

Mini Review

可溶性 CAR 融合蛋白質を介した
アデノウイルスベクターの細胞ターゲティング伊藤 章^{1, 2)}, 岡田尚巳¹⁾, 花園 豊¹⁾, 久米晃啓¹⁾, 小澤敬也¹⁾¹⁾自治医科大学分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部²⁾旭化成株式会社中央技術研究所*Targeting of adenoviral vector to immature hematopoietic cells mediated by a soluble CAR fusion protein*

Adenoviral vectors primarily derived from the adenovirus serotype 5 (Ad5) are widely used for many gene transfer applications. However, they cannot efficiently infect hematopoietic cells because these cells barely express the coxsackie-adenoviral receptor (CAR). In this study, we developed a soluble fusion protein linking viral fibers and the c-Kit receptor to alter Ad5 tropism to immature hematopoietic cells. The CAR-SCF fusion protein consists of two extracellular domains of human CAR and mouse stem cell factor (SCF). CAR-SCF was added to culture of various human hematopoietic cell lines together with an Ad vector expressing the eGFP gene driven by the CMV promoter. CAR-SCF greatly enhanced Ad5-mediated gene transfer and eGFP expression in c-Kit⁺ cell lines. The ability of CAR-SCF to enhance Ad5 vector infectivity was dependent on cellular c-Kit expression levels. Furthermore, CAR-SCF also enhanced Ad5 vector transfection into human cord blood CD34⁺ cells. In conclusion, the fusion protein will allow us to efficiently retarget adenoviral vectors to c-Kit⁺ human immature hematopoietic cells by just adding the fusion protein to transduction culture with adenoviral vectors. This method has an advantage that all conventional Ad5 vectors can be used to infect hematopoietic cells without any reconstruction or modification of the vectors.

Rec.4/23/2003, Acc.8/1/2003, pp286-290

Akira Itoh^{1, 2)}, Takashi Okada¹⁾, Yutaka Hanazono¹⁾, Akihiro Kume¹⁾, Keiya Ozawa¹⁾¹⁾Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School²⁾Central Technology Laboratory, Asahi Kasei Corporation**Key words** adapter, adenovirus, hematopoietic cell, c-Kit

Thomas ら¹⁾ によって 1975 年に報告された白血病患者に対する同種骨髄移植療法の確立以来, 造血幹細胞移植は再生医療の中で最も成功し, 実績ある細胞移植療法と言えよう。また近年, まだ多くの議論が残されているものの, 造血幹細胞は血球系だけでなく, 内皮細胞²⁾, 肝細胞³⁾, 心筋⁴⁾ などにも分化し得ると報告され, いわゆる可塑性の点でも興味深い。臍帯血はドナーに負担をかけない造血幹細胞の理想的なソースであるが, 得られる量が少ないため臨床上的適応範囲は限られている。臍帯血造血幹細胞の体外増幅が可能になれば, 再生医療への広範な用途が考えられるが, 既存の増殖因子やサイトカインを用いた培養方法では十分な増殖が得られず, 増殖に伴って造血幹細胞の有する多分化能が失われてしまうの

が現状である。

我々は遺伝子導入技術を用いた造血幹細胞の体外増幅を目指しており, 本稿では筆者らの最近の研究成果を紹介する。

分化抑制遺伝子の可逆的導入システム

造血幹細胞への分化抑制遺伝子の導入により, 未分化状態で細胞を増殖させることができる。しかし, 移植後に正常な血球分化ができないという問題がある。そこで, 筆者らは分化抑制遺伝子を着脱可能な可逆的導入システムを検討している。このシステムの概念を図 1 に示した。

分化抑制遺伝子の例として, ドミナントネガティブ型レチノイン酸受容体 α (dn-RAR) が挙げられる。dn-RAR は

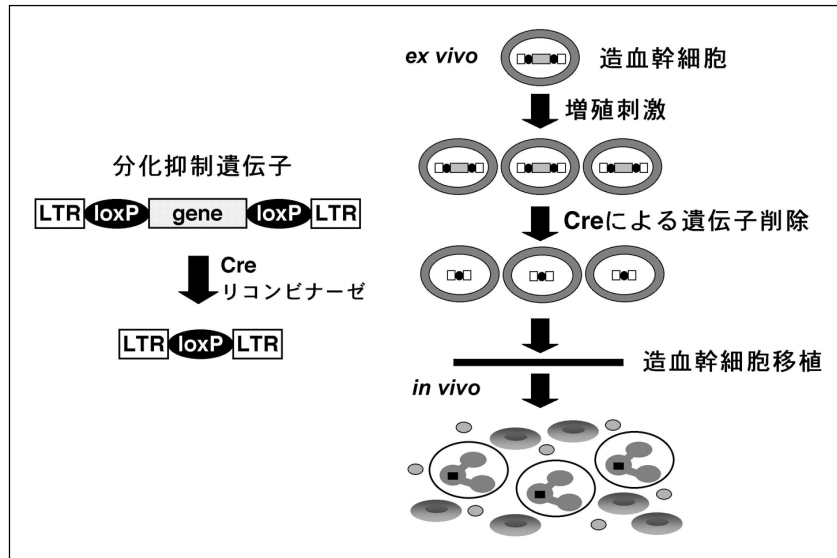


図1 分化抑制遺伝子の可逆的導入法
Creリコンビナーゼは2つのloxP配列に挟まれた遺伝子を着脱する作用を有する。分化抑制遺伝子をloxP配列に挟んだ構造を含むレトロウイルスベクターを作製し、造血幹細胞に導入しておく。サイトカイン等の刺激によって細胞を増殖させるが、分化抑制遺伝子が働いているため、分化することなく増殖する。細胞が増えた時点で、Creリコンビナーゼを作用させ、分化抑制遺伝子を取り除くことにより、造血幹細胞本来の分化能が回復する。この細胞を移植することで体内では正常な血液分化が可能になる。

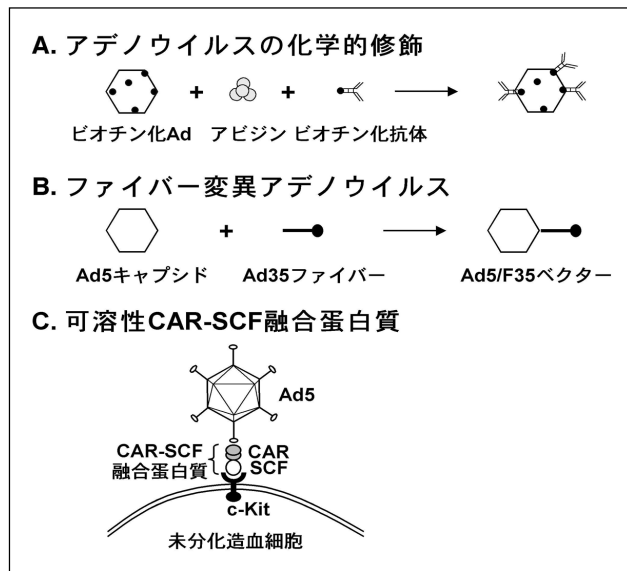


図2 造血系細胞へのAd吸着法

- A: アデノウイルスの化学的修飾
B: ファイバー変異アデノウイルス
C: 可溶性CAR-SCF融合蛋白質

前骨髄球の分化を抑制するだけでなく、リンパ球と血球の両系統への分化が可能な未熟な前駆細胞レベルでの分化抑制も報告されている⁵⁾。

筆者らはこのシステムの検証のため、loxP配列に挟まれたdn-RAR遺伝子を含むレトロウイルスベクターを構築し、IL-3刺激で増殖し、G-CSF刺激で好中球に分化が誘導されるマウス骨髄系細胞株32Dに遺伝子導入した⁶⁾。その結果、G-CSF刺激による好中球への分化が抑制され、増殖のみが観察された。次に、このdn-RAR遺伝子導入32D細胞にCreリコンビナーゼを作用させてdn-RAR遺伝子を削除すると、G-CSF刺激によって32D細胞本来の分化能が

回復することが観察された。すなわち、分化抑制遺伝子の着脱によって、造血系細胞の分化制御が可能になった。

造血系細胞への一過性遺伝子導入

ゲノムに遺伝子を組み込むレトロウイルスベクターは、自己再生能を有する造血幹細胞に治療遺伝子を安定導入するベクターとして広く使用されている。一方で、Creリコンビナーゼのように一過性の発現が望まれ、ゲノムへの組み込みが好ましくない場合には、遺伝子をゲノムに組み込まないアデノウイルス(Ad)ベクターが適している。しかし、未分化造血系細胞はAd受容体 coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)の発現が乏しいため、遺伝子治療で広く使用されている5型Adベクターの感染が困難である⁷⁾。

そこで未分化造血系細胞への様々なAd吸着法が検討されている。その一つは、造血系細胞を認識する抗体とAdベクター粒子を化学的に結合する方法⁸⁾である(図2A)。もう一つは、Adの細胞への吸着部位であるファイバーを変更する方法で、CARに親和性のあるAd5型のファイバーをAd35型のものに置換したベクターは造血系細胞への感染が報告⁹⁾されている(図2B)。しかし、これらの方法はベクターを再構築するか、修飾を施す必要があった。

一方で、Ad5型ファイバーのCAR指向性を特定の細胞表面分子に変換する可溶性アダプター分子は、特定細胞へのAdベクターの感染性を増加させる。この方法は、アダプター分子を培地中に添加するだけで良く、ベクターの再構築や修飾の必要がなく既存のベクターをそのまま利用できる。この例として、epidermal growth factor (EGF)受容体を発現する腫瘍細胞を標的とするCARとEGFを連結した融合蛋白質¹⁰⁾、Fcγ受容体を発現する細胞を標的とする

表 造血系細胞株の細胞表面抗原解析

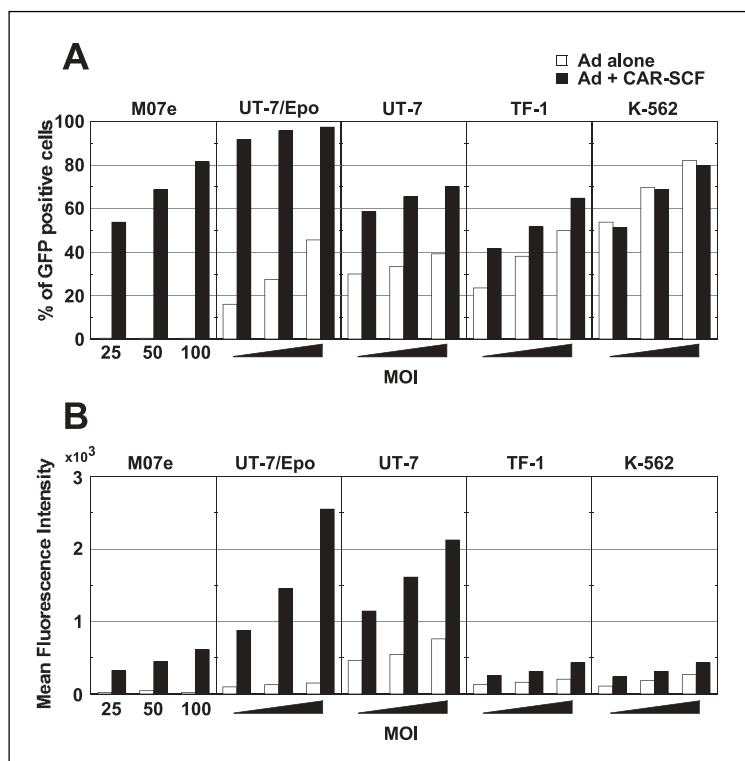
	M07e	UT-7/Epo	UT-7	TF-1	K-562
c-Kit	100	98	79	57	0.6
CAR	1.0	NT	18	1.7	65
CD51	99	NT	87	89	100

数値は% , NT: not tested

図3 造血系細胞株へのAdベクター遺伝子導入

A: GFP陽性率

B: GFP陽性細胞の平均蛍光強度



CARとイムノグロブリンFc領域を連結した融合蛋白質¹¹⁾が挙げられる。しかし、未分化な造血細胞を標的とするアダプター分子の報告はなかった。

可溶性CAR-SCF融合蛋白質

筆者らは未分化な造血系細胞の細胞表面に発現する受容体型チロシンキナーゼc-Kitに着目し、そのリガンドのstem cell factor (SCF)とCARを連結した可溶性融合蛋白質を作製し(図2C)、Ad5型ベクターを造血系細胞に吸着させるためのアダプター分子としての利用を検討した。

CAR-SCF融合蛋白質の構造は、N末側にI型膜蛋白質であるヒト由来CARの細胞外領域、C末側にI型膜蛋白質であるマウス由来のSCFの細胞外領域を配置し、ヒスチジンタグ(His⁶-tag)および6アミノ酸からなるリンカーで2つの蛋白質の細胞外領域を連結した。ちなみにマウスSCFはヒトc-Kit受容体にも親和性とリガンド活性を有する。

CAR-SCF融合蛋白質を産生させるために、シグナルペプチドを付加した同蛋白質を発現するプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションした。これにより得られた培養上清を限外濾過膜で100倍程度濃縮し、培地成分をリン酸緩衝食塩水に置換したものをAdベクター遺伝子導入実験に用いた。His⁶-tagに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、CAR-SCF融合蛋白質はアミノ酸配列から推定される理論分子量約44kDaにメインバンドを有し、また44-57kDaの間にヘテロな糖鎖付

加と思われるスメア状のバンドが観察された。CAR-SCF融合蛋白質の濃度はSCFに対する酵素結合免疫測定法により定量した。なお、His⁶-tagに親和性を有するニッケル結合ビーズを用いたCAR-SCF融合蛋白質の精製が可能である。

CAR-SCF融合蛋白質を用いたヒト造血系細胞株へのAdベクター遺伝子導入

CAR-SCF融合蛋白質のAdベクター遺伝子導入への作用の検討は、ヒト巨核芽球系細胞株M07e、UT-7/Epo亜株、UT-7、ヒト赤白血病細胞株TF-1、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K-562を用いた。それぞれの細胞表面に発現するc-Kit、CAR、そしてAdの細胞内在化に必要とされる α_v インテグリン(CD51)をフローサイトメトリーで測定した(表)。

次に、CMVプロモーター下で緑色蛍光蛋白質(eGFP)を発現するAdベクターをmultiplicity of infection (MOI) 25, 50, 100にてそれぞれの細胞株に24時間感染させた。図3AにGFP陽性率、図3Bに陽性細胞の平均蛍光強度を示す。M07e細胞はAdベクター単独ではMOI 100でもほとんど感染が認められないが、終濃度10 ng/mlのCAR-SCF融合蛋白質を添加することにより、80%以上の細胞への感染が可能であった。また、UT-7/Epo細胞ではMOI 25で90%以上の感染効率を得られた。c-Kitを発現していないK-562細胞では、CAR-SCF融合蛋白質を添加による感染効率

の増強は認められなかった。すなわち、CAR-SCF 融合蛋白質は、c-Kit 発現率 (表) に量依存的に Ad ベクター遺伝子導入を増強した。また、平均蛍光強度に関しても CAR-SCF 融合蛋白質は c-Kit 陽性細胞に対して強い増強作用を示した。

CAR-SCF 融合蛋白質の作用解析

CAR-SCF 融合蛋白質の用量依存性を調べるため、終濃度 1-100 ng/ml の範囲の CAR-SCF 融合蛋白質を Ad5-eGFP ベクターとともに M07e 細胞へ添加し、24 時間後にフローサイトメトリーで GFP 陽性細胞を検出した。結果として、MOI 25, 50, 100 のいずれの Ad ベクター濃度でも 30 ng/ml の添加で最も高い GFP 陽性率と蛍光強度が得られた。

CAR-SCF 融合蛋白質の作用原理は Ad ファイバーと c-Kit の吸着にあるが、CAR-SCF 融合蛋白質中の SCF 部分が c-Kit シグナル経路を活性化した結果として、細胞の Ad 感受性を变化させた可能性も否定できない。そこで、100 ng/ml のフリーの SCF を CAR-SCF 融合蛋白質の代わりに Ad5-eGFP ベクターとともに UT-7 細胞に添加したが、遺伝子導入の増強は認められず、CAR-SCF 融合蛋白質は上記の作用原理の通り、増強作用を発揮すると考えられた。

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞への Ad ベクター遺伝子導入

正常未分化造血細胞としてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用い、CAR-SCF 融合蛋白質の Ad ベクター遺伝子導入増強作用を検討した。細胞は SCF、トロンボポエチン、Flt-3 リガンドをそれぞれ 100 ng/ml 加えた培地で 2 日間前培養の後、Ad-eGFP ベクターを加えてさらに 2 日間培養した。GFP 陽性率は、Ad ベクター単独では $9.8 \pm 3.7\%$ ($n=3$) だが、30 ng/ml の CAR-SCF 融合蛋白質の添加により $17.5 \pm 2.5\%$ ($n=3$) になることが観察され、CAR-SCF 融合蛋白質が正常未分化造血細胞への Ad ベクター遺伝子導入を増強することが明らかとなった。

しかし、検討に用いた CD34 陽性細胞は 80% 以上の c-Kit 発現があるにもかかわらず、Ad ベクター遺伝子導入効率は 20% 弱でしかなかった。この一つの要因として、CD34 陽性細胞の α_v インテグリン発現率は 6-49% に過ぎず、Ad ベクターの細胞侵入の過程が律速になっていることが考えられた。ヒストン脱アセチル化阻害剤¹²⁾やサイトカイン混合物¹³⁾の添加により、未分化造血細胞のインテグリン発現が上昇することが報告されており、このような薬剤 (分化を誘導しない薬剤が望ましい) と CAR-SCF 融合蛋白質を組み合わせることによって、導入効率がさらに向上することが期待される。

おわりに

筆者らは未分化造血細胞への可逆的遺伝子導入システムを開発した。このシステムは dn-RAR 遺伝子の導入だけでなく、他の遺伝子への応用が可能である。例えば、造血幹細胞の体外増幅を誘導する HoxB4 遺伝子¹⁴⁾や造血幹細胞の不死化を誘導する Notch1 遺伝子¹⁵⁾が挙げられる。これらの遺伝子を造血幹細胞に導入して増殖させ、移植前に遺伝子を取り除くことで、造血幹細胞の体外増幅が可能になるだろう。

文 献

- 1) Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD: Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*, 292: 832-843, 1975.
- 2) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377, 2001.
- 3) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grampé M: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*, 6: 1229-1234, 2000.
- 4) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bordin DM, Leri A, Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-705, 2001.
- 5) Tsai S, Bartelmez S, Sitnicka E, Collins S: Lymphohematopoietic progenitors immortalized by a retroviral vector harboring a dominant-negative retinoic acid receptor can recapitulate lymphoid, myeloid, and erythroid development. *Genes Dev*, 8: 2831-2841, 1994.
- 6) Muramatsu M, Hanazono Y, Ogasawara Y, Okada T, Mizukami H, Kume A, Mizoguchi H, Ozawa K: Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 891-896, 2001.
- 7) Marini FC 3rd, Yu Q, Wickham T, Kovesdi I, Andreeff M: Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther*, 7: 816-825, 2000.
- 8) Smith JS, Keller JR, Lohrey NC, McCauslin CS, Ortiz M, Cowan K, Spence SE: Redirected infection of directly biotinylated recombinant adenovirus vectors through cell surface receptors and antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8855-8860, 1999.
- 9) Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T,

- Stamatopannopoulos G, Lieber A: Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol*, 74: 2567-2583, 2000.
- 10) Dmitriev I, Kashentseva E, Rogers BE, Krasnykh V, Curiel DT: Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol*, 74: 6875-6884, 2000.
- 11) Ebbinghaus C, Al-Jaibaji A, Operschall E, Schoffel A, Peter I, Greber UF, Hemmi S: Functional and selective targeting of adenovirus to high-affinity Fcγ receptor I-positive cells by using a bispecific hybrid adapter. *J Virol*, 75: 480-489, 2001.
- 12) Kitazono M, Rao VK, Robey R, Aikou T, Bates S, Fojo T, Goldsmith ME: Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances adenovirus infection of hematopoietic cells. *Blood*, 99: 2248-2251, 2002.
- 13) Takahashi T, Yamada K, Tanaka T, Kumano K, Kurokawa M, Hirano N, Honda H, Chiba S, Tsuji K, Yazaki Y, Nakahata T, Hirai H: A potential molecular approach to ex vivo hematopoietic expansion with recombinant epidermal growth factor receptor-expressing adenovirus vector. *Blood*, 91: 4509-4515, 1998.
- 14) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK: HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, 109: 39-45, 2002.
- 15) Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID: Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, 6: 1278-1281, 2000.