

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659609

研究課題名（和文） 再生／細胞治療用血液細胞のスフェロイド形成による  
低傷害・高効率遺伝子導入法の開発研究課題名（英文） Development of a highly efficient, lower cellular damage gene transfer  
method by a spheroid formation of blood cells for regenerative medicine and cellular therapy

研究代表者

片野 尚子 (KATANO HISAKO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50376620

研究成果の概要（和文）：樹状細胞への EGFP 遺伝子組換えアデノウイルスベクターを介した遺伝子導入モデルを用いて、従来の遺伝子導入方法における効率の低さ、あるいは細胞への傷害性の問題を回避できるスフェロイド形成を利用した遺伝子導入法を開発した。これにより、スフェロイド形成の利用が再生／細胞治療用血液細胞への新たな低傷害・高効率遺伝子導入法となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：Using a model of gene transduction into dendritic cells with recombinant adenoviral vector expressing EGFP, I developed an improved gene transfer method with spheroid formation, which avoided low efficient and/or high cellular damage through conventional methods. It could be a new method of a highly efficient, lower cellular damage gene transfer by a spheroid formation for blood cells for regenerative medicine and cellular therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：トランスレショナルリサーチ、ウイルスベクター、遺伝子治療、細胞療法、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

患者由来の細胞を *ex vivo* にて遺伝子導入し、その効果を付加することは、再生・細胞治療分野における画期的な治療法を生み出すための有力な手法である。なかでもアデノウイルスベクター(Adv)を用いる方法は高い遺伝子導入効率と低い細胞傷害性を特長とし汎用されているが、吸着受容体発現の乏しい血液細胞に対する導入効率は低く、従来の開発手法にも課題は残っている

申請者はこれらの手法①Adv ファイバー遺伝子改変による受容体指向性の変更(Okada 2003)や②遠心法による接触抑制の解除(Nishimura 2001)等を検証する過程で、偶然できた細胞塊に高い導入遺伝子の発現

が見られた例を経験したことから、細胞塊（スフェロイド）形成によって細胞単体では発揮されていない接着因子を活性化し、受容体として機能させるという着想を得て、樹状細胞モデルにてスフェロイド形成を利用した新しい遺伝子導入法を開発を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究においては細胞塊（スフェロイド）細胞塊形成によって細胞単体では発揮されていない接着因子を活性化し、侵入受容体として機能させる可能性を検討し、スフェロイド形成を利用した再生／細胞治療用血液細胞への低傷害・高効率遺伝子導入法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト樹状細胞の調製

健康人より末梢血を採取し、フィコール遠心分離法で単核球を分離、Non-CD14 磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて非標識単核球画分を分離した。この細胞を GM-CSF (50ng/ml) と IL-4 (50ng/ml) 添加した 10% human AB serum 含有 RPMI 1640 培地で培養し樹状細胞に分化させた。培養容器には低接着表面 6-well プレート (EZ-BindShut II, 平底, iwaki) を使用した。5 日間培養した後に細胞を回収し、D-PBS で洗浄して以降の実験に使用した。

#### (2) スフェロイド形成システムの構築

低接着培養容器を用いた複数の方法を検討し、細胞塊の三次元的大きさ・数の決定・細胞表面抗原の発現から遺伝子導入工程においてスフェロイドの形成が行われるような条件を検討した。

#### (3) 遺伝子導入

ファイバー野生型と RGD ファイバー改変型の 2 種の EGFP 遺伝子組換えアデノウイルスベクター Ad-EGFP-Fwt, Ad-EGFP-RGD を用いた。細胞数は  $5 \times 10^5$  cells/well とし、細胞あたりのウイルスベクター粒子数は 100, 1000, 10000 とした。2 時間の感染操作後、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  にて培養を継続し、2 日後に遺伝子導入効率/遺伝子発現強度の比較を行った。遠心力を併用する場合は  $2000 \times g$  を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 低接着表面培養容器を用いて、ヒト末梢血由来単核球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養したところ、樹状細胞のスフェロイド形成が確認された。

スフェロイド状態の細胞は培地を浮遊しており、細胞回収操作によりスフェロイド状態は容易に解消した。フローサイトメトリによる白血球表面抗原 (CD14, CD11c, CD40, CD80, CD86, HLA-DR) の発現パターン (図 1) は付着細胞の培養に使用する細胞培養用表面処理容器で培養した場合と同等であった。

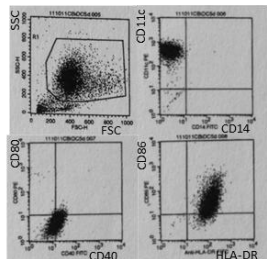


図1: 低接着表面培養容器で分化誘導させた樹状細胞の表面抗原発現パターン

(2) 単球から分化誘導した樹状細胞を回収し、96-well plate に  $5 \times 10^5$  cells/well になるよう播種し、2 時間経過した時点でスフェロイドの形成が見られた培養容器・培養条件は、①低接着培養容器 (平底; F) 静置、②低接着容器 (F)、回転振とう、③低接着容器 (U 底; U)、回転振とうであった (いずれも  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下)。また、このときのスフェロイドの大きさは、①②③の順に大きくなっていった。一方、細胞培養用表面処理容器 (ポリスチレン)、細胞培養用表面処理容器 (ガラス)、ポリプロピレン容器ではスフェロイドの形成は見られなかった。

(3) 異なるスフェロイド条件における遺伝子導入効率/遺伝子発現強度の比較を行うために、遺伝子導入に用いるウイルスベクター粒子数は細胞培養用表面処理容器に遠心力併用の有無によって差がみられるような容量で行った。すなわち、Ad-EGFP-Fwt 100, 1000, 10000 vp/cells の感染条件では、遠心力を併用しない場合、10000 vp/cells で EGFP の発現が蛍光顕微鏡で観察できる程度であるが、 $2000 \times g$ , 2h の遠心力を併用した場合は、Ad-EGFP-Fwt 100, 1000, 10000 vp/cells で段階的に蛍光強度が高くなることが確認できる。

この比較システムを用いて①低接着培養容器 (平底; F) 静置、②低接着容器 (F)、回転振とう、③低接着容器 (U 底)、回転振とう、の 3 つのスフェロイド形成条件による遺伝子導入効果を比較したところ、①では Ad-EGFP-Fwt 10000 vp/cells のみ、②では 1000 vp/cells と 10000 vp/cells に、③では 100, 1000, 10000 vp/cells で容量依存的に蛍光が確認できた (表 1)。すなわち、③低接着容器 (U 底)、回転振とう、条件では細胞培養用表面処理容器に遠心力を併用した場合と同程度の遺伝子導入効果があると考えられた。

		No virus	100 VP/cells	1000 VP/cells	10000 VP/cells
細胞培養用表面処理	遠心力(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
細胞培養用表面処理	遠心力(+)	(-)	(+)	(++)	(+++)
低接着F底	回転振とう(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
低接着F底	回転振とう(+)	(-)	(-)	(++)	(+++)
低接着U底	回転振とう(+)	(-)	(+)	(++)	(+++)

表 1: 種々の細胞培養容器に遺伝子発現強度

(4) ファイバー野生型と RGD ファイバー改変型の 2 種の EGFP 遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いて、①②③の条件で RGD 改変型が優位に作用するかどうかを検討した。その結果から、スフェロイド形成に

よる遺伝子発現強度の増加が細胞のどの要因に起因するものであるかの検討を進めている。

本研究では、樹状細胞モデルでは低接着加工処理培養容器、U 底、回転振盪の併用は、細胞培養用表面処理容器、F 底、回転振盪なしの場合よりも効果的にスフェロイド形成が行われ、かつ、より少ないウイルスベクター粒子数で強い発現が見られることが確認された。このことから、スフェロイド形成の利用が再生／細胞治療用血液細胞への新たな低傷害・高効率遺伝子導入法となり得る可能性が示された。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片野 尚子 (KATANO HISAKO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50376620