

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790335  
 研究課題名（和文） 遺伝子治療用 MLV ベクターの組み込み指向性を制御する細胞因子の同定  
 研究課題名（英文） Identification of cellular factors involved in regulation of integration preferences of gene therapeutic MLV vector.  
 研究代表者  
 塚原 智典（TSUKAHARA TOMONORI）  
 信州大学・医学部・助教  
 研究者番号：10362120

## 研究成果の概要：

免疫不全症の遺伝子治療では、治療用のレトロウイルスベクターの組み込みによるがん遺伝子の活性化により、副作用（白血病）が発生した。そこで、ベクターの安全性の再評価のために、ベクターの組み込み性状を解析し、特有の組み込み指向性とそれに伴う標的宿主遺伝子の転写制御を明らかにした。さらに、白血病に関与したがん遺伝子の活性化の機序をベクター組み込みの観点から解析し、がん遺伝子近傍でのベクター組み込み特性およびその頻度を算出した。これらの結果は、より安全な遺伝子治療を考える上で重要である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	360,000	2,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子・ウイルスベクター・遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）の遺伝子治療で、レトロウイルスベクターの組み込みによるがん遺伝子の活性化により、白血病が発生した。そのため、ベクターの組み込み特性の解明および安全性の再評価が必要となった。

(2) 当初、X-SCID遺伝子治療後、白血病（2例）が報告された。いずれの症例においても、

同一のがん遺伝子（LMO2）の転写開始点近傍がベクターの標的となっており、ベクター挿入変異によるLMO2の異常活性化を伴っていた。現在までに、新たに3例の白血病が報告された。臨床データをまとめると、遺伝子治療を受けた20例のうち、5例が白血病を発症した。そのうち4例では、LMO2がベクターの標的になっていた。そのため、LMO2の活性化メカニズムの解析は、上記の白血病発症機序の解明に重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) X-SCIDの遺伝子治療で起きた白血病発生の事例から、レトロウイルスベクターのリスク評価を目的として、治療の対象となるヒトT細胞を用いてレトロウイルスベクターの組み込み部位を探索し、さらに、組み込みによる標的宿主遺伝子の転写制御についてmRNAレベルで解析を行った。

(2) 先の白血病でみられたベクター挿入変異によるがん遺伝子LMO2の異常活性化のメカニズムを明らかにするために、LMO2の転写開始点近傍における組み込み特性およびその組み込み頻度を算出した。さらに、ベクター挿入によるLMO2の転写制御についても検討した。

(3) レトロウイルスベクターの組み込み指向性を制御する細胞側因子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) レトロウイルスベクターの組み込み部位を調べるために、まず、マウス白血病ウイルス (MLV) ベクターをT細胞 (TPA-Mat) に感染させ、クローン化した。感染T細胞クローンから、ゲノムDNAを抽出し、ベクターと宿主ゲノムの境界領域をPCRで検出した。ベクターの組み込み部位は、ゲノムデータベースであるNCBIで決定した。国外の研究グループから報告されているHeLa細胞におけるMLVベクターの組み込み部位とHIVベクターの組み込み部位を比較対象とした。また、10000件のランダム値 (挿入部位) を作成し、コントロールとした。

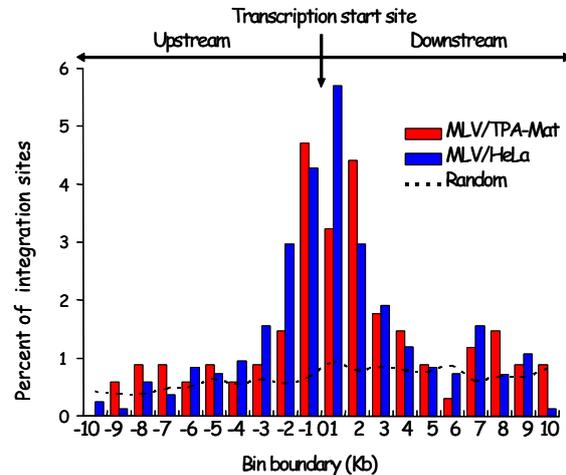
(2) レトロウイルスベクターの挿入による標的宿主遺伝子mRNAの動態を調べるために、ベクター挿入部位を決定したMLV感染T細胞クローンからcDNAを合成し、半定量性RT-PCRを行った。増幅したPCR産物を非感染細胞のものと相対的に比較した。

(3) LMO2の異常活性化のメカニズムを調べるために、LMO2の転写開始点近傍におけるレトロウイルスベクターの組み込み部位をベクタープライマーとLMO2特異的プライマーを使ったPCRで決定し、その頻度についても解析した。

(4) 酵母Two-Hybrid法により、レトロウイルスの組み込みに関与するインテグラーゼに結合する細胞側因子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

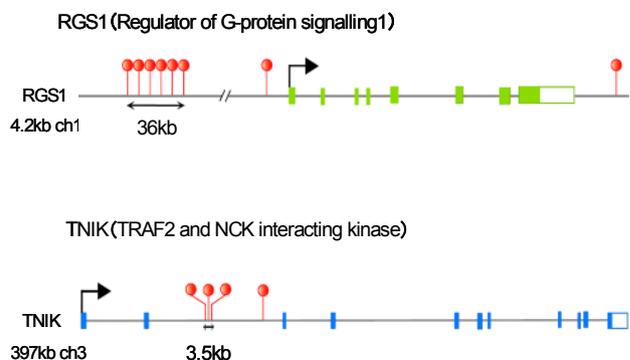
(1) T細胞におけるレトロウイルスベクターの組み込みは、染色体全体に分散していた。ゲノム情報をもとに組み込み部位を詳細に解析したところ、ランダム値に比べて、組み込みは、イントロン1および転写開始点近傍 (下図) さらにCpGアイランドに有意に起こることを明らかにした。



このレトロウイルスベクターの組み込み指向性は、遺伝子内全体にわたって組み込みが起こるレンチベクターとは性質が異なり、特徴的である。国外からは、遺伝子治療で使われる造血幹細胞 (CD34陽性細胞) におけるMLVベクターの組み込み特性が報告され、我々のデータとほぼ一致していた。

(2) レトロウイルスベクターの標的遺伝子の中には、細胞増殖関連遺伝子、シグナル分子またはがん原遺伝子が多く含まれていることが、がん遺伝子データベース (RTCGD) による検索から明らかになった。

(3) T細胞においてレトロウイルスベクターの組み込みが集中する15個のHot spotを初めて発見した。代表的な2例を下に示す。特に、TNIKは、3.5kb以内に3つの組み込みが認められた。



(4) 転写開始点近傍にレトロウイルスベクターが挿入されたT細胞クローンでは、非感染

細胞に比べて、mRNAレベルで約10倍転写が上昇していた。この転写活性化のメカニズムを調べたところ、通常は存在しないウイルスのLTRと標的遺伝子のmRNAが融合したいわゆるfusion transcriptが認められた。さらにプロモーター解析から、レトロウイルスベクターのLTR挿入が、LMO2プロモーターの転写活性化に関与していることを明らかにした。

(5) T細胞株(TPA-Mat)におけるLMO2転写開始点近傍へのレトロウイルスベクターの組み込み部位を調べたところ、転写開始点から上流約2kb付近に、ベクターが高頻度に組み込まれる領域を見出した。TPA-Matでは、同領域における組み込み頻度は、約45000個の細胞あたり1つであった。さらに、この領域には、白血病(1例)で報告された挿入部位が含まれていた。この組み込み特性については、臍帯血から分離した造血幹細胞(CD34陽性細胞)を用いて、同様な実験を進めている。

(6) 我々が見出した高頻度領域にベクターが挿入されると、LMO2の転写活性化が起こることがプロモーター解析から明らかになった。コントロールとして、白血病患者で報告されたベクター挿入部位にも人為的にベクター(LTR)を挿入すると、予想通り、有意にLMO2の転写が活性化した。

(7) インテグラーゼに結合し、機能的にレトロウイルスベクターの組み込みを制御する細胞側因子は今のところ、同定できていない。国外の研究から、インテグラーゼ結合分子がいくつか同定されたが、MLVベクターの組み込み指向性を説明できるものではなかった。

本研究では、レトロウイルスベクター遺伝子治療で白血病という有害事象が起きたことから、ベクターの安全性の再評価を目的として解析を進めてきた。その結果、レトロウイルスベクターの転写開始点近傍への組み込み指向性とそれに伴う宿主標的遺伝子の制御のメカニズムの一部を明らかにした。これらは、ベクターの安全性およびより安全なベクター開発に対して有用な情報であると考えられる。今後、レトロウイルスベクターの組み込み特性を制御する細胞側因子が同定されればベクター組み込みに関する分子レベルでの解明が進み、安全な遺伝子治療の確立に役立つことが予想される。

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 1件)

(1) Yamashita Y, Kojima K, Tsukahara T, Agawa H, Yamada K, Kurotori N, Tanaka N, Sugamura K, and Takeshita K  
Ubiquitin-independent binding of Hrs mediates endosomal sorting of the interleukin 2 receptor  $\beta$  chain.

J Cell Sci.121:1727-1738, 2008

査読有り

[学会発表] (計 3件)

(1) 山田幸一郎、塚原智典、小嶋克彦、山下勇毅、天野勇治、田中伸幸、竹下敏一  
LMO2近傍でのレトロウイルスベクター挿入頻度

第67回日本癌学会学術集会

平成20年10月28日

名古屋国際会議場 (名古屋)

(2) 塚原智典、田中伸幸、竹下敏一  
LMO2の転写開始点近傍におけるMLVベクターの組み込み特性

第56回日本ウイルス学会学術集会

平成20年10月26日

岡山コンベンショナルセンター (岡山)

(3) 山下勇毅、小嶋克彦、塚原智典、阿川英之、山田幸一郎、天野勇治、黒鳥直樹、竹下敏一

Ubiquitin-independent binding of Hrs to Interleukin 2 receptor chain  $\beta$  mediates its endosomal sorting

第37回日本免疫学会学術集会

平成19年11月21日

グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 智典 (TSUKAHARA TOMONORI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：1 0 3 6 2 1 2 0

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者