

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等 研究事業

造血系再生医療への応用を目的とした  
増殖分化制御システムの開発研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

造血系再生医療への応用を目的とした 増殖分化制御システムの開発研究 -----	1
小澤 敬也	
（資料1）班会議資料	
（資料2）2 <sup>nd</sup> CGD-GT Symposium 資料	

### II. 分担研究報告

1. (1) 慢性肉芽腫症の治療法開発 (2) 体性幹細胞の分化転換実験 -----	8
久米 晃啓	
2. 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 -----	15
花園 豊	
3. 第二世代選択的増幅遺伝子の開発と 造血幹細胞への導入に関する研究 -----	20
長谷川 護	
4. サルを用いた造血系再生 -----	23
寺尾 恵治	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	33
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）  
総括研究報告書

造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究

主任研究者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

研究要旨 再生医療は、体性幹細胞あるいは ES 細胞を利用するアプローチに大別される。

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用：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において、EPO 反応型第二世代 SAG を利用することにより、修復造血系細胞を体内で選択的に増幅する技術の開発を進めた。このシステムを慢性肉芽腫症の幹細胞治療に応用するため、本年度は疾患モデルマウスや霊長類のサルを用いた実験系で前臨床研究を行い、その有効性を確認した。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発：骨格筋に脱分化誘導遺伝子 (Msx 1 転写因子遺伝子) を導入して一時的に作用させることにより、脱分化段階を経て、造血系再構築能を持った細胞に再分化させるという、全く新しい再生医療技術の開発に取り組んだ。本年度は、Msx1 遺伝子を一過性に発現させたマウス骨格筋の中に、造血系前駆細胞が出現することを確認した。後天性難治性造血器疾患において、患者自身の非造血系組織から正常造血系を再生することが可能になれば、画期的な治療法の開発に繋がるものと期待される。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発：ヒトへの応用展開を考慮し、サル ES 細胞を用いた *in vitro* ならびに個体レベルの研究を行った。本年度は以下の研究を実施した。

(1) センダイウイルスベクターを用いたサル ES 細胞への遺伝子導入法の検討。(2) サル ES 細胞から *in vitro* で血液細胞を作り出す方法の検討、および分化誘導 ES 細胞に対する免疫反応の解析。(3) サル ES 細胞をサル胎仔へ同種移植する技術の開発。(4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開発：造血幹細胞や ES 細胞の遺伝子操作に関して、安全性を高めるため、染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発を進めた。具体的には、AAV の二つのコンポーネント (ITR 配列と Rep 蛋白質) を利用し、第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域に遺伝子を組み込ませる方法の応用開発を推進した。造血幹細胞遺伝子治療で白血病の発生が問題となっており、このような基盤技術の重要性が高まっている。

分担研究者

久米 晃啓

自治医科大学医学部

助教授

花園 豊

自治医科大学医学部

助教授

長谷川 護

ディナベック研究所

所長

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

A. 研究目的

再生医療は大きな発展が期待される新規医療技術であり、体性幹細胞あるいはES細胞を利用するアプローチに大別される。前者の代表が造血幹細胞移植であるが、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

を一段と広げることが可能となる。本研究では、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において、第二世代選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) を利用することにより、移植した修復造血系細胞の体内での選択的増幅を誘導し、治療効果の増強を図る技術の開発を推進した。このシステムを慢性肉芽腫症の幹細胞治療に応用するため、本年度は疾患モデルマウスや霊長類のサルを用いた実験系で前臨床研究を行った。体性幹細胞を利用するもう一つの研究テーマは、分化転換技術により非造血系組織から造血系を再生させるプロジェクトである。幹細胞の生理的可塑性は限定的であるため、遺伝子操作技術の応用が鍵となる。具体的には、筋肉に脱分化誘導遺伝子を導入して一時的に作用させることにより、脱分化段階を経て、骨格筋細胞から造血系再構築能を持った細胞に再分化させるという、全く新しい再生医療技術の開発に取り組んだ。本年度は、基礎データの確認に力を入れた。後天性難治性造血器疾患においてゲノムに異常の生じていない患者自身の非造血系組織から正常造血系を再生することが可能になれば、将来的には画期的な治療法の開発に繋がるものと期待される。もう一つのES細胞を利用する再生医療に関しては、ヒトへの応用展開を考慮し、霊長類のサルのES細胞を用いたin vitro分化誘導実験や、個体レベルの研究を行った。尚、この分野でも遺伝子操作技術は必須のツールであり、本年度はセンダイウイルスベクター (SeVベクター) やサル免疫不全ウイルス由来のレンチウイルスベクター (SIVベクター) を用いた遺伝子導入法や、in vitro分化誘導実験と免疫反応に関する解析、および体内追跡用マーカー遺伝子を導入したES細胞のサル胎仔への移植法などを検討した。また、造血幹細胞やES細胞の遺伝子操作に関して、安全性を高めるため、染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発を進めた。最近、造血幹細胞遺伝子治療で白血病の発生が深刻な問題となっており、このような基盤技術は重要な研究テーマとなっている。

## B. 研究方法

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用 (小澤、長谷川、寺尾) :

EPO 反応型の第二世代 SAG [EPO 受容体細胞外領域と Mpl 受容体の細胞内領域の融合蛋白質をコードする遺伝子] について、サルの系で造血系再構築実験を行い、その有効性 (SAG 導入造血系細胞の EPO 投与に対する反応性) を検討した。尚、移植前処置 (全身放射線照射) の代わりに、骨髓還流置換法 (池原法) を行った。即ち、サルの大腿骨および上腕骨のそれぞれ両端に針を刺し、骨髓腔を洗浄した。その後、遺伝子導入 CD34 細胞を骨髓腔内に注入した。骨髓中の前駆細胞における遺伝子導入効率は、腸骨より経時的に採取した細胞を用い、造血系コロニーを形成させ、導入遺伝子の一部を特異的に増幅するプライマーセットにより PCR 解析を行った。また、骨髓血、末梢血中の有核細胞における遺伝子導入効率は、同様のプライマーセットを用いリアルタイム PCR を行って検討した。

疾患モデルでの治療実験としては、ヒト gp91 遺伝子と第二世代 SAG を搭載するレトロウイルスベクターを構築し、X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) モデルマウス (gp91 遺伝子ノックアウトマウス) の骨髓細胞に遺伝子導入した。このドナー細胞を、致死量放射線照射したレシピエント X-CGD マウスに移植して造血系再構築後 EPO を投与し、活性酸素産生能を回復した顆粒球が増えるか否かを、ジヒドロローダミン-123 還元法フローサイトメトリー (DHR 法) にて定期的に追跡した (久米)。

尚、平成 15 年 9 月 13 日の班会議では、この SAG プロジェクトを中心に話し合いを行った。さらに、韓国のソウル国立大学および ViroMed 社との共同研究に向けたシンポジウムを平成 15 年 11 月 8 日にソウルで開催した。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発 (久米) :

骨格筋系細胞株を脱分化させる作用のある Msx1 に注目し、Msx1 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV/Msx1) を作製した。このベクター

をマウス前脛骨筋に注射し、筋注後1週から4週にわたり、前脛骨筋からの単核細胞を分離採取し、分化マーカーの発現パターンを解析した。また、これらの細胞を半固形培地にまいて造血系コロニー形成能を測定した。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 (花園、寺尾) :

(1) サル ES 細胞の遺伝子操作技術については、SeV ベクターを用いてサル ES 細胞に GFP 遺伝子を導入した。その後、経時的に GFP の発現、ES 細胞の分化能を調べた。

(2) サル ES 細胞の造血系への *in vitro* 分化誘導技術については、ストローマ細胞 OP9 との共培養およびサイトカイン添加条件を検討した。また、ES 細胞に対する同種免疫応答の程度をリンパ球混合培養での幼若化反応 (MLR) で評価した。

(3) サル ES 細胞の移植技術については、SIV ベクターで GFP 遺伝子を導入した ES 細胞を、サル胎仔 5 頭の肝臓内または腹腔内へ移植した (未分化 ES 細胞 4 頭、造血分化 ES 細胞 1 頭)。移植後、適当な時期に胎仔を娩出し、移植細胞の生着・増殖・分化を調べた。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発 (小澤) :

AAV の二つのコンポーネント (ITR 配列と Rep 蛋白質) を利用し、第 19 番染色体長腕 AAVS1 領域に遺伝子を組み込ませる方法の応用開発を推進した。特に、Rep を一過性に発現させるシステムの開発を行った。即ち、Cre-loxP 法により Rep の発現を制御した AAVS1 特異的遺伝子組込みプラスミドベクターを構築した。まず、HSV-tk プロモーターと Rep との間に、loxP 配列で挟まれた転写終結シグナルを含む stuffer 配列を挿入した。また、この stuffer 配列に ITR 配列を連結したマーカー発現ユニットを逆向きに配置した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験 (自治医大) 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。

### C. 研究結果

1) 選択的増幅遺伝子 (SAG) を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

遺伝子導入 CD34 細胞のサルへの移植実験を、以下の3通りに分けて実施した。1) SAG 導入細胞を骨髄内に移植、2) 非発現ベクターにて標識した細胞を骨髄内に移植、3) 非発現ベクターにて標識した細胞を経静脈的に移植した。

SAG 導入細胞を骨髄内移植したサルでは、EPO 投与に応じて末梢血中の遺伝子導入細胞が増加し、移植後約 100 日に 7% を超える遺伝子導入効率を示した。その後 EPO 投与を中断したところ、導入効率は速やかに減少し 0.02% となった。しかし、EPO 再投与で導入効率は 8% にまで再上昇した。3 回目の EPO 投与でも移植後約 350 日に 8.9% に達した。

一方、SAG を含まない遺伝子を導入した細胞を骨髄内に移植したサルでは、移植した箇所 (四肢) と異なる部位 (腸骨) から採取した骨髄中に遺伝子導入細胞が検出され、長期にわたり維持していることが示された。しかし、末梢血中の遺伝子導入細胞は 0.1% 以下と極めて低い値を示した。また、経静脈的に移植を行ったサルでは、骨髄内移植法に比べて骨髄への生着率が悪かった。

尚、EPO 投与による多血症 (瀉血を行った) 以外の副作用は認められず、白血病などの遺伝子導入に基づく副作用は認められなかった。

gp91-EpoRMpl 遺伝子導入細胞にて造血系を再構築した X-CGD マウスに EPO を反復投与する実験では、末梢血の機能回復顆粒球が増加した。DHR 法陽性顆粒球の割合は、EPO 投与後有意に上昇し、最高  $27.5 \pm 6.8\%$  ( $n = 3$ ) となったが、このとき非投与群  $8.4 \pm 3.1\%$  ( $n = 3$ ) であった ( $p = 0.01$ )。

平成 15 年 9 月 13 日の班会議では、臨床用 SAG の開発を急ぐことが確認された (資料 1)。また、平成 15 年 11 月 8 日に韓国で開催されたソウル

国立大学および ViroMed 社との共同研究に向けたシンポジウムでは、今後の課題と分担すべき検討事項について議論した(資料2)。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発:

筋肉から採取した単核細胞のフローサイトメトリー解析で、CD34<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>分画は、コントロール筋肉群の 1.3±0.9%に対し、AAV/Msx1 筋注 4 週間後には 13.6±6.0%に増加した。また CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>分画は、コントロール筋肉群の 2.4±0.4%から、AAV/Msx1 筋注 2 週間後に 36.0±8.1%に増加した。Msx1 強制発現により骨格筋の中の造血前駆細胞も増大した。コントロールの前脛骨筋由来単核細胞 5×10<sup>4</sup> 個から生じた造血コロニーの総数は 0.44±0.97 にすぎなかったのに対し、AAV/Msx1 筋注後は 7.41±3.66 となった。このときの造血コロニーの内訳は、顆粒球系(3.12±3.31)と単球系(3.35±1.93)が優勢だったが、赤芽球系(0.88±1.22)も認められた。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発:

(1) サル ES 細胞の遺伝子操作技術の開発では、SeV ベクターで GFP 遺伝子をサル ES 細胞に導入すると、2 日後には約 60%の細胞が GFP 蛍光を発し、その後 GFP の発現は数ヶ月以上にわたって安定していた。また、遺伝子導入 ES 細胞は、免疫不全マウスにテラトーマを形成することができ、ES 細胞の三胚葉分化能を損なわないことが判明した。

(2) サル ES 細胞の分化誘導技術の開発では、OP9 ストローマ細胞上で、SCF, IL-3, IL-6, BMP-4, VEGF を含む培地で培養すると、数日後には CD34 の発現が見られるようになり、1 週間~10 日後にはコロニー形成能をもつ造血前駆細胞が出現した。1 ヶ月後には NBT 還元能陽性の好中球が出現した。また、未分化の ES 細胞と分化誘導した細胞を刺激細胞とし、正常カニクイザル末梢単核球を反応細胞とした MLR では、未分化 ES 細胞に対する反応はほとんど見られなかったが、分化誘導した細胞に対しては幼若化反応が認められた。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発では、未分化 ES 細胞の移植を受けたサル胎仔で、広範な組

織に移植細胞の生着を認めた。生着した細胞はその場に応じた分化を遂げることが明らかになった。また、移植針の軌跡に沿った胸腔や腹腔内にテラトーマ形成がみられた。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み(TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発: Rep 発現誘導カセットを導入した HeLa 細胞に Cre 発現ベクターを感染させ、Cre によって Rep の発現が誘導されることを確認した。

#### D. 考察

1) 選択的増幅遺伝子(SAG)を利用した造血系細胞体内増幅法の開発と応用:

経静脈的移植に比べて骨髄腔内移植では生着率が高いことが示された。しかし、遺伝子導入細胞が末梢血に効率よく出現しないという問題点が明らかになった。これに対しては、EPO反応型キメラ受容体をコードする第二世代SAGシステムを導入することにより解決することができた。今回得られた遺伝子導入効率は、前処置を行わない場合には世界でもほとんど例のない高いレベルである。

さらに、第二世代 SAG が CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の効果を増大させることをモデルマウスの系で確認できた。今後は、CGD が顆粒球単球系の疾患であることも考慮し、エリスロポエチン受容体細胞外部分と G-CSF 受容体細胞内部分を組み合わせた、新しい SAG システムの応用を検討する計画である。

尚、SAG プロジェクトを効率的に推進するため、韓国の研究グループとの実質的な共同研究の立ち上げを検討している。

2) 非造血系組織からの造血系再生を目指した分化転換技術の開発:

Msx1 遺伝子を一過性に発現させた骨格筋で、造血前駆細胞が増加することを確認できた。顆粒球・単球系のみならず赤芽球系前駆細胞も含まれており、Msx1 による脱分化後に未分化造血幹細胞の段階を経て各前駆細胞に至ったことが示唆される。したがって、Msx1 発現骨格筋から得られた細胞は、in vivo 造血系再構築能を有することが期待される。

### 3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 :

(1) サル ES 細胞の遺伝子操作技術の開発では、安全性の観点からゲノムに組み込まれない SeV ベクターの検討を行った。その結果、SIV ベクターに匹敵する遺伝子導入効率が得られた。レンチウイルスベクターには挿入変異の問題、センダイウイルスベクターは免疫原性の問題があり、これらへの対応が今後の課題である。

(2) サル ES 細胞の分化誘導技術の開発では、*in vitro* で造血系細胞への分化に成功した。効率の改善と分化制御技術が今後の課題である。また、分化誘導した ES 細胞に対して同種免疫応答が誘導されることが明らかとなったため、この問題についても対策を考えていく必要性がでてきた。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発では、サル胎仔への同種移植を実施し、ES 細胞が生着した場所に依りて分化することが判明した。この系は、今後の ES 細胞移植治療の有効性や安全性を評価するための系として有用である。来年度以降は、体内微小環境を利用した ES 細胞の分化実験を進める予定である。尚、ES 細胞が胸腔や腹腔内に漏れるとテラトーマが形成された事例があることから、臨床応用の際には未分化 ES 細胞の混入がないようにすること、細胞を漏らさずに移植することが重要になると考えられる。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI: Targeted Vector Integration) 法の開発 : Rep 発現誘導カセットを構築した。HeLa 細胞を用いて、Southern blot 解析による AAVS1 領域の遺伝子再構成を検討し、マーカー遺伝子の AAVS1 領域特異的遺伝子組込みとその頻度を解析中である。現在の構想では、Cre によって切り出された loxP 配列で挟まれた配列中の ITR に Rep が結合することによって、第 19 番染色体 AAVS1 領域に特異的に遺伝子組込みが生ずることが期待される。Rep 発現誘導カセットを有するアデノウイルスベクターについては現在構築中である

### E. 結論

ヒトに近縁であるカニクイザルを用いて、全身放射線照射や抗がん剤大量投与などの前処置

を行うことなく、骨髄内移植法により遺伝子導入細胞を生着させることができた。さらに SAG システムを併用することにより、1 年以上の長期間に渡り、末梢血における遺伝子導入効率を 10% 近くまで高めること (EPO 投与時) に成功した。また、CGD モデルマウスの系でも、SAG システムを利用した造血幹細胞遺伝子治療の有効性が確認された。

骨格筋組織の人為的分化転換に関する基礎研究では、非造血系組織から造血系を再構築できる可能性を示すことができた。

霊長類 (サル) ES 細胞から造血系再生に必要な基盤技術に関して、SeV ベクターを用いた遺伝子導入法、造血系への *in vitro* 分化誘導法、サル胎仔への同種移植技術を開発した。

その他、TVI 法の開発研究を推進した。

### 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) Hara, T., Kume, A., Hanazono, Y., Mizukami, H., Okada, T., Tsurumi, H., Moriwaki, H., Ueda, Y., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther.*, in press

2) Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and Ozawa, K.: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol. Biotechnol.* (in press)

3) Nagashima, T., Ueda, Y., Hanazono, Y., Kume, A., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Ozawa, K., and Hasegawa, M.: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the

- erythropoietin receptor as a molecular switch. *J. Gene Med.* 6: 22-31, 2004.
- 4) Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takano, K., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther.* 11: 253-259, 2004.
  - 5) Xu, R., Kume, A., Hanazono, Y., Matsuda, K.M., Ueda, Y., Hasegawa, M., Takaku, F., and Ozawa, K.: G-CSF receptor-mediated STAT3 activation and granulocyte differentiation in 32D cells. *Gene Ther. Mol. Biol.* 7:167-172, 2003.
  - 6) Ishii, H., Vecchione, A., Furukawa, Y., Sutheesophon, K., Han, S.Y., Druck, T., Kuroki, T., Trapasso, F., Nishimura, M., Saito, Y., Ozawa, K., Croce, C.M., Huebner, K., and Furukawa, Y.: Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol. Cancer Res.* 1: 940-947, 2003.
  - 7) Itoh, A., Okada, T., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H., Kume, A., Takatoku, M., Komatsu, N., Hanazono, Y., and Ozawa, K.: A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J. Gene Med.* 5: 929-940, 2003.
  - 8) Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatsuji, N., and Shimada, K.: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J. Gene Med.* 5: 921-928, 2003.
  - 9) Asano, T., Ageyama, N., Takeuchi, K., Momoeda, M., Kitano, Y., Sasaki, K., Ueda, Y., Suzuki, Y., Kondo, Y., Torii, R., Hasegawa, M., Ookawara, S., Harii, K., Terao, K., Ozawa, K. and Hanazono, Y.: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 76: 1061-1067, 2003.
  - 10) Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K. and Mano, H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 123: 288-296, 2003.
  - 11) Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K. and Mano, H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 123: 288-296, 2003.
  - 12) Shibata, H., Hanazono, Y., Ageyama, N., Nagashima, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Ozawa, K., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am. J. Primatol.* 61: 3-12, 2003.
  - 13) Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and Ozawa, K.: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J. Gen. Virol.* 84: 2127-2132, 2003.
  - 14) Kametaka, M., Kume, A., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., and Ozawa, K.: Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera. *Cancer Sci.* 94: 639-643, 2003.
  - 15) Nagai, T., Tarumoto, T., Miyoshi, T., Ohmine, K., Muroi, K., Komatsu, N., Sassa, S., and Ozawa, K.: Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. *Br. J. Haematol.* 121: 657-661, 2003.
  - 16) Ohmine, K., Nagai, T., Tarumoto, T., Miyoshi, T., Muroi, K., Mano, H., Komatsu, N., Takaku, F., and Ozawa, K.: Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell



- line, KCL22/SR. *Stem Cells* 21: 315-321, 2003.
- 17) Mori, M., Uchida, M., Watanabe, T., Kirito, K., Hatake, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J. Cell. Physiol.* 195: 290-297, 2003.
- 18) 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 170-176, 2003.
- 19) Kume, A., Koremoto, M., Xu, R., Okada, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Hasegawa, M., and Ozawa, K.: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J. Gene Med.* 5: 175-181, 2003.
- 20) Kami, M., Hamaki, T., Miyakoshi, S., Murashige, N., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., Taniguchi, S., Hirai, H., Ozawa, K., and Kasai, M.: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.* 120: 304-309, 2003.
- 21) Komatsu, N., Watanabe, T., Uchida, M., Mori, M., Kirito, K., Kikuchi, S., Liu, Q., Tauchi, T., Miyazawa, K., Endo, H., Nagai, T., and Ozawa, K.: A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. *J. Biol. Chem.* 278: 6411-6419, 2003.
- 22) Ageyama, N., Kimikawa, M., Eguchi, K., Ono, F., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (*Macaca mulata*). *J. Clin. Apheresis.* 18(1): 26-31, 2003.
- 23) Kirii, Y., Inoue, T., Yoshino, K., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and Terao, K.: Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand. *J Immunol Methods.* 278: 201-209, 2003.
- 24) Hanazono, Y., Asano, T., Ueda, Y., and Ozawa, K.: Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. *Trends Cardiovas. Med.* 13: 106-110, 2003.
- 25) Ishii, H., Ozawa, K., and Furukawa, Y.: Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update. *J. Exp. Ther. Oncol.* 3: 291-296, 2003.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
- 1) 発明の名称：選択的増殖性を付与する遺伝子  
出願番号：特願平9-531668  
出願日：1969年3月5日  
公開番号 W097/32971  
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) 発明の名称：A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal  
出願番号：60/483,357号  
発明者：長谷川護  
(米国仮出願済み)
- 3) 発明の名称：胚性幹細胞に遺伝子を導入する方法  
出願番号：特願2003-62289  
出願日：2003年3月7日  
発明者：花園豊、佐々木京子、上田泰次  
井上誠
- 4) 発明の名称：霊長類動物の胚性幹細胞から造血系細胞への分化の方法  
出願番号：特願2003-153494  
出願日：2003年5月29日  
発明者：花園豊、佐々木京子

## (資料1) 班會議資料

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
[第 1 回班会議]  
造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究  
(H15-再生-014)

日時：平成 15 年 9 月 13 日（土）午後 1 時～4 時  
場所：自治医科大学研修センター 1 階中研修室 2、3

## プログラム

12：30～13：00 昼食（軽食を用意します）

13：00～13：05

主任研究者挨拶 自治医科大学・内科学講座血液学部門、遺伝子治療研究部 小澤 敬也

13：05～15：00

I) 選択的増幅遺伝子（SAG）プロジェクト

13：05～13：30

1) Epo 反応型 SAG の開発状況

（株）ディナベック研究所・研究開発部 上田 泰次、長谷川 護

13：30～13：55

2) Epo 反応型 SAG を利用したマウス慢性肉芽腫症モデルでの遺伝子治療実験

自治医科大学・遺伝子治療研究部 久米 晃啓

13：55～14：20

3) カニクイザルを用いた骨髄還流置換技術の開発

国立感染症研究所・筑波霊長類センター 寺尾 恵治

14：20～14：45

4) 選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法を組み合わせた新しい造血幹細胞遺伝子治療法に関するサルを用いた検討

自治医科大学・再生医学研究部 花園 豊

14：45～15：00

5) 総合討論—今後の研究方針

15：00～15：10 休憩

15：10～16：00

II) その他の研究テーマの進捗状況

各分担研究者からの報告

（筋肉から造血系への分化転換、サル ES プロジェクト、SIV ベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入、部位特異的遺伝子導入法、TPC 将来構想「医薬基盤研究所構想と霊長類センターの役割」など）

主任研究者 小澤 敬也

事務局：〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1

自治医科大学・分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部（高田 明美）

TEL (0285) 58-5258 FAX (0285) 44-8675

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
「造血系再生医療への応用を目的とした増殖分化制御システムの開発研究」  
（H15-再生-014 主任研究者：自治医科大学・小澤敬也）  
第 1 回班会議議事録

[日時]

平成 15 年 9 月 13 日（土） 12:55～16:05

[場所]

自治医科大学研修センター1階 中研修室 2・3

[参加者]

自治医科大学・遺伝子治療研究部

小澤敬也、久米晃啓、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、松下卓、信吉正治

同・再生医学研究部

花園豊、佐々木京子

同・内科学講座血液学部門

高德正昭、岡田真由美

株式会社ディナベック研究所・研究開発部

上田泰次

国立感染症研究所・筑波霊長類センター（TPC）

寺尾恵治

[議事要旨]

主任研究者挨拶：小澤敬也

本研究班は平成 12-14 年度の第一期 3 年間に引き続く第二期目であるが、元々ミレニアムプロジェクトの一環として発足した研究班であるので、計 5 年間、すなわち 2 年計画の 1 年目にあたる（添付資料 1「厚生労働科学研究費補助金交付申請書様式 A-1」参照）。第二期目スタートにあたり、主に選択的増幅遺伝子の開発・応用に焦点を絞り、若干分担研究者の入れ替えを行った。2 年間で研究計画を達成し、さらに今後発展を望めるよう、分担各位の奮闘に期待する。

ヒューマンサイエンス振興財団より、研究者招聘・派遣・活用の案内（添付資料 2「平成 15 年度ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業の募集について」参照）が来ているが、〆切が本年 10 月 3 日と迫っているので、希望があれば早急に申し込まれたい。

また、昨今の文部科学省・厚生労働省よりの通達にもあるように、研究費支出にあたっては、これまでもまして厳正な執行が求められているので、消耗品以外の支出については事前に事務局と協議の上で願います。

第 1 部：選択的増幅遺伝子（SAG）プロジェクト

以下のテーマにつき各分担研究者が報告した（添付資料 3-6 参照）。

1) エリスロポエチン（Epo）反応型 SAG の開発状況（ディナベック 上田泰次、長谷川護；添付資料 3）

ステロイド結合ドメインを分子スイッチに用いた第一世代の SAG では、細胞増殖シグナル発生装置としての顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体（GcR）やトロンボポエチン受容体（Mpl）を生かし切れない。そこでヒト Epo 受容体（EpoR）細胞外部分を分子スイッチに用いた第二世代 SAG システムとして、シグナル発生装置を EpoR、ヒト Mpl、分化シ

グナル減弱型マウス GcR (mY703FGcR) にしたキメラ分子を構築し、それぞれヒト臍帯血 CD34 陽性細胞、マウス骨髄細胞に発現させて、エリスロポエチン刺激による増幅効果を比較した。結論として、EpoR-Mpl キメラが最も強力かつ持続的な増幅効果を発揮し、マウスの骨髄移植ならびに二次移植の系でも *in vivo* 増幅が確認された。

しかしながら、実際の臨床応用を考えた場合、当面の対象疾患である慢性肉芽腫症 (CGD) が顆粒球の疾患であり GcR のシグナルが適すること、Mpl の遺伝子変異による発癌の危険性もゼロとは言えないことなどから、EpoR-GcR キメラの開発を先行させることとした。臨床応用のため、キメラ分子の全てのパーツをヒト由来の野生型蛋白質とする。ヒト EpoR の細胞外部分とヒト GcR の膜貫通部および細胞内部分を BamHI リンカー (Gly-Ser の 2 アミノ酸付加) でつないだバージョン 1、または HindIII リンカー (Lys-Leu の 2 アミノ酸付加) でつないだバージョン 2 を作製した。ただし、マウスとヒトの GcR は相同性がやや低く、用いたヒト GcR が実際に正しい膜貫通部以下であるかについては若干疑問がある。

いずれにせよ、構築したヒト型 EpoR-GcR キメラは、Ba/F3 細胞に発現させた場合は全長 EpoR・EpoR-Mpl・EpoR-mY703F キメラに遜色ない増幅効果を発揮した。しかし、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いた *in vitro* での増幅効果は、他の Epo 反応型キメラに比べてやや劣った。キメラ構築における接合部分の最適化が今後の課題である。

(質疑応答)

小澤： 増幅シグナル確認に用いた Ba/F3 細胞のサイトカイン依存性は大丈夫か？

上田： 増殖因子なしでは増えないことを確認している。ヒト GcR の分化シグナルを弱めることも検討すべきか？

小澤： 安全性を考えると、まず野生型から始めるべきだろう。

久米： 接合部の問題、特に膜貫通部は GcR より EpoR の方を使うべきではないか？

上田： 実際にやってみないとわからない。

小澤： 臍帯血では、EpoR-GcR は EpoR-Mpl ばかりか EpoR 全長より増幅効果が落ちるが、CGD を対象疾患として考えるなら、やはり GcR のシグナルを使うべきだろう。

## 2) Epo 反応型 SAG を利用したマウス慢性肉芽腫症モデルでの遺伝子治療実験 (自治医大 遺伝子治療 久米晃啓; 添付資料 4)

第一世代 SAG を総括すると、増殖シグナル発生装置としては GcR より Mpl の方が強力であること、分子スイッチとしてはエストロゲン結合ドメイン (ER) にせよタモキシフェン結合ドメイン (TmR) にせよあまり強力でないことは、前演者が述べたとおりである。それでも、レトロウイルスベクターで治療用遺伝子と GcRER タイプの SAG を X 連鎖型 CGD

(X-CGD) モデルマウスの骨髄細胞に同時に導入し、これを移植後エストロゲンで刺激して機能を回復した好中球を増やすことには成功しており、当教室の原が今年の米国血液学会で報告した。特に注目すべきは、遺伝子導入して移植後 9 ヶ月後に初めてエストロゲン投与した群でも、刺激により正常化好中球が急激に増えたことである。治療用遺伝子自体が増殖優位性をもたらさない CGD のような疾患では、SAG が有効に働くことを示唆している。

Epo 反応型の第二世代 SAG としては、まず EpoR-Mpl キメラを用いて X-CGD モデルマウスにおける *in vivo* 増幅を検討した。第一世代 SAG の実験と同様、遺伝子導入・移植後 4 週毎に 6 回薬剤投与、この場合 Epo を皮下注した。エストロゲン反応型と違い、初回・2 回目の投与では明らかな増幅は認められなかったが、3 回目の投与後から正常化好中球が増え始め、5 回目の投与後ピークに達した。この時間経過の違いは、GcR の増殖シグナルがある程度分化した顆粒球前駆細胞で最も強力に働くのに対し、Mpl のシグナルは主により未分化な細胞で働くため、増幅された細胞が末梢に出てくるまでに時間がかかるためだと考えている。

Epo 反応型 SAG が CGD 遺伝子治療に有用であることが原理的に示されたので、安全性等の観点からシグナル発生装置を GcR に置き換えてキメラを作製した。当教室の原が、ヒト EpoR 細胞外部分にマウスの野生型 GcR の細胞内部分をつなぎ、Ba/F3 細胞での増幅効果を検討した。同時に検討した EpoR-Mpl に比べると、GcR 由来の増幅シグナルはやや弱いという結果となり、DNAVEC での実験結果と共通している。

今後の検討課題としては、EpoR と GcR のつなぎ方を最適化する。シグナルの強さはまず Ba/F3 細胞やヒト由来の UT-7 細胞で、次いでマウス骨髄前駆細胞で確かめる。有望なものについては X-CGD マウスでの *in vivo* 増幅実験をするが、実際の臨床応用を想定して前処置なしのホストに移植した場合でも *in vivo* 増幅可能であることを示すことが必要である。この場合、生着率がかなり低くなるので、直接骨髄内に遺伝子導入細胞を注入するなどして、生着率を高める必要がある。

(質疑応答)

小澤： EpoR-Mpl を用いたマウスの *in vivo* 増幅実験で、ディナベックでは Epo 投与の効果が比較的早く現れたのに対し、自治医大ではやや遅れて効果が出現したのは、Epo の投与方法の違いか、あるいは当初のマーキングレベルの違いによるのか？

上田： 元々の遺伝子導入効率の違いか、あるいはアッセイ法の違い、ディナベックでは末梢血中の全白血球を測っているのに対し、自治医大では成熟顆粒球のみ測っているためかもしれない。実際の CGD 患者では G-CSF 投与は無効なのか？

久米： 無効である。遺伝子治療の場合でも、正常化した細胞を選択的に増やすとは考えにくい。

小澤： CGD に対してはインターフェロン- $\gamma$  (IFN) 投与は有効だが、その作用機序はわかっているのか？

岡田真： IFN が有効な症例は約1/3で、その中にはスプライシング異常が是正される例も報告されているが、大部分は機序不明である。NADPH oxidase がわずかでも発現している患者ではそれが増大するという説明が可能だが、実際には全欠損の患者でも臨床効果があったりする。

小澤： 日本ではどのくらい移植が行われているのか？

岡田真： 昨年末の段階で骨髄移植が 13 例、重症複合免疫不全症ほど成績は良くない。臍帯血移植は全例不成功に終わっている。ちなみに米国での骨髄移植後の 5 年生存率は約 60% である。

久米： ミニトランスプラントでも死亡率 25% と、リスクは決して小さくない。

3) サルを用いた遺伝子治療プロトコールの有用性評価に関わる基盤技術の開発 (TPC 寺尾恵治; 添付資料 5)

本日は、1) ヒトレコンビナントタンパク質に対する抗体産生とその抑制、2) 骨髄還流置換技術の開発、3) 中国産カニクイザルで生じた移植後死亡例について報告する。

まず、ヒトレコンビナントタンパク質に対する抗体産生とその抑制について。Epo 反応型 SAG をサルに用いた最初の例では、ヒト Epo を 3000 単位/kg、週 3 回連続投与したところ、投与開始 2 週間には明らかな抗体産生を認め、ヒト Epo がこのサルの血中から消失した。そこで 2 匹目からは Epo を 200 単位/kg、2 週で 6 回投与に減量し、同時に Cyclosporin A (CyA) 投与を併用して、ヒト Epo に対する抗体産生を抑制するのに成功した。

移植細胞の生着率を高めるため、骨髄内に直接注入する方法を検討した。予備実験として、サル長管骨の両端に穴をあけ、骨髄内圧を測定しつつ生食で陽圧にて還流する方法と、陰圧で還流する方法を試した。いずれもかける圧に相当して骨髄内圧の変動がみられたが、陽圧法では骨髄血が相当量末梢血に混入したのに対し、陰圧法では末梢血への混入がみられなかった。この結果から、脂肪塞栓等の合併症を起こさないためには後者が適当である

と結論し、生食 50ml で陰圧をかけながら骨髓腔を還流してから細胞を注入している。

当初本研究では TPC 内で繁殖した東南アジア産カニクイザルを用いて骨髓移植および末梢血幹細胞移植プロトコルを確立したが、このコロニーのサルに継続使用が不可能になったため、中国産カニクイザルを購入して実験に使い始めた。ところがこれらのサルが6頭連続して術後死亡し、骨髓内輸注した1匹だけが長期生存している。剖検所見からは感染症が死因とは認められず、消化器症状が主であるところから、中国産カニクイザルはアカゲザルや東南アジア産カニクイザルに比べて放射線感受性が高いのではないかと考えている。

(質疑応答)

小澤： 術後経過から、死亡したサルでも放射線照射による造血抑制はそれほど強くないと思われる。すると、死因はやはり消化管のダメージによるものか？

寺尾： そう考えている。

#### 4) 選択的増幅遺伝子と骨髓内移植法を組み合わせた新しい造血幹細胞遺伝子治療法に関するサルを用いた検討 (自治医大再生医学 花園豊; 添付資料 6)

前演者と共同で開発したプロトコルを用い、非発現型レトロウイルスベクターで標識したカニクイザル骨髓細胞を前処置なしで自家移植した。一方の大腿骨に細胞を注入後、経時的に注入部位・遠隔部位から骨髓を採取して造血コロニーを作らせ、その DNA から PCR 法にて導入遺伝子を検出した。早くも術後2週目から遺伝子標識コロニーが検出され、その頻度は2%以上にて1年以上推移している。しかも注入した大腿骨のみならず、遠隔部位の骨盤から採取した造血前駆細胞が検出され、骨髓内注入法により移植細胞が速やかに定着し、かつ骨髓と末梢とを往来する能力も損なわれていないことが確認された。ところが、同時に採取した末梢血中の標識細胞頻度はリアルタイム PCR 法にて0.01%以下で、移植細胞の増殖は限定的と推測された。

そこで、EpoR-Mpl 遺伝子を導入した骨髓細胞を自家移植したところ、最初のサルでは Epo 刺激にて0.01%以下から約8%に、2頭目のサルでも約2%に上昇した。ただし、2頭目のサルではヒト由来蛋白質を発現する遺伝子導入細胞に対して細胞性免疫が惹起され、3回目以降の Epo 刺激に反応しなくなった。いずれにせよ、前処置なしの動物に移植した遺伝子導入細胞が末梢血中で約8%まで上昇したのは世界初の結果であり、骨髓内注入と SAG との組み合わせによって初めてなしえた成果である。しかもその増幅効果は顆粒球単球・Tリンパ球・Bリンパ球と多系統にわたっており、LAM-PCR 法によるクローン解析で多クローンであることが確認された。

(質疑応答)

久米： CyA 投与は前演者が示したプロトコルで行ったのか？

花園： その通り行って Epo に対する抗体産生は抑えられたが、細胞性免疫は抑えきれなかった。ただしそれも前例で起こったのではなく2頭のうち1頭のみであることから、個体差があると思われる。また、臨床応用に際しては完全にヒト由来の分子を用いるので、患者においてはこの問題は極めて起こりにくいと考えている。

小澤： SAG なしの場合、前処置を行わないと骨髓と末梢の標識頻度が大きく異なるのはなぜか？前処置をした場合にはこれほど大きな差にはならなかったが。

花園： 今のところ理由は不明である。

上田： 全身ではなく一部に照射したらどうなるか？

花園： 今後の検討課題である。

小澤： 細胞注入前の還流は必要か？

花園： 実際には必要ないかもしれない。注入するときには還流すると損失が大きいので、もう一方の穴はふさいでいる。

高德： 成体サルでは長管骨で造血が行われているのか？

花園： サルのデータはない。ヒトでは長ずるとほとんど造血の場は体幹骨と頭蓋骨のみであり、ヒトに対しては骨盤内注入などを考える必要がある。

寺尾： 東大にてサル骨盤への注入システムを開発中である。

## 5) 総合討論

小澤： 本日の議論をまとめると、大筋において今後どのように研究を進めていくかのコンセンサスは得られた。当面の課題として、CGD を標的疾患として臨床バージョンの EpoR-GcR キメラ開発を急ぐことと、これを用いてサルの系で安全性を確認するとともに明確な増幅効果を示すことがあげられる。ところで、来年4月以降ディナベックが完全民営化されたら、このプロジェクトに対する関わりはどうなるのか？

上田： 現在検討中であり、おそらく民営化直前までわからない。ただ民間企業としては、韓国の Viromed 社が SAG に関するライセンスを買いたいという意向を示している。

小澤： Viromed とは、昨年引き続き、本年は11月8日にソウルで協議する予定なので、研究分担者各位も是非出席されたい。また冒頭申し上げたように、ヒューマンサイエンス財団のリソースも活用して、研究が円滑に進むようにお願いしたい。

## 第2部：その他の研究テーマの進捗状況

以下のテーマにつき各分担研究者が口頭で報告した。

### 1) 非造血組織の分化転換 (久米)

骨格筋に分化抑制遺伝子を導入して造血細胞に転換する研究を行っているが、まだ予備実験の段階である。

### 2) サル胎生幹細胞 (ES 細胞) プロジェクト (花園)

サル ES 細胞に、ディナベックで開発したセンダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。導入遺伝子の発現は長期にわたり安定で、しかも血球・神経・心筋に分化させた後でも保たれていた。

サル ES 細胞を *in vitro* で血球に分化させ、ヒツジの胎仔に注射して造血系キメラ動物を作製した。ヒト細胞に特異的に働く stem cell factor を投与したところ、骨髄前駆細胞の標識率が 1.1-1.6% から 4.7-13% にまで増加した。今後リンパ球への分化も確認したい。

### 3) サル免疫不全症ウイルス (SIV) ベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入 (上田)

近く米国にてサルの造血幹細胞への遺伝子導入実験を開始すべく協議している。

### 4) 部位特異的遺伝子導入法 (岡田尚)

アデノ随伴ウイルスのゲノム繰り返し配列と Rep 蛋白質を用いたシステムを開発中である。

### 5) TPC 将来構想 (寺尾)

厚生労働省関連の研究所再編・独立法人化に向けて、担当部局と協議している。

## 主任研究者挨拶 (小澤)

今回の協議を元に、さらに鋭意研究に励まされたい。今年度第2回目の班会議は、平成16年1月ないし2月に予定している。



(資料 2) 2<sup>nd</sup> CGD-GT Symposium 資料

## 2<sup>nd</sup> CGD-GT Meeting

### Meeting I (3 Hrs.): Open Seminar

Total 45 minutes for Korea side

Dr. Seung Shin Yu (15 min.)

Recent progress in retroviral gene therapy program

Dr. Jong-Mook Kim(15 min.)

Recent progress in naked DNA gene medicine for ischemic disease

Another speaker : not determined (15 min.)

Total 120 minutes for Japan side

Keiya Ozawa (5 min)

Introduction

Akihiro Kume (25 min)

Summary of selective amplifier gene constructs for hematopoietic cell expansion: current in vitro and in vivo data

Masaaki Takatoku (15 min)

Rested cell reinfusion improves engraftment of retrovirally transduced hematopoietic cells in nonhuman primates

Yutaka Hanazono (25 min)

Intra-bone marrow transplantation combined with selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy

Keiji Terao (25 min)

Development of nonhuman primate models for evaluating safety and efficacy of gene therapy

Yasuji Ueda (25 min)

Introduction of DNAVEC Research Inc: development and business of new technology for gene therapy

15 minutes for Coffee Break

### Meeting II (1.5 Hrs.): Closed Meeting

Detailed discussions on

- 1) Vector development for animal experiment and clinical trial for CGD
- 2) Licensing of SAG system
- 3) Possibility of industrial collaboration between DNAVEC and ViroMed

**Sunyoung Kim D.Phil**

Professor, School of Biology Sciences, Seoul National University

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

Vice Director, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Japan

**Seung Shin Yu Ph.D.**

Director, R&D Center, ViroMed

- Recent progress in retroviral gene therapy program

**Akihiro Kume Ph.D.**

Associate Professor, Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

- Summary of selective amplifier gene constructs for hematopoietic cell expansion: current in vitro and in vivo data

**Masaaki Takatoku Ph.D.**

Assistant Professor, Division of Hematology Department of Medicine, Jichi Medical School, Japan

- Rested cell reinfusion improves engraftment of retrovirally transduced hematopoietic cells in nonhuman primates

**Yutaka Hanazono Ph.D.**

Associate Professor, Division of Regenerative Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

- Intra-bone marrow transplantation combined with selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy

**Keiji Terao Ph.D.**

Associate Professor, Department of Medical Science, Tsukuba University, Japan

- Video: Introduction of Tsukuba Primate Center

- Development of nonhuman primate models for evaluating safety and efficacy of gene therapy

**Jong-Mook Kim Ph.D.**

Senior Research Scientist, R&D Center, ViroMed

- Recent progress in naked DNA gene medicine for ischemic disease

**Yasuji Ueda Ph.D.**

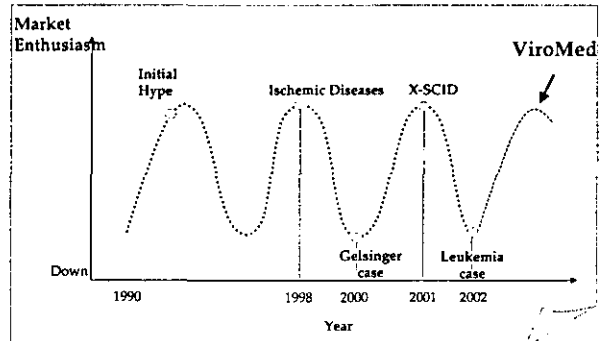
Department Head, Department of Technology Development, DNAVEC Research Inc. Japan

- Introduction of DNAVEC Research Inc: development and business of new technology for gene therapy

# JMS-SNU 2nd Gene Therapy Symposium

2003年 11月 8日  
Seoul National University

## UPs and DOWNs of Gene Therapy



ViroMed is committed to playing a major role(s) in the coming upsurge

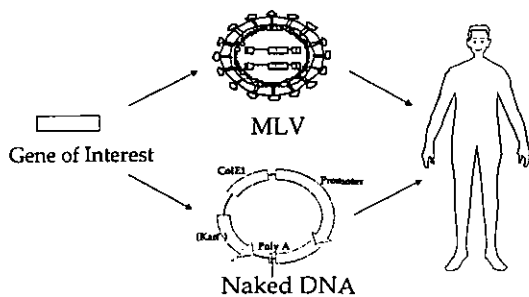
## Conclusion

- ☐ Gene therapy has potential to become the drug of the 21<sup>st</sup> century.
- ☐ This is a typical future oriented technology and a high risk but high return style investment.
- ☐ Still a number of problems exist. → There is much room for us to make improvements, providing us with great opportunities and the time to build up competitiveness.
- ☐ Success will come to the one(s) who finds the right target diseases at the fastest time.

## Milestones achieved

- ☐ Phase I trial for ischemic limb disease was completed in June 2003.
- ☐ Signing of an international collaborative clinical trial agreement with Genethon (France).
- ☐ Establishment of Gene Therapy Clinic for Immune Deficiency and Metabolic Disorders. (Children's Hospital, SNU)

## Platform Technology on Gene Delivery Systems



Our gene delivery systems are safer and more efficient than any other competitors.

[www.viomed.co.kr](http://www.viomed.co.kr)

## Improvement of Safety Feature of MT-Based Retroviral Vectors

- ☐ SIN
- ☐ Suicide gene
- ☐ Insulator