

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701099

研究課題名(和文)レトロウイルスベクターの細胞特異的組み込み領域の解析

研究課題名(英文)Identification of the cell type specific region for retroviral vector integration

研究代表者

吉野 和寿 (YOSHINO, kazuhisa)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：40551859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：レトロウイルスベクターによる遺伝子治療において insertional mutagenesisによる白血病が発生した。レトロウイルスベクター挿入高頻度部位、High incidence region (HIR) が原がん遺伝子LMO2以外でも存在することを、CCND2を例に取り、明らかにした。HIRの包括的解析を行うために、次世代シーケンサーを用いた解析条件検討を行い、また、ベクター挿入の標的となる原がん遺伝子および細胞増殖関連遺伝子の候補を600個同定した。

研究成果の概要(英文)：Retroviral vector integration near the LMO2 promoter is the most likely cause of leukemia in the gene therapy trials. Here, we showed identification of a high incidence region (HIR) for retroviral vector integration, which we had originally identified in the LMO2 promoter region, near the promoter region of the CCND2 locus, suggesting that there is the HIR in the promoter region of various genes. To perform comprehensive analysis of HIR, next-generation sequencer was applied to examine the analysis condition for the HIR. Furthermore, using the next-generation sequencer, 600 candidates for proto-oncogene or the cell proliferation-related gene, which are targets for the vector integration on HIR, were identified.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスベクターによる遺伝子治療は insertional mutagenesis による腫瘍の発生が危惧されていたが、その確率は問題にならないほど小さいとして、続けられてきた。遺伝子治療による治療の完全な成功例は、2000年によろやく報告された Moloney leukemia virus (MLV)ベクターに組み込んだ IL-2レセプター $\gamma$ c鎖(IL-2R $\gamma$ c)によるX連鎖重症複合免疫不全症(XSCID)の治療である (Science 288, 669-672, 2000)。造血幹細胞に目的遺伝子をレトロウイルスベクターで組み込むこの治療法は、直ちに他の遺伝子疾患、ADA欠損症ならびに慢性肉芽腫症に応用され、成功が報告されている。しかし、2000年の成功のわずか2年後に治療を受けた小児が白血病を発症した (Science 302, 415-419, 2003)。insertional mutagenesisによる原がん遺伝子、LMO2の活性化が発癌に大きく関わっていると推定されている。しかし、遺伝子治療20名中5名と言う高率発症のメカニズムの全容はまだ明らかではなく、レトロウイルスベクターを用いた他の遺伝子治療における安全性も懸念されている。

## 2. 研究の目的

原がん遺伝子近傍へのベクター挿入確率の解析は、これまで報告がない。その理由の1つに解析法の技術的な困難さがある。PCR法はウイルスベクター挿入確率や挿入位置決定においても有用な技術と考えられるが、定量的にベクター挿入確率を求めるためには、先ず基準となるベクター組み込み頻度の高い領域を同定し、その領域を用いてベクター挿入頻度の検証が必要である。我々は染色体上の340箇所のベクター挿入位置を決め、約3.5kb間に3つのベクター組み込みがあり、理想的なPCRの基準領域となる hotspot を見出した (Biochem Biophys Res Commun. 345:1099-107. 2006)。この領域を利用して、我々は PCR によって組み込まれたベクターを100%検出する条件を確立することが

できた。無論、個々のPCRの及ぶ範囲は1~2kbであるので、広範囲なゲノムDNA領域を調べるためには、労力を必要とする。しかしながら、これまでの解析により染色体遺伝子の転写開始点の前後3kbに集中してベクター組み込みが起こることが分かっているので、染色体上の個々の解析は順調に進むと考えられる。実際、我々はTリンパ球細胞株(TPA-Mat)を用いて、原がん遺伝子、LMO2近傍の挿入確率を決定し、さらに正確な確率を求めるために挿入ベクターをリアルタイムPCRで定量した。この解析で、我々はLMO2遺伝子の転写開始点近傍に高頻度にベクター挿入が起こる領域を見出した。我々はこの領域をHigh incidence region (HIR)と名付けた。このLMO2近傍のHIRは、Tリンパ球細胞株のJurkatにも同定されたが、HeLa細胞においては見出されないことから、細胞特異的であることが示唆された。一方、遺伝子治療はヒトCD34陽性細胞を用いて行われることから、臍帯血由来CD34陽性細胞にウイルスベクターを感染させて解析を行い、上記Tリンパ球細胞株と同じ領域に高頻度組み込み領域を見出した。従って、本方法は遺伝子近傍に存在するHIRの位置探索ならびにHIRの細胞特異性の解析に十分機能する。原がん遺伝子近傍に存在するHIRに的を絞った組み込み部位の包括的な解析は、レトロウイルスベクターの組み込み特性に関する研究において新たな局面を切り開くと考えられる。

本研究では

LMO2以外の白血病発症に関わる原がん遺伝子についてウイルスベクター挿入確率および挿入位置の分布を明らかにする。

高頻度組み込み領域(HIR)の細胞特異性について解析、解明を行う。

## 3. 研究の方法

遺伝子治療により白血病を発症した2名は、2名ともそれぞれ原がん遺伝子LMO2のエクソン第1の上流もしくは下流にベクターが組み込まれていた。遺伝子治療では患者一人当たり少なくとも $10^7$ 個のベクター組

み込み細胞が導入されるが、ベクターが LMO2 近傍に挿入される確率は、計算上では、ベクターが各々遺伝子のプロモーター近傍に 20% の確率で挿入されると仮定すると、約 3 万の遺伝子全てに組み込まれた場合、約 66 個となる。これはベクター組み込みが各遺伝子上流に均一に組み込まれた場合である。組み込みを受けた血液幹細胞の 1% が T リンパ球になると仮定すると、T リンパ球には治療を受けた患者あたり、1 個組み込まれるかどうか、と言う確率になる。遺伝子治療用の MLV ベースのベクターについては当初、組み込みを受けやすい染色体上の hotspot は少ないと考えられていた。しかし、我々がベクター組み込みの見られた 340 箇所を調べたところ、15 箇所の hotspot が存在することを見出した (Biochem Biophys Res Commun. 345:1099-107, 2006)。このことはヒトリンパ球染色体上に多数の hotspot が存在することを示唆している。従って、染色体上の個々の遺伝子上流域に組み込まれるベクターの頻度は、個々の遺伝子ごとに異なると考えられる。我々は既に染色体上のウイルスベクター挿入位置の決定法を用いて、すでに LMO2 近傍に hotspot 以上の効率で組み込みが起こる High incidence region (HIR) があることを見出した (Retrovirology 6:79, 2009. Equal contributor として)。HIR へのベクター組み込み頻度を解析したところ、2 万~4 万細胞に 1 個の割合で組み込まれることが解った。これは治療を受けた患者あたり、組み込みを受けた T リンパ球が 30 個~60 個存在する見積もりとなり、予想以上の数である。他方、X 連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) の遺伝子治療により生じた白血病では、LMO2 以外の原がん遺伝子 (CCND2, BMI1) 近傍にもベクターが組み込みが報告されている。これらの遺伝子座について LMO2 と同様に転写開始点を中心に HIR の存在の有無ならびにその範囲を探り、HIR の存在が確認されたならば、その組み込み頻度を明らかにする。さらに、白血病発症に至っていないが、遺伝子治療を受けた患者リンパ球の解析により、細胞増殖

関連遺伝子座へのベクター組み込みが報告されている。これらの遺伝子座についても HIR の探索を行う。これら原がん遺伝子や細胞増殖関連遺伝子座近傍に的を絞った組み込み部位の包括的な解析は、レトロウイルスの染色体組み込み機構の解析に新たな局面を切り開くと考えられる。

#### 4. 研究成果

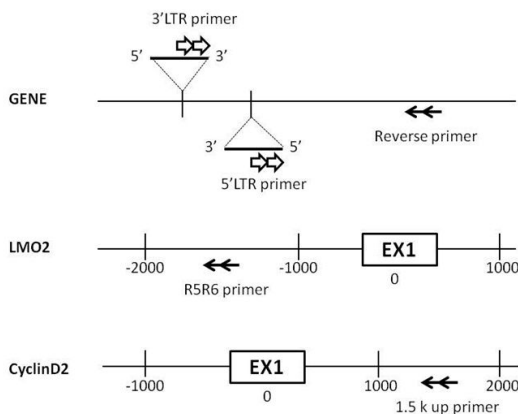
##### (1) 染色体に組み込まれたウイルスベクターの安定的検出条件の確立

遺伝子のプロモーター領域に組み込まれたウイルスベクターを安定的に検出するために、先ずヒトリンパ球細胞を用いて染色体にベクターが挿入された 1135 個の細胞クローンを得た。Mouse retroviral tagged cancer gene database (RTCGD) は MLV を感染させたマウスから生じた腫瘍細胞からゲノム上のウイルス組み込み位置を特定したデータベースである。即ち、RTCGD におけるウイルス組み込み部位はポテンシャルな proto-oncogene と考えられているので、決定したベクター挿入位置とこのデータベースを比較検討し、一致する BLK, ITGA4, LMO4, MEF2C, NFKB1, PTK2B, RGS1, RUNX1, DUSP2, PLAG1 などを見出した。また、同じ遺伝子座に複数の組み込みのある hotspot として、多いものから RGS1 (8 個)、TMEM49 (7 個)、ITGA4 (5 個)、BRMS1L (5 個)、TNF1K (4 個)、NOX3 (4 個)、Raptor (4 個)、MYC (3 個)、GPR15 (3 個)、RDX (3 個)、EDG1 (3 個)、TNFSF4 (3 個) などを見出した。以上より PCR によって染色体に組み込まれたベクターを検出する条件は、ほぼ確立できたと考えられる。

##### (2) ウイルスベクター高頻度挿入領域、HIR の解析

遺伝子のプロモーター領域に的を絞った定量的ベクター組み込み解析としては、LMO2 遺伝子近傍へのベクター挿入確率について我々が初めて報告したが、これまで LMO2 以外の個々の遺伝子のプロモーター領域のベクター組み込みの定量的解析は行われていない。そこで LMO2 以外の原がん遺伝子の中から 1 つを選び、

本方法でプロモーター領域解析を行った。原がん遺伝子の upstream で 100kb 間に 3 個のベクター組み込みが報告されている CCND2 を選択した。CCND2 の upstream 1.5kb に primer を設定し、同様に LMO2 の upstream 1.5kb に設定した primer をコントロールとした。LMO2 の primer とウイルスベクター 3' LTR の primer 間の PCR を行ったところ 24/112 ( 検出数/サンプル数 ) の結果を得、CCND2 の primer とウイルスベクター 3' LTR の primer 間の PCR を行ったところ 8/91 ( 検出数/サンプル数 ) であった。同様に LMO2 の primer とウイルスベクター 5' LTR の primer 間の PCR を行ったところ 31/112 ( 検出数/サンプル数 ) であり、CCND2 の primer とウイルスベクター 5' LTR の primer 間の PCR を行ったところ 19/98 ( 検出数/サンプル数 ) の結果を得た。研究者間で 100kb 間に 3 個のベクター挿入のある領域を hotspot する 경우가多いが、今回の結果は hotspot 領域の解析に本方法が適用できることを示唆した。



### ( 3 ) がん関連遺伝子プロモーター領域 HIR の包括的解析に向けた検討

プロモーター領域のウイルスベクター挿入の安定的検出条件は整い、標的遺伝子について問題なく解析を進めることが可能となった。本方法ではプロモーター領域を一つずつ解析するので、他のプロモーター領域との比較、特に染色体上の多数のプロモーター領域を包括的に解析することは困難である。近年次世代シーケンサーの活用が進展して

きたことから、次世代シーケンサーを用いて、ウイルスベクター挿入部位の網羅的検出系の開発を試みた。ヒト T リンパ球株細胞に挿入されたウイルスベクターの配列を次世代シーケンサーで解読することで、ゲノムにおけるベクター挿入部位の決定が技術的に可能となってきた。しかしながら、次世代シーケンサーの開発はゲノム解析に指向して進められており、外来遺伝子を含む本研究に適応するには、改めて条件を検討することが不可避である。現在、外来遺伝子を含む配列の解析ツールの構築に成功し、シーケンシング条件を設定中である。

### ( 4 ) T リンパ球におけるがん関連遺伝子および細胞増殖関連遺伝子の網羅的探索

次世代シーケンサーを用いて、T リンパ球におけるがん関連遺伝子および細胞増殖関連遺伝子の網羅的探索を行った。同定された遺伝子は HIR 解析の候補となる。shRNA ライブラリーを導入した T リンパ球株細胞の増殖を次世代シーケンサーにより評価した結果、600 の候補遺伝子を検出した。これらの遺伝子のプロモーター領域における HIR の有無を解析することにより、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療で発生した白血病の発症メカニズムの詳細が明らかになると期待できる。

### ( 5 ) 考察

本研究では我々が見出したレトロウイルスベクター挿入高頻度部位、High incidence region ( HIR ) が原がん遺伝子 LMO2 以外でも存在することを、CCND2 を例に取り、明らかにした。このことは多くの原がん遺伝子プロモーター領域に HIR が存在することを示唆している。従って、次の課題として HIR の包括的な解析が必要である。そこで本研究では次世代シーケンサーを用いて染色体上の HIR を幅広く解析する予備的実験を行った。次世代シーケンサーは膨大な遺伝子情報を解析するのに適しているが、ゲノム中心で、

本研究に用いるには独自の工夫が必要となる。今回の試みでは、次世代シーケンサーにより得られる遺伝子情報に含まれる外来遺伝子を抽出する手法を構築することが出来た。さらに、本研究において、次世代シーケンサーを利用し、shRNA ライブラリーを導入したTリンパ球株細胞の増殖を評価することで、がん関連遺伝子の候補を拾い上げることが出来た。今回得られた約600の候補遺伝子のプロモーター領域は、また、HIRの存在する遺伝子の候補でもある。レトロウイルスベクター遺伝子治療に伴う白血病等のがん化に関わる遺伝子の解析は、未だ多くのことが判っておらず、本研究の進展は多くの情報を提供できるであろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Amano Y., Yoshino K., Kojima K., Takeshita T.: A hydrophobic amino acid cluster inserted into the C-terminus of a recycling cell surface receptor functions as an endosomal sorting signal. **Biochem Biophys Res Commun**, 441, 164-168, 2013. DOI

10.1016/j.bbrc.2013.10.019

(査読有り)

Amano Y., Yamashita Y., Kojima K., Yoshino K., Tanaka N., Sugamura K., Takeshita T.: Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting. **J Biol Chem** 286,15458-15472,(2011). (査読有り)

[学会発表](計2件)

Amano Y., Kojima K., Yoshino K., Takeshita T.: Hydrophobic amino acid cluster in the cytoplasmic tail of

interleukin-2 receptor  $\beta$  chain acts as a sorting signal for lysosome. 国際免疫学会、ミラノ、2013年8月23日

天野勇治、小嶋克彦、吉野和寿、竹下敏一: Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting. 日本免疫学会、千葉、2011年11月29日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 和寿 (YOSHINO, kazuhisa)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 40551859

(2) 研究分担者

( )

研究者番号: