

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09676

研究課題名(和文) 免疫不全症への造血幹細胞遺伝子治療における新規エンベロープによる幹細胞性の維持

研究課題名(英文) Establishment of Baboon envelope pseudotyped LV vector system to maintain the stemness in stem cell gene therapy.

研究代表者

内山 徹 (Uchiyama, Toru)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長

研究者番号：10436107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞毒性を示さないヒビ内在性レトロウイルスのエンベロープ(BaEV env)を用いて、レンチウイルス(LV)ベクターのパッケージング細胞の作製を行った。まず、LVの構成遺伝子 gag-polと制御遺伝子 revを293T細胞に導入し、293LVgpr細胞を作製した。この細胞はベクターおよびエンベローププラスミドをトランスフェクションすることでLVベクターの産生が可能であった。次に、この細胞にBaEV envを導入し、パッケージング細胞を作製したが、十分な力価のウイルスは産生されなかった。原因としてBaEV envの発現が低いことが判明し、現在BaEVのコピー数の上昇を試みている。

研究成果の概要(英文)：An envelope protein of Baboon endogenous retrovirus (BaEV env) can efficiently package the lentivirus (LV) without any cytotoxicity, and we used BaEV env to make the stable packaging cell line for LV vector. LV gag-pol genes encoding structural proteins and rev regulatory gene were transferred into 293T cells to make 293LVgpr cells. Resultant cells expressed gag-pol and rev, and could make the lentivirus particle by the transfection of vector and any kind of envelope plasmids. To make the stable packaging cell line, we then transduce 293LVgpr cells with self-inactivating retroviral vector containing BaEV env. Transduced cells, however, could not produce high titer of LV by the transfection of vector plasmid, because the expression level of BaEV env is not sufficient. We now try to increase the copy number of BaEV env in 293LVgpr cells to increase its expression.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：レンチウイルスベクター 造血幹細胞遺伝子治療 幹細胞性 ヒビ内在性レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスベクターによる原発性免疫不全症に対する遺伝子治療では、その強力な遺伝子発現効果から、ほぼ完全な免疫能の再構築が得られた。一方で、ベクターによる挿入発がん変異という有害事象が報告され、現在は自己不活型 (self-inactivating) であるレンチウイルスベクターが主流となっている。

造血幹細胞遺伝子治療では、遺伝子導入時の幹細胞性 (stemness) を維持しつつ、高い遺伝子導入効率を達成することが重要である。レンチウイルスベクターでは、エンペロープを水疱性口内炎ウイルス G タンパク質 (VSV-G) に変えることで、野生型 HIV-1 とは異なり幅広い細胞への感染が可能になったが、一方で、VSV-G は強い細胞毒性を示すことが知られている。また、レトロウイルスベクターに比べてその発現力が弱いことから、レンチウイルスベクターではより高い遺伝子導入効率を求められ、サイトカイン刺激による細胞増殖が必須である。

この VSV-G の毒性や細胞増殖刺激などは、造血幹細胞の stemness の低下を引き起こし、その結果、遺伝子治療の効果を低下させる可能性がある。そのため、これらの克服による stemness の維持は、依然として遺伝子治療における重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入時の細胞刺激や、エンペロープの細胞毒性を克服し、stemness を維持したまま遺伝子導入を可能にするレンチウイルスベクターシステムの確立を目的とする。

2014 年に報告されたヒヒ内在性レトロウイルス (baboon endogenous retrovirus: BaEV) のエンペロープ (BaEV env) はレンチウイルスベクターを効率よくパッケージングすることが可能である。BaEV env は amino acid (aa) transporter-1 及び -2 (ASCT-1、ASCT-2) を受容体とするが、これらは造血幹細胞において非常に高く発現しており、VSV-G に比べても高い効率で遺伝子導入が可能である。特筆すべきは、BaEV env を使用することで幹細胞への刺激を行わずに遺伝子導入が可能になることや、VSV-G のような細胞毒性が無いことなどから、遺伝子導入時の stemness の低下を克服することが可能である。

通常のレンチウイルスベクターは、VSV-G の毒性から、293T 細胞に対してベクタープラスミドとウイルスの構成要素 (gag-pol, rev) VSV-G を一過性にトランスフェクションすることで産生される。そのため、レトウイルスベクターのように、ウイルスの構造タンパクが導入されたパッケージング細胞が利用できず、操作が煩雑となることや、産生ウイルスの力価が不安定なるなどの課題が存在する。

一方で、BaEV env は細胞毒性を示さないことから、細胞における安定した発現が可能となる。本研究ではこの BaEV を利用したレンチウイルスパッケージング細胞の作製を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 293T 細胞への gag-pol、rev の導入
レンチウイルスの構造遺伝子 (gag-pol) と制御遺伝子 (rev) を、Hygromycin 耐性遺伝子とともにアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに組み込む。次に、これを AAV の染色体への挿入に関与している、AAV タンパク Rep78 とともに 293T 細胞にトランスフェクションする。Hygromycin によるセレクションを実施して、これを gag-pol、rev の発現細胞とする (293LVgpr 細胞)。

(2) BaEV エンペロープの導入によるパッケージング細胞の作製

Baboon envelope の cDNA を、puromycin 耐性遺伝子とともに自己不活型レトロウイルスベクターに組み込む。これを 293LVgpr 細胞に導入し、puromycin によるセレクションを実施し、293LVgprBaEV 細胞とする。

4. 研究成果

(1) gag-pol-rev プラスミドの構築

ウイルスの構造遺伝子である gag-pol と制御遺伝子 rev を tail to tail で AAV ベクタープラスミドに組み込んだ。また、rev 遺伝子の下流に、hygromycin 耐性遺伝子を、IRES 配列を挟んで挿入した (図 1)。

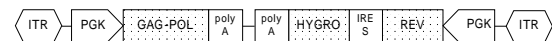


図 1 gag-pol-rev プラスミド

(2) 293LVgpr 細胞の作製

上記のプラスミドを、AAV タンパクである rep78 を発現するプラスミド pCMV-Rep78 とともに 293T 細胞へとトランスフェクションした。Rep78 は、AAV の ITR と結合し、ゲノム上の AAVS1 サイトへの組み込みを引き起こす (図 2)。トランスフェクション後の細胞に、hygromycin によりセレクションを実施し、安定発現株を樹立した。樹立した複数のクローンに対して、VSV-G と EGFP 発現レンチウイルスベクタープラスミド (pLentiCMVEGFP) をトランスフェクションし、上清を Hela 細胞へ感染させることで、最も高力価のウイルス産生クローンを選択した (293LVgpr 細胞: 図 3)。次に、この細胞に対して、pLentiCMVEGFP と BaEV をトランスフェクションすることでウイルスを作製し、臍帯血より分離した CD34 陽性細胞へと遺伝子導入したところ、VSV-G ウイルスに比べて高い遺伝子導入効率が認められた。

このことから、BaEV によるレンチウイルスの CD34 陽性造血幹細胞への高い感染性と、作製した 293gpr 細胞はウイルス産生に十

分なレベルの gag-pol, rev を発現していることが判明した。

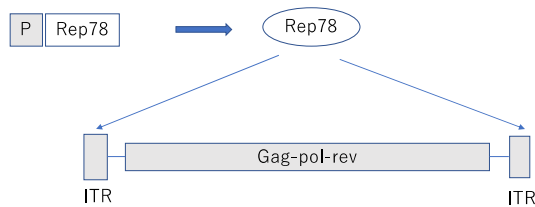


図2 Rep78 による AAVS1 サイトへの挿入

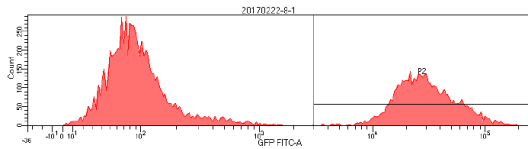


図3 293LVgpr 細胞

(3) BaEV env の導入

次に、293gpr 細胞に BaEV env を導入することで、LV ベクターパッケージング細胞 (293LVgprBaEV) の作成を試みた。使用する BaEV エンペロープは、ウイルス粒子への gag-pol の取り込みを改善するために、細胞内ドメインをマウス白血病ウイルス (MLV) へ変更している (BaEVTR : 図4)。これを自己不活型レトロウイルスベクターへ puromycin 耐性遺伝子と共に組み込み、293LVgpr 細胞に導入した。puromycin によるセレクションを実施し、セレクション後の細胞から RNA を抽出し、gag および BaEV の RT-PCR をしたところその発現が認められた (図5)。

この細胞に対してウイルス産生能を確認するため、pLentiCMVEGFP をトランスフェクションし、その上清を CD34 陽性造血幹細胞へ感染させたが、EGFP の発現は認められなかった。BaEVTR を別個とトランスフェクションした上清を感染させた場合には十分な発現が認められたことから、BaEVTR の発現がウイルス産生に十分でないことが考えられた。



図4 BaEVTR

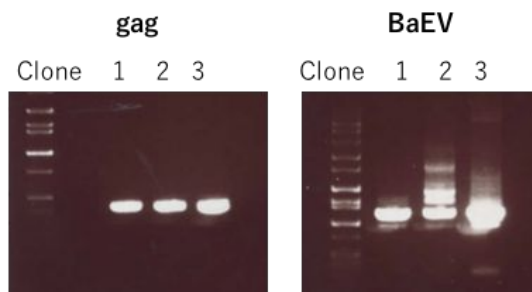


図5 gag と BaEV env の発現

(4) 今後の方針

BaEV の発現には構成的プロモーターが使用されていることから、ベクター内の発現は十分と思われる。よって、より発現を高めるためには、パッケージング細胞 1 つあたりの BaEVTR のコピー数を上昇させる必要があり、現在複数回の導入を行なっている。

一方で、293LVgpr 細胞は、任意のエンペロープとベクタープラスミドによるウイルス産生が可能なセミパッケージング細胞であり、研究において有用なツールになると考えられた。

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 10 件)

- 1) Okano T, Imai K....., Uchiyama T (56 人中 38 番目), Morio T. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive combined immunodeficiency and lymphoproliferation in Activated PI3K δ syndrome type 1. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 (in press)
- 2) Shin-ichi Tsujimoto, Tomoo Osumi, Meri Uchiyama, Ryota Shirai, Takaya Moriyama, Rina Nishii, Yuji Yamada, Ko Kudo, Masahiro Sekiguchi, Yuki Arakawa, Masanori Yoshida, Toru Uchiyama, Kiminori Terui, Shuichi Ito, Katsuyoshi Koh, Junko Takita, Etsuro Ito, Daisuke Tomizawa, Atsushi Manabe, Nobutaka Kiyokawa, Jun Yang, Motohiro Kato. Diplotype analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2018 (in press)
- 3) Osumi T, Tsujimoto S, Nakabayashi K, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida M, Uchiyama T, Nagasawa J, Goyama S, Yoshida T, Tomizawa T, Kurokawa M, Matsubara Y, Kiyokawa N, Hata K, Kato M. Somatic MECOM mosaicism in a patient with congenital bone marrow failure without a radial abnormality. *Pediatr Blood Cancer* 65:e26959, 2018
- 4) Nakazawa Y, Kawai T, Arai K, Tamura E, Uchiyama T, Onodera M. Fecal calprotectin rise in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Immunol.* 2017. doi: 10.1007/s10875-017-044-3
- 5) Igarashi Y, Uchiyama T, Minegishi T, Takahashi S, Watanabe N, Kawai T, Yamada M, Ariga T, Onodera M. Single cell-based vector tracing in patients with ADA-SCID treated with stem cell gene therapy. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* 6: 8-16, 2017.

- 6) Goto F, Uchiyama T, Nakazawa Y, Kawai T, Imai K, Onodera M. Persistent impairment of T cell regeneration in a patient with activated PI3K d syndrome. *J. Clin. Immunol.* 37: 347-350, 2017.
- 7) Osumi T, Kato M. Ouchi-Uchiyama M, Tomizawa D, Kataoka K, Fuji Y, Seki M, Takita J, Ogawa S, Uchiyama T, Ohki K, Kiyokawa N. Blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia caused by the copy number gain of oncogenic KRAS. *Pediatr. Blood Cancer* 2017 doi: 10.1002/pcb.26496
- 8) Okawa Y, Uchiyama T, Jagadeesh GJ, Candotti F. The long terminal repeat negative control region is a critical element for insertional oncogenesis after gene transfer into hematopoietic progenitors with Moloney murine leukemia viral vectors. *Gene Ther.* 23:815-818, 2016.
- 9) Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, Goto F, Watanabe N, Maekawa T, Ishiguro A, Okuyama T, Otsu M, Yamada M, Hershfield MS, Ariga T, Onodera M. Effects of enzyme replacement therapy on immune function in ADA deficiency patient. *Clin. Immunol.* 161:391-393, 2015.
- 10) Kawai T, Arai K, Harayama S, Nakazawa Y, Goto F, Maekawa T, Tamura E, Uchiyama T, Onodera M. Severe and rapid progression in very early-onset chronic granulomatous disease-associated colitis. *J. Clin. Immunol.* 35:583-588, 2015.

〔学会発表〕(計 17件)

1. 三浦茜、内山徹、峰岸知子、小野寺雅史. X連鎖無ガンマグロブリン血症に対するゲノム編集技術による遺伝子治療法の確立. 第 79 回日本血液学会学術集会 2017年10月
2. 大隅朋生、飯島友加、辻本信一、内山徹、富澤大輔、清河信敬、真田昌、加藤元博 白血病特異的一塩基多型を標的とした定量的微笑残存病変検出法の検討 第 79 回日本血液学会学術集会 2017年10月
3. 内山 徹 . Progress in gene therapy for primary immunodeficiencies. 第 23 回日本遺伝子細胞治療学会 2017年7月
4. 高橋シリラット、内山徹、小野寺雅史 Biased engraftment of transduced cells in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. 第 10 回日本免疫不全症研究会 2017年1月
5. 内山徹、後藤文洋、田中壽子、渡辺信之、河合利尚、小野寺雅史アデノシンデアミナーゼ欠損症の従姉弟例第 10 回日本免疫不全症研究会 2017年1月
6. Toru Uchiyama. Current status of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in Japan. The 7th International Collaboration Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease. 2017年1月
7. 後藤文洋、内山徹、河合利尚、小野寺雅史. 新規の ADA スプライシング変異を認めた重症複合免疫不全症の一例 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016年12月
8. 内山徹、五十嵐友香、渡辺信之、高橋シリラット、中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、山田雅文、有賀正、小野寺雅史 Selective pressure of vector-derived ADA in ADA-SCID patients treated with gene therapy. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016年10月
9. 後藤文洋、長田香代、峰岸知子、諸田沙織、中島英規、奥山虎之、河合利尚、小野寺雅史、内山徹. 重症複合免疫不全症 (SCID) の新生児スクリーニング 第 43 回日本マススクリーニング学会 2016年8月
10. 高橋シリラット、五十嵐友香、内山徹、小野寺雅史 Single cell-based vector tracing in the patients treated with stem cell gene therapy 第 22 回日本遺伝子治療学会学術集会 2016年7月
11. 内山徹 Hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome. 第 22 回日本遺伝子治療学会学術集会 2016年7月
12. 河合利尚、内山徹、後藤文洋、中澤裕美子、小須賀基通、和田友香、塚本桂子、伊藤裕司、奥山虎之、小野寺雅史乾燥ろ紙血を用いた原発性免疫不全症の新生児マススクリーニングパイロット研究 第 119 回小児科学会学術集会 2016年5月
13. Kawai T, Okamura K, Yagita M, Goto F, Nakazawa Y, Uchiyama T, Nakabayashi K, Nunoi H, Harry Malech, Onodera M A Gene Therapy Clinical Study of a Patient with X-linked Chronic Granulomatous Disease, The 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy 2016年5月
14. Toru Uchiyama Current status of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in Japan The 7th International Collaboration Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease. 2016年1月
15. Rapamycin controls lymphoproliferation and restores functional T cells in activated PI3Kδ syndrome. 内山徹、後藤文洋、中澤裕美子、渡辺信之、河合利尚、工藤豊一郎、富澤大輔、中澤温子、前川貴伸、小野寺雅史 第 77 回日本血液学会学術集会

2015年10月

16. A novel tracking system of transgene using droplet-based single cell PCR in hematopoietic stem cell gene therapy Igarashi Y, Uchiyama T, Watanabe N, Nakazawa Y, Otsu M, Ariga T, Onodera M. The 22nd Annual Meeting of European Society of Gene & Cell Therapy 2015年9月
17. Influence of virus production methods on genotoxic potential of gene transfer vectors. 高橋シリラット、内山徹、小野寺雅史 第21回日本遺伝子治療学会 2015年7月

〔図書〕(計2件)

- 1) 内山徹:「遺伝子治療で承認されたものはありますか?承認に近いものも含めて教えてください」小児内科49巻7号: 936 - 939, 2017
- 2) 内山徹:小児希少疾患に対する遺伝子治療の現状と問題点.先端治療技術の実用化と開発戦略(核酸医療、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)(株)技術情報協会、2017年;411 - 417

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 徹 (Toru Uchiyama)

国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長

研究者番号: 10436107

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

峰岸 知子 (Tomoko Minegishi)

秋葉 由美 (Yumi Akiba)