

20010488

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための
増殖分化制御システムの開発と応用

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成14 (2001) 年4月

目 次

I. 総括研究報告書

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための増殖分化制御システムの開発と応用	1
-------------------------------------	---

小澤 敬也

(資料) 研究成果のプレプリント (投稿中論文 3報)

II. 分担研究報告書

1. 造血幹細胞の採取・純化に関する研究	88
----------------------	----

峯石 真

2. 造血障害の病態解析	90
--------------	----

山下 孝之

3. サルを用いた造血幹細胞移植モデルの作成	92
------------------------	----

寺尾 恵治

4. 細胞増殖分化制御遺伝子の開発	100
-------------------	-----

長谷川 護

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	106
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	107
-----------------	-----

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）
総括研究報告書

造血幹細胞の体内増幅／体外増幅のための増殖分化制御システムの開発と応用

主任 研究者 小澤 敬也 自治医科大学 医学部 教授

研究要旨 造血幹細胞移植をベースとした細胞治療法の可能性を拡げるため、造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。まず、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、増殖制御遺伝子（選択的増幅遺伝子）を利用し、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅を誘導する方法を検討した。これは、造血因子受容体の増殖シグナルを利用するもので、その活性をコントロールする分子スイッチとしては、まずエストロゲン受容体やタモキシフェン受容体を用いた（第一世代）。霊長類のサルを用いて、この第一世代の選択的増幅遺伝子の有効性について検討したところ、まだ実用段階には至っていないと判断した。そこで、より強力な選択的増幅遺伝子を開発するため、エリスロポエチン受容体の細胞外領域／膜貫通領域を分子スイッチとする方法を新たに開発した（第二世代）。その有効性についてin vitroで検討したところ、有望な結果が得られた。また一方、造血幹細胞の体外増幅（自己複製／再生）に関しては、増幅培養期間中、分化抑制遺伝子により分化を一時的に停止させるテクノロジーの開発が鍵になると考えられる。この場合、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化抑制遺伝子を取り外す必要があり、Cre/loxPシステムを応用した細胞制御遺伝子着脱システム（ゲノムへの組み込みと取り外し）の確立が重要となる。本年度は、造血幹細胞でCreリコンビナーゼを一過性に発現させるための方法の開発に力を入れた。特に、アデノウイルスベクターを造血幹細胞に効率よく感染させるためのアダプター分子の開発を行った。この技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。本研究は、機能不全に陥った造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。

分担研究者

峯石 真
国立がんセンター 中央病院
医 長

山下 孝之
東京大学医科学研究所
助教授

寺尾 恵治
国立感染症研究所筑波霊長類センター
センター長

長谷川 護
ディナバック研究所
所 長

A. 研究目的

細胞治療は今後大きな発展が期待される重要な医療技術の一つとして位置付けられる。その中で、造血幹細胞移植は最も先行している細胞治療であるが、そこにさらに細胞制御技術を絡ませることにより、臨床応用の可能性を一段と拡げることが可能となる。例えば、患者自身の造血幹細胞を機能修復して自家移植する細胞治療法では、増殖制御遺伝子を利用することにより、移植した造血幹細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果のより一層の増強を図ることができる。この場合、体内での増幅効率を制御するための信頼性の高い分子スイッチ機構を付けておく必要がある。今年度は、プロトタイプとして開発した選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) (第一世代) の有用性を霊長類のサルの系で検討すると共に、より強力な第二世代の選択的増幅遺伝子の開発に着手した。また一方、重要課題として従来より活発な研究が行われてきている造血幹細胞の体外増幅 (自己複製/再生) に関しては、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させるテクノロジーの開発が鍵になると考えられる。そのため新しいタイプの細胞制御技術として分化制御遺伝子の開発に取り組んでいる。この場合、体外増幅培養の期間中に限定してこの制御遺伝子を働かせる工夫が必要であり、理想的には、増幅した造血幹細胞を移植する際に、不要となった分化制御遺伝子を取り外すことができるようにするのが望ましい。そこで、細胞制御遺伝子着脱システム (ゲノムへの組み込みと取り外し) の開発を進めてきているが、そのために必要となる新しい技術の開発に力を入れた。このような先端技術が実現すれば、細胞治療に必要とされる造血幹細胞を少量で済ませることが可能になる。将来的には、量的制限のある臍帯血幹細胞移植の成人患者への適応拡大、さらには自己

造血幹細胞の保存 (バンキング) システムへの応用に繋がっていく魅力的な技術である。

また、臨床展開への準備として、CD34細胞を臨床レベルで大量に採取・純化する方法の開発を進めた。造血障害をきたす疾患としては、Fanconi貧血 (FA) の病態に焦点を当て、分子レベルでの解析を行った。

以上、造血幹細胞移植の周辺技術として種々のタイプの増殖分化制御遺伝子の開拓を推進し、数年以内にその臨床応用を図るのが本研究の目的であり、造血幹細胞を再生させる技術開発の基礎となるものである。

B. 研究方法

1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発。

1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発: エストロゲンあるいはタモキシフェン反応性SAG [G-CSF受容体 (GcR) のリガンド結合領域を除いた部分とエストロゲン受容体あるいはタモキシフェン受容体のホルモン結合領域の融合蛋白質 (GcR-ERあるいはGcR-TmR) をコードする遺伝子] を導入した造血幹細胞の移植実験を、カニクイザルを用いて実施した。具体的には、骨髓細胞を採取し、CD34陽性細胞を分離し、SAG及びGFP遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターで遺伝子導入を行い、放射線照射後に自家移植を行った。エストロゲンあるいはタモキシフェン投与によりSAGを組み込んだ移植細胞が体内で増幅するかどうか、長期的観察を行った。また、より厳密な解析を行うため、移植細胞の半分を非発現ベクターで遺伝子導入し、混合して移植し、SAGを導入したポピュレーションだけが刺激に反応するかどうか検討した。尚、この研究と平行して、カニクイザルの系での自己末梢血幹細胞移植技術の開発を行った。

また、より強力な増幅効果をもつ第二世代

SAGを新たに開発するため、エリスロポエチン受容体 (EpoR) の細胞外領域/膜貫通領域を分子スイッチに利用したEpo反応型SAG (EpoR-GcR, EpoR-Mpl遺伝子) を構築した。この第二世代SAGの機能を調べるために、IL-3依存性Ba/F3細胞に導入してEpo刺激による増殖刺激作用を調べた。次に、ヒト臍帯血CD34陽性細胞を用いて、Epo刺激による増幅効果と分化特性を、液体培養、コロニーアッセイ及びフローサイトメトリーにより検討した。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験：

フランスにおけるX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 遺伝子治療臨床研究の成功の要因を検討するため、コモンガンマ鎖ノックアウトマウス (X-SCIDマウス) をベースにして樹立したLy5.1/Ly5.2コンジェニックマウスを用いて骨髄移植実験を行った。野生型Ly5.2マウスの骨髄細胞を $10^5 \cdot 10^6 \cdot 10^7$ 個ずつ前処置なしの野生型Ly5.1マウスならびにX-SCID/Ly5.1マウスに移植し、白血球キメリズムの推移を観察した。

さらに、正常コモンガンマ鎖遺伝子導入によるX-SCIDマウスの造血幹細胞遺伝子治療実験を行った。血球系において長期間高発現が期待できるシスエレメントを組み合わせたレトロウイルスベクター骨格 (MGK) を構築し、これに正常コモンガンマ鎖遺伝子とGFP遺伝子を組み込んだ。致死量放射線照射X-SCIDレシピエントに遺伝子導入骨髄細胞を移植し、造血系再構築過程を解析した。

3) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

分化抑制遺伝子として、ドミナントネガティブ・レチノイン酸受容体 α (RARE) 遺伝子を用いる。この分化制御遺伝子のゲノムからの取り外しにはCre/loxPシステムを応用する。即ち、体外培養で造血幹細胞を増やす間は分化抑

制遺伝子を働かせ、その後でCreリコンビナーゼを発現させて分化抑制遺伝子を取り外す方法を開発する。前年度はレトロウイルスベクターを用いたが、Creの発現は一過性であることが望ましいため、新たにアデノウイルスベクターの利用を検討した。特に、造血系細胞への遺伝子導入効率を高めるため、アデノウイルスベクターと造血幹細胞を架橋するアダプター分子の開発を行った。

2. 臨床応用に向けた準備。

ヒト造血幹細胞の採取法に関して、大量末梢血幹細胞採取及びそこから免疫磁気ビーズ法によるCD34陽性細胞純化技術の検討を行った。さらに、移植後の臨床経過を追跡した。

FAに関する病態解析では、患者で報告されているFANCA遺伝子の変異体を作製し、FANCA (-) 細胞に発現させ、MMC感受性とFA分子経路の解析を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に従って行った。筑波霊長類センターでのサルの実験は、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」を遵守して行った。また、臨床研究における末梢血幹細胞採取およびCD34陽性細胞純化は、当該施設の倫理委員会またはそれに準ずる組織によって認可されたプロトコールに拠った。

C. 研究結果

1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発。

1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発：エストロゲンまたはタモキシフェンに反応するタイプのSAGシステムの有効性に関して、カニクイザルの系で前臨床研究を行った。SAGを導入した6頭のうち3頭でエ

ストロゲンまたはタモキシフェンの投与に反応して遺伝子導入細胞の増加が認められた。遺伝子導入細胞の増幅効果が認められなかった個体の中には、刺激因子の血中濃度の上昇が不十分のものもみられた。いずれにせよ、現状ではエストロゲンあるいはタモキシフェン反応型SAGでは効果が不十分であり、実用化にはさらなる改良が必要と考えられた。尚、移植を受けたサルは最長で2年以上が経過するが、その間、SAGによる白血病または骨髄増殖性疾患等の発生やその他の重大な副作用は認められていない。

新たに開発した第二世代のEpo反応型SAG (EpoR-GcR, EpoR-Mpl遺伝子)の機能を調べるために、Ba/F3細胞に導入して調べたところ、Epo依存性増殖能の獲得が認められた。そして、狙い通り、第一世代のタモキシフェン反応型SAGと比較して増殖刺激活性がより強力であることが示された。次に、ヒト臍帯血CD34陽性細胞を用いた検討では、EpoR-Mpl遺伝子を導入した場合に、液体培養系において最も顕著な細胞増殖が認められた。さらに、増殖した細胞のc-Kit陽性率も、EpoR-Mpl遺伝子の場合が最も高い値を維持していた。コロニーアッセイにおいても、Epo刺激によるコロニー形成能はEpoR-Mpl導入細胞が最も高かった。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験:

骨髄移植実験で、野生型ドナー細胞 (Ly5.2) は野生型レシピエント (Ly5.1) には生着できず、 $10e7$ 個移植した場合でも1%以下の白血球キメリズムしか示さなかったが、同じ骨髄細胞がX-SCIDレシピエントにはよく生着した。すなわち、移植後5ヶ月における全白血球キメリズムは、 $10e5$ 個移植群で $11 \pm 10\%$ 、 $10e6$ 個移植群で $54 \pm 10\%$ 、 $10e7$ 個移植群で $75 \pm 7\%$ であった。これを白血球リニエージごとに詳しく解析したところ、ドナー由来細胞の中でも、

X-SCIDレシピエントによく生着するのはリンパ球に限られることが判明した。リンパ球の絶対数についても、移植前にはほとんど存在しなかったものが、 $10e5$ 個移植群で正常の $13 \pm 7\%$ 、 $10e6$ 個移植群で $35 \pm 11\%$ 、 $10e7$ 個移植群で $73 \pm 8\%$ (リンパ球サブセットごとにみると50-100%) にまで回復した。

X-SCIDマウスの造血幹細胞遺伝子治療実験で、致死量放射線照射X-SCIDレシピエントに遺伝子導入骨髄細胞を移植すると、造血系再構築に伴い良好なリンパ系再構築が得られた。次に、ヒトでの臨床研究と同様に、前処置を施さないX-SCIDレシピエントに遺伝子導入細胞を移植して経過を観察した。移植後1ヶ月の時点で、遺伝子導入リンパ球 (GFP陽性) がレシピエント体内で順調にふえつつあるが、顆粒球・単球リニエージにおいては遺伝子導入細胞がほとんど認められなかった。

3) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発:

造血幹細胞へのアデノウイルスベクターの感染効率を改善するアダプター分子として、アデノウイルス受容体 (CAR) の細胞外領域とSCF細胞外領域の融合蛋白質を作成した。これはアデノウイルスベクターと未分化造血系細胞を架橋する分子である。SCF受容体 (c-Kit) を比較的多く発現しているヒト白血病細胞株UT-7を用いてその有効性を検討したところ、アダプター分子の添加によってGFP発現アデノウイルスベクターの遺伝子導入効率が約20%から80%に上昇した。また、GFP陽性細胞のGFP発現レベルも有意に高くなった。

2. 臨床応用に向けた準備.

大量幹細胞採取と純化を安定して行うことができた。純化操作によって幹細胞の生着力は損なわれなかった。また、弱い前処置によってCD34陽性細胞を移植する方法を検討した。

20種類のFANCA変異蛋白質について、MMC感受性を補正できるかどうか検討した。その結果、3群に分けることができた。また、FANCCとの相互作用など、FA分子経路について興味深い知見が得られた。

D. 考察

1. 造血幹細胞増殖分化制御システムの開発。

1) 増殖制御遺伝子を利用した造血幹細胞体内増幅法の開発：

第一世代のエストロゲンあるいはタモキシフェン反応型SAGに関しては、有効性という点で、サルの系でまだ安定した増幅効果が得られていない。したがって、実用化にはさらなる改良が必要と考えられ、Epo反応型の第二世代SAGの開発に着手した。このシステムでは、分子スイッチ部分を細胞外に配置することにより、細胞内で発生する増殖シグナルがスムーズに核に伝達されると考えられること、またSAGに由来するキメラ分子全体の3次構造がリガンド結合により自然な形で変化すると想定され、より強力な増殖シグナルを誘発できるものと推定した。実際に、*in vitro*のデータでは、増幅効率が明らかに改善し、また、Mplの増殖シグナルはEpoRあるいはGcRよりも未分化造血系細胞の増幅により適しているものと考えられた。この新規Epo反応型SAGの体内での有効性に関しては、マウス及びサルの系での検討を開始したところである。

尚、遺伝子導入細胞の増幅効果は一過性であったことから、SAGは主に前駆細胞レベルで働いているものと考えられる。但し、増幅効果が一時的であっても、顆粒球・単球など食細胞の先天性機能異常症の一つ（活性酸素産生能の欠如）であるX連鎖慢性肉芽腫症（X-CGD）を対象とする場合は、感染症などの必要時にのみ正常化した顆粒球を増幅させるだけでも臨床

的には充分価値があると考えられる。

2) 疾患モデル動物を用いた細胞治療実験：

X-SCIDマウスへの正常骨髄細胞の移植実験では、正常なコモンガンマ鎖遺伝子を持つリンパ球がX-SCID個体において選択的な増殖優位性をもち、この疾患では少数の正常化した造血幹細胞でもリンパ系を再構築できることを示唆している。X-SCIDマウスを用いた造血幹細胞遺伝子治療実験でも、正常コモンガンマ鎖遺伝子を獲得したリンパ球のみ選択的な増殖優位性を発揮してリンパ系を再構成し、骨髄移植実験と同様の結果が得られた。

さて、X-SCIDの場合と異なり、X-CGDにおいては、治療用遺伝子（gp91遺伝子）そのものによる増殖優位性賦与は期待できない。実際、これまで行われたX-CGD遺伝子治療の第一相臨床研究では、前処置なしで遺伝子導入細胞の自家移植が行われたが、患者末梢血中には一過性にごく少数の活性酸素産生細胞が出現しただけで、長期の生着には至らなかった。そこでこのような疾患に対しては、治療用遺伝子と共に上述のSAGを同時に造血幹細胞に組み込んで、必要時に誘導剤を投与して遺伝子導入細胞の体内増幅を図ることが必要になるものと考えられる。そこで、GcR-ERキメラ分子とgp91を同時に発現するレトロウイルスベクターを構築し、X-CGDマウス（gp91遺伝子ノックアウトマウス）の骨髄細胞に遺伝子導入し、コンジェニックX-CGDレシピエントに移植してエストロゲン刺激する実験を開始した。

2) 分化制御遺伝子を利用した造血幹細胞体外増幅法の開発：

このプロジェクトでは、Creリコンビナーゼを一過性に働かせる方法を確立する必要がある。そこで、アデノウイルスベクターを利用することとし、造血幹細胞への遺伝子導入効率を高めるためのアダプター分子を開発した。細胞株を

用いた実験で良好な結果が得られたため、今後はヒト臍帯血造血幹細胞を用いた系への応用を計画している。

ヒト造血幹細胞の体外増幅培養の期間だけ分化抑制遺伝子を働かせ、移植時にはその遺伝子を取り外す方法が確立できれば、その意義は大きい。また、このシステムは造血幹細胞以外の細胞を増幅させる場合にも応用が可能であり、再生医療のための基本テクノロジーに発展していく可能性を秘めている。

2. 臨床応用に向けた準備:

抗CD34抗体-免疫磁気ビーズ法によって、従来よりも優れた純度、回収率でCD34陽性細胞を安定して純化することができた。

FANCA変異蛋白質はI~IIIの3群に分けられ、それぞれの特徴を示すことができた。尚、I群はpolymorphismの可能性がある。

E. 結論

造血幹細胞の体内増幅ならびに体外増幅を行うための細胞増殖分化制御システムの開発を推進した。前者では、従来開発を進めてきた第一世代の選択的増幅遺伝子 (GcR-ERあるいはGcR-TmR遺伝子) に関して、霊長類のサルの系を用いた検討を進めた。まだ実用レベルには到達していないと判断し、本年度は新たに第二世代の選択的増幅遺伝子 (Epo反応型SAG) の開発に着手した。in vitroでは有望な結果が得られている。一方、造血幹細胞の体外増幅 (自己複製/再生) の場合は、増幅培養期間中、分化を一時的に停止させる必要があり、分化抑制遺伝子のゲノム着脱システムの開発に力を入れた。これはCre/loxPシステムを応用したもので、本年度は、Creリコンビナーゼを一過性に働かせるための技術の開発を行った。

その他、臨床応用のための基盤技術として、造血幹細胞の大量採取・純化法を確立した。

FAの病態解析に関する今回の知見は、今後の診断法の開発に繋がっていくものと期待される。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuki, T., Nagashima, T., Komatsu, N., Kirito, K., Furukawa, Y., Kobayashi, S., Liu, J.M., and Ozawa, K.: Phosphorylation of Fanconi anemia protein, FANCA, is regulated by Akt kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 628-634, 2002.
- 2) Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 99: 102-110, 2002.
- 3) Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol-3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.* 277: 8329-8337, 2002.
- 4) Kishino, K., Muroi, K., Kawano, C., Obata, T., Sugano, N., Nakagi, Y., Nagashima, T., Watari, K., Iwamoto, S., and Ozawa, K.: Evaluation of engraftment by ABO genotypic analysis of erythroid burst-forming units after bone marrow transplantation. *Leuk. Res.* 26: 13-17, 2002.
- 5) Ohtsuki, T., Furukawa, Y., Ikeda, K., Endo, H., Yamashita, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Ozawa, K., and Liu, J.M.: Fanconi anemia

- protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2651-2660, 2001.
- 6) Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 39012-39020, 2001.
- 7) Muramatsu, M., Hanazono, Y., Ogasawara, Y., Okada, T., Mizukami, H., Kume, A., Mizoguchi, H., and Ozawa, K.: Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 891-896, 2001.
- 8) Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98: 422-427, 2001.
- 9) Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and Ozawa, K.: Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* 73: 469-475, 2001.
- 10) Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes. Regulation of cell cycling as a downstream molecule of thrombopoietin signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 15082-15089, 2001.
- 11) Hanazono, Y., Terao, K., and Ozawa, K.: Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* 19: 12-23, 2001.
- 12) Uchida, M., Kirito, K., Shimizu, R., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of mitogen-activated protein kinases, Erk1 and Erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: A possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int. J. Hematol.* 73: 78-83, 2001.
- 13) Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K., and Inaba, T.: Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 21: 854-864, 2001.
- 14) Suenaga, K., Kanda, Y., Niiya, H., Nakai, K., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Takeuchi, T., Tanosaki, R., Makimoto, A., Miyawaki, S., Ohnishi, T., Kanai, S., Tobinai, K., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp. Hematol.* 29: 639-642, 2001.
- 15) Saito, T., Nakamura, F., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Reduced intensity regimen for a second

mismatched transplant. *Haematologica* 86: 780-781, 2001.

16) Niiya, H., Kanda, Y., Saito, T., Ohnishi, T., Kanai, S., Kaano, Y., Kamijo, K., Iizuka, A., Yakushijin, K., Ueda, K., Chizuka, A., Iijima, K., Ohnishi, M., Nakai, K., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., Takaue, Y., and Mineishi, S.: Early full donor myeloid chimerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. *Haematologica* 86: 1071-1074, 2001.

17) Yagasaki, H., Adachi, D., Oda, T., Garcia-Higuera, I., Tetteh, N., D'Andrea, A.D., Futaki, M., Asano, S., and Yamashita, T.: A cytoplasmic serine protein kinase binds and may regulate the Fanconi anemia protein FANCA. *Blood* 98: 3650-3657, 2001.

18) Oda, T., Muramatsu, M.A., Isogai, T., Masuho, Y., Asano, S., and Yamashita, T.: HSH2: a novel SH2 domain-containing adapter protein involved in tyrosine kinase signaling in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 1078-1086, 2001.

19) Yamashita, T. and Nakahata, T.: Current knowledge on the pathophysiology of Fanconi anemia: from genes to phenotypes. *Int. J. Hematol.* 74: 33-41, 2001.

20) Ageyama, N., Shibata, H., Narita, H., Hanari, K., Khono, A., Ono, F., Yoshikawa, Y. and Terao, K.: Specific gravity of whole blood and total blood volume in nonhuman primates. *Contemporary Top. Lab. Animal Sci.*, 40: 33-35, 2001.

21) Osada, N., Hida, M., Tanuma, R., Iseki, K.,

Hirata, M., Suto, Y., Hirai, M., Terao, K., Suzuki, Y., Sugano, S. and Hashimoto, K: Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosome. *Gene* 275: 31-37, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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: 2001.10.16

特許願「アデノウイルス吸着架橋剤」

出願番号: 特願2001-317766

発明者: 伊藤章, 岡田尚巳, 花園豊, 小澤敬也

3. 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

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

4. 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イルスベクター」

出願番号: 特願2000-169090

(未公開)

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

***In Vivo* Selective Expansion of Gene-Modified Hematopoietic Cells
in A Nonhuman Primate Model.**

Yutaka Hanazono,¹ Takeyuki Nagashima,³ Masaaki Takatoku,² Hiroaki Shibata,⁴
Naohide Ageyama,⁴ Takayuki Asano,¹ Yasuji Ueda,³ Cynthia E. Dunbar,⁵ Akihiro
Kume,¹ Keiji Terao,⁴ Mamoru Hasegawa,³ and Keiya Ozawa^{1,2}.

¹Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, and ²Division of
Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School, Tochigi 329-0498, Japan.

³DNAVEC Res. Inc., Ibaraki 305-0856, Japan.

⁴Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases, Ibaraki 305-0843,
Japan.

⁵Hematology Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, MD 20892, USA.

Running title: *In vivo* expansion of transduced hematopoietic cells.

Correspondence should be addressed to:

Keiya Ozawa, M.D., Ph.D.

Professor, Division of Genetic Therapeutics,

Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School

3311-1 Yakushiji, Minamikawachi, Kawachi, Tochigi 329-0498, Japan

Tel: +81-285-58-7402 Fax: +81-285-44-8675

E-mail: kozawa@ms.jichi.ac.jp

Summary

A major problem limiting hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy is the low efficiency of gene transfer into human HSCs using retroviral vectors. Strategies, which would allow *in vivo* expansion of gene-modified hematopoietic cells, could circumvent the problem. To this end, we developed a selective amplifier gene (SAG) consisting of a chimeric gene composed of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor gene and the estrogen receptor gene hormone-binding domain. We have previously demonstrated that primary bone marrow progenitor cells transduced with the SAG could be expanded in response to estrogen *in vitro*. In the present study, we evaluated the efficacy of the SAG in the setting of a clinically-applicable cynomolgus monkey transplantation protocol. Cynomolgus bone marrow CD34⁺ cells were transduced with retroviral vectors encoding the SAG and reinfused into each myeloablated monkey. Three of the six monkeys that received SAG transduced HSCs showed an increase in the levels of circulating progeny containing the provirus *in vivo* following administration of estrogen or tamoxifen without any serious adverse effects. In one monkey examined in detail, transduced hematopoietic progenitor cells were increased by several-fold (from 5% to 30%). Retroviral integration site analysis revealed that this observed increase was polyclonal and no outgrowth of a dominant single clonal population was observed. These results demonstrate that the inclusion of our SAG in the retroviral construct allows selective *in vivo* expansion of genetically modified cells by a non-toxic hormone treatment.

Key words: hematopoietic stem cell, gene therapy, retroviral vector, selective amplifier gene, *in vivo* expansion, nonhuman primate, transplantation.

Introduction

Hematopoietic stem cells (HSCs) are desirable targets for gene therapy based upon their self-renewal and multilineage differentiation abilities and retroviral vectors are the most extensively employed for HSC gene therapy applications. However, gene transfer efficiency into HSCs using retroviral vectors has been disappointingly low.¹ The quiescent nature of human HSCs along with the low density of retroviral receptors on their surface has hindered the efficiency of gene transfer with retroviral vectors.² Many efforts have been made to improve upon the gene transfer efficiency into HSCs using nonhuman primate models.³ One promising strategy to overcome these limitations is to expand gene-modified hematopoietic cells *in vivo* after transplantation. Should *in vivo* expansion be feasible, clinically relevant gene transfer levels could theoretically be achieved even with very low initial engraftment levels of successfully genetically modified cells.

To this end, several investigators have explored strategies designed to confer chemotherapeutic drug resistance to HSCs by the introduction of the multidrug resistance (MDR)-1 gene allowing selection and expansion of transduced HSCs *in vivo* after transplantation by administration of an MDR-pumped drug such as taxol.⁴⁻⁸ Although *in vivo* selection of transduced cells with the MDR-1 gene appeared feasible in mice,⁴ it has been difficult to document such selection in nonhuman primates or humans.⁵⁻⁸ *In vivo* selection with the MDR-1 gene may have resulted from selection at the level of relatively mature precursor cells, not at the level of HSCs, since HSCs

express the MDR-1 gene.⁹⁻¹¹ In addition, aberrant splicing of the vector-derived MDR-1 transcript has been shown in human hematopoietic cells, which lead to the generation of nonfunctional, truncated MDR-1 gene product.¹² Furthermore, mice transplanted with *ex vivo* expanded MDR1-transduced HSCs developed a myeloproliferative disorder, raising concerns about this approach and questioning the nature of the selection observed in earlier studies.¹³ Several alternative drug resistance genes have been studied *in vitro*, including O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, which confers protection to some alkylating agents^{14,15} and mutant dihydrofolate reductase.^{16,17} Although the strategy using the mutant dihydrofolate reductase has proven feasible *in vivo* in mice,¹⁷ confirmatory studies in nonhuman primates or humans have not yet been reported. An alternative strategy for *in vivo* expansion of transduced cells is to confer a direct proliferative advantage to the gene-modified cells relative to their nontransduced counterparts. Some groups developed selective amplifier genes or cell growth switches, which are chimeric genes expressing a fusion protein composed of a growth factor receptor signaling domain and its specific molecular switch.^{18,19} Blau *et al.* developed cell growth switches that are cytokine receptor-FK506 binding protein (FKBP) fusion genes to confer inducible proliferation to transduced cells.^{19,20} In their system, cytokine receptor signaling is turned on by treatment with a synthetic dimerizer FK1012 or its derivatives. Although the original FK1012 is complicated by its potential interactions with endogenous FKBP's leading to immunosuppression of recipients, its derivatives (AP1903, AP20187 *et al.*) have been designed to reduce this interaction.²¹ Successful *in*

vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells was obtained using the cell growth switch composed of the intracellular part of Mpl and FKBP in a murine model.²²

We previously developed a chimeric selective amplifier gene (SAG) composed of the signalling domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor and the estrogen receptor hormone-binding domain, and demonstrated that primary bone marrow progenitor cells transduced with the SAG could be expanded in response to estrogen or tamoxifen *in vitro*.^{18,23,24} The estrogen receptor-mediated dimerization of the chimeric gene product is assumed to be critical for the activation of the G-CSF receptor signaling.²⁵ We have further shown that *in vivo* expansion of transduced cells with the SAG is feasible in a murine transplantation model.²⁶ Adaptation of this *in vivo* selection system for use in nonhuman primates should determine its clinical feasibility. In this study, we evaluated efficacy of the SAG in the setting of a clinically-applicable nonhuman primate (cynomolgus monkey) transplantation protocol.

Results

Construct of retroviral vectors.

The selective amplifier gene (SAG) is a chimeric gene composed of the G-CSF receptor gene and the estrogen receptor gene hormone-binding domain (Fig. 1).¹⁸ To abolish responsiveness to G-CSF, the G-CSF-binding domain was deleted from the chimeric gene. Thus, G-CSF signaling can be generated by treatment with estrogen but no longer with G-CSF. The G-CSF receptor transmits two signals; proliferation and differentiation. The differentiation signal was undesirable for the purpose of expansion of transduced cells. To abolish the differentiation signal, tyrosine 703 was replaced by phenylalanine (Y703F), as this residue is reported to be involved in the differentiation signaling.²⁷ We previously demonstrated that this SAG (estrogen-responsive SAG, or designated GCRER) product predominantly transmits a proliferation signal by treatment with estrogen *in vitro*.²³ We constructed a further modified SAG in which a point mutation (G525R) was introduced into the estrogen receptor moiety of the GCRER (Fig. 1).^{24,28} This SAG product (tamoxifen-responsive SAG, or designated GCRTmR) no longer reacts to endogenous estrogen but reacts to synthetic hormones such as tamoxifen (Tm).²⁴

To facilitate monitoring *in vivo*, we constructed a bicistronic retroviral vector expressing both GCRER (as the first cistron) and green fluorescent protein (GFP; as the second cistron) (Fig. 1). The internal ribosome entry site (IRES) enables coordinated expression of both genes.²⁹ Retroviral vectors expressing only GCRER, GCRTmR, or

GFP were also constructed (Fig. 1).²⁴ Additionally, we prepared control, non-expressing retroviral vectors (G1PLI and G1PLII) which contain non-translated sequences from the neomycin resistance and β -galactosidase genes by disrupting the first ATG codons.³⁰

Single marking study.

To increase the likelihood of primitive hematopoietic cell cycling and thus retroviral transduction, stem cell factor (SCF) and G-CSF were administered to the animals prior to bone marrow harvesting.³¹ Furthermore, this strategy could allow CD34⁻ HSCs, if any, to convert to CD34⁺ HSCs, thus increasing the number of HSCs included in the CD34⁺-cell fraction.³² Bone marrow CD34⁺ cells were harvested from four cynomolgus monkeys primed with these cytokines. As summarized in Table 1, CD34⁺ cells were transduced with a retroviral vector expressing only GFP in two monkeys (C1 and C2) or with a retroviral vector expressing both SAG and GFP (GCRER/GFP) in the other two monkeys (S1 and S2). The transductions were performed for 4 days in the presence of multiple cytokines including Flt-3 ligand and RetroNectinTM.^{33,34} Following *ex vivo* transduction, gene transfer efficiency was assessed by semiquantitative PCR performed on the end transduction product or by PCR of individual clonogenic progenitors (colony forming units, CFU) derived from the sample. Thirteen to 40% of cells contained the provirus, and 10 to 70% of colonies formed by the cells contained the provirus (Table 1). There was little correlation between transduction efficiency estimated by the two methods, yet this observation has

been repeatedly reported in nonhuman primate models.³³ The transduced cells were infused into each animal after myeloablative conditioning by total body irradiation.

The presence of the GFP gene within the vector construct allows assessment of transgene expression by fluorescence among peripheral blood cells and bone marrow-derived clonogenic colonies after transplantation. However, few peripheral blood cells fluoresced and bone marrow-derived colonies fluoresced at very low levels. Several explanations for such poor transgene expression have been offered previously including transgene silencing³⁵ and poor expression of the second cistron in a bicistronic vector,³⁶ the position of the GFP gene in our construct. To avoid complicating the analysis of the gene transfer efficiency by assessment of the GFP expression, we defined gene transfer efficiency as the percentage of provirus-containing cells. We examined the provirus in peripheral blood and bone marrow-derived CFU by PCR after transplantation.

In the two monkeys transplanted without the SAG (C1 and C2), around 5-10% of CFU contained the provirus for more than 1 year after transplantation (data not shown). In one female recipient of cells transduced with the estrogen-responsive SAG (S1), although only 10% of CFU contained the provirus in the *ex vivo* transduced cell population (Table 1), nearly half of bone marrow-derived CFU contained the provirus just after transplantation without administration of estrogen (Fig. 2). Some transduced cells presumably reacted to endogenous estrogen or estrogen-like substances. Six months after transplantation, the transduced fraction dropped to 5%, at which point estrogen administration was initiated. Following estrogen administration, the percentage

of CFU containing the transgene increased up to 30% (Fig. 2). A lineage preference for myeloid over erythroid colony formation was not observed in the presence of the SAG that generated the G-CSF receptor-mediated proliferation signal in the cells. Peripheral blood cells containing the SAG vector sequence also increased from <0.1% to ~1% (data not shown) in response to estrogen administration. Estrogen-responsiveness was not demonstrable in the second animal (S2) as the fraction of CFU containing the SAG sequence was not increased following estrogen administration (data not shown). The development of an estrogen related thoracic deformation precluded subsequent estrogen administration.

Dual marking study.

Dual genetic marking was subsequently employed to compare the effect of the SAG vectors to non-SAG vectors within, rather than between, individual animals. From four monkeys (D1-4), cytokine-primed bone marrow CD34⁺ cells were harvested and split into two equal aliquots. One aliquot was transduced with an SAG-vector and the other with a control, non-expressing vector (Table 1). Both aliquots were reinfused simultaneously into each animal following myeloablative conditioning. The animals received toremifene (a derivative of tamoxifen; D1 and D2)³⁷ or hydroxytamoxifen (an active metabolite of tamoxifen; D3 and D4) after transplantation and *in vivo* marking levels derived from the two populations were examined and compared by PCR.

The results of two monkeys (D1 and D2) which received toremifene are shown