

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790676

研究課題名 (和文) 造血幹細胞への遺伝子導入マウスモデルの開発

研究課題名 (英文) Establishment of a novel mouse model to allow efficient in vivo gene transfer into hematopoietic stem cells

研究代表者

小野 伸之 (ONO NOBUYUKI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号:00336025

研究成果の概要 (和文): 多能性かつ自己複製能のある造血幹細胞に in vivo で遺伝子導入できれば、正常造血を模倣した形で特定の遺伝子の機能を探ることができる。本研究で、我々は麻疹ウイルスの SLAM 分子指向性をもつ組換えレンチウイルスを作製し、造血幹細胞を標的とした新規 in vivo 遺伝子導入システムの確立を試みた。

研究成果の概要 (英文): In vivo gene transfer into hematopoietic stem cells (HSCs) which possess multi-potential and self-renewal capacity allows us to elucidate the function of specific genes of interest in normal hematopoiesis. In this study we sought to generate a recombinant lentivirus expressing measles virus-derived proteins to interact with human SLAM receptors, thereby serving as a novel in vivo gene transfer system for HSCs.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、遺伝子導入、ウイルス、マウスモデル、免疫

1. 研究開始当初の背景

生体における遺伝子の機能を探る上で、in vivo の実験系によって得られるデータは非常に有用である。そのため、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスという遺伝子改変マウスの開発によって、現代の生命科学は大きな進歩を遂げた。その恩恵を得る

ためには多大な労力と資力を必要とされるが、それにも関わらず胎生致死であり目的のマウスを得ることができないことも多い。その場合は、組織特異的な遺伝子改変マウスを作ることになり、更なる労力を必要とする。

血液細胞の解析では、それに代わる簡便な方法として、in vitro で遺伝子導入し

た骨髓細胞をマウスに移植するという手段がとられてきた。しかし、大量の放射線照射をしたマウスに細胞を移入するため、この方法が正常造血を模倣できているとは言い難い。多能性であり、自己複製能のある造血幹細胞に in vivo で遺伝子導入できれば、この問題は解決できる。その実現により、造血幹細胞を含むすべての血液細胞の生理的な条件下での観察が、遺伝子改変マウスよりも容易に行える。特に近年の幹細胞研究において、幹細胞の stemness の維持には niche などを含む環境因子が大きく関わっているとされ (Arai F et al, Cell 2004) in vivo での実験が重要となっている。過去に in vivo で造血幹細胞への遺伝子導入に成功した報告はない。環境因子を大きく変えない in vivo での遺伝子導入は、造血幹細胞の生態を知るのに理想的であると考えられる。

申請者はウイルスのヒト細胞への感染機構を研究してきた。その結果、麻疹ウイルスがその表面蛋白とヒト CD150(SLAM)分子との結合で細胞内に侵入することを世界に先駆けて発見した (Tatsuo H, Ono N et al, Nature 2000)。興味深いことに、近年 SJ Morrison らのグループは SLAM 分子が造血幹細胞に発現していることを発見し、SLAM をマーカーとして更なる造血幹細胞の純化に成功している (MJ Kiel et al, Cell 2005)。このことを利用して、麻疹ウイルスの SLAM 分子指向性の組換えレンチウイルスを作製できれば、造血幹細胞を標的とした新規 in vivo 遺伝子導入法が確立できる。

2. 研究の目的

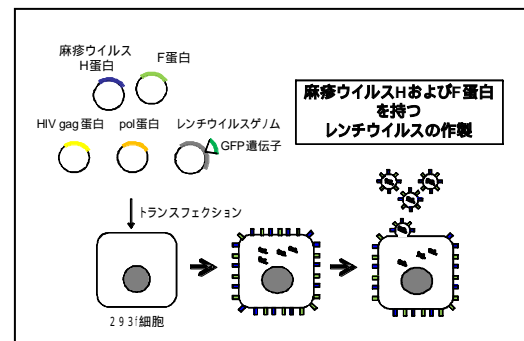
麻疹ウイルスの SLAM 分子指向性をもつ組換えレンチウイルスを作製し、造血幹細胞を標的とした新規 in vivo 遺伝子導入システムを確立する。

3. 研究の方法

(1) 麻疹ウイルス H 蛋白および F 蛋白をもつレンチウイルスの作製

ウイルスをいかにして高いタイターで回収することができるかが、in vivo 遺伝子導入

を目的とするこのプロジェクトの最重要課題と考える。下図に作製の手順を示す。



293f 細胞をパッケージング細胞として用い、通常レンチウイルスベクター表面の蛋白として用いられる VSV-G 蛋白の代わりに、麻疹ウイルス H 蛋白および F 蛋白発現ベクターを、レンチウイルスベクターコンポーネント発現ベクターとともにトランスフェクションする。すると細胞から麻疹ウイルスの H 蛋白および F 蛋白で被包されたレンチウイルスが上清に出現してくる。高タイターのウイルスを得るため、下記に従い実験を進める。

細胞および発現ベクターの入手

麻疹ウイルスタンパク発現ベクターは作製されており (柳雄介先生より供与) レンチウイルスベクターは GFP が発現するものを使用する。レンチウイルスベクターのシステムはキットとして市販のものも購入可能である。今後、GFP 遺伝子を他遺伝子に置き換えることを念頭に置き計画を進める。

トランスフェクション条件の最適化

リポフェクタミンを使用する。

ウイルス作製

ウイルスのタイトレーション

SLAM 陽性細胞 (Vero/hSLAM) でウイルス力価を確認する。SLAM 特異性を確認するために、Vero には感染しないことも確認する。GFP 発現細胞の評価は感染後 1 日培養と 1 週間以上の継代培養を行い、短期的な感染だけでなく、長期的なゲノムへのインテグレーションを確認する。

過去に我々は SLAM 指向性水泡性口内炎ウイルスの作製に成功しており、その知見に従い至適条件を決定する。トランスフェク

ションの時のプラスミドのモル比を調整することが重要となってくると考えている。また、ウイルス量のスケールアップのためウイルス大量培養および濃縮を行う。

(2) *in vitro*でのヒト SLAM ノックインマウス造血幹細胞への遺伝子導入

ヒト SLAM ノックインマウス骨髄中の造血幹細胞のほか、SLAM 陰性である前駆細胞、成熟細胞の各集団をマルチカラーフローサイトメトリーを用いて純化する。純化した各集団それぞれにウイルスを接種し、SLAM 特異的に遺伝子導入されることを、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞出現で確認する。

(3) *in vivo*でのヒト SLAM ノックインマウス造血幹細胞へ遺伝子導入（最適条件を確認）

～ の条件を最適化し、*in vivo*でのヒト SLAM ノックインマウスへのウイルス投与方法を決定する。造血幹細胞への *in vivo*での遺伝子導入効率は、フローサイトメトリーを用いての末梢血各系統での GFP 陽性細胞出現で評価する。

投与経路 --- 静脈内投与、骨髄内投与
ウイルス量

投与回数

宿主の modification

--- Cyclophosphamide+G-CSF

(4) 遺伝子導入された細胞の造血幹細胞としての機能を確認

造血幹細胞の多能性および自己複製能を確認する。

(3)で決定された条件にて、GFP 陽性細胞が全系統の血球に長期に維持されることを確認する。

GFP陽性造血幹細胞をフローサイトメトリーを用いて純化し、放射線照射したマウスに移植し、レシピエントマウスで再び全系統の血球が再構成されることを確認する。

4. 研究成果

(1) 麻疹ウイルス H 蛋白および F 蛋白をもつレンチウイルスの作製

本研究は *in vivo*での遺伝子導入を目的とするため、ウイルスをいかにして高いタイタ

ーで回収できるか否かが重要である。研究方法に従い、我々は293f細胞をパッケージング細胞として用いて、通常エンベロープ蛋白として用いられるVSV-G蛋白の代わりに、麻疹ウイルスH蛋白およびF蛋白をレンチウイルスベクターコンポーネント発現ベクターとともにトランスフェクションした。こうして細胞上清中に、麻疹ウイルスのH蛋白およびF蛋白で被包されたレンチウイルスの回収を試みたが、この段階での設定条件では高いウイルスタイターでの回収はできず、トランスフェクション条件のさらなる最適化が必要と思われた。

そこで、次に高いウイルスタイターを得るために、麻疹ウイルスH蛋白およびF蛋白発現ベクターとレンチウイルスベクターコンポーネント発現ベクターのモル比を変えての調整を検討した。また、トランスフェクションの段階での異なるリポフェクタミン法や異なるパッケージング細胞の使用についても検討した。しかしながら、このような種々の試みにもかかわらず、これまでに *in vivo*の実験にまで十分なタイターは得られておらず、今後さらなる条件設定が必要である。最近、SLAM発現にて純化したマウス造血幹細胞へレンチウイルスによる遺伝子導入が成功した報告がある。よって、高いウイルスタイターを得ることで、ヒトSLAMノックインマウスを使用し、我々のウイルスベクターの造血幹細胞選択的な *in vivo*導入は、今後十分可能と予想される。

(2) ヒト骨髄造血細胞の SLAM 蛋白発現

我々は麻疹蛋白発現レンチウイルスが感染しうるヒトSLAMが骨髄造血細胞のどのような集団に発現しているかについてフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、ヒトSLAMは骨髄中のCD34⁺CD38⁺Lin⁻造血前駆細胞の集団に高く発現していることが判明した。次に、SLAM陽性ヒト造血細胞集団の純化を試みたが、最終的に造血幹細胞と特定できなかった。この結果は、造血幹細胞におけるSLAM発現パターンがマウスとヒトでは大きく異なるという最近の報告に一致する。

以上の研究成果より、我々のSLAM分子を介した造血幹細胞選択的なin vivo遺伝子導入の系は、現時点でヒトでは使用困難が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, Niuro H, Arinobu Y, Ono N, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K: CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. J. Autoimmun. 31(2):110-115, 2008

査読有

小野伸之、新納宏昭、堀内孝彦：
新規インターフェロン産生細胞と自己免疫
リウマチ科 40:648-654, 2008

査読無

[学会発表](計3件)

第52回日本リウマチ学会総会
2008.4.22 札幌

演題名：高安動脈炎様病変を示すHLA-B52
陽性血管パーチエット病の一例

小野伸之、相澤久美子、三苫弘喜、三宅勝久、有信洋二郎、新納宏昭、塚本浩、園田康平、中島衡、堀内孝彦

第52回日本リウマチ学会総会
2008.4.22 札幌

演題名：全身性硬化症に対する大量免疫

抑制療法と自己末梢血幹細胞移植：移植後4年間の臨床成績と免疫学的検討
塚本浩、堀内孝彦、三苫弘喜、小野伸之、内野愛弓、木本泰孝、高橋美聡、押領司健介、藤健太郎、相澤久美子、新納宏昭、赤司浩一、原田実根

日本内科学会第285回九州地方会
2009.5.30 北九州

演題名：潰瘍性大腸炎を合併した強直性脊椎炎に生物学的製剤を使用した一例
尾野英美子、小野伸之、上田尚靖、阿部太郎、姫路大輔、上田章

第38回九州リウマチ学会
2009.9.6 久留米

演題名：ネフローゼ症候群合併全身性エリテマトーデスの経過中に硬膜静脈洞血栓症を発症した一例

山中篤志、小野伸之、中武大志、児玉圭子、姫路大輔、上園繁弘、河野寛、上田章

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/immune/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野伸之 (ONO NOBUYUKI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究者

研究者番号：00336025