シンポジウム

遺伝子治療をめぐる諸問題

Gene Therapy
— Advances in Research and Treatment —

第509回新潟医学会

日　時　平成7年6月17日（土）午後1時50分～午後3時50分
会　場　新潟大学医学部　有壬記念館

司　会　柴田　昭教授（第一内科）
演　者　斉藤　泉（東大医科研遺伝子解析施設），森山美昭（燕労災病院内科），田中憲一（産婦人科），古川達雄（第一内科），里方一郎（小児科）
発言者　濱田忠彌（ウイルス学），高橋益広（医療短大）

1）　より安全なアデノウイルス・ベクターの開発と将来

東大医科研遺伝子解析施設
斉　藤　　泉

2) 遺伝子マーキング――ヒト造血幹細への遺伝子導入

燕労災病院内科　森　山　美　昭

Gene Marking: Retroviral Vector-Mediated Gene Transfer into CD34-Enriched Human Bone Marrow Stem Cells

Yoshiaki MORIYAMA

Tubame Rosai Hospital for Labour Welfare Corporation, Niigata, Japan

In order to improve the efficiency of gene transduction into human hematopoietic stem cells by retrovirus vectors, we conducted an in vitro study to determine the optimal conditions. Cells used as the target were CD34-enriched human bone marrow stem cells. Retrovirus vectors used were LNL6 and G1Na40, both carrying the Neomycin-resistant (Neo-R) gene as a genetic marker. Transduction efficiency varied from 5.1% to 35.0%, depending on the factors and procedures in the experiments, which comprised MOI, the duration of exposure of cells to the vectors, and conduct/nonconduct of centrifuge of the cells during the exposure. The most effective gene transduction into CFV-GM was found to be a 48h-liquid culture with growth factors followed by 48h-vector exposure with the spin transduction.

Key words: retrovirus vectors, Neo-R gene, spin transduction, hematopoietic stem cells
レトロウイルスベクター，ネオマイシン耐性遺伝子，造血幹細胞，導入効率

はじめに

遺伝子治療には，直接治療を目的とする狭義の遺伝子治療と，遺伝子を操作する点で方法論的に同様であるが，治療を目的としない遺伝子標識（gene marking）が含まれる．特に，レトロウイルス系ベクターを用いた場合，標的細胞に組み込まれた外来遺伝子は宿主染色体の一部として安定に保持されるので，ネオマイシン耐性（Neo-R）遺伝子などマーカー遺伝子として標的細胞（例えば造血幹細胞）に導入し，再び患者に戻し，体内での標的細胞の挙動を追求することが可能である．中でも自己造血幹細胞移植における造血再構築，ex vivo purging の意義，再発の機序，さらにその安全性などの追求に，遺伝子マーキングは有力な手段となる．

しかし，ヒト造血幹細胞は一般に，S期にある細胞が少ないため[1]，レトロウイルス系ベクターによる遺伝子導入は未だ困難で，十分な導入効率が得られていない[2)3]．今回，私共は，米国の GTI 社から臨床用レトロウイルスベクターの提供を受け，ヒト造血幹細胞への遺伝子導入について基礎的検討を行ったので報告する．

Reprint requests to: Yoshiaki MORIYAMA, Tubame Rosai Hospital for Labour Welfare Corporation, Tubame City, 959-12, JAPAN.

別刷請求先：〒959-12 燕市大字佐渡633
燕労災病院内科　森山美昭

I. 遺伝子導入効率に及ぼす諸因子

Neo-R 遺伝子が組み込まれたレトロウイルスベクター；G1Na・40 (titer: 1×10^7 cfu/ml), LNL6 (同: 5×10^5 cfu/ml), さらに G1Na・40 の濃縮ベクター (同: 5×10^8 cfu/ml) の3種 (GTI 社提供) を使用し, K562 cell への Neo-R 遺伝子導入とその発現に及ぼす諸因子を検討した. 使用ベクターの遺伝子構造を**図 1** に示すが, これらは S^+/L^- assay などで helper virus の混入や複製はなく, 臨床でも安全性が確認されたものである.

K562 cell への Neo-R 遺伝子導入は種々の因子によって左右されたが[4], 中でも vector の純度や濃度 (MOI), S期細胞の割合と接触時間, fresh vector の頻回暴露, 遠心操作 (2,500 rpm, 90分) 等で, 導入効率 (TDE) は影響する. 特に, vector と標的細胞を接触させる際, 遠心操作を加えると[5], TDE は2～5倍上昇することが確認された (**表 1**).

さらに, Neo-R 遺伝子導入細胞の選択培養に用いる G418 濃度も重要で, その低濃度は過剰評価, 高濃度は過小評価の原因となるので, **表 1** のごとく, G418 (0.5 mg/ml) 添加した clonogenic assay による選択培養と, 私共が開発した well assay (G418 無添加の条件で, clonogenic assay を行い, その後個々のコロニーを pick up し, G418 (1.0 mg/ml) を加えた well 内で選択培養) で比較すると, 前者では G418 による cytotoxity で, TDE は常に過小評価される. 後者では G418 濃度 (1.0 mg/ml) が高いにもかかわらず, TDE は改善し, 遠心操作を加えると60%前後に上昇し, かつ well 内で増殖した K562 cell は Neo-R 遺伝子を発現していることが PCR 法で確認することができる (**図 2**).

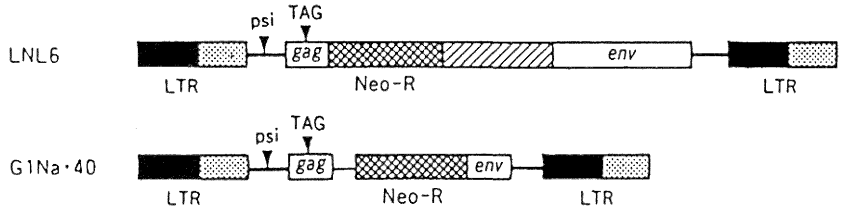

図 1 遺伝子導入に用いたレトロウイルスベクターの遺伝子構造
LTR: モロニー白血病ウイルスと肉腫ウイルスを融合した long terminal repeat
psi: パッケージングシグナル
TAG: mutatid start codon
Neo-R: ネオマイシン耐性遺伝子

表 1 異なる G418 選択培養法による Neo-R 遺伝子導入の K562 細胞への導入効率：従来の colony assay と well assay の比較

Vector	(MOI)	Selection assays (TDE%)			
		colony assay		well assay	
		non-spin	spin	non-spin	spin
G1Na40	(20.0)	6.0	21.0	31.3	59.1
(supernatant)	(2.0)	5.8	16.4	—	—
G1Na40	(25.0)	18.7	30.5	33.6	50.0
(concentrated)	(2.5)	9.4	23.0	—	—
	(0.25)	6.1	—	—	—

1) colony assay: After vector exposure, cells were cultured with G418 (0.5 mg/ml). Colonies grown in G418 compared to total colonies grown without G418.
2) well assay: After vector exposure, each colonies grown without G418 were picked up, transferred to wells with G418 (1.0 mg/ml) and cultured for 7～10 days.

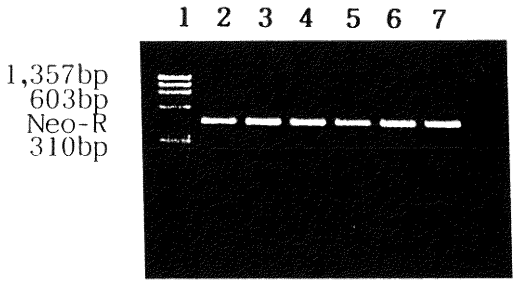

図 2　K562 細胞へ Neo-R 遺伝子導入後，形成されたコロニーを at random に pick up し，G418（1.0 mg/ml）添加 well に移し，その well 内で増殖した K562 細胞の PCR 解析：1は marker；2～7は well 内で増殖した各クローン．

Ⅱ．ヒト造血幹細胞への遺伝子導入

以上の基礎的実験を基に，ヒト骨髄細胞から CD34 陽性細胞を分離し，幹細胞への Neo-R 遺伝子導入を検討した．レトロウイルスベクタへによる遺伝子導入には，標的細胞の増殖期（S期）の有無が重要であることから，CD34 陽性細胞を growth factor（SCF，IL-3，IL-6）と共に液体培養し，その増殖曲線を求めた（図 3）．この曲線から，vector 添加の至適時間は液体培養24時間以降と考えられた．

一方，液体培養24および48時間後，経時的に colony assay（BFU-E，CFU-GM，CFU-GEMM）し，vector 添加時間と頻回暴露の至適条件を検索した（図 4）．その結果，growth factor と共に48時間液体培養し，その後48時間 vector を暴露（24時間毎に fresh vector を交換）し，遠心操作を加えて vector を接触させる方法[5]が至適条件で，CFU-GM のTDE は最高35％と改善した（表 2）．しかし，液体培養時間の長短にかかわらず，CFU-GEMM の増加は微動で，未熟な幹細胞への遺伝子導入には，growth factor の組み合せなど，工夫が必要である．

一般に，白血病や神経芽細胞腫の自己造血幹細胞移植では，移植細胞から再発する場合，clonogenic cell として少なくとも 100 個以上含まれているといわれる[6]．従って，標的細胞（clonogenic）に 1％以上マーカー遺伝子が導入され，かつ発現すれば，遺伝子標識試験は成立することになる．

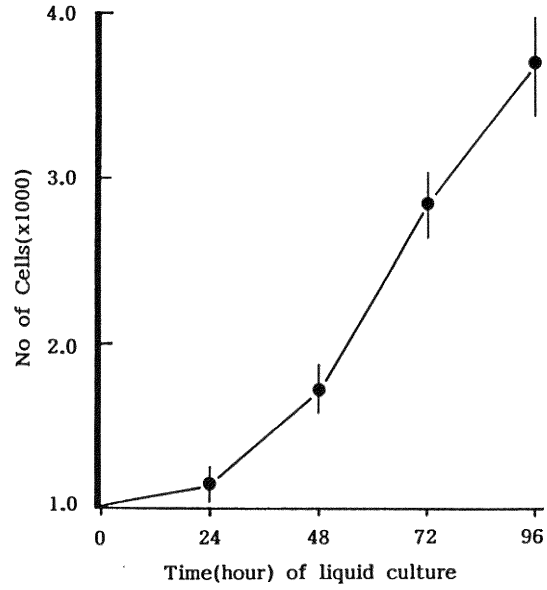

図 3　Growth factors（SCF，IL-3，IL-6）添加液体培養による CD34 陽性ヒト骨髄細胞の増殖曲線．

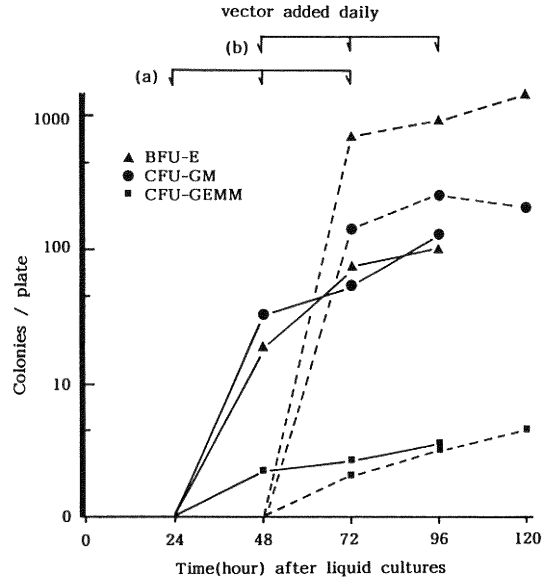

図 4　Growth factors 添加液体培養後の経時的なヒト造血幹細胞の増殖曲線とベクター添加と暴露のタイミング．

（a）24時間液体培養後，（b）48時間液体培養後，経時的に colony assay．

表 2 レトロウイルスベクターによるヒト造血幹細胞（CFU-GM）への Neo-R 遺伝子の導入効率（%）

G1Na40* (supernatant)	24h-48h exposure		48h-48h exposure	
	non-spin	spin	non-spin	spin
MOI: 25.0	12.5	23.8	32.1	31.4
MOI: 2.5	5.1	12.1	10.3	35.0
MOI: 0.25	—	—	6.9	18.8

*: 1×10^7 cfu/ml

#: After 24 or 48h liquid cultures in the presence of SCF, IL-3 and IL-6, all transductions were carried out with daily changes of growth factors and retro-viral vector-containing supernatant with and without spin. CFU-GM positive colonies for the transduced Neo-R gene were selected by a clonogenic assay with G418 (2.0 mg/ml).

おわりに

自己造血幹細胞移植における遺伝子マーキングは，既に unpurged marrow で AML，CML のみならず固形腫瘍（neuroblastoma）においても実施され，いずれの再発にも移植細胞（unpurged の場合）が関与していたことが PCR 法で確認されている．しかし，自己造血幹細胞移植に対する purging の有用性，autologous GVHD による graft vs leukenria（GVL）効果の機序，さらに末梢血幹細胞移植で長期の造血再構築が可能かなど，未だ結論が得られていない．私共は，レトロウイルスベクターの安全性を含め，これらの問題を解明する目的で，ヒト造血幹細胞への遺伝子マーキングを企画している．

参考文献

1) **Siminovitch, L., McCulloch, E.A. and Till, J.E.**: The distribution of colony forming cells among spleen colonies. J. Cell Comp. Physical, **62**: 327～336, 1963.

2) **Bregni, M., Magni, M., Siena, S., et al.**: Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. Blood, **80**: 1418～1422, 1992.

3) **Cassel, A., Cottler-Fox, M., Doren, S., et al.**: Retroviral-mediated gene transfer into CD34-enriched human peripheral blood stem cells. Exp. Hematol, **21**: 585～591, 1993.

4) **Moriyama, Y., Takahashi, M., Masuko, M., et al.**: Augmentation of gene transfer efficiency into human hematopoietic stem cell cells by the spin transduction method. Acta Med. Biol., **43**: 217～222, 1995.

5) **Kotani, H., Newton, P.B., Zhang, S., et al.**: Improve methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. Human gene Ther, **5**: 19～28, 1994.

6) **Brenner, M., Krance, R., Heslop, H.E., et al.**: Assessment of the efficacy of purging by using gene marked autologous marrow transplantation for children with AML in first complete remission. Human Gene Ther, **5**: 481～499, 1994.

7) **Rill, D.R., Santana, V.M., Brenner, M., et al.**: Direct demonstration that autolongous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. Blood, **84**: 380～386, 1994.

3) リポソームによる遺伝子導入

新潟大学医学部産婦人科 田中憲一