

新規センダイウイルスベクターによる ヒト臍帯血造血幹細胞体外増幅法の開発

自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部

講師 増田 茂夫

(共同研究者)

自治医科大学 再生医学研究部

教授 花園 豊

自治医科大学 再生医学研究部

大学院生 阿部 朋行

はじめに

白血病などの造血器腫瘍の根治的治療法として造血幹細胞移植が知られている。特にヒト臍帯血中に含まれる造血幹細胞を利用した臍帯血移植が盛んに行われているが、依然、細胞数不足のため特に成人への移植適応が限られることがあり問題となっている (図 1)。

臍帯血由来の造血幹細胞の体外増幅法には以下の 2 つの方法がある。

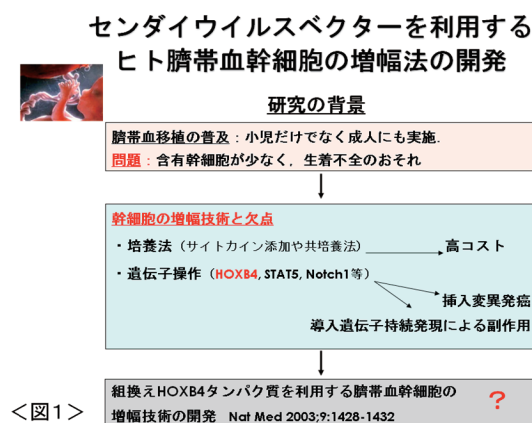
(1) サイトカインを用いる増幅：京大の中畑教授らは SCF, TPO, FL, IL-6/sIL-6R という 4 種のサイトカインを用いて、臍帯血中の造血幹細胞の増殖に成功し、これを用いた臨床研究を計画している (J Clin Invest 2000; 105: 1013)。

(2) 遺伝子を用いる増幅：同手法も種々行

われている。HoxB4 (Blood 2002; 100: 862, Blood 2003; 101: 1759, Mol Ther 2003; 8: 618, Nat Med 2003; 9: 1423), STAT5 (J Exp Med 2005; 202: 169), Notch1 (Blood 2002; 99: 2369), Bmi-1 (Immunity 2004; 21: 843) などがある。特に HoxB4 は造血幹細胞の増幅に有効であるとの報告が数多くなされている。

ところが既存のレトロウイルスベクターでは HoxB4 の持続発現や挿入変異に因る有害事象 (腫瘍化) が報告され (J Clin Invest 2008; 118: 1502)、安全性を担保した系が必要とされてきた。

そこで本研究では以下のような新規センダイウイルスベクターを開発し、その有効性・安全性を検証した。



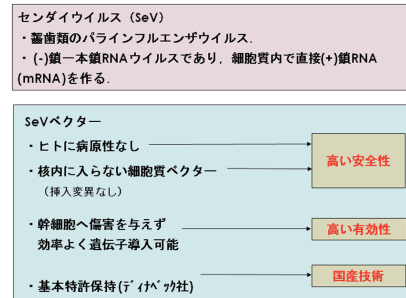
結 果

(1) P 欠損型 SeV ベクターの遺伝子導入能の確認

遺伝子導入ベクターは、造血細胞へ効率よく遺伝子導入できる国産のセンダイウイルス (SeV) ベクターを利用した。SeV ベクターはヒトへの病原性がなく、DNA を一切介さない細胞質型 RNA ベクターである。従って挿入変異の恐れがない (図 2)。

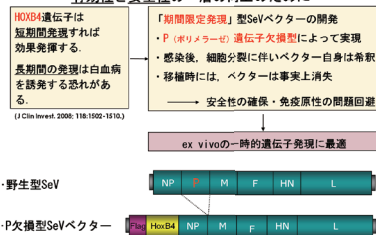
HoxB4 は短期間作用すれば造血幹細胞の増幅効果をもつ一方で、発現が持続することによる有害事

センダイウイルスベクターを利用する ヒト臍帯血幹細胞の増幅法の開発



<図2>

センダイウイルス (SeV) ベクターを利用する ヒト造血幹細胞増幅法の開発



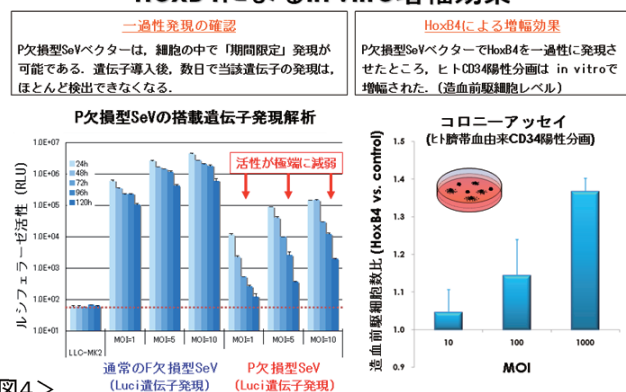
<図3>

また in vitro において細胞障害性をほとんど示さず、生存細胞の中で「期間限定」発現可能であることを確認した (図 4)。また、ヒト臍帯血造血幹細胞に P 欠損型 SeV ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を導入し、遺伝子導入効率 (50-70%) や一過性発現 (RT-PCR) を確認した。

(2) 増幅効果の in vitro assay (colony assay)

ヒト臍帯血造血幹細胞に P 欠損型 SeV ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を導入することによって、造血前駆細胞レベルで増幅効果があるか否かを colony assay で調べた。結果、MOI: 100 ~ 1000 で造血前駆細胞の増加 (1.2 ~ 1.4 倍) を認めた (図 4)。

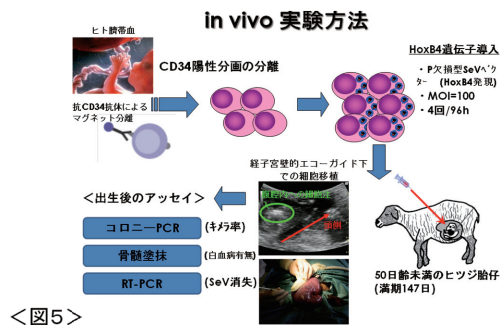
P 欠損型 SeV ベクターの一過性発現と HoxB4 による in vitro 増幅効果



<図4>

(3) 増幅効果の in vivo assay (sheep-repopulating cell assay)

方法としては、ヒト臍帯血から CD34 陽性分画を分離。P 欠損型 HoxB4 搭載センダイウイルス (SeV) ベクターを in vitro で 24hr 毎、計 4 回感染させ、同細胞を免疫系の未熟なヒツジ胎仔の腹腔内へ移植。約 100 日後に誕生。出生後のアッセイとして、(1) Colony PCR (キメラ率算定)、(2) 骨髄塗抹 (白血球発症有無)、(3) RT-PCR (SeV 消失) などを行った (図 5)。



＜図5＞

**子宮内移植後のヒト造血幹細胞の生着
(生後の仔ヒツジでの評価)**

	ヒツジ No.	移植時 妊婦日齢	移植細胞数 (x 10 ³)	造血キメラ率 (ヒツジ/ヒツジ)		
				ヒツジ骨髄中 ヒトCD34 (%)	1 x 10 ⁴ 細胞 移植時の 検出率 (%)	1 x 10 ⁴ 細胞 移植時の 平均検出率 (%)
HoxB4 導入群	Y705-1	49	5.2	0	0	3.8 (n = 4)
	Y705-2	49	4.5	1.1	2.4	
	Y271-1	49	3.2	3.3	10.3	
	Y271-2	49	8.9	2.2	2.5	
対照群	G2149-2	50	11.7	1.1	0.9	0.8 (n = 4)
	G2149-4	50	6.0	0	0	
	Y526-1	45	9.6	2.2	2.3	
	Y526-2	45	11.0	0	0	

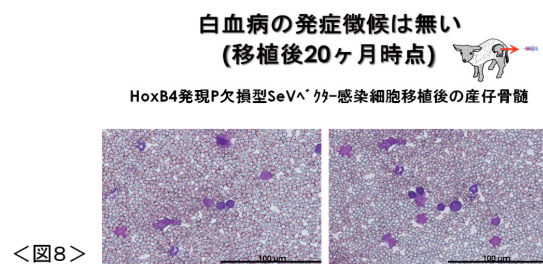
＜図6＞

真に造血再構築可能な細胞を評価するために、免疫不全動物（ヒツジ胎仔）への移植後、ヒト由来の造血細胞の割合を定量し、造血幹細胞レベルでの増幅をHoxB4 有り無しで比較した。移植後 5 ヶ月での評価では、HoxB4 群で 4.8 倍の増幅効率を確認した（図 6）。

さらに長期の観察を行った結果、移植後 15 ヶ月での評価では HoxB4 群の増幅効果が有意であることが判明した（図 7）。

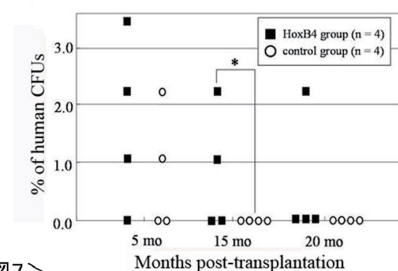
(4) 有害事象（腫瘍化など）の確認

Zhang et al. (J Clin Invest 2008; 118: 1502) の報告では、レトロウイルスベクターによる HoxB4 持続発現の結果、サル・イヌで移植後 1～2 年での白血病発症が高率に生じた。我々の系でも長期の安全性を継続して評価した結果、移植後 20 ヶ月の時点で白血病などの腫瘍化の事象は認められていない（図 8）。



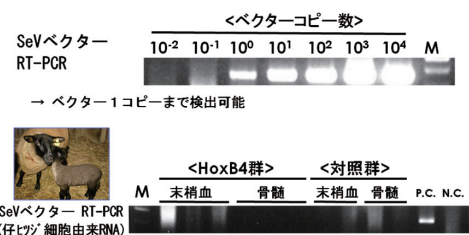
＜図8＞

**Long-term engraftment of human HSC
in HoxB4 group**



＜図7＞

仔ヒツジ体内からP欠損型SeVベクターは消失する



＜図9＞ → ベクター検出できず

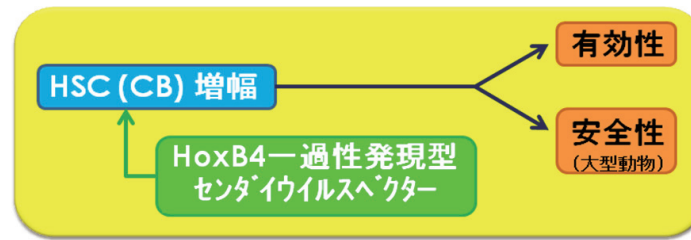
(5) 一過性発現ベクターの消失の確認

P 欠損型 SeV ベクターは導入細胞中からいずれ消失することが期待される。移植後のヒツジ体内の細胞（ヒト由来細胞を含む）を採取し、SeV ゲノムやウイルス蛋白の消失を確認した（図 9）。

要 約

本研究では、ヒト臍帯血（Cord Blood; CB）由来 造血幹細胞（Hematopoietic Stem Cell; HSC）を有効かつ安全に増幅する方法を新規開発した（図 10）。(1) HoxB4 搭載センダイウイルスベクター

<図10>



を一過性発現型に改変した。(2) 大型動物（ヒツジ）異種移植を用いた評価系により長期観察した。その結果、有効性に関しては造血幹細胞の増幅効率は4.8倍、安全性に関しては腫瘍化などの有害事象は認めなかった。以上、新規センダイウイルスベクターにより、既報のレトロウイルスベクターを用いた場合と比較して、有効性はほぼ同等、安全性は向上したと考えられた。

謝 辞

本研究は下記の先生方のご協力の下に施行されました。厚く御礼申し上げます。

- Tomoyuki Abe (Jichi Medical University)
- Hiroshi Ban (DNAVEC Corporation)
- Satoshi Hayashi (National Center for Child Health and Development)
- Makoto Inoue (DNAVEC Corporation)
- Mamoru Hasegawa (DNAVEC Corporation)
- Yoshikazu Nagao (Utsunomiya University)
- Yutaka Hanazono (Jichi Medical University)

文 献

1. Abe T, Masuda S, Ban H, Hayashi S, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y. Ex vivo expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation. *Exp Hematol*. 39 (1) :47-54, 2011.
2. Masuda S, Hanazono Y. Induced pluripotent stem cells in long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 364 (2) : 181-182, 2011.
3. Masuda S. Cord colitis syndrome in cord-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. in press.
4. Masuda S. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med*. 365 (5) : 464-465, 2011.
5. Masuda S. Point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 365 (12) : 1154-1155.
6. Masuda S. More on NK-cell and B-cell deficiency with a thymic mass. *N Engl J Med*. 364 (20) : 1979-1981, 2011.
7. Masuda S. Leukemic stem cell gene expression signature and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 305 (11) : 1094-1095, 2011.
8. Masuda S, Yokoo T, Sugimoto N, Doi M, Fujishiro S, Takeuchi K, Kobayashi E, Hanazono Y. A simplified in vitro teratoma assay for pluripotent stem cells injected into rodent fetal organs. *Cell Med*. in press.

9. Masuda S, Hayashi S, Ageyama N, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Hanazono Y. Migration of cells from the yolk sac to hematopoietic tissues after in utero transplantation of early and mid gestation canine fetuses. *Transplantation*. 92 (2) : e5-6, 2011.
10. Masuda S. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: impact on low risk patients with CEBPA mutations. *J Clin Oncol*. in press.
11. Masuda S. Dysfunctional transforming growth factor- β signaling with constitutively active Notch signaling in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Cancer*. in press. Published online September 6, 2011. 10.1002/cncr.26444.
12. Masuda S. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann Oncol*. in press. Published online June 27, 2011. 10.1093/annonc/mdr307.