

Expansion *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques humaines par la transduction passive de l'homéoprotéine HOXB4

par Sophie Amsellem^{1,2} & Serge Fichelson¹

¹ Institut Cochin, Département d'Hématologie, Inserm U567, CNRS UMR 8104, Université Paris 5, Faculté de Médecine René Descartes, UM 3. Paris, F-75014 France ; ² Institut Gustave Roussy, Département de Biologie et de Pathologie Médicales, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

E-mail : amsellem@cochin.inserm.fr – fichelson@cochin.inserm.fr

Reçu le 2 novembre 2006

RÉSUMÉ

L'expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente une étape essentielle pour l'amélioration des greffes de moelle osseuse et le développement de nouveaux protocoles de thérapie cellulaire. L'utilisation de transferts de gènes codant des facteurs de transcription est une des voies pouvant mener à une expansion cellulaire efficace. Parmi ces facteurs, l'homéoprotéine HOXB4 est particulièrement intéressante car elle permet l'expansion très importante des CSH de souris, sans induire de leucémie même à long terme. Cependant, pour éviter tout effet délétère en rapport avec le transfert stable et la transcription constitutive du gène HOXB4 dans les cellules, nous avons utilisé la propriété des homéoprotéines à traverser passivement les membranes. Nous avons montré que les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques immatures étaient nettement amplifiés, quand ces cellules étaient co-cultivées avec une lignée cellulaire stromale génétiquement modifiée

pour sécréter activement HOXB4. Le caractère pluripotent des cellules ainsi amplifiées était préservé. Nous avons testé, dans un modèle comparable, le rôle de HOXB4 sur l'expansion des progéniteurs lymphoïdes : nous avons montré que les progéniteurs immatures lympho-myéloïdes et pro-T/NK ainsi que les progéniteurs NK plus matures étaient clairement amplifiés. Nous avons aussi recherché une éventuelle activité synergique entre HOXB4 et d'autres homéoprotéines telles que HOXC4. Nous avons montré que HOXC4 était capable d'induire l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques humain *in vitro* de façon comparable à HOXB4. La présence simultanée des deux homéoprotéines dans les co-cultures provoquait une expansion encore plus élevée qu'avec chacune d'entre elles. Notre méthode constitue donc une base pour le développement de nouvelles stratégies en thérapie cellulaire, par l'utilisation de cellules souches amplifiées *in vitro* mais non modifiées génétiquement.

SUMMARY *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by passive transduction of the HOXB4 homeoprotein

Expansion of human hematopoietic stem cells (HSCs) is a challenge for cellular therapy. It currently relies on either the use of recombinant cytokines or transfer of transcription factor genes. Among these, the HOXB4 homeoprotein is of particular interest since it promotes the expansion of mouse HSCs without inducing leukemia. To prevent potential deleterious side effects associated with stable HOXB4 gene transfer into the cells, we took advantage of the ability of homeoproteins to passively pass through cell membranes. We have shown that, when co-cultured with stromal cells engineered to secrete HOXB4, human stem cells and immature progenitors clearly were expanded. This expansion was associated with enhanced stem cell repopulating capacity *in vivo* and main-

tenance of pluripotentiality. The role that HOXB4 plays on stem cell expansion has also been tested on human lymphoid progenitors. We found that our model of protein transfer was also able to induce the expansion of the immature lympho-myeloid and pro-T/NK progenitors as well as of more mature NK progenitors. We then looked for synergistic activities between HOXB4 and other homeoproteins such as HOXC4. We found that HOXC4 was able to promote the expansion of human hematopoietic cells *in vitro* roughly as HOXB4 did and that the presence of both HOXB4 and HOXC4 molecules induced even higher expansion levels of these cells. Our method provides a basis for developing cell therapy strategies using expanded HSCs that are not genetically modified.

INTRODUCTION

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent un petit contingent de cellules capables de régénérer l'ensemble des cellules du sang tout au long de la vie, en réponse aux besoins de l'organisme. Elles sont présentes majoritairement dans la moelle osseuse et, de façon plus minoritaire, dans le sang circulant ainsi que dans le sang placentaire («sang de cordon»). Le caractère-souche de ces cellules consiste en leur capacité à s'auto-renouveler presque indéfiniment et ainsi à reconstituer l'hématopoïèse à long terme d'un individu après transplantation. L'hématopoïèse est un processus finement régulé et en équilibre grâce à des signaux endogènes (régulation intrinsèque par des facteurs de transcription), ou à des signaux exogènes (cytokines) produits par l'environnement des cellules souches dans des structures appelées «niches hématopoïétiques» (régulation extrinsèque) (Fig. 1).

Les difficultés en rapport avec l'identification et l'isolement des CSH ne sont pas seulement liées à leur rareté mais aussi à leur hétérogénéité et à leur absence de localisation précise dans la moelle osseuse. Ainsi, les techniques d'enrichissement des CSH chez l'Homme sont basées sur leurs caractéristiques phénotypiques (présence d'antigènes de surface tels que le CD34 et le CD38) et sur leurs caractéristiques métaboliques (exclusion du colorant vital Hoechst 33342). La présence de cellules souches dans ces populations est ensuite confirmée par des tests fonctionnels réalisés *in vivo* pour les cellules plus immatures ou *in vitro* pour les progéniteurs engagés dans la différenciation (Fig. 2).

La mise en place de protocoles de thérapie cellulaire ou génique ainsi que le développement de travaux de recherche sur la régulation de l'hématopoïèse reposent sur l'obtention d'un nombre suffisant de CSH. Ainsi, l'emploi de ces cellules en thérapeutique peut nécessiter des techniques visant à leur expansion *ex vivo* tout en préservant leur caractère-souche. Pour parvenir à ce but, différentes procédures ont été proposées et plus particulièrement l'utilisation de cocktails de cytokines, en association ou non avec d'autres facteurs solubles (Ueda *et al.*, 2000; Gammaitoni *et al.*, 2003; Bhardwaj *et al.*, 2001; Reya *et al.*, 2003). Cependant, il est admis que ce type de manipulation des cellules souches *in vitro* peut leur faire perdre certaines de leurs propriétés et conduire à leur engagement dans un processus de différenciation irréversible.

HOXB4 ET HÉMATOPOÏÈSE

Une alternative à l'utilisation des cytokines consiste en l'infection des CSH par un rétrovirus recombinant codant des facteurs de transcription capables de réguler l'expression de gènes impliqués dans la régulation de ces cellules. Différents facteurs de transcription sont actuellement connus pour leur rôle dans l'auto-renouvellement et l'expansion des cellules souches. Parmi ceux-ci, certaines homéoprotéines paraissent être de bons candidats. L'importance des gènes codant les homéoprotéines (les homéogènes), dans la détermination et la régulation du système hématopoïétique, avait été établie par des expériences de surexpression ou, à l'inverse, d'inhibition

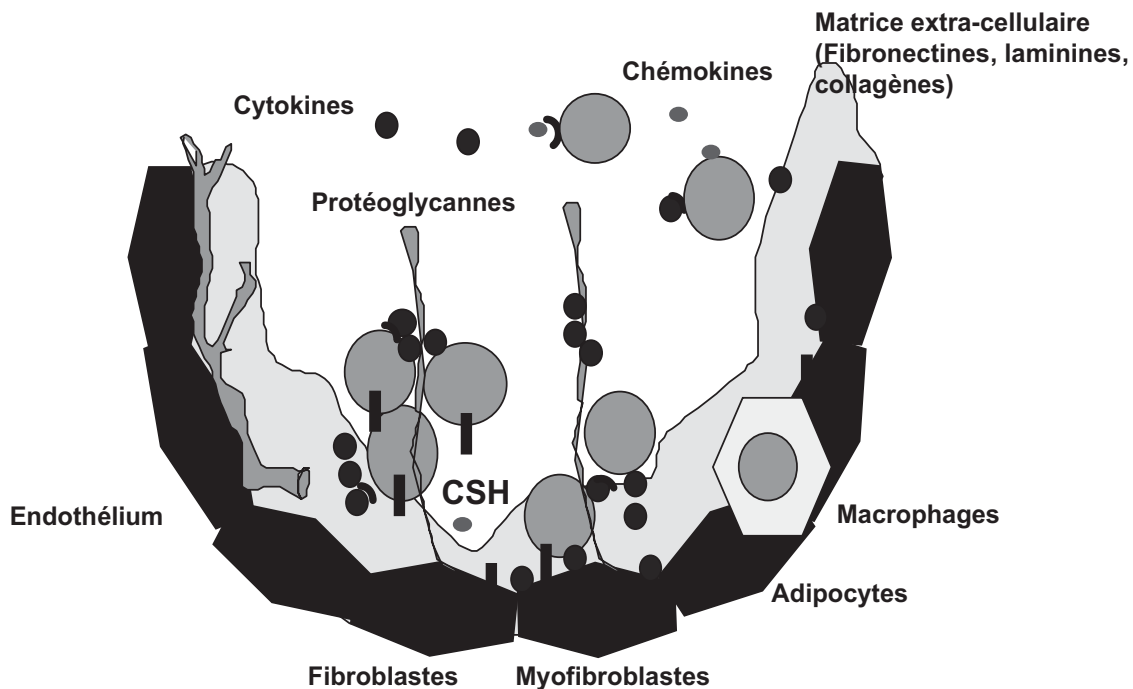


FIG. 1. – Représentation schématique de la « niche hématopoïétique ».

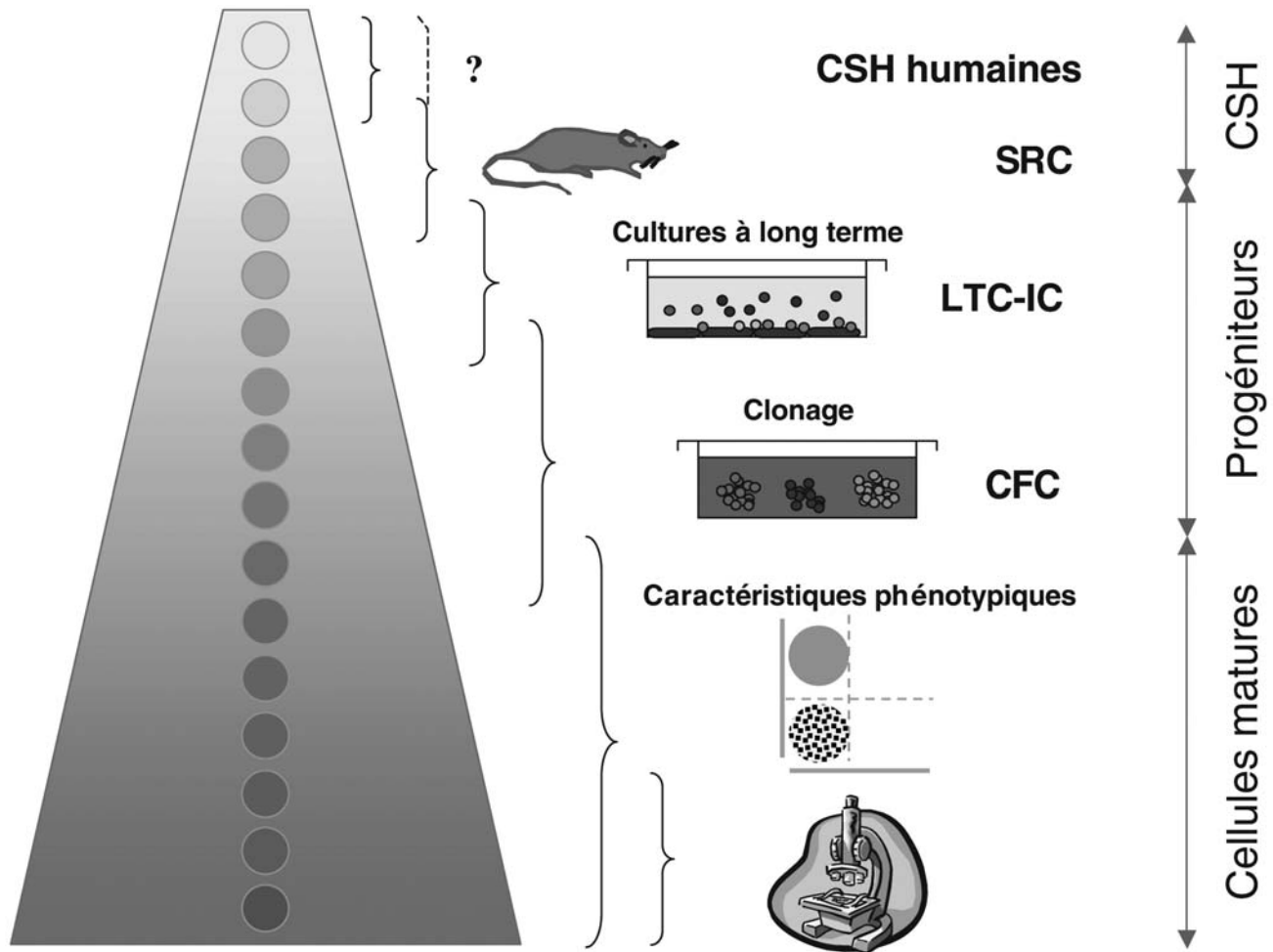


FIG. 2. – Tests fonctionnels pour l'étude de l'hématopoïèse humaine.

L'hématopoïèse peut être représentée comme un système pyramidal en expansion dont le sommet comprend les cellules souches et la base les cellules les plus matures du sang. Ce système doit être vu comme un continuum que l'on peut explorer à différents niveaux par des tests spécifiques. Ces tests reposent sur l'étude rétrospective des cellules issues des cellules immatures à dénombrer ou à étudier. Schématiquement, le compartiment des CSH est exploré *in vivo* par transplantation xénogénique dans des souris immunodéficientes NOD-SCID. Les cellules hématopoïétiques humaines capables d'être greffées à long terme, 7 semaines après leur transplantation, sont les "SCID repopulating cells" (SRC). Le compartiment des progéniteurs immatures est exploré grâce à des cultures à long terme en milieu liquide pour détecter la présence des LTC-IC capables d'engendrer des cellules clonogéniques plus matures pendant 5 à 8 semaines. Ces cellules clonogéniques (ou colony forming cells [CFC]) donnent naissance à des colonies de cellules morphologiquement identifiables après 15 jours en culture en milieu semi-solide. Les étapes finales de la différenciation sont composées de cellules que l'on peut identifier précisément grâce à des marqueurs spécifiques ou sur la base de leurs caractéristiques morphologiques.

d'expression dans des modèles murins. Chez l'Homme, certains de ces gènes sont fréquemment surexprimés ou impliqués dans des translocations récurrentes au cours des leucémies. De plus, de nombreux homéogènes, en particulier des homéogènes de classe I (gènes Hox), sont normalement exprimés au cours de l'hématopoïèse humaine (Fig. 3). Cependant, leur surexpression conduit le plus souvent à l'immortalisation ou à la transformation leucémique des cellules hématopoïétiques.

HOXB4, dont l'expression physiologique est restreinte aux cellules hématopoïétiques immatures, a été choisi à cause de son innocuité apparente par l'équipe de Guy Sauvageau à Montréal. Ce gène était jusque-là connu

pour être impliqué dans la détermination et le développement de certains segments de l'embryon. L'équipe de Montréal a montré que la surexpression constitutive de ce gène dans les cellules hématopoïétiques des souris provoquait une expansion forte et persistante de l'ensemble des cellules souches, sans induire leur différenciation ni leur transformation maligne même à long terme (Sauvageau *et al.*, 1995; Thorsteinsdottir *et al.*, 1999; Antonchuk *et al.*, 2002). Chez l'Homme, il a de même été rapporté plus récemment que l'infection des CSH avec un vecteur rétroviral recombinant contenant la séquence codante du gène HOXB4 permettait d'obtenir un certain niveau d'expansion *in vitro* de ces cellules (Buske *et al.*,

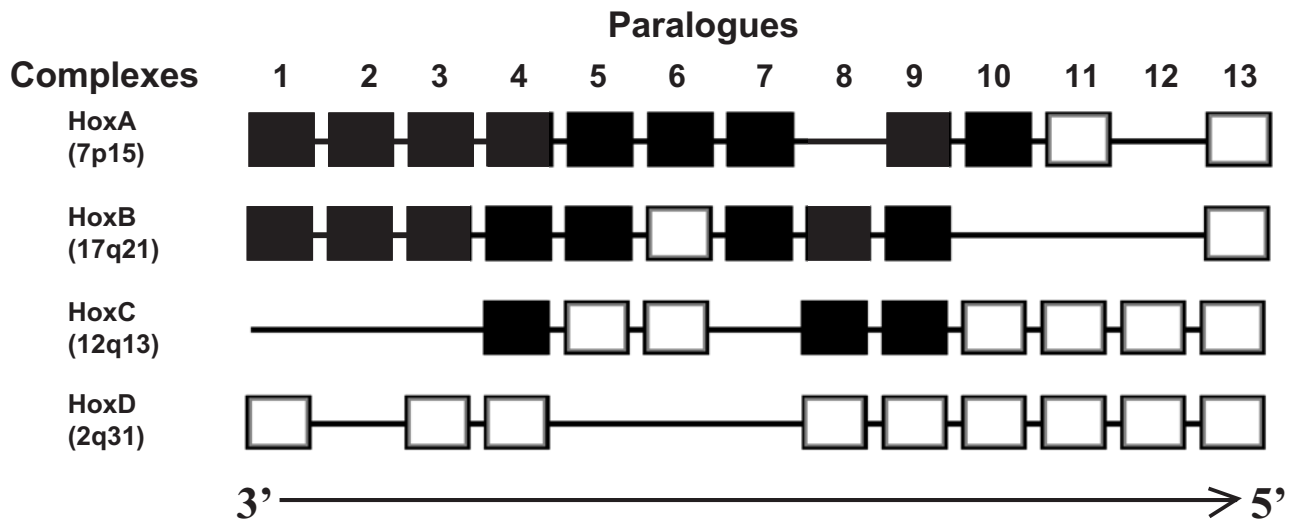


FIG. 3. – Expression des gènes *Hox* dans les cellules hématopoïétiques humaines immatures. Les homéogènes de classe I sont organisés en 4 complexes situés sur des chromosomes différents. Les gènes situés en des loci homologues dans différents complexes sont appelés gènes paralogues. Les carrés noirs correspondent aux gènes exprimés dans les cellules hématopoïétiques au cours du développement ou de la régénération du système hématopoïétique.

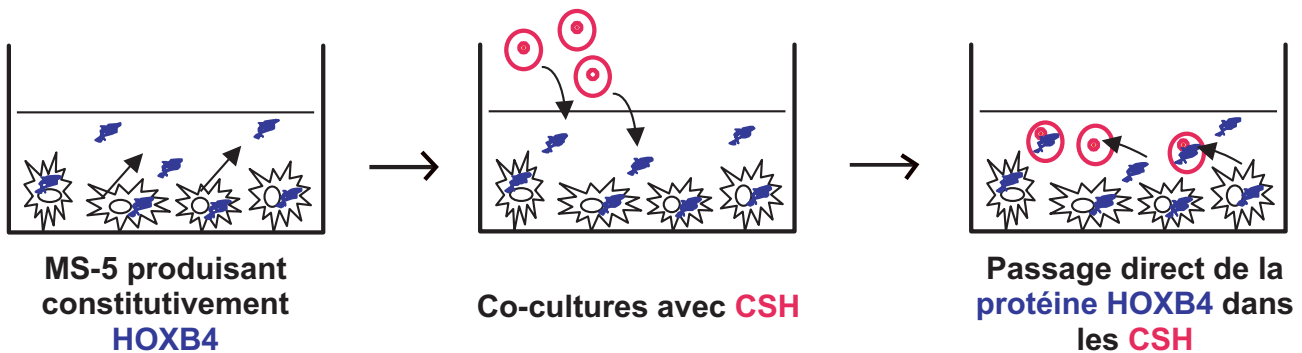


FIG. 4. – Schéma de la méthodologie utilisée pour la transduction de la protéine HOXB4 dans les CSH.

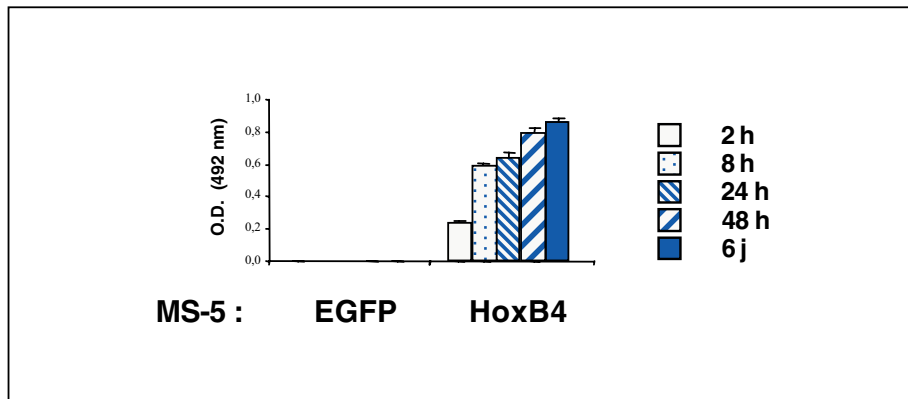
2002). Cependant, les CSH ainsi infectées sont modifiées génétiquement et expriment HOXB4 de façon constitutive, ce qui peut ne pas être anodin dans le cadre d'une application thérapeutique éventuelle.

TRANSFERT PASSIF DE L'HOMÉOPROTÉINE HOXB4 DANS LES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Afin d'éviter tout effet délétère en rapport avec l'intégration stable du gène HOXB4 dans les cellules souches humaines, nous avons utilisé la propriété des protéines HOX de traverser spontanément les membranes cellulaires sans apparemment nécessiter de récepteur spécifique. Cette propriété est liée à l'homéodomaine, structure particulière spécifique de ces protéines. Le modèle de transfert passif des protéines à homéodomaine avait été

décrit par l'équipe d'Alain Prochiantz (ENS, Paris) dans des cultures de neurones. Cette équipe avait clairement établi qu'il s'agissait d'un processus indépendant de tout récepteur spécifique et réversible et que les protéines ainsi transférées conservaient leurs activités biologiques (Derossi *et al.*, 1994; Derossi *et al.*, 1996; Maizel *et al.*, 1999). Nous avons donc mis à profit cette propriété de transfert des homéoprotéines pour faire pénétrer la protéine HOXB4 dans les CSH humaines dans le but de provoquer leur expansion *ex vivo*. Pour ce faire, nous avons tiré parti des propriétés de la lignée cellulaire stromale murine MS-5 à permettre la survie et l'expansion à long terme des CSH humaines en culture (Issaad *et al.*, 1993) : nous avons intégré dans cette lignée, par l'intermédiaire d'un vecteur lentiviral, l'ADNc qui code la protéine HOXB4 humaine à laquelle nous avons ajouté un peptide-signal pour en faciliter l'export hors des cellules MS-5 productrices (cellules MS-5/HOXB4) (Fig. 4). Nous

Sécrétion de HOXB4 dans les surnageants des cellules MS-5



Co-culture avec des cellules hématopoïétiques humaines

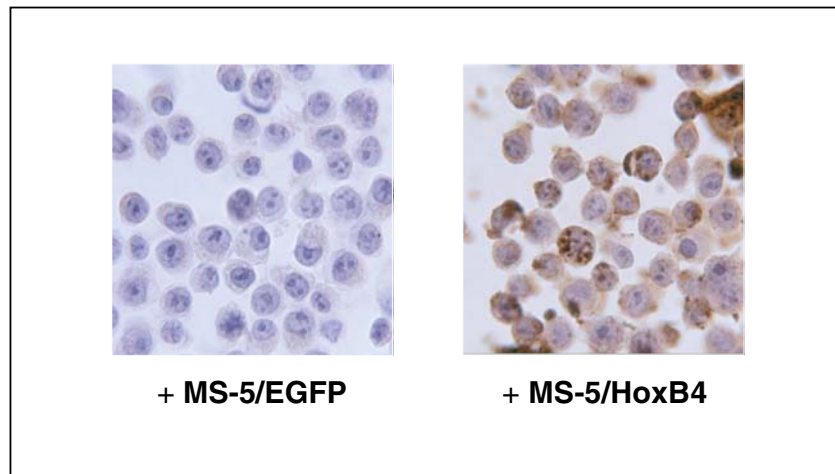


FIG. 5. – *Sécrétion et transport intercellulaire de HOXB4.*

- a) Analyse en test ELISA de la cinétique de sécrétion de HOXB4 par les cellules MS-5 modifiées.
 b) Transfert de la protéine HOXB4 dans les cellules hématopoïétiques humaines. Des cellules hématopoïétiques ont été co-cultivées pendant 48 h soit avec des cellules MS-5 témoins transduites par le cDNA du gène de l'EGFP (image de gauche), soit avec des cellules MS-5 transduites par le cDNA de HoxB4 (image de droite). Les cellules hématopoïétiques ont ensuite été marquées par un anticorps monoclonal spécifique de HOXB4 et le marquage a été révélé par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la diamino-benzidine.

avons montré que la protéine HOXB4 sécrétée par les cellules MS-5 était présente dans le surnageant de culture (Fig. 5a) et pénétrait passivement dans des cellules hématopoïétiques humaines mises en co-culture avec celles-ci (Fig. 5b) (Amsellem *et al.*, 2003).

EXPANSION DES CSH ET DES PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES PAR LA PROTÉINE HOXB4

Dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé des cellules de phénotype CD34⁺ ou CD34⁺/CD38^{low}

isolées à partir de sang placentaire comme source de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques. Nous avons observé, de façon reproductible, une augmentation moyenne de 2 à 6 fois du nombre de progéniteurs clonogéniques (Colony Forming Cells = CFC) après 2 à 5 semaines de co-culture de ces cellules avec les cellules MS-5/HOXB4, par rapport aux mêmes cultures effectuées avec des cellules MS-5 témoins. Nous avons montré que cette augmentation était liée à la présence d'un plus grand nombre ($\times 20$) de progéniteurs très immatures (Long-Term Culture-Initiating Cells = LTC-IC) en présence de HOXB4. L'ensemble de ces progéniteurs représente cependant des cellules déjà engagées de façon

irréversible dans le processus de différenciation hématopoïétique. Leur expansion est toutefois importante dans le cadre des greffes de cellules souches car elles sont capables de générer, de façon provisoire mais rapide, les cellules matures du sang, utiles durant la période d'aplasie précédant la prise de greffe définitive des cellules souches.

Les cellules hématopoïétiques humaines les plus immatures expérimentalement identifiables sont des cellules capables de se greffer dans la moelle osseuse de souris immuno-déficientes receveuses NOD-SCID (SCID repopulating cells = SRC). Nous avons donc voulu établir la capacité de la protéine HOXB4 à amplifier les SRC *in vitro*, dans notre système. Des greffes xénogéniques dans des souris NOD-SCID ont ainsi été effectuées avec les CSH humaines récupérées des co-cultures. Nous avons alors observé une amplification de 2,5 à 3 fois des SRC après culture à long terme en présence de HOXB4 par rapport aux mêmes cellules non cultivées, et de plus de 12 fois par rapport à des cellules cultivées dans les mêmes conditions mais en l'absence de HOXB4. Nous avons enfin démontré que ces cellules amplifiées *in vitro* gardaient, au cours de leur différenciation *in vivo* chez l'animal, leur pluripotentialité intacte, c'est-à-dire leur capacité à engendrer des cellules matures de différents lignages du sang (Amsellem *et al.*, 2003).

EXPANSION DES PROGÉNITEURS LYMPHOÏDES PAR HOXB4

Des travaux plus récents nous ont permis d'étendre ces résultats à l'étude des effets de HOXB4 sur l'expansion des différentes sous-populations de progéniteurs lymphoïdes. Des co-cultures réalisées avec la lignée MS-5/HOXB4 par rapport à une lignée témoin montrent que HOXB4 permet non seulement l'expansion des cellules CD34⁺ issues des CSH mais également de celles issues des progéniteurs lympho-myéloïdes et Pro-T/NK. À l'inverse, les progéniteurs B, précoces ou tardifs, ne sont pas amplifiés dans ce système. L'étude du potentiel de différenciation en cellules NK des cellules CD34⁺ dérivées de ces co-cultures montre une expansion nette des progéniteurs NK issus des CSH exposées à HOXB4, supérieure à 2000 et une expansion relative de ces cellules d'un facteur 10 par rapport aux cultures témoins. De plus, HOXB4 participe efficacement au maintien du potentiel NK des cellules dérivées des populations de cellules Pro-T/NK plus matures (Haddad *et al.*, 2004, et données non publiées).

EXTENSION DU MODÈLE À L'ÉTUDE DES EFFETS D'AUTRES HOMÉOPROTÉINES

Il avait été montré que HOXC4 (dont le gène appartient au même 4^{ème} paragraphe de la famille HOX que celui codant HOXB4) jouait un rôle dans l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques humains, quand son

ADNc était transduit directement dans les cellules (Daga *et al.*, 2000). Nous avons voulu établir : 1) si l'addition de l'homéoprotéine HOXC4 dans les milieux de culture à long terme des CSH humaines permet, comme la protéine HOXB4, de favoriser leur expansion et 2) si l'apport simultané des homéoprotéines HOXB4 et HOXC4 améliore l'expansion des CSH par une éventuelle synergie entre les deux protéines. Nous avons donc mis en place des co-cultures entre d'une part des cellules stromales MS-5 génétiquement modifiées pour excréter activement les homéoprotéines humaines HOXB4 et/ou HOXC4 et, d'autre part, des cellules hématopoïétiques humaines immatures CD34⁺/CD38^{low}. Après vérification de la présence des homéoprotéines dans les surnageants des lignées MS-5, nous avons quantifié l'expansion des progéniteurs dans les différentes conditions de co-culture. De façon intéressante, HOXC4 paraît capable d'expandre les CSH de façon comparable voire supérieure à HOXB4. De plus, la présence simultanée des deux homéoprotéines semble améliorer encore l'expansion observée avec chacune d'entre elles (données non publiées). Le caractère synergique ou additif de cette expansion reste à établir. Des greffes xénogéniques dans des souris immunodéficientes NOD-SCID vont nous permettre d'évaluer le potentiel de reconstitution à long terme *in vivo* des cellules souches après culture en présence des protéines HOXB4 et/ou HOXC4.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Au total, nous avons mis au point un système permettant la multiplication des CSH humaines primitives en l'absence de cytokines et de toute modification génétique de ces cellules. En thérapeutique, l'utilisation des CSH dans les greffes exige de disposer d'un nombre suffisant de ces cellules. Les sources de CSH actuellement disponibles sont : 1) la moelle osseuse, ce qui implique des prélèvements par ponctions multiples des os riches en moelle productrice de cellules (sternum, iliaques); 2) le sang périphérique après « mobilisation » des cellules du donneur par des cytokines (G-CSF, essentiellement). Ce type de prélèvement se fait par cytophèrese et n'est pas dénué de certains effets secondaires quelquefois sérieux, surtout chez des patients affaiblis ou âgés. De plus, on sait que certains donneurs sont dits « faibles mobilisateurs » et que le nombre de cellules souches alors recueillies est trop faible pour autoriser une greffe; 3) le sang placentaire est actuellement réservé à la greffe de jeunes enfants compte tenu du trop petit nombre de cellules souches que ces greffons contiennent. La greffe de patients adultes par des cellules souches de sang placentaire peut être réalisée mais nécessite alors l'injection de cellules dérivées de plusieurs prélèvements différents.

Quelle que soit l'origine des cellules souches, on sait que les greffes sont d'autant plus efficaces que le nombre de cellules injectées est élevé. C'est pourquoi leur multiplication *in vitro* constitue une étape cruciale pour l'amélioration des protocoles thérapeutiques et, en par-

ticulier, pour répondre au problème des greffons insuffisants. En effet, comme nous l'avons observé, la présence de HOXB4 provoque non seulement une expansion des SRC mais aussi des progéniteurs hématopoïétiques plus matures. L'utilisation d'un tel modèle pourrait donc représenter un bénéfice important en clinique pour améliorer les greffes à long terme comme à court terme grâce à l'administration d'un plus grand nombre de progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés dans la différenciation et potentiellement responsables d'un raccourcissement de la durée de la phase d'aplasie. Dans cette perspective, la production de la protéine recombinante HOXB4 a été réalisée en *E. coli* par le laboratoire GTP Technology (Labège, France) et va nous permettre de tester directement son activité sur les CSH humaines en l'absence de cellules stromales productrices. L'adaptation de cette méthodologie à des conditions répondant aux normes utilisées dans les unités de thérapie cellulaire pourra alors être envisagée et étendue à l'utilisation concomitante d'autres molécules purifiées telles que HOXC4.

Notre modèle d'expansion des CSH est, en principe, dénué de risque et peut donc constituer une base pour le développement de nouvelles stratégies impliquant l'amplification des cellules souches humaines hématopoïétiques ou d'autres tissus (cellules souches endothéliales, neurales, musculaires, hépatiques, épidermiques).

BIBLIOGRAPHIE

- Amsellem S., Pflumio F., Bardin D., Izac B., Charneau P., Roméo P. H., Dubart-Kupperschmitt A. & Fichelson S., *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat. Med.*, 2003, 9, 1423-1427.
- Antonchuk J., Sauvageau G. & Humphries R. K., HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell*, 2002, 109, 39-45.
- Bhardwaj G., Murdoch B., Wu D., Baker D.P., Williams K. P., Chadwick K., Ling L. E., Karanu F. N. & Bhatia M., Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells *via* BMP regulation. *Nat. Immunol.*, 2001, 2, 172-180.
- Buske C., Feuring-Buske M., Abramovich C., Spiekermann K., Eaves C. J., Coulombel L., Sauvageau G., Hogge D. E. & Humphries R. K., Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood*, 2002, 100, 862-868.
- Daga A., Podesta M., Capra M.C., Piaggio G., Frassoni F. & Corte G., The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34⁽⁺⁾ cells induces an *in vitro* expansion of clonogenic and early progenitors. *Exp. Hematol.*, 2000, 28, 569-574.
- Derossi D., Joliot A. H., Chassaing G. & Prochiantz A., The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 10444-10450.
- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. & Prochiantz A., Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 18188-18193.
- Gammaitoni L., Bruno S., Sanavio F., Gunetti M., Kollet O., Cavalloni G., Falda M., Fagioli F., Lapidot T., Aglietta M. & Piacibello W., *Ex vivo* expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp. Hematol.* 2003, 31, 261-270.
- Haddad R., Guardiola P., Izac B., Thibault C., Radich J., Delezoide A., Baillou C., Lemoine F., Gluckman J., Pflumio F. & Canque B., Molecular characterization of early human T/NK and B lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*, 2004, 104, 3918-3926.
- Issaad C., Croisille L., Katz A., Vainchenker W., Coulombel L., A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood*, 1993, 81, 2916-2924.
- Maizel A., Bensaude O., Prochiantz A. & Joliot A., A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development*, 1999, 126, 3183-3190.
- Reya T., Duncan A. W., Ailles L., Domen J., Scherer D. C., Wille K., Hintz L., Nusse R. & Weissman I. L., A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, 423, 409-414.
- Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C. J., Lawrence H. J., Largman C., Lansdorp P. M. & Humphries R. K., Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev.*, 1995, 9, 1753-1765.
- Thorsteinsdottir U., Sauvageau G. & Humphries R. K., Enhanced *in vivo* regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*, 1999, 94, 2605-2612.
- Ueda T., Tsuji K., Yoshino H., Ebihara Y., Yagasaki H., Hisakawa H., Mitsui T., Manabe A., Tanaka R., Kobayashi K., Ito M., Yasukawa K. & Nakahata T., Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 1013-1021.