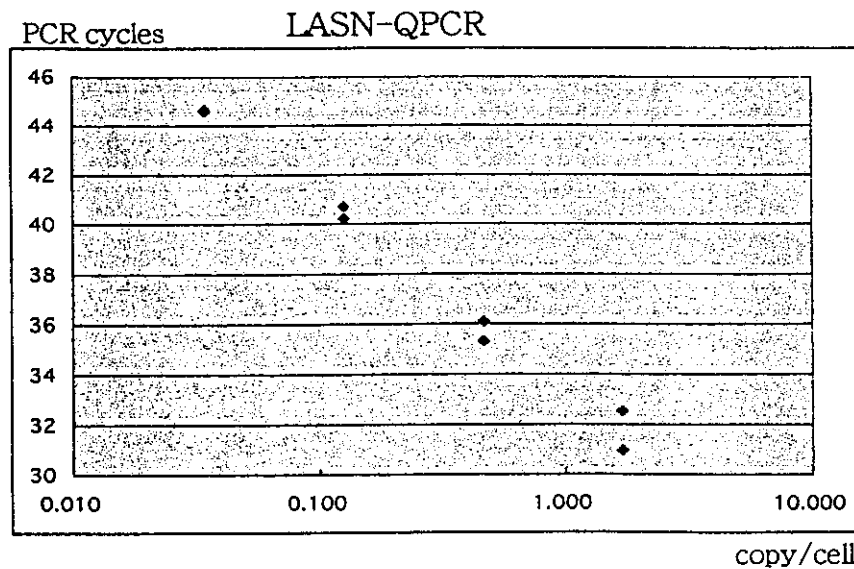
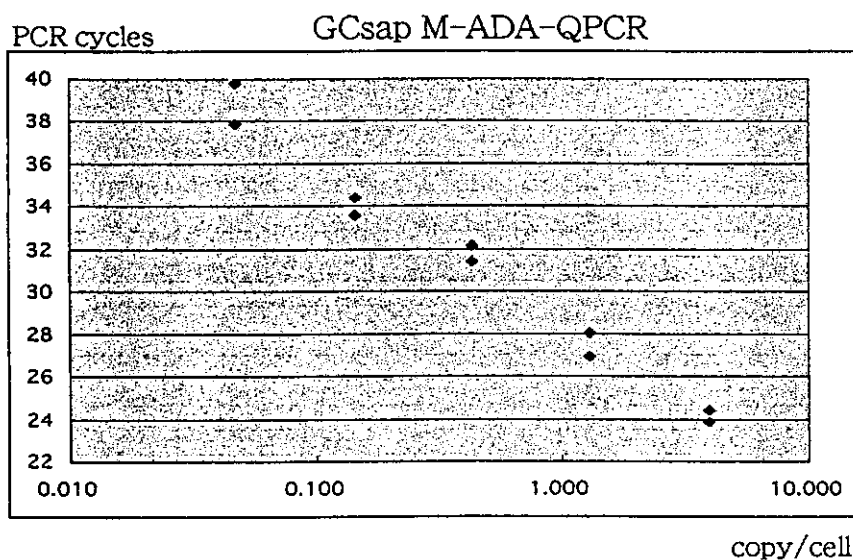
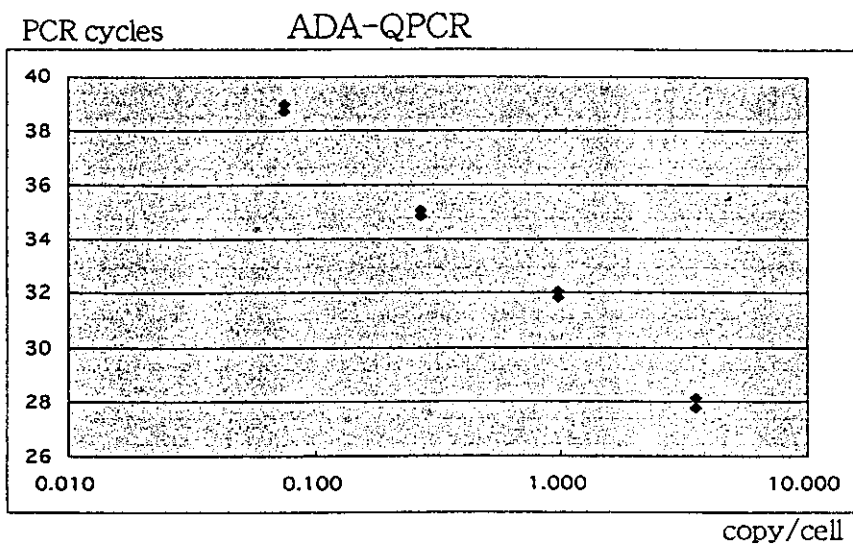


研究成果 1~10

導入遺伝子の定量的評価に用いた三種類の定量PCR法



研究成果 1

導入遺伝子の定量的評価に用いた三種類の定量 PCR 法

上段；ADAcDNA の特異的配列を指標とした定量 PCR 法の標準サンプルの結果

中段；GCsap M-ADA の特異的配列を指標とした定量 PCR 法の標準サンプルの結果

下段；LASN の特異的配列を指標とした定量 PCR 法の標準サンプルの結果

それぞれ、標的となる配列を含む DNA を PCR 法で増幅しプラスミッドに組み込んで増幅・精製後、正確に定量・希釈系列を作製し、テンプレートとして使用した。

A 臍帯血CD34陽性細胞に対する遺伝子導入効率の比較
(copy/cell)

	ベクター	
	GCsap M-ADA	LASN
	0.48	0.135
	0.363	0.082
	0.4	0.073
	0.651	0.095
	0.332	0.11
mean±SD	0.45±0.13	0.10±0.02

研究成果2A

B 患者由来EBV樹立B細胞株への遺伝子導入効率と
遺伝子発現の比較

GCsap M-ADA		LASN	
導入効率(copy/cell)	ADA 活性(U)	導入効率(copy/cell)	ADA 活性(U)
0.162	41.1	0.150	11.3
0.399	75.7	0.122	8.5
0.414	58.6		
0.388	52.8		
mean±SD	0.34±0.12		57.1±14.4

研究成果2B

臍帯血CD34陽性細胞に対する遺伝子導入効率の評価

臍帯血 サンプル	前培養 (時間)	サイトカイン	細胞数 ($\times 10^6$)	CD34陽性細胞率 (%)	Q-PCR (copy/cell)
1	24	S+T+FL+IL6	1		0.462
2	24	S+T+FL+IL6	0.4		0.79
3	24	S+T+FL+IL6	0.5		0.374
4	24	S+T+FL+IL6	0.4		0.311
5	24	S+T+FL+IL6	0.7		0.314
6	24	S+T+FL+IL6	3		0.621
7	24	S+T+FL+IL6	1.2		0.458
8	24	S+T+FL+IL6	1.5		0.332
9	24	S+T+FL+IL6	0.3		0.216
10	24	S+T+FL+IL6	0.5		0.4
11	24	S+T+FL	0.4	98	0.804
12	48	S+T+FL	0.4	98	0.567
13	24	S+T+FL+IL6	0.7	97	0.242
14	24	S+T+FL	0.7	97	0.238
mean \pm SD					0.44 \pm 0.19

S; Stem cell factor
T; Thrombopoietin
FL; Flt-3L
IL6; Interleukin-6

骨髓血CD34陽性細胞に対する遺伝子導入効率の評価

骨髓血 サンプル	前培養 (時間)	サイトカイン	細胞数 ($\times 10^6$)	CD34陽性細胞 (%)	Q-PCR (copy/cell)
ボランティア1	24	S+T+FL+IL6	2		0.35
ボランティア2	24	S+T+FL+IL6	0.4		0.561
ボランティア3	24	S+T+FL+IL6	0.5		0.55
ボランティア4	24	S+T+FL+IL6	0.8		0.28
ボランティア5	24	S+T+FL	0.4	98	0.621
ボランティア6	48	S+T+FL	1.5	98	0.385
mean \pm SD					0.46 \pm 0.14

S; Stem cell factor
 T; Thrombopoietin
 FL; Flt-3L
 IL6; Interleukin-6

研究成果4-1

患者骨髓血CD34陽性細胞に対する遺伝子導入効率の評価

骨髓血 サンプル	前培養 (時間)	サイトカイン	細胞数 ($\times 10^6$)	CD34陽性細胞 (%)	Q-PCR (copy/cell)	ADA (U)
症例1	24	S+T+FL+IL6	2.3		0.288	20.5
症例2	24	S+T+FL	3.5	99	0.199	9.2
症例2	48	S+T+FL	3.5	99	0.162	7.2
ボランティア1-6					0.46 ± 0.14	ND

S; Stem cell factor
 T; Thrombopoietin
 FL; Flt-3L
 IL6; Interleukin-6

研究成果4-2

NOD/SCIDマウスへの遺伝子導入臍帯血CD34陽性細胞移植の評価

CD34陽性 細胞サンプル	細胞数 ($\times 10^6$)	骨髄細胞表面マーカー (%)				ADAcDNA (PCR)	
		CD45+	CD45+19+	CD45+33+	CD45+34+	骨髄	脾臓
臍帯血1	1.2	16.1	14.6	0.6	3.5	+	+
臍帯血2	1.5	41.9	35	1.5	9.2	+	+
臍帯血3	1.6	2.3	N.D.	N.D.	0.3	-	N.D.
臍帯血4	3	17.6	N.D.	N.D.	2	+	N.D.
臍帯血5	4	24	20.9	1.8	N.D.	+	+

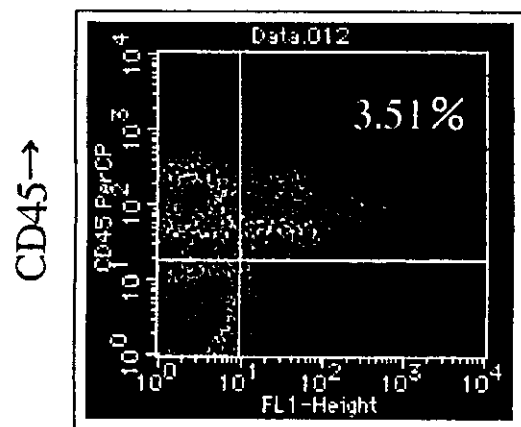
研究成果5-1

NOD/SCIDマウスへの遺伝子導入骨髄CD34陽性細胞移植の評価

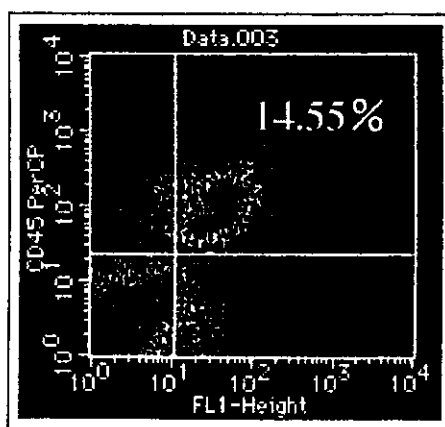
CD34陽性 細胞サンプル (×10 ⁶)	細胞数 (×10 ⁶)	骨髄細胞表面マーカー (%)				ADAcDNA (PCR)	
		CD45+	CD45+19+	CD45+33+	CD45+34+	骨髄	脾臓
骨髄血1	1	2.7	0.4	0.2	0.3	+	+
骨髄血2	1	1.1	0.7	0.5	0.3	+	+
骨髄血3	1	0.7	0.3	0.3	0.4	+	+
骨髄血4	1	0.6	0.3	0.3	0.3	+	+
骨髄血5	0.5	-	-	-	-	-	-
骨髄血6	0.5	0.7	0.4	0.2	0.2	+	+

研究成果5-2

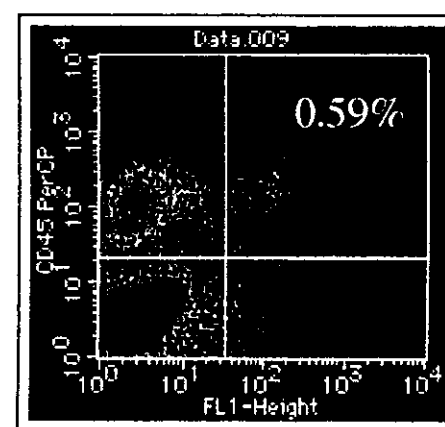
NOD/SCIDマウスへの遺伝子導入臍帯血CD34陽性細胞の移植実験
FACSでの解析



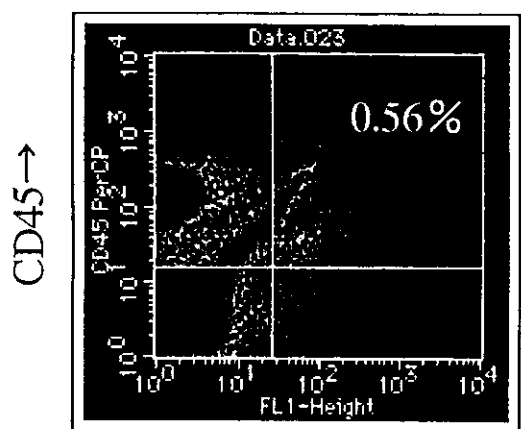
骨 髄 →CD34



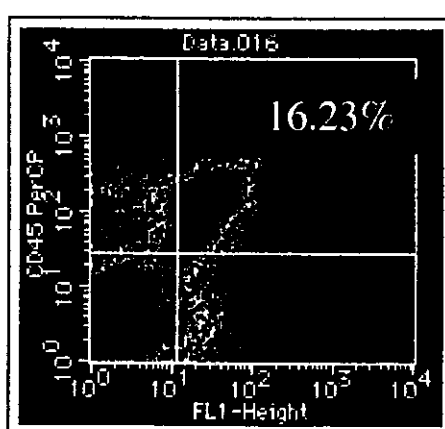
→CD19



→CD33



脾 臓 →CD34



→CD19

研究成果6

研究成果 6

NOD/SCID マウスへの遺伝子導入臍帯血 CD34 陽性細胞の移植実験 ; FACS での解析

臍帯血単核球から CD34 陽性細胞を分離し、GCsap M-ADA を用いて遺伝子導入後、 $0.5-1 \times 10^6$ 細胞を放射線照射した NOD/SCID マウス尾静脈へ静注した。移植後 6-8 週に骨髓、脾臓から単核球を分離し、細胞表面マーカー検索を行った。上段は骨髓由来の細胞、下段は脾臓由来の細胞の結果を示す。

縦軸、横軸に検索した細胞表面抗原を示す。数字は検索した抗原がどちらも陽性の細胞の割合を示す。

移植した遺伝子導入後の血液幹細胞がマウスの体内で、いくつかのリネージのヒト細胞に分化したことが示された。