

遺伝子治療にレンチウイルスベクターを用いる際の最適な構造の検討 Optimal structure of lentiviral vectors for gene therapy

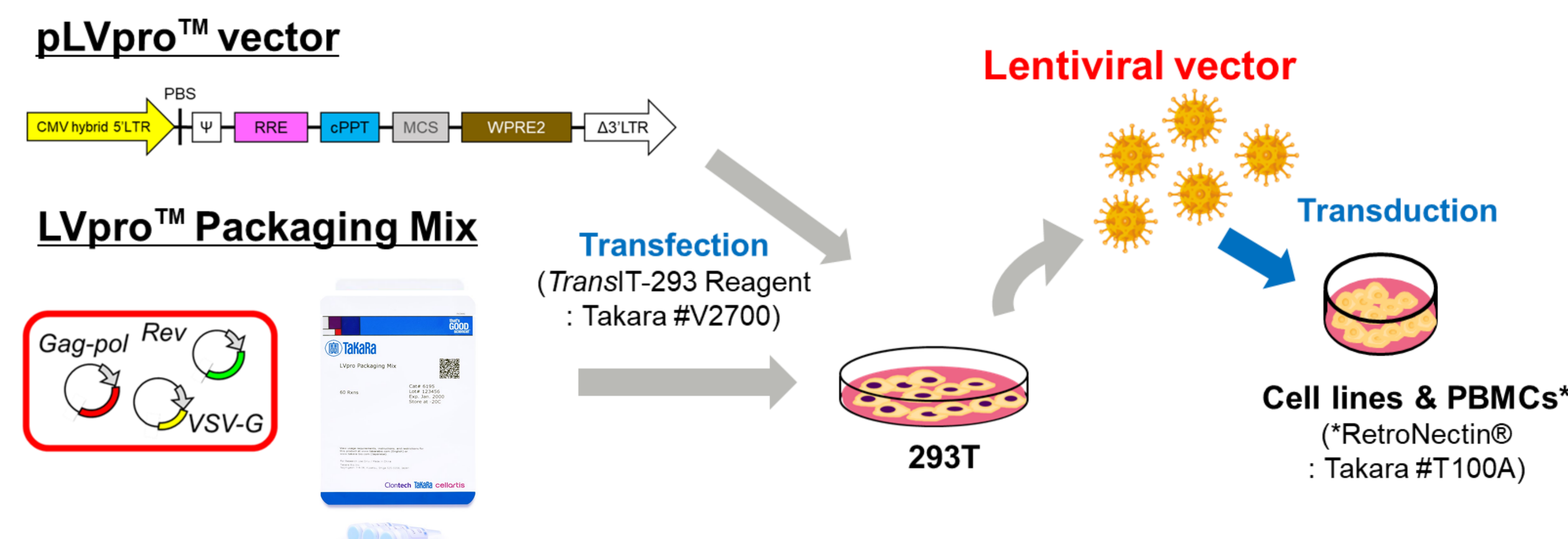


タカラバイオ株式会社 基盤技術開発センター 榎いづみ、天石泰典、永田亮佑、岡本幸子、峰野純一

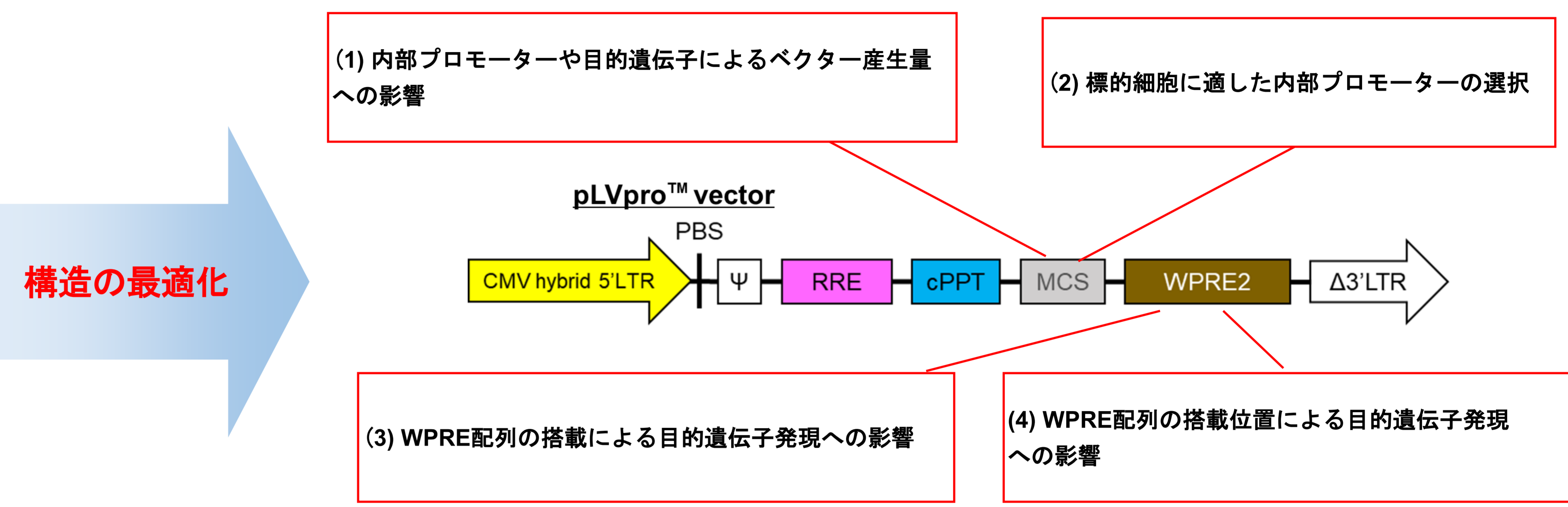
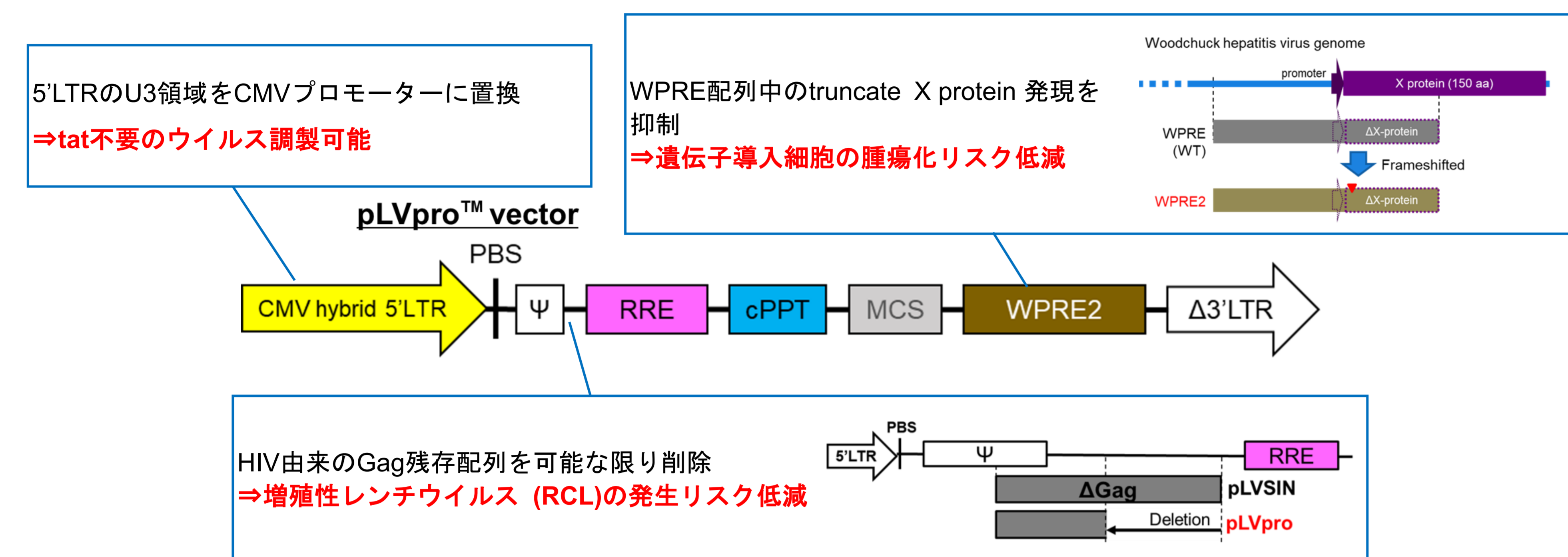
背景 ~LVpro™ レンチウイルスベクター産生システム~

レンチウイルスベクターは、初代培養細胞や幹細胞、神経細胞などの非分裂細胞を含む、ほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入が可能のため、分子生物学研究ツールとして幅広く利用されている。さらに、導入遺伝子は染色体に組み込まれ長期間安定発現することから、癌、免疫不全症、代謝疾患などの遺伝子治療への応用が進められている。

特に臨床用途にレンチウイルスベクターを用いる場合、導入遺伝子の発現が長期間持続するため、より安定かつ機能的なベクター構造の選択が重要となる。我々はこれまで、安全性を配慮してHIV由来配列を可能な限り削減した、Tat非依存性の第三世代型レンチウイルスベクタープラスミド (pLVpro) と、ベクターの大量製造を実現するための、高力価ウイルス産生系の開発を進めてきた。今回は、遺伝子治療の中でもTCR/CAR-T細胞療法等で用いられるT細胞におけるレンチウイルスベクター構造の最適化を実施した。

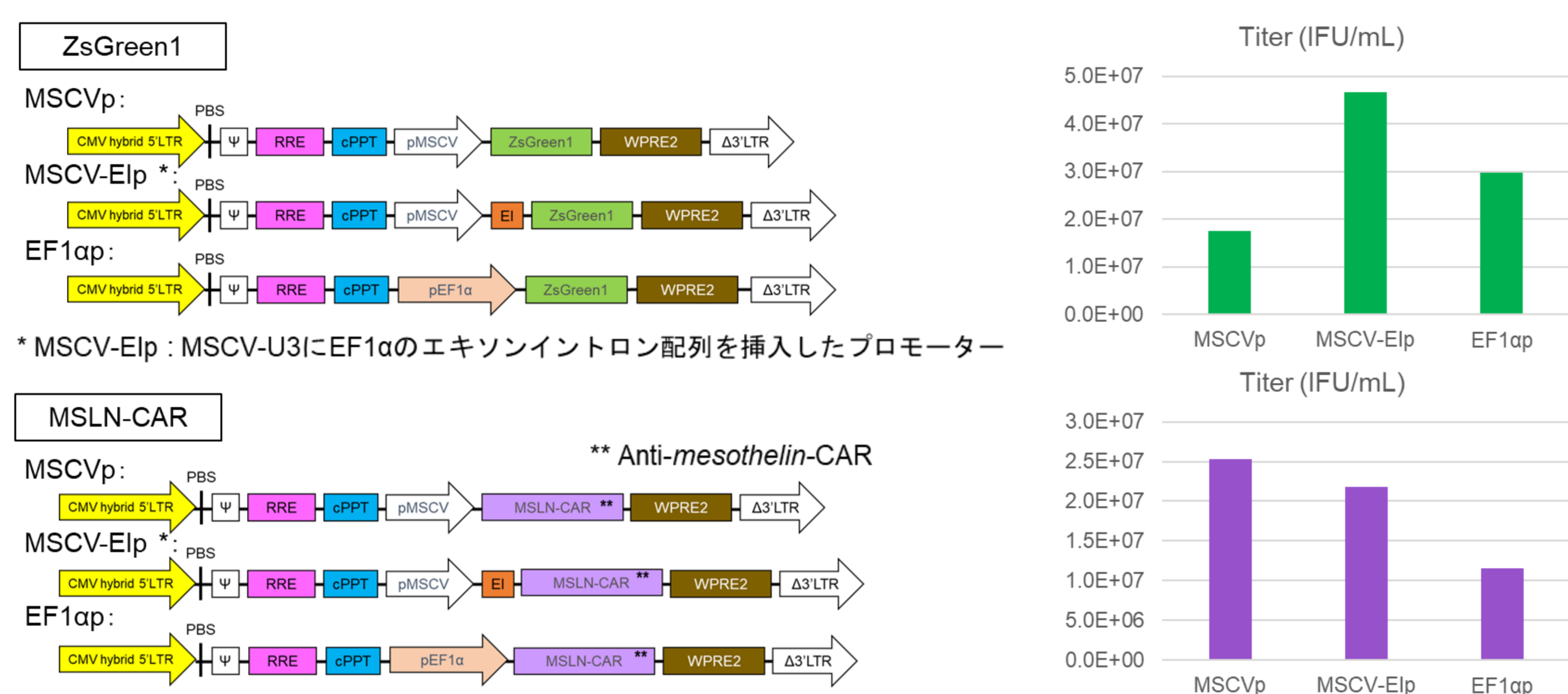


pLVpro™ レンチウイルスベクターの特徴と構造の最適化



内部プロモーターや目的遺伝子によるベクター産生量への影響

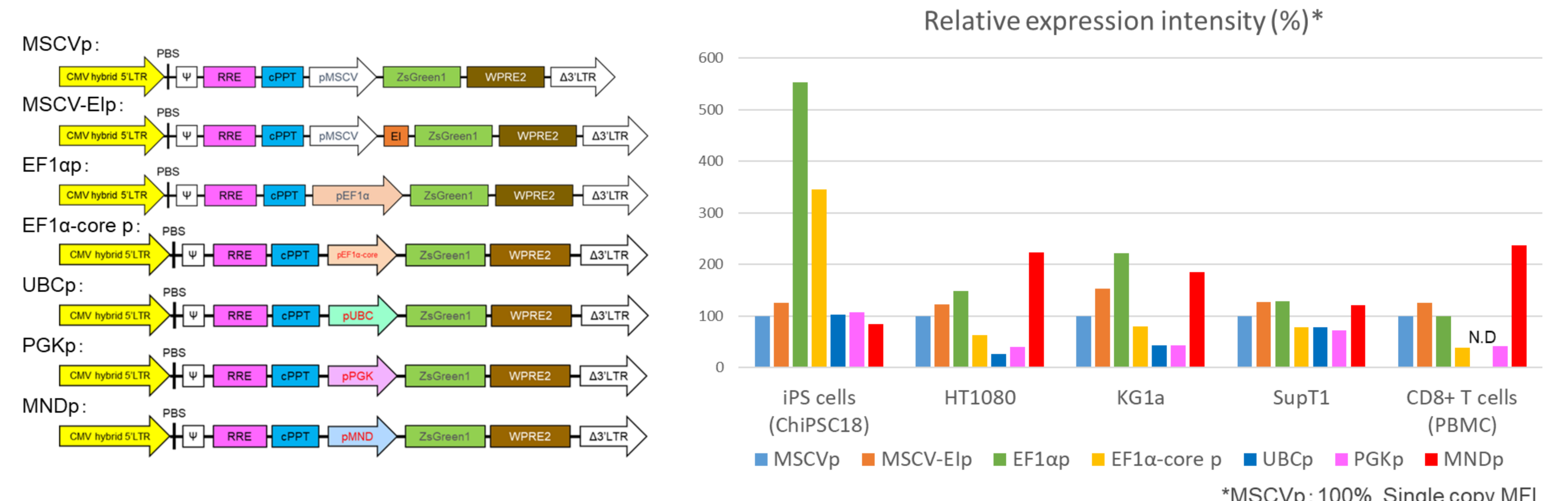
3種類の内部プロモーターを用いて、2種類の目的遺伝子のウイルス産生量の比較。



✓ 内部プロモーターおよび目的遺伝子の違いにより、ベクターの産生量が異なる。

標的細胞に適した内部プロモーターの選択

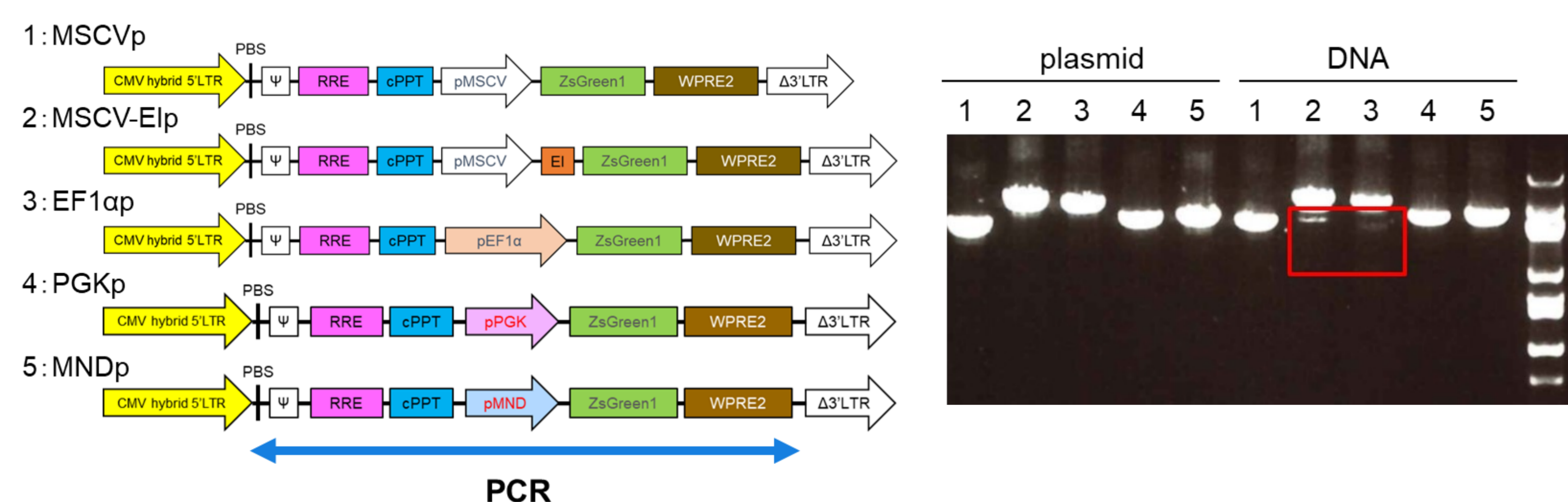
MSCV、MSCV-EI、EF1α、EF1α-core **, UBC、PGK、MNDプロモーターを用いて、多種の細胞に遺伝子導入し、発現を比較。



✓ 標的細胞の種類および内部プロモーターによって、目的遺伝子の発現強度が異なる。

標的細胞に適した内部プロモーターの選択

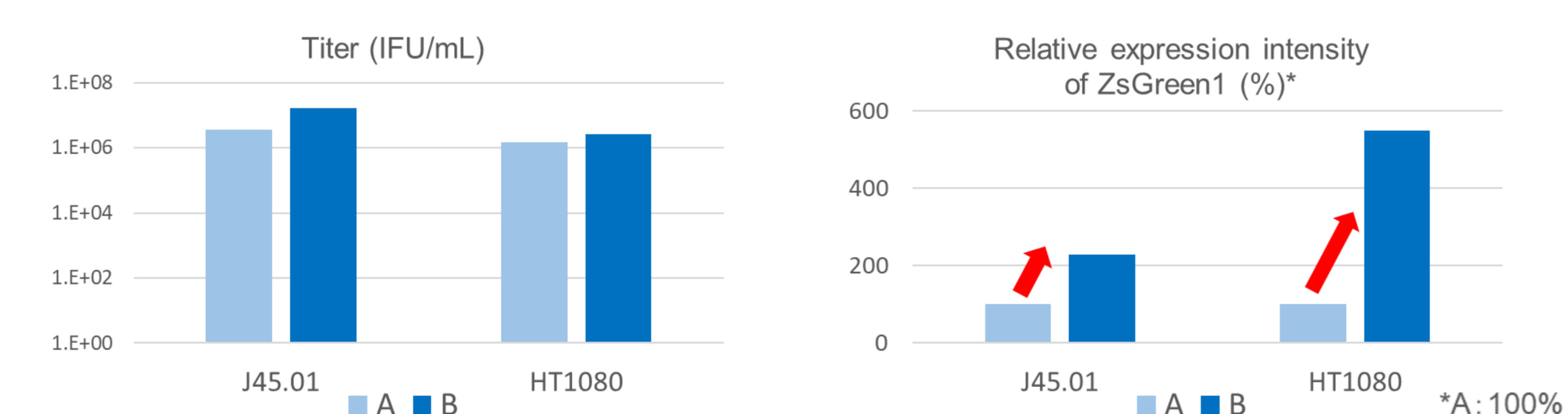
プロウイルス中のスライシングの発生頻度を確認するために、各ベクターを導入した細胞からゲノムDNAを回収し、プロウイルス配列のPCRを実施。



✓ プロモーター内にエキソイントロン配列を持つ、MSCV-EIおよびEF1αプロモーターではスライシングが起きていることが確認された。

WPRE配列搭載位置による発現への影響

薬剤耐性遺伝子などの複数遺伝子を発現させる場合の、WPRE配列の搭載位置について検討。



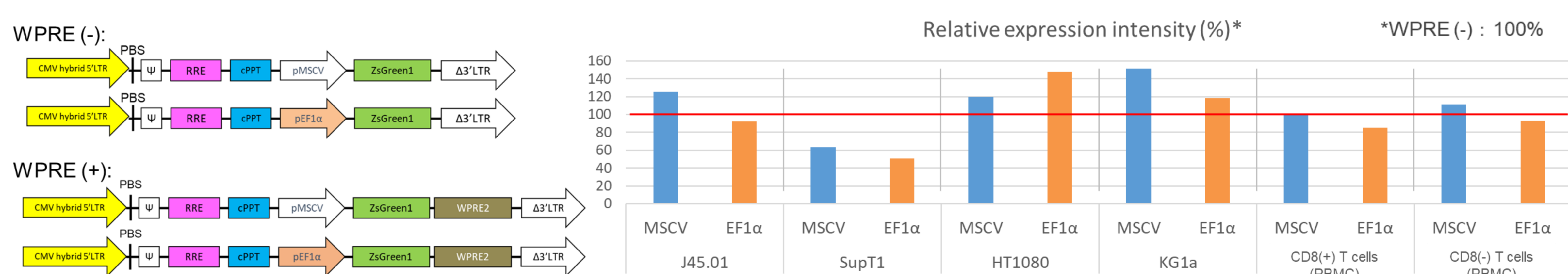
✓ 複数遺伝子を発現させる場合、発現を増強させたい遺伝子の直下にWPRE配列を搭載することで、その遺伝子の発現が上昇する。

COI開示:

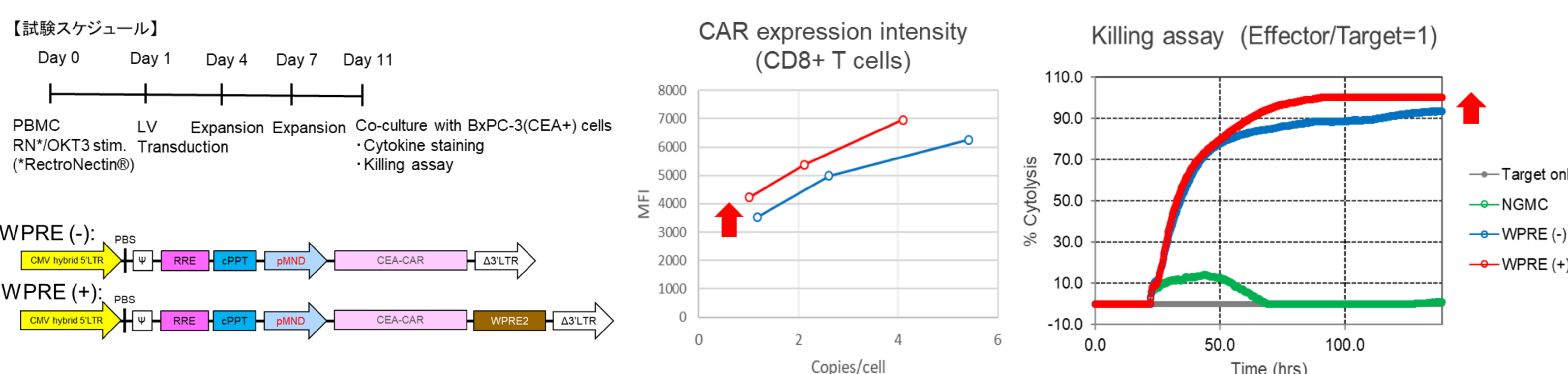
発表者名: 榎いづみ、天石泰典、永田亮佑、岡本幸子、峰野純一
発表者はタカラバイオ株式会社の従業員である。
演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある他企業などはありません。

WPRE配列搭載による発現への影響

(1) WPRE配列は目的遺伝子の発現の増強とウイルス力価を向上させる目的で挿入されるが、WPRE配列の搭載による目的遺伝子発現への影響を検討。



(2) 抗CEA-CAR発現レンチウイルスベクターを作製し、WPRE配列搭載による影響を比較。



(1) WPRE配列搭載による発現への影響は、細胞の種類やプロモーターの種類によって異なる。
(2) CEA-CARベクターにおいて、WPRE配列を搭載することでCARの発現および傷害活性が向上。

まとめ ~遺伝子治療用レンチウイルスベクターの最適化に重要なポイント~

- ◆ 標的細胞の種類や目的遺伝子によって、プロモーターの種類を選択する
- ◆ Provirusのスライシングが起こりにくい、プロモーターと遺伝子配列の組み合わせを選択する
- ◆ WPRE配列の搭載は細胞種、プロモーター種によって判断する
- ◆ WPRE配列の搭載位置は、発現を増強させたい遺伝子の下流に搭載する