

## 厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

CD34 陽性細胞を標的とするADA欠損症における  
遺伝子治療臨床研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 崎山 幸雄

平成14年（2002年）3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

崎山 幸雄

CD34 陽性細胞を標的とする ADA 欠損症における遺伝子治療臨床研究..... 1

## II. 分担研究報告

1. 小林 邦彦

遺伝子治療臨床研究の効果、安全性解析..... 3

2. 小林 正伸

血液幹細胞への遺伝子導入基礎実験..... 5

3. 有賀 正

ADA 欠損症の遺伝子解析、酵素補充療法の評価..... 6

4. 川村 信明

ADA 欠損症の遺伝子解析、酵素補充療法の評価..... 8

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 10

IV. 研究成果の刊行物・別冊..... 11

# I .総括研究報告書

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

（分担・**総括**）研究報告書

CD34陽性細胞を標的とするADA欠損症における遺伝子治療臨床研究 主任研究者 崎山 幸雄

## 研究要旨

平成7年8月から平成14年3月まで実施されたアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症患者に対する患児末梢血T細胞を標的とした酵素補充療法下の遺伝子治療臨床研究について、遺伝子導入細胞とその体内動態、免疫能、安全性などについて7年間の経緯を解析する。

新たにADA欠損症2家系の遺伝子解析を行い、酵素補充療法の評価と血液幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究の可能性を検討する。

臍帯血、正常人・ADA欠損症骨髓血由来のCD34陽性(+)細胞を標的にレトロウイルスベクターGCsapM-ADAを用いて遺伝子導入後、NOD/SCIDマウスの尾静脈内投与によって、マウス脾臓、骨髓にCD45+CD34+細胞、CD45+CD19+細胞とベクター由来ADAcDNAの存在を解析する。これらに基づいて骨髓血CD34陽性細胞を標的とするADA欠損症に於ける遺伝子治療臨床研究プロトコールを作成する。

## A. 研究目的

ADA欠損症における末梢血T細胞を標的にした遺伝子治療臨床研究の有効性、安全性について酵素補充療法併用下に解析する。新たにADA欠損症家系の遺伝子解析を行って治療方針を決定し、その評価をする。さらに、CD34+細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究に向けてNOD/SCIDマウスを用いて血液幹細胞への遺伝子導入法を解析する。

## B. 研究方法

1) ADAGENによる酵素補充療法(週1回、1バイアル筋肉内注射)継続下に遺伝子治療中断後の臨床経過、一般血液生化学検査、リンパ球機能検査、増殖性レトロウイルス検査、遺伝子導入細胞の検索等を経時的に解析する。2)新たに臨床診断された重症複合免疫不全症のADA遺伝子解析、酵素補充療法の評価を行う。3)臍帯血、正常人・患児骨髓血由来のCD34+細胞を標的に新規レトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADA(MPSV)、レトロネクチン、SCF、TPO、Flt3リガンドを使用してADA遺伝子を導入する。さらに、ADA遺伝子導入CD34+細胞をNOD/SCIDマウスの尾静脈内に投与し、末梢血、脾臓、骨髓におけるCD45+CD19+細胞、CD45+CD34+細胞の経時的解析、ADA遺伝子の検索を行う。

## C. 研究結果

1.酵素補充療法下に患児末梢血T細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究について治療開始後7年を経て以下の結果を得た。

1) ADAEGNは遺伝子治療前25単位/kg体重/週から14単位/kg体重/週に減量が可能になった。2)末梢血リンパ球数は、500~1,000/ $\mu$ Lと低値である。3)導入ADA遺伝子は末梢血単核球の0.045~0.09copy/cellに検出される。4)末梢血単核球中ADA活性は5~10単位を維持し、抗CD3抗体による試験管内刺激によって20~30単位に増加を認める。5)水痘、麻疹罹患後にそれぞれの抗体上昇、正常下限域の血清免疫グロブリン値を維持し、遺伝子治療前に施行されていた静注用グロブリン製剤の定期的投与は中止されている。6)副作用は認められていない。7)増殖性レトロウイルス検査は全て陰性で

ある。8)患児の身体発育は正常域である。

2.新たにADA欠損症の2家系を診断、1症例に酵素補充療法を開始した。

3.レトロネクチン使用下にFlt3リガンド、TPO、SCFで前培養した臍帯血由来CD34+細胞(N=14)、正常人骨髓血由来CD34+細胞(N=6)、ADA欠損症骨髓血由来CD34+細胞(N=2)への遺伝子導入、遺伝子導入細胞のNOD/SCIDマウスへの尾静脈内注入実験を実施した。遺伝子導入効率臍帯血由来CD34+細胞:0.44 $\pm$ 0.19copy/cell、正常人骨髓血由来CD34+細胞:0.45 $\pm$ 0.14、患児骨髓血由来CD34+細胞:0.46 $\pm$ 0.14で、これらの導入細胞を注入6-8週後のマウス脾臓、骨髓細胞中にCD45+CD19+細胞の出現とベクター由来ADAcDNAを検出した。

## D. 考察

患児末梢血T細胞を標的とした酵素補充療法下の遺伝子治療臨床研究は年余にわたる遺伝子導入細胞、遺伝子発現を末梢血単核細胞に見いだして、抗体産生能の再建に関わっていると考えられた。レトロネクチン、Flt3リガンド、SCF、TPOの使用はレトロウイルスベクターによるヒトCD34+細胞への遺伝子導入に有用と考えられた。また、NOD/SCIDマウスへの遺伝子導入ヒトCD34陽性細胞の静脈内投与によって導入遺伝子を発現するヒトB細胞を検出することが可能と考えられた。

## E. 結論

末梢血T細胞を標的としたADA欠損症における遺伝子治療臨床研究で、導入遺伝子の持続的な発現と安全性が確認された。レトロウイルスベクターGCsapM-ADAを用いてレトロネクチン、Flt3リガンド、SCF、TPOによるヒトCD34+細胞へ遺伝子導入による遺伝子治療臨床研究はNOD/SCIDマウスの系でその有用性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

○Makoto Otsu, Michael S.Hershfield, Laura M. Tuschong, Linda M.Muul, Masafumi Onodera, Tadashi Ariga, Yukio Sakiyama, Fabio Candotti:Flow Cytometry Analysis of Adenosine Deaminase(ADA) Expression:A

Simple and Reliable Tool for the Assessment of ADA-Deficient Patients Before and After Gene Therapy. *Hum Gene Ther*, 2002,13(425-432)

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Koji Yamaguchi, Nobuaki Kawamura, Hideki Kikuta, Shoichiro Taniuchi, Yohonosuke Kobayashi, Kihei Terada, Hisami Ikeda, Michael S.Hershfield, Kunihiko Kobayashi, Yukio Sakiyama: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*,2001,97(2896-2899)

○Yoshikata Misaki, Ichiko Ezaki, Tadashi Ariga, Nobuaki Kawamura, Yukio Sakiyama, Kazuhiko Yamamoto:Gene-transferred Oligoclonal T Cells Predominantly Persist in Peripheral Blood from an Adenosine Deaminase-Deficient Patient during Gene Therapy. *Mol Therapy*, 2001,3(24-27)

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Ines Sanstesteban, Francisco X.Arredonido-Vega, Mitsutaka Shioda, Hideki Ueno, Kihei Terada, Kunihiko Kobayashi, Michael S.Hershfield, Yukio Sakiyama:Molecular Basis for Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase(ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency. *J Immunol*, 2001,166 (1698-1702)

## 2. 学会発表

○Tatsunosuke Ichimura, Ju-kei Yoshida, Tadashi Ariga, Masafumi Onodera, Yukio Sakiyama:Additional ADA gene transfer to peripheral T-lymphocytes obtained from the patient with ADA-SCID who had undergone peripheral-T-lymphocyte-directed gene therapy. Fourth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May30-June 3,2001, Seattle, Washington, USA

○Ju-kei Yoshida,1 Tatsunosuke Ichimura,1 Masafumi Onodera,2 Shin Kaneko,2 Tadashi Ariga and Yukio Sakiyama1:Feasibility study using SCID repopulating cells in hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase deficiency.第7回日本遺伝子治療学会、東京、2001年7月

## Ⅱ.分担研究報告書

### 研究要旨

平成7年8月から平成14年3月まで末梢血T細胞を標的とした酵素補充療法下の遺伝子治療臨床研究をアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症患者に対して実施した。遺伝子導入細胞の投与中断後の臨床経過、末梢血単核細胞に於ける導入遺伝子とその酵素活性の発現、血清免疫グロブリン値、T細胞レパトア、安全性などについて解析する。また新規に国内で診断され、酵素補充療法を選択したADA欠損症の治療効果を評価する。これらの結果に基づき酵素補充療法中断下の患児骨髓血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究に向けてその可能性を検討する。

### A. 研究目的

ADA欠損症における末梢血T細胞を標的とした酵素補充療法併用下の遺伝子治療臨床研究の有効性、安全性について解析する。さらに、新規に診断されたADA欠損症の酵素補充療法の効果を評価する。また酵素補充療法中断下の患児骨髓血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究に向けてその可能性を検討する。

### B. 研究方法

1)ADAGENによる酵素補充療法(週1回、1バイアル筋肉内注射)の継続下に遺伝子導入細胞の投与中断後の症例(1)について臨床経過、一般血液生化学検査、リンパ球機能検査、リアルタイム定量PCR法による遺伝子導入細胞の検索、TCRVβのクロナリティ、ADA酵素活性による導入遺伝子の発現等を経時的に解析する。2)新たなADAGEN治療中のADA欠損症(症例2)についてその臨床経過、リンパ球数、T細胞分画、血清免疫グロブリン、リンパ球機能検査などの解析によってADAGENによる治療効果を評価する。

### C. 研究結果

1.酵素補充療法下に患児末梢血T細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究(症例1)について治療開始後7年を経て以下の結果を得た。

1) ADAEGNは遺伝子治療前25単位/kg体重/週から14単位/kg体重/週に減量が可能になった。2)末梢血リンパ球数は、500~1,000/μLと低値である。3) 導入ADA遺伝子は末梢血単核球の0.045~0.09copy/cellに検出される。4) 末梢血単核球中ADA活性は5~10単位を維持している。5)抗CD3抗体による試験管内刺激によって導入ADA遺伝子はやや増加傾向でADA活性は20~30単位に増加を認める。5)正常下限域の血清免疫グロブリン値を維持し、遺伝子治療前に施行されていた静注用グロブリン製剤の定期的投与は中止されている。6)水痘、麻疹罹患後にそれぞれの特異抗体の上昇を認めて治癒した。7) 副作用は認められていない。8) 増殖性レトロウイルス検査は全て陰性である。9) 患児の身体発育は正常域である。

2.新たなADA欠損症患児(症例2)はADAGENによる酵素補充療法：30-45単位/kg体重/週の維持後も1)

リンパ球数300-500/μL、末梢血T細胞30%と著明なリンパ球数低値が持続している。2)血清免疫グロブリン低値は持続し、4週毎のγグロブリン補充療法、ST合剤の感染予防内服、日常生活の逆隔離が持続されている。

### D. 考察

患児末梢血T細胞を標的とした酵素補充療法下の遺伝子治療臨床研究は7年を経て導入遺伝子、遺伝子発現を末梢血単核細胞に見だし、常用量のほぼ1/4の酵素補充療法で抗体産生能の再建に関わっていると考えられた。しかし、リンパ球数低値は持続し、遺伝子導入細胞の生体内での存在は漸減傾向にあることがTCRVβのクロナリティ解析から示唆された。酵素補充療法の中断とより長期的な遺伝子導入細胞の維持を考えると骨髓血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究は、適応になると考えられる。

また新規に診断されたADA欠損症は酵素補充療法開始後2年8ヶ月を経てもその治療効果は極僅かなリンパ球数増加に限られている。遺伝子治療の適応になるものと考えられる。

既に遺伝子治療臨床研究を受けている症例1においては酵素補充療法中断後のADA遺伝子を維持する細胞の動態、症例1.2で新たな遺伝子導入骨髓血CD34陽性細胞からの生体内での選択的増殖・生存・分化の優位性に及ぼす酵素補充療法の影響などを解析することが可能になると考える。

### E. 結論

末梢血T細胞を標的としたADA欠損症における遺伝子治療臨床研究で、7年を経て導入遺伝子の持続的な発現と安全性が確認された。しかし、末梢血リンパ球数低値は持続し、酵素補充療法は持続されており、根治に向けて新たな治療法の必要性も明らかとなった。新規に診断されたADA欠損症は酵素補充療法の開始後2年8ヶ月を経て、治療効果が限局されていることが確認された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Koji Yamaguchi, Nobuaki Kawamura, Hideki Kikuta, Shoichiro Taniuchi, Yohonosuke Kobayashi, Kihei Terada, Hisami Ikeda,

Michael S.Hershfield, Kunihiro Kobayashi, Yukio Sakiyama: 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*, 2001, 97(2896-2899)

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Ines Sanstisdeban, Francisco X.Arredonido-Vega, Mitsutaka Shioda, Hideki Ueno, Kihei Terada, Kunihiro Kobayashi, Michael S.Hershfield, Yukio Sakiyama: Molecular Basis for Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase(ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency. *J Immunol*, 2001, 166 (1698-1702)



## 研究要旨

血液幹細胞を標的とした遺伝子治療の基礎的研究としてCD34陽性細胞を標的として遺伝子導入実験を実施し、臨床応用への可能性を検討する。標的として臍帯血由来のCD34陽性細胞、正常人ボランティアの骨髓血CD34陽性細胞、ADA欠損症患者由来の骨髓血CD34陽性細胞を用いる。遺伝子導入には二種類のレトロウイルスベクター；新規のPG13/GCsap-ADA(MPSV)と従来用いたLASNを使用する。遺伝子導入効率の評価にはリアルタイム定量PCR法による検討、その発現の評価は患者細胞をもちいた場合のADA酵素活性の測定で行う。また、NOD/SCIDマウスを用いて遺伝子導入細胞が生体内で分化増殖しうるかどうか、導入遺伝子を保持し続けるかも判定する。

## A. 研究目的

ADA欠損症に対するCD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究に向け、遺伝子導入方法、その評価方法を確立する。さらに、NOD/SCIDマウスを用いた血液幹細胞への遺伝子導入を解析し、遺伝子導入細胞の生体内での分化・増殖能を検討する。遺伝子治療の対象となりうる患者由来の細胞を標的とした基礎研究も実施し評価する。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝子導入方法

臍帯血、骨髓血よりマグネットビーズ法にてCD34陽性細胞を採取する。遺伝子治療臨床研究の対象となる可能性のある2症例からも骨髓血を採取し遺伝子導入操作を試みる。その純度をFACSで確認後、サイトカインのカクテル（SCF, TPO, Flt-3L）存在下で24時間培養後、フィブリノネクチンをコートしたプレート上でベクター上清を用いて繰り返し（4x/48hr）遺伝子導入を実施する。ADA遺伝子導入には二種類のレトロウイルスベクター；新規のPG13/GCsap-ADA(MPSV)と従来用いたLASNを使用する。

### 2) 評価方法

遺伝子導入効率は通常のPCR法に加え、リアルタイム定量PCR法にて評価し、最善の導入効率が得られる条件を検討する。患者からのCD34陽性細胞を用いた場合は遺伝子の発現を評価する目的で導入前後でのADA酵素活性を薄層クロマトグラフィー法にて算出する。さらに遺伝子導入細胞の生体内での分化・増殖を検討するため放射線処理したNOD/SCIDマウスへ移植し、6-8週後に人細胞の有無と導入遺伝子の有無をFACS法、PCR法で検索する。

### （倫理面への配慮）

臍帯血、正常人骨髓血の採取に関しては予めその目的と意義を説明し、目的以外の研究には用いないことと同意をえる。患者からの骨髓血採取に関しても両親、本人に十分な説明・同意を得て実施する。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝子導入効率の評価

臍帯血、骨髓血由来のCD34陽性細胞への遺伝子導入効率は、新規のPG13/GCsap-ADA(MPSV)では0.4-0.5 copy/cellであった。これは従来用いたベクターLASNを用いた結果の0.1-0.2 copy/cellに比べ優位に高率であった。患者由来の骨髓CD34陽性細胞では新規ベクターによる遺伝子導入効率は0.3-0.4 copy/cellであった。

### 2) 導入遺伝子発現の評価

患者の細胞を用いた遺伝子導入ではADA酵素活性の測定により導入遺伝子の発現の評価が可能である。遺伝子導入効率を同等と換算した場合、酵素活性の増加は新規のPG13/GCsap-ADA(MPSV)が有意にLASNよりも優れていた。PG13/GCsap-ADA(MPSV)を用いて2症例のCD34+細胞への遺伝子導入の結果、ADA酵素活性は1-2単位から15-20単位へ増加が確認された。

### 3) NOD/SCIDマウスへの移植実験の結果

遺伝子を導入した臍帯血、骨髓血いずれのCD34陽性移植の場合もマウス脾臓、骨髓にてヒト細胞を検出し、ミエロイド系、B細胞系への分化していることが確認された。さらに、それらの細胞の中に導入遺伝子の存在がPCR法で確認された。

患者由来の骨髓CD34陽性細胞を用いた移植の場合も同様の結果が得られた。

## D. 考察

新規のPG13/GCsap-ADA(MPSV)を用いたヒトCD34陽性細胞へのADA遺伝子導入方法が確立した。NOD/SCIDを用い、患者骨髓由来のCD34陽性細胞を用いた実験からこの方法が臨床研究へ応用可能であることが示唆された。

## E. 結論

レトロウイルスベクターGCsapM-ADAを用いてレトロネクチン、Flt-3L、SCF、TPOによるヒトCD34陽性細胞へ遺伝子導入方法が確立し、遺伝子治療臨床研究への応用の可能性が示唆された。

### 研究要旨

新規に臨床診断されたADA欠損症2家系(I,II)の遺伝子解析を行う。解析によって興味ある保因者を家系IIIに見だし、その病態の解明を行う。さらに家系Iでは次子の妊娠が判明し、出生前診断と、骨髄移植の提供者の可能性の有無につき検討する。家系Iの症例は酵素補充療法を実施しているが十分な治療効果が得られておらず、骨髄血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究に向けて経過観察中。家系IIの症例はHLA一致の同胞から骨髄移植を実施し経過を観察中である。

### A. 研究目的

1) ADA欠損症に対する遺伝子治療臨床研究への新規の対象となるべき症例を検討するため、新たに臨床診断された2家系(I,II)のADA欠損症の遺伝子解析を行い、診断を確定する。2) 家系IIでは極めて低いADA活性を保因者である母親、兄にも認めその機序の解析をこころみる。3) 家系Iでは酵素補充療法の経過観察中に次子の妊娠が判明し、両親の希望によって出生前診断、骨髄提供者としての適合性をも検討する。

### B. 研究方法

臨床的に重症複合免疫不全と診断され、スクリーニングでADA酵素活性が極めて低いと判定された2症例とその家族を検索する。

1) 遺伝子解析はDNAを分離しADA遺伝子をエクソンごとにPCRで増幅させて直接塩基配列を検索、変異検出を試みる。2) 予想外にADA活性が低い保因者に関しても病因とはならない変異の有無を検討し、EBV樹立細胞株の活性等からも検討する。3) 両親の同意の下に羊水細胞を採取、培養して遺伝子解析、ADA酵素活性を検討、またHLAのタイピングも実施する。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に関しては学内の倫理委員会の承諾、本人、両親の同意を得て行う。出生前診断に関しても同様である。

### C. 研究結果

1) 遺伝子解析の結果、家系Iでは父由来のQ119Xと母由来のR235Qを認め、家系2では父由来のエクソン4内での一塩基欠損と母由来のR235Qを認めた。R235Qは*in vitro*のADA欠損株を用いた発現実験にてADA酵素活性が極めて低く、病的変異が確認された。

2) 末梢血単核球のADA酵素活性は家系IIの母親、兄が極めて低値であったが、樹立したEBV樹立細胞株では正常者の約1/6-1/3であった。遺伝子解析の結果、病因とはならないもののADA活性が低くなる変異M310Tを検出した。この変異は非常に不安定なADA酵素を形成することがEBV樹立細胞株を用いた熱実験で示された。

3) 家系Iの母親の羊水細胞から得たDNAの解析で両方のalleleには変異を認めず、非患者、非保因者であることが示された。羊水細胞のADA酵素活性も十分

な値を示した。一方HLAのタイピングの結果は患者である姉と全くことな型であった。

### D. 考察

1) 遺伝子解析により、2家系のADA欠損症としての診断が確定した。家系Iの症例はHLAの一致した血縁骨髄提供者が存在せず、現在酵素補充療法を継続している。家系IIの症例は研究結果2)で示した兄からの骨髄移植を実施し経過良好である（しかしながら末梢血単核球のADA活性は極めて低く、低γグロブリン血症を認めγグロブリン補充療法を必要としている）。3) 家系Iの出生前診断した児はその後無事に出生し、現在も良好な発育を認めている。繰り返しHLAの検索を行ったが同様の結果であった。4) 家系Iの症例では現在酵素補充療法を実施しているが末梢血リンパ球数は低値を持続している。現在CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の適応を考慮し経過を観察している。

### E. 結論

新たなADA欠損症2家系の遺伝子学的検討の結果、診断が確定し、家系Iの症例は酵素補充療法、家系IIの症例はHLA一致同胞より骨髄移植を実施した。酵素補充療法の実施例は現在CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の適応を考慮し経過観察中である。また、骨髄移植をした症例では骨髄を提供した同胞が極めて特殊な保因者であるため、その経過にも注意すべきである。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Koji Yamaguchi, Nobuaki Kawamura, Hideki Kikuta, Shoichiro Taniuchi, Yohonosuke Kobayashi, Kihei Terada, Hisami Ikeda, Michael S. Hershfield, Kunihiko Kobayashi, Yukio Sakiyama: 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* 2001, 97(2896-2899)

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Ines Sansteban, Francisco X. Arredondo-Vega, Mitsutaka Shioda, Hideki Ueno, Kihei Terada, Kunihiko Kobayashi, Michael S. Hershfield, Yukio Sakiyama: Molecular Basis for

Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase(ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency. *J Immunol*, 2001,166 (1698-1702)

○Makoto Otsu, Michael S.Hershfield, Laura M. Tuschong, Linda M.Muul, Masafumi Onodera, Tadashi Ariga, Yukio Sakiyama, Fabio Candotti:Flow Cytometry Analysis of Adenosine Deaminase(ADA) Expression:A Simple and Reliable Tool for the Assessment of ADA-Deficient Patients Before and After Gene Therapy. *Hum Gene Ther*, 2002,13(425-432)

○Yoshikata Misaki, Ichiko Ezaki, Tadashi Ariga, Nobuaki Kawamura, Yukio Sakiyama, Kazuhiko Yamamoto:Gene-transferred Oligoclonal T Cells Predominantly Persist in Peripheral Blood from an Adenosine Deaminase-Deficient Patient during Gene Therapy. *Mol Therapy*, 2001,3(24-27)

## 2. 学会発表

○Tatsunosuke Ichimura, Ju-kei Yoshida, Tadashi Ariga, Masafumi Onodera, Yukio Sakiyama:Additional ADA gene transfer to peripheral T-lymphocytes obtained from the patient with ADA-SCID who had undergone peripheral-T-lymphocyte-directed gene therapy. Fourth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May30-June 3,2001, Seattle, Washington, USA

○Jukei Yoshida,1 Tatsunosuke Ichimura,1 Masafumi Onodera,2 Shin Kaneko,2 Tadashi Ariga1 and Yukio Sakiyama1:Feasibility study using SCID repopulating cells in hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase deficiency. 第7回日本遺伝子治療学会、東京、2001年7月

## 研究要旨

新たに臨床診断されたADA欠損症2家系の遺伝子解析を行う。解析中に興味ある保因者を検出し、その病態を解析する。また家系Iの症例に体内で変異が自然解消している細胞を検出したので、その病態の解明を行う。家系Iの症例はHLA一致血縁骨髄ドナーが得られずに酵素補充療法を開始しているためその評価を行い、酵素補充療法の遺伝子治療に及ぼす影響を検討する。

## A. 研究目的

1) ADA欠損症に対する遺伝子治療への新規の対象となるべき症例を検討するため、新規に臨床診断された2家系(I,II)のADA欠損症の患者の遺伝子解析を行い、診断を確定する。2) 家系IIでは保因者である母親、兄に極めて低いADA活性を認めたので、その機序の解析を試みる。3) 家系Iでは酵素補充療法での経過観察中に母親に次子の妊娠が判明し、両親の希望によって出生前診断、骨髄提供者としての適合性を検討する。4) ADA遺伝子変異が自然解消している細胞の存在が症例I,IIで推定され、その解析を試みる。

## B. 研究方法

臨床的に重症複合免疫不全と診断され、スクリーニングでADA酵素活性が極めて低いと判定された2症例とその家族を検索する。

1) 遺伝子解析はDNAを分離しADA遺伝子をエクソンごとにPCRで増幅させて直接塩基配列を検索、変異検出を試みる。2) 予想外にADA活性が低い保因者に関して病因とはならない変異の有無を検討し、EBV樹立細胞株の活性等からも検討する。3) 患者からHV saimiriを用いてT細胞株を樹立しそのADA活性と遺伝子変異の有無、その細胞のオリジン等を検討する。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に関しては学内の倫理委員会の承諾、本人、両親の同意を得て行う。出生前診断に関しても同様である。

## C. 研究結果

1) 遺伝子解析の結果、家系Iの症例では父由来のQ119Xと母由来のR235Qを認め、家系IIの症例では父由来のエクソン4内での一塩基欠損と母由来のR235Qを認めた。R235Qはin vitroのADA遺伝子欠損細胞に於ける発現実験にてADA酵素活性が極めて低く、病的変異であることが確認された。

2) 末梢血単核球のADA酵素活性は家系IIの母親、兄が極めて低値であったが、樹立したEBV樹立細胞株では正常者の約1/6-1/3であった。遺伝子解析の結果、病因とはならないもののADA活性が低くなる変異M310Tを検出した。この変異は非常に不安定なADA酵素を形成することがEBV樹立細胞株を用いた熱負荷実験でしめされた。

3) 両患者からHV saimiriを用いたT細胞株が樹立したが、この細胞株の酵素活性は予想外にも正常者の約

1/2を示した。遺伝子解析の結果、家系Iの症例では父由来の、家系IIの症例では母由来の変異の解消が確認された。家系IIの症例ではin vitroでの培養中に変異が解消した可能性が示唆された。家系Iの症例では体内でADA遺伝子変異の解消した細胞が存在する可能性が反復して示唆された。酵素補充療法の開始後に繰り返して細胞株の樹立を試みたが不可能であった。

## D. 考察

1) 遺伝子解析により、2家系のADA欠損症としての診断が確定した。家系IはHLAの一致した骨髄提供者が存在せず、現在酵素補充療法を継続している。家系IIの症例は研究結果2)で示した兄からの骨髄移植を実施し経過良好である（しかしながら末梢血単核球のADA活性は極めて低い）。2)家系IIの保因者である母、兄は末梢血単核球のADA活性が極めて低く病因とはならない変異が存在し、そのADAは不安定な酵素活性を示すことが明らかになった。3) 症例Iで酵素補充療法前にはその存在が示唆されたADA遺伝子変異の解消した細胞が補充療法開始後には検出が困難になった。このことは酵素補充療法がADA発現細胞の増殖・分化・生存に於ける非発現細胞に対する優位性を希薄にさせる可能性を示唆する。遺伝子治療に於ける酵素補充療法併用の再評価が必要と考えられる。また酵素補充療法を中断して遺伝子治療を実施する場合には体内に残存している可能性のある変異遺伝子の消失した細胞の動向に注意することが必要と考えられる。

## E. 結論

新規のADA欠損症2家系の遺伝子学的検討の結果、診断が確定し、家系Iの症例は酵素補充療法を開始した。酵素補充療法の開始前に体内でADA遺伝子変異の解消した細胞の存在が示唆され、この細胞は補充療法開始後には検出されなくなっている。酵素補充療法がADA産生細胞の非産生細胞に対する選択的増殖・生存の優位性を損なう可能性が示唆される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

○Tadashi Ariga, Noriko Oda, Koji Yamaguchi, Nobuaki Kawamura, Hideki Kikuta, Shoichiro Taniuchi, Yohonosuke Kobayashi, Kihei Terada, Hisami Ikeda, Michael S.Hershfield, Kunihiko Kobayashi, Yukio

Sakiyama: 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*, 2001, 97(2896-2899)

○ Tadashi Ariga, Noriko Oda, Ines Sanstesteban, Francisco X. Arredondo-Vega, Mitsutaka Shioda, Hideki Ueno, Kihei Terada, Kunihiko Kobayashi, Michael S. Hershfield, Yukio Sakiyama: Molecular Basis for Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase (ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency. *J Immunol*, 2001, 166 (1698-1702)

### Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

#### 和文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
崎山幸雄	遺伝子治療の現状と問題点-免疫不全	小児内科	34	115-118	2002
崎山幸雄	重症複合免疫不全症の遺伝子治療	小児科診療	65	324-325	2002
崎山幸雄	原発性免疫不全症の遺伝子治療	北海道医報	17	38-42	2002
崎山幸雄 有賀 正 川村信明	遺伝病の遺伝子治療-ADA 欠損症への臨床応用	治療	83	166-169	2001
有賀 正	ADA 欠損症	日本臨床	59	72-75	2001

#### 英文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Makoto Otsu, Michael S.Hershfield, Laura M. Tuschong, Linda M. Muul, Masafumi Onodera, Tadashi Ariga, Yukio Sakiyama, Fabio Candotti	Flow Cytometry Analysis of Adenosine Deaminase(ADA) Expression:A Simple and Reliable Tool for the Assessment of ADA-Deficient Patients Before and After Gene Therapy.	Human Gene Therapy	13	425-432	2002
Tadashi Ariga, Noriko Oda, Koji Yamaguchi, Nobuaki Kawamura, Hideki Kikuta, Shoichiro Taniuchi, Yohonosuke Kobayashi, Kihei Terada, Hisami Ikeda, Michael S.Hershfield, Kunihiko Kobayashi, Yukio Sakiyama	T-cell lines from 2 patients with adenosine deaminase(ADA)deficiency showed the restoration of ADA activity resulted from the reversion of an inheited mutaion.	Blood	97	2896-2899	2001
Yoshikata Misaki, Ichiko Ezaki, Tadashi Ariga, Nobuaki Kawamura, Yukio Sakiyama, Kazuhiko Yamamoto	Gene-transferred Oligoclonal T Cells Predominantly Persist in Peripheral Blood from an Adenosine Deaminase-Deficient Patient during Gene Therapy.	Molecular Therapy	3	24-27	2001
Tadashi Ariga, Noriko Oda, Ines Sanstisteban, Franxisco X.Arredonido-Vega, Mitsutaka Shioda, Hideki Ueno, Kihei Terada, Kunihiko Kobayashi, Michael S.Hershfield, Yukio Sakiyama	Molecular Basis for Paradoxical Carriers of Adenosine Deaminase(ADA) Deficiency That Show Extremely Low Levels of ADA Activity in Peripheral Blood Cells Without Immunodeficiency.	Journal Immunolgy	166	1698-1702	2001

## IV.研究成果の刊行物・別冊

20010436

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。