

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~16 年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

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~16 年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 敬也

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	11
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	14
------------------------	----

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）
総合研究報告書

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、エリスロポエチン (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、平成 15 年度 (H15) 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。H16 は、EPO 反応型 SAG を改良して完全にヒト化し、野生型 EPO 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。また、サルを用いた実験系で SAG システムと骨髓還流置換法 (BMR 法) を組み合わせた前臨床研究を引き続き行い、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。AAV ベクターで 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 (H15)、さら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 (H16)。後天性難治性造血管疾患において、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: サル ES 細胞を用いた *in vitro* ならびに個体レベルの研究に関して、以下のテーマを実施した。(i) 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実施し (H15)、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 (H16)。(ii) 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を行った (H15)。(iii) ヒツジをレシピエントとしたサル ES 細胞からの造血系再構築実験で、サルの造血を一部持つヒツジの作製に成功した (H16)。(iv) サル ES 細胞をサル胎児肝臓へ同種移植する技術の開発を行い (H15)、移植細胞の中から未分化マーカー (SSEA4) 陽性細胞を予め除去することにより、テラトーマ形成を抑制できることが判明した (H16)。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI: Targeted Vector Integration) 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、TVI 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。(i) TVI 法による遺伝子導入を容易にするためのアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製を試みた (H15, 16)。(ii) 骨髓ストローマ細胞由来の KM-102 細胞株への応用実験を行い、導入遺伝子と AAVS1 領域との junction DNA 配列の同定も行った (H16)。AAV の部位特異的組込み機構を利用した TVI 法は、再生医療に遺伝子操作を加えていく際に、安全性の観点から役に立つものと期待される。

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

ディナベック株式会社

代表取締役社長

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上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EPO反応型選択的増幅遺伝子 (SAG: selective amplifier gene) の利用により、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を開発する。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、第二世代SAGを改良・最適化し、疾患モデルマウスでの有効性を確認する。さらに、霊長類のサルでの有効性・安全性試験を行う。その成果に基づいて臨床プロトコルを策定し、数年以内の臨床研究実施を目指す。

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、筋肉で脱分化誘導遺伝子を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む。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に繋がるものと期待される。

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細胞を用いた個体レベルの研究を行う。この分野でも遺伝子操作技術は必須のツールであり、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細胞のヒツジやサルの胎児への移植法などを検討する。これは体内微小環境を利用してサルES細胞の造血系分化を図るものである。これらの研究は、将来的には、ES細胞に分化制御遺伝子や特定の機能遺伝子を導入した再生医療法の開発に繋がる技術である。

尚、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る。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。具体的には、アデノ随伴ウイルス (AAV) の性質を利用する方法である。AAVは細胞に感染すると第19番染色体のAAVS1領域 (19q13.42) に特異的に組み込まれる傾向がある。この現象には、AAVのRep蛋白質とAAVゲノムの両末端にあるITR (inverted terminal repeat) の両者が必要である。ITR上のRep認識配列と相同な配列がAAVS1領域にも存在し、Repが双方に結合することによりAAVゲノムの特異的組込みが起きるものと想定されている。そこで、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TVI法の応用開発を推進する。

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:

EPO反応型の第二世代SAG [EPO受容体細胞外領域とG-CSF受容体または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) ならびに安全性を検討した。また、移植前処置 (全身放射線照射) の代わりに、骨髓還流置換法 (BMR: bone marrow replacement) (池原法) が有効かどうかをサルの系で検討した (花園、長谷川、寺尾)。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)。

また、臨床応用を考慮し、ヒト EPO 受容体細胞外部分とヒト G-CSF 受容体細胞内部分を融合させた SAG に関して、より効率的なシグナル伝達を実現するため、その接合部構造の詳細な検討を行った (久米)。

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。

次に、AAV/Msx1 を C57BL/6-Ly5.2 マウス前頸骨筋に注射し、経時的に筋組織から単核球を採取して C57BL/6-Ly5.1 マウス (コンジェニックマウス) の前頸骨筋に移植し、その後経時的に採血して、末梢血中の Ly5.2 細胞の割合を追跡することにより、造血系再構築能をもつ骨格筋由来細胞の出現頻度を検討した。また、長期観察後、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骨格筋由来細胞の割合を追跡した。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発 (花園、寺尾) :

(i) サル ES 細胞の遺伝子操作技術に関しては、GFP 遺伝子を搭載した 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、抗ウイルス剤リパビリンの添加によって、GFP 発現量を調節できるかどうか検討した。

(ii) 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。

(iii) ヒツジへの移植実験では、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) で培養し、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) の段階まで予め分化させた。この分化段階の細胞の移植にあたっては、免疫拒絶を避けるため、免疫能獲得前 (妊娠 1/3 期前後) のヒツジ胎仔肝臓内にエコーガイド下で移植した (子宮内移植法)。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。

(iv) サル ES 細胞のカニクイザル胎児へ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、サル胎児 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、適当な時期に胎児を娩出し、移植細胞の生着・増殖・分化を調べた。

また、分化誘導培地で培養したサル ES 細胞の、同種サル胎児の肝臓内への移植実験を行った。その際、培養 6 日目に回収した細胞をそのままエコーガイド下で 60-80 日齢のカニクイザル胎児に移植する実験と、培養 6 日目に回収した細胞を抗ヒト SSEA4 抗体 (PE-anti-SSEA4) で染色し、フローサイトメトリーにより精製した GFP⁺/SSEA4⁻細胞分画を 50-70 日齢の胎児の肝臓内に移植する実験の 2 群に分けた。移植後 85-100 日後に帝王切開により胎児を摘出し、主要臓器での ES 細胞由来組織を検索した。特に、ES 細胞移植後のテラトーマ形成の有無を調べた。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開発 (小澤) :

AAVS1 領域への特異的組込み可能なアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製を試みた。Rep は少量でもアデノウイルスの増殖を抑制することから、発現は厳密に制御する必要があり、Cre-loxP システムを用いた。TK プロモーターと Rep 遺伝子の間に loxP 配列で挟んだ transgene カセット (ITR, CMV プロモーター、プラスターサイジン耐性遺伝子 bsr, IRES, CD8 遺伝子, ITR) を逆向きに挿入した (p32) (図 1)。このユニットでは更に Rep の leak を抑制するため CMV プロモーターからの mRNA が Rep の mRNA と相補的になり、アンチセンス RNA による発現抑制機構も備わっている。Cre 酵素により loxP 部位間での組換えが起こり、TK プロモーターの直後に Rep 遺伝子が

配置され、切り出された transgene は Rep の作用で AAVS1 に組み込まれると予想できる。Cre によって Rep の発現が誘導されるか 293 細胞に Cre 発現プラスミド (pMCCre) とトランスフェクションして検討した。次に HeLa 細胞に transgene プラスミドと Cre 発現プラスミドをトランスフェクションし、プラストサイジン S 存在下で培養を行い、コロニーを形成させ、genomic DNA のサザン解析により AAVS1 への組込み頻度を検討した。

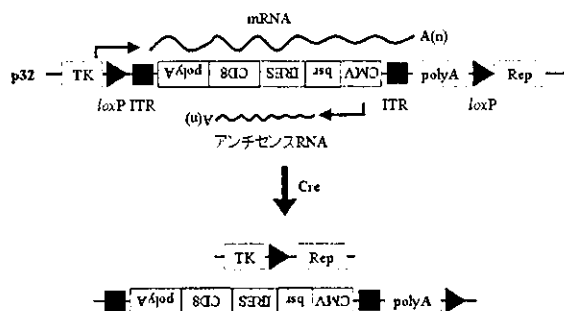


図1 Rep遺伝子の制御法

また、造血幹細胞への特異的遺伝子導入の前段階として、骨髄ストローマ由来の KM-102 細胞株の AAVS1 領域への GFP 遺伝子導入を実際に試み、導入効率、導入遺伝子の安定性などを検討した。AAVS1 領域に組み込ませる遺伝子として GFP-IRES-bsr を ITR で挟んだものを用いた。Rep 発現プラスミドと共に KM-102 にリポフェクションを行い、プラストサイジン S で選択を行い、single cell clone のサザン解析を行った。また、AAVS1 への組込みが確認できたクローンでは、ITR と AAVS1 に設定したプライマーで PCR を行い、junction 配列の同定を試みた。

(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。サルを用いる実験プロトコルは、国立感染症研究所の「動物実験委員会」において承認を受けている。また、SIVベクターを含め、サル個体を用いる組換えDNA実験 (基準外組換えDNA実験) については、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。

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BMR法により骨髄内に移植、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日に約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。

EPO 刺激時は、in situ PCR でも導入遺伝子陽性細胞が数%程度確認され、また、分画した細胞のPCR解析では、T細胞、B細胞、好中球いずれも導入遺伝子陽性細胞が増幅されていた。さらに、LAM-PCR ではこの増幅がポリクローナルであることが明らかになった。

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-EpoRMp1 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 ($p=0.01$)。

MT レトロウイルスベクターに gp91 遺伝子 (慢性肉芽腫症の治療用遺伝子) と SAG (EPOR 全長、EPOR-GcR キメラ数種、EPOR-Mp1 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。増殖シグナルは、EPOR-Mp1 キメラが最強

であったが、EPOR と EPOR-GcR キメラ数種はいずれも同レベル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。

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-/c-kit+分画は、コントロール筋肉群の $1.3 \pm 0.9\%$ に対し、AAV/Msx1 筋注 4 週間後には $13.6 \pm 6.0\%$ に増加した。また CD45+/Sca-1+分画は、コントロール筋肉群の $2.4 \pm 0.4\%$ 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 5×10^4 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。

さらに、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。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発：

(i) 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。

また、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 4 mM 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。一方、低濃度 (0.5-0.75 mM) 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。この濃度の場合にはリバビリン投与後も細胞の継代が可能であったが、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。

(ii) 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。

(iii) ヒツジにおけるサル ES 細胞由来の血液産生では、未分化 ES 細胞を移植すると奇形腫を作ってしまうので、まず試験管内で中胚葉細胞に分化させた。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。移植部位としては、ヒツジ胎仔の肝臓を選択した。そ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いう狙いである。

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。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。4 頭のヒツジが生まれた。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。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) で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。尚、腫瘍の発生は認め

られなかった。

(iv) 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定め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。

次に、GFP 標識したカニクイザル ES 細胞 (CMK6/G) を MMC 処理した OP9 細胞をフィーダーとして種々のサイトカイン存在下で 6 日間培養したところ、60-80% の細胞が未分化マーカー (SSEA4) 陰性となった。これらの細胞をエコーガイド下で 60-80 日齢のカニクイザル胎児肝臓内に移植した結果、臍帯血・肝臓・脾臓・胸腺などの臓器に 0.2-1.1% のキメラ率で ES 細胞由来と思われる GFP 陽性細胞 (これらの細胞と周囲の細胞とで形態学的な差は認められなかった) が検出され、さらに骨髄 CFU あたり 4% 前後のキメラ率が確認できたが、全例でテラトーマの形成が認められた。そこで、*in vitro* で同様に分化誘導した細胞から未分化マーカー SSEA4 陽性細胞を FACS 法によるネガティブ・セレクションで除去し、純化した GFP⁺/SSEA4⁻細胞を 50-70 日齢の胎児肝臓内に移植した結果、全例でテラトーマの形成は認められず、CFU あたりのキメラ率は平均 3.2% であった。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開発 :

アデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製に向けては、まず、293 細胞に p32 と pMCCre をトランスフェクションし Rep の発現をウエスタン解析した。Cre を共発現させたときにのみ Rep が発現することが確認できた。p32 と pMCCre を HeLa 細胞にコトランスフェクションして得られた薬剤耐性クローンの genomic DNA をサザン解析した。最初に AAVS1 特異的プローブと反応させ、プローブを剥がした後、transgene プローブと反応させた。両者のプローブに共に反応するバンドが認められれば AAVS1 領域に transgene が組み込まれたと判断した。得られた 7 クローンのうち、2 クローンで AAVS1 に transgene が組み込まれていた。p32 を用いてハイブリッドベクターの作製を試みたところ、力価は 10^3 /ml と通常の組換えアデノウイルスより著しく低かった。

KM-102 細胞への部位特異的組込みの検討では、Rep 発現プラスミドと transgene プラスミドをリポフェクションし、プラストサイジン S 存在下で培養し、耐性クローンを得た。それらのサザン解

析から、8 個中 3 個のクローンで AAVS1 特異的組込みが認められた。3 個のクローンから AAVS1 と transgene の junction の配列を試みたところ、2 クローンで junction の同定ができた。また AAVS1 領域に遺伝子導入できた 3 クローンでは、6 ヶ月の培養後も GFP の発現が確認でき、導入遺伝子が安定に維持されていることが分かった。

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。本法で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。

MT ベクターは、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い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さらに検討する予定である。

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。そこでさらに移植実験を行ったところ、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真に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。

3) 霊長類 ES 細胞からの造血系再生技術の開発：
(i) 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。

尚、抗ウイルス剤のリバビリンによって 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。リバビリンは幅広い抗ウイルス活性を示すとされ、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 ベクターで導入した遺伝子の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。

その結果、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。いずれにせよ、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。

(ii) 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。

(iii) 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 分化は難しい。そこで、ヒツジ胎仔の体内微小環境を利用して ES 細胞から造血系を再構築することを試みた。これまでの実験では、生まれたキメラヒツジでは、末梢血のサル/ヒツジキメラ率が低いという問題が残った。この解決が今後の最大の課題である。

(iv) サル ES 細胞のサル胎児への移植実験では、ES 細胞が生着した場所に応じて分化することが判明した。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。

また、サル ES 細胞の in vitro 分化誘導系では胎児でテラトーマ形成能を有する SSEA4 陽性細胞が残存すること、SSEA4 陽性細胞を除去した場合にはテラトーマ形成が認められなかったことから、SSEA4 は臨床的な未分化マーカーであると考えられる。

ES 細胞を用いた再生医療戦略では in vitro で目的とする細胞を効率的に分化誘導する技術と、分化誘導した細胞の移植によるテラトーマ形成などのリスクを取り除くことが重要である。今回得られた GFP⁺/SSEA4⁻細胞移植の結果は、霊長類で初めて ES 細胞の clinical stemness marker を実証した結果であり、今後の ES 細胞を用いた再生医療技術の開発において重要な知見となる。一方、今回採用した in vitro 分化誘導系は、少なくともテラトーマ形成能を有する未分化細胞が混在すると言う意味で不完全なシステムであり、今後より効率的にヘマンジオブラストが誘導できる培養システムの開発が必要である。細胞表面抗原を利用して細胞を純化する方法には、今回用いた未分化マーカーを指標としたネガティブセクションと初期分化マーカーを指標としたポジティブセクションとの二つの方法がある。初期分化マーカー陽性細胞の純度という観点からは、ポジティブセクションがはるかに優れている。GFP⁺/SSEA4⁻細胞集団には当然ヘマンジオブラスト以外の細胞も含まれており、これが移植後のキメラ率が低い要因とも考えられる。今後は効率的な分化誘導系を開発すると同時に、ヘマンジオブラストに特異的な初期分化マーカーを確立し、効率的で安全な造血系再生技術の開発を行うことが重要である。

4) 染色体部位特異的遺伝子組込み (TVI) 法の開発：

AAVS1 特異的に治療用遺伝子を導入するためのアデノウイルス・AAV ハイブリッドベクターの作製では、Rep の発現を厳密に制御するため Cre-loxP で Rep の発現を調節し、更に制御を確実なものにするため、アンチセンス RNA で二重に cryptic な Rep の発現を抑制するようにした。トランスフェクションの実験では、Cre 依存的に Rep の発現が誘導され、HeLa 細胞のサザン解析から AAVS1 領域へ transgene が組み込まれていることが確認された。しかしながら、組換えアデノウイルスの作製を試みたところ、力価が著しく低く、

さらなる改良が必要と考えられた。

骨髄ストローマ細胞由来の細胞株 KM-102 を用いた応用実験では、AAVS1 領域に外来遺伝子を組み込ませることができた。このことは骨髄間葉系幹細胞、造血幹細胞等に同手法を応用することが可能であることを示唆している。

E. 結論

- ・SAG プロジェクトに関しては、サルの系で BMR 法との組み合わせを試みたところ、1 年以上に亘って、EPO 刺激で末梢血細胞の 9% まで導入遺伝子陽性細胞を増幅することができた。
- ・CGD モデルマウスの系で、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。
- ・慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の臨床応用を目指して、SAG 構築の最適化を図った。
- ・骨格筋組織の人為的分化転換に関する研究では、脱分化遺伝子 (*Msx1*) を一過性に働かせることにより、非造血系組織から造血系を再構築しうる可能性が示された。
- ・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が示された。しかし、サル ES 細胞に対する毒性も観察され、その軽減に向けて更なる検討が必要である。
- ・試験管内でサル ES 細胞を初期中胚葉細胞 (ヘマジオブラスト) に分化させてからヒツジ胎仔肝臓に移植すると、まだ効率の点で問題が残るが、サルの造血を一部有するキメラヒツジが誕生した。
- ・カニクイザル ES 細胞を分化誘導条件下で培養した後、全ての細胞をサル胎児肝臓内に移植すると、全例でテラトーマの形成が認められた。そこで、GFP⁺/SSEA4⁺細胞を精製して移植を行ったところ、テラトーマの形成は認められなかった。この結果は霊長類 ES 細胞の臨床的未分化マーカーを特定した初めての結果であり、ES 細胞を用いた再生医療技術開発に重要な情報である。
- ・AAV の組込み機序を利用した AAVS1 領域特異的遺伝子導入法 (TVI 法) の基盤技術開発をさらに推進すると共に、間葉系幹細胞への応用を目指し、骨髄ストローマ細胞由来の KM-102 を用いてスタートした。TVI 法は、再生医療に必要な造血幹細胞や ES 細胞の遺伝子操作を行う上で、安全性の観点から役に立つものと期待される。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asano T, Shibata H, Hanazono Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. In, Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.
- 2) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. In, Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.
- 3) Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics. 2005 Mar 3; in press.
- 4) Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., Terao, K., Shimada, K., Ikeda, U., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. Stem Cells 23: 355-364, 2005.
- 5) Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, H., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. Transplantation 79: 32-37, 2005.
- 6) Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y.: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. Gene Ther. 12: 203-210, 2005.
- 7) Ueda, K., Hanazono, Y., Ageyama, N., Shibata, H., Ogata, S., Ueda, Y., Tabata, T., Ikehara, S., Taniwaki, M., Hasegawa, M., Terao, K., and Ozawa, K.: Method - Intra-bone marrow transplantation of hematopoietic stem cells in non-human primates: long-term engraftment without conditioning. Gene Ther. Reg 2: 207-218, 2004
- 8) 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., and 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.
- 9) 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.* 11: 1370-1377, 2004.
- 10) 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.
- 11) 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
- 12) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K., Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol.* 2004 Feb;33(1):34-37.
- 13) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K., Yamada A, Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 2004 Jun;56(3):155-163.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.

24) 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.

25) 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.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 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

PCT 国際出願済み

国際出願番号：PCT/JP2004/009370 (2004/6/25)

国際公開番号：WO2005/000890 (2005/1/6)

2) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., <u>Terao, K.</u> , Shimada, K., Ikeda, U., <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hanazono, Y.</u>	Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34 ⁺ stem cells in a nonhuman primate model.	Stem Cells.	23	355-364	2005
Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, H., <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hanazono, Y.</u>	Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells.	Transplantation,	79	32-37	2005
Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S., Okada, T., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hanazono, Y.</u>	Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved.	Gene Ther.	12	203-210	2005
Ueda, K., <u>Hanazono, Y.</u> , Ageyama, N., Shibata, H., Ogata, S., Ueda, Y., Tabata, T., Ikehara, S., Taniwaki, M., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Terao, K.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Method — Intra-bone marrow transplantation of hematopoietic stem cells in non-human primates: long-term engraftment without conditioning.	Gene Ther. Reg	2	207-218	2004
Ueda, K., <u>Hanazono, Y.</u> , Shibata, H., Ageyama, N., Ueda, Y., Ogata, S., Tabata, T., Nagashima, T., Takatoku, M., <u>Kume, A.</u> , Ikehara, S., Taniwaki, M., <u>Terao, K.</u> , <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa,</u> <u>K.</u>	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
Hara, T., <u>Kume, A.</u> , <u>Hanazono, Y.</u> , Mizukami, H., Okada, T., Tsurumi, H., Moriwaki, H., Ueda, Y., <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa,</u> <u>K.</u>	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

Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hanazono, Y., Kume, A.,</u> Shibata, H., Ageyama, N., <u>Terao, K., Ozawa, K.,</u> and <u>Hasegawa, M.</u>	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
Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, <u>Terao K,</u> Yamada A.	Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP.	J Med Primatol.	33(1)	34-37	2004
Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, <u>Terao K,</u> Yamada A,	Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys.	Immunogenetics.	56(3)	155-163	2004
Xu, R., <u>Kume, A., Hanazono,</u> <u>Y.,</u> Matsuda, K.M., Ueda, Y., <u>Hasegawa, M., Takaku, F.,</u> and <u>Ozawa, K.</u>	G-CSF receptor-mediated STAT3 activation and granulocyte differentiation in 32D cells.	Gene Ther. Mol. Biol.	7	167-172	2003
Itoh, A., Okada, T., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H., <u>Kume, A.,</u> Takatoku, M., Komatsu, N., <u>Hanazono, Y.,</u> and <u>Ozawa,</u> <u>K.</u>	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
Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., <u>Hanazono, Y., Takeuchi, K.,</u> Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., <u>Hasegawa,</u> <u>M., Ozawa, K.,</u> 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
Asano, T., Ageyama, N., Takeuchi, K., Momoeda, M., Kitano, Y., Sasaki, K., Ueda, Y., Suzuki, Y., Kondo, Y., Torii, R., <u>Hasegawa, M.,</u> Ookawara, S., Harii, K., <u>Terao, K., Ozawa, K.,</u> and <u>Hanazono, Y.</u>	Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells	Transplantation	76	1061-1067	2003

Shibata, H., <u>Hanazono, Y.</u> , Ageyama, N., Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , Yoshikawa, Y., and <u>Terao, K.</u>	Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (<i>Macaca fascicularis</i>): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies	Am. J. Primatol.	61	3-12	2003
Urabe, M., Kogure, K., <u>Kume, A.</u> , Sato, Y., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration	J. Gen. Virol.	84	2127-2132	2003
Kametaka, M., <u>Kume, A.</u> , Okada, T., Mizukami, H., <u>Hanazono, Y.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera	Cancer Sci.	94	639-643	2003
Nagashima, T., Ueda, Y., <u>Hanazono, Y.</u> , <u>Kume, A.</u> , Shibata, H., Ageyama, N., <u>Terao, K.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and <u>Hasegawa, M.</u>	New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion	Biochem. Biophys. Res. Commun.	303	170-176	2003
<u>Kume, A.</u> , Koremoto, M., Xu, R., Okada, T., Mizukami, H., <u>Hanazono, Y.</u> , <u>Hasegawa, M.</u> , and <u>Ozawa, K.</u>	In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene	J. Gene Med.	5	175-181	2003
Ageyama, N., Kimikawa, M., Eguchi, K., Ono, F., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and <u>Terao, K.</u>	Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (<i>Macaca mulata</i>)	J. Clin. Apheresis	18(1)	26-31	2003
Kirii, Y., Inoue, T., Yoshino, K., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Shibata, H., Yoshikawa, Y., and <u>Terao, K.</u>	Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand	J Immunol Methods.	278	201-209	2003
<u>Hanazono, Y.</u> , Asano, T., Ueda, Y., and <u>Ozawa, K.</u>	Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors	Trends Cardiovas. Med.	13	106-110	2003

研究成果の刊行物・別刷

Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow–Derived CD34⁺ Stem Cells in a Nonhuman Primate Model

TORU YOSHIOKA^{a,c}, NAOHIDE AGEYAMA,^f HIROAKI SHIBATA,^{a,f} TAKANORI YASU,^c YOSHIO MISAWA,^d KOICHI TAKEUCHI,^e KEIJI MATSUI,^c KEIJI YAMAMOTO,^c KEIJI TERAU,^f KAZUYUKI SHIMADA,^e UICHI IKEDA,^g KEIYA OZAWA,^{a,b} YUTAKA HANAZONO^a

^aCenter for Molecular Medicine; ^bDivision of Hematology, and ^cDivision of Cardiology, Department of Internal Medicine; ^dDivision of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery; and ^eDepartment of Anatomy, Jichi Medical School, Minamikawachi, Tochigi; ^fTsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases, Tsukuba, Ibaraki; ^gDepartment of Organ Regeneration, Shinshu University Graduate School of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan

Key Words. Nonhuman primate • Acute myocardial infarction • Stem cell transplantation
Genetic marking • Lentivirus vector • Plasticity • Neoangiogenesis

ABSTRACT

Rodent and human clinical studies have shown that transplantation of bone marrow stem cells to the ischemic myocardium results in improved cardiac function. In this study, cynomolgus monkey acute myocardial infarction was generated by ligating the left anterior descending artery, and autologous CD34⁺ cells were transplanted to the peri-ischemic zone. To track the *in vivo* fate of transplanted cells, CD34⁺ cells were genetically marked with green fluorescent protein (GFP) using a lentivirus vector before transplantation (marking efficiency, 41% on average). The group receiving cells (*n* = 4) demonstrated improved regional blood flow and cardiac function compared with the saline-treated group (*n* = 4) at 2 weeks after transplant. However, very few transplanted cell–derived,

GFP-positive cells were found incorporated into the vascular structure, and GFP-positive cardiomyocytes were not detected in the repaired tissue. On the other hand, cultured CD34⁺ cells were found to secrete vascular endothelial growth factor (VEGF), and the *in vivo* regional VEGF levels showed a significant increase after the transplantation. These results suggest that the improvement is not the result of generation of transplanted cell–derived endothelial cells or cardiomyocytes; and raise the possibility that angiogenic cytokines secreted from transplanted cells potentiate angiogenic activity of endogenous cells. STEM CELLS 2005;23:355–364

INTRODUCTION

Recent clinical studies have shown that the introduction of bone marrow cells can restore blood flow in ischemic myocardium and ameliorate cardiac function [1–6]. Despite

enthusiasm for these studies, it is unclear how transplanted bone marrow cells contribute to the clinical improvement. Because endothelial progenitor cells are identified in bone marrow cells [7], these cells might participate in the repair

Correspondence: Yutaka Hanazono, M.D., Ph.D., Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi, Tochigi 329-0498, Japan. Telephone: 81-285-58-7450; Fax: 81-285-44-5205; e-mail: hanazono@jichi.ac.jp Received August 16, 2004; accepted for publication November 30, 2004. ©AlphaMed Press 1066-5099/2005/\$12.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2004-0200

of vascular tissue. On the other hand, it has been reported that hematopoietic stem cells differentiate into endothelial cells and cardiomyocytes when transplanted into the ischemic myocardium in mice [8]. More recently, however, it has been reported that hematopoietic stem cells do not give rise to nonhematopoietic cells in the ischemic myocardium in murine models [9–11].

In vivo tracking and plastic properties of hematopoietic stem or progenitor cells have not been examined in primate cardiac ischemia. We have transplanted genetically marked autologous CD34⁺ cells to the ischemic myocardium in a nonhuman primate (*cynomolgus macaque*) model and tracked the in vivo fate of the cells. We have used CD34⁺ cells because the cells are widely used as a fraction of hematopoietic stem cells in clinical and nonhuman primate studies [12]. In addition, CD34⁺ cells contain vascular endothelial progenitor cells [7]. Thus, the present study can address the question of whether transplanted CD34⁺ cells really give rise to endothelial cells and cardiomyocytes in ischemic myocardium in primates.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Eight *cynomolgus macaques* bred in the Tsukuba Primate Center (Ibaraki, Japan) were enrolled in the present study. This study strictly adhered to the rules for animal care and management of the Tsukuba Primate Center, as well as the guiding principles for animal experiments using nonhuman primates formulated by the Primate Society of Japan. The protocols of animal experiments were approved by the animal welfare and animal care committee of the National Institute of Infectious Diseases (Tokyo).

Preparation of CD34⁺ Cells

Cynomolgus bone marrow (50 ml) was aspirated from the iliac crest under an isoflurane-induced general anesthesia. From the bone marrow, a nucleated cell fraction was obtained after red blood cell lysis with addition of ACK buffer (Biosource, Camarillo, CA). CD34⁺ cells were isolated using magnetic beads conjugated with anti-human CD34 (clone 561; Dynal, Lake Success, NY), which cross-reacts with *cynomolgus* CD34 [13]. The purity of CD34⁺ cells at harvest ranged from 90% to 95%, as assessed with another anti-human CD34 (clone 563; PharMingen, San Diego) that cross-reacts with *cynomolgus* CD34 [13]. The purity remained at the same levels after the 1-day transduction culture, which is discussed next.

Lentiviral Transduction

A simian immunodeficiency virus (SIV)-based lentivirus vector carrying enhanced jellyfish green fluorescent protein (GFP) (Clontech, Palo Alto, CA) was used for transduction. The vector was prepared as previously reported [14, 15]. All recombinant DNA experiments were approved by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

CD34⁺ cells (1×10^6) were seeded in six-well plates in 2 ml of StemSpan serum-free expansion medium (Stem Cell Technologies, Vancouver) supplemented with recombinant human thrombopoietin (100 ng/ml; Kirin, Tokyo), recombinant human stem cell factor (100 ng/ml; Biosource, Camarillo, CA), recombinant human Flt-3 ligand (100 ng/ml; Research Diagnostics, Flanders, NJ), and antibiotics (100 U/ml of penicillin and 0.1 µg/ml of streptomycin; Meiji, Tokyo). The cells were transduced twice each for 12 hours (total, 24 hours) with the SIV vector at 50 transducing units per target cell. After transduction, cells were cryopreserved with 10% dimethylsulfoxide (Wako, Osaka, Japan) and 1% Dextran 40 (Yoshitomi, Osaka, Japan) in a controlled-rate programmable freezer (Kryo 10; Planer Biomed, Middlesex, UK) until transplantation. The viability of cells after thawing was $53.0 \pm 6.5\%$, as assessed by trypan blue staining. An aliquot of transduced cells was assessed for GFP expression at 48 hours after transduction by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with excitation at 488 nm and fluorescence detection at 530 ± 30 nm.

In Vitro Endothelial Differentiation

CD34⁺ cells were seeded on fibronectin-coated plates (Becton Dickinson) in M199 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 20% fetal calf serum and bovine pituitary extracts (Invitrogen) as previously described [7]. After 7 days in culture, cells were examined for the uptake of DiI-acetylated low-density lipoprotein (LDL) and for the expression of CD31, von Willebrand factor (vWF), vascular endothelial (VE)-cadherin, and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2. Briefly, adherent cells were incubated with 1 µg/ml of DiI-acetylated LDL (Molecular Probes, Eugene, OR) for 4 hours at 37°C. For immunofluorescence staining, after fixation in ice-cold 4% paraformaldehyde for 10 minutes and blocking in 1% bovine serum albumin (BSA) for 15 minutes, cells were incubated with a primary antibody: mouse anti-human CD31 (VM-59; Becton Dickinson), rabbit anti-human vWF (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), mouse anti-human VE-cadherin (55-7H1; Becton Dickinson), or rabbit anti-mouse VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 hour at room

temperature. Cells were then incubated with a secondary antibody, Texas red-conjugated horse anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Vector, Burlingame, CA) or goat anti-rabbit IgG (Vector) for 30 minutes at room temperature.

Myocardial Infarction and Transplantation

All operations on cynomolgus monkeys were performed under an isoflurane-induced general anesthesia. Thoracotomy was conducted, the pericardium was opened, and the left anterior descending coronary artery was ligated with 5-0 prolene sutures. One to 2 hours after the ligation, GFP-transduced, autologous CD34⁺ cells in normal saline were injected with a microsyringe through a 27-gauge needle into 10 sites (5 μ l/site) in the peri-ischemic zone. In the control group, saline alone was injected in the same way. The pericardium and chest were closed. The animals then received butorphanol tartrate (0.5 mg/kg, intramuscularly) daily for 5 days to alleviate the pain associated with the operation and myocardial infarction.

Echocardiography

Echocardiographic imaging was obtained using a Sonos 5500 system (Philips Medical Systems, Andover, MA) before transplantation and at 2 weeks after transplant. The echocardiography was conducted by independent technicians irrelevant to our study group. In one animal (BM97080), it was additionally performed at 12 weeks. Short-axis two-dimensional images at the midpapillary level of the left ventricle were stored, and percent fractional shortening (%FS) was calculated to assess cardiac function.

Myocardial contrast echocardiography (MCE) was performed at day 0 (just before transplantation) and at 2 weeks after transplant to assess regional blood flow and blood flow defect size. In one animal (BM97080), chronic assessment was performed at 12 weeks after transplant. The electrocardiograph-triggered end-systolic intermittent imaging was conducted in short-axis views at incremental pulsing intervals (triggering intervals of 1, 2, 3, 4, and 8 beats) using an S12 probe. Once optimized, the settings of depth (4 cm), mechanical index (0.9), and focus (3 cm) were fixed. The contrast agent (perflutren; Yamanouchi, Tokyo) consisted of lipid-coated microbubbles of perfluorocarbon [16]. Perflutren diluted with saline (1:10) was administered intravenously at a constant rate (0.01 ml/kg per min). For the assessment of regional blood flow, MCE images were analyzed using ORIGIN 6.0J (Lightstone, Tokyo), and the blood flow was calculated as previously described [17]. Data are presented as a blood flow ratio (the peri-infarct versus nonischemic control region or the infarct versus nonischemic control region). For the assessment of blood flow defect, MCE images obtained at triggering interval of four beats were

analyzed using National Institutes of Health Image software (version 1.61). Data are presented as percent defect compared with the total blood flow.

Microspheres

Colored microspheres (15 μ m \pm 2% diameter; E-Z Trac, Los Angeles) were used to evaluate regional blood flow 2 weeks after transplant [18], with the exception of one animal (BM97080), in which evaluation was performed 12 weeks after transplant. A set of microspheres (2×10^6) was diluted in 2 ml of saline and injected into the left ventricle over 30 seconds. A reference blood sample was withdrawn at a constant rate of 5 ml/min through the femoral artery. After the collection of blood samples, monkeys were irrigated with saline for mercy killing and blood was completely washed out. The heart was excised from each monkey. Tissue samples from the infarct, peri-infarct, and nonischemic regions (one sample per region) were digested, microspheres were collected, and the blood flow was calculated according to the manufacturer's instructions. Data are presented as blood flow ratio (the peri-infarct versus nonischemic control region or the infarct versus nonischemic control region).

Immunohistochemistry

Tissue samples from the infarct, peri-infarct, and nonischemic regions at 2 weeks after transplant were embedded in optimal cutting temperature compound (Sakura, Zoeterwoude, Netherlands) and frozen in liquid nitrogen. Sections were prepared (6 μ m), fixed for 10 minutes at 4°C in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), and blocked with 1% BSA in PBS. The sections were incubated at room temperature with a primary antibody, monoclonal mouse anti-human CD31 (1:200; Becton Dickinson), followed by a secondary antibody, biotin-conjugated horse anti-mouse IgG (1:500; Vector). The sections were then treated with avidin-alkaline phosphatase (ABC AP kit; Vector) for 30 minutes. The reaction was developed with a Vector Red substrate kit (SK-5100; Vector). In the case of double staining of CD31 and GFP, the above sections were further incubated with polyclonal rabbit anti-GFP (1:200; Clontech) followed by biotin-conjugated anti-rabbit IgG (1:500; Vector) and treated with avidin-peroxidase (ABC Elite kit; Vector). The reaction was developed with a Vector SG substrate kit (SK-4700; Vector). The sections were counterstained with hematoxylin, mounted in glycerol, and examined under a light microscope.

In Situ Polymerase Chain Reaction

In situ detection of transduced cell progeny was performed by amplifying proviral sequences as previously reported [19]. The following primer set for the GFP gene was used: