

## 厚生労働科学研究費補助金

### 基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 崎山 幸雄

平成 16 年 (2004 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

酵素補充療法中断下遺伝子治療の危険性・利益の評価…………… 3

2) 守内 哲也

CD34 陽性細胞への遺伝子導入、末梢血液細胞のクローナリティ、遺伝…………… 6  
子挿入部位の解析

3) 有賀 正

血液幹/前駆細胞への遺伝子導入、ADA 遺伝子の検索・評価…………… 9

4) 大津 真

血液幹/前駆細胞、末梢血液細胞での導入遺伝子の発現解析…………… 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 15

IV. 研究成果の刊行物・別冊…………… 17

# I. 総括研究報告

### 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)欠損症患者における末梢血T細胞を標的とした酵素補充(PEG-ADA)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8年間の最終評価を行う。

ADA欠損症2症例の適応性を評価し、患児骨髓血CD34陽性細胞を標的に新規レトロウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究をPEG-ADA中断下、前処置なしで実施して、その効果と安全性を評価する。

### A. 研究目的

致死的な疾患であるアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症における根治療法を確立することを目的に、酵素補充(PEG-ADA)療法併用下の末梢血T細胞を標的にした遺伝子治療臨床研究の有効性、安全性について最終的に評価する。次いで、血液幹/前駆細胞；CD34陽性細胞を標的にした遺伝子治療臨床研究に向けて対象患児の適応性を検討して実施、その効果と安全性を評価する。

### B. 研究方法

1.PEG-ADA療法(週1回、1バイアル筋肉内注射)継続下に遺伝子導入細胞の投与中断後の症例A.1.について末梢血リンパ球数、リンパ球機能検査、野生型レトロウイルス、末梢血単核細胞における導入遺伝子の定量的解析、導入遺伝子発現等を経時的に解析して最終評価を行う。

2.血液幹/前駆(CD34陽性)細胞を自動的に分離し、これを標的に新規レトロウイルスベクター(PG13/GCsapM-ADA)を用いて遺伝子導入法の条件を評価し、CD34陽性細胞を標的とする遺伝子導入法を確立する。

CD34陽性細胞はIsolex™300iシステムを用いて自動的に分離する。遺伝子導入にはリコンビナントフィブロネクチン(レトロネクチン、宝酒造供与)をコートし、ベクターをプレロードしたガス透過性バック、臨床使用が米国で認可されているサイ

トカイン；stem cell factor(SCF), thrombopoietin(TPO), Flt3リガンド(Flt-3L), IL-6, 可溶性IL-6受容体(sIL-6R)(R&D社より購入)のカクテルを用いる。

3.遺伝子導入効率はPCR法に加えてリアルタイム定量PCR法、コロニー形成細胞を用いたPCR法にて評価する。治療後の遺伝子導入リンパ球増加時には遺伝子挿入部位の解析をLAM-PCR法にて行う。

4.適応患児を決定し、PEG-ADAを中断後、前処置なしに患児骨髓血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究を実施、その効果、安全性を解析する。

### C. 研究結果

1.PEG-ADA療法下に末梢血T細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究について遺伝子導入細胞の投与開始後8年を経て以下の最終結論を得た。

1) 症例A.1のPEG-ADAは遺伝子治療前5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)末梢血単核球に0.04~0.09copy/cellの導入ADA遺伝子が検出される4)。末梢血単核球ADA活性は~5単位で、血清免疫グロブリン値IgG,IgA,IgMは正常下限に維持されている。5)野生型レトロウイルス発現を含め、副作用は認められていない。6)患児の身体発育は年齢相応で、通常の日常生活を送っている。

2.CD34陽性細胞のIsolex™300iによる自動

分離は純度80-90%、回収率40-50%、細胞生存率95-98と良好に実施された。

3. コロニー形成法による遺伝子導入効率の解析では50-70%、導入細胞におけるADA活性は患児A2,1でそれぞれ318単位、299単位と正常化が確認された。

4. ADA欠損症患児A2,1にPEG-ADAの最終投与5週後に遺伝子導入細胞の輸注を行った。PEG-ADA中断後は急速に血中ADA活性の減少・消失、dAXPの漸増をもたらした。全身状態の低下をきたした。その後、dAXPは遺伝子導入細胞の輸注2週後をピークに漸減して、これと一致して全身状態の改善を認めている。

#### D. 考察

Isolex™300iシステムによる骨髓血CD34陽性細胞の自動分離は閉鎖回路で分離純度、生存度ともに良好であった。レトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADA、リコンビナントフィブロネクチン、サイトカインカクテルなどの遺伝子導入法の設定は高率なCD34陽性細胞への遺伝子導入、遺伝子発現をもたらした。

#### E. 結論

PEG-ADA療法下のADA欠損症2症例を対象にPEG-ADAを中断し無処置下に患児骨髓血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究を実施し、初期の目的を達成することができた。今後の効果と安全性の解析から有用な知見が得られると考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

● 崎山幸雄：X-SCID遺伝子治療と白血病。臨床免疫、40、99-102、2003。

● 有賀 正：X-SCID遺伝子治療に伴った白血病様副作用；想定される機序とその対策。小児科 45、197-202、2004。

● 有賀 正：原発性免疫不全症の遺伝子治療における白血病発症の機序。臨床免疫

印刷中。

● 有賀 正、崎山幸雄：「目で見る骨系統疾患2004」各論 小児科医が知っておきたい骨系統疾患。Adenosine deaminase (ADA) deficiency. 小児内科第36巻2004年増刊号 印刷中

● Horiuchi K, Ariga T, Fujioka H, Kawashima K, Yamamoto Y, Ikawa H, Sakiyama Y, Sugihara T: Treacher Collins Syndrome with craniosynostosis, occlusion of choanae and esophageal regurgitation caused by nonsense mutation in the *TCOF1*: a new variant. Am J Med Genet. in press

● Ariga T: Gene therapy for primary immunodeficiency diseases; recent progress and misgivings. Current Pharmaceutical Design in press.

#### 2. 学会発表

● 中島 督、有賀 正、山口晃司、大津真、Nelson DL、崎山幸雄：Flow cytometryを用いた末梢血単核球内WASP分子の構造的、機能的解析の可能性。日本免疫学会総会・学術集会、福岡、12/8～12/10、2003。

● 前山義博、大津真、有賀正、加藤紘之、崎山幸雄：Donor骨髓細胞へのCXC chemokine receptor 4 (CXCR4) 遺伝子導入による骨髓移植成績改善の試み。日本免疫学会総会・学術集会、福岡、12/8～12/10、2003。

● M.Otsu, R.Ichimura, J.Yoshida, N.Kawamura, I.Kobayashi, T.Ariga, M.S. Hershfield, Y.Sakiyama. Discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in a patient with ADA-deficiency previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy. American Society of Gene Therapy The 6th meeting, Washington DC, June 5-8, 2003.

## II. 分担研究報告

**研究要旨**

アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に対する治療法としての血液幹／前駆細胞へのレトロウイルスベクターを用いた酵素補充療法中断下での遺伝子治療について、その安全性および治療効果を検討する。

**A. 研究目的**

ADA欠損症患児においてヒト白血球抗原（HLA）の一致する同胞が存在する例ではその同胞をドナーとする骨髄移植を行うことで治癒が期待される。しかしながら、ハプロタイプ一致の片親あるいはHLA一致の非血縁ドナーからの移植、または酵素補充療法（PEG-ADA）単独での生命予後は必ずしも良好とはいえず、これらの代替療法として血液幹／前駆細胞を標的とした遺伝子治療（以下、単に遺伝子治療）の研究が世界的に進められている。本研究においてはPEG-ADA療法中のADA欠損症患児A2,1よりPEG-ADA療法中断下にCD34陽性細胞を採取し、レトロウイルスベクターGCsapM-ADAを用いて遺伝子導入を行った後、前処置なしで患児体内に輸注する方法で遺伝子治療を行い、その有効性、安全性を評価する。

**B. 研究方法**

**1. 遺伝子導入方法**

骨髄血採取に先立ち、PEG-ADAの投与を中断する。生体内の残存するADAが十分に減少した時点で全身麻酔下に骨髄を採取する。全骨髄血から赤血球沈降、および溶血手技にて赤血球を可及的に除いた後、Isolex™ 300iシステムを用いてCD34陽性細胞分画を採取する。前刺激として、ガス透過性バッグ内にて無血清培地（X-VIVO15™ + ヒトアルブミン）、サイトカイン（stem cell factor; SCF, thrombopoietin; TPO, flt3-リガンド, IL-

6, 可溶性IL-6 受容体）存在下に2日間培養する。遺伝子導入はフィブロネクチン断片CH296（レトロネクチン™）をコートしたガス透過性バッグ内にて1日1回、3日間行なう。初日のみ細胞の混入前にレトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADAをバッグ内にプレロードする。以降はウイルス液と上述した無血清培地の1:1混合培地にて培養する。全培養期間6日間の後、細胞を回収、洗浄し、生理食塩水の浮遊液として患児の末梢静脈より輸注する。

**2. 評価方法（倫理面への配慮）**

**1) 安全性の評価**

遺伝子導入細胞における安全性：一般細菌検査、マイコプラズマ感染の有無、エンドトキシン定量、逆転写活性。

患児のモニタリング：一般血液検査、生化学検査、細菌学的検査、免疫学的検査、フローサイトメトリー解析によるクロナリティー検査。導入遺伝子陽性リンパ球の増加があれば遺伝子挿入部位の解析。

**2) 有効性の評価**

遺伝子導入細胞の解析：導入遺伝子の検索、ADA活性測定による機能評価、前駆細胞のコロニー形成能の評価。血漿中ADA値および赤血球中代謝毒性産物（dAXP）濃度の測定。

**C. 研究結果**

**1. 臨床経過**

両患児A2,1ともにPEG-ADAの最終投与から5週間後に遺伝子導入細胞の輸注を

行った（患児A.2: 2003年12月22日、患児A.1: 2004年2月2日）。中断後3週目頃よりリンパ球数が著減し、好中球数の低下も観察された。4週目頃から肝機能障害を反映して血中トランスアミナーゼ値（AST, ALT）が上昇し、軽度の嘔気、食欲不振、活動性の低下がみられた。遺伝子導入細胞輸注後からAST, ALT値は改善し、患児A.2においては細胞輸注後6週で正常化した。肝機能の改善に伴い上記臨床症状も軽快した。細胞輸注からそれぞれ12週、6週後の現在まで、個室管理下に重症感染症の罹患なく両患児とも良好な健康状態を維持している。

## 2. 遺伝子導入

両患児A2,1ともに全身麻酔下に約15 cc/kg体重の骨髓血を採取し、骨髓採取に伴う副反応はみられなかった。計画通りの操作を行い、それぞれ  $1.2 \times 10^6$ /kg体重、 $5.7 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞が得られた。培養および遺伝子導入操作はバッグを用いた閉鎖系で行い、細胞は良好な生細胞率を保ち、それぞれ  $1.4 \times 10^6$ /kg体重、 $9.2 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞の輸注が可能であった。

## 3. 患児のモニタリング

両患児ともにADA欠損による代謝毒性の顕性化と考えられる肝機能異常を認めたが、遺伝子導入細胞輸注後に改善した。血液検査では両患児ともに依然リンパ球減少（患児A.2:  $100\text{--}150/\mu\text{L}$ 、患児A.1:  $200\text{--}300/\mu\text{L}$ ）が続いており、特定のサブセットのクローナルな増殖を疑わせる所見は認めていない。好中球数は最低  $500/\mu\text{L}$  程度にまで減少したが、患児A.2では細胞輸注後に増加し現在  $1000\text{--}1500/\mu\text{L}$ 、患児A.1では  $500\text{--}1000/\mu\text{L}$  で経過しており、異常増殖はみられない。骨髓採取および採血手技に伴い軽度の貧血を認めたが改善し、血小板数は正常のまま経過している。その他、腎機能、電解質等にも異常を認めていない。患児A.2についてDuke大学に依頼

し、細胞輸注後10週までの赤血球中dAXP値を測定したところ、PEG-ADA中断後1週めから蓄積が観察され、中断後7週、遺伝子導入細胞輸注後2週まで急速に値は上昇したが以後漸減に転じ、最終10週の時点ではピーク値の15%まで改善していることが確認された。血液細胞のクロナリティー解析は、リンパ球減少が続いている現時点においては、白血球分画およびフローサイトメトリーにより検討しているが、特定の分画、リンパ球サブセットのクローナルな増殖は認めていない。輸注細胞の一部および毎週の血液検査時に得られる血液細胞サンプルは、明らかなリンパ球数の増加がみられた時点から開始する予定の導入遺伝子の検索、遺伝子挿入部位の解析に用いることができるよう凍結保存を続けている。

## D. 考察

本研究の特色である、治療に先立つPEG-ADAの中断により次の点が明らかになった。

1. PEG-ADAを継続して投与されたADA欠損症患児A.1においての、その中断に伴う血漿ADA値および赤血球中dAXP値の動向である。両患児ともに中断前には正常人血漿ADA値を大きく越える値を維持していたが、中断後急速に値は減少し、最終投与から5週目に最低値となり現在までの観察期間中ほぼその値が維持されている。今回の臨床研究においてはこの5週目の時点で遺伝子導入細胞が輸注されたが、これより早期での遺伝子導入操作では、酵素中断により期待される治療効果の増強が損なわれ、またこれより遅い導入スケジュールでは患児の免疫能、体力の低下による骨髓採取に伴うリスクの増加が懸念される。今後さらに検討の余地はあるものの、PEG-ADA中断から遺伝子導入陽性細胞輸注までを5週間とする日程は術前術後のトラブルもなく2例とも安全に施行することができ、妥当であると考えられた。



2. PEG-ADA中断によってADA欠損に起因する血液、免疫系以外の症状が顕性化した。全身へのアデノシン関連代謝毒性産物dAXPの蓄積を反映して、肝機能障害、食欲不振、嘔気、活動力低下が共通して観察された。遺伝子導入細胞輸注後にdAXPレベルは低下し、肝機能および上記症状ともに改善したため、特別な治療は不要であった。通常、年長児においてのADA欠損症の無治療での症状を観察する機会はごく稀であるため、今回の結果はADA欠損症が全身性代謝性疾患である事実を年長児において示したという点で意義があると同時に、その治療においては血液、免疫系の再建のみならず全身における代謝毒性の改善をも目標とする必要性を再認識させるものである。

血液幹/前駆細胞への遺伝子導入およびその生着の確認は輸注後早期の現時点においては未だ困難であるものの、細胞輸注後のdAXPレベルの改善、それに伴う肝機能、臨床症状の改善が明らかであることから、少なくとも患児体内で生存、増殖しうる比較的未分化な細胞で導入遺伝子、機能蛋白の発現が維持されている可能性は大きいと考えられる。

## E. 結論

1. PEG-ADA中断に伴い、リンパ球減少等の免疫能の低下のみならず肝機能障害、食欲不振などADA欠損に起因する症状が顕性化した。
2. 上記症状は遺伝子導入細胞輸注後に改善し大きな問題とならず、今回の臨床研究においては、酵素補充の中断、骨髄採取から細胞輸注までの一連の手技を比較的安全に行うことが可能であった。
3. 遺伝子導入細胞輸注後12週および6週の現時点において、両患児にリンパ球数の増加は観察されず免疫系の再建はみられていない。しかしながら、上記1)の症状は両患児とも著明に改善しており、特に患児1に

おいては蓄積代謝毒性産物の減少も明らかであることから、ADA欠損症に起因する全身性の代謝毒性を一部緩和するに十分なADAが体内で産生されていることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

●M Otsu, et al. Discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in a patient with ADA-deficiency previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy. American Society of Gene Therapy The 6th meeting, Washington DC, June 5-8, 2003

#### 研究要旨

アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に対する治療法としての血液幹／前駆細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入について、導入条件と遺伝子導入細胞輸注後の安全性を評価する。

### A. 研究目的

ADA欠損症においてその根治療法である骨髄移植、酵素補充療法（PEG-ADA）はそれぞれその適応、治療予後に問題を残している。これらの代替療法として血液幹／前駆細胞を標的とした遺伝子治療（以下、単に遺伝子治療）の研究が世界的に進められている。本研究においてはADA欠損症患者2例より骨髄血CD34陽性細胞を採取し、レトロウイルスベクターGCsapM-ADAを用いた遺伝子導入細胞の投与後の有効性、安全性を評価することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子導入方法

骨髄血から赤血球を可及的に除いた後、Isolex™ 300iシステム；Isolex™ 300i磁気細胞分離システム、ディスプレイザブルセット、Isolex™ 幹細胞分離キットを用いてCD34陽性細胞分画を採取する。前刺激は、ガス透過性バッグ内にて無血清培地（X-VIVO15™ + ヒトアルブミン）、サイトカイン（stem cell factor; SCF, thrombopoietin; TPO, flt3-リガンド, IL-6, 可溶性 IL-6 受容体）存在下に2日間培養する。遺伝子導入はフィブロネクチン断片CH296（レトロネクチン™）をコートしたガス透過性バッグ内にて1日1回、3日間行なう。初日のみ細胞の混入前にレトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADAをガス透過性バッグ内にて1日1回、3日間行なう。初日のみ細胞の混入前にレトロ

ウイルスベクターPG13/GCsapM-ADAをバッグ内にプレロードする。以降はウイルス液と無血清培地の1：1混合培地にて培養する。全培養基間6日間の後、細胞を回収、洗浄し、生理食塩水の浮遊液として患児の末梢静脈より輸注する。

#### 2. 評価方法（倫理面への配慮）

##### 1) 遺伝子導入法の評価

遺伝子導入細胞の解析：導入遺伝子の検索、ADA活性測定による機能評価、前駆細胞のコロニー形成能の評価。

##### 2) 安全性の評価

遺伝子導入細胞における安全性：一般細菌検査、マイコプラズマ感染の有無、エンドトキシン定量、逆転写活性。

患児のモニタリング：一般血液検査、生化学検査、細菌学的検査、免疫学的検査、フローサイトメトリー解析によるクローナリティ検索。導入遺伝子陽性リンパ球の増加があれば遺伝子挿入部位の解析。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床経過

両患児ともにPEG-ADAの最終投与から5週間後に遺伝子導入細胞の輸注を行った（患児A.2: 2003年12月22日、患児A.1: 2004年2月2日）。中断後3週目頃よりリンパ球数が著減し、好中球数の低下も観察された。4週目頃から肝機能障害を反映して血中トランスアミナーゼ値（AST, ALT）が上昇し、嘔気、食欲不振、活動性の著し低下がみられた。遺伝子導入細胞輸注後か

らAST, ALT値は次第に改善し、患児A.2においては細胞輸注後6週で正常化した。肝機能の改善に伴い上記臨床症状も軽快した。細胞輸注からそれぞれ12週、6週後の現在まで、個室クリーンベット管理下に重症感染症の罹患なく両患児とも良好な健康状態を維持している。

## 2. 遺伝子導入

両患児A2,1ともに全身麻酔下に約15 ml/kgの骨髓血を採取し、それぞれ  $1.2 \times 10^6$ /kg体重、 $5.7 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞が得られた。培養および遺伝子導入後、それぞれ  $1.4 \times 10^6$ /kg体重、 $9.2 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞が輸注された。

## 3. 遺伝子導入細胞の解析

安全性試験では一般細菌、真菌、マイコプラズマ全てが陰性であった。最終日の非希釈培養上清中に微量のエンドトキシンが検出されたが、洗浄後の輸注細胞では検出感度以下であった。定量PCR法、およびメチルセルロース培地でのコロニー形成細胞を用いたPCR解析による遺伝子導入細胞の評価では、2例とも50-70%の良好な導入効率が得られた。導入細胞におけるADA活性は患児A.2では遺伝子導入前1.9 U、導入後318.2 U（正常162.5 U）、患児A.1ではそれぞれ1.4 U、299.4 U（正常90.1 U）と正常化しており、ADA機能蛋白の発現が確認された。

## 4. 患児のモニタリング

両患児ともにADA欠損による代謝毒性の顕性化と考えられる肝機能異常を認めたが（前述）、遺伝子導入細胞輸注後に改善した。両患児ともに依然リンパ球減少（患児A.2:  $100-150/\mu\text{L}$ 、患児A.1:  $200-300/\mu\text{L}$ ）が続いており、特定のサブセットのクローナルな増殖を疑わせる所見は認めない。好中球数は最低 $500/\mu\text{L}$ 程度にまで減少したが、患児A.1では細胞輸注後に増加し現在 $1000-1500/\mu\text{L}$ 、患児2では $500-1000/\mu\text{L}$ で経過しており、異常増殖

はみられない。

血液細胞のクロナリティー解析は、リンパ球減少が続いている現時点においては、白血球分画およびフローサイトメトリーにより検討しているが、特定の分画、リンパ球サブセットのクローナルな増殖は認めない。輸注細胞の一部および毎週の血液検査時に得られる血液細胞サンプルは、明らかにリンパ球数の増加がみられた時点から開始する予定の導入遺伝子の検索、遺伝子挿入部位の解析に用いることができるよう凍結保存を続けている。

## D. 考察

CD34陽性細胞分離、遺伝子導入手技についてはバッグを用いた閉鎖系を用いることで無菌操作を確実に行うことが可能であった。Isolex™ 300iシステムによるCD34陽性細胞分離は純度、生存率ともに良好であった。

無血清培地でIL-6, 可溶性IL-6受容体を含んだ特長あるサイトカインカクテルの使用、バッグへのレトロネクチン™コート、ウイルス上清によるバッグのプレロード等、基礎検討により至適化された方法を用いることによって、CD34陽性細胞への遺伝子導入効率はコロニー法によるPCR解析の結果50-70%の高効率の遺伝子導入が可能であった。さらには輸注細胞サンプル中でADA活性の正常化が観察され、遺伝子導入による患児骨髓細胞の機能的修復も確認された。

血液幹細胞への遺伝子導入およびその生着の確認は輸注後早期の現時点においては未だ困難であるものの、細胞輸注後のdAXPレベルの改善、それに伴う肝機能、臨床症状の改善が明らかであることから、少なくとも患児体内で生存、増殖しうる比較的未分化な細胞で導入遺伝子、機能蛋白の発現が維持されている可能性は大きいと考えられる。

## E. 結論

1. 遺伝子導入細胞の解析から、遺伝子導入操作は無菌的に行われ、少なくとも血液前駆細胞のレベルで高い導入効率と機能修復が可能であったことが示された。

2. 遺伝子導入細胞輸注後12週および6週の現時点において、両患児にリンパ球数の増加は観察されず免疫系の再建はみられていない。しかしながら、両患児とも臨床的には安定しており、特に患児A.2においては蓄積代謝毒性産物dAXPの減少も明らかであることから、ADA欠損症に起因する全身性の代謝毒性を一部緩和するに十分なADAが体内で産生されていることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

●M Otsu, et al. Discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in a patient with ADA-deficiency previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy. American Society of Gene Therapy The 6th meeting, Washington DC, June 5-8, 2003.

### 研究要旨

アデノシンデアミナーゼ(ADA欠損症における)血液幹/前駆細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の予備実験として、実際に患者で行う同じスケール、方法でシミュレーション実験を行い、試薬、器具、手技等に不備が無いかを検証した。複数の施設から臍帯血検体を収集し、Isolex TM300iシステムを用いてCD34陽性細胞を自動分離した。純度を確認した後、臨床研究で使用する予定のレトロウイルスベクター；PG13/GCsapM-ADA(MPSV)、リコンビナントフィブロネクチン、サイトカインカクテルを用いた。遺伝子導入効率の評価にはリアルタイム定量PCR法による検討と、コロニーアッセイから各コロニーの遺伝子導入の有無を検索してその割合から検討した。その遺伝子発現の評価はADA酵素活性の測定で行った。

## A. 研究目的

アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症における骨髓血CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の実施に向け、臍帯血検体を収集し、遺伝子導入の操作を実際に行うスケール、方法でシミュレーション実験を行い、試薬、器具、手技に不備が無いかを検証する。

## B. 研究方法

### 1. 遺伝子導入方法

複数の施設より収集した臍帯血5-6検体約300mlを血液バックに集めてHESを混和・静置して単核球に富む上清を得、溶血操作を行った後、Isolex™300iシステムを用いてCD34陽性細胞を自動的に分離した。その純度をFACSで確認後、既に予備実験で確認され、臨床使用が認可されたのサイトカインのカクテル；stem cell factor(SCF), thrombopoietin (TPO), Flt-3リガンド(Flt-3L), IL-6, 可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6r) (以上R&D社)存在下で48時間培養した。遺伝子導入は、まずリコンビナントフィブロネクチン（レトロネクチン、宝酒造供与）をコートし、ベクターをプレードしたCO<sub>2</sub>透過性バックX-Fold™ bag (Life cell 社)へ培養CD34陽性細胞を移し、以後はベクター上清を用いて24時間ごとに3回（3x/72hr）遺伝子導入を実施し

た。ADA遺伝子導入にはレトロウイルスベクター；PG13/GCsapM-ADA(MPSV),(NIH供与)を使用した。全ての操作は、TSCD™などを用いて原則として閉鎖回路を用いて無菌的に行った。

### 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法にて評価した。一部の遺伝子導入細胞はコロニーアッセイを行い、出現してきた各コロニーからDNAを分離して、それぞれの導入遺伝子の有無をPCRで検索し、コロニー形成能力のある細胞への遺伝子導入効率の評価とした。

（倫理面への配慮）

臍帯血の採取に関しては、分娩前に使用目的を説明し、書面で同意を得て行った。遺伝子治療臨床研究の実施に関しては、学内、厚生科学審議会科学技術部会；小児免疫不全疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会へ申請し、許可を得てから実施する予定である。また、両親、本人に対しても十分な説明・同意を得て実施する予定である。

## C. 研究結果

### 1. CD34陽性細胞の分離

実際の遺伝子治療臨床研究で使用されるIsolex™300iシステムを用いたCD34陽性細胞の自動分離は良好に実施された。

CD34陽性細胞の純度は80-90%、回収率は40-50%、細胞生存率は95-98%であった。

## 2. 細胞培養、遺伝子導入

細胞数は培養2日目では減少したが、遺伝子導入操作日程近くから増殖傾向を示し、最終的には培養終了日には培養開始日の約2倍となった。遺伝子導入に関連する操作は器具、手技共に不備なく実施可能であった。

## 3. 導入遺伝子発現の評価

遺伝子導入操作をおこなった細胞での遺伝子導入はPCRにて確認された。また、コロニー形成細胞における遺伝子導入効率は60-70%と評価された。

## 4. 無菌操作の評価

細菌培養、マイコプラズマの培養とPCRの結果から無菌操作の確実性が確認できた。

## D. 考察

これまでのスモールスケールの実験による遺伝子治療基礎研究から、新規レトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADA(MPSV)を用いたヒトCD34陽性細胞へのADA遺伝子導入方法が臨床応用可能である結果を得ていた。今回の実際に行われるスケールでのシミュレーション実験から、臨床に用いられるベクター、試薬、器具、手技に不備は無く、遺伝子治療臨床研究が問題なく実施可能であること、遺伝子導入効率もこれまでのスモールスケール同様に期待できることが検証された。

## E. 結論

今回の遺伝子治療臨床研究のシミュレーション実験によって、遺伝子治療臨床研究の実施が可能であることが検証された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

●有賀 正：X-SCID遺伝子治療に伴った白血病様副作用；想定される機序とその対

策。小児科 45, 197-202, 2004.

●有賀 正：原発性免疫不全症の遺伝子治療における白血病発症の機序。臨床免疫印刷中。

●有賀 正、崎山幸雄：「目で見える骨系統疾患2004」各論 小児科医が知っておきたい骨系統疾患。Adenosine deaminase (ADA) deficiency. 小児内科第36巻2004年増刊号 印刷中

●Horiuchi K, Ariga T, Fujioka H, Kawashima K, Yamamoto Y, Ikawa H, Sakiyama Y, Sugihara T: Treacher Collins Syndrome with craniosynostosis, occlusion of choanae and esophageal regurgitation caused by nonsense mutation in the *TCOF1*: a new variant. Am J Med Genet. in press

●Ariga T: Gene therapy for primary immunodeficiency diseases; recent progress and misgivings. Current Pharmaceutical Design in press.

## 2. 学会発表

●中島 督、有賀 正、山口晃司、大津真、Nelson DL、崎山幸雄：Flow cytometryを用いた末梢血単核球内WASP分子の構造的、機能的解析の可能性。日本免疫学会総会・学術集会、福岡、12/8～12/10、2003.

●前山義博、大津真、有賀正、加藤紘之、崎山幸雄：Donor骨髄細胞へのCXC chemokine receptor 4 (CXCR4) 遺伝子導入による骨髄移植成績改善の試み。日本免疫学会総会・学術集会、福岡、12/8～12/10、2003.

**研究要旨**

アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に対する治療法としての血液幹/前駆細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入について、その導入法、導入遺伝子発現を解析する。

**A. 研究目的**

ADA欠損症患児においてヒト白血球抗原（HLA）の一致する同胞が存在する例ではその同胞をドナーとする骨髄移植を行うことで治癒が期待される。しかしながら、ハプロタイプ一致の片親あるいはHLA一致の非血縁ドナーからの移植、または酵素補充療法（PEG-ADA）単独での生命予後は必ずしも良好とはいえず、これらの代替療法として血液幹/前駆細胞を標的とした遺伝子治療（以下、単に遺伝子治療）の研究が世界的に進められている。

本研究においてはADA欠損症患児2例より骨髄幹/前駆細胞を採取し、基礎検討により至適化された方法により臨床試験グレードのレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った後、患児体内に輸注する手技を実際に行い、安全性、有効性を評価することを目的とする。

**B. 研究方法**

**1. 遺伝子導入方法**

骨髄採取に先立ち、PEG-ADAの投与を中断する。生体内の残存するADAが十分に減少した時点で全身麻酔下に骨髄を採取する。全骨髄液から赤血球沈降、および溶血手技にて赤血球を可及的に除いた後、Isolex™ 300iシステムを用いてCD34陽性細胞分画を採取する。前刺激として、ガス透過性バッグ内にて無血清培地（X-VIVO15™ + ヒトアルブミン）、サイトカイン（stem cell factor;SCF, thrombopoietin;TPO, flt3-リガンド, IL-

6, 可溶性IL-6 受容体）存在下に2日間培養する。遺伝子導入はフィブロネクチン断片CH296（レトロネクチン™）をコートしたガス透過性バッグ内にて1日1回、3日間行なう。初日のみ細胞の混入前にレトロウイルスベクターPG13/GCsapM-ADAをバッグ内にプレロードする。以降はウイルス液と上述した無血清培地の1:1混合培地にて培養する。全培養期間6日間の後、細胞を回収、洗浄し、生理食塩水の浮遊液として患児の末梢静脈より輸注する。

**2. 評価方法（倫理面への配慮）**

**1) 安全性の評価**

遺伝子導入細胞における安全性：一般細菌検査、マイコプラズマ感染の有無、エンドトキシン定量、逆転写活性。

患児のモニタリング：一般血液検査、生化学検査、細菌学的検査、免疫学的検査、フローサイトメトリー解析によるクロナリティー検索。導入遺伝子陽性リンパ球の増加があれば遺伝子挿入部位の解析。

**2) 有効性の評価**

遺伝子導入細胞の解析：導入遺伝子の検索、ADA活性測定による機能評価、前駆細胞のコロニー形成能の評価。

患児のモニタリング：上記と重複。血漿中ADA値および赤血球中代謝毒性産物（dAXP）濃度の測定。

**C. 研究結果**

**1. 臨床経過**

両患児A2,1ともにPEG-ADAの最終投与

から5週間後に遺伝子導入細胞の輸注を行った（患児A.2: 2003年12月22日、患児A.1: 2004年2月2日）。中断後3週目頃よりリンパ球数が著減し、好中球数の低下も観察された。4週目頃から肝機能障害を反映して血中トランスアミナーゼ値（AST, ALT）が上昇し、軽度の嘔気、食欲不振、活動性の低下がみられた。遺伝子導入細胞輸注後からAST, ALT値は改善し、患児A.2においては細胞輸注後6週で正常化した。肝機能の改善に伴い上記臨床症状も軽快した。細胞輸注からそれぞれ12週、6週後の現在まで、個室管理下に重症感染症の罹患なく両患児とも良好な健康状態を維持している。

## 2. 遺伝子導入

両患児A2,1ともに全身麻酔下に約15 cc/kg体重の骨髓血を採取し、骨髓採取に伴う副反応はみられなかった。計画通りの操作を行い、それぞれ $1.2 \times 10^6$ /kg体重、 $5.7 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞が得られた。培養および遺伝子導入操作はバッグを用いた閉鎖系で行い、細胞は良好な生細胞率を保ち、それぞれ $1.4 \times 10^6$ /kg体重、 $9.2 \times 10^5$ /kg体重のCD34陽性細胞の輸注が可能であった。

## 3. 遺伝子導入細胞の解析

安全性試験では一般細菌、真菌、マイコプラズマ全て陰性であった。最終日の非希釈培養上清中に微量のエンドトキシンが検出されたが、洗浄後の輸注細胞では検出感度以下であり、実際にも輸注に伴う悪寒等の副反応は認めず問題はみられなかった。

定量PCR法、およびメチルセルロース培地でのコロニー形成細胞を用いたPCR解析による評価では、2例とも50-70%の良好な導入効率が得られた。導入細胞におけるADA活性は患児A.2では遺伝子導入前1.9 U、導入後318.2 U（正常162.5 U）、患児A.1ではそれぞれ1.4 U、299.4 U（正常90.1 U）と正常化しており、ADA機能蛋白の発現が確認された。

## 4. 患児のモニタリング

両患児ともにADA欠損による代謝毒性の顕性化と考えられる肝機能異常を認めたが（前述）、遺伝子導入細胞輸注後に改善した。血液検査では両患児ともに依然リンパ球減少（患児A.2:  $100-150/\mu\text{L}$ 、患児A.1:  $200-300/\mu\text{L}$ ）が続いており、特定のサブセットのクローナルな増殖を疑わせる所見は認めていない。好中球数は最低500/ml程度にまで減少したが、患児A.2では細胞輸注後に増加し現在 $1000-1500/\mu\text{L}$ 、患児A.1では $500-1000/\mu\text{L}$ で経過しており、異常増殖はみられない。骨髓採取および採血手技に伴い軽度の貧血を認めたが改善し、血小板数は正常のまま経過している。その他、腎機能、電解質等にも異常を認めていない。

患児A.2についてDuke大学に依頼し、細胞輸注後10週までの赤血球中dAXP値を測定したところ、PEG-ADA中断後1週めから蓄積が観察され、中断後7週、遺伝子導入細胞輸注後2週まで急速に値は上昇したが以後漸減に転じ、最終10週の時点ではピーク値の15%まで改善していることが確認された。

血液細胞のクロナリティー解析は、リンパ球減少が続いている現時点においては、白血球分画およびフローサイトメトリーにより検討しているが、特定の分画、リンパ球サブセットのクローナルな増殖は認めていない。輸注細胞の一部および毎週の血液検査時に得られる血液細胞サンプルは、明らかかなリンパ球数の増加がみられた時点から開始する予定の導入遺伝子の検索、遺伝子挿入部位の解析に用いることができるよう凍結保存を続けている。

## D. 考察

本研究の特色である、治療に先立つPEG-ADAの中断により次の点が明らかになった。①PEG-ADAを継続して投与されたADA欠損症患児においての、その中断に



伴う血漿ADA値および赤血球中dAXP値の動向である。両患児ともに中断前には正常人血漿ADA値を大きく越える値を維持していたが、中断後急速に値は減少し、最終投与から5週目に最低値となり現在までの観察期間中はほぼその値が維持されている。今回の臨床研究においてはこの5週目の時点で遺伝子導入細胞が輸注されたが、これより早期での遺伝子導入操作では、酵素中断により期待される治療効果の増強が損なわれ、またこれより遅い導入スケジュールでは患児の免疫能、体力の低下による骨髓採取に伴うリスクの増加が懸念される。今後さらに検討の余地はあるものの、PEG-ADA 中断から遺伝子導入陽性細胞輸注までを5週間とする日程は術前術後のトラブルもなく2例とも安全に施すことができ、妥当であると考えられた。

②PEG-ADA中断によってADA欠損に起因する血液、免疫系以外の症状が顕性化したことである。全身へのアデノシン関連代謝毒性産物dAXPの蓄積を反映して、肝機能障害、食欲不振、嘔気、活動力低下が共通して観察された。遺伝子導入細胞輸注後にdAXPレベルは低下し、肝機能および上記症状ともに改善したため、特別な治療は不要であった。通常、年長児におけるADA欠損症の無治療での症状を観察する機会はごく稀であるため、今回の結果はADA欠損症が全身性代謝性疾患である事実を年長児において示したという点で意義があると同時に、その治療においては血液、免疫系の再建のみならず全身における代謝毒性の改善をも目標とする必要性を再認識させるものである。

遺伝子導入手技についてはバッグを用いた閉鎖系を用いることで無菌操作を確実に行うことが可能であった。Isolex™300iシステムによるCD34陽性細胞分離、無血清培地、IL-6、可溶性L-6 受容体を含んだ特長あるサイトカインカクテルの使用、バッグへのレトロネクチン™コート、ウイルス

上清によるバッグのプレロード等、基礎検討により至適化された方法を用いることによって、前駆細胞での検討ではあるが50-70%の高効率の遺伝子導入が可能であった。さらには輸注細胞サンプル中でADA活性の正常化が観察され、遺伝子導入による患児骨髓細胞の機能的修復も確認された。血液幹細胞への遺伝子導入およびその生着の確認は輸注後早期の現時点においては未だ困難であるものの、細胞輸注後のdAXPレベルの改善、それに伴う肝機能、臨床症状の改善が明らかであることから、少なくとも患児体内で生存、増殖しうる比較的未分化な細胞で導入遺伝子、機能蛋白の発現が維持されている可能性は大きいと考えられる。

## E. 結論

1. PEG-ADA中断に伴い、リンパ球減少等の免疫能の低下のみならず肝機能障害、食欲不振などADA欠損に起因する症状が顕性化した。
2. 上記症状は遺伝子導入細胞輸注後に改善し大きな問題とならず、今回の臨床研究においては、酵素補充の中断、骨髓採取から細胞輸注までの一連の手技を比較的安全に行うことが可能であった。
3. 遺伝子導入細胞の解析から、遺伝子導入操作は無菌的に行われ、少なくとも血液前駆細胞のレベルで高い導入効率と機能修復が可能であったことが示された。
4. 遺伝子導入細胞輸注後12週および6週の現時点において、両患児にリンパ球数の増加は観察されず免疫系の再建はみられていない。しかしながら、上記1)の症状は両患児とも著明に改善しており、特に患児1においては蓄積代謝毒性産物の減少も明らかであることから、ADA欠損症に起因する全身性の代謝毒性を一部緩和するに十分なADAが体内で産生されていることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

● M. Otsu, et al. Discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in a patient with ADA-deficiency previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy. American Society of Gene Therapy The 6th meeting, Washington DC, June 5-8, 2003

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Clinical study of gene therapy for a patient with adenosine deaminase deficiency. Technology Innovation and Its Relations to Humanities and Social Sciences.	2003		Sakiyama Y
The First Report of a Japanese Family with Autosomal-dominant Amelogenesis Imperfecta Caused by an Enamalin Gene Mutation Archives of Comparative Biology of Tooth Enamel	2003	Association for Comparative Biology of Tooth Enamel	M. Kida, T. Ariga, T. Shirakawa, H. Oguchi, and Y. Sakiyama
Gene Therapy for primary immunodeficiency diseases; recent progress and misgivings. Current Phramaceutical Design. in press.	2003		Ariga T
Treacher Collins Syndrome with Craniosynostosis, Occlusion of Choanae and Esophageal Regurgitation caused by Nonsense Mutation in the <i>TCOF1</i> : A New Variant. in press.	2003		Horiuchi K, Ariga T, Fujioka H, Kawashima K, Yamamoto Y, Ikawa H, Sakiyama Y, Sugihara T.

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
X-SCID 遺伝子治療と白血病。臨床免疫、40	2003	科学表論社	崎山幸雄
X-SCID 遺伝子治療に伴った白血病様副作用；想定される機序とその対策。小児科、45	2004	金原出版株式会社	有賀 正
原発免疫不全症の遺伝子治療における白血病発症の機序。臨床免疫、印刷中。	2004	科学表論社	有賀 正
「目で見える骨系統疾患 2004」各論 小児科医が知っておきたい骨系統疾患。Adenosine deaminase (ADA) deficiency. 小児内科第 36 巻 (増刊号) 印刷中。	2004		有賀 正

20030688

以降は雑誌/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。