

当該遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを用いた遠心法を選択した理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されていること、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。

③レトロウイルスベクターの選択根拠

レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行うことにより、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の基になる SFCMM-3 DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全てもしくは一部を欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12、ATCC CRL-9641) は、gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて導入されているため、増殖性レトロウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて低いと考えられており、すでに世界的に広く使用されている。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

①野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

MoMLV はマウス白血病ウイルス (MLV) を実験室で継代して高病原性株として単離された。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであり、オンコウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好性ウイルスも知られているが、MoMLV は細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。ヒトへの感染の報告はない。

②ウイルスベクターの作製方法

・SFCMM-3 DNA ベクターの構築

pLXSN からネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除いて SV40 初期プロモーターの下流に Δ LNGFR 遺伝子を、パッケージングシグナルの下流に HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。

・パッケージング細胞株の構築

本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、Am12 である。本細胞株は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (ひとつは gag 遺伝子と pol 遺伝子で、もうひとつはマウスアンフトロピックウイルス 4070A 由来の env 遺伝子) で別々にマウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 に導入したアンフトロピックパッケージング細胞株である。また、gag 遺伝子と pol 遺伝子を含むプラスミド及び MoMLV の env 遺伝子を含むプラスミドによりこれらの遺伝子を NIH 3T3 に導入して作製されたエコトロピックパッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) をウイルス産生細胞の構築に用いた。

・ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 を含む培養上清を回収した。この上清を Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞を構築した。

SFCMM-3 産生細胞から、良好な生育性と T リンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、MCB を作製した。

・レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、バンキングされたウイルス産生細胞株の培養上