
別添2. 3. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書
厚生科学研究費補助金分担研究報告書
刊行物 別刷

造血幹細胞を用いる遺伝子治療技術の開発：遺伝子導入細胞
の選択的増幅法に関する研究 (H10-ゲノム-017)

株式会社ディナベック研究所
長谷川 護

総括研究報告書

造血幹細胞を用いる遺伝子治療技術の開発：遺伝子導入細胞の選択的増幅法に関する研究

主任研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所 取締役研究所長

研究要旨 造血幹細胞増幅の目的で巨核球刺激因子(TPO)受容体を用いた新規選択的増幅遺伝子を構築し、エストロゲン刺激により細胞増殖シグナルを発生伝達できることを示した。細胞内部分に変異を加えた顆粒球コロニー刺激因子受容体とエストロゲン受容体のホルモン結合ドメインとのキメラ分子の遺伝子を導入し、エストロゲン刺激を加えることにより血液前駆細胞を未分化な状態のまま可逆的に増殖させることが可能であることを示した。これらを用いたマウス、カニクイザルによるin vivoでの解析のための予備検討を行った。

分担研究者 小澤 敬也・自治医科大学
血液学講座・遺伝子治療研究部教授

A. 研究目的

先天性あるいは難治性血液疾患に対し、根本的な治療を目指す遺伝子治療に大きな期待が集まっている。血液疾患に対する遺伝子治療の標的細胞はいうまでもなく総ての血液細胞を作り出す造血幹細胞である。レトロウイルスを用いた改良法により幹細胞への遺伝子導入効率が上がったもののまだ実用レベルには達していないのが現状である。遺伝子導入された細胞を選択して濃縮する方法もあるが技術的に困難な点も多く、必ずしも実際的な方法ではない。我々は全く新しいアプローチとして、遺伝子が導入された細胞を積極的に増幅させる方法を考案した。我々が開発を目指す選択的増幅遺伝子によれば、結果的に遺伝子導入効率を上げ、臨床効果が大いに高まることが期待できる。これまで造血幹細胞の選択的増幅遺伝子の候補として顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体(GCR)とエストロゲン受容体(ER)のホルモン結合ドメイン(HBD)との融合蛋白質(GCRER)、およびG-CSFの結合領域を削除したその変異体(Δ GCRER)遺伝子を構築し、機能解析を行ってきた。今回、GCR細胞内

部分に含まれる分化シグナル伝達ドメインに変異を加え、より増殖優位に働くか否かを検討した。また、内因性エストロゲンによって増殖シグナルの擾乱が起こらないように、合成ステロイドであるタモキシフェンに特異的に反応する分子スイッチの検討を行った(小澤)。さらに造血幹細胞の増幅により適したものと期待される巨核球刺激因子TPO受容体(c-mpl)を用いた新規選択的増幅遺伝子の開発および機能解析を行った(長谷川)。さらに選択的増幅遺伝子の実用化に向けて、マウスを用いた幹細胞増幅の系の検討(長谷川)、霊長類造血幹細胞遺伝子治療の実験系を確立するための条件検討(小澤)を行った。

B. 研究方法

(1) 分化シグナル抑制型選択的増幅遺伝子
マウスGCRにおいて分化シグナル伝達に重要な働きをすると想定されるチロシン残基(Tyr703)をin vitro mutagenesis法によってフェニルアラニンに置換(Y703F変異)したキメラ分子(Δ Y703FGCRER)の遺伝子を構築し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。比較検討の対象として、 Δ GCRER遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターも構築した。IL-3依存性マウ

ス32D細胞株は内因性GCRおよびその下流のシグナル伝達系分子をもち、G-CSFによって好中球へと分化誘導可能である。上記のレトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入して得られた32D細胞を限界希釈法でクローン化し、G-CSFまたはエストロゲン刺激後の細胞増殖をXTT法にて、一方顆粒球への分化をWright-Giemsa染色標本の光顕的観察にて判定した。

(2) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子

マウスエストロゲン受容体のGly525→Arg変異体 (G525R変異体; タモキシフェン受容体) は合成ステロイドであるタモキシフェンに選択的に結合し、生理的に存在する濃度のエストロゲンには殆ど反応しない。GCRERおよびΔGCRERキメラのホルモン結合ドメインをタモキシフェン結合ドメイン (TmR) に置き換えた融合蛋白質 (GCRTmRおよびΔGCRTmR) 遺伝子を構築し、レトロウイルスベクターに搭載した。4種のベクターを用いてIL-3依存性マウスプレB細胞株Ba/F3にGCRER、ΔGCRER、GCRTmR、またはΔGCRTmR遺伝子を導入し、エストロゲンおよびタモキシフェンが増殖におよぼす影響をXTT法で検討した。また、これらレトロウイルスベクターを新鮮マウス骨髄細胞に感染させた後メチルセルロース培地上でコロニーアッセイを行い、リガンド特異的な増殖が得られるか検討した。

(3) 新規選択的増幅遺伝子

TPO受容体であるc-mplタンパクには少なくともc-mplpタイプとc-mplkタイプの二種類が存在する。c-mplpタイプはTPO受容体の完全長型で、細胞内ドメインにはサイトカイン受容体スーパーファミリーに共通してみられるBox1、Box2構造が存在し、TPOのシグナルを細胞内に伝達できるが、c-mplkタイプはスプライシングの違いによって生じたもので、細胞内ドメインは、Box1やBox2は存在せず、TPOシグナルは細胞内に伝達できないものと考えられている。従って、選択的増幅遺伝子としてはc-mplpを用いて構築を行った。また、c-

mplpのアミノ酸604~626の領域は分化シグナルを伝達する領域であることが報告されているので、アミノ酸604~635を欠失した変異体も構築に用いた。5'側にC-mplを、3'にエストロゲン受容体のHBDをコードするキメラ遺伝子を作成し (C-mplER、Δ(604-635) mplER)、レトロウイルスベクターに組み込んだ。選択的増幅遺伝子を含む高力価のレトロウイルスを産生するために、エコトロピック・パッケージング細胞であるBOSC23に構築したレトロウイルスベクターDNAをトランスフェクションし、二日後、上清中のウイルスを回収し、レトロネクチン法にてBa/F3細胞へ感染させた。選択的増幅遺伝子を導入したBa/F3細胞の増殖能を調べるため、Ba/F3細胞をIL-3、TPO、エストロゲンをそれぞれの培地に添加した試験区、サイトカイン無添加の試験区において、3日目まで細胞増殖をMTS法にて調べた。

(4) マウス骨髄再建系における増幅効果の検討

5-フルオロウラシルを腹腔内投与したマウスから骨髄細胞を採取し、2日間、SCFおよびIL-6によって前刺激した後、レトロネクチンをコートしたプレート上でレトロウイルスによりΔ703FGCRERを導入した。このとき末梢中の遺伝子導入細胞をモニターするため、Δ703FGCRERの下流にIRES配列を挟んでGFP遺伝子も導入した。これを致死量のガンマ線 (7+4Gy) を照射した同系マウスに静脈から移注し、骨髄の再建をおこなった。移植一ヶ月後に、再建後末梢血の赤血球を溶解し、フローサイトメータにより、GFP発現細胞を検出して遺伝子導入細胞の比率とした。解析後、エストロゲン錠剤 (15mg) を皮下に埋込み、エストロゲン投与一ヶ月後、再び遺伝子導入細胞の比率を算出した。また少量の末梢血液を用いて、遺伝子導入細胞の比率の変化を測定するために、GCRとER部分に渡って増幅がかかるようにプライマーを設計し、導入したGCRERの半定量的PCRの方法論検討も行っている。このとき、より正確な定量結果を得るため、内在性のGCR

で増幅がかかるプライマーセットを用いてデータを標準化した。

(5) カニクイザル造血幹細胞の純化および遺伝子導入

霊長類体内での幹細胞増幅を確認するための準備段階として、カニクイザルの骨髄自家移植を行った。サルからの骨髄血採取、CD34陽性細胞選択、全身放射線照射（10Gy）、輸注、ICU管理、輸血、抗生剤投与等の予備実験を行った。サルの実験は国立感染症研究所・筑波霊長類センターにおいて行い、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」を遵守している。

C. 研究結果

(1) 分化シグナル抑制型選択的増幅遺伝子導入による細胞増殖

Δ GCRER発現32D細胞をエストロゲンで刺激したところ、G-CSFで刺激した場合と同様に一過性増殖の後、好中球へと分化し、やがて死滅した。一方、 Δ Y703FGCRER発現32D細胞は、エストロゲン刺激により未分化な状態で一ヶ月以上増殖を続けた。また培地からエストロゲンを除くと細胞は速やかに死滅した。一方、刺激をエストロゲンからG-CSFに切り替えると、親株同様に好中球へと分化した。

(2) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子導入による細胞増殖 GCRER・ Δ GCRERを発現するBa/F3細胞は、 10^{-7} Mのエストロゲンによく反応してIL-3非存在下で増殖を続けたが、同濃度のタモキシフェンには反応しなかった。逆に、GCRTmR・ Δ GCRTmR発現Ba/F3細胞は 10^{-7} - 10^{-6} Mのタモキシフェンに反応して増殖したが、同濃度のエストロゲンには反応しなかった。このリガンド特異的増殖はマウス骨髄前駆細胞においても確認され、さらに、GCRER・ Δ GCRER遺伝子導入細胞では少数認められたリガンド非依存性コロニーが、GCRTmR・ Δ GCRTmR遺伝子導入細胞からは出現しなかった。

(3) 新規選択的増幅遺伝子による細胞増

幅

親株Ba/F3細胞は、IL-3添加培地中では増殖するが、エストロゲンやTPOのみを含む培地、コントロール培地中では増殖しない。c-mplERを導入したBa/F3細胞は、エストロゲンやTPOに反応して増殖を示し、また Δ (604-635)mplERを導入したBa/F3細胞もBと同様、エストロゲンによる細胞増殖がみられた。

(4) マウス骨髄再建系における増幅効果の検討

骨髄再建後の末梢血液中にバイシストロニックシステムでGFPを発現した細胞を確認することができた。フローサイトメーターによる解析では、2-5%の導入効率であり、エストロゲン投与によってその比率の上昇はみられなかった。またPCRにより骨髄キメラマウスの末梢血液中からの導入遺伝子を検出している。この方法をもとに現在より正確な導入効率を算出する条件の検討を進めている。

(5) カニクイザル造血幹細胞の純化および遺伝子導入

Dynal社のCD34陽性細胞分離キットによって、カニクイザルCD34陽性細胞を効率良く分離できることがわかった。これによってコロニー形成細胞は50-100倍の濃縮が可能であった。分離したCD34陽性細胞を自家移植することによって、全身放射線照射し骨髄廃絶したカニクイザルの造血を約2週間以内に再構築できることがわかった。この造血回復が内因性でなく移植由来の回復であることを確認するために、現在、GFP発現レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞標識試験を施行中である。

D. 考察

選択的増幅遺伝子のGCR部分のY703F変異によりキメラ分子を介する分化シグナルが抑制され、より増殖優位のシグナルを伝える。従って、より効率の高い選択的増幅遺伝子が開発できることが示された。また増殖刺激をc-mpl分子によって惹起する選択的増幅遺伝子も構築されその機能解析も進んでいる。今後、より幹細胞増幅に適し

た遺伝子の選択を行う予定である。安全性の面から、リガンド特異的分子スイッチの部分の変異体の研究も進められ、生理的濃度のエストロゲンには反応せず、合成ステロイドであるタモキシフェン投与によって可逆的に遺伝子導入血液細胞の増殖を誘導できる特異性の高い増幅分子の開発が進んだ。体内での幹細胞増幅の系としてマウスとカニクイザルの2つの系での検討を行う。マウスではまだ体内での増幅が確認できていないが、これは実験検体マウスに過度な負担がかかっていることも原因と考えられる。検体マウスにより負担の少ない解析法として少量の末梢血からのPCRによるより正確な解析法を検討している。カニクイザルを用いることはヒトの遺伝子治療技術の確立に直結するステップであると同時に、中型動物を用いることで、増幅効果の有無もより正確に検出されることが期待できる。選択的増幅遺伝子の実用化に向けて非常に重要な実験と位置づけている。

E. 結論

細胞株を用いた選択的増幅遺伝子の検討は、増幅効果の高い遺伝子の開発に有効な方法であり、この目的に適した遺伝子の探索を進めることができた。また同時により安全なシステムも開発されつつある。ここでの検討をもとに、さらにマウスおよびサルの造血幹細胞増幅が可能なシステムを探索することにより、治療効果の高い実用的な選択的増幅遺伝子の開発を行っていく方針である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Kokubun M, Kume A, Urabe M, Mano H, Okubo M, Kasukawa R, Kakizuka A, Ozawa K: Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Ther* 5(7):923-929, 1998
2. Ozawa K, Ueda Y, Ito K, Urabe M,

Kume A: A novel selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Proceedings of the UCSD symposium "Recent advances in hematopoietic stem cell transplantation"* *Cancer Res Ther Contr* 7:27-31, 1998

3. Kodaira H, Kume A, Ogasawara Y, Urabe M, Kitano K, Kakizuka A, Ozawa K: Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-induced apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 89(7):741-747
 4. Ogasawara Y, Hanazono Y, Kodaira H, Urabe M, Mano H, Kakizuka A, Kume A, Ozawa K: Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Ther Mol Biol*, in press
 5. Matsuda K, Kume A, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther*, in press
- (2) 学会発表

1. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、坂田恒昭、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也：造血幹細胞遺伝子治療のための選択的増幅遺伝子の開発：分化シグナル抑制誘導体に関する検討。第60回日本血液学会総会、1998年3月25日、大阪 (*Int J Hematol* 67 suppl:44, 1998)
2. 小平宏、久米晃啓、上田泰次、小笠原洋治、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也：アポトーシス誘導遺伝子による細胞制御法の開発：tamoxifen反応性変異エストロゲン受容体を用いた分子スイッチの検討。第60回日本血液学会総会、1998年3月26日、大阪 (*Int J Hematol* 67 suppl:127, 1998)
3. 小笠原洋治、久米晃啓、小平宏、卜部匡司、間野博行、小澤敬也：ドミナントネガティブレチノイン酸受容体遺伝子導入による造血幹細胞体外増幅法の基礎的

- 検討. 第60回日本血液学会総会、1998年3月25日、大阪 (Int. J Hematol 67 suppl: 184, 1998)
4. Kume A, Xu R, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Suda T, Ozawa K: In vivo tracking of retrovirally transduced hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. American Society of Gene Therapy 1st Annual Meeting, May 29, 1998, Seattle, WA, USA. (Abstract p90a)
 5. Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Sakata T, Hasegawa M, Kume A, Ozawa K: Development of a modified selective amplifier gene for stem cell gene therapy: growth stimulation of transduced cells without differentiation. American Society of Gene Therapy 1st Annual Meeting, May 29, 1998, Seattle, WA, USA. (Abstract p91a)
 6. Kume A, Xu R, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Ozawa K: In vivo long-term tracking of retrovirally transduced murine hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. Second conference on stem cell gene therapy: biology and technology, May 31, 1998, Orcas Island, WA, USA.
 7. 久米晃啓、Ruifang Xu、松田幹人、上田泰次、卜部匡司、坂田恒昭、長谷川護、小澤敬也: In vivo long-term tracking of retrovirally transduced murine hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月4日、東京 (Abstract p35)
 8. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、坂田恒昭、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也: A modified version of selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy: growth stimulation of transduced cells without differentiation. 第3回日本遺伝子治療学会総会、1997年8月4日、東京 (Abstract p36)
 9. 小平宏、久米晃啓、小笠原洋治、卜部匡司、垣塚彰、北野喜良、小澤敬也: Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月5日、東京 (Abstract p139)
 10. 小笠原洋治、久米晃啓、小平宏、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也: Ex vivo expansion of hematopoietic cells using dominant negative retinoic acid receptor genes. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月5日、東京 (Abstract p152)
 11. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也: 造血幹細胞治療のための改良型選択的増幅遺伝子の開発: 分化シグナル抑制誘導体に関する検討. 第57回日本癌学会総会、1998年9月30日、横浜(日本癌学会総会記事p241)
 12. 久米晃啓、松田幹人、卜部匡司、小澤敬也: Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子マーカーをもつバイシストロニック・レトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療技術の開発. 第57回日本癌学会総会、1998年9月30日、横浜(日本癌学会総会記事p244)
 13. 久米晃啓、小平宏、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也: アポトーシス誘発遺伝子による細胞性漁法の開発—tamoxifen反応性変異エストロゲン受容体を用いた分子スイッチの検討. 第28回日本免疫学会総会、1998年12月4日、神戸 (日本免疫学会総会・学術集会記録p343)
 14. Matsuda KM, Kume A, Xu R, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: Improvement of selective amplifier genes for hematopoietic stem cell gene therapy. American Society of Hematology 39th Annual Meeting, December 5, 1998, Miami Beach, FL, USA. (Blood 92:150a, 1998)
 15. 久米晃啓、Ruifang Xu、松田幹人、上田泰次、卜部匡司、小澤敬也: GFP標識

レトロウイルスベクターにて導入した遺伝子のin vivo発現追跡. 第6回食細胞機能異常研究会、1998年12月11日、東京

分担研究報告書

分化刺激を惹起しないキメラ受容体の構築とその細胞増殖促進効果に関する研究

分担研究者 小澤 敬也 自治医科大学血液学講座・遺伝子治療研究部教授

研究要旨 細胞内部分に変異を加えた顆粒球コロニー刺激因子受容体とエストロゲン受容体ホルモン結合ドメインとのキメラ分子の遺伝子を導入しエストロゲン刺激を加えることにより、血液前駆細胞を未分化な状態のまま可逆的に増殖させることが可能であることを示した。

A. 研究目的

自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞は遺伝子治療の理想的な標的細胞の一つであるが、従来の方法では遺伝子導入効率が極めて低く、遺伝子治療臨床研究において明らかな効果が得られていない。この現状を打破する一法として、遺伝子導入造血幹細胞を体内で選択的に増幅する技術の開発が挙げられる。その目的で我々は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体 (GCR) とエストロゲン受容体ホルモン結合ドメイン (ER) との融合蛋白質 (GCRER) 遺伝子を構築し、「選択的増幅遺伝子」と名付けて機能解析と改良を行っている。今回、GCR 細胞内部分に含まれる分化シグナル伝達ドメインに変異を加え、より増殖優位に働くか否かを検討した。また、内因性エストロゲンによる増殖シグナル擾乱が起こらないように、合成ステロイドであるタモキシフェンに特異的に反応する分子スイッチの検討を行った。さらに選択的増幅遺伝子の実用化に向けて、霊長類造血幹細胞遺伝子治療の実験系を確立するため、カニクイザルを用いて骨髓造血幹細胞回収・濃縮の条件決めを行った。

B. 研究方法

(1) 分化シグナル抑制型選択的増幅遺伝子

選択的増幅遺伝子のプロトタイプである GCRER (GCR 全長と ER とのキメラ) および GCRER から G-CSF 結合部位を欠失させた Δ GCRER を造血前駆細胞に発現させると、エストロゲン刺激によって細胞増殖のみならず分化も誘導される。そこで、マウス GCR において分化シグナル伝達に重要な働きをすると想定されるチロシン残基 (Tyr703) を *in vitro* mutagenesis 法によってフェニルアラニンに置換 (Y703F 変異) したキメラ分子 (Δ Y703FGCRER) の遺伝子を構築し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。比較検討の対象として、 Δ GCRER 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターも構築した。これらのレトロウイルスベクターはバイシストロニックタイプで、それぞれ選択的増幅遺伝子の下流に第二シストロンとして CD8 遺伝子を組み込み、遺伝子導入細胞が二つの外来遺伝子を同時に発現するように設計した。IL-3 依存性マウス 32D 細胞株は内因性 GCR およびその下流のシグナル伝達系分子をもち、G-CSF によって好中球へと分化誘導可能

である。親株の 32D 細胞は CD8 を発現していないため、上記のレトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入した後、CD8 抗体を結合した磁気ビーズを用いて CD8 陽性細胞すなわち遺伝子導入細胞を純化した。得られた細胞を限界希釈法でクローン化し、G-CSF またはエストロゲン刺激後の細胞増殖を XTT 法にて、顆粒球への分化を Wright-Giemsa 染色標本の光顕的観察にて判定した。

(2) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子

マウスエストロゲン受容体の Gly525→Arg 変異体 (G525R 変異体; タモキシフェン受容体) は合成ステロイドであるタモキシフェンに選択的に結合し、生理的に存在するエストロゲンには殆ど反応しない。そこで英国 G. I. Evan 博士よりタモキシフェン受容体遺伝子の供与を受け、GCRER および ΔGCRER キメラのホルモン結合ドメインをタモキシフェン結合ドメイン (TmR) に置き換えた融合蛋白質 (GCRTmR および ΔGCRTmR) 遺伝子を構築し、CD8 遺伝子とともに発現させるべくレトロウイルスベクターを構築した。4 種のベクターを用いて IL-3 依存性マウスプレ B 細胞株 Ba/F3 に GCRER・ΔGCRER・GCRTmR・ΔGCRTmR 遺伝子を導入し、エストロゲンおよびタモキシフェンが増殖におよぼす影響を XTT 法で検討した。また、これらレトロウイルスベクターを新鮮マウス骨髄細胞に感染させた後メチルセルロース培地上でコロニーアッセイを行い、リガンド特異的な増殖が得られるか検討した。

(3) カニクイザル造血幹細胞の純化および遺伝子導入

カニクイザルの骨髄自家移植を行うために、サルからの骨髄血採取、CD34 陽性

細胞選択、全身放射線照射 (10Gy)、輸注、ICU 管理、輸血、抗生剤投与等の予備実験を行った。サルの実験は国立感染症研究所・筑波霊長類センターにおいて行い、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」を遵守している。

C. 研究結果

(1) 分化シグナル抑制型選択的増幅遺伝子導入による細胞増殖

ΔGCRER 発現 32D 細胞をエストロゲンで刺激したところ、G-CSF で刺激した場合と同様に、一過性増殖の後好中球へと分化し、やがて死滅した。一方、ΔY703FGCRER 発現 32D 細胞は、エストロゲン刺激により未分化な状態で一ヶ月以上増殖を続けた。これらの細胞の培地からエストロゲンを除くと細胞は速やかに死滅し、また刺激をエストロゲンから G-CSF に切り替えると、親株同様に好中球へと分化した。

(2) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子導入による細胞増殖

GCRER・ΔGCRER を発現する Ba/F3 細胞は、 10^{-7} M のエストロゲンによく反応して IL-3 非存在下で増殖を続けたが、同濃度のタモキシフェンには反応しなかった。逆に、GCRTmR・ΔGCRTmR 発現 Ba/F3 細胞は 10^{-7} - 10^{-6} M のタモキシフェンに反応して増殖したが、同濃度のエストロゲンには反応しなかった。このリガンド特異的増殖はマウス骨髄前駆細胞においても確認され、さらに、GCRER・ΔGCRER 遺伝子導入細胞では少数認められたリガンド非依存性コロニーが、GCRTmR・ΔGCRTmR 遺伝子導入細胞からは出現しなかった。

(3) カニクイザル造血幹細胞の純化および遺伝子導入

Dynal 社の CD34 陽性細胞分離キットによって、カニクイザル CD34 陽性細胞を効率良く分離できることがわかった。これによってコロニー形成細胞は 50-100 倍の濃縮が可能であった。

分離した CD34 陽性細胞を自家移植することによって、全身放射線照射し骨髄廃絶したカニクイザルの造血を約 2 週間以内に再構築できることがわかった。この造血回復が内因性でなく移植由来の回復であることを確認するために、現在、GFP 発現レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞標識試験を施行中である。

D. 考察

選択的増幅遺伝子の GCR 部分の Y703F 変異によりキメラ分子を介する分化シグナルが抑制され、より増殖優位のシグナルを伝える。従って、より効率の高い選択的増幅遺伝子が開発できることが示された。

また、リガンド特異的分子スイッチの部分の G525R 変異により、生理的濃度のエストロゲンには反応せず、合成ステロイドであるタモキシフェン投与によって可逆的に遺伝子導入血液細胞の増殖を誘導できることが示され、より安全性の高い選択的増幅遺伝子の開発に道が開かれた。

カニクイザルについて最適化した造血幹細胞採取・濃縮プロトコルを用いて、サルの造血幹細胞に選択的増幅遺伝子を導入する実験を計画中である。これらの成果は、ヒトの遺伝子治療技術の確立に直結する重要なステップであり、実用化に向けて大きな期待がもたれる。

E. 結論

選択的増幅遺伝子の改良により、造血幹細胞の分化なき人為的増幅という目的に即した、安全性の高いシステムが開発されつつある。サルの造血幹細胞採取・濃縮法の最適化と合わせて、ヒト造血幹細胞遺伝子治療に向けての実用化が待たれる。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Kokubun M, Kume A, Urabe M, Mano H, Okubo M, Kasukawa R, Kakizuka A, Ozawa K: Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Ther* 5(7):923-929, 1998
2. Ozawa K, Ueda Y, Ito K, Urabe M, Kume A: A novel selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Proceedings of the UCSD symposium "Recent advances in hematopoietic stem cell transplantation"* *Cancer Res Ther Contr* 7:27-31, 1998
3. Kodaira H, Kume A, Ogasawara Y, Urabe M, Kitano K, Kakizuka A, Ozawa K: Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-induced apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 89(7):741-747
4. Ogasawara Y, Hanazono Y, Kodaira H, Urabe M, Mano H, Kakizuka A, Kume A, Ozawa K: Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Ther Mol Biol*, in press

5. Matsuda KM, Kume A, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther*, in press
- (2) 学会発表
1. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、坂田恒昭、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也：造血幹細胞遺伝子治療のための選択的増幅遺伝子の開発：分化シグナル抑制誘導体に関する検討。第60回日本血液学会総会、1998年3月25日、大阪 (*Int J Hematol* 67 suppl:44, 1998)
 2. 小平宏、久米晃啓、上田泰次、小笠原洋治、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也：アポトーシス誘導遺伝子による細胞制御法の開発：tamoxifen 反応性変異エストロゲン受容体を用いた分子スイッチの検討。第60回日本血液学会総会、1998年3月26日、大阪 (*Int J Hematol* 67 suppl:127, 1998)
 3. 小笠原洋治、久米晃啓、小平宏、卜部匡司、間野博行、小澤敬也：ドミナントネガティブレチノイン酸受容体遺伝子導入による造血幹細胞体外増幅法の基礎的検討。第60回日本血液学会総会、1998年3月25日、大阪 (*Int J Hematol* 67 suppl:184, 1998)
 4. Kume A, Xu R, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Suda T, Ozawa K: In vivo tracking of retrovirally transduced hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. American Society of Gene Therapy 1st Annual Meeting, May 29, 1998, Seattle, WA, USA. (Abstract p90a)
 5. Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Sakata T, Hasegawa M, Kume A, Ozawa K: Development of a modified selective amplifier gene for stem cell gene therapy: growth stimulation of transduced cells without stimulation. American Society of Gene Therapy 1st Annual Meeting, May 29, 1998, Seattle, WA, USA. (Abstract p91a)
 6. Kume A, Xu R, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Ozawa K: In vivo long-term tracking of retrovirally transduced murine hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. Second conference on stem cell gene therapy: biology and technology, May 31, 1998, Orcas Island, WA, USA.
 7. 久米晃啓、Ruifang Xu、松田幹人、上田泰次、卜部匡司、小澤敬也：In vivo long-term tracking of retrovirally transduced murine hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月4日、東京 (Abstract p35)
 8. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、坂田恒昭、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也：A modified version of selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy: growth stimulation of transduced cells without differentiation. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1997年8月4日、東京 (Abstract p36)
 9. 小平宏、久米晃啓、小笠原洋治、卜部匡司、垣塚彰、北野喜良、小澤敬也：Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月5日、東京 (Abstract p139)

10. 小笠原洋治、久米晃啓、小平宏、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也： Ex vivo expansion of hematopoietic cells using dominant negative retinoic acid receptor genes. 第4回日本遺伝子治療学会総会、1998年7月5日、東京 (Abstract p152)
11. 松田幹人、上田泰次、卜部匡司、長谷川護、久米晃啓、小澤敬也： 造血幹細胞治療のための改良型選択的増幅遺伝子の開発：分化シグナル抑制誘導体に関する検討. 第57回日本癌学会総会、1998年9月30日、横浜(日本癌学会総会記事 p241)
12. 久米晃啓、松田幹人、卜部匡司、小澤敬也： Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子マーカーをもつバイシストロニック・レトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療技術の開発. 第57回日本癌学会総会、1998年9月30日、横浜 (日本癌学会総会記事 p244)
13. 久米晃啓、小平宏、卜部匡司、垣塚彰、小澤敬也： アポトーシス誘発遺伝子による細胞性漁法の開発--tamoxifen 反応性変異エストロゲン受容体を用いた分子スイッチの検討. 第28回日本免疫学会総会、1998年12月4日、神戸 (日本免疫学会総会・学術集会記録 p343)
14. Matsuda KM, Kume A, Xu R, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: Improvement of selective amolpfier genes for hematopoietic stem cell gene therapy. American Society of Hematology 39th Annual Meeting, December 5, 1998, Miami Beach, FL, USA. (Blood 92:150a, 1998)
15. 久米晃啓、Ruifang Xu、松田幹人、上田泰次、卜部匡司、小澤敬也： GFP 標識レトロウイルスベクターにて導入した遺伝子の in vivo 発現追跡. 第6回食細胞機能異常研究会、1998年12月11日、東京
16. Kume A, Xu R, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Ozawa K: Long-term tracking of retrovirally transduced murine hematopoietic cells stably expressing CD24 and GFP transgenes. Keystone symposia on molecular and cellular biology: molecular and cellular biology of gene therapy. January 11, 1999, Salt Lake City, UT, USA. (Abstract p58)

19980404

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy

Matsuda KM, Kume A, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K
Gene Ther. 1999 Jun;6(6):1038-44.

A Novel Selective Amplifier Gene for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy

Keiya Ozawa, Yasuji Ueda , Keiko Ito…
Cancer Research Therapy and Control 7 P.27-31 1998

A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells.

Xu R, Kume A, Matsuda KM, Ueda Y, Kodaira H, Ogasawara Y, Urabe M, Kato I, Hasegawa M, Ozawa K.
J Gene Med. 1999 Jul-Aug;1(4):236-44.