

れる予定のMT（共同研究相手のViroMed社より供与）を用いた。比較対照するSAGとしてEpoR全長、およびEpoRとトロンボポエチン受容体のキメラ（EpoR-Mpl）を搭載するベクターも作製した。

上記ベクターを用いてX-CGDモデルマウスの骨髄細胞に遺伝子導入し、Epo刺激およびG-CSF刺激下でコロニーアッセイを行った。生じたコロニーには直接ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）溶液を添加して活性酸素産生能を調べ、gp91遺伝子導入により機能を回復した顆粒球コロニーを算定した。Epo刺激により最も多数の造血コロニーを生ぜしめたEpoR-GcRについては、この遺伝子を導入したX-CGD骨髄細胞を同系マウスに移植して、Epo刺激（10単位皮下注連続5日間を1クール）により遺伝子導入細胞の体内増幅が可能であるか検討した。遺伝子導入効率の算定には、末梢血顆粒球の活性酸素産生能を、ジヒドロローダミン-123（DHR）還元能を指標としてフローサイトメトリーで測定した。

（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

G-CSF刺激による顆粒球コロニーは、内因性のGcRを介する細胞増殖の結果出来るもので、SAGの有無や種類にかかわらず骨髄細胞10万個あたり約1,000個で一定だった。いずれのSAGを用いた場合も100個弱のコロニーでNBT陽性となり、これは本実験における遺

伝子導入効率がほぼ一定（約10%）であったことを示す。一方、Epo刺激によってできるコロニーは、殆どがSAGの作用を介するもので、SAGの機能（増殖促進効果や有効に働く細胞の分化段階など）を反映する。今回検討したSAGの中で最も強力だったのがEpoR-Mplで、骨髄細胞10万個から400個近いコロニーを生ぜしめた。EpoR全長やEpoR-GcRのバリエーションはいずれも100個余のコロニーを誘導し、その強度はほぼ同等と考えられたが、その中ではEpoRとGcRの間に2アミノ酸（KL）を挟んだもの（Version 2）が最も多数のコロニーを作らせた。なお、Epo刺激によってできたコロニーのNBT陽性率はいずれも85%程度と高率で、SAGを介した刺激が特異的に働いて顆粒球を増殖させたことを示す。

EpoR-GcR (Version 2) 遺伝子を導入したX-CGDマウスの骨髄細胞を移植して造血系を再構築した同系マウスにEpoを投与して機能回復顆粒球の割合を測定したところ、第1クールの刺激にて $1.0 \pm 0.1\%$ から $3.9 \pm 0.8\%$ ($P = 0.006$)、第2クールの刺激にては $1.5 \pm 1.1\%$ から $3.2 \pm 2.2\%$ ($P = 0.065$)へとそれぞれ上昇した。

D. 考察

疾患モデルマウスの骨髄細胞に、改良型SAG（EpoR-GcR型キメラ受容体遺伝子）を導入することにより、CGD治療の標的である骨髄球系細胞を増幅できることが示された。GcRの細胞増殖シグナルはMplより弱いものの、特異性の高い増幅が得られ、安全性は高いと考えられる。

E. 結論

改良型選択的増幅遺伝子 (EpoR-GcR 型キメラ受容体遺伝子) を治療用遺伝子とともに標的細胞に導入することにより、慢性肉芽腫症遺伝子治療の効果を増強しうる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Liu Y, Okada T, Sheykholeslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K, Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-732, 2005
2. Okada T, Nomoto T, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Ogura T, Iwata-Okada M, Uchibori R, Shimazaki K, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-1218, 2005
3. Urabe M, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM, Ozawa K: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-1885, 2006

4. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E, Ozawa K: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther*, in press
5. Urabe M, Xin KQ, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus type vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther*, in press
6. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med*, in press

2. 学会発表

1. 久米晃啓, 小倉剛, 水上浩明, 小澤敬也: 新生児期遺伝子治療におけるベクター動態のイメージング解析. 第108回日本小児科学会小児科学会学術集会. 2005. 4. 23, 東京. (日児誌 109: 168, 2005)
2. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Hamada H, Kume A, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: AAV vector-mediated neonatal gene transfer: efficient transgene expression in muscles after intraperitoneal cavity vector injection. The 8th Annual Meeting of the American

- Society of Gene Therapy, 2005.6.2, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S52, 2005)
3. Urabe M, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Kotin RM, Ozawa K: Type 1 Rep52 is superior to authentic Rep52 for producing recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.3, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S200, 2005)
 4. Ito T, Okada T, Miyashita H, Nomoto T, Maeda Y, Sarukawa M, Shimpo M, Yoshioka T, Matsushita T, Mizukami H, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Protection of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 expression. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.3, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S239, 2005)
 5. Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Sheykholslami, Muramatsu S, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.3, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S256-257, 2005)
 6. Kume A: On-demand expansion of genetically corrected blood cells. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Executive Summaries p29)
 7. Ogura T, Mizukami H, Zhang YY, Okada T, Kume A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y, Ozawa K: Tissue distribution of expression using AAV8-based vectors after intramuscular injection and other routes of delivery. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S334, 2005)
 8. Zhang YY, Ogura T, Mimuro J, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K, Mizukami H: Adipose tissue transduction using AAV8-based vectors: inadvertent gene transfer into liver. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S335, 2005)
 9. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Matsushita T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Effective purification of adeno-associated virus vectors by disposable ion exchange membranes. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S337, 2005)
 10. Kume A, Ogura T, Mizukami h, Kure S, Okada T, Urabe M, Matsushita T, Ozawa K: Overcoming gender-specific barrier of AAV-mediated gene therapy by neonatal intervention. The 8th Annual Meeting of

- the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S348-349, 2005)
11. Sarukawa M, Okada T, Yoshioka T, Nomoto T, Ito T, Maeda Y, Shimpo M, Matsushita T, Mizukami H, Shimazaki K, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Intramuscular administration of AAV vector expressing interleukin-10 in Dahl salt-sensitive rats prevents the development of hypertensive heart disease. The 8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005.6.4, St. Louis, MO, USA. (Mol Ther 11 Suppl1:S363, 2005)
 12. Sarukawa M, Okada T, Yoshioka T, Ito T, Nomoto T, Mizukami H, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Prevention of hypertention and heart failure in Dahl salt-sensitive rats by intramuscular delivery of AAV vector expressing interleukin-10. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.28, 東京 (Abstract #038)
 13. Kume A, Ogura T, Mizukami H, Okada T, Urabe M, Matsushita T, Ozawa K: Neonatal intervention to overcome gender-specific barrier of AAV-mediated gene therapy for phenylketonuria. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.29, 東京 (Abstract #011)
 14. Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Matsushita T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Large-scale purification system for adeno-associated virus vectors by using disposable ion exchange membranes. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.29, 東京 (Abstract #051)
 15. Urabe M, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Kotin RM, Ozawa K: Type 5 AAV genome is more effectively packaged into type 5 capsids with type 1 Rep52 than authentic Rep52 in insect cells. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.29, 東京 (Abstract #053)
 16. Mizukami H, Zhang YY, Ogura T, Mimuro J, Okada T, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Inadvertant liver transduction after AAV8-based vector injection into adipose tissue. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.29, 東京 (Abstract #063)
 17. Takano K, Mimuro J, Mizukami H, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Okada T, Ohmori T, Madoiwa S, Sugo T, Kume A, Ozawa K, Sakata T: Endothelial cell specific expression of human factor IX gene driven by the enhanced PAI-1 promoter in mice using AAV1 vectors. 2005.7.29, 第11回日本遺伝子治療学会, 東京 (Abstract #064)
 18. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Okada T, Hamada H, Urabe M, Kume A, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K: Neonatal gene transfer: efficient transgene expression in muscles after intraperitoneal AAV vector injection. 2005.7.29, 第11回日本遺伝子治療学会, 東京 (Abstract #065)
 19. Nobuyoshi M, Kume A, Mizukami H, Matsushita T, Okada T, Urabe M, Ohgoshi Y, Endo T, Ozawa K: Transient Msx1

expression in skeletal muscle induces immature cells with hematopoietic activity in situ. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.30, 東京 (Abstract #018)

20. Ito T, Okada T, Miyashita H, Sarukawa M, Nomoto T, Yoshioka T, Matsushita T, Maeda Y, Mizukami H, Matsusita T, Kume A, Yamamoto K, Ikeda U, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Prevention of rat pulmonary hypertension by adeno-associated virus vector-mediated sustained interleukin-10 expression. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.30, 東京 (Abstract #021)

21. Ajalli R, Urabe M, Soma M, nakakura T, Mizukami H, kume A, Ozawa K: Site-specific insertion of therapeutic DNA into the AAVS1 locus (19q13.4) in human mesenchymal stem cells by using adeno-associated virus integration machinery. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.30, 東京 (Abstract #090)

22. Ogura T, Mizukami H, Zhang YY, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y, Ozawa K: Tissue distribution of transgene expression using AAV8-based vectors after intramuscular injection and other routes of delivery. 第11回日本遺伝子治療学会, 2005.7.30, 東京 (Abstract #094)

23. 久米晃啓, 小倉剛, 水上浩明, 卜部匡司, 岡田尚巳, 松下卓, 北直喜, 小澤敬也: フェニルケトン尿症遺伝子治療におけるアデ

ノ随伴ウイルスベクター投与時期と経路の検討. 日本人類遺伝学会第50回大会, 2005.9.21, 倉敷 (抄録集 p170)

24. 吳繁夫, 小倉剛, 水上浩明, 松下卓, 卜部匡司, 岡田尚巳, 松原洋一, 小澤敬也, 久米晃啓: 新生児期遺伝子導入しおけるフェニルケトン尿症治療の試み. 第48回日本先天代謝異常学会総会, 2005.11.17, 熊本 (日本先天代謝異常学会雑誌 21:127, 2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず。
3. その他
該当せず。

霊長類のサルを用いた前臨床研究

分担研究者 花園 豊（自治医科大学・助教授）

研究要旨

目的：造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞（骨髄間質細胞）を直接骨髄内へ移植することにより、骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を図る。

必要性：造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

平成 17 年度の成果：サル造血幹細胞自家移植の系で、造血幹細胞（CD34⁺細胞）を間葉系幹細胞（骨髄間質細胞）と共に直接、骨髄内へ移植することによって、造血幹細胞の生着が促進されることを示す予備的データが得られた。

A. 研究目的

造血幹細胞移植を受ける患者では、術前の化学療法や放射線照射による前処置によって骨髄微小環境が重度に破壊されるために、生着不全・不良を来すことがある。生着促進のためには骨髄微小環境の再建技術が必要である。また、臍帯血を用いる移植では、臍帯血中の造血幹細胞の量が少ないため、少ない造血幹細胞を無駄なく効率よく生着させる技術が望まれる。

本研究では、造血幹細胞移植治療において、前処置後、間葉系幹細胞を含む骨髄間質細胞を直接骨髄内へ移植することにより、骨髄微小環境を再構築し、造血幹細胞の生着促進を

図る。本年度は、このことを検証するためのサルの実験系を構築し、実際に1頭の移植実験を実施した。

B. 研究方法

(1) 移植用細胞の単離と遺伝子標識:骨髄間質細胞は、サル骨髄血中の付着性単核球を用いる。造血幹細胞としてサル CD34⁺細胞を用いる。CD34⁺細胞は、後の移植実験のために二等分する。

骨髄間質細胞および2群に分けた造血幹細胞（CD34⁺細胞）をそれぞれ異なるレトロウイルスベクター（PLII, G1Na, LNL6）を用いて遺伝子標識する（triple marking）。

(2) 骨髄内移植:サルに対して全身放射線照射によって骨髄破壊的前処置を施行する。サル自家移植の系で、同一個体の左右別々にヘミ移植 (hemi-transplantation) を行う (個体差の影響を排除するため)。すなわち、右側には造血幹細胞 (G1Na で標識) と骨髄間質細胞 (PLII で標識) を骨髄内に直接、共移植する。左側にはコントロールとして造血幹細胞 (LNL6 で標識) のみを骨髄内に移植する。

(3) 移植後の評価:移植後の造血が、共移植群(G1Na 標識)と単独移植群(LNL6 標識)のどちらに由来するか判定する。具体的には、腸骨から採取した骨髄細胞のコロニーアッセイを行い、各コロニーに対して G1Na と LNL6 を判別する PCR を行う。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験: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。

- ・花園豊申請「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 6 月 1 日承認 (H16-51)

- ・花園豊申請「幹細胞治療法のサルを用いた有用性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 17 年 4 月 1 日承認 (DNA-070)

動物実験倫理:サルを用いる動物実験については、以下の通り承認を受けた。

- ・花園豊申請「サルを用いた幹細胞治療法の開発」自治医科大学 平成 17 年 2 月 22 日承認 (No.3)

- ・花園豊申請「サルの幹細胞を用いた治療法の有効性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成 17 年 6 月 21 日承認 (第 4-11 号)

C. 研究結果

現在、1 頭目のサルの移植実験を終了し、結果を解析中である。これまでに判明した実験結果を表にまとめた (表 1)。

表 1 1 頭目の実験結果

	共移植群	単独群
移植部位	右側 上下肢	左側 上下肢
移植細胞とマーキングベクター	CD34 ⁺ 細胞 G1Na	CD34 ⁺ 細胞 LNL6
	間質細胞 PLII	
採取時 CD34 ⁺ 細胞数	11.4 x 10 ⁶	11.4 x 10 ⁶
移植時 CD34 ⁺ 細胞数	22.4 x 10 ⁶	18.2 x 10 ⁶
移植時 間質細胞数	11.0 x 10 ⁶	なし
CD34 ⁺ 細胞の移植前遺伝子導入効率 (全細胞 PCR)	27.8%	21.8%
CD34 ⁺ 細胞の移植前遺伝子導入効率 (コロニー PCR)	50.0% (24/48)	54.2% (26/48)
間質細胞の移植前遺伝子導入効率 (全細胞 PCR)	39.3%	NA
移植後 46 日目の遺伝子導入効率 (腸骨コロニー PCR)	47.8% (22/46)	10.1% (5/46)

D. 考察

本研究事業の初年度あたる平成 17 年度は、サルを用いた遺伝子標識研究を計画し、1 頭実施した。その結果、造血幹細胞 (CD34⁺細胞) を間葉系幹細胞 (骨髄間質細胞) と共移植した場合、造血幹細胞の生着がよい傾向が観察された。

骨髄間質細胞を骨髄内に直接移植すれば、骨髄内で骨髄間質細胞から骨芽細胞が分化し、造血幹細胞のニッチ (niche) が創出され、造血幹細胞の生着が促進されたのではないかと考えられる。そう考える根拠は以下の通りである。

- ・放射線照射を受けたレシピエントマウスでは、造血幹細胞のニッチは放射線照射により破壊されており、移植された造血幹細胞の骨髄への生着が低下している (Plett et al. *Blood* 2002;100:3545-3552)。

- ・一方、マウス骨髄中で骨芽細胞が造血幹細胞のニッチであると報告された (Zhang et al. *Nature* 2003;425:836-841. Calvi et al. *Nature* 2003;425:841-845)。

- ・ヒト骨髄間質細胞は骨芽細胞への分化能を有する (Prockop et al. *Science* 1997;276:71-74)。

- ・マウス骨髄間質細胞は骨髄へのホーミング能が低く、血管内から移植しても生着効率はよくない (Wynn RF et al. *Blood* 2004;104:2643-2645)。今回は骨髄内へ直接移植したため、間質細胞の生着の効率が上がり、より多くのニッチを供給でき、結果として造血幹細胞の生着が亢進した可能性を指摘できる。

しかし、まだ移植例数は 1 頭で予備的結果

にすぎない。来年度以降はサルの例数を増やし、本治療法の有効性と安全性をしっかりと検証する必要がある。

造血幹細胞移植後の造血回復に関しては、造血幹細胞の体外増幅やサイトカイン投与による造血回復の促進など、主にドナー細胞の観点から研究が進められている。これに対して、骨髄微小環境の観点から造血幹細胞の生着促進を図る本研究はユニークといえ、いっそうの進展を図りたい。

E. 結論

サルを用いた実験から、骨髄間質細胞を造血幹細胞とともに骨髄内へ直接移植すると、造血幹細胞の生着を高めることを示す予備的データが得られた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* in press.
2. Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting.

Stem Cells first published online February 2, 2006; doi:10.1634/stemcells.2005-0391.

3. Asano T, Shibata H, Hanazono Y: Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol Biol* 329: 295-303, 2005.
4. Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y: In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol Biol* 329: 459-467, 2005.
5. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima N, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim* 54: 421-428, 2005.
6. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, 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.
7. Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther* 12: 203-210, 2005.
8. Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K,

Hanazono Y: Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. *Transplantation* 79: 32-37, 2005.

2. 学会発表

1. Hanazono Y: Stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. International Society for Cellular Therapy 11th Annual Meeting, Vancouver, Canada, May 4-7, 2005. (abstract not available)
2. Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nakamura S, Sasaki K, Tanaka Y, Hayashi S, Kitano Y, Terao K: Purging SSEA-4-positive cells prevents tumor formation after allogeneic transplantation of cynomolgus monkey ES cell-derivatives. International Society for Stem Cell Research 3rd Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, June 23-25, 2005. (abstracts p. 73-74)
3. Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Nakamura S, Sasaki K, Hayashi S, Kitano Y, Terao K: Prevention of tumor formation after allogeneic in utero transplantation of cynomolgus monkey embryonic stem cell-derived hematopoietic precursors. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, USA, Dec. 10-13, 2005 (*Blood* 106 suppl:58a-59a, 2005).
4. 柴田宏昭, 佐々木京子, 揚山直英, 北野良博, 林聡, 田中裕次郎, 寺尾恵治, 花園豊: サル ES 細胞を用いた同種移植実験: テラ

トーマ形成リスクの軽減の試み. 第4回日本再生医療学会, 大阪, 2005年3月1-2日.

(日本再生医療学会誌 4 suppl:190, 2004)

5. 田中裕次郎, 柴田宏昭, 小原陽子, 岸友紀子, 林聡, 長尾慶和, 北野良博, 花園豊: サルES細胞由来の造血をもつヒツジの作製. 第8回日本異種移植研究会, 奈良, 2005年3月5日. (抄録集 p.15)
6. 柴田宏昭, 揚山直英, 林聡, 北野良博, 寺尾恵治, 花園豊: サルES細胞由来の造血再構築. 第3回幹細胞シンポジウム, 淡路島, 2005年4月21-23日. (抄録集 p.50)
7. 花園豊, 柴田宏昭, 岸友紀子, 揚山直英,

中村紳一郎, 田中裕次郎, 林聡, 北野良博, 寺尾恵治: サルをレシピエントとするサルES細胞由来の造血再構築. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 2005年9月17-19日. (臨床血液 46:728, 2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし.

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

選択的増幅遺伝子（SAG）を利用した造血系細胞の体内増幅法に関する開発研究

分担研究者 長谷川 護（ディナベック株式会社・社長）

研究要旨

目的：造血幹細胞移植治療において、前処置無しに、間葉系幹細胞（骨髄間質細胞）と共に造血幹細胞を直接骨髄内へ移植することにより、造血幹細胞の生着促進を図る。さらにこの造血幹細胞に体内において、遺伝子導入造血幹細胞を選択的に増殖優位性を付与する選択的増幅遺伝子（SAG）を導入することにより、より高い生着効率と、末梢血中の移植幹細胞由来の細胞比率を高めることを目指す。即ち SAG と骨髄内移植と間葉系幹細胞共移植の三者併用により、遺伝子導入幹細胞の生着効率と増幅効率の向上を期待する。

必要性：難治性血液疾患の治療において、造血幹細胞移植を受ける患者では、生着効率の向上が重要な鍵となる。一方、自己の造血幹細胞に疾患治療遺伝子を導入した細胞を移植する遺伝子治療法では、造血幹細胞が遺伝子導入効率の低い細胞であることから、体内で選択的に遺伝子導入細胞を増幅することが、治療効果を高める一つの方法である。生着率を高めることと選択的な幹細胞増幅は、互いに相加相乗効果をもたらすことが期待され、これらの併用により造血幹細胞遺伝子治療の新たな道が開けると思われる。

平成 17 年度の成果：SAG の造血幹細胞への導入、骨髄内移植、間葉系幹細胞（骨髄間質細胞）と共移植の三法併用の予備実験として SAG を用いない造血幹細胞（CD34⁺細胞）と間葉系幹細胞（骨髄間質細胞）共移植を花園分担研究者と共同で行い、造血幹細胞の生着が促進されることを示すデータが得られた。また、SAG を搭載したレトロウイルスベクターの生産クローンを樹立し、今回の三者併用の準備を行った。

A. 研究目的

難治性血液疾患の治療法として、造血幹細胞遺伝子治療法に期待が集まったが、遺伝子導入の低さに問題があり、まだ確立された治療法には至っていない。加えて遺伝子導入による副作用の問題からも、安全装置の入った細胞や、安全に導入された細胞を選択し、患者

に移植するとなると細胞数が、治療レベルにははるかに至らない。これまでに遺伝子導入された細胞を選択的に増幅する遺伝子（Selective Amplifier Gene: SAG）を開発し、in vitro 及び in vivo 実験で遺伝子導入細胞を増幅することに成功した。しかし、増幅後の遺伝子導入効率は必ずしも安定した高値が得られ

るわけではない。個体間の増幅効果の差は生着効率の差に起因するところが大きいと考えた。また治療後の患者 QOL を考えた場合、化学療法や放射線療法といった前処置は好ましくない。そこで前処置無しという厳しい条件下で生着効率を上昇させる工夫が必要であった。そのために髄腔を還流し「空間」を作り出し、骨髄内に幹細胞を移植する骨髄置換法 (iBMT) を考案し、これと SAG と組み合わせることにより生着を向上させ体内増幅効果を上昇させることに成功した。

本研究では、さらなる生着率の上昇を期待し、間葉系幹細胞を含む骨髄間質細胞を直接骨髄内へ移植し骨髄微小環境を再構築し、SAG 導入造血幹細胞の生着促進を図る。このとき移植と同時に薬剤 (EPO) により増幅刺激を与えることにより、生着の上昇及び生着後の細胞増幅をおこなう。本年度は、この予備実験としてサルの実験系を構築し、SAG 無しでの移植実験を実施した。また、来年度以降に実施を予定している、SAG と iBMT さらに、MSC 共移植の三者併用試験のために、SAG の高力価生産細胞を樹立した。

B. 研究方法

(1) トリプルマーキングベクターの準備

サルの実験では頭数を十分確保出来ないことや、個体差が大きいことなどから、正しく対照実験を用意出来ない場合がある。ただし個体サイズが大きいため、一個体内で移植細胞を2群に分け、同一個体内で対照実験を行うことが十分可能である。本実験では、比較用の造血幹細胞マーキングに二種類のベクター、

G1Na、LNL6、を用い共移植群と単独移植群を別標識する。共移植する骨髄間質細胞マーキング用にもう一種、PLII を用意した。三種それぞれネオマイシン耐性遺伝子由来の配列を持ち、PCR によってプロウイルスを持つ細胞を検出することが可能となる。これら三種類のレトロウイルスベクターを生産した。

(2) SAG ベクター高力価生産株の樹立

SAG を用いるサルでの試験用に高力価の SAG 搭載レトロウイルスベクター生産株を樹立した。

まず SAG (EPORMpl) を搭載したマウス幹細胞ウイルス (MSCV) ベクターを、エコトロピックレトロウイルスベクターパッケージング細胞株、BOSC23 細胞にトランスフェクションした。そうして培養上清中に生産されたベクターを、ギボンエイブ白血病ウイルスエンベロープ型ウイルスのパッケージング細胞である PG13 に感染させ、クローニング後培養上清のドットプロットによって高力価生産クローンを選択した。さらに BOSC23 細胞上清によるウイルスベクターの感染、クローニングを3回繰り返す、高力価の生産細胞を得た。

C. 研究結果

トリプルマーキング用のベクターそれぞれを生産し、マーキングを行い、花園分担研究者と共同による移植実験を行った。マーキングレベルは CD34 陽性細胞に対して 20%以上、間質細胞に対して約 40%と実用レベルの力価のウイルス液を得ることができた。また、SAG 搭載ベクター生産細胞に関しても、

クローニングと感染を繰り返すことにより、 10^7 以上の粒子力価を生産するクローンが複数クローン (PG13/EPORMpl #20、PG13/EPORMpl #35 他) 得られた。

さらに *in vivo* 実験に使用しにくいのが、SAG に IRES-YFP を接合させたベクター高力価生産細胞株 (PG13/EPORMpl-YFP #71) も得られた。

D. 考察

本研究は、これまで行ってきた SAG 研究成果の実用化に向けて、安全かつ効率のよい方法を開発することである。本年度は、予備実験として SAG を用いず造血幹細胞を効率よく、造血組織として生着させるために新しい方法の確認を行った。

今回共同研究にて得られた造血幹細胞と間葉系幹細胞 (骨髄間質細胞) との共移植した場合、造血幹細胞の生着率の向上が観察されたが、移植造血幹細胞が SAG を有し回りの細胞に対し増殖優性を示せば生着率はさらに向上する可能性がある。これまでの研究でも、移植時に既に SAG 導入細胞が増殖優位になるように EPO を投与した場合、移植後に EPO を投与した場合に比べて生着がよい傾向が見られている。また、本研究の最終目標である末梢血中における遺伝子導入細胞の比率を高めることと、生着率向上との関連性はまだ不明であるが、必要条件となりうることは容易に予想出来る。

今後、末梢血中の遺伝子導入効率を数十%まで高めることができれば、遺伝子治療の対象となる疾患の範囲を広げることが可能となる。さらに、遺伝子挿入位置による発癌の

危険性の少ない細胞を選択的しても、体内外で増幅出来れば、遺伝子治療の危険性を回避可能になると思われる。

今回得られた SAG ベクター生産細胞により、次回は、SAG 導入細胞を効率よく生着させ、体内における増幅効率を調べる予定である。

E. 結論

骨髄間質細胞を造血幹細胞とともに骨髄内へ直接移植すると生着率が向上するという予備試験及び SAG ベクター生産細胞の樹立により、三者併用試験の準備を終えた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Griesenbach U, Boyton RJ, Somerton L, Garcia SE, Ferrari S, Owaki T, Ya-Fen Z, Geddes DM, Hasegawa M, Altmann DM, Alton EW. Effect of tolerance induction to immunodominant T-cell epitopes of Sendai virus on gene expression following repeat administration to lung. *Gene Ther.* 13: 449-56, 2006
2. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* in press.

3. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima N, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K: Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim* 54: 421-428, 2005.
4. Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency

preserved. *Gene Ther* 12: 203-210, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

A method for transplanting lymphohematopoietic cells into a mammal

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)

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
Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choin Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K., and Mano, H.	Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	338	1256-1262	2005
Ishii, H., Inageta, T., Mimori, K., Saito, T., Sasaki, H., Isobe, M., Mori, M., Croce, C.M., Huebner, K., Ozawa, K., and Furukawa, Y.	Fragl, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis.	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	102	9655-9660	2005
Inoue, H., Ohsawa, I., Murakami, T., Kimura, A., Hakamata, Y., Sato, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okada, T., Ozawa, K., Francis, J., Leone, P., and Kobayashi, E.	Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	329	288-295	2005
Inukai, T., Inaba, T., Dang, J., Kuribara, R., Ozawa, K., Miyajima, A., Wu, W., Look, A.T., Arinobu, Y., Iwasaki, H., Akashi, K., Kagami, K., Goi, K., Sugita, K., and Nakazawa, S.	TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down regulating expression of the common b chain of cytokine receptors.	Blood	105	4437-4444	2005

Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, K. Q., Okuda, K., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u> , and Koshino, T.	Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector.	Arthritis Rheum.	52	164-170	2005
Asano, T., Shibata, H., and <u>Hanazono, Y.</u>	Use of SIV vectors for simian ES cells.	Methods Mol. Biol.	329	295-303	2005
Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K., and <u>Hanazono, Y.</u>	In vivo tumor formation from primate ES cells.	Methods Mol. Biol.	329	459-467	2005
Ageyama, N., <u>Hanazono, Y.</u> , Shibata, H., Ono, F., Ogawa, H., Nagashima, N., Ueda, Y., Yoshikawa, Y., <u>Hasegawa, M.</u> , <u>Ozawa, K.</u> , and Terao, K.	Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) with human newborn-equivalent body weights.	Exp. Anim.	54	421-428	2005
Yoshioka, T., Ageyama, N., Shibata, H., Yasu, T., Misawa, Y., Takeuchi, K., Matsui, K., Yamamoto, K., Terao, K., 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., 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

Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, S., <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
Griesenbach, U., Boyton, R. J., Somerton, L., Garcia, S. E., Ferrari, S., Owaki, T., Ya- Fen, Z., Geddes, D. M., <u>Hasegawa,</u> <u>M.</u> , Altmann, D. M., and Alton, E. W.	Effect of tolerance induction to immunodominant T-cell epitopes of Sendai virus on gene expression following repeat administration to lung.	Gene Ther.	13(5)	449-456	2006

研究成果の刊行物・別刷



Transforming activity of the lymphotoxin- β receptor revealed by expression screening

Shin-ichiro Fujiwara^{a,b,c}, Yoshihiro Yamashita^a, Young Lim Choi^a, Tomoaki Wada^a,
Ruri Kaneda^{a,d}, Shuji Takada^a, Yukio Maruyama^c, Keiya Ozawa^b, Hiroyuki Mano^{a,d,*}

^a Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, Tochigi 329-0498, Japan

^b Division of Hematology, Jichi Medical School, Tochigi 329-0498, Japan

^c First Department of Internal Medicine, Fukushima Medical University, Fukushima 960-1295, Japan

^d CREST, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

Received 13 October 2005

Available online 24 October 2005

Abstract

Pancreatic ductal carcinoma (PDC) remains one of the most intractable human malignancies. To obtain insight into the molecular pathogenesis of PDC, we constructed a retroviral cDNA expression library with total RNA isolated from the PDC cell line MiaPaCa-2. Screening of this library with the use of a focus formation assay with NIH 3T3 mouse fibroblasts resulted in the identification of 13 independent genes with transforming activity. One of the cDNAs thus identified encodes an NH₂-terminally truncated form of the lymphotoxin- β receptor (LTBR). The transforming activity of this short-type LTBR in 3T3 cells was confirmed by both an in vitro assay of cell growth in soft agar and an in vivo assay of tumorigenicity in nude mice. The full-length (wild-type) LTBR protein was also found to manifest similar transforming activity. These observations suggest that LTBR, which belongs to the tumor necrosis factor receptor superfamily of proteins, may contribute to human carcinogenesis.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Lymphotoxin- β receptor; Pancreatic ductal carcinoma; Retrovirus; cDNA expression library; Oncogene

Pancreatic ductal carcinoma (PDC) originates from pancreatic ductal cells and remains one of the most intractable human malignancies [1,2]. Effective therapy for PDC is hampered by the absence of specific clinical symptoms. At the time of diagnosis, most affected individuals are no longer candidates for surgical resection, and, even in patients who do undergo such surgery, the 5-year survival rate is only 20–30% [2].

The molecular pathogenesis of PDC has been the subject of intensive investigation. The gene *KRAS2* is frequently mutated and activated in PDC cells [3], and various tumor suppressor genes, including those for p53, p16, and BRCA2, are inactivated [4]. Furthermore, genetic or epigenetic alterations of genes important in apoptosis or in

tumor cell invasion or metastasis have been detected in PDC cells [5]. However, mutations in *KRAS2* have also been identified in pancreatic tissue affected by nonmalignant chronic pancreatitis [6], and genetic changes truly specific to PDC remain to be uncovered. Improvement in the prognosis of individuals with PDC will require identification of the genetic or epigenetic alterations responsible for the aggressive nature of this cancer.

The focus formation assay with 3T3 or RAT1 fibroblasts has been extensively used to screen for transforming genes in various carcinomas [7]. Given that the expression of exogenous genes in this assay is usually controlled by their own promoters or enhancers, however, oncogenes are able to exert their transforming effects in the recipient cells only if these regulatory regions are active in fibroblasts, which is not always the case. Regulation of the transcription of test cDNAs by a promoter known to function efficiently in fibroblasts would be expected to

* Corresponding author. Fax: +81 285 44 7322.

E-mail address: hmano@jichi.ac.jp (H. Mano).

ensure sufficient expression of the encoded protein in the focus formation assay. We have therefore now constructed a retroviral cDNA expression library from a human PDC cell line, MiaPaCa-2, and tested this library in the focus formation assay with 3T3 cells. For library construction, we took advantage of a polymerase chain reaction (PCR) system that preferentially amplifies full-length cDNAs. The resulting library had sufficient complexity with a high percentage of full-length cDNAs. With this library, we have revealed that the lymphotoxin- β receptor (LTBR) gene possesses transforming activity.

Materials and methods

Cell lines and culture. MiaPaCa-2, NIH 3T3, and BOSC23 cell lines were obtained from American Type Culture Collection and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 2 mM L-glutamine.

Construction of retroviral cDNA expression library. Total RNA extracted from MiaPaCa-2 cells with the use of an RNeasy Mini column and RNase-free DNase (Qiagen, Valencia, CA) was subjected to first-strand cDNA synthesis with PowerScript reverse transcriptase, SMART IIA oligonucleotide, and CDS primer IIA (Clontech, Palo Alto, CA). The resulting cDNAs were amplified for 14 cycles with 5' PCR primer IIA and a SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech), with the exception that LA *Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) was substituted for the Advantage 2 DNA polymerase provided with the kit. The amplified cDNAs were treated with proteinase K, rendered blunt-ended with T4 DNA polymerase, and ligated to the BstXI-adaptor (Invitrogen). Unbound adaptors were removed with the use of a cDNA size-fractionation column (Invitrogen), and the remaining cDNAs were ligated into the BstXI site of the pMXS retroviral plasmid (kindly provided by T. Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo). The resulting pMXS-cDNA plasmids were introduced into ElectroMax DH10B cells (Invitrogen) by electroporation.

Focus formation assay. BOSC23 cells (1.8×10^6) were seeded into a 6-cm culture dish, cultured for 24 h, and then transfected with 2 μ g of retroviral plasmids mixed with 0.5 μ g of pGP plasmid (Takara Bio), 0.5 μ g of pE-eco plasmid (Takara Bio), and 18 μ l of Lipofectamine reagent (Invitrogen). Two days after transfection, polybrene (Sigma, St. Louis, MO) was added to the culture supernatant at a concentration of 4 μ g/ml, and the supernatant was subsequently used to infect 3T3 cells for 48 h. The culture medium of the 3T3 cells was then changed to DMEM-F12 supplemented with 5% calf serum and 2 mM L-glutamine, and the cells were cultured for 2 weeks.

Recovery of cDNAs from transformants. Transformed 3T3 cell clones were harvested with a cloning syringe and cultured independently in 10-cm culture dishes. Genomic DNA was extracted from each clone by standard procedures and then subjected to PCR with 5' PCR primer IIA and LA *Taq* polymerase for 50 cycles of 98 °C for 20 s and 68 °C for 6 min. Amplified DNA fragments were purified by gel electrophoresis and ligated into the pT7Blue-2 vector (EMD Biosciences, San Diego, CA) for nucleotide sequencing.

Anchorage-independent growth in soft agar. 3T3 cells (2×10^6) were infected with a retrovirus encoding a truncated form of LTBR or activated KRAS2 (see Results), resuspended in the culture medium supplemented with 0.4% agar [SeaPlaque GTG agarose (Cambrex, East Rutherford, NJ)], and seeded onto a base layer of complete medium supplemented with 0.5% agar. Cell growth was assessed after culture for 2 weeks.

Tumorigenicity assay in nude mice. 3T3 cells (2×10^6) infected with a retrovirus either encoding the truncated form of LTBR or containing the human wild-type LTBR cDNA (GeneCopoeia, Germantown, MD) were resuspended in 500 μ l of phosphate-buffered saline and injected into each

shoulder of a nu/nu Balb-c mouse (6-weeks old). Tumor formation was assessed after 3 weeks.

5'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE). 5'-RACE was performed as described [8]. In brief, total RNA extracted from MiaPaCa-2 cells was used to generate cDNAs with an LTBR-specific primer (5'-GCAGTGGCTGTACCAAGTCA-3'). Excess primer was removed with a microconcentrator (Amicon, Austin, TX), and a poly(A) tail was added to the cDNAs by incubation with dATP and terminal deoxynucleotidyltransferase (Invitrogen). The first PCR was performed with the dT-adaptor primer (5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT TTTT-3') and RACE-1 antisense primer (5'-CTCCCAGCTCCAGCT ACAG-3'), and the second PCR with the adaptor primer (5'-GACTCGA GTCGACATCG-3) and RACE-2 antisense primer (5'-GAGCAGAAA GAAGGCCAGTG-3'). The amplification protocol for the first PCR comprised incubation at 94 °C for 2 min followed by 20 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 3 min. That for the second PCR included incubation at 94 °C for 2 min followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 53 °C for 1 min, and 72 °C for 3 min. The final PCR products were ligated into pT7Blue-2 for nucleotide sequencing.

Results

Screening for transforming genes by focus formation assay

To screen for transforming genes in PDC, we constructed a cDNA expression library from MiaPaCa-2 cells. Full-length cDNAs were selectively amplified by a PCR protocol from total RNA isolated from the cells and were ligated into the retroviral vector pMXS. We obtained a total of 1.2×10^6 colony-forming units of independent library clones, from which we randomly selected 30 clones and examined the incorporated cDNAs. An insert of ≥ 500 bp was present in 24 (80%) of the 30 clones and the average size of these 24 inserts was 1.84 kbp.

Introduction of the library plasmids into a packaging cell line yielded a recombinant retroviral library that was used to infect mouse NIH 3T3 fibroblasts. After culture of the infected cells for 2 weeks, a total of 18 transformed foci were identified. No foci were observed for 3T3 cells infected with the empty virus. Each transformed focus was isolated, expanded, and used to prepare genomic DNA. PCR amplification of the inserts identified a total of 29 cDNA fragments, each of which was ligated into a cloning vector and subjected to nucleotide sequencing from both ends. Screening of the 29 cDNA sequences against the public nucleotide sequence databases revealed that they showed >95% sequence identity to 13 independent genes, 11 known and 2 unknown (Table 1).

To confirm the transforming ability of the isolated cDNAs, we again ligated them into pMXS and used the corresponding retroviral vectors to re-infect 3T3 cells. Two of the 13 independent genes (clone ID #4, corresponding to *LTBR* [GenBank Accession No. NM_002342]; clone ID #10, corresponding to *KRAS2* [GenBank Accession No. NM_004985]) reproducibly induced the formation of transformed foci in 3T3 cells (Fig. 1). Further sequencing our *KRAS2* cDNA revealed that it has a point mutation leading to the amino acid change from a glycine residue at position 12 to a cysteine (data not shown). Whereas the oncogenic potential of mutated *KRAS2* has been