

### 3. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療： 臨床治験での進展と安全性

土 肥 可奈世, 竹 内 康 裕

MRC/UCL Centre for Medical Molecular Virology and Wohl Virion Centre,  
Division of Infection and Immunity, University College London

レトロウイルスベクターは自身のゲノムを宿主ゲノムに挿入できることから、治療遺伝子を患者の体内に運ぶ有効な手段として注目されてきた。レトロウイルスベクターが標的とする遺伝子疾患は、疾患の原因である変異遺伝子の正常型を患者細胞に直接導入することで治療が行われる。従来のガンマレトロウイルスベクターは標的細胞における治療遺伝子の発現、患者の疾患症状改善という点からこれまでの臨床治験において数々の成功例を報告してきた。しかし、遺伝子治療後の副作用としてベクターを介した遺伝子挿入を由来とする白血病が発生した。この insertional mutagenesis (IM) の報告により、ベクターコンストラクト自身の安全性が見直されただけでなく、患者細胞内のウイルスベクター挿入位置をモニタリングすることが重要であることも確認された。一方、非分裂細胞へも治療遺伝子を導入できるレンチウイルスベクターは、神経性の遺伝子疾患の治療にも利用されてきた。また、これら2種のウイルス間の宿主ゲノム内の挿入傾向も比較して調べられた結果、レンチウイルスベクターのがん原遺伝子への挿入傾向がガンマレトロウイルスベクターよりも集中していないこと、またレンチウイルスベクターを用いた臨床治験ではIMによる白血病のケースがこれまで報告されていないことから、より安全なベクターとしての認識が広まった。しかし、レンチウイルスベクターが自身の挿入により宿主遺伝子のスプライシングパターンを変化させることから、IMによる副作用を発生させる可能性は残っている。最近では、レンチウイルスベクターを用いて患者体内のT細胞に癌や感染した細胞を死滅させるレセプターを発現させ、間接的に治療を行うことも始まった。これら疾患数、患者数の多い病気への応用が始まったことから、レンチウイルスベクターが今後広く臨床応用されることが期待される。

#### 序 論

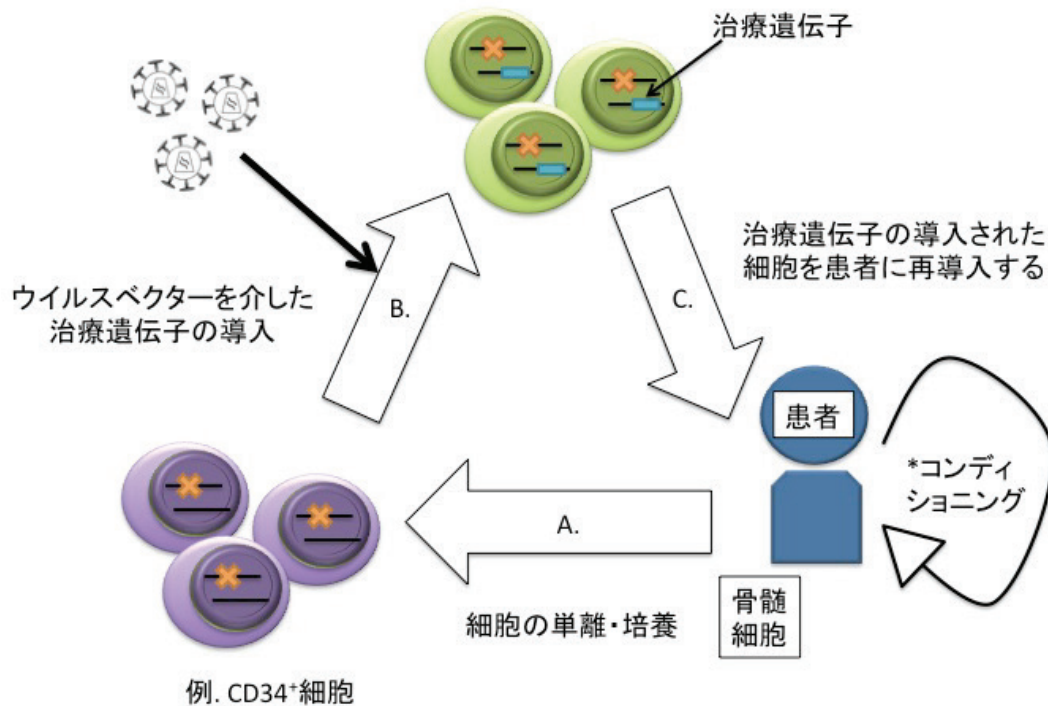
ヒトのゲノム解読が完了して10年以上が経つ。現在ではヒトだけでなく、様々な生物のゲノムが解読され、どの

ような遺伝子がゲノムのどの位置にコードされているか、それぞれの遺伝子がどのような機能を持ち、どのような病気と関連しているかが明らかとなってきている。遺伝子を薬として治療に応用しようとするコンセプトから始まった遺伝子治療は、これらの遺伝子のデータベースの構築とともに発展したと言っても過言ではない。また遺伝子を哺乳類細胞へ導入する技術の向上もまた、遺伝子治療研究を促進する力となった。

遺伝子治療は、治療遺伝子を細胞に運ぶことで成立する。その主な手法として、ウイルスベクターの使用が挙げられる<sup>1)</sup>。現在の臨床治験では、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノアソシエイテッドウイルス、単純ヘルペスウイルスが代表的に使用されている。中でも、レトロウイルスベクターは遺伝子治療の有力候補として25年前から臨床応用のために研究されてきた。また臨床治験での成功の

#### 連絡先

MRC/UCL Centre for Medical Molecular Virology and Wohl Virion Centre, Division of Infection and Immunity, University College London  
Cruciform building, 90 Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom  
TEL: +442031082144  
E-mail: kanayo.doi.11@ucl.ac.uk  
ytakeuchi@ucl.ac.uk



**Fig.1 Ex vivo 遺伝子治療の概要**

患者自身の細胞を用いた骨髄移植 (Autologous stem cell transplantation) は以下のステップにより行われる。A. 患者の骨髄細胞 (Hematopoietic stem cell) から CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞を単離する。単離された CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞には、stem cell factor (SCF), megakaryocyte growth and differentiation factor (MGDF), Flt-3 ligand (Flt-3) 等の増殖因子により刺激を与えられる。B. CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞に治療遺伝子を持ったウイルス粒子を感染させる (transduction)。C. 治療遺伝子を発現する細胞を再び患者の体内に移植する。この移植と患者体内での増殖を促進するため、化学療法によって遺伝子導入されていない細胞数の削減が行われる場合もある (コンディショニング)。

傍ら、近年その安全性が見直され、従来のガンマレトロウイルスだけではなく、バクターの機能と安全性の面で優れたレンチウイルスを使用する割合が増えてきた。本総説では、遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用とその安全性について、その現在までの発展を追ってみたい。

#### 遺伝子治療におけるベクター

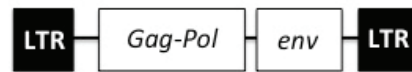
レトロウイルスの第一の特徴は、その複製課程において自身の DNA を宿主細胞内クロマチンに直接挿入できることである<sup>2)</sup>。そのため、レトロウイルスベクターを介して挿入された遺伝子は、細胞分裂によって娘細胞にも分配され、世代を経てクロマチン上の遺伝子が希釈されることなく、安定に発現することができる。またベクター内に収容できる遺伝子の許容サイズも 9kb と大きく、様々な遺伝子を運ぶことができる。レトロウイルスベクターを介した遺伝子治療は、患者の骨髄細胞から得られた造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell) と共に用いることが一般的である (Fig.1)。この ex vivo 治療法によって、ドナーの有無に依存してきた遺伝病の治療の可能性を広げるだけでな

く、またドナーからの骨髄移植 (Allogeneic transplantation) に付随する拒否反応 (graft versus host diseases/host versus graft diseases) のリスクを回避することもできる。現在、レトロウイルスベクターは、がん治療に最もよく用いられ、遺伝子治療の臨床治験全体の 60% を越える。続いて、遺伝性疾患治療への応用が約 10% を占める<sup>3)</sup>。本総説で取り扱うガンマレトロウイルスベクターは murine leukemia virus (MLV) 由来のもの、レンチウイルスベクターは human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) 由来のものが最も一般的に使用されている。

#### レトロウイルスベクターの歴史と改善

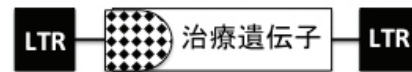
遺伝子治療研究の初期には MLV 由来のガンマレトロウイルスベクターが研究対象とされた。ガンマレトロウイルスゲノムはコアタンパク質をコードする *gag*、逆転写反応等ウイルス複製に必要な酵素をコードする *pol*、そしてエンベロープをコードする *env* から成り立つ。これら感染性を持つウイルスを産生する際に必要な cis acting 要素として LTR (long terminal repeat) と呼ばれる繰り返し配列で両端を囲まれている。また、5'LTR の直後に位置する

## 野生型プロウイルスゲノム

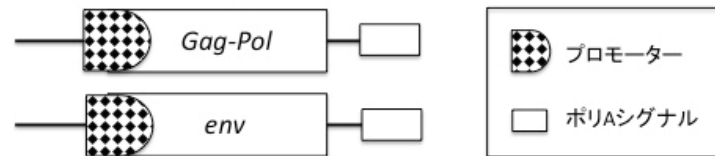


## ウイルス産生用DNAコンストラクト

### ウイルスベクターゲノムコンストラクト



### パッケージングコンストラクト



**Fig.2** レトロウイルスベクターの構築原理

野生型ウイルスは自身の複製に必要な遺伝子を単一のゲノム上にもつ。ウイルスベクターゲノムコンストラクトからはウイルス構造タンパク質遺伝子が除かれ、その代わりに治療遺伝子が組み込まれる。このゲノムコンストラクトから産生されるウイルスベクター RNA ゲノムをウイルス粒子に包む（パッケージング）ため、ウイルス構造タンパク質遺伝子、Gag-Polと Env を別途、トランスに供給する。このように、ウイルスの構成に必要な遺伝子を3個のコンストラクトに分配することで、病原性を持つウイルスの産生を防いでいる。

primer binding site (PBS) は逆転写反応の開始に不可欠である。さらにその下流には、ウイルスの RNA ゲノムをウイルスのコアタンパク質内に収納するために必要なパッケージングシグナルが位置する<sup>4)</sup>。これらの野生型ウイルス複製に必要な要素は同一ゲノム上にコードされている (Fig.2)。基本的なレトロウイルスベクターは replication competent virus の産生を防ぐために、これらベクター内のウイルス遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) は除かれ<sup>5)</sup>、治療遺伝子を発現することを主な目的としてデザインされている。これら除かれたウイルス遺伝子はトランスに供給されることでウイルスの産生が行われる (Fig.2)。

ガンマレトロウイルスよりも複雑な遺伝構造を持つレンチウイルスのベクターにおいては、それら主要遺伝子の他、アクセサリー遺伝子 (*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu*) も取り除かれている。レンチウイルスベクターの配列にはガンマレトロウイルスベクターに必要な構成要素に加えて、ウイルス RNA の核外輸送の際に Rev タンパク質が結合するために必要とされる rev response element (RRE)<sup>6)</sup>、ベクターゲノムを宿主ゲノム内に挿入する際に形成される pre-integration complex (PIC) の核内輸送を媒介するはたらきを考えると考えられている cPPT (the central polypurine tract)<sup>7)</sup> が含まれる。レトロウイルス産生の際には通常

HEK293T 細胞を用い、*gag-pol*, *env* そして目的遺伝子を別々に発現する、3個（もしくは4個、*rev* 発現ベクターを用いる場合）のプラスミドベクターによる transient transfection が行われる (Fig.2)。また、ベクターの感染できる宿主細胞の幅を広げるために、他のウイルスのエンベロープ遺伝子を借りる pseudotyping も行われている。現在では、ほとんどの哺乳類細胞表面上に発現しているとされるリン脂質や LDL レセプターに結合し、ウイルスベクターの細胞内侵入を媒介する vesicular stomatitis virus の G タンパク質 (VSV-G) が広く用いられている<sup>8-10)</sup>。臨床治験でも、*gag-pol*・VSV-G が細胞毒性を有することから<sup>11,12)</sup>、293T 細胞を用いた一過的なレンチウイルスベクター産生のプロトコルが用いられてきた。しかし、コストやカルチャースケールへの制限がかかることから、その他のウイルスベクターの産生法が模索されてきた。そこで、高い感染性を持つウイルスベクターを持続的且つ、大量に産生できるように、packaging cell line (PCL) の開発がおこなわれた。PCL とは、ウイルス産生に必要な構成要素を既に細胞内に取り込んだ細胞株のことで<sup>13)</sup>、ガンマレトロウイルスベクターを産生する FLY 細胞<sup>14)</sup> や、レンチウイルスベクターを産生する PCL として STAR<sup>15)</sup>、そして最新の WinPac 細胞<sup>16)</sup> が本研究室で開発された。

**Table 1** 従来のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床治験

ベクター	標的細胞	疾患名	IM*	文献例
ガンマレトロウイルスベクター	hCD34 <sup>+</sup>	ADA-SCID	-	24)
		X-SCID	+	26, 27)
		X-CGD	+	30)
		WAS	+	33)
	T細胞	ADA-SCID	-	58)
レンチウイルスベクター	hCD34 <sup>+</sup>	ALD	-	40)
		MLD	-	59)
		β-thalassaemia	***	41)
		WAS	-	53)
	T細胞	AIDS	-	39)
		Cancer	-	54-56)
	脳の被核へ注射**	Parkinson's disease	-	60)

ADA-SCID, アデノシンデアミナーゼ欠損症; X-SCID, X連鎖重症複合型複合型免疫不全症; X-CGD, X連鎖性慢性肉芽腫症; WAS, Wiskott-Aldrich 症候群; ALD, 副腎白質ジストロフィー; MLD, 白質ジストロフィー異染性; β-thalassaemia, βサラセミア; AIDS, 後天性免疫不全症候群; Parkinson's disease, パーキンソン病, \*IMの報告例の有無, \*\*EIAV (equine infectious anemia virus) ベクターを使用, \*\*\*クローナルドミナンス

### ガンマレトロウイルスベクターを利用した 遺伝性免疫不全症の治療の成果

ガンマレトロウイルスベクターは広く遺伝子疾患の治療に用いられてきた (Table 1). 遺伝子治療で長年ターゲットとされてきた遺伝病に severe combined immunodeficiencies (SCID, 重症複合型免疫不全症) がある. 中でも adenosine deaminase-severe combined immunodeficiencies (ADA-SCID, アデノシンデアミナーゼ欠損症) は, 細胞毒性を持つデオキシアデノシンを無害なデオキシイノシンに変換する際に必要な酵素をコードする ADA 遺伝子の変異により引き起こされる<sup>17, 18)</sup>. 幼児期に発症し, 白血球細胞内に蓄積されたデオキシアデノシンにより細胞は死に, この免疫不全により生命を左右する重度の感染症にかかりやすくなる<sup>19, 20)</sup>. これまでは点滴によってアデノシンデアミナーゼを直接体内に供給する enzyme replacement therapy (ERT) が治療の主流だったが, 長期にわたる継続的な治療が必要であり, その分コストもかかる<sup>21)</sup>. その治療条件改善のために, ガンマレトロウイルスベクターが ADA 遺伝子のキャリアとして選ばれ, 臨床治験で治療された患者体内では, 正常レベルの ADA 酵素の発現が見られ, 治療後は ERT に頼る事が無くなるという成功を納めた<sup>22-24)</sup>.

また, X-SCID (X-linked severe combined immunodeficiency) もガンマレトロウイルスベクターを用いた臨床治験ターゲットの代表例である. この疾患は, 正常な免疫システムの様々なシグナル経路に必要な白血球表面サイトカインレセプターである common cytokine receptor γ chain (*IL2RG*) をコードする X chromosome 上の遺伝子の変異

が原因である. T細胞やNK細胞の数が極端に減少し, 分化の阻害されたB細胞は機能しない. その結果, 患者は生後2年までが余命とされ, 外界の病原菌に対する免疫システムはほとんど機能していないため無菌室での生活を余儀なくされる. 遺伝子治療の研究が本格化する前までは, ドナーからの骨髄移植をメインの治療法としてきた. しかし, 成功率は90%を越えるものの, 拒否反応を少なくする為にMHCクラスの一一致するドナーが必要なことが治療の可能性を制限してきた. 一方で, 患者から摘出された骨髄細胞にウイルスベクターを介して正常な *IL2RG* を導入, 返還移植することで, 移植の際の拒否反応のリスクを回避することができるだけでなく, 特定のドナーの必要性に治療が制限されることなく, より多くの患者を治療の視野に入れることを可能とした.

### ガンマレトロウイルスベクターを使用した 臨床研究における安全性への疑問

2000年には, 初の遺伝子治療治験での成功例として, X-SCID患者の治療が行われた<sup>25)</sup>. *IL2RG* を発現する murine leukemia virus (MLV) ベクターが患者の CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞に導入され, T/NK/B細胞の正常な産生と機能回復に成功し, 遺伝子治療におけるガンマレトロウイルスベクターの有効性が広く認知されるようになった. ところが, その後パリとロンドンの X-SCID 臨床研究でガンマレトロウイルスベクターを用いて治療された患者の中で高頻度 (パリ 40%, ロンドン 10%) に T cell lymphoblastic acute leukemia (T-ALL, Tリンパ芽球性白血病) が発生した<sup>26, 27)</sup>. 治療後は, 正常な機能を持つT細胞の増殖, 分化が見られた. その増殖したクローンを調べたところ,

がん原遺伝子 *LMO2*, *CCDN2* の付近にウイルスベクターが挿入し、これらの遺伝子が活性化されていた。このようなウイルスベクターの宿主ゲノム内への挿入が原因で細胞増殖変化や悪性化を促す変異を Insertional Mutagenesis (IM) と呼び、ガンマレトロウイルスベクター使用の安全性を制限する主要な要因である。さらに、パリの臨床試験では、がん抑制遺伝子 *CDKN2A* の欠損や *NOTCH1* の機能獲得変異が見られた。ロンドンの臨床試験でも、ウイルスベクターの *LMO2* 付近の挿入、*NOTCH1* の機能獲得変異だけでなく、TCR- $\beta$  領域の *SIL-TAL1* 位置のトランスロケーションが見られた。これらの変異の蓄積が急性白血病の発症の原因となったことが示唆される<sup>28)</sup>。

また、食細胞の NADPH オキシダーゼ活性の低下による免疫不全、X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD, X連鎖性慢性肉芽腫症) は gp91<sup>phox</sup> サブユニットをコードする *CYBB* 遺伝子の欠陥があるために発症する<sup>29)</sup>。この臨床試験では、*MDS1-EVII*, *PRDM16*, *SETBP1* にガンマレトロウイルスベクターの挿入が確認され、治療された2人の患者で骨髄細胞の異常増殖が見られた<sup>30)</sup>。ベクター挿入によるものとみられる、*MDS1-EVII*, *SETBP1* の mRNA 発現の上昇も確認された。その後の追跡研究の結果、ウイルスベクターの *MDS1-EVII* への挿入がもたらした染色体の不安定化(monosomy 7)が原因であると判った。

ガンマレトロウイルスベクターは Wiskott Aldrich Syndrome (WAS, Wiskott-Aldrich 症候群) の臨床試験でも使用されている。WAS protein (WASP) をコードする遺伝子に変異を持つために発症する免疫疾患である<sup>31)</sup>。WASP は造血細胞内のアクチンの構築制御に重要な役割を果たしている<sup>32)</sup>。最近の臨床試験では、治療された10名全員に末梢血液細胞、血小板における WASP の発現が見られるとともに、NK 細胞の細胞殺傷能力の回復や、4名の患者には IgG レベルの通常回復が見られた<sup>33)</sup>。しかし、治療された6名の患者にベクター挿入による急性白血病の発症が見られた。細胞内ウイルスベクターの挿入位置を調べたところ、*LMO2* への挿入が6名に共通して見られただけでなく、急性白血病発病に関わるとされる *TAL1*, *LYL1* へのベクター挿入も一部の患者に認められた<sup>34)</sup>。この臨床試験により、ガンマレトロウイルスベクターの使用が白血病のリスクを高めることが改めて確認されることとなった。

### レンチウイルスベクターと臨床研究

レンチウイルスは MLV の持つ特性に加え、細胞分裂をしない細胞(神経細胞、網膜細胞等)にも自身の遺伝情報を挿入できるという長所をもつ<sup>35,36)</sup>。さらには、ウイルスベクターの挿入位置はガンマレトロウイルスと比べてよりランダムに分布しやすいことも IM 研究を通して明らかとなった<sup>37,38)</sup>。従って、レンチウイルスベクターは従来

のガンマレトロウイルスベクターよりも優れた、安全性のより高いベクターであると言える。

レンチウイルスベクターは感染症、遺伝子疾患、癌治療に用いられる (Table1)。

レンチウイルスベクターは Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS, 後天性免疫不全症候群) の遺伝子治療に初めて導入された<sup>39)</sup>。この臨床研究では患者の CD4<sup>+</sup>T 細胞にアンチセンス HIV *env* 遺伝子をコードしたレンチウイルスベクターが導入された。平均4年にわたって患者のモニタリングがおこなわれたが、ウイルスベクター挿入を原因とした白血病やその他の病気は報告されなかった。また、遺伝子治療後の患者の末梢血単核球を異なる時期から取り、ゲノム中のウイルスベクター挿入の位置や数の変化もベクターの安全性を確かめるために調べられた。ベクターのゲノム挿入に関して、活発に転写の行われる部位との正の相関や、転写抑制部位との負の相関がみられたものの、原がん遺伝子への集中的な挿入は認められなかった。一方、導入したレンチウイルスベクターによって HIV 感染を防ぐ効果は明らかではなかったようだ。

X-linked Adrenoleucodystrophy (X-ALD, 副腎白質ジストロフィー) は ALD タンパク質をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異により引き起こされる遺伝病である。ALD タンパク質の欠損によりペルオキシソームを介した長鎖脂肪酸の代謝が正常に行われず、長鎖脂肪酸が神経細胞内に蓄積して、中枢神経のミエリン髄鞘に損害を与える(脱髄)。患者から単離された CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞に ALD タンパク質をコードするレンチウイルスベクターが導入され、この遺伝子治療により回復された白血球細胞の数やその細胞中のウイルスの挿入位置の変化がモニタリングされた<sup>40)</sup>。ウイルス挿入による、細胞の異常増殖は見られず、遺伝子治療から14-16ヶ月後には患者の脱髄の進行を食い止めることができた。

### レンチウイルスベクターを使用した臨床研究における安全性への疑問

ところが、レンチウイルスベクター使用の安全性に疑問を投げける報告が2010年の  $\beta$ -thalassaemia 遺伝子治療の臨床試験でなされた<sup>41)</sup>。 $\beta$ -thalassaemia 患者は  $\beta$ -globin 遺伝子に変異があり、正常な機能を持つ赤血球を産生できない。そのため、輸血によって血液機能を維持している<sup>42)</sup>。この  $\beta$ -thalassaemia 患者の遺伝子治療では、患者の CD34<sup>+</sup> 造血前駆細胞に正常  $\beta$ -globin をコードするレンチウイルスベクターが導入された。しかし、遺伝子治療後、ベクター挿入を受けた細胞に由来する赤芽球の急激な増殖が認められた(クローナルドミナンス)。ウイルスベクターの挿入が *HMG2* 遺伝子の exon3-4 間に見いだされ、ベクター 5'LTR 内のスプライスアクセプターを介して宿主ベクターキメラ mRNA が創出されていた。その mRNA に

はHMGA2遺伝子を負に制御するマイクロRNA (*let7*) をコードする exon5 が exon4 とともに転写されず、結果としてHMGA2遺伝子の発現を上昇させることとなった。このベクター挿入によって遺伝子本来のスプライシングパターンが変化し、HMGA2遺伝子が exon4, 5 を欠いても機能することが明らかとなった。その後6年に渡る患者のモニタリングの後、この異常増殖を見せたクローンは患者体内でドミナントではなくなった<sup>43)</sup>。このクローンは良性として報告されたが、悪性となる可能性も大いにあり、レンチウイルスベクター使用の安全性を再び問いかけることとなった。

#### ウイルスベクターの安全性向上のために

報告されたIMの事例をもとに、ベクターの安全性が見直されるようになった。X-SCIDの例にもあったように、ベクターLTR内のU3領域に存在するエンハンサー／プロモーターがIMの一因となることから、その領域を取り除いたself-inactivating vectorがIMのリスクを減少させることのできるベクターとして利用されるようになった<sup>45)</sup>。さらには、他のIMメカニズムとして宿主-ベクター間のスプライシングによるキメラmRNAの創出が挙げられる。これは、aberrant splicingと呼ばれ、ウイルスベクターの介入が通常の遺伝子エキソン間のスプライシングを変化させることで遺伝子発現の変化を招く。可能なキメラmRNAパターンを把握するために、ベクター内のスプライシングサイトをマッピングする事もベクターの安全性向上のために行われるようになった<sup>46,47)</sup>。

本研究室では、レトロウイルスベクターのリスクを *in vitro* でスクリーニングする、IMモデルを考案した<sup>48,49)</sup>。これは、マウス未分化B細胞由来IL-3依存細胞株BAF3/Bcl15<sup>50,51)</sup>にレトロウイルスベクターを導入することで得られた変異株(IL-3非依存性細胞)を単離し、その原因をベクター挿入位置や、その挿入によるmRNA発現の変化を調べるものである。それらの比較の結果、ガンマレトロウイルスとレンチウイルスベクターとでは遺伝子に対して挿入される相対位置が違っており異なるシグナル経路を用いて変異株の増殖を助けていることが判った。

また、ベクター内に要素を挿入することでベクターの安全性を高める試みもなされている。クロマチンインシュレーターは宿主細胞のヘテロクロマチンの分布やプロモーター／エンハンサー間の相互作用を制御することができ、chicken  $\beta$ -globin locus control region (cHS4) は最も研究されているインシュレーターの一つで、 $\beta$ -thalassaemia の治療ベクター内に用いられている<sup>41)</sup>。Ubiquitous chromatin opening element (UCOE) はDNAメチレーションを受けにくいことからgene silencingが起きにくくことができ、この要素を入れたベクターは治療遺伝子の安定した発現を実現させた。安全性の向上のため、このUCOE

内のスプライシングサイトを取り除く研究もなされた<sup>52)</sup>。

#### レンチウイルスベクターの今後

これまでの遺伝子治療の臨床治験から、レンチウイルスベクターは安全性が完全には確保されていないものの、従来のガンマレトロウイルスベクターと比べ、機能面、安全面において優れていることが明らかとなった。従来のガンマレトロウイルスベクターを用いた臨床治験もレンチウイルスベクターを用いたものに移行してきている<sup>53)</sup>。レンチウイルスをこれからの遺伝子治療を担うツールの一つとするために、IMのメカニズム解明を含めレンチウイルスベクターの更なる安全性の追求が必要である。

また、新たな試みとして、レンチウイルスベクターを用いたがん治療も始まった<sup>54-57)</sup>。例えば、がん細胞を殺傷する能力をT細胞に与える研究としてCD19を認識するレセプターをがん細胞認識レセプターとして用いている。このような、レンチウイルスベクターによって発現させた細胞表面レセプターをキメラ抗原レセプター (chimeric antigen receptor, CAR) と呼ぶ。

本総説で取り上げた遺伝子疾患の多くは難病であり、患者の数も限られている。しかし、AIDSやがん治療といったより身近な病気の治療法の一つとしてレンチウイルスベクターが使用され始めたことは、これまでの遺伝子治療臨床治験を越えて広く医療の現場で使用される可能性を示唆している。

#### 謝 辞

竹内研究室で進められてきた遺伝子治療関係の研究はMary Collins 研究室との永年の共同プロジェクトである。近年、UK Medical Research Council, UK Health and Safety Executive, European Commission FP6 project CONSERT LSHB-CT-2004-005242 及びUCL Cancer Institute Research Trust から助成を受けている。これら研究支援をしてくださった基金、土肥のUCL博士課程修学を支援してくださった日本学生支援機構、そして、本草稿の精読、批評推敲をいただいた渡邊雄一郎博士に厚く御礼申しあげる。

#### 参考文献

- 1) Giacca, M. and S. Zacchigna, *Virus-mediated gene delivery for human gene therapy*. J Control Release, 2012. 161(2): p. 377-88.
- 2) Varmus, H.E., P.K. Vogt, and J.M. Bishop, *Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(11): p. 3067-71.
- 3) *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. [cited 2015 May]; Available from: <http://www.abedia.com/wiley>.
- 4) Mann, R., R.C. Mulligan, and D. Baltimore, *Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to*

- produce helper-free defective retrovirus*. Cell, 1983. 33(1): p. 153-9.
- 5) Schambach, A., et al., *Biosafety features of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2013. 24(2): p. 132-42.
  - 6) Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. 338(6212): p. 254-7.
  - 7) Zennou, V., et al., *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell, 2000. 101(2): p. 173-85.
  - 8) Emi, N., T. Friedmann, and J.K. Yee, *Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus*. J Virol, 1991. 65(3): p. 1202-7.
  - 9) Amirache, F., et al., *Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor*. Blood, 2014. 123(9): p. 1422-4.
  - 10) Finkelshtein, D., et al., *LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. 110(18): p. 7306-7311.
  - 11) Kaplan, A.H. and R. Swanstrom, *Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(10): p. 4528-32.
  - 12) Hoffmann, M., et al., *Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity*. J Gen Virol, 2010. 91(Pt 11): p. 2782-93.
  - 13) Miller, A.D., *Retrovirus packaging cells*. Hum Gene Ther, 1990. 1(1): p. 5-14.
  - 14) Cosset, F.L., et al., *High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum*. J Virol, 1995. 69(12): p. 7430-6.
  - 15) Ikeda, Y., et al., *Continuous high-titer HIV-1 vector production*. Nat Biotechnol, 2003. 21(5): p. 569-72.
  - 16) Sanber, K.S., et al., *Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production*. Sci Rep, 2015. 5: p. 9021.
  - 17) Hershfield, M.S., *Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy*. Semin Hematol, 1998. 35(4): p. 291-8.
  - 18) Apasov, S.G., et al., *Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling*. J Clin Invest, 2001. 108(1): p. 131-41.
  - 19) Ratech, H., et al., *Pathologic findings in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. I. Kidney, adrenal, and chondro-osseous tissue alterations*. Am J Pathol, 1985. 120(1): p. 157-69.
  - 20) Albuquerque, W. and H.B. Gaspar, *Bilateral sensorineural deafness in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency*. J Pediatr, 2004. 144(2): p. 278-80.
  - 21) Gaspar, H.B., et al., *How I treat ADA deficiency*. Blood, 2009. 114(17): p. 3524-32.
  - 22) Aiuti, A., et al., *Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency*. N Engl J Med, 2009. 360(5): p. 447-58.
  - 23) Gaspar, H.B., et al., *Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction*. Sci Transl Med, 2011. 3(97): p. 97ra80.
  - 24) Candotti, F., et al., *Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans*. Blood, 2012. 120(18): p. 3635-46.
  - 25) Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. 288(5466): p. 669-72.
  - 26) Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. Journal of Clinical Investigation, 2008. 118(9): p. 3132-42.
  - 27) Howe, S.J., et al., *Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients*. Journal of Clinical Investigation, 2008. 118(9): p. 3143-50.
  - 28) Wang, G.P., et al., *Dynamics of gene-modified progenitor cells analyzed by tracking retroviral integration sites in a human SCID-X1 gene therapy trial*. Blood, 2010. 115(22): p. 4356-66.
  - 29) Winkelstein, J.A., et al., *Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients*. Medicine (Baltimore), 2000. 79(3): p. 155-69.
  - 30) Ott, M.G., et al., *Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1*. Nat Med, 2006. 12(4): p. 401-9.
  - 31) Derry, J.M., H.D. Ochs, and U. Francke, *Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome*. Cell, 1994. 78(4): p. 635-44.
  - 32) Thrasher, A.J., *WASp in immune-system organization and function*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(9): p. 635-46.
  - 33) Braun, C.J., et al., *Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity*. Sci Transl Med, 2014. 6(227): p. 227ra33.
  - 34) Nagel, S., et al., *Multiple mechanisms induce ectopic expression of LYL1 in subsets of T-ALL cell lines*. Leuk Res, 2010. 34(4): p. 521-8.
  - 35) Stevenson, M. and H.E. Gendelman, *Cellular and viral determinants that regulate HIV-1 infection in macrophages*. J Leukoc Biol, 1994. 56(3): p. 278-88.
  - 36) Brady, T. and F.D. Bushman, *Nondividing cells: a safer bet for integrating vectors?* Mol Ther, 2011. 19(4): p. 640-1.
  - 37) Berry, C., et al., *Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome*. PLoS Comput Biol, 2006. 2(11): p. e157.
  - 38) Bushman, F.D., *Retroviral integration and human gene therapy*. J Clin Invest, 2007. 117(8): p. 2083-6.
  - 39) Wang, G.P., et al., *Analysis of lentiviral vector integration in HIV+ study subjects receiving autologous infusions of gene modified CD4+ T cells*. Mol Ther, 2009.

- 17(5): p. 844-50.
- 40) Cartier, N., et al., *Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy*. Science, 2009. 326(5954): p. 818-23.
- 41) Cavazzana-Calvo, M., et al., *Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia*. Nature, 2010. 467(7313): p. 318-22.
- 42) Galanello, R. and R. Origa, *Beta-thalassemia*. Orphanet J Rare Dis, 2010. 5.
- 43) Leboulch, P., *Gene therapy: primed for take-off*. Nature, 2013. 500(7462): p. 280-2.
- 44) Cavazza, A., A. Moiani, and F. Mavilio, *Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis*. Hum Gene Ther, 2013. 24(2): p. 119-31.
- 45) Yu, S.F., et al., *Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(10): p. 3194-8.
- 46) Cesana, D., et al., *Whole transcriptome characterization of aberrant splicing events induced by lentiviral vector integrations*. Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(5): p. 1667-76.
- 47) Moiani, A., et al., *Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts*. Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(5): p. 1653-66.
- 48) Bokhoven, M., et al., *Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors*. J Virol, 2009. 83(1): p. 283-94.
- 49) Knight, S., et al., *Effect of the internal promoter on insertional gene activation by lentiviral vectors with an intact HIV long terminal repeat*. J Virol, 2010. 84(9): p. 4856-9.
- 50) Collins, M.K., et al., *Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents*. J Exp Med, 1992. 176(4): p. 1043-51.
- 51) Palacios, R. and M. Steinmetz, *Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo*. Cell, 1985. 41(3): p. 727-34.
- 52) Knight, S., et al., *Safer, silencing-resistant lentiviral vectors: optimization of the ubiquitous chromatin-opening element through elimination of aberrant splicing*. J Virol, 2012. 86(17): p. 9088-95.
- 53) Aiuti, A., et al., *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. Science, 2013. 341(6148): p. 1233151.
- 54) Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. Sci Transl Med, 2011. 3(95): p. 95ra73.
- 55) Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. 365(8): p. 725-33.
- 56) Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2013. 368(16): p. 1509-18.
- 57) Maus, M.V., et al., *Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies*. Blood, 2014. 123(17): p. 2625-35.
- 58) Biasco, L., et al., *Integration profile of retroviral vector in gene therapy treated patients is cell-specific according to gene expression and chromatin conformation of target cell*. EMBO Mol Med, 2011. 3(2): p. 89-101.
- 59) Biffi, A., et al., *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy*. Science, 2013. 341(6148): p. 1233158.
- 60) Palfi, S., et al., *Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial*. Lancet, 2014. 383(9923): p. 1138-46.



# **Gene therapy using retrovirus vectors: vector development and biosafety at clinical trials**

**Knayo DOI, Yasuhiro TAKEUCHI**

MRC/UCL Centre for Medical Molecular Virology and Wohl Virion Centre,  
Division of infection and Immunity, University College London

Retrovirus vectors (gammaretroviral and lentiviral vectors) have been considered as promising tools to transfer therapeutic genes into patient cells because they can permanently integrate into host cellular genome. To treat monogenic, inherited diseases, retroviral vectors have been used to add correct genes into patient cells. Conventional gammaretroviral vectors achieved successful results in clinical trials: treated patients had therapeutic gene expression in target cells and had improved symptoms of diseases. However, serious side-effects of leukemia occurred, caused by retroviral insertional mutagenesis (IM). These incidences stressed the importance of monitoring vector integration sites in patient cells as well as of re-consideration on safer vectors. More recently lentiviral vectors which can deliver genes into non-dividing cells started to be used in clinical trials including neurological disorders, showing their efficacy. Vector integration site analysis revealed that lentiviruses integrate less likely to near promoter regions of oncogenes than gammaretroviruses and no adverse events have been reported in lentiviral vector-mediated gene therapy clinical trials. Therefore lentiviral vectors have promises to be applied to a wide range of common diseases in near future. For example, T cells from cancer patients were transduced to express chimeric T cell receptors recognizing their tumour cells enhancing patients' anti-cancer immunity.

