

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860836

研究課題名(和文)免疫不全症への遺伝子治療に向けたFVベクターによる長期造血幹細胞への遺伝子導入

研究課題名(英文) Foamy virus vector-mediated gene transfer into long-term HSC in the gene therapy for primary immunodeficiencies.

研究代表者

内山 徹 (UCHIYAMA, TORU)

独立行政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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Foamy virus (FV) ベクターによるX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対するより安全な造血幹細胞遺伝治療の確立を行った。A2UCOE配列をプロモーターとしてc鎖cDNAを組み込んだFVベクターによりX-SCIDマウスの骨髄細胞に遺伝子導入を行い、その後NOD/SCID-c nullマウスに移植した。移植後のマウスでは、T細胞(CD3抗体による増殖とIL-2の産生)、B細胞(血清免疫グロブリンの上昇)の機能回復を認め、免疫系の再構築を認めた。ベクター挿入部位解析では、レトロウイルスベクターに比べて、よりランダムな挿入パターンであり、FVベクターの安全性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using Foamy virus-based (FV) vector, we have established the gene transfer system for X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID). We constructed FV vector containing human c under the control of A2UCOE for stable gene expression, and transduced the bone marrow cells from X-SCID mice. Gene transduced cells were transplanted into NOD/SCID-c null mice, which provided high level of engraftment of hematopoietic cells. In transplanted mice, splenic T cells showed the improvement in proliferation and IL-2 production in response to anti-CD3 stimulation, and serum levels of IgM, IgA and IgG were also elevated. These results revealed the functional reconstitution of immune system. Analysis of vector integration demonstrated that FV integration sites were slightly less likely to be located within or near transcriptional start sites than retroviral vector (RV) integration sites. These data suggest that FV vector is a safer system than RV vector in stem cell gene therapy for X-SCID.

研究分野：遺伝子治療、血液、免疫

キーワード：FVベクター X連鎖重症複合免疫不全症 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) は重症感染症で発症し、生後 1 年以内に致命的な経過をたどる原発性免疫不全症である。HLA 一致同胞ドナーが存在せず、安全に造血幹細胞移植が行えない患者に対して、1999 年よりレトロウイルス (RV) ベクターによる遺伝子治療が開始され、ほぼ全例で免疫能の再構築が認められた。しかし、その後フランスとイギリスにおいて遺伝子治療を受けた患者 20 例中 5 例で T リンパ性の白血病の発症が報告された。いずれも治療後 3 年以降の発症であり、RV ベクターが染色体上のがん原遺伝子 LMO2 の近傍に組込まれて発症する挿入発がん変異によることが判明した。RV ベクターは、染色体上の遺伝子の転写開始部位近傍に挿入されやすく、また、その強力なエンハンサー/プロモーターは、近傍遺伝子への交叉活性を持つことから、これらを克服したベクターの開発が求められている。

(2) フォミーウイルス (FV) ベクターはレトロウイルスの一種である simian foamy virus より開発されたベクターである。FV ベクターは、染色体上での「遺伝子」内外への組み込みが、従来の RV ベクターやレンチウイルス (LV) ベクターに比べてよりランダムであること、FV 自体がヒトに対して病原性を示さないこと、自然宿主での挿入発がん変異が認められないこと、ヒト CD34 陽性細胞への高い遺伝子導入効率を示す、などの特徴を持っている。申請者は、この FV ベクターによって原発性免疫不全症である Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) のマウスモデルに対して遺伝子治療を行いその成果を発表している (Uchiyama T, et al. Mol Ther. 20: 1270, 2012)。

## 2. 研究の目的

(1) 申請者の先行研究である WAS マウスに対する遺伝子治療においても、造血幹細胞に対する高い遺伝子導入効率と免疫系の再

構築、また、他のウイルスベクター (RV や LV) に比べて、より安全な遺伝子挿入パターンが認められた。この結果を基に、X-SCID に対するより安全性の高い遺伝子治療法の開発を目指して、FV ベクターによる X-SCID への遺伝子導入法の確立を目指した。

(2) FV ベクターは、従来の RV ベクターと同様に、遺伝子導入の際に細胞分裂が必要である。この ex vivo における細胞分裂の誘導は造血幹細胞の特性 (stemness) の低下を招く可能性を有する。これらを克服する手段として、造血幹細胞で発現が認められる細胞内アダプタータンパクである Lnk に注目した。Lnk は TPO シグナルを負に制御しており、そのドミナントネガティブフォーム (dNLnk) は、造血幹細胞の増殖や、その生着能を上昇させることが報告されている。この dNLnk を用いることで、遺伝子導入時の造血幹細胞の stemness の維持と遺伝子導入効率の上昇を両立させ、長期造血幹細胞への遺伝子導入を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) FV ベクターの作製

安定した発現を目指して、methylation-free CpG island である A2UCOE 配列を genomic DNA より増幅し、ヒト  $\gamma$ c 鎖 cDNA とともに FV ベクターに組込んだ。このベクタープラスミド (FV-IL2RG) を 3 種類のヘルパープラスミドとともに 293T 細胞へトランスフェクションすることで FV ベクターを産生した。ヘルパープラスミドの pCiGS、pCiPS、pCiES はそれぞれ FV の gag、pol、env をコードしている。

### (2) T 細胞株への遺伝子導入

作成した FV ベクターによって  $\gamma$ c 鎖を発現しない T 細胞株である ED40515(-) に遺伝子導入を行い、 $\gamma$ c 鎖の発現と、下流のシグナルである STAT5 のリン酸化を flow cytometry analysis (FACS) または western blot (WB) により解析した。更に、遺伝子導入細胞より

ゲノム DNA を抽出し、ligation-mediated PCR (LM-PCR) によるベクター挿入部位の同定を行った。

(3) マウスモデルを利用した *in vivo* での効果の検討

X-SCID マウスより骨髓細胞を採取し、Lineage negative 分画 (Lin<sup>-</sup> BM) を免疫磁気ビーズによって分離した。分離した Lin<sup>-</sup>BM に FV ベクターによって遺伝子導入を行い、その後造血幹細胞が高率に生着する NOD/SCID- $\gamma$ c null (NOG) マウスへ移植した。移植後 8 週~12 週で、末梢血における T 細胞と B 細胞の出現や血清の IgG、IgA、IgM に関して評価を行い、また抗 CD3 抗体の刺激による T 細胞の増殖と IL-2 の産生を解析した。

(4) ドミナントネガティブ Lnk の作製と Lin-BM への導入

RT-PCR によってマウス Lnk cDNA を増幅し、その後 site-directional mutagenesis による R364E 変異の挿入と制限酵素による PH ドメインと C 末端の削除によって dPH/R364E/dC を作製した。これを dNLnk として、EF1a プロモーターにより発現するレンチウイルスベクターに組み込んだ。造血幹細胞への導入には、染色体への挿入を避けるためにインテグラーゼ欠損型レンチウイルスベクターシステム (ヘルパープラスミドの gag 上のインテグラーゼ活性が D64V 変異によって欠如している) を使用した。

#### 4. 研究成果

(1) T 細胞株を利用したベクターの評価

作製した FV ベクター (FV-IL2RG) により、ヒト T 細胞株である ED40515(-) に遺伝子導入を行った。遺伝子導入後には細胞表面に  $\gamma$ c 鎖の発現を認め、また、WB 解析により STAT5 のリン酸化が認められた。以上の結果より、作製した FV ベクターによる発現と機能の回復を確認した (図 1)。

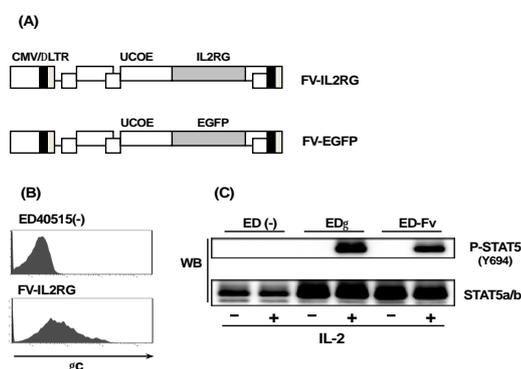


図 1 A FV ベクター、B  $\gamma$ c の発現、C STAT5 のリン酸化。

(2) ベクターの挿入部位解析

FV ベクターにより遺伝子導入した細胞からゲノム DNA を抽出し、ベクターの挿入部位に関して LM-PCR による解析を行った。また、RV ベクターにより遺伝子導入した ED40515(-) をコントロールとした。転写開始部位 (transcriptional start site: TSS) への集積は、RV に比べて FV は有意に低かった (図 2)。また、有意差は認めなかったものの、遺伝子内への挿入、がん原遺伝子近傍への挿入も低い傾向が認められた。

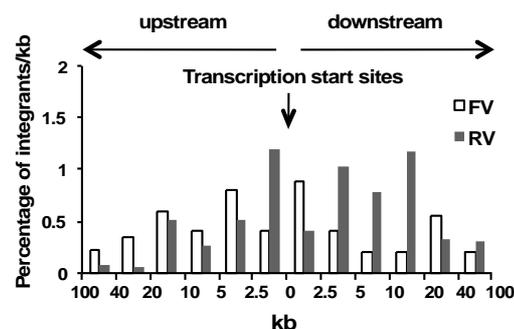


図 2 ベクターの挿入部位解析

(3) マウスモデルによる *in vivo* における効果の検討

X-SCID マウスから骨髓細胞を採取し、免疫磁気ビーズによって Lin-BM を分離した。サイトカイン (SCF、IL-3、IL-6、Flt-3 ligand) 刺激下で FV ベクターにより遺伝子を導入し、その後 NOG マウスへ移植した。移植後 8-12

週のマウスでは、コントロールマウス(EGFP 遺伝子を導入)に比べてCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、B220<sup>+</sup>B細胞の上昇が認められた(図3)。脾臓より分離したT細胞を抗CD3抗体で刺激し、細胞増殖とIL-2産生を測定したところ共に上昇が認められた。また、FV-IL2RG移植マウスにおける血清IgG、IgA、IgMを測定したところ、コントロールに比べて大きな上昇を認めた。以上より、遺伝子導入マウスにおける免疫能の再構築が証明された(図4)。

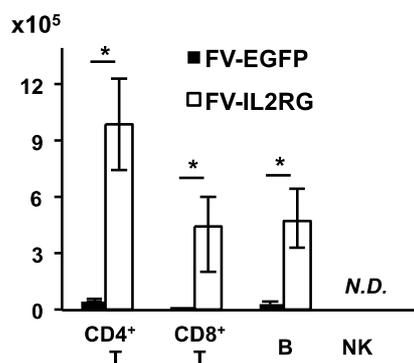


図3 末梢血におけるリンパ球の出現

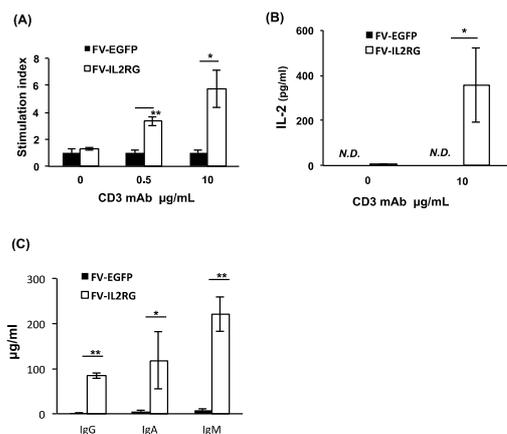


図4 移植後のマウスにおける免疫能の評価 . A 抗CD3抗体刺激によるT細胞の増殖、B IL-2の産生、C 末梢血における血清IgG、IgA、IgMレベル .

以上の結果を、学術雑誌に報告した(Horino S, Uchiyama T, et al. PLOS One 8: e71594, 2013)

(4) dNLnkの作製と造血幹細胞への遺伝

子導入

マウスの骨髓細胞よりRNAを抽出し、その後RT-PCRによってLnk cDNAを増幅した。その後mutagenesisによってR64V変異を導入したdNLnkをレンチウイルスベクターに挿入した。FVベクターによる造血幹細胞への遺伝子導入時の、dNLnkの一過性の発現を目的として、インテグラーゼ欠損型レンチウイルスベクターシステム(IDLV)を作製した。ヘルパープラスミド(pCMV-gag/pol)のgag遺伝子にD64V変異を導入し、インテグラーゼ活性を欠損させた。EGFP発現レンチウイルスベクターを利用した実験では、一過性のEGFPの発現を認めた(図5)。現在X-SCIDマウスを利用して、dNLnkを導入することによるFVベクターの長期造血幹細胞への遺伝子導入効率の上昇に関して検討中である。

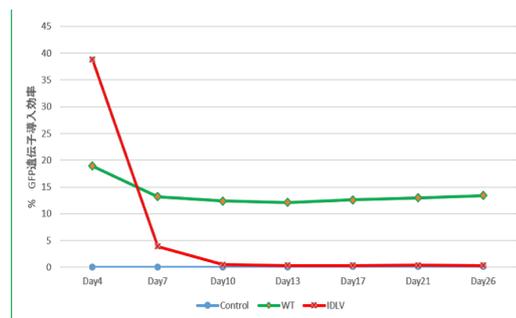


図5 IDLVによるEGFPの一過性発現

## 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7件)

1. Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Nakazawa Y, Goto F, Uchiyama T, Higuchi M, Maekawa T, Tamura E, Nagasaka S, Hojo M, Onodera M. Interstitial Lung Disease with Multiple Microgranulomas in Chronic Granulomatous Disease. J. Clin. Immunol, 34: 933-940, 2014. doi: 10.1007/s10875-014-0089-1.

2. Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Sato M, Hakozaki I, Uchiyama M, Wong WF, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int. Immunol.* 26: 341-52, 2014. doi: 10.1093/intimm/dxt072.
  3. 内山徹：原発性免疫不全-複合免疫不全、小児の治療指針（小児科診療77増刊）：228-230，2014  
<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=01&cd=4141300&kbn=2#toku>
  4. Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One.* 8: e71594, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0071594.
  5. Watanabe Y, Sasahara Y, Sato M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Suzuki N, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, Onuma M, Kitazawa H, Irie M, Niizuma H, Uchiyama T, Rikiishi T, Kumaki S, Minegishi M, Wada T, Yachie A, Tsuchiya S, Kure S. A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study. *Eur. J. Haematol.* 91: 242-248, 2013. doi: 10.1111/ejh.12151.
  6. Kitazawa H, Moriya K, Niizuma H, Kawano K, Saito-Nanjo Y, Uchiyama T, Rikiishi T, Sasahara Y, Sakamoto O, Setoguchi Y, Kure S. Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations. *Eur. J. Pediatr.* 172: 953-957, 2013. doi: 10.1007/s00431-013-1977-8.
  7. 内山 徹、小野寺雅史. 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と今後の展望 *日本臨床免疫学会誌* 36: 148-155, 2013. doi: <http://doi.org/10.2177/jsci.36.148>
- 〔学会発表〕(計12件)
1. 内山 徹：原発性免疫不全症への造血幹細胞遺伝子治療の現況：第4回関西免疫不全症研究会、2014/7/19、大阪
  2. 堀野智史、内山徹、宗孝紀、佐藤美季、孫舒嵐、笹原洋二、土屋滋、呉繁夫、菅村和夫、石井直人：Foamy virus vector を用いた X 連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療モデルの作製、第 117 回小児科学会学術集会、2014/4/11、名古屋
  3. 中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、内山徹、渡辺信之、前川貴伸、石黒精、奥山虎之、山田雅文、大津真、有賀正、小野寺雅史：酸素補充療法が造血幹細胞遺伝子治療後の ADA 欠損症患者に与える免疫機能改善効果、第 117 回小児科学会学術集会、2014/4/11、名古屋
  4. 後藤文洋、河合利尚、中澤裕美子、内山徹、原山静子、田村英一郎、亀井宏一、新井勝大、小野寺雅史：慢性肉芽腫症42例における肉芽腫性疾患の臨床的検討、第117回小児科学会学術集会、2014/4/11、名古屋
  5. 河合利尚、中澤裕美子、後藤文洋、内山徹、新井勝大、久保田雅也、石黒精、布井博幸、小林正夫、小野寺雅史：慢

- 性肉芽腫症の炎症性肉芽腫に対する  
サリドマイドの治療効果、第117回小  
児科学会学術集会、2014/4/11、名古屋  
屋
6. 中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、内  
山徹、渡辺信之、前川貴伸、石黒精、  
奥山虎之、山田雅文、大津真、有賀正、  
小野寺雅史：酵素補充療法が奏効した  
造血幹細胞遺伝子治療後アデノシン  
デアミナーゼ欠損症の一例。第7回免  
疫不全症研究会、2014/1/25、東京
7. 河合利尚、後藤文洋、渡辺信之、横山  
みどり、中澤裕美子、内山徹、前川貴  
伸、樋口昌孝、小野寺雅史：慢性肉芽  
腫症における過剰炎症と肉芽腫形成。  
第7回免疫不全症研究会、2014/1/25、  
東京
8. Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T,  
Arai K. Onodera M: Effect of  
Thalidomide Therapy on Bowel  
Inflammation in Chronic  
Granulomatous Disease. 第13回ア  
ジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学  
会(第40回日本小児栄養消化器肝臓  
学会)、2013.11.2、東京。
9. Kawai T, Nakazawa Y, Uchiyama T,  
Arai K. Onodera M: Effects of  
chronic granulomatous  
disease-associated bowel  
inflammation on microbial gut  
flora. 第13回アジア汎太平洋小児  
栄養消化器肝臓学会(第40回日本小  
児栄養消化器肝臓学会) 2013.11.2、  
東京。
10. 河合利尚、中澤裕美子、田村英一郎、  
清水泰岳、伊藤玲子、内山徹：単  
球の活性酸素産生能低下による肉芽  
腫性腸炎第 45 回日本小児感染症  
学会、2013.10.27、札幌。
11. Uchiyama T, Horino S, So T, G

Jayashree Jagadeesh, Ishii  
N, Candotti F: Gene therapy  
models of X-linked severe combined  
immunodeficiency and  
Wiskott-Aldrich syndrome using  
foamy virus vectors. 20<sup>th</sup> Annual  
Meeting, European society of gene  
and cell therapy, 2013.10.27,  
Madrid.

12. 河合利尚、中澤裕美子、渡辺信之、  
横山みどり、内山徹、田村英一郎、  
伊藤秀一、放生雅章、小野寺雅史：  
慢性肉芽腫症における肺間質性炎症。  
第23回日本小児リウマチ学会、  
2013.10.12、埼玉

〔図書〕(計0件)

〔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：  
出願年月日：  
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 (UCHIYAMA TORU)  
国立成育医療研究センター研究所・成育遺  
伝研究部・室長  
研究者番号：10436107