

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4834291号
(P4834291)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00
A 61 K	35/12	(2006.01)	A 61 K	35/12
A 61 P	35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00
A 61 P	35/02	(2006.01)	A 61 P	35/02
A 61 P	43/00	(2006.01)	A 61 P	43/00

107

請求項の数 8 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-568067 (P2003-568067)
(86) (22) 出願日	平成15年2月17日 (2003.2.17)
(65) 公表番号	特表2005-517404 (P2005-517404A)
(43) 公表日	平成17年6月16日 (2005.6.16)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2003/000515
(87) 國際公開番号	W02003/068952
(87) 國際公開日	平成15年8月21日 (2003.8.21)
審査請求日	平成16年11月2日 (2004.11.2)
審判番号	不服2007-27576 (P2007-27576/J1)
審判請求日	平成19年10月9日 (2007.10.9)
(31) 優先権主張番号	10-2002-0008272
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002.2.15)
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)

(73) 特許権者	307044518 インダストリー・アカデミック コオペレーション ファウンデーション, ザ カソリック ユニバーシティー オブ コーリア 大韓民国 137-701, ソウル, セオチョンギ, バンボードン 505
(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
(74) 代理人	100135208 弁理士 大杉 順也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 STAT3活性化幹細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

STAT3-Cを導入した造血幹細胞。

【請求項 2】

STAT3-Cを導入していない親細胞の多能性を維持しながら、生体外（培養）(in vitro)における増殖能力が向上した請求項 1 の造血幹細胞。

【請求項 3】

STAT3-Cタンパク質が細胞内に導入されている請求項 1 又は 2 の造血幹細胞。

【請求項 4】

STAT3-C遺伝子が細胞内に導入されている請求項 1 又は 2 の造血幹細胞。

10

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか一の造血幹細胞を増殖させることを含む造血幹細胞集団を増大させる方法。

【請求項 6】

細胞集団が以下の何れか一から選ばれる請求項 5 の方法：

- 1) 細胞集団が生体外 (ex vivo) である、
- 2) 細胞集団が生体外 (培養) (in vitro) である。

【請求項 7】

STAT3-Cを発現する細胞を造血幹細胞と共に培養することを含む請求項 5 又は 6 の何れか一の方法。

20

【請求項 8】

骨髄細胞を損失した患者に投与することを特徴とする請求項 1 の造血幹細胞を含む治療組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(発明の背景)

1. 発明の分野**【0002】**

本発明は修飾幹細胞に関する。本発明は、また生体外(培養)(in-vitro)における幹細胞増大を目的とした、幹細胞の修飾方法にも関する。本発明は、さらに生体内(in-vivo)での自己複製と幹細胞増殖とを増強する方法にも関する。本発明はさらに、修飾幹細胞を使った組織の再生にも関する。

10

【背景技術】**【0003】**

2. 技術の全般的背景と現状

【0004】

幹細胞療法は、多数の難治性疾患に対する医学的介入への新たなアプローチである。成人型幹細胞と胚性幹細胞の2種類の幹細胞が、組織の再生に使用できる。成人型幹細胞には臍帯血幹細胞、骨髄由来幹細胞、臍臓幹細胞、肝臓幹細胞が含まれ、与えられた組織から得られる細胞数は非常に限られている。

20

【0005】

多能性の成人型幹細胞は、自己複製の能力を持ち、複数の細胞系譜分化を行なう。しかし、このような成人型幹細胞の、特に造血幹細胞の、自己複製および増大を調節する分子レベルのメカニズムは解明されつつある。

【0006】

造血幹細胞は、生体内(in-vivo)および生体外(培養)(in-vitro)における増殖能力と多能性における異質性に最も特徴のある成人型幹細胞の1つである。

【0007】

最も初期の未分化状態の造血幹細胞は、自己複製能力を有し、照射されたレシピエントに移植後、長期間にわたり複数系譜への再増殖を起こす。これらの細胞は、CRU(競合的再構築ユニット)として移植モデルにおいて同定され、定義されている(Larochelle 1996)。

30

【0008】

造血作用に関与する別のクラスの前駆細胞は、脾臓コロニー(CFU-S:コロニー形成単位・脾臓)の形成能力から査定され、脾臓コロニーは、さらに分化した表現型と短期間再構築能力を有している。

【0009】

これらの多能性幹細胞による幹細胞療法の最適化を制限する要因が1つあり、それは、非常に分化されやすく、幹細胞の特性をすぐに失い、操作後実質的に幹細胞数が減少してしまうことである。サイトカイン補助による生体外培養(ex vivo culture)、または幹細胞増殖の調節に関する遺伝子修飾など、これらの幹細胞を増大させる方法が試みられてきた。しかし、生体外培養は、細胞数を実質的に増加させても、さらに分化した表現型の幹細胞を生ずる傾向にある(Danet 2001, Dorrel 2000, Xu 2001)。

40

【0010】

これらの制限を回避するために、幹細胞活性の種々の増加の割合を有する、成長因子受容体または形質導入因子など、幹細胞の遺伝的修飾を行なうことにより、数種の方法が実施された(Hanazono 2002, Sauvageau 1995)。

【0011】

幹細胞分化の最近の研究では、成人幹細胞は非推定型組織と、推定型組織両方への分化

50

能力を有することが示された。例えば、造血幹細胞は、造血リンパ骨髓系譜と同様に、神経細胞、肝細胞、腎細胞、心筋細胞、血管組織へも分化することができる (Eglitis 1997, Poulsome 2001, Lagasse 2000, Orlic 2000)。

【0012】

STAT3は、IL-6ファミリー成長因子、およびgp-130受容体ファミリーを活性化することによりトリガーされた1個のシグナル伝達分子である。この分子は、N末端近くのDNA結合ドメイン、SH2ドメイン、C末端近くのトランス活性化ドメインから構成される。

【0013】

JAK2キナーゼは、gp-130受容体からのシグナルを受け取ると、活性化され、続いてSTAT3のチロシン残基をリン酸化する。STAT3は、引き続き標的遺伝子をさらに活性化させるために、二量化および核局在化を行なう。10

【0014】

近年、数個のアミノ酸残基をシステイン残基と置換することで(STAT3-Cと呼ばれる)、STAT3活性が構成的に活性化され、その結果、ジスルフィド結合が形成され、チロシンリン酸化またはセリンリン酸化が不在でもこの分子を二量化できることが、明らかとなつた(Bromberg 1999)。

【0015】

STAT3遺伝子の機能的ノックアウトにより、胚性幹細胞の自己複製および分化が失われること、さらに胚性幹細胞の未分化表現型を維持するためにSTAT3機能が必要であることがわかった(Matsuda 1999, Niwa 1998)。20

【0016】

しかし、胚性幹細胞の移植によって、新たに骨髄が再構築されることはないので、成人造血幹細胞を調節する分子メカニズムが、胚性幹細胞に類似することはほとんどなく、成人造血幹細胞に対するこれらのメカニズムは実体のないものである。

【0017】

優性阻害型STAT3が過剰発現すると、遺伝的修飾造血幹細胞によって骨髄再構築が抑制されることが最近報告され、それ故、STAT3活性が、成人造血幹細胞に特有である、移植幹細胞の生体内増殖に必要なメカニズムであることが初めて確認された(Oh, 2002)。

【0018】

しかし、この研究では、野生型STAT3遺伝子の過剰発現は、幹細胞の骨髄再構築への活性に影響を与えたかった。その結果、その文献は、STAT3の遺伝子操作によって幹細胞が増大されることを開示も、示唆もしていないかった。30

【0019】

米国特許No. 6,235,873(特許文献1)は、STAT3の変異体(STAT3-C)が、細胞中でSTAT3タンパク質の二量化を促進することを明らかにした。STAT3-CはSH2ドメインの中に、タンパク質のC末端にある2個のシステイン残基を含んでいる。しかし、この'873特許では、幹細胞とこれに関連する前駆細胞、および再生作用に対するこれら細胞の機能的調節を、明らかにしていないし、また示唆をしていない。

【0020】

MatsudaらはEMBO Journal, 18, 15, 4261-4269 (1999)(非特許文献1)で、STAT3の活性化がマウス胚性幹細胞の未分化状態を維持するのに十分であることを明らかにしている。Niwaらは、Genes & Development, 12, 13, 2048-2060 (1998)(非特許文献2)において、多能性胚性幹細胞の自己複製はSTAT3の活性化によって仲介されることを見出した。これらの論文では、胚性幹細胞が未分化状態を維持する時のSTAT3の役割を述べている。STAT3の優性阻害型(STAT3-F)とSTAT3の誘発型(STAT3-ER)を使って、胚性幹細胞が未分化表現型を維持するためにSTAT3活性が必要であることを示した。しかし、これらの論文は、活性型STAT3がSTAT3活性を操作前の状態以上に増大させることを、見出すことも示唆することにも成功していない。さらに、これらの論文は、成人幹細胞や造血幹細胞のような一次幹細胞の利用や、組織生体内再生中の活性増大について一切明らかにすることも、示唆することもしていない。40

【0021】

Oh et al., Oncogene Jul 18; 21(31): 4778-87 (2002) (非特許文献3) では、優性阻害型STAT3の過剰発現によって、造血幹細胞の再構築作用を抑えることを見出した。しかし、野生型STAT3の過剰発現は、これらの幹細胞に影響を与えない。それ故、この論文は、幹細胞活性の活性型STAT3による増強を、明らかにすることも、示唆することもしていない。

【0022】

本出願は、活性型STAT3 (STAT3-Cで例示) の外因性発現によって、自己複製および再生能力が増加した幹細胞の実質的増大が起こることを記載する。

【特許文献1】米国特許No. 6,235,873

10

【非特許文献1】Matsuda et al., EMBO Journal, 18, 15, 4261-4269 (1999)

【非特許文献2】Niwa et al., Genes & Development, 12, 13, 2048-2060 (1998)

【非特許文献3】Oh et al., Oncogene Jul 18; 21(31): 4778-87 (2002)

【発明の開示】

【0023】

(発明の要旨)

本発明の1つの実施態様は、幹細胞の自己複製と生体内 (in vivo) / 生体外 (培養) (in vitro) 増殖を促進させ、その結果組織や器官の再生を高める方法を対象としている。幹細胞中のSTAT3活性を増大させると、未分化幹細胞数が増えると共に幹細胞は自己複製能力を高め、再生作用を増強する。

20

【0024】

幹細胞に活性型STAT3遺伝子 (STAT3-Cで例示) を導入するか、そのタンパク質 (His-TAT-STAT3-C融合タンパク質で例示) を取込むことによりSTAT3活性を増加させると、幹細胞に同様の効果を発揮し、増殖と再生作用が高まった。

【0025】

それ故、幹細胞増大と再生機能の増強は、遺伝子療法またはタンパク質療法のいずれかによって実現可能である。

【0026】

幹細胞増殖能力の上述の増加は、活性型STAT3 (STAT3-Cで例示) を発現させる間葉性幹細胞支持細胞層と共に幹細胞を培養することによっても、達成された。

30

【0027】

増大および再生機能の増加は、生体外培養 (in vitro cultivation) 中と生体内再生中の両方で起こり、幹細胞の生体外 (ex-vivo) 増幅が可能となり、前述の方法で修飾した特定幹細胞集団の生体内再生および / または選択的増殖を増強する方法も可能となる。

【0028】

好ましい実施形態において、幹細胞は造血幹細胞である。より具体的な実施形態において、造血幹細胞には、細胞表面マーカーであるCD34またはc-kitを発現するヒト造血幹細胞であり、さらに、肝臓、心臓、腎臓、または神経組織などの非造血組織に分化する造血幹細胞も含まれる。

【0029】

40

別な実施態様において、STAT3活性を増加することにより幹細胞活性を増強させ、さらにSTAT3活性の調節を目的とした薬理学的介入や天然リガンドを使用して、幹細胞の増殖および再生作用を操作できる。

【0030】

そのため、本発明は、幹細胞を操作して、STAT3活性の調節を目的とした複数のアプローチにより、幹細胞の自己複製と増大を増加させる方法を対象としている。

【0031】

本発明は、活性型STAT3を含む修飾幹細胞を対象としている。修飾幹細胞は、未修飾の親細胞の多能な特性を維持しながら、生体外 (培養) (in vitro) 増殖活性を増加されることもある。さらに、修飾幹細胞は造血幹細胞でもある。修飾幹細胞は、非造血細胞と造

50

血細胞に分化し得る多能性幹細胞でもある。細胞は哺乳類の幹細胞、好ましくはヒト幹細胞であり、必要なら臍帯血から得てもよい。さらに、STAT3はSTAT3-Cであってもよい。

【0032】

本発明は、上述の修飾幹細胞を対象としており、構成的に活性化されたSTAT3のタンパク質生成物が、タンパク質の導入によって細胞に送達される。

【0033】

本発明は、活性型STAT3遺伝子で細胞に形質導入することを含む、上述の修飾幹細胞の作製方法を対象としている。上述方法において、STAT3遺伝子はSTAT3-C遺伝子のことであり、修飾幹細胞は細胞にSTAT3ポリペプチドを送達することにより作製されることができる。この方法では、STAT3はSTAT3-Cである。

10

【0034】

本発明は、上記修飾幹細胞を増殖させることを含めた、幹細胞集団の増幅方法も対象としている。細胞集団は生体外(ex-vivo)、生体内(in-vivo)または生体外(培養)(in-vitro)の状態でもよい。この方法はさらに、幹細胞を化学物質と接触させ、STAT3活性を増加させることを含む場合もある。1つの実施態様において、化学物質はSTAT3を二量化する化合物またはSTAT3の二量化変異体であってもよい。別の実施態様において、本方法は、活性化STAT3を発現させる細胞を幹細胞集団と共に培養させることを含んでもよい。

【0035】

本発明は、対象への移植後の細胞生着を促進させる方法を対象としており、必要に応じて上記修飾幹細胞を必要とする対象への該細胞を投与することを含む。別の実施態様において、本発明は、対象の組織再生方法を対象としており、上記修飾幹細胞を必要な対象への投与を含む。

20

【0036】

さらに別な実施態様において、本発明は、骨髄細胞欠損患者の骨髄を回復させる方法を対象としており、必要に応じて上記修飾幹細胞の対象への投与を含む。

【0037】

本発明に対するこれらの目的およびその他の目的は、以下に記載する本発明の説明、添付された参照図、および本文書に添えられた請求項から十分に理解されるだろう。

【0038】

(図面の簡単な説明)

30

本発明は、以下に記載する本発明の詳細な説明と、説明のためのみに示した添付図面、つまり本発明に限定されない、から十分に理解されるだろう。その図面についてここで説明する；

【0039】

図1は、様々な段階の造血幹細胞に対するSTAT3活性の影響を研究するための実験方法を図解したものである。Ly5.2(C57BL6)表面マーカーを持つドナー細胞を、5-FUで4日間前処理することにより前駆細胞を豊富にさせ、骨髄細胞を回収した。この細胞は様々な変異STATを宿すウイルスに前もって刺激されて感染しており、照射レシピエント(Pep3b: 表面マーカー Ly5.1)に移植し、レシピエントの骨髄に生着し再構築する能力をアッセイした。同時に、形質導入された細胞分取部は、移植後12日に脾臓コロニー(CFU-S)を形成する能力を期待して、レシピエントに移植するか、またはメチルセルロースプレート上のコロニー形成能力を期待して、メチルセルロースプレートで培養した。

40

【0040】

図2は、優性阻害STAT3(dnSTAT3)または活性化STAT3(STAT3-C)に対するレトロウイルスコンストラクトの概略図である。各cDNAは、レトロウイルスベクターであるMIG(MSCV-IRES-GFP)にクローニングされ、そこで、各cDNAは、IRES(内部リボソーム侵入部位)を持つGFPに結合され、両遺伝子が同時発現するため、各遺伝子の発現がGFP遺伝子の発現によってモニターされる。

【0041】

図3Aは、造血幹細胞中のSTAT3活性の変化が及ぼす、生着および生体内骨髄再生への

50

影響を示している。5-FUで処理した骨髄細胞から得た造血幹細胞に、dn-STAT3またはSTAT3-Cをエンコードするレトロウイルス(MIG)をコントロールベクターと共に形質導入し、照射レシピエントに移植した。各ウイルスコンストラクトの遺伝子転移効率は85-90%であった。移植後、種々の時点において、Ly5.2(ドナー細胞)のパーセントおよびGFP(形質導入のみ細胞)のパーセントを分析して、レシピエントの末梢血をドナー細胞の生着とSTAT3活性変化の影響について分析した。この図で示されているように、STAT3活性が減少した細胞(dn-STAT3)の生着と再構築は対照群に比べて低下するが、STAT3活性が増加した細胞(STAT3-C)は生体内再生を顕著に増強している。

【0042】

図3Bは、STAT3-C形質導入細胞の複数系譜への分化を示している。ドナー由来のSTAT3-C形質導入細胞のリンパおよび骨髄系譜への分化を、Bリンパ(B220抗体)および骨髄(Mac-1/Gr-1抗体)細胞用表面マーカーを使って分析した。図で示すように、STAT3-C形質導入造血幹細胞は、特殊な系譜に逸脱することなく骨髄およびリンパ系譜へも分化能力を保持している。これらのデータは、図3-Aで示した生着の増加が、特別な系譜の選択的な増殖ではなく、むしろ複数系譜への分化能力を有する幹細胞レベルの増加によるものであることを示している。

【0043】

図4は、造血前駆細胞の他段階でのSTAT3活性増大の効果を示している。dn-STAT3、STAT3-C、または、コントロールベクターを形質導入した骨髄細胞を、CFU-S測定用に12日目に照射マウスに移植するか、コロニー発生CFCアッセイ用にメチルセルロースの半固体培地で培養した。図に示すように、各ウイルスコンストラクトによって形質導入されたCFU-SまたはCFCに有意な変化は見られなかった。これらのデータは、STAT3-Cまたはdn-STAT3の発現によって、さらに下流領域段階で造血細胞は影響を受けずに、初期の移植可能な幹細胞活性が選択的に調節されることを示している。

【0044】

図5Aと5Bは、生体外(ex-vivo)増大または生体内(in-vivo)再生増強に対する造血幹細胞のタンパク質療法の概略図である。活性化STAT3のタンパク質生成物(STAT3-Cがここでは例示される)を、タンパク質導入ドメイン(HIVのTAT配列によって)および6個のヒスチジン残基に融合させた。このキメラタンパク質は、細胞膜を通過し、細胞に送達され、その細胞中のSTAT3活性の増加をもたらす。さらに、このタンパク質を哺乳動物体内に注入すると、同様に幹細胞中のSTAT3活性を増加させる効果が現れた。図5Bは、タンパク質を発現させるベクターコンストラクトを示す。

【0045】

図6は、自己複製と幹細胞の生体内(in-vivo)増大の定量を示している。試験細胞をSTAT3-Cで形質導入し、3種類の異なる細胞用量で少なくとも6匹の照射レシピエントに移植した。これらの移植マウスにおけるドナー細胞の再構築を評価した。37%の試験動物で生着されない細胞用量(リンパおよび骨髄細胞中ドナ-細胞が1%未満)を、1CRU(競合的再構築ユニット)とした。一次レシピエントの骨髄を移植後36週で再び収集し、用量が限界投与量(37%未満の動物に生着されない)に達するまで連続希釈後、二次レシピエントに移植し、一次レシピエントに移植された総CRU数と、一次マウスから二次マウスに移植されたCRU数を算出する。

【0046】

図7は、幹細胞を、STAT3-C、dn-STAT3、またはMIGベクターコントロールで形質導入した間葉系幹細胞と共に培養する効果を示している。骨髄から得た間葉系幹細胞にdn-STAT3、STAT3-C、MIGを形質導入した。形質導入後、陽性GFP(各レトロウイルスベクターにより形質導入された)を分別しプレートで培養した。5-FU処理した動物から得た骨髄前駆細胞を、これらの間葉系幹細胞と共に培養し、5日間培養を続けた。各細胞群を照射マウスに移植し、移植3週間後、ドナー細胞の再構築パーセントを、ドナー細胞に特異的なマーカー(Ly5.2)上でFACSによって分析した。図に示すように、STAT3-Cで形質導入した間葉系幹細胞中に培養した間葉系幹細胞は、移植3週間後、生体内生着が顕著に増加した。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】**【0047】**

本発明において、“a”や“an”は単数および複数の両方の対象物を示すのに用いられる。

【0048】

本発明および同一に使用する方法を説明する前に、本発明は、例示されている特定細胞タイプ、STAT3-C遺伝子あるいは方法に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用している用語は、特定の実施形態を説明する目的のためであり、それらに限定されるものではない。

【0049】

10

(定義)

【0050】

本明細書で使用する「活性化STAT3」とは、幹細胞の増殖能力が増大するようなSTAT3への多様な修飾を意味する。そのような活性化はSTAT3の二量化によって起こることもある。別法には、STAT3のリン酸化が含まれる。例えば、STAT3は、チロシン(705残基)とセリン残基(723残基)で活性化の際、リン酸化される。ある種のホスファターゼは、非常に急速に脱リン酸化することも知られている。このように、このSTAT3特異的ホスファターゼを抑制すると、STAT3活性を増加させる可能性がある。STAT3を活性化させる他の方法として、STAT3活性化に対する負の調節因子を抑制する化学物質を、細胞に接触させる方法を含んでもよい。例えば、SOCSファミリー遺伝子(SOCS-1からSOCS-6)がSTATの負の調節に役割を果たしていることが示唆される。そのため、SOCS遺伝子ファミリーを抑制するとSTAT3を活性化させる可能性がある。

20

【0051】

本明細書で使用している「アミノ酸(単数および複数)」とは、すべて天然に存在するL-アミノ酸である。この定義は、ノルロイシン、オルニチンおよびホモシステインを含むことを意味している。

【0052】

30

本明細書で全般的に使用している、「アミノ酸配列変異型」とは、基準となるポリペプチド(例えば天然型配列)と比較して、一部のアミノ酸配列が異なる分子を指している。アミノ酸変異とは、天然アミノ酸配列における、置換、挿入、欠失、あるいはこれらの望ましい組み合わせを示すこともある。

【0053】

置換による変異型とは、天然配列から少なくとも1個のアミノ酸残基を取り去り、同じ部位の同じ場所に異なるアミノ酸を挿入したものである。置換は、分子中で1個のアミノ酸だけが置換される1置換、または、同じ分子中で2個以上のアミノ酸が置換される複数置換を示す場合がある。

【0054】

40

配列内でのアミノ酸に対する置換基は、そのアミノ酸が属しているクラスの他のアミノ酸から選択される場合もある。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正電荷(塩基)アミノ酸には、アルギニン、リジン、ヒスチジンが含まれる。負電荷(酸性)アミノ酸にはアスパラギン酸とグルタミン酸が含まれる。本発明の範囲内に含まれるのは、同一または類似の生物学的活性を示す、タンパク質またはフラグメント、あるいはそれらの誘導体、および翻訳中または翻訳後に、異なる修飾、例えば、グルコシル化、タンパク質分解による開裂、抗体分子または他の細胞性リガンドなどとの結合などにより修飾を受ける誘導体である。

【0055】

挿入による変異型とは、天然アミノ酸配列中、特定位置のアミノ酸に隣接して1つ以上のアミノ酸を挿入したものである。アミノ酸に隣接するとは、アミノ酸の-カルボキシ

50

ル基またはアミノ基のいずれかに結合するという意味である。

【0056】

欠失による変異型とは、天然アミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸を取り去ったものである。通常、欠失による変異型は、分子の特定領域から1個または2個のアミノ酸を取り去っている。

【0057】

1つの実施態様において、本発明のSTAT3変異型に含まれる、アミノ酸数、またはポリペプチド領域やSTAT3コード遺伝子における置換、および／または、挿入、および／または、欠失などによるSTAT3のアミノ酸の変化数は、いずれの個数にもなる可能性があり、その場合、変異型STAT3は活性化され、活性化STAT3または活性化STAT3コード遺伝子を宿す幹細胞の増殖能力を促進する。変異型STAT3タンパク質またはDNAは、既知STAT3配列のポリペプチドまたはDNA配列と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%一致する配列を含んでいることがある。10

【0058】

本明細書において、「キャリア」とは、使用した投与形態と濃度で細胞または哺乳動物に無毒性である、薬理学的に許容されるキャリア、賦形剤または安定剤のことである。薬理学的に許容されるキャリアとは、多くの場合、水溶性pH緩衝液を示す。薬理学的に許容されるキャリアの例には、制限はなく、リン酸、クエン酸、他の有機酸などの緩衝液、アルコルビン酸のような抗酸化剤、低分子量（残基約10個未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンのようなアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンなどの单糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤、マンニトール、またはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成対イオン；および／またはTween（登録商標）、ポリエチレン glycole (PEG)、およびPLURONICS（登録商標）などの非イオン性表面活性剤などが含まれる。20

【0059】

本明細書で、「共有結合誘導」には、STAT3またはそのフラグメントのような天然タンパク質の有機タンパク質性、または非タンパク質性誘導化剤による修飾など、および翻訳後の修飾が含まれる。STAT3の活性化は、共有結合による修飾が好ましい。そのような活性化はSTAT3の二量化によって起こることもある。別 の方法にはリン酸化がある。共有結合による修飾は、標的アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導化剤と反応させるか、または選択した組換えホスト細胞中で機能する翻訳後の修飾機序を持たせることによって、典型的には導入されている。翻訳後のある種の修飾は、発現されたポリペプチド上における組換えホスト細胞の作用結果である。30

【0060】

本明細書で、「有効量」とは、有益なまたは好ましい臨床結果や生化学的結果をもたらすのに十分な量である。有効量は1回以上投与可能である。本発明の目的としての有効量とは、STAT3を活性化する化合物の量、または幹細胞の増殖能力増強に必要な活性化STAT3の量である。さらに別な実施形態において、「有効量」とは、組織再生に有効な活性化幹細胞の量として定義される。40

【0061】

この明細書で「ホスト細胞」とは、本発明ベクターのレシピエントになり得るか、すでになっている、個々の細胞または細胞培養のことである。ホスト細胞は、ホスト細胞1個の子孫を含み、その子孫は、自然的、偶発的、意図的な変異および／または変化が起こるため、元の親細胞と（形態学的に、または総DNA補体において）完全に一致する必要はないかもしれない。ホスト細胞は、血管形成因子をコードするポリペプチドを含むベクターによって、形質移入または生体内感染した細胞も含む。

【0062】

本明細書で、治療を目的とする「哺乳動物」とは、イヌ、ネコ、畜牛、馬、羊、豚、な50

どのヒト、家畜、動物園用、スポーツ用、ペット動物を含む哺乳類に分類されるすべての動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0063】

本明細書で「精製された」または「単離された」分子とは、自然環境から除かれ、単離または分離され、その分子が自然界で関連している他の要素を含まない、生物学的分子のことである。

【0064】

本明細書で「サンプル」または「生体サンプル」とは、最も広い解釈を意味し、実施される検査のタイプによって、個体、体液、細胞株、組織培養、幹細胞または他のソースから得たあらゆる生物学的サンプルを含むこともある。

10

【0065】

本明細書で「配列同一性」とは、その配列を比較し、ギャップ導入後、天然ポリペプチド配列中と同一のアミノ酸残基が候補配列中に存在するパーセントを意味し、必要なら、最大パーセントの配列同一性を達成させ、配列同一性の一部として従来の置換は考慮しない。配列同一性値%は、Altschul et al. (1997)の論文“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a newgeneration of protein database search programs”, Nucleic Acids Res., 25: 3 389-3402によって定義されているように、NCBIBLAST 2.0ソフトウェアによって算出される。パラメータは、ミスマッチのペナルティを-1にセットした以外は、初期設定値にセットされる。

【0066】

20

本明細書で「対象」とは、脊椎動物のことであり、好ましくは、哺乳類であり、さらに好ましくはヒトである。

【0067】

本明細書で「治療」とは、有益または望ましい臨床結果を得る方法である。本発明の目的において、有益または望ましい臨床結果には、症状の緩和、疾病的程度の軽減、疾病的安定状態（例えば悪化の停止）、疾病進行の遅延または減速、疾病状態の改善または緩和、および寛解（部分的または全体）などが、検出、非検出にかかわらず含まれるが、これだけに限定されない。「治療」は、治療を受けない場合の予想生存に比べて、生存を長くすることも意味する。「治療」は、療法による治療と、予防的対策の両方を指している。治療が必要な対象には、すでに障害を持つ者および障害を予防されるべき者を含む。疾病を「緩和」するとは、疾症状状の広範囲および／または望ましくない臨床的発現が減少すること、および／または進行の経時変化が、未治療状況に比べ減速するか延びることである。通常、「治療」では、活性化または修飾された幹細胞を患者に投与し、組織を再生させることを、必然的に意味する。

30

【0068】

本明細書で「ベクター」、「ポリヌクレオチドベクター」、「コンストラクト」、および「ポリヌクレオチドコンストラクト」の用語は、区別なく同様に用いられる。本発明のポリヌクレオチドベクターは、RNA、DNA、レトロウイルス被膜上で被包されているRNA、アデノウイルス被膜で被包されているDNA、別のウイルスまたはウイルス様形態（単純疱疹、アデノ随伴ウイルス（AAV））で包まれているDNA、リボソームで被包されているDNA、さらに、ポリリジン、合成ポリカチオン性分子、ポリエチレンギリコール（PEG）のような化合物と複合体を形成するDNAなどのよう、数種の形態をとるが、これらの形態に限定されず、免疫学的に分子を「マスク」し、および／または半減期を増加し、または非ウイルス性タンパク質と複合体形成する。好ましくは、ポリヌクレオチドは、DNAである。本明細書で使用する、「DNA」とは、A(アデニン)、T(チミン)、C(シトシン)、G(グアニン)だけでなく、それらのアナログのすべてまたはメチル化ヌクレオチドのようなこれら塩基の修飾型、無電荷結合およびチオエートのようなヌクレオチド内部の修飾型、糖アナログの使用、およびポリアミドのような修飾されたおよび／または代替え骨格構造も含む。

40

【0069】

50

この明細書で使用する「幹細胞」とは、複数系譜分化および自己複製能力と組織再生能力を持つ細胞を意味する。幹細胞は、本発明の応用において、大部分は造血幹細胞について説明しているが、本発明は、それだけに限定されず、他に起源を持つ幹細胞も含まれ、肝臓、脾臓、神経、およ骨髓間葉系幹細胞などを含むこともあるが、それだけに限定されない。

【0070】

この明細書で使用する「生着」および「生体内再生 (in vivo regeneration)」とは、生物学的現象を意味し、その現象として、埋め込みまたは移植された幹細胞は、体内で幹細胞自身と分化された細胞子孫を生成し、および / または損失または損傷した細胞を注入された細胞と交換する。

10

【0071】

この明細書で使用する「CRU (競合的再構築ユニット)」とは、長期間生着している幹細胞を測定するユニットを意味し、生体内移植後に検出することができる。

【0072】

本明細書で使用する「修飾幹細胞」または「活性化幹細胞」とは、外因性遺伝物質が細胞にすでに挿入され、場合によっては、そのゲノムと、細胞に送達された外因性タンパク質生成物内に取込まれる幹細胞を意味する。

【0073】

(幹細胞)

【0074】

20

幹細胞は体内の他種類の細胞とは異なる。すべての幹細胞は、その源に関わらず、3つの一般的性質を有している：当該細胞は、長期間その細胞自身を分裂および複製できること；特定化されること；および特定の細胞タイプを生み出すこと。長期間の自己複製に関連して、胚性幹細胞は実験室で、1年以上も分化することなく増殖するが、多くの成人幹細胞では不可能である。

【0075】

幹細胞は、複数のサイトカインを含む培地で頻繁に培養してきた。しかし、これらの技法は有核細胞の正味の総数増加に導く一方、生体外 (ex-vivo) で増大した幹細胞が分化し、幹細胞の性質を失うことが、多数の実験で観察してきた (Danet 2001, Dorrel 2000, Xu 2001)。培養中の幹細胞量のこの損失理由は、非対称細胞分裂に一部起因している可能性があり、その分裂では、未分化幹細胞はより多くの分化した娘細胞子孫を生成する。さらに、細胞表面の遺伝子型は、生体外 (ex-vivo) 培養処理中に変化する。例えば、CD34+CD38-細胞集団に比べてより分化された集団を表すCD34+38+細胞は、CD38発現を喪失しているためCD34+CD38-細胞の表現型をとり、そのため、表現型に似た原始CD34+CD38-細胞の増大が起こるが、生体内 (in-vivo) 再構成の範囲を反映した移植可能な幹細胞の実質的な増加はない (Dorrel 2000)。

30

【0076】

これらの分化による幹細胞喪失の結果、幹細胞移植による生着および生体内 (in-vivo) 再構築が減少する。

【0077】

40

これらの試験では、臨床グレードの増大用バイオリアクターで培養したヒトCD34+細胞を含み、移植可能幹細胞の正味の損失が観察された。

【0078】

造血原始幹細胞に関する標準的な試験では、照射後骨髄細胞の再生能力を持つCRU (競合的再構築ユニット) を示した (Larochelle 1996)。

【0079】

CRUは、自己複製において確立論的挙動が起こることを示したが、サイトカイン混合物と特定の組み合わせによると、他のサイトカイン状態よりも自己複製の確立が高くなる傾向が示された (Zandstra 1997)。この観察結果は、分子操作に基づいて造血幹細胞の自己複製と生体外 (ex-vivo) 増大に導く、ある種のシグナルが存在することを示唆してい

50

る。しかし、自己複製についても、原始造血幹細胞の無分化状態の維持についても、その分子メカニズムは殆ど知られていない。

【0080】

STAT3は、胚性幹細胞の未分化状態維持に必要であることがわかっているが、胚性幹細胞と成人造血細胞との間に大きな違いがある。第一に、胚性幹細胞はリンパ・骨髄の再構築を伴う骨髄再生を行なわず、このことは、胚性幹細胞と成人造血幹細胞が2つの別なクラスの幹細胞であることを示す。第二に、胚性幹細胞の分子環境は成人造血幹細胞と異なっている。例えば、胚性幹細胞の最も特徴的なマーカーは、段階特異性抗原(SSEA)と転写因子Oct-4の発現であり、これらの両遺伝子とも成人造血幹細胞では発現されない(我々のデータ)。それ故、造血幹細胞が生着し、複数系譜の分化を伴い骨髄を再構成する分子メカニズムは、造血幹細胞に特異的な状況であり、他のいずれの細胞タイプにも見られない。

10

【0081】

最近、ヒト骨髄原始細胞集団におけるSTAT3の発現レベルは、分化した前駆細胞群のより下流ステージで見られるレベルよりも、さらに高いレベルに維持されることが発見された。さらに、優性阻害型STAT3のレトロウイルス発現が、外因性STAT3活性化経路を阻害するが、ネズミの胎児肝臓から得た移植幹細胞の再構築能力を明らかに抑制することが発見された。

【0082】

本出願は、一次造血幹細胞の生着およびレシピエント骨髄の再構築能力が、STAT3活性によって直接調節されることを示し、さらに本発明の出願人は、一次造血細胞の増殖・再構築能力が、STAT3活性の増加によって有意に増強されることを明らかにした。

20

【0083】

それ故、幹細胞の挙動が確立論的方法で調節されるという古典的な見方と異なり、この発明で、幹細胞の挙動は、細胞中のSTAT3活性を操作することにより改変可能であることが発見された。このことは、1) 遺伝的修飾、2) 活性型STAT3のタンパク質転移、あるいは3) STAT3遺伝子生成物の分子活性を変化させる薬理学的介入によって達成される。

【0084】

以下で述べる遺伝子治療を考慮することが望ましい場合、これらの方針を使用すると、一次幹細胞は、生体外(*in vitro*)培養中または生体内(*in vivo*)再生中に増大され、幹細胞移植効率の正味の増加、および特定の細胞サブセットの選択的増幅が起こる。

30

【0085】

(幹細胞による生体内再生の増強)

【0086】

自家移植用の造血幹細胞は、直接形質導入または各種ウイルスベクターによるSTAT3-C遺伝子を転移させるため、吸引または流動により対象から取り出してもよい。

【0087】

患者が化学療法または放射線療法を受けた後、修飾幹細胞を体内に再注入すると、修飾幹細胞は、生着と骨髄再構築を促進させ、形成不全時期を短縮させ、その結果移植による死亡率を低下させる。

40

【0088】

別法として、取り出した幹細胞を、タンパク質導入ドメインを有するSTAT3-Cタンパク質を含む培地でインキュベーションし、対象に再注入する。細胞に送達された活性型STAT3のタンパク質は、細胞が持つ骨髄中の自己複製と再構築能力を増加させる。我々の研究では、TAT-STAT3-Cタンパク質転移タンパク質は、TAT-GFPタンパク質のみにより転移された対照群に比べ、高い再構築能力(2~5倍)を有すことを示している。それ故、この方法は、STAT3活性を標的としたタンパク質療法によって幹細胞の再生容量を増強するために、うまく使用できる。

【0089】

さらに、タンパク質は対象に直接注入しもよく、そこでタンパク質は幹細胞に送達され

50

るので、生体内 (in vivo) 再生活性を達成する。

【0090】

(特定幹細胞集団の選択的増大)

【0091】

サセラミアのような体細胞変異、あるいは先天的代謝疾患に起因する遺伝的疾患に罹患している患者では、すべての系譜を生産する幹細胞を対象から取り出し、遺伝的修正が実施される。これらの細胞が体内に再導入される場合、遺伝的に修正された細胞は、非修正細胞と比べて個別な利点は何もなく、治療的再構成効果はこれら 2 群間の競合によって減少する。

【0092】

10

しかし、本発明方法を使用すると、遺伝子組み換えした特定幹細胞は、さらに修飾され、活性型STAT3を発現し、続いてこれらの修飾細胞は、非修飾幹細胞よりも個別の利点を有し、その結果、遺伝的修正細胞の正味容量が増加する。

【0093】

(化学的二量化剤による生体内幹細胞増殖の誘発的増大)

【0094】

STAT3活性は、幹細胞再生に対する直接の調節因子である。従って、幹細胞の挙動が誘発される可能性がある。STAT3とFKBPの結合タンパク質間の融合遺伝子を作製するか、DNAジャイレースBドメインを二量化すると (Brino, 2000)、STAT3が誘発され、FK1012またはcoumermycinA1のような化学物質共存下で二量化が起こる可能性がある。STAT3を含む融合遺伝子によって幹細胞が形質導入され、ドメインが二量化された後、幹細胞は対象に再融合される。対象をFK1012やcoumermycinA1のような二量化剤で処理すると、キメラSTAT3タンパク質は二量化され、修飾幹細胞のみに増殖作用を發揮する。化学二量化剤不在下では、二量化されず、よってSTAT3の促進効果は減退する。この方法で、生体内移植幹細胞の幹細胞活性は、二量化剤の外因的投与によって制御することができる。

20

【0095】

生体内増大と幹細胞特性の維持

【0096】

多数の幹細胞は、対象から取り出された後、生体外 (培養) で修飾する必要がある。このような状況では、幹細胞の全体量を増加させるため、幹細胞の生体外 (ex vivo) 増大が含まれる。さらに、幹細胞は、遺伝的修飾あるいは化学的処理により、機能的变化を達成し、そしてウイルスベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理、またはサイトカインによる遺伝子転移などの生体外 (ex vivo) 操作に供されることがよくある。これらの過程で、幹細胞は容易にその幹細胞特性を失い、またその数も減少する。ここで、タンパク質導入ドメインに融合された活性化STAT3 (STAT3-Cを例示) のタンパク質生成物を使用すると、その細胞の自己複製と再生能力をうまく維持させることができる。別法として、STAT3活性を増加させる化学物質または天然リガンドを、前述の目的のために使用する場合もある。

30

【0097】

別の実施形態において、本発明は骨髄に混入した腫瘍細胞の除去を対象としている。癌または白血病患者は、通常、骨髄細胞に有害な化学療法または放射線療法を必要とする。骨髄細胞は、後の再融合用に取り出され、抗癌治療が適用される。治療の合間に、混入腫瘍細胞は、正常幹細胞上での表面マーカーの選択、あるいは、細胞毒性、放射性化学物質によって取り除かれる。この工程中に、前述の方法を採用して幹細胞をうまく維持することができ、タンパク質導入または分子活性を増加させる化学的処理によって、幹細胞中のSTAT3活性を増加させる。

40

【0098】

(遺伝子療法)

【0099】

特定の実施形態において、STAT3ポリペプチドをコードする配列を含む核酸を投与し、

50

幹細胞を活性化させるが、それは遺伝子療法の目的で幹細胞の増殖および組織の再生に使用され得る。遺伝子療法とは、発現または発現可能な核酸を、対象に投与することにより実施される治療法を意味する。本発明のこの実施形態において、核酸は治療効果を仲介するコードタンパク質を生成する。

【0100】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療方法はいずれも、本発明に従って使用することができる。方法の例を以下に説明する。

【0101】

遺伝子治療法の一般的な概要は、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); WuおよびWu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); および、MorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5): 15 5-215 (1993)の論文を参照されたい。当技術分野で使用可能な一般的に知られている組換えDNA法は、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。10

【0102】

好ましい実施形態において、核酸配列が、STAT3ポリペプチドをコード化する場合があり、そこでは、核酸配列は、適切なホスト中でそのポリペプチドを発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸配列は、ポリペプチドのコード領域に操作可能な結合している操作可能なプロモーターを有し、当該プロモーターは、誘発されるか構成的であり、任意に組織特異的である。別の特定実施形態において、核酸分子を使用し、そこで、ポリペプチドコード配列および他のいざれか望ましい配列を、ゲノム中の望ましい部位で相同組換えが促進される領域に隣接させ、その結果STAT3コード化核酸の内部染色体発現が提供される。20

【0103】

患者への核酸の送達は、直接的、この場合患者は核酸または核酸運搬ベクターに直接暴露される、あるいは間接的、この場合は細胞はまず生体外（培養）（*in vitro*）で核酸により転移され、続いて患者に移植される、のいざれかであってもよい。これらの2つの方法は、それぞれ生体内または生体外遺伝子療法として知られている。30

【0104】

特定な実施形態において、核酸配列は、直接生体内に投与され、そこで発現されコード化生成物を生成する。これは、当技術分野において知られる多数の方法によって達成されることができる。例えば、適切な核酸発現ベクターの一部として構築して投与しその結果細胞内に入れる方法、欠損もしくは減弱したレトロウイルス、または他のウイルスベクターで感染させる方法、裸のDNAを直接注入するか、脂質もしくは細胞表面受容体、もしくは形質移入剤で被覆する方法、リポソーム、微粒子、もしくはマイクカプセル中に被包する方法、核に侵入すると知られているペプチドに結合させて投与する方法、受容体介在エンドサイトーシスを受けやすいリガンドに結合して投与する方法（WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432(1987)を参照）（受容体を特異的に発現する細胞タイプを標的にするために使用することができる）、などである。別の実施形態において、核酸 - リガンド複合体が形成され、そこでリガンドは融合性ウイルスペプチドを含み、エンドソームを破壊させ、核酸のリソソーム分解を回避させる。また別な実施形態では、核酸は、特異的受容体を標的にすることにより、細胞の特異的取込みおよび発現に対する生体内標的になり得る。あるいは、核酸が細胞内部に導入され、相同組換えによって、発現用にホスト細胞DNA内で取込まれ得る（KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935(1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989)）。40

【0105】

特定な実施形態では、ポリペプチドをコード化する核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。遺伝子療法で使用されるポリペプチドをコード化する核酸配列は、1つ以上50

のベクターにクローン化され、遺伝子の患者への送達を容易にする。レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスは、使用される可能性のあるウイルスベクターの例である。レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しい包み込みおよびホスト細胞DNAへの組み込みに必要な要素を含んでいる。

【0106】

アデノウイルスは、呼吸器上皮細胞の遺伝子送達に関して、特に興味をそそる媒体であるが、その理由は、アデノウイルスが、軽度な疾病の原因となる呼吸器上皮に自然に感染するからである。アデノウイルスベースの送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞を感染できる利点を持っている。さらにアデノ随伴ウイルス（AAV）を、遺伝子療法に使用することも提言されている。10

【0107】

遺伝子療法の別 の方法は、電気穿孔法、リポフェクション、リン酸カルシウム介在形質移入、あるいはウイルス感染のような方法によって、組織培養中の細胞に遺伝子を転移させることを含む。通常、転移方法は、その細胞への選択的なマーカーの転移を含む。細胞は続いて、選択にかけられ、すでに取込んだ細胞を単離し、転移遺伝子を発現することになる。これらの細胞は、続いて患者に送達される。

【0108】

この実施形態では、核酸は、生じる組換え細胞の生体内投与の前に、細胞内に導入される。このような導入は、本技術分野で知られるいかなる方法、形質移入、電気穿孔法、マイクロインジェクション、ウイルスまたは核酸配列を含むバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体介在遺伝子転移、ミクロ細胞介在遺伝子転移、スフェロプラスト融合などによっても実行できるが、これだけに限定されない。レシピエント細胞の必要な発生的および生理的機能が崩壊されない場合は、外来遺伝子の細胞への導入について多数の技術が、本技術分野で知られており、本発明に沿って使用され得る。この技術によって、核酸の細胞への安定な転移がもたらされ、その結果核酸は細胞によって発現可能であり、好ましくは遺伝性であり、その細胞子孫によって発現可能となる。20

【0109】

遺伝子治療の目的で核酸が導入される細胞には、望ましい全てのもの、各種の幹細胞または前駆細胞、例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られた造血幹または前駆細胞が含まれる。30

【0110】

好ましい実施形態では、遺伝子療法に使用する細胞は、患者の細胞であり、同種系ドナー細胞も含まれる。

【0111】

組換え細胞が遺伝子療法に使用される実施形態では、ポリペプチドをコード化する核酸配列が細胞に導入され、その細胞または子孫によって発現され、続いて組換え細胞は治療効果を目指して生体内に投与される。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞が使用される。単離され生体外（培養）で維持されるいかなる幹細胞および／または前駆細胞も、本発明の本実施形態に従って使用することができる。40

【0112】

特定の実施形態では、遺伝子療法を目的とし導入される核酸は、コード領域に結合された操作可能な誘発プロモーターを含み、核酸の発現は、適切な転写インデューサーの有無を制御することにより調節可能である。

【0113】

（治療組成物）

【0114】

治療化合物の剤形は、本技術分野で一般的に知られており、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USAを参照すると便利である。例えば、約0.05 μg/kg体重/日から約20 mg/kg体重/日のSTAT3活性化物質、または活50

活性STAT3遺伝子もしくはタンパク質が投与され得る。治療に対する最適な反応が得られるように、投与方法を調節することが可能である。例えば、数回に分けた用量を毎日投与するか、またはその用量を治療状況の緊急性に応じて減少させることもできる。有効化合物は、経口、静注（水溶性）、筋注、皮下、鼻腔内、皮内、または座薬のような便利の良い方法、あるいは移植（例えば、腹腔内経路による徐放分子によって、または生体外（培養）で感作され、レシピエントに養子性に転移された単球あるいは樹状突起細胞）によって投与することができる。投与経路に依存して、ペプチドは酵素、酸類、および他の当該成分を不活性化させる可能性のある自然条件から保護するために、ある材料で被覆する必要があるかもしれない。

【0115】

10

活性化合物は、非経口あるいは腹膜内投与してもよい。分散液はグリセロール液体ポリエチレングリコール、それらの混合液、および油中に調製することができる。通常の保存および使用条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含んでいる。

【0116】

注入使用に適切な医薬剤形として、滅菌水溶液（水溶性）または分散液、および滅菌注射液または分散液の用事調製用の滅菌粉末が含まれる。常に剤形は滅菌され、容易に注出できる程度の液体でなければならない。剤形は、製造および保存条件下で安定であり、細菌や真菌類のような微生物による汚染作用から保護しなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール、および類似物）、それらの適当な混合液、および植物油を含む、溶媒または分散媒であってよい。適切な流動性は、例えば、レシチン等の被覆剤、分散液の場合、必要な粒子サイズの維持、およびスーパーファクタント（superfactant）の使用により維持することができる。様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、テオマーサル（theomersal）および類似物によって、微生物の作用を防ぐことができる。多くの場合、糖または塩化ナトリウムのような等張剤を含むことが好ましいであろう。注入可能な組成物は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような、吸収遅延剤組成物での使用により長期間吸収させることができる。

【0117】

20

滅菌注射液は、活性化合物の必要量を、上記で列挙した他の色々な成分と共に適切な溶媒に混合して調製し、必要なら滅菌ろ過を引き続き行なう。一般的に、分散液は色々な滅菌活性成分を滅菌媒体に混合して調製し、その媒体は、分散媒基剤および上記で列挙した成分のうち必要な他の成分を含んでいる。滅菌注射液調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および冷凍乾燥技術であり、この乾燥法により、活性成分の粉末に、以前に滅菌ろ過したそれらの溶液の望ましい追加成分が追加されて得られる。

【0118】

30

（送達システム）

【0119】

色々な送達システムが知られており、本発明の化合物を投与するのに用いることができ、例えば、リポソームによるカプセル化、微粒子、微小カプセル、化合物を発現可能な組換え細胞、受容体介在エンドサイトーシス、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などである。導入方法には、皮内、筋内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口などを含むが、これだけに限定されない。化合物または組成物は、すべての便利のよい経路、例えば、輸注またはボーラス注入、上皮または粘膜皮膚内壁（例えば、口内粘膜、腎および腸粘膜など）を介して吸収させることによって、投与でき、他の生物学的活性剤と共に投与してもよい。全身および局所投与ができる。さらに、本発明の薬剤化合物または組成物を、心室内および髄膜内など適切な経路で、中枢神経系に導入することが望ましいかもしれない。心室内注入は、心室内カテーテル、例えば、オマヤ（Ommaya）リザーバーのようなリザーバーが付いたカテーテルによって容易に行なうこ

40

50

とができる。肺への投与は、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアゾール剤の剤形を使用して行なうことができる。

【0120】

特定の実施形態では、本発明の薬剤化合物または組成物を、治療が必要な部分に局所的に投与することが望ましい場合もある；これは、例えば、手術中の局所輸注、局部適用、例えば術後の創傷包帯と併せたもの、注射、カテーテル、座薬、または移植、移植とはシアラスティック(sialastic)膜もしくは繊維などの膜のような、多孔、非多孔、またはゼラチン材質の当該インプラントによって達成することができる。好ましくは、抗体あるいは本発明のペプチドなどタンパク質を投与する場合、タンパク質を吸収しない材料を使用するように注意を払わなければならない。別の実施形態では、化合物または組成物は、小胞体、特にリボソーム中で送達され得る。さらに別な実施形態では、化合物または組成物は、放出制御システムで送達され得る。1つの実施形態では、ポンプを使用してもよい。別の実施形態では、重合物質を使用する場合もある。さらに別な実施形態では、放出制御システムを、治療標的、例えば、脳などの近くに配置することができ、その場合用量は、全身投与量の一部しか必要でない。

10

【0121】

組成物は、その投与がレシピエント動物によって許容され、その動物への投与は適切であれば、「薬理学的または生理学的に受け入れ可能である」と言える。そのような薬剤は、投与量が生理学的に有意である場合、「治療に有効な量」を投与すると言える。薬剤の存在により、レシピエント患者に検出可能な生理的变化が見られる場合、その薬剤は生理学的に有効である。

20

【0122】

本発明は、ここで説明する特定な実施形態の範囲だけに限定されない。事実、この説明に追加された本発明の色々な変更は、前述の説明と添付の図面から、当業者には明らかであろう。このような変更は、付録の請求の範囲内に含むことが意図されている。以下の実施例は、本発明を図解することによって提供されるが、それだけに限定されない。

【実施例】

【0123】

(実施例1 - 材料と方法)

【0124】

30

動物：骨髄ドナーとして使用した遺伝子導入マウスは、8-12 wk Peb3b/C57/BL6(表面マーカー：Ly5.1)であり、レシピエントはC57/BL6(表面マーカー：Ly5.2)である。

【0125】

これらのマウスは、韓国カソリック大学の動物施設の滅菌隔離飼育ケージで滅菌餌と水で飼育された。

【0126】

クローニングとレトロウイルスの生産

【0127】

STAT3-Cは、すでに述べた野生型STAT3 cDNAから出発する部位特異的な変異誘発によって構築された(Bromberg et al. 1999)。優性阻害型STAT3は、Alice Mui博士(British Columbia大学、カナダ)の好意で提供された。これらのcDNAを、複数のクローニング部位中のEcoR1とXho1部位を使用して、MIGベクター内にクローン化した。

40

【0128】

レトロウイルスMIG(MSCV-IRES-GFP)は、ハツカネズミ幹細胞ウイルス(米国赤十字社R. Hawley博士の好意により提供された)からLTRによって誘導される。このベクターの複数クローニング部位は、IRES(内部リボソーム侵入部位)でEGFP(増強緑色蛍光タンパク質、Clontech、CA)に結合され、その結果、クローニング遺伝子の発現は、発現に直結し、従って蛍光によるEGFPによる検出に直結している(図2)。

【0129】

クローニング後、レトロウイルスは、同時形質移入レトロウイルスコンストラクト、ブ

50

ラスミドコード化gag-pol (GP3、Rob Kay博士、Terry Fox Lab、Vancouver、カナダの好意で提供された)、およびリン酸カルシウム形質移入方法による293 T細胞内エンベロープ (VSV-G) に対する同時形質移入プラスミドによって、生産される。形質移入48時間後、ウイルス上澄み液を採取し、超遠心分離器25,000 RPMで1時間濃縮する。濃縮されたウイルス粒子は、GPE-86生成細胞またはPG13細胞を侵入させるために使用し、このように調製したウイルス上澄み液は、硫酸プロタミン (5 µg/ml) 共存下で骨髄細胞を侵入させるために使用した。

【0130】

レトロウイルス形質導入と骨髄移植

【0131】

図1は、色々な造血段階における、造血幹細胞の再生能力を分析するための実験デザインを示す。

10

【0132】

マウスを5-フルオロウラシルで処理し、骨髄細胞を投与後4日間回収した。未分化のこの時点で、前駆細胞は、サイクリング細胞上の5-FU選択的毒性のため豊富である。

【0133】

続いてドナー細胞を、サイトカイン混合物 (トロンボポエチン50ng/ml、flt3-リガンド100ng/ml、スティールファクター (steel factor) 100ng/ml) 共存下、血清不含培養液で48時間前刺激し、引き続き、前刺激と同じ条件下でレトロウイルス粒子によって48時間に3回形質導入し、レシピエントに移植した。

20

【0134】

形質導入したドナー細胞の移植では、レシピエントを照射し (900 rad)、照射24時間以内に移植し、続いて3週間酸性水 (pH3.0) を与えた。

【0135】

移植ドナー細胞による再構築量を、移植後色々な時間にレシピエントの末梢血を用いて定量した。特異抗体を使用して、ドナー細胞の% (レシピエント中の% Ly5.2) をフローサイトメトリー (FACS Caliber、Beckton Dickinson) を用いて算出した。

【0136】

さらに、形質導入した幹細胞を、12日目にメチルセルロースプレート中のCFU-Sコロニー形成アッセイのために同時に移植した。

30

【0137】

(実施例2 - 活性型STAT3による幹細胞活性の増強)

【0138】

骨髄幹細胞におけるSTAT3活性の変化による効果を、優性阻害STAT3 (dn-STAT3) で形質導入したドナー細胞を移植し、コントロールベクター (MIG) で形質導入した細胞と共に活性化STAT3 (STAT3-C) を移植することにより、測定した。

【0139】

50,000個の各入力細胞を、上述の方法で形質導入し、GFPにより評価した遺伝子転移効率は85~90%であった。これらの細胞をレシピエントマウス (Pep3b、Ly5.1) に移植し、骨髄の生着と再構築を、色々な測定時間における、レシピエント末梢血中のGFP陽性細胞を伴うドナー細胞から分析した。

40

【0140】

図3は、骨髄再生における幹細胞活性に対する、各ウイルスコンストラクトの形質導入効果を示している。

【0141】

図3Aに示すように、活性化型STAT3 (STAT3-C) の形質導入の結果、ドナー細胞の生着が、対照群に比べて5~10倍に有意に増加している ($P<0.05$)。STAT3-C形質導入細胞の生体内再構築の増強は、移植後3週間という早期から明らかに開始され、移植ドナー細胞による生着過程を促進する可能性があることを示している。

【0142】

50

興味あることに、STAT3-C形質導入細胞の増加能力によって、再構築の増加は継続せず移植後6週目でプラトートに達した。このように、STAT3活性化による幹細胞の生体内再生能力の増強は、白血病状態を起こさせず、むしろ再生の安定期間に達した後、正常な生理学的フィードバックによって調節される。

【0143】

これに対し、優性阻害型STAT3(dn-STAT3)の形質導入は、対照群に比べ、骨髄再生は有意に減少し($P<0.05$)、このことは、細胞中のSTAT3活性の阻害により、移植幹細胞の生体内再構築活性が抑えられている可能性があることを示している。

【0144】

STAT3-C形質導入細胞が複数系譜分化の能力を維持するか否かを見るために、STAT3-C形質導入細胞から誘導された細胞の系譜分布を分析した。図3Bは、リンパ(B220)と骨髄(Mac-1/Gr-1)細胞によって表された系譜分布の代表的な分析である。図に示すように、STAT3-C形質導入細胞は、特定な系譜を外れずにリンパと骨髄両系譜に分化することができる。この結果は、STAT3-C形質導入細胞による骨髄再構築の増強は、特定な系譜細胞のクローニング増殖のためではないことを示しており、むしろ、それは原始多能性幹細胞レベルにおける再生増強による。

10

【0145】

(実施例3 - CFU-SとCFCに対するSTAT3活性変化の影響)

【0146】

STAT3-Cで仲介された骨髄再構築の増強が、造血細胞分化の他のステージ中も起こるか否かを試験するために、12日目にCFU-Sを観察し、CFU-Sは、多能性幹細胞からの幹細胞分化のすぐ次の下流ステージを反映しており、CFCは、CFU-Sからさらに下流のオリゴ-クローン前駆細胞を反映している。

20

【0147】

図4に示すように、12日目のCFU-SまたはCFCに有意な変化は見られず、従って、STAT3活性は、造血幹細胞の他のステージに影響を与えないことが示された。それ故、STAT3の活性化は、下流前駆細胞のいずれにも影響しないで、幹細胞活性を選択的に上昇制御することにより、骨髄再構築を増加し、再構築の増加は、幹細胞活性増強を直接反映する。

【0148】

(実施例4 - 幹細胞活性と生体外増大の増加を目的とするタンパク質療法)

30

【0149】

活性化型STAT3をコード化する遺伝子の形質導入は、細胞中のSTAT3活性を増加させる信頼性のある方法であるが、活性化STAT3のタンパク質生成物を送達することも、細胞内部のSTAT3活性を増加させる代替え方法になるはずである。

【0150】

外因的に追加したタンパク質生成物は、HIV(図5で概略図に示す)中のTAT配列から膜透過ドメイン(9個のアミノ酸)のような、タンパク質導入ドメイン(PTD)を融合することによって細胞内に送達することができる。

【0151】

6個のヒスチジン残基を有するキメラタンパク質、TATとSTAT3-Cを、細菌で生産しNi-NTAカラムで精製した。5-FU処理動物で得た骨髄細胞を、サイトカイン混合物(上述濃度のトロンボポエチン、スティールファクター(steele factor)、flt-3リガンド)とHIS-TA-T-STAT3-C(1μg/ml)タンパク質生成物またはTAT-GFPタンパク質(1μg/ml)の共存下で培養した。

40

【0152】

培養5日後に、説明したように細胞を照射動物に移植し、3週間と6週間にドナー細胞の再構築について分析した。これらの実験は、TAT-STAT3-C形質導入細胞は、対照群に比べて再生作用を2~5倍増強することを示した。従って、「細胞中のSTAT3活性を増加する」目的は、タンパク質導入ドメインに融合した活性化STAT3のタンパク質生成物を使ったタンパク質療法で、達成することができる。

50

【0153】

(実施例5 - 移植幹細胞の生体内自己複製)

【0154】

増強された幹細胞活性として、移植可能な生体外(培養)幹細胞の増強自己複製が含まれるかを測定するため、GFPおよびSTAT3-Cにより形質導入された細胞を感染後48時間のマウスに連続して移植した。さらに、移植される生体外(培養)幹細胞の自己複製を観察するために、一次レシピエントに移植した細胞を連続希釈し、各用量で最低6匹のマウスに移植して、各症例のCRU頻度を測定した。一次レシピエントへの移植36週後、一次マウスから生着細胞を再び回収し、同様な連続希釈をして二次マウスに移植し、生体内再生中の一次レシピエントで生成されるCRU数を測定した。

10

【0155】

図6は、実験デザインの概略図であり、これにより、CRU頻度の変化が反映される幹細胞含有量の変化を測定する。

【0156】

これらの実験からCRU頻度が得られ、それらを表1と2に示した。表1に示すように、STAT3-C形質導入細胞 1×10^6 個中CRUの数は、20 CRUに達し、一方にGFPが形質導入された細胞は14 CRUに達した。細胞を、ウイルス感染48時間後に移植しているので、この結果は培養期間が48時間未満でも、生体外(培養)でCRU(または幹細胞数)の有意な増加が達成できることを示している。それ故、STAT3活性の増加を、自己複製と生体外増大を誘発するのに使用することができる。

20

【表1】

表1. 生体外(培養)遺伝子転移培養後のCRU頻度

移植タイプ	CRU頻度(95% CI)	No. CRU/ 1×10^6 GFP+ 細胞 (95% CI)
STAT3C-GFP	1/49,794 (1/18,474–1/134,209)	20 (8–54)
GFP	1/98,652 (1/24,438–1/398,235)	14 (3–41)

CI, 信頼区間

30

【表2】

移植タイプ	CRU頻度(95% CI)	No. CRU/2大腿骨&2頸骨 (95% CI)
STAT3C-GFP	1/85,840 (1/25231–1/292046)	208 (61–709)
GFP	1/279,382 (1/109,682–1/711,641)	14 (6–36)

CI, 信頼区間

40

【0157】

表2は、生着過程における一次レシピエントのCRU変化を示す。GFPで形質導入した骨髄細胞は、大腿骨2本と頸骨2本から得た細胞中で14 CRUを生成し、一方、STAT3-Cで形質導入した細胞は、同時実験において約208 CRUを生成した。このように、これらの結果は、幹細胞中のSTAT3活性の増加は、生体内自己複製の増強を誘発し、それによって修飾幹細胞による正味の再生が増加することを示している。

【0158】

(実施例6 - STAT3-C形質導入細胞の共培養による幹細胞の生体外(培養)増大)

【0159】

幹細胞中のSTAT3活性の増加によって、自己複製と幹細胞の再生活性が導かれる。

50

【0160】

ここで、活性の増加が、パラクリン機序、例えば、細胞と細胞の接触または可溶性活性物質の分泌などによって起こるか否かを測定するために実験を行なった。

【0161】

この可能性を試験するために、間葉系幹細胞（MSC）を骨髄から確立し、STAT3-C、dn-S TAT3、およびMIGで形質導入した。各遺伝子の形質導入後、GFP陽性細胞（形質導入済み細胞）をFACSでソートし、上述のサイトカイン存在下、ドナー細胞（C57BL6/Ly5.2）と5日間共培養した。このように、培養細胞をレシピエントマウス（Pep3b/Ly5.1）に移植し、ドナーの生着を分析した。図7は、その実験から得た代表的なデータを示す。データが示すように、近隣の付着性MSC細胞中の生体内STAT3活性の増加は、共培養幹細胞の生体内再生作用を増強させることができる。この結果は、STAT3が介在する幹細胞作用の増強は、直接細胞内シグナルとパラクリンの両機序によって起きる可能性を示している。10

【0162】

この結果は、支持細胞中でSTAT3活性を操作することができる条件下で、これらの支持細胞を使用すると、共培養系または分泌された可溶性因子を用いて幹細胞作用の増強が可能であることを示している。

【0163】

参考文献

【0164】

1. Danet GH, Lee HW, Luongo JL, Simon MC, Bonnet DA. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD3 4(+) cells after ex vivoexpansion. *Exp Hematol.* 2001 Dec; 29(12):1465-73.20

【0165】

2. Dorrel C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE (2000), Blood, 95, 1, 102 -110: Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex vivo cultue during retroviral transduction without acorresponding increase in SCID repopulating cell S RC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function.

【0166】

3. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in thebrains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 15; 94(8): 4080-5.30

【0167】

4. Hanazono Y, Nagashima T, Takatoku M, Shibata H, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Dunbar CE, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K. In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a non human primate model. *Gene Ther.* 2002 Aug; 9(16): 1055-64.

【0168】

5. II-Hoan Oh, Eaves CJ, 2000, Retrovirus mediated overexpression of a dominant negative form of STAT3 selectively impairs long term repopulating stem cell activity without affecting later stages of hematopoiesis, 2000, Blood, 96, 11, 27540

【0169】

6. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoieticstem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000 Nov; 6(11): 1229-34.

【0170】

7. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Katol, Williams DA, Dick JE. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mousebone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med.* 1996 Dec; 2(12): 1329-37.

【0171】

8. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuke M, Heike T, Yokita T (1999) EMBO Journal, 18, 15, 4261-4269, STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells.

【0172】

9. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A (1998) Genes & Development, 12, 13, 2048-2060, Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3.

【0173】

10. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001 Apr 5; 410(6829): 701-5. 10

【0174】

11. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. J Pathol. 2001 Sep; 195(2): 229-35.

【0175】

12. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes Dev. 1995 Jul 15; 9(14): 1753-65. 20

【0176】

13. Xu R, Reems JA. Umbilical cord blood progeny cells that retain a CD34+ phenotype after ex vivo expansion have less engraftment potential than unexpanded CD34+ cells. Transfusion. 2001 Feb; 41(2): 213-8.

【0177】

14. U. S. Patent No. 6,235,873.

【0178】

ここで引用しているすべての参考文献は、その全文が参考文献として組み入れられている。

30

【0179】

本技術分野のこれらの技法によって、当業者は、本明細書で特記した発明の特定な実施態様の均等物を、通常の実験で十分に認知または確認することができるであろう。このような均等物は、特許請求の範囲に包括されるよう意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0180】

【図1】様々な段階の造血幹細胞に対するSTAT3活性の効果を試験するための実験方法を示す図である。

【図2】優性阻害STAT3 (dnSTAT3) または活性化STAT3 (STAT3-C) に対するレトロウイルスコンストラクトの概略図である。

40

【図3A】造血幹細胞中のSTAT3活性の変化が及ぼす、生着および生体内骨髄再生への影響を示す図である。

【図3B】STAT-C形質導入細胞の複数系譜への分化を示す図である。

【図4】造血前駆細胞の他段階へのSTAT3活性増大の効果を示す図である。

【図5A】生体外 (ex-vivo) 増大または生体内 (in-vitro) 再生増強に対する造血幹細胞のタンパク質療法の概略図である。

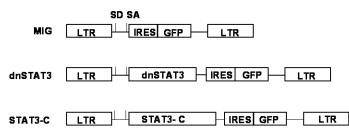
【図5B】図5Aのタンパク質を発現させるベクターコンストラクトを示す。

【図6】自己複製と幹細胞の生体内増大の定量を示す図である。

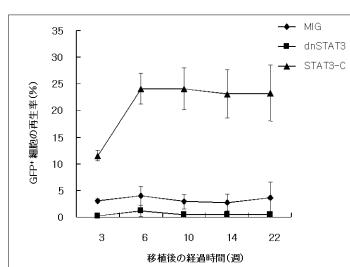
【図7】幹細胞を、STAT3-C、dn-STAT3、またはMIGベクターコントロールで形質導入した間葉系幹細胞と共に培養する効果を示す図である。

50

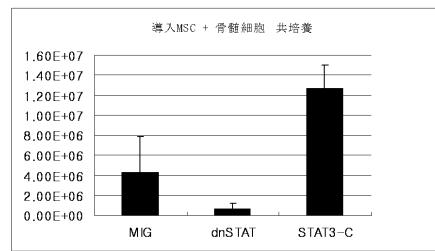
【図2】



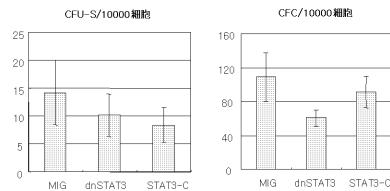
【図3 A】



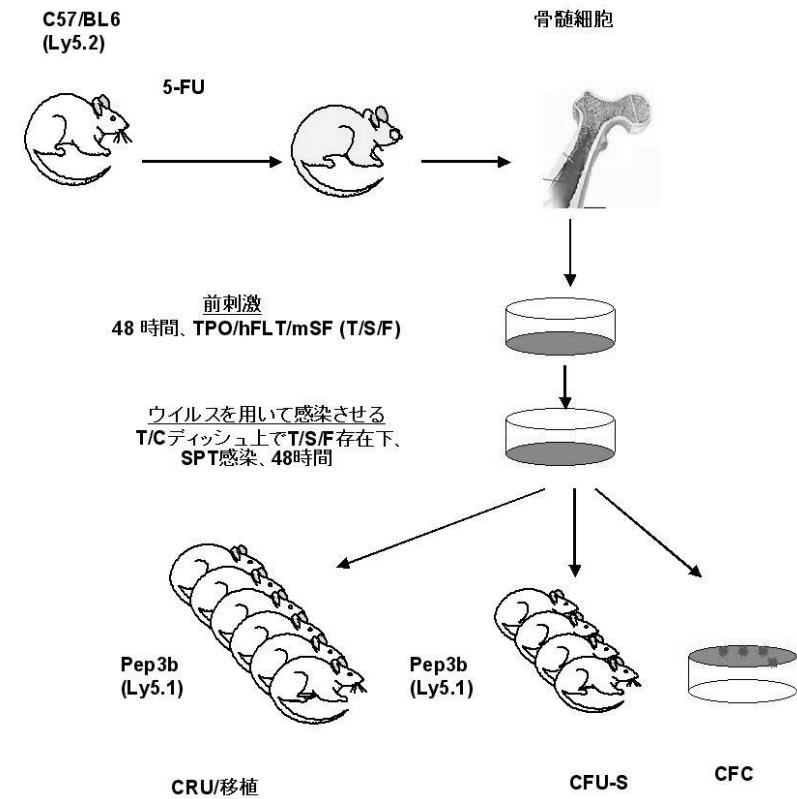
【図7】



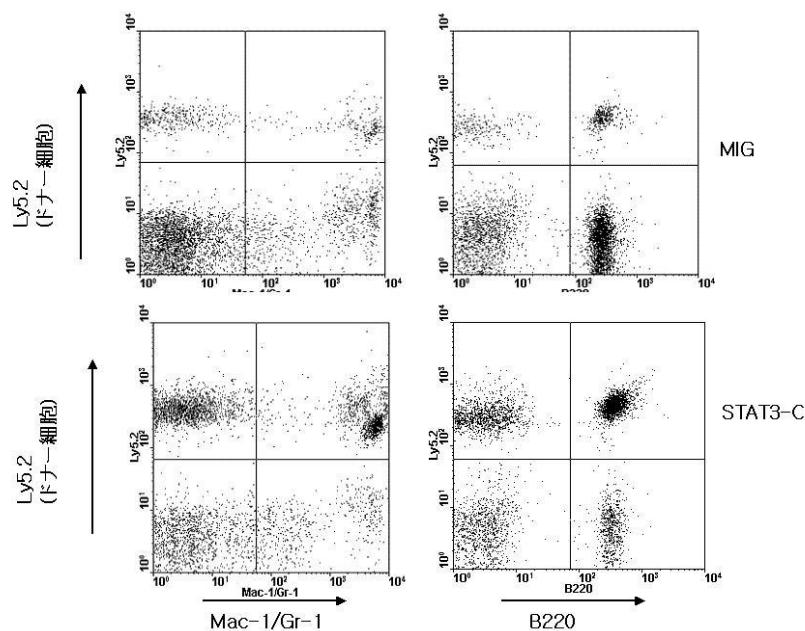
【図4】



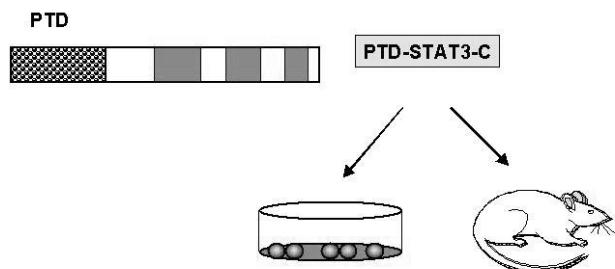
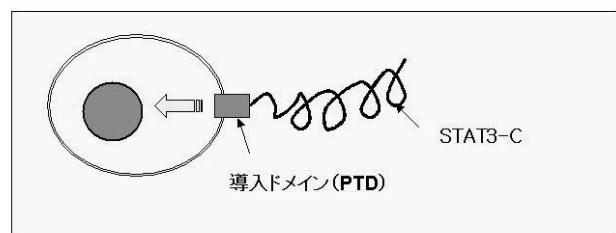
【図1】



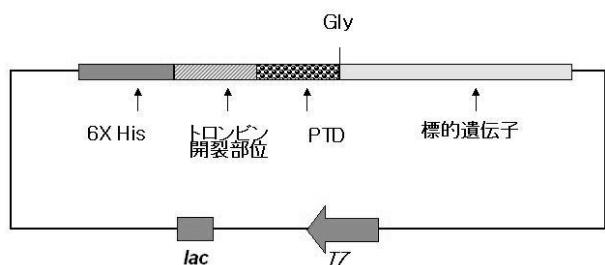
【図3B】



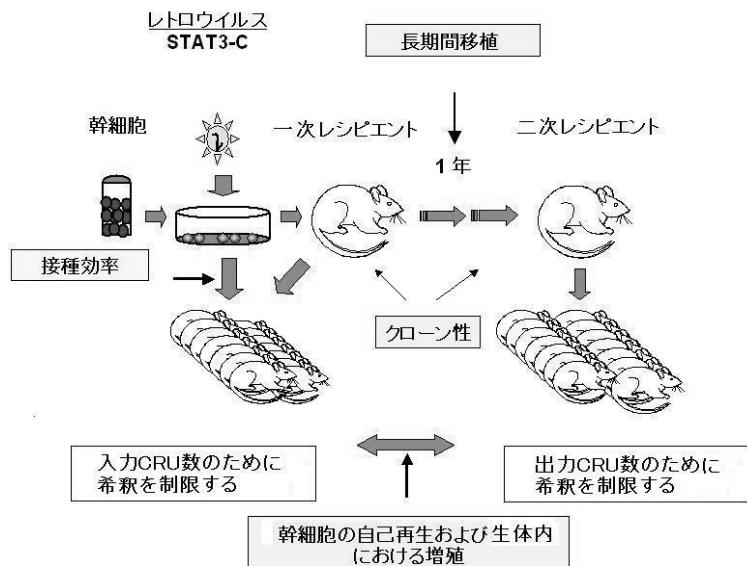
【図5A】



【図5B】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 15/09 (2006.01) C 12 N 15/00 A

(72)発明者 オウ , イル - ホアン
大韓民国 , 137-701 , ソウル , セオチョ - ク , バンポ - ドン , 505 , カソリック ユニバ
ーシティ オブ コリア , セル アンド ジーン セラピー インスティテュート

合議体

審判長 鵜飼 健
審判官 六笠 紀子
審判官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 EMBO J. , vol. 18 (15) , pp. 4261 - 4269 (1999)
Genes and Develop. , vol. 12 , pp. 2048 - 2060 (19
98)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , vol. 96 , pp. 2846 - 28
51 (1999)
Cell , vol. 98 , pp. 295 - 303 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N5/00
BIOSIS
MEDLINE
WPIDS