

using 293GPG cells; K.E. and H.E. supported experiments with their professional knowledge and experience; and M. Otsu and H.N. supervised the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Hiromitsu Nakauchi, Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai Minato-ku, 108-8639 Tokyo, Japan; e-mail: nakauchi@ims.u-tokyo.ac.jp.

References

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676.
2. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448:318-324.
3. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007;2:3081-3089.
4. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917-1920.
5. Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134:877-886.
6. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321:699-702.
7. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26:1276-1284.
8. Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009;113:5476-5479.
9. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008;133:250-264.
10. Onishi M, Kinoshita S, Morikawa Y, et al. Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol*. 1996;24:324-329.
11. Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, et al. Stable transgene expression in mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2007;15:560-565.
12. Nabekura T, Otsu M, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M. Potent vaccine therapy with dendritic cells genetically modified by the gene-silencing-resistant retroviral vector GCDNsap. *Mol Ther*. 2006;13:301-309.
13. Sanuki S, Hamanaka S, Kaneko S, et al. A new red fluorescent protein that allows efficient marking of murine hematopoietic stem cells. *J Gene Med*. 2008;10:965-971.
14. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11400-11406.
15. Kawamoto H, Ikawa T, Ohmura K, Fujimoto S, Katsura Y. T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity*. 2000;12:441-450.
16. Schlissel MS, Corcoran LM, Baltimore D. Virus-transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J Exp Med*. 1991;173:711-720.
17. Ramos CA, Zheng Y, Colombowala I, Goodell MA. Tracing the origin of non-hematopoietic cells using CD45 PCR restriction fragment length polymorphisms. *Biotechniques*. 2003;34:160-162.
18. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*. 2008;18:890-894.
19. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245.
20. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002;297:2256-2259.
21. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997;407:313-319.

造血幹細胞を標的とした 遺伝子治療法の開発

ONODERA Masafumi 小野寺雅史

国立成育医療センター研究所・成育遺伝研究部・部長

はじめに

自己と同一の細胞を創出(自己複製)し、すべての血球系細胞に分化(多分化)する造血幹細胞は、骨髄移植というかたちで最も早くから臨床応用された細胞である。また、幹細胞の能力をレシピエントの造血能再構築という明確な基準で評価できる点で、現在ある再生医療の幹細胞の定義のもととなった細胞でもある。およそ造血幹細胞移植において、投与された造血幹細胞はレシピエントの骨髄に移行し、そこで生着することで増殖・分化を繰り返し、最終的にはレシピエントの骨髄造血能を再構築するが、この骨髄腔への生着とその後の増殖こそが移植の成否を決定する重要な鍵となる。これは、以前からたとえられている、造血幹細胞を「種」、骨髄腔を「畑」とする「種と畑の関係」で捉えると理解しやすい。す

なわち、たとえ高い造血能を有する幹細胞(良い種)を投与しても、骨髄腔に十分な場所(niche)がなければ(悪い畑)、移植された幹細胞は生着しない。逆に、造血能を失った幹細胞(悪い種)では、一時的に骨髄腔には生着するが、骨髄造血能を再構築するだけの十分な増殖は起こらず、最終的に細胞は死滅し、骨髄造血は枯渇する。このように、良い種、良い畑があつてこそ、造血幹細胞移植は良い実をつける。

同様のことは造血幹細胞遺伝子治療についてもいえる。ただ、造血幹細胞遺伝子治療の場合、造血幹細胞移植とは異なり、移植する細胞が体外で遺伝子改変した自己の造血細胞であるため、移植の際に行われる前処置(畑の準備)は不必要と考えられていた。確かに、前処置なしでも治療効果を示す疾患も存在はするが、遺伝子治療の場合、体

外での細胞培養が必要で、これにより造血幹細胞の造血能は大幅に減弱し、前処置を行わない造血幹細胞遺伝子治療は、まさに「悪い種」と「悪い畑」の組み合わせで「良い実」を望むようなものであった。ただ、最近はこのような失敗のもと、導入技術の向上もあいまって、軽度の前処置を組み合わせることで、複数の疾患に対し有効な治療成績を示すようになってきている。そこで本稿では、これら問題点とその解決策を示すことで現行の造血幹細胞遺伝子治療を概説し、今後の方向性を考える。

種の改良による造血幹細胞遺伝子治療

1980年頃より始まったレトロウイルスをベクターとして用いる研究は、1983年、Joynerらのマウス造血幹細胞への外来遺伝子導入の成功¹⁾により、一気に臨床応用への機運が高まった。レトロウイルスベクターは、特性上、宿主染色体に挿入されることで、長期間外来遺伝子を感染細胞に発現させることができるため、当初よりその対象疾患として原発性免疫不全症や遺伝性血液疾患が考えられていた。しかし、ヒト造血幹細胞の特性はマウスのそれと大きく乖離し、マウスで得られた結果を単純にヒト造血幹細胞に外挿することはできず、1990年、米国国立衛生研究所で行われた世界初のアデノシン・デアミナーゼ(ADA)欠損症に対する遺伝子治療では、標的細胞として患者末梢血リンパ球が用いられた²⁾。当時、その原因として造血幹細胞の細

胞周期、ウイルス指向性、ベクターのメチル化が考えられていた。たとえば、細胞周期に関しては、レトロウイルスベクターは静止期の細胞には感染せず、また、造血幹細胞も未熟性を維持するため、細胞周期上静止期(G₀期)にある。このような状況下で感染を成立させるためには、サイトカインを用いて造血幹細胞を細胞周期に誘導しなければならないが、当時使用されていたサイトカインの組み合わせ(stem cell factor, IL-3, IL-6など)は造血幹細胞の細胞分裂は誘導するものの、同時に強い分化誘導も引き起こし、感染終了時の造血幹細胞の多くはその骨髄造血能を失っていた。また、ヒト細胞に感染するアンフォトロピック・ウイルスの受容体が、ヒト造血幹細胞ではあまり発現しておらず、造血幹細胞への感染効率の低さも指摘されていた。さらに、MoMLV由来のベクターの場合、未熟細胞内でメチル化されることが多く、たとえ感染が成立しても、時間の経過とともに外来遺伝子の発現が低下する現象(gene silencing)もその原因と考えられていた。

これら諸問題に対し、次の10年間に血液学、ウイルス学を含むさまざまな分野で複数の発見がなされ、それらが遺伝子治療の分野に応用されていった。たとえば、サイトカインに関しては、未熟性を維持しながら、造血幹細胞の細胞分裂を促すトロンボポイエチン(TPO)やFlt3リガンドが遺伝子導入の際に使用され、また、造血幹細胞への感染効率を高めるために異なったエンベロープを有するウイルスやウイルス粒子と造血幹細胞を架橋するフィ

ブロネクチンも開発された。そして、これら技術革新によって高い造血能を有する遺伝子導入造血幹細胞(良い種)が準備され、2000年、フランス X 連鎖重症複合免疫不全症(SCID-X1)に対する造血幹細胞遺伝子治療において画期的な治療成績を収めるに到った³⁾。ただ、SCID-X1は造血幹細胞遺伝子治療において特殊な例であり、同様な方法を用いてもほかの疾患に対してはほとんど有効な臨床効果を示すことはなかった。これは、これら技術革新があくまでも良い種を作るための造血幹細胞に向けられたもので、良い畑を作るために向けられたものではなかったためである。

畑の改良による造血幹細胞遺伝子治療

確かに、サイトカインを含めた遺伝子導入法の改良により、造血能を保持したままヒト造血幹細胞に治療遺伝子を導入できるようになり、SCID-X1では劇的な治療効果を見た。ただ、ADA欠損症や慢性肉芽腫症(CGD)では、これら改良遺伝子導入法を用いてもSCID-X1でみられたような有効な治療効果は確認されなかった。これは、ADA欠損症の場合、全くT細胞が存在しないSCID-X1とは異なり、少数ながらも患者体内にT細胞が存在するため、ことにCGDでは、疾患の原因が顆粒球の機能異常であり、患者顆粒球数は健常人と同程度存在することから、患者骨髄腔はこれら細胞により埋められており、骨髄腔に遺伝子導入細胞生着のためのスペース(niche)が

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の開発

ほとんどないことが原因と考えられた。このようななか、2002年、イタリアのグループが ADA 欠損症患者に対して、遺伝子導入造血幹細胞投与前に骨髓抑制作用があるブスルファン (busulfan ; BUS) を投与する造血幹細胞遺伝子治療を開始した⁴⁾。その結果、現在まで10名中8名で劇的に免疫能が回復し⁵⁾、また、同様の結果が、前処置を行った CGD 症例においても確認された⁶⁾。現在では、造血幹細胞移植同様、造血幹細胞遺伝子治療においても前処置は必要であり、遺伝子治療の成功には良い種と良い畑がともに

必要であると認識されている。

成功する 造血幹細胞遺伝子治療に向けて

ここでは、これまで述べてきた種と畑の関係から再度、造血幹細胞遺伝子治療の成功要因を考える(図1)。種である造血幹細胞に関しては、細胞培養により失われる未熟性の保持はもとより、遺伝子導入細胞の非遺伝子導入細胞(もともとの患者細胞)に対する増殖優位性が重要である。およそ造血幹細胞遺伝子治療において、体外で遺伝子

修飾を受けた患者造血幹細胞の数は体内に存在する非遺伝子導入細胞に比べてきわめて少数であり、もし、これら遺伝子導入細胞の増殖力が非遺伝子導入細胞より低い場合、患者体内で時間とともにその割合は低下し、最終的に治療効果は望めないことになる。一方、遺伝子導入細胞が高い増殖優位性を示せば、移植当初はごく少数でも、時間とともにその割合を増し、最終的に治療効果を示すほどの増加が期待できる。このような増殖優位性は ADA 欠損症や SCID-X1 などで確認できるが、CGD では造血幹細胞レベルでの増殖

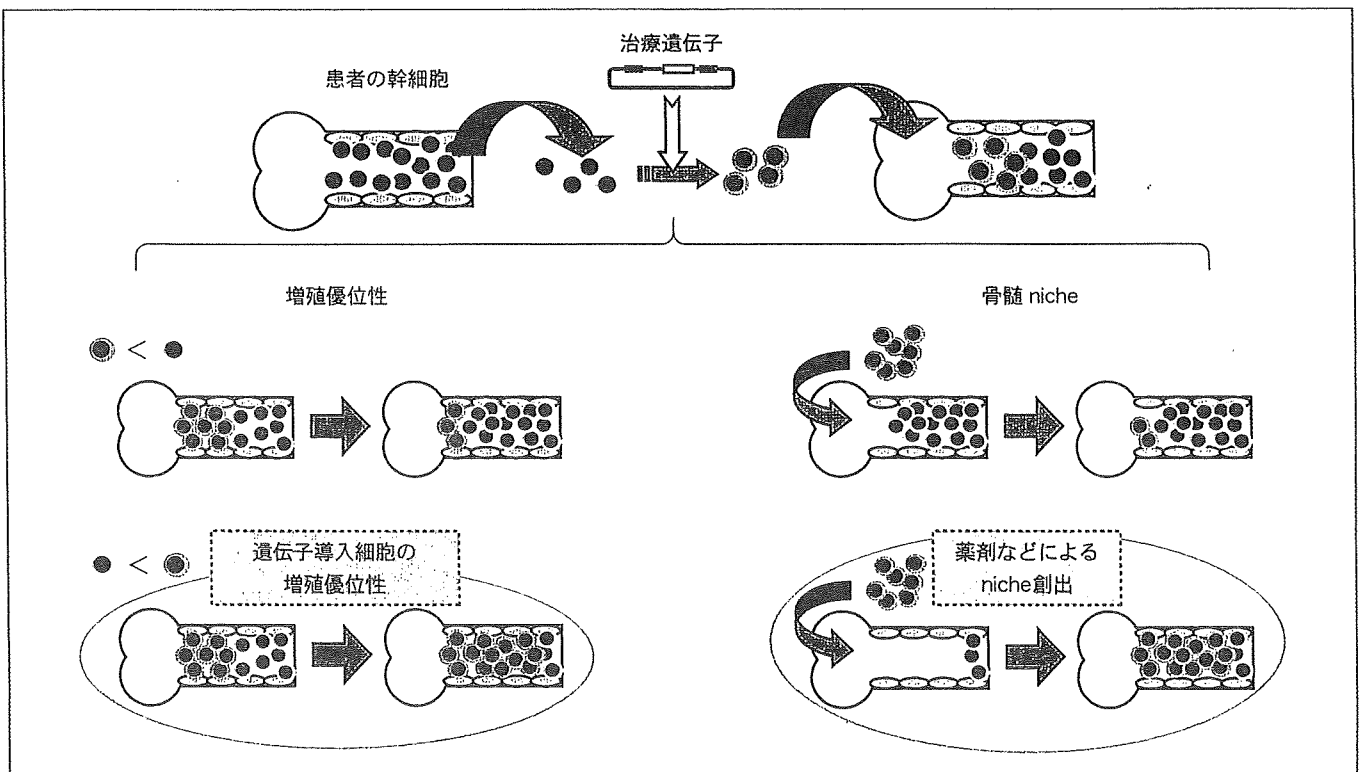


図1 造血幹細胞遺伝子治療の原理と成功の要因

造血幹細胞遺伝子治療では、患者骨髓より幹細胞を回収し、レトロウイルスベクターにて治療遺伝子を導入したのち、再び患者に投与する(上段)。遺伝子導入細胞(●)が残存する患者細胞(○)より増殖力が低いときは、時間とともに遺伝子導入細胞の比率が低下する(中段左)。このため、遺伝子導入細胞の増殖優位性が必要となる(下段左)。一方、骨髓中にスペース(骨髓 niche)がなければ、移植した細胞は生着しない(中段右)。このため、薬剤による niche の創出が必要となる(下段右)。

優位性はなく、治療成功のためには次に述べる畑である骨髄 niche が重要になってくる。

骨髄 niche の重要性に関しては、原発性免疫不全症に対する HLA 一致幹細胞移植がそのよい例である⁷⁾。現在、これら疾患に対する幹細胞移植は、HLA 一致ドナーが存在する場合は前処置を行わず、幹細胞が移植される。ただ、ADA や SCID-X1 のように患者体内に B 細胞が存在する例では、ドナー幹細胞は T 細胞(+NK 細胞)のみに分化し、B 細胞系は分化しない。これは、たとえドナー細胞が患者細胞より増殖優位性を示しても、ドナー細胞が生着する際、残存する患者細胞を押し退けるのではなく、空いているスペース(niche)を利用することを意味している。すなわち、ADA 欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療で BUS を使用した理由は、患者体内に少ないながら存在する T 細胞に分化する患者造血幹細胞を排除し、遺伝子導入細胞生着のための niche を準備するた

めのものである。同様のことは CGD にもいえるが、CGD の場合、顆粒球はもとより T 細胞、B 細胞も存在しているため、ADA 欠損症で使用される BUS のほぼ 4 倍の量を必要とする。このような、造血幹細胞遺伝子治療においては、造血能を有した遺伝子導入幹細胞のみならず、これら細胞の生着に関する骨髄 niche が必要であり、BUS などの前処置は、良い種が根付くための良い畑を準備するために必要な手段であると考えられている。

おわりに

現行の造血幹細胞遺伝子治療は、改良された遺伝子導入法と BUS などの前処置を組み合わせ、複数の遺伝性疾患に対して一定の治療成績を挙げている。特に、ADA 欠損症に関しては、適当なドナーが見つからない患者に対しての治療の選択肢ともなっている。ただ、治療効果を示すための増殖優位性は、時に無秩序な増殖につながり、遺伝子導入細胞が腫瘍化することもあ

る。実際、SCID-X1 で造血幹細胞遺伝子治療を受けた患者 5 名で T 細胞系の腫瘍を発症した⁸⁾。90 年代より始まった造血幹細胞遺伝子治療は、20 年を経て有効な治療法へと転換したが、今後は有効性のみではなく、より安全な治療への変貌が望まれる。

References

- 1) Joyner A et al : *Nature* 305 : 556-558, 1983
- 2) Blaese RM et al : *Science* 270 : 475-480, 1995
- 3) Cavazzana-Calvo M et al : *Science* 288 : 669-672, 2000
- 4) Aiuti A et al : *Science* 296 : 2410-2413, 2002
- 5) Aiuti A et al : *N Engl J Med* 360 : 447-458, 2009
- 6) Ott MG et al : *Nat Med* 12 : 401-409, 2006
- 7) Dvorak CC, Cowan MJ : *Bone Marrow Transplant* 41 : 119-126, 2008
- 8) Hacein-Bey-Abina S et al : *Science* 302 : 415-419, 2003

小児科 第50巻 第7号 (平成21年6月30日発行) 別冊

Pediatrics
of Japan

小児科

特集：小児疾患における臨床遺伝学の進歩

小児における遺伝子治療

小野寺 雅 史

金原出版株式会社

小児における遺伝子治療

小野寺雅史* (おのてらまさふみ)

*国立成育医療センター研究所・成育遺伝研究部

要旨

1990年、アデノシン・デアミナーゼ (ADA) 欠損症に対して始まった遺伝子治療は、現在までがんや心血管系疾患を中心におよそ1,500の臨床研究を数える。ただ、これら疾患は複数の遺伝子が複雑に絡み合っており発症するため、単一遺伝子による治療効果は十分ではない。一方、小児難治性疾患では単一遺伝病が多いため、正常遺伝子導入による責任遺伝子の機能回復は十分に可能で、遺伝子治療はこれら疾患に対し劇的な治療効果を示す。このように、小児難治性疾患に対する遺伝子治療の歴史は遺伝子治療の歴史でもあり、今後も小児難治性疾患に対する遺伝子治療の動向が遺伝子治療全体の流れを決定していくものと思われる。

Key words : 原発性免疫不全症, レトロウイルスベクター, 造血幹細胞, 遺伝子導入, niche

はじめに

小児難治性疾患の多くは、責任遺伝子の異常が直接病気の発症につながる単一遺伝病であり、異常遺伝子の機能解析が病態の発症機序解明にもつながり、そこから得られる結果を基に新たな治療法が開発される疾患でもある。例えば、糖脂質やアミノ酸を代謝する酵素異常の先天性代謝異常症は、その治療法として責任遺伝子がコードする正常な酵素を遺伝子組み換え蛋白として投与する酵素補充療法が行われ、劇的な治療効果を上げている。同様に、治療遺伝子を患者細胞に組み込むことで疾患の治療にあたる遺伝子治療も、その開発当初より小児難治性疾患に対する根治療法として期待され、1990年、米国国立衛生研究所 (NIH) で行われたアデノシン・デアミナーゼ (ADA) 欠損症に対する遺伝子治療¹⁾より、現在まで120を超える臨床研究が単一遺伝病に対して行われ²⁾、症例によっては根治療法とよべるほどの治療効果を上げている³⁾⁴⁾。ただ、X連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1) での白血病の発症⁵⁾や、オルニチン・トランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症での過剰なベクター投与による肝障害からの患者死

亡⁶⁾など、臨床効果が報告される一方で、安全面に関してはいまだ多くの課題を残している。

本稿では、現在までに行われた単一遺伝病に対する遺伝子治療を紹介し、今後の方向性を考える。

I 遺伝子治療とは

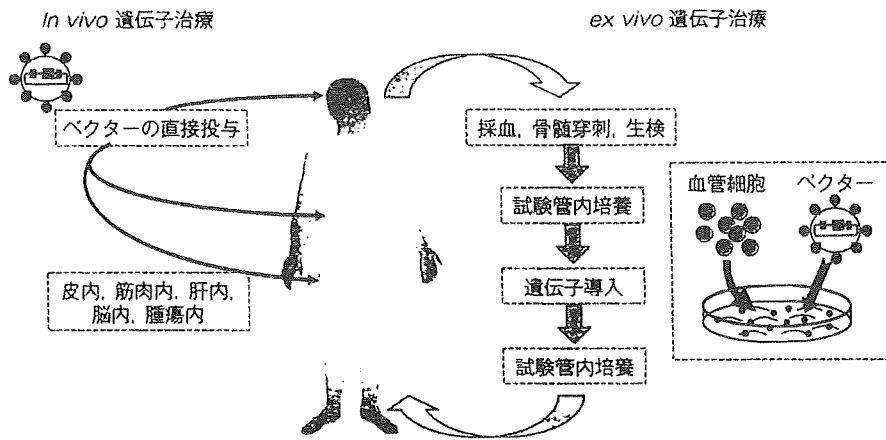
ヒトゲノム計画が終了し、今後はその情報を基に疾患に対する新たな治療の開発が望まれるところではあるが、「疾患の治療を目的に遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と定義される遺伝子治療は、その第一候補として考えられている。遺伝子治療の利点は、遺伝子自体を薬とするため疾患の根本治療が可能で、また、化学物質や生物製剤とは異なり、発現時間が長いことから治療効果の持続性が期待できることにある。現在、遺伝子治療は、導入法やその標的細胞により複数に分類されている (図)。

1. 導入場所による分類

a. *in vivo* 遺伝子治療

アデノウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) あるいはリポソームなど、一般的には

1. 導入場所による分類



2. 導入細胞による分類

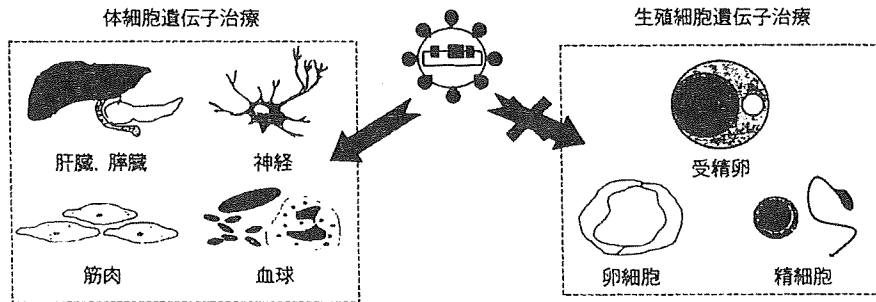


図 遺伝子治療の分類

宿主染色体に組み込まれないベクターを用いて治療遺伝子を直接患者体内（肝臓，筋肉，脳実質など）に投与する方法である。遺伝子が導入される細胞は投与された局所の細胞に限られるため，血管系や神経・筋疾患ならびに固形腫瘍に対して行われる。ベクターを直接患部に投与するため，技術的には比較的容易で，また，投与するベクター量も限られるためコスト面での利点もある。ただ，ウイルスベクターの場合，感染部位が患者体内であることから，安全性は担保されず，時に強い免疫反応を引き起こす。

b. ex vivo 遺伝子治療

レトロウイルスやレンチウイルスなど宿主染

色体に挿入されるウイルスベクターを用いて，患者から採取した細胞に治療遺伝子を試験管内で導入し，再び患者に投与する方法である。この方法を *in vitro* (試験管内) 遺伝子治療とよばない理由は，細胞回収から遺伝子導入，患者投与を一連の流れと考え，試験管内も患者の一部 (生体外 *ex vivo*) と考えているためである。標的細胞としては，増殖能を有する造血幹細胞や末梢血 T 細胞が主体となり，患者投与後にこれら細胞が患者体内に生着することで，遺伝子導入細胞の分布は全身に及ぶこととなる。対象疾患は造血幹細胞移植が治療の第 1 選択となる原発性免疫不全症や免疫療法が有効ながんやウ

表1 単一遺伝性疾患に対する遺伝子治療一覧

| 疾患 | 遺伝子 | ベクター | 標的細胞 |
|---------------------------|--|----------------------------|-------------------|
| 網膜色素変性症 | RPE65 | AAV | 網膜 |
| 血友病 | F8, F9 | AAV, Retro, Adeno, plasmid | 線維芽細胞, 筋肉, 肝臓, 静注 |
| サラセミア | β -globin | Lenti | 造血幹細胞 |
| Fanconi 貧血 | FANCA | Retro | 造血幹細胞 |
| SCID-X1 | γ c | Retro | 造血幹細胞 |
| ADA 欠損症 | ADA | Retro | 造血幹細胞, 末梢血 T 細胞 |
| PNP 欠損症 | PNP | Retro | 造血幹細胞 |
| JAK3 欠損症 | JAK3 | Retro | 造血幹細胞 |
| WAS | WASP | Retro, Lenti | 造血幹細胞 |
| CGD | gp91 ^{phox} , p47 ^{phox} | Retro | 造血幹細胞 |
| LAD | CD18 | Retro | 造血幹細胞 |
| MPS I (Hurler) | IDUA | Retro | 線維芽細胞, 造血幹細胞 |
| MPS II (Hunter) | IDS | Retro | 造血幹細胞 |
| MPS VII (Sly) | β -glucuronidase | Lenti | 造血幹細胞 |
| Fabry 病 | α -galactosidase | Retro | 間質系幹細胞 |
| Gaucher 病 | glucocerebrosidase | Retro | 造血幹細胞 |
| OTC 欠損症 | OTC | Adeno | 肝細胞 |
| 家族性高脂血症 | LDLR | Retro | 肝細胞 |
| LPL 欠損症 | LPL | AAV | 筋細胞 |
| α 1antitrypsin 欠損症 | ATA | Retro, AAV | 造血幹細胞, 筋細胞 |
| Canavan 病 | ASPA | AAV, plasmid | 脳実質 |
| Duchenne | dystropin, antisense | AAV, plasmid | 筋細胞 |
| 肢帯型筋ジストロフィー | α - γ -sarcoglycan | AAV | 筋細胞 |
| Huntington 舞踏病 | CNTF | plasmid | 脳実質 |
| 副腎白質ジストロフィー | ALD | Lenti | 造血幹細胞 |
| 筋萎縮性側索硬化症 | EAAT2 | AAV | くも膜下内 |
| 嚢胞性線維症 | CFTR | AAV, Adeno, plasmid | 気管内 |
| 先天性表皮水疱症 | Laminin5, VIIcollagen | Retro | 皮膚, 角化細胞 |

SCID-X1: X連鎖重症複合免疫不全症, ADA 欠損症: アデノシン・デアミナーゼ欠損症, PNP 欠損症: プリンヌクレオシド・ホスホリパーゼ欠損症, WAS: Wiskott-Aldrich 症候群, CGD: 慢性肉芽腫, LAD: 白血球接着不全症, MPS I: ムコ多糖症I型, MPS II: ムコ多糖症II型, MPS VII: ムコ多糖症VII型, OTC 欠損症: オルニチン・トランスカルバミラーゼ欠損症, LPL 欠損症: リポ蛋白リパーゼ欠損症

ウイルス感染症が主となる。宿主染色体の挿入されることで、治療効果が長期化する反面、一度投与した細胞を排除することができず、腫瘍化の際には問題となる。また、体外での細胞調整に一定の培養技術が要求される。

2. 導入細胞による分類

a. 体細胞遺伝子治療

血球, 肝臓, 神経, 筋肉など体細胞を標的とした遺伝子治療である。

b. 生殖細胞遺伝子治療

受精卵など生殖細胞を標的とした遺伝子治療

である。これら遺伝子改変は患者のみならず、次世代にも影響を与えるため、現行の遺伝子治療では禁止されている。ただ、*in vivo* 遺伝子治療のように直接ウイルスベクターを患者体内に投与する方法では、残存するウイルス粒子が血流などにより生殖器官まで移行し、そこで生殖細胞に感染する危険性は否定できない。そのため、現行の遺伝子治療臨床研究では、投与後の患者体内におけるウイルスの存在確認が義務付けられ、患者に対しては数年間の避妊をお願いしている。

表2 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子治療

| 疾患 | 実施国 | ベクター | 標的細胞 | 前処置* | 患者数 |
|----------|------|-----------|---------|--------|-----|
| ADA 欠損症 | イタリア | GIADA1 | 骨髄 CD34 | 1 | 13 |
| | 米国 | GCsapMADA | 骨髄 CD34 | — | 6 |
| | | MNDADA | | | |
| | 英国 | SFada/W | 骨髄 CD34 | 2 | 5 |
| | 日本 | GCsapMADA | 骨髄 CD34 | — | 2 |
| SCID-X1 | フランス | MFG | 骨髄 CD34 | — | 12 |
| | 英国 | MFG | 骨髄 CD34 | — | 11 |
| | 米国 | MFG | 骨髄 CD34 | — | 3 |
| Jak3 欠損症 | 米国 | MSCV | 骨髄 CD34 | — | 1 |
| X-CGD | 英国 | MFG-gp91 | 骨髄 CD34 | 2 | 1 |
| | 欧州** | SFG-gp91 | 末梢 CD34 | 1 or 2 | 8 |
| | 米国 | MFG-gp91 | 末梢 CD34 | 1 | 2 |
| WAS | ドイツ | SFG-WASp | 末梢 CD34 | 1 | 2 |

*1: プスルファン, 2: メルファラン, **英国 5 例 + ドイツ 3 例

II 遺伝子治療の実際

現在まで数多くの単一遺伝病に対し、種々のベクターを用いて遺伝子治療臨床研究が行われているが(表1)、実際に治療効果を示しているのは原発性免疫不全症に対する遺伝子治療のみである。ここでは、原発性免疫不全症を中心にその臨床研究を説明する。

1. 原発性免疫不全症

原発性免疫不全症に対する遺伝子治療を表2に示す。ただ、ここに示すのは2000年以降に行われた造血幹細胞遺伝子治療であり、それ以前に行われた遺伝子治療は含まれていない。これは、2000年を境に遺伝子治療のプロトコルが大きく変わったためであり、とくに、以前は行っていなかった前処置が、遺伝子導入細胞の骨髄生着には必須と考えられ、積極的にプロトコルに取り入れられたためである。これにより、治療効果は劇的に改善し、疾患によってはHLA適合ドナーの見つからない患者に対する有効な治療法と認められるようになった。

a. ADA 欠損症

ADAはヌクレオチドの分解過程で生成されるプリン代謝産物のdeoxyadenosineをdeoxyinosineに変換する核酸代謝酵素で、ADAの活性低下によりdeoxyadenosineが蓄積し、これらリン酸化合物(dATP)が主に胸腺細胞に傷害を与え、T細胞不全を主体とするSCIDが発症する。このため、遺伝子治療においては異常ADA遺伝子を正常ADA遺伝子に置換することが理想的であるが、このような技術ははまだ確立されておらず、現行では異常遺伝子はそのままに、責任遺伝子の正常型を導入する方法が採られている。

使用するベクターは、治療効果の永続性を期待して宿主染色体の挿入されるレトロウイルスベクターであり、標的細胞としては、自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞である。ただ、ADA欠損症ではミスセンス変異が多いため、少ないながらも細胞内にADA活性を認め、患者末梢血中にはT細胞がわずかながらも存在する。また、ADA欠損症にはウシ由来のADAをポリエチレン・グリコールで包埋したPEG-ADAの酵素補充療法が存在し、これによ

り患者末梢血 T 細胞はさらに増加する。このような状況下で、遺伝子導入細胞を投与しても、骨髓腔には投与された細胞が生着する場所（骨髓間隙, niche）は存在せず、投与された細胞は治療効果を発揮前に死滅する。このため、現在では積極的にブスルファンなどの抗がん剤を前処置として使用し、遺伝子導入細胞生着のための niche を創出している。

b. SCID-X1

SCID-X1 は IL-2, -4, -7, -9, -15, -21 などのサイトカイン受容体に共通する γ 鎖 (γ c) をコードする遺伝子に変異があり、胸腺細胞の成熟障害による T 細胞, NK 細胞の欠如ならびに B 細胞の機能不全をきたす疾患で、生下時より無菌室での管理を余儀なくされるため「パブルボーイ」とよばれている疾患でもある。

SCID-X1 は ADA 欠損症とは異なり、T 細胞を完全に欠如している。このため、遺伝子導入細胞生着のための niche はもともと存在しており、抗がん剤による前処置を必要としない。実際、フランスや英国で行われた遺伝子治療においては、前処置を行わずに遺伝子導入細胞が投与され、長期にわたる遺伝子導入細胞の生着と治療効果を確認している。しかし、このような理想的な状況は、逆に遺伝子導入細胞の無制限な増殖を許し、現在までに遺伝子治療を受けた 23 名中 5 名の患者に T 細胞系の白血病を発症している。もちろん、この腫瘍化には γ c 遺伝子や挿入部位近傍遺伝子の LMO-2 遺伝子の関与が考えられるが、免疫サーベイランスの観点から T 細胞完全欠如の SCID-X1 で腫瘍発生が多いことは十分に理解できる。

c. 慢性肉芽腫症 (CGD)

CGD は、活性酸素産生に必要な NADPH oxidase に異常があり、食細胞が細菌や真菌貪食後の殺菌を行えず、感染が遷延する疾患である。NADPH oxidase は、細胞膜チトクロム b558 の gp91^{phox}, p22^{phox} と細胞質成分の p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, rac からなる複合酵素であり、いずれの

遺伝子異常でも CGD を発症する。ただ、わ国では X 染色体に gp91^{phox} をコードしている CYBB 遺伝子に変異がある X-CGD の頻度もっとも多く、全 CGD の約 8 割を占める。

CGD は食細胞の機能異常であり、食細胞の分化・増殖に影響を与えないため、患者体内には健康人と同等数の食細胞が存在し、遺伝子導入細胞のための niche は存在しない。このため、遺伝子治療に際しては、より強力な抗がん剤による前処置が必要である。現在、主に用いられている前処置は体重あたり 8~10 mg のブスルファンの投与であり、これにより以前は確認されなかった遺伝子導入細胞の年を越える骨髓生着が確認され、治療前にみられた肝腫瘍や肺腫瘍の治療例も報告されている⁷⁾。

d. Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)

WAS も CGD 同様、原発性免疫不全症の中では発症頻度の多い疾患であり、易感染性、湿疹、血小板減少を特徴とする X 連鎖型の免疫不全症である。原因遺伝子はアクチンの制御など細胞骨格にかかわる WASP 遺伝子で、異常が免疫系に限定しない分、症状が多岐にわたり、SCID のような重篤の免疫不全状態はきたさない。このため、ドイツで行われている遺伝子治療では、CGD と同様に強力な前処置が行われ、感染症の軽減や湿疹の改善など一定の治療成績を上げている⁸⁾。また、イタリアのグループもレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療を計画しており、今年度中 (2009 年) に実施する予定である。

2. 免疫不全以外の疾患

a. 血友病

血友病も遺伝子治療開始当初より適当な対象疾患として研究されている疾患である。これは、治療効果の判定が凝固活性を測定することで容易に行えることや、およそ正常の 2~3% の活性で臨床症状が軽減され、30% 以上の活性でほぼ通常の生活を送ることが可能なためである。同時に、第 XI 因子の場合、遺伝子の大きさ

が1.4 Kb と小さく (第V因子は8 Kb 以上), 発現ベクターの構築が容易なことにもよる。ただ, 実際には動物実験のような良好な結果を示した症例はなく, 今のところ遺伝子治療の有効性は確認されていない。唯一, 投与後3年を超えて投与部の筋肉に導入遺伝子の存在と第XI因子の発現を認めた症例もあるが, これら症例でも凝固能の改善は認めておらず⁹⁾, 現在では筋肉内投与では十分量の発現が得られないと考え, 肝臓などの別の臓器への投与が検討されている。

b. Fanconi 貧血

Fanconi 貧血は, 再生不良性貧血を呈する先天性の骨髄形成不全症であり, 染色体の脆弱性のため白血病を起こしやすい疾患である。原因遺伝子は最近, 新たな遺伝子 (*FANCI*) が同定され13となった。そのうちもっとも頻度が多いグループA (*FANCA*) が治療の対象となっている。治療法は原発性免疫不全症と同様に患者造血幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて *FANCA* 遺伝子を導入する方法が採られている¹⁰⁾。ただ, Fanconi 貧血の場合, 診断時に造血幹細胞の数が極端に減っていることや培養による細胞操作により容易に細胞死を起こすことから, 原発性免疫不全症のような治療効果は得られてはいない。

おわりに

表1に示したように, 現在までさまざまな小児難治性疾患に対して遺伝子治療が行われている。ただ, 血友病の例をみるまでもなく, その多くは動物などを用いた前臨床研究とは大きく異なり, ほとんど治療効果を示していない。これは, 造血幹細胞遺伝子治療の際に指摘されていたことだが, 免疫系をはじめとするヒトの防御機構が他の生物と大きく異なるためで, 動物

実験の結果を単純にヒト臨床研究に外挿することはできないことを示唆している。もちろん, 臨床研究の安全性の見地から動物実験は必須ではあるが, 最終的にはヒトのデータはヒトから得られることを銘記し, 今後も患者の risk/benefit balance を十分に考慮しながら, 臨床研究を進めていくことが肝要であると思われる。

文献

- 1) Blaese RM et al : T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. *Science* 1995 ; 270 : 475-480
- 2) <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
- 3) Cavazzana-Calvo M et al : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000 ; 288 : 669-672
- 4) Aiuti A et al : Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 447-458
- 5) Hacein-Bey-Abina S et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after therapy for SCID-X1. *Science* 2003 ; 302 : 415-419
- 6) Raper SE et al : Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene therapy. *Mol Gene Metab* 2003 ; 80 : 148-158
- 7) Ott MG et al : Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS-EV1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006 ; 12 : 401-409
- 8) Dewey RA et al : Retroviral WASP gene transfer into human hematopoietic stem cells reconstitutes the actin cytoskeleton in myeloid progeny cells differentiated in vitro. *Exp Hematol* 2006 ; 36 : 1161-1169
- 9) Manno CS et al : AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003 ; 101 : 2963-2972
- 10) Kelly PF et al : Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 211-219

Kinetics and Effect of Integrin Expression on Human CD34⁺ Cells During Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy

Yasuomi Horiuchi,¹ Masafumi Onodera,² Yoshitaka Miyagawa,¹ Ban Sato,¹ Keiko Onda,¹ Yohko U. Katagiri,¹ Hajime Okita,¹ Mayumi Okada,³ Makoto Otsu,⁴ Akihiro Kume,⁵ Torayuki Okuyama,⁶ Junichiro Fujimoto,⁷ Tadatoshi Kuratsuji,⁷ and Nobutaka Kiyokawa¹

Abstract

The CH-296 recombinant fragment of human fibronectin is essential for murine leukemia virus (MLV)-derived retroviral transduction of CD34⁺ cells for the purpose of stem cell gene therapy. Although the major effect of CH-296 is colocalization of the MLV-derived retrovirus and target cells at specific adhesion domains of CH-296 mediated by integrins expressed on CD34⁺ cells, the precise roles of the integrins are unclear. We examined the kinetics of integrin expression on CD34⁺ cells during the course of MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction with CH-296. Flow cytometry revealed that the levels of both very late activation protein (VLA)-4 and VLA-5 on CD34⁺ cells freshly isolated from cord blood were insufficient for effective MLV-derived retroviral transduction. However, increases were achieved during culture for preinduction and MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction in the presence of a cocktail of cytokines. In addition, we confirmed by using specific antibodies that inhibition of the cell adhesion mediated by the integrins significantly reduced transduction efficiency, indicating that integrin expression is indeed important for CH-296-based MLV-derived retroviral transduction. Only a few cytokines are capable of inducing integrin expression, and stem cell factor plus thrombopoietin was found to be the minimal combination that was sufficient for effective transduction of an MLV-derived retrovirus based on CH-296. Our findings should be useful for improving the culture conditions for CH-296-based MLV-derived retroviral transduction in stem cell gene therapy.

Introduction

STEM CELL GENE THERAPY in which a defective gene in some hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) is replaced with a functional copy can reconstitute the immune system and is therefore expected to be an effective treatment for inherited immunodeficiencies. Indeed, clinical trials in children with severe combined immunodeficiency (SCID), adenosine deaminase (ADA) deficiency, and chronic granulomatous disease (CGD) have been successful (Onodera *et al.*,

1998; Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Ariga *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006).

Murine leukemia virus (MLV)-derived retroviral vectors are used to place a functional copy of a gene in HSPCs. Although MLV-derived retroviruses have the ability to introduce and express genes stably in the host cell genome, applicable protocols in humans have been limited because of the low gene transfer efficiency achieved (Bodine *et al.*, 1998). However, the development and application of a truncated form of recombinant human fibronectin (CH-296

¹Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan.

²Laboratory of Genetic Diagnosis and Gene Therapy, Department of Genetics, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan.

³Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Higashiyamato Medical Center for the Severely Disabled Japan, Tokyo 207-0022, Japan.

⁴Laboratory of Stem Cell Therapy, Institute of Medical Science of the University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan.

⁵Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan.

⁶Department of Clinical Laboratory Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan.

⁷National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan.

[RetroNectin; Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) have significantly improved the efficiency of transduction of MLV-derived retroviral vectors into reconstituting hematopoietic stem cells (Kimizuka *et al.*, 1991).

CH-296 is a recombinant fragment of human fibronectin composed of the cell-binding domain (C domain), heparin-binding domain II (H domain), and CS1 site. The H domain was found to bind MLV-derived retroviral particles, and the RGD sequence in the C domain and the LDV sequences in the CS1 site are recognized by a variety of cell types through integrins $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) and $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), respectively. Consequently, CH-296 is capable of enhancing MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction by binding to both MLV-derived retroviral particles and target cells that express VLA-5 and/or VLA-4 (Hanenberg *et al.*, 1996, 1997).

The practical effects of CH-296 on MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction into HSPCs have been well established in both basic biological experiments and clinical trials of stem cell gene therapy using MLV-derived retroviral vectors (Ariga *et al.*, 2001). However, the actual effects of integrins expressed on HSPCs on MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction with CH-296 have not been well characterized. Although differences in integrin expression on HSPCs should significantly affect the efficiency of MLV-derived retroviral gene transduction and thus greatly influence the success of clinical trials of stem cell gene therapy, the details remain unclear, and investigating the kinetics of integrin expression on HSPCs during their manipulation for gene transduction should help to improve stem cell gene therapy.

In this paper we present evidence that CD34⁺ cells freshly isolated from cord blood express only small amounts of integrins, but that they accumulate integrins during culture for preinduction and MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction in the presence of a cocktail of cytokines. We also confirmed the effect of integrin levels on CH-296-based MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction in human CD34⁺ cells and attempted to identify the minimal combination of cytokines that would allow effective integrin expression sufficient for MLV-derived retrovirus-mediated gene transduction.

Materials and Methods

Reagents, cells, and cell culture

The cord blood was distributed by the Tokyo Cord Blood Bank (Tokyo, Japan) and had originally been collected and stored for stem cell transplantation. Stocks inappropriate for transplantation because they contained too few cells were distributed for research use with the informed consent of the donor and the permission of the ethics committee of the Tokyo

Cord Blood Bank. All the experiments in which cord blood was used in this study were performed with the approval of the local ethics committee. After isolating mononuclear cells from the cord blood by density gradient centrifugation with Ficoll-Hypaque, immunomagnetic enrichment of CD34⁺ cells was performed with a magnetic-activated cell-sorting (MACS) system according to the instructions of the manufacturer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

X-VIVO 10 (Lonza Walkersville, Walkersville, MD) containing 1% human albumin and a cytokine cocktail consisting of stem cell factor (SCF, 50 ng/ml), thrombopoietin (TPO, 50 ng/ml), Flt3 ligand (FL, 300 ng/ml), interleukin-6 (IL-6, 100 ng/ml), and soluble IL-6 receptor (sIL-6R, 500 ng/ml) was used for pretransduction and maintenance of the CD34⁺ cells *ex vivo*. In some experiments the cytokines were used alone or in combinations of fewer cytokines than in the complete cocktail, as indicated in the figures. All the cytokines used in this study were purchased from PeproTech EC (London, UK).

Viral supernatants were obtained from P13/DNEGFP cells developed from PG13 packaging cells transfected with pGCDN₅ap (DNEGFP), as described previously (Suzuki *et al.*, 2002), and used as the MLV-derived retroviral vector for enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression. PG13 is a retrovirus-packaging cell line derived from TK-NIH/3T3 cells and stably expresses the gibbon ape leukemia virus (GALV) envelope glycoprotein of this virus for pseudotyping of the MLV vectors that are transfected in these cells. The viral titer was determined with HT-1080 cells (American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA).

The monoclonal antibodies (mAbs) used for immunofluorescence analysis were as follows: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD49d and anti-CD49e from BD Biosciences (San Jose, CA), and PE-conjugated anti-CD29 and PE-cyanine 5 (PC-5)-conjugated anti-CD34 from Beckman Coulter (Fullerton, CA).

Transduction of CD34⁺ cells

CD34⁺ cells isolated from cord blood were suspended at a concentration of 1×10^6 cells/ml in X-VIVO 10 and cultured for 48 hr, as preinduction; in the presence of the cytokines described previously. To transduce CD34⁺ cells with the EGFP expression vector, 1×10^5 cells were resuspended in 1 ml of diluted P13/DNEGFP supernatant supplemented with the cytokines used for preinduction and plated in retroviral-precoated 35-mm dishes. After incubation for 12 hr the cells were collected by centrifugation ($200 \times g$ for 5 min) and washed once with X-VIVO 10 medium. The cells were then cultured for 48 hr in X-VIVO 10 supplemented with the same cytokines as used for induction. In this experiment, only a single induction was performed to identify the effect of the reagents.

TABLE 1. RESULTS OF COLONY ASSAYS

| | SCF | TPO | Flt3 ligand | IL-6, sIL-6R | SCF, TPO | SCF, TPO, Flt3 ligand, IL-6, sIL-6R |
|----------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|-------------------------------------|
| All colonies | 48.7 ± 1.2 | 43.0 ± 1.4 | 36.3 ± 5.3 | 33.0 ± 5.0 | 67.3 ± 1.7 | 71.7 ± 3.9 |
| GFP positive | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 ± 4.2 | 9.7 ± 1.5 |
| Large colonies | 15.3 ± 1.7 | 13.3 ± 2.1 | 13.7 ± 3.1 | 10.0 ± 0.8 | 16.7 ± 1.2 | 25.7 ± 1.2 |
| GFP positive | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.3 ± 1.7 | 5.3 ± 0.9 |

Abbreviations: IL-6, interleukin 6; SCF, stem cell factor; sIL-6R, soluble IL-6 receptor; TPO, thrombopoietin.

All the transduction assays in this study were performed at a multiplicity of infection (MOI) of 1.

In some experiments, purified mAbs against CD49d and/or CD49e (1 μ g/ml, Beckman Coulter; both capable of inhibiting the cell adhesion mediated by their target molecule) were added to the culture 10 min before MLV-derived retroviral induction to assess the effect of inhibition of integrin-mediated cell adhesion.

The colony assay was performed with Methocult GF+ H4435 (StemCell Technologies, Northampton, UK). After MLV-derived retroviral transduction, 3×10^2 CD34⁺ cells were suspended on 1 ml of Methocult and plated in 35-mm dishes. The number of colonies comprising more than 50 cells, including erythroid colonies, was scored after incubation for 21 days. The experiments were performed in triplicate, and colony numbers (means \pm SD) are indicated in Table 1.

Immunofluorescence study

After cultivation periods the cells were stained with fluorescence-labeled mAbs and analyzed by flow cytometry as described previously (Kiyokawa *et al.*, 1990). A three-color immunofluorescence study was performed with a combination of PE, PC-5, and GFP introduced by MLV-derived retroviral vectors. Experiments were performed in triplicate, and means and standard deviations of the cell counts are indicated in the figures.

Results

Expression of integrins on CD34⁺ cells on the course of MLV-derived retroviral transduction

As shown in Fig. 1, we first confirmed that the recombinant fibronectin fragment CH-296 is effective for transduction of CD34⁺ cells with an MLV-derived retroviral vector for GFP

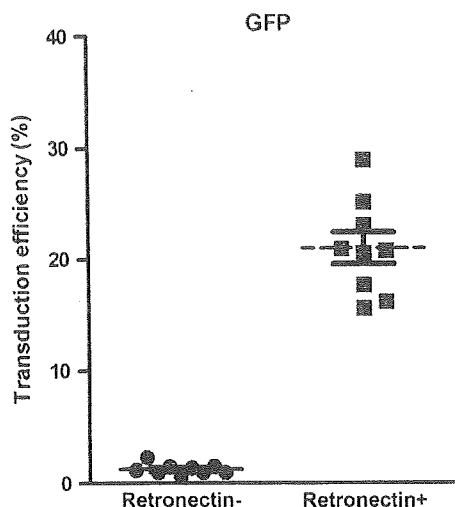


FIG. 1. Effect of CH-296 (RetroNectin) on murine leukemia virus (MLV)-derived retrovirus-mediated green fluorescent protein (GFP) gene introduction. CD34⁺ cells were transduced with an MLV-derived retroviral vector for GFP expression in the absence (*left*) or presence (*right*) of the recombinant fibronectin fragment CH-296, as described in Materials and Methods, by means of a single exposure. Subsequent GFP expression was tested by flow cytometry. Results are expressed as means \pm SD.

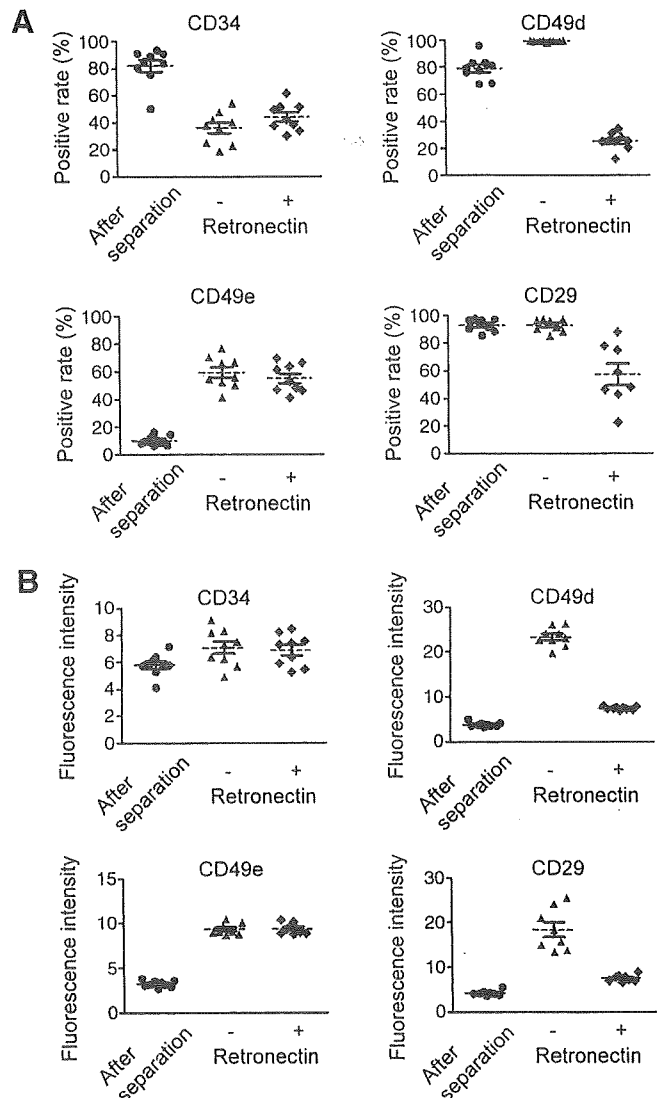


FIG. 2. Expression of VLA-4 and VLA-5 in the course of MLV-derived retroviral transduction of CD34⁺ cells. Expression of VLA-4 and VLA-5 on CD34⁺ cells before (*left*) and after *ex vivo* culture for MLV-derived retroviral transduction in the absence (*middle*) or presence (*right*) of CH-296 was examined by flow cytometry, using specific antibodies as indicated. (A) Positive rates and (B) mean fluorescence intensities are shown as means \pm SD.

expression. After transduction with a single exposure to fresh viral supernatant, almost no GFP expression was observed in CD34⁺ cells in the absence of CH-296, whereas when the dish precoated with CH-296 was used, about 20% of the cells (15.6 to 29.0%; mean, $21.0 \pm 3.1\%$) expressed GFP in repeated experiments (Fig. 1), indicating that CH-296 was indeed effective for MLV-derived retroviral transduction of CD34⁺ cells.

We therefore tested CD34⁺ cells for integrin expression during MLV-derived retroviral transduction. As shown in Fig. 2A, when freshly isolated CD34⁺ cells were tested for expression of CD49d, a component of VLA-4, the percentage of positive cells was already about 80% (67.6 to 96.0%; mean, $79.1 \pm 6.0\%$), but it rose to approximately 100% during culture

with the combination of cytokines for MLV-derived retroviral transduction. Moreover, comparison of the mean fluorescence intensity of CD49d in the positive cells showed a significant increase after the culture periods (Fig. 2B). Testing CD34⁺ cells for expression of CD49e, a component of VLA-5, revealed a low positive rate and mean fluorescence intensity when first isolated, but they both increased significantly after cultivation for transduction. A significant level of expression of CD29, another component of both VLA-4 and VLA-5, was found in freshly isolated CD34⁺ cells, but the mean fluorescence intensity still increased in the course of cultivation for MLV-derived retroviral transduction. The data indicate that the levels of VLA-4 and VLA-5 in freshly isolated CD34⁺ cells were not always high, but that the intensity of expression of both molecules significantly increased in the course of MLV-derived retroviral transduction.

Interestingly, although integrin expression was significantly increased by cultivation with the cytokine cocktail, it was significantly reduced in the presence of CH-296 (Fig. 2). The degree of reduction was more significant for CD49d expression, but the decrease in CD49e expression was less marked (Fig. 2).

Role of integrins in CH-296-based MLV-derived retroviral transduction of CD34⁺ cells

We next investigated whether the integrins are indeed involved in the CH-296-based MLV-derived retroviral transduction of CD34⁺ cells. When anti-CD49d antibody, which inhibits cell adhesion via CD49d, was added to the culture, transduction efficiency was significantly reduced (Fig. 3). The anti-CD49e antibody similarly reduced the transduction efficiency (Fig. 3), and when both antibodies were added at the same time, a synergistic effect in reducing transduction efficiency was observed. The data indicate that the integrins expressed on CD34⁺ cells are indeed important to CH-296-based MLV-derived retroviral transduction.

Effect of cytokines on integrin levels on CD34⁺ cells

We next attempted to identify the cytokines in the cocktail that were responsible for inducing expression of the integrins during the course of MLV-derived retroviral transduction. Both the positive rates and the fluorescence intensity measurements showed that SCF, TPO, and FL each increased expression of CD49d, but their effects were limited (Fig. 4A and B). SCF was the most effective of the three cytokines in enhancing CD49d expression. Exposure to a combination of IL-6 and sIL-6R had a weaker effect on CD49d expression than SCF, TPO, and FL alone (Fig. 4A and B). When SCF and TPO were combined, however, the level of CD49d expression increased significantly, and as shown in Fig. 4A and B, the positive rate and fluorescence intensity of CD49d on CD34⁺ cells cultured with the combination of SCF and TPO were almost the same as when cultured with the complete cocktail of five factors. In addition, the cytokines enhanced CD49e expression to the same extent as the cytokine-induced expression of CD49d (Fig. 4C and D).

We then examined the effect of the cytokines on transduction efficiency with the GFP-expressing MLV-derived retroviral vector. Flow cytometry showed that the degree of

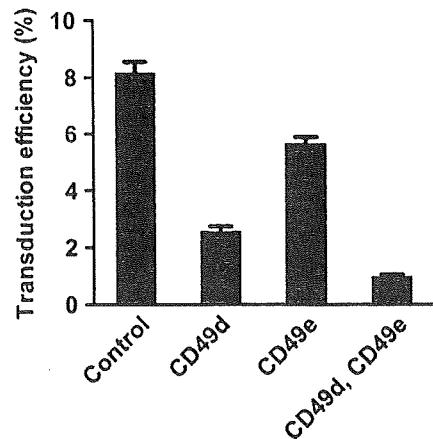


FIG. 3. Effect of inhibition of integrin-mediated attachment to CH-296 on the efficiency of transduction of CD34⁺ cells with MLV-derived retroviral vector. CD34⁺ cells were transduced with MLV-derived retroviral vector for GFP expression in the presence of CH-296 as described in Fig. 1. Antibody against CD49d, CD49e, or both was added to the cells before exposure to the virus, and their effects were examined as described in Materials and Methods.

GFP expression after transduction with SCF and TPO was comparable to that achieved with the full cocktail, whereas no significant GFP expression was observed after transduction with SCF, TPO, or FL alone or with the IL-6 and sIL-6R combination (Fig. 4E). When transduction efficiency was tested by colony assay, the effect of SCF and TPO was more prominent (Table 1), and the colony assay also showed that the SCF and TPO combination could maintain progenitor cells with colony-forming ability at a level comparable to that achieved with the complete cocktail.

The data indicated that the SCF and TPO combination is sufficient to induce integrin expression that is adequate for effective MLV-derived retroviral transduction in the presence of CH-296, and that FL, IL-6, and sIL-6R are not essential for transduction of MLV-derived retroviruses with CH-296.

Discussion

Introduction of the recombinant human fibronectin fragment CH-296 into the MLV-derived retroviral gene transduction of HSPCs has contributed significantly to progress in stem cell gene therapy and has enabled success in clinical trials of gene therapy for children with inherited immunodeficiencies (Ariga *et al.*, 2001). In theory the effect of CH-296 is achieved by colocalizing the MLV-derived retrovirus and target cells of specific adhesion domains of CH-296, including integrin-binding sites (Hananberg *et al.*, 1996). Although the efficacy of this method for MLV-derived retroviral gene transduction of human HSPCs has been confirmed in a number of experiments *in vitro* (Murray *et al.*, 1999), the actual role of the integrins expressed on HSPCs had not been analyzed. In the present study we investigated the kinetics of VLA-4 and VLA-5 expression on CD34⁺ cells during *ex vivo* culture for MLV-derived retroviral gene transduction

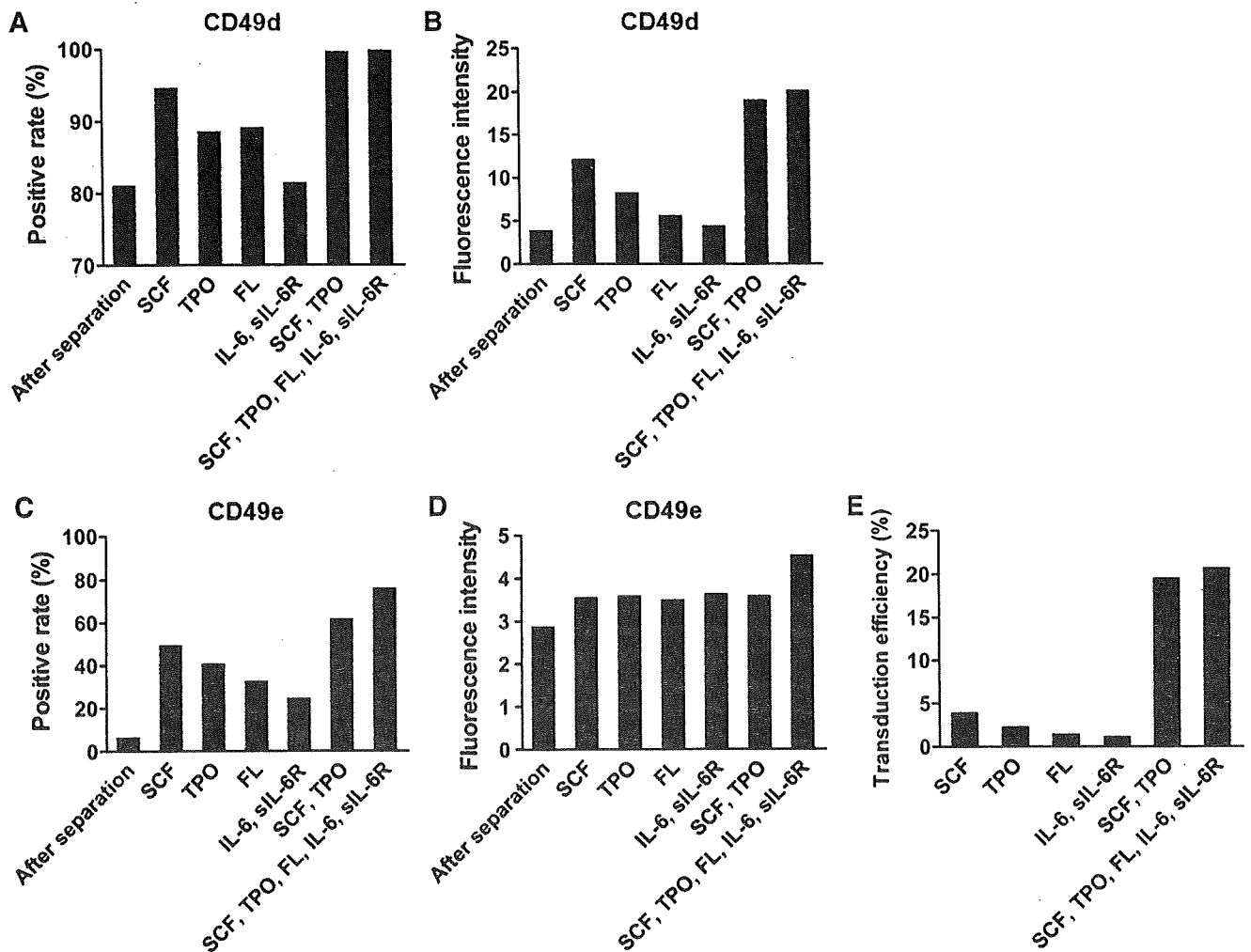


FIG. 4. Effect of cytokines on CD49d and CD49e expression on CD34⁺ cells. CD34⁺ cells were cultured in the presence of the cytokines indicated, and the expression of CD49d and CD49e was examined as described in Fig. 2. (A and C) Positive rates and (B and D) mean fluorescence intensities of CD49d and CD49e are shown. The experiments were performed in duplicate. (E) CH-296-based transduction efficiency with the MLV-derived retroviral vector for GFP expression in each culture was examined as in Fig. 1.

and demonstrated the importance of integrins for efficient transduction.

As demonstrated in this study, use of either the anti-CD49d antibody or anti-CD49e antibody, both of which are capable of inhibiting integrin-mediated cell adhesion, led to a reduction in the efficiency of transduction with the MLV-derived retroviral vector (Fig. 3). Because culture conditions insufficient to enhance CD49d expression on CD34⁺ cells were found to result in extremely low gene transduction (Fig. 4E), abundant levels of integrins VLA-4 and VLA-5 are required, for the effective transduction of MLV-derived retroviral vectors. Interestingly, CD49d expression on the surface of CD34⁺ cells has been shown to be significantly downregulated during treatment with MLV-derived retroviral gene transduction in the presence of CH-296, and the magnitude of the downregulation was far greater than that of CD49e expression. Because downregulation of integrins is thought to indicate

adhesion-mediated activation of integrin signaling (Pellinen and Ivaska, 2006), our data indicate that VLA-4 is more effectively activated in the presence of CH-296. We also observed that the anti-CD49d antibody inhibited MLV-derived retroviral gene transduction more effectively than the anti-CD49e antibody did. Thus, our findings indicate that VLA-4 plays a more important role in CH-296-mediated MLV-derived retroviral gene transduction than VLA-5 does, although more detailed experiments are needed to be able to draw a definite conclusion.

The levels of VLA-4 and VLA-5 on CD34⁺ cells are quite low immediately after purifying the cells from a source such as cord blood, and they are insufficient for effective MLV-derived retroviral gene transduction. As we demonstrated in this study, the cells must be cultured with certain cytokines to yield adequate integrin levels for effective MLV-derived retroviral transduction. Therefore, pretransduction culture

is needed not only to introduce cells into the cell cycle but also to induce sufficient expression of VLA-4 and VLA-5 on CD34⁺ cells. It is also important to be able to induce the expression of VLA-4 and VLA-5 with only a limited number of cytokines, and we determined that a combination of SCF and TPO is the minimum required for sufficient expression of integrins to achieve effective MLV-derived retroviral gene transduction.

A combination of SCF, TPO, FL, and IL-3 is commonly used for MLV-derived retroviral gene transduction, and a combination of SCF, TPO, FL, IL-6, and soluble IL-6 receptor has proven useful for stem cell gene therapy to treat ADA deficiency. Although both cocktails are able to maintain stem cells or progenitor cells and supply a sufficient number of target cells in which the defective gene has been replaced (Ariga *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2006), they induce significant expression of CD33, a myeloid marker antigen, in most CD34⁺ cells during the course of MLV-derived retroviral gene transduction (data not shown). Because our data indicate that the combination of SCF and TPO is sufficient to induce adequate integrin expression to achieve effective MLV-derived retroviral gene transduction, it is worth investigating more appropriate combinations of cytokines based on these two, to expand the population of progenitor cells for more successful replacement with functionally complemented target cells according to the lineage of the defective cells in each disease. Interestingly, Dao and Nolte have reported that engagement of the integrins VLA-4 and VLA-5 to CH-296 in combination with cytokines induces up- and downregulation of specific transcription factors and sustains the capacity of cultured CD34⁺ cells to undergo hematopoiesis in immunodeficient mice, suggesting that CH-296-induced stimulation via integrins affects the maintenance of their ability as HSPCs (Dao and Nolte, 2007). The use of CH-296 in MLV-derived retroviral gene transduction should therefore not only be beneficial in terms of achieving higher transduction efficiency but in maintaining HSPCs.

In conclusion, we confirmed that expression of VLA-4 and VLA-5 on HSPCs is necessary for effective CH-296-based MLV-derived retroviral gene transduction and that a combination of cytokines is important to inducing expression of integrins on HSPCs. Our results should aid in the development of a more successful protocol of MLV-derived retroviral gene transduction for stem cell gene therapy with CH-296.

Acknowledgments

The authors thank the Tokyo Cord Blood Bank for the distribution of cord blood for research use. This work was supported by Health and Labor Sciences Research grants (Research on Children and Families [H19-003 and H18-005], the third term comprehensive 10-year-strategy for cancer control [H19-010], Research on Human Genome Tailor Made and Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices [H18-005]) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. It was also supported by a grant from the Japan Health Sciences Foundation for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices (KHA1004), and by a Child Health and Development grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. The study was also supported by CREST, JST.

Author Disclosure Statement

No competing personal or financial interests exist for any of the authors in relation to this manuscript.

References

- Ariga, T., Oda, N., Yamaguchi, K., Kawamura, N., Kikuta, H., Taniuchi, S., Kobayashi, Y., Terada, K., Ikeda, H., Hershfield, M.S., Kobayashi, K., and Sakiyama, Y. (2001). T-cell lines from 2 patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency showed the restoration of ADA activity resulted from the reversion of an inherited mutation. *Blood* 97, 2896–2899.
- Bodine, D.M., Dunbar, C.E., Girard, L.J., Seidel, N.E., Cline, A.P., Donahue, R.E., and Orlic, D. (1998). Improved amphotropic retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 30,139–150.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nussbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669–672.
- Dao, M.A., and Nolte, J.A. (2007). Cytokine and integrin stimulation synergize to promote higher levels of GATA-2, c-Myb, and CD34 protein in primary human hematopoietic progenitors from bone marrow. *Blood* 109, 2373–2379.
- Gaspar, H.B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K.C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L.D., Gaspar, J., Henderson, L., Xu-Bayford, J.H., Davies, E.G., Veys, P.A., Kinnon, C., and Thrasher, A.J. (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol. Ther.* 14, 505–513.
- Hanenberg, H., Xiao, X.L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D.A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* 2, 876–882.
- Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R.A., Kato, I., and Williams, D.A. (1997). Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34⁺ hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.* 8, 2193–2206.
- Kimizuka, F., Taguchi, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Hashino, K., Kato, I., Sekiguchi, K., and Titani, K. (1991). Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 110, 284–291.
- Kiyokawa, N., Kokai, Y., Ishimoto, K., Fujita, H., Fujimoto, J., and Hata, J. (1990). Characterization of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) as an activation molecule on mature human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 79, 322–327.
- Murray, L., Luens, K., Tushinski, R., Jin, L., Burton, M., Chen, J., Forestell, S., and Hill, B. (1999). Optimization of retroviral gene transduction of mobilized primitive hematopoietic progenitors by using thrombopoietin, Flt3, and Kit ligands and RetroNectin culture. *Hum. Gene Ther.* 10, 1743–1752.
- Onodera, M., Ariga, T., Kawamura, N., Kobayashi, I., Ohtsu, M., Yamada, M., Tame, A., Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., Kotani, H., McGarrity, G.J., Blaese, R.M., and Sakiyama, Y. (1998). Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91, 30–36.
- Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwald, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kulcke, K., Schilz, A., Kunkel, H.,

- Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Luhi, U., Hassan, M., Thrasher, A.J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R., and Grez, M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 12, 401–409.
- Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J. Cell Sci.* 119, 3723–3731.
- Suzuki, A., Obi, K., Urabe, T., Hayakawa, H., Yamada, M., Kaneko, S., Onodera, M., Mizuno, Y., and Mochizuki, H. (2002). Feasibility of *ex vivo* gene therapy for neurological disorders using the new retroviral vector GCDNsap packaged in the vesicular stomatitis virus G protein. *J. Neurochem.* 82, 953–960.

Address correspondence to:

Dr. Nobutaka Kiyokawa
Department of Developmental Biology
National Research Institute for Child Health and Development
2-10-1, Okura, Setagaya-ku
Tokyo 157-8535, Japan

E-mail: nkiyokawa@nch.go.jp

Received for publication September 29, 2008;
accepted after revision March 13, 2009.

Published online: April 9, 2009.

Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin

Yoshitaka Miyagawa,¹ Nobutaka Kiyokawa,¹ Nakaba Ochiai,^{2,3} Ken-ichi Imadome,⁴ Yasuomi Horiuchi,¹ Keiko Onda,¹ Misako Yajima,⁴ Hiroyuki Nakamura,⁴ Yohko U. Katagiri,¹ Hajime Okita,¹ Tomohiro Morio,^{2,5} Norio Shimizu,^{2,6} Junichiro Fujimoto⁷ and Shigeyoshi Fujiwara,⁴

¹Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Setagaya-ku, ²Center for Cell Therapy, Tokyo Medical and Dental University Medical Hospital, Bunkyo-ku, Tokyo, ³Lymphotec Inc., Koto-ku, Tokyo. ⁴Department of Infectious Diseases, National Research Institute for Child Health and Development, Setagaya-ku, Tokyo. ⁵Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo. ⁶Department of Virology, Division of Medical Science, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo. and ⁷Vice Director General, National Research Institute for Child Health and Development, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

Summary

With an increase in the importance of umbilical cord blood (CB) as an alternative source of haematopoietic progenitors for allogeneic transplantation, donor lymphocyte infusion (DLI) with donor CB-derived activated CD4⁺ T cells in the unrelated CB transplantation setting is expected to be of increased usefulness as a direct approach for improving post-transplant immune function. To clarify the characteristics of activated CD4⁺ T cells derived from CB, we investigated their mRNA expression profiles and compared them with those of peripheral blood (PB)-derived activated CD4⁺ T cells. Based on the results of a DNA microarray analysis and quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), a relatively high level of forkhead box protein 3 (Foxp3) gene expression and a relatively low level of interleukin (IL)-17 gene expression were revealed to be significant features of the gene expression profile of CB-derived activated CD4⁺ T cells. Flow cytometric analysis further revealed protein expression of Foxp3 in a portion of CB-derived activated CD4⁺ T cells. The low level of retinoic acid receptor-related orphan receptor γ isoform t (ROR γ t) gene expression in CB-derived activated CD4⁺ T cells was speculated to be responsible for the low level of IL-17 gene expression. Our data indicate a difference in gene expression between CD4⁺ T cells from CB and those from PB. The findings of Foxp3 expression, a characteristic of regulatory T cells, and a low level of IL-17 gene expression suggest that CB-derived CD4⁺ T cells may be a more appropriate source for DLI.

Keywords: CD4; cord blood; donor lymphocyte infusion; forkhead box protein 3; interleukin 17; T cell

doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03122.x

Received 1 September 2008; revised 30 March 2009; accepted 15 April 2009.

Correspondence: N. Kiyokawa, MD, PhD, Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan.

Email: nkiyokawa@nch.go.jp

Senior author: Nobutaka Kiyokawa

Abbreviations: BIM, BCL2-like 11; CB, cord blood; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; CDKN, cyclin-dependent kinase inhibitor; DLI, donor lymphocyte infusion; Foxp3, forkhead box protein 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GVHD, graft-versus-host disease; GVL, graft-versus-leukaemia; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation; ICOS, inducible T-cell co-stimulator; IFNG, interferon γ ; IL, interleukin; PB, peripheral blood; ROR γ t, retinoic acid receptor-related orphan receptor γ isoform t; RT, reverse transcriptase; TCR, T-cell receptor; Th, T helper cell; Treg, regulatory T cell.