

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-511219

(P2007-511219A)

(43) 公表日 平成19年5月10日(2007.5.10)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 5/10	C 12 N 5/00	4 B 02 4
C 12 N 15/09	C 12 N 15/00	4 B 06 5
A 61 K 35/12	A 61 K 35/12	4 C 08 1
A 61 K 35/28	A 61 K 35/28	4 C 08 7
A 61 P 43/00	A 61 P 43/00	1 O 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

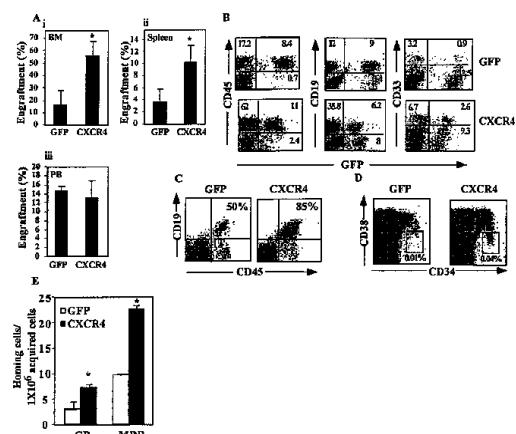
(21) 出願番号	特願2006-539071 (P2006-539071)	(71) 出願人	500018608 イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド イスラエル国、76100 レホボト、ピオーボックス 95、ワイズマン インスティチュート オブ サイエンス (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成16年11月8日 (2004.11.8)	(74) 代理人	100065226 弁理士 朝日奈 宗太
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月12日 (2006.5.12)	(74) 代理人	100117112 弁理士 秋山 文男
(86) 國際出願番号	PCT/IL2004/001018	(72) 発明者	ラピドット、ツヴィー イスラエル国、アイエル-74046 ネスージオナ、ボクサー ストリート 6
(87) 國際公開番号	W02005/047494		
(87) 國際公開日	平成17年5月26日 (2005.5.26)		
(31) 優先権主張番号	158868		
(32) 優先日	平成15年11月13日 (2003.11.13)		
(33) 優先権主張國	イスラエル(IL)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】移植に好適な幹細胞、その調製およびそれらを含む医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、移植に好適な幹細胞およびその製造方法に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多量の未熟な初期前駆細胞を有する幹細胞を含む細胞の集団を製造するための方法であつて、幹細胞を回収し、その細胞内に、CXCR4の配列を含むDNA断片を導入することを含む方法。

【請求項 2】

細胞の集団が、低濃度のSDF-1に応答してCXCR4シグナル伝達の改善を示す請求項1記載の方法。

【請求項 3】

細胞の集団が、高濃度のSDF-1に応答してCXCR4シグナル伝達の改善を示す請求項1記載の方法。 10

【請求項 4】

幹細胞が、造血幹細胞である請求項1記載の方法。

【請求項 5】

造血幹細胞が、CD34⁺濃縮されている請求項4記載の方法。

【請求項 6】

未熟な初期前駆細胞が、CD34⁺/CD38^{-/-low}系統のものである請求項1記載の方法。 20

【請求項 7】

幹細胞を回収することが、幹細胞の移行手法を誘導した後に実行され、および/または手術手法を含む請求項1記載の方法。

【請求項 8】

所定の閾値以上のCXCR4レベルを有する幹細胞をFACSにより単離することをさらに含む請求項1記載の方法。 20

【請求項 9】

幹細胞が、脊髄および赤血球系へ分化可能である請求項1記載の方法。

【請求項 10】

CD34⁺/CD38^{-/-low}系統の未熟な初期前駆細胞の量が、集団の約1~5%である請求項6記載の方法。 30

【請求項 11】

CD34⁺/CD38^{-/-low}系統の未熟な初期前駆細胞が、集団の約3%以上の量である請求項6記載の方法。

【請求項 12】

低濃度のSDF-1が、約50ng/ml以下である請求項2記載の方法。

【請求項 13】

改善されたシグナル伝達が、低濃度のSDF-1によって仲介される細胞遊走の増強として現れる請求項2または12記載の方法。

【請求項 14】

改善されたシグナル伝達が、低濃度のSDF-1によって仲介される細胞増殖の増強として現れる請求項2または12記載の方法。 40

【請求項 15】

高濃度のSDF-1が、約1マイクログラム/ml以上である請求項3記載の方法。

【請求項 16】

改善されたシグナル伝達が、SDF-1による脱感作の減少によって現れる請求項3または15記載の方法。

【請求項 17】

幹細胞内にCXCR4の配列を含むDNA断片を導入することによって製造され、多量の未熟な初期前駆細胞を発現し、低濃度および/または高濃度のSDF-1に応答して改善されたCXCR4シグナル伝達能力を示す幹細胞を含む集団。

【請求項 18】

50

幹細胞が、造血幹細胞である請求項 1 7 記載の幹細胞の集団。

【請求項 1 9】

脊髄および赤血球系統へ分化可能である請求項 1 7 または 1 8 記載の細胞の集団。

【請求項 2 0】

造血幹細胞が、CD34⁺造血幹細胞である請求項 1 9 記載の細胞の集団。

【請求項 2 1】

未熟な初期前駆細胞が、CD34⁺ / CD38^{-/+low} 系統のものである請求項 1 7 記載の細胞の集団。

【請求項 2 2】

多量のCD34⁺ / CD38^{-/+low} が、集団の約 1 ~ 5 % である請求項 2 1 記載の細胞の集団。 10

【請求項 2 3】

多量のCD34⁺ / CD38^{-/+low} が、集団の約 3 % 以上である請求項 2 1 記載の細胞の集団。

【請求項 2 4】

低濃度の SDF - 1 が、約 50 ng / ml 以下である請求項 1 7 記載の細胞の集団。

【請求項 2 5】

高濃度の SDF - 1 が、約 1 マイクログラム / ml 以上である請求項 1 7 記載の細胞の集団。

【請求項 2 6】

必要とする対象の標的組織に対する幹細胞のホーミングを増加させるための医薬の製造における請求項 1 7 ~ 2 5 のいずれか記載の細胞の集団の使用。 20

【請求項 2 7】

必要とする対象の標的組織の再増殖を増加させるための医薬の製造における請求項 1 7 ~ 2 5 のいずれか記載の細胞の集団の使用。

【請求項 2 8】

前記標的組織が、骨髓、血管、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、神経系、皮膚、骨および骨格筋からなる群より選択される請求項 2 6 または 2 7 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 2 9】

移植を促進するための請求項 2 6 または 2 7 記載の細胞の集団の使用。 30

【請求項 3 0】

移植が化学治療プロトコールにしたがう請求項 2 9 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 3 1】

移植が自家移植である請求項 2 9 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 3 2】

移植が、自系細胞の移行を伴う請求項 3 1 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 3 3】

移植が異種移植である請求項 2 9 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 3 4】

移植が移行幹細胞で実施される請求項 2 9 に記載の細胞の集団の使用。 40

【請求項 3 5】

細胞または組織置換が必要な対象における疾患の治療方法であって、それを必要とする対象に、治療的に有効量の請求項 1 7 ~ 2 5 のいずれか記載の細胞の集団を提供することを含む方法。

【請求項 3 6】

インタクトな 6 H 8 エピトープを含む CXCR4 を発現している幹細胞を含む、細胞の集団を製造する方法であって、幹細胞を回収すること、および細胞に CXCR4 の配列を含む DNA 断片を導入することを含む方法。

【請求項 3 7】

CXCR4 の配列を含む DNA 断片を導入することによって製造される、インタクトな C 50

X C R 4 6 H 8 エピトープを含む幹細胞を含む細胞の集団。

【請求項 3 8】

必要とする対象における移植のための医薬の製造における請求項 3 7 記載の細胞の集団の使用。

【請求項 3 9】

細胞または組織置換を必要とする疾病を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療的に有効量の請求項 3 7 記載の細胞の集団を提供することを含む方法。

【請求項 4 0】

C X C R 4 の配列を含む D N A 断片を細胞に導入することによって製造されるインタクトな C X C R 4 6 H 8 エピトープを示している幹細胞を含む幹細胞の集団を含む医薬組成物。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、移植に好適な幹細胞、およびそれらの調製のための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

臨床的、および実験的造血幹細胞 (H S C) 移植手法は、生涯を通じて、後期胚発達および成人における安定状態造血のあいだに起こる循環から骨髄 (B M) への H S C 遊走の生理学的過程を模倣している¹⁻³。ヒト H S C への遺伝子伝達が、広い範囲の造血および遺伝子病の矯正における、見込みのあるツールとして役に立ちうる。H S C 移植は、これらの遺伝的に改変した細胞を、B M に永続的に伝達するのに使用可能であり、言い換えれば、生涯を通じて、循環内へ、訂正された遺伝子を有する成熟細胞を放出する。 20

【0 0 0 3】

幹細胞生着の効率の増強は、臨床的な移植、ならびに遺伝子治療プロトコールの成果を改善し、幹細胞の、レシピエント B M へ戻すおよび再増殖 (repopulate) させる能力を改変することによって達成されうる。この目的のために、これらの過程を調節する機序のよりよい理解が必要である。

【0 0 0 4】

C X C L 1 2 とも呼ばれるケモカイン ストロマ細胞由来因子 - 1 (S D F - 1) と、そのレセプター C X C R 4 との間の相互作用が、マウス胚発達中に B M の幹細胞播種において重要な役割をはたす^{10, 11}。先に、本発明者らは、免疫欠損 N O D / S C I D マウスをレシピエントとして用いて、短期間のインビオ遊走 (ホーミング) と、ヒト C D 3 4⁺ 濃縮細胞による、マウス骨髄の、高レベルの多系統 (multilineage) 再増殖との両方が、S D F - 1 / C X C R 4 相互作用に依存していることを示すことができた¹²⁻¹⁵。これらのデータの裏付けとして、ヒト C D 3 4⁺ 細胞上の高レベルの C X C R 4 発現、またはインビトロでの高 S D F - 1 誘導指向性運動性のいずれかが、C D 3 4⁺ 細胞の陽性選別での、同種異系および自己臨床移植療法におけるより早い回復と相関関係があることが示された^{16, 17}。 30

【0 0 0 5】

C X C R 4 発現は動的な過程であり、サイトカイン、ケモカイン、ストロマ細胞、接着分子およびタンパク質分解酵素などの環境因子によって調節される¹⁸。ヒト起源の造血幹細胞および前駆細胞において、C X C R 4 は、短時間 (~ 40 時間) のインビトロサイトカイン培養^{13, 19}、または M M P - 2 および M M P - 9 などのタンパク質分解酵素による臍帯血 (C B) C D 3 4⁺ の刺激²⁰によって、細胞内プールからアップレギュレートされる。これは続いて、S D F - 1 勾配に向かうそれらのインビトロ遊走¹³、ならびに移植 N O D / S C I D および連続的に移植した 2 m n u l l N O D / S C I D マウスにおけるそのインビオ ホーミングおよび再増殖能を増強し、幹細胞自身の更新 (renewal) と運動性を伴う発達とを連結する。最近の報告では、サイトカインカクテルでのより長い培養期間が、ヒト C B C D 3 4⁺ 濃縮細胞上での、細胞表面 C X C R 4 発現の減少をも 40

たらすことが実証され²²、さらに、より長期間インビトロで培養したヒト前駆細胞における再増殖の減少が証明された²³。近年、本発明者らは、C B C D 3 4⁺ / C X C R 4⁻ソート細胞が、低レベルの細胞内C X C R 4を有し、インビトロでの短期間サイトカイン刺激について、迅速に、細胞表面上で機能的に発現され、移植N O D / S C I DマウスのS D F - 1 依存ホーミングおよび再増殖を仲介可能であることを示した¹⁵。

【0006】

ヒトおよびマウス幹細胞の指向性遊走を仲介することにおける、それらの中心的な役割²⁴に加えて、S D F - 1 / C X C R 4相互作用はまた、他の幹細胞機能にも関与する。重要なことに、S D F - 1 / C X C R 4相互作用はまた、B Mにおける、幹細胞および前駆細胞の保持に関する¹⁰、³²、³³。この仮説はまた、マウスB M空洞内に直接注入したヒトH S Cの固定に対するS D F - 1 / C X C R 4相互作用の関与を示した他の研究によって確認されてきた³⁴、³⁵。これらの相互作用の干渉によって、ヒトおよびマウス前駆細胞の両方の、B Mから循環への放出/移行が誘導される。

【0007】

そのC D 4⁺ T細胞上で、ヒトC D 4およびC X C R 4を過剰発現しているトランジエニックマウスでは、そのB Mにてこれらの細胞のレベルが増加し、循環中では、非常に低いレベルである⁴²。したがって、ヒトC D 3 4⁺前駆細胞上のC X C R 4の過剰発現が、それらのホーミングおよび再増殖の潜在能力を促進しうる。

【0008】

レンチウイルスベクターが、非分割細胞を形質導入するそれらの固有能力のために、S C I D再増殖細胞(S R C s)内にトランスジーンを誘導するために利用されてきた⁴³⁴⁶。さらに、遺伝子治療における有意な臨床でのブレイクスルーが、ヒト重度複合免疫欠損(S C I D)-X 1を患有患者で起こり、遺伝子治療が実効をあげるという条件で、疾患表現型の完全なる修正を結果としてもたらした⁴⁸、⁴⁹。しかしながら、新たな証拠が、レトロウイルスで形質導入したヒトC D 3 4⁺細胞のホーミングの低下⁸および低い生着⁹に関して存在する。

【0009】

低濃度のS D F - 1が、他の早期に働くサイトカインとの相乗効果により、ヒトC D 3 4⁺細胞ならびにマウス幹細胞および前駆細胞の増殖を増強し、前駆細胞生存におけるこのケモカインの役割を示唆しており²⁵、²⁹、一方、高レベルのS D F - 1が、移植N O D / S C I Dマウスの連続的に再増殖できる、ヒト長期間培養開始細胞(L T C I C)および始原ヒト胎児肝C D 3 4⁺幹細胞の増殖の停止を誘導することが十分に立証されている³⁰、³¹。

【0010】

B M移植の不都合の1つは、健康な個体と比較して、移植患者のB Mでは、長期間培養開始細胞(L T C I C)のような未熟な前駆細胞のレベルが長期間にわたり減少(110g減少)することである。

【0011】

長期間培養開始細胞(L T C - I C)は、骨髄(B M)ストロマ上の5~8週間(35~60日間)の培養の後、コロニー形成単位細胞(C F U)を産生し、インビトロで容易に検出可能な前駆細胞を意味する造血前駆細胞である。ヒトB Mまたは臍帯血由来のC D 3 4⁺ C D 3 8⁻細胞で開始した長期間の培養は、少なくとも100日間、すなわち、標準L T C - I C期間を超えて、C F Uを産出し続けることが可能であることが報告してきた。臍帯血由来の単細胞培養物を、C D 3 4⁺ C D 3 8⁻細胞の亜集団が、60日を超えてC F Uを産出可能であるかどうかを研究するために使用した('超長期間培養開始細胞'またはE L T C - I C)。L T C - I C臍帯血と対照的に、E L T C - I Cは培養後半に増殖し、より静止した前駆細胞集団である。E L T C - I Cは、L T C - I Cよりも、三倍~四倍より多い前駆細胞を産出する(P < . 0 0 2)。これは、長期間培養中の前駆細胞の機能的ヒエラルキーであり、それらの静止レベルと比例する(Blood. 1996 Nov 1;88(9):3306-13 Crooks GM et al.)。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

幹細胞治療の利用がますます拡大していることを考慮すると、細胞置換治療の効率および成功率を改善するために、幹細胞の集団における C D 3 4 + / C D 3 8 - 細胞のレベルを増強することが非常に望ましい。

【発明の開示】**【 0 0 1 3 】**

本発明は、多量の未熟な初期前駆細胞を有する幹細胞を含む細胞の集団を製造するための方法に関し、前記方法は、幹細胞を回収し、その細胞内に、C X C R 4 の配列を含むDNA断片を導入することを含む。

【 0 0 1 4 】

本発明の1つの実施態様において、細胞の集団は、低濃度の S D F - 1 に応答して改善された C X C R 4 シグナル伝達を示す。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の実施態様において、細胞の集団は、低濃度の S D F - 1 に応答して改善された C X C R 4 シグナル伝達を示す。

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる実施態様において、幹細胞は、造血幹細胞、とりわけ C D 3 4 + 濃縮幹細胞である。

【 0 0 1 7 】

本発明のさらなる実施態様において、未熟な初期前駆細胞は、C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 系統のものである。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる実施態様において、幹細胞の回収は、幹細胞移行手法の後、および/または手術手法の後に実行する。

【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる実施態様において、回収の後、所定の閾値より上の C X C R 4 レベルを有する幹細胞を F A C S によって単離する。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらなる実施態様において、本発明の幹細胞は、脊髄および赤血球系統へ分化可能である。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらなる実施態様において、C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 系統の未熟な初期前駆細胞は集団のおよそ 1 ~ 5 % である。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる実施態様において、C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 系統の未熟な初期前駆細胞は幹細胞の約 3 % 以上である。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらなる実施態様において、低濃度の S D F - 1 は約 5 0 n g / m l 以下である。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらなる実施態様において、改善されたシグナル伝達は、低濃度の S D F - 1 によって仲介された細胞遊走の増強によって現れる。

【 0 0 2 5 】

本発明のさらなる実施態様において、高濃度の S D F - 1 は、約 1 マイクログラム / m l 以上である。

【 0 0 2 6 】

本発明のさらなる実施態様において、改善されたシグナル伝達は、S D F - 1 による脱感作の減少によって現れる。

【 0 0 2 7 】

1 つの態様において、本発明は、多量の未熟な初期前駆細胞を含む幹細胞を含み、C X

10

20

30

40

50

C R 4 配列を含む D N A 断片を幹細胞に導入することによって製造される、低濃度および / または高濃度 S D F - 1 に応答して改善された C X C R 4 シグナル伝達能力を示す細胞の集団を提供する。

【 0 0 2 8 】

本発明の 1 つの実施態様において、幹細胞は造血幹細胞である。

【 0 0 2 9 】

本発明のさらなる実施態様において、細胞の集団は脊髄および赤血球系統へ分化可能である。

【 0 0 3 0 】

本発明のさらなる実施態様において、造血幹細胞は C D 3 4 + 濃縮幹細胞である。 10

【 0 0 3 1 】

本発明のさらなる実施態様において、未熟な初期前駆細胞は、 C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 系統のものである。

【 0 0 3 2 】

本発明のさらなる実施態様において、 C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w の量は、集団の約 1 ~ 5 % である。

【 0 0 3 3 】

本発明の他のさらなる実施態様において、 C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w の量は、集団のおよそ 3 % 以上である。

【 0 0 3 4 】

本発明のさらなる実施態様において、低濃度の S D F - 1 は、約 5 0 n g / m l 以下である。 20

【 0 0 3 5 】

本発明のさらなる実施態様において、高濃度の S D F - 1 は、約 1 マイクログラム / m l 以上である。

【 0 0 3 6 】

他の態様において、本発明は、必要とする対象において標的組織への幹細胞のホーミングを増加させるための医薬の製造における本発明の細胞集団の使用を提供する。

【 0 0 3 7 】

また、本発明は、必要とする対象において標的組織への細胞の再増殖を増強するための医薬の製造における本発明の細胞集団の使用を提供する。 30

【 0 0 3 8 】

本発明の 1 つの実施態様において、標的組織は、骨髄、血管、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、神経系、皮膚、骨および骨格筋からなる群より選択される。

【 0 0 3 9 】

本発明の 1 つの実施態様において、本発明の細胞集団は移植を促進するために使用される。

【 0 0 4 0 】

本発明のさらなる実施態様において、移植は化学治療プロトコールにしたがう。

【 0 0 4 1 】

本発明の他のさらなる実施態様において、移植は自家移植である。 40

【 0 0 4 2 】

本発明の他のさらなる実施態様において、移植には自己細胞の移行を伴う。

【 0 0 4 3 】

本発明の他のさらなる実施態様において、移植は移行した幹細胞で実施される。

【 0 0 4 4 】

さらに、本発明は、対象における細胞または組織置換を必要とする疾病的治療方法を提供し、前記方法は、必要としている対象に、治療的に有効量の本発明による細胞集団を投与することを含む。

【 0 0 4 5 】

また、本発明は、インタクトな 6 H 8 エピトープを有する C X C R 4 を発現している幹細胞を含む細胞の集団を製造するための方法を提供し、本方法は、幹細胞を回収すること、および幹細胞に C X C R 4 の配列を含む D N A 断片を導入することを含む。

【 0 0 4 6 】

他の態様において、本発明は、幹細胞に C X C R 4 の配列を含む D N A 断片を導入することによって製造される、インタクトな C X C R 4 6 H 8 エピトープを含む幹細胞を含む細胞集団、および必要とする対象における移植のための医薬の製造におけるその細胞の集団の使用を提供する。

【 0 0 4 7 】

本発明のさらなる態様は、細胞または組織置換を必要とする疾病を治療するための方法に関し、前記方法は、必要とする対象に、治療的に有効量の本発明による細胞集団を提供することを含む。

【 0 0 4 8 】

また、本発明は、幹細胞に C X C R 4 の配列を含む D N A 断片を導入することによって製造される、インタクトな C X C R 4 6 H 8 エピトープを発現している幹細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物を提供する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 4 9 】

本発明は、未熟な初期前駆細胞を強化した幹細胞であって、低濃度および高濃度の S D F - 1 に応答して改善された C X C R 4 シグナル伝達を示す幹細胞、ならびにその製造方法および使用方法に関する。より具体的には、本発明の細胞は、低濃度の S D F - 1 に応答可能であり、高濃度の S D F - 1 によって脱感作されにくい。とりわけ、本発明によって、細胞または組織置換を必要とする疾病的治療が可能になる。本発明は、C X C R 4 を過剰発現しているトランスジェニック幹細胞が、C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 細胞集団のレベルの増強を示し、および / または、低濃度および高濃度の S D F - 1 に応答して C X C R 4 シグナル伝達能力の改善を示し、かつインタクトな C X C R 4 6 H 8 エピトープを示すということを明示する結果に基づいている。

【 0 0 5 0 】

本発明の原理および操作は、図面および付随する記述を参照して、よく理解されうる。

【 0 0 5 1 】

本発明の少なくとも 1 つの実施態様を詳細に説明する前に、本発明が、その適用において、以下の記述で列記され、実施例により実証された詳細に限定されないことが理解されるべきである。本発明は、他の実施態様、または種々の方法で、実施または達成されうる。また、本明細書で用いられる表現および語句は、説明の目的のためであり、制限として見なされるべきではないことが理解されるべきである。

【 0 0 5 2 】

細胞治療の利用が急速に広がっており、徐々に種々の疾病的治療における重要な治療手法になりつつある。造血幹細胞 (H S C) (たとえば、脊髄、臍帯血または移行末梢血由来) 移植は、日常的に実施される保険補償細胞治療の 1 つの例である。しかしながら、がんおよび感染疾患のための免疫治療、軟骨欠損のためのコンドロサイト治療、神経変性疾患のための神経細胞治療、および多数の適用のための幹細胞治療を含む多くの他の細胞治療が同様に発展いる [Forbes(2002) Clinical Science 103:355-369] 。

【 0 0 5 3 】

幹細胞治療に関する問題の 1 つは、標的組織において、細胞の長期にわたる生着の成功を達成することの難しさである。現在、首尾良く移植された患者は、所望の表現型を有する細胞を産生する幹細胞と未熟前駆細胞の非常に低いレベルを示す。

【 0 0 5 4 】

C D 3 4 + 前駆細胞の、H G F および M M P s などのサイトカインでの処理は、C X C R 4 の発現をアップレギュレートし、S D F - 1 に対してよりよい応答を示すことが先に示されている。しかしながら、S D F - 1 の濃度が増加しているとき、C X C R 4 は内在

10

20

30

40

50

化し、細胞は S D F - 1 に対する応答が低くなる。また、S D F - 1 レベルの増加は、移植 N O D / S C I D マウスの連續再増殖を可能とする、ヒト長期間培養開始細胞 (L T C I C) および初期ヒト胎児肝 C D 3 4 + 幹細胞の増殖の脱感作および静止を誘導する^{30, 31}。

【 0 0 5 5 】

B M 移植の問題の 1 つは、健康な個体と比較して、移植患者の B M では長期維持未熟前駆細胞のレベルが減少 (1 1 o g 減少) することである。

【 0 0 5 6 】

本発明者らは、C X C R 4 を過剰発現しているトランスジェニック造血幹細胞が、予想しなかった高レベルの C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 細胞集団を示すことを発見した。
10

【 0 0 5 7 】

得られた結果は、C B および M B P C D 3 4 + 濃縮細胞などのトランスジェニック幹細胞が、高レベルの C X C R 4 トランスジーンを発現しているレンチウイルスベクターで首尾良く形質導入されることを示す。たとえば一つの実施態様では、形質導入細胞は細胞表面 C X C R 4 発現に関して $87 \pm 2.7\%$ (C B) および $80 \pm 4\%$ (M P B) が陽性であり、一方で G F P ベクター感染した C B および M P B C D 3 4 + 細胞の両方はたった $28 \pm 3.1\%$ が内因性 C X C R 4 を発現した。

【 0 0 5 8 】

C X C R 4 を過剰発現しているトランスジェニック細胞は、脊髄および赤血球系統へ分化するその能力に影響を受けないことが示されている。本発明によれば、形質導入した C D 3 4 + 細胞 (対照および C X C R 4 の両方) を、14 日目に位相差顕微鏡により記録し、バースト形成赤血球 (B F U - E) およびコロニー形成単位顆粒球、マクロファージ (C F U - G M) のような、G F P + C F C コロニーへの多系統分化を表したことが示される (図 3 A)。
20

【 0 0 5 9 】

予期しなかったことに、M P B C D 3 4 + C X C R 4 形質導入細胞は、対照細胞における 0.5 % と比較して、より高い割合 (2.9 %) の C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 集団を示した。この効果は、C B C D 3 4 + 細胞では観察されなかった (図 3 C)。C X C R 4 形質導入はしたがって、C D 3 4 + / C D 3 8 - / l o w 初期集団の増殖および / または維持を支持する。
30

【 0 0 6 0 】

これも予期しなかったことに、C X C R 4 形質導入幹細胞は、幹細胞の表面においてよりインタクトな C X C R 4 6 H 8 エピトープを示す。

【 0 0 6 1 】

C X C R 4 を過剰発現しているトランスジェニック細胞は、対照ベクター - 形質導入細胞と比較すると、S D F - 1 仲介走化性において C B では 1.5 ± 0.04 ($p < 0.001$) 倍、M P B では 2.3 ± 0.3 ($p = 0.03$) 倍という、有意に増加した応答を示す (図 4 B)。C X C R 4 を過剰発現しているトランスジェニック細胞はさらに、アクチン重合化の増加および / または S D F - 1 によって仲介された細胞運動性の増加を示す。本発明によれば、C X C R 4 を過剰発現している C D 3 4 + 細胞は、未刺激細胞と比較した場合、アクチン重合化において 3 ± 0.11 ($p < 0.001$) 倍の増加を示し、それに対し対照細胞では 1.5 ± 0.07 ($p = 0.002$) 倍の増加を示す (図 4 A)。
40

【 0 0 6 2 】

したがって、ヒト前駆細胞での C X C R 4 の過剰発現が S D F - 1 誘導シグナル伝達を増強させ、細胞運動性およびアクチン重合化の増加を導く。

【 0 0 6 3 】

さらに、7 日間にわたる C X C R 4 過剰発現細胞の増殖の評価で、C X C R 4 - 形質導入 C B C D 3 4 + 細胞がほとんどその播種した数の二倍になり、一方対照細胞数は、播種した本来の量以下に減少したことが観察された。

【 0 0 6 4 】

C X C R 4 - 形質導入細胞は、対照細胞と比較して、C B C D 3 4⁺細胞では $4 \pm 0 . 0 7$ ($p = 0 . 0 0 1$) までの生着の増加を示した(図 6 A)。さらに、C D 1 9 および C D 3 3 モノクローナル抗体を用いた代表的な F A C S 染色によって、骨髓および赤血球集団への多分化造血が、それぞれ C X C R 4 - 形質導入細胞を移植したマウスにおいて、B - 細胞リンパ球産出の傾向をより強めて(図 6 C)、形質導入細胞で維持された(図 6 B)ことが示され、これはおそらく、S D F - 1 がまた、P r e B 細胞増殖因子でもあるからである。さらに、平均 $3 6 \% \pm 1 9 \%$ (幅 $7 . 5 \% \sim 7 7 \%$) の C D 4 5⁺細胞が G F P を発現していることがわかった(図 6 B)。トランスジーン発現もまた、脊髓およびリンパ集団の両方において検出された(図 6 B)。C X C F 4 過剰発現細胞を形質導入したマウスは、対照ベクター - 形質導入細胞を注射したマウスと比較して、B M における初期 C D 3 4⁺ / C D 3 8^{-/-10^w} 細胞集団が 4 倍の増加を示し(図 6 D)、C X C R 4 - 過剰発現細胞生着レベルの高まりが、より初期の細胞集団の再増殖の増加によることを示唆している。

【 0 0 6 5 】

移植後 2 時間(C B)または 1 6 h(M P B)で、C X C R 4 - 形質導入細胞は、それらの対照同等物と比較して、脾臓に対するホーミングにおいて 2 倍以上の増加を示したことが観察された(図 6 E)。しかしながら、B Mへのホーミング能力に関するこれらの違いは検出されなかった(データは示していない)。これらの結果は、C X C R 4 - 形質導入細胞が、先に示唆されたように(Papayannopoulou T. Curr Opin Hematol. 2003;10:21 4-219、Ref 18: Kollet O, Blood. 2001, 97:3283-3291) B Mを再増殖する前(移植後 5 週間)に、まず短期間脾臓にホームし得ることを示唆している。

【 0 0 6 6 】

本発見は、標的組織に対して効果的に補充され、それを再増殖させ得る幹細胞の産出を可能にし、そのようにして、肝障害の回復および肝臓または骨髄移植などの、多数の臨床適用に使用可能である。

【 0 0 6 7 】

したがって、本発明の 1 つの観点によると、「延長長期培養開始細胞(extended long-term culture-initiating cells)」すなわち E L T C - I Cを得るために、または初期 C D 3 4⁺ / C D 3 8^{-/-10^w} 細胞集団を増加させる方法が提供される。本発明の他の観点にしたがって、増加した S D F - 1 濃度に暴露したときでさえ、S D F - 1 に対して応答可能な E L T C - I C 細胞を得る方法が提供される。

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、語句「幹細胞」は、とりわけ特定の機能を有する他の細胞型(たとえば「完全に分化した」細胞)に分化可能な細胞を意味する。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される場合、「トランスジェニック細胞」は、形質導入した遺伝子または断片を有する細胞を意味する。

【 0 0 7 0 】

本発明のこの観点により使用可能である幹細胞の非限定例は、任意の年齢の個体の骨髄組織から、または新生児個体の臍帯血から得られた、造血幹細胞(H S C s)および間葉幹細胞(M S C s)、妊娠期間後形成される胚性組織(たとえば胚盤胞)から得た胚幹(E S)細胞、または妊娠中の任意の時期、好ましくは妊娠の 1 0 週より前の胎児の生殖器組織から得た胎児胚(E G)細胞である。本発明のこの観点により使用可能な幹細胞のさらなる記述を以下に要約する。

【 0 0 7 1 】

H S C s - 造血幹細胞(H S C s)は、赤血球、リンパ球、マクロファージおよび巨核芽球などの造血または血液細胞の任意の特定の種類へ分化可能な、胎児肝臓、臍帯血、骨髄および末梢血中で見られる、発達多能性プラスト細胞である。H S C s は、典型的には骨髄内で、器官の寿命が続く限りその能力を維持し、成熟した前駆細胞の適切にバランスのとれたアウトプットを産出するために、全ての必要な因子および接着特性を支える隙間

内に存在する [Whetton (1999) Trends Cell Biol 9:233-238; Weissman (2000) Cell 10 0:157-168; Jankowska-Wieczorek (2001) Stem Cells 19:99-107; Chan (2001) Br. J. Haematol. 112:541-557] 。

【 0 0 7 2 】

本発明のこの観点によると、HSCsは、好ましくはCD34+細胞であり、より好ましくはCD34+/CD38-/low細胞であり、これらは、より初期の幹細胞の集団であり、それゆえ系統制限が少なく、主要な長期BM再増殖細胞であることが示された。

【 0 0 7 3 】

MSCs - 間葉幹細胞は、サイトカインのような、生物活性因子からの種々の影響に依存して、間葉性または結合組織の1つの特定の型（すなわち、脂肪、骨性、間質、軟骨性、弾性および線維性結合組織のような、特殊化した要素を支持する体の組織）へ分化可能な骨髄、血液、皮膚および骨膜中でみられる発達多能性プラスト細胞である。

【 0 0 7 4 】

可塑物に接着しているヒト骨髄穿刺液細胞のおよそ30%が、MSCsと考えられる。これらの細胞は、インビトロで展開でき、その後分化を誘導できる。成人MSCsはインビトロで展開可能であり、骨、軟骨、腱、筋肉または脂肪細胞を形成するように刺激できるという事実から、これらは組織エンジニアリングおよび遺伝子治療戦略にとって魅力的なものである。MSC機能をアッセイするために、インビオアッセイが発達してきた。循環系に注射したMSCsは上述の多数の組織になることができる。とりわけ、骨格筋および心筋は、5-アザシチジンに暴露することによって誘導可能であり、培養中のラットおよびヒトMSCsの神経への分化は、-メルカプトエタノール、DMSOまたはブチル化ヒドロキシアニソールに暴露することによって誘導可能である [Tomita (1999) 100:11 247-11256; Woodbury (2000) J. Neurosci. Res. 61:364-370] 。さらに、MSC - 由来細胞は、末梢への注射後ならびにラット脳内へのヒトMSCsの直接の注入後、脳内に、深く統合されるようにみられ、これらは、発達上で、神経性幹細胞の遊走中に使用される経路にそって遊走し、広く分散するようになり、HSC特殊化したマーカーを失い始める [Azizi (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3908-3913] 。間葉幹細胞および系統特異的細胞の増殖を促進する方法が米国特許第6,248,587号で開示されている。

【 0 0 7 5 】

米国特許第5,486,359号にて記述されたSH2、SH3およびSH4などのヒト間葉幹細胞(hMSCs)の表面上のエピトープは、たとえば骨髄中に存在するような外来細胞集団から間葉幹細胞集団を選別して捕獲するための試薬として利用可能である。本発明の本観点によれば、種々の間葉性系統に分化可能であるため、CD45に対して陽性である前駆間葉幹細胞が使用されることが好ましい。

【 0 0 7 6 】

本発明の本観点によれば、好ましい幹細胞はヒト幹細胞である。

【 0 0 7 7 】

以下の表1は、本発明の本観点により、成体幹細胞の例を提供しており、対象の標的組織中で示された表現型を得るために使用可能である。

【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

【表1】

表 1

幹細胞	分化した表現型	標的組織	参考文献
骨髓	卵細胞、肝細胞	肝臓	Petersen (1999) Science 284:1168-1170
KTLS 細胞	肝細胞	肝臓	Lagasse (2000) Nat. Med. 6:1229-1234
骨髓	肝細胞	肝臓	Alison (2000) Nature 406:257; Thiese (2000) Hepatology 32:11-16
脾臓・外分泌細胞	肝細胞	肝臓	Shen (2000) Nat. Cell Biol. 2:879-887
脾臓	肝細胞	肝臓	Wang (2001) Am. J. Pathol. 158:571-579
骨髓	内皮	肝臓	Gao (2001) Lancet 357:932-933
骨髓	腎細管上皮、糸球体	腎臓	Poulson (2001) J. Pathol. 195:229-235
骨髓	内皮	腎臓	Lagaaij (2001) Lancet 357:33-37
外腎	内皮	腎臓	Williams (1969) Surg. Forum 20:293-294
骨髓	心筋層	心臓	Orlic (2001) Nature 410:701-704
骨髓	心筋細胞、内皮	心臓	Jackson (2001) J. Clin. Invest. 107:1395-1402
骨髓	1型肺胞細胞	肺	Krause (2001) Cell 105:369-377
神経	多様な造血系	骨髓	Bjornson (1999) Science 283:534-537
骨髓	神経	CNS	Mezey (2000) Science 290:1779-1782
骨髓	小グリア細胞、星状細胞	CNS	Eglitis (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4080-4085

略語: SP- 側集団細胞 ; CNS - 中枢神経系 ;

10

20

20

30

【0079】

以上で言及したように、本発明の本観点による幹細胞は、CXCR4 トランスジーンを高発現するレンチウイルスベクターによって、首尾良く形質導入される。

【0080】

本明細書中の語句「ポリペプチドおよびタンパク質」は互換性がある。

【0081】

本発明はまた、本発明の上記 CXCR4 タンパク質のムテインにも関し、ムテインは本質的に CXCR4 の天然に存在する配列のみを有する、 CXCR4 タンパク質と同一の生物学的活性を維持している。そのような「ムテイン」は、この種の変異が、本質的にタンパク質それ自身に関してタンパク質変異の生物学的活性を変化させないように、それぞれ、 CXCR4 タンパク質中、約 20まで、好ましくは、10以内のアミノ酸残基が欠損、付加または他で置換されうるものでありうる。

40

【0082】

これらのムテインは、公知の合成によって、および / または部位特異的変異導入技術によって、またその他の好適な任意に公知の技術によって調製される。

【0083】

任意のそのような突然変異導入タンパク質は好ましくは、本質的にそれと同様の活性を有するように、 CXCR4 の基礎のものの、本質的に複製であるアミノ酸配列を有する。そこで、そのようなムテインを以下の実施例で列記した生物アッセイ試験にかけることを含む所定の実験方法によって、任意の該ムテインが、本質的に本発明の基礎タンパク質と

50

同一の活性を有するかどうかを決定可能である。

【 0 0 8 4 】

本発明により使用可能である C X C R 4 のムテイン、またはそれをコードしている核酸には、本明細書で示した技術およびガイダンスに基づいて、過度の実験をすることなく当業者によって日常的にえられる代用ペプチドまたはポリヌクレオチドのような本質的に C X C R 4 相当配列の有限の組が含まれる。タンパク質の化学および構造の詳細な記述の代わりに、本明細書に参考文献によって組み込まれている、Schulz,G.E.et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1978、および Creighton,T.E. *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H.Freeman & Co., San Francisco, 1983 を参照のこと。コドン選択のような、ヌクレオチド配列置換の表示の代わりに、たとえば、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995、Sambrook et al., *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 を参照のこと。10

【 0 0 8 5 】

本発明によるムテインとして好ましい変化は、「保存的 (conservative)」置換として知られるものである。本質的に天然に存在する C X C R 4 配列を有するタンパク質中の、これらの保存アミノ酸置換は、群のメンバー間の置換が分子の生物学的機能を保存することとなるような、十分に類似した物理化学的特性を有する、群内での同義アミノ酸を含みうる。Grantham, *Science*, Vol.185, pp.862-864(1974)を参照のこと。アミノ酸の挿入および欠損はまた、その機能を変更することなく上で定義した配列内で、とりわけ挿入または欠損が数個のアミノ酸、たとえば 50 以下、好ましくは 20 以下の C X C R 4 のみを含み、さらにたとえばシスティン残基のような、機能的な配座に重要であるアミノ酸を除去または置換しない場合に作成しうることが明らかである。Anfinsen, *Principles That Govern The Folding of Protein Chains*, *Science*, Vol.181, pp.223-230(1973) 参照のこと。そのような欠損および / または挿入によって生じるムテインは、本発明の範囲内に入る。好ましくは、同義のアミノ酸群は、表 A で定義されたものである。より好ましい同義のアミノ酸群は、表 B で定義されたものであり、もっとも好ましい同義のアミノ酸群は、表 C で定義されたものである。20

【 0 0 8 6 】

30

【表A】

表A

同義アミノ酸の好ましい群

アミノ酸 同義の群

Ser	Ser, Thr, Gly, Asn	
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His	
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu	
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro	10
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr	
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala	
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val	
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile	
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe	
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr	
Cys	Ser, Thr, Cys	
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His	20
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln	
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn	
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys	
Asp	Glu, Asn, Asp	
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu	
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	
Trp	Trp	

【0087】

30

【表B】

表B

同義アミノ酸のより好ましい群

アミノ酸 同義の群

Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

10

20

【0088】

【表C】

表C

同義アミノ酸の最も好ましい群

アミノ酸 同義の群

Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

10

20

40

50

【0089】

本発明で使用するタンパク質のムテインを得るために利用できるタンパク質中のアミノ酸置換の産出の例には、Mark et alに付与された米国特許第R E 3 3 , 6 5 3 号、第4 , 9 5 9 , 3 1 4 号、第4 , 5 8 8 , 5 8 5 号および第4 , 7 3 7 , 4 6 2 号、K o t h s e t a l . に付与された第5 , 1 1 6 , 9 4 3 号、Namen et alに付与された第4 , 9 6 5 , 1 9 5 号、Chong et alに付与された第4 , 8 7 9 , 1 1 1 号、およびLee et alに付与された第5 , 0 1 7 , 6 9 1 号で示されたような任意の公知の方法工程、および米国特許第4 , 9 0 4 , 5 8 4 号(Straw et al)で示されたリジン置換タンパク質が含まれる。

【0090】

本発明の他の好ましい実施態様において、本発明で使用するC X C R 4 タンパク質の任意のムテインは、本発明の上記のC X C R 4 タンパク質と、本質的に相当するアミノ酸配列を有する。語句「本質的に相当する(essentially corresponding to)」は、特にC X C R 4 に対するその能力を考える限りでは、その基本的特性に影響を与えない基礎タンパク質の配列に対する軽微な変化を有するムテインを含むことを意図する。「本質的に相当する」語句内に含まれると一般的に考えられる変化の種類は、結果として、2、3の軽微な改変となる、本発明のC X C R 4 タンパク質をコードしているD N A の従来の変異導入技術、およびたとえば化学誘引物質に対する幹細胞の感受性を増加させるための、所望の活性に対するスクリーニングによって得られるものである。

【0091】

本発明はまた、C X C R 4 変異体も含有する。好ましいC X C R 4 変異体は、C X C R 4 アミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するものであり、より好

ましくは、CXC4変異体は少なくとも90%の同一性を有するものであり、もっとも好ましい変異体は少なくとも95%同一性を有するものである。

【0092】

本明細書で使用するところの語句「配列同一性」は、アミノ酸配列が、Clustal W多重配列アライメントプログラム(Thompson et al., 1994)用のウインドウズインターフェイスである、Clustal-Xプログラムを用いた低相同性領域の微調整により、Hanks and Quinn(1991)にしたがったアライメントに基づいて比較されることを意味する。Clustal-Xプログラムは、<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx/>にてインターネット上で入手可能である。もちろん、このリンクが働かなくなつても、当業者は過度の試行をすることなく、標準的なインターネット検索技術を用いて他のリンクにより本プログラムのバージョンを見つけうることが理解されるべきである。特に言及しない限り、本願の有效出願日の時点で本明細書で引用された任意のプログラムのもつとも最近のバージョンが、本発明を実施するために利用されるものである。10

【0093】

「配列同一性」を決定する他の方法を以下に示す。配列は、(最初のギャップゼロに対して)-12のギャップオープンペナルティー、および(ギャップ内の各さらなる連続ゼロあたり)-4のギャップ伸長ペナルティーで、デフォルト(BLOSUM62)マトリックス(値-4~+11)を用いて、Genetic Computing Group's GDAp(グローバルアライメントプログラム)のバージョン9を使用しアライメントする。アライメントの後、請求項に記載したアミノ酸の数の割合として、割合同一性を、適合する数を表示することによって計算する。20

【0094】

本発明におけるムテインには、CXC4をコードする自然発生配列、および遺伝的コードの縮重に基づく天然由来のヌクレオチド配列とは異なる配列を本質的に全て含み、ストリンジエンントな条件下でDNAまたはRNAにハイブリダイズする、そして本発明によるCXC4タンパク質をコードするDNAまたはRNAなどの核酸によってコードされたものが含まれる、すなわち、いくらか異なる核酸配列は、その縮重により、同一のアミノ酸配列をまだコードしうる。20

【0095】

本明細書で使用する場合、語句「ハイブリダイゼーション」は、核酸の鎖を塩基対合を介して相補的な鎖と結合する任意の工程を含むべきである(Coombs J, 1994, Dictionary of Biotechnology, stokton Press, New York NY)。「増幅」は、核酸配列のさらなるコピーの産出として定義され、一般的には本技術分野でよく知られているポリメラーゼ連鎖反応技術を用いて実施される(Dieffenbach and Dveksler, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)。30

【0096】

「ストリンジエンシー」は、典型的には約Tm-5(プローブの融解温度より5低い)~Tmより約20~25低い範囲でおこる。

【0097】

語句「ストリンジエンントな条件」は、ハイブリダイゼーションおよびそれに続く洗浄条件を意味し、当業者が「ストリンジエンント」として従来言及するものである.Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと。40

【0098】

本明細書で使用する場合、ストリンジエンントな条件は、ハイブリダイゼーション実験で使用した温度、ハイブリダイゼーション溶液中の一価のカチオンのモル濃度およびホルムアミドの割合の関数である。任意の所定の組の条件に関するストリンジエンシーの程度を決定するために、まず、DNA-DNAハイブリッドの融解温度Tmとして表した、50

0 % 同一性のハイブリッドの安定性を決定するための Meinkoth et al. (1984) の等式を利用する。

$$T_m = 81.5C + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%form) - 500/L$$

式中、Mは一価のカチオンのモル濃度であり、%GCはDNA中のGおよびCヌクレオチドのパーセンテージであり、%formはハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの割合であり、Lは塩基対のハイブリッドの長さである。100%同一ハイブリッドに対して計算したものよりTmが減少された各1°Cについて、許容されるミスマッチの量は、約1%まで増加する。したがって、特定の塩およびホルムアミド濃度での、任意の所定のハイブリダイゼーション実験に対して使用したTmが、Meinkothの等式にしたがって、100%ハイブリッドについて計算したTmよりも10°C低い場合、約10%までのミスマッチが存在する場合でさえも、ハイブリッド形成が起こる。

【0099】

本明細書で使用するように、「高度にストリンジエントな条件 (highly stringent conditions)」は、上記式によって計算されたか、または実際測定したかのいずれかで、標的配列を有する完全な二本鎖に対して存在するTmよりも10°C以上低くはないTmを供するものである。「中程度にストリンジエントな条件」は、上記式によって計算されたか、または実際測定したかのいずれかで、標的配列を有する完全な二本鎖に対して存在するTmよりも20°C以上低くはないTmを供するものである。限定はしないが、高度にストリンジエントな条件（ハイブリッドの計算された、または測定されたTmよりも5~10°C低い）および中程度にストリンジエントな条件（ハイブリッドの計算された、または測定されたTmより15~20°C低い）の例では、ハイブリッドの計算されたTmより低い適切な温度で、2×SSC（標準クエン酸食塩水）および0.5% SDS（硫酸ドデシルナトリウム）の洗浄溶液を使用する。該条件の究極のストリンジエンシーは主に洗浄条件によるものであり、とりわけ、使用したハイブリッド形成条件は、安定性の低いハイブリッドを安定なハイブリッドにしたがって形成させるものである。ついで、より高度にストリンジエントな洗浄条件によって、安定性の低いハイブリッドを取り除く。上述した高度なストリンジエンシーから中程度の洗浄条件まで使用可能な一般的なハイブリダイゼーション条件は、Tmよりもおよそ20~25°C低い温度での、6×SSC（または6×SSPE（標準リン酸食塩水-EDTA）、5×Denhardt's試薬、0.5% SDS、100&マイクロ；g/ml変性し、断片化サケ精子DNAの溶液中でのハイブリダイゼーションである。混合プローブを使用する場合、SSCの代わりに塩酸テトラメチルアンモニウム（TMAc）を利用することが好ましい（Ausubel, 1987, 1999）。成体幹細胞は、骨髄吸引のような外科的手法を用いて入手可能であるか、またはNexell Therapeutics Inc. Irvine, CA, USAより入手できるもののような市販システムを用いて得られる。本発明で利用する幹細胞は、好ましくは、幹細胞移行手法を用いて回収（すなわち収穫）し、この方法ではHSCsを対象の循環系へ放出するために、化学治療またはサイトカイン刺激を用いる。移行が、脊髄手術よりも、より多くのHSCsおよび前駆細胞を産出することが知られているので、幹細胞は好ましくはこの手法を用いて回収する。

【0100】

幹細胞移行は、多数の分子によって誘導可能である。実施例には、顆粒球コロニー-刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー-刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン（IL）-7、IL-3、IL-12、幹細胞因子（SCF）およびflt-3リガンドのようなサイトカイン、IL-8、Mip-1、Gro、またはSDF-1のようなケモカイン、化学治療薬剤シクロホスファミド（Cy）およびパクリタキセルが含まれるが、限定されるものではない。しかしながら、これらの分子は、速度論および効果が異なることが認められるが、しかしながら、現在公知の実施態様にしたがって、G-CSFが単独でまたはシクロホスファミドとのような組み合わせで、幹細胞を移行するために、好ましく使用される。典型的には、G-CSFは5~10μg/kgの用

10

20

30

40

50

量で5～10日間、毎日投与する。幹細胞を移行する方法は、米国特許第6,447,766号および第6,162,427号で開示されている。ヒト胚幹細胞はヒト胚盤胞より単離可能である。ヒト胚盤胞は典型的には、ヒトのインビトロでの未着床胚から、またはインビトロでの受精（IVF）胚から得る。あるいは、単一細胞ヒト胚を胚盤胞期に広げることが可能である。ヒトES細胞の単離のために、透明帯を胚盤胞から取り除き、内部細胞塊（ICM）を免疫手術によって単離し、そこでは、栄養外胚葉細胞を溶解し、穏やかにピペッティングすることによって無損傷のICMより除去する。ついでICMを、その増殖を可能にする適切な培養を含む組織培養フラスコ中にプレートする。9～15日後、機械的分解によって、または酵素的分解によってのいずれかで、増殖を誘導したICMをクランプ内に分離させ、ついで細胞を、新しい組織培地上に再プレートする。未分化形態を示しているコロニーをマイクロビペットによって個々に選別し、クランプ内に機械的に分離し、再プレートする。ついで、得られたES細胞を1～2週間ごと定期的に分割する。ヒトES細胞の製造方法における、さらなる詳細に関しては、Thomson et al., [米国特許第5,843,780号、Science 282:1145,1998; Curr.Top.Dev.Biol.38:133,1998; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844,1995]、Bongso et al., [Hum Reprod 4:706,1989]、Gardner et al., [Fertil.Steril.69:84,1998]を参照のこと。
10

【0101】

市販されて入手可能な幹細胞はまた、本発明の本観点にしたがって使用可能であることが理解されるであろう。ヒトES細胞を、NIHヒト胚幹細胞登録（<http://escr.nih.gov>）より購入可能である。市販されて可能な幹細胞系統の非限定例は、BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03およびTE32である。
20

【0102】

ヒトEG細胞は、当業者に公知の研究技術を用いて妊娠の約8～11週のヒト胎児より得た始原生殖細胞より回収可能である。生殖堤を分離し、小さな塊に切断し、その後、機械的分離によって、細胞をバラバラにする。ついで、EG細胞を、適切な培地で、細胞培養フラスコ中で増殖させる。細胞を、EG細胞と一致した細胞形態が観察されるまで、典型的には、7～30日後、または1～4継代、毎日培養液を交換して培養する。EG細胞を調製する方法における、さらなる詳細に関して、Shambrott et al., [Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726,1998]および米国特許第6,090,622号を参照のこと。
30

【0103】

多分化能を示している幹細胞集団の濃縮が、好ましく実施されうることが理解されるであろう。したがって、たとえば、本明細書以上で概略したように、本明細書以下でさらに記述するように、CD34+幹細胞はアフィニティーカラムまたはFACSを用いて濃縮可能である。

【0104】

幹細胞数が、治療に利用するために少なすぎる場合に、増殖条件下で幹細胞の培養もまた達成されうる。幹細胞の培養は、米国特許第6,511,958号、第6,436,704号、第6,280,718号、第6,258,597号、第6,184,035号、第6,132,708号および第5,837,573号で記述されている。
40

【0105】

一旦幹細胞を得たならば、CXCR4をコードしている配列を含むDNA、またはその活性部分をトランスフェクトする。

【0106】

「形質導入、トランスフェクトまたはトランスジェニック」細胞を、ポリヌクレオチドまたはDNAによってコードされたタンパク質を発現させる可能にする、好適な条件下で培養する。

【0107】

幹細胞に、CXCR4をコードする配列を含む組換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを形質導入可能であり、レンチウイル
50

ス系が、C X C R 4 またはその活性部分を発現するために好ましく使用される。どの場合でも、形質導入細胞をC X C R 4 の発現を可能にする効果的な条件下で培養する。効果的な培養条件には、限定はしないが、タンパク質産出を許容する効果的培地、バイオリアクター、温度、p H および酸素条件が含まれる。効果的な培地とは、本発明の組換え体改変ポリペプチドを産出するために細胞を培養する任意の培地を意味する。そのような培地には、典型的に、同化炭素、窒素およびリン酸供給源を有する水溶液、およびビタミンのような、適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養源が含まれる。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、およびペトリ皿内で培養可能である。培養は、組換え体細胞に好適な温度、p H および酸素含量で実施可能である。そのような培養条件は当業者の技能の範囲内である。

10

【0108】

そのような場合、発現構成体には、誘導可能で増殖特異的または組織特異的条件であります、哺乳動物細胞（上記の例）において活性であるシス・活性調節要素を含む。

【0109】

細胞特異的および/または組織特異的プロモーターの例には、肝臓特異的であるアルブミン [Pinkert et al., (1987)Genes Dev.1:268-277]、リンパ球特異的プロモーター [Calame et al., (1988)Adv. Immunol.43:235-275]、とりわけ、T-細胞レセプターのプロモーター [Winoto et al., (1989)EMBO J.8:729-733] および免疫グロブリン [Banerji et al. (1983)Cell 33:729-740]、神経フィラメントプロモーターのようなニューロン特異的プロモーター [Byrne et al. (1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477]、胰臓・特異的プロモーター [Edlunch et al. (1985)Science 230:912-916] または乳漿プロモーターのような哺乳動物腺・特異的プロモーター（米国特許第4,873,316号および欧洲特許第264,166号）のようなプロモーターが含まれる。本発明の核酸構築物はさらに、プロモーター配列に隣接可能であるか、または遠位でありうる、そして、それからの転写をアップレギュレートするように機能可能なエンハンサーを含みうる。

20

【0110】

好ましくは、誘導可能なシス・活性調節要素は、ホーミング・移植工程のあいだの幹細胞の環境の変化によって調節されうる。

【0111】

本発明の核酸構成は、さらにI R E S 要素、好ましくはE M C V I R E S を含み得、これはC X C R 4 遺伝子とマーカーまたは選別遺伝子配列間に存在し得、マーカーまたは選別遺伝子の翻訳をアップレギュレートする際に機能可能である。

30

【0112】

一旦C X C R 4 またはその活性部分が過剰発現したならば、幹細胞はS D F - 1 に対する応答の増加を示す。

【0113】

本発明の本観点によると、C X C R 4 を過剰発現しているそのような細胞の同定および単離は、本技術分野でよく知られている多数の細胞学的、生化学的および分子的方法を用いて達成可能である。

40

【0114】

レセプターレベルの解析は、フローサイトメトリーによって達成可能である。このアプローチは、培養液中の励起供給源を通じて流れる単一細胞をスキャンする器具を使用する。この技術は、可視および蛍光発光の測定に基づく、単一の生（または死）細胞の、迅速で、定量的、多パラメータ解析を提供可能である。この基礎プロトコールは、特異的な細胞結合分子に結合する蛍光・標識抗体およびリガンドによって産出される蛍光強度を測定することに焦点を当てている。蛍光活性化細胞ソーターを用いて細胞群を単離するために、本発明の幹細胞を、R & D , 614 M c K i n l e y P l a c e N E M i n n e a p o l i s , MN から市販されて入手可能な抗C X C R 4 と接触させる。

【0115】

走化性レセプター発現のレベルを定量的に評価するための他の細胞学的または生化学的

50

方法には、限定はしないが、標識化（たとえば放射活性標識化）ケモカインを用いる結合解析、ウエスタンプロット解析、細胞 - 表面ビオチン化および免疫蛍光染色が含まれる。レセプター発現レベルは、mRNAレベルによって決定することも可能であることが理解されるであろう。たとえば、CXCR4のmRNAは、特異的プローブとハイブリダイゼーションすることによって細胞内で検出しうる。そのようなプローブは、典型的には、インピトロでの転写によって作製するクローニングDNAまたはその断片、RNA、または通常固相合成によって生成するオリゴヌクレオチドプローブでありうる。特定ハイブリッド形成のために好適なプローブを生成し、利用するための方法は、本技術分野でよく知られており、使用されている。mRNAレベルの定量はまた、対象の走化性レセプターのmRNAに特異的にハイブリッド形成するプライマーを用いる增幅反応 [たとえば、PCR、
[PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA(1990)] を用いて実施することが可能である。

10

【0116】

mRNA検出アッセイにおける精度を改善するために、多様な対照を有効に利用しうる。たとえば、試料をハイブリダイゼーションの前にRNase Aで処理して不適切なプローブでハイブリダイズさせ、誤りのハイブリダイゼーションを評価する。

【0117】

機能アッセイもまた、走化性レセプター発見を決定するために利用可能である。たとえば、走化性試薬（たとえばSDF-1）の勾配を用い、走化性試薬に向かって膜を通る幹細胞遊走を追う走化性アッセイは、走化性の増加を示している幹細胞を同定し、単離するために利用可能である。細胞が十分なレベルの走化性レセプター（たとえばCXCR4）を発現しない場合、細胞の大部分が膜上に残る。しかしながら、本発明の化学誘引物質レセプターの発現の増加に際し、細胞が膜を通って遊走し、走化性プレートのウェルの底に定着する（実施例項の実施例3を参照のこと）。機能的ホーミングアッセイもまた、本発明の方法によって利用可能であることが理解されるであろう。そのようなアッセイは、Koillet (2001) Blood 97:3283-3291で記述されている。

20

【0118】

低または高SDF-1濃度に対する応答における、CXCR4シグナル伝達能力の改善を示している幹細胞、および / またはCD34+/CD38-/low集団のような、未熟な初期前駆細胞のレベルの増加を示している幹細胞を、広範囲の臨床適用で使用可能である。

30

【0119】

したがって、本発明の他の観点によると、細胞または組織の置換を必要とする疾病を治療する方法が提供される。本方法は、それを必要とする対象に、治療的に有効量のCXCR4またはその活性断片を過剰発現しているトランスジェニック幹細胞を投与すること、それによってSDF-1の濃度が増加する環境中でさえ、SDF-1に対するよりよい応答をするCD34+/CD38-/low集団のような高レベルの未熟な初期前駆細胞を提供することによって実施され、それによって対象の細胞または組織の置換を必要とする疾病を治療する。細胞または組織の置換を必要とする疾患には、限定はしないが、リウマチ様関節炎のように、Tおよび / またはB-リンパ球のような種々の免疫不全または免疫疾病が含まれる。そのような免疫不全は、ウイルス感染、HTLV-I、HTLV-II、HTLV-III、放射線への重度の暴露、癌治療の結果、または他の医薬治療の結果である。血液学的不全には、限定はしないが、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性非リンパ芽球性白血病(ANLL)、急性骨髓性白血病(AML)または慢性骨髓性白血病(CML)のような、白血病が含まれる。他のそのような血液学的不全は、限定はしないが、[たとえばアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損およびX-結合SCID(XSCID)のような]重度混合免疫不全(SCID)症候群、大理石骨病、再生不良性貧血、ゴーシュ病、地中海性貧血および他の先天性または遺伝的に決定された造血異常でありえ、細胞または組織の置換を必要とする他の疾患には、肝不全、脾臓不全、神経学的疾患有関連するものや、変形性関節症、骨粗鬆症、骨欠損、結合組織欠損、骨格欠損または軟骨

40

50

欠損のような任意の結合組織が関与する外傷性または病的状態が含まれる。

【0120】

本発明にしたがった好ましい個々の対象は、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、および好ましくはヒトのような哺乳動物である。

【0121】

本発明の本観点にしたがった幹細胞は、治療すべき対象から得ることが好ましい。しかしながら、幹細胞はまた、同系、同種異系、そしてあまり好ましくはないが、異種ドナーから得て良い。

【0122】

同種異系または異種幹細胞を利用する場合、レシピエント対象および／または細胞を、好ましくは、移植片対宿主、および宿主対移植片拒絶を防止するために処置することが理解されるであろう。免疫抑制プロトコールは、本技術分野で公知であり、いくつかは米国特許第6,447,765号で開示されている。

【0123】

本発明の幹細胞は、米国特許第5,928,638号でさらに記述されている肝炎に対する抗ウイルス薬のような、任意の治療的遺伝子を発現するために、遺伝的に改変可能である。幹細胞を、レシピエント対象に移植する。これは一般的に、本技術分野でよく知られた方法を用いて実施され、通常当業者によく知られている臨床ツールを用いて、対象内に処理した幹細胞を注射または導入することが含まれる（米国特許第6,447,765号、第6,383,481号、第6,143,292号および第6,326,198号）。

【0124】

たとえば、本発明の幹細胞の導入は、静脈内または動脈内投与のような血管内投与、腹腔内投与などを介して、局所または全身で実施可能である。細胞は、無菌シリンジまたは他の無菌伝達機構を用いて、50 mol Fenwall注入バッグに注射可能である。ついで細胞をすぐに、15分間程度の時間以上でにわたり、IV投与を介して、患者内のフリーフローIVライン内に注入可能である。いくつかの実施態様において、緩衝液または塩のようなさらなる試薬も同様に加えて良い。投与する組成物は、適切な無菌性および安定性を達成する標準の方法にしたがって、処方、生成および保存すべきである。

【0125】

幹細胞投与量は、指示された利用にしたがって決定可能である。一般的に、非経口投与の場合、レシピエントの体重1キログラムあたり、約0.01～約5百万細胞を投与することが通例である。使用した細胞の数はレシピエントの体重および状態に依存し、投与の回数または頻度および他の変数は当業者に公知である。

【0126】

CXCR4過剰発現系のさらなる拡大は、遺伝子治療プロトコールに続く、損なわれたホーミングおよび生着を改善するために効果的なツールとして働き得る^{8,9}。さらに、ヒトCD34⁺細胞のCXCR4過剰発現は、両方ともが低い細胞収率によって限定され得る化学治療処置に続く臨床CB-CD34⁺移植の改善、ならびに自己移行PBL-CD34⁺移植を促進しうる⁶。さらに、間葉性幹細胞のような他の細胞型は、種々の器官へ遊走する能力を有するが、しかしながら、それらの生着のレベルは特に低い。したがって、標的器官内でのSDF-1の発現または投与の誘導とともに、細胞表面の構造性または一過性CXCR4発現を促進する系の発展が、インビオでの指向性遊走ならびに器官回復の一部として患者の対象の器官の種々の細胞型の長期再増殖および発達のために有益であり得る。したがって、本発明者らは、多くの臨床プロトコールの結果を改善できる幹細胞の機能および発達を調節するための普遍的な系として、CXCR4の過剰発現を提案する。

【0127】

対象へ細胞を投与した後、もし望むなら、本技術分野で公知のように治療の効果を評価し得る。治療を必要であったりまたは必要とされるように繰り返して良い。

【0128】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる目的、利点および新規の特徴が、限定する意図はないが、以下の実施例を試みることで当業者に明らかになるであろう。さらに、本明細書の以上で記述したような、そして以下の請求項の項目で請求したような、各種々の実施態様および観点は以下の実施例において実験的支持を見いだす。

【0129】

実施例

ここで前記記述とともに、非限定様式にて本発明を例示する以下の実施例に対し、参考文献を作製する。

【0130】

一般的に、本明細書で使用される用語および本発見で利用される実験手法には、分子学的、生化学的、微生物学的および組換え体DNA技術が含まれる。そのような技術は、文献にて、十分に説明されている。たとえば、「モレキュラークローニング：研究室マニュアル (Molecular Cloning:A laboratory Manual)」Sambrook et al.,(1989);「分子生物学のカレントプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」Volumes I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel et al.,「分子生物学のカレントプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,「分子クローニングに対する実施ガイド (A Practical Guide to Molecular Cloning)」,John Wiley & Sons,New York(1988);Watson et al.,「組換え体DNA (Recombinant DNA)」,Scientific American Books,New York;Birren et al.(eds)「ゲノム解析：研究室マニュアルシリーズ (Genome Analysis:A Laboratory Manual Series)」,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);米国特許第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号および第5,272,057号で列記されたような方法論；「細胞生物学：研究室ハンドブック (Cell Biology:A Laboratory Handbook)」Volumes I-III Cellis J.E.,ed.(1994), "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J.E.,ed(1994);Stites et al.(eds),「基礎および臨床免疫学 (Basic and Clinical Immunology)」(8th Edition)、Appleton & Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds),「細胞免疫学における選別方法 (Selected Methods in Cellular Immunology)」,W.H.Freeman and Co.,New York(1980)を参照のこと。利用可能な免疫アッセイは、特許および科学的文献にて広く記述され、たとえば、米国特許第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号および第5,281,521号；「オリゴヌクレオチド合成 (Oligonucleotide Synthesis)」Gait,M.J.,ed.(1984);「核酸ハイブリッド形成 (Nucleic Acid Hybridization)」Hames,B.D.,and Higgins S.J.,eds.(1985);「転写および翻訳 (Transcription and Translation)」Hames,B.D.,and Higgins S.J.,Eds.(1984);「動物細胞培養 (Animal Cell Culture)」Freshney,R.I.,ed.(1986);「固定化細胞および酵素 (Immobilized Cells and Enzymes)」IRL Press,(1986);「分子クローニングへの実施ガイド (A Practical Guide to Molecular Cloning)」Perbal,B.,(1984)および「酵素学における方法論 (Methods in Enzymology)」Vol.1-317,Academic Press;「PCRプロトコール：方法および適用へのガイド (PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications)」,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak et al.,「タンパク質精製および特性化に関する戦略 - 研究室コースマニュアル (Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual)」CSHL Press(1996)を参照のこと。技術の全ては、本明細書で完全に列記したような参考文献に組み入れられている。他の一般的な参考文献が、本文書を通して提供される。本明細書内の手法は、本技術分野でよく知られていると信じられ、読者の利便性のために提供される。本明細書に含まれる全ての情報が、参考文献によって、本明細書に組み込まれている。

10

20

30

40

50

【実施例 1】

【0131】

C X C R 4 - 形質導入ヒト C D 3 4⁺細胞は、表面 C X C R 4 発現を増加させた C X C R 4 を、 H I V - 由来レンチウイルス遺伝子伝達系を用いて、ヒト C B および M P B C D 3 4⁺濃縮細胞上で過剰発現させた。形質導入細胞を、 C X C R 4 表面発現に関して解析した。

【0132】

材料および実験手法

ヒト細胞 - 脇帯血 (C B) 細胞および成人移行末梢血 (M P B) 細胞を、インフォームドコンセントの後に得た。 C D 3 4⁺細胞濃縮を、先に記述された [Kollet(2001)Blood 9 10:3283-3291] ように、磁気ビーズ分離を用いて実施した。 C X C R 4 発現を、精製した抗ヒト C X C R 4 (クローン 1 2 G 5 、 R & D 、ミネアポリス、 MN) およびヤギ抗マウス I g G F I T C の二次 F (a b') 2 断片 (ジャクソン (Jackson) 、ウエストグループ、 PA) を用いた、フローサイトメトリーによって促進した。

【0133】

ウイルスベクター構築および生産 - ヒト C X C R 4 遺伝子レンチウイルス発現ベクターを、ヒト C B 細胞から 1 . 2 k b C X C R 4 c D N A を単離し、それを、内部リボソームエントリー部位 (I R E S) を介して、増強グリーンフルオレセントタンパク質 (G F P) に連結することによって構築した。 C X C R 4 - I R E S - G F P を含む断片を、 E F - 1 プロモーターとライゲートし、 E F - 1 - C X C R 4 - I R E S - G F P バイリストロン性カセットを含む断片を、親切にも Dr . D i d i e r Trono , Geneva , Switzerland によって提供された、 p H R ' - S I N ベクター骨格内に挿入された (Woods et al. Blood. 2000 Dec 1;96(12):3725-33.) 、自己 - 不活性化 (S I N) ベクターを生成した。対照ベクターは、 C X C R 4 遺伝子を欠き、 G F P のみを発現する (図 1) 。

【0134】

複製 - 欠損、自己 - 不活性化 H I V - 由来レンチウイルスベクターを、 3 プラスマド系 : 運搬ベクター、 C D 3 4⁺細胞に対して p H R ' - E F 1 a - G F P - S I N (対照ベクター) または p H R ' - E F 1 a - C X C R 4 - I R E S - G F P - S I N 、 h M S C s に対して p H R ' - C M V - G F P (対照ベクター) または p H R ' - C M V - C X C R 4 - I R E S - G F P (実験ベクター) 、エンベロープコードプラスマド p M D . G およびパッケージング構築物 p C M V R 8 . 9 1 (Zufferey R , Nat. Biotechnol. 1997;15:87 1-875, Naldini L , Science. 1996;272:263-267) を用いて、 F u G E N E 6 トランスフェクション試薬 (ロッシュ ダイアグノスティックス (Roche Diagnostics) 、ミュンヘン ドイツ) の方法により、 2 9 3 T パッケージング細胞株の一過性トランスフェクションにて産出した。トランスフェクション 2 4 時間後に、ウイルス上清を、 2 % B S A (シグマ (Sigma) 、セントルイス、 M O 、 U S A) 、 1 0 m g / m l インスリン (バイオロジカル インダストリーズ (Biological Industries) 、 Be it Ha emek 、イスラエル) 、 2 0 0 m g / m l トランスフェリン (シグマ) 、 0 . 1 m M 2 - メルカプトエタノール、 2 m M L - ゲルタミン (バイオロジカル インダストリーズ) 、 1 0 0 m g / m l ストレプトマイシン (バイオロジカル インダストリーズ) 、および 1 0 m M H e p e s (バイオロジカル インダストリーズ) を含む血清不含培地で置換した。 2 4 時間後、ウイルス上清を回収し、濾過し (0 . 4 5 μ M M i n i s a r t フィルター、サルトリウス (Sartorius) 、 A G 、ドイツ) 、標的細胞の形質導入のために利用した。

【0135】

C D 3 4⁺細胞の形質導入 - C D 3 4⁺細胞の形質導入を、 H S C 中の二重形質導入プロトコール⁵⁰を用いて実施した。 C D 3 4⁺細胞 (ウェルあたり 4 × 1 0⁵ まで) を、 1 2 - ウェルプレート中で 2 4 時間、 4 0 0 μ l の血清不含培地中、 S C F (5 0 n g / m l) で前刺激した。 S C F (5 0 n g / m l) および F L T - 3 L (5 0 n g / m l) (とも 50

に R & D システムズ、ミネアポリス、M N から)、IL - 6 (50 ng / ml ; インターファーム ラボラトリーズ (Interpharm Laboratories)、アレス - セロノグループ (Ares-Serono Group)、N e s s Z i o n a、イスラエル) を補足したウイルス上清 (1.6 ml / 35 mm ウェル) を、 2×10^7 TU / ml 程のウイルス負荷で、細胞に加えた (一次感染)。形質導入を 24 時間後に繰り返した (二次感染)。感染効率を、形質導入 72 時間後、フローサイトメトリー解析 (Kollet 2002 Blood vol100、2778 ページ) (FACSCalibur、ベクトン ディッキンソン (Becton Dickinson) (BD)、サンジョゼ、CA) によって、特異的抗ヒト CXCR4 - PE (12G5、BD ファーミング (Pharmingen)、サンディエゴ、CA) および GFP (FL1 チャンネル) を用いて、CXCR4 の細胞発現により決定した。モック細胞を、レンチウイルスベクターへの暴露なしに、形質導入細胞と同様の条件で培養した。

10

【0136】

CB および MPB CD34⁺ 細胞両方が、フローサイトメトリーによって記録したところ、高い形質導入効果を示し、GFP ベクター (対照) 形質導入細胞では 70% GFP 陽性細胞に、CXCR4 - 形質導入細胞では 50% に達した (図 2A - 上パネル)。さらに、CXCR4 - 感染 CD34⁺ 細胞は、細胞表面 CXCR4 発現に関して、 $87 \pm 2.7\%$ (CB) および $80 \pm 4\%$ (MPB) 陽性であり、一方で、GFP ベクターに感染した CB および MPB CD34⁺ 細胞両方では $28 \pm 3.1\%$ のみが内因性 CXCR4 を発現しており、非形質導入細胞 (モック細胞) のレベルに類似していた (図 2A - 下パネル (それぞれ) および B)。興味深いことに、CXCR4 形質導入細胞は、GFP ベクター形質導入細胞の 10.2 と比較して、89.4 のより高い平均蛍光強度 (MFI) を示した (図 2C)。しかしながら、それらの細胞内 CXCR4 発現は、それらの対照 (GFP) 対応物より低かった (図 2C)。とりわけ、CXCR4 ベクターを形質導入した細胞は、GFP⁺ 細胞が少なく、IRES から下流に位置する遺伝子の発現レベルの減少を示している、先の報告⁵¹ と一致する。

20

【0137】

これらの結果は、CB および MPB CD34⁺ 細胞の両方が、CXCR4 トランスジーンを高発現するレンチウイルスベクターを用いて、首尾良く形質導入できることを示している。

30

【実施例 2】

【0138】

CXCR4 - 過剰発現ヒト CD34⁺ 細胞は、インビトロでの分化可能性およびトランスジーン発現を維持する

幹細胞および前駆細胞は、適切なサイトカインカクテルを供した場合に、骨髓および赤血球系にインビトロで多系統分化が可能である (cancer research 1977 vol 61 ページ 1 での Metcalf の最近の結果)。したがって、本発明者らは、分化した系ににおける、形質導入細胞の、インビトロでの分化する能力に対する、トランスジーン発現の効果を評価した。

40

【0139】

実験手法

CFU アッセイ - エクソビオ培養中の形質導入後の、ヒト前駆細胞のレベルならびにトランスジーン発現の維持を検出するために、半固体培養を、先に記述された⁵² ように実施した。簡単に記すと、CB CD34⁺ 形質導入細胞 (3×10^3 細胞 / ml) を、0.9% メチルセルロース (シグマ)、30% FCS、 5×10^{-5} M 2ME、50 ng / ml SCF、5 ng / ml IL - 3、5 ng / ml GM-CSF (R&D)、および 2 u / ml エリスロポエチン (オルソバイオ テック (Orto Bio Tech)、Don Mills, Canada) 中にプレートした。培養物を、5% CO₂ を含む加湿雰囲気中、37°にてインキュベートし、14 日後、GFP⁺ に関しては、位相差顕微鏡を用いて、ならびに形態基準を用いて、骨髓または赤血球コロニーを記録した。

【0140】

50

トランスジーン発現が、細胞の、骨髓および赤血球系統への分化能力に影響を与えないことがわかった。形質導入 CD 34⁺細胞（対照および CXCR4 両方）は、14日目に位相差顕微鏡によって記録し、バースト・形成ユニット・赤血球（BFU-E）およびコロニー・形成ユニット・顆粒球、マクロファージ（CFU-GM）のような GFP⁺ CFU-CFC コロニーへの多分化能分化を示した（図3A）。対照ベクターを形質導入した GFP⁺ CFC コロニーの数は、CXCR4 ベクターを形質導入した GFP⁺ CFC コロニーより 2 倍多く、本ベクターでの形質導入の後の GFP⁺ 細胞のより低い割合と一致する（図3B）。興味深いことに、対照ならびに CXCR4 - 形質導入細胞両方が、同数の CFU-GM コロニーを産出する一方で、CXCR4 - 形質導入細胞より産出される BFU-E コロニーが、25% ($p = 0.004$) 減少し（図3B）、SDF-1 / CXCR4 相互作用が、赤血球系統分化を抑制することを示した Gibelli et al の先の発見⁵³を証明している。さらに、MPB CD 34⁺ CXCR4 形質導入細胞は、対照細胞での 0.5% と比較して、より高い割合（2.9%）の CD 34⁺ / CD 38⁻ / low 集団を示した。この効果は、CB CD 34⁺ 細胞では観察されなかった（図3C）。CXCR4 形質導入はしたがって、CD 34⁺ / CD 38⁻ / low 始原集団をより保存および / または拡大しうる。

【実施例3】

【0141】

形質導入 CD 34⁺ 細胞で発現した CXCR4 は機能的である

ケモカインは、細胞骨格配置、とりわけアクチン重合化を導く細胞内事象のカスケードを活性化することによって、細胞運動性を誘導する⁵⁴。挿入したレセプターの機能性を決定するための方法として、本発明者らは、運動性機構の SDF-1 誘導活性化に対する CXCR4 過剰発現の効果を試験した。

【0142】

実験手法

アクチン重合化アッセイ - 形質導入細胞を、示した時間、37にて、血清 - 不含 RPMI 中で、SDF-1 (300 ng/ml、ペプロテック (Peprotech)、Rocky Hill, NJ) で刺激した。反応を、RT にて 10 分間、3 容量の 3.7% パラホルムアルデヒドを加えることによって停止させ、続いて、PBS で洗浄し、0.1% Triton-Hepes (20 mM Hepes, 300 mM サッカロース、50 mM NaCl、3 mM MgCl₂、0.1% Triton) で、2 分間、氷上にて透過化処理をした。ついで細胞を、RT にて 30 分間、FITC-Phalloidin (2 mg/ml、シグマ) で染色し、洗浄し、フローサイトメトリーによって解析した。

【0143】

遊走アッセイ - 125 ng/ml SDF-1 を含む、10% FCS 含有 RPMI (600 μl) を、Costar 24 - ウェルトランスウェル（コーニング (Corning) (ボアサイズ 5 μm)、NY) の下部チャンバーに加えた。100 μl の培地中の 1×10^5 形質導入 CD 34⁺ 細胞を、上部チャンバーにのせ、37 にて 4 時間遊走をさせた。遊走している細胞を、下部チャンバーより回収し、FACSCalibur を用いて、30 秒間計数した。対照自発遊走は、SDF-1 なしで、下部チャンバーで実施した。

【0144】

本発明者らは、CB CD 34⁺ 細胞が、SDF-1 での 30 秒の刺激後に、アクチン重合化のピークを示したことを見出した（図4A）。この時点で、刺激していない細胞と比較した場合、CXCR4 過剰発現細胞はアクチン重合化において、 3 ± 0.11 ($p < 0.001$) 倍増加、対して対照細胞において、 1.5 ± 0.07 ($p = 0.002$) 倍増加を示した（図4A）。これらの結果を踏まえ、本発明者らは、トランスウェル遊走アッセイにて、SDF-1 (125 ng/ml) の勾配に対する、CXCR4 - 形質導入 CB および MPB CD 34⁺ 細胞の遊走潜在能力を調査した。CXCR4 を過剰発現している細胞は、対照ベクター - 形質導入細胞と比較した場合、CB について 1.5 ± 0.0

10

20

30

40

50

4 ($p < 0.001$) 倍、およびMPBについて 2.3 ± 0.3 ($p = 0.03$) 倍の、SDF-1 介走化への応答の有意な増加を示した(図4B)。全てこれらのデータは、ヒト濃縮CD34⁺前駆細胞上のCXCR4の過剰発現が、SDF-1 誘導シグナル伝達の增强を示し、細胞運動性の增加を導くことを示唆している。

【実施例4】

【0145】

CXCR4形質導入CD34⁺細胞は、低SDF-1濃度に対して、より応答しやすい

CD34⁺細胞上のCXCR4の過剰発現が、低SDF-1濃度に対して、それらをより応答しやすくしうることが仮定された。これを検証するために、形質導入細胞のインビトロ遊走を、異なるSDF-1濃度に対して実施した。さらに、サイトカインとの相乗効果での低濃度のケモカインSDF-1が、ヒトCD34⁺細胞の増殖、ならびにヒトおよびマウス両方の前駆細胞の生存を増強することが示された²⁵⁻²⁸。したがって、CXCR4過剰発現細胞の増殖における、低濃度でのSDF-1の効果をモニタした。

10

【0146】

実験手法

遊走アッセイ - 先に記述したのと同様(12)。簡単に記すと、10ng/mlまたは12ng/mlのいずれかのSDF-1を含む、10% FCS含有 RPMI(600μl)を、Costar 24-ウェルトランスウェル(コーニング(ポアサイズ5μm)、NY)の下部チャンバーに加えた。100μlの培地中の 1×10^5 形質導入CD34⁺細胞を上部チャンバーにのせ、37にて4時間遊走をさせた。遊走している細胞を下部チャンバーより回収し、FACSCaliburを用いて、30秒間計数した。対照自発遊走は、SDF-1なしで下部チャンバーで実施した。

20

【0147】

増殖アッセイ - 96時間の形質導入プロトコールの後、CB CD34⁺細胞を、SDF-1 50ng/mlの存在下、または非存在下で、SCF 50ng/ml、FLT-3L 50ng/mlおよびIL-6 50ng/mlを含む血清不含培地中で、二重に、7日間培養した。細胞を毎日計数し、生存を、トリパンブルー排除によって評価した。

【0148】

すでに、低濃度のSDF-1(10ng/ml)にて、CB CXCR4-形質導入細胞の遊走は、高SDF-1濃度(125ng/ml)でのこれらの細胞の遊走と同様に、25%のピークレベルに達することが見出された。図4Bで示すように、低濃度のSDF-1(10ng/ml)で、ヒトCBから単離したCXCR4-感染細胞が、それらの対照ベクター-形質導入同等物に比べて、遊走において2.5倍($p < 0.05$)までの増加を示し、一方で高SDF-1濃度(125ng/ml)ではこの増加は有意性が低かった(1.5倍)。同様に、遊走細胞の割合がCB CD34⁺細胞に関してよりも非常に低かったにも関わらず、CXCR4-形質導入MPB CD34⁺細胞は、125ng/ml SDF-1に対する2倍増加と比較して、10ng/ml SDF-1に対して、遊走に関して、2.6($p = 0.05$)倍の増加を示した(図4B)。さらに、7日にわたりCXCR4過剰発現細胞の増殖を評価したところ、CXCR4-形質導入CB CD34⁺細胞が、播種後48時間ですでに、その播種した量のほとんど二倍になることが観察され($p < 0.05$)、この効果は培養中7日までの間見られうる($p = 0.001$)。しかしながら、対照細胞は5日目に 1.2 ± 0.05 倍までその細胞数が増加しただけで、7日までに、播種した本来の量以下にその数が減少した(図5A)。特に、このCXCR4過剰発現細胞の増殖効果の增强は、より高い(100ng/ml)SDF-1濃度では検出されなかった(データは示していない)。長期の培養が細胞分化を導き、レンチウイルス形質導入に続く細胞形質転換の可能性を除外する。総合すると、本発明者らの結果は、対照細胞と比較した場合に、CD34⁺細胞上のCXCR4の過剰発現が、低SDF-1濃度に対するそれらの応答を增强し、それらの運動性および増殖/生存の両方を増加させ、高濃度にはあまり応答しないことを示している。

30

40

50

【実施例 5】

【0149】

C X C R 4 過剰発現細胞は、 S D F - 1 誘導脱感作に対する応答性は低い

S D F - 1 は高濃度 (1 μ g / m l およびそれ以上) で最終的に細胞表面へ再循環される細胞表面 C X C R 4 分子のエンドサイトーシスを介した脱感作および内部化を誘導することが記述されてきた⁵⁵。したがって、本発明者らは、 C X C R 4 を過剰発現している細胞における高 S D F - 1 濃度の効果を試験した。

【0150】

実験手法

C X C R 4 細胞表面発現 - C X C R 4 - 形質導入 C B C D 3 4⁺ 細胞を、 1 μ g / m l S D F - 1 とともに一晩インキュベートした。細胞表面 C X C R 4 発現を、細胞を抗ヒト C X C R 4 - P E (12G5、 BD ファーミング、サンディエゴ、 CA) で標識することにより特定し、フローサイトメトリー (F A C S C a l i b u r 、ベクトン ディッキンソン (BD) 、サンジョゼ、 CA) によって解析した。10

【0151】

遊走アッセイ - 125 ng / m l S D F - 1 を含む、 10 % F C S 含有 R P M I (600 μ l) を、 Costar 24 - ウェルトランスウェル (コーニング (ポアサイズ 5 μ m) 、 NY) の下部チャンバーに加えた。100 μ l の培地中の 1 × 10⁵ 形質導入 C D 3 4⁺ 細胞を、上部チャンバーにのせ、 37 ℃ にて 4 時間遊走をさせた。遊走している細胞を、下部チャンバーより回収し、 F A C S C a l i b u r を用いて、 30 秒間計数した。対照自発遊走は S D F - 1 なしで下部チャンバーで実施した。20

【0152】

C X C R 4 - 形質導入 C B C D 3 4⁺ 細胞を、 1 μ g / m l S D F - 1 を加えて一晩インキュベートし、 C X C R 4 細胞表面発現に関して解析した。予想外にも、 C X C R 4 過剰発現細胞では、細胞表面レセプター発現が 40 % (p < 0.05) 減少しただけで、一方対照細胞では、 90 % (p < 0.05) までレセプターが内部化した (図 5 B i) 。この脱感作につづき、細胞を S D F - 1 (125 ng / m l) 勾配に向かう指向性遊走に関して、インビトロで同様にアッセイした。対照細胞は S D F - 1 仲介遊走の有意な (p < 0.05) 減少を示し、一方で C X C R 4 - 形質導入細胞の遊走はほとんど影響を受けなかった (図 5 B ii) 。このことは、 C X C R 4 の内部化が、継続して機能的であるレセプターの持続的過剰発現によって補償されることを示唆している。30

【実施例 6】

【0153】

C X C R 4 過剰発現は、 N O D / S C I D マウスの S R C 生着を改善する

ヒト C B C D 3 4⁺ 細胞の S D F - 1 / C X C R 4 - 依存生着における C X C R 4 過剰発現の効果を評価するために、形質導入前駆細胞を N O D / S C I D マウスに移植した。

【0154】

実験手法

マウス N O D / L t S z - P r k d c s c i d (N O D / S C I D) マウスを、先に 18 に記述したように、交配し、維持した。すべての実験はワイズマン インスティチュート (Weizmann Institute) の動物ケア委員会によって許可された。8 ~ 10 週齢のマウスに亜致死的放射をし (375 c G y 、 60 C o 供給源より) 、放射 24 時間後に、示した [2 × 10⁵ 細胞 / マウス (生着) および 5 × 10⁵ 細胞 / マウス (ホーミング)] ように、ヒト細胞を移植した。40

【0155】

ヒト細胞生着およびホーミング - マウスを、移植後 5 週間後あたりで犠牲死させ、骨髄および脾臓細胞を回収し、単一細胞懸濁液に再懸濁させた。ヒト細胞生着を、特異的抗ヒト C D 4 5 - A P C m A b (BD ファーミング) を用いて、フローサイトメトリー (F A C S C a l i b u r 、 BD) によってアッセイした。系統解析は抗 - C D 1 9 - P 50

E (BD ファーミング) または抗 - CD33 - PE (BD) で染色することによって実施した。より前駆的な細胞集団を、抗 - CD38 - PE (BD) と一緒に CD34 - APC mAb (BD ファーミング) を用いて解析した。ヒト細胞もまた、GFP 発現 (FL1 チャネル) に関して解析した。ヒト血漿およびマウス IgG を使用して、Fc レセプターをブロックした。アイソタイプ対照抗体、および移植を受けなかったマウスから得た細胞を、陰性対照として使用し、ヒト CB CD34⁺ 細胞を陽性対照として使用した。

【0156】

本発明者らは、対照細胞と比較した場合、CXCR4 - 形質導入細胞が、CB CD34⁺ 細胞に関して、4 ± 0.7 (p = 0.001) 倍までのマウス BM におけるヒト細胞の生着の増加を示したことを発見した (図 6A i)。同様に、CXCR4 - 形質導入細胞は、脾臓の再増殖を 2.7 ± 0.8 (p = 0.05) 倍増加することを示した (図 6A ii)。興味深いことに、対照または CXCR4 - 形質導入細胞を移植したマウスにおいて、循環ヒト細胞の数に有意差は観察されなかった (図 6A iii)。さらに、CD19 および CD33 モノクローナル抗体での代表的な FACS 染色により、それぞれリンパ球および骨髄集団への多系統造血が、もっともおそらく、SDF-1 は PreB 細胞増殖因子でもあるので、CXCR4 - 形質導入細胞を移植したマウスで、より B - 細胞リンパ造血の傾向を有して (図 6C)、マウス BM 中で維持される (図 6B) ことを示している。さらに、CD45⁺ 細胞の平均 36% ± 19% (範囲 7.5% ~ 77%) が GFP を発現することがわかった (図 6B)。トランスジーン発現もまた、骨髄およびリンパ集団の両方で検出された (図 6B)。CXCR4 過剰発現細胞を移植したマウスは、対照ベクター - 形質導入細胞を注射したマウスと比較して、前駆 CD34⁺ / CD38^{-/+10^w} 細胞集団の 4 倍の増加を示し (図 6D)、これは CXCR4 - 過剰発現細胞のより高い生着レベルがより前駆的な細胞集団の再増殖の増加によることを示唆している。

【0157】

未熟ヒト CD34⁺ CD38^{-/+10w} CXCR4⁺ 細胞の、マウス BM および脾臓へのホーミングは、CXCR4 / SDF-1 相互作用に依存することが先に示された¹⁸。したがって、ヒト CD34⁺ 細胞上の CXCR4 の過剰発現が、亜致死的放射 NOD / SCID マウスの、BM および脾臓へのそれらのホーミングを改善できるかどうかをさらに試験した。移植 2 時間 (CB) および 16 h (MPB) 後の CXCR4 - 形質導入細胞が、それらの対照同等物と比較して、脾臓へのホーミングにおいて 2 倍以上の増加を示した (図 6E)。しかしながら、これらの差は、BM へのそれらのホーミング能力では検出されなかつた (データは示していない)。これらの結果は、先に示唆されたように¹⁸、CXCR4 - 形質導入細胞が BM の再増殖前に短期間で脾臓にホーミングすることを示唆している (移植後 5 週間)。

【実施例 7】

【0158】

過剰発現 CXCR4 の抗原決定基

最初の一組の実験で、本発明者らは、対照 GFP 形質導入臍帯血 CD34⁺ 細胞、または CXCR4 過剰発現 CD43⁺ 細胞のいずれかに対して、CXCR4 の最初の N - 末端細胞外ドメイン内に局在する (図 7)、ヒト CXCR4 - a 位の残基 22 ~ 25 に特異的な mAb 6H8 の結合を解析した。本発明者らは、内因性 CXCR4 のみを発現している GFP (対照) 形質導入 CB CD34⁺ 細胞が、ヒト CXCR4 の第二細胞外ドメインに結合する mAb 12G5 に結合する (データは示していない) にもかかわらず、mAb 6H8 に結合せず、一方で CXCR4 過剰発現 CB CD34⁺ 細胞は、抗体 12G5 および 6H8 の両方で陽性に染色されたことを発見した。これらのデータは、CXCR4 の過剰発現が、CXCR4 走化性機能において部分的に役割を果たすことが示された 6H8 エピトープの変質または開裂を妨げることを示唆している (Brelot et al, J Biol Chem. 275:23736-23744)。

【0159】

10

20

30

40

50

第二組の実験では、本発明者らは、対照またはCXCR4過剰発現CB CD34+細胞いずれかを移植したNOD/SCIDマウスのBMから単離したヒト細胞への6H8および12G5 mAbsの結合を追った(図8)。本発明者らは、ヒトCXCR4過剰発現細胞を有するキメラマウスBMから単離したヒト細胞が、ヒト対照細胞を有するキメラマウスBMにおいてよりも、6H8および12G5の両方に關してより高い割合の陽性細胞を示したことを発見した。さらに、対照GFPを有する細胞が6H8エピトープの明らかな変質を示した一方で、GFPを有するCXCR4過剰発現細胞において変質は見られず、これは過剰発現細胞中の6H8エピトープのインビオにおける変質も少ないことを示唆している。

【0160】

10

本発明はその特定の実施態様に關連して記述されてきているが、多くの変更、改変および変化が当業者に理解されるであろうことが明らかである。したがって、付隨する請求項の精神および広い目的の範囲内である、すべてのこれらの変更、改変および変化が包含されることが意図されている。本明細書内で言及されたすべての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願が、参考文献によって本明細書に組込まれていると具体的におよび個々に示唆されたのと同様の程度で、本明細書内の参考文献によって、そのすべてがここに組込まれている。さらに、本明細書内の任意の参考文献の引用または同定は、そのような参考文献が本発明の先行技術として利用可能であることを承認したとして解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

20

【0161】

本発明を、添付の図面を参照しながら、例示のためのみで本明細書において記載する。図面に対する詳細な以下の具体的な言及により、示される特定の内容は、例示のため、および本発明の好ましい実施形態の実例の検討を目的とするにすぎず、本発明の原理および概念的態様の最も有用かつ容易に理解される記載と考えられるものを提供する過程において示されたことを強調する。これに關連し、本発明の構造的詳細を、本発明の基本的な理解に必要とされる以上に詳細に示す試みはしておらず、本記載内容は、図面と合わせると、本発明のいくつかの形態がどのようにして実際に具現化され得るかが当業者に自明となる。

【図1】レンチウイルスベクター構築物の略図的表示を示す。統合プロウイルスの相当する部分のみを描写している。EF1-プロモーターを利用して、対照ベクターにおける緑色蛍光タンパク質(GFP) cDNA(上パネル)または実験ベクターのCXCR4-IREs-GFPバイシストロン性カセット(下パネル)のいずれかの発現を駆動する。SD=スプライスドナー、SA=スプライスアクセプター、pA=ポリアデニル化シグナル、SIN=自己-不活性化ベクター。

30

【図2】レンチウイルス-形質導入ヒトCD34+細胞における、細胞表面CXCR4発現を示す。モック-またはレンチウイルス感染に続いて、臍帯血(CB)および移行末梢血(MPB)CD34+細胞を、GFP発現のみ、または抗-hCXCR4-PE抗体を用いたCXCR4発現に付隨するGFPのいずれかに關して、フローサイトメトリーによって解析した。A.データは、CB CD34+細胞の代表的なFACS解析を示す。数字は総CD34+細胞の割合を示す。フォワードスカッタード(FSC)は細胞サイズの指標である。B.結果は、CXCR4を発現しているCBおよびMPB CD34+細胞の割合を示し、7回の独立した実験の平均値±SEを示している。対照GFP-感染細胞と比較して、*p<0.01。C.GFP形質導入(GFP)、CXCR4形質導入(CXCR4)またはアイソタイプ対照細胞の細胞表面(上パネル)および細胞内(下パネル)CXCR4発現の免疫蛍光検出。

40

【図3】形質導入CB CD34+細胞のコロニー形成前駆細胞含量を示す。レンチウイルス形質導入CB CD34+細胞を、半固体メチルセルロース培地中に播種した。A.GFP+コロニー形成細胞(CFC)コロニーを、14日目に位相差顕微鏡によって解析した。上パネルは対照ベクター形質導入細胞から得たBFU-E(a)およびCFU-G

50

M (b) を示す。下パネルは CXCR4 形質導入細胞から得た BFU-E (c) および CFU-GM (d) を示す。代表的な実験を示す。B . データは、CFU-GM および BFU-E コロニーの総数を示す。棒の上の数字は、総コロニーに対する GFP⁺コロニーの割合を示す。棒は、3回の独立した実験の平均値 ± SE を示す。GFP- 形質導入細胞の BFU-E コロニーと比較して * p = 0.004 。C . CB および MPB CD34+ 細胞を、ヒト抗 - CD34 および抗 - CD38 mAb によって標識化した。数字は、全集団から得た陽性細胞の割合を示す。3回のうち、代表的な実験を示す。

【図4】形質導入 CD34+ 細胞において発現した CXCR4 の機能を示す。A . CXCR4- 形質導入 CB CD34+ 細胞を、示した時間 SDF-1 (300 ng / ml) で刺激し、細胞内 F- アクチン含量を FACS によって測定した。データは、未刺激細胞と比較して、SDF-1 での刺激後に F- アクチン含量が倍増加したことを示唆している。データは、3回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。B . 示したように CXCR4- 形質導入 CB および MPB CD34+ 細胞を異なる SDF-1 濃度に向かうそれらの遊走に関して、トランスウェル遊走アッセイにて試験した。データは SDF-1 への遊走細胞の割合を示す。棒は5回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。125 ng / ml SDF-1 での対照 GFP- 形質導入細胞と比較して、* p < 0.04 (CB) 、 * p = 0.03 (MPB) 。10 ng / ml SDF-1 での対照 GFP- 形質導入細胞と比較して、* p < 0.05 (CB) 、 * p < 0.05 (MPB) 。

【図5】異なる SDF-1 濃度に対する CXCR4- 過剰発現 CB CD34+ 細胞の応答を示す。A . レンチウイルス形質導入 CB CD34+ 細胞を、SCF (50 ng / ml) 、 FLT-3L (50 ng / ml) および IL-6 (50 ng / ml) との組み合わせで、SDF-1 (50 ng / ml) を含む血清不含条件中で7日間インキュベートした。結果は、SDF-1 の存在しない状態でインキュベートした細胞と比較して、生細胞の数の倍増加として表している。結果は、二重で実施した3回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。B . レンチウイルス形質導入 CB CD34+ 細胞を、1 μg / ml SDF-1 とともに一晩インキュベートし、(i) 免疫染色によって CXCR4 発現を、および (ii) トランスウェル遊走系を用いて SDF-1 (125 ng / ml) 誘導インビトロ中の遊走を試験した。棒は、二重で実施した2回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。未処理細胞と比較して * p < 0.05 (黒棒) 。

【図6】CXCR4 過剰発現 SCID 再生細胞 (SRC) のインビオでの多系統分化再構築および GFP 発現を示す。CXCR4- 形質導入 CB CD34+ 細胞を、亜致死的放射 NOD / SCID マウスに注射した。移植の5週間後のマウスを、対照 GFP- 形質導入細胞と比較して、ヒト再増殖細胞の存在に関して試験した。A . マウス BM (i) 、脾臓 (ii) および末梢血 (PB) (iii) を、ヒト CD45+ 細胞の % を検出する FACS 解析によって、ヒト細胞生着に関して解析した。棒は、二重または三重で実施した9回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。対照 GFP- 形質導入細胞と比較して * p < 0.05 。B . 代表的な NOD / SCID 移植レシピエントにおけるヒト SRC のリンパおよび骨髄分化を、それぞれ CD19 および CD33 抗体染色によって示す。数字は、総生集団に対する陽性細胞の割合を表す。C . BM 細胞を、ヒト特異的パン白血球マーカー CD45 および B 細胞系統分化マーカー CD19 で染色し、FACS によって解析した。数字は、総 CD45 集団から計算した CD19 細胞の割合を示す。データは代表的な実験を示す。D / 生着マウス BM 細胞をヒト特異的抗 - CD34 および抗 - CD38 mAb s で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。数字は、始原、未分化 CD34+ / 38- / low 細胞の割合を示す。データは代表的な実験を示す。E . 濃縮、未熟 CD34+ 細胞の、脾臓へのホーミングを、ヒト特異的抗 - CD34 および抗 - CD38 mAb s での染色によって、移植 16 時間 (MPC) 後または 2 時間 (CB) 後に決定した。棒は二重で実施した3回の独立した実験の平均値 ± SE を表す。対照細胞と比較して * p < 0.05 。

【図7】 CXCR4 の略図的実例を示す。

【図8】 CB CD34+ 細胞における CXCR4 過剰発現がインビオで 6H8 エピト-

10

20

30

40

50

の変質を防止することを示す。A. 形質導入 CD34+ 細胞を亜致死的(375R)放射NOD/SCIDマウスに移植した。移植の5週間後、マウスBMを回収し、CXCR4の12G5または6H8エピトープに対して陽性に染色されたヒト細胞の存在を解析した。数字は平均 CXCR4 蛍光を表す。B. GFP(対照)および CXCR4 過剰発現細胞の12G5および6H8 mAbsでの染色に続く、Aのような平均 CXCR4 蛍光の代表的なヒストグラムFACS解析。

【0162】

[参考文献]

1. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35 10
2. Abkowitz J, Robinson A, Kale S, Long M, Chen J. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood.* 2003
3. Wright DE, Wagers AJ, Pathak Gulati A, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001;294:1933-1936
4. Selleri C, Maciejewski J, De Rosa G, Raiola A, Risitano A, Picardi M, Pezzullo L, Luciano L, Ricci P, Varriale G, Della Cioppa P, Del Vecchio L, Rotondi B. Long-lasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1029-1037
5. Podesta M, Transplantation hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:331-336.
6. Podesta M, Piaggio G, Frassoni F, Pitti A, Mordini N, Bregante S, Valeriani A, Bacigalupo A. Deficient reconstitution of early progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1011-1017 20
7. Carton G, Herault O, Benboubker L, Clement N, Benard M, Roingeard F, Desbois I, Colombat P, Binet C, Domenech J. Quantitative and qualitative analysis of the human primitive progenitor cell compartment after autologous stem cell transplantation. *Journal of Hematology & Stem Cell Research.* 2002;1:359-368
8. Hall K, Abonour R, Cornetta K, EF S. Decreased homing of transduced human bone marrow CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003;abst.100
9. Kang E, Hanazano Y, Frare P, Vanin E, De Witte M, Metzger M, Liu J, Tisdale J. Persistent low-level engraftment of rhesus peripheral blood progenitor cells transduced with the fanconi anemia C gene after conditioning with low-dose irradiation. *Mol Ther.* 2001;3:911-919 30
10. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996;382:635-638
11. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9448-9453
12. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null)mice. *Blood.* 2001;97:3283-3291 40
13. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999;283:845-848
14. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman R, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *JCI.* 2000;106:1331-1339 50

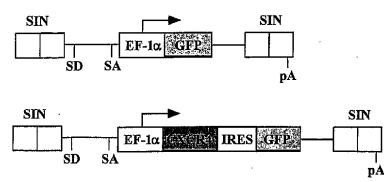
15. Kollet O,Petit I,Kahn J,Samira S,Dar A,Peled A,Deutsch V,Gunetti M,Piacibello W,Nagler A,Lapidot T. Human CD34+CXCR4- sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood*.2002;100
16. Spencer A,Jackson J,Baulch-Brown C. Enumeration of bone marrow 'homing' haemopoietic stem cells from G-CSF-mobilised normal donors and influence on engraftment following allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:1019-1022.
17. Voermans C,Kooi ML,Rodenhuis S,van der Lelie H,van der Schoot CE,Gerritsen W R. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*.2001;97:799-804 10
18. Lapidot T,Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*.2002;16:1992-2003
19. Forster R,Kremmer E,Schubel A,Breitfeld D,Kleinschmidt A,Nerl C,Bernhardt G,Lipp M. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol*.1998;160:1522-1531
20. Kollet O,Shivtiel S,Chen YQ,Suriawinata J,Thung SN,Dabeva MD,Kahn J,Spiegel A,Dar A,Samira S,Goichberg P,Kalinkovich A,Arenzana-Seisdedos F,Nagler A,Hardan I,Revel M,Shafritz DA,Lapidot T. HGF,SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003;12:160-169 20
21. Rusten L,Cue L,Pharo A,Jacobsen S,Lapidot T,Kvalheim G. TNF- and TGF- potentially upregulate the expression of CXCR4 on peripheral blood progenitor cells. *Blood*.2000;94:252a
22. Denning-Kendall P,Singha S,Bradley B,Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood Cd34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells*. 2003;21:61-70
23. Bhatia M,Wang JCY,Kapp U,Bonnet D,Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*.1997;94:5320-5325 30
24. Wright DE,Bowman EP,Wagers AJ,Butcher EC,Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*.2002;195:1145-1154
25. Grafte-Faure S,Levesque C, Ketata E,Jean P,Vasse M,Soria C,Vannier JP. Recruitment of primitive peripheral blood cells:synergism of interleukin 12 with interleukin 6 and stromal cell-derived FACTOR-1. *Cytokine*.2000;12:1-7
26. Broxmeyer HE,Hangoc G,Cooper S,H.KC. Enhanced myelopoiesis in sdf-1-transgenic mice:sdf-1 modulates myelopoiesis by regulating progenitor cell survival and inhibitory effects of myelosuppressive chemokines [abstract].*Blood*.1999;94:650a 40
27. Lataillade JJ,Clay D,Dupuy C,Rigal S,Jasmin C,Bourrin P,Le Bousse-Kerdiles MC. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+)cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*.2000;95:756-768
28. Lataillade JJ,Clay D,Bourrin P,Herodin F,Dupuy C,Jasmin C,Bousse-Kerdiles MC. Stromal ce11-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells:evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*.2002;99:1117-1129.
29. Broxmeyer H, Kohli L,Kim C,Lee Y,Mantel C,Cooper S,Hangoc G,Shaheen M,Li X,Capp D. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapopto 50

- tosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G_i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J.Leukoc.Biol.*2003;73:630-638
30. Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice. *Blood.*2002;99:792-799.
31. Cashman J, Dykstra B, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Changes in the proliferative activity of human hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice and enhancement of their transplantability after in vivo treatment with cell cycle inhibitors. *J.Exp.Med.*2002;196:1141-1149
32. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.* 1999;10:463-471 10
33. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, Katsura Y, Kishimoto T, Nagasawa T. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*1999;96:5663-5667
34. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood.*2003;101:2905-2913
35. Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y, Fujimura Y, Tsuji T, Ikebara S, Sonoda Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34+ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood.*2003;101:2924-2931 20
36. Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT. CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 2001;166:5027-5033
37. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood.*2002;99:44-51
38. Levesque J-P, Bendall LJ, Hendy J, Williams B, Simmons PJ. SDF-1 is inactivated by proteolytic cleavage in the bone marrow of mice mobilized by either G-CSF or cyclophosphamide. *Blood.*2001;98:831a 30
39. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafil S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann.N.Y.Acad.Sc.*2001;938:36-45, 45-37
40. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafil S, Moore MA. Plasma elevation of stromal-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.*2001;97:3354-3360
41. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.*2002;3:687-694 40
42. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J.Exp.Med.*1998;187:1439-1449
43. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira D, Kelly M, Naldini L, Dick J. Transduction of human CD34+CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third generation lentiviral vectors. *Mol Ther.*2000;1:566-573
44. Miyoshi H, Smith K, Mosier D, Verma I, Torbett B. Transduction of human CD34+ ce 50

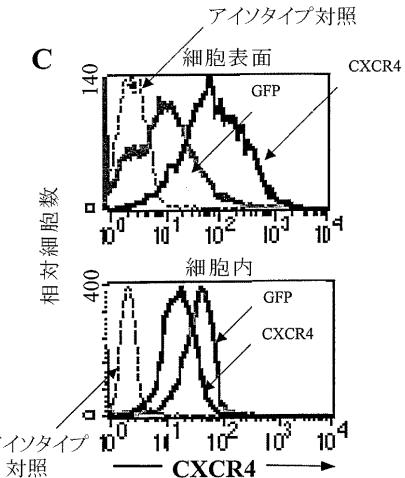
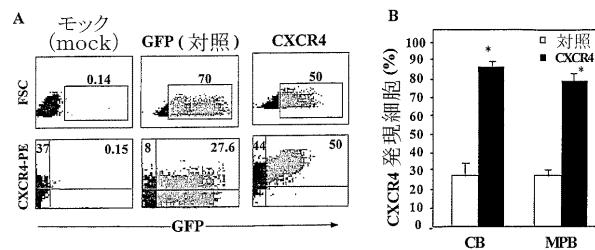
- IIs that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999;283:682-686
45. Barquinero J, Segovia J, Ramirez M, Limon A, Guenechea G, Puig T, Briones J, Garcia J, Bueren J. Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *Blood*. 2000;3085-3093
46. Woods N, Fahlman C, Mikkola H, Hamaguchi I, Olsson K, Zufferey R, Jacobsen S, Trono D, Karlsson S. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells., *Blood*. 2000;96:3725-3733
47. Sutton R, Reitsma M, Uchida N, Brown P. Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent., *J Virol*. 1999;73:3649-3660 10
48. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile G. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency(SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669-672
49. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Morteellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo M, Bordignon C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloblative conditioning. *Science.* 2002;296:2410-2413
50. Darash-Yahana M, Kahn J, Aslan H, Gropp M, Nagler A, Gazit Z, Reubinoff B, Lapidot T, Gazit D, Galun E, Peled A. Rapid and efficient lentiviral mediated transduction of human mesenchymal and hematopoietic stem cells. Submitted. 2003 20
51. Wagstaff M, Lillee C, Smith J, Robinson M, Coffin R, Latchman D. Gene transfer using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 1998;5:1566-1570
52. Metcalf D. Haemopoietic colonies: In vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results in Cancer Res.* 1977;61:1
53. Gibellini D, Bassini A, Re MC, Ponti C, Mischia S, Gonelli A, La Placa M, Zauli G. Stroma-derived factor 1 alpha induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol.* 2000;111:432-440 30
54. Bleul CC, Aiuti A, Fuhrbrigge RC, Casanova JM, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1(SDF-1). *The Journal of Experimental Medicine*, 1996;184:1101-1109
55. Signoret N, Oldbridge J, Perchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* 1997;139:651-664

【図1】

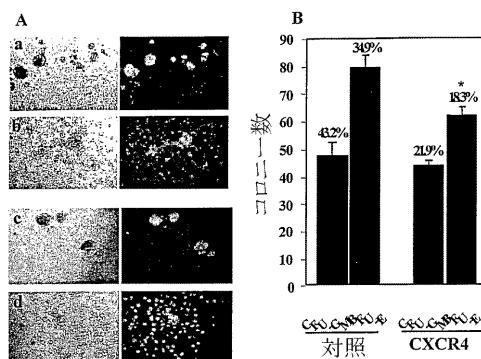
Figure 1



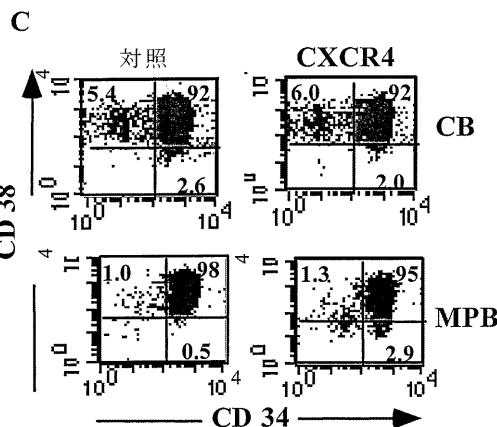
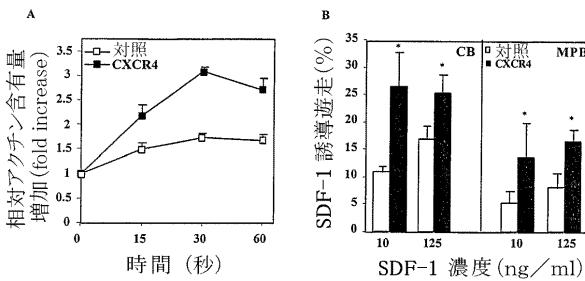
【図2】



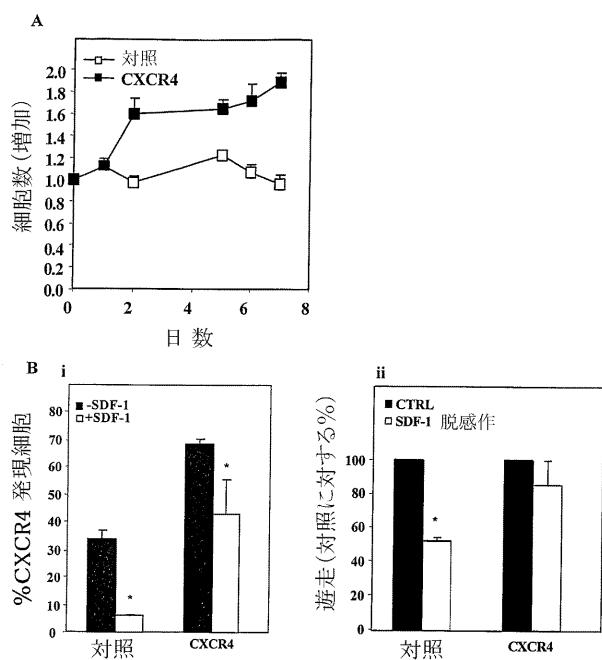
【図3】



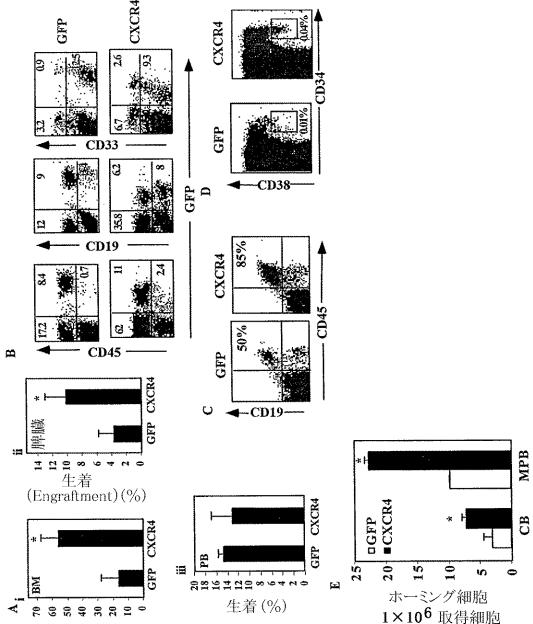
【図4】



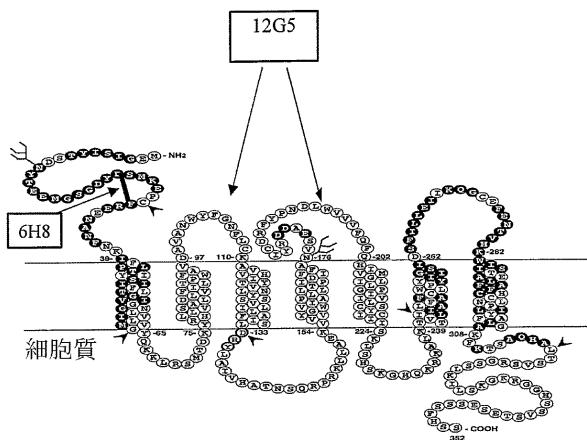
【図5】



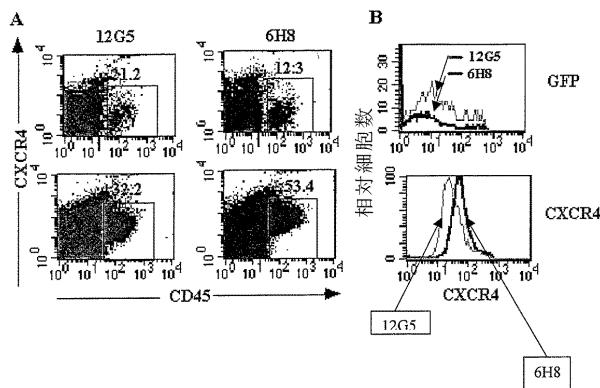
【図6】



【図7】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IL2004/001018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/06 C07K14/715 A61K35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SAWADA S ET AL: "DISTURBED CD4+ T CELL HOMEOSTASIS AND IN VITRO HIV-1 SUSCEPTIBILITY IN TRANSGENIC MICE EXPRESSING T CELL LINE-TROPIC HIV-1 RECEPTORS" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 187, no. 9, 4 May 1998 (1998-05-04), pages 1439-1449, XP000866065 ISSN: 0022-1007 figure 6</p> <p>—/—</p>	17-25, 37

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2005

Date of mailing of the international search report

04/05/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nichogianopoulou, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/IL2004/001018

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOUACHE FAWZIA ET AL: "Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors" BLOOD, vol. 84, no. 10, 1994, pages 3344-3355, XP002324832 ISSN: 0006-4971 abstract -----	17-25,37
P,X	KAHN JOY ET AL: "Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation" BLOOD, vol. 103, no. 8, 15 April 2004 (2004-04-15), pages 2942-2949, XP002324814 ISSN: 0006-4971 the whole document -----	1-40
A	KOLLET ORIT ET AL: "Human CD34+CXCR4-sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation" BLOOD, vol. 100, no. 8, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 2778-2786, XP002324815 ISSN: 0006-4971 the whole document -----	1
A	LAPIDOT T ET AL: "The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice" LEUKEMIA (BASINGSTOKE), vol. 16, no. 10, October 2002 (2002-10), pages 1992-2003, XP002324816 ISSN: 0887-6924 page 1998, right-hand column, line 1 - page 1999, left-hand column, line 31 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2004/001018

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 7, 29-36 and 39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IL2004/001018

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.1**

Although claims 7, 29-36 and 39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Present claims 1-40 relate to stem cells in general, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only human hematopoietic stem cells (HSCs). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the effect of CXCR4 overexpression on human HSCs.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 Z

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,L,V,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注:以下のものは登録商標)

1. ウィンドウズ

(72) 発明者 カーン、ジョイ
イスラエル国、99081 ラマト ベイト シエメシュ、ヘイアーデン ブールバード 120
/ 5
F ターム(参考) 4B024 AA01 CA02 DA02 EA04 GA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 CA44
4C081 AB11 CD34
4C087 AA01 AA02 BB44 BB63 CA04 DA31 NA14 ZA02 ZA36 ZA51
ZA59 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96