

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3934005号
(P3934005)

(45) 発行日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47

請求項の数 7 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2002-225109 (P2002-225109)	(73) 特許権者	301046787
(22) 出願日	平成14年8月1日(2002.8.1)		インディアナ・ユニバーシティ・リサーチ
(62) 分割の表示	特願平7-525257の分割		・アンド・テクノロジー・コーポレーション
原出願日	平成7年3月27日(1995.3.27)		アメリカ合衆国、インディアナ州 462
(65) 公開番号	特開2003-111598 (P2003-111598A)		02、インディアナポリス、ウェスト
(43) 公開日	平成15年4月15日(2003.4.15)		ンス ストリート 351
審査請求日	平成14年8月1日(2002.8.1)	(73) 特許権者	500041019
(31) 優先権主張番号	08/218,355		ノースウェスタン ユニバーシティ
(32) 優先日	平成6年3月25日(1994.3.25)		アメリカ合衆国 イリノイ州60208、
(33) 優先権主張国	米国(US)		エバンストン、クラークストリート633
前置審査		(74) 代理人	100089705
			弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス仲介DNA導入の増強

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レトロウイルス仲介による遺伝子導入により形質導入された、生存可能な造血細胞を含む培養物であって、レトロウイルス、及び固定化された組換えフィブロネクチンフラグメントCH-296を含有し、そしてレトロウイルス産生細胞を含有しない、前記培養物。

【請求項2】

形質転換された生存可能な造血細胞が臍帯血由来の造血細胞を含む、請求項1に記載の培養物。

【請求項3】

形質転換された生存可能な造血細胞が造血幹細胞を富化した造血細胞である、請求項1または2に記載の培養物。 10

【請求項4】

形質転換された生存可能な造血細胞が、ヒト造血幹細胞を富化したヒト造血細胞である、請求項3に記載の培養物。

【請求項5】

形質転換された生存可能な造血細胞が、付着陰性の低密度単核細胞としての性質を有するヒト造血細胞の均一な集団である、請求項4に記載の培養物。

【請求項6】

形質転換された生存可能な造血細胞が、細胞におけるタンパク質の欠損または異常を適正化するための外因性遺伝子を含む組換えレトロウイルスベクターにより形質導入された 20

、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の培養物。

【請求項 7】

細胞におけるアデノシンデアミナーゼ欠損を適正化するためのヒトアデノシンデアミナーゼ遺伝子を含む組換えレトロウイルスベクターにより形質導入された生存可能な造血細胞を含む、請求項 6 に記載の培養物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は一般にウイルスによる細胞の形質導入効率を高める方法、より詳細にはフィブロネクチンおよび/またはフィブロネクチンフラグメントを用いてウイルス仲介による細胞内への遺伝子導入を増強する方法に関するものである。

10

【0002】

【従来の技術】

ヒトの疾病の多くについて分子基準での理解が進み、かつ遺伝子導入技術が向上したことにより、最近では重篤な遺伝病に対して体細胞遺伝子療法のためのプロトコルの開発が試みられるようになった。現在、ヒトの遺伝子療法にとって有望な候補である疾病には、酵素または他のタンパク質が欠損または欠如しているものであって、酵素または他のタンパク質の水準を厳密に調節する必要のない場合、特にそれらが構成的に調節されているもの、および患者の骨髓に見られる欠損が含まれる。

【0003】

20

たとえば遺伝子療法の候補である疾病の 1 つは、重篤な複合型免疫不全病 (SCID) をもたらすアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症である。ADA 欠損患者は骨髓中に検出する酵素をほとんど、または全く含まない。しかし ADA 欠損症は適合骨髓移植によって治癒している。ADA 正常細胞は ADA 欠損細胞より選択的利点を持ち、患者の骨髓を正常にリポピュレート (repopulate) するであろう。

【0004】

骨髓組織はインビトロで容易に取り扱うことができ、かつリポピュレートする細胞を含むので、骨髓細胞は体細胞遺伝子療法の良好な標的である。あるいはヒトの臍帯血が未発達の前駆細胞を多数含有することもこれまでに証明されている。長期的にリポピュレートする細胞である造血幹細胞中への遺伝子導入に成功すれば、これらの細胞の子孫において顕性となる多様な疾病を生涯にわたって治癒することができる。

30

【0005】

リポピュレートする幹細胞中への遺伝子導入およびそこでの長期的な遺伝子発現が、ネズミモデルにおいて多数の研究者により達成された。しかしより大型の動物、たとえばイヌおよび霊長類におけるインビボ実験の成功は限定されている。これは未発達の造血幹細胞の感染効率が低いことが大きな原因である。現在の遺伝子導入技術の制限は、ヒトのプロトコルに適用した場合、幾つかの要因によってさらに複雑になる。これらの要因には成人骨髓 (ABM) 中に存在する幹細胞数が少ないこと、これらの細胞を精製する適切な方法がないこと、および細胞周期においてこのような未発達細胞の部分が少ないことが含まれる。

40

【0006】

骨髓細胞に関するネズミおよび大型動物双方の実験において、成功例のプロトコルは大部分が標的細胞とレトロウイルス産生細胞系の同時培養を採用していることが指摘された。同様に、FDA が承認したヒトの遺伝子導入の試みは大部分が遺伝子導入のために組換えレトロウイルスベクターに依存している。組換えレトロウイルスベクターは外因性 DNA を細胞内 DNA 中へ効果的に導入し、正確かつ安定に組み込むので、遺伝子療法にとって望ましい。これらのベクターは遺伝子導入のための外因性 DNA を含有し、ウイルス病原性を排除するためにさらに修飾される。これらの修飾がなされているため、ウイルスの産生は一般にレトロウイルスパッケージング細胞を用いて行われる。しかし臨床遺伝子療法には、生物学的安全性および品質管理の懸念から無細胞形質導入の方が望ましい。残念

50

ながら造血細胞、たとえば幹細胞への効果的な遺伝子導入はウイルス産生細胞との同時培養なしには一般に不可能であった。

【0007】

最近、感染に際して標的細胞を間質細胞に暴露することにより遺伝子導入効率を高めうることが示された。間質細胞は造血ミクロエンバイロメント(HM)の主成分である。HMはマクロファージ、間質細胞、内皮細胞、脂肪細胞、および多様な特定の付着分子から構成される複雑な細胞外マトリックス(ECM)の統制された網状構造からなる。ECM分子、たとえばラミニン、コラーゲン、トロポスポンジン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンおよびフィブロネクチンが、造血細胞と成長因子の双方に対する足場部位を提供する。間質細胞がレトロウイルス感染に及ぼすこの促進作用の基礎となるメカニズムは不明であるが、造血細胞の増殖および分化の生理学的調節はこれらの細胞がHMの細胞と直接に接触した際に起こることが最近知られた。

10

【0008】

長期的にリポピュレートする造血幹細胞および他の細胞への効果的な遺伝子導入には依然として問題が多く、このことが現在では遺伝子導入プロトコールを造血および他の疾病の治療的療法に広範に適用するのを妨げている。従来法がもつ危険性および制限なしに遺伝物質を哺乳動物細胞に効果的に導入する方法が依然として求められている。本発明はこれらの要求に応えるものである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

20

すなわち本発明の好ましい1態様は、レトロウイルスベクターによる造血細胞の形質導入頻度を増大させる方法を提供する。この方法には、生存可能な造血細胞に複製欠損性組換えレトロウイルスベクターを、レトロウイルスによる細胞形質導入を増大させるのに有効な実質的に純粋なフィブロネクチンおよび/またはフィブロネクチンフラグメントの存在下で感染させることが含まれる。フィブロネクチンおよび/またはフィブロネクチンフラグメントは天然物質に由来するものであってもよく、または合成によるもの(たとえば組換え法により遺伝子工学的に合成されたもの、または化学的合成法によるもの)、もしくは天然物質と合成物質の組合わせに由来するものであってもよい。さらに本発明に用いられるフィブロネクチンポリペプチド(1または2以上)には、天然フィブロネクチンアミノ酸配列に対する突然変異体であって、それにもかかわらず本発明による形質導入の増大を達成するのに必要な付着性を備えたものが含まれることは理解されるであろう。

30

【0010】

本発明の他の好ましい態様は、生存可能な造血細胞に外因性DNAを保有する複製欠損性組換えレトロウイルスを、レトロウイルスによる細胞形質導入頻度の増大に有効な量の固定化されたフィブロネクチン、固定化されたフィブロネクチンフラグメント、またはその固定化された混合物の存在下で感染させることを含む、形質導入された造血細胞の調製方法を提供する。

【0011】

本発明の他の好ましい態様は、改良された細胞移植法を提供する。本方法には、ドナー動物から生存可能な造血細胞を採取し;これらの造血細胞に組換えレトロウイルスベクターを感染させて、形質導入された生存可能な造血細胞を調製し、その際感染は固定化された形の、かつ形質導入頻度を増大させるのに有効なフィブロネクチンおよび/またはそのフラグメントの存在下で行われ;そして形質導入された生存可能な造血細胞を細胞移植体としてレシピエント動物に導入する工程が含まれる。好ましい1態様においては、感染細胞を自己ドナー(autologous donor)に導入することができる。

40

【0012】

本発明の他の好ましい態様は、細胞移植法に適した形質導入された臍帯血細胞を得る方法を提供する。本方法には、臍帯血由来の造血細胞に複製欠損性組換えレトロウイルスベクターを、レトロウイルスベクターによる造血細胞の形質導入頻度を増大させるのに有効な固定化された量のフィブロネクチンおよび/またはそのフラグメントの存在下で感染させ

50

ることが含まれる。本発明は、その方法で得られた、臍帯血細胞由来の生存可能な形質導入細胞集団、およびそれらの形質導入細胞集団を動物に細胞移植体として導入することをも包含する。

【0013】

以上に述べた本発明の態様のより具体的な観点によれば、使用されるフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントは、フィブロネクチンのヘパリン - II 結合性ドメインがもつレトロウイルス結合活性を与える第 1 アミノ酸配列、およびフィブロネクチンの CS - 1 ドメインがもつ細胞結合活性を与える第 2 アミノ酸配列を含むであろう。フィブロネクチンのこれら 2 結合ドメインを合わせて使用することにより、レトロウイルスによる標的細胞の形質導入効率が著しく増大することが証明された。

10

【0014】

本発明の他の好ましい態様は、レトロウイルスベクターによる予め定めた標的細胞の形質導入頻度を増大させる構築体の製造方法を提供することである。本方法には、標的細胞に結合するリガンドを、フィブロネクチンのヘパリン - II 結合性ドメインがもつレトロウイルス結合活性を与えるアミノ酸配列を含むポリペプチドに共有結合させる工程が含まれる。本発明は、これらの構築体をレトロウイルスベクターによる予め定めた標的細胞の形質導入頻度を増大させるために使用する方法、および形質導入細胞を用いる移植法をも包含する。

【0015】

本発明の他の好ましい態様は、ウイルスを含有する培地を、一定量のウイルスの局在化に有効な固定化された量のフィブロネクチン、またはヘパリン - II 結合性ドメインがもつウイルス結合活性を含むフィブロネクチンフラグメントの存在下でインキュベートすることを含む、一定量のウイルスを局在化する方法を提供することである。

20

【0016】

本発明のさらに他の好ましい態様は一般に、実質的に純粋な、および / または固定化されたフィブロネクチンまたはそのフラグメントを含有する形質導入された生存可能な造血細胞および他の細胞の培養物、ならびに細胞内へのレトロウイルス仲介による DNA 導入を実施するためのキットを提供することである。

【0017】

本発明の目的は、哺乳動物細胞の効果的なレトロウイルス感染方法を提供することである。

30

本発明の他の目的は、同時培養の必要がない、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入方法を提供することである。

【0018】

本発明の他の目的は、自己および / または同種間細胞移植のための方法および細胞培養物を提供することである。

本発明のこれらおよび他の目的、利点および特色は、以下の記載から当業者に自明であろう。

【0019】

【課題を解決するための手段】

本発明の原理を理解しやすくするために本発明の特定の態様を参照し、具体的な語を用いてそれを説明する。ただしこれは本発明の範囲の限定を意図するものでないことは理解されるであろう。本明細書に示すような本発明の原理の変更、さらに修正および適用は本発明に関連する技術分野の専門家が普通に行うものと解される。

40

【0020】

前記のように、本発明はウイルス、たとえばレトロウイルスによる生存可能な細胞の形質導入頻度を増大させる方法を提供することである。本発明は、組換えレトロウイルスベクターを用いた生存可能な細胞中への効果的な遺伝子導入法、形質導入細胞を得る方法、ならびに自己および他の細胞移植を達成するための方法および材料をも提供する。

【0021】

本発明の 1 特色は、フィブロネクチン (FN)、および FN の CS - 1 細胞付着ドメイン

50

を含むフィブロネクチンフラグメントが、フィブロネクチン受容体を保有することによりフィブロネクチンまたはそのフラグメントへの結合能を示す細胞、たとえば造血細胞、たとえばコミッティッド前駆細胞および未発達の造血幹細胞または長期培養 - 開始細胞 (LTC - IC) 中へのレトロウイルス仲介による遺伝子導入を有意に増強するという知見である。有利には、この増大した効率によりウイルス産生細胞との同時培養が不必要になる。本発明の他の特色は、フィブロネクチンのウイルス結合性ドメインがヘパリン - II 結合性ドメイン内にあるという知見を利用する。このウイルス結合性ドメインは、たとえばウイルスを標的細胞へ運搬するための広範な構築体を含めた多くの用途において、ウイルス粒子を局在化するために使用しうる。

【0022】

本発明の特定の好ましい観点による組換えウイルスベクターは、外因性DNAを含有し、非病原性、すなわち複製欠損性である。これらのベクターは外因性DNAを宿主細胞、たとえば動物細胞、特に哺乳動物細胞の細胞DNA中へ効果的に導入し、正確かつ安定に組み込む。たとえば本発明においては目的とする遺伝子のコード配列に由来する一連の塩基を含むヌクレオチド配列を、遺伝子を駆動するための適切なプロモーター、一般に外因性プロモーターの制御下に、組換えレトロウイルスベクター中へ取り込ませることができる。これに関して外因性DNAは天然または合成により産生されたDNAを含むことができ、かつ異種供給源に由来する部分であってもよく、それらの部分は天然分子または化学合成された分子のいずれであってもよく、かつそれらの部分はライゲーションまたは当技術分野で既知の他の手段で結合される。前記のように、導入されたヌクレオチド配列はプロモーターの制御下にあり、したがって一般にプロモーターの下流にある。言い換えると、プロモーター配列は一般にコード配列の上流 (すなわち5'末端) にある。その際、プロモーターと協同作用する他の調節要素 (たとえばエンハンサー配列)、および外因性コード配列の転写を行う転写開始コドンが存在してもよく、存在しなくてもよいことは周知である。“の制御下にある”という字句は、導入された遺伝子の転写を行うためにこのような他の要素が必要であることを表す。同様に組換えDNAは好ましくは、導入されたコード配列の下流に終止配列を含む。

【0023】

選択マーカーまたは他の選択性利点を与える外因性DNAを含むレトロウイルスを使用しうる。たとえばベクターは、抗生物質、たとえばネオマイシンを含めた種々の選択試薬に対する耐性を与える1または2以上の外因性遺伝子を含むことができる。本発明に使用しうる代表的ベクターには、たとえば下記のものが含まれる：N2 / ZipTKNEOベクター (TKNEO) (力価：NIH 3T3細胞上で 1×10^5 G418^r cfu/ml)、ZipPGK-hADAベクター、およびZipPGK-mADAベクター、これらはすべてMoritzら (1993) J. Exp. Med. 178: 529により報告されている。TKNEOベクターにおいては、neoホスホトランスフェラーゼ配列が単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターによりセンス配向で (5'側ロングターミナルリピート-LTRに対して) 発現する。このベクターは、形質導入された細胞の同定を容易にするためのネオマイシン耐性を与える選択マーカー遺伝子を含む。ZipPGK-hADAベクターにおいては、ヒトADA (“hADA”) がヒトホスホグリセレートキナーゼ (PGK) プロモーターにより5'LTRに対してセンス配向で発現する。それは発現しうる遺伝子配列1個のみを含み、優性選択マーカーを欠如する。ZipPGK-mADA (PGK-mADA) ベクターはヒトADA cDNAがネズミADA (“mADA”) DNAで置換された点以外はZipPGK-hADAベクターと等しい。これらおよび他のウイルスベクターならびにそれらの調製法は周知であり、それらの実施および本発明における使用は本明細書の記載から当業者が容易になしうるものである。

【0024】

本発明に用いられるウイルスベクターは、ヒトフィブロネクチンを含めたフィブロネクチンのヘパリン - II 結合性ドメインのアミノ酸配列への結合能を示す。本発明はいずれかの理論によって限定されるものではないが、後記の節に述べるように、ウイルスおよび標

10

20

30

40

50

的細胞がそれぞれの官能性ドメインに結合することによりウイルスおよび細胞が同時局在 (c o - l o c a l i z a t i o n) することによって、ウイルスによる細胞の形質導入が促進されると考えられる。これに関してウイルスがヘパリン - I I 結合性ドメインのアミノ酸配列に結合し、したがって本発明において効果的に作用する効力は、ルーティン方法、たとえば後記実施例 8 および 9 に記載された方法で容易に確認しうる。一般にこれらのアッセイ法は、ヘパリン - I I 結合性ドメインを含む固定化されたポリペプチドにウイルス粒子が結合し、したがって固定化されたポリペプチドマトリックスからの洗浄に耐える程度を測定するものである。以下に要約する：たとえばフィブロネクチンヘパリン - I I 結合性ドメインを含む固定化されたポリペプチドを収容したウェル内でウイルスを含有する上清をインキュベートすることができる。次いでウェルを生理食塩緩衝液で徹底的に 10
洗浄したのち、ウイルスに対する標的細胞をウェル内でインキュベートして、ウェル内に残存する感染活性の水準を測定する。初期ウイルス上清と比較した感染活性、すなわち力価の低下を評価し、同様な対照試験 (たとえば B S A コーティングしたウェルの使用) のものと比較する。対照ウェルと比較してヘパリン - I I 結合性ドメイン含有ウェル内に残存する力価の方が有意に高いことは、被験ウイルスが本発明の観点に使用するのに適していることを示す。このスクリーニング法を容易にするために、ウイルスベクターは前記のように選択マーカーを含んでもよい。

【 0 0 2 5 】

本発明に使用するフィブロネクチンのフラグメントは天然または合成のいずれに由来するものであってもよく、天然材料からたとえば先に R u o s l a h t i ら (1 9 8 1) J . 20
B i o l . C h e m . 2 5 6 : 7 2 7 7 ; P a t e l および L o d i s h (1 9 8 6) J .
C e l l . B i o l . 1 0 2 : 4 4 9 ; ならびに B e r n a r d i ら (1 9 8 7) J .
C e l l . B i o l . 1 0 5 : 4 8 9 が記載したように、実質的に純粋に調製することができる。これに関して本明細書中で、実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントという場合、フィブロネクチンが天然にそれらと共に存在する他のタンパク質を本質的に含有しないことを意味するものとする。本発明に使用する実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントは組換えにより、たとえば米 30
国特許第 5 , 1 9 8 , 4 2 3 号明細書 (1 9 9 3 年 3 月 3 0 日にタグチらに交付され、京都の宝酒造株式会社に譲渡された) に一般的に記載された方法に従って製造することもできる。特に後記実施例において H - 2 7 1 、 H - 2 9 6 、 C H - 2 7 1 、 C H - 2 9 6 お
よび C - C S 1 と定める組換えフラグメントならびにそれらを得る方法が、この第 5 , 1
9 8 , 4 2 3 号明細書に詳述されている。後記実施例で用いた C 2 7 4 フラグメントは米
国特許第 5 , 1 0 2 , 9 8 8 号明細書の記載に従って得られた。これらのフラグメントま
たはそれらをルーティンに誘導しうるフラグメントは、工業技術院生命工学工業技術研
究所に F E R M P - 1 0 7 2 1 (H - 2 9 6) 、 F E R M B P - 2 7 9 9 (メチオニン
により H - 2 7 1 に結合した C - 2 7 7) 、 F E R M B P - 2 8 0 0 (メチオニンによ
り H - 2 9 6 に結合した C - 2 7 7) 、および F E R M B P - 2 2 6 4 (H - 2 7 1)
として寄託された大腸菌 (E . c o l i) を同様に米国特許第 5 , 1 9 8 , 4 2 3 号明細
書に記載された方法に従って培養することにより得られる。さらに、本発明に使用し
うるフィブロネクチンに関して、またはそれらのフラグメントの出発原料に関して有用な情報 40
が下記に見られる： K i m i z u k a ら , J . B i o c h e m . 1 1 0 , 2 8 4 - 2 9 1
(1 9 9 1) 、これは前記の組換えフラグメントにつきさらに報告する； E M B O J .
, 4 , 1 7 5 5 - 1 7 5 9 (1 9 8 5) 、これはヒトフィブロネクチン遺伝子の構造につ
き報告する； B i o c h e m i s t r y , 2 5 , 4 9 3 6 - 4 9 4 1 (1 9 8 6) 、これは
ヒトフィブロネクチンのヘパリン - I I 結合性ドメインにつき報告する。C S - 1 細胞
付着ドメインおよびヘパリン - I I 結合性ドメインの両方を含むフィブロネクチンフラ
グメント、たとえば約 3 0 または 3 5 k d フラグメント (3 0 / 3 5 F N) および後記実施
例に報告する種々の組換えフラグメントに含まれるものが造血細胞中への遺伝子導入効率
を著しく増大させることがこれまでの研究で認められ、本発明に使用するのに好ましい。
したがっておおまかに言うと、本発明に使用されるフィブロネクチン関連ポリペプチドは 50

、フィブロネクチンのCS-1細胞付着ドメインがもつ細胞結合活性、およびウイルスを結合する、フィブロネクチンのヘパリン-Ⅱ結合性ドメインのアミノ酸配列を提供する。必要な細胞結合活性およびウイルス結合活性が両方とも、これらの官能性フィブロネクチンドメインの天然アミノ酸配列により、ならびに天然配列とは異なるがなお細胞結合活性およびウイルス結合活性を示すのに十分なほど類似するアミノ酸配列により提供されることは、当業者には自明であろう。これらの類似アミノ酸配列はそれらに対応する天然アミノ酸配列に実質的に相同な配列を示し、アミノ酸が欠失、置換および/または修飾されたにもかかわらず目的とする細胞結合性またはウイルス結合性を備えたアミノ酸配列を提供するものを包含しうる。

【0026】

10

これに関して、関連のバイオテクノロジー技術分野は対象となる官能ドメインにおいてアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾をルーティンに実施しうる状態にまで進歩している。得られたアミノ酸配列を、次いで目的とする細胞結合活性およびウイルス結合活性につきルーティンにスクリーニングすることができる。たとえばフィブロネクチンの突然変異形または修飾形のヘパリン-Ⅱ結合性ドメインは一般的に先に述べたように、かつ実施例8および9に詳述するように、ウイルスのインキュベーション、洗浄、および対照と比較した感染性の保持を測定するためのウイルス力価アッセイによりスクリーニングすることができる。本明細書に示す教示を考慮すると、これらの結合アッセイは当業者にはルーティン実験にすぎないであろう。

【0027】

20

フィブロネクチンの修飾形もしくは突然変異形のCS-1細胞付着ドメインへの、または他の細胞結合性ポリペプチドへの細胞の結合も、同様に常法によりアッセイしうる。たとえばそれらの方法にはNature 352:438-441(1991)に記載されたものが含まれる。以下に要約する：細胞結合性ポリペプチドをプラスチック皿にコートし、アッセイすべき細胞集団を培地に入れて30分ないし2時間載せておく。このインキュベーション期間後に、タンパク質に付着していない細胞を回収し、計数し、生存性につきアッセイする。ポリペプチドに付着した細胞をトリプシンまたは細胞解離用緩衝液（たとえばギブコ）を用いて同様に回収し、計数し、生存性につきアッセイする。場合により、たとえば造血コロニー形成細胞については、細胞をさらに12-14日間培養して、細胞のコロニー形成性を確認する。次いで付着細胞の%を計算し、標準対照、たとえばウシ血清アルブミン(BSA)コートしたプラスチック皿と比較する。アッセイされるポリペプチドに標的細胞が実質的に結合した場合、そのポリペプチド/細胞の組み合わせが本発明に適しており、そのポリペプチドをフィブロネクチンからのレトロウイルス結合性フラグメントに結合させて、ウイルスベクターによる標的細胞の感染を増強するための本発明構築体を製造しうることを示す。

30

【0028】

本発明のより具体的な観点によれば、レトロウイルスベクターによる形質導入を増強するために用いるウイルス結合性ポリペプチドは下記を含む：(i)次式(配列番号：1)で表される、ヒトフィブロネクチンのヘパリン-Ⅱ結合性ドメインのAla¹⁶⁹⁰-Thr¹⁹⁶⁰に相当する第1アミノ酸配列：

40

【0029】

【化3】

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser
 Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val
 Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala
 Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr
 Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln
 Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
 Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu 10
 Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro
 Ile Gln Arg Thr Ile Sys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
 Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg
 Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
 Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro
 Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Sys Pro Gly Sev Pro
 Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile 20
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys
 Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr;

【 0 0 3 0 】

またはレトロウイルスの結合能を示すのに十分なほどこれと類似するアミノ酸配列；
 および (i i) 次式 (配列番号： 2) で表される、ヒトフィブロネクチンの I I I C S 結
 合性ドメインの一部 (C S - 1 細胞結合性ドメイン) に相当する第 2 アミノ酸配列：

【 0 0 3 1 】

【 化 4 】

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly 30
 Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr;

【 0 0 3 2 】

あるいは造血細胞、たとえば未発達の前駆細胞および / または長期リポビュレーションす
 る (幹) 細胞の結合能を示すのに十分なほどこれと類似するアミノ酸配列。

【 0 0 3 3 】

前記のように、得られるアミノ酸配列がウイルスの結合能 (ヘパリン - I I 結合性ドメイ
 ンの場合) および標的細胞の結合能 (C S - 1 細胞結合性ドメイン) を示すのに十分なほ
 ど類似している限り、本発明の実施に際してこれらの天然配列の一定の修飾および / また 40
 は突然変異を行うのが可能であることは理解されるであろう。

【 0 0 3 4 】

本発明の 1 観点は、インビトロ細胞療法、次いで宿主への標的細胞の移植 (t r a n s p
 l a n t a t i o n) を伴う、体細胞遺伝子治療法を提供する。これは宿主への形質導入
 された標的細胞の “ 移植 (e n g r a f t m e n t) ” としても知られている。造血細胞
 または他の細胞はヒトその他の哺乳動物源から標準プロトコールにより採集することがで
 きる。たとえば造血細胞はヒトドナーの骨髓もしくは末梢血から、またはヒト胎児臍帯血
 から採集することができる。採集したのち、造血細胞を幹細胞および / または未発達の
 前駆細胞に富むものにするために、所望によりそれらを標準法で処理することができる。次
 いで造血細胞を適宜、たとえば組織培養プレート上でインキュベートしうる。所望により 50

この期間に付着陰性の低密度単核細胞をレトロウイルス感染前に予備刺激することができる。当技術分野で知られており、本発明に用いられる予備刺激とは、細胞をレトロウイルス暴露する前に増殖刺激因子に暴露させることを意味する。このような予備刺激はレトロウイルスによる造血細胞の形質導入を向上させることが証明された。

【0035】

予備刺激ののち、細胞を収穫し、本明細書に記載するようにレトロウイルスによる細胞形質導入頻度を増大させるフィブロネクチンまたはそのフラグメントと共にインキュベートすることができる。好ましくは精製した、および/または不溶性の、たとえば固定化したフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントと共に細胞をインキュベートする。次いで細胞に組換えウイルス、たとえば細胞における酵素または他のタンパク質の欠損または異常を適正化するための遺伝子を含むレトロウイルスに、ウイルスによる細胞の形質導入頻度を増大させるのに有効な量のフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントの存在下で感染させる。得られた形質導入された造血細胞を、次いで細胞移植体レシピエント動物、好ましくは自己ドナーに常法により、たとえば静脈内へ導入することができる。これには同種異系移植体も包含され、これは特に後記のように移植体として臍帯血細胞を用いる場合に利用される。

10

【0036】

本発明方法は、がん、白血病などを含めた骨髄障害、タンパク質の欠損または異常を伴う障害を含む、多様な障害の遺伝子マーキングまたは遺伝子治療プロトコルに、および他の治療プロトコル、たとえば化学療法に対する抵抗性を改善するために造血細胞を改質する治療に利用しうる。本発明を利用しうる代表的障害には、たとえばADA欠乏症、たとえばADA欠乏性SCID、小児急性骨髄性白血病(AML)、神経芽細胞腫、ならびに成人AMLおよび急性リンパ性白血病(ALL)が含まれる。

20

【0037】

本発明の特に好ましい1態様においては、細胞移植に用いられる細胞をヒト臍帯血から得る。たとえばヒト臍帯血を採集し、たとえば付着陰性かつ低密度の単核細胞集団を得ることにより、生存可能な未発達の造血前駆細胞および/または幹細胞を富化することができる。次いでこの集団を所望により予備刺激し、レトロウイルスベクター、ならびにベクターによる細胞の形質導入効率を増大させるために、固定化したおよび/または精製したフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントの存在下でインキュベートする。これに関して、フィブロネクチンは臍帯血中のECMの一部を構成せず、また臍帯血由来の未発達の造血前駆細胞および/または幹細胞は骨髄由来の細胞と異なることが解明されているが、臍帯血由来の未発達の造血前駆細胞および/または幹細胞の形質導入はフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントの存在下で大幅に増強されることが見出された。特に臍帯血幹細胞はCD34⁺、HLA-DR⁺であることが解明され、これに対し骨髄由来の幹細胞はCD34⁺、HLA-DR⁻であることが解明されている。臍帯血由来の未発達の造血前駆細胞はフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントの存在下で増強された様式で効果的に形質導入されるといふ本発明者らの知見により、簡便な、かつ高度に幹細胞富化した造血細胞源の利用が可能となる。さらに、未発達の造血前駆細胞および/または幹細胞を富化した同種異系移植体を用いた多数の患者の移植に成功したという証拠により、臍帯血は極めて好ましい造血細胞源となる。Kohli-Kummerら, Brit. Haematol. 85: 419-422 (1993); Broxmeyerら, Blood Cell 17: 313-329 (1991); Gluckmanら, Br. J. Haematol. 45: 557 (1980); Heidelberg: スプリンガー-フェルラーク, pp. 60-68 (1989); Wagnerら, Blood 79: 1874-1881 (1992); およびWagnerら, Blood 82: 86a (抄録)を参照されたい。

30

40

【0038】

所望により、収穫した形質導入された造血細胞その他の細胞を形質導入効率および遺伝子発現につき試験することができる。たとえば本発明により得られるレトロウイルス仲介遺

50

伝子導入における著しい改良は、後記の具体的な実施例において証明される。実施例にはフィブロネクチンまたは有効なフィブロネクチンフラグメントの存在下でのレトロウイルスによる高い感染および遺伝子導入効率を証明する幾つかの試験を記載する。特に P G K - h A D A レトロウイルスに感染したネズミ造血細胞は高水準の導入 A D A c D N A を発現した。同様に個々の P G K - m A D A ウイルス感染したヒト前駆細胞コロニーは、内因性ヒト A D A タンパク質より最高 10 倍高いネズミ A D A タンパク質を発現した。したがって導入効率を厳密に分析するために、前駆細胞コロニーは導入された m A D A の発現が内因性ヒト A D A 水準以上である場合にのみ形質導入されたとみなされた。T K N E O ベクターからの n e o の高水準の発現は、ネオホスホトランスフェラーゼ (n e o 遺伝子生成物) 活性のアッセイと同様に G 4 1 8 薬物耐性により検出された。

10

【 0 0 3 9 】

前記のように、本発明方法はレトロウイルス産生細胞の存在下で同時培養する必要なしに有利に実施することができる。したがって本発明の 1 観点によれば、レトロウイルス仲介遺伝子導入を、標的である造血細胞その他の細胞以外の細胞が実質的に存在しない状態で実施することができる。たとえばレトロウイルスベクタープラスミドを含む産生細胞を培養し、上清を採集することができる。次いでレトロウイルス含有上清を、フィブロネクチンおよび / またはフィブロネクチンフラグメントの存在下で造血細胞の感染に用いることができる。これらは好ましくは固定化された形のものであり、たとえば支持体にコートし、この上で感染を行うか、または他の方式で感染用培地と接触させる。これに関して、高力価の無ヘルパーレトロウイルスを産生する任意の産生細胞が本発明に使用するのに適していると考えられる。これらには、たとえばパッケージング細胞、たとえば P s i - 2、C 2、P A 1 2、P A 3 1 7、および G P + e n v A M 1 2、ならびに当技術分野で知られている他の多数のパッケージング細胞系が含まれる。

20

【 0 0 4 0 】

本発明の他の観点によれば、フィブロネクチンのヘパリン - I I 結合性ドメイン内のアミノ酸への強いウイルス結合を利用して、広範な細胞タイプにわたるウイルス療法に用いる運搬システムを構築しうる。このためには、フィブロネクチン由来のレトロウイルス結合性ドメインを含むポリペプチドを、この構築体に標的細胞に対する特異性を与える任意のリガンドに共有結合させることができる。この方法によれば、各標的細胞に特異的なレトロウイルス細胞系を予め構築する必要性が回避されるであろう (K a s a h a r a , N . , A . M . D o z y および Y . W . K a n . , S c i e n c e , V o l . 2 6 6 , p p . 1 3 7 3 - 1 3 7 6 (1 9 9 4)、ならびに V a l s e s i a - W i t t m a n n , S . , A . D r y n d a , G . D e l e a g e , M . A u m a i l l e y , J . M . H e a r d , O . D a n o s , G . V e r d i e r および F . L . C o s s e t , J . V i r o l . , V o l . 6 8 , p p . 4 6 0 9 - 4 6 1 9 (1 9 9 4))。標的構築体の特異性は、たとえば下記を含めたりガンドの使用により与えることができる： 1) 細胞付着性タンパク質、 2) ホルモンまたはサイトカイン、 3) 標的細胞に対するモノクローナル抗体、 4) 標的細胞に結合する炭水化物 (G . A s h w e l l s , A n n u . R e v . B i o c h e m . , V o l . 5 1 , p p . 5 3 1 - 5 5 4 (1 9 8 2))、 5) 標的細胞に関する代謝産物、または 6) 標的細胞に結合する官能性ポリペプチド。遺伝子運搬のための構築体の効率は、数種類のヘパリン - I I ウイルス結合性ドメインを含有させ、したがって標的細胞に運搬されるウイルス粒子の量を増加させることによって、改善することができる。たとえば米国特許第 5 , 1 9 8 , 4 2 3 号明細書に記載されたフィブロネクチンの P r o 1 2 3 9 - S e r 1 5 1 5 に相当するヒトフィブロネクチン細胞結合性ドメインは、B H K および B 1 6 - F 1 0 細胞を含めた細胞に結合することが示された (K i m i z u k a r a , J . B i o c h e m . 1 1 0 , 2 8 4 - 2 9 1 (1 9 9 1))。さらに、ヘパリン - I I ドメイン自体が線維芽細胞、内皮細胞、および腫瘍細胞に結合することが示された。これらのポリペプチド配列をフィブロネクチン由来のレトロウイルス結合性ドメインに結合させて、レトロウイルスによる感染のために予め定めた細胞をターゲティングすることができる。

30

40

50

【0041】

造血系における用途の例には、それぞれ高特異性赤血球または顆粒球の前駆細胞をターゲティングするための、フィブロネクチンのレトロウイルス結合性ドメインに結合したエリトロポエチンまたはG-CSFの構築体が含まれる。本発明による他の一般的用途は、レトロウイルス結合性ドメイン（1または2以上）を、悪性細胞に特異的にまたは主として結合するリガンドと結合させることであろう。たとえば標的細胞上の受容体に結合する物質、たとえば下記のものを用いて、乳がん細胞のインビトロ増殖に、またインビボ増殖にすら影響を及ぼしうることを示された：黄体形成ホルモン放出性誘導体、Emons, G.ら, Hum. Reprod. 9: 1364 - 1379 (1994); エストロゲン、Tolcher, A.W., Oncol. 8: 39 - 43 (1994); またはアンチエストロゲン、Howell, A.ら, Lancet 345: 29 - 30 (1995); プロゲステロンまたはアンチプロゲステロン、Klijn, F.G.ら, Hum. Reprod. 9 Suppl. 1: 181 - 189 (1994); Griffiths, K.ら, Semin. Oncol. 21: 672 - 687 (1994); これらはフィブロネクチン由来のウイルス結合性ドメイン1または2以上を含む本発明の構築体においてリガンドとして用いられるであろう。他の例として、ヨウ化物を含む構築体を用いて甲状腺（がん）細胞を高度に特異的にターゲティングすることができ、またHDLもしくはその一部を含む構築体により肝（がん）細胞を高度に特異的にターゲティングすることができる。最後に、モノクローナル抗体およびフィブロネクチンのレトロウイルス結合性ドメインの構築体は、抗体が得られるいかなる細胞および器官をもターゲティングすることができるであろう。したがってフィブロネクチンのレトロウイルス結合性ドメインがウイルスベクターを結合および局在化しうる能力を利用することにより、広範な哺乳動物細胞タイプをターゲティングすることができる。

10

20

【0042】

したがって本発明の他の好ましい態様は、標的細胞のウイルス形質導入を増強するために使用しうる構築体を製造するものである。フィブロネクチンのヘパリン-II結合性ドメインのウイルス結合性アミノ酸配列を、標的細胞が結合するリガンドに結合させる。前記のように、リガンドはたとえばフィブロネクチン由来のもしくは他のタンパク質（細胞付着性タンパク質、たとえばラミニン、コラーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチンまたはトロンボスポンジンを含む）由来のポリペプチド、ホルモン、代謝産物、抗体（モノクローナル抗体を含む）、または標的細胞に、好ましくは特異的に結合する能力を示す他の任意のリガンドであってもよい。得られた構築体全体を、後記の実施例に具体的に例示するフィブロネクチンポリペプチドに用いたと同様な様式で固定化された形で用いることができる。

30

【0043】

構築体の安定性および特異性、ならびに生理的条件下でのレトロウイルス構築体の相互作用など種々の要因を考慮して、これらの構築体および細胞ターゲティング法を前記のようにインビトロでの、またインビボでのレトロウイルスによるターゲティングに用いることができる。運搬システムを改変して標的細胞への構築体の運搬を局在化することにより、たとえば肝細胞をターゲティングするために門脈にカテーテル挿入することにより、特異性を改良することもできる。

40

【0044】

本発明方法を実施するために特に設計されたキットを用いると、レトロウイルス仲介DNA導入が極めて簡便に実施されることが考えられる。したがって本発明の他の観点は、レトロウイルスによる標的細胞の形質導入を増強する量の前記の実質的に純粋なポリペプチドまたは構築体、およびレトロウイルス感染を実施しうる人工的支持体を含むキットを提供することができる。ポリペプチドまたは他の構築体は別個に、または人工的支持体にコートして供給することができる。ヒト造血細胞に関する感染プロトコールの場合、キットは細胞の予備刺激のための造血細胞成長因子をも含むであろう。さらにキットは形質導入のための前記の組換えレトロウイルスベクターを含むことができる。一般にキットは、キットの取り扱い中

50

に成分が漏出するのを防止するのに十分な程度に互いに間隔をおいてこれらの各種キット成分を保管する無菌のパッケージングを含むであろう。たとえばキット成分を互いに間隔をおいた関係に保持するための多数のコンパートメントまたは領域を備えたプラスチック成形品を用いるのが一般的である。

【0045】

本発明をさらに理解および認識しやすくするために、以下の具体例を提示する。これらの例は説明のためのものであって限定する性質のものでないことは理解されるであろう。

【0046】

【実施例】

実施例1 TKNEOを用いた骨髄細胞への遺伝子導入

10

1.1. ウイルス上清の調製

レトロウイルスプラスミドTKNEOベクターを含むGP+EnvAM 12産生細胞(Markowitzら(1988) Virology 167:400)を、10%のウシ胎児血清(FCS、ハイクローン、ユタ州ローガン)ならびに100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシン(P/S、両方ともギブコ)を含有するイスコブ(Iscove)の改変ダルベッコ培地(IMDM、ギブコ、マリーランド州ガイザースバーグ)中で培養した。20%FCSを含有するIMDMを10ml添加して平板を一夜で集密化することにより、ウイルスを含有する上清を採集した。収穫した培地を0.45ミクロンのフィルター(ゲルマン・サイエンシズ、ミシガン州アンアーバー)で濾過し、使用時まで-80℃に保存した。

20

【0047】

1.2. フィブロネクチンフラグメントの調製

Ruoslahtiら, Methods Enzymol. 82:803-831(1982)の記載に従ってヒト血漿(ライフソース、イリノイ州グランビュー)からFNを精製した。ただし4M尿素によるFNの溶離前にゼラチン-アガロースカラムを1M尿素で洗浄した。精製FNを4℃で10mM 3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパン-スルホン酸(CAPS)、150mM NaCl、2mM CaCl₂、pH11.0に対して徹底的に透析し、少量ずつに分けて-80℃に保存した。FNのキモトリプチック細胞結合性ドメイン(CBD)(CS-1)およびヘパリン-II結合性フラグメントを先の記載に従って精製した(Ruoslahtiら(1982), 前掲、PatelおよびLodish, J. Cell Biol. 102, pp. 449-456(1986)、並びにBernardiら, J. Cell Biol. 105, pp. 489-498(1987))。ヘパリン-アガロースカラムからの1M NaCl溶出液中に3つの主要なヘパリン結合性フラグメント(30kD、35kDおよび42kD)が得られた。これらのヘパリン結合性フラグメントをさらに精製するために、1M NaCl溶出液を4℃で10mM トリス-HCl(pH7.0)に対して一夜透析し、10mM トリス-HCl(pH7.0)で平衡化したアニオン交換カラム(2ml DEAEセファロース高速用(ファルマシア・ファイン・ケミカルズ、スウェーデン国ウプサラ)/mgタンパク質)に導通した。30/35kDフラグメントは結合しない画分中に採集され、一方42kDフラグメントはカラムから100mM NaClで溶離された。500mgのFNからほぼ26mgの30/35kDフラグメントおよび4mgの42kDフラグメントを得た。ウェスタンブロッティング法で測定すると、42kDフラグメントはフィブリン結合性ドメインに対する抗体により認識されたが、30/35kDフラグメントは認識されなかった。42kDフラグメントはフィブリン-セファロースアフィニティーカラムにも結合する。

30

40

【0048】

感染プロトコールに用いるために、フィブロネクチンフラグメントをPatelおよびLodish(1986)、前掲、の記載に従って35または100mmのペトリ皿(ファルコン、ニュージャージー州リンカーン・パーク)上に75pmol/cm²の濃度で固定化した。対照の皿に2%(無FN)ウシ血清アルブミン(BSA、ベーリンガー・マン

50

ハイム、ドイツ国マンハイム)で同様にコートした。

【0049】

1.3. レトロウイルス感染プロトコール

健康な成人ドナーから骨髓試料を、インディアナ医科大学 Institutional Review Board により立証されたプロトコールに従って、無菌の、防腐剤を含有しない硫酸ナトリウムヘパリンを入れた試験管中へ採集した。フィコール - ハイパック (Ficoll - Hypaque) (密度 1.077 g/ml 、ファルマシア、ニュージャージー州ピスカッタウェイ) 上において 25°C で 45 分間遠心分離することにより、低密度単核細胞を調製した。さらに 37°C で 2% FCS を含有する IMDM 中、 5% CO_2 において $4 - 16$ 時間、組織培養皿上でインキュベートすることにより、プラスチック付

10

【0050】

付着陰性の低密度単核細胞をレトロウイルス感染前に、先に Luskey ら (1992) Blood 80:396 が記載したものに従って 37°C で 48 時間、 20% FCS、 100 U/ml rhIL-6、 100 ng/ml rhSCF (両方ともアムゲン、カリフォルニア州サウザンド・オークス)、および P/S を含有する IMDM 中、 5% CO_2 において細胞密度 1×10^6 個 $/\text{ml}$ でペトリ皿内において予備刺激した。激しくピペッティングしてプラスチックにゆるく付着した細胞を除去することにより、予備刺激した細胞を収穫した。

【0051】

予備刺激した細胞 (5×10^5 細胞 $/\text{ml}$) を、BSA (対照のプレート) またはフィブロネクチンもしくはそのフラグメント (タンパク質をより良くプラスチックプレートに付着させるために UV 照射した) でコートしたプレート上で 6 時間インキュベートし、次いで成長因子 (前記) および $7.5 \mu\text{g/ml}$ のポリブレン (アルドリッチ・ケミカル、ワイオミング州ミルウォーキー) の存在下にウイルス上清を感染させた。ウイルス上清を 2 時間後に交換し (成長因子および $5.0 \mu\text{g/ml}$ のポリブレンを含有)、細胞をさらに $12 - 24$ 時間インキュベートした。培地交換の度に付着していない細胞を再添加した。

20

【0052】

感染プロトコールに従って、付着していない細胞をデカントし、付着した造血細胞を培養物から細胞解離用緩衝液 (CDB) (無酵素 / PBS 系、ギブコ) により採集した。付着細胞を非付着画分に添加し、 2 回洗浄し、計数した。収穫した細胞をクローン原性メチルセルロース前駆細胞アッセイまたは長期骨髓培養において平板培養した。

30

【0053】

1.4. 長期骨髓培養

LTC-IC (ヒト幹細胞) アッセイを先に記載された方法に従い、わずかに改変して実施した。Sutherland ら, Blood 74:1563 (1989)。以下に要約する。 $0.5 - 1 \times 10^6$ 個の感染細胞を、 6 ウェル組織培養プレート (コスター、マサチューセッツ州ケンブリッジ) 中で、 10% FCS、 10% ウマ血清 (シグマ) および P/S、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ヒドロコルチゾン (アップジョン、ミシガン州カラマズー) ならびに 320 mosmol 塩化ナトリウムを含有する IMDM 5 ml 中の、集密的な前照射した (前記に従う) 同種ヒト骨髓線維芽細胞 (BMF) 上での長期骨髓培養 (LTMC) に接種した。LTMC を 33°C において 5% CO_2 中でインキュベートし、 50% の培地および付着していない細胞を分離することにより週 1 回供給した。 5 週間後に、付着した造血細胞を CDB により BMF から分離することによって、LTC-IC 培養物を殺した。付着していない造血細胞および付着した造血細胞の両方を合わせてメチルセルロース中で平板培養し、LTC-IC 由来のコロニーを得た。

40

【0054】

1.5. クローン原性メチルセルロースアッセイ

メチルセルロースアッセイを先に Toksoz ら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 89, p 7350 (1992) が記載したものに従い、わずかに

50

改変して実施した。以下に要約する：2 - 5 × 10⁴個の感染した成人骨髄細胞を、5 U / mlのエリトロポエチン (Epo、アムゲン)、100 ng / ml rhSCF、10 ng / ml rhIL-3 (ゲンザイム、マサチューセッツ州ケンブリッジ) と共に、25 % FCS、10 % ヒト血漿、10⁻⁵ M ベータ-メルカプトエタノール (シグマ) および P / S を含有する 2 . 4 % IMDM メチルセルロース (フルカ、ニューヨーク州ロンコンコーマ) 1 ml 中で平板培養した。培養物を 37 °C で 5 % CO₂ / 95 % 空気中においてインキュベートし、13 日目に倒立顕微鏡で観察することによりコロニー (> 50 細胞) を CFU - GM (顆粒球およびマクロファージを含有)、CFU - Mix (骨髄様および赤血球様要素を含有)、または BFU - E (赤血球様要素のみを含有) として計数した。

【0055】

10

1.6. レトロウイルス感染の分析

13 日目に 1 . 5 mg / ml の G418 (乾燥粉末、ギブコ) に対して耐性であるメチルセルロースコロニーの % を測定することにより、TKNEO ウイルスによる感染効率を分析した。各実験において、骨髄を GP + EnvAM 12 パッケージング系上で組換えウイルスを形成させずにインキュベートすることにより、模擬感染を行った。これらの模擬感染細胞を 1 . 5 mg / ml の G418 と共に培養したものは、常に < 1 % のバックグラウンドコロニーを示した。

【0056】

1.7. コミットッド前駆細胞への遺伝子導入効率

骨髄細胞を 30 / 35 FN コートまたは BSA コートした皿で平板培養した状態で感染させることにより、形質導入効率を比較した。これらの条件下では選択なしに感染させたのちに得られたコロニー数には差がなかった。図2は感染後の G418^r コロニーの % を示す。系列限定 (lineage-restricted) 前駆細胞 (BFU - E および CFU - GM) および多系列 (multilineage) 前駆細胞 (CFU - Mix) に由来するものを含めてすべてのタイプの前駆細胞に由来する 30 / 35 FN 上に、高率の G418^r コロニーが認められた。BSA と対比して 30 / 35 FN 上ではすべてのコミットッド前駆細胞への感染が 9 倍増大した。

20

【0057】

1.8. 長期培養開始細胞への遺伝子導入効率

TKNEO ベクターを用いて LTC - IC への遺伝子導入を評価した。LTC - IC 由来のコロニーへの遺伝子導入は 30 / 35 FN 上での感染後に検出されたにすぎない (16 % G418^r コロニー対 0 % G418^r コロニー、30 / 35 FN 対 BSA)。

30

【0058】

1.9. 造血細胞の感染効率に対する 30 / 35 FN 作用の特異性

30 / 35 FN 上で見られた遺伝子導入効率増大の特異性を判定するために、TKNEO による感染を下記のものでコートした皿上で実施した：BSA、30 / 35 FN、無傷のフィブロネクチン、RGDS テトラペプチド配列を含む中心-細胞結合性ドメイン (CBD) を含む 115 kd の FN フラグメント、ヘパリン- II 結合性ドメインを特色とし、ただし CS - 1 配列を欠如する 42 kd C - 末端 FN フラグメント (42 FN) (図1)。BSA 上での感染では、3 ± 1 % の G418^r BFU - E、1 ± 1 % の G418^r CFU - GM、および 0 ± 0 % の G418^r CFU - Mix が得られた。CBD 上では G418^r コロニーの割合には有意の増大が認められず、一方 42 FN 上ではわずかに高い BFU - E (6 . 0 ± 1 %) の感染が見られた (図3)。しかし無傷の FN はすべてのコミットッド前駆細胞への遺伝子導入の増大を促進した。無傷の FN 上での感染後の G418^r コロニーの割合は、下記を含めてすべての系列において 30 / 35 FN 上でのものより低かった：BFU - E (16 ± 2 対 24 ± 4 %)、CFU - GM (5 ± 2 対 20 ± 4 %)、および CFU - Mix (6 ± 1 対 9 ± 1 %); それぞれ無傷の FN 対 30 / 35 FN。

40

【0059】

実施例 2 P G K - m A D A を用いた骨髄細胞への遺伝子導入

50

2. 1. 一般法

P G K - m A D A ウイルス上清を、実施例 1 において T K N E O につき記載したと同様に調製した。フィブロネクチンのキモトリプチックフラグメント (図 1) を先に実施例 1 に記載したと同様に調製し、実施例 1 のレトロウイルス感染プロトコルに従った。L T C - I C (ヒト幹細胞) アッセイおよびメチルセルロースアッセイを実施例 1 に従って実施した。

【 0 0 6 0 】

2. 2. レトロウイルス感染の分析

P G K - m A D A ベクターによる感染効率を、A D A アイソザイム電気泳動によるタンパク質分析により測定した。個々の前駆細胞コロニーの分析を、先に M o r i t z (1 9 9 3) および L i m ら (1 9 8 9) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , V o l . 8 6 , p 8 8 9 2 が記載したと同様に実施した。導入効率を厳密に分析するために、内因性ヒト A D A と同じか、またはより高い水準の m A D A を発現するコロニーのみを形質導入されたとみなした。プールしたコロニーの分析のために、メチルセルロース培養物から取り出したコロニーを 1 . 5 m l ミクロ試験管 (レイニン、マサチューセッツ州ウーバン) 内で一緒にし、温培地およびリン酸緩衝食塩水 (P B S) で洗浄し、遠心分離し、- 2 0 ° C に保存した。A D A 分析のために、細胞を 5 μ l の細胞溶解用緩衝液中で反復凍結融解サイクルにより溶解し、先の記載に従ってアイソザイム電気泳動を実施した。

【 0 0 6 1 】

2. 3. コミットッド前駆細胞への遺伝子導入効率

骨髄細胞を 3 0 / 3 5 F N コートまたは B S A コートした皿上で平板培養した状態で感染させることにより、形質導入効率を比較した。これらの条件間に、選択なしの感染後に得たコロニー数の差は見られなかった。表 1 に示すように、すべてのコミットッド前駆細胞への感染効率が B S A に対比して 3 0 / 3 5 F N 上で実質的に増大した。高力価 (約 1×10^7 ウイルス粒子 / m l) ベクターを用いる場合に予想されたように、コミットッド前駆細胞の形質導入効率は著しく高かった。表 1 を参照すると、3 0 / 3 5 F N 上での骨髄の P G K - m A D A 感染により、別個の 2 実験でコミットッド前駆細胞のほぼ 1 0 0 % の形質導入が得られた。

【 0 0 6 2 】

【 表 1 】

表 1

P G K - m A D A ベクターを用いた
フィブロネクチン 3 0 / 3 5 フラグメント上における
コミットッドヒト前駆細胞の感染効率

実験	BSA	30/35FN
実験 1	1/18*	13/14
実験 2	2/13	12/13

* m A D A 発現コロニー数 / 分析した全コロニー数

【 0 0 6 3 】

2. 4. 長期培養開始細胞への遺伝子導入効率

P G K - m A D A を用いて行った 4 つの独立した実験で、有意の割合の 5 週齢 L T M C 由

来の前駆細胞コロニー（すなわちLTC-IC由来のコロニー）が、導入されたネズミADA遺伝子を発現した。発現は分析したコロニーのうち2/12（17%）-6/6（100%）に及んだ（表2）。導入されたmADA遺伝子の発現は、陽性であるとみなされたすべてのコロニーにおいて内因性ヒトADA活性を上回るか、または少なくともそれと同等であった。PGK-mADAに関する感染効率はTKNEOに関するよりも高かった。表2に示すように、2つの別個の実験において30/35 FN上での骨髓のPGK-mADA感染により、コミッティッド前駆細胞のほぼ100%の形質導入が得られた。

【0064】

【表2】

表2

PGK-mADAベクターを用いた

ヒト長期培養開始細胞（LTC-IC）の感染効率

実験	BSA	30/35FN
実験1	0/14*	10/19
実験2	N/A	2/12
実験3	0/4	3/5
実験4	0/4	6/6
合計	0/22	21/42

* mADA陽性コロニー数/分析した全コロニー数

N/A：分析せず

【0065】

2.5. 造血細胞の感染効率に対する30/35 FN作用の特異性
LTC-IC中への遺伝子導入効率が30/35 FN上で増大した。これらの二次LTC-IC由来コロニーの大きさが比較的小さいため、単一コロニーにつきタンパク質分析を行う可能性には限界があった。BSA、無傷のフィブロネクチン、および42 FN上でのPGK-mADA感染後にネズミADAの発現を示したのは、それぞれ0/6、0/4および0/3のLTC-IC由来コロニーであったが、30/35 FN上で感染させたLTC-IC由来コロニー3/5がmADAを発現した。さらに、多数のLTC-IC由来コロニーをプールしたのち2つの追加実験で分析した場合、mADA発現は30/35 FN上、およびこれより低いが無傷のFN上での感染後にのみ検出され、42 FNまたはBSA上では検出されなかった。

【0066】

実施例3 PGK-hADAを用いた骨髓細胞への遺伝子導入

3.1. 一般法

PGK-hADAウイルス上清を実施例1においてTKNEOにつき記載したと同様に調製する。フィブロネクチンのキモトリプチックフラグメント（図1）を先に実施例1に記載したと同様に調製し、実施例1のレトロウイルス感染プロトコルに従う。LTC-ICアッセイおよびメチルセルロースアッセイを実施例1に従って実施する。

【0067】

3.2. レトロウイルス感染の分析

プールしたコロニーの分析のために、メチルセルロース培養物から取り出したコロニーを1.5 ml ミクロ試験管（レイニン、マサチューセッツ州ウーバン）内で一緒にして、温培地およびPBSで洗浄し、遠心分離し、-20℃に保存する。ADA分析のために、細胞を5 µlの細胞溶解用緩衝液中での反復凍結融解サイクルにより溶解し、前記に従ってアイソザイム電気泳動を実施する。

【0068】

実施例4 TKNEOを用いた臍帯血細胞への遺伝子導入

4.1. 一般法

TKNEOウイルス上清およびフィブロネクチンのキモトリプチックフラグメント（図1）を先に実施例1に記載したと同様に調製した。実施例1のレトロウイルス感染プロトコールに従い、ただし正常な満期新生児からの臍帯血をインディアナ医科大学Institutional Review Boardにより立証されたプロトコールに従ってヘパリンを入れた試験管中へ採集し、骨髓細胞の代わりに使用した。LTC-IC（ヒト幹細胞）アッセイおよびメチルセルロースアッセイを実施例1に従って実施した。

【0069】

4.2. コミッティッド前駆細胞への遺伝子導入効率

3つの別個の実験において、30/35 FN上での感染はBSAと比較して4倍以上増大した（表3）。

【0070】

【表3】

表3

30/35 FNフラグメントおよびTKNEOベクターを用いた

臍帯血前駆細胞の感染効率

BSA	12 ± 17
30/35	55 ± 16

【0071】

実施例5 PGK-mADAを用いた臍帯血細胞への遺伝子導入

5.1. 一般法

PGK-mADAウイルス上清およびフィブロネクチンのキモトリプチックフラグメント（図1）を、先に実施例1に記載したと同様に調製した。実施例1のレトロウイルス感染プロトコールに従い、ただし正常な満期新生児からの臍帯血をインディアナ医科大学Institutional Review Boardにより立証されたプロトコールに従ってヘパリンを入れた試験管中へ採集した。LTC-ICアッセイおよびメチルセルロースアッセイを実施例1に従って実施した。

【0072】

5.2. 長期培養開始細胞への遺伝子導入効率

高力価PGK-mADAベクターを用いた場合、LTC-IC由来のコロニーの分析により、上清をFN30/35上で用いて感染させた臍帯血から株化された培養物からのみ、導入mADAcDNAの高水準の発現が証明された。BSA対照プレートで感染させたLTC-IC由来のコロニーにはほとんどmADAの発現が検出されなかった。

【0073】

実施例4および5に示した結果は、臍帯血前駆細胞および幹細胞を用いた場合にもFN3

10

20

30

40

50

0 / 35 を用いることによって改良された感染効率を達成しうることを証明する。

【0074】

実施例6 PGK-hADAを用いた臍帯血細胞への遺伝子導入

PGK-hADAウイルス上清およびフィブロンネクチンのキモトリプチックフラグメント（図1）を、実施例1にTKNeoにつき記載したと同様に調製する。実施例1のレトロウイルス感染プロトコルに従い、ただし正常な満期新生児からの臍帯血をインディアナ医科大学 Institutional Review Boardにより立証されたプロトコルに従ってヘパリンを入れた試験管中へ採集し、骨髓細胞の代わりに使用する。LTC-ICアッセイおよびメチルセルロースアッセイを実施例1に従って実施する。

【0075】

実施例7-11

実施例7-11のレトロウイルスベクターおよび産生細胞系

実施例7-11には2種類のレトロウイルス産生パッケージング細胞系を用いた：それぞれエコトリピックGP+E86細胞系（Markowitz, D., S. GoffおよびA. Bank, J. Virol., Vol. 62, pp 1120-1124 (1988)）およびアンフォトリピックGP+envAM12細胞系（Markowitz, D., S. GoffおよびA. Bank, Virology, Vol. 167, pp 400-406 (1988)）。ここに記載した実験で用いたレトロウイルスベクターおよび産生クローンを表4に挙げる。

【0076】

【表4】

表4

ベクター	産生細胞／クローン	cDNA 発現
PGK-hADA	GP+E86/EPHA-5	ヒト ADA
PM5neo	GP+E86/EAL2a	neo ホスホトランスフェラーゼLAC-Z
TKNeo	GP+E86/TKNeo	neo ホスホトランスフェラーゼ
PGK-mADA	GP+EnvAM12/55/6	ネズミ ADA

【0077】

細胞系はすべて10%のウシ胎児血清（FCS、ハイクローン、ユタ州ローガン）および100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシン（P/S、両方ともギブコ）を含有する改変ダルベッコ培地（DME、ギブコ、ニューヨーク州グランドアイランド）中で培養された。ただしEAL2a細胞は10%FCSおよびP/Sを含有するDME-F12（ギブコ）中で増殖させた。ネズミ細胞については、それぞれ10%FCSプラスP/Sを含有するアルファ最小必須培地（αMEM、ギブコ）またはヒト細胞についてはイスコブのダルベッコ培地（IDME、ギブコ）10mlを添加して、10cmのプレートを一夜集密化させることにより、ウイルスを含有する上清を採集した。収穫した培地を0.45ミクロンのフィルター（ゲルマン・サイエンシズ、ミシガン州アンアーバー）で濾過し、使用時まで-80℃に保存した。

【0078】

実施例7 一次ネズミ造血細胞の形質導入

7.1. 実験

ネズミ細胞を用いる実験のために、6-8週齢のC3H/HeJマウスの大腿骨および脛骨から、150mg/kgの5-フルオロウラシル（ソロパック・ラボラトリーズ、イリノイ州フランクリン・パーク）投与の2日後に骨髓を収穫した（Lim, B., J. F. Apperley, S. H. OrkinおよびD. A. Williams, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 86, pp 8892-8896 (1989)）。

9))。細胞を 5×10^5 細胞 / ml の濃度において IMDM / 20 % FCS プラス P / S 中で、 100 ng / ml のラット組換え幹細胞因子 (r r S C F ; アムゲン、カリフォルニア州サウザンズ・オークス) および 100 U / ml の組換えヒトインターロイキン - 6 (r h I L - 6 ; ペプロ・テク・インコーポレーテッド、ニュージャージー州ロックヒル) により 48 時間予備刺激した (L u s k e y , B . D . , M . R o s e n b l a t t , K . Z s e b o および D . A . W i l l i a m s , B l o o d , V o l . 80 , p p 396 - 402 (1992)) 。次いで E P H A - 5 産生細胞が産生した P G K - h A D A ベクターによる遺伝子導入効率を 3 つの異なる感染プロトコールにより比較した : 1) 上清感染 ; 2) F N 30 / 35 上での上清感染 ; 3) E P H A - 5 産生細胞上での同時培養。したがって 100 mm の細菌皿に、 5 ml のリン酸緩衝食塩水 (P B S ; ギブコ) に溶解した $2.5 \mu \text{g / cm}^2$ の F N 30 / 35 ($75 \text{ p m o l / cm}^2$ に相当) で室温において UV 光線下に、皿の蓋を開けた状態で 1 時間、そして皿の蓋を閉じた状態でさらに 1 時間コートした。2 % ウシ血清アルブミン (B S A 、フラクシオン V ; ベーリンガー・マンハイム、インディアナ州インディアナポリス) により室温で 30 分間ブロッキングしたのち、2 . 5 % (v / v) の 1 M H e p e s を補充したハンクスの平衡塩類溶液 (H B S S) (両方ともギブコ) で皿を 1 回洗浄した。上清感染のためには皿を B S A のみでコートした。 5×10^6 個の予備刺激したドナー細胞を、前記に従って E P H A - 5 細胞から得たウイルス上清 10 ml に 100 U / ml の r h I L - 6 、 100 ng / ml の h r S C F および $7.5 \mu \text{g / ml}$ のポリブレンを補充したものと共にインキュベートした。付着していない細胞を採集し、新鮮なウイルス上清を再添加した。同時培養のためには、培地 4 ml 中の E P H A - 5 細胞を $10 \mu \text{g / ml}$ のマイトマイシン C と共に 37 で 2 時間インキュベートし、洗浄し、トリプシン処理し、 100 mm の組織培養皿に 10 ml の $\alpha \text{ M E M / 20 \% FCS プラス P / S}$ 中 3×10^6 個の細胞濃度で接種した。翌日、 100 U / ml の r h I L - 6 、 100 ng / ml の h r S C F および $4 \mu \text{g / ml}$ のポリブレンで予備刺激した 5×10^6 個の骨髓細胞を 48 時間添加した。感染プロトコール後に付着していない細胞をデカントし、付着した造血細胞を培養物から細胞解離用緩衝液 (C D B) (無酵素 / P B S 系、ギブコ) により、製造業者の指示に従って採集した。付着細胞を非付着画分に添加し、2 回洗浄し、約 1 ml の H B S S / H e p e s に懸濁した。 5×10^6 個の予備刺激した細胞から得た全細胞を、致死量の全身照射 ($700 \text{ プラス } 400 \text{ c G y}$ による、 $^{137} \text{Cs}$ - 源) した 3 匹のレシピエントマウスの尾静脈に注射した (L u s k e y , B . D . , M . R o s e n b l a t t , K . Z s e b o および D . A . W i l l i a m s , B l o o d , V o l . 80 , p p 396 - 402 (1992)) 。再構成マウスを、導入したヒト A D A c D N A の発現につき検査することにより、造血幹細胞の形質導入を分析した。この A D A アイソザイム分析は、移植したマウスにおいて末梢血細胞を酢酸セルロース i n s i t u 酵素分析により h A D A タンパク質の存在につき検査することによって実施された (L i m , B . , D . A . W i l l i a m s および S . H . O r k i n , M o l . C e l l . B i o l . , V o l . 7 , p p 3459 - 3465 (1987)) 。検査は移植後 4 カ月目から実施し、月毎に反復した。

【 0079 】

7 . 2 . 結果

遺伝子操作した造血幹細胞によるマウスの長期骨髓再構成は、一般に移植の 4 カ月後に幹細胞形質導入効率を判定するのが適切であると受け取られている。7 カ月後にレシピエントの形質導入骨髓をアイソザイム分析により分析して、下記のことになった : 1) ヒト A D A c D N A 発現は同時培養または F N 30 / 35 上での上清感染を採用した場合に存在したが、F N 30 / 35 なしの上清感染後に移植した群には存在しなかった ; および 2) 発現の水準は同時培養群と F N 30 / 35 群で同等であった。図 4、2 - 4 列に示すように、E P H A - 5 細胞上での同時培養により形質導入された骨髓を移植した 3 匹のマウスは容易に検出するヒト A D A を立証した。同様な水準のヒト A D A が、F N 30 / 35 上でのの上清感染により形質導入された造血細胞を移植した 3 匹のマウスに検出された (図 4、5 - 7 列) 。これに対し、B S A 上での上清感染により形質導入された

10

20

30

40

50

3匹のマウスにはヒトA D Aが検出されなかった(図4、8-10列)。ヒトA D Aの位置に関する対照を図4の1および12列に、ネズミA D Aに関する対照を11列に示す。2-10列のネズミバンドは等量のタンパク質が装填されたことを明らかにする。これらのデータはF N 3 0 / 3 5 上での上清感染による長期再構成性の造血幹細胞の形質導入が同時培養と同等であり、かつF N 3 0 / 3 5 なしの上清感染よりはるかに優れていることを立証する。

【0080】

実施例8 F N 3 0 / 3 5 へのレトロウイルスベクター結合による形質導入改良のメカニズム

8.1. 実験

形質導入の増大がウイルスと造血細胞の同時局在の結果であるか否かを調べるために、組換えレトロウイルス粒子がF N 3 0 / 3 5 への結合を示すか否かを分析した。したがってF N 3 0 / 3 5 コートしたプレートを、T K N E Oウイルスを含有する上清と共に30分間ブレインキュベートしたのち、徹底的に洗浄した。上清のウイルス力価を標準法により、N I H / 3 T 3細胞を用いて測定した(Markowitz, D., S. GoffおよびA. Bank, J. Virology, Vol. 62, pp 1120-1124 (1988))。以下に要約する: 3 T 3細胞を1000個/ウェルの濃度で6ウェル組織培養プレートに接種し、一夜増殖させた。各ウェルにウイルス上清の系列希釈液を7.5 μ g/mlのポリブレンと共に添加し、37℃で2.5時間インキュベートしたのち、2mlの培地を添加した。24時間後に培地をG 4 1 8 (0.75 mg/ml、乾燥粉末、ギブコ) 含有培地と交換し、プレートを10-12日間インキュベートした。G 4 1 8 耐性コロニー(G 4 1 8^r)を10-12日後に染色し、計数した。コロニー/ウェル×ウイルス上清希釈度の数値を、感染性粒子数(cfu)/上清mlとして用いた。F N 3 0 / 3 5 コートまたはB S Aコートした35mmのプレートをウイルス上清と共にブレインキュベートし、徹底的に洗浄したのち、35mmの細菌用皿当たり1000個のN I H / 3 T 3およびポリブレンを添加することにより、プレート上に残留するレトロウイルス粒子の量を評価“力価測定”した。24時間後に培養物に0.75 mg/mlのG 4 1 8 (乾燥粉末)を含有する培地を供給し、細胞をさらに10-12日間インキュベートした。このインキュベーションののち、G 4 1 8 耐性N I H / 3 T 3コロニーを計数することにより付着ウイルスの存在を定量した。

【0081】

F N 3 0 / 3 5 へのウイルスの結合が用量依存性様式で起こるか否かを評価するために、皿をコートするF N 3 0 / 3 5 の濃度を漸増させて上記実験を反復した。したがって35mmの細菌用皿を上記に従って1、4、10および20 μ g/cm²のF N 3 0 / 3 5 でコートした。予め感染性粒子1×10⁴個/mlと力価測定されたT K N E Oウイルス原液の1:50希釈液を、F N 3 0 / 3 5 コートしたプレート上で30分間インキュベートした。徹底的に洗浄したのち、各ウェルに2000個のN I H / 3 T 3細胞を添加した。上記に従って選択を行い、10日間の選択後にG 4 1 8 耐性N I H / 3 T 3コロニーを計数した。

【0082】

8.2. 結果

図5に代表的な3実験中の1つの結果を提示する。T K N E O上清を用いた場合、N I H / 3 T 3細胞中のG 4 1 8^rコロニーにより測定したレトロウイルス力価が、B S Aコートしたプレート上では3 log以上低下した(4×10³から0)が、力価低下は30/35 F Nコートしたプレート上では1 logにすぎなかった。これらのデータは、レトロウイルスがF N 3 0 / 3 5 には定量的に結合するが、B S Aコートした皿(対照の皿)のは結合しないことを証明する。図6は、ウイルス含有上清をより高い濃度のF N 3 0 / 3 5 でコートすると、より多数のG 4 1 8 耐性コロニーが検出されたことを示す。したがってF N 3 0 / 3 5 へのウイルスの結合は用量依存性の様式で起こる。

【0083】

実施例 9 組換えフィブロネクチンフラグメントへのウイルスの結合

9.1. 実験

Kimizukaらは先に大腸菌におけるクローン化FN DNA配列の発現につき報告した(Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, D. Hashino, I. Kato, K. SekiguchiおよびK. Titani, J. Biochem., Vol. 110, pp 284 - 291 (1991))。クローン化およびキメラペプチドは細胞の付着に与ることが知られている、フィブロネクチン中の幾つかの重要な配列の1つまたは組合わせを含む(RGDS、CS-1およびヘパリン結合部位を含む)。図7を参照されたい。レトロウイルスがこれらの組換えFNフラグメントに結合しうるか否かを分析するために、陽性対照としての組換えフラグメントC-274、H-271、H-296、CH-271、CH296、C-CS1およびFN30/35でコートしたプレート上で、感染性粒子 1×10^4 / mlの凍結レトロウイルスTKNEO原液の2種類の異なる希釈液(1:10および1:100)を用いて3T3細胞コロニー形成アッセイを反復した。FNフラグメントは $120 - 130 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ の濃度で用いられた(C-274、H-271、H-296、C-CS1、FN30/35については $4 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ 、CH-271、CH296については $8 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ に相当)。要約すると、プレートをコートし、ウイルスを添加し、プレートを徹底的に洗浄し、NIH/3T3細胞を24時間添加し、次いで選択培地中で10日間選択したのちコロニーを染色し、計数した。

【0084】

9.2. 結果

図8は、フラグメントH-271、H-296、CH-271およびCH296においてG418耐性コロニー数(したがってウイルスの付着)が増加したことを証明する。さらにこれは、結合したウイルスの量がこれらの組換えフラグメントとFN30/35との間でほぼ同等であったことを示す。ただしこの実験ではCH-271フラグメントが最高水準のウイルス結合を示した。これら5種類のFNフラグメントすべてに共通して、高親和性のヘパリン結合部位を含むタイプIII反復配列12-14がある(Ruoslahti, E., Ann. Rev. Biochem., Vol. 57, pp 375 - 413 (1988))、およびKimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. SekiguchiおよびK. Titani, J. Biochem., Vol. 110, pp 284 - 291 (1991))。この部位は恐らく反復配列13内に位置すると思われる(Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. SekiguchiおよびK. Titani, J. Biochem., Vol. 110, pp 284 - 291 (1991))。これは、ウイルス結合がこの既知の付着部位により起こっていることを示唆する。これは、 $4 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ のCH-271でコートした皿を、漸増する濃度($10 - 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$)のヘパリン硫酸、すなわちヘパリン結合部位への細胞の結合を阻害することが知られている高度に帯電した分子と共にブレインキュベートすることにより証明された。図9に示すように、ヘパリン硫酸の濃度が増大するのに伴ってCH-271のブレインキュベーションによりG418耐性コロニー数が減少する。これらのデータは、FNへのウイルスの結合がFNのカルボキシル末端のCS-1部位のすぐ隣に位置する高親和性ヘパリン結合部位により仲介されることを示唆する。

【0085】

実施例 10 組換えフィブロネクチンフラグメント上での造血細胞の形質導入

10.1. 実験

FN30/35につき先に記載した造血細胞の形質導入の増大が組換えFNフラグメントを用いた場合にも見られるか否かを分析するために、高増殖性の潜在的コロニー形成性細胞(HPP-CFC)アッセイ法を用いて、インビトロでの上清感染の形質導入効率を評価した。EAL2aベクターを使用し、遺伝子導入を指示するものとしてG418耐性コ

ロニーの増殖を利用する造血細胞形質導入に種々の組換えFNフラグメントが及ぼす影響を、FN30/35またはBSA上での上清感染と比較した。さらに、既にFNフラグメントに付着したウイルス粒子（上清ウイルスと対比）が造血細胞に形質導入する能力を比較した。0.5 - 1×10^6 個の予備刺激した骨髓細胞を35mmのFNコートしたペトリ皿上で、成長因子および5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレンを含有するEAL2aウイルス含有上清1 - 2ml中において、前記に従ってインキュベートした。FNフラグメントに結合したウイルスによる造血細胞の形質導入を評価するためには、ウイルス含有上清と共にインキュベートした35mmのFNコート皿をそれぞれ2mlのPBSで3回洗浄した。次いで0.5 - 1×10^6 個の予備刺激した骨髓細胞を、成長因子およびポリブレンを補充した培地2ml中において添加した。22時間後に細胞を収穫し、1.5mg/mlのG418を含有する、および含有しないHPP-CFCアッセイに接種した（Bradley, T. R. および D. Metcalf, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., Vol. 44, pp 287 - 293 (1966) の記載に従う）。培養物を7% CO₂中で33℃において14日間インキュベートし、G418耐性コロニーの%として遺伝子導入効率を計算した。

【0086】

10.2. 結果

上清感染による未発達の造血細胞の形質導入（図10参照）は、ヘパリン結合部位（HS）および少なくともさらに1つの有効な細胞付着部位を含むすべてのフラグメントにつき、BSA上での上清感染より有意に高かった（中実の棒）。組換えフラグメントCH-271、H-296、CH-296およびC-CS1の形質導入効率は、FN30/35、ヘパリン結合部位およびCS-1部位の両方を含む3フラグメントすべての作用と類似していた。他のすべての場合、形質導入は著しく低下した。これらのデータは、先にFN30/35につき示した未発達の造血細胞の形質導入増大を組換えFNフラグメントについて再現しうることを証明する。それはさらに、フィブロネクチンに直接に結合したウイルスが造血細胞の遺伝子形質導入を行いうることを証明する。最後にそれは、CS-1とヘパリン結合部位の両方が存在することが未発達の造血前駆（幹）細胞の形質導入に有用であることを確認する。

【0087】

実施例11 組換えフィブロネクチンフラグメント上でのネズミドナー細胞の形質導入を利用したマウスの長期骨髓再構成

11.1. 実験

未発達の造血前駆細胞についての前記のインビトロ実験（実施例10から）を、BSAまたはFN30/35または組換えFNフラグメント上での上清感染と同時培養とを対比しながら、骨髓移植を用いて反復し、造血幹細胞の再構成に対する影響を分析した。以下に要約する：致死量照射したマウスに、ヒトADA cDNAを含むEPHA-5ベクターを形質導入したドナー細胞を注射した。1カ月後に末梢血からADAアイソザイム分析により遺伝子導入効率を分析した。

【0088】

11.2. 結果

図11は、ヘパリン結合部位とCS-1の両方を含むフィブロネクチンフラグメントH-296がFN30/35および同時培養と類似の結果を与えることを明瞭に示す。これらの部位を両方を含むものでないフラグメントは移植可能な造血細胞の形質導入における有効性がより低い。これらのデータは、未発達の造血/幹細胞と、CS-1およびヘパリン結合部位の両方を含む組換えFNフラグメントに結合したレトロウイルスとの同時局在によって、移植可能な造血細胞が効果的に形質導入されることを証明する。

【0089】

以上の記載において本発明を詳細に説明および記述したが、これは説明のためのものであって限定する性質のものではないと考えるべきであり、好ましい態様を記載したものであって、本発明の精神に包含される変更および修正はすべて保護されることを望むと解すべ

10

20

30

40

50

きである。

【 0 0 9 0 】

本明細書に引用した刊行物はすべて、それらが個々に引用されて完全に提示されたと同様に、それらの全体が参考として本明細書に含まれるものとする。

【 0 0 9 1 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> ADVANCED RESEARCH & TECHNOLOGY INSTITUTE

NORTHWESTERN UNIVERSITY

10

<120> ENHANCED VIRUS-MEDIATED DNA TRANSFER

<130> 021762

<150> US 08/218,355

<151> 1994-3-25

<160> 2

20

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr

30

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr

20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile

35 40 45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val

50 55 60

40

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro

85 90 95

Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile

20 25

50

【図2】図2は、フィブロネクチンフラグメントの存在下でTKNEOベクターを用いたコミットド(committed)ヒト前駆細胞の感染効率を示す；実施例1に詳細に記載する。

【図3】図3は、フィブロネクチンまたはそのフラグメントの存在下でTKNEOベクターを用いた種々のコミットドヒト造血前駆細胞の感染効率を示す；実施例1に詳細に記載する。

【図4】図4は、下記の方法で形質導入された骨髓細胞を移植したマウスにおけるhADAの存在を比較する：(i)同時培養法(2-4列)、(ii)固定化フィブロネクチンフラグメントの存在下での上清感染(5-7列)、およびBSA上での上清感染(8-10列)；実施例7に詳細に記載する。hADAに関する対照を1および12列に、ネズミADAに関する対照を11列に示す。

10

【図5】図5は、フィブロネクチンフラグメントに対するレトロウイルスの結合を示す；実施例8に詳細に記載する。

【図6】図6は、フィブロネクチンフラグメントに対するレトロウイルスの結合が用量依存性であることを示す；実施例8に詳細に記載する。

【図7】図7は、実施例9-11で用いた種々の組換えフィブロネクチンフラグメントを示す模式図である。

【図8】図8は、種々の組換えフィブロネクチンフラグメント(幾つかの組換えフラグメントを含む)へのレトロウイルスの結合を示す；実施例9に記載する。

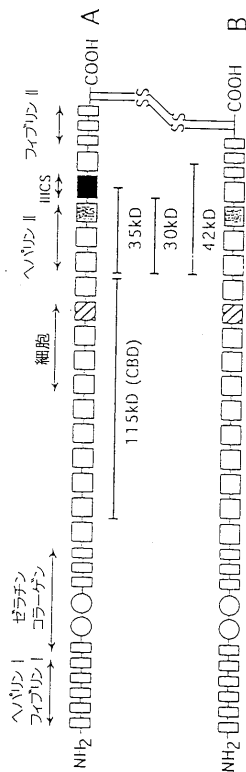
【図9】図9は、ヘパリンがフィブロネクチンフラグメントへのレトロウイルスの結合を遮断することを示す；実施例9に記載する。

20

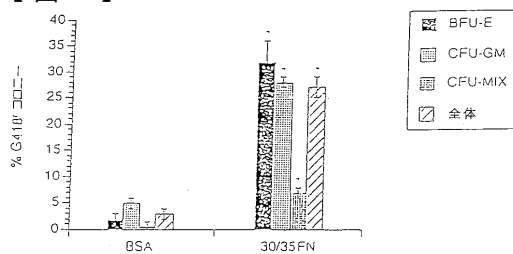
【図10】図10は、種々の組換えフィブロネクチンフラグメントの存在下でのネズミ造血細胞のレトロウイルス感染効率を示す；実施例10に詳細に報告する。

【図11】図11は、下記の方法で形質導入された骨髓細胞を移植したマウスにおけるhADAの存在を比較する：(i)同時培養法、(ii)種々のフィブロネクチンフラグメント上での上清感染、および(iii)BSA上での上清感染；実施例11に記載する。

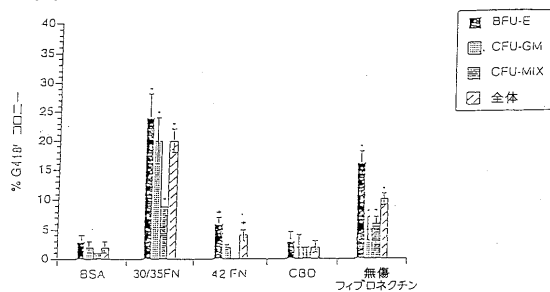
【 图 1 】



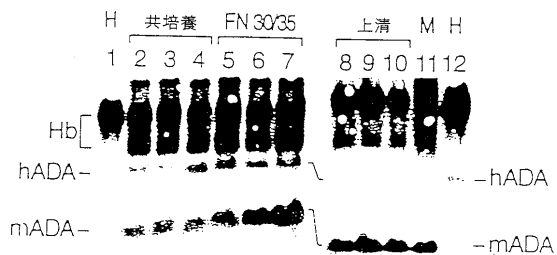
【 図 2 】



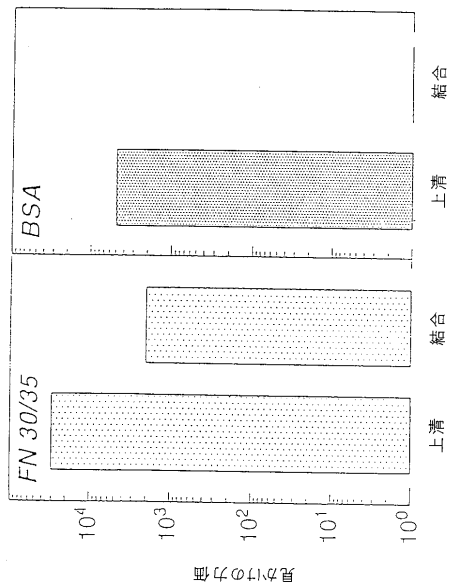
【 図 3 】



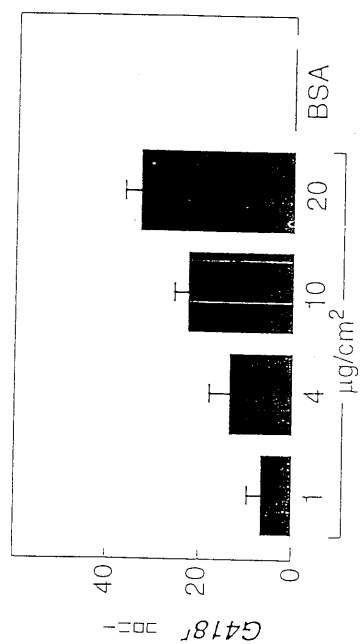
【 図 4 】



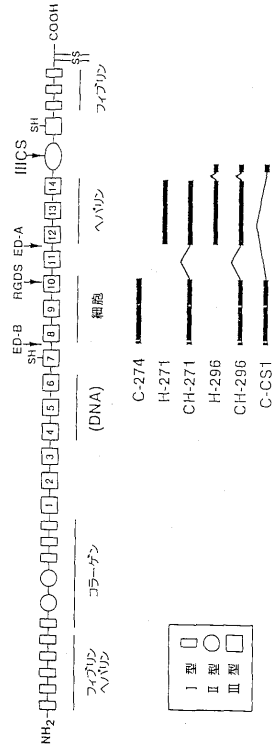
【 図 5 】



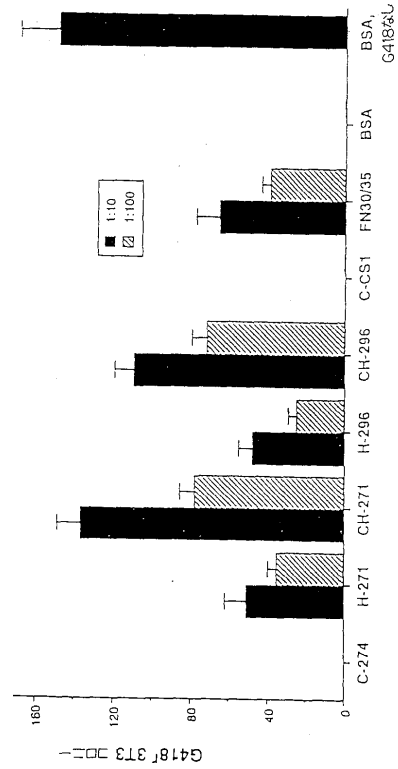
【 図 6 】



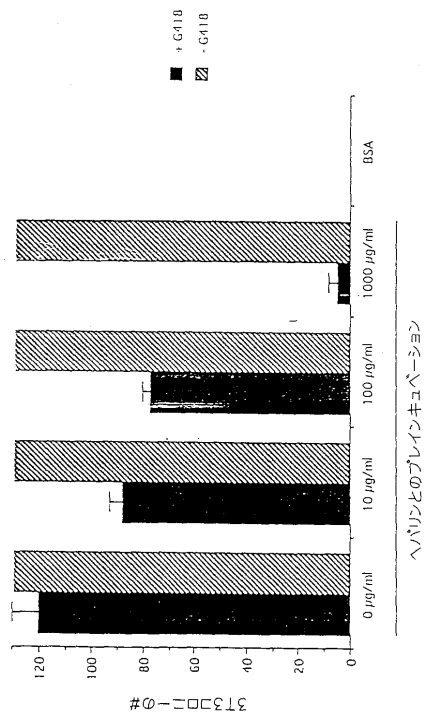
【図 7】



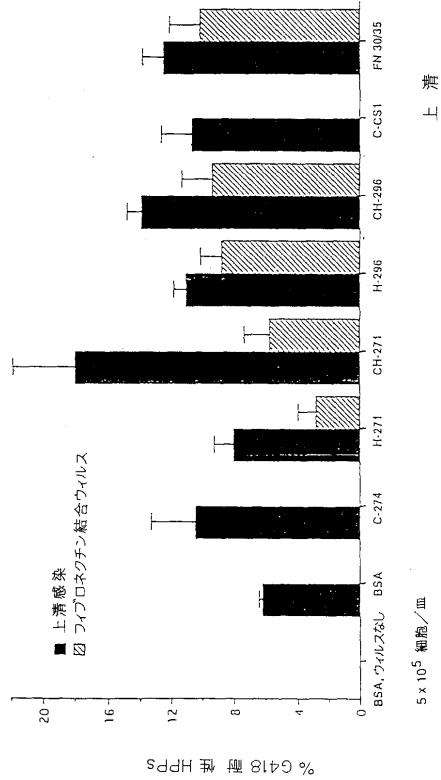
【図 8】



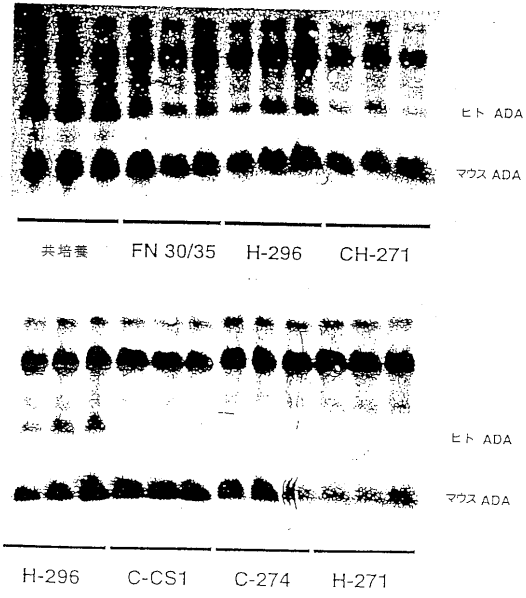
【図 9】



【図 10】



【図 11】



 フロントページの続き

- (74)代理人 100075270
弁理士 小林 泰
- (74)代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
- (74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
- (74)代理人 100107386
弁理士 泉谷 玲子
- (72)発明者 ウィリアムズ, デヴィッド・エイ
アメリカ合衆国インディアナ州46278, インディアナポリス, ノース・ムーア・ロード 87
51
- (72)発明者 バテル, ヴィクラム・ピー
アメリカ合衆国メリーランド州20876, ジャーマンタウン, セプター・リッジ・テラス 11
117

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 David Williams et al., Umbilical Cord Blood Stem Cells as Targets for Genetic Modification: New ... , Blood Cells, 1994年 2月 9日, Vol.20, pp.504-516
Albert R. Kornblitt, Primary structure of human fibronectin: differential... , The EMBO Journal, 1985年, Vol.4, No.7, pp.1755-1759
Ikuo Saiki, Inhibitory Effect of Fibronectin and Its Recombinant Polypeptides on the Adhesion ... , Jpn. J. Cancer Res., 1991年10月, Vol.82, pp.1112-1119
Fusao Kimizuka et al., Production and Characterization of Functional Domains ... , J. Biochem., 1991年, Vol.110, pp.284-291
Dan A. Wiginton et al., Complete Sequence and Structure of the Gene ... , Biochemistry, 1986年, Vol.25, pp.8234-8244
Donna E. Hogge et al., The Elusive Peripheral Blood Hemopoietic Stem Cell, Seminars in Hematology, 1993年, Vol.30, No.4, Suppl. 4, pp.82-91

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
C12N 5/10
C07K 14/47
BIOSIS/WPI(DIALOG)
JSTPlus(JDream2)