

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

新規センダイウイルスベクターを用いた臍帯血幹細胞増幅法の開発

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 花 園 豊

平成 19 年 (2007 年) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

新規センダイウイルスベクターを用いた臍帯血幹細胞増幅法の開発 花園 豊 -----	1
--	---

II. 分担研究報告

HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターの作製と性能評価に関する 研究 井上 誠 -----	8
---	---

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

(付録) 第 12 回に本遺伝子治療学会発表演題の抄録

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

新規センダイウイルスベクターを用いた臍帯血幹細胞増幅法の開発

主任研究者

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・助教授）

研究要旨

目的：臍帯血造血幹細胞の増幅技術を確立する。

方法：造血幹細胞の増幅能が明らかな HOXB4 遺伝子を利用し、本遺伝子が必要な期間だけ発現した後は消滅する、新しい遺伝子導入用ベクター（「期間限定発現」ベクター）を開発する。

期待される成果：(1)「期間限定発現」ベクターは、遺伝毒性のない細胞質型 RNA ベクターであるセンダイウイルスベクターの利用によって実現できる。(2) 本法の有効性と安全性がサルを用いて明らかになる。(3) HOXB4 は、ES 細胞から造血幹細胞を誘導する作用を併せ持つので、本法は ES 細胞を利用する将来の骨髄移植代替治療にそのまま応用可能である。

当該年度の成果：(1) SeV ベクターを用いてサル ES 細胞への遺伝子導入実験を実施した。(2) 遺伝子導入細胞から、薬剤による SeV ベクターの除去法を検討した。(3) サル胎仔およびヒツジ胎仔への細胞移植法を確立し、本法の有効性と安全性を大型動物で評価する系を開発した。

A. 研究目的

造血幹細胞の増幅に必要な遺伝子を必要な期間のみ発現するウイルスベクター（「期間限定発現」ベクター）を用いて、臍帯血造血幹細胞の増幅技術を確立する。

現在、臍帯血移植は小児だけでなく成人に対しても普及しつつある。しかし、HLA が適合し十分な細胞数を有する臍帯血は少なく、移植後の生着不全が問題である。サイトカインを用いた臍帯血幹細胞の増幅は臨床応用段階にあるが、多大な費用を要する。また、レトロウイルス

ベクターを用いた遺伝子操作技術による造血幹細胞の増幅も試みられているが、挿入変異発癌が問題となっている。このため、安価で安全な臍帯血増幅法の確立が望まれる。

本研究では、造血幹細胞の増幅能が明らかな HOXB4 遺伝子を搭載し、本遺伝子が必要な期間だけ発現した後は消滅する新しい概念のウイルスベクターである「期間限定発現」ベクターを開発する。それは、遺伝毒性のない細胞質型 RNA ベクターであるセンダイウイルスベクター

の改良によって実現する。本ベクターの使用後、細胞の移植時にはベクターウイルスが消失しているため、安全性が高い。しかも、高価なサイトカインを用いないため、低コストを達成できる。

今回の方法で安全かつ効率のよい臍帯血幹細胞の増幅が可能となれば、少ない細胞数の臍帯血であっても、使用直前に増幅させ、臨床応用が可能となる。この技術は、稀な HLA を有する患者に対する移植応用に対して特に有望である。さらに、体外での血液細胞の分化法が確立されれば、十分に増やした臍帯血幹細胞から赤血球や血小板を作製する道が開け、輸血製剤の新たなソースになりうる。現在ボランティアに依存しているドナーの不足問題を解消できる可能性がある。この場合、肝炎ウイルスや HIV ウイルスのみでなく、未知のウイルス感染の問題なども回避できる。

しかも HOXB4 は、ES 細胞から造血幹細胞を誘導する作用も持つので、本法は ES 細胞を利用する、将来の骨髄移植代替治療にそのまま転用可能である。

本法の有効性と安全性をマウスおよびサルを用いた動物実験を通して明らかにしたい。とくにサルの実験は、その結果をヒトに外挿可能な前臨床試験として重要であり、我々は従来からサルの実験を積極的に推進してきたところである。

B. 研究方法

(1) ベクター：本研究で用いるセンドライウイルス (SeV) ベクターは、分担研究

者の井上誠 博士 (ディナベック株式会社) から供与を受けた。ベクターの詳細は、分担研究者の井上の報告書を参照のこと。ベクターの感染実験は、自治医科大学内の P2 実験施設で実施した。

(2) ヒトとサルの臍帯血の準備

(a) ヒト：自治医科大学付属病院において試料提供者から提供された臍帯血から CD34⁺細胞を単離し保存した。研究協力者：自治医科大学血液科 高德正昭 講師。

(b) サル：霊長類医科学研究センターにて妊娠サルを確保し、分娩および臍帯血採取を行い凍結保存した。研究協力者：霊長類医科学センター 寺尾恵治センター長、揚山直英、柴田宏昭 両研究員。

(3) ES 細胞：サル (カニクイザル) ES 細胞は、京都大学 中辻憲夫 教授、田辺製薬株式会社 近藤泰 主任研究員から供与された。サル ES 細胞を至適条件下 (OP9 フィーダー細胞上、各種サイトカイン存在下) で培養し、ES 細胞由来造血細胞を得た。

(4) 移植実験：移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能が未成立 (妊娠 1/3 期前後) のカニクイザル胎仔またはヒツジ胎仔をレシピエントとした。移植後、満期帝王切開を行い、生まれたサル新生仔またはヒツジ新生仔における造血キメラ率や腫瘍形成の有無を調べた。サル実験協力者：霊長類医科学センター 寺尾恵治センター長、揚山直英、柴田宏昭 両研究員。ヒツジ実験協力者：宇都宮大学農学部付属農場 長尾慶和 助教授。

(5) 倫理面への配慮

ヒト臍帯血利用：本研究では、自治医科大学付属病院で試料提供者から提供された臍帯血を利用するが、その採取・利用にあたって、試料提供者に対する身体的危害および不利益がないことを説明し、試料提供者から書面でインフォームド・コンセントを得ている。提供された試料は、連結不能の匿名化を行い、個人情報の特性を不可能にしている。臍帯血の採取および研究利用に関しては、実験実施機関から以下のとおり承認が得られている。

・高徳正昭申請「臍帯血細胞への遺伝子導入の基礎検討」自治医科大学 平成 14 年 5 月 27 日承認（第 02-13 号）

組換え DNA 実験：実験実施機関から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）

・長尾慶和申請「緑色蛍光タンパク質遺伝子（GFP）を組み込んだサル ES 細胞を in vitro で造血系へ初期分化させ、この細胞を妊娠ヒツジ子宮内の胎子の肝臓内へ外科的に移植する」宇都宮大学 平成 17 年 7 月 27 日承認

動物実験倫理：サルを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から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 18 年 3 月 31 日承認（No.150）

・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 18 年 7 月 21 日承認（DS18-031 号）

ヒツジを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「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 18 年 3 月 31 日承認（No.172）

マウスを用いる実験プロトコールは、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「ES 細胞の増殖・分化の解析」自治医科大学 平成 18 年 3 月 31 日承認（No.175）

C. 研究結果

(1) 臍帯血細胞と ES 細胞：自治医科大学付属病院において試料提供者から提供された臍帯血から CD34⁺細胞を単離し保存した。しかし、臨床用臍帯血バンクへの提供が優先されるので、本研究への提供が必ずしも十分得られないことが問題点として挙げられる。

また、サル臍帯血に関しては、妊娠サルを確保し、分娩、臍帯血採取を行い凍結保存した。しかし、自然分娩下では臍帯血の採取は困難なため、帝王切開にてサル胎仔を娩出し臍帯血を採取した。問題点として、この方法は非常に手間・費用がかかることが挙げられる。

以上の理由によってヒト・サル臍帯血細胞は利用可能量が限られる。その上、個体差による試料のロット差が大きいから、種々のベクターやHOXB4の有効性をin vitroで比較・評価するためにヒト・サル臍帯血細胞の使用は必ずしも適切ではない。そこで以下の通り、株化細胞であるサルES細胞を利用して、SeVベクターのin vitroの有効性の評価系を評価した。

(2)サルES細胞への遺伝子導入：通常型(F欠損型)のSeVベクターを用いるとサルES細胞に対して効率よく外来遺伝子を導入できた。1回のみ感染で2日後には約60%の細胞がGFP蛍光を発した。これはレンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率に匹敵する。通常型SeVベクターはそれ自身が自己複製能をもつので、細胞分裂によってベクターが希釈されることなく、GFPの発現は感染後数ヶ月以上にわたって安定していた。しかも、SeVベクターはES細胞の三胚葉分化能を損わず、成熟細胞に分化してからも導入遺伝子の発現は衰えることがなかった。

P欠損型SeVベクターの場合、通常型に比べて導入遺伝子コピー数は1-2%以下にとどまった。HOXB4はこの程度の発現量でも十分機能すると予想されるが、遺伝子導入回数を増やすなどによって導入遺伝子コピー数を上げる工夫をしていきたい。

(3)SeVベクター除去法の開発：細胞へ導入後のSeVベクターを薬剤で除去できるかどうかを検討した。抗RNAウイルス

薬のリバビリンを添加すると、用量依存性に導入遺伝子の発現を抑制した。ただし、リバビリンによる細胞毒性は無視できず、より毒性の少ない化合物の探索が必要である。

また、KSRという、一般的によく使われているES細胞の無血清培地を添加すると、SeVベクターの完全除去が可能であった。ただし、KSRのSeV除菌効果はES細胞に限られること、また除菌までに2、3ヶ月を必要とすることから、その有用性は限定的なものにとどまるかもしれない。

(4)有効性と安全性の評価系の開発

造血幹細胞の増幅をin vivoで評価する系として、我々はサルとヒツジの子宮内胎仔への細胞移植の系を開発した。

(a)サル胎仔への移植：サルES細胞由来造血細胞をサル胎仔に移植すると(n=6)、その造血系を一部再構築できたことから(2-5%)、この系を造血幹細胞の増幅のアッセイ系として利用可能であることがわかった。

しかし、移植例全例で腫瘍(奇形腫)形成が観察された。移植細胞中に未分化ES細胞が残存していたのが原因と考えられた。

(b)ヒツジ胎仔への移植：サルES由来造血細胞をヒツジ胎仔に移植する実験も行なった。生後、約1%のサル/ヒツジ造血キメラになっていた。2年後、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（ヒト幹細胞因子 SCF）を投与し、サルの造血を選択的に刺激する実験を行い、造血キメラ率を 10%前後まで上げることに成功した。したがって、ヒツジ胎仔への移植実験は、造血幹細胞の増幅の *in vivo* アッセイ系として利用可能である。

一方、ヒツジ胎仔に移植した場合の腫瘍形成は稀であった（1/10）。免疫不全マウスへ移植した場合も多くはなかった（2/5）。したがって、ヒツジ胎仔や免疫不全マウスへの異種移植実験では腫瘍形成等のリスクを過少評価する危険があり、安全性の厳密な評価には、サルへの同種移植実験が欠かせないこともわかった。

D. 考察

臍帯血に含まれている造血幹細胞の増幅法としては、以下の 2 つの方法がある。

(1) サイトカインを用いる増幅：京都大学の中畑教授らは SCF, TPO, FL, IL-6/sIL-6R という 4 種のサイトカインを用いて、臍帯血に含まれる造血幹細胞を 30 倍に増殖させることに成功し、これを用いた臨床研究を計画している。

(2) 遺伝子を用いる増幅：遺伝子を用いた造血幹細胞の増幅も種々行われている。HOXB4, STAT5, MDR, Bmi-1 などがある。特に HOXB4 は、造血幹細胞の増幅に有効であることが多くの研究者によって示されている。

本研究では、造血幹細胞の増幅効果が明らかな HOXB4 遺伝子を利用する。

HOXB4 は、ES 細胞の造血分化を促進する効果も知られており、造血幹細胞だけではなく、ES 細胞を利用する骨髓移植代替治療への応用も可能である。

遺伝子導入には、国産のセンダイウイルス（SeV）ベクターを利用する。SeV ベクターは造血幹細胞や造血前駆細胞に効率よく遺伝子導入することができる。しかも、サル ES 細胞に対しても効率よく外来遺伝子を導入できることがわかった。

さらに、SeV ベクターは、ヒトへの病原性がなく、DNA を介さない細胞質型 RNA ベクターである。したがって、レトロウイルスベクターで問題になる挿入変異や相同組換えによる変異ウイルス産生といった心配がない。

HOXB4 遺伝子は、転写因子であり短期間の作用により造血幹細胞に対する高い増幅効果をもつ一方、発現が持続することによる悪影響（腫瘍化等）が報告されており、一過性の発現が強く求められる。そのため「期間限定発現」ベクターを開発し利用する。すなわち「P 欠損型 SeV ベクター」である。P 遺伝子は RNA ポリメラーゼをコードし SeV の転写・複製を可能にするが、P 欠損型であればウイルスの自己複製は不能になり、遺伝子発現は初回取込みの P 蛋白質の活性に限定され、HOXB4 を発現後、細胞が分裂・増幅すると、ウイルスは希釈消失する。造血幹細胞への効率的な遺伝子導入と、細胞傷害のない一過性の遺伝子発現は、P 欠損型 SeV ベクターのみで達成できる画期的な技術である。

本年度、サル ES 細胞への遺伝子導入には SeV ベクターが断然優れていることを示した。1 回のみでの感染で 2 日後には約 60% の細胞が GFP 蛍光を発した。これは、ES 細胞への遺伝子導入効率がもっとも優れているレンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率に匹敵する。通常型 (F 欠損型) の SeV ベクターは、それ自身が自己複製能をもつので、細胞分裂によってベクターが希釈されることなく、GFP の発現は感染後数ヶ月以上にわたって安定していた。しかも、SeV ベクターは ES 細胞の三胚葉分化能を損わず、成熟細胞に分化しても導入遺伝子の発現は衰えることがなかった。

さらに、SeV ベクターで導入した遺伝子の発現を、抗ウイルス剤 (リバビリンなど) や KSR の添加によって調節するという、薬剤による全く新しい遺伝子発現調節法も検討した。分担研究者の井上によって、HOXB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターが開発され、その「期間限定発現」が確認された (分担報告書参照)。現在、我々はこのベクターの供与を受け、サル ES 細胞への遺伝子導入実験を実施中である。

さて、本ベクターを臍帯血造血幹細胞や ES 細胞へ利用するにあたって、その有用性と安全性を評価するにはどのような方法が望ましいか? ヒトとサルの遺伝的近縁性から言って、サル幹細胞をサルへ移植する実験は、ヒト幹細胞をヒトに移植する治療の、もっとも忠実な疑似モデルといえる。しかし、このような同種

移植では、移植後の免疫反応のことを考えないといけない。サルの細胞をサルに同種接種しても生着することなく迅速に拒絶される。したがって、今のところサル同種移植の実験系は限られている。一つは免疫学的に比較的隔離されている脳内移植実験である。この場合、適当な免疫抑制剤を使用すれば移植後の生着が可能である。筆者の施設 (自治医科大学) でも村松慎一准教授らがヒト・サル ES 細胞を使ってパーキンソン病モデルサルへの移植実験を成功裏に実施している。もう一つが我々が進めている子宮内移植、つまり動物胎仔への移植である。

胎仔への移植とは聞き慣れないかもしれないが、それには 3 つの大きなメリットがある。まず、胎仔は、とくに第 1 トリメスターの胎仔は、免疫学的に未成熟であり、たとえ異種の細胞を移植しても拒絶されることなく生着し、免疫抑制がいらないこと。第 2 は、胎仔は日に日に大きくなるため、生着のためのスペースが自然に生まれ、移植前処置がいらないこと。そして第 3 は、子宮内はそもそも無菌環境なので、移植前後の無菌管理がいらないこと。サルへの移植実験は費用と手間がかかる。ヒツジ等、他の動物も利用しながら、今後、本技術の有用性と安全性を評価していきたい。

E. 結論

(1) SeV ベクターはサル ES 細胞へきわめて効率よく遺伝子導入できる。

(2) 遺伝子導入細胞から、薬剤による

SeV ベクターの除去法を検討した。

(3)サル胎仔およびヒツジ胎仔への細胞移植法を確立し、本技術の有効性と安全性の評価系を開発した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 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* 2006;24:1450-1457.
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* 2006;68:507-510.

3. Asano T, Shibata H, Hanazono Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol Biol* 2006;329:295-303.
4. Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol Biol* 2006;329:459-467.
5. 花園豊 : ES 細胞のゲノム操作. *ゲノム医学* 6:249-253, 2006.

学会発表

1. Kishi, Y., Inoue, M., Tanaka, Y., Ikeda, T., Shibata, H., Hasegawa, M., Hanazono, Y. Eradication of the Sendai virus vector genome in primate embryonic stem cells by Knockout Serum Replacement (KSR). The Japan Society of Gene Therapy the 12th Annual Meeting, Tokyo, August 24-26, 2006. (abstract p. 41)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

HoxB4 遺伝子を搭載する P 欠損型 SeV ベクターの作製と性能評価に関する研究

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社 研究開発部長

研究要旨

HOXB4 遺伝子を搭載する P 遺伝子欠失型センドライウイルス (SeV/ Δ P) ベクターの構築を試み、高タイター（高力価）での調製に成功した。SeV/ Δ P ベクターを作製するためには、欠損した P 遺伝子をトランスに供給するパッケージング細胞の作出が必須であるが、P 蛋白の発現のより高い細胞の作出に成功し、効率的な SeV/ Δ P ベクターの調製が可能になった。また、HoxB4 遺伝子以外に、マーカー遺伝子 (GFP あるいは luciferase) を搭載した SeV/ Δ P ベクターを構築した。SeV/ Δ P ベクターは、他のタイプの SeV ベクターと類似の、効率的な遺伝子導入能を有しており、発現量は一般的に使用している F 遺伝子欠失型ベクター (SeV/ Δ F) の一数%であることを対照細胞を用いて確認した。また SeV/ Δ P ベクターは、*in vitro* において細胞傷害性をほとんど示さず、生存細胞の中で「期間限定」発現が可能であり、期待通りの性能を有することを確認した。

A. 研究目的

センドライウイルス (SeV) ベクターは、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA ベクターであり、その全生活環において DNA への変換がなく、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で、自前の RNA ポリメラーゼ (P および L 蛋白質) を利用して行われる。すなわち、治療用遺伝子を核内に挿入し染色体遺伝子に組み込むことなく、細胞質において直接発現することができる特徴があり、「細胞質型 RNA ベクター」と呼ばれている。また、SeV ベクターは、ほとんどの哺乳類細胞に存在する、糖鎖のシアル酸を受容体として認識し、他のベクターでは遺伝子導入が困難な、ES 細胞あるいは造血幹細胞へも効率的に遺伝子導入が可

能である。

これらの有効な性質を利用し、さらに ES 細胞あるいは造血幹細胞の *ex vivo* での細胞増殖あるいは分化シグナルを一時的に活性化することを目的として、SeV のポリメラーゼ小サブユニットである P 遺伝子を欠失した P 遺伝子欠失型 SeV ベクター (SeV/ Δ P) を構築し、実際に転写遺伝子 (HoxB4) を搭載した SeV/ Δ P ベクターの構築すること、並びにベクター自身の性能を評価することを目的とした。

B. 研究方法

(1) P 蛋白発現パッケージング細胞の作出

サル腎由来細胞株である LLC-MK₂ 細胞に P 遺伝子を搭載した Cre リコンビナーゼ誘導型

プラスミド (pCALNdLw) をトランスフェクトし、P 蛋白発現誘導後、発現の高い細胞株を選択した。

(2) ベクターの構築 (再構成)

HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ Δ P ベクター (SeV¹⁸⁺HoxB4/ Δ P) を構築した。HoxB4 遺伝子を SeV cDNA (pSeV/ Δ P) の NP 遺伝子上流に挿入し、発現量を出来るだけ確保するベクターデザインとした。ベクターの再構成は T7 RNA ポリメラーゼでドライブして調製した。この時、T7 の供給は plasmid で行い、ワクシニアを使用しない系で実施した。また同時に、マーカー遺伝子である GFP, および luciferase 遺伝子搭載ベクター (それぞれ、SeV¹⁸⁺GFP/ Δ P, SeV¹⁸⁺luci/ Δ P) についてもベクター再構成を実施した。

(3) ベクター大量生産・精製

今回新たに取得した P 蛋白発現パッケージング細胞株を利用し、SeV¹⁸⁺HoxB4/ Δ P の大量生産を実施した。フィルターろ過による細胞残渣除去、カラムクロマトグラフィー、濃縮の過程を組み合わせることによって、ベクターの精製を行った。

(4) ベクターの品質検査

力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定し、実施した。

(5) 対照細胞を用いた SeV/ Δ P の基本性能評価

SeV¹⁸⁺luci/ Δ P を用いて、luciferase 遺伝子搭載 SeV/ Δ F (SeV¹⁸⁺luci/ Δ F) との性能比較を行った。対照細胞として LLC-MK₂ 細胞を用い、遺伝子導入効率とともに、luciferase 活性を測定し、発現量を経時的に測定した。また、対照細胞として SeV に起因する細胞傷害が顕著に出る CV-1 細胞を用い、細胞傷害性についても評価した。

(倫理面への配慮)

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒト

への病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、非常に安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使用するベクターは、ウイルスの転写複製に必要なポリメラーゼ小サブユニット P 蛋白質遺伝子を欠失した非増殖型のベクター (SeV/ Δ P)、およびウイルスの感染融合に必須の F 蛋白質遺伝子をゲノムから欠損した非伝播型のベクター (SeV/ Δ F) を用いているため、理論的にも実験的にも増殖性あるいは伝播性が無いことが証明されている。この様に実験動物および環境等に与える影響は最小限にとどまる。なお、当分担研究では動物等への投与実験は厳選して限定されるものとし、その際には動物愛護の基準に従うものとする。

C. 研究結果

(1) SeV/ Δ P の調製・生産

HoxB4 遺伝子搭載 SeV/ Δ P ベクター (SeV¹⁸⁺HoxB4/ Δ P) について、ベクター再構成を実施し、ベクタークローニング、大量生産・精製を行った。今回、発現量のより高い細胞の取得に成功し、高タイターで生産することが可能になった。最終的には、PBS 溶液に置換し、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を実施し、in vivo 試験に十分使用可能なクオリティーでのベクター調製に成功した。また、コントロールベクターとしての GFP 遺伝子搭載ベクター (SeV¹⁸⁺GFP/ Δ P) および luciferase 遺伝子搭載ベクター (SeV¹⁸⁺luci/ Δ P) を構築し、大量生産を実施した。

(2) SeV/ Δ P の QC

1) ベクター : SeV¹⁸⁺HoxB4/ Δ P

力価 : 4.9×10^8 CIU/ml

無菌試験(TG 培地/SCD 培地) : 適合

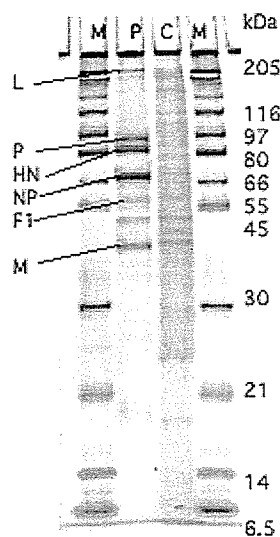
マイコプラズマ否定試験(PCR 法) : 適合

エンドトキシン試験 : 3.84EU/ml 未満

タンパク質濃度：225.585 μ g/ml

電気泳動：下記参照

電気泳動



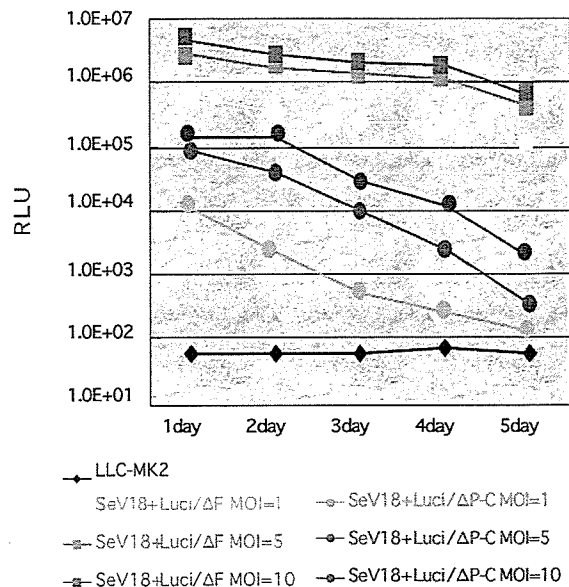
SDS-PAGE result
M: Molecular Marker
C: Control Vector SeV/ΔP
P: Product Vector

(2) SeV/ΔP の基本性能評価

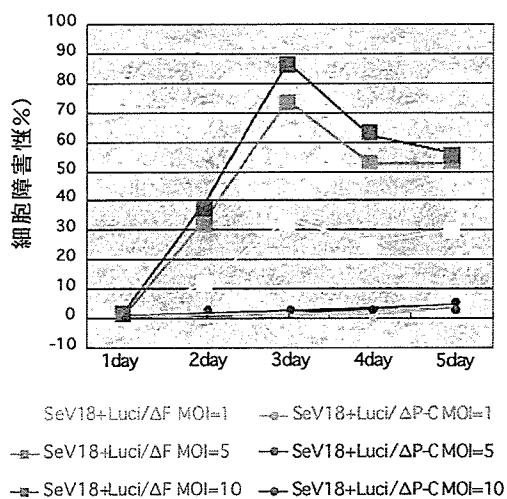
対照細胞である LLC-MK₂ 細胞に、SeV¹⁸⁺luci/ΔP および SeV¹⁸⁺luci/ΔF を MOI=1, 5, 10 で遺伝子導入を行い、遺伝子導入1日目から5日目まで細胞を回収し、luciferase 活性を測定した。遺伝子導入1日目から2日目については、SeV¹⁸⁺luci/ΔP の発現は SeV¹⁸⁺luci/ΔF の発現の1数%を維持しているが、経時的に減少し、5日目にはその 1/100 に減少し、一過的な期間限定発現であることが確認された。

また SeV に起因する細胞傷害が顕著に出易い CV-1 細胞に、SeV¹⁸⁺luci/ΔP および SeV¹⁸⁺luci/ΔF を MOI=1, 5, 10 で遺伝子導入を行い、経時的に培養上清を回収し、細胞傷害の指標である LDH 活性を測定した。SeV¹⁸⁺luci/ΔF は遺伝子導入3日目から細胞傷害を示したが、SeV¹⁸⁺luci/ΔP の場合は導入5日目でもほとんど細胞傷害性を示さなかった。

SeV/ΔP の遺伝子発現能



SeV/ΔP の細胞傷害性



D. 考察

SeV/ΔP の構築のためには、P 蛋白強発現細胞が必要であるが、より高い発現を示すパッケージ細胞を作出し、高タイターでの調製が可能になった。構築した SeV/ΔP は、遺伝子導入初期のみ SeV/ΔF の数%の発現を示し、

経時的にみると早期に減弱した。更に細胞傷害性がほとんどなく、「期間限定」発現ベクターとしての基本性能が確認された。

E. 結論

HOXB4 遺伝子を搭載する P 遺伝子欠失型センダイウイルス (SeV/ Δ P) ベクターの構築を試み、高タイターでの調製に成功した。また、HoxB4 遺伝子以外に、マーカー遺伝子 (GFP あるいは luciferase) を搭載した SeV/ Δ P ベクターを構築した。SeV/ Δ P ベクターは、効率的な遺伝子導入能を有しており、発現量は一般的に使用している F 遺伝子欠失型ベクター (SeV/ Δ F) の少数%であり、また *in vitro* において細胞傷害性をほとんど示さず、生存細胞の中で「期間限定」発現が可能であることを確認した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

- 1) Nagai Y, Kato A, Inoue M. [Establishment and progress of Sendai virus engineering] Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2006;51(1):27-37.
- 2) Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, Inoue M. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. J Gene Med. 2006;8(9):1151-1159.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, <u>Hanazono Y</u>	Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting	Stem Cells	24 巻 6 号	pp.1450-1457	2006 年
Ageyama N, <u>Hanazono Y</u> , 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 (<i>Macaca fascicularis</i>)	J Vet Med Sci	68 巻 5 号	pp.507-510	2006 年
Asano T, Shibata H, <u>Hanazono Y</u>	Use of SIV vectors for simian ES cells	Methods Mol Biol	329 巻	pp.295-303	2006 年
Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, <u>Hanazono Y</u>	In vivo tumor formation from primate ES cells	Methods Mol Biol	329 巻	pp.459-467	2006 年
Nagai Y, Kato A, <u>Inoue M</u>	Establishment and progress of Sendai virus engineering	蛋白質核酸酵 素	51 巻	pp. 27-37	2006 年
Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, <u>Inoue M</u>	Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity.	J Gene Med.	8 巻	pp.1151-1159	2006 年
<u>花園豊</u>	ES細胞のゲノム操作	ゲノム医学	6 巻	pp.249-253	2006 年

研究成果の刊行物・別刷

Improved Safety of Hematopoietic Transplantation with Monkey Embryonic Stem Cells in the Allogeneic Setting

HIROAKI SHIBATA,^{a,b} NAOHIDE AGEYAMA,^b YUJIRO TANAKA,^a YUKIKO KISHI,^a KYOKO SASAKI,^a SHINICHIRO NAKAMURA,^{b,c} SHIN-ICHI MURAMATSU,^d SATOSHI HAYASHI,^e YOSHIHIRO KITANO,^f KEIJI TERAQ,^b YUTAKA HANAZONO^a

^aDivision of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan;

^bTsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Japan; ^cDepartment of Veterinary Pathology, Nippon Veterinary and Animal Science University, Tokyo, Japan; ^dDepartment of Neurology, Jichi Medical University, Tochigi, Japan; Departments of ^eObstetrics and Gynecology and ^fSurgery, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Key Words. Cynomolgus monkey • Hematopoiesis • Embryonic stem cell • In utero transplantation • Teratoma • Purging
Tumor prevention

ABSTRACT

Cynomolgus monkey embryonic stem cell (cyESC)-derived *in vivo* hematopoiesis was examined in an allogeneic transplantation model. cyESCs were induced to differentiate into the putative hematopoietic precursors *in vitro*, and the cells were transplanted into the fetal cynomolgus liver at approximately the end of the first trimester ($n = 3$). Although cyESC-derived hematopoietic colony-forming cells were detected in the newborns (4.1%–4.7%), a teratoma developed in all newborns. The risk of tumor formation was high in this allogeneic transplantation model, given that tumors were hardly observed in immunodeficient mice or fetal sheep that had been xeno-transplanted with the same cyESC

derivatives. It turned out that the cyESC-derived donor cells included a residual undifferentiated fraction positive for stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4 ($38.2\% \pm 10.3\%$) despite the rigorous differentiation culture. When an SSEA-4-negative fraction was transplanted ($n = 6$), the teratoma was no longer observed, whereas the cyESC-derived hematopoietic engraftment was unperturbed (2.3%–5.0%). SSEA-4 is therefore a clinically relevant pluripotency marker of primate embryonic stem cells (ESCs). Purging pluripotent cells with this surface marker would be a promising method of producing clinical progenitor cell preparations using human ESCs. *STEM CELLS* 2006;24:1450–1457

INTRODUCTION

Human embryonic stem cells (hESCs) hold great potential in the treatment of a variety of diseases and injuries because embryonic stem cells (ESCs) have the ability to proliferate indefinitely in culture and to differentiate into any cell type [1, 2]. Because ESCs are able to form teratomas when transplanted into immunodeficient mice, safety concerns would be raised against the clinical application of hESCs [3, 4]. It will be necessary to test the safety of these cells in animal transplantation models before clinical application. Nonhuman primate transplantation models would be desirable for this purpose; however, there have been only a few reports on these models [5–7]. The successful engraftment of transplanted cells in primates will not be achieved unless the immune rejection of transplanted cells is circumvented (e.g., through immunosuppressive treatment) [6]. The

early gestational fetus may be a good recipient with which to circumvent immune rejection because the immune system is premature [8]. In addition, in the animal fetus, transplanted cells would engraft without conditioning of recipients such as irradiation or immunosuppressive treatment [9–12]. We have previously established a system for allogeneic transplantation of cynomolgus ESCs (cyESCs) using preimmune fetal monkeys as recipients [5].

We have also reported a novel method for hematopoietic engraftment from cyESCs in sheep [13]. The method is a combination of three steps: (a) differentiation *in vitro* to generate the putative hematopoietic precursors [14]; (b) transplantation of the cells *in utero* [15]; and (c) development into hematopoietic cells *in vivo* using the hematopoietic microenvironment of the fetal liver [16]. In the present study,

Correspondence: Yutaka Hanazono, M.D., Ph.D., Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Telephone: +81-285-58-7450; Fax: +81-285-44-5205; e-mail: hanazono@jichi.ac.jp Received on August 13, 2005; accepted for publication on January 23, 2006; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* February 2, 2006. ©AlphaMed Press 1066-5099/2006/\$20.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2005-0391

we have examined the safety as well as the efficacy of hematopoietic engraftment of cells derived from cyESCs in the allogeneic transplantation model.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Pregnant cynomolgus monkeys (16–22 years old) were obtained by mating and were reared at the Tsukuba Primate Research Center in accordance with Rules for Animals Care and Management set forth by the Research Center and Guiding Principles for Animal Experiments Using Nonhuman Primates formulated by the Primate Society of Japan. Experimental procedures were approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee of the National Institute of Infectious Diseases. The animals were free of intestinal parasites and were seronegative for herpes virus B, varicella-zoster-like virus, measles virus, and simian immunodeficiency virus.

Cell Preparation

A cyESC line (CMK6G) stably expressing green fluorescent protein (GFP) was established after transfection of the parental cyESC line (CMK6) with the enhanced GFP gene (Clontech, Palo Alto, CA, <http://www.clontech.com>) [17]. cyESCs were maintained on a feeder layer of mitomycin C (Kyowa, Tokyo, <http://www.kyowa.co.jp>)-treated mouse (ICR or BALB/c; Clea Japan, Tokyo, <http://www.clea-japan.com>) embryonic fibroblasts as previously described [18]. The mouse bone marrow stromal cell line OP9 was maintained in α -minimum essential medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS; Invitrogen) [19].

cyESCs were induced to differentiate into the putative hematopoietic precursors as previously described [13]. Briefly, undifferentiated cyESCs were transferred onto mitomycin C-treated confluent OP9 cells and cultured for 6 days in Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 8% FCS, 8% horse serum (Invitrogen), 5×10^{-6} M hydrocortisone (Sigma, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>), and multiple cytokines, including 20 ng/ml recombinant human (rh) bone morphogenetic protein-4 (R&D Systems, Minneapolis, <http://www.mdsystems.com>), 20 ng/ml rh stem cell factor (Biosource, Camarillo, CA, <http://www.biosource.com>), 20 ng/ml rh vascular endothelial growth factor (VEGF; R&D Systems), 20 ng/ml rh Flt-3 ligand (PeproTech, Rocky Hill, NJ, <http://www.peprotech.com>), 20 ng/ml rh interleukin-3 (PeproTech), 10 ng/ml rh interleukin-6 (PeproTech), 20 ng/ml rh granulocyte colony-stimulating factor (PeproTech), and 2 IU/ml rh erythropoietin (Roche, Basel, Switzerland, <http://www.roche.com>). The cells were resuspended in 0.1% human serum albumin (Sigma/Hanks' balanced saline solution (Sigma) for transplantation.

Flow Cytometry

Primary antibodies (Abs) used in the present study were anti-human CD34 monoclonal Ab (mAb; BD Pharmingen, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com/pharmingen>), anti-human CD31 mAb (Pharmingen), anti-human CD45 mAb (Pharmingen), anti-human vascular endothelial (VE) cadherin mAb (Pharmingen), rabbit anti-human VEGF receptor (VEGFR)-2 Ab (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>), and anti-stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4

mAb (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>). All of them cross-reacted to cynomolgus counterparts as previously demonstrated [18, 20–22]. Secondary Abs were phycoerythrin (PE)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (Ig) Ab (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, <http://www.dako.com>) and Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (Molecular Probes, Eugene, OR, <http://probes.invitrogen.com>). Cells stained with unlabeled primary Abs were incubated with fluorescence-labeled secondary Abs. Cells were incubated with either primary or secondary Ab for 20–60 minutes at 4°C. Regarding staining with the anti-VEGFR-2 Ab, the cells were incubated with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Beckman Coulter, Miami, <http://www.beckmancoulter.com>), followed by PE-conjugated streptavidin (Beckman Coulter). Fluorescence-labeled cells were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, <http://www.bd.com>). Data analysis was performed using the CellQuest software (Becton, Dickinson and Company). Isotype-matched, irrelevant mAbs (DakoCytomation or Beckman Coulter) served as negative controls. Nonviable cells were excluded from analysis by propidium iodide (Sigma) costaining.

Cell Sorting

Cell sorting was performed to purge SSEA-4⁺ cells from among the cultured cyESCs in vitro. Cells were incubated with the anti-SSEA-4 mAb for 1 hour at 4°C and washed twice with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS. The cells were then incubated with the PE-conjugated anti-mouse Ig Ab for 1 hour at 4°C and washed twice again. GFP-positive and SSEA-4-negative cells were sorted using an Epics Elite cell sorter (Beckman Coulter). Data acquisition was performed using the Expo2 software (Beckman Coulter).

Transplantation and Delivery

Transplant procedures were previously described [5]. Briefly, animals were anesthetized via an intramuscular administration of ketamine hydrochloride (Ketalar, 10 mg/kg; Sankyo, Tokyo, <http://www.sankyo.co.jp>) and received 0.5%–1.0% isoflurane by inhalation by means of an endotracheal tube. Cells ($0.16\text{--}46 \times 10^6$ cells per fetus; Table 1) were injected into the fetal liver through a 23-gauge needle using an ultrasound-guided technique at approximately the end of the first trimester. The fetuses were delivered by cesarean section at 2–3 months after transplant (gestation 120–157 days, full term 165 days).

Colony Polymerase Chain Reaction

Cynomolgus clonogenic hematopoietic colonies were produced as previously described [20]. After cells were cultured in methylcellulose medium for 10–14 days, well-separated individual colonies were plucked into 50 μ l of distilled water and digested with 20 μ g/ml proteinase K (Takara, Shiga, Japan, <http://www.takara-bio.com>) at 55°C for 1 hour, followed by 99°C for 10 minutes. Each sample (5 μ l) was used for a nested polymerase chain reaction (PCR) to detect the *GFP* gene sequence. The outer primer set was 5'-AAGGACGACGGCAACTACAA-3' and 5'-ACTGGGTGCTCAGGTAGTGG-3', and the inner primer set was 5'-GCATCGACTTCAAGGAGGAC-3' and 5'-GTTGTGGCGGATCTTGAAGT-3'. Amplification conditions for both the outer and inner PCR were 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The

Table 1. ESC-derived hematopoiesis and tumor formation

Animals	Animal no.	Transplanted cells	Purging SSEA-4 ⁺ cells	Cell number per fetus ($\times 10^6$)	Donor-derived CFU in recipients ^a at birth (donor/total colony number)	Tumor formation	Observation period (months)	
Monkeys	0031	Undifferentiated	—	3.90	n.d.	+	3	
	2311	ESCs	—	0.16	n.d., Dead	+	2	
	0321		—	0.21	n.d., Dead	+	2	
	0841	Day-6 ESC-	—	10	4.1% (2/49)	+	3	
	1551	derived cells	—	46	n.d., Dead	+	2.5	
	0021		—	46	4.7% (4/85)	+	3	
	0691	Day-6 ESC-	+	0.16	3.2% (2/62)	—	3	
	0381	derived cells	+	1.40	5.0% (4/80)	—	3	
	0022		+	0.17	2.3% (2/86)	—	3	
	0981		+	0.31	4.1% (3/73)	—	3	
	0051		+	0.31	n.d., Dead ^b	—	3	
	1552		+	0.75	4.4% (2/45)	—	4	
	Sheep ^c	57	Day-6 ESC-	—	50	1.1% (1/91)	—	18
		55	derived cells	—	50	1.1% (1/91)	—	26
		141		—	78	1.1% (1/91)	—	26
182			—	14	1.6% (1/63)	—	21	

^aPercentage of donor-derived CFU was calculated by dividing the number of CFU positive for the green fluorescent protein gene sequence by the number of CFU positive for the β -actin gene sequence. Donor-derived CFU were analyzed at delivery.

^bDeath due to ablation of placentae. Other deaths were presumably tumor-related.

^cAs published by Sasaki et al. [13].

Abbreviations: CFU, colony-forming units; ESC, embryonic stem cell; n.d., not done; SSEA, stage-specific embryonic antigen.

outer PCR products were purified using a QIA quick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, <http://www.qiagen.com>). Simultaneous PCR for the β -actin sequence was also performed to ensure DNA amplification of the sample in each colony. The primer set for β -actin was 5'-CATTGTCATG-GACTCTGGCGACGG-3' and 5'-CATCTCCTGCTCGAAG-TCTAGGGC-3'. Amplification conditions for β -actin PCR were 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Amplified GFP (131 bp) and β -actin (234 bp) products were resolved on 2% agarose gel (Sigma) and visualized by ethidium bromide (Invitrogen) staining.

RNA PCR

Total RNA was extracted from cells of interest using the EZ1 RNA universal tissue kit (Qiagen). RNA was reverse-transcribed at 50°C for 30 minutes using the RNA LA PCR kit (Takara) with oligo dT primer. The resulting cDNA was then subjected to PCR. Regarding PCR for Oct-4, the primer set was 5'-GGACACCTGGCTTCGGATT-3' and 5'-TTCGCTTTCTC-TTTCGGGC-3'. The PCR conditions were 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 67°C for 45 seconds, and 68°C for 1.5 minutes. Regarding PCR for *Scl*, the primer set was 5'-GGGCG-GAAAGCTGTTTGGCGATT-3' and 5'-TCGCTGAGAGGCC-TGCAGTT-3'. The PCR conditions were 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 63°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. A simultaneous PCR for β -actin was also conducted on each cDNA sample as an internal control as described above. Amplified Oct-4 (697 bp), *Scl* (201 bp), and β -actin (234 bp) products were resolved on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

In Utero Transplantation and Delivery

cyESCs stably expressing GFP were used in this study [17]. In the setting of allogeneic transplantation, GFP was used as a genetic tag to track transplanted cell progeny. We employed the OP9 stromal cell coculture method instead of the embryoid body formation method to facilitate the hematopoietic differentiation [19, 23, 24] (Fig. 1A, 1B). According to the flow cytometric analysis, CD34, CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 [PECAM-1]), CD144 (VE-cadherin), and VEGFR-2 (Flk-1) were all upregulated on day 6 but decreased thereafter (Fig. 1C–1E, 1G). Among the markers examined, CD34 is a widely used surface marker of hematopoietic stem cells in both human and monkey subjects [25–27]. The others are key markers of hemangioblasts (which generate endothelial and hematopoietic lineages) in both mice and humans [14, 28]. Cells positive for both VEGFR-2 and VE-cadherin emerged on day 6 (Fig. 1H). CD45, however, was not detected until day 12 (Fig. 1F). Despite the hemangioblast marker expression on day 6, the hematopoietic *Scl* gene was upregulated at this time point as assessed by RNA PCR (Fig. 1I), implying that the hematopoietic commitment might have already occurred on day 6 [29, 30]. We therefore designated the day 6 cyESC-derived progenitor cells as putative hematopoietic precursors. The time course profiles presented here were similar to those of hESCs [14, 24]. The GFP expression was stable during the 6-day culture (Fig. 1A, 1B) and afterward (data not shown).

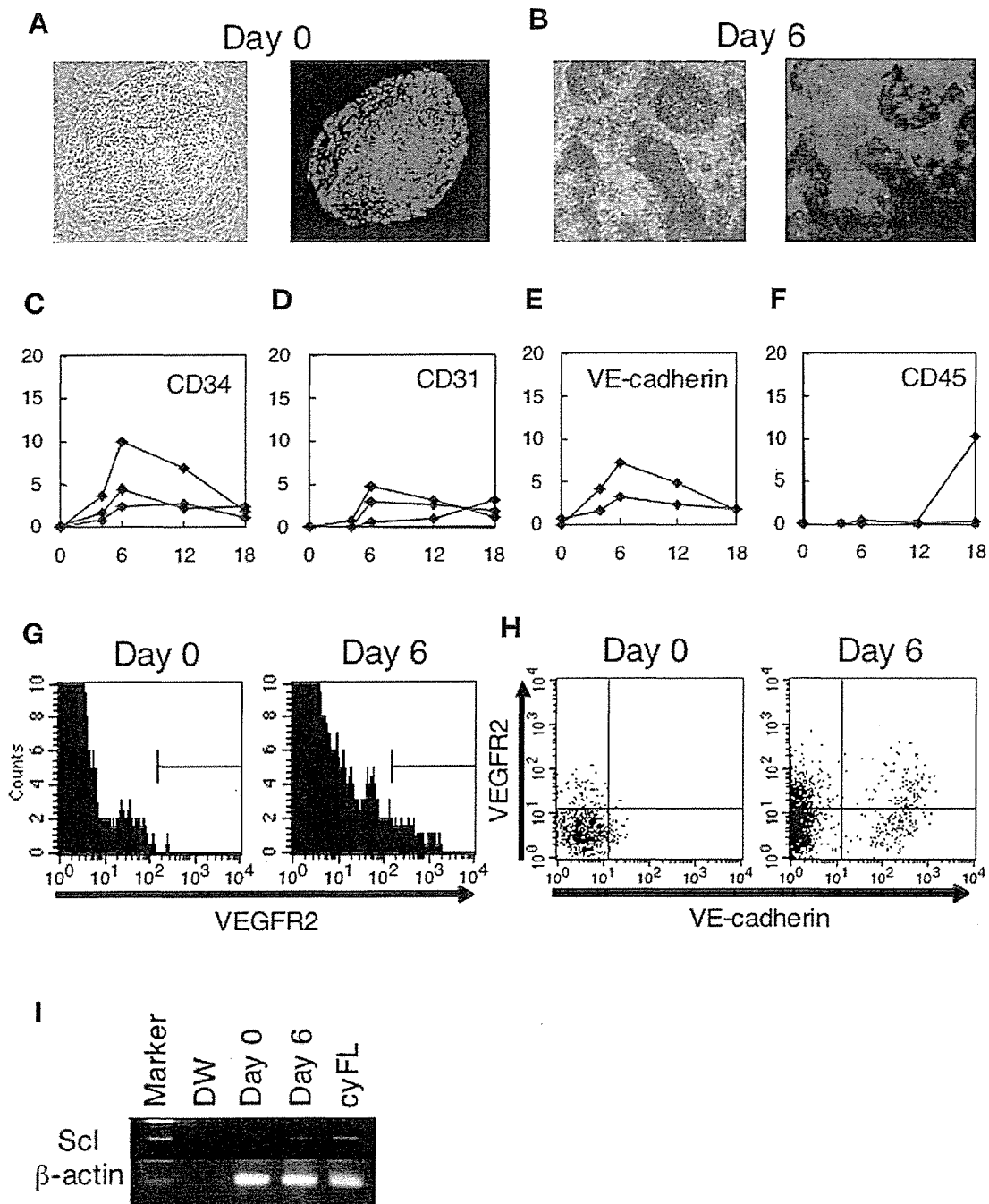


Figure 1. Flow cytometric analysis during the in vitro differentiation of cyESCs. Undifferentiated cyESCs expressing green fluorescent protein were cultured on OP9 cells with multiple cytokines (see Materials and Methods). (A): Cells on day 0 are shown in bright (left) and dark (right) fields. (B): Cells on day 6 are shown in bright (left) and dark (right) fields. (C): Cells on days 0, 4, 6, 12, and 18 were stained for CD34. (D): Cells on days 0, 4, 6, 12, and 18 were stained for CD31. (E): Cells on days 0, 4, 6, 12, and 18 were stained for VE-cadherin. (F): Cells on days 0, 4, 6, 12, and 18 were stained for CD45. The vertical axis shows the fraction (percentage) of cells that were stained positive. (C–F): Results of two or three independent experiments are shown. (G): Although cells on day 0 already express low levels of VEGFR-2, a VEGFR-2^{high} population did not emerge until day 6. (H): Dot-plot profiles for VEGFR-2 and VE-cadherin expression indicate that cells positive for both VEGFR-2 and VE-cadherin emerged until day 6. (G, H): Representative results from three independent experiments are shown. (I): The *Scl* gene expression was upregulated on day 6 to a level similar to that in the cynomolgus fetal liver as assessed by RNA polymerase chain reaction. Day-6 cells (putative hematopoietic precursors) were used for transplantation. Abbreviations: cyESC, cynomolgus embryonic stem cell; cyFL, cynomolgus fetal liver; DW, distilled water; VE, vascular endothelial; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

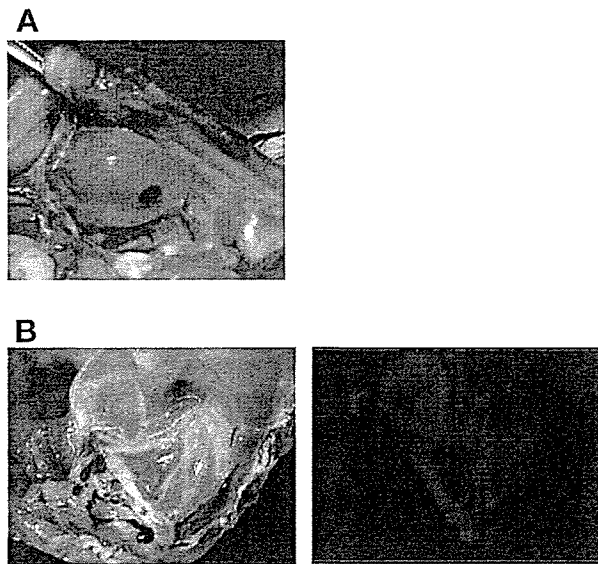


Figure 2. Tumor formation after the transplantation of cynomolgus embryonic stem cell (cyESC)-derived progenitor cells. Tumors formed in all three monkey fetuses transplanted with the day-6 cyESC-derived progenitor cells (putative hematopoietic precursors). (A): A representative tumor in the thoracic cavity at 3 months after transplantation (monkey no. 0841). (B): The tumor was observed in bright (left) and dark (right) fields under a fluorescence microscope.

Teratoma Formation

The undifferentiated cyESCs ($n = 3$) or cyESC-derived putative hematopoietic precursors ($n = 3$) were transplanted in utero into allogeneic fetuses in the liver under ultrasound guidance at approximately the end of the first trimester (49–66 days, full term 165 days) (Table 1). Regardless of whether the undifferentiated cyESCs or putative hematopoietic precursors were transplanted, tumors were found in the thoracic or abdominal cavities in all the six animals at 2–3 months after transplant (Table 1; Fig. 2A). The tumors fluoresced (Fig. 2B) and consisted of three germ layer cells. Thus, they were teratomas derived from transplanted cells. However, tumors were hardly observed in fetal sheep (1/10; [13] and our unpublished data) (Table 1) and immunodeficient (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) mice (3/10; our unpublished data) after the same putative hematopoietic precursors were transplanted.

In Vivo cyESC-Derived Hematopoiesis

Regarding the newborn monkeys that had been transplanted with the putative hematopoietic precursors, we harvested cells from the femur, cord blood, and liver and plated the cells in methylcellulose medium to produce clonogenic hematopoietic colonies (colony-forming units [CFU]) (Fig. 3A). The monkey cells generated colonies of clear hematopoietic morphology in this assay (Fig. 3B). To detect transplanted cell-derived, GFP-positive colonies, we tried to observe GFP fluorescence of colonies under a fluorescent microscope but were hampered by the high autofluorescence. We then conducted PCR for the *GFP* gene sequence in DNA isolated from each colony (colony PCR) (Fig. 3C). The transplanted cell-derived CFU were clearly detected in the animals (4.1% and 4.7%; Table 1). We repeated the colony PCR and confirmed that the results were reproducible.

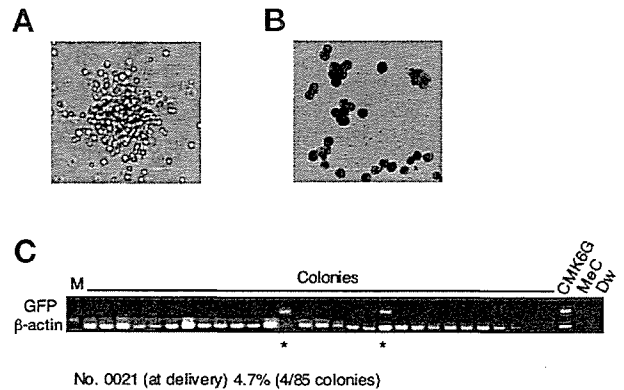


Figure 3. cyESC-derived hematopoiesis in vivo. (A): Bone marrow, cord blood, and liver cells were harvested from newborn monkeys and placed in methylcellulose medium to produce clonogenic hematopoietic colonies. (B): A cytopspin specimen (stained with the May-Giemsa method) of plucked colonies reveals mature neutrophils. To identify cyESC-derived colonies, well-separated individual colonies were plucked and examined for the GFP sequence by PCR. Plucked MeC alone (not containing colonies) served as a negative control. PCR of the β -actin sequence in the same colonies was simultaneously performed as an internal control. Colony PCR was repeated at least twice. (C): Representative colony PCR results for monkey no. 0021. Asterisk indicates bands positive for the GFP sequence. Abbreviations: CMK6G, positive control green fluorescent protein-expressing cynomolgus cells; cyESC, cynomolgus embryonic stem cell; DW, distilled water; GFP, green fluorescent protein; M, molecular weight marker; MeC, methylcellulose; PCR, polymerase chain reaction.

We detected both granulocytic and erythroid cynomolgus CFU. In the peripheral blood, however, we were not able to detect cells expressing GFP by flow cytometry. It turned out that, as assessed by quantitative PCR, the fractions of GFP-positive cells in the peripheral blood were very small (<0.1%). Low peripheral “chimerism” has been reported more than once in other in utero transplantations of ESCs or hematopoietic stem cells such as in mice, sheep, and pigs [13, 31–33].

Purging SSEA-4⁺ Cells of the Putative Hematopoietic Precursors

We examined the expression of an undifferentiated primate ESC marker, SSEA-4, in the undifferentiated cyESCs (day 0) and putative hematopoietic precursors (day 6). The proportion of SSEA-4⁺ cells was $93.4\% \pm 8.1\%$ and $38.2\% \pm 10.3\%$ among the day-0 and -6 cells, respectively (Fig. 4A). A substantial number of cells were still positive for SSEA-4 after the rigorous differentiation culture. In addition, a considerable number of cells expressing another undifferentiated marker, Oct-4, remained among the day-6 population as assessed by RNA-PCR (Fig. 4B). Those residual undifferentiated cells might be responsible for the formation of teratomas in the recipients.

To prevent teratomas from forming in recipients, we purged SSEA-4⁺ cells of the putative hematopoietic precursors and transplanted the SSEA-4⁻ population into the fetal monkey liver ($n = 6$) (Fig. 4C). At delivery, tumors were no longer observed in the six animals that had been transplanted with the sorted SSEA-4⁻ cells (Fig. 4D). The transplanted cell-derived CFU were clearly detected in the newborns, and