

造血幹細胞への遺伝子導入

久米 晃 啓・小澤 敬 也

(自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部)

I. はじめに

造血幹細胞への遺伝子導入には、オンコウイルスの Maus 白血病ウイルスをベースとしたレトロウイルスベクターを用いるのが一般的である。アデノウイルスベクターは血球系への遺伝子導入効率が低く、また、一部の細胞に導入されたとしても、標的細胞内でエピソームとして存在することから細胞増殖とともに次第に失われていき、遺伝子発現は一過性である。また、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの場合も造血幹細胞への遺伝子導入効率は低く、遺伝子の組込み効率も低い。ここではレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入法について概説する。

II. 造血幹細胞への遺伝子導入：総論

多能性造血幹細胞 (multipotential hematopoietic stem cell) は、自己複製能 (self-renewal capacity) を有するとともに、すべての成熟血球 (赤血球・顆粒球・単球/マクロファージ・血小板・リンパ球) に分化しうる多分化能 (multipotentiality) をもつ。すなわち、造血幹細胞は終末分化していく一方で、自己複製により造血系の維持を図っているわけである。したがって、造血幹細胞のゲノムに治療用遺伝子を組込ませることができれば、遺伝子治療の永続的な効果を期待することができる。

造血幹細胞への遺伝子導入効率は現在でも満足すべきレベルに到達していないのが実情であるが、その理由の一つとして造血幹細胞の性質を挙げることができる。生体の中ではすべての造血幹細胞が常時働いているわけではなく、その中の一部のみが時折活性化され成熟血球を

供給していると考えられている。すなわち、定常状態では造血幹細胞プールの大部分は細胞周期の静止期 (G_0 期) にあり、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が低いことの原因となっている (従来のオンコウイルス由来のレトロウイルスベクターでは非分裂細胞への遺伝子導入ができない)。

また、マウスに比べて霊長類の方が、造血幹細胞への遺伝子導入効率が低いことが知られている。レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合、ウイルスエンベロープの標的細胞上のレセプターへの結合が最初のステップとなるため、エンベロープの種類により遺伝子導入可能な細胞種が規定される。すなわち、齧歯類のみに感染するエコトロピックウイルス (ecotropic virus) と、齧歯類以外にヒトを含めた様々な種の細胞にも感染することが可能なアンフォトロピックウイルス (amphotropic virus) があり、それぞれのレトロウイルスベクター作製用のパッケージング細胞株が作られている。レセプター自体の解析も進んでおり、エコトロピックウイルスの場合は塩基性アミノ酸のトランスポーターであり、アンフォトロピックウイルスのレセプター (ラットでは Ram-1 [1], ヒトでは Glvr-2 [2]) はリン酸のトランスポーターであることが判明している [3]。なお、サル (gibbon ape leukemia virus) のレセプターは Glvr-1 で、やはりリン酸のトランスポーターである [3]。造血幹細胞では、このアンフォトロピックウイルスのレセプターの発現レベルが低いと報告されており [4]、このことが霊長類の造血幹細胞への遺伝子導入効率が低いことと関連しているものと考えられている。

Ⅲ. 造血幹細胞のソース

マウスの骨髄細胞を用いて実験する場合は、

予め 5-FU (5-fluorouracil) を投与することが多い。この処理により未分化細胞の濃縮と細胞周期への導入を行うことができる。具体的には、

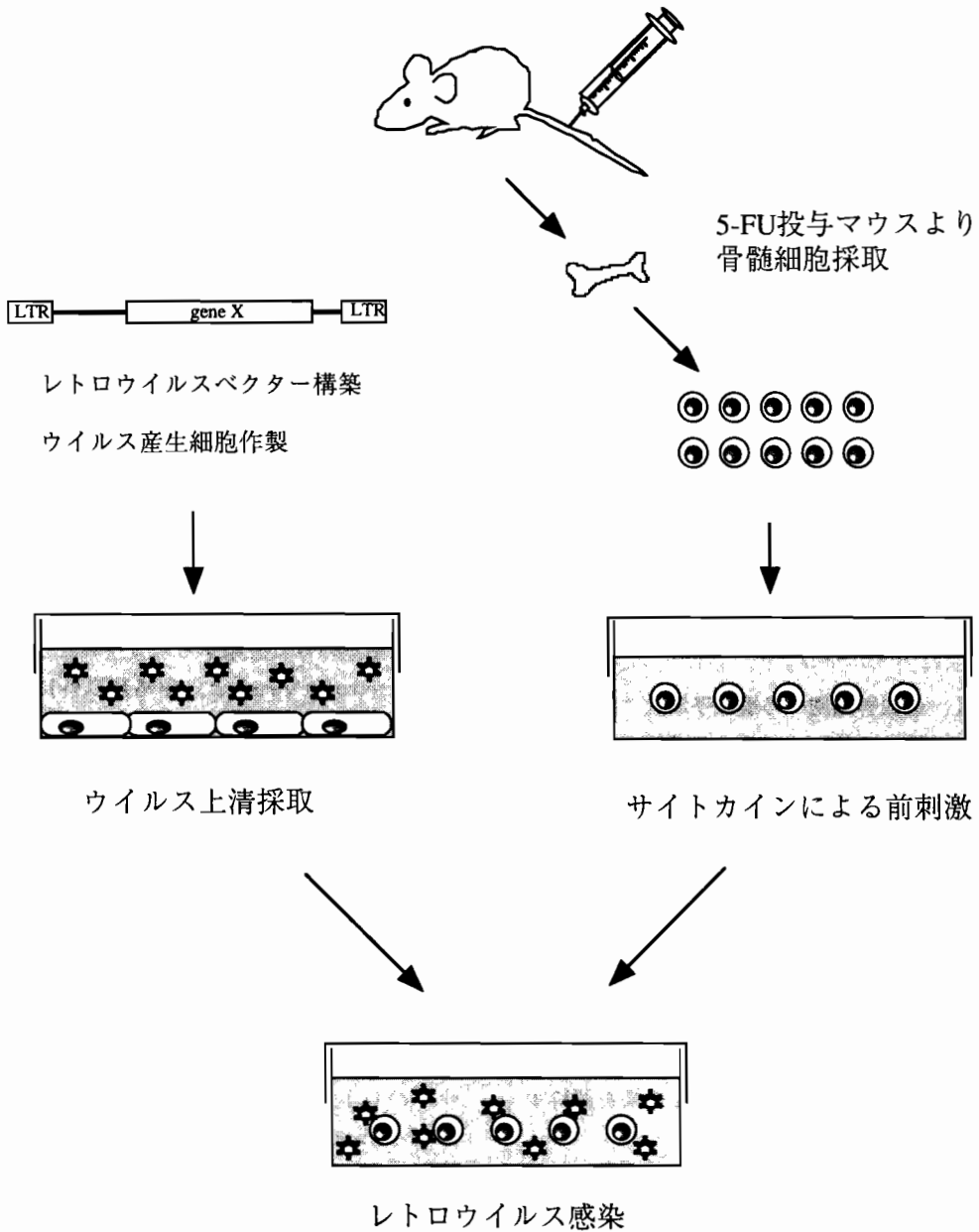


図1. レトロウイルスベクターによるマウス骨髄細胞への遺伝子導入。ウイルス上清を用いた *in vitro* 感染プロトコルを示す。目的遺伝子 (gene X) を発現するように構築したベクターをパッケージング細胞に導入してウイルス産生細胞を作製し、ウイルス上清を得る。5-FU 投与マウスより骨髄低密度単核細胞を採取し、サイトカインで前刺激した後、ウイルス上清中で培養して感染を行う。

6～8週齢のマウスに150 mg/kgの5-FUを腹腔内投与して48時間後に屠殺し、大腿骨・脛骨から骨髓細胞を採取する。無菌的に骨を取り出して両側の骨端を切り、22～23 G 針を付けたシリンジを使ってメディアウムで骨髓を押し出すようにして集める。骨髓液はナイロンメッシュ(筆者らは300メッシュ)を通して骨片や凝血塊を除き、比重遠心法(Lympholyte-M等に重層して室温にて1500 rpm×30 min 遠心)により低密度単核細胞を採取する。C57BL/6 マウスの場合、未処置では1匹あたり $1\sim 2\times 10^7$ 個の細胞が得られるが、5-FU投与により分裂中の細胞が死ぬため、得られる細胞数は $1\sim 2\times 10^6$ 個程度に減少する。さらにこれらの細胞を分裂サイクルに入れて遺伝子導入効率を上げるため、通常サイトカイン(SCF: stem cell factor, IL-3: interleukin-3, IL-6, FL: Flk 2/Flt 3 ligand, TPO: thrombopoietinなどを適宜組み合わせる)により48時間ほど前刺激してからレトロウイルスの感染操作を行う(図1)。

ヒトの造血幹細胞のソースとしては、骨髓、臍帯血、末梢血が利用されている。前二者の場合は、そのまま十分な数の造血幹細胞が含まれているが、末梢血から造血幹細胞を採取する場合には、予めG-CSF(顆粒球コロニー刺激因子, granulocyte colony-stimulating factor)を数日間投与することにより造血幹細胞の末梢血への動員を図る。また、造血幹細胞をある程度濃縮しておいた方が、大量のベクターを必要とせず、遺伝子導入効率も高くなることが報告されている。現在提出されている臨床プロトコールでは、G-CSF投与後の末梢血CD34陽性細胞分画を用いることが多い。

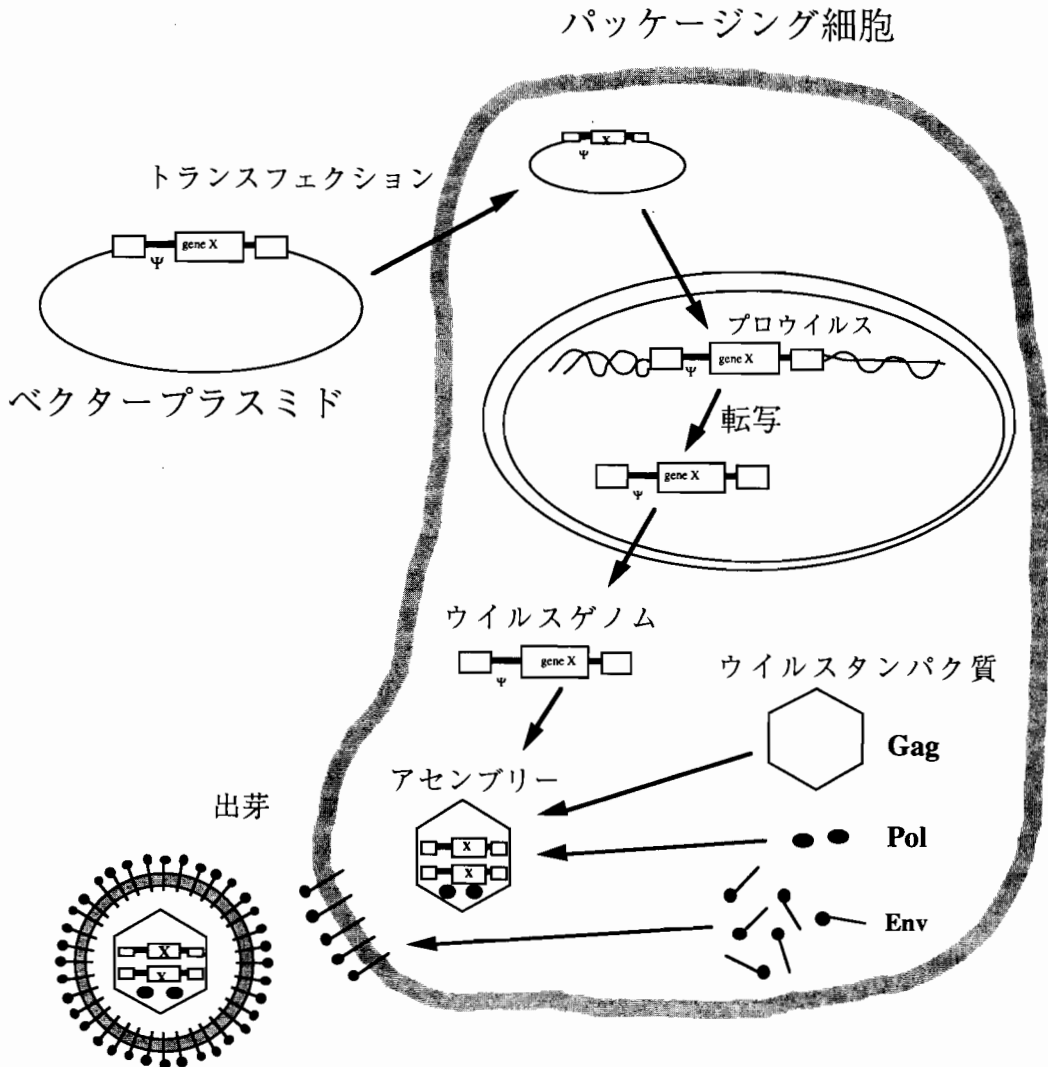
IV. レトロウイルスベクターの作製と遺伝子導入[5,6]

レトロウイルスベクターを作製するには、まずウイルスゲノムのLTR(long terminal repeat)の間のgag(構造タンパク質)、pol(逆転写酵素)、env(エンベロープタンパク質)の大部分を取り除き、代わりに目的の遺伝子を挿入した

ベクタープラスミドを構築する(パッケージングシグナル配列=Ψは残す)。なお、LTRの部分にはプロモーターとしての活性や宿主細胞の染色体DNAへの組込みに必要な塩基配列が存在する。つぎに、このベクタープラスミドをウイルスタンパク質(gag, pol, env)を発現するように作ったパッケージング細胞株に導入すると、培養上清中にレトロウイルスベクターが産生されるようになる(図2)。

レトロウイルスベクターの骨格としては、MMLV(Moloney murine leukemia virus)のLTRとパッケージングシグナルを用いたものが多く、代表的なものとしてMFGやLXSNがある。しかし、宿主染色体に組込まれたMMLVのLTRプロモーターはメチル化などによりsilencingを受ける場合があり、またMMLV骨格の中には遺伝子発現を抑制するシスエレメントが複数存在する。そこでより良い発現を得るため、MPSV(myeloproliferative sarcoma virus)とMMLVとのハイブリッドLTRをもち、その他の部分にも改変を加えたベクター(MSCV, MNDなど)が開発された。導入遺伝子の発現方式については、LTRのプロモーターをそのまま利用するような構築にしたものと内部プロモーターを用いる場合があるが、前者の方が遺伝子発現効率が一般に良好である。

ベクタープラスミドに挿入する遺伝子については、単一のものを用いることもあるが、治療用遺伝子と選択マーカー遺伝子の2種類を用いることも多い(図3)。その場合、スプライシングを利用して一つの転写ユニットから二つの蛋白質を発現させる方法や、LTRのプロモーターと別に内部プロモーターを用いて転写ユニットを二つにする方法が従来とられてきた。しかしながら、いずれの場合も二種類の蛋白質をバランス良く発現させることは困難である。最近では、IRES(internal ribosome entry site)を利用することにより、一つの転写産物から二つの蛋白質を確実に発現させるdicistronic typeのベクターを利用することが多くなっている[7]。ただし、IRES依存性の翻訳レベルは、cap依



組換えレトロウイルス

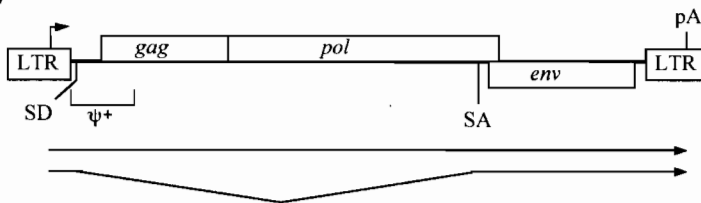
図2. 組換えレトロウイルス産生株の作製. パッケージング細胞(ウイルスタンパク質を高発現している)をベクタープラスミドでトランスフェクトし、ベクターをゲノムにもつ組換えレトロウイルスを得る.

存性のものに比べるとかなり低くなる(数分の一から十分の一). なお, 選択マーカー遺伝子としては, 従来薬剤耐性遺伝子を用いるのが一般的であったが, 最近は細胞表面マーカーの遺伝子を利用する研究も進んでいる[8,9]. いずれにせよ, ベクターに挿入する目的遺伝子やマーカー遺伝子のサイズ上の制約として, ウィ

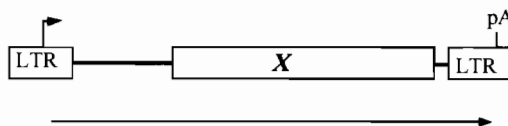
ルスゲノム全長(5'-LTR から 3'-LTR まで)が 10 kb 以上になるとパッケージング効率が悪化する点に留意する.

レトロウイルスのパッケージング細胞としては, 従来マウスの細胞(NIH 3 T3 線維芽細胞など)にウイルスタンパク質を高発現させたものが多用されてきた. 複製可能レトロウイルス

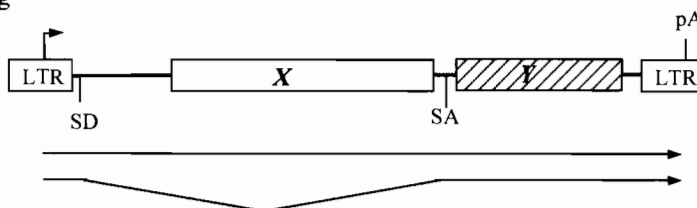
A. MMLV



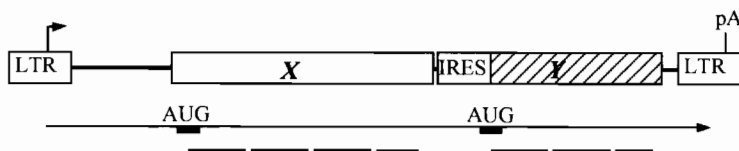
B. single gene



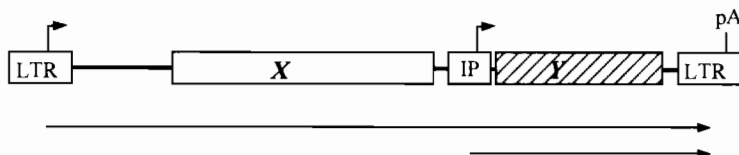
C. splicing



D. dicistronic



E. internal promoter



F. normal genomic structure

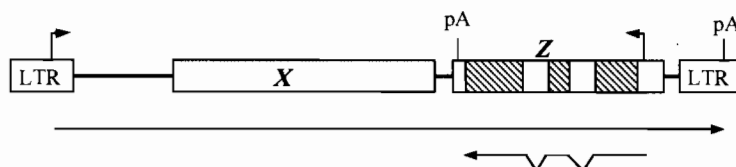


図3. 代表的なレトロウイルスベクターのデザイン。(A) MMLV プロウイルスゲノム。(B) LTR プロモーターでドライブされる単一遺伝子(X)をもつシンプルなベクター。(C) 二つの遺伝子(X, Y)をもつベクター。Y遺伝子発現のためにはRNA スプライシングが必要。(D) ダイシストロニックベクター。単一の mRNA から cap 依存性にX遺伝子が、IRES 依存性にY遺伝子が翻訳される。(E) “ダブルプロモーター”ベクター。Y遺伝子は内部プロモーター(IP)から転写される。(F) イントロン構造をもつ遺伝子(Z)を内包するベクター。通常Z遺伝子はウイルスゲノムの逆向きに挿入され、独自のプロモーターとポリA付加シグナルをもつ。LTR: long terminal repeat. gag, pol, env: MMLV viral genes. SD: splice donor site. SA: splice acceptor site. Ψ+: packaging signal extending to gag region. pA: polyadenylation signal. IRES: internal ribosome entry site. AUG: initiator codon. IP: internal promoter.

(RCR: replication competent retrovirus)が生じにくいように改良されたパッケージング細胞(GP + E 86 & GP + envAm 12, Ψ -CRE & Ψ -CRIP など)を含めて, ATCC などから数種が入手可能である. 最終的な標的細胞とウイルスの宿主域を考慮してパッケージング細胞を選び, ベクタープラスミドを直接トランスフェクトするか, いったんウイルスの形にして感染させるかしてウイルス産生細胞を樹立し, その培養上清をウイルス液として感染に用いる. しかしこのようにして得たウイルス産生細胞株は, クローン毎にウイルス産生量に大きなばらつきがあり, 高タイトーのウイルス産生細胞株を得るため多数(100個以上)のクローンをスクリーニングしなければならないことも多い.

最近, トランスフェクション効率が圧倒的に高い293細胞(ヒト胎児腎由来)を使ったパッケージング細胞がいくつか樹立された(BOSC 23 & Bing, Phoenix-E & Phoenix-A など)[10]. これらにベクタープラスミドをトランスフェクトすると, 一過性にはあるが培養上清中に多量のウイルスが放出され, 高タイトーのウイルス液を得ることができる. レトロウイルスで発現ライブラリーを作りたい場合や, 多数のベクターを使って標的細胞に色々な遺伝子を導入したい場合など, 数日で目的のウイルスが得られるので便利である. 例えば, 第1日に 2×10^6 個のBOSC 23細胞を60 mm デイッシュに撒き, 第2日に3~5 mg のプラスミドDNAでトランスフェクトする(リン酸カルシウム法かりポフェクション法が良い). 第3日に培地を交換し(マウス血球用には α -MEMをデイッシュあたり3 ml程度), 第4日にウイルス上清として採取し, 0.22~0.45 mm のフィルターを通してそのまま感染に用いるか, -70°C にて保存する.

以上が通常のエコトロピックまたはアンフォトロピックレトロウイルスベクター作製の概要であるが, エンベロープと中身のゲノムが異なったウイルスに由来するものも作ることができ, シュードタイプウイルスベクターと称す

る. その代表的なものは, レトロウイルスベクターのゲノムをVSV(小水疱性口内炎ウイルス vesicular stomatitis virus)のエンベロープ蛋白質(VSV-G)に包み込んだものである. このようなシュードタイプのものを作ることにより, 標的細胞の範囲を変えたり, ベクターの安定性を高めることが可能となる.

遺伝子導入の方法としては, レトロウイルスベクターを含む培養上清(ウイルス上清)を用いて標的細胞に感染させるのが一般的であるが, 遺伝子導入効率が低い場合はベクター産生細胞と標的細胞を共培養することもある. 造血幹細胞を標的とする場合は遺伝子導入効率が低いいため, ウイルス上清を用いる場合はウイルス感染を通常3回位繰り返す(つまり3日間感染させる). この際, 遠心操作を加えると導入効率が上昇すると報告されている[11]. ベクター産生細胞との共培養あるいは骨髓ストローマ細胞存在下での遺伝子導入の方が効率は良好であるが, その代わりにフィブロネクチンフラグメント(C端側;商品名はレトロネクチン)を用いると造血幹細胞への遺伝子導入効率が上昇する[12]. その機序としては, このフラグメントがレトロウイルス結合ドメインと細胞結合ドメインを含むため, レトロウイルスベクターが細胞に接触しやすくなることによると考えられている. レトロウイルスベクターは非常に不安定であり(半減期は数時間以内), 早くターゲット細胞に接触することが重要である. また, 造血幹細胞を細胞周期に入れ, 遺伝子導入の効率を上げることを目的として, 種々の造血因子を添加するのは前述したとおりである.

V. レトロウイルスベクターの問題点

このベクターの問題点としては, 分裂細胞にしか遺伝子導入ができないこと, 遺伝子発現レベルが低いこと, 遺伝子が存在していてもその発現が必ずしも長期間持続するわけではないこと, ヒトの血中では補体により急速に不活化されてしまうこと, 長期的な安全性はまだ確認されていないことなどが挙げられる. また, 染色

体 DNA への組込み部位が決まっておらずランダムであることから、偶然癌遺伝子などの隣りに入り込みそれを活性化する可能性が懸念されている(挿入変異)。ただし、レトロウイルスが体内で増殖し感染を次々と繰り返さない限り、短期間の観察では大きな問題はないと考えられている。その意味で、RCR の発生を未然に防ぐパッケージング細胞株の開発が進められると同時に、レトロウイルスベクター作製時に RCR の混入がないようにロットごとに厳重なチェックが行われている。

VI. おわりに

現在、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なレンチウイルス由来のベクターの開発が進められている [13, 14]。MMLV などオンコウイルス亜科に属するレトロウイルスと異なり、HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) を代表とするレンチウイルス亜科のレトロウイルスは自らのゲノムの逆転写産物を能動的に核内へ輸送する機構を備え、非分裂細胞に対しても感染が成立する。大部分の造血幹細胞など静止期にある細胞や、神経・筋組織など終末分化した細胞への遺伝子導入に向けて、このような新しいベクターの開発に期待が寄せられている。

文 献

1. Miller DG, Edwards RH & Miller AD : Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 78-82, 1994
2. van Zeijl M, Johann SV, Closs E, et al : A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 1168-1172, 1994
3. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al : Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 7071-7075, 1994
4. Orlic D, Girard LJ, Jordan C et al : The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 11097-11102, 1996
5. Cepko C & Pear W : Transduction of genes using retrovirus vectors. In : *Current protocols in molecular biology*, Ed. Ausubel FM et al. Wiley, New York, suppl. 36 1996
6. Miller AD : Development and applications of retroviral vectors. In : *Retroviruses*, Ed. Coffin JM, Hughes SH & Varmus HE, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997
7. Migita M, Medin JA, Pawliuk R et al : Selection of transduced CD34⁺ progenitors and enzymatic correction of cells from Gaucher patients, with bicistronic vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 12075-12079, 1995
8. Mavilio F, Ferrari G, Rossini S, et al : Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* **83** : 1988-1997, 1994
9. Pawliuk R, Kay R, Lansdorp P, et al : Selection of retrovirally transduced hematopoietic cells using CD24 as a marker of gene transfer. *Blood* **84** : 2868-2877, 1994
10. Finer MH, Dull TJ, Qin L, Farson D & Roberts MR : kat : A high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* **83** : 43-50, 1994
11. Kotani H, Newton III PB, Zhang S, et al : Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum Gene Therapy* **5** : 19-28, 1994
12. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D et al : Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* **2** : 876-882, 1996
13. Naldini L, Blömer U, Gallay P et al : In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272** : 263-267, 1996
14. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ et al : Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15** : 871-875, 1997