

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 造血幹細胞遺伝子治療の最大の課題である遺伝子導入効率の向上を目的に、遺伝子導入された造血幹細胞を増幅させる「選択的増幅遺伝子」(SAG)を開発している。昨年度は、第二世代 SAG として、造血幹細胞増幅に係わる増殖装置に TPO 受容体 (mpl) を利用し、それを制御する分子スイッチ用に EPO 受容体の細胞外領域 (EPOR) を融合させたものを開発した。本年度は、この選択的増幅遺伝子をマウス骨髄細胞に遺伝子導入し、放射線照射マウスに移植を行った後、EPO 投与の有無で遺伝子導入細胞の割合を検討した。その結果、EPORmpl を導入した細胞は、EPO 投与によって有意に増幅された。一方、SAG を搭載しないコントロールの遺伝子導入細胞では EPO 投与の有無でその比率に変化は生じなかった。

A. 研究目的

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り、期待される治療効果が得られていない。そのため造血幹細胞への遺伝子導入効率を上昇させることを目的として、新規ベクターの開発、既存のレトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入法の改良等により、実際に幹細胞への遺伝子導入効率が上がったものの、まだ多くの血液疾患に対しては治療レベルには達していない。我々がこれまで開発してきた、選択的増幅遺伝子は、遺伝子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。昨年度は選択的増幅遺伝子の実用化に向けて、1)分子スイッチとして EPOR の利用、2)幹細胞の増幅装置として Mpl の利用を考案し EPOR mpl を作製し、マウス細胞株 BaF3、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて in vitro においてその機能評価を行った。その結果、期待通

りに EPORmpl は EPO 依存的に未熟な造血系細胞を増幅することが明らかになった。本年度は生体内で SAG を導入した造血幹細胞を EPO 投与によって増幅させることが可能かどうか評価する目的でマウスを用いた骨髄移植試験を実施した。

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。またヒト Mpl の細胞質領域をコードする DNA 鎖をヒト Mpl 遺伝子を鋳型に PCR を行い合成した。これらを繋いだ EPORMpl 遺伝子と、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) 配列と共にマウス幹細胞ウイルスベクター (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、EPORmpl-ires-YFP ベクターを作製した。また、コントロールベクターとして mtYFP のみを発現する YFP ベクターも作製した。

2. マウス骨髄細胞への遺伝子導入と移植

8週令の C57Bl/6 マウスに 5-fluoro-uracil を 150 μ g/kg (体重) 腹腔内に投与する。2日後これらのマウス的大腿骨より骨髄を採取し、有核細胞を密度勾配遠心により分取した。これを 20%ウシ胎児血清、20ng/ml ヒト IL-6、100ng/ml rat SCF 添加 IMDM 培地にて前培養後、レトロネクチンを塗布した

培養ディッシュ上で、上記の EPORmpl-IRES-YFP、YFP 搭載レトロウイルスベクターをそれぞれ感染した。2日間の感染後、細胞は 800cGy の放射線照射した 8週令のマウスに経尾静脈に移植した。移植後6週間から1週間マウス EPO (rmEPO) を投与した。さらに 10 週後に再び 1 週間 rmEPO を投与した。

3. 骨髄移植マウスの評価

マウス末梢血は眼窩より採血した後、ACK により溶血後、フローサイトメータにて解析を行った。また採血による内因性の EPO の上昇を抑えるため採血直後に 20Gy の照射を行った同系マウスの貯蔵血液を経尾静脈に輸血した。

C. 研究結果

EPORmpl-ires-YFP、YFP を遺伝子導入した骨髄細胞の移植によって、YFP 陽性細胞を末梢血に有する骨髄キメラマウスを得た。これらのマウスをそれぞれ2群に分け、一方に EPO を投与し、他方は EPO 投与無しに飼育した。その結果、EPORmpl-ires-YFP 感染マウスでは EPO 投与に反応して、投与後 1~2 週後に末梢血中の YFP 陽性細胞の比率が有為に上昇した。これに対し EPO 非投与では YFP 陽性細胞の比率の有為な上昇はなかった。コントロールマウスである YFP のみを導入したマウスでは、EPO の有無に関わらず、YFP 陽性細胞の比率は変動しなかった。また EPORmpl-ires-YFP を導入した細胞を移植したマウスの骨髄を採取し、再度別の放射線照射マウスに移植したところ、

高い遺伝子導入効率を維持した。また2次移植マウスにEPOを投与すると若干ではあるがYFP陽性細胞の比率が上昇した。

なおEPO投与による体調の変化もなく、また遺伝子導入したマウスに白血病の発症は観察されなかった。

D. 考察

EPORmpl 遺伝子の働きによって遺伝子導入細胞はEPO投与に応じて体内で増幅することが明らかになった。またEPOの投与は期待通り重篤な副作用もなく安全に作用した。また2次移植したマウスが高い遺伝子導入細胞の比率を示したことから、体内でEPO/EPORmplによって増幅した細胞は未熟な造血幹細胞に近い細胞であると考えられる。

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により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、ホルモン等に比べ内分泌系の攪乱等の副作用が小さいことが期待されることから、EPORMplは臨床に即した有効な選択的増幅遺伝子であると結論できる。

F. 健康危険情報

有害事象や不都合は特に観察されなかった。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K and Hasegawa M, New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Riochem Biophys Res Comm* 2003 303: 345-354

学会発表

1. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Komatsu N, Terao K, Ozawa K and Hasegawa M, Second generation selective amplifier genes for efficient in vivo expansion of gene modified hematopoietic cells. 日本遺伝子治療学会 東京 2002.7.18

2. 長島 建之、上田 泰次、花園 豊、久米 晃啓、柴田 宏昭、揚山 直英、寺尾 恵治、小澤 敬也、長谷川 護、第2世代選択的増幅遺伝子の開発：エリスロポエチン受容体による分子スイッチとMplの増殖分化シグナル。第64回日本血液学会総会 横浜 2002.9.13

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

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

3. 審査請求中 出願日 2000.6.1

特許の名称 ハ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

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
Kume, A., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K., <u>Ozawa, K.</u> , and Takaku, F	Lymphoid reconstitution in X-linked severe combined immunodeficient mice by retrovirus-mediated gene transfer.	Proc Japan Acad	78, Ser.B	211-216	2002
Ageyama, N., Hanazono, Y., Shibata, H., Ohto, K., Ono, F., Nagashima, T., Ueda, Y., Donahue, R.E., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , Yoshikawa, Y., and <u>Terao, K.</u>	Safe and efficient methods of autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical research in cynomolgus monkeys.	Comp.Med	52	445-451	2002
Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., and <u>Ozawa, K.</u>	Selective expansion of transduced cells for hematopoietic stem cell gene therapy.	Int J Hematol	76	299-304	2002
Hanazono, Y., <u>Terao, K.</u> , Shibata, H., Nagashima, T., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Kato, I., Kume, A., <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Introduction of the green fluorescent protein gene into hematopoietic stem cells results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates.	J Gene Med.	4	470-477	2002
Asano, T., Hanazono, Y., Ueda, Y., Muramatsu, S., Kume, A., Suemori, H., Suzuki, Y., Kondo, Y., Harii, K., <u>Hasegawa, M.</u> , Nakatsuji, N., and <u>Ozawa, K.</u>	Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector	Mol. Ther	6	162-168	2002
Hanazono, Y., Nagashima, T., Takatoku, M., Shibata, H., Ageyama, N., Asano, T., Ueda, Y., Dunbar, C E., Kume, A., <u>Terao, K.</u> , <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model.	Gene Ther	9	1055-1064	2002
Kume, A., Koremoto, M., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Sugamura, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients	Bone Marrow Transplant.	30	113-118	2002

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
Saito T, Kanda Y, Kami M, Kato K, Shoji N, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Nakai K, Ogasawara T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Takaue Y, and <u>Mineishi S</u>	Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma.	Clin. Cancer Res.	8	1014-1020	2002

20020477

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.23-P.24の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。