

19990344

1999年度

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

厚生科学研究費 ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

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

長谷川 護（株式会社ディナベック研究所）

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 血液疾患を対象とした遺伝子治療の為、選択的増幅遺伝子を開発中である。造血幹細胞増幅の目的で巨核球刺激因子(TPO)受容体(mpl)を用いた新規選択的増幅遺伝子を元に、TPO への反応性を欠落させた、新たな選択的増幅遺伝子を構築し、その反応性を確認した。また、これまでに開発してきた、顆粒球刺激因子受容体 (GCR) 及びその誘導体と、タモキシフェン受容体を用いて、その刺激特異性を高め、刺激によりシグナル伝達分子群の解析を行い、伝達経路の一部を明らかにした。さらに選択的増幅遺伝子の生体内での機能を示すためカニクイザルを用いた骨髓造血幹細胞遺伝子導入実験を開始した。

分担研究者 久米 晃啓
自治医科大学
遺伝子治療研究部講師

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。

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全ての血液細胞を作り出す造血幹細胞である。レトロウイルスでのフィブロネクチン誘導体を用いた改良法により幹細胞への遺伝子導入効率が上

これまで造血幹細胞の選択的増幅遺伝子に用いるシグナルの発信源として顆粒球コロ

ニー刺激因子 (G-CSF) 受容体 (GCR) とその誘導体 Δ GCR (G-CSF の結合領域を削除したその変異体)、 Δ FGCR (Δ GCR 細胞内部分に含まれる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、をフェニルアラニンに置換した受容体) (Δ FGCR、さらに巨核球刺激因子受容体(mpl) を用いてきた。また、その発信源を活性化する分子スイッチとしてエストロゲン受容体のホルモン結合ドメイン (HBD)、および体内外のエストロゲン様物質による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(Tm)に特異的に反応するタモキシフェン受容体(TmR)を用いて構築している。

mpl に関しては本来のリガンドである巨核球刺激因子(TPO)に対する反応性を抑制するため、細胞質外領域を部分的に削除したものや、細胞外領域を Δ GCR の細胞外領域に置換したものと ER を作製し、エストロゲンによる増幅効果作用を確認した (長谷川)。ER と TmR の分子スイッチとしてのリガンド特異性の検討を行った (久米)。また、GCR 及び Δ FGCR の分化、増幅シグナルの量と質の検討のため、GCR 下流の Jak1、Jak2、Stat3、Stat5 のリン酸化の具合を調べた (久米)。さらに選択的増幅遺伝子の実用化に向けて、霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療に向けた幹細胞増幅の系の検討を行った (長谷川、久米共同実験)。

B. 研究方法

(1) mpl 型選択的増幅遺伝子

TPO 受容体である二種類の c-mpl タンパク質のうち、シグナルを細胞内に伝達できる完全長タイプの c-mplp を用いて新しい選択的増幅遺伝子、mplER の構築を行ってきた。本年度は、この遺伝子産物が内在性の TPO に反応しないように c-mpl のリガンド結合部位と思われる領域を削除した。具体的には mplER より、それぞれアミノ酸位置、10-267、10-472、30-455、40-267、40-472、280-472 の領域のアミノ酸を欠失させた 6 種類の変異体を作製した。また、同時に c-mplp の細胞外領域を GCR の細胞外領域より G-CSF 結合部位を削除した Δ GCR の細胞外ドメインに置き換えた Δ GCRmpl-ER を作製した。

これらを搭載したレトロウイルスベクターを作製し Ba/F3 細胞へ感染させた。こうして得た遺伝子導入 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。

(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 \rightarrow Arg 変異体 (G525R 変異体) 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 (タモキシフェン受容体、TmR)。 Δ GCRER キメラ、および Δ FGCRER キメラのそれぞれ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に置き換えた融合蛋白質 (Δ GCR TmR、 Δ FGCR TmR) 遺伝子を構築し、レトロウイルスベクターに搭載した。さらに対照として ER を含む Δ GCRER と Δ FGCRER を搭載したレトロウイルスを

作製した。4種のベクターはレポーター分子としてオワンクラゲの蛍光蛋白質由来のeGFPを共発現するようにEMCV由来のIRES配列を利用したバイシストロニック型で搭載している。これらのベクターを用いてマウス骨髄前駆細胞導入し、腫瘍の刺激を与えて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) 顆粒球分化のシグナル伝達系の解析

分化シグナルの解析にはマウス骨髄系前駆細胞である32Dを用いた。昨年度、 Δ GCRER発現32Dと Δ FGCRER発現32DをE2で刺激すると、前者は分化刺激を受け好中球へ分化し、後者は分化刺激を受けずに未熟な形態を保ったまま増殖することを見出した。そこで、Y703F変異に伴う分化シグナル減弱のメカニズムを知るために、GCR下流のシグナル伝達分子であるJak1・Jak2・Stat3・Stat5（活性化される時にチロシン燐酸化を受ける）について、 Δ GCRER発現32Dと Δ FGCRER発現32DをE2で刺激した際の挙動を解析した。

(4) カニクイザル造血幹細胞の純化および遺伝子導入

カニクイザル骨髄よりCD34陽性細胞選択し、レトロウィルスで Δ FGCRER、 Δ FGCR^{TmR}遺伝子を導入し、E2あるいはTm刺激下でコロニー形成実験を行った。

さらに霊長類体内での幹細胞増幅を確認するために、国立感染症研究所・筑波霊長類センターで確立したカニクイザルの骨髄自家移植の系を利用し造血幹・前駆細胞に対する遺伝

子導入実験を開始した。サルから骨髄血採取、CD34陽性細胞選択後、レトロウィルスにて遺伝子導入を行い、全身放射線照射(10Gy)、その後輸注、ICU管理、輸血、抗生剤投与等により遺伝子導入したサルの管理を行った。サルは定期的に骨髄細胞と末梢血を採取し、細胞に含まれるタンパク質、プロウィルスの検出による解析を行った。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自治医大と共同で行い、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) mpl型選択的増幅遺伝子

親株Ba/F3細胞は、IL-3添加培地中では増殖するが、コントロール培地やE2、TPOのみを含む培地、中では増殖しない。mpl^{ER}を導入したBa/F3細胞は、E2やTPOに反応して増殖を示した。しかし、TPO結合領域を含むと思われる細胞外領域を削除した6種類の変異型mpl^{ER}を導入したBa/F3細胞は、TPO添加培地での増殖性だけでなくE2添加培地での増殖性も失った。これに対し、 Δ GCR^{mpl-ER}を導入したBa/F3細胞は、TPOには反応性を見せず、E2の添加にのみ増殖性を示した。また、 Δ GCR^{mplER}を導入したBa/F3細胞のE2添加培地での増殖性は Δ FGCRERを導入したBa/F3細胞の増殖性を凌ぐものであった。現在、これをもとに Δ GCR^{mplTmR}も作製し、Tmに対する反応性も確認している。

(2) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子

Δ GCR_{TmR} 遺伝子または Δ FGCR_{TmR} 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞はタモキシフェンに反応して複数のリニエージ（骨髄球系・赤芽球系）のコロニーを形成したが、エストロゲンには全く反応せず、増殖因子無添加時にもコロニーはできなかった。即ち、TmR のリガンド特異性は極めて高く、生体に適用した際にも内因性物質による不必要な活性化が起こりにくいことが予想された。一方、 Δ GCR_{ER} 遺伝子または Δ FGCR_{ER} 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞からは、E2、Tm 刺激によってほぼ同数のコロニーができてだけでなく、増殖因子無添加時にも相当数のコロニーが形成され、ER のリガンド特異性は相対的に低いことが確認された。

バイシストロニックベクターの有効性としては、Tm 特異的選択的増幅遺伝子の作用により形成されたコロニーは、ほぼ 100% が EGFP レポーター分子を発現しており、この形のベクターによって、治療用遺伝子を発現する血液細胞をタモキシフェン特異的に増幅できることが示唆された。

(3) 顆粒球分化に関わるシグナル伝達分子群の解析

32D 細胞を G-CSF で刺激すると、内因性 GCR およびその下流のシグナル伝達分子である Jak1、Jak2、Stat3、Stat5 は速やかに（10 分以内）チロシンリン酸化された。32D 細胞に Δ GCR_{ER} または Δ FGCR_{ER} を発現させて E2 で刺激した場合は、Jak1、Jak2、Stat5 は上記に比べ、やや遅れてチロシンリン酸化されたが（60-90 分で最高）、どちらの

選択的増幅遺伝子を導入した 32D でも、それらシグナル伝達分子のリン酸化レベルに明らかな差はなかった。一方、Stat3 の活性化には明らかな差があった。即ち、 Δ FGCR_{ER} を E2 で刺激したときの Stat3 のチロシンリン酸化レベルは、 Δ GCR_{ER} を刺激したときに比べて顕著に低下しており、このとき Stat3 と共沈するチロシンリン酸化蛋白質（分子種については未同定）も著明に減少していた。Y703F 変異による顆粒球分化シグナルの減弱と、Stat3 リン酸化レベルの低下との連関が示唆された。

(4) カニクイザル造血幹細胞への遺伝子導入と自家移植系の確立

GCR 型選択的増幅遺伝子 Δ FGCR_{ER} あるいは Δ FGCR_{TmR} を導入したカニクイザルの造血系前駆細胞細胞はそれぞれ E2 あるいは Tm 刺激によってコロニーを形成した。

カニクイザル造血幹細胞の自家移植実験においては、移植後に無菌室管理・中心静脈栄養・輸血・抗生剤投与を必要としたが、死亡例なくおおむね安全に行なうことができた。

遺伝子標識したカニクイザル血液細胞の追跡実験については、これまでに移植後最長で 9 ヶ月間追跡した。経時的骨髄サンプリングにより算定した前駆細胞のプロウイルス陽性率は 2-20%であった。ただし EGFP 遺伝子を導入した場合、齧歯類の場合と異なり、EGFP 陽性細胞は末梢血中にはほとんど出現しないことが判明した。

選択的増幅遺伝子の前臨床研究では、カニクイザル骨髄前駆細胞に Δ FGCR_{ER} を導入して移植したところ、遺伝子導入細胞の頻度

を40%前後にまで上昇させ得た。

さらに E2 を含むペレットの皮下投与により E2 の血中濃度が *in vitro* で効果のある 10^{-7} M まで上昇しうることを確認した。現在、体内での E2 刺激による遺伝子導入細胞の選択的増幅効果を確認中である。

D. 考察

造血幹細胞に有効だと思われる *mpl* を用いた選択的増幅遺伝子を構築した。E2 や Tm などの刺激因子に反応し増殖刺激を発することを確認し、さらに本来のリガンドである TPO に対する反応性も欠失することができた。今後、造血幹細胞に対しより高い増幅機能があるか、これまで構築してきた GCR 型の選択的増幅遺伝子と比較する予定である。

タモキシフェン結合ドメインを取り入れることにより、内因性のエストロゲン及び、類似物質等には反応しない特異性の高いキメラ受容体を構築することができた。これを用いれば、より安全性の高い選択的増幅遺伝子の開発が可能だと考えられる。また、改良型選択的増幅遺伝子と治療用遺伝子を共発現するバイシストロニック・ベクターは、実質的な治療効果を高めるために有用であると考えられた。

選択的増幅遺伝子の GCR 部分の Y703F 変異による分化シグナルの抑制には、Stat3 の磷酸化レベルの低下が関与していることが示唆された。血液細胞に増殖優位のシグナルを伝えるための新たな分子標的の候補としても興味深い。

これまでマウス由来の GCR を用いマウスの細胞でその効果を確認してきたが、今回こ

の遺伝子が霊長類においても機能することが明らかになった。カニクイザル造血幹細胞移植実験系は、造血幹細胞生物学、移植免疫学等の研究において、ヒトの場合をよりよく反映するモデル系として有用と思われる。また、この系を用いて得られた遺伝子導入効率は、米国のそれとほぼ同じ水準に達した。今回サルに用いた「選択的増幅遺伝子」は ER を分子スイッチとして用いたため、血清中のエストロゲン類似物質にも反応した可能性がある。来年度は、より特異性の高い TmR を含む「選択的増幅遺伝子」発現ベクターを用いて、カニクイザル造血幹細胞遺伝子導入実験を継続する予定である。

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デザイン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。これまでの検討をもとに、サルの造血幹細胞増幅が可能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. 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* 6(6):1038-1044, 1999

2. Kume A, Ito K, Ueda Y, Hasegawa M, Urabe M, Mano H, Ozawa K: A G-CSF receptor-gyrase B fusion gene: a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260(1):9-12, 1999
 3. Xu R, Kume A, Matsuda KM, Ueda Y, Kodaira H, Ogasawara Y, Urabe M, Kato I, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. *J Gene Med* 1(4):236-244, 1999
 4. Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Urabe M, and Ozawa K: Hematopoietic stem cell gene therapy: a current overview. *Int. J. Hematol.* 69:227-233, 1999.
 5. 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
- (2) 学会発表
1. 久米晃啓、Xu Ruifang、松田幹人、ト部匡司、小澤敬也: Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子マーカーをもつパリストロニック・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61回日本血液学会総会、1999年4月20日、東京 (Int J Hematol 69, Suppl 1, p55, 1999)
 2. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. 第61回日本血液学会総会、1999年4月20日、東京 (Int J Hematol 69, Suppl 1, p258, 1999)
 3. Kume A, Kodaira H, Kametaka M, Kakizuka A, Mizukami H, Hanazono Y, Urabe M, Ozawa K: Development of an inducible suicide system with fusion proteins between Fas and steroid-binding domains. The 2nd Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 1999.6.10, Washington D.C., USA (Abstract p69a)
 4. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. The 2nd Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 1999.6.10, Washington D.C., USA (Abstract p70a)
 5. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: An improved selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy: tamoxifen-inducible expansion of genetically modified cells. 第5回日本遺伝子治療学会総会、1999年6月18日、東京 (抄録 p38)
 6. 久米晃啓、Ruifang Xu、花園豊、

水上浩明、卜部匡司、小澤敬也：GFP 標識
バイシストロニックレトロウイルスベクター
を用いた in vivo 追跡。日本人類遺伝学会第
44 回大会、1999 年 11 月 11 月 18 日、仙台
(抄録 p138)

7. 小澤敬也、続瑞芳、水上浩明、花
園豊、卜部匡司、久米晃啓：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。平
成 11 年度特定領域研究 (A) 公開班会議「造
血システムにおける自己複製と分化機構の解
析」、1999 年 11 月 19 日、大阪 (抄録 p31)

8. 花園豊、久米晃啓、長谷川護、寺
尾恵治、小澤敬也：GFP を用いたカニクイ
ザル造血幹細胞遺伝子標識研究。平成 11 年
度特定領域研究 (A) 公開班会議「造血シス
テムにおける自己複製と分化機構の解析」、
1999 年 11 月 19 日、大阪 (抄録 p34)

9. Xu R, Kume A, Hanazono Y,
Matsuda KM, Ueda Y, Urabe m, Mano H,
Hasegawa M, Ozawa K: Development of
selective amplifier genes for tamoxifen
inducible expansion of hematopoietic
stem cells. (Blood 94:356a, 1999)

10. Hanazono Y, Ageyama N,
Shibata H, Nagashima T, Ueda Y,
Hasegawa M, Kato I, Kume A, Ozawa K:
In vivo discrepancy of carrying the GFP
gene between progenitors and circulating
cells after cynomolgus monkey stem cell
transduction and transplantation. (Blood
94:357a, 1999)

11. Kume A, Xu R, Matsuda KM,

Hanazono Y, Mizukami H, Ueda Y,
Hasegawa M, Urabe M, Ozawa K:
Selective amplifier genes conferring
tamoxifen-inducible expansion of
transduced hematopoietic progenitors.
Keystone Symposia. Gene therapy: the
next millennium, 2000.1.8, Keystone, CO,
USA (Abstract p75)

12. 長島建之、上田泰次、花園豊、続
瑞芳、久米晃啓、小松則夫、小澤敬也、長谷
川護：新規選択的増幅遺伝子の開発：mpl シ
グナル伝達ドメインの利用。第 62 回日本血
液学会総会、2000 年 3 月 17 日、福岡 (Int J
Hematol 71, Suppl 1, p175, 2000)

13. 花園豊、揚山直英、柴田宏昭、長
島建之、上田泰次、久米晃啓、加藤郁之進、
長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也：カニクイザ
ルを用いた造血幹細胞遺伝子治療モデル実験
系の樹立。第 62 回日本血液学会総会、2000
年 3 月 17 日、福岡 (Int J Hematol 71, Suppl
1, p175, 2000)

14. 久米晃啓、続瑞芳、水上浩明、花
園豊、卜部匡司、間野博行、小澤敬也：改良
型選択的増幅遺伝子導入による血球分化・増
殖シグナルの解析。第 62 回日本血液学会総
会、2000 年 3 月 18 日、福岡 (Int J Hematol
71, Suppl 1, p58, 2000)

分担 研究報告書

タモキシフェン受容体を用いた高特異性選択的増幅遺伝子の開発と機能に関する研究

分担研究者：久米 晃啓（自治医科大学遺伝子治療研究部講師）

研究要旨

顆粒球コロニー刺激因子受容体とタモキシフェン結合ドメインとのキメラ分子の遺伝子を導入しタモキシフェン刺激を加えることにより、内因性生理活性物質の影響を受けることなく、血液前駆細胞を増殖させることが可能であることを示した。また、このようなキメラ受容体の細胞内部分に変異を加えた際に観察された分化シグナルの減弱は、Stat3 転写因子の活性化の違いによることが示唆された。

A. 研究目的

造血幹細胞は、その自己複製能と多分化能によって一生涯にわたり個体の血球産生を支えている。従って、これに治療用遺伝子を組込めば永続的な治療効果が期待できるため、遺伝子治療の理想的な標的細胞の一つと考えられる。しかし、従来の方法では遺伝子導入効率が低く、幹細胞遺伝子治療実用化の上で隘路となっている。この問題を解決する一法として、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あげられる。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重ねてきた。今年度は内因性エストロゲン等による増殖シグナル擾乱を回避するために、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。また、昨年度作製した増殖優位に

働く GCR 変異体の分子的背景を探るために、GCR の下流のシグナル伝達分子群について解析した。さらに、選択的増幅遺伝子の実用化に必須である霊長類造血幹細胞遺伝子導入システムを確立するため、カニクイザルの骨髓造血幹細胞に効率よく遺伝子を導入する条件を検討した。

B. 研究方法

(1) 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 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、エストロゲンには殆ど反応しない。そこで、GCR から G-CSF 結合部位を除いた Δ GCR とタモキシフェン受容体のホルモン結合ドメイン（TmR）との融合蛋白質（ Δ GCR/TmR）遺伝子を組込んだレトロウイルスベクターを作製した。さらに、増殖優位のシグナルを伝える Δ GCR の変異体（昨年度報告した Y703F 変異体； Δ FGCR）との融合蛋白質

(Δ FGCRTmR) 遺伝子や、対照として ER を含む融合蛋白質 (Δ GCRER および Δ FGCER) 遺伝子を組込んだレトロウイルスベクターも作製した。構築した 4 種のベクターは、それぞれ選択的増幅遺伝子 (Δ GCRTmR \cdot Δ FGCRTmR \cdot Δ GCRER \cdot Δ FGCER) とともに、レポーター分子として enhanced green fluorescent protein (EGFP) を共発現するパイシストロニック・タイプで、遺伝子導入細胞を蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで迅速かつ非侵襲的に同定できる。これらのベクターを用いてマウス骨髄前駆細胞に遺伝子を導入し、種々の刺激を与えて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。

(2) 顆粒球分化に関わるシグナル伝達分子群の解析

顆粒球分化の解析には、マウス骨髄系前駆細胞株である 32D を用いた。32D はインターロイキン-3 存在下で芽球様増殖を続け、G-CSF 刺激にて好中球に分化する細胞である。昨年度、 Δ GCRER 発現 32D と Δ FGCER 発現 32D をエストロゲンで刺激すると、前者は好中球へ分化し、後者は未熟な形態を保ったまま増殖することを見出した。そこで、Y703F 変異に伴う分化シグナル減弱のメカニズムを知るために、GCR 下流のシグナル伝達分子である Jak1 \cdot Jak2 \cdot Stat3 \cdot Stat5 (活性化される時にチロシンリン酸化を受ける) について、 Δ GCRER 発現 32D と Δ FGCER 発現 32D をエストロゲンで刺激した際の挙動を解析した。

(3) カニクイザル造血幹細胞への遺伝子導入と自家移植系の確立

最近、筑波霊長類センターの寺尾らによって確立されたカニクイザル自家骨髄移植系を発展させ、

カニクイザル骨髄より分取した CD34 陽性細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入するシステムを確立した。このシステムを用いて Δ FGCER 遺伝子を導入した骨髄細胞を用いてエストロゲン刺激下でコロニーを作らせた。また、 Δ FGCRTmR 遺伝子を導入した細胞を用いて同様の実験を行った。

In vivo での遺伝子導入細胞の消長を追跡する目的で、EGFP を発現するレトロウイルスベクターを作製し、カニクイザル CD34 陽性細胞へ遺伝子導入を行い、自家移植した (造血幹細胞遺伝子標識実験)。さらに、選択的増幅遺伝子を発現するベクターを用い、カニクイザル骨髄前駆細胞への遺伝子導入効率を上げられるかどうかを検討した (選択的増幅遺伝子の前臨床研究)。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) 合成リガンド特異的選択的増幅遺伝子

Δ GCRTmR 遺伝子または Δ FGCRTmR 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞はタモキシフェンに反応して複数のリニエージ (骨髄球系 \cdot 赤芽球系) のコロニーを形成したが、エストロゲンには全く反応せず、増殖因子無添加時にもコロニーはできなかった。即ち、TmR のリガンド特異性は極めて高く、生体に適用した際にも内因性物質による不必要な活性化が起こりにくいことが予想される。一方、 Δ GCRER 遺伝子または Δ FGCER 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞からは、エストロゲン \cdot タモキシフェン刺激によってほぼ同数のコロ

ニーができただけでなく、増殖因子無添加時にも相当数のコロニーが形成され、ER のリガンド特異性は相対的に低いことが確認された。

パイシストロニックベクターの有効性としては、タモキシフェン特異的選択的増幅遺伝子の作用により形成されたコロニーは、ほぼ 100%が EGFP レポーター分子を発現しており、この形のベクターによって、治療用遺伝子を発現する血液細胞をタモキシフェン特異的に増幅できることが示唆された。

(2) 顆粒球分化に関わるシグナル伝達分子群の解析

32D 細胞を G-CSF で刺激すると、内因性 GCR およびその下流のシグナル伝達分子である Jak1・Jak2・Stat3・Stat5 は速やかに (10 分以内) チロシンリン酸化された。32D 細胞に Δ GCRER または Δ FGCRER を発現させてエストロゲンで刺激した場合は、Jak1・Jak2・Stat5 はやや遅れてチロシンリン酸化されたが (60-90 分で最高)、どちらの選択的増幅遺伝子を導入した 32D でも、それらシグナル伝達分子のリン酸化レベルに明らかな差はなかった。一方、Stat3 の活性化には明らかな差があった。即ち、 Δ FGCRER をエストロゲンで刺激したときの Stat3 のチロシンリン酸化レベルは、 Δ GCRER を刺激したときに比べて顕著に低下しており、このとき Stat3 と共沈するチロシンリン酸化蛋白質 (分子種については未同定) も著明に減少していた。Y703F 変異による顆粒球分化シグナルの減弱と、Stat3 リン酸化レベルの低下との関連が示唆された。

(3) カニクイザル造血幹細胞への遺伝子導入と自家移植系の確立

コロニー形成実験の結果、GCR 型選択的増幅

遺伝子を導入した骨髓細胞は、エストロゲンあるいはタモキシフェン刺激下では無刺激のものに比べると多くのコロニーを形成し、マウス由来の増幅遺伝子がカニクイザルの細胞においても機能したことを示した。また、カニクイザル造血幹細胞の自家移植実験においては、移植後に無菌室管理・中心静脈栄養・輸血・抗生剤投与を必要としたが、死亡例なくおおむね安全に行なうことができた。

遺伝子標識したカニクイザル血液細胞の追跡実験については、これまでに移植後最長で 9 ヶ月間追跡した。経時的骨髓サンプリングにより算定した前駆細胞のプロウイルス陽性率は 2-20%であった。ただし EGFP 遺伝子を導入した場合、齧歯類の場合と異なり、EGFP 陽性細胞は末梢血中にはほとんど出現しないことが判明した。

選択的増幅遺伝子の前臨床研究では、カニクイザル骨髓前駆細胞に選択的増幅遺伝子を導入して移植したところ、遺伝子導入細胞の頻度を 40%前後にまで上昇させ得た。

D. 考察

タモキシフェン結合ドメインを取り入れることにより、内因性のエストロゲン等には反応しない特異性の高いキメラ受容体を構築することができた。これを用いれば、より安全性の高い選択的増幅遺伝子の開発が可能だと考えられる。また、改良型選択的増幅遺伝子と治療用遺伝子を共発現するパイシストロニック・ベクターは、実質的な治療効果を高めるために有用であると考えられた。

選択的増幅遺伝子の GCR 部分の Y703F 変異による分化シグナルの抑制には、Stat3 のリン酸化レベルの低下が関与していることが示唆された。血

液細胞に増殖優位のシグナルを伝えるための新たな分子標的候補としても興味深い。

カニクイザル造血幹細胞移植実験系は、造血幹細胞生物学、移植免疫学等の研究において、ヒトの場合をよりよく反映するモデル系として有用と思われる。また、この系を用いて得られた遺伝子導入効率は、米国のそれとほぼ同じ水準に達した。しかも、本研究において開発中の選択的増幅遺伝子が実際に霊長類の体内で機能すると示唆されたことは、今後の臨床応用に向けて大いに期待を抱かせる。ただし、今回サルに用いた「選択的増幅遺伝子」はERを分子スイッチとして用いたため、血清中のエストロゲン類似物質にも反応した可能性がある。来年度は、より特異性の高いTmRを含む「選択的増幅遺伝子」発現ベクターを用いて、カニクイザル造血幹細胞遺伝子導入実験を継続する予定である。

E. 結論

リガンド特異性や分化シグナル抑制などの改良により、造血幹細胞の分化なき人為的増幅という目的に即した、安全性の高い選択的増幅遺伝子が開発されつつある。一方、サルの造血幹細胞への遺伝子導入プロトコルの改善も進んでおり、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. 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* 6(6):1038-1044, 1999

2. Kume A, Ito K, Ueda Y, Hasegawa M, Urabe M, Mano H, Ozawa K: A G-CSF receptor-gyrase B fusion gene: a new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260(1):9-12, 1999

3. Xu R, Kume A, Matsuda KM, Ueda Y, Kodaira h, Ogasawara Y, Urabe M, Kato I, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. *J Gene Med* 1(4):236-244, 1999

4. Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Urabe, M., and Ozawa, K.: Hematopoietic stem cell gene therapy: a current overview. *Int. J. Hematol.* 69:227-233, 1999.

5. 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

(2) 学会発表

1. 久米晃啓、Xu Ruifang、松田幹人、ト部匡司、小澤敬也：Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子マーカーをもつサイストロニック・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61回日本血液学会総会、1999年4月20日、東京(*Int J Hematol* 69, Suppl

- 1, p55, 1999)
2. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. 第61回日本血液学会総会, 1999年4月20日, 東京 (Int J Hematol 69, Suppl 1, p258, 1999)
3. Kume A, Kodaira H, Kametaka M, Kakizuka A, Mizukami H, Hanazono Y, Urabe M, Ozawa K: Development of an inducible suicide system with fusion proteins between Fas and steroid-binding domains. The 2nd Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 1999.6.10, Washington D.C., USA (Abstract p69a)
4. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. The 2nd Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 1999.6.10, Washington D.C., USA (Abstract p70a)
5. Xu R, Kume A, Matsuda K, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K: An improved selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy: tamoxifen-inducible expansion of genetically modified cells. 第5回日本遺伝子治療学会総会, 1999年6月18日, 東京 (抄録 p38)
6. 久米晃啓, Ruifang Xu, 花園豊, 水上浩明, ト部匡司, 小澤敬也: GFP 標識パイシストロニックレトロウイルスベクターを用いた in vivo 追跡. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999年11月11日, 仙台 (抄録 p138)
7. 小澤敬也, 統瑞芳, 水上浩明, 花園豊, ト部匡司, 久米晃啓: 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. 平成11年度特定領域研究 (A) 公開班会議「造血システムにおける自己複製と分化機構の解析」, 1999年11月19日, 大阪 (抄録 p31)
8. 花園豊, 久米晃啓, 長谷川護, 寺尾恵治, 小澤敬也: GFP を用いたカニクイザル造血幹細胞遺伝子標識研究. 平成11年度特定領域研究 (A) 公開班会議「造血システムにおける自己複製と分化機構の解析」, 1999年11月19日, 大阪 (抄録 p34)
9. Xu R, Kume A, Hanazono Y, Matsuda KM, Ueda Y, Urabe m, Mano H, Hasegawa M, Ozawa K: Development of selective amplifier genes for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic stem cells. (Blood 94:356a, 1999)
10. Hanazono Y, Ageyama N, Shibata H, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Kato I, Kume A, Ozawa K: In vivo discrepancy of carrying the GFP gene between progenitors and circulating cells after cynomolgus monkey stem cell transduction and transplantation. (Blood 94:357a, 1999)
11. Kume A, Xu R, Matsuda KM, Hanazono Y, Mizukami H, Ueda Y, Hasegawa M, Urabe M, Ozawa K: Selective amplifier genes conferring tamoxifen-inducible expansion of transduced hematopoietic progenitors. Keystone Symposia. Gene therapy: the next millennium, 2000.1.8,

Keystone, CO, USA (Abstract p75)

12. 長島建之、上田泰次、花園豊、統瑞芳、久米晃啓、小松則夫、小澤敬也、長谷川護：新規選択的増幅遺伝子の開発：mpl シグナル伝達ドメインの利用。第 62 回日本血液学会総会、2000 年 3 月 17 日、福岡 (Int J Hematol 71, Suppl 1, p175, 2000)

13. 花園豊、揚山直英、柴田宏昭、長島建之、上田泰次、久米晃啓、加藤郁之進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也：カニクイザルを用いた造血幹細胞遺伝子治療モデル実験系の樹立。第 62 回日本血液学会総会、2000 年 3 月 17 日、福岡 (Int J Hematol 71, Suppl 1, p175, 2000)

14. 久米晃啓、統瑞芳、水上浩明、花園豊、卜部匡司、間野博行、小澤敬也：改良型選択的増幅遺伝子導入による血球分化・増殖シグナルの解析。第 62 回日本血液学会総会、2000 年 3 月 18 日、福岡 (Int J Hematol 71, Suppl 1, p58, 2000)