

論文の内容の要旨

論文題目 第三世代レンチウイルスベクターを用いたヒト血液細胞に
対する効率良い長期安定遺伝子導入法の検討

指導教官 浅野 茂隆 教授
東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 白 元松

白血病をはじめとする造血器腫瘍の治療は、新しい造血細胞移植療法や分子標的薬剤、モノクローナル抗体などの導入により、過去数年の間に確実に進歩している。いっぽう、現状では、薬剤抵抗例や再発例などの難治例、年齢やドナー不在等何らかの理由で移植を受けられない例も少なくない。したがって、今後さらに新しい治療法の開発がのぞまれており、その有力候補の一つが遺伝子治療である。当研究室では、キメラ型がん遺伝子 *bcr-abl* が病因となっている慢性骨髄性白血病(CML)に対する遺伝子治療法として、新規リボザイムであるマキシザイムの効果を検討してきた。その結果、*b2a2 type* の *bcr-abl* を持つ CML 由来細胞株に対してマウス白血病ウイルス (MLV)ベクターで導入したマキシザイムが特異的に細胞傷害活性を示し、NOD-SCID マウスへの移植モデルでも白血化を完全に抑制することができた。しかし、これが実際の患者細胞でも効果を示すか否かについては、MLV のようなレトロウイルスベクターでは遺伝子導入効率が低いため検討できなかった。このような遺伝子導入効率の低さは抗白血病遺伝子治療の開発において大きな障壁であった。

当研究室でも、これまでに、MLV ベクターやアデノウイルスベクターによる遺伝子導入法に様々な工夫を加えてきたが、白血病細胞株に対して 20%程度の導入効率しか得られなかった。その後、細胞指向性の広い小水泡性口内炎ウイルス(VSV)の外殻蛋白(*env*)をヒト免疫不全ウイルス(HIV)に持たせたシュードタイプレンチウイルス [HIV(VSV)]ベクターが、これまで遺伝子導入困難であった造血幹細胞や神経細胞にも遺伝子導入を可能にすることを Naldini らが報告し、注目を集めた。そこで、私も HIV(VSV)ベクターの利用を試みた。HIV(VSV) ベクターは安全性の確認が十分に済んでおらず、未だ臨床応用に至っていないため、安全性の確立された MLV ベクター

を VSV シュードタイプにしたベクター[MLV (VSV)]も同時に検討した。

使用した第3世代レンチウイルスベクターシステムは、ウイルス粒子の中に入り細胞に遺伝子を導入する **transfer vector** と構造蛋白および酵素または **rev** をコードするプラスミドと **VSV.G protein** をコードするプラスミド(**pMD.G**)の計4種のプラスミド、さらにこれらの遺伝子を導入する **293T** 細胞よりなる。安全性の向上のため、**transfer vector** からは全てのアクセサリー遺伝子(**vif, vpr, vpu** および **nef**)および調節遺伝子を削除し、HIV 蛋白による細胞への影響を最小限にしており、レポーター遺伝子として修飾型緑色蛍光タンパク質(**hrGFP**)遺伝子を含む。また、ベクター産生プラスミドの組み換えによる自己複製可能組み換えウイルスの発現を抑えるために3'LTRの一部を削除して自己不活性化 (**SIN; self-inactivation**) ベクターとした。さらに、遺伝子導入効率と導入遺伝子の発現を高めるため、**transfer vector** に HIV-1 の **central DNA flap** を形成する **central polypurine tract (cPPT)** と **central terminalion sequence (CTS)** および **woodchuck hepatitis virus** の **posttranscriptional regulatory element(WPRE)**を挿入した。このベクター系では4種のプラスミドが同時に組み換えを起こさない限り、自己複製可能ウイルスが産生される可能性がないと考えられている。これらのプラスミドを **293T** 細胞にトランスフェクションし、2日および3日後に培養上清を回収してさらに超遠心により濃縮した。MLV(VSV) ベクターは自己不活性化した **transfer vector**、MLV の **gag** および **pol** をコードするプラスミドおよび **pMD.G** の3種のプラスミドを用いて同様に作成し、濃縮した。HIV(VSV)ベクターと MLV (VSV)ベクターは同一の感染多重度(**moi; multiplicity of infection**)で標的細胞に感染させた。標的細胞として **K562**、**BV173** 等 10 種類の白血病細胞株、11 名の患者から同意を得て採取した白血病細胞、7名の健常人末梢血リンパ球、4 例の臍帯血由来 **CD34** 陽性細胞を用いた。遺伝子発現は導入2日後から一ヶ月後まで蛍光顕微鏡による観察とフローサイトメトリーで確認した。**K562**、**MEG-01** および **CD34** 陽性細胞への遺伝子導入後にはコロニーアッセイを行い、コロニー形成細胞における **hrGFP** 遺伝子発現の有無およびゲノム DNA へのウイルスベクターの組み込みを **Alu-PCR** 法を用いて調べた。

その結果、HIV(VSV)では大部分の白血病細胞株に対してほぼ 100%の遺伝子導入効率が得られたが、MLV(VSV)では 50%までにとどまった。11 例の患者細胞でも HIV(VSV)では 50-90%と高い遺伝子導入効率が得られたが、MLV では 10-80%であった。さらに、HIV(VSV)による導入遺伝子の発現は一ヶ月以上持続することが確認されたが、MLV(VSV)では感染後 2 週間以内に急速な発現の低下が認められた。リ

ンパ球に対する遺伝子導入効率も HIV(VSV)では 90%以上であったが、MLV(VSV)では低かった。臍帯血 CD34 陽性細胞に対しても 90%以上の導入効率を得られ、生じたコロニーのほとんどで hrGFP 遺伝子発現が認められた。コロニー形成細胞のゲノムにおけるベクターの組み込みは、HIV(VSV)の場合 100%認められたのに対して、MLV(VSV)では 10%と低率であった。この組み込み効率の低さが感染後 2 週間以内の急速な遺伝子発現低下の原因と考えられた。

HIV(VSV)は血液細胞に対し高い効率で遺伝子導入が可能であり、1ヶ月間安定した遺伝子発現が確認された。いっぽう、MLV(VSV)の導入効率はより低く、遺伝子発現は継時的に低下した。第 2 世代 HIV(VSV)ベクターを用いて白血病細胞株や患者細胞に遺伝子導入を試みた報告は幾つかあるが、私の実験結果では、これらの報告よりもさらに高い導入効率を得られており、cPPT、CTS、WPRE など新たに挿入した配列が影響している可能性がある。今回の研究において、安全性を考慮した新しい第 3 世代 HIV(VSV)ベクターが血液細胞へ遺伝子導入する場合極めて優れていることが示唆され、今後、マキシザイムなどを用いた白血病遺伝子治療法の開発において有用と思われる。