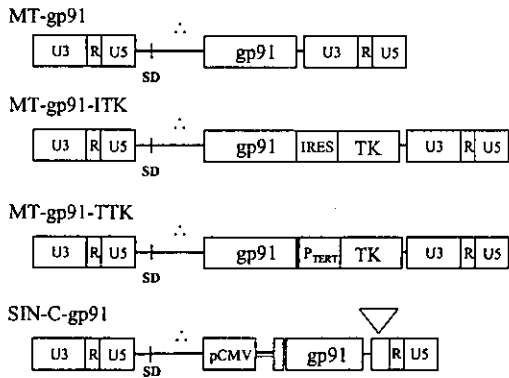
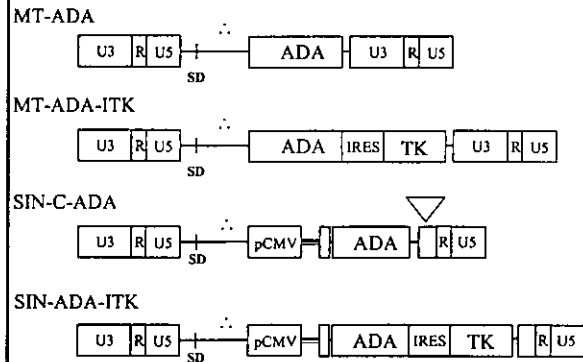


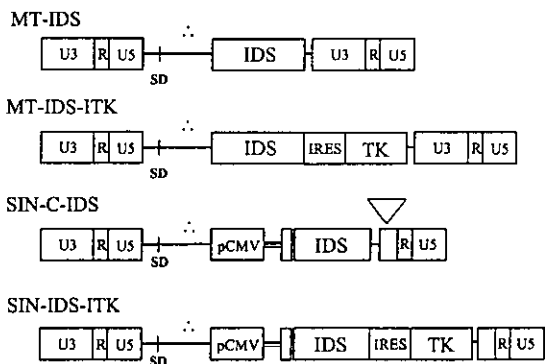
### Improved Retroviral Vectors for CGD



### Improved Retroviral Vectors for ADA-SCID



### Improved Retroviral Vectors for Hunter Syndrome



### Topics to be discussed

1. Use of animal model
  - murine
  - primate
2. Use of SAG technology
3. Possible alliance with Dनावेक

## 2ND SNU-JMS MEETING (NOVEMBER 8, 2003; SEOUL, KOREA)

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

Akihiro Kume, MD, PhD, JMS Genetic Therapeutics

### I. AIM

Selective amplifier gene (SAG)

ligand-controlled molecular switch + signal generator

Target disease: X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD; gp91 deficiency)

### II. ACHIEVEMENTS

1st generation SAG: steroid-responsive type

estrogen receptor (ER) as a molecular switch

G-CSF receptor (GcR) as a signal generator

- # in vivo expansion demonstrated in murine and primate models
- # human gp91-IRES-GcRER vector expanded corrected PMN in murine CGD
- # chimeric receptors generate weaker growth signal than native receptors
- # high-dose steroid administration may be problematic

2nd generation SAG: erythropoietin (Epo)-responsive type

Epo receptor (EpoR) as a molecular switch

EpoR, GcR or Mpl as a signal generator

- # Ba/F3 cells: EpoR, murine GcR and Mpl worked equally
- # cord blood CD34+ cells: Mpl worked best, next EpoR and murine GcR
- # mouse in vivo expansion: Mpl worked best
- # targeting granulocyte progenitors → GcR signal may be safer

### III. QUESTION / DISCUSSION

Humanizing EpoR-GcR

- # earlier EpoR-hGcR worked less effective than EpoR-mGcR
- # EpoR-GcR junction?

In vitro expansion → evaluate with human cells

- # Ba/F3, bone marrow progenitors are mouse-derived
- # UT7, cord blood CD34+, CGD patient bone marrow/mobilized progenitors

In vivo expansion → proof of principle in mice

- # nonablated hosts
- # intra-bone marrow injection

Vector safety

- # gag-minimized backbone?

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

Masaaki Takatoku<sup>1</sup>, Stephanie Sellers<sup>2</sup>, Brian A. Agricola<sup>2</sup>, Mark E. Metzger<sup>2</sup>, Ikunoshin kato<sup>3</sup>, Robert E. Donahue<sup>2</sup>, Cynthia E. Dunbar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School, <sup>2</sup> Hematology Branch, NHLBI, NIH, <sup>3</sup> Biotechnology Research Laboratories, TaKaRa Shuzo Co.

We have recently reported improved efficiency by additional cytokines such as Flt-3 ligand (FLT) and stromal or fibronectin fragment CH-296 (FN) support during transduction of hematopoietic stem cells in nonhuman primates. However the levels achieved are still below those necessary for many clinical applications. Some studies have suggested that actively cycling primitive hematopoietic cells have an engraftment defect compared with quiescent cells in the G0 phase of the cell cycle. In the murine model, there is some evidence that this defect may be reversible, if cells are allowed to come back out of active cycle before transplantation. We used nonhuman primates to investigate this finding, which has direct implications for clinical transplantation and gene therapy applications. Transfer of rhesus CD34+ cells to culture in stem cell factor (SCF) on the FN after 4 days of culture in stimulatory cytokines maintained cell viability but decreased cycling. Using retroviral marking with two different gene transfer vectors, we compared the engraftment potential of cytokine-stimulated cells versus those transferred to nonstimulatory conditions (SCF on FN alone) before reinfusion. In vivo competitive repopulation studies showed that the level of marking originating from the cells continued in culture for 2 days with SCF on FN following a 4-day stimulatory Transduction was significantly higher than the level of marking coming from cells transduced for 4 days and reinfused without the 2-day culture under nonstimulatory conditions. We observed stable in vivo overall gene marking levels of up to 29%. This approach may allow more efficient engraftment of transduced or ex vivo expanded cells by avoiding active cell cycling at the time of reinfusion.

## **Intra-Bone Marrow Transplantation Combined With Selective Amplifier Gene for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy.**

Yutaka Hanazono, M.D., Ph.D.

Division of Regenerative Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan.

The successful engraftment of genetically modified hematopoietic stem cells without toxic conditioning is a highly desirable goal for the hematopoietic stem cell gene therapy for CGD. However, the conventional transplantation method (i.e. intravenous injection of gene-modified hematopoietic stem cells) without marrow conditioning resulted in disappointingly low levels of engraftment in humans and nonhuman primates.

In this meeting, I will show a potentially effective approach around this obstacle, implanting gene-modified cells directly into the bone marrow cavity (intra-bone marrow transplantation, iBMT), followed by the *in vivo* selective expansion by selective amplifier gene (SAG). I will present some data about this approach in a nonhuman primate model. This method would allow clinically relevant levels of *in vivo* gene transduction without marrow conditioning.

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

Keiji TERAO

Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases

Gene therapy, new powerful medical treatment, primarily came into the world to save the patients with genetic diseases by inserting or modifying target gene using newly developed vectors. Today, this technology is improving its potential to expand the application field to cancer, metabolic diseases and age-related disorders. The increase in number of target diseases resulted in the increase in number of strategies including new vector, new drug (gene) delivery system and new clinical protocol. The safety and efficacy of such novel approach must be evaluated using laboratory animals before human trial.

The nonhuman primates are considered to be the most suitable model animals to evaluate the safety and efficacy of newly developed gene therapy technology, because every treatment uses human gene as target, and the function of target gene can be estimated by using only nonhuman primates. Therefore, the useful animal models must be established using nonhuman primates to establish the most practical and effective gene therapy system,

In general, the process for establishment of gene therapy technology can be divided into the following three steps.

### The first step: development of new vector

Several devised vectors are now being developed in the world. The transduction efficiency to different kinds of tissue cells must be firstly determined using primary cells prepared from primate tissues. The cytotoxicity induced by vector must also be determined *in vitro*.

Then next, the safety and efficacy are evaluated *in vivo* using promising vector which shows high transduction efficiency to target cells and no serious cytotoxicity in *in vitro* evaluation. Several clinical parameters are monitored after inoculating excess dose of vector and pathological examination is necessary to demonstrate the host response to vector. Immune response to vector is also important to evaluate the efficacy of vector.

### The second step: Establishment of efficient drug (vector) delivery system

When the safety and efficacy of newly established vector were verified, the most effective vector delivery system must be determined. Different injection routes of vector are compared based on the distribution of vector among tissues and gene expression in target cells.

### The 3rd step: Establishment of Clinical Protocol of Gene Therapy

The final step is pre-clinical trial to target particular disease using vector carrying therapeutic gene. This step needs disease model to evaluate the efficacy of gene therapy protocol including vector, therapeutic gene and gene delivery system. The usefulness of protocol must be judged by the improvement of host condition.

The new facility was constructed five years ago in Tsukuba Primate Center. One of the purposes of this facility is establishment of nonhuman primate model to evaluate new gene therapy technology. The function of new facility and the current findings in evaluation of new gene therapy technology will be presented.

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) 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

分担研究者 久米 晃啓 自治医科大学医学部助教授

研究要旨

エリスロポエチン受容体細胞外部分をもつキメラ分子の遺伝子（新規「選択的増幅遺伝子」）を導入することにより、慢性肉芽腫症モデルマウスに対する遺伝子治療の効果を増大させた。マウス骨格筋に *msx1* 転写因子遺伝子を導入して脱分化を促し、さらに *in vitro* にて造血系細胞へと分化誘導した。

A. 研究目的

(1) 慢性肉芽腫症の治療法開発

幹細胞移植による造血系再生の安全性と治療効果向上のため、対象疾患に応じて必要な細胞集団を随意制御する技術を開発する。本課題の対象疾患である慢性肉芽腫症（CGD）は造血幹細胞移植により根治しうるが、適合ドナーの不足、強力な前処置に続発する感染症、重篤な移植片対宿主病など問題も多い。ゆえに遺伝子治療法の確立が切望されているが、現在の技術では臨床効果をあげるために必要な細胞数の確保が困難である。われわれは、治療用遺伝子と細胞増幅用遺伝子（選択的増幅遺伝子）を同時に導入して機能を回復した顆粒球系細胞を増幅することを目指す。

(2) 体性幹細胞の分化転換実験

造血幹細胞移植のドナーソースとして、自己の非造血組織中の体性幹細胞が利用できれば、ドナー不足解消につながり、しかも拒絶や移植片対宿主病のおそれがない。

ここでは、大量に存在する骨格筋組織に存在する筋芽細胞や衛星細胞に一過性に脱分化遺伝子 *msx1* を発現させ、造血細胞への分化転換を図る。本遺伝子を筋組織に強制発現させた際に出現する単核球細胞は、軟骨細胞・脂肪細胞・骨細胞などに再分化させ得ることが報告されており、適当な分化刺激により造血系細胞へと誘導することも可能と考える。

B. 研究方法

(1) 慢性肉芽腫症の治療法開発

X連鎖性CGD(X-CGD)の治療用にヒトgp91遺伝子、選択的増幅遺伝子としてエリスロポエチン受容体細胞外部分とトロンボポエチン受容体細胞内部分のキメラ蛋白質(EpoRMp1)遺伝子を搭載するレトロウイルスベクターを構築し、X-CGDモデルマウスの骨髄細胞に両遺伝子を導入した。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

構築後エリスロポエチンを投与し、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。

## (2) 体性幹細胞の分化転換実験

Msx1発現用アデノ随伴ウイルスベクター（AAV/msx1）を作製し、前脛骨筋に注入した。筋注後1週から4週にわたり、1週毎に前脛骨筋からの単核球細胞を分離採取し、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。

### （倫理面への配慮）

動物実験は、自治医科大学倫理委員会において当該研究の承認を受けた上で、動物愛護に関する学内ガイドラインに沿って遂行した。

## C. 研究結果

### (1) 慢性肉芽腫症の治療法開発

ヒトgp91-EpoRMpl遺伝子導入細胞にて造血系を再構築したX-CGDマウスにエリスロポエチンを4週毎反復投与したところ、機能回復顆粒球が増加した。DHR法陽性顆粒球の割合は、エリスロポエチン投与3回目以降有意に上昇し、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 ( $p = 0.01$ )。機能回復顆粒球の絶対数もエリスロポエチン投与群で高い傾向が認められた ( $1349 \pm 1010/\mu\text{l}$  対  $268 \pm 82/\mu\text{l}$ )。

### (2) 体性幹細胞の分化転換実験

フローサイトメトリー解析では、AAV/msx1投与筋肉由来の単核球において造血前駆細胞/幹細胞分画の増加が認めら

れた。CD34<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>分画は、未処理群の $1.3 \pm 0.9\%$ に対し、AAV/msx1筋注4週後には $13.6 \pm 6.0\%$ に増加した。またCD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>分画は、未処理群の $2.4 \pm 0.4\%$ から、AAV/msx1筋注2週後に $36.0 \pm 8.1\%$ に増加し、その後平衡状態に達した。

これに対応し、msx1強制発現により*in vitro*での造血前駆細胞活性も増大していた。未処理前脛骨筋由来単核球細胞 $5 \times 10^4$ 個から生じた造血コロニーの総数は $0.44 \pm 0.97$ にすぎなかったのに対し、AAV/msx1筋注後は時間経過とともに増加し、3週間で最大 ( $7.41 \pm 3.66$ ) となった。このときの造血コロニーの内訳は、顆粒球系 ( $3.12 \pm 3.31$ ) と単球系 ( $3.35 \pm 1.93$ ) が優勢だったが、赤芽球系 ( $0.88 \pm 1.22$ ) も認められた。

## D. 考察

エリスロポエチン反応型キメラ受容体をコードする選択的増幅遺伝子がCGDに対する治療効果を増大させることを確認した。ただし、われわれが先に開発したエストロゲン反応型キメラ受容体に比し、薬剤刺激に反応して末梢血中の遺伝子導入細胞が増加するまでのタイムラグが大きく、これは増殖シグナル発生源となる細胞内部分の違いによるのかもしれない（これまで用いてきた顆粒球コロニー刺激因子受容体に替え今回はトロンボポエチン受容体を使用）。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顆粒球コロニー刺激因子受容体細胞内部分を組み合わせ、新しいキメラ分子の構築を進めている。

骨格筋にmsx1遺伝子導入により脱分化した細胞に、造血系増殖因子を作用させて

造血前駆細胞へと誘導できた。ここで得られた前駆細胞には顆粒球・単球系のみならず赤芽球系も含まれており、*msx1* による脱分化後に造血幹細胞の段階を経てコロニーを形成したことが示唆される。従って、*msx1* 投与骨格筋から得られた細胞は、*in vivo* 造血系再構築能をもつと期待される。

## E. 結論

選択的増幅遺伝子は造血幹細胞遺伝子治療の効果を高めるために有用であるが、対象疾患に合わせてさらに改良を進める必要がある。骨格筋組織の体性幹細胞の人為的分化転換により、造血幹細胞ドナーソースが拡大できる可能性がある。

## F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

1. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Katsura K, Katayama Y, Ozawa K: Distinct patterns of gene transfer to gerbille hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci Lett* 340(2):153-157, 2003
2. Kametaka M, Kume A, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Ozawa K: Reduction of CTLL-2 Cytotoxicity by Inducible Apoptosis with a Fas-estrogen Receptor Chimera. *Cancer Sci* 94(7):639-643, 2003
3. Urabe M, Kogure K, Kume A, Sato Y, Tobita K, Ozawa K: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J Gen Virol* 84(8):2127-2132, 2003
4. Itoh A, Okada T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizukami H, Kume A, Takatoku M, Komatsu N, Hanazono Y, Ozawa K: A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J Gene Med* 5(11):929-940, 2003
5. Xu R, Kume A, Hanazono Y, Matsuda KM, Ueda Y, Hasegawa M, Takaku F, Ozawa K: G-CSF receptor-mediated STAT3 activation and granulocyte differentiation in 32D cells. *Gene Ther Mol Biol* 7: 167-172, 2003
6. Kohno T, Mizukami H, Suzuki m, Saga Y, Takei Y, Shimpo M, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Sato I, Ozawa K: Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res* 63(16):5091-5094, 2003
7. Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, Ozawa K: Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol Ther* 8(6):895-902, 2003
8. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, 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(1):22-31, 2004

9. Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, Matsushita T, Urabe M, Kume A, 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

10. Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Ueda Y, Hasegawa M, 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

11. Mochizuki S, Mizukami H, Ogura T, Kure S, Ichinohe A, Kojima K, Matsubara Y, Kobayashi E, Okada T, Hoshika A, Ozawa K, Kume A: long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther*, in press

12. Mochizuki S, Mizukami H, Kume A, Muramatsu S, Takeuchi K, Matsushita T, Okada T, Kobayashi E., Hoshika A, Ozawa K: Adeno-Associated Virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther Mol Biol*, in press

## (2) 学会発表

1. 望月慎史、水上浩明、小倉剛、岡田尚巳、花園豊、小林英司、松原洋一、星加明德、小澤敬也、久米晃啓: AAV ベクターを用いたフェニルケトン尿症に対する遺伝子治療。第106回日本小児科学会学術集会、2003.4.26、福岡(日本小児科学会雑誌 107(2):212, 2003)

2. Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, Shimpo M, Nomoto T, Takeuchi K, Matsushita T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Ikeda U, Ishibashi S, Shimada K, Ozawa K: Intramuscular administration of AAV5-mIL10 into apoprotein E-deficient mice inhibits atherogenesis through anti-inflammatory and cholesterol-lowering effects. The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2003.6.5, Washington, DC, USA. (*Mol Ther* 7(5):S22, 2003)

3. Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Iwata-Okada M, Yoshioka T, Takahashi M, Ajalli R, Liu Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Ozawa K: The histone deacetylase inhibitor enhanced recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression in cancer cells. The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2003.6.5, Washington, DC, USA. (*Mol Ther* 7(5):S47, 2003)

4. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Ono F, Kobayashi E, Muramatsu S, Madoiwa S, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Terao K, Ozawa K, Sakata Y: Muscle-mediated human factor IX

expression in Cynomolgus monkey using AAV serotype-derived vectors. The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2003.6.5, Washington, DC, USA. (Mol Ther 7(5):S81, 2003)

5. Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: Muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using AAV1 vector can suppress ovarian cancer growth in nude mice. The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2003.6.5, Washington, DC, USA. (Mol Ther 7(5):S136, 2003)

6. Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Hasegawa M, Ozawa K: Boosting respiratory burst-positive granulocytes in chronic granulomatous disease mice with a second generation selective amplifier gene. The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2003.6.7, Washington, DC, USA. (Mol Ther 7(5):S407, 2003)

7. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Maeda Y, Takeuchi K, Mizukami H, Matsushita T, Kume A, Katsura K, Yamamoto K, Ikeda U, Ohkawara S, Katayama Y, Ozawa K: Adeno-associated viral vector-mediated intramuscular delivery of interleukin-10 gene reduces blood pressure and stroke episode in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. 第8回日本遺伝子治療学会、2003.7.18、東京 (Abstract #003)

8. Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Nagata M, Nara Y, Tsuchida J, Kawasaki K, Ono F, Okada T, Mizukami H, Kume A, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, Ozawa K: Restoration of L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease by adeno-associated virus vector-mediated gene delivery of aromatic L-aminoacid decarboxylase. 第8回日本遺伝子治療学会、2003.7.18、東京 (Abstract #007)

9. Mizukaki H, Mimuro J, Ogura T, Ono F, Kobayashi E, Muramatsu S, Madoiwa S, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Terao K, Sakata Y, Ozawa K: Serotypes of AAV vectors: muscle-directed expression of human coagulation factor IX in Cynomolgus monkeys. 第8回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #013)

10. Mizukaki H, Mimuro J, Ogura T, Mochizuki S, Matsushita T, Okada T, Kume A, Muramatsu S, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K: Serotypes of AAV vectors: muscle-directed expression of human coagulation factor IX in mice. 第8回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #014)

11. Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using AAV serotype 1-derived vector. 第8回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #018)

12. Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima T, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara S, Hasegawa M, Terao K, Ozawa K: A novel method of hematopoietic stem cell gene therapy without conditioning: the intra-bone marrow transplantation with the selective amplifier gene in primates. 第 8 回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #023)
13. Matsushita T, Mimuro J, Madoiwa S, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Hemophilia A gene therapy using adeno-associated virus dual vector system. 第 8 回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #055)
14. Kume A, Hara T, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Hasegawa M, Ozawa K: Expansion of respiratory burst-positive granulocytes in chronic granulomatous disease mice with a second generation selective amplifier gene. 第 8 回日本遺伝子治療学会、2003.7.19、東京 (Abstract #056)
15. Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Iwata-Okada M, Yoshioka T, Ajalli R, Liu Y, Takahashi M, Matsushita T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: The histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into cancer cells. 第 8 回日本遺伝子治療学会、2003.7.20、東京 (Abstract #097)
16. Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Ageyama N, Kume A, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M: Expansion of gene-modified hematopoietic cells by second generation selective amplifier genes (SAGs) in the secondary transplanted mice. 第 8 回日本遺伝子治療学会、2003.7.20、東京 (Abstract #104)
17. 上田亨司、花園豊、柴田宏明、揚山直英、長島建之、田畑寿晃、上田泰次、久米晃啓、池原進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也: 霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療法の開発: 選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法による移植前処置の回避。第 65 回日本血液学会総会、2003.8.28、大阪 (臨床血液 44(8):641, 2003)
18. 原武志、久米晃啓、花園豊、水上浩明、岡田尚巳、鶴見寿、森脇久隆、長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也: 慢性肉芽腫症モデルマウスにおける第二世代選択的増幅遺伝子を用いた造血幹細胞遺伝子治療。第 65 回日本血液学会総会、2003.8.28、大阪 (臨床血液 44(8):704, 2003)
19. 水上浩明、三室淳、小倉剛、望月慎史、松下卓、岡田尚巳、花園豊、久米晃啓、村松慎一、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也: AAV ベクターの血清型による発現の比較: マウス骨格筋への凝固第 IX 因子遺伝子導入を用いた検討。第 65 回日本血液学会総会、2003.8.28、大阪 (臨床血液 44(8):705, 2003)
20. 三室淳、水上浩明、小野文子、高野勝弘、窓岩清治、小倉剛、松下卓、岡田尚巳、花園豊、久米晃啓、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一: カニクイザルをモデルとした血友病 B 遺伝子治療の基礎検討。第 65 回日本血液学会総会、2003.8.31、大阪

(臨床血液 44(8):645, 2003)

21. 岡田尚巳、岡田真由美、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也： ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた AAV ベクターによる癌細胞遺伝子導入の増強。第 62 回日本癌学会総会、2003.9.26、名古屋 (第 62 回日本癌学会総会記事 p161)

22. 竹井裕二、水上浩明、嵯峨泰、高野貴弘、岡田尚巳、久米晃啓、鈴木光明、小澤敬也： Soluble Flt-1 発現 1 型 AAV ベクターを用いた卵巣癌遺伝子治療の検討。第 62 回日本癌学会総会、2003.9.27、名古屋 (第 62 回日本癌学会総会記事 p231)

23. 水上浩明、三室淳、小倉剛、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也： 脂肪組織を標的とした AAV ベクターによる *in vivo* 遺伝子導入の開発。第 62 回日本癌学会総会、2003.9.27、名古屋 (第 62 回日本癌学会総会記事 p233)

24. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer using Adeno-associate Virus (AAV) vectors. 第 76 回日本生化学会大会、2003.10.17、横浜 (生化学 75(8):1033, 2003)

25. 水上浩明、三室淳、小倉剛、松下卓、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也： AAV ベクターを用いた脂肪組織への *in vivo* 遺伝子導入法の開発。第 51 回日本ウイルス学会総会、2003.10.28、京都 (抄録集 p332)

26. 岡田尚巳、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也： ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた AAV ベクターによる癌細胞遺伝子導入と殺細胞効果の増強。第 51 回日

本ウイルス学会総会、2003.10.28、京都 (抄録集 p333)

27. 水上浩明、三室淳、小倉剛、小野文子、松下卓、岡田尚巳、久米晃啓、寺尾恵治、坂田洋一、小澤敬也： 様々な血清型由来の AAV ベクターを用いた骨格筋に対する凝固第 IX 因子遺伝子導入の比較。第 51 回日本ウイルス学会総会 2003.10.29、京都 (抄録集 p183)

28. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Adipose tissue as a novel target for *in vivo* gene transfer using Adeno-associate Virus (AAV) vectors. The 11th Annual Congress, European Society of Gene Therapy, 2003.11.15, Edinburgh, UK (Abstract p56)

29. Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima T, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara S, Hasegawa M, Terao K, Ozawa K: A novel hematopoietic stem cell gene therapy method without marrow conditioning by intra-bone marrow transplantation combined with selective amplifier gene. The 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2003.12.8, San Diego, CA, USA. (Blood 102(11):200a, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。

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）  
分担研究報告書

霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発

分担研究者

花園 豊（自治医科大学・分子病態治療研究センター・再生医学研究部）

研究要旨

本研究ではサル ES 細胞を用いて造血系再生のための技術開発を進める。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 細胞への効率的な遺伝子導入方法の検討。(2) サル ES 細胞から試験管内で血液細胞を作り出す方法の検討。(3) 今後の ES 細胞移植治療の有効性と安全性を検討する系として、サル ES 細胞をサル胎仔へ同種移植する技術の開発。

A. 研究目的

ES 細胞は三胚葉いずれの細胞にも分化可能な幹細胞である。しかも ES 細胞は株化された細胞であり試験管内で無限に増殖する。したがって、もし ES 細胞から造血系を再生できれば、事実上、無制限の供給量をもつ血液ソースを手中におさめることができる。本研究では、ヒトに近いサル（カキザル）の ES 細胞を用いて、造血系再生技術の開発を進める。そのために本年度は以下の研究を実施した。

(1) サル ES 細胞の遺伝子操作技術の開発：ES 細胞の分化制御には遺伝子操作が欠かせない技術になる。本年度はセンダイウイルス（SeV）ベクターの有用性について検討した。

(2) サル ES 細胞の分化技術の開発：サル ES 細胞から試験管内で血液細胞を作り出せないか検討した。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発：今後の ES 細胞移植治療の有効性と安全性を検討する系として、サル ES 細胞のサル胎仔への同種移植技術の確立を試みた。

GFP 遺伝子を運ぶ SeV ベクターを作製し（研究協力者：ディナベック研究所長谷川護）、これをサル ES 細胞に感染させた。その後、経時的に GFP の発現を調べた。また、感染後の ES 細胞の分化能、および分化に伴う GFP 発現の変化を調べた。

(2) サル ES 細胞の分化技術の開発：サル ES 細胞から試験管内で効率よく血液細胞を作るために、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。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発：サル免疫不全ウイルス由来のレンチウイルスベクターを用いて、サル ES 細胞に GFP 遺伝子を導入した。GFP で標識したサル ES 細胞を、妊娠約 60 日（満期 165 日）の同種のサル（カキザル）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）。この時期の胎仔は、免疫系が完成していないため同種細胞を拒絶することなく受け入れることができる。移植後、適当な時期に胎仔を娩出し、体内における移植細胞の生着、増殖、分化を GFP を指標にして調べた。

B. 研究方法

(1) サル ES 細胞の遺伝子操作技術の開発：

倫理面への配慮

### (1) 組換えDNA実験

本研究で必要な組換えDNA実験については、以下の通り文部科学省科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会組換えDNA技術専門委員会の承認が得られている。

花園 豊（自治医科大学）申請

「レンチウイルスベクターを用いた霊長類ES細胞への遺伝子導入法とその細胞移植法」平成13年5月17日承認

### (2) 動物実験倫理

本研究ではサルへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理の問題に対する十分な配慮が必要である。また実験には必要最小限の個体数のサルを用いた。サル個体レベルでの実験に際しては、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、文部科学省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」、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。

サルを用いる実験プロトコールは、実験実施機関である国立感染症研究所の「動物実験委員会」において以下の通り承認を受けた。

花園 豊（自治医科大学）申請

「カニクイザル ES 細胞を用いた再生医療の基盤技術の開発」平成 15 年 3 月 24 日承認

## C. 研究結果

(1) サルES細胞の遺伝子操作技術の開発：GFP 遺伝子を運ぶ SeV ベクターをサル ES 細胞に感染させると、1 回のみ感染で 2 日後には約 60%の細胞が GFP 蛍光を発した。これは昨年度我々が発表したレンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率にほぼ匹敵する (Asano T. et al. Mol Ther. 2002; 6: 162-168)。その後 GFP の発現は数ヶ月以上わたって安定していた。アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターは、SeV ベクターに比べるとサル ES 細胞への遺

伝子導入効率は劣った。

SeV ベクターで GFP 遺伝子を導入した 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、SeV ベクターの感染は ES 細胞の三胚葉分化能を損なわないことがわかった。テラトーマを構成する各種分化細胞は GFP を発現しており、SeV ベクターによって導入した遺伝子の発現は、分化に伴うサイレンシングを受けづらいことも判明した。

(2) サル ES 細胞の分化技術の開発：サル ES 細胞を 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。サル ES 細胞から好中球までの分化を試験管内で再現することができた。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発：未分化 ES 細胞の移植を受けたサル胎仔では、広範な組織に移植細胞の生着を認めた。移植細胞は単独で存在し、周囲の細胞と区別がつかない形態を呈していた。胎仔にはとくに前処置を加えなくても移植した ES 細胞が生着できるスペースが存在すること、生着した細胞はその場に応じた分化を遂げること、移植細胞は拒絶されないことが明らかになった。一方、移植 3 ヶ月後以降に娩出したサルでは、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。造血系へ分化させた ES 細胞を移植した胎仔は現在解析中である。

## D. 考察

(1) サルES細胞の遺伝子操作技術の開発：レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療を受けた重症複合型免疫不全症患者 10 名中 2 名において白血病を発症したことから、レトロウイルスベクターの挿入変異の問題が大きく取り上げられている。そこで我々は、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。SeV ベクターは(-)鎖 RNA ベクターであり、ベクターゲノムから直接 mRNA が読み取られる。したがって DNA 相を経ることがなく、挿入変異の心配のないベクターである。

サル ES 細胞に対する SeV ベクターによる遺伝子導入は、サル由来レンチウイルスベクターに匹敵する、きわめて効率のよいものであった。これらのベクターはいずれも RNA ウイルスベクターであるが対照的な特徴をもっており、目的に応じた使い分けが可能と思われる。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 細胞の分化技術の開発:サル ES 細胞から、試験管内において造血細胞の分化に成功した。ただし分化の効率や純度はまだ十分とは言いがたく、分化の進み具合も制御できない。分化制御技術が今後の課題である。

発生の初期に出現する卵黄嚢の造血細胞は、ES 細胞からの試験管内分化が容易だが、成人型の造血幹細胞のように発生の後の方で「場」誘導的に出現する細胞は、ES 細胞から分化させることが難しい。発生の時間・場依存性を試験管内で完全に再現するのは難しく、動物胎仔の体内微小環境を利用して ES 細胞を分化させる我々の戦略(下記)は、今後いっそう重要性を増すと思われる。

(3) サル ES 細胞の移植技術の開発:サル ES 細胞の胎仔への同種移植を実施した。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。本実験の結果、ES 細胞は同種胎仔に生着し、生着した場所に応じて分化することがわかった。このことは、体内微小環境を上手に利用すれば ES 細胞を目的の細胞に分化させることが可能であることを示す。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。

しかし一方、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。

## E. 結論

霊長類(サル)の ES 細胞から造血系再生に必要な基盤技術を以下の通り開発した。

- (1) サル ES 細胞に対して SeV ベクターを用いて遺伝子を導入する技術
- (2) サル ES 細胞から試験管内で血液細胞を作り出す技術
- (3) サル ES 細胞のサル胎仔への同種移植技術

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

1. Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa Y. 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. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, 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.* 2004; 6: 22-31.
3. Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, Ozawa K. Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing Arginine-Vasopressin in brattleboro rats. *Mol Ther.*

- 2003; 8:895-902.
4. 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, Shimada K. Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med.* 2003; 5: 921-8.
  5. Itoh A, Okada T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizukami H, Kume A, Takatoku M, Komatsu N, Hanazono Y, Ozawa K. A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J Gene Med.* 2003; 5: 929-940.
  6. 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, Hanazono Y. Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 2003; 76: 1061-1067.
  7. Kohno T, Mizukami H, Suzuki M, Saga Y, Takei Y, Shimpo M, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Sato I, Ozawa K. Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 5091-5094.
  8. Muramatsu S, Wang L, Ikeguchi K, Fujimoto K, Nakano I, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Nakano I, Ozawa K. Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2003; 55: 205-22.
  9. Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.* 2003; 61: 3-12.
  10. Kametaka M, Kume A, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Ozawa K. Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera. *Cancer Sci.* 2003; 94: 639-643.
  11. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Katsura K, Katayama Y, Ozawa K. Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci Lett.* 2003; 340: 153-157.
  12. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 303: 170-176.
  13. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K. *In vivo* expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med.* 2003; 5: 175-181.
  14. Hanazono Y, Asano T, Ueda Y, Ozawa K. Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13: 106-110.
  15. Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Nishino H, Takeuchi K, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K. Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer



xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 2003; 10: 51-58.

16. Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res.* 2003; 45: 33-40.

#### H. 知的財産権の出願状況

1. 花園豊、佐々木京子、上田泰次、井上誠（発明人）：胚性幹細胞に遺伝子を導入する方法（平成 15 年 3 月 7 日特願 2003-62289）
2. 花園豊、佐々木京子（発明人）：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（平成 15 年 5 月 29 日特願 2003-153494）

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

分担研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所 所長

研究要旨 造血幹細胞遺伝子治療の成功の鍵となる高い効率での遺伝子導入の実現のために、これまで遺伝子導入した造血幹細胞を、体内で外部からの薬剤刺激によって選択的に増幅させるシステム「選択的増幅遺伝子：selective amplifier gene, SAG」を検討してきた。われわれは、EPO(erythropoietin)受容体を用いた第二世代 SAG を開発し、カニクイザルを用い、臨床プロトコール上必要と考えられる非骨髄抑制下で、in vivo 細胞増幅試験を行った。本研究では SAG の導入と細胞の骨髄内での生着率の向上が期待される骨髄内移植法の併用により、遺伝子導入幹細胞の増幅を試みた。その結果、末梢血単核球において、EPO 刺激に依存した遺伝子導入効率の上昇が見られ、その値は 8%という高いレベルにまで達した。またその効果は 1 年以上の長期にわたり持続しておいた。非骨髄抑制下での高い遺伝子導入効率は世界でも殆ど例のない結果であり、SAG と骨髄内移植の併用は、多岐にわたる血液疾患に対する遺伝子治療の実現に有用であることを示唆している。

#### A. 研究目的

造血幹細胞は自己複製能と多分化能をあわせもっているため、種々の血液疾患に対する遺伝子治療の理想的なターゲットである。造血幹細胞への遺伝子導入には、これまでマウス白血病ウイルス (MLV) 由来のレトロウイルス (RV) ベクターが用いられてきた。しかし、そのヒトの造血幹細胞への遺伝子導入効率は低く、まだ実用レベルに達していない。その理由として、ヒトの造血幹細胞の分裂速度がマウスなどに比べて極めて遅いこと、造血細胞膜上にはRV受容体の数が少ないことなどがあげられる。この問題解決の手段として、本研究において、遺伝子導入造血幹細胞を、外部からの薬剤刺激によって体内で選択的に増幅させるシステム「選択的増幅遺伝子：selective amplifier gene, SAG」を検討してきた。その基本コンセプトは、血液細胞に増殖優位性を与えるために造血因子受容体を「増幅シグナル発信分子」として用い、薬剤によってその機能をオン・オフできる「分子スイッチ」をそれに融合させるというものである。分子スイッチに反応する薬剤を作用させることによってSAG分子が活性化され、増殖シグナルが核内に伝達され、細胞増幅が生じる。これまで、ステロイド受容体を分子スイッチに

用いた第一世代、EPO(erythropoietin)受容体を用いた第二世代SAGを開発し、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を用いたin vitroにおける細胞増幅、およびマウスを用いたin vivo細胞増幅試験を行い、有望な結果を得てきた。このSAGを用いた様々な疾患に対応できる造血幹細胞遺伝子治療を実現するためには、臨床プロトコール上必要な非骨髄抑制下での移植と、その遺伝子導入細胞の増幅効果が求められていた。本年度は、SAGと新たな移植方法である骨髄内移植法を併用することにより高い遺伝子導入効率の実現を試みた。

#### B. 研究方法

筑波霊長類センターにおいて飼育されていたカニクイザル (*Macaca Fascicularis*) 骨髄細胞、あるいは末梢血有核細胞を採取し、抗ヒトCD34抗体結合ビーズを用い、CD34陽性細胞を集めた。サルCD34陽性細胞は直ちにレトロネクチンにてコートしたディッシュ上にて、Stem Cell Factor (SCF)、Thrombopoietin (TPO)、FLT-3リガンドをそれぞれ100ng/mlを添加し、レトロウイルスベクターを加えることによって、感染させた。ウイルスベクターはSAG搭載レトロウイルスベクター、コントロールの非発現ベクターを用い、24時間ごとに新しいベ

クター液とサイトカイン液に交換し、96時間感染を行った。その後2日間、SCF添加培地にて培養を行った。骨髄内移植法は、以下の手順に従った。麻酔をかけたサルの大腿骨、および上腕骨それぞれの両端に針を刺し、片側の針に50mlの生理食塩水入りの注射筒を装着し、もう一方の針に装着した空の注射筒にて吸引し髄腔を洗浄した。この洗浄を繰り返した後、遺伝子導入を行った細胞を1mlの10%の自己血清含有PBSに懸濁し、髄腔内に注入した。骨髄中の前駆細胞に対す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、血球系コロニーを形成させ、コロニーに対する遺伝子導入効率より求めた。即ち出現したコロニーごとにDNAを分離し、それを用い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、骨髄血、末梢血中の有核細胞に対する遺伝子導入効率は血液よりDNAを抽出し、それに対し前述のプライマーセットを用いリアルタイムPCRにより遺伝子導入効率を求めた。

(倫理面への配慮)

サルを用いた実験は筑波霊長類センターの動物実験指針に従って行い、できる限り苦痛を与えないよう配慮した。また、血液検査の実施し、EPOの投与による副作用などサルの身体的な異常に対して迅速に対応した。

### C. 研究結果

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入の効率は導入直後においてほぼ常に数十%と十分な率での遺伝子導入を確認した。この遺伝子導入細胞のサルへの移植実験を以下の3通りの実験区に分けて実施した。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静脈に移植、である。

SAGを投与し、骨髄内移植を行ったサル(実験区1)ではEPOの投与に応じ、末梢血中の遺伝子導入効率が上昇し、第一期EPO投与で移植後約100日に7%を超える導入効率を示した。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。しかし再びEPOの投与を開始すると移植後約200日に、導入効率は8%にまで上昇した。EPO投与停止による導入効率の低下はその後も見られ、3回目のEPO投与の後も導入効率の上昇が確認され、移植後約350日に8.9%に達した。増幅された遺伝子導入細胞の細胞種を調べたところ、顆粒

球、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(実験区2)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その効率は移植後約2ヶ月に30%と非常に高く、300日以上経ても、2%以上の値を示し、長期にわたり維持していることが示された。しかしそれらのサルの末梢血では、0.1%以下と極めて低い値を示した。また、骨髄内移植を行わず、中心静脈から移植したサル(実験区3)では、骨髄内移植法に比べて、骨髄への生着率が悪かった。

EPO投与により、多血になった以外は副作用は認められず、多血も瀉血により速やかに制御することができた。またいずれの動物も白血病の発症等、遺伝子導入による副作用は認められなかった。

### D. 考察

静脈内への移植と骨髄内移植を比べると、骨髄腔内への生着率は骨髄内移植の方が高い。そこにさらにSAGを導入し、生着率が低下しないうちにEPOを投与し、体内で遺伝子導入細胞を増幅することにより、非骨髄抑制下での移植における末梢血中の遺伝子導入効率を高めることができたと思われる。

また、EPO投与により導入効率が高まるのは標的細胞の増幅によるものと考えられる。しかしその一方、EPO投与停止に伴う、速やかな導入効率の低下は細胞の寿命等を考えると合理的な説明が難しく、今後の細胞解析を待たねばならない。

### E. 結論

ヒトに近縁であるカニクイザルを用いて、放射線照射や、抗がん剤処理による骨髄の抑制をまったく行うことなく、遺伝子導入細胞を移植した。その結果SAGを骨髄内移植法と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に成功した。この数値は非骨髄抑制下では世界でもほとんど例のないレベルである。またこの体内での細胞増幅はEPO依存的であり、EPO投与により遺伝子導入効率を制御することが可能であり、安全性の面からも有利であることが示された。

### F. 健康危険情報

(該当なし)

## 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, Hasegawa M, New selective amplifier genes containing c-Mpl for hemato-poietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun.* 303(1): 170-6 (2003)
- 2) Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K, In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med.* 5(3): 175-81 (2003)
- 3) Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.* 61(1): 3-12 (2003)
- 4) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, 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(1): 22-31 (2004)

### 2. 学会発表

- 1) Ueda K, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara A, Hasegawa M, Terao K, Ozawa K, A novel method of hematopoietic stem cell gene therapy without conditioning: the intra-bone marrow transplantation with the selective amplifier gene in primates. The 9th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (2003)
- 2) Kume A, Hara T, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Expansion of respiratory

burst-positive granulocytes in chronic granulomatous disease mice with a second generation selective amplifier gene. The 9th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (2003)

- 3) Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Ageyama N, Kume A, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M, Expansion of gene-modified hematopoietic cells by second generation selective amplifier genes (SAGs) in the secondary transplanted mice. The 9th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (2003)
- 4) 原武志、久米晃啓、花園豊、水上浩明、岡田尚巳、鶴見寿、森脇久隆、長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、慢性肉芽腫症モデルマウスにおける第二世代選択的増幅遺伝子を用いた造血幹細胞遺伝子治療. 第66回日本血液学会 (2003)
- 5) 上田享司、花園豊、柴田宏昭、揚山直英、長島建之、田畑寿晃、上田泰次、久米晃啓、池原進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也、霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療法の開発: 選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法による移植前処置の回避. 第66回日本血液学会 (2003)
- 6) Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima T, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara S, Hasegawa M, Terao K, Ozawa K, A Novel Hematopoietic Stem cell Gene Therapy Method without Marrow Conditioning by Intra-Bone Marrow Transplantation Combined with Selective Amplifier Gene. 第45回 米国血液学会 (2003)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal  
米国仮出願済み 出願番号 60/483,357号