

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4012688号
(P4012688)

(45) 発行日 平成19年11月21日(2007.11.21)

(24) 登録日 平成19年9月14日(2007.9.14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/50

請求項の数 8 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-562487 (P2000-562487)	(73) 特許権者	501029135
(86) (22) 出願日	平成11年7月22日(1999.7.22)		ラルフ・フス
(65) 公表番号	特表2003-527817 (P2003-527817A)		R a l f H U S S
(43) 公表日	平成15年9月24日(2003.9.24)		ドイツ連邦共和国デー-83666ヴァー
(86) 国際出願番号	PCT/DE1999/002309		キルヒェン、テガーンゼーア・シュトラ-
(87) 国際公開番号	W02000/006705		セ78番
(87) 国際公開日	平成12年2月10日(2000.2.10)	(74) 代理人	100062144
審査請求日	平成13年1月23日(2001.1.23)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	198 33 476.1	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成10年7月24日(1998.7.24)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(72) 発明者	ラルフ・フス
			ドイツ連邦共和国デー-83666ヴァー
			キルヒェン、アルテ・ホルツガッセ4番
		審査官	森井 隆信

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子修飾したCD34-陰性付着成長性幹細胞および遺伝子療法におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 単離した末梢単核細胞をインターロイキン-6と共にインキュベートし、ここに、ほとんど完全にCD34-陰性である成長性繊維芽細胞様細胞から均一な細胞集団が形成され；

(ii) 該均一な細胞集団を治療遺伝子でトランスフェクトし；次いで

(iii) 陽性にトランスフェクトされたCD34-陰性付着成長性造血幹細胞を単離することを特徴とする、遺伝子修飾したCD34-陰性付着成長性造血幹細胞の製造法。

【請求項2】

細胞を不死化させて該幹細胞を増殖させる請求項1記載の方法。

【請求項3】

治療遺伝子がインスリン、因子VIIII、アデニンデアミナーゼ、多剤耐性(MDR)または不死化因子をコードする請求項1記載の方法。

【請求項4】

単核細胞が患者のヘパリン処理した血液またはクエン酸塩処理した血液由来である請求項1記載の方法。

【請求項5】

工程(ii)におけるトランスフェクションがCaCl₂手法またはリポフェクタミンによって行われる請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

10

20

工程 (i i) におけるトランスフェクションがレトロウイルス構築物または E B V 構築物またはアデノ随伴ウイルス構築物によって行われる請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

トランスフェクションが P G - 1 3 細胞系統のレトロウイルス上清を用いて行われる請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

使用されるインターロイキン - 6 が組み換え型インターロイキン - 6 である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【 0 0 0 1 】

発明の記載

本発明は、遺伝子修飾した最も初期の造血および間充織幹細胞 (C D 3 4 表面分子の発現に関して陰性である) の、モノまたはオリゴ遺伝子性疾患の各々、造血疾患ならびに慢性障害の個体の遺伝子療法における使用に関する。この目的のため、内因性 C D 3 4 - 陰性付着成長性幹細胞培養物が患者の末梢血から樹立され、遺伝子構築物で各々、効果的にトランスフェクトまたは感染される。長期間、該遺伝子の遺伝子産物は、患者生物において欠損または欠失タンパク質あるいは因子を各々、置換し、または細胞治療を可能にするであろう。

【 0 0 0 2 】

20

体性遺伝子療法または細胞療法の目的は、各々、遺伝物質の生物中への有効な移入である。体性遺伝子療法において、体細胞中の遺伝子欠損を補正するか、または治療上有益な遺伝子産物をコードしている遺伝子を細胞中に導入する。遺伝子療法による改変は、子孫に伝達されない。遺伝物質の標的細胞中への導入は、エクス・ピボならびにイン・ピボで行ってもよい。エクス・ピボは、標的細胞を体外で培養し、次いで、遺伝物質の導入後に患者中へ再導入することを意味する。しかしながら、体性遺伝子療法の効率は、トランスフェクト細胞の限られた寿命によって影響される。したがって、造血幹細胞のような特に長命な細胞が、体性遺伝子療法の標的細胞として特に適当である。これまで、移植目的の造血幹細胞は、提供者の骨髄から、または末梢血から富化工程後に得られた。患者または近親者の体からの細胞の単離は、同種骨髄移植と呼ばれる。次いで、しばしば、幹細胞および他の骨髄細胞の非選択混合物を患者に再導入する。最後に、該混合物に含有される造血幹細胞が血液から造血性骨髄に移動して、造血系の全細胞を必要量、生産する。該型の移植は、しばしば、重篤な合併症を伴う。提供者と受容者の間の最小の組織相違であっても、患者にとって非常に危険な合併症を引き起こすかもしれない。この危険性は、実際の疾患、例えば、白血病に対して推量されなければならない。提供者 - 受容者不適合性 (移植片対宿主疾患) は、通常、実際の幹細胞調製物に混入している細胞によって引き起こされる。特に、これらは、提供者の免疫系の細胞である。

30

【 0 0 0 3 】

骨髄または幹細胞移植のこの混入を排除するために、各々、造血幹細胞の集団を豊富にするための方法が開発されてきた。多能性造血幹細胞とも呼ばれる該細胞は、これまで、特定の表面分子の発現または非発現によって定義付けられてきた。該多能性造血幹細胞は、付加的な前駆細胞を経て、ヒト造血細胞系統、例えば、B細胞、T細胞、白血球、血小板または赤血球を生産できる。現在、多能性造血幹細胞としての造血細胞の決定は、いわゆる C D 3 4 分子の発現によって、同時に、C D 5 のような他の表面分子の非発現によって定義付けられる。C D 3 4 分子は、約 1 0 5 ~ 1 2 0 k D の分子量を有するムチンファミリーの強く負に荷電したプロテオグリカンである。Cellpro Inc. company, Seattle, USA は、アフィニティークロマトグラフィーによる C D 3 4 - 陽性細胞の精製方法を開発した (米国特許第 5 , 2 1 5 , 9 2 7 号、5 , 2 6 2 , 3 3 4 号、5 , 2 4 0 , 8 5 6 号、5 , 2 2 5 , 3 5 3 号、E P 5 2 6 5 7 7 B および E P 2 6 0 2 8 0 B) 。同時に、C D 3 4 - 陰性細胞は、間充織幹細胞のプールを形成する。

40

50

【 0 0 0 4 】

現在、造血幹細胞による体性遺伝子療法の場合、CD34 - 陽性細胞は、増殖因子、例えば、G-CSF（ノイポゲン - R（neupogen-R））で該細胞を刺激後、患者の末梢血から単離され、遺伝子操作後、患者に再導入されて、致死照射され、化学療法で処理された骨髄を再構築する。今まで、この方法で修飾された造血幹細胞は、アデノシンデアミナーゼ欠損、SCID症候群またはHIV感染のような特異的免疫欠乏症候群、ゴージェ病のような代謝性疾患、造血障害、例えば、地中海貧血の特異的形態および白血病のような悪性疾患に特に用いられてきた。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、道徳上および社会的理由のため、該方法は、自己または近親者による血液幹細胞の提供に限られ、末梢血中の幹細胞の蓄積のために、増殖因子を各々、提供者または患者に投与しなければならない。今まで、白血病クローンの可能な拡大（expansion）または健康な血液幹細胞の可能な形質転換に対する該増殖因子の長期間の効果を予測することは不可能であった。

【 0 0 0 6 】

さらに、造血幹細胞による体性遺伝子療法は、ある特定の技術的困難を引き起こす。治療遺伝子または遺伝子構築物でトランスフェクトされた造血幹細胞のほんの一部しか遺伝子修飾を受けず、または遺伝子産物が生産されないであろう。したがって、現在、該方法の効率は非常に低い（Huss, R. Infusionsthera. Transfusionsmed. 23 (1996) 147-160参照）。

【 0 0 0 7 】

遺伝子療法に使用できる改善された手段および方法に対する要望がある。

目的は、請求項1～8に記載の内容によって解決される。

したがって、本発明の主題は、遺伝子修飾したCD34 - 陰性付着成長性幹細胞である。好ましい具体例において、寿命または分裂能は、各々、一時的不死化によって延長される。

本発明は、図1および2ならびに下記の記載によって、より詳細に記載される。

【 0 0 0 8 】

発明の詳細な記載

最も初期のCD34 - 陰性造血幹細胞の存在の最初の観察は、繊維芽細胞に類似し、特に、造血増殖因子を生産できるCD34 - 陰性細胞からなるイヌ初代骨髄ストロマ培養由来の対応する細胞系統の単離およびクローニングに基づいている。今まで、造血増殖因子の生産は、ストロマ細胞系統についてすでに記載されていた（DE4322570C1参照）。かかる初代培養から、モノクローナル集団（コロニー形成単位 = CFU）が標準的コロニーアッセイにおいて樹立された。該クローンのいくつかは、より成熟した造血前駆細胞に分化することができた（Hussら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 748-752）。該細胞の分化ならびに増殖は、異なる増殖因子に依存する。したがって、幹細胞因子（c-kitリガンド；SCF）は、CD34 - 陰性付着成長性細胞のもはや付着成長性ではないCD34 - 陽性細胞への分化を誘発するが、インターロイキン6（IL-6）は、主として、増殖および付着成長を促進する（Hussら、Blood 85 (1995) 2414-2421）。

【 0 0 0 9 】

末梢血のCD34 - 陽性細胞から、繊維芽細胞に類似のCD34 - 陰性付着成長性集団を樹立できた。CD34 - 陰性付着成長から、もはや付着成長しないCD34 - 陽性への分化の手順は可逆的であることが見出された。IL-6の添加により、付着性であるが最初に非均一な細胞集団が、健康な自発的提供者の末梢単核細胞から樹立された。この目的で、約20mlのヘパリン処理した血液を2回、Ficoll勾配上に充填し、標準的な方法にしたがって単核細胞フラクションを単離し、37 °および5%CO₂のインキュベーター中における細胞培養フラスコ中のIL-6含有培地に添加した。2、3日後、付着成長性細胞層が生産された。該初代培養は、免疫表現型によって検出するとき、最初、繊維芽細胞に類似の細胞ならびにマクロファージ、内皮細胞および時折、脂肪細胞からなった

10

20

30

40

50

。しかしながら、「混入」細胞の量は、ほとんど均一な細胞集団が形成されるまで、最初の数日および数週の間完全に減少した (Hussら、Infusionsthera. Ytansfusionsmed. 24(1997) 404-409)。しかしながら、このとき、それは不死化されなかったため、該集団をクローン化することはできない。にもかかわらず、該細胞は、細胞培養において維持するか、または通常の方法において液体窒素中で冷凍してもよい。

【0010】

また、細胞培養における条件を修飾することによって、CD34 - 陰性付着成長性細胞は間充織幹細胞に分化し、よって、骨、軟骨および他の組織の前駆細胞を生産しうる。

【0011】

遺伝子移入

繊維芽細胞に類似のCD34 - 陰性付着成長性細胞は、末梢血の精製した単核細胞から、上記の方法にしたがって単離された。最初に、他の細胞の多くの混入があったが、時間が経つにつれて完全に消失し、その結果、付着細胞の100%がCD34 - 陰性付着細胞を提示した。最適な形質導入効率のために、「緑色蛍光タンパク質 (GFP)」の遺伝子移入のための種々の方法が研究された。「緑色蛍光タンパク質」は、トランスフェクトされたまたは感染された細胞において、各々、紫外線下で緑色を示し、よって、単純な方法で、各々、トランスフェクトされたまたは感染された細胞の検出をGFPを用いて可能にする遺伝子構築物である。

【0012】

イン・ビトロ培養ならびにSCIDマウス (SCIDマウスは、細胞性免疫欠乏を有し、該マウスは、同種または異種移植モデルのためのイン・ビトロモデルとして役立つ) におけるイン・ビトロ実験での結果は、標的細胞におけるGFPの発現が数週間持続し、ここに、SCIDマウスにおけるGFPトランスフェクト細胞の蛍光は、明らかに認識できるが、純粋な細胞培養法におけるよりも弱いことを示した。

【0013】

GFPタンパク質について、各々、異なるトランスフェクションまたは感染法の研究は、下記の異なる結果を与えた。

トランスフェクションのためのCaCl₂手法は、トランスフェクトされるべき細胞の大部分を死に導く強い細胞性ストレスを誘発した。

【0014】

対照的に、リポフェクタミンまたはウイルス上清を用いる感染による遺伝子移入の効率は、各々、非常に高かった。リポフェクタミンを用いるトランスフェクション効率は1回の適用後、約40~50%であり、一方、ウイルス上清を用いる感染効率は10~14日および3~4継代後、88~94%であった。相応じて、新しいウイルス含有上清を3~4日毎に標的細胞に添加した。

【0015】

【表1】

	%GFP 陽性	反復	%死細胞
CaCl ₂ でのトランスフェクション	68±17	なし	40±21
リポフェクタミンでのトランスフェクション	47±6	なし	<5
ウイルス上清での感染	91±5	あり	<1%

【0016】

効率

本発明の系の明らかな利益は、主として、まだモノクローナルではないが、しばしばオリゴクローナルである該均一な細胞集団の高いトランスフェクションまたは感染効率である。

激しい努力にもかかわらず同様の方法が、造血前駆細胞の約5～20%の感染効率を有する一方で、本発明の初期幹細胞集団のほとんど全ての細胞が所望の遺伝子で感染される。

【0017】

SCIDマウスを用いる実験は、遺伝子の発現が、造血の全系統においてイン・ビボでも起きることを示した。これは、レトロウイルス構築物に当てはまるだけでなく、アデノ随伴ウイルス(AAV)の応用またはエプスタイン-バーウイルス(EBV)由来の構築物にも当てはまる。

10

【0018】

均質性

末梢血からの単純な単離およびその高い効率のため、繊維芽細胞に類似の付着成長性のほとんど均一な細胞集団は、遺伝子療法および細胞療法の分野において非常によく応用できる。

【0019】

実験は、最も初期の造血幹細胞が長期の再構築を示すだけでなく、胸腺におけるそれらのコロニー化を介する耐性も誘導しうることを示した。

これは、自己または同系の系におけるだけでなく、同種移植の分野においても応用が可能である。

20

【0020】

療法選択

患者において欠損または欠失している遺伝子産物を示す全遺伝子を、欠失または欠損遺伝子のための構築物での自己造血細胞の感染による患者自身の遺伝子修飾細胞を用いて患者に再導入してもよい(図1参照)。

【0021】

候補は、特に、ある特定の代謝性疾患(例えば、ゴージェ病、PNH、糖尿病)、免疫欠乏症候群(ADA欠乏、SCID、CGD、LAD、AIDS)、異常ヘモグロビン症(例えば、鎌状赤血球貧血、地中海貧血)および悪性疾患(例えば、同定された突然変異に関して、MDR、アンチセンス構築物、ハンマーヘッド型リボザイム)に關与する遺伝子である(Somatic Gene Therapy; P.L. Chang(編)CRC Press, Inc., Boca Raton, USAの表1、8頁を参照)。

30

【0022】

患者の自己の初期造血幹細胞中への所望の遺伝子の移入後、患者から単離された細胞を液体窒素中で冷凍し、必要に応じて、それらを1回または再度使用してもよい。これは、該細胞が非常に大量に増殖するので、可能である。

【0023】

さらなる具体例は、所望により、感染細胞をガンシクロビルによって完全にまたは部分的に除去するための、「自殺遺伝子」、例えば、チミジンキナーゼの導入に関する。これにより、例えば、酵素の活性が所望の血清レベルを上回る場合、または腫瘍疾患が治った場合に、細胞をイン・ビボで連続的な成長制御下に維持してもよい。

40

【0024】

また、一時的(パサージャー(passager))方法において部分的に不死化された幹細胞を細胞療法あるいは内因性軟骨または骨物質の調製に各々、使用してもよい(図2参照)。また、該具体例において、患者の造血を完全に再構築する必要がなく、単に造血幹細胞の一部を遺伝子修飾した幹細胞で置換するだけなので、患者を骨髄除去療法に付す必要はない。

【0025】

以下の実施例は本発明を説明する。

実施例1：細胞の単離

50

約 20 ml のヘパリン処理した血液またはクエン酸塩を添加した血液を患者または自発的な提供者から各々、採取し、Ficoll Hypaque 勾配 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 上に上層する (Hussら、Infusionsthera. Transfusionsmed. 24 (1997) 404-409)。

【0026】

ブレーキをかけることなく 400 x g で 15 ~ 20 分遠心分離後、単核細胞の輪を取りだし、PBS または等張セーライン中で数回洗浄する。

その後、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/ml を細胞培養フラスコ (例えば、NUNC) 中において、細胞培養培地 (例えば、12.5% 胎仔ウシ血清および 12.5% ウマ血清を含有する McCoy の標準培地) 中 10 ng/ml 組換えインターロイキン-6 (rhIL-6; RD Systems GmbH, Wiesbaden) の存在下、37 °C および 5% CO₂ のインキュベーター中でインキュベートする。

10

【0027】

培養物を毎日モニターし、毎週カウントした。

10 ~ 14 日後、繊維芽細胞に類似の付着成長性細胞の均一な細胞集団が出現し、それは、FACScan 分析または免疫組織化学によって、各々、ほとんど完全な CD34 - 陰性であった。にもかかわらず、いくつかの分化中の細胞が、同時性をもたないので、CD34 抗原を一時的に発現する。

【0028】

実施例 2: レトロウイルス感染 / EBV 構築物での感染の例

上記の均一細胞集団は、ここで、PG-13 細胞系統 (テナガザル白血病ウイルス包膜中への PG-13 細胞のトランスフェクション後に所望のレトロウイルスベクターをパッケージ化するパッケージング細胞系統。パッケージング細胞系統のトランスフェクションは、2.5 μg のプラスミド DNA を 15 μl の Superfect (Qiagen) と混合し、100 μl の無血清培地中、室温で 20 分間インキュベートすることによって行われる。その後、該混合物を PG-13 細胞と一緒に 37 °C で 5 時間インキュベートし、次いで、新しい血清含有培地を添加する) のレトロウイルス上清と一緒に、10 ~ 14 日間にわたり、その間、ウイルス含有培地を少なくとも 3 ~ 4 回交換してインキュベートする。この期間の後、標的細胞において遺伝子発現を調べ (蛍光顕微鏡によって GFP について)、効率を決定する。

20

【0029】

ここで、陽性細胞を患者に再導入するか、または後の使用のために冷凍してもよい。これらのレトロウイルス感染において、MOI (感染多重度 = どれ程多くのウイルス粒子が 1 つの細胞の感染に必要なものであるか) は約 10 である。

30

細胞はまた、幹細胞の拡大を達成するために、一時的に不死化させてもよい。

【0030】

実施例 3: ルシフェラーゼを発現する組換え AAV ウイルスでの患者から単離した標的細胞の感染

患者から単離した標的細胞をルシフェラーゼを発現する組換え AAV ウイルスで非常に効果的に感染させることができた。患者の標的細胞は、LUC-rAAV と一緒に 37 °C で 3 時間インキュベートし、その後、無血清培地中でさらに 72 時間維持した。その後、ルシフェラーゼ活性およびルミネセンスの両方を測定した。該系において、MOI は約 1000 である。

40

【0031】

実施例 4: 患者例 1

図 1 に手順を図示する。

遺伝子欠損 X を有する患者 A の腕の静脈から採血し、そこから末梢単核細胞を勾配遠心分離によって単離する。付着細胞層が樹立されるまで、これらの単核細胞をインターロイキン-6 と一緒に細胞培養基中でインキュベートする。

【0032】

初代培養において、非造血幹細胞の混入は、まだ非常に高い。2 ~ 4 週後、排他的に CD

50

34 - 陰性造血幹細胞が増殖し、ここに拡大しうる。

ここで、以前に所望の遺伝子構築物でトランスフェクトしたレトロウイルス構築物またはAAVウイルスでこれらを感染させる。2、3日後、遺伝子Xの存在および遺伝子産物Xの発現（例えば、グルコセレブロシダーゼまたはインスリン）が患者Aの造血幹細胞中で検出されうる。

【0033】

ここで、患者Aは、自身の遺伝子修飾した初期造血幹細胞を注入によって受け取り、一方、該細胞の一部は、後の使用のために液体窒素中に保管されている。新しい遺伝情報を供給された患者の血液幹細胞は、患者Aに自身にとって重要な遺伝子産物Xを供給する。

【0034】

糖尿病の場合、非常に低い割合の内因性幹細胞だけに新しい遺伝物質を供給すれば、十分に血糖値の減少、よって、必要なインスリン要求の減少を達成できる。糖尿病患者において、これは、長期間、重篤な併発症を遅らせるか、または予防さえするであろう。

【0035】

実施例5：患者例2

患者Bは、膝関節における重篤な軟骨欠損に罹患している。末梢血幹細胞を該患者から採取し（例えば、アフエーシスによって）、一時的に（パサージャー）不死化させる（例えば、EBNA1を有するcre/lox系におけるSV40ラージT抗原による）。次いで、これらの細胞を細胞培養において軟骨/骨前駆細胞に分化し、欠損部位に移植する。

【0036】

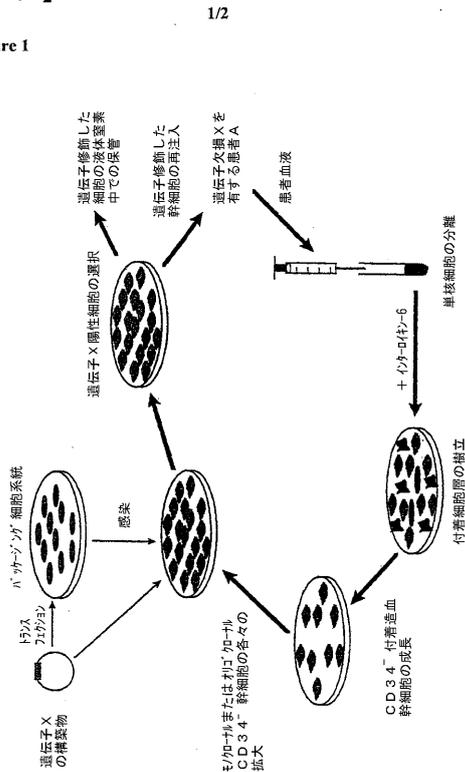
【図面の簡単な説明】

【図1】 患者Aの遺伝子療法を図示する。

【図2】 末梢血幹細胞の使用を図示する。

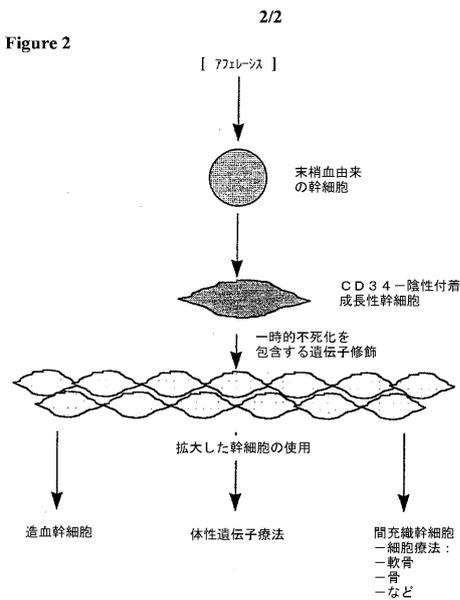
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

(56) 参考文献 特許第 5 5 9 1 6 2 5 (J P , B 2)
国際公開第 9 7 / 0 0 8 9 4 7 (W O , A 1)
国際公開第 9 7 / 0 0 7 6 7 0 (W O , A 1)
特開平 0 5 - 1 7 6 7 6 2 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 1 8 3 1 3 (W O , A 1)
Beitr. Infusionsther. Transfusionsmed. , 1 9 9 7 年 , Vol.34 , 128-132
Chin.Med.J. , 2 0 0 4 年 , Vol.117, No.6 , p.882-887
J.Surg.Res. , 1 9 9 6 年 , Vol.62, No.2 , p.229-232
J.Cell.Biochem. , 1 9 9 4 年 , Vol.56, No.3 , p.283-294

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00
C12N 5/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)