

博士論文

Foamy Virus ベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症に  
対する遺伝子治療モデル作成に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生・発達医学講座 小児病態学分野

堀野 智史

## 1 要約

X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency; 以下 SCID-X1) はサイトカイン共通受容体  $\gamma$  鎖 ( $\gamma$ c) をコードする遺伝子の変異によって生じる、T 細胞と NK 細胞の欠損を特徴とする先天性免疫不全症候群である。従来の retrovirus ベクターを用いた SCID-X1 の遺伝子治療の結果、T 細胞性免疫の再構築には成功したが、一方ベクターに起因する T 細胞性白血病が高い頻度で発症した。これは癌原遺伝子近傍にベクターが挿入し、癌原遺伝子が異常に活性化するために起こることが明らかになり、遺伝子治療上の大きな問題となっている。この問題への取り組みとして、私は改変 foamy virus ベクターを用いたマウス SCID-X1 遺伝子治療モデルの構築と、遺伝子挿入変異の安全性の検討を目的として実験を行った。本研究は foamy virus ベクターを用いて SCID-X1 の遺伝子治療のマウスモデルを作成した最初の報告である。 $\gamma$ c を発現するベクターを用いたヒト T 細胞株への感染実験では、遺伝子挿入部位の解析において retrovirus ベクターよりも foamy virus ベクターの方が遺伝子周辺に挿入する確率が有意に低かった。また、ベクターの治療効果を評価するために、 $\gamma$ c 欠損マウスの造血幹細胞に foamy virus ベクターを用いて  $\gamma$ c 鎖を遺伝子導入し、 $\gamma$ c 欠損マウスに移植する実験を行った。その結果、foamy virus ベクターで処理した造血幹細胞を移植したマウスでは、機能的な T 細胞の再構築が認められた。これらの結果から、foamy virus ベクターは SCID-X1 の遺伝子治療において効果的であり、かつ従来の retrovirus ベクターよりも安全性が高い可能性が示唆された。

## 2 研究背景

X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency; 以下 SCID-X1) は T 細胞、NK 細胞の欠損と B 細胞の抗体産生不全を特徴とする先天性免疫不全症候群である。液性免疫と細胞性免疫が著しく低下し、乳児期に重篤な感染症を繰り返し、無治療では 1 歳以内に死亡する。その原因は、IL (interleukin; インターロイキン)-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 受容体に共通するサブユニットである  $\gamma$  鎖 ( $\gamma$ c) の遺伝子変異である<sup>1)</sup>(図1)。 $\gamma$ c 鎖の遺伝子変異により  $\gamma$ c 鎖の受容体機能が障害されると、T 細胞分化に必須の IL-7 のシグナルが供与されなくなり、T 細胞が欠損する。同様に、NK 細胞分化に必要な IL-15 や B 細胞機能に重要な IL-4 や IL-21 のシグナル伝達不全が、上述した多彩な免疫不全症状を惹起する<sup>1)</sup>(図1)。治療はヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; 以下 HLA) 一致の同胞をドナーとする骨髄移植により、全生存率が 90%程度となる良好な成績が得られている。しかし、HLA 一致の同胞ドナーを持たない SCID-X1 患者では、移植片対宿主病や拒絶、T 細胞の選択的生着不全等により、生存率が 50%から 78%に低下する<sup>2, 3)</sup>。この適切なドナーを持たない患者に対して、骨髄移植の代替治療として遺伝子治療が開発され臨床応用されてきた。

SCID-X1 に対する遺伝子治療は 1999 年から 2002 年にフランスのグループによって初めて行われた<sup>4, 5)</sup>。患者骨髄から CD34 陽性細胞を単離し、 $\gamma$ c の相補 DNA を組み込んだレトロウイルス (retrovirus; 以下 RV) ベクターを感染させ、この感染細胞を患者に投与する

方法であった。T細胞の再構築は10例中9例で認められ、その他NK細胞の検出や免疫グロブリンの産生も確認され、RVベクターを用いた遺伝子治療はSCID-X1に対して有効であることが明らかになった。

しかし、遺伝子治療の数年後、複数の患者においてT細胞の単クローン性の増殖が認められ、T細胞性白血病の発症が確認された。英仏の臨床試験を合わせて20例中5例という高い発症頻度であり、このうち4例は白血病細胞において癌原遺伝子*LMO2*の近傍にベクターの遺伝子挿入が認められ、*LMO2*の異常に高い発現が確認された<sup>6-8</sup>。これはRVベクターのlong-terminal repeat (LTR)のU3領域に存在する強力なエンハンサー活性が近傍の遺伝子活性化を引き起こすために生じていることが明らかになった。また、RVベクターの特徴としてゲノム上の遺伝子転写開始部位の近傍に遺伝子挿入しやすいことが報告されており、これが発癌のリスクを高める原因の一つと考えられている<sup>9</sup>。

フォーミーウイルス(foamy virus;以下FV)はretrovirus科に属するspumavirus亜科に分類されるウイルスである。retrovirus科に属する一部のウイルスは遺伝子治療用に改変されており、主にマウス白血病ウイルス由来のRVベクターやヒト免疫不全ウイルス由来のレンチウイルスベクターがある。FVの構造の特徴は*gag*、*pol*、*env*の他に、*bel-1*、*bel-2*、*bel-3*と呼ばれる翻訳領域を持つことであり、*bel-1*はトランス活性化因子としての機能を持つが、*bel-2*、*bel-3*の働きの詳細は明らかになっていない。FVは幅広い種の多様な細胞に感染することが報告されており、ヒトにも感染することが知られている。しかし、ヒトを含むほ乳類への感染は不顕性であり病原性を持たないとされており、その点でマウス白血病ウイルス

やヒト免疫不全ウイルスと安全性が大きく異なる。またこれらの利点から将来的な遺伝子治療のベクターとなりうる可能性が指摘されている<sup>10, 11)</sup>。これまで開発されてきた **FV** ベクターは遺伝子のパッケージング容量が従来の **RV** ベクターに劣らず、またマウス造血幹細胞やヒト造血幹細胞への遺伝子導入が効果的であったことが報告されている<sup>12-15)</sup>。注目すべき点として、**FV** ベクターの遺伝子挿入部位の解析では、**RV** ベクターに比較してゲノムの遺伝子内に挿入する頻度が低く、よりランダムな挿入をすることが報告されており、安全性の高さが示唆されている<sup>16)</sup>。これらの利点から、造血幹細胞の遺伝子修復を目的とした遺伝子治療のモデルに用いられており、**Wiskott–Aldrich** 症候群<sup>17)</sup>、白血球接着不全症<sup>18)</sup>、**Fanconi** 貧血<sup>19)</sup>、 $\beta$ -サラセミア<sup>20)</sup>、**X**連鎖慢性肉芽腫症<sup>21)</sup>のモデルマウスへの有効性が報告されている。

### 3 研究目的

白血病発症によって長期間頓挫した SCID-X1 に対する遺伝子治療において、FV ベクターの将来的な臨床応用への可能性を検討することを目的とする。安全性の評価のため、ヒト T 細胞に対する  $\gamma$ c-FV ベクターによる遺伝子挿入部位の解析を行い、有効性の評価のため  $\gamma$ c-FV ベクターを用いたマウス SCID-X1 の遺伝子治療モデルを作成する。

## 4 研究方法

### 4-I FV ベクターの構造とベクターの産生

FV ベクターのプラスミドは以下のように以前報告されている構造を使用した<sup>17, 22, 23</sup>)。LTR 内の強力な転写促進因子である U3 領域を削除し、プロモーターとして UCOE (the ubiquitously acting chromatin-opening element; 遍在性クロマチンオープニングエレメント) が挿入されている。UCOE はヒト HNRPA2B1-CBX3 領域から制限酵素 *BspEI* と *Tth11II* によって単離された。UCOE の下流にヒト  $\gamma$ c (*IL2RG*) または EGFP (enhanced green fluorescent protein) の相補 DNA を組み込んで、FV-IL2RG と FV-EGFP を作成した (図 2A)。

ベクター粒子は、293T 細胞にベクタープラスミドとヘルパープラスミド (pCiGS、pCiPS、pCiES) を FuGENE HD (Roche Applied Science) を用いて遺伝子導入することにより産生した<sup>17</sup>)。培養上清は遺伝子導入の 48 時間後に回収し、90 分間 49,700g の遠心分離によって濃縮した。

$\gamma$ c-RV ベクターはヒト  $\gamma$ c の相補 DNA をプラスミド pMX-IRES-EGFP (コスモバイオ) のマルチクローニングサイトに挿入することによって作成した。ベクター粒子は pMx-IL2RG-IRES-EGFP を広宿主性レトロウイルスパッケージング細胞 (PLAT-A) に fugene HD を用いて遺伝子導入し、導入 48 時間の培養上清として作成した。遺伝子導入

時の培養には 10%FCS (fetal calf serum ;牛胎児血清)を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)培地を用い、5%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養した。

#### 4-II 細胞株

$\gamma$ c 欠損ヒト T 細胞性白血病細胞株である ED40515(-)と、ED40515(-)に  $\gamma$ c を強制発現させた細胞株 ED $\gamma$ -16<sup>24-26</sup>)を用いて実験を行った。これらの細胞株は 10%FCS、100 units/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培地で培養した。

#### 4-III マウス

$\gamma$ c 欠損マウスは以前報告されたものを用いた<sup>27)</sup>。NOD/scid 種由来の  $\gamma$ c 欠損マウス (NOG マウス)は実験動物中央研究所(川崎市)より購入した。いずれのマウスも東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設にて、個別換気のケージで、無菌餌と無菌水を用いた specific pathogen free 管理下に飼育された。すべての動物実験は東北大学動物実験安全専門委員会の承認に基づいて行われた。(承認番号 2011 医動-139)

#### 4-IV ベクター形質導入と骨髄移植



雄の 6 から 8 週齢の  $\gamma c$  欠損マウスの大腿骨、脛骨、骨盤より骨髓を取り出し、ACK(ammonium chloride-potassium)細胞溶解液で溶血処理をした。細胞をリン酸緩衝液(Phosphate Buffered Saline;PBS)で洗浄し、ビオチン標識抗マウス B220 抗体、Ter119 抗体(いずれも BD バイオサイエンスで購入)、Dx-5 抗体、Gr-1 抗体、CD90 抗体(いずれも Biolegend で購入)を結合させ、抗ビオチンマイクロビーズ(Miltenyi Biotech)にて磁気標識し、AutoMACS (Miltenyi Biotech、ドイツ)を用いてlineage マーカー陰性の細胞を純化した。これらの細胞を stem cell factor 50 ng/ml、IL-3 5 ng/mL、IL-6 10 ng/ml、Flt-3 ligand 5 ng/ml(全て和光純薬)を加えた StemSpan 培地(StemCell Technologies)で一晩培養した。その後 CH-296(Retronectin; 宝酒造)でコーティングされたプレート上で、濃縮した FV ベクター培養上清を加えてさらに 16 時間培養した。遺伝子導入された細胞は洗浄後、PBS で懸濁し 120 rad 照射した 6~8 週齢の雌 NOG マウスに 1 匹あたり  $1\sim 3\times 10^6$  個、経静脈的に投与された。移植後 8~12 週後に、これらのマウスから脾臓と末梢血を採取し、解析に用いた。

遺伝子導入効率を調べるために、ウイルスベクター感染後の lineage マーカー陰性の細胞 ( $1\times 10^3$ )を 2mL の Methocult メチルセルロース培地(Stem Cell Technologies)に懸濁し、35mm プレートで 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した。7 日後、コロニー形成単位を顕微鏡下に各々独立して採取した。コロニーを形成している細胞において、EGFP の発現はフローサイトメトリー法で解析し、FV-IL2RG で処理したコロニーについてはポリメラーゼ連

鎖反応(Polymerase Chain Reaction;PCR)法を用いて細胞内に存在する FV の DNA を検出し、解析した。PCR に使用する FV 特異的プライマーとして、  
5'-AATCCTTTACATGGAGAAGTTATAGGTCTT-3' と 、  
5'-TGGCCAAATCCATAGCCTTAGA-3'を用いた。

ED40515(-)細胞の形質導入は、サイトカイン非存在下で骨髓細胞と同様の方法で行った。

#### 4-V 蛍光免疫染色

フローサイトメトリー法による解析のため、採取したマウスの末梢血と脾細胞は ACK 細胞溶解液で溶血処理され、PBS で洗浄後、allophycocyanin (APC)標識抗マウス CD3 モノクローナル抗体(以下、mCD3-APC の形式で記載する)、mCD4-APC、CD8-phycoerythrin(PE)、mNK1.1-PE、mB220-APC、および mIgM-PE で染色した。これらの抗体は BD バイオサイエンスより購入した。また、 $\gamma c$  の発現の解析には、細胞にビオチン標識抗ヒト  $\gamma c$  モノクローナル抗体(eBioscience)を結合させ、PBS で洗浄した後に、APC 標識ストレプトアビジン(eBioscience)で処理した。染色後の細胞はフローサイトメーター FACS CantoII(BD バイオサイエンス)を使用し、FACS Diva software を用いて多重染色解析を行った。

#### 4-VI リン酸化 STAT5 の解析

IL-2 刺激依存的な STAT5 のリン酸化を、過去の報告と同様にウエスタンブロット法で検出した<sup>25)</sup>。具体的には、IL-2 刺激前に、FCSを0.02%まで減らした培地で細胞を12時間、餓餓培養し、その後 IL-2 100ng/mL を加え 15 分間 37°C で刺激し、直ちに細胞溶解バッファーで処理し、タンパク溶解液を作成した。これを SDS-PAGE で電気泳動し、フッ化ポリビニリデン膜上にトランスファーした。3%ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) を含む Tween20 含有 Tris Buffered Saline (TBS-T) でブロッキングした後、一次抗体として抗リン酸化 STAT5 (pY694) 抗体 (Cell Signaling Technology) を結合させた。これに horseradish peroxidase 結合抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体として反応させ、ECL (enhanced chemiluminescence) 検出試薬によって検出した。

#### 4-VII T 細胞増加能と IL-2 産生の解析

脾細胞を、IL-2 存在下あるいは非存在下で、抗 CD3 抗体で刺激し、T 細胞の増殖とサイトカイン産生を解析した。CD3 刺激は、抗 CD3 mAb (モノクローナル抗体、クローン 2C11) を 0.5 µg/mL、10 µg/mL の濃度に希釈し、プレート上に固相化して細胞を培養することにより行った。IL-2 刺激は、100 ng/mL のヒト組み換え IL-2 (PeproTech) を培地に添加して行った。T 細胞増殖は、脾細胞を 48 時間各条件の刺激とともに培養した後、<sup>3</sup>H-チミジンの

取り込みとシンチレーション測定により評価した。この実験において刺激係数を、FV-IL2RG ベクターを感染させた造血幹細胞を移植したマウスの脾細胞の放射活性と FV-EGFP ベクターを感染させた造血幹細胞を移植したマウスの脾細胞の放射活性の比と定義した。サイトカイン産生は、IL-2 は脾細胞を抗 CD3 抗体 48 時間後、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) は 72 時間後に培養上清を回収し、培養上清中の各サイトカイン濃度を OptiEIA ELISA kit (BD バイオサイエンス)を用いて測定した。いずれの実験も triplicate で行った。

#### 4-VIII Linker-mediated PCR

ベクター挿入部位を検出するために、 $\gamma$ c 遺伝子導入 ED40515(-)細胞のゲノム DNA において Linker-mediated PCR を施行した<sup>9, 17)</sup>(図 3)。ゲノム DNA を制限酵素 *MseI* で切断し、断片に *MseI*-Linker (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCCGCTTAAGGGACGAGGCGAATTCCTGAT-3', 5'-PO4-TAGTCCCTTAAGCGGAG-NH2-3')を結合させた。その後、Linker 特異的プライマー 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' と FV-LTR 特異的プライマー 5'-GTCTATGAGGAGCAGGAGTA-3' または RV-LTR 特異的プライマー 5'-TAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTT-3'を用いて PCR を行った。さらに Linker 特異的プライマー 5'-AGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3' と FV-LTR 特異的プライマー 5'-CCTCCTTCCCTGTAATACTC-3' または RV-LTR 特異的プライマー

5'-CTCAATAAAAGAGCCCACAACCCC-3'を用いて、nested PCR を行った。続いて PCR 産物を TOPO cloning kit の pCR2.1 プラスミド (Life technologies Japan) に添付説明書の使用方法に基づいて挿入した。これを熱刺激によりコンピテントセル DH5  $\alpha$  に導入し、形質転換させた。18 時間の培養後、各コロニーを採取し、滅菌水に懸濁した後 pCR2.1 特異的プライマー (kit 添付) で direct colony PCR を行い、ベクター/ゲノム DNA 接合部を増幅させ、シーケンス解析を行った。シーケンス解析には ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。得られたベクター/ゲノム DNA 接合部の塩基配列について、UCSC (University of California, Santa Cruz) genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) の BLAT (Blast Like Alignment Tool) software を使用し、ヒトゲノム上の位置を同定した。ベクター挿入部位から 30kb 以内に存在する遺伝子は the Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology database (<http://atlasgeneticsoncology.org/>) の annotated cancer gene のリストに照会した。

#### 4-IX 統計

遺伝子挿入部位の解析では  $\chi^2$  検定を行い、P 値 < 0.05 未満を有意差ありとした。T 細胞増殖能の解析ではスチューデントの T 検定を行い、P 値 < 0.05 未満を有意差ありとした。

## 5 結果

### 5-I FV ベクターの性能

ヒト $\gamma$ c鎖あるいはEGFPを発現するFVベクターとして、それぞれFV-IL2RGとFV-EGFPを作成した。プロモーターとしてUCOEを用いた(図2A、研究方法Iを参照)。UCOEはメチル化されないCpGアイランドを含みエンハンサー活性を有さないことが知られている。

FV-IL2RGベクターによって発現した $\gamma$ cの機能を評価するために、 $\gamma$ c欠損ヒトT細胞株であるED40515(-)にベクターを感染させた。フローサイトメトリー解析で細胞膜上の $\gamma$ cの発現を確認した(図2B)。ウエスタンブロット解析では、発現した $\gamma$ cを通じた細胞内シグナル伝達として、IL-2刺激依存的なStat5のリン酸化を確認した(図2C)。これらの結果から、ヒトT細胞株においてFVベクターによる $\gamma$ cの遺伝子導入と機能的なタンパク発現が可能であることが示された。

### 5-II ヒトT細胞株におけるウイルスベクター挿入部位の解析

ウイルスベクターのゲノム上の挿入部位の特性を解析するために、 $\gamma$ cを発現するFVベクターとRVベクターをそれぞれED40515(-)細胞に感染させ、標準的なLinker-mediated PCR法を用いてベクター挿入部位を同定した。Linker-mediated PCR法の概略を図3に

示す。FV ベクターと RV ベクターのそれぞれ独立した 100 ヶ所の挿入部位を同定し、図 4A にベクター挿入部位に関する解析結果を示す。挿入部位が遺伝子内であった頻度は FV36%に対して、RV42%であった。しかし、遺伝子転写開始部位の直接上流または下流に位置する頻度は、FV ベクターは 13%、一方 RV ベクターは 25%と、FV ベクターが有意に低かった ( $p=0.031$ )。挿入部位のより詳細な解析では、過去の報告に類似して<sup>16, 17, 28)</sup>、FV ベクターは RV ベクターと比較して、転写開始部位の近傍に挿入される頻度が少ない傾向があった(図 4B)。続いて、ベクター挿入部位から 30kb 以内に存在するがん関連遺伝子について検討した。100 ヶ所の FV ベクター挿入部位のうち、1 ヶ所において癌関連遺伝子である TCF12 の遺伝子内への挿入が見つかった。TCF12 は細胞増殖の負の制御因子として知られている。一方 RV ベクターは 100 ヶ所の挿入部位のうち、3ヶ所において癌関連遺伝子、Klf5、NUMB、および FHIT の遺伝子内または近傍への挿入が認められた。この 3 遺伝子はいずれも白血病の発症や進行に関わると報告されている。

これらの結果から、FV ベクターは従来の RV ベクターよりも挿入変異の危険性が低い可能性が示唆された。

### 5-III FV ベクターによる遺伝子治療後の T 細胞再構築

$\gamma c$  を発現する FV ベクターの遺伝子治療における有効性を検討するために、造血幹細胞移植の実験を行った。 $\gamma c$  欠損マウス骨髄由来の lineage マーカー陰性の細胞に

FV-IL2RG または FV-EGFP のいずれかを遺伝子導入した。感染効率はいずれも 33% から 40% の範囲であった。続いて FV ベクターを感染させた細胞を、 $\gamma$  線照射した NOG マウスに経静脈的に移植した。C57BL/6 背景の  $\gamma$ c 欠損マウスは、週齢が進むと非機能性の CD3 陽性 CD4 陽性細胞が出現することが知られているため、これらの細胞が出現しない NOD/scid 背景の  $\gamma$ c 欠損マウスである NOG マウスを recipient に用いた。移植から 8 週間後、FV-IL2RG で遺伝子導入した細胞を移植したマウスの末梢血において T 細胞が出現した (データ提示せず)。フローサイトメトリー法による解析により、末梢血 CD8 陽性 T 細胞上に  $\gamma$ c の発現が認められた (図 5A)。CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞は、FV-IL2RG で遺伝子導入した細胞を移植したマウスの脾臓で再構築を認め、一方 FV-EGFP で遺伝子導入した細胞を移植したマウスの脾臓では検出されなかった。また、FV-IL2RG で遺伝子導入した細胞を移植したマウスでは、脾臓に B220 陽性 IgM 陽性 B 細胞の再構築も観察されたが、NK 細胞は認められなかった (図 5B)。これらの結果は、FV-IL2RG の遺伝子導入により、 $\gamma$ c 鎖欠損造血幹細胞が B 細胞と T 細胞への分化能を獲得したことを示している。

図 6A に、抗 CD3 モノクローナル抗体刺激に対するマウス脾細胞の増殖反応を示す。

FV-IL2RG で遺伝子導入した細胞を移植したマウスの脾細胞は抗 CD3 抗体による刺激によって増殖したが、FV-EGFP で処理した群では増殖は認められなかった (図 6A 左)。同様に、IL-2 刺激の実験では、FV-IL2RG で処理した群において脾細胞の有意な増殖が認められた (図 6A 右)。次に、抗 CD3 モノクローナル抗体刺激に対する脾細胞の IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生を検討した。FV-EGFP で処理した群の脾細胞培養上清では IL-2、IFN- $\gamma$  ともに検出で



きなかったが、FV-IL2RG で処理した群の脾細胞の培養上清では、IL-2、IFN- $\gamma$  がそれぞれ検出された(図 6B)。

これらの結果をまとめると、FV ベクターによる  $\gamma$ c 遺伝子導入は *in vivo* において T 細胞の分化と機能の再構築を可能にすることが示された。

## 6 考察

ウイルスベクターに起因する挿入変異は、SCID-X1 の遺伝子治療上、最大の問題である。私はこの問題に取り組むため  $\gamma c$  を導入する FV ベクターを作成し、ベクター挿入変異の解析と、*in vivo* における T 細胞、B 細胞および NK 細胞の再構築の評価を行った。この実験では、FV ベクターは従来の RV ベクターに比較し、遺伝子転写開始部位の近傍への挿入頻度が有意に低いという結果が得られ、これは、FV がベクターに起因する挿入変異の危険性が低いことを示唆している。さらに、FV ベクターで  $\gamma c$  鎖を遺伝子導入された  $\gamma c$  鎖欠損造血幹細胞を  $\gamma c$  欠損マウスに移植すると、T 細胞と B 細胞の再構築できることを示した。本論文は FV ベクターを用いて SCID-X1 の遺伝子治療のマウスモデルを作成した最初の報告である。

古典的な RV ベクターを用いた SCID-X1 の過去の遺伝子治療では、その合併症として高頻度に白血病が発症した<sup>29, 30)</sup>。これは、RV ベクターが遺伝子内あるいはその近傍に挿入されやすい性質を有するために、遺伝子治療用の RV ベクターが癌原遺伝子の近傍に挿入され、その結果、不適切に活性化された癌原遺伝子が細胞を白血病化したためであると考えられている。正常ヒト造血幹細胞を用いた FV ベクターによる遺伝子挿入部位解析の実験が過去に行われ、FV ベクターの高い遺伝子導入比率と、RV ベクターに比べてよりランダムに遺伝子挿入が起こったことが報告されている<sup>16)</sup>。本実験ではヒト  $\gamma c$  欠損細胞を用いる目的で、 $\gamma c$  欠損 T 細胞株を使用した。本研究の結果は、これまでの報告と同様に、FV

ベクターが RV ベクターよりもよりランダムにゲノムに挿入する傾向があり、遺伝子転写開始部位の近傍への挿入が有意に低いことを示した(図 4A、4B)。コンピュータでランダムな遺伝子挿入をサンプリングした解析では、遺伝子挿入が無作為に行われたと仮定した場合、遺伝子内に挿入する比率が 37.3%であり、遺伝子転写開始部位から 10kb 以内に挿入する比率が 14.2%、癌原遺伝子内に挿入する比率が 2.4%であると解析した報告があり<sup>28)</sup>、これと比較し FV ベクターの挿入部位は同程度であった。RV ベクターの遺伝子挿入はこのランダムな遺伝子挿入と比較すると、遺伝子転写開始部位から約 15kb 以内の位置で有意に多くなることが知られており<sup>16)</sup>、本実験においては RV ベクターとの比較を目的に転写開始部位から 15kb に設定した。図 4 において解析範囲を癌関連遺伝子から 30kb に設定した理由は、過去の SCID-X1 の遺伝子治療で生じた白血病において、癌原遺伝子 LMO2 の 30kb 以内に RV ベクターの遺伝子挿入が集中していたことによる。また、癌関連遺伝子への挿入解析においては、RV ベクターでは挿入部位が 3 カ所(Klf5、NUMB および FHIT)であったが、FV ベクターでは 1 カ所(TCF12)であった。さらに、Klf5、NUMB および FHIT はいずれも白血病発症や進行に関わると報告されているの<sup>31-33)</sup>に対し、TCF12 と白血病発症の関連は現在まで報告されていない。これまで FV 感染による疾患発症は報告されておらず、イヌやヒト以外の霊長類を用いた FV ベクターの遺伝子治療モデルにおいても白血病発症は認めず、ベクターに由来すると考えられる合併症を認めなかった<sup>34)</sup>。本研究の結果は FV ベクターがヒトに対して非病原性であるという定説に矛盾せず、従来の RV ベクターよりも安全性が高い可能性を示唆している。また、本研究で用いた改変 FV ベクターは LTR

内の強力な転写促進因子である U3 領域を削除してあり、転写開始部位近傍に挿入した場合においてもその遺伝子を活性化する可能性が低く、従来の RV ベクターよりも癌化のリスクが低いであろうと考えられる。

SCID-X1 遺伝子治療の主要な目的は、T 細胞、B 細胞および NK 細胞の再構築である。しかし、FV-IL2RG を用いた実験では、4 ヶ月の経過観察後も NK 細胞の再構築が認められなかった(図5B、データ提示せず)。この NK 細胞再構築不全の原因として、ヒト  $\gamma$ c 鎖がマウス内では機能が不完全であったためである可能性が考えられる。私の結果と同様に、ヒト  $\gamma$ c 鎖を用いた過去のマウス SCID-X1 遺伝子治療モデルにおいても NK 細胞の再構築不全が報告されている<sup>35)</sup>。一方、マウス  $\gamma$ c 鎖を用いた遺伝子治療モデルでは、2 ヶ月以内に NK 細胞の再構築が認められている<sup>36-38)</sup>。NK 細胞の分化には IL-15 が、T 細胞と B 細胞の分化には IL-7 を要するが、いずれのサイトカイン受容体も  $\gamma$ c サブユニットを共有している<sup>39)</sup>。すなわち、T 細胞と B 細胞の分化回復から、ヒト  $\gamma$ c 鎖はマウス IL-7 受容体のサブユニットとして機能すると考えられるが、NK 細胞再構築不全はヒト  $\gamma$ c 鎖とマウス  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖から構成される IL-15 キメラ受容体の機能が不十分である可能性を示すのかも知れない。実際に、私の知る限り、ヒト  $\gamma$ c 鎖とマウス  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖にマウス IL-15 が結合しうることを証明した報告は存在しない。従って、本研究で NK 細胞の再構築の障害は、FV ベクターの使用が原因ではなく、ヒト  $\gamma$ c 鎖を使用したことに起因する可能性が高いと考えられる。

最近、FV ベクターを用いた Wiskott–Aldrich 症候群の遺伝子治療モデルが報告された<sup>17)</sup>。SCID-X1 と同様に Wiskott–Aldrich 症候群の遺伝子治療においても T 細胞の増殖と

機能的な再構築が必須である。この報告では FV ベクターの感染効率は約 50%であり、12 ヶ月以上遺伝子導入 T 細胞の発現が確認された。本実験や Wiskott–Aldrich 症候群モデルの実験から、FV ベクターを用いた遺伝子治療は T 細胞性の免疫不全症の治療に効果的であると考えられる。さらに、FV ベクターは赤血球や顆粒球の先天性障害における遺伝子修復のマウスモデルでも効果的であると報告されている<sup>18-21)</sup>。宿主の幅が広く、また造血幹細胞への遺伝子導入が可能であることから、FV ベクターは多様な血液疾患の遺伝子治療に応用できる可能性が示唆される。

過去 10 年間に於いて、SCID-X1 の遺伝子治療に伴う問題を克服するために種々の改変 RV ベクターが開発され続けている。しかし、安全性においてどのベクターが最も適切であるかについては未だ議論の余地を残している。FV ベクターは造血幹細胞の遺伝子修復における効果を高め、遺伝子毒性を減少させる可能性を秘めている。克服すべき課題は安定した感染効率の高さを維持すること、より長期的な合併症の有無を観察していくことがあげられる。また、ヒト SCID-X1 患者の造血幹細胞に対して FV ベクターを用いて  $\gamma c$  を導入し、ヒト化マウス等で遺伝子治療の効果を評価できれば、より臨床に近いモデルになると考えられる。さらなる研究が必要であるが、本研究の結果は将来の SCID-X1 の遺伝子治療における FV ベクターの臨床応用への可能性を支持するものである。

## 7 結論

ヒト  $\gamma c$  鎖を遺伝子導入する FV ベクターを作成し、挿入変異の解析と、*in vivo*における T 細胞、B 細胞、NK 細胞の再構築の評価を行った。FV ベクターは従来の RV ベクターに比較し、遺伝子転写開始部位の近傍への挿入頻度が有意に低いことを示した。次に FV ベクターで  $\gamma c$  鎖欠損マウス由来の造血幹細胞に遺伝子導入を行い、マウス遺伝子治療モデルを作成し T 細胞と B 細胞の再構築を確認した。FV ベクターは SCID-X1 の遺伝子治療に有効であり、ベクター挿入変異を減少させる可能性を秘めている。

## 8 文献

1. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:179-205.
2. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1999;340(7):508-16.
3. Haddad E, Landais P, Friedrich W, et al. Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood.* 1998;91(10):3646-53.
4. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288(5466):669-72.
5. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev.* 2005;203:98-109.
6. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated

clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302(5644):415-9.

7. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3132-42.

8. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3143-50.

9. Wu X, Li Y, Crise B, et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 2003;300(5626):1749-51.

10. Hill CL, Bieniasz PD, McClure MO. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol*. 1999;80 ( Pt 8):2003-9.

11. Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. *J Virol*. 1996;70(1):217-22.

12. Heinkelein M, Dressler M, Jarmy G, et al. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol*. 2002;76(8):3774-83.

13. Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, et al. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood*. 2001;98(3):604-9.



14. Josephson NC, Trobridge G, Russell DW. Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum Gene Ther.* 2004;15(1):87-92.
15. Leurs C, Jansen M, Pollok KE, et al. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther.* 2003;14(6):509-19.
16. Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1498-503.
17. Uchiyama T, Adriani M, Jagadeesh GJ, et al. Foamy virus vector-mediated gene correction of a mouse model of Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Ther.* 2012;20(6):1270-9.
18. Bauer TR, Jr., Allen JM, Hai M, et al. Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med.* 2008;14(1):93-7.
19. Si Y, Pulliam AC, Linka Y, et al. Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of *Fancc*<sup>-/-</sup> stem cells. *Blood.* 2008;112(12):4458-65.
20. Morianos I, Siapati EK, Pongas G, et al. Comparative analysis of FV vectors with human alpha- or beta-globin gene regulatory elements for the

correction of beta-thalassemia. *Gene Ther.* 2012;19(3):303-11.

21. Chatziandreu I, Siapati EK, Vassilopoulos G. Genetic correction of X-linked chronic granulomatous disease with novel foamy virus vectors. *Exp Hematol.* 2011;39(6):643-52.

22. Trobridge G, Josephson N, Vassilopoulos G, et al. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther.* 2002;6(3):321-8.

23. Zhang F, Thornhill SI, Howe SJ, et al. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood.* 2007;110(5):1448-57.

24. Ishii N, Asao H, Kimura Y, et al. Impairment of ligand binding and growth signaling of mutant IL-2 receptor gamma-chains in patients with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1994;153(3):1310-7.

25. Asao H, Okuyama C, Kumaki S, et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol.* 2001;167(1):1-5.

26. Kumaki S, Ishii N, Minegishi M, et al. Functional role of interleukin-4 (IL-4) and IL-7 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood.* 1999;93(2):607-12.

27. Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, et al. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*. 1996;87(3):956-67.
28. Beard BC, Keyser KA, Trobridge GD, et al. Unique integration profiles in a canine model of long-term repopulating cells transduced with gammaretrovirus, lentivirus, or foamy virus. *Hum Gene Ther*. 2007;18(5):423-34.
29. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol*. 2010;11(6):457-60.
30. Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*. 2007;117(6):1456-65.
31. Zhu N, Gu L, Findley HW, et al. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *J Biol Chem*. 2006;281(21):14711-8.
32. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature*. 2010;466(7307):765-8.
33. Stam RW, den Boer ML, Passier MM, et al. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2006;20(2):264-71.
34. Trobridge GD, Horn PA, Beard BC, et al. Large animal models for foamy

virus vector gene therapy. *Viruses*. 2012;4(12):3572-88.

35. Huston MW, van Til NP, Visser TP, et al. Correction of murine SCID-X1 by lentiviral gene therapy using a codon-optimized IL2RG gene and minimal pretransplant conditioning. *Mol Ther*. 2011;19(10):1867-77.

36. Otsu M, Sugamura K, Candotti F. In vivo competitive studies between normal and common gamma chain-defective bone marrow cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2000;11(14):2051-6.

37. Otsu M, Sugamura K, Candotti F. Lack of dominant-negative effects of a truncated gamma(c) on retroviral-mediated gene correction of immunodeficient mice. *Blood*. 2001;97(6):1618-24.

38. Kume A, Koremoto M, Mizukami H, et al. Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(2):113-8.

## 9 図の説明

図 1  $\gamma_c$  を共有するサイトカイン受容体。 $\gamma_c$  はリンパ球の分化、増殖に不可欠である。

図 2 FV ベクターの構造と *in vitro* の機能。(A) FV ベクターの構造。UCOE631 プロモーターはヒト HNRPA2B1-CBX3 領域から取り出し、FV ベクターに組み込まれた。(B) FV ベクターによって形質移入された ED40515(-)細胞の細胞表面  $\gamma_c$  の発現。(C) IL-2 刺激による STAT5 のリン酸化。ED40515(-)細胞、ED $\gamma$ -16 細胞、ED40515(-)に FV ベクターで  $\gamma_c$  を遺伝子移入した細胞を IL-2 で 30 分間刺激し、リン酸化 STAT5 モノクローナル抗体で検出した。

図 3 Linker-mediated PCR 法。FV または RV ベクターの挿入部位を同定するため、(i) ~ (iv)の手順で操作した。

図 4 形質移入された ED40515(-)細胞のベクター挿入部位の解析。(A)FV または RV ベクターの挿入部位。遺伝子転写開始部位から 15kb 以内に存在する頻度、遺伝子内に存在する頻度、癌関連遺伝子から 30kb 以内に存在する頻度をそれぞれ示した。\* $p < 0.05$ 。(B) FV または RV ベクターの挿入部位と RefSeq データベース上の遺伝子転写開始部位との位置関係。

図 5 *in vivo* における T 細胞、B 細胞の再構成。(A) FV-IL2RG で遺伝子導入された造血幹細胞を移植した NOG マウスの末梢血 CD8 陽性細胞表面上の  $\gamma c$  発現。(B) FV-IL2RG および FV-EGFP を感染した造血幹細胞を移植した  $\gamma c$  欠損マウスの脾臓リンパ球分画のフローサイトメトリー解析。下段は T 細胞、B 細胞および NK 細胞の絶対数。N.D. は検出できなかったことを示す。\* $p < 0.05$ 。1 群あたり 4 匹のマウスを用いて、平均値  $\pm$  標準偏差で表示した。

図 6 *in vivo* で再構成した T 細胞の機能。(A) レシピエントマウスの脾細胞の刺激反応性の増殖。脾細胞を各濃度の抗 CD3 mAb で刺激した。左図は IL-2 刺激なし、右図は 1nM の IL-2 で刺激。刺激係数は FV-IL2RG レシピエントマウス脾細胞の  $^3\text{H}$ -チミジン取り込みの値と FV-EGFP の値の比。1 群あたり 4 または 5 匹のマウスを用いて、刺激係数の平均  $\pm$  標準偏差で表した。\* $p < 0.05$ 。\*\* $p < 0.01$ 。(B) レシピエントマウスの T 細胞によるサイトカイン産生。脾細胞を 10ng/mL の抗 CD3 mAb で刺激し、48 時間 (IL-2) および 72 時間 (IFN- $\gamma$ ) 培養し、その上清中の各サイトカインを測定した。1 群あたり 4 または 5 匹のマウスを用いて、サイトカイン濃度の平均  $\pm$  標準偏差で表した。

图1

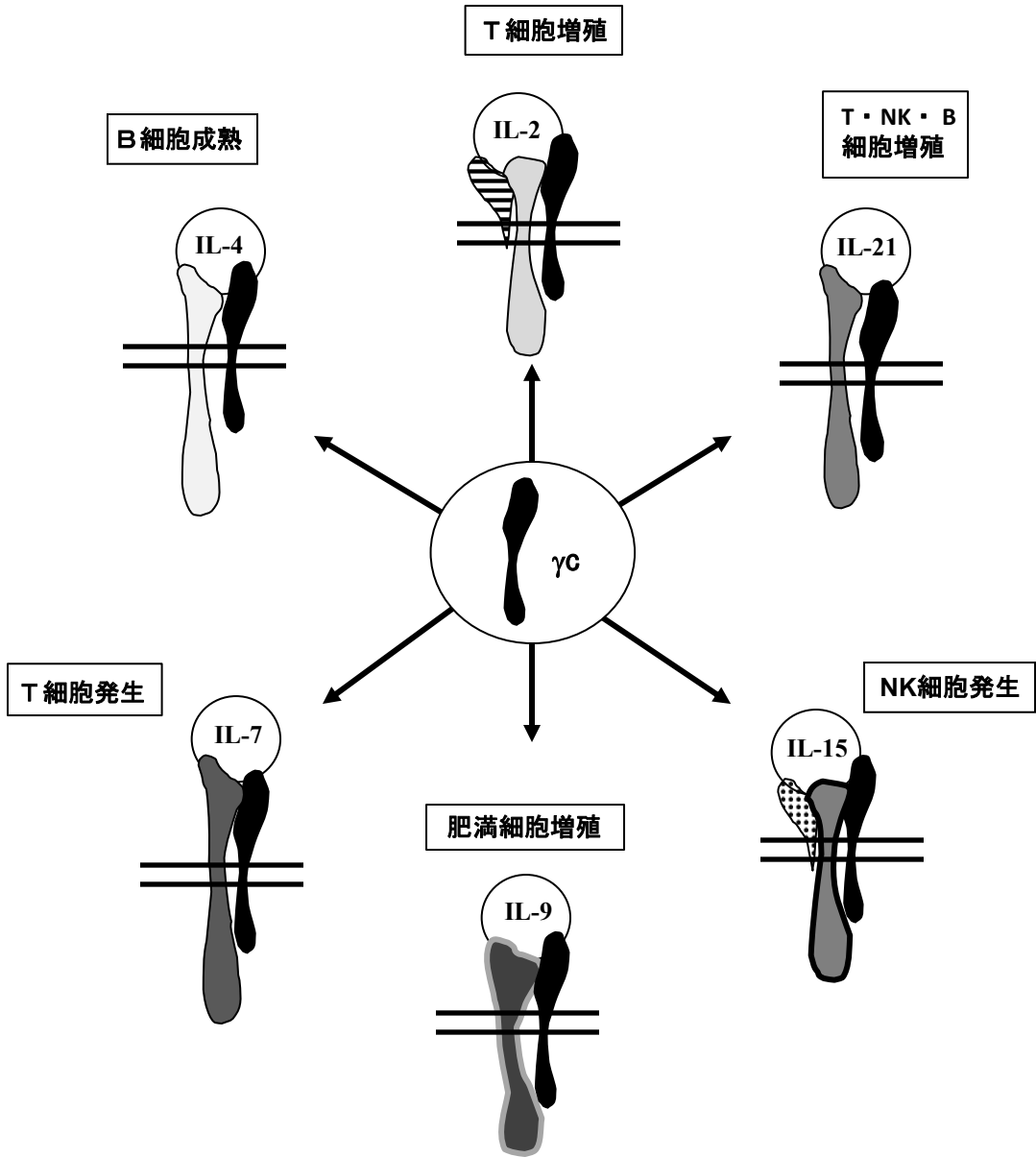
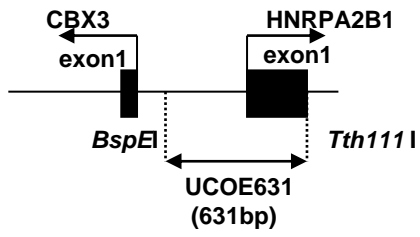
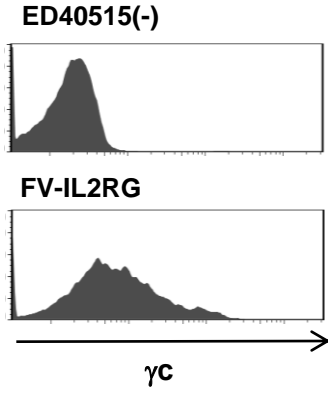


图 2

(A)



(B)



(C)

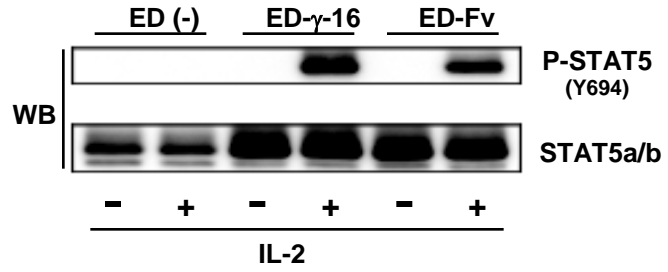
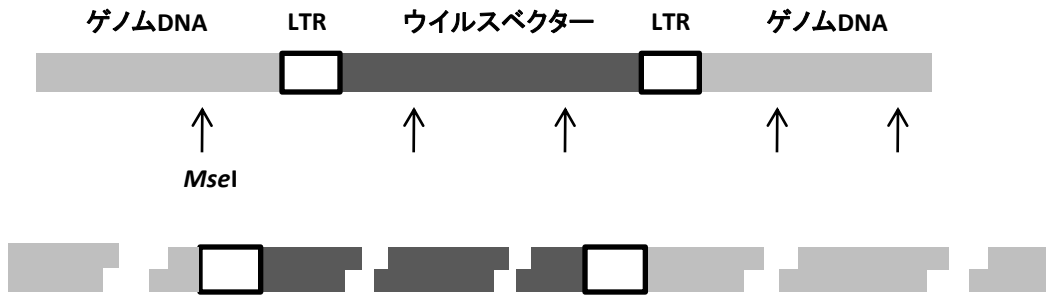


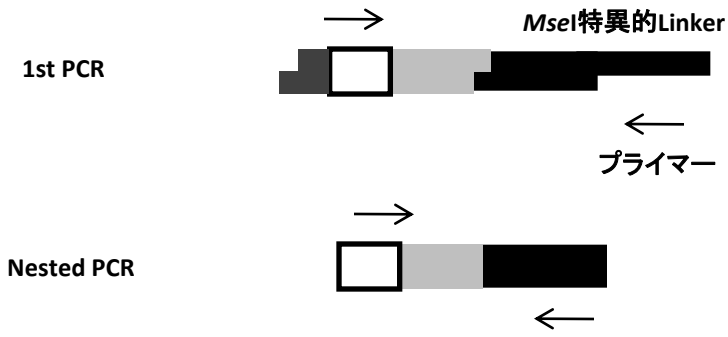


図3

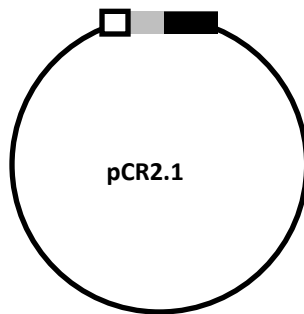
( i ) DNA切断



( ii ) *Mse*I特異的Linker結合、PCR



( iii ) TOPO pCR2.1ベクターに挿入  
コンピテントセルに導入して形質転換



( iv ) コロニーを採取して塩基配列解析

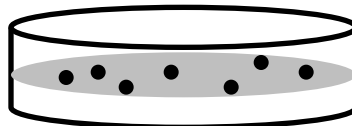
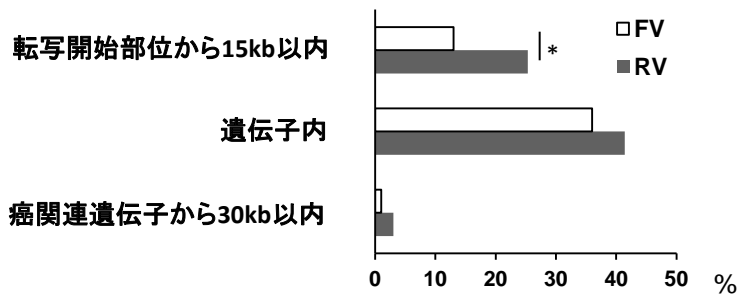


図 4

(A)



(B)

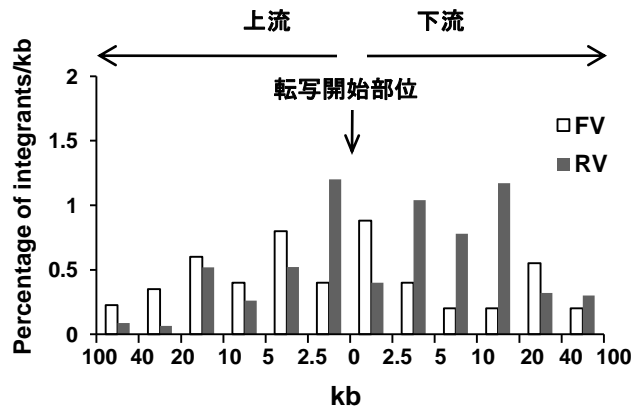
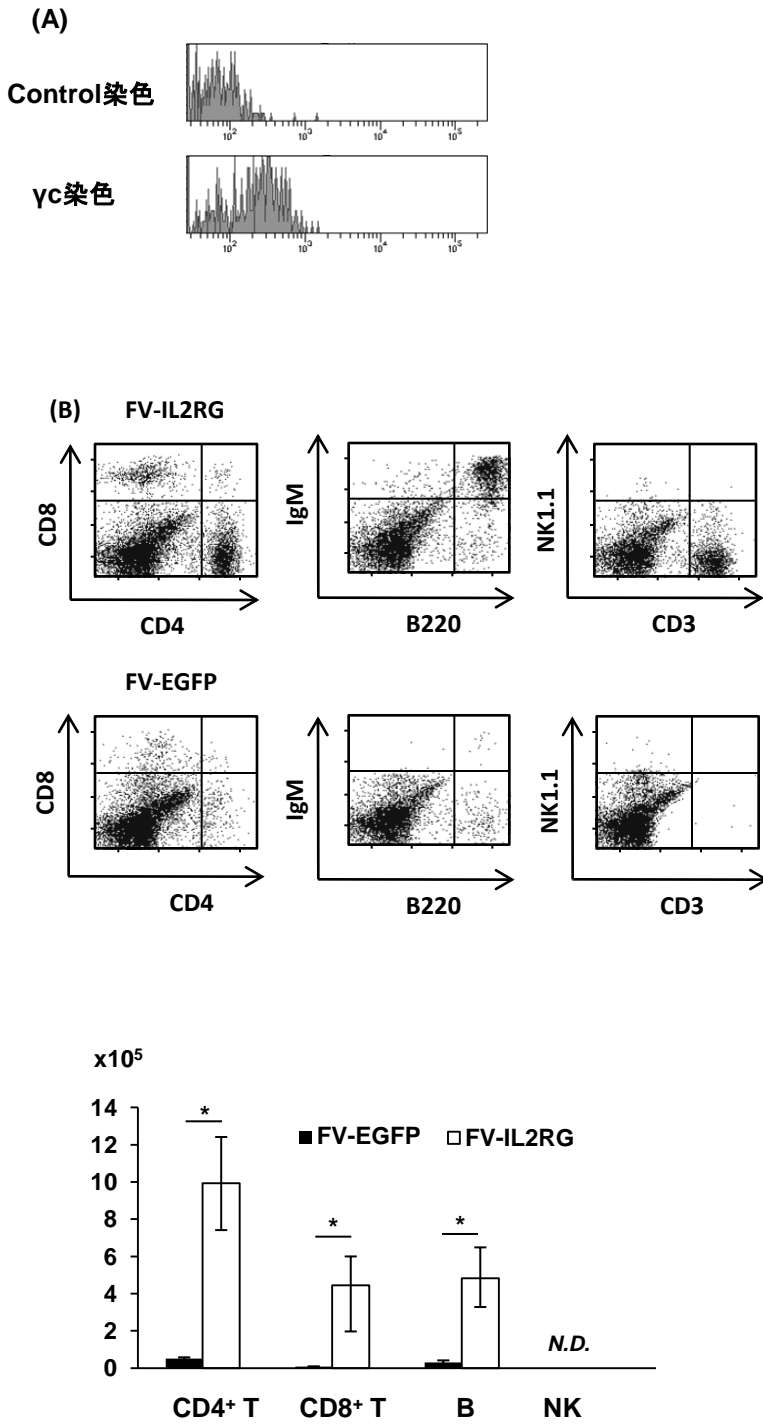
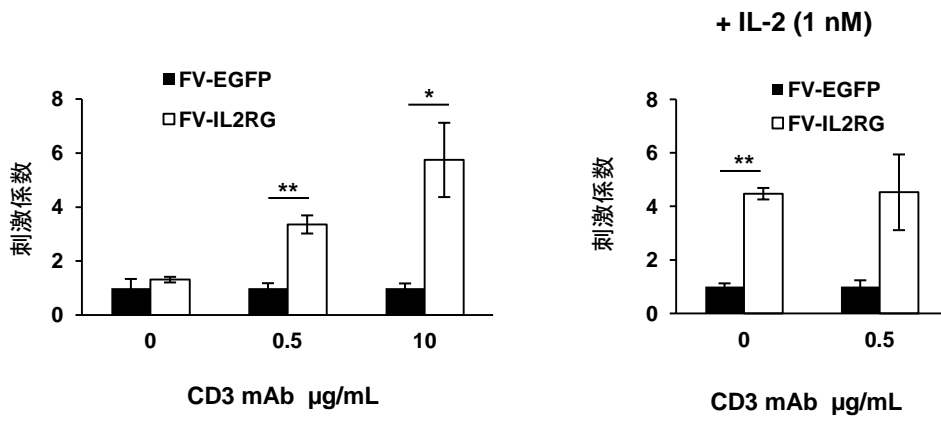


图 5



(A)



(B)

