0.3 \times 10^4$ 個から3週後に最高 $13.7 \pm 0.4 \times 10^4$ 個 ($p = .04$) へと増加した。AAV/EPO を注射した対照群マウス前頸骨筋中の CD45⁺/Sca1⁺細胞の最高値は $1.4 \pm 0.9 \times 10^4$ 個 ($p = .04$) だった。Msx1 強制発現により骨格筋中の造血前駆細胞も前値 2.8 ± 6.2 個から注射3週後に最高値 97.7 ± 48.8 個 ($p < .01$) に増加したが、対照の AAV/EPO 投与群の最高値は4週後の 17.3 ± 31.8 個 ($p < .01$) だった。AAV/Msx1 注射4週後のマウス前頸骨筋から分離した単核細胞を、致死量放射線照射したコンジェニックマウスに移植したところ、キメラ率約60%で安定に推移し、2次移植ではキメラ率約80%となった。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発:

i) サル ES 細胞の基礎研究:

- ・サル ES 細胞の増殖特性と形態により多分化能を維持した継代方法を開発した。未分化 ES 細胞に発現しているタンパクは、抗体アレイで解析中である。
- ・サル ES 細胞から *in vitro* で CD34 陽性細胞を誘導することは可能だが、前駆細胞の誘導には至っていない。骨髓由来ストローマ細胞をフィーダーとする培養法を検討中である。
- ・未分化 ES 細胞移植では全例にテラトーマの発生を確認したが、分化誘導後 SSEA-4 陽性細胞を除去した細胞を移植した場合にはテラトーマの発生はなかった。

ii) サル ES 細胞の遺伝子操作技術: アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、HIV ベクターを用いた場合のサル ES 細胞に対する GFP 遺伝子の導入効率は高々20%で、あまり高くはなかったが、SeV ベクターでは50%以上の遺伝子導入効率が得られた。SeV ベクターで GFP 遺伝子を導入したサル ES 細胞を免疫不全マウスに移植するとテラトーマをつくったが、そのテラトーマも GFP を強く発現した。SeV ベクターで GFP 遺伝子を導入した ES 細胞を、胚様体・血液細胞・神経細胞に分化させたところ、分化後の細胞も GFP の蛍光を発した。すなわち、導入遺伝子の発現は、最終分化後でも衰えることなく安定していた。SeV ベクターで導入した GFP 遺伝子の発現は、リバビリンの添加量に応じて調節することが出来た。

iii) サル ES 細胞からの造血系再生: 細胞移植3ヶ月後にサル胎仔を帝王切開で取り出して調べたところ、骨髓造血前駆細胞の1-5%が ES 細胞由来だった。しかし、テラトーマの形成も見られた。移植前の細胞の表面マーカーを調べてみたところ、未分化マーカーである SSEA4 が陽性の ES 細

胞がまだかなり混じっていることが判明した。

これがテラトーマの原因になったと考えられた。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み(TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発:

i) Cre-loxP 法により Rep の発現を制御した AAVS1 特異的遺伝子組込みベクターを構築した。まず、HSV-tk プロモーターと Rep との間に、loxP 配列で挟まれた転写終結シグナルを含む stuffer 配列を挿入した。この stuffer 配列に ITR 配列を連結したマーカー発現ユニットを逆向きに配置した。この Rep 発現誘導カセットを導入した細胞に Cre 発現ベクターを感染させ、Rep が一過性に発現することを確認した。さらに、ITR 配列を連結したマーカー発現ユニットと Rep 発現誘導カセットを有するアデノウイルスベクターを構築中である。

ii) KM102 細胞への TVI 法の応用実験では、得られた 24 クローン解析により 3 クローンで GFP 遺伝子が AAVS1 領域へ特異的に組み込まれていると考えられた。

4. 考察

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

経静脈的移植に比べて骨髓腔内移植では生着率が高いことが示された。しかし、遺伝子導入細胞が末梢血に効率よく出現しないという問題点が明らかになった。これに対しては、EPO 反応型キメラ受容体をコードする第二世代 SAG システムを導入することにより解決することができた。今回得られた遺伝子導入効率は、前処置を行わない場合には世界でもほとんど例のない高いレベルである。

さらに、第二世代 SAG が CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の効果を増大させることをモデルマウスの系で確認できた。今後は、CGD 治療の標的である顆粒球単球系に照準を定めて SAG のさらなる改良を進める一方、共同研究者である韓国の Kim 博士ら (ソウル国立大学および ViroMed 社) が開発したレトロウイルスベクターにこれを搭載して臨床に応用することを検討している。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発:

AAV ベクターの性質を利用して Msx 1 遺伝子を一過性に発現させた骨格筋で、造血前駆細胞が増加することを確認できた。Msx 1 の一時的強制発現が骨格筋に脱分化を促し、一部の細胞を、多分化能 (造血系を含む) を有する未分化幹細胞に至らしめ、これらの細胞が造血環境下で血球へ分化した可能性があるとして解釈している。このような人

為的分化転換が実際に起こったのか、起こったとすればこれをさらに効率よく行う方法に関して、さらに詳しい検討を要する。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発:

i) マウス ES 細胞と比較してサル ES は未分化能を維持したまま継代することが比較的困難であり、未分化性 (stemness) を評価する ES 特異的タンパクの特定が急務であったが、今年度中に成果が得られる予定である。また、ES 細胞由来の CD34 陽性細胞を骨髓ストローマ細胞と共培養することにより、サル ES 細胞から *in vitro* で造血前駆細胞を効率よく分化誘導する技術の確立を進めている。その他、同種胎児移植の結果から、SSEA-4 抗原が臨床的な stemness marker として有用であることが判明した。

ii) サル ES 細胞の遺伝子操作技術: サル ES 細胞に対しては、サル由来のレンチウイルスベクターである SIV ベクターを用いると効率よく遺伝子導入できることを以前報告したが、本研究ではセンダイウイルスベクターでも効率よく遺伝子導入できることを明らかにした。用途に応じて二つのベクターの使い分けが可能になった。また、SeV ベクターで導入した遺伝子の発現は、抗ウイルス剤であるリバビリンの添加によって調節ができる可能性が示唆された。

iii) サル ES 細胞からの造血再生: ES 細胞から初期中胚葉に分化させた細胞を (ここにはヘマンジオブラストが含まれる) サル胎仔の肝臓に移植すると、生後の動物で造血系を一部再構築することができた。しかし、*in vitro* で 6 日間かけて分化させた細胞を移植したのだが、テラトーマをつくった。テラトーマの形成を防ぐために、未分化 ES 細胞 (SSEA4 陽性細胞) を除去してから移植する実験を行っている。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み(TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発:

i) Rep 発現誘導カセットを構築した。HeLa 細胞を用いて、Southern blot 解析による AAVS1 領域の遺伝子再構成を検討し、マーカー遺伝子の AAVS1 領域特異的遺伝子組込みとその頻度を解析している。Cre によって切り出された loxP 配列で挟まれた配列中の ITR に Rep が結合することによって、第 19 番染色体 AAVS1 領域に特異的に遺伝子組込みが生ずることが期待される。

ii) ヒト骨髓間質細胞でも、TVI 法により、AAVS1 領域特異的に外来遺伝子を挿入することが確認できた。今後、部位特異的組込み効率を上げることが望まれる。

5. 評価

1) 達成度について

・SAG プロジェクトに関しては、目的としたシステムの構築はほぼ達成され、第二世代 SAG が慢性肉芽腫症の幹細胞治療に有用であることを治療モデルで確認できた。しかし、臨床用 SAG の *in vivo* での有効性確認と臨床プロトコルの策定には至らなかった。前処置なしで遺伝子導入造血幹細胞を移植するという、臨床で要求される課題をクリアすることは、予想以上に、技術的に困難で時間のかかる作業であったためである。

・Msx1 プロジェクトに関しては、大変興味深い結果が観察されたが、筋肉内に出現した造血系細胞の由来に関する検討は技術的な限界で決着が付かなかった。

・ES 細胞プロジェクトは、ほぼ当初の研究計画通り進捗した。

・TVI プロジェクトでは、Rep 発現アデノウイルスベクターの作製が難航している。理論的にもかなり困難な戦略である。新しい方向性として、間葉系細胞を標的とした遺伝子導入への応用実験を開始した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

・SAG プロジェクトは、同種造血幹細胞移植のドナーが得られない造血異常疾患で、患者自身の造血系細胞を遺伝子操作により機能修復して自家移植するという治療法に直結するものである。本研究で、前処置を施すことなくほぼ 10% という世界最高水準まで遺伝子導入効率を高めることができた。効果的な幹細胞遺伝子治療技術は未だ確立されておらず、SAG 実用化の意義は大きい。

・Msx1 プロジェクトは極めて独創的なものである。また、ドナーソースの拡大は移植・再生医療における最大の課題であり、解決に向けて様々な角度から取り組む必要があることから、本研究の進展が望まれる。

・ES 細胞から造血系の再構築に初めて成功したのは、Daley らによる 2002 年のことである。彼らは、この技術と体細胞核移植技術を組み合わせて、重症複合型免疫不全症 (severe combined immunodeficiency, SCID) に対する ES 細胞遺伝子治療モデルを提唱している。しかし、特殊な実験系を使っており、ヒト ES 細胞を使ってすぐ出来る技術ではない。霊長類 ES 細胞から造血系再構築の成功例はまだ報告されていないのが現状である。したがって、霊長類 ES 細胞の同種移植を行い、造血系の一部の再構築に成功した本研究は、きわめてオリジナリティーの高いものである。また、基礎研究で得られた成果は、霊長類 ES 細胞

の維持、分化誘導、移植に関わる再生医療の臨床応用にとって、学術的・国際的・社会的に必須の成果といえる。

・TVI 法に関しては、安全性の面でより優れた遺伝子導入技術となることが期待される。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究において挿入変異による癌化 (白血病発生) が問題となっていることから、本研究の意義は益々増大している。

3) 今後の展望について

・SAG プロジェクトは臨床応用の目処がほぼ立ったと判断されるが、その実現に向けてはさらに細部の詰めが必要である。また、移植細胞の生着率を向上させることが重要と考えられ、今後は移植法に関しても新しい工夫を加えることを計画している。

・Msx1 プロジェクトは、遺伝子操作により分化転換効率を高めることが本当に可能かどうか、確認する必要がある。また、筋肉内に出現した幹細胞の採取法 (末梢血への動員) の開発も併せて進めることが大事である。

・ES 細胞の安定的継代培養技術、*in vitro* 血液細胞への分化誘導技術、移植技術を総合して基盤技術を充実させると共に、サルを用いたトランスレーショナル研究を推進することにより、ES 細胞を用いた、安全で効率的な細胞治療技術が確立できるものと思われる。本研究のヒト ES 細胞から造血系を再構築する技術は、大きな目標の一つである。ヒト ES 細胞は、将来的には骨髄バンクや臍帯血バンクに代るドナーソースになる可能性を秘めている。今後の研究では、ES 細胞由来の造血再構築能を一層高める工夫と共に、腫瘍形成のリスク評価が重要である。

・TVI 法に関しては、幹細胞へ遺伝子導入する際に望ましいテクノロジーであるが、比較的アプローチしやすい間葉系幹細胞への応用を当面目指していく計画である。

4) 研究内容の効率性について

一つ一つのテーマが大きなものであり、その点を考慮するとそれぞれにおいて着実に成果を上げることができたと言える。

また、サルを用いる移植実験は、多大な費用と時間を要し、多数例実施することも困難である。本研究では分担研究者が連携してそれぞれの担当実験を注意深く実施し、大型動物の実験としては効率よく実施することができた。

6. 結論

・SAG プロジェクトに関しては、サルの系で骨髄内移植法との組み合わせを試みたところ、1年以

上に亘って、EPO 刺激で末梢血細胞の 9%まで導入遺伝子陽性細胞を増幅することができた。

・CGD モデルマウスの系を用いて、SAG システムを利用した造血幹細胞遺伝子治療の有効性が確認された。また、臨床応用を目指して SAG の最適化を図った。

・骨格筋組織の人為的分化転換に関する研究では、脱分化遺伝子 (Msx1) を一過性に働かせることにより、非造血系組織から造血系を再構築しうる可能性が示された。

・サル ES 細胞の継代培養、血液細胞への分化誘導、同種移植に関わる基礎的検討を行い、ES 細胞を用いた細胞治療・再生医療の基礎となる技術を確立した。

・SeV ベクターによってサル ES 細胞に効率よく外来遺伝子を導入できること、そして導入遺伝子の発現を抗ウイルス剤リバビリン添加によって調節できる可能性が示された。また、サル ES 細胞を用いた同種移植の系で、造血系の一部を再構築することができた。

・TVI 法の基盤技術開発と、間葉系幹細胞への応用実験をスタートした。

7. 研究発表

1) 国内

口頭発表	9 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等) の発表	11 件

2) 海外

口頭発表	2 件
原著論文による発表	15 件
それ以外 (レビュー等) の発表	4 件

そのうち主なもの

論文発表

1) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, and Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther* (in press)

2) Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Ogata S, Tabata T, Nagashima T, Takatoku M, Kume A, Ikehara S, Taniwaki M, Terao K, Hasegawa M, and Ozawa K: High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol*

Ther 10: 469-477, 2004.

3) Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Ueda Y, Hasegawa M, and Ozawa K: Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther* 11: 1370-1377, 2004.

4) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, and Hasegawa M: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med* 6: 22-31, 2004.

5) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, and Hanazono Y: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 76: 1061-1067, 2003.

6) Urabe M, Kogure K, Kume A, Sato Y, Tobita K, and Ozawa K: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J Gen Virol* 84: 2127-2132, 2003.

8. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1) 特許取得

発明の名称: A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal

出願番号: 60/483,357 号

発明者: 長谷川護

2004 年 6 月 25 日に PCT 出願済

国際出願番号: PCT/JP2004/009370