

**遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び遺伝子治療臨床
研究に係る生物多様性影響評価に関する申請について
(千葉大学医学部附属病院)**

【遺伝子治療臨床研究実施計画の申請】

- 諮問・付議. P1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書・概要書. P3
- 同意説明文書. P28

【遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請】

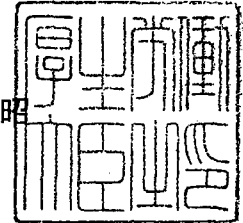
- 諮問・付議. P53
- 第一種使用規程承認申請書. P55
- 生物多様性影響評価. P58
- 厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会
委員名簿. P77

厚生労働省発科 0430 第 1 号
平成 22 年 4 月 30 日

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生 殿

厚生労働大臣 長 妻



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

平成 22 年 4 月 9 日に千葉大学医学部附属病院長から提出された「家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」計画

厚 科 審 第 4 号

平成 22 年 4 月 30 日

科学技術部会部会長

永 井 良 三 殿

厚生科学審議会会長

垣 添 忠 生



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

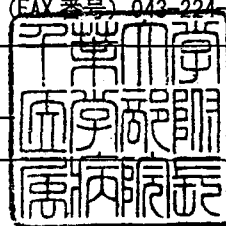
標記について、平成 22 年 4 月 30 日付け厚生労働省発科 0430 第 1 号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第 3 条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 22 年 4 月 9 日

厚生労働大臣 殿

実 施 設	所在地	〒 260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
	名称	千葉大学医学部附属病院 (電話番号) 043-222-7171 (FAX 番号) 043-224-3830
	代表者 役職名・氏名	千葉大学医学部附属病院長 河野 陽 (職印)



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記


遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
家族性 LCAT (レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ) 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究	医学研究院臨床遺伝子応用医学・教授 武城 英明

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成22年4月9日

研究の名称	家族性LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象としたLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究
研究実施期間	厚生労働大臣による了承の日より2年間

総括責任者	所属部局の所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	所属機関・部局・職	千葉大学大学院医学研究院臨床遺伝子応用医学 教授	
	氏名	武城 英明 (印)	
実施の場所	所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号 260-8677)	
	名称	千葉大学医学部附属病院	
	連絡先	糖尿病・代謝・内分泌内科 (電話番号 043-222-7171)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	佐藤 兼重 松本 文昭	医学研究院形成外科学 教授 医学研究院形成外科学 非常勤講師	脂肪組織摘出術およびLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液移植
	横手 幸太郎	医学研究院細胞治療学 教授	被験者の診療、移植後の観察および評価
	花岡 英紀	医学部附属病院 臨床試験部長	臨床研究の円滑な遂行に関わる業務、スケジュール、記録管理
	黒田 正幸	医学研究院臨床遺伝子応用医学 准教授	遺伝子治療臨床研究に係わる培養細胞及び実験動物を用いる研究全般ならびにLCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製における工程管理試験および品質管理試験の管理
	セルジェンテック株式会社	創薬研究開発部	LCAT遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液の調製（業務委託）

<p>審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由</p>	<p>「家族性 LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の自家移植に関する臨床研究」について「遺伝子治療臨床研究実施計画概要書」ならびに「遺伝子治療臨床研究実施計画書」に基づき検討し、次の理由により本研究を妥当と判断した。</p> <p>① 根本的治療法のない、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である家族性 LCAT 欠損症に対する有効な治療法は確立されておらず、新規治療法の確立が必要であること。</p> <p>② LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が産生、分泌する LCAT は基礎研究の結果から本来の活性を発揮し、患者血清検体中でその病態を正常化させる機能を有することが示されたこと。</p> <p>③ 動物実験において、LCAT 血中濃度が患者の治療レベルに達していることが推察できる結果が得られたこと。</p> <p>④ 用いるレトロウイルスベクターは安全性が高く、また基礎研究の結果から、遺伝子導入後の細胞において有害事象は認められなかったこと。</p> <p>⑤ 移植する生成物は GMP 準拠施設で調製されること。</p> <p>⑥ 同意の取得方法が適切であること。</p> <p>⑦ プライバシーの保護、プロトコルの遵守、プロトコルの内容変更について、適切な対応が行われる体制があること。</p> <p>⑧ 遺伝子治療臨床研究に関する指針、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律などの指針・基準を遵守した実施計画となっていること。</p> <p>以上の理由により本臨床研究を実施することを適当である、と判断した。</p>	
	<p>審査委員会の長の職名</p>	<p>氏 名</p>
	<p>千葉大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長</p>	<p>松 原 久 裕 </p>

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>家族性 LCAT 欠損症に対して、患者の自己前脂肪細胞より調製した LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を自家移植することにより LCAT 補充を行う方法の安全性について検証する。また、併せて LCAT 欠損に起因する症状（低 HDL コレステロール血症、角膜混濁、腎障害、溶血性貧血）の改善効果についても評価することを目的とする。</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>家族性 LCAT 欠損症は、稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。本症は、古典型 LCAT 欠損症、部分型 LCAT 欠損症、魚眼病に分類され、血中コレステロールのエステル化を担うコレステロール逆転送系酵素である LCAT（レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ）の先天的な欠損もしくは遺伝子異常による LCAT 活性の欠失や活性低下によって、低 HDL（高比重リポ蛋白）血症、角膜混濁、腎障害および溶血性貧血など多様な臨床症状を呈するとされている。本邦でも 22 家系が報告されている。</p> <p>家族性 LCAT 欠損症のうち、古典型 LCAT 欠損症の LCAT 活性（合成基質法による HDL 分画中 αLCAT）は、正常 LCAT 活性に比較しその活性は 10%未満、部分型 LCAT 欠損症および魚眼病は正常の 20%以下であることが知られている。このことから、LCAT を安定持続的に供給し、正常な LCAT 活性の 10%に相当する LCAT 活性を増加させることによって、臨床症状の改善が期待できるものと考えた。</p> <p>現在、LCAT 補充を目的とした遺伝子組換え型 LCAT を用いた医薬品開発は世界的に行われていない。一般的に欠損蛋白の補充療法は、その酵素の半減期から推定した補充頻度や通院頻度などから、患者・家族に大きな負担を強いられると言われている。またこれまでに、新鮮血（全血または血漿）輸血（LCAT 補充）が行われた報告があり、一部の症状（溶血性貧血）が速やかに改善することが報告されているが、その効果は一時的であり、加えて新鮮血輸血は感染症の危険性を拭えない。</p> <p>そこで、患者の皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞^{注1)}を用いて、正常な LCAT の持続供給が可能な LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞^{注2)}を調製し、患者の皮下脂肪組織内に自家移植することにより LCAT 補充を行う細胞・遺伝子治療法の開発を行うこととし、千葉大学大学院医学研究院細胞治療学、臨床遺伝子応用医学、形成外科及びセルジェンテック株式会社の間で共同研究を開始した。本共同研究においては、健康成人より提供を受けた皮下脂肪組織から分離・培養した前脂肪細胞を用いて LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を調製することに成功し、また、その LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞が発現・産生する LCAT は、分子サイズ、免疫学的特性および生物活性の面から正常 LCAT であることを確認した。hLCAT 遺伝子導入マウス前脂肪細胞のマウス移植実験での血中ヒト LCAT 活性測定が困難なため、マウス血中に分泌される hLCAT 蛋白量を測定し、健康人の血中 LCAT 蛋白量の 10%を補充できることを確認した。</p> <p>以上より、家族性 LCAT 欠損症を対象とした LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた細胞・遺伝子治療法の安全性と臨床効果の検討を、本臨床研究において実施することとした。</p> <p>^{注1)} 前脂肪細胞は脂肪油滴を持たない細胞である。天井培養法（脂肪含有細胞が低比重特性を有することを利用した方法）を用いて脂肪油滴を含有する脂肪細胞から得られる。</p> <p>^{注2)} ヒトの皮下脂肪組織から調製した前脂肪細胞に hLCAT 遺伝子搭載レトロウイルスベクターによって hLCAT 遺伝子を導入し、LCAT 蛋白質の持続発現をもたらすヒト前脂肪細胞</p>	

遺伝子の種類及び
その導入方法

1. 導入する遺伝子の構造と性質

hLCAT 遺伝子はヒト肝がん細胞株 HepG2 から全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製後、PCR 法によって回収した。用いたプライマーを以下に示す。

forward primer: 5' -atcgatccagggtggaaatggggccgcc-3'

reverse primer: 5' -atcgatccgctcgacggaaggtctttattcaggaggcgggg-3'

得られた塩基配列 (約 1.3kb) を以下の文献に発表されている hLCAT 遺伝子のオープンリーディングフレーム配列と比較し、一致していることを確認した。

[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (8), 2335-2339 (1986) ACCESSION M12625]

この遺伝子では、C末端のグルタミン酸とストップコドンに重なった形でポリ A 付加シグナル (AATAAA) がコードされているため、ストップコドンを TAA より TGA に改変して導入遺伝子内のポリ A 付加シグナルを除いた。また、蛋白質合成の効率を上げるために開始コドン上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入した。

2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞として選択した理由

酵素補充療法は生理活性を有する分泌蛋白質欠損または低下症の治療として有効であり、これには遺伝子組換え蛋白質製剤の投与あるいは遺伝子治療等がある。遺伝子治療は、遺伝子組換え蛋白質製剤に比べ、体内で持続的に蛋白質産生可能なため長期治療に適していると考えられている。

LCAT 補充療法の効率的な遺伝子導入系として、皮下脂肪組織由来ヒト前脂肪細胞を標的細胞とし、*ex vivo*でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法を選択した。分泌蛋白質の補充療法には、一定レベルの血中濃度を維持するのに必要な生産・供給体制の構築が不可欠であり、当該蛋白質の高発現細胞を充分量確保できるかどうか課題である。標的細胞とするヒト前脂肪細胞は、形成外科領域で実用化されている脂肪摘出術により皮下脂肪組織から容易に十分量採取することができ、また、体外で選別、増殖させたヒト前脂肪細胞に導入効率の高いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が可能である。さらに自家移植であるため、遺伝子導入されたヒト前脂肪細胞を脂肪組織内に移植した際、拒絶反応を起こさずに安定して生着するものと考えられる。なお、脂肪組織には血管網が発達しており、ヒト前脂肪細胞 (脂肪細胞) より分泌された LCAT は速やかに血中に移行するものと考えられる。

ヒト前脂肪細胞が遺伝子導入の標的細胞として補充療法に有用であることは、以下の試験の結果からも推察される。

マウスを用い修飾型ヒトインスリン遺伝子および標識遺伝子をレトロウイルスベクターにより *ex vivo*でマウス前脂肪細胞へ遺伝子導入し、体内に移植後に遺伝子発現状態を組織学的に観察した結果、マウス前脂肪細胞およびその分化した脂肪細胞で導入遺伝子の良好な発現が確認された。また、糖尿病モデルマウスを用いた試験では、修飾型ヒトインスリン遺伝子導入マウス前脂肪細胞の移植後、約 2 ヶ月以上にわたり安定・持続した血糖低下作用が観察されている。

純度の高いヒト前脂肪細胞の調製には、まず皮下より摘出して得られる脂肪組織を酵素処理と遠心分離することにより、低比重脂肪細胞含有画分を得る。脂肪組織に存在する他の血液系細胞や内皮系細胞をさらに分離するために、この画分の比重特性を利用し、培養フラスコを培

地で満たした天井培養を行って、フラスコの天井面に接着性の低比重細胞群を濃縮する。この1週間程度の天井培養で天井面に接着・増殖した細胞を初代ヒト前脂肪細胞とした。その形態は線維芽細胞様の細胞群である。最初の遠心分離により沈殿した Stromal Vascular Fraction (SVF) に多く存在する未分化間葉系細胞は、様々な細胞への分化能力を有しており、長期培養した細胞を免疫不全マウスに移植することにより細胞ががん化したことが報告されているが、天井培養にて単離・回収したヒト前脂肪細胞ではそのような形質転換は現在まで認められていない。

得られたヒト前脂肪細胞の細胞表面マーカーは、CD13⁺31⁻34⁻45⁻90⁺105⁺146⁺であり、脂肪細胞への分化能があり、かつレトロウイルスベクターによる遺伝子導入に不可欠な分裂・増殖能力を保持している。なお、ヒト体内への移植後は増殖せず脂肪細胞に成熟すると考えられる。

3. 遺伝子導入方法の概略および当該導入方法を選択した理由

ヒト前脂肪細胞への hLCAT 遺伝子の導入は、hLCAT 発現レトロウイルスベクター懸濁液を予め設定した割合 (multiplicity of infection: MOI) で、皮下脂肪組織から調製したヒト前脂肪細胞培養液に添加して培養することにより行う。遺伝子導入後、必要細胞数までに培養させ、移植用溶媒に懸濁させた細胞を採取時と同じ皮下脂肪組織内に注入移植する。皮下脂肪組織からのヒト前脂肪細胞調製より移植用 LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞懸濁液 (以降「細胞懸濁液」という) 調製までの工程は治験薬 GMP 準拠の細胞調製室 (CPC) において行う。

遺伝子導入法としては *in vivo* での直接導入の系と、*ex vivo* での遺伝子導入の系が考えられる。*in vivo* の直接導入の系で、比較的感染効率の高いベクターとしてはアデノウイルスベクターがあるが、ヒトへの投与では免疫反応の惹起は避けがたく、長期にわたる治療で再投与も考慮せざるを得ない場合には適切とは言えない。非病原性ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は、もともとなったウイルスの性質から安全性は高く、筋細胞、神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞に効率よく遺伝子導入ができ、そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する。筋細胞を標的とした AAV による蛋白質補充遺伝子治療では当初ある程度の臨床的効果が得られたとの報告があったが、その後ベクター量を増量したものの明瞭な臨床効果が得られずこの臨床研究は中止となっている。AAV はそのゲノムが一本鎖であるため、遺伝子の発現には二本鎖になる必要がある。しかしながら現行の AAV ではその効率が必ずしも高くないため十分な発現が起きなかったためではないかと考えられる。その後肝臓への遺伝子導入に基づく臨床研究も行なわれたが、免疫反応の惹起に起因する肝細胞障害から導入遺伝子の発現が長期間持続しなかったと報告されている。したがって、ある程度の発現量を必要とする酵素補充療法における導入遺伝子方法としては *in vivo* での AAV の使用は適切ではないと考えられる。

本臨床研究では、*in vivo* での遺伝子導入ではなく、*ex vivo* でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を選択した。これは、レトロウイルスベクターの分裂細胞への遺伝子導入効率が高く、効率の良い遺伝子組み込みに基づく安定した持続蛋白質発現が可能な特徴を有するためである。*ex vivo* での遺伝子導入後の遺伝子の組み込みを考えた場合、ウイルスベクターの候補としてはレトロウイルスベクターの他に AAV の使用も考えられる。しかしながら現行の AAV は、遺伝子の挿入サイズを確保する目的で染色体への挿入に寄与する Rep 配列が除かれて

いるため染色体への挿入効率が非常に低く、また染色体外に環状 DNA として存在することが報告されている。したがって、この AAV を用いて前脂肪細胞のような分裂時期の細胞に導入された遺伝子は細胞の増殖に伴い希釈されるため、本臨床研究のように必要細胞数まで拡大培養すると、前述の二本鎖 DNA への変換効率の低さに加えて、染色体への組み込み能の低さから、十分な薬効を保証できるだけの LCAT 遺伝子が残存しなくなるおそれがある。以上から、*ex vivo* での AAV の使用も本酵素補充療法における導入遺伝子方法としては適切ではないと考えられる。一方、レトロウイルスベクターでは増殖性ウイルス (RCR) の出現が危惧されるが、本臨床研究で用いるレトロウイルスベクターとしては、*gag*、*pol*、*env* 遺伝子配列を完全に除いた Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来の pDON-AI を用い、パッケージング細胞として *gag-pol* と *env* 遺伝子が別々の DNA 上に存在している GP+envAM-12 細胞を用いることで、相同的組換えによる増殖性ウイルス (RCR) 出現の可能性を低く抑えている。

1999 年からフランス、続いてイギリスでレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked Severe Combined Immunodeficiency : X-SCID) に対する遺伝子治療が始まり、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになった。しかし、治療を受けた患者 20 名のうちフランスで 4 名、イギリスで 1 名計 5 名に T リンパ性白血病を発症し、1 名が死亡した。これは、患者の染色体中のがん遺伝子 LMO2 のプロモーター領域近傍にレトロウイルスが組込まれ、LMO2 が恒常的に活性化された結果、白血病を発症したと考えられる (フランスの 1 例は、CCDN2 遺伝子へのベクター組み込みによる)。これまでに全世界でレトロウイルス遺伝子治療を受けた数千名以上の患者のうち実際に発がんにいたったのはこれらの X-SCID 遺伝子治療例のみで、またフランス及びイギリス以外で実施された X-SCID に対するレトロウイルス遺伝子治療では安全性上の問題は報告されていない。細胞のがん化には複数の遺伝子異常の蓄積が必要である。X-SCID の場合、*γc* 遺伝子自体が強力な T リンパ球増殖作用を持つという特殊事情が重なって白血病を発症したと考えられる。本研究は X-SCID 遺伝子治療と同様にレトロウイルスベクターを用いているが、LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験では形質転換が現在のところ認められていない。以上より、本臨床研究におけるがん化の危険性は極めて低いと考えられる。

ex vivo による遺伝子導入の利点は、細胞への遺伝子導入の工程を品質管理できる点にある。標的細胞をヒト前脂肪細胞に絞り込むことで、遺伝子導入した細胞を体内の脂肪組織に戻したときに、脂肪細胞以外の細胞に分化して予測外の副作用を引き起こす可能性を極力排除した。さらに、ヒトの脂肪組織 (前脂肪細胞) の状態にも個人差のあることが報告されており、投与前の LCAT 遺伝子導入ヒト前脂肪細胞の LCAT 活性を予め確認してから移植できることは移植細胞数のコントロール面からも大きなメリットである。

一方、脂肪細胞の体内での代謝回転が遅いことから安定した遺伝子発現が期待できるが、さらに導入遺伝子が染色体に組み込まれることは、細胞が分裂しても娘細胞に引き継がれていく点で長期間の発現には有利である。

4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

(1) 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

使用するベクターは Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。MoMLV は sarcoma37 細胞より分離された RNA ウイルスであるが、発がん遺伝子は持たない。長期間感染したマウスにリンパ性白血病を起こすことが知られているが、ヒトには感染することはない。

MoMLV のゲノムは 5' LTR、パッケージングシグナル (Ψ)、*gag*、*pol*、*env*、および 3' LTR よりなる。LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、 Ψ はウイルスゲノム RNA がウイルス粒子に取り込まれるのに必要な配列である。*gag* はウイルスのコア構造蛋白質を、*pol* は逆転写酵素及びインテグラーゼを、*env* はウイルス外被蛋白質をそれぞれコードする遺伝子である。レトロウイルスはウイルス粒子外被に存在する ENV と標的細胞の表面にある特異的受容体が結合した後、膜融合によりウイルス粒子が細胞内に取り込まれる。その後、逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA が 2 本鎖 DNA に逆転写され、核に移行してインテグラーゼにより宿主染色体に組み込まれる。宿主 DNA 上のウイルスゲノム (プロウイルス) は宿主の転写機構によってウイルス RNA へと転写されるが、一部は GAG、POL、ENV へと転写・翻訳され、ウイルス粒子を形成する。ウイルス RNA を取り込んだウイルス粒子は出芽により細胞外へと放出され、次々と周囲の細胞に感染していく。MoMLV はエコトロピックウイルス (同種指向性ウイルス) のため、マウス細胞にしか感染しないが、異なる種にも感染性を示すアンフォトロピックウイルス (多種指向性ウイルス) 由来の ENV を用いることで、ヒト細胞への感染も可能となる。

(2) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の作製方法

ヒト肝がん細胞株の cDNA ライブラリーから調製した hLCAT 遺伝子を用い、pDON-AI DNA ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の *Bam* HI 切断部位と *Sa*II 切断部位の間に、当該制限酵素配列を含むプライマーにより増幅させた hLCAT 遺伝子を挿入した。次に、蛋白質合成効率の向上のために開始コドン ATG 上流に Kozak 配列 (CCGCCACC) を挿入し、また、hLCAT 遺伝子ストップコドン近傍に存在する poly A 付加配列の AATAAA (TAA がストップコドン) を別のストップコドン TGA に改変した。さらに、目的以外の不都合な遺伝子の発現を避けるために、*Sa*II 切断部位から *Xho*I 切断部位までを切り出し、Minimal SV40 promoter 配列及び *Neo*^r (ネオマイシン耐性遺伝子配列) を除去し、レトロウイルス産生用プラスミド (pCGThLCAT) を構築した。

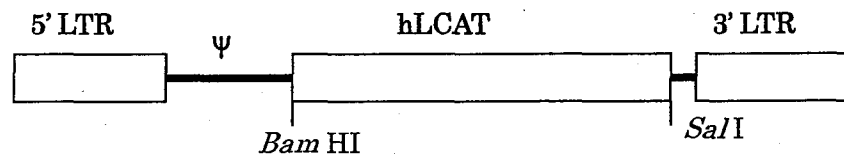
MoMLV の *gag-pol* 遺伝子とエコトロピックエンベロープ遺伝子を発現するパッケージング細胞 GP+E-86 細胞に、レトロウイルスベクター産生用プラスミド (pCGThLCAT) をハイグロマイシン耐性遺伝子と同時に、Lipofectamine2000CD (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いてトランスフェクションした。これらについて Hygromycin B 選択を行うことにより薬剤耐性細胞プールを獲得し、この細胞の培養上清から調製した hLCAT 発現エコトロピックレトロウイルスベクターを、RetroNectin (タカラバイオ株式会社) を用いて、同じく MoMLV の *gag-pol* 遺伝子およびマウスウイルス 4070A 由来アンフォトロピックエンベロープ遺伝子を発現する GP+envAM-12 細胞 (マウス由来細胞) に接種させた。

遺伝子導入細胞をプレートに限界希釈して播種し、ウイルスベクター産生細胞のスクリーニングを行い、シングルクローンと考えられるウェルについてその上清をリアルタイム RT-PCR で分析して得た陽性クローンの中から、最も高タイトーのウイルス産生細胞を選択した。この細胞を hLCAT 発現アンフォトロピックレトロウイルスベクター産生細胞としてプレマスターセルバンクを作製し、さらにこのプレマスターセルバンクよりマスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) を作製した。

(3) ウイルスベクターの遺伝子構造と性質

hLCAT 発現レトロウイルスベクターの塩基配列の基本骨格は、pDON-AI プラスミド (タカラバイオ株式会社) に由来しているが、マスターセルバンクを作製する際に GP+envAM-12 細胞にエクトロピックウイルスベクターを感染させてアンフォトロピック hLCAT 発現レトロウイルスベクターを構築する過程で、宿主染色体に組み込まれる時に、逆転写酵素によりウイルスゲノム上の 3' LTR 配列が 5' LTR 領域へとコピーされるため、5' LTR 領域塩基配列はオリジナルの MFG ベクターと同一となる。従って、MCB により生産されるウイルスベクターでは、hLCAT 遺伝子の発現は元の MoMLV 由来の LTR エンハンサー/プロモーターにより誘導されることになる。ウイルスゲノム RNA をウイルス粒子に取り込むのに必要なパッケージングシグナルとしての Ψ 配列を有するが、ウイルス粒子形成に必須な *gag*, *pol*, *env* が除かれているため、*gag*, *pol*, *env* のすべての遺伝子を発現しているパッケージング細胞 (GP+envAM-12 細胞) でのみ感染性ウイルス粒子を形成することが出来る。従って、細胞内で組換えを起こしてこれらの遺伝子を全てウイルスゲノムに取り込まない限り、通常の細胞でも増殖可能な増殖性ウイルス (RCR) が出現することはない。

以下に hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略を示す。



LTR : Long terminal repeat、 Ψ : パッケージング配列

hLCAT 発現レトロウイルスベクター遺伝子の構造概略図

(4) ウイルスベクター (マスターセルバンク) の生物学的特徴

hLCAT 発現レトロウイルスベクター作製には、パッケージング細胞として GP+envAM-12 を用いた。GP+envAM-12 細胞は野生型 MoMLV の *gag-pol* 及びマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の *env* を効率よく発現する NIH3T3 由来のマウス細胞株である。 Ψ 配列を持たないためウイルス粒子中に RNA を取り込むことが出来ず、単独で野生型ウイルスを産生することはない。上記 hLCAT 発現レトロウイルスベクター製造用マスターセルバンク MCB (CGT_hLMC) から産生されるウイルスベクターの遺伝子導入可能宿主は広範囲のもの (アンフォトロピック) になり、マウス、ラットのみでなくヒト、サル等にも遺伝子導入可能である。なお、レトロウイルスの特質として、細胞への遺伝子導入には標的細胞が増殖期にあることが必要であるが、一度染色体に組み込まれた遺伝子は安定して娘細胞へと伝えられ、長期にわたる発現が期待できる。パッケージング細胞内で hLCAT 発現ベクター