

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた
基盤技術の開発に関する研究(H19-生物資源-一般-002)

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 九州大学・生体防御医学研究所
ゲノム病態学分野
教授 谷 憲三朗

平成21 (2009) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と 悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術 の開発に関する研究	1
谷 憲三朗		
II. 分担研究報告		
1. サル ATLL 作出に関する研究	5
谷 憲三朗		
2. 小型霊長類コモンマーモセット白血病 モデル作出に関する研究	7
小林 誠一郎		
3. 小型霊長類コモンマーモセット白血病 モデル作出に関する研究： コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞 の単離に関する研究	9
佐々木 えりか		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	13

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

サルに疾患モデルを作出することは新規薬剤の前臨床研究動物系確立の観点から極めて重要である。先ず成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルコモンマウスモセットの作出を目的にHTLV-1産生細胞をコモンマウスモセット2頭に腹腔内ならびに静脈内投与しその後の経過を観察したところ、腹腔内投与個体において持続的に抗HTLV-1抗体の出現を認め、キャリア状態にあると考えられた。次に、骨髄内へのp190 bcr/ablレンチウイルスベクターの直接遺伝子導入法を用いてコモンマウスモセットに白血病(特に急性リンパ性白血病)を作出する研究を実施した。そのうちの1頭に骨髄線維症の発症を認め現在病因を解析中である。さらにmll/enl遺伝子の発現ベクターをbcr/ablベクターと同時に骨髄内に接種したところ、末梢血細胞において持続的に両遺伝子の発現を観察できている。将来的に遺伝子ノックアウトモデル作出を目的にコモンマウスモセットES細胞もしくは受精卵p53遺伝子への変異導入を目的にコモンマウスモセットp53ゲノム解析とそれを基にZFPヌクレアーゼを設計・構築し、現在その細胞への効果を検討中である。

分担研究者

谷憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・教授
小林誠一郎 東京大学医科学研究所・助教
佐々木えりか 実験動物中央研究所・室長

A. 研究目的

近年のゲノム医療の進歩によりヒト細胞や遺伝子などを利用した研究から重要な知見が多く蓄積されるようになり、これらの情報を十分に生かした分子標的薬ならびに遺伝子治療薬の開発も急速に進められてきている。特に分子標的薬に関しては難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として臨床での使用が次第になされてきている。しかし一方でこれら新規薬剤の開発においては今後さらにヒトゲノム情報に基づいた分子設計がなされてくることが予想され、その安全性ならびに有効性の検定に際してゲノムレベルで相同性の低いマウスモデルでは大きな限界が生じてくることが予想される。この観点からサル疾患モデルは極めて重要な情報を提供してくれることが期待できるものの、現在サルには悪性腫瘍モデルはない。この大きな理由はマウスと比べて世代時間が長いこと、化学・放射線発癌誘導法は実用的ではなく胚性幹(ES)細胞を用いたトランスジェニックもしくはノックアウト法による疾患モデル作出技術も開発されていないためである。本研究ではサルを用いて特に造血器悪性腫瘍モデルを作出することを第一の目的とする。さらに第二の目的として将来的に悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルを作出することを最終目的に、サルES細胞を用いたノックアウト法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発を行う。

B. 研究方法

1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出:

- 平成19年度に2種類のHTLV-1産生細胞(CM-1およびMT-2)を静脈投与した妊娠カニクイザル(n=2)を用いて、生体組織中のHTLV-1プロウイルスの検出を行うとともに血漿中のHTLV-1抗体の推移を観察した。さらに、ウイルス産生細胞接種母体から出生した新生仔(n=2)をそれぞれの母体が泌乳した母乳によって飼育し、随時採血を行って血中におけるHTLV-1プロウイルスの検出および抗体価を解析した。
- ウイルスキャリアモデルを構築することを目的として、免疫学的に未成熟な幼弱マウスモセットを用いて5 x 10⁵のMT-2を腹腔あるいは静脈内に接種した(各n=1)。

2) フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病(Ph1-ALL)モデルの作出:

- 平成19年度中にbcr/abl融合遺伝子を発現するよう設計したレンチウイルスベクターを大腿骨髄内に直接注入することによって造血細胞にbcr/abl遺伝子を導入したコモンマウスモセットを用いて、末梢血単核球中のbcr/abl遺伝子の発現状態を解析した(n=2)。
- bcr/ablおよびmll/enlのそれぞれの白血病関連融合遺伝子の下流にVenusタンパク質を発現するよう新たに設計したbcr/abl遺伝子およびmll/enl遺伝子の発現VSV-Gシールドタイプレンチウイルスベクターを作成し、さらにbcr/abl発現ベクターのみ接種する群(n=2)およびbcr/ablとmll/enlの両遺伝子発現ベクターを同時に接種する群(n=2)を設け、免疫学的に未成熟である幼弱マウスモセットの大腿骨中にウイルス液を直接注入することで、各遺伝子の導入を図った。さらに、接種後2週毎に末梢血を採取して単核球を回収し、bcr/abl遺伝子およびmll/enl遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

3) p53変異導入サルES細胞の作製

- ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc finger nuclease)設計を目的として、コモンマウスモセットES細胞のp53ゲノム構造を解析し、塩基配列を決定した。次にこの解析結果とヒトp53ゲノム構造を比較し、ヒト腫瘍において高頻度に検出される一塩基多型Arg175, Arg248, Arg273に対応するコモンマウスモセット塩基部位を決定した。
- ①の多型部位をターゲットとするジンクフィンガーヌクレアーゼの設計をSangamo社に依頼しジンクフィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドを作成した。そして正常なp53遺伝子配列であることを確認したコモンマウスモセット繊維芽細胞にジンクフィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドを電気穿孔法により遺伝子導入し、その機能効率を検討した。
- コモンマウスモセットの造血幹・前駆細胞の単離に関する研究
マウスモセットの骨を培養液で灌流することにより骨髄細胞を回収し、さらにLymphoprepを用いた比重分離法により骨髄単核球(BM-MNC)を分離した。次いで回収したBM-MNCを用いて、蛍光標識したCD34抗体およびc-kit抗体で染色し、FACS法によってCD34⁺/c-kit⁺、CD34⁻/c-kit⁺、CD34⁺/c-kit⁻およびCD34⁻/c-kit⁻の4分画に分離した。分離した細胞はコロニーアッセイ法によりin vitroでの分化能を観察するとともに(n=2)

免疫不全マウス (NOGマウス) にそれぞれの細胞分画を 1×10^6 個ずつ静脈中に移植し、*ex vivo*での生着および分化能について移植後8週から2週毎に採血を行いFACS法で解析した。さらに移植後15週にマウスを屠殺し血液および臓器におけるマーマセット細胞の存在の有無をPCR法により確認した ($n=16$)

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針(「九州大学動物実験に関する指針」、「東京大学動物実験マニュアル」)のつとり委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した

C. 研究結果

(1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出

① CM-1 の接種後、母体の血漿中において抗 HTLV-1 抗体価の一過性の上昇を観察したものの、3ヶ月後までには陰性レベルに低下した。新生仔においても出生後3および4ヶ月間にわたって抗 HTLV-1 抗体価の上昇が観察されたもののそれ以降は陰性であった。さらに、全個体を犠牲にして各組織をPCR法にて解析したが HTLV-1 ウイルスの存在は確認できなかった。

② 腹腔内接種したマーマセット個体の血漿中において MT-2 細胞接種後4ヶ月が経過した現在に至るまで高い抗 HTLV-1 抗体価が持続的に観察されている。一方、静脈中に MT-2 細胞を接種した個体の血漿中では抗 HTLV-1 抗体価は終始陰性であった(図1)。末梢血単核球を経時的に回収しPCR法で解析したところ、いずれの個体においても HTLV-1 プロウイルスはこれまでのところ観察されていない。ヒトの臨床事例では HTLV-1 の抗体価が陽性的一方でプロウイルスはPCR検出限界以下であるというキャリアが報告されており、本実験の腹腔接種モデルの結果と類似していた。

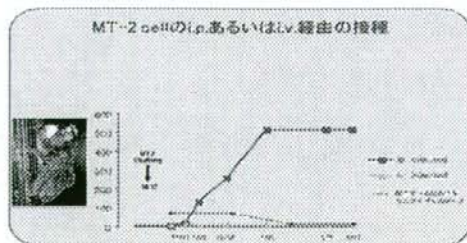


図1. ウイルスのキャリア化を目指したHTLV-1産生細胞のマーマセット幼弱個体へのMT-2細胞接種

(2) フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病 (Ph1-ALL) モデルの作出

① 処置を行ったうちの1頭において *bcr/abl* 遺伝子が持続的に末梢血単核球中で発現する事を確認した。その後、同個体の容態が悪化したため、サクリファイスをして各組織における *bcr/abl* 遺伝子の発現を確認するとともに、組織染色により病理解析を行った。その結果、末梢血および骨髄細胞において *bcr/abl* の発現が認められ、また病理解析の結果、骨髄線維症の病態が観察された。この結果を受け、現在レンチウイルスベクターの組み込み部位を明らかにするために、Linear Amplification-mediated PCR (LAM-PCR) を行ってシークエンス解析を進めている。

② 接種直後からすべての個体において導入した遺伝子の発現が確認され、さらに接種から4ヶ月が経過する現在に至るまで明瞭な発現が持続している(図2)。



図2. 新たに構築した2種類 (BCR/ABLおよび MLL/ENL) の発現レンチウイルスベクターを骨髄に直接導入したマーマセットの末梢血における各遺伝子の発現とその持続性

(3) p53変異導入サルES細胞の作製

設計されたジンクフィンガーヌクレアーゼを実際の共通マーマセット細胞にたいして遺伝子導入を行ったところ、3日目において多数の細胞形態異常をおこし細胞死が確認できた。生細胞を集めゲノム抽出を行い、塩基置換ミスマッチ部位を高い特異性で切断する CEL-1 酵素を用いて、その切断効率の検討を行った。しかしこれまでの所、すべてのジンクフィンガーヌクレアーゼにおいて遺伝子切断に伴う遺伝子修復が確認できていない。

(4) コモンマーマセットの造血幹・前駆細胞の分離に関する研究

コロニーアッセイの結果、CD34+/c-kit+およびCD34-/c-kit+の表現系を持つBM-MNC分画を培養した場合にCFU-Mixを含む多種のコロニーが多数観察され、この2つの表現系を示すBM-MNC分画中に造血幹・前駆細胞が濃縮されることが示された。一方で、NOGマウスにそれぞれの細胞分画を移植した場合、CD34+/c-kit+ BM-MNCおよびCD34-/c-kit+ BM-MNCを移植したマウスの末梢血からマーマセットCD45陽性細胞が最長で移植後10週まで観察された。一方、移植後12週以降は全移植マウスの末梢血においてマーマセット細胞の存在はFACSレベルで確認されなかった。さらに、*c-kit* の発現の有無にかかわらずCD34陽性細胞を移植したマウス7匹のうち6匹までが移植10週までに著しい体重の減少と体調の悪化を示し、死亡あるいは早期安楽殺の処置を行った。安楽殺を行った個体のうちCD34+/c-kit+分画移植個体の末梢血ではマーマセットCD3陽性細胞の著しい増加が観察された。死亡あるいは早期安楽殺を行わなかった全個体を移植後15週目に屠殺し、血液および脾臓細胞を用いてFACSとPCR解析を行ったところ、FACSでは両サンプル中にマーマセット由来の血球細胞の存在は検出されず、またPCRレベルでも血液中にマーマセットゲノムの存在は観察されなかったものの脾臓細胞ではマーマセットゲノムの存在が確認された。

D. 考察

(1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出

腹腔内接種個体からリンパ節など免疫組織の一部を回収しウイルス感染細胞がないかを確認するとともに、免疫抑制剤を投与して白血病化への進展の有無を確認する。また、抗体価の変動が観察されていない静脈内接種個体では HTLV-1 特異的 CTL の存在の有無を ELISA 法で確認するとともに、持続的感染が維持される事がラットにおいて報告されている経口投与方法により再度キャリア化を検討する。

(2) フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病

(Ph1-ALL)モデルの作出

今後は G-CSF を個体に投与して造血幹・前駆細胞を末梢血中に動員し、CD34 陽性細胞を FACS 法により分取してコロニーアッセイを行い、多分化能を有した造血細胞にそれぞれの白血病細胞が導入されているかを検証するとともに、標識タンパク質として導入した Venus を指標として、リンパ球に導入遺伝子が組み込まれているかについて各種細胞表面抗体を用いながら FACS 解析を行う予定である。さらに、免疫抑制剤を用いてそれぞれの白血病関連融合遺伝子導入個体における病態の発症を試みる。また、これら一連のマウスマネジメントを用いた研究と平行して、免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた *ex vivo* の遺伝子導入造血幹・前駆細胞の分化能と白血病化についても検討することも有効であると考えられる。すなわち、ライフスパンの長いマウスマネジメントと比較してより短期間での白血病の発症をモニターしうる可能性があるとされており、検討を進める予定である。

(3) p53変異導入サルES細胞の複製

設計したジククフィンガーヌクレアーゼの機能は大腸菌において確認されていたが、対象細胞において、ヌクレアーゼの機能を解析するには細胞への遺伝子導入効率、解析開始時期の決定、腫瘍細胞形成を予防するため細胞に本来備わっている細胞死などの防御機構の解除等の問題点を解決する予定である。

(4) コモンマウスマネジメントの造血幹・前駆細胞の単離に関する研究

*in vitro*での解析の結果、c-kit陽性細胞が多分化能を有した未成熟な細胞が含まれることが強く示唆されたが、一方で同分画をNOGマウスに移植しても生着および長期間の血液細胞産生は観察されなかった。また、CD34陽性細胞を移植することで、移植個体に病態が生じることからマウスやヒトの場合と異なり、マウスマネジメントのCD34はある程度分化の進んだ成熟リンパ球においても発現していることが示唆された。今後はソーティングに用いる抗体の種類を増やすことで、移植細胞から免疫系の成熟細胞をあらかじめ完全に除去し、得られた新しい細胞分画の多分化能を *in vitro*で確認するとともに、多分化能が維持されていることが確認された場合には新たにNOGマウスに移植して *ex vivo*での生着および血液細胞産生能を評価することが必要である。

E. 結論

ATLLは、ウイルスキャリアーとして長期経過しその一部が白血病(リンパ腫)を発症する疾患である。キャリアー状態の維持、単クローン増殖、白血病化の病態変化は、宿主の世代時間、免疫状態に大きく依存していると考えられているが、その詳細な病態解明はまだ霊長類においてはなされていない。ウイルスキャリアー状態から発症に至るまでの病態の解明は本邦在住の100万人のウイルスキャリアーの健康維持に対して極めて重要な情報となるものと考えられる。さらにATLL発症予防法の開発はこれらウイルスキャリアーの方に取っては切実な問題であり、その1候補として副作用の少ない免疫細胞療法は注目されているものの、ヒトでの使用の前に慎重な前臨床研究が必要であるとされる。

コモンマウスマネジメント末梢血中に長期間bcr/ablならびにm11/en1遺伝子の存在が確認されたことで、我々が開発した骨髄内直接遺伝子導入法の有用性が再確認された。今後白血病発症を誘導する条件検討が重要であると考えられる。P53遺伝子変異導入サルES細胞ならびに受精卵の複製に必要な試料が準備できたことにより今後 *in vivo*における研究を推進できるものと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Inoue H, Iga M, Nabeta H, Yokoo T, Suehiro Y, Okano S, Inoue M, Kinoh H, Katagiri T, Takayama K, Yonemitsu Y, Hasegawa M, Nakamura Y, Nakanishi Y, Tani K. Non-transmissible Sendai virus encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor is a novel and potent vector system for producing autologous tumor vaccines. *Cancer Sci*. 99(11):2315-2326. 2008
- Inoue, H., Iga, M., Xin, M., Asahi, S., Nakamura, T., Kurita, R., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Takayama, K. Nakanishi, Y., Tani, K. TARC and RANTES Enhance Antitumor Immunity Induced by the GM-CSF-Transduced Tumor Vaccine in a Mouse Tumor Model. *Cancer Immunol Immunol*. 57: 1399-1411. 2008
- Kurita R, Oikawa T, Okada M, Yokoo T, Kurihara Y, Honda Y, Kageyama R, Suehiro Y, Okazaki T, Iga M, Miyoshi H, Tani K. Construction of a high-performance human fetal liver-derived lentiviral cDNA library. *Mol Cell Biochem*. 319(1-2):181-187. 2008
- Yanagie, H., Tanabe, T., Sumimoto, H., Sugiyama, H., Matsuda, S., Nonaka, Y., Ogiwara, N., Sasaki, K., Tani, K., Takamoto, S., Tkahashi, H., Eriguchi, M., Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene to in a pancreatic cancer model. *Biomed Pharmacother* 2008 (in press)
- Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Kobayashi S, Tojo A, Ohtomo K. Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Experimental Hematology* 2008;36:1634-1641
- Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi-mediated silencing of p190Bcr-Abl inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin in selective killing of p190Bcr-Abl-expressing leukemia cells. *Leukemia* 2008;22:1131-1138
- Hao Chen, Hattori, F., Murata, M., Li, W., Yuasa S., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Sasaki, E., Kimura, K., Hakuno, D., Sano, M., Makino, S., Ogawa, S., and Fukuda, K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *BBRC*, 9:369:801-6(2008)
- Ikuo Tomioka and Erika Sasaki. Recent progress in reproductive technologies based on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) *JOURNAL OF MAMMALIAN OVA RESEARCH* Vol.2 5,143-149,2008
- Kohu K., Yamabe E., Mstszawa A., Onda D., Suemizu H., Sasaki E., Tanioka Y., Yagita H., Suzuki D., Kametani Y., Takai T., Toyoda A., H. abu S. and Satake M. (2008) Comparison of 30 Immunity-Related Genes from the Common Marmoset with Orthologues from H human and Mouse. *Tohoku J. Exp. Med.*, 215: 167-180
- Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, PA., Sasaki, E., Behr, R. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum Reprod*. 2009 [Epub ahead of print] Feb 27.

5. Gesine Fleischmann, Thomas Müller, Rüdiger Behr, Rainer Blaszczak, Erika Sasaki, Peter A. Horn Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line CJES001 depending on feeder cell treatment
Cloning and Stem cells, 2009 in print

2. 学会発表

1. Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Kenzaburo Tani. In vitro induction of the hematopoietic progenitor/stem cells from human ES cells ASGT 12th Annual Meeting, May 27 - 30, 2009, San Diego, CA
2. Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Haruka Nabeta, Meng Xin, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Dendritic Cells Transduced with Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor or mediated by Non-Transmissible Sendai Virus Induce Therapeutic Antitumor Immunity in LLC Bearing Mice ASGT May 28-Jun 1, 2009, Boston
3. Haruka Nabeta, Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Meng Xin, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Blocking LT β 4 Signaling Maintains the Antitumor Effect of GM-CSF in the Tumor Challenge Model Using BLT-1 $^{-/-}$ Mice ASGT May 28-Jun 1, 2009, Boston
4. Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Haruka Nabeta, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Immunotherapy with Autologous Dendritic Cells Activated by Non-transmissible Sendai Virus Encoding Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor elicits Antitumor Immunity Against Lung Cancer in Mice APSR Nov 19-22, 2009
5. Hiroyuki Inoue, Yosuke Yokota, Haruka Nabeta, Mutsunori Iga, Chika Sakamoto, Fumiyo Sasaki, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Loss of LT β 4 Signaling Confers the Long-Term Antileukemia Effects Induced by GM-CSF $^{-}$ Transduced Tumor in BLT-1 deficient Mice ASH 50th Annual Meeting and Exposition, Dec 6-9, 2008, San Francisco
6. Hui-Jen Tsai, Seiichiro Kobayashi, Kiyoko Itoh, Takaomi Ishida, Kazuo Umezawa, and Arinobu Tojo. Tumor Necrosis Factor- Contributes to Microenvironmental up- Regulation of NF- κ B Activity in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Implication for a Novel Therapeutic Target. Blood, Nov 2008; 112: 1912.
7. Tokiko Nagamura-Inoue, Kazuo Ogami, Kazuaki Yokoyama, Kiyoko Izawa, Seiichiro Kobayashi, Shin Nakayama, Ikuo Ishige, Yusuke Inoue, Jun Ooi, Kaoru Uchimaru, Satoshi Takahashi, and Arinobu Tojo. Large Scale Selective *Ex Vivo* Expansion of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ Regulatory T Cells from Peripheral Blood. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008; 112: 2344
8. Kazuaki Yokoyama, Tokiko Nagamura-Inoue, Shin Nakayama, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Munenori Futami, Seiichiro Kobayashi, and Arinobu Tojo. Imatinib Mesylate Has a Stage-Specific Inhibitory Role in Generation of CD26 high CD8 $^{+}$ Central Memory T Cells *In Vitro* and *In Vivo*. Blood (ASH), Nov 2008; 112: 3243.

9. 長村-井上登紀子, 尾上和夫, 横山和明, 伊東清子, 石下郁夫, 小林誠一郎, 東條有伸 制御性T細胞の選択的増幅によるGVHD制御法の開発 第70回日本血液学会
10. 横山和明, 長村-井上登紀子, 中山紳, 尾上和夫, 石下郁夫, 二見宗弘, 小林誠一郎 塚田信弘, 大野伸広, 湯地 晃一郎, 大井淳, 高橋聡, 内丸薫, 東條有伸 イマチニブの示す免疫抑制作用のin vitroにおける検証 第70回日本血液学会
11. 室橋道子, 黒田雅彦, 小林誠一郎, 東條有伸, 後藤典子, ヒト乳癌幹細胞株における癌幹細胞の解析, 第67回日本癌学会
12. 佐々木えりか, 大岩亮, 島田亜樹子, 上岡智子, 花澤喜三郎, コモンマーモセットの非侵襲的採卵法の確立, 第55回日本実験動物学会総会, 2008
13. 外丸祐介, 平川玲子, 島田亜樹子, 塩澤誠司, 佐々木えりか, コモンマーモセット体細胞クローン胚の発生能に影響する要因の検討 第55回日本実験動物学会総会, 2008
14. 富岡郁夫, 上岡美智子, 島田亜樹子, 佐々木えりか, コモンマーモセット精子凍結技術の条件検討, 第55回日本実験動物学会総会, 2008
15. 上岡美智子, 佐々木えりか, 伊藤豊志雄, 谷岡功邦, コモンマーモセットにおける連続採血の影響, 第55回日本実験動物学会総会2008
16. 亀谷美恵, 鈴木大介, 河府和義, 末水洋志, 佐々木えりか, 伊藤豊志雄, 小柳明美, 八木田秀夫, 佐竹正延, 野村達次, 垣生園子 コモンマーモセットの免疫系解析ツールの開発, 第55回日本実験動物学会総会, 2008
17. 島田 亜樹子, 大岩 亮, 上岡 美智子, 横山 紳, 富岡 郁夫, 佐々木 えりか コモンマーモセットの卵巣刺激に適した卵巣成熟ホルモン(FSH)製剤の比較検討 第101回日本繁殖生物学会大会, 2008
18. 富岡 郁夫, 島田 亜樹子, 佐々木 えりか コモンマーモセット卵子体外成熟培養の検討 第101回日本繁殖生物学会大会, 2008
19. 佐々木えりか 多次元共同脳科学推進センター キックオフシンポジウム, 自然科学研究機構, 2008
20. 佐々木えりか 実験動物としてのマーモセットの開発, 静岡実験動物研究会, 2008
10. 佐々木えりか, マーモセットの発生工学分野トランスジェニックマーモセット作出を目指してー, 脳科学研究戦略推進プログラムー分科会・ワークショップ, 2008
11. 佐々木 えりか, 新しい遺伝子操作技術による疾患モデルの可能性, 第3回分子イメージング研究センターシンポジウム, 2009
12. ヒト疾患モデルマーモセット作出に向けた基礎研究, 脳科学研究推進プロジェクトシンポジウム, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

出願日: 2008年4月25日

(優先日: 2007年4月27日)

発明の名称: 遺伝子治療用ウイルスベクター

発明者: 谷 憲三朗ら5名

出願人名:

出願番号: PCT/JP2008/058132

サルATLL作出に関する研究

分担研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

サルに疾患モデルを作出することは新規薬剤の前臨床研究動物系確立の観点から極めて重要である。先ず成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルコモンマーモセットの作出を目的にHTLV-1産生細胞をコモンマーモセット2頭に腹腔内ならびに静脈内投与しその後の経過を観察したところ、腹腔内投与個体において持続的に抗HTLV-1抗体の出現を認め、キャリア状態にあると考えられた。将来的に遺伝子ノックインモデル作出を目的にコモンマーモセットES細胞もしくは受精卵p53遺伝子への変異導入を目的にコモンマーモセットp53ゲノム解析とそれを基にZFPヌクレアーゼを設計・構築し、現在その細胞への効果を検討中である。

A. 研究目的

近年のゲノム医療の進歩によりヒト細胞や遺伝子などを利用した研究から重要な知見が多く蓄積されるようになり、これらの情報を十分に生かした分子標的薬ならびに遺伝子治療薬の開発も急速に進められてきている。特に分子標的薬に関しては難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として臨床での使用が次第になされてきている。しかし一方でこれら新規薬剤の開発においては今後さらにヒトゲノム情報に基づいた分子設計がなされてくることが予想され、その安全性ならびに有効性の検定に際してゲノムレベルで相同性の低いマウスモデルでは大きな限界が生じていることが予想される。この観点からサル疾患モデルは極めて重要な情報を提供してくれることが期待できるものの、現在サルには悪性腫瘍モデルはない。この大きな理由はマウスと比べて世代時間が長いため、化学・放射線発癌誘導法は実用的ではなく、胚性幹(ES)細胞を用いたトランスジェニックもしくはノックアウト法による疾患モデル作出技術も開発されていないためである。本研究ではサルを用いて特に造血器悪性腫瘍モデルを作出することを第一の目的とする。さらに第二の目的として将来的に悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルを作出することを最終目的に、サルES細胞を用いたノックイン法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発を行う

B. 研究方法

- (1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出：
①平成19年度に2種類のHTLV-1産生細胞(CM-1およびMT-2)を静脈投与した妊娠カンクイザル(n=2)を用いて、生体組織中のHTLV-1プロウィルスの検出を行うとともに血漿中のHTLV-1抗体の推移を観察した。さらに、ウィルス産生細胞接種母体から出生した新生仔(n=2)をそれぞれの母体が泌乳した母乳によって飼育し、随時採血を行って血中におけるHTLV-1プロウィルスの検出および抗体価を解析した。
②ウィルスキャリアモデルを構築することを目的として、免疫学的に未成熟な幼弱マーモセットを用いて 5×10^5 のMT-2を腹腔あるいは静脈内に接種した(各n=1)。
(2) p53変異導入サルES細胞の作製
①ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc finger nuclease)設計を目的として、コモンマーモセットES細胞のp53ゲノム構造を解析し、塩基配列を決定した。

次にこの解析結果とヒトp53ゲノム構造を比較し、ヒト腫瘍において高頻度に検出される一塩基多型Arg175, Arg248, Arg273に対応するコモンマーモセット塩基部位を決定した。
②①の多型部位をターゲットとするジンクフィンガーヌクレアーゼの設計をSangamo社に依頼しジンクフィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドを作成した。そして正常なp53遺伝子配列であることを確認したコモンマーモセット繊維芽細胞にジンクフィンガーヌクレアーゼ発現プラスミドを電気穿孔法により遺伝子導入しその機能効率を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針(「九州大学動物実験に関する指針」、「東京大学動物実験マニュアル」)にのっとり委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

- (1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出
①CM-1の接種後、母体の血漿中において抗HTLV-1抗体価の一過性の上昇を観察したものの、3ヶ月後までには陰性レベルに低下した。新生仔においても出生後3および4ヶ月間にわたって抗HTLV-1抗体価の上昇が観察されたもののそれ以降は陰性であった。さらに、全個体を犠牲にして各組織をPCR法にて解析したがHTLV-1ウィルスの存在は確認できなかった。
②腹腔内接種したマーモセット個体の血漿中においてMT-2細胞接種後4ヶ月が経過した現在に至るまで高い抗HTLV-1抗体価が持続的に観察されている。一方、静脈中にMT-2細胞を接種した個体の血漿中では抗HTLV-1抗体価は終始陰性であった。末梢血単核球を経時的に回収しPCR法で解析したところ、いずれの個体においてもHTLV-1プロウィルスはこれまでのところ観察されていない。ヒトの臨床事例ではHTLV-1の抗体価が陽性的一方でプロウィルスはPCR検出限界以下であるというキャリアが報告されており、本実験の腹腔接種モデルの結果と類似していた。

(2) p53変異導入サルES細胞の作製

設計されたジンクフィンガーヌクレアーゼを実際のコモンマーモセット細胞にたいして遺伝子導入を行ったところ、3日目において多数の細胞

形態異常をおこし細胞死が確認できた。生細胞を集めゲノム抽出を行い、塩基置換ミスマッチ部位を高い特異性で切断するCEL-1酵素を用いて、その切断効率の検討を行った。しかしこれまでの所、すべてのジンクフィンガーヌクレアーゼにおいて遺伝子切断に伴う遺伝子修復が確認できていない。

D. 考察

- (1) ヒト成人T細胞性白血病・リンパ腫の作出腹腔内接種個体からリンパ節など免疫組織の一部を回収しウイルス感染細胞がないかを確認するとともに、免疫抑制剤を投与して白血病化への進展の有無を確認する。また、抗体価の変動が観察されていない静脈内接種個体では HTLV-1 特異的 CTL の存在の有無を ELISA 法で確認するとともに、持続的感染が維持される事がラットにおいて報告されている経口投与方法により再度キャリア化を検討する。
- (2) p53変異導入サルES細胞の作製
設計したジンクフィンガーヌクレアーゼの機能は大腸菌において確認されていたが、対象細胞において、ヌクレアーゼの機能を解析するには細胞への遺伝子導入効率、解析開始時期の決定、腫瘍細胞形成を予防するため細胞に本来備わっている細胞死などの防御機構の解除等の問題を解決する予定である。

E. 結論

ATLLは、ウイルスキャリアーとして長期経過しその一部が白血病(リンパ腫)を発症する疾患である。キャリアー状態の維持、単クローン増殖、白血病化の病態変化は、宿主の世代時間、免疫状態に大きく依存していると考えられているが、その詳細な病態解明はまだ霊長類においてはなされていない。ウイルスキャリアー状態から発症に至るまでの病態の解明は本邦在住の100万人のウイルスキャリアーの健康維持に対して極めて重要な情報となるものと考えられる。さらにATLL発症予防法の開発はこれらウイルスキャリアーの方にとって切実な問題であり、その1候補として副作用の少ない免疫細胞療法は注目されているものの、ヒトでの使用の前に慎重な前臨床研究が必要であると考えられる。

P53遺伝子変異導入サルES細胞ならびに受精卵の作製に必要な試料が準備できたことにより今後 in vivoにおける研究を推進できるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Inoue H, Iga M, Nabeta H, Yokoo T, Suchiro Y, Okano S, Inoue M, Kinoh H, Katagiri T, Takayama K, Yonemitsu Y, Hasegawa M, Nakamura Y, Nakanishi Y, Tani K. Non-transmissible Sendai virus encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor is a novel and potent vector system for producing autologous tumor vaccines. *Cancer Sci.* 99(11):2315-2326. 2008
- Inoue, H., Iga, M., Xin, M., Asahi, S., Nakamura, T., Kurita, R., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Takayama, K., Nakanishi, Y., Tani, K. TARC and RANTES Enhance Antitumor Immunity Induced by the GM-CSF-Transduced Tumor Vaccine in a Mouse Tumor Model. *Cancer Immunol Immun.* 57: 1399-1411, 2008
- Kurita R, Oikawa T, Okada M, Yokoo T, Kurihara Y, Honda Y, Kageyama R, Suchiro Y, Okazaki T, Iga M, Miyoshi H, Tani K Construction of a high-performance human fetal liver-derived lentiviral cDNA library. *Mol Cell Biochem.* 319(1-2):181-

187. 2008

- Yanagie, H., Tanabe, T., Sumimoto, H., Sugiyama, H., Matsuda, S., Nonaka, Y., Ogiwara, N., Sasaki, K., Tani, K., Takamoto, S., Takahashi, H., Eriguchi, M., Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene tob in a pancreatic cancer model. *Biomed Pharmacother* 2008 (in press)

2. 学会発表

- Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Kenzaburo Tani. In vitro induction of the hematopoietic progenitor/stem cells from human ES cells ASGT 12th Annual Meeting, May 27 - 30, 2009, San Diego, CA
- Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Haruka Nabeta, Meng Xin, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Dendritic Cells Transduced with Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor or mediated by Non-Transmissible Sendai Virus Induce Therapeutic Antitumor Immunity in LLC Bearing Mice ASGT May 28-Jun 1, 2009, Boston
- Haruka Nabeta, Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Meng Xin, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Blocking LTB4 Signaling Maintains the Antitumor Effect of GM-CSF in the Tumor Challenge Model Using BLT-1^{-/-} Mice ASGT May 28-Jun 1, 2009, Boston
- Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Haruka Nabeta, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Immunotherapy with Autologous Dendritic Cells Activated by Non-transmissible Sendai Virus Encoding Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor elicits Antitumor Immunity Against Lung Cancer in Mice APSR Nov 19-22, 2009
- Hiroyuki Inoue, Yosuke Yokota, Haruka Nabeta, Mutsunori Iga, Chika Sakamoto, Fumiyuki Sasaki, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Loss of LTB4 Signaling Confers the Long-Term Antileukemia Effects Induced by GM-CSF-Transduced Tumor in BLT-1 deficient Mice ASH 50th Annual Meeting and Exposition, Dec 6-9, 2008, San Francisco

小型霊長類コモンマーモセット白血病モデル作出に関する研究

主任研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授
分担研究者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野 助教

研究要旨

サルに疾患モデルを作出することは新規薬剤の前臨床研究動物系確立の観点から極めて重要である。本研究はコモンマーモセットに急性リンパ性白血病(ALL)モデルを作出することを最終目的に、骨髄内へのp190 BCR-ABLレンチウイルスベクターの直接遺伝子導入法を用いた研究を実施した。大変興味深いことに同研究を実施した2頭中1頭に骨髄線維症の発症を認め現在病因を解析中である。さらにmll/enl遺伝子の発現ベクターをbcr/ablベクターと同時に骨髄内に接種したところ、末梢血細胞において持続的に両遺伝子の発現を観察できており今後の白血病発症に向けた重要な結果を得ることができた。

A. 研究目的

近年のゲノム医療の進歩によりヒト細胞や遺伝子などを利用した研究から重要な知見が多く蓄積されるようになり、これらの情報を十分に生かした分子標的薬ならびに遺伝子治療薬の開発も急速に進められてきている。特に分子標的薬に関しては難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として臨床での使用が次第になされてきている。しかし一方でこれら新規薬剤の開発においては今後さらにヒトゲノム情報に基づいた分子設計がなされてくることが予想され、その安全性ならびに有効性の検定に際してゲノムレベルで相同性の低いマウスモデルでは大きな限界が生じてくることが予想される。この観点からサル疾患モデルは極めて重要な情報を提供してくれることが期待できるものの、現在サルには悪性腫瘍モデルはない。この大きな理由はマウスと較べて世代時間が長いため、化学・放射線発癌誘導法は実用的ではなく、胚性幹(ES)細胞を用いたトランスジェニックもしくはノックアウト法による疾患モデル作出技術も開発されていないためである。本研究ではサルを用いて特に造血器悪性腫瘍モデルを作出することを第一の目的とする。さらに第二の目的として将来的に悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルを作出することを最終目的に、サルES細胞を用いたノックイン法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発を行う。

B. 研究方法

- 平成19年度中にbcr/abl融合遺伝子を発現するよう設計したレンチウイルスベクターを大腿骨髄内に直接注入することによって造血細胞にbcr/abl遺伝子を導入したコモンマーモセットを用いて、末梢血単核球中のbcr/abl遺伝子の発現状態を解析した(n=2)。
- bcr/ablおよびmll/enlのそれぞれの白血病関連融合遺伝子の下流にVenusタンパク質を発現するよう新たに設計したbcr/abl遺伝子およびmll/enl遺伝子の発現VSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターを作成し、さらにbcr/abl発現ベクターのみ接種する群(n=2)およびbcr/ablとmll/enlの両遺伝子発現ベクターを同時に接種する群(n=2)を設け、免疫学的に未成熟である幼弱マーモセットの大腿骨中にウイルス液を直接注入することで、各遺伝子の導入を図った。さらに、接種後2週毎に末梢血を採取して単核球を回収し、bcr/abl遺伝子およびmll/enl遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と施設内動物実験に関する指針「東京大学動物実験マニュアル」のつとり委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

- 処置を行ったうちの1頭においてbcr/abl遺伝子が持続的に末梢血単核球中で発現する事を確認した。その後、同個体の容態が悪化したため、サクリファイズをして各組織におけるbcr/abl遺伝子の発現を確認するとともに、組織染色により病理解析を行った。その結果、末梢血および骨髄細胞においてbcr/ablの発現が認められ、また病理解析の結果、骨髄線維症の病態が観察された。この結果を受け、現在レンチウイルスベクターの組み込み部位を明らかにするために、Linear Amplification-mediated PCR (LAM-PCR)を行ってシーケンス解析を進めている。
- 接種直後からすべての個体において導入した遺伝子の発現が確認され、さらに接種から4ヶ月が経過する現在に至るまで明瞭な発現が持続している。

D. 考察

今後はG-CSFを個体に投与して造血幹・前駆細胞を末梢血中に動員し、CD34陽性細胞をFACS法により分取してコロニーアッセイを行い、多分化能を有した造血細胞にそれぞれの白血病細胞が導入されているかを確認するとともに、標識タンパク質として導入したVenusを指標として、リンパ球に導入遺伝子が組み込まれているかについて各種細胞表面抗体を用いながらFACS解析を行う予定である。さらに、免疫抑制剤を用いてそれぞれの白血病関連融合遺伝子導入個体における病態の発症を試みる。また、これら一連のマーモセット個体を用いた研究と平行して、免疫不全マウス(NOGマウス)を用いたex vivoでの遺伝子導入造血幹・前駆細胞の分化能と白血病化についても検討をすることも有効であると考えられる。すなわち、ライフスパンの長いマーモセットと比較してより短期間で白血病の発症をモニターしうる可能性があると考えており、検討を進める予定である。

E. 結論

コモンマーモセット末梢血中に長期間bcr/ablならびにm11/enl遺伝子の存在が長期に確認されたことで、我々が開発した骨髄内直接遺伝子導入法の有用性が再確認された。今後白血病発症を誘導する条件検討が重要であると考えられた。さらにBCR-ABL遺伝子導入コモンマーモセットの1頭に骨髄線維症を発症できたことは本疾患病因を明らかにする上で大変重要な示唆を与えるものと考えられ、今後の分子学的解析が重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Kobayashi S, Tojo A, Ohtomo K. Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Experimental Hematology* 2008;36:1634-1641
2. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi-mediated silencing of p190Bcr-Abl inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190Bcr-Abl-expressing leukemia cells. *Leukemia* 2008;22:1131-1138

2. 学会発表

1. Hui-Jen Tsai, Seiichiro Kobayashi, Kiyoko Itoh, Takaomi Ishida, Kazuo Umezawa, and Arinobu Tojo. Tumor Necrosis Factor- α Contributes to Microenvironmental up-Regulation of NF- κ B Activity in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Implication for a Novel Therapeutic Target. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008; 112: 1912.
2. Tokiko Nagamura-Inoue, Kazuo Ogami, Kazuaki Yokoyama, Kiyoko Izawa, Seiichiro Kobayashi, Shin Nakayama, Ikuo Ishige, Yusuke Inoue, Jun Ooi, Kaoru Uchimaru, Satoshi Takahashi, and Arinobu Tojo. Large Scale Selective *Ex Vivo* Expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells from Peripheral Blood. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008; 112: 2344.
3. Kazuaki Yokoyama, Tokiko Nagamura-Inoue, Shin Nakayama, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Muneori Futami, Seiichiro Kobayashi, and Arinobu Tojo. Imatinib Mesylate Has a Stage-Specific Inhibitory Role in Generation of CD26^{high}CD8⁺ Central Memory T Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008; 112: 3243.
4. 長村-井上登紀子, 尾上和夫, 横山和明, 伊東清子, 石下郁夫, 小林誠一郎, 東條有伸 制御性T細胞の選択的増幅によるGVHD制御法の開発 第70回日本血液学会

5. 横山和明, 長村-井上登紀子, 中山紳, 尾上和夫, 石下郁夫, 二見宗孔, 小林誠一郎 塚田信弘, 大野伸広, 湯地 晃一郎, 大井淳, 高橋聡, 内丸薫, 東條有伸 イマチニブの示す免疫抑制作用の*in vitro*における検証 第70回日本血液学会
6. 室橋道子, 黒田雅彦, 小林誠一郎, 東條有伸, 後藤典子 ヒト乳癌幹細胞株における癌幹細胞の解析 第67回日本癌学会

小型霊長類コモンマーモセット白血球モデル作出に関する研究
コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞の単離に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授
分担研究者 佐々木えりか 実験動物中央研究所・胚性幹細胞生物学・室長

研究要旨

本研究はコモンマーモセット造血を免疫不全マウスにおいて再構築することが可能であるかについて検討を行った。in vitroでの解析の結果、c-kit陽性細胞に多分化能を有した未成熟な細胞が含まれることが強く示唆されたが、一方で同分画をNOGマウスに移植しても生着および長期間の血液細胞産生は観察されなかった。また、CD34陽性細胞を移植することで、移植個体に病態が生じることからマウスやヒトの場合と異なり、マーモセットのCD34はある程度分化の進んだ成熟リンパ球においても発現していることが示唆された。

A. 研究目的

マーモセットはライフスパンが20年程度有り、他の齧歯類実験動物モデルと比較して著しく長期である。従って、白血病遺伝子の導入に成功した場合においても病態の発症に至る期間は長期間を要することが予想される。一方で、現在では多様な免疫不全マウスが実験使用可であり、異種間の細胞・組織を同マウスに移植した場合、ex vivoでのドナー細胞の分化・増殖がより短期間に起こることが期待できる。この異種間移植モデルは本研究の白血病マーモセットモデルの作出においても極めて有益な情報を提供し得るものと期待されるが、使用可能な抗体の種類が限定されていたこともあり、現在までに造血系をマーモセット由来の細胞で置き換えることに成功した免疫不全マウスモデルは報告されていない。そこで、本研究ではマーモセットの造血幹・前駆細胞を探索することを目的として、多くの種において未分化な造血細胞の膜表面マーカーとして認識されているCD34とc-kitの抗体を用いてマーモセット骨髓細胞を分離し、その分化能をin vitroおよびex vivoにおいて検証した。

B. 研究方法

マーモセットの骨を培養液で灌流することにより骨髓細胞を回収し、さらにLymphoprepを用いた比重分離法により骨髓単核球 (BM-MNC) を分離した。次いで回収したBM-MNCを用いて、蛍光標識したCD34抗体およびc-kit抗体で染色し、FACS法によってCD34+/c-kit+、CD34-/c-kit+、CD34+/c-kit-およびCD34-/c-kit-の4分画に分離した。分離した細胞はコロニーアッセイ法によりin vitroでの分化能を観察するとともに (n=2)、免疫不全マウス (NOGマウス) にそれぞれの細胞分画を 1×10^5 個ずつ静脈中に移植し、ex vivoでの生着および分化能について移植後8週から2週毎に採血を行いFACS法で解析した。さらに移植後15週にマウスを屠殺し血液および臓器におけるマーモセット細胞の存在の有無をPCR法により確認した (n=16)。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては動物実験に関する指針「実験動物中央研究所実験マニュアル」の通り委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

コロニーアッセイの結果、CD34+/c-kit+およびCD34-/c-kit+の表現系を持つBM-MNC分画を培養した場合にCFU-Mixを含む多種のコロニーが多数観察され、この2つの表現系を示すBM-MNC分画中に造血幹・前駆細胞が濃縮されることが示された。一方で、NOGマウスにそれぞれの細胞分画を移植した場合、CD34+/c-kit+ BM-MNCおよびCD34-/c-kit+ BM-MNCを移植したマウスの末梢血からマーモセットCD45陽性細胞が最長で移植後10週まで観察された。一方、移植後12週以降は全移植マウスの末梢血においてマーモセット細胞の存在はFACSレベルで確認されなかった。さらに、c-kitの発現の有無にかかわらずCD34陽性細胞を移植したマウス7匹のうち6匹までが移植10週までに著しい体重の減少と体調の悪化を示し、死亡あるいは早期安楽殺の処置を行った。安楽殺を行った個体のうちCD34+/c-kit+分画移植個体の末梢血ではマーモセットCD3陽性細胞の著しい増加が観察された。死亡あるいは早期安楽殺を行わなかった全個体を移植後15週目に屠殺し、血液および脾臓細胞を用いてFACSとPCR解析を行ったところ、FACSでは両サンプル中にマーモセット由来の血球細胞の存在は検出されず、またPCRレベルでも血液中にマーモセットゲノムの存在は観察されなかったものの脾臓細胞ではマーモセットゲノムの存在が確認された。

D. 結論

in vitroでの解析の結果、c-kit陽性細胞に多分化能を有した未成熟な細胞が含まれることが強く示唆されたが、一方で同分画をNOGマウスに移植しても生着および長期間の血液細胞産生は観察されなかった。また、CD34陽性細胞を移植することで、移植個体に病態が生じることからマウスやヒトの場合と異なり、マーモセットのCD34はある程度分化の進んだ成熟リンパ球においても発現していることが示唆された。今後はソーティングに用いる抗体の種類を増やすことで、移植細胞から免疫系の成熟細胞をあらかじめ完全に除去し、得られた新しい細胞分画の多分化能をin vitroで確認するとともに、多分化能が維持されていることが確認された場合には新たにNOGマウスに移植してex vivoでの生着および血液細胞産生能を評価することが必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hao Chen, Hattori, F., Murata, M., Li, W., Yuasa S., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Sasaki, E., Kimura, K., Hakuno, D., Sano, M., Makino, S., Ogawa, S., and Fukuda, K.
Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. BBRC, 9;369:801-806 (2008)
2. Ikuo Tomioka and Erika Sasaki. Recent progress in reproductive technologies based on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) JOURNAL OF MAMMALIAN OVA RESEARCH Vol.25, 143-149, 2008
3. Kohu K., Yamabe E., Mitsuizawa A., Onda D., Suemizu H., Sasaki E., Tanioka Y., Yagita H., Suzuki D., Kametani Y., Takai T., Toyoda A., Habu S. and Satake M.
Comparison of 30 Immunity-Related Genes from the Common Marmoset with Orthologues from Human and Mouse. Tohoku J. Exp. Med., 215: 167-180, 2008
4. Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, P.A., Sasaki, E., Behr, R.
A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. Hum Reprod. 2009 [Epub ahead of print] Feb 27.
5. Gesine Fleischmann, Thomas Müller, Rüdiger Behr, Rainer Blasczyk, Erika Sasaki, Peter A. Horn
Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line CJES001 depending on feeder cell treatment
Cloning and Stem cells, 2009 in press

2. 学会発表

1. 佐々木えりか、大岩亮、島田亜樹子、上岡智子、花澤喜三郎
コモンマーモセットの非侵襲的採卵法の確立
第55回日本実験動物学会総会、2008
2. 外丸祐介、平川玲子、島田亜樹子、塩澤誠司、佐々木えりか
コモンマーモセット体細胞クローン胚の発生能に影響する要因の検討
第55回日本実験動物学会総会、2008
3. 富岡郁夫、上岡美智子、島田亜樹子、佐々木えりか
コモンマーモセット精子凍結技術の条件検討
第55回日本実験動物学会総会、2008
4. 上岡美智子、佐々木えりか、伊藤豊志雄、谷岡功邦
コモンマーモセットにおける連続採血の影響
第55回日本実験動物学会総会、2008
5. 亀谷美恵、鈴木大介、河府和義、末水洋志、佐々木えりか、伊藤豊志雄、小柳明美、八木田秀夫、佐竹正延、野村達次、垣生園子
コモンマーモセットの免疫系解析ツールの開発
第55回日本実験動物学会総会、2008
6. 島田 亜樹子、大岩 亮、上岡 美智子、横山 円、富岡 郁夫、佐々木 えりか
コモンマーモセットの卵胞刺激に適した卵胞成熟ホルモン (FSH) 製剤の比較検討
第101回日本繁殖生物学会大会、2008
7. 富岡 郁夫、島田 亜樹子、佐々木 えりか
コモンマーモセット卵子体外成熟培地の検討
第101回日本繁殖生物学会大会、2008
8. 佐々木えりか 多次元共同脳科学推進センター キックオフシンポジウム、自然科学研究機構、2008
9. 佐々木えりか 実験動物としてのマーモセットの開発、静岡実験動物研究会、2008

10. 佐々木えりか

マーモセットの発生工学 —トランスジェニックマーモセット作出を目指して—
脳科学研究戦略推進プログラム—分科会・ワークショップ、2008

11. 佐々木 えりか
新しい遺伝子操作技術による疾患モデルの可能性、第3回分子イメージング研究センターシンポジウム、2009
12. ヒト疾患モデルマーモセット作出に向けた基礎研究、脳科学研究推進プロジェクトシンポジウム、2009

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
出願日：2008.12.9
発明の名称：霊長類動物の初期胚への外来遺伝子導入法及び該導入法を含むトランスジェニック霊長類動物を作出する方法
発明者：佐々木 えりか他
出願番号：PCT/JP2008/072732

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
谷憲三朗	がんと免疫の最前線	武藤徹一郎	免疫細胞治療	幻冬舎	東京都	2009	110-119

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
Inoue H, Iga M, Xin M, Asahi S, Nakamura T, Kurita R, Nakayama M, Nakazaki Y, Takayama K, Nakanishi Y, <u>Tani K.</u>	TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model	Cancer Immunol Immunother	57	1399-1411	2008
Inoue H, Iga M, Nabeta H, Yokoo T, Suehiro Y, Okano S, Inoue M, Kinoh H, Katagiri T, Takayama K, Yonemitsu Y, Hasegawa M, Nakamura Y, Nakanishi Y, <u>Tani K.</u>	Non-transmissible Sendai virus encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor is a novel and potent vector system for producing autologous tumor vaccines	Cancer Sci.	99	2315-2326	2008
Kurita R, Oikawa T, Okada M, Yokoo T, Kurihara Y, Honda Y, Kageyama R, Suehiro Y, Okazaki T, Iga M, Miyoshi H, <u>Tani K.</u>	Construction of a high-performance human fetal liver-derived lentiviral cDNA library.	Mol Cell Biochem	319	181-187	2008
Yanagie H, Tanabe T, Sumimoto H, Sugiyama H, Matsuda S, Nonaka Y, Ogiwara N, Sasaki K, <u>Tani K.</u> , Takamoto S, Tkahashi H, Eriguchi M,	Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene to in a pancreatic cancer model.	Biomed Pharmacother	-	in press	2008
Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, <u>Kobayashi S.</u> Tojo A, Ohtomo K.	Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model.	Experimental Hematology	36	1634-1641	2008
Futami M, Hatano T, Soda Y, <u>Kobayashi S.</u> Miyagishi M, Tojo A.	RNAi-mediated silencing of p190Bcr-Abl inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190Bcr-Abl-expressing leukemia cells	Leukemia	22	1131-1138	2008

Hao Chen, Hattori, F., Murata, M., Li, W., Yuasa, S., Onitsuka, Shimoji, K., Ohno, Sasaki, E., Kimura, K., Hakuno, D., Sano, M., Makino, S., Ogawa, S., Fukuda, K.	Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes.	BBRC	9	801-806	2008
Kohu K., Yamabe E., Mtsuzawa A., Onda D., Suemizu H., Sasaki E., Tanioka Y., Yagita H., Suzuki D., Kametani Y., Takai T., Toyoda A., H abu S. and Satake M.	Comparison of 30 Immunity-Related Genes from the Common Marmoset with Orthologues from H uman and Mouse.	Tohoku J. Exp. Med.	215	167-180	2008
Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, PA., Sasaki, E., Behr, R	A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (Callithrix jacchus) exhibiting germ cell-like characteristics.	Hum Reprod	-	in press	2009
谷 憲三郎	コモンマーモセット	最新医学社	64	243-257	2009

TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model

Hiroyuki Inoue · Mutsunori Iga · Meng Xin · Saori Asahi · Takafumi Nakamura · Ryo Kurita · Masaharu Nakayama · Yukoh Nakazaki · Koichi Takayama · Yoichi Nakanishi · Kenzaburo Tani

Received: 24 August 2007 / Accepted: 1 February 2008 / Published online: 20 February 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract

Introduction Transduction of the granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) gene into mouse tumor cells abrogates their tumorigenicity in vivo. Our previous report demonstrated that gene transduction of GM-CSF with either TARC or RANTES chemokines suppressed in vivo tumor formation. In this paper, we examined whether the addition of either recombinant TARC or RANTES proteins to irradiated GM-CSF-transduced tumor vaccine cells enhanced antitumor immunity against established mouse tumor models to examine its future clinical application.

Materials and methods Three million irradiated WEHI3B cells retrovirally transduced with murine GM-CSF cDNA in combination with either recombinant TARC or RANTES were subcutaneously inoculated into syngeneic WEHI3B-preestablished BALB/c mice.

Results Vaccinations were well tolerated. Mice treated with GM-CSF-transduced cells and the chemokines demonstrated significantly longer survival than mice treated with GM-CSF-transduced cells alone. Splenocytes harvested from mice treated with the former vaccines produced higher levels of

IL-4, IL-6, IFN- γ , and TNF- α , suggesting enhanced innate and adaptive immunity. Immunohistochemical analysis of tumor sections after vaccination revealed a more significant contribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to tumor repression in the combined vaccine groups than controls.

Conclusions TARC and RANTES enhance the immunological antitumor effect induced by GM-CSF in mouse WEHI3B tumor models and may be clinically useful.

Keywords Gene therapy · Antitumor immunity · GM-CSF · TARC · RANTES

Abbreviations

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
APCs	Antigen-presenting cells

Introduction

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) matures and differentiates dendritic cells (DCs) into functional antigen-presenting cells (APCs), and enhances their capacity to present tumor-associated antigens, effectively inducing an activation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and augmenting antitumor immunity in mouse tumor models [11, 14, 17, 22, 26, 28, 34, 45]. Therefore, GM-CSF has been postulated to be one of the most potent immunostimulatory cytokine in the initial tumor immune response [7, 41]. However, the detailed molecular mechanism by which GM-CSF induces antitumor immunity is still unknown. In the past decade, clinical

H. Inoue · M. Iga · M. Xin · S. Asahi · T. Nakamura · R. Kurita · M. Nakayama · Y. Nakazaki · K. Tani
Division of Molecular and Clinical Genetics,
Medical Institute of Bioregulation,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

H. Inoue · M. Iga · M. Xin · S. Asahi · T. Nakamura · R. Kurita · M. Nakayama · Y. Nakazaki · K. Tani (✉)
Department of Advanced Cell and Molecular Therapy,
Kyushu University Hospital, Kyushu University,
Fukuoka 812-8582, Japan
e-mail: taniken@bioreg.kyushu-u.ac.jp

H. Inoue · K. Takayama · Y. Nakanishi
Institute of Diseases of the Chest,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

trials have shown that autologous GM-CSF-transduced tumor vaccines are feasible, safe, and effective therapies in melanoma [8, 40], renal cell carcinoma (RCC) [38, 44], prostate cancer [19, 39], and non-small cell lung cancer [12, 35]. Our previous clinical studies showed that GM-CSF-transduced tumor vaccines activated acquired immunity, indicated by skewed repertoires of the T cell receptor V β chain variables at tumors sites and delayed-type hypersensitivity at vaccination sites with eosinophil infiltration [44]. In spite of these positive immunological findings, the clinical benefits of this therapy alone are insufficient, and additional techniques are required to enhance GM-CSF gene therapy.

We previously analyzed gene expression profiles on temporarily transplanted tumor masses *in vivo* by serial analysis of gene expression (SAGE) to identify key molecules involved in this antitumor effect [29]. Our results revealed different gene expression levels between the parental and GM-CSF-transduced tumors and identified several molecules involved in the immune response. Among 20 candidate genes, we focused on the chemokine genes of TARC (thymus and activation-regulated chemokine, CCL17) and RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted, CCL5) [25], which were highly expressed in GM-CSF-transduced tumors. TARC is produced mainly by DCs and specifically chemottracts Th2 T cells and DCs by binding to the CCR4 surface receptor expressed on Th2 T cells and DCs [16, 36]. RANTES is a CCL5 CC chemokine that is generated by various blood cells including DCs, and binds to the CCR1, CCR3, and CCR5 receptors. As CCR5 is expressed on Th1 cells as well as on macrophages, NK cells and immature DC, RANTES is categorized as both a Th1 cell recruitment mediator and a Th2 cell mediator by activating eosinophils and basophils through CCR3 [9, 20]. Our previous report demonstrated that co-transduction of GM-CSF and TARC/RANTES genes into tumor cells cooperatively inhibited tumor formation *in vivo* [29]. In this study, we examined whether the therapeutic antitumor effects of irradiated GM-CSF-transduced WEHI3B cells were enhanced by either TARC or RANTES in mouse WEHI3B tumor models to examine its future clinical application.

Materials and methods

Mice

Six- to seven-week-old female BALB/c immunocompetent mice and BALB/c severe combined immunodeficiency (SCID) mice were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Experiments were started with mice 7–8

weeks of age. All animal experiments were approved and performed according to the Guidelines of the Animal Ethics Committees of Kyushu University, Fukuoka, Japan. All animal experiments were performed at least twice to confirm results.

Tumor cells

WEHI3B cells, a murine myelomonocytic leukemia cell line obtained from Dr. D. Metcalf (University of Melbourne), were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI 1640 medium (Gibco BRL, NY, US) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics/antimycotics (Gibco BRL). RENCA cells, derived from a spontaneous renal cell carcinoma in a syngeneic BALB/c mouse, were kindly provided by Dr. Miyuki Azuma (Tokyo Medical and Dental University).

Establishment of GM-CSF-producing WEHI3B cells

Recombinant GM-CSF-transduced WEHI3B cell clones were established as previously described. Briefly, the cCRIP-MFG murine GM-CSF retrovirus producing cell line kindly provided by Richard Mulligan [7] was used to produce recombinant retroviruses; isolated retroviral supernatants were then co-cultivated with WEHI3B cells for 5 days. A single clone, producing high levels of GM-CSF (144 ng/24 h/10⁶ cells), as measured by ELISA (BD Pharmingen, NJ, US), was obtained by limiting dilution and designated as WEHI3B/GM-CSF (W/GM).

Preparation of tumor vaccine cells and quantification of their cytokine production before and after irradiation

Using an established mouse skin cDNA library, we PCR amplified the chemokine cDNAs using specific primers for murine TARC and RANTES as previously described. These cDNAs were subcloned into the pCR4Blunt TOPO sequencing plasmid (Invitrogen, CA, US) to confirm cloning of the full-length cDNA sequences by nucleotide sequencing. These chemokine cDNAs were then subcloned into a retroviral vector (pMXneo). The recombinant pMXneo vectors were transduced using Lipofectamine (Invitrogen) into the Phoenix A retroviral packaging line, kindly provided by Dr. Toshio Kitamura (The University of Tokyo). Retroviral supernatants (viral solution) were harvested after 2 days of culture. W/GM cells (1 × 10⁶) were then suspended and incubated in 1 ml of viral solution at 37°C for 1 h. After centrifugation, W/GM cells were cultured for two additional days in fresh medium. The medium was replaced with selective medium containing G418 (400 µg/ml) for an additional 7 days. Chemokine-transduced clones were selected by limiting dilution in selective

medium. Cells producing high levels of chemokines were screened by ELISA (R&D systems, MN, US). Clonal W/GM cells containing TARC and RANTES were designated, respectively, as W/GM + T and W/GM + R.

Cloned cells W/GM, W/GM + T and W/GM + R were irradiated at 50 Gy using ^{137}Cs source gamma cell 40 (Atomic Energy of Canada Limited, Ontario, Canada). These irradiated cells were then incubated for 24 h, suspended in 300 μl HBSS (Hank's Buffer Salt Solution; Gibco BRL, NY, US) to 1×10^7 cells/ml, and inoculated subcutaneously (s.c.) into the left flank of mice as a tumor vaccine. The murine GM-CSF, TARC, and RANTES production levels *in vitro* were measured using the ELISA kits described above.

Tumor vaccination and tumor rechallenge

On the day of tumor challenge, 1×10^5 WEHI3B cells preliminarily cultured *in vitro* for 1–2 weeks were washed twice in PBS and injected s.c. into the right flank of immunocompetent BALB/c mice ($n = 7$ or 8/group), and the tumor volume was measured twice a week until the end of this experiment. As a treatment, 3×10^6 WEHI3B tumor vaccine cells resuspended in 300 μl HBSS, were injected subcutaneously into the left flank 3 days after tumor challenge then every 4 days for four treatments. The treatment groups included HBSS only, irradiated WEHI3B cells (irW), irradiated W/GM-CSF cells (irW/GM), irradiated W/GM + T cells (irW/GM + T), or irradiated W/GM + R cells (irW/GM + R). In the TARC and RANTES dose escalation study, 20, 60 and 200 ng of recombinant murine TARC (rmTARC) (R&D Systems, MN, US) or 50, 75, 100 and 150 ng of recombinant murine RANTES (rmRANTES) (R&D Systems, MN, US) mixed with 3×10^6 irW/GM cells, irW/GM cells alone, or 100 μl of HBSS were injected s.c. into the left flank of mice on days 3, 6, 9 and 12 after inoculation of 1×10^5 WEHI3B cells into the right flank of BALB/c mice. The products of perpendicular tumor diameters were calculated, plotted, and shown as the mean values and SEM (Bars). Survival was also monitored in WEHI3B-bearing mice and analyzed by a Kaplan–Meier curve. Two bisecting diameters of each tumor were measured with calipers. The tumor volume was calculated using the formula $V = 0.4ab^2$ with “a” as the larger diameter and “b” as the smaller diameter. Changes in tumor growth were monitored twice a week. Mice that responded and completely rejected the tumor with therapy were rechallenged on day 60 with an s.c. injection of 1×10^5 WEHI3B cells into the right flank and monitored in the same fashion. Mice with tumor burdens greater than 2,000 mm^3 were killed and excluded from data for ethical reasons. The serum concentrations of murine TARC and RANTES were measured by ELISA as described above.

CTL assay

Splenocytes were prepared from euthanized tumor-bearing mice 8 days after the fourth tumor vaccinations (s.c. injection in the left flank of 3.0×10^6 irW, irW/GM, irW/GM + rmTARC 200 ng or irW/GM + rmRANTES 75 ng cells), and were depleted of erythrocytes with ammonium chloride. For CTL induction, splenocytes devoid of erythrocytes (4×10^6 cells/well) were co-cultured with mitomycin C-treated WEHI3B cells at a ratio of 10:1 in 1 ml of T cell culture medium (RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, antibiotics, and 50 μM 2-ME) in 24-well plates at 37°C in 5% CO_2 . Two days later, 30 U of recombinant human IL-2 (PeproTech EC, London, U.K.) was added to each well in 500 μl fresh culture medium. Splenocytes including CTLs were harvested on day 6 and used as effector cells in a standard 5 h ^{51}Cr release assay to examine the antitumor cytolytic activity [37]. Briefly, WEHI3B cells as a target tumor and RENCA cells as a nonspecific target (1×10^6 cells) were labeled with 100 μCi of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (PerkinElmer, Boston, MA, US) in 200 μl of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS for 90 min at 37°C. After three washes with PBS, the labeled target cells (1×10^4 cells/well) were incubated with the effector cells for 5 h at 37°C in 96-well round bottomed microtiter plates in 200 μl of T cell medium at the indicated E:T ratios. The plates were then centrifuged at 500 rpm for 5 min, and the radioactivity of the supernatants was measured with a γ counter, Auto Well Gamma System (ALOKA, Tokyo, Japan). The maximum release and spontaneous release were determined from samples incubated with 1% Triton X-100 or medium alone, respectively. Cytolytic activity was calculated using the following formula: percentage of specific ^{51}Cr release = (experimental release – spontaneous release) \times 100/(maximum release – spontaneous release). Assays were performed in triplicate. The spontaneous release in all assays was <20% of the maximum release.

Mouse IFN- γ and IL-4 ELISPOT

In the course of tumor vaccination as described above, splenocytes from WEHI3B-bearing mice at 5 days after the fourth tumor vaccinations (s.c. injection in the left flank of HBSS, 3×10^6 irW/GM, irW/GM + rmTARC 200 ng or irW/GM + rmRANTES 75 ng cells) were tested for secretion of mouse IFN- γ and IL-4 using an ELISPOT assay kit (Cytokine ELISPOT Set, BD Pharmingen, NJ, US). ImmunoSpot™ ELISPOT 96-well plates were coated with 5 μl /ml of purified anti-mouse IFN- γ or anti-mouse IL-4 monoclonal antibody and incubated overnight at 4°C. Wells were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated for 2 h with blocking buffer (RPMI 1640 with 10%

FBS) at room temperature. RBC depleted splenocytes (1×10^5) were incubated in the presence or absence of irradiated WEHI3B cells at the indicated splenocyte:WEHI3B cell ratios (100:1, 50:1) in a total volume of 200 μ l at 37°C with 5% CO₂ for 20 h. As a positive control, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate 20 ng/ml; Sigma, St Louis, MO, US), known as mitogen for T cell stimulation, was added to the indicated wells. After the plates were washed, the wells were incubated with 2 μ l/ml of biotinylated anti-mouse IFN- γ or anti-mouse IL-4 monoclonal antibody for 2 h at room temperature. Then the plates were washed extensively and streptavidin-HRP solution was added for 1 h at room temperature. After washing the plates twice, Final Substrate Solution (AEC Substrate mixed with AEC Chromogen, BD Pharmingen, NJ, US) was added and spot development was monitored for about 5 min at room temperature. After drying, color spots indicating IFN- γ or IL-4-secreting cells were counted manually under a dissecting microscope and expressed as the mean number of spots+SD of quadruplicate determinations.

CBA and ELISA assay to quantitate mouse IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , and IFN- γ production by splenocytes

In a similar fashion to ELISPOT, RBC depleted splenocytes (5×10^6) harvested from mice after the fourth vaccination were incubated in the presence or absence of irradiated WEHI3B cells at a 10:1 ratio in a total volume of 1.0 ml at 37°C for 20 h, and then culture supernatants were collected. The concentrations of mouse IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α and IFN- γ in the supernatants were measured by the BD Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA (Cytometric Bead Array) Kit (BD Pharmingen, NJ, US) according to the manufacturer's protocol. The concentration of IL-6 was measured using a mouse IL-6 immunoassay kit (R&D Systems, MN, US) following the manufacturer's instructions.

NK cell depletion in vivo

NK cells were depleted from BALB/c SCID mice by peritoneal injection of 200 μ l rabbit anti-asialo GM₁ antiserum (freeze-dried anti-serum diluted 1:20 in PBS; Wako, Osaka, Japan), at 1 day before, and 7 and 14 days after tumor inoculation. As with the therapeutic protocol for immunocompetent BALB/c, indicated tumor vaccines were injected subcutaneously into the left flank a total of four times, once on every fourth day, starting 3 days after the tumor challenge (ten mice per group). Tumor growth and survival rates were assessed. Our previous results following the same experimental conditions confirmed NK cells elimination by the absence of splenocyte cytotoxic activity against YAC-1 cells (ATCC) in a standard ⁵¹Cr release assay [30].

Immunohistochemistry

Five days after the fourth tumor vaccinations (s.c. injection in the left flank of 3×10^6 irW, irW/GM, irW/GM + rmTARC 200 ng or irW/GM + rmRANTES 75 ng cells), implanted tumor tissues ($n = 4$ /group) were snap frozen by overlaying with OCT compound (Sakura Fine Technical Co., Tokyo, Japan) and stored at -80°C until analysis. Serial cryostat (8 μ m) frozen sections were adhered to Superfrost glass slides (Matsunami, Osaka, Japan), fixed in acetone at room temperature for 10 min, air-dried, and rinsed in distilled water to remove embedding medium. Staining was conducted following standard procedures. Briefly, sections were sequentially incubated overnight at 4°C with appropriately diluted primary antibodies, mouse CD4(GK1.5), CD8(53-6.7), CD11c(N418) (DCs), FoxP3(FJK-16s) (Tregs), CD45R/B220(RA3-6B2) (B cells), F4/80(BM8) (macrophages), and Ly-6G/Gr-1(RB6-8C5) (granulocytes) (all from eBioscience, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions, followed by a 1-h incubation with biotinylated anti-rat or anti-hamster secondary Abs (eBioscience). After a 30-min incubation with streptavidin-peroxidase (Dako Japan Co. Ltd., Kyoto, Japan), Ag-Ab reactions were developed using 3, 3'-diaminobenzidine (Nakalai tesque, Kyoto, Japan) as a substrate. Slides were washed three times with PBS between each incubation step. Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin and dehydrated in sequentially degraded alcohol and xylene prior to mounting. All incubations were conducted in a humidified chamber. Photographs were taken with a Zeiss Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, NY, US). The stained cells were counted microscopically at 100 \times magnification in 10–30 high-power fields. Results are presented as the means \pm SD.

Flow cytometric analysis of helper T cells (Th1/Th2 balance) in the tumor and spleen

Five days after the fourth tumor vaccination (s.c. injection in the left flank of 3×10^6 irW, irW/GM, irW/GM + rmTARC 200 ng, or irW/GM + rmRANTES 75 ng), single cell suspensions of primary tumor and splenocytes were obtained from vaccinated mice ($n = 3$ /group). Splenocytes and tumor cells were homogenized by mincing and filtered through a 70 μ m cell strainer (BD Labware, NJ, US). The homogenized tumor was then digested with collagenase IV (GIBCO) in RPMI 1640 for 90 min at 37°C with continuous stirring. The splenocytes and tumor infiltrating cells (TILs) were then isolated from tumor cells/erythrocytes by centrifuging the cell suspension on a Lympholyte M gradient (CEDAR-LANE, Ontario, Canada) following the manufacturer's protocol. The resulting single cell suspensions were washed twice with 1% FBS in PBS and stained for flow cytometry. Splenocytes and TILs were stimulated with PMA (40 ng/ml)

(Sigma) and ionomycin (1 µg/ml) (Sigma) for 5 h. Two hours before harvesting, the cells were treated with brefeldin A (50 µg/ml, eBioscience) to retain cytoplasmic cytokines. After washing twice in a fluorescent antibody buffer (FAB) consisting of 0.1% bovine serum albumin and 0.02% sodium azide in 0.01 M PBS (pH 7.2), cells were pretreated with FcR (CD16/32) block followed by an APC-conjugated anti-CD4 mAb for 30 min. Subsequently, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and then stained intracellularly with FITC-conjugated IFN-γ and PE-conjugated IL-4 mAb in permeabilization buffer (eBioscience) for 1 h at room temperature. All mAbs were purchased from eBioscience. Stained cells were washed three times in FAB and analyzed by multi-parameter flow cytometry using a Becton Dickinson FACS Calibur (San Jose, CA). Dead cells were excluded by the FSC/SCC profiles. Surface marker profiles were analyzed using CELLQUEST Software (Becton Dickinson) and the percentages of positive cells were determined.

Statistical analysis

Except for the animal survival data, statistical analyses were performed using Student's *t* tests. The *P* values were obtained from two-tailed tests of statistical significance. A Kaplan–Meier curve was used to analyze survival rates, and the statistical relevance was determined using a log-rank comparison. A probability value was considered significant when *P* < 0.05.

Results

In vivo antitumor effect of irradiated WEHI3B cells producing GM-CSF plus either murine TARC or murine RANTES

We previously reported that mice inoculated s.c. with non-irradiated WEHI3B cells transduced with GM-CSF

plus TARC or RANTES exhibited a significantly better survival rate than mice injected with GM-CSF-transduced WEHI3B cells [29]. In this study, the hypothesis whether irW/GM + T or irW/GM + R provided additional antitumor immunity compared to irW/GM was examined. Prior to vaccination, the production of murine GM-CSF, TARC and RANTES from WEHI3B, W/GM, W/GM + T and W/GM + R cells before and 24 h after irradiation was compared to evaluate the influence of irradiation on the production of transduced cytokine genes. There were no striking differences in cytokine production before and after irradiation (Table 1). A total of 1×10^5 of parental WEHI3B cells were injected subcutaneously into the right flank of immunocompetent BALB/c mice. On day 3, 3×10^6 each of irW, irW/GM, irW/GM + T and irW/GM + R were injected s.c. into the left flank of mice every 4 days for four treatments and monitored periodically for 60 days (Fig. 1). At day 27, posttumor inoculation irW/GM significantly inhibited tumor growth compared to irW (*P* < 0.05). irW/GM + T and irW/GM + R induced a slightly better, although not statistically significant, antitumor effect compared with those induced by irW/GM. Interestingly, the irW/GM + T group had significantly better survival than irW/GM alone (*P* < 0.05). On day 60 postinoculation, some mice in each therapeutic group had completely rejected tumor formation. In the irW/GM + T group, five of the seven mice rejected the tumor development and showed a longer survival compared with that of both the irW/GM and irW/GM + R groups. Furthermore, when rechallenged with 1×10^5 parental WEHI3B cells s.c. into the right flank, three of the five irW/GM + T-treated mice that rejected the original WEHI3B tumor, also rejected the second WEHI3B challenge. In contrast, mice treated with either irW/GM or irW/GM + R rejecting the primary tumor challenge died within 25 days after the rechallenge of WEHI3B cells (Table 2).

Table 1 Comparison of cytokine production levels in retrovirally indicated gene transduced WEHI3B cells between before and 24 h after irradiation

Transfectant cells	Amounts of respective cytokines secreted by indicated transfectant cells			
	WEHI3B	W/GM	W/GM + T	W/GM + R
GM-CSF (before)	0	142.47 ± 0.97	104.42 ± 1.35	97.36 ± 12.01
(After)	0	28.42 ± 0.31	47.53 ± 1.62	35.92 ± 0.76
TARC (before)	0	0	6.07 ± 0.12	0
(After)	0	0	6.41 ± 0.35	0
RANTES (before)	0	0	0.259 ± 0.01	18.31 ± 0.14
(After)	0	0	0	28.49 ± 0.43

The amount of cytokine secreted by indicated transfectant cells were measured by ELISA. Each value is mean ± SD of culture supernatant measurements (per 10^6 cells/24 h)

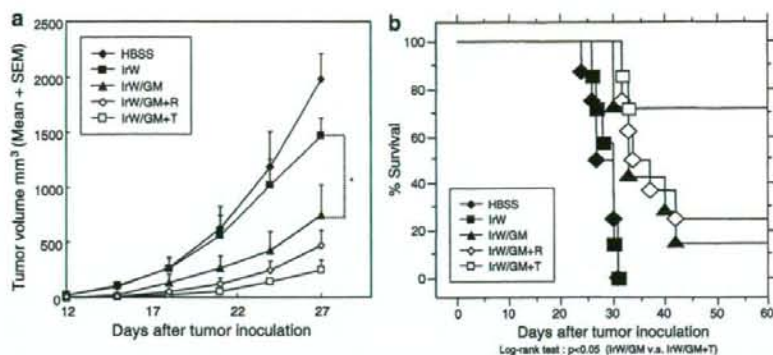


Fig. 1 Therapeutic antitumor effects of irW/GM, irW/GM + T, or irW/GM + R cells on preestablished tumors. A total of 1×10^5 WEHI3B cells were inoculated s.c. into the right flank of BALB/c mice on day 0. Next, 3×10^6 irW, irW/GM, irW/GM + T, or irW/GM + R cells or 100 μ l of HBSS were injected s.c. into the left flank of mice on

days 3, 6, 9 and 12. The products of perpendicular tumor diameters were calculated and plotted. The mean products and SEM (bars) are depicted (a). Kaplan–Meier analyses of WEHI3B-bearing mice are shown (b) (* $P < 0.05$). Data are representative of two independent experiments, with similar results

Table 2 Antitumor effects induced by s.c. injection of irW/GM, irW/GM + T, and irW/GM + R

Vaccination groups	Challenged mice	Rejected mice (%) ^a	Re-rejected mice ^d
HBSS	8	0 (0) ^b	–
IrW	8	0 (0)	–
IrW/GM	7	1 (14.3) ^c	1
IrW/GM + T	7	5 (71.4) ^c	3
IrW/GM + R	8	2 (25.0)	0

^a Assessed at day 60 after tumor inoculation

^b Parenthesis shows % of mice that rejected the WEHI3B challenge

^c χ^2 test: $P < 0.05$

^d Assessed at day 60 after WEHI3B rechallenge

Both recombinant murine TARC and RANTES enhanced the antitumor effects of irW/GM in mice with established tumors

We then conducted a dose escalation test of rmTARC or rmRANTES mixed with irW/GM cells against pre-established tumors to determine the appropriate dose of TARC or RANTES to enhance the antitumor effect of irW/GM. Three days after the injection of 1×10^6 WEHI3B cells, 3×10^6 irW/GM cells containing either rmTARC (20, 60, 200 ng/mouse) or rmRANTES (50, 75, 100, 150 ng/mouse) were s.c. inoculated into the left flank every 4 days for four treatments, and tumor growth and survival rate were monitored. On day 26, mice treated with irW/GM + rmTARC suppressed WEHI3B growth in an rmTARC dose dependent manner, with a significant additional antitumor effect compared to irW/GM vaccinated mice ($P < 0.05$) (Fig. 2a). Mice vaccinated with irW/GM + rmTARC at 60 ng and especially 200 ng rmTARC had significantly prolonged

survival compared to control mice vaccinated with or without irW/GM, all of which died within 37 days ($P < 0.05$) (Fig. 2c). Furthermore, 1, 2 and 4 mice vaccinated, respectively, with irW/GM + rmTARC 20, 60 and 200 ng completely rejected tumor formation (Table 3). On day 26, the mice vaccinated with irW/GM + rmRANTES 75 ng suppressed WEHI3B growth most significantly among the rmRANTES treated mice, and three mice completely eradicated their tumors. In contrast, none of the eight mice treated with HBSS or irW/GM rejected tumor challenge. Mice vaccinated with irW/GM + rmRANTES 50, 75, and 100 ng, had significantly prolonged survival compared with control mice vaccinated with or without irW/GM ($P < 0.05$) (Fig. 2d). Interestingly, a rmRANTES dose of 75 ng per mouse was the optimal dose that promoted antitumor immunity. Moreover, four of eight and three of seven mice vaccinated with irW/GM + rmTARC 200 ng and irW/GM + rmRANTES 75 ng, respectively, were rechallenged as described above, and two of four, and two of three respective mice with rejected tumors survived for more than 60 additional days without tumors (Table 3). The serum concentrations of murine TARC 4 h ($2,338.55 \pm 168.01$ pg/ml) and murine RANTES 2 h (713.99 ± 118.04 pg/ml) after s.c. tumor vaccination with irW/GM + rmTARC 200 ng and irW/GM + rmRANTES 75 ng, respectively, were measured by ELISA. During the vaccinations, mice were well tolerated without any major adverse events.

Splenocytes from mice vaccinated with irW/GM in combination with either rmTARC or rmRANTES had enhanced antitumor cytotoxicity in vitro

To investigate the mechanism underlying the enhanced specific antitumor immunity by TARC and RANTES, we