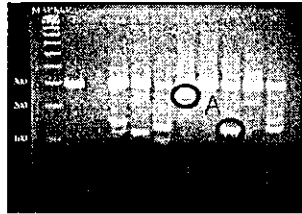
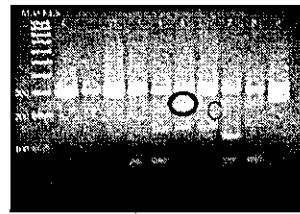


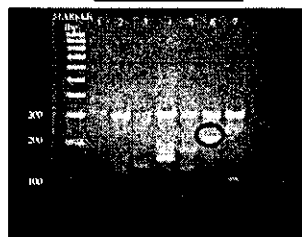
Analysis of Integration Sites



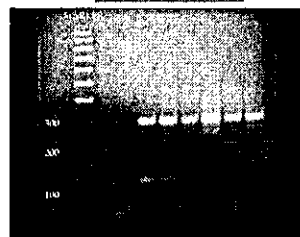
G2 - 2 Months



G2 - 4 Months



G1 - 2 Months



G1 - 4 Months

Analysis of Integration Sites

Sample	Chromosome Number	Orientation of Integration	Genebank Accession Number	Location (Genebank)
A	16	reverse	AC 126030	152396
B	5	right	AC 115293	120655
C	16	right	AC 124600	75433
D	4	right	AL 772232	36976
E	4	right	AL 772232	36976

Each DNA band observed in LAM-PCR assay showed a single integration site.

CGD Patients in Korea

– provided by SNU College of Medicine -

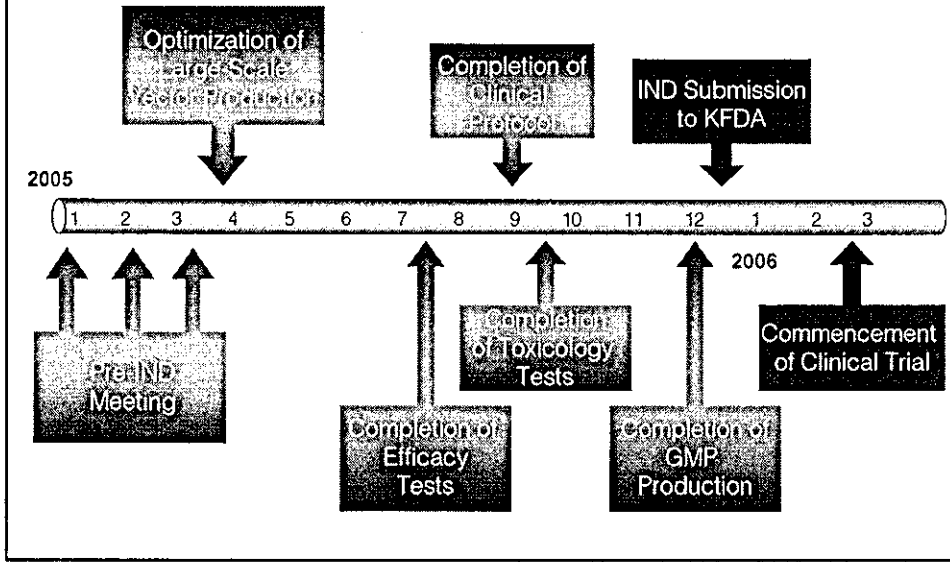
Family Number	Number of Patient	Age	Age on Dignosis	Location of Mutation	Type of Mutation	Current Condition
1	1	(19.1)	6.2	Intron 11	5'gt tt	Dead
2	2 (Brother)	8.9/5.2	0.8/0.1	Exon 10	G1235 T	2
3	1	15	7.0	Exon 9	C1024 T	1
4	2 (cousin)	(28.5)/6.7	19.0/0.1	Exon 1	G insertion	One was dead
5	1	(4.2)	1.1	Exon 11	G1473 T	Dead
6	1	16.7	0.8	Exon 8	C880 T	1
7	1	2.1	0.7	Exon 10	T1293 A	1
8	1	10.4	0.7	Intron 1	5'gtaa taaa	1
9	1	4.7	0.6	Exon 13	C del	1
10	1	3.9	0.10	intron 2	5'gtaag gtaaa	1
11	2 (twins)	7.7/7.7	0.1/0.1	Intron 1	5'gtaa ctaa	2

Two or three of these patients will be selected for the phase I/II clinical trial.

SUMMARY

- GMP production of MT-gp91 retrovirus was initiated.
- *In vitro* efficacy tests were completed.
- *In vivo* efficacy tests are under progress.
- Safety tests are expected to be completed by the end of August.
- We hope to treat the first patient at the beginning of 2006.

Overall Time Plan



Epo-responsive SAG for CGD Gene Therapy: Evaluation of Chimeric Receptors Comprising Epo Receptor and G-CSF Receptor

SNU - JMS Meeting
February 19, 2005; Tochigi, Japan
JMS Genetic Therapeutics
○ A. Kume, M. Matsuda, K. Ozawa

Chronic Granulomatous Disease (CGD)

- Pathophysiology
 - Inherited deficiency in phagocyte O_2^- production
- Clinical Symptoms
 - Recurrent, severe infections by catalase⁺ microbes
 - Chronic inflammatory granulomas
- Genetics

Mutations in the respiratory burst oxidase complex

Component	Chromosome	Incidence
Membrane Cytb ₅₅₈		
p22 ^{phox}	16q24	5%
gp91 ^{phox}	Xp21.1	60% (~ 75% in Japan)
Cytosolic Factors		
p47 ^{phox}	7q11.23	30% (< 10% in Japan)
p67 ^{phox}	1q25	5%

X-CGD Gene Rx Clinical Trials

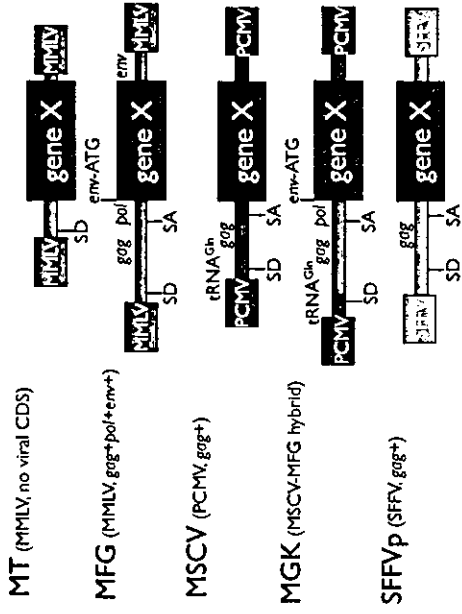
Investigator	Institution	Vector	Preconditioning	Result
Malech HL	NIH, USA	MFG-S	None	O ₂ : Gran < 0.1% Transient
Dinauer MC	Indiana U, USA	SFF	None	O ₂ : Gran < 0.1% Transient
Grez M	U Frankfurt, Germany	SFF	BUS 4mg/kg x 2 days	O ₂ : Gran ~ 50% Lasting > 6 mo

CGD Gene Rx German Study (ASH #409, 2004)

Marion G. Ott, Stefan Stein, Ulrike Kowth, Klaus Kuhlcke, Manfred Schmidt, Christof von Kalle, Monstapla Hassen, Ulrich Siler, Dieter Hoelzer, Reinhard Seger, Manuel Grez, Hematology/Oncology, University Medical School, Frankfurt, Germany; Gene Therapy, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, Germany; Pediatric Hematology/Oncology, University Medical School, Frankfurt, Germany; EUFETS AG, Idar-Oberstein, Germany; Molecular Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany; Stem Cell Transplantation, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; Immunology/Hematology, University Childrens Hospital, Zurich, Switzerland (Blood 104(11):206, 2004)

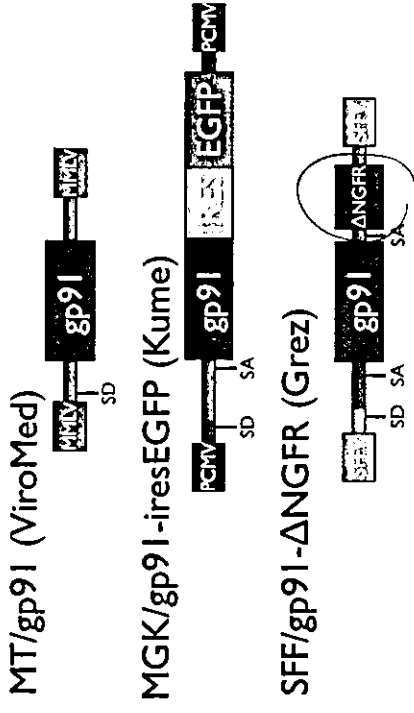
Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a primary immunodeficiency in which phagocytic cells of affected patients have impaired antimicrobial activity due to a defect in the production of reactive oxygen species (ROS). CGD is caused by mutations in any one of four genes encoding for the subunits of the NADPH oxidase complex. CGD is an ideal target for a gene replacement therapy, since females carriers of CGD with as low as 5-10% NADPH oxidase activity are healthy. Based on our preclinical work, we initiated a Phase III trial in January 2004. Two X-CGD patients, 26 and 25 years old, were recruited based on their long history of recurrent and life-threatening bacterial and fungal infections. G-CSF mobilized CD34⁺ cells were transduced with a monospecific gp91^{phox} removal vector. The transduction efficiency was 45% for Pat. 1 and 40% for Pat. 2. The number of CD34⁺ cells transfused was 1.2x10⁶ per kg for Pat. 1 and 0.9x10⁶ per kg for Pat. 2. Before reinfusion, the patients were conditioned with liposomal busulfan given i.v. at a dose of 4 mg/kg at two consecutive days, starting at day -3. The treatment was well tolerated and no adverse effects have been observed. Neutrophil counts declined to less than 100 cells per μ l at day 15 post reinfusion in both patients and recovered to more than 500 cells per μ l at day 30 for Pat. 1 and day 20 for Pat. 2. A significant fraction of gene marked cells has been detected in peripheral blood of both patients since day +21. Similarly, therapeutically relevant levels of ROS production have been observed. In conclusion, the protocol we have used allows for stable engraftment of gene transduced hematopoietic cells under conditions in which gene corrected cells lack a selective advantage over non-corrected cells.

Retroviral Vector Backbones



5

Testing gp91 Retroviruses



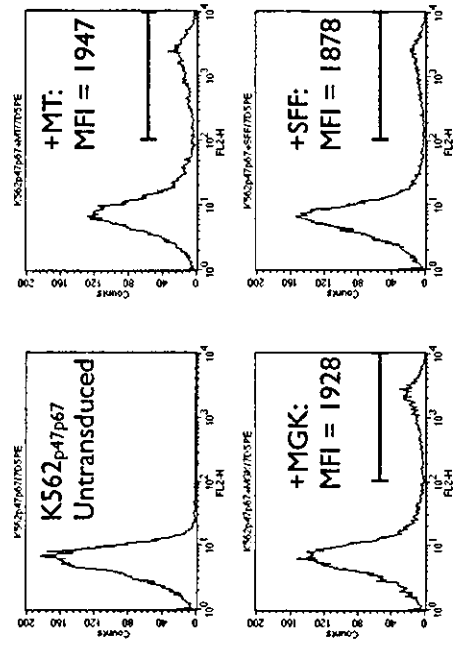
6

Cells for NADPH Oxidase Reconstitution

- K562_{p47p67}
 - human erythroleukemia-derived
 - constitutively p22+; p47/p67 transduced
 - require exogenous gp91 for O₂ production
- XCGD-PLB
 - human APL-derived
 - constitutively p22+; p47/p67 inducible
 - gp91 knockout (↔ inducible in PLB wt)

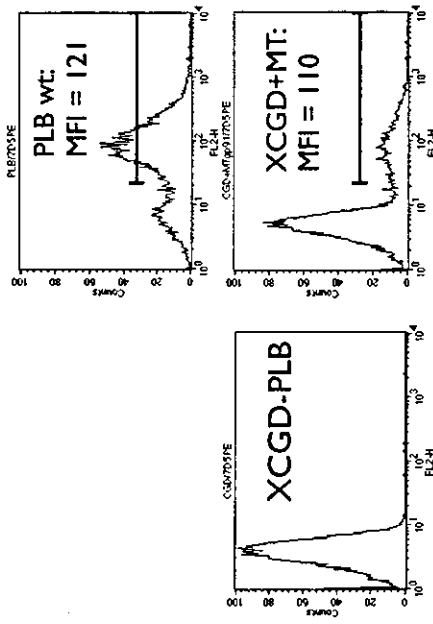
7

gp91 Expression in Transduced K562



8

gp91 Expression in XCGD-PLB Cells



9

O₂⁻ Production in Transduced K562 Cells



10

O₂⁻ Production in XCGD-PLB Cells



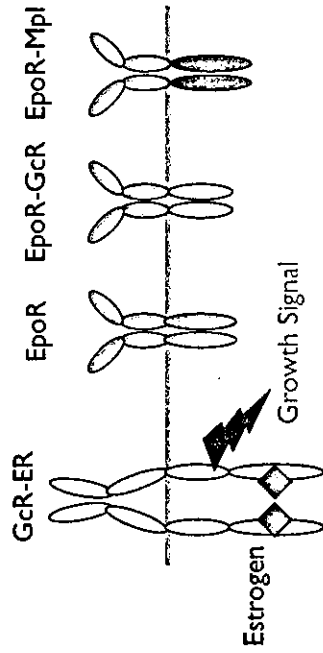
11

Repopulation of Transduced Cells

- Intrinsic selective advantage
- X-SCID (very strong growth advantage)
- ADA-SCID (survival advantage)
- Preconditioning
 - irradiation
 - chemotherapy
- In vivo selection ~ amplification
 - drug-resistance gene
 - selective amplifier gene (SAG)

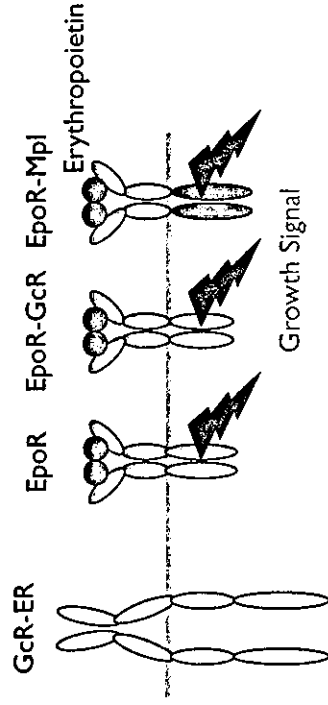
12

Selective Amplifier Gene: 1st Generation



13

Selective Amplifier Gene: 2nd Generation



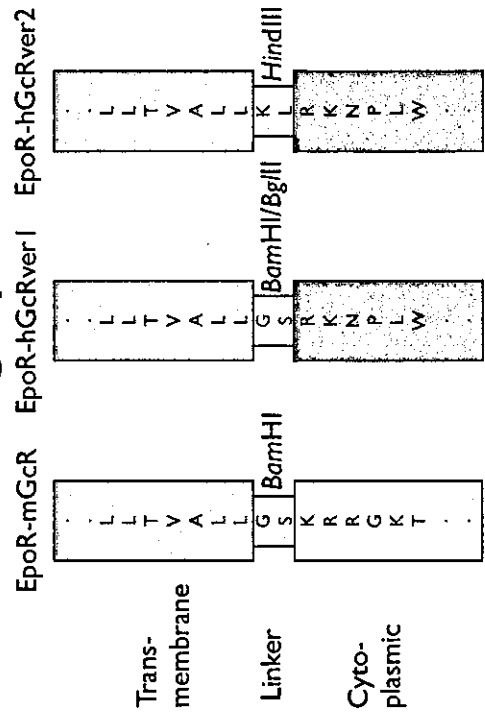
14

2nd Generation SAG as of Nov/2003

- Results
 - Compared EpoR, EpoR-GcR and EpoR-Mpl
 - EpoR-Mpl was most potent in cord blood CD34+ and murine progenitors
 - EpoR-Mpl expanded functionally corrected neutrophils in X-CGD mice
- Discussion
 - GcR signal is appropriate for myeloid progenitors
 - GcR signal may be safer than Mpl
 - should be humanized for clinical applications
 - may be fine-tuned for robust expansion

15

Humanizing EpoR-GcR



16

EpoR-GcR Junction (1)

receptor	transmembrane	linker/cytoplasmic
EpoR	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	-----SHRRALKQKIWPG
Mp1	WISLVTALHLVGLSAVLGLLL	RWQFPAHYRRLRHALWPS
mGcR	IFLGLICLVLLST-TCVVTWLCC	-----KRRGKTSFWS
hGcR	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	-----[SPNR--KNPLWPS]
EpoR-Mp1	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	GSRWQFPAHYRRLRHALWPS
EpoR-mGcR	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	GS-----KRRGKTSFWS
EpoR-hGcR.1	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	GS-----R--KNPLWPS
EpoR-hGcR.2	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	KL-----R--KNPLWPS

17

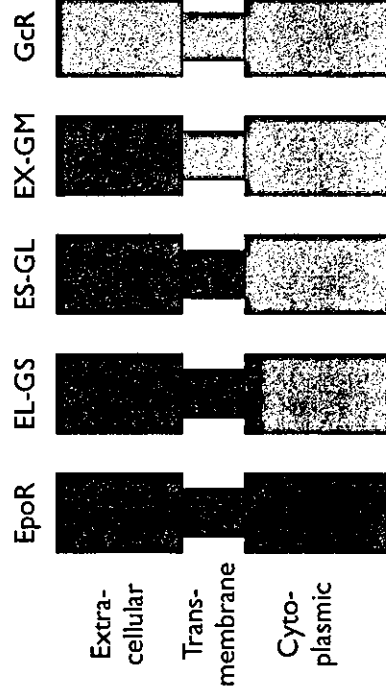
EpoR-GcR Junction (2)

receptor	extra-cellular	transmembrane	cytoplasmic
Mp1	ETATETA	WISLVTALHLVGLSAVLGLLL	RWQFPAHYRRLRHALWPS
EpoR	TPSDLDP	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	-----SHRRALKQKIWPG
hGcR	PEGSELH	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	-----SPNR--KNPLWPS
EpoR-Mp1	TPSDLDP	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	GS RWQFPAHYRRLRHALWPS
EpoR-GcRv.2	TPSDLDP	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	KL -----R--KNPLWPS
EX-GM	TPSDLDP	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	-----SPNR--KNPLWPS
ES-GL	TPSDLDP	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	-----SPNR--KNPLWPS
EL-GS	TPSDLDP	LILTLSLILVILVLLTVLALL-	-----SHRRALKQKIWPG

Brown: shared, Blue: synthetic linker,
Black: unique in Mp1, Red: unique in EpoR, Green : unique in GcR

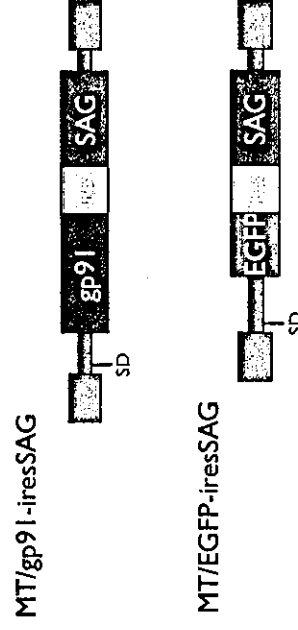
18

EpoR-GcR Constructs



19

SAG Evaluating Retroviruses



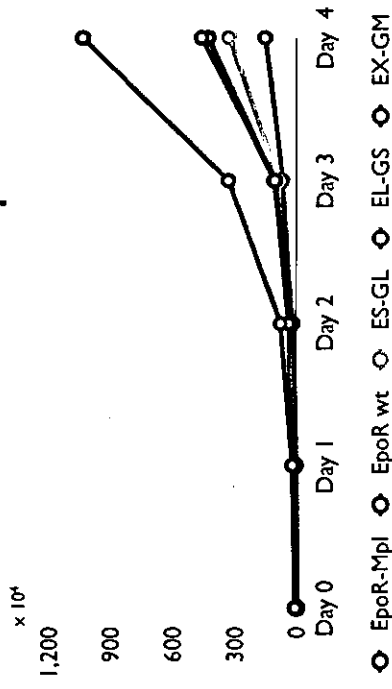
20

Cells for Proliferation Assay

- Ba/F3
- murine pro-B cell line
- IL3-dependent
- MO7e
- human megakaryoblastic leukemia cell line
- IL3- or GMCSF-dependent

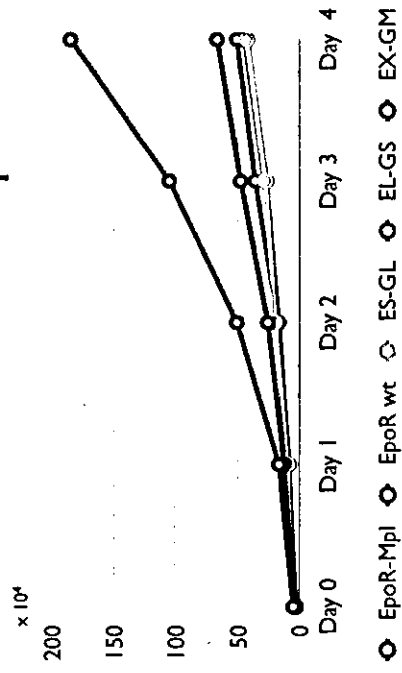
21

BaF3/SAG + Epo



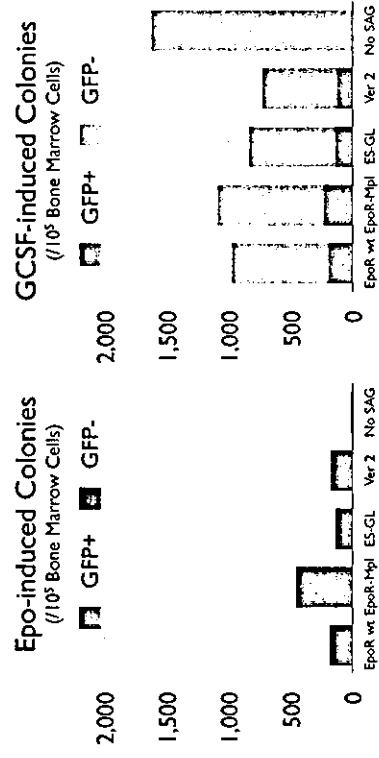
22

MO7e/SAG + Epo



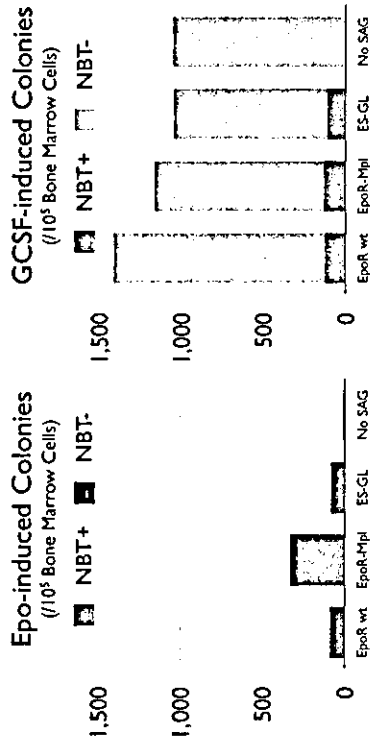
23

Transduced Progenitors: MT/EGFP-iresSAG



24

Transduced Progenitors: MT/gp91-iresSAG



25

Summary

- Evaluated retroviral backbones for gp91 expression in K562 and PLB cells:
MT ≥ MFG, SFF
- Evaluated humanized EpoR-GcR SAG's for cytokine-dependent cell and progenitor expansion:
EpoR-Mpl > EpoR wt
= EX-GM, ES-GL, EL-GS

26

To Do Next

- In vivo expansion in mouse transplants
 - exogenous Epo or phlebotomy?
- Human BM or cord blood progenitors
- Primate study
 - preconditioning?
 - intravenous or intramarrow?
- expansion: Q-PCR on WBC, colony PCR

27

Safety Concerns

- Leukemogenesis in French X-SCID trial
 - earlier 2 patients hit LMO2; one died in Oct/2004
 - 3rd case caused by another genetic glitch
- Vector improvement
 - SIN
 - chromatin insulator
 - suicide gene

28

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

エリスロポエチン反応型細胞増殖促進キメラ受容体遺伝子（新規「選択的増幅遺伝子」）を改良して完全にヒト化し、野生型エリスロポエチン受容体に比肩する細胞増殖シグナルが得られることを確認した。慢性肉芽腫症遺伝子治療のためのレトロウイルスベクター骨格について比較検討し、自己複製可能なウイルスが出現する可能性が最も低いものを、臨床グレードのベクター候補として選定した。アデノ随伴ウイルスベクターを用いてマウス骨格筋に *msx1* 転写因子遺伝子を導入して脱分化を促し、得られた脱分化細胞の中に造血系再構築能をもつ幹細胞が存在することを示した。

A. 研究目的

(1) 慢性肉芽腫症の治療法開発

再生医療は、胚性幹細胞を用いるものと体性幹細胞を用いるものに大別される。造血幹細胞移植は後者の代表とも言え手技的にはほぼ完成されているが、適合ドナーの不足、移植片対宿主病その他の合併症など未解決の問題も多い。

そこで我々は造血幹細胞移植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している。本課題で扱う慢性肉芽腫症（CGD）においては、患者本人の造血幹細胞を用いる遺伝子治療法の確立が切望されているが、その成功の鍵は、いかにして治療用遺伝子を導入した細胞を患者体内で増やせるかに

かかっている。そこで我々は、治療用遺伝子と細胞増幅用遺伝子（選択的増幅遺伝子；SAG）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している。

(2) 体性幹細胞の分化転換実験

現在の造血幹細胞移植における問題点は、殆どアロ移植であることに起因する。即ち、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・拒絶・移植片対宿主病などが回避できる。ここでは、大量に存在する骨格筋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細胞は、軟骨細胞・脂肪細胞・骨細胞など間葉系各

細胞系列に再分化し得る。昨年度の研究で、これら単核細胞の一部は造血系細胞への分化能を有する可能性が示唆されたので、本年度はさらにくわしく検討した。

B. 研究方法

(1) 慢性肉芽腫症の治療法開発

CGD 遺伝子治療用レトロウイルスベクターの骨格として、これまで米国の臨床試験で用いられた MFG、ドイツで用いられた SFF、韓国で使用される予定の MT に、それぞれ X 連鎖性 CGD (X-CGD) の治療用遺伝子である gp91 遺伝子とマーカー遺伝子を搭載した。これらのウイルスをテスト細胞 (K562 細胞および PLB-985 細胞) に感染させ、フローサイトメトリーで gp91 の発現を、ニトロブルーテトラゾリウム還元試験で活性酸素産生能を解析した。

エリスロポエチン (Epo) 反応型 SAG として、前年度に効果を確認したエリスロポエチン受容体 (EpoR) 細胞外部分とトロンボポエチン受容体 (Mpl) 細胞内部分からなるキメラ受容体 (EpoR-Mpl) を、CGD 遺伝子治療に合わせて改変した。治療の標的となる骨髓球系細胞に合わせて細胞内部分を顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体 (GcR) とし、EpoR・GcR ともヒト由来とした。また、EpoR と GcR の接合部を少しずつずらしたキメラ受容体を数種構築し、それぞれのキメラ受容体と gp91 を共発現するためのレトロウイルスベクターを作製した。これらのウイルスをサイトカイン依存性細胞株 (Ba/F3 細胞および M07e 細胞) に感染させ、Epo 依存性増殖曲線を作製した。同様に、X-CGD モデルマウスの骨髓細胞に感染させ、Epo 刺激および G-CSF 刺激下でコロニーア

ッセイを行った。

(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 (AAV) ベクター (AAV/msx1)、および対照用として大腸菌 β -ガラクトシダーゼ発現用 AAV (AAV/lacZ)・Epo 発現用 AAV (AAV/Epo) を C57BL/6-Ly5.2 マウス前頸骨筋に注射し、1 ないし 4 週後に同筋から採取した単核細胞を、致死量放射線照射した C57BL/6-Ly5.1 レシピエントマウスに移植した。移植後経時的に採血して、末梢血中の Ly5.2 細胞の割合を追跡した。長期観察後、これら第一次レシピエントの骨髓細胞を第二次レシピエント (Ly5.1/5.2 ヘテロ) に移植して、同様に第一次ドナー筋肉由来細胞の割合を追跡した。

(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

MFG・SFF・MT いずれのベクター骨格を用いた場合も、K562 細胞・PLB-985 細胞における gp91 発現量と活性酸素産生能は同等だった。

MT ベクターに gp91 遺伝子と SAG (EpoR 全長、EpoR-GcR キメラ数種、EpoR-Mpl キメラ) を搭載し、これらの組み換えレトロウイルスをサイトカイン依存性 Ba/F3 細胞・M07e 細胞に感染させたところ、いずれも Epo 依存性に増殖するようになった。増殖曲線から判定したシグナル強度は、EpoR-Mpl キメラが最強だったが、EpoR と

EpoR-GcR キメラ数種はいずれも同等の増殖シグナルを伝えた。X-CGD マウス骨髄細胞を用いたコロニーアッセイでは、Epo で誘導されるコロニー数は EpoR-Mpl 遺伝子を導入した場合が最大で(骨髄細胞 10^5 個当たり約 300 個)、EpoR と EpoR-GcR キメラ遺伝子を導入した場合はほぼ同数のコロニー(骨髄細胞 10^5 個当たり 100-150 個)が出来た。これら Epo 反応性のコロニーは全てが活性酸素産生能を有しており、治療用 gp91 遺伝子が働いていることを確認した。一方、G-CSF 刺激下ではいずれの SAG を導入した場合も同数(骨髄細胞 10^5 個当たり約 1,000 個)のコロニーが出来、活性酸素産生能を有する割合は 10-15% で有意差はなかった。

(2) 体性幹細胞の分化転換実験

AAV/msx1 投与後の前頸骨筋から採取した単核球を移植したレシピエント (Ly5.1) において、ドナータイプ (Ly5.2) の細胞が生着したものが数匹出現した。中でも、AAV/msx1 注射 4 週後の筋肉由来の細胞を移植した 1 匹は、キメリズム 50-60% にて長期間推移し、ドナータイプの細胞は T リンパ球・B リンパ球・顆粒球単球いずれの系列にも均等に分化していた。移植 9 ヶ月後に、この第一次レシピエントの骨髄細胞を第二次レシピエントマウス (Ly5.1/5.2 ヘテロ) に移植したところ、約 80% の高いキメリズムが持続した(観察期間 7 ヶ月)。このマウスにおいても、もとのドナータイプ (Ly5.2) の細胞は、T リンパ球・B リンパ球・顆粒球単球にほぼ均等に分化していた。

D. 考察

検討した 3 種類のレトロウイルス骨格を用いた場合、いずれも X-CGD 治療用の gp91

遺伝子発現は良好で、差は認められなかった。このうち MT は、レトロウイルス蛋白質コード領域を全て削除してあるため、自己複製可能なウイルスが出現する可能性が最も低い。また、組み込み可能な遺伝子サイズが最も大きく、治療用遺伝子と SAG を同時に組み込む本課題の系に適している。以上の理由から、今後臨床グレードのベクターを作製するにあたっては、MT をベースに開発を進めていく予定である。組み込む SAG として、EpoR-GcR キメラは野生型 EpoR と同等の増殖シグナルを伝えた。GcR 下流のシグナル系は、CGD 治療の標的となる顆粒球単球系分化と言う点では最も生理的であり、安全性も高いと考えられる。EpoR と GcR の接合部構造については、免疫原性という点からも検討する予定である。

骨格筋に msx1 遺伝子を導入して得られた単核細胞のうち、少なくとも一部は *in vivo* 造血系再構築能をもつことが示唆された。これらの単核細胞が脱分化筋由来か否かについて、さらに厳密な検証を進めている。

E. 結論

CGD 遺伝子治療用の選択的増幅遺伝子とベクターの選定について、さらに検討を進めた。分化抑制遺伝子導入により、骨格筋組織が造血幹細胞ソースとなり得る可能性が高まった。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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* 27:7-14, 2004

2. 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* 11:1081-1086, 2004

3. 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* 11:1370-1377, 2004

4. Kanazawa T, Mizukami H, Nishino H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K: Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 25:729-735, 2004

5. Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Ogata S, Tabata T, Nagashima T, Takatoku M, Kume A, Ikehara S, Taniwaki M, Terao K, Hasegawa M, Ozawa

K: High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol Ther* 10:469-477, 2004

6. Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y: Sustained transgene expression by human cord blood-derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTY01-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med* 6:1049-1060, 2004

7. Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Nomoto T, Takeuchi K, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takahashi T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Ookawara S, Kawano M, Ishibashi S, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11:1772-1779, 2004

(2) 学会発表

1. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated soluble Flt-1 gene transfer prevents diabetic retinopathy in spontaneously diabetic rat model. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene

Therapy, 2004. 6. 3, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S72, 2004)

2. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Hamada H, Kume A, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: Characterization of delivery routes of AAV vectors for neonatal gene transfer. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 4, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S130, 2004)

3. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Sarukawa M, Takeuchi K, Mizukami H, Matsushita T, Katsura K, Yamamoto K, Kume A, Ikeda U, Ookawara S, Katayama Y, Ozawa K: Protection of end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by intramuscular injection of AAV vector expressing interleukin-10. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 4, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S149, 2004)

5. Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Ogura T, Matsushita T, Mizukami H, Kume A, Nielsen V, Ozawa K: Large-scale production of AAV and adenovirus vectors using active gassing with large culture vessel. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 4, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S161, 2004)

6. 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-associated virus (AAV) vectors. The 7th

Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 4, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S163, 2004)

7. Ueda K, Ueda Y, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima T, Tabata T, Kume A, Ikehara S, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M: Efficient *in vivo* gene marking of hematopoietic cells without marrow conditioning in nonhuman primates. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 5, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S267, 2004)

8. Okada T, Nomoto T, Liu Y, Iwata-Okada M, Takahashi M, Shimazaki K, Matsushita T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in cancer cells in vitro and in vivo. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 5, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S288, 2004)

9. Liu Y, Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Sheykholeslami K, Muramatsu S, Ajalli R, Takeuchi K, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Specific and efficient transduction of the cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. The 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2004. 6. 5, Minneapolis, MN, USA. (Mol Ther 9 Suppl1:S407, 2004)

10. Sarukawa M, Okada T, Yoshioka T, Nomoto T, Ito T, Maeda Y, Mizukami H,

Matsushita T, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated intramuscular delivery of interleukin-10 gene prevents the development of hypertensive heart disease in Dahl salt-sensitive rats. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #006)

11. Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K: Subretinal expression of soluble Flt-1 using AAV5 vector prevents diabetic retinopathy in a spontaneously diabetic rat model. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #007)

12. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Hamada H, Kume A, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: Optimal serotypes and characterization of delivery routes of AAV vectors for neonatal gene transfer. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #050)

13. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: A novel method for in vivo gene transfer to adipose tissue using adeno-associated virus (AAV) vectors. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #052)

14. Ito T, Okada T, Sarukawa M, Nomoto T, Yoshioka T, Maeda Y, Miyashita H, Mizukami H, Matsushita T, Kume A, Yamamoto K, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated systemic expression of

interleukin-10 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #053)

15. Matsushita T, Mimuro J, Ishihata A, Madoiwa S, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Hemophilia A gene therapy using adeno-associated virus dual vector system: Improved FVIII activity by balanced expression of heavy and light chains of FVIII. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #054)

16. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Sheykholeslami K, Ajalli R, Muramatsu S, Takeuchi K, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.5、東京 (Abstract #055)

17. Okada T, Ogura T, Fujishiro J, Sato Y, Kobayashi M, Hakamata Y, Murakami T, Iwata-Okada M, Maeda Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E, Ozawa K: In vivo bioimaging of transgene expression in intact living animals. 第10回日本遺伝子治療学会、2004.8.6、東京 (Abstract #066)

18. 石渡彰、三室淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、大森司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一: 第VIII因子欠乏マウスへのシングル AAV1 ベクターを用いた第VIII因子遺伝子導入と

発現. 第 66 回日本血液学会総会、2004.9.18、京都 (臨床血液 45:787, 2004)

19. 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: 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 66 回日本血液学会総会、2004.9.18、京都 (臨床血液 45:788, 2004)

20. 高野勝弘、三室淳、水上浩明、石渡彰、柏倉裕志、大森司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一: PAI-1 promoter を用いた血管内皮細胞特異的ヒト第 IX 因子遺伝子導入と発現. 第 66 回日本血液学会総会、2004.9.18、京都 (臨床血液 45:892, 2004)

21. 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* 遺伝子導入法の開発とその最適化. 第 63 回日本癌学会総会、2004.10.1、福岡 (第 63 回日本癌学会総会記事 p410)

22. 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 ベクターによる導入遺伝子の発現増強. 第 63 回日本癌学会総会、2004.10.1、福岡 (第 63 回日本癌学会総会記事 p518)

23. 呉繁夫、小倉剛、水上浩明、小林英二、松原洋一、小澤敬也、久米晃啓: アデノ随伴ウイルス 8 型ベクターを用いたフェニルケトン尿症遺伝子治療の前臨床研究. 第 47 回日本先天代謝異常学会総会、2004.11.11、宇都宮 (日本先天代謝異常学会雑誌 20:145, 2004)

24. Nobuyoshi M, Kume A, Mizukami H,

Matsushita T, Okada T, Urabe M, Ohgoshi Y, Endo T, Ozawa K: Hematopoietic differentiation of muscle-derived cells after *in vivo* transient expression of MSX1 transcription factor. The 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2004.12.5, San Diego, CA, USA. (Blood 104:734a, 2004)

25. 岡田真由美、翁家国、久米晃啓、小澤敬也: X連鎖星慢性肉芽腫症(X-CGD)モデルマウスに対する iBMT (骨髄腔内骨髄移植) の試み. 第 12 回食細胞機能異常研究会、2004.12.10、東京 (抄録集 p3)

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

サル ES 細胞を用いた造血再生技術の開発を目的として、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 (SeV) によるサル ES 細胞の遺伝子操作法に関する研究を昨年度に引き続き実施した。その結果、本年度は SeV ベクターによって導入した GFP 遺伝子の発現は、抗ウイルス剤リバビリン添加によって調節できる可能性を示した。(2) ヒツジをレシピエントとしてサル ES 細胞からの造血系再構築実験を実施した。その結果、サルの造血を一部もつヒツジの作製に成功した。本成果は、動物に移植用血液細胞を作らせる「動物工場」実現の可能性を示すものである。

A. 研究目的

ヒト ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導し造血系を再構築する技術は、血液学研究者にとって大きな目標の一つである。この技術が開発され、さらにヒト ES 細胞バンクができれば、造血幹細胞移植治療のドナー不足の根本的解決につながるからである。ES 細胞は株化細胞であるから、いったんバンクで保管したら、いつでも、どこでも、いくらでも、何度でも増やして使うことが出来る。しかも、さまざまな細胞に分化させて利用可能であり、用途は造血細胞供給に限らない。このような点が、骨髄バンクや臍帯血バンクにはない、大きな利点である。

我々は、マウス、サル、ヒツジをレシピエントとして ES 細胞からの造血再構築実験を実施し、ES 細胞が将来はたして骨髄バンクや臍帯血バンクに代るドナーソースになりうるかどうか検討している。実験に用いる ES 細胞はサル（カニクイザル）のものである。言うまでもなく、それはヒトに近いからである。マウスへの移植実験は、ES 細胞を利用する造血再生の基盤研究と位置づけている。サルへ

の移植実験は、同種移植という、より臨床応用に近い系で有効性と安全性の評価をめざしている。一方、ヒツジへの移植実験は、動物に移植用血液細胞を作らせる「動物工場」をめざす研究として行っている。このうち、サルへの移植実験に関しては、分担研究者寺尾による報告書を参照されたい。本報告書では、サルの血液をもつヒツジの作製について述べる。

ES 細胞の遺伝子操作は、ES 細胞から効率の良い造血再生を図るためには欠かせない技術である。また、ES 細胞は、遺伝子操作を通してカスタム化できるのが大きな特長の一つである。昨年度は、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いると、サル ES 細胞に対してきわめて効率よく外来遺伝子を導入できることを明らかにしたが、本年度は、導入遺伝子の発現調節法の開発を試みたので併せて報告する。

B. 研究方法

(1) 遺伝子操作：GFP 遺伝子を運ぶ SeV ベクターを作製し、これをサル（カニクイザル）

ES細胞に感染させた。その後、抗ウイルス剤リバビリンの添加によって、GFP発現量を調節できるかどうかを検討した。

(2) 移植細胞：サルES細胞を至適条件下(OP9フィーダー細胞上で各種サイトカイン添加)でヘマンジオブラスト(造血細胞と血管内皮の元になる細胞)の段階まで分化させた。この分化段階の細胞を移植細胞とした。

(3) 移植法：移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能獲得前(妊娠1/3期前後)のヒツジ胎仔に移植した(子宮内移植法)。胎仔の肝臓内にエコーガイド下で細胞を移植した。

(4) 評価：移植後、満期で娩出し、生まれたヒツジにおけるサルES細胞由来の造血を調べた。

(5) 倫理面への配慮：組換えDNA実験については、以下の通り承認が得られている。「幹細胞を利用する再生医療の基盤技術の開発」自治医科大学 平成16年4月1日承認。ヒツジを用いる動物実験については、以下の通り承認を受けている。「ヒツジを利用するES細胞の分化技術の開発」自治医科大学 平成16年2月24日承認。

C. 研究結果

(1) SeVベクターで導入した遺伝子の発現調節：SeVベクターでGFP遺伝子導入後のサルES細胞にリバビリンを添加したところ、リバビリン濃度依存性にGFPの発現が減少した。リバビリン4mMの投与ではGFPの発現がほぼ完全に抑制されたものの、投与後の細胞の継代培養は不可能であった。高濃度(1mM以上)のリバビリンはサルES細胞の増殖を妨げた。一方、低濃度(0.5-0.75mM)のリバビリン投与ではGFPの発現をおよそ半減させることができた。この濃度だとリバビリン投与後も細胞の継代は可能だったが、GFP発現抑制は一過性でリバビリン投与終了後、発現レベルは元に戻った。

(2) ヒツジにおけるサルES細胞由来の血液産生：サルES細胞を未分化のままヒツジ胎仔に移植しても奇形腫を作ってしまうので、まず試験管内で数日かけて中胚葉細胞に分化させる。ここには血液細胞や内皮の元になるヘマンジオブラストが含まれている。その細胞を、微小環境利用の観点から造血幹細胞が発生するAGM(Aorta-Gonad-Mesonephros, 大動脈-生殖隆起-中腎)領域に移植したいところである。しかし、ヒツジ胎仔のAGM領域に移植するのは技術的に困難なことから、次善の策として、AGMの次の造血器官である肝臓に移植することにした。ヒツジ胎仔の肝臓の微小環境を利用して、ヘマンジオブラストから造血幹細胞を誘導しようと試みた。もし、造血幹細胞が誘導できれば、生まれてきたヒツジは、サルの血液をもつはずである。

ヒツジが生まれるとサル由来の造血を観察した。サル由来の造血はコロニーアッセイ法によって判定した。すなわち、ヒツジ骨髄細胞をメチルセルロース半固形培地に薄く撒き、細胞集落(コロニー)を形成するまで待つ(約2週間)。各コロニーは元々一個の細胞が増えて出来たものであり、すなわちサルかヒツジかどちらかの由来である。どちらの由来かを知るために、各コロニーからDNAを抽出し、サルに特異的な配列に対するPCR(コロニーPCR)を行った。これによってサル由来のコロニーを正確に同定でき、キメラ率の算出が可能になる。4頭のヒツジが生まれたが、いずれも約1%のサル/ヒツジ造血キメラになっていた。2年後の現在、サル/ヒツジ造血キメラは依然として維持されており、ヒツジの体内でサルの造血幹細胞が出来たことを強く示唆している。なお、腫瘍の発生は認められなかった。

しかし、現在の1%のサル/ヒツジ造血キメラ率では、「動物工場」として利用するには不十分である。キメラ率をもっと上げる工夫が必要である。そのために我々は、これらのキ

メラヒツジに対して、ヒツジには効かないがサルには効くヒトの造血因子（ヒト SCF）を投与し、サルの造血を選択的に刺激する実験を行い、骨髄の造血キメラ率を 10%前後まで上げることに成功した。ただし、末梢血のキメラ率は依然として低い（0.1%以下）という問題が残った。

D. 考察

(1) 導入遺伝子の発現制御をめざして：昨年度、SeV ベクターによって、サル ES 細胞の三胚葉分化能を損なわずに、極めて効率よく遺伝子導入が可能であることを示した。SeV ベクターは DNA 相を経ないため宿主 DNA を傷つけない安全な遺伝子導入法である。本年度は、抗ウイルス剤リバビリンを投与することによって SeV ベクターの転写・複製を抑制し、導入した遺伝子の発現を調節可能かどうか検討した。リバビリンは 1972 年に合成されたプリンヌクレオシドアナログで、ウイルスの複製・蛋白合成・RNA ポリメラーゼを阻害することにより、幅広い抗ウイルス活性を示すとされる。我が国でも C 型慢性肝炎の治療薬としてインターフェロンとの併用投与が承認されている薬剤である。SeV ベクターで遺伝子導入した ES 細胞の遺伝子発現を抗ウイルス剤によって調節するという試みは、全く新しいアプローチである。

高濃度のリバビリン投与では、細胞毒性が強く、サル ES 細胞の生存および増殖を妨げる原因となった。しかし、このときフィーダー細胞の方もサル ES 細胞以上に強い細胞障害を受けていることが観察された。したがって、サル ES 細胞の生存および増殖を妨げたのは、リバビリンのサル ES 細胞に対する直接毒性だけが原因とはいえない。実際、リバビリン 1 mM の投与ではフィーダー細胞が全て死滅していたのに対し、同じ培養皿で共培養されていたサル ES 細胞の一部はしばらく生き永らえていた。サル ES 細胞はフィーダー細胞が

なければその多分化能および増殖能を失うため、リバビリンの毒性でフィーダー細胞が死滅したため、二次的にサル ES 細胞が傷害を受けた可能性もある。いずれにしても、薬剤投与による遺伝子発現調節を実用化するには、今後、より毒性の低い化合物を模索する必要がある。

(2) 動物工場をめざして：ヒト ES 細胞株が 1998 年に発表されて以来、医療への応用をめざし、ES 細胞を分化させる技術が競って開発されている。この手の研究はもっぱら試験管内 (in vitro) で行われてきた。しかし、一般的に発生の初期に出現する細胞（神経、心筋、卵黄嚢造血細胞など）は、ES 細胞からの in vitro 分化が比較的容易だが、造血幹細胞、肝臓細胞、膵臓β細胞のように発生の後期に「場」から誘導的に出現する細胞については、ES 細胞からの in vitro 分化はとても難しい。たとえば、以前 McKay らがヒト ES 細胞からβ細胞分化に成功したと Science 誌に報告したが、あれは培養液中のインスリンを溜め込んだ細胞だったらしい。ヒト ES 細胞から in vitro で造血幹細胞、肝臓細胞、膵臓β細胞などを効率よく分化させる技術の開発は、おそらく一筋縄ではいかないであろう。

そこで、ヒツジ胎仔の体内 (in vivo) 微小環境を利用して ES 細胞から造血系を再構築できないかと考えた。動物胎仔の体内微小環境には、各種細胞の増殖・分化に必要な「お膳立て」が揃っているはずだ。この環境を上手に利用して、ES 細胞を分化させようというわけである。いわば「in vivo パワー」の利用である。また、胎仔（とくに妊娠 1/3 期まで）は、免疫学的に未成熟であり（まだ胸腺が出来ていない）、移植細胞を（たとえ異種であっても）拒絶しないことが報告されている。さらに、胎仔は日々成長するから、移植細胞が生着するためのスペースが毎日のように創出されるであろう。したがって、生着スペースを得るための放射線照射や薬剤による移植前