

表1：アフェレーシス結果と回収細胞の性状

animal ID	Body weight (kg)	Estimated total blood volume (ml)	Processed blood		Harvested cells			
			Total Volume (ml)	ml/kg	Total Nucleated Cells ($\times 10^8/\text{kg}$)	MNCs ($\times 10^8/\text{kg}$)	CD34 ⁺ cells ($\times 10^6/\text{kg}$)	CFU ($\times 10^6/\text{kg}$)
099033	4.9	310	1000	200	2.99	10.45	27.17	-
099038	4.9	300	1000	210	1.41	10.17	26.44	98.97
099036	4.2	270	900	210	1.29	6.22	16.16	247.96
000033	7.4	420	1150	150	0.83	2.10	-	9.57
099030	4.3	400	1050	150	0.89	3.78	-	13.75
average	5.1	340.0	1020.0	184.0	1.5	6.5	23.3	92.6

細胞増殖分化制御遺伝子の開発

分担研究者 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 遺伝子導入された造血幹細胞を効率よく増幅するため、選択的増幅遺伝子(SAG)を開発した。遺伝子発現により細胞を選択的に増幅させ、遺伝子治療での重要な課題である造血幹細胞への遺伝子導入効率の不足を補おうというものである。これまでに造血幹細胞増幅に係わる増殖装置としてG-CSF受容体(GCR)とそれを制御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領域との融合させたGCRERをプロトタイプとして用いてきた。この選択的増幅遺伝子をカニクイザルの造血幹細胞に導入し自家移植を行った結果、一部の個体で外部からのホルモン投与に反応して、遺伝子導入された血球前駆細胞を増幅した。今年度はSAGをより安全かつ強力な分子スイッチであるエリスロポエチン受容体を用い、またより幹細胞増幅に適した増幅装置と考えられる巨核球刺激因子(TPO)受容体(mpl)を用いたEPORMplを構築した。これを用い、*in vitro*で株化細胞やヒト臍帯血由来CD34陽性細胞における増幅効果を調べた結果これまでのGCRER型のSAGに比べより高い増幅効果を示し、これまでの増幅装置と比較した結果、mplからの増幅刺激はGCRやEPORと比べてより未熟な状態で高い増幅効果をもたらす好ましい性質をもつことが明らかになった。

A. 研究目的

成体内における幹細胞を用いて、神経、筋肉、消化器など多くの組織を再生し治療する方法がクローズアップされているが、血液こそ、幹細胞研究の歴史が古く、臨床応用に関して既に多く試みられてきた唯一の組織である。こうしたなかで、先天性、あるいは難治性血液疾患の根治のため造血幹細胞を標的

とした遺伝子治療研究も精力的に行われているが、幹細胞への遺伝子導入効率が障壁となっている。レトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入法も導入時に細胞に添加するサイトカインの選定やフィブロネクチン誘導体を用い細胞とベクター接触の効率を上げる導入方法の改良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。1999年フランスで成功したX染色体性重症免疫不全症の遺伝子治療も用いた手法は従来のものと大きな差はない。成功した要因は導入した治療遺伝子である共通 γ 鎖遺伝子が、導入細胞に対して増殖優位性を付与したという点であり、その結果、遺伝子導入細胞が選択的に増幅されて高い遺伝子導入と同じ効果をもたらしたと考えられている。しかし、多くの血液疾患では治療遺伝子自体が増幅効果をもたらすことは期待できないため、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きいと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、これまで顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体(GCR)またはより増殖優位になる誘導変異体を用いてきた。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(ER)、およびERに変異を加え、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)に対する反応特異性を高めた、タモキシフェン受容体(TmR)を用いて検討している。これまでの結果、*in vitro*では目論見通り、ER、Tmに依存した細胞増殖を確認することができた。また、カ

ニクイザル骨髓細胞の自家移植系を用いた検討でも、一部の個体でステロイド依存的な遺伝子導入細胞の増加が末梢血液および骨髓中に認められた。

今期は選択的増幅遺伝子の実用化に向けてさらに以下のような改良を加えた。

1) 分子スイッチとしてのEPO受容体の利用：GCR、mpl、c-kit等のサイトカイン受容体は共通の構造からサイトカイン受容体ファミリーを形成しており、いずれもリガンドが結合することにより二量体を形成し、増殖分化シグナルを伝達すると考えられている。プロトタイプSAGは二量体形成にホルモン受容体を用いたが、立体構造的にはサイトカイン受容体を用いた二量体形成の方がシグナル伝達により適していると予想した。また、その際のリガンドとしては、既に長年にわたり臨床応用され、副作用の少ないEPOを選択した。このEPORを分子スイッチとしたSAGの増殖シグナルの強さを検証した。

2) 造血幹細胞の増幅により効果的であると考えられるMplの利用については昨年度から検討を開始しているが、今年度はEPORを分子スイッチに用いたときの幹細胞増幅能を、GCR、EPOR、Mpl間で比較した。

B. 研究方法

1. EPORGCR、EPORMplの作製

ヒトEPOR遺伝子より細胞膜貫通領域および細胞外領域をコードするDNA鎖816bpをPCRにて合成した。またマウスGCR、ヒトMplの細胞質領域をコードするDNA鎖をそれぞれY703FGCRER、ヒトMpl遺伝子を

鋳型に PCR を行い合成した。これらを繋いだ EPORGCR および、EPORMpl 遺伝子をマウス幹細胞ウィルスベクター (MSCV) に組み込み、BOSC23 パッケージング細胞に transfection することによりマウス細胞感染用のレトロウイルスベクターを作製した。ヒト細胞感染用ベクターは、各 MSCV ベクターと共に amphi 発現ベクターを 293T 細胞に co-transfection することにより作製した。また比較用に野生型 EPOR (EPORwt 遺伝子) も同様に MSCV に組み込み、レトロウイルスベクターの作製を行った。また解析用マーカーとしてミトコンドリア局在黄色蛍光タンパク質(mtYFP)をインターナルリポゾームエントリーサイト (IRES) 配列と共に SAG 遺伝子の下流に挿入したパイシストロニックベクターも作製した。

2. マウス BaF3 細胞を用いた増幅効果の検討

マウス BaF3 細胞株にレトロウイルスベクターにより EPORGCR、EPORMpl、EPORwt 遺伝子を導入し、EPO 存在下で遺伝子導入 BaF3 細胞の増殖を調べた。

3. ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対する増幅効果

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (Biowhitaker 社) に対し、レトロウイルスベクターを用いて EPORGCR-IRES-mtYFP、EPORMpl-IRES-mtYFP、EPORwt-IRES-mtYFP 遺伝子を導入し EPO 存在下において培養を行い、細胞数、YFP 陽性細胞率、c-kit 陽性率を求めた。また増幅後の細胞の成熟度を調べる目的で、血球系コロニー形成アッセイを行い、コロニー形成細胞数をカウントした。

またコロニーの DNA を抽出し、PCR により遺伝子導入効率を調べた。

(倫理面への配慮)

本年度は in vitro の実験が中心であり、マウス細胞株や購入したヒト臍帯血由来 CD34 細胞を用いており、倫理面で問題となるような研究内容を含んでいない。

C. 研究結果

1. 細胞増殖の亢進

マウスプロ B 細胞株 BaF3 細胞は IL-3 に依存した生存、増殖を示す。この細胞にレトロウイルスベクターを用いて、従来の SAG である GCRTmR (分化シグナルが伝達されないような変異を持つマウス GCR と TmR の融合タンパク質) 遺伝子、EPOR 型 SAG (EPORGCR、EPORMpl 遺伝子)、ヒト野生型 EPOR 遺伝子を導入した結果、いずれも IL-3 非依存的かつ、GCRTmR 遺伝子を導入した細胞は Tm 依存的に、EPORGCR、EPORMpl、EPORwt 遺伝子を導入した細胞は EPO 依存的な増殖を示した。また、増殖速度は EPORGCR、EPORMpl、EPORwt 遺伝子を導入した細胞では培地中に EPO を添加することにより、IL-3 添加条件下のコントロール細胞と同様の増殖速度にまで増殖性が高まった。しかし、従来の GCRTmR を用いた場合は Tm を培地に添加しても、そのおよそ半分の増殖速度しか示さなかった。また、これらの細胞を用いて増殖に必要な EPO 濃度を調べたところ 0.1ng/ml で増殖を開始し、10ng/ml でほぼ最大増殖速度に達した。

2. 遺伝子導入細胞の選択的増幅

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対し、EPORGCR-IRES-mtYFP、EPORMpl-IRES-mtYFP、EPORwt-IRES-mtYFP 遺伝子を導入した。遺伝子導入直後の YFP 陽性細胞率が 20-30%であったこれらの細胞を EPO 存在下(10ng/ml)、あるいは Flt-3 リガンド存在下(100ng/ml)で 3 週間培養を行ったところ、EPO 存在下では遺伝子導入細胞である YFP 陽性細胞が選択的に増幅され、1 週間で 90%以上に増幅されその比率は 3 週間維持された。しかし、Flt-3 リガンド存在下では導入細胞は最初の導入効率を増やすことなく維持したままであった。

3. EPOR 型 SAG によるヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の増幅

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞は体外で培養を行うと EPO 存在下 (10ng/ml) でも増殖することなく 2 週間程度で死滅してしまう。ところが、EPO 型 SAG、あるいは野生型 EPOR 遺伝子を導入した細胞は、EPO 存在下で非常によく増殖した。特に EPORMpl を導入した細胞では 30 日以上に渡って増殖を続け、数では約 7000 倍になった。一方 EPORwt や EPORGCR も細胞を増殖させたが増殖期間も短く、EPORwt で 2 週間、EPORGCR で 3 週間であった。また増殖率も EPORwt で 960 倍、EPORGCR で 270 倍にとどまった。また、EPO によって 2 週間増幅させた CD34 陽性細胞を c-kit 陽性率を指標に未熟性を調べたところ、EPORMpl 導入細胞では 78%という高い率で未熟性を維持したが、EPORGCR では 62%とやや下

がり、EPORwt では 18%にまで低下した。また EPO 存在下で 1 週間培養した細胞を用いてコロニー形成試験を行った結果も、EPORMpl 導入細胞がコロニーを形成する未熟な細胞をより多く含んでいることを示した。

4. 増殖シグナルの種類と分化決定

EPORGCR-IRES-mtYFP、EPORMpl-IRES-mtYFP、EPORwt-IRES-mtYFP 遺伝子を導入したヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を TPO、EPO、G-CSF の 3 種のサイトカイン存在下で 2 週間培養した後、赤芽球、好中球、巨核球のマーカであるグリコスホリン A、CD15、CD41 にて分化指向性を調べた結果、EPORwt を用いた場合は極端な赤芽球系への分化指向性を示したが、EPORMpl、EPORGCR ではそれほど高い指向性は見られなかった。

D. 考察

サイトカイン受容体を増幅装置に用いた場合、EPOR-EPOによる分子スイッチは期待通り、ホルモン受容体より強い増幅シグナルを発信させることが分かった。また、増幅シグナルとして、Mpl、GCR、EPORを比較した場合、造血幹細胞に近いより未熟な細胞を未熟なまま増殖させ、しかも増殖率が最も高かったのが Mplであった。また GCR も Mpl に次いで成績が良く、EPOR は増殖性および赤芽球系への分化誘導能も高く幹細胞増幅には不適であると思われた。

E. 結論

これまでに開発してきたホルモン受容体を用

いた SAG に比べ、今回検討した EPOR 型は高い増殖性を細胞に付与し、また Mpl、GCR を用いた SAG は未熟性を保持させながら増幅を行うことが明らかになった。また、EPO のヒトへの投与の実績および、ホルモン等と比べ副作用が小さいことが期待されることから、EPORMpl、EPORGCR はより臨床に即した SAG であると結論できる。

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) 学会発表

1. 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 with retroviral vectors expressing the Selective Amplifier Gene in a Nonhuman Primate Model. 米国遺伝子治療学会 シアトル 2001. 6. 2

1. Hanazono Y, Nagashima T, Asano T, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo Selective Expansion of Retrovirally Transduced Hematopoietic Cells in the Setting of a Clinically Applicable Nonhuman Primate Transplantation Protocol. 日本遺伝子治療学会 東京 2001. 7. 5

2. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T,

Mizugami H, Hanazono Y, Ueda Y, Nagashima T, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo Expansion of Transduced Murine Hematopoietic Cells with Selective Amplifier Genes 日本遺伝子治療学会 東京 2001. 7. 7

3. Kobayashi M, Huang K, Iida A, Hasegawa M. Pseudotyping of SIVagm-Based Lentiviral Vectors with Envelope Proteins from Paramyxovirus 日本遺伝子治療学会 東京 2001. 7. 7

4. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Komatsu N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M: A New Design of Selective Amplifier Genes with an Erythropoietin Receptor-Based Molecular Switch for Controlled Expansion of Gene-Modified Hematopoietic Cells 日本遺伝子治療学会 東京 2001. 7. 6

5. Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Shibata H, Kume A, Terao K, Komatsu N, Ozawa K, Hasegawa M: Efficient Expansion of Hematopoietic Cells by a Novel Selective Amplifier Gene, EPOR-MPL. 米国血液学会 オランダ 2001. 6. 8

H. 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
Muramatsu, M., Hanazono, Y., Ogasawara, Y., Okada, T., Mizukami, H., Kume, A., Mizoguchi, H., and <u>Ozawa, K.</u>	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
Otsuki, T., Nagashima, T., Komatsu, N., Kirito, K., Furukawa, Y., Kobayashi, S., Liu, J.M., and <u>Ozawa, K.</u>	Phosphorylation of Fanconi anemia protein, FANCA, is regulated by Akt kinase.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	291	628-634	2002
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., <u>Ozawa, K.</u> , and Mano, H.	Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction.	Blood	98	422-427	2001
Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., <u>Ozawa, K.</u> , 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
Yagasaki, H., Adachi, D., Oda, T., Garcia-Higuera, I., Tetteh, N., D'Andrea, A.D., Futaki, M., Asano, S., and <u>Yamashita, T.</u>	A cytoplasmic serine protein kinase binds and may regulate the Fanconi anemia protein FANCA.	Blood	98	3650-3657	2001
Oda, T., Muramatsu, M.A., Isogai, T., Masuho, Y., Asano, S., and <u>Yamashita, T.</u>	HSH2: a novel SH2 domain-containing adapter protein involved in tyrosine kinase signaling in hematopoietic cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	16	1078-1086	2001
<u>Yamashita, T.</u> and Nakahata, T	Current knowledge on the pathophysiology of Fanconi anemia: from genes to phenotypes.	Int. J. Hematol.	74	33-41	2001
Osada, N., Hida, M., Tanuma, R., Iseki, K., Hirata, M., Suto, Y., Hirai, M., <u>Terao, K.</u> , Suzuki, Y., Sugano, S. and Hashimoto, K	Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosome.	Gene	275	31-37	2001

研究成果の刊行物・別刷

20010488

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。