

幅されて高い遺伝子導入と同じ効果をもたらしたと言える。しかし、これは多くの血液疾患は治療遺伝子自体が増幅効果をもたらすとは限らないため、それらの遺伝子治療が可能であったとしても同等の治療効果は期待できない。我々がこれまで開発してきた、選択的増幅遺伝子は、まさに導入された細胞を選択的に増幅させるもので、この増幅遺伝子を治療遺伝子と同時に幹細胞に導入すれば、結果的に遺伝子導入効率を上げることになり、多くの血液疾患で臨床効果が大いに高まるものと期待できる。

選択的増幅装置としては幹細胞への増殖シグナルの発信源とそれを制御する分子スイッチからなる構造をデザインした。その増幅シグナルにはサイトカイン受容体を用い、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) とその誘導体を主に用いてきた。また最近、巨核球刺激因子受容体 (mpl) を用いたものの検討も開始した。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) を用いて検討している。

今期は選択的増幅遺伝子の実用化に向けて以下の3点について検討を加えた。

1) mpl は非常に未熟な造血細胞に発現しており、より造血幹細胞増幅に適していると期待されるが、SAG のシグナル発信部位を GCR

から mpl に置換したときの効果を検討を行った。

2) 確立したカニクイザル骨髄細胞の自家移植系を用い、選択的増幅遺伝子の体内での増幅効果について検討した。

3) さらに治療効果を上げ、また適応疾患の範囲を広げるため、さらに高い遺伝子導入効率を求め、レンチウイルスベクターに搭載予定であるが、その準備として開発中のサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターの調製法の改善を行った。

## B. 研究方法

### 1. mpl の造血幹・前駆細胞の *in vitro* 増幅の検討

G-CSF 受容体誘導体をシグナル発信源、TmR を分子スイッチとした  $\Delta$ FGCRTmR、mpl の全長をシグナル発信源とした MplTmR、リガンド結合能を除去した  $\Delta$ GCRMplTmR を構築し、それぞれ MSCV ベクターにレポーターである緑色蛍光タンパク質 (GFP) を共発現するように挿入し、アンフォトロピックレトロウイルスベクターを調製した。これをカニクイザル CD34 陽性細胞に感染した後、それぞれ3群に分け、Flt-3 リガンド、巨核球刺激因子 (TPO)、ハイドロキシタモキシフェン (OH-Tm) を添加した培地で液体培養した。培養1週間および2週間後にそれぞれのSAG導入細胞の比率を調べた。

### 2. カニクイザルを用いた選択的増幅遺伝子の *in vivo* 増幅効果の検討

#### (1) CD34 陽性細胞の調製

骨髄採取の5日前から G-CSF と SCF を1日2回、毎日サルに投与しプライミングを行

った後、座骨または腸骨から骨髓血を採取し、ACK 溶血法によって赤血球を選択的に溶血して単核球を分離した。CD34 細胞は抗ヒト CD34 抗体結合磁気ビーズを使用して分離した。単核球から約 1%の CD34 陽性細胞( $1-5 \times 10^7$  個)が得られた。また、幹・前駆細胞の存在の指標となるコロニー形成細胞(CFU)の濃縮率を調べるため、CD34 陽性細胞の分離前後に血球コロニー形成法により前駆細胞の存在比を求めた。磁気ビーズにより CFU はおよそ 50 倍に濃縮された。

## (2)感染

レトロウイルス産生細胞は  $225\text{cm}^2$  のフラスコで、DMEM+10%FCS を用いて継代培養した。SAG ベクターの産生細胞は、それぞれのベクターを高生産するクローン、PG13/703GFPIII (MSCV- $\Delta$ FGCRER-ires-EGFP) #57、PG13/703III (MSCV- $\Delta$ FGCRER) #16-14、PG13/GTIII (MSCV- $\Delta$ FGCR TmR) #8-9 を用いた。また、非発現ベクターは産生細胞、PA317/ PLII または PA317/ PLI c124 を用い産生した。産生細胞が 80% コンフルエントの時に培地交換し、次の日に培養上清を  $0.45\ \mu\text{l}$  のフィルターで濾過しベクター液を得た。一部のベクター上清を用いて力価測定を行い、約  $5-10 \times 10^5/\text{ml}$  の粒子力価があることを確認し、残りのベクターは使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。細胞への感染はレトロネクチンコートしたプレート上で行った。即ち  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のレトロネクチン (TaKaRa) を 6-well plate にウェル当たり  $1\ \text{ml}$  ずつ入れ、室温で 2 時間コーティングを行った。その後上清を回収し、2%BSA/PBS

で 30 分ブロッキングを行った。上清を捨て、PBS で 2 回洗浄後、CD34 陽性細胞を  $1-3 \times 10^5\ \text{cells}/\text{ml}$  の濃度で一晩培養した。この時培地にヒト IL6、SCF、Flt-3、TPO を加え、細胞に分裂刺激を与えた。骨髓採取した次の日から感染を開始し、1 日 2 回、ベクター液を交換し、3 日間で計 6 回の感染を行った。感染終了後、細胞を回収する際、トリプシン/EDTA にて培養皿に付着した細胞もすべて集めるようにした。感染前後で細胞数をカウントしたところ、約 2 倍程度の細胞増幅が認められた。また、CFU アッセイを行った結果、これも前後で約 2 倍の CFU の増幅があった。

## (3) 移植

感染細胞は、10 ml PBS (10u/ml heparin、約 20%自己血清含有)に懸濁し、感染細胞を移植する 2 日前に、に X 線  $550\text{cGy}$  で 2 日間に分けて照射し、体内の骨髓を廃絶したカニクイザルに輸注した。その後は ICU 管理、輸血、抗生剤投与等により遺伝子導入したサル管理を行った。

なお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」を遵守した。

## (4)導入効率解析

遺伝子の導入効率は以下の方法を用い算出した。

a. ペレット PCR : 感染終了後の細胞の一部をペレットにし、これから DNA を抽出した。そしてコントロール DNA とともにリアルタ

イム PCR 装置を用い、感染効率を算出した。コントロール DNA としてはレトロウイルス産生細胞株から抽出した DNA を健常サル血液細胞の DNA で希釈した系列を作製した。

b. コロニー PCR：感染終了後の CFU アッセイで、2 週間後のコロニーをカウントした後、コロニーを回収した。各コロニーから DNA を抽出し、PCR を行い、感染効率を算出した。コントロールとして、 $\beta$ -アクチンの PCR を行い、感染率を補正した。c. バルク PCR：細胞移植後、定期的に採血し（末梢血 5ml および骨髄血 2ml）、DNA を抽出してベレット PCR と同様の PCR を行い、感染効率を算出した。末梢血は回復時と考えられる 2 週間後に採血し、その後は 1 ヶ月ごとに採血した。また、骨髄血については、1 ヶ月ごとに採取し、CFU アッセイを行い、コロニー PCR にて感染効率を算出した。

### 3. SIV ベクターの調製法の改善

パッケージングに必要な SIVagm 株の gag、pol、vif、vpr、tat、rev を発現させるパッケージングベクター、と LTR とパッケージングシグナルを含む配列に目的遺伝子を搭載したジーントランスファーベクター、それに外被タンパク質となるヒト水疱性口内炎ウイルス G タンパク質を発現させる

VSV-G ベクターの 3 種類を一枚あたり  $2.5 \times 10^6$  の 293T 細胞を培養した 15cm シャーレ 25 枚にトランスフェクションし、翌日培地交換をした。トランスフェクション 48 時間後と 72 時間後の 2 回にわたってベクターを含む培地を回収した。回収した培地は  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターにて濾過後、高速遠心機

を用いた 42500G の遠心によって、含まれるウィルスベクターを沈降させる。これを少量のバッファーにて回収することによってベクターの濃縮を行った。ベクターの力価は一定数の 293T 細胞に感染させ、レポーター遺伝子の発現によってその機能的なベクター粒子力価を測定した。

### C. 研究結果

1. mpl による造血幹・前駆細胞の増幅効率  
GCR を用いた選択的増幅遺伝子を導入した細胞では、培養 1 週間後において、OH-Tm で刺激した場合、遺伝子導入直後に比べて顕著に遺伝子導入細胞の比率が上昇した。しかしながら、培養 2 週間後にはその比率が低下した。一方、Mpl (全長)を用いた選択的増幅遺伝子を導入した細胞では、巨核球刺激因子 (TPO) で刺激した場合、培養 1 週間後において遺伝子導入細胞の顕著な増幅を示した。OH-Tm で刺激した場合でも TPO で刺激した場合に比べるとやや劣るものの、増幅効果が認められ、その効果は 2 週間に渡って維持された。また、リガンド結合部位を欠失したタイプ ( $\Delta$ GCRMplTmR) を導入した場合には、OH-Tm の刺激でそれほど大きな増幅効果は得られなかったが、GCR 型のように培養 1 4 日目で遺伝子導入細胞の比率が低下することはなかった。

### 2. 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

カニクイザルを用いて造血幹細胞遺伝子治療の評価系を確立するためには、まずサルの造血幹細胞を特定し単離する方法を確立する必要があった。また現在臨床応用されてい

るレトロウイルスベクターによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入効率は1%以下と非常に低い。その問題点を克服するため、1. Flt-3 リガンドや TPO といった非常に未分化な造血細胞に作用する新しいサイトカインを *ex vivo* 培養系に導入する、2. フィブロネクチン C 末端(CH-296、レトロネクチン)を用いることにより、ベクターと標的細胞の接触頻度を高める、3. 一般に使われているアンフォトロピックエンベロープをテナガザル白血病ウイルス(GALV)エンベロープに置換する、などの方法により、カニクイザル CD34 陽性細胞に含まれる大部分のコロニー形成細胞に高率に遺伝子導入することが可能になった。

このようにして *ex vivo* で遺伝子導入された細胞を致死量の X 線照射で骨髄を廃絶したサルへ移植した。こ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、おおむね安全に行うことができた。

GFP 遺伝子標識したカニクイザル（実験ザル 1、2）の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18ヶ月間追跡した。経時的骨髄採取により算出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ほとんど出現しないことが判明した。

### 3. 選択的増幅遺伝子(SAG)の前臨床試験

これまで開発してきた GCR 型 SAG のなかで、*in vitro* の効果の高かった  $\Delta$ FGCRER を実験ザル3の CD34 陽性細胞に感染導入し

て移植した。その結果、前駆細胞の導入効率は移植直後で40%であった。これが6ヶ月後には5%に低下したが、エストロゲン投与によって30%前後にまで遺伝子導入細胞を上昇させ得た。それから1ヶ月間この値を維持したが、エストロゲンの血中濃度が低下した後は再び導入効率は低下した。

実験ザル3で選択的増幅遺伝子を導入することにより、導入効率を30~40%に引き上げられる可能性が示唆されたが、この選択的増幅遺伝子の効果を裏付けるため、実験ザル4を用いて2重標識試験を行った。即ち CD34 陽性細胞を2群に分け、一方を SAG( $\Delta$ FGCRER)、もう一方を非発現遺伝子(PLII)で遺伝子導入し、すべての感染実験が終了した後にそれらの細胞をあわせて移植した。移植直後において非発現遺伝子の存在は前駆細胞および末梢血細胞で確認されたが、SAG のプロウイルスはどちらも検出限界以下であった。しかしながらこのサルにタモキシフェンを一ヶ月間投与した結果、非発現遺伝子は検出限界以下のレベルまで導入効率が低下したが、SAG は前駆細胞および末梢血細胞で導入効率の上昇が認められた。さらに実験ザル5では、SAG を  $\Delta$ FGCRTmR に変えて同様の実験を行ったところ、タモキシフェン投与により末梢血細胞において遺伝子導入効率が検出限界以下から約1%に上昇した。

### 4. SIV ベクターの調整法の改善

濃縮前後の力価測定によって、濃縮倍率とほぼ同じ程度にベクターが濃縮されていることがわかった。実際には GFP あるいは lacZ などのマーカー遺伝子を含む SIV ベクター

の場合、濃縮前に  $10^6$  の力価を示し濃縮後は  $10^9$  まで力価を上げることができた。また、トランスフェクション 48 時間後と 72 時間後のベクター回収ではほぼ同程度の量のベクター回収に成功した。

現在、 $\Delta$ FGCRTmR を SIV ジーントランスファーベクターに搭載中である。

#### D. 考察

本研究で、遺伝子導入細胞がエストロゲン刺激により 30% 前後まで増幅したこと、また 2 重標識試験で選択的増幅遺伝子を導入した細胞のみを刺激依存的に増幅させ得た結果は GCR 型選択的増幅遺伝子による体内における造血幹細胞・前駆細胞の増幅に成功したことを示している。しかし同時に、まだ実用にはいくつかの課題があることも提示された。即ち、末梢血での遺伝子導入細胞の検出率が低いこと、初期遺伝子導入効率が低い場合、外部刺激によっても増幅し得ないこと、エストロゲン受容体を用いた場合、内因性因子に反応することなどである。GFP をレポーターに用いた場合、末梢血への遺伝子導入細胞の動員が低いことが報告されており、GFP の毒性や抗原性に起因するものと考えられている。本研究でも GFP を搭載しないベクターでの遺伝子導入実験を行い末梢血への遺伝子導入細胞の動員を上昇させる予定である。初期導入効率の課題は、造血幹細胞への遺伝子導入効率の高いとされるレンチウィルスベクターに搭載することで克服できると考えており、現在選択的増幅遺伝子を搭載した SIV ベクターの調製準備をしている。また本研究

で示したように幹・前駆細胞増幅により有効な mpl をシグナル発信源に用いることで、増幅率を高めることも可能だと期待している。さらに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している。これを用いれば、より安全性と効果の高い選択的増幅遺伝子の開発が可能だと考えられる

#### E. 結論

サルでの体内での造血幹細胞増幅が複数個体で確認できたことはこれまで開発してきた選択的増幅遺伝子の概念が有効であり、また現在計画中の改良によってさらに増幅効率が上昇すれば、充分臨床応用可能なシステムとなりうるものと期待できる結果が得られた。今後は適応疾患の選択と、治療遺伝子を同時搭載したベクターの構築を行い、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. Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M, Hasegawa M. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. Hum Gene Ther. 2000 Sep 1;11(13):1863-74.

##### (2) 学会発表

1. Hanazono Y, Wu T, Agricola B, Nagashima T, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Hasegawa M, Kato I, Kume

- A, Donahue R, Ozawa K, Dunbar C, Terao K: In vivo discrepancy of carrying the GFP gene between progenitors and circulation cells after macaque monkey hematopoietic stem cell transduction and autologous transplantation. アメリカ遺伝子治療学会 デンバー 2000.6.1
2. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Xu R, Kume A, Komatsu N, Ozawa K, Hasegawa M: Employment of the thrombopoietin receptor mediated growth signals for selective expansion of transduced hematopoietic cells. アメリカ遺伝子治療学会 デンバー 2000.6.1
3. Ueda Y, Hasegawa M. 他 Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentivirus vector based on SIVagm. 第3回米国遺伝子治療学会 (Denver) 2000. 6. 1
4. Nakajima T, Hasegawa M. 他 An advanced self-inactivating lentiviral vector based on SIVagm carrying a novel dual gene expression system. 第3回米国遺伝子治療学会 (Denver) 2000. 6. 3
5. Kobayashi M, Hasegawa M. 他 An advanced self-inactivating lentiviral vector designed from SIVagm equipped with a novel dual gene expression system. 第6回日本遺伝子治療学会(東京)2000. 7. 28
6. Ueda Y, Hasegawa M. 他 Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentivirus vector based on SIVagm. 第6回日本遺伝子治療学会 (東京) 2000. 7. 28
7. Hanazono Y, Wu T, Shibata H, Nagashima T, Ageyama N, Kume A, Agricola B, Kato I, Hasegawa M, Donahue RE, Terao K, Dunbar CE, and Ozawa K: In Vivo Genetic Marking Study of Rhesus and Cynomolgus Monkey Hematopoietic Stem Cells with GFP-Expressing Retroviral Vectors. 日本遺伝子治療学会 (東京) 2000.7.28
8. Hanazono Y, Nagashima T, Shibata H, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by the selective amplifier gene in a nonhuman primate model. アメリカ血液学会 サンフランシスコ 12/4 2000
9. 花園豊、長島建之、柴田宏昭、揚山直英、浅野隆之、上田泰次、久米晃啓、寺尾恵治、長谷川護、小澤敬也：霊長類モデルを用いた遺伝子導入造血細胞の体内選択的増幅法の開発 日本造血幹細胞移植学会 (京都) 2000.12.9
10. 揚山直英、花園豊、小野文子、柴田宏昭、長島建之、浅野隆之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、寺尾恵治：カニクイザル造血幹細胞の自家移植法の確立、日本造血幹細胞移植学会総会、2000.12.9
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 出願日 1996.03.05

特許の名称 選択的増殖性を付与する遺伝子  
特定の細胞を外部刺激により選択的に増殖さ  
せる技術を提供する。

出願番号 特願平 9-531668

公開番号 WO97/32971

発明者 小澤 敬也 坂田 恒昭 伊藤 克  
久 上田 泰次 長島 建之 長谷川 護

審査請求中

2. 出願日 1999.6.22

特許の名称 2 遺伝子を発現するベクター  
(SIV)

出願番号 特願平 11-175646

特願平 11-175646

公開番号 WO00/78987

発明者 中島 俊洋、中丸 健治、長谷川 護、  
速水 正憲、井戸 栄治

審査請求中

3. 出願日 2000.6.1

特許の名称 ヘマグルチニン活性を有するシ  
ュードタイプレトロウィルスベクター

出願番号 特願 2000-169090

出願済み

発明者 長谷川 護、米満 吉和、中島 俊  
洋、榊原 裕幸、中丸 健治、飯田 章博、  
小林 雅典、上田 泰次、

未公開

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名              | 巻号  | ページ         | 出版年  |
|--|--|-------------------|-----|-------------|------|
| Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., Momoi, M., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N. | A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. | Blood             | 96  | 941-949     | 2000 |
| Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K., and Mano, H   | Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1.   | J. Biol. Chem.    | 275 | 24945-24952 | 2000 |
| Kume, A., Xu, R., Ueda, Y., Urabe, M., and Ozawa, K.   | Long-term tracking of murine hematopoietic cells transduced with a bicistronic retrovirus containing CD24 and EGFP genes.  | Gene Ther.        | 7   | 1193-1199   | 2000 |
| Mineishi, S., Saito, T., Kanda, Y., Tanosaki, R., Tobinai, K., Takaue, Y   | Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration.   | Jpn J Clin Oncol. | 31  | 43-45       | 2001 |
| Watanabe, T., Mineishi, S., Kawano, Y., Takaue, Y.   | Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells.   | Leuk. Lymphoma    | 37  | 487-496     | 2000 |
| Futaki, M., Yamashita, T., Yagasaki, H., Toda, T., Yabe, M., Kato, S., Asano, S., and Nakahata, T.   | The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients.  | Blood             | 95  | 1493-1498   | 2000 |
| Murayama, Y. Terao, K., and Inoue-Murayama, M  | Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas.   | Hum. Immunol.     | 61  | 474-485     | 2000 |
| Nakajima, T., Nakamaru, K., Ido, E., Terao, K., Hayami, M., and Hasegawa, M.   | Development of novel non pathogenic simian immunodeficiency virus vector carrying dual gene expression system.   | Hum. Gene Ther.   | 11  | 1863-1874   | 2000 |



20000428

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