

厚生労働科学研究費補助金
子ども家庭総合研究事業

小児難治性先天異常症に対する
幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用

(H19-子ども-一般-003)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉辻 忠俊
平成20(2008)年 3月

子ども家庭総合研究事業（H19-子ども一般-003）
「小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用」

平成 19 年度総括研究報告書

目 次

1. 総括研究報告・・・・・・・・・・・・・・・・主任研究者	倉辻 忠俊	1
2. 分担研究報告		
1) 遺伝子治療臨床研究に必要な予備実験の実施	清河 信敬	11
2) ex vivo 操作法の確立	大津 真	15
3) 定量 PCR、抗 gp91phox 抗体検出法の確立	梨井 康	17
4) 発がん性検出法の確立	小野寺 雅史	21
5) 特定部位への遺伝子導入	久米 晃啓	25
6) ムコ多糖症への肝臓移植	奥山 虎之	27
7) 単一臓器における慢性肉芽腫症の予後調査	立澤 宰	31
8) 慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植評価	布井 博幸	33
9) ADA 欠損症への遺伝子治療評価	有賀 正	43
10) SF71gp91 ベクターによる有害事象	藤本 純一郎	45
11) 遺伝子治療における機能発現乖離	岡田 真由美	47
12) 有害事象発症の対処の倫理と法	掛江 直子	51
13) 米国 NIH との国際共同臨床試験	倉辻 忠俊	57
3. 資料		
1) SF71gp91 ベクターの有害事象報告		59
2) X-CGD 遺伝子治療臨床研究計画書		63
3) MFGSgp91 ベクターによる X-CGD 遺伝子治療臨床研究計画書		167
4. 研究成果の刊行に関する一覧表		275
5. 研究成果の刊行物・別冊		285

以上

厚生労働科学研究費補助金

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)

(総括)研究報告書

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用に関する研究
(H19-子ども一般-003)

主任研究者 倉辻 忠俊 国立成育医療センター 研究所長

研究要旨

小児難治性先天異常症の根治的治療法開発として、幹細胞遺伝子細胞療法の実用性、有効性及び効率性を向上させることを目的に、前臨床的研究に併せ、遺伝子治療のための臨床研究計画書の作成及び実施体制作りを行った。前臨床的研究では以下の結果を得た。①標的細胞への遺伝子導入方法として、サイトカインカクテルとの培養条件を決め、さらにバッグ使用による閉鎖系操作方法を確立した。②遺伝子導入ヒト CD34 陽性細胞の慢性肉芽腫症(CGD)モデル免疫不全マウス(NOG)への移植、生着と、蛋白発現を確認した。③移植造血幹細胞の骨髄再構築能の分析からキメラリズム変動は認めなかった。④遺伝子発現と機能発現の乖離の一つとして、抗ヒト gp91phox 抗体の測定系開発のための抗原部分を決定した。⑤挿入変異による発がん性検出のための4系統の遺伝子改変マウスを作成した。⑥Rep・アデノ随伴ウイルスを用いて特定部位への遺伝子導入に成功したが、問題点もあった。

臨床的研究では、①1医療施設の CGD 長期観察の 23 名を分析し、造血幹細胞移植を受けた5名の予後は良好であったが、アスペルギルス感染は死亡或いは腎不全のための透析の予後不良因子である。②全国の CGD 患者の内、造血幹細胞移植を実施した 34 名を分析し、HLA 一致なら同胞と非血縁ドナーで差がなかった。前処置は CY+Flu が最も良かった。③本邦で実施した ADA 欠損症遺伝子治療は、4年以上経過し、遺伝子導入変異の増殖優位性を認めず、また臨床的、社会的にも有効性が認められた。④使用予定であった SF71gp91 ベクターは使用6名中2名に挿入変異を来たし、7番染色体モノソミーを伴った骨髄異形成症候群の有害事象を来たした。⑤MFGSgp91 ベクターは使用 10 名で、1～10 年経過で遺伝子導入変異の増殖優位性を認めず、このベクターを使用することに決定した。⑥慢性肉芽腫症遺伝子治療の臨床研究計画書を作成すると共に、院内及び全国規模の臨床研究体制を確立した。

分担研究者・所属機関・職名

清河信敬:国立成育医療センター発生分化研究部・部長

梨井康:国立成育医療 C 移植免疫研究室・室長

奥山虎之:国立成育医療 C 臨床検査部・部長

立澤幸:国立成育医療 C 膠原病感染症科・医長

掛江直子:国立成育医療 C 成育保健政策科学研究室・室長

有賀正:北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授

布井博幸:宮崎大学医学部生殖発達学講座小児科分野・教授

久米晃啓:自治医科大学准教授

小野寺雅史:筑波大学大学院人間総合科学研究科・講師

大津真:東京大学医科学研究所・助手

藤本純一郎:国立成育医療 C 研究所・副所長

岡田真由美:国立成育医療 C 遺伝子診療科レジデント

A. 研究目的

先天性免疫不全症や代謝異常症など、小児難治性先天異常症は、診断はについても有効な根治療法がない疾患が多い。また、ひとつ一つの疾患の患者数は少ないが、種類が多いため、治療法開発と共に実施体制の整備が重要である。

本研究では、①造血幹細胞移植、遺伝子導入幹細胞移植、肝細胞移植などの細胞療法開発、特に、遺伝子細胞療法に必要な前臨床研究を併せて行い、安全性、有効性、効率性を高めることを目的とする。

さらに②臨床応用に必要な手続き・環境など等を整えること、

および、③遺伝子治療臨床試験の第 1 例として先天性免疫不全症の中で最も患者数の多い「慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease=CGD)」を対象に 3 年以内に遺伝子細胞療法の臨床試験を実施することを目的とする。

B. 研究方法

1) 前臨床的研究

① 遺伝子導入効率と導入細胞の生体内発現 (清河):

CD34 陽性細胞は、市販のもの及び東京脐帯血バンクから提供された脐帯血からマグネットビーズで分離したものをを用いた。SF71gp91 ウイルスベクターはドイツ Eufets 社から購入、種々の条件で感染させ、コロニーアッセイを行いゲノム DNA を抽出した。感染効率はウイルス骨格の部分と gp91 の cDNA の塩基配列から設計したプライマーを用いた。

② 慢性肉芽腫症における造血幹細胞の骨髄再構築能 (大津):

gp91phox 欠失 CGD マウスを用い、キメリズムの変移を競合的骨髄再構築アッセイ法で検討した。

③ 閉鎖系システムの確立 (大津・清河):

タカラバイオのバッグを用い、無菌性および遺伝子導入効率確保の条件を決めた。

④ 遺伝子検出システムの確立 (梨井):

導入遺伝子の数を定量的に検出するために、蛍光プローブと exon8 内と exon9 内に gp91phox に特異的なプライマーを作成した。

⑤ 抗 gp91phox 抗体の検出システムの確立 (梨井):

gp91phox の膜外部分 5 箇所遺伝子配列から、親水性の部分の 5 ペプチドを選択し、抗原とした。

⑥ 遺伝子挿入変異の検出法 (小野寺)

マウス胚性幹 (ES) 細胞にレトロウイルスベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入し、3.5 日胚盤胞に移入することにより、遺伝子改変マウスを作成し、減数分裂を利用して染色体上に 1 コピーしかプロウイルスを有しないマウス系統を樹立した。

⑦ 遺伝子の特定部位導入法の開発 (久米)

ヒト凝固第 IX 因子発現ベクター単独、または Rep 発現ベクターを同時に骨髄間葉系幹細胞にトランスフェクとし、導入クローンの遺伝子組み込み部位を解析し、AAVS1 領域への組み込み頻度を算定した。

⑧ 先天代謝異常症への肝細胞移植法の開発 (奥山):

ムコ多糖症の一つである VI 型モデルである arsb 遺伝子の 1 塩基挿入 MPR ラットに、正常 MPR ラットの肝臓を移植し、尿中のウロン酸を測定して効果を評価した。

2) 臨床的研究

⑨ 慢性肉芽腫症の臨床的評価 (立澤):

国立成育医療センターで長期に亘ってフォローアップしている 23 例について、臨床的解析を行い、治療法の評価と問題点を明らかにした。

⑩ 造血幹細胞移植の評価と遺伝子治療の適応 (布井):

慢性肉芽腫症に対し本邦で造血幹細胞移植を実施した 34 例につき、移植経過と現状について、主治医を通して調査、回答のあった 32 例について分析した。また、生存中の 25 例については慢性 GVHD および Karnofsky score による Performance status を用いて、主治医が評価し、その結果を基に遺伝子治療の適応を作成した。さらに患者及び家族に骨髄移植及び遺伝子医療に関するアンケート調査を実施した。

⑪ 遺伝子治療の安全性と有効性 (有賀):

北海道大学で分担研究者が実施した ADA 欠損型重症複合免疫不全症の 2 名について、臨床症状、一般検査、免疫学的検査、遺伝子学的検査、社会生活により評価を行った。

⑫ X-CGD 遺伝子治療臨床研究計画書

文部科学省・厚生労働省の「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日改正)を基に、ドイツおよび米国のプロトコルも参考にして、分担研究者で細部まで検討した。

⑬ ベクターの安全性・有効性 (藤本・岡田):

ドイツ国フランクフルト大学 Manuel Grez 博士の開発した SF71gp91 ベクターを用いて遺伝子治療を行ったドイツ国 Grez 博士、Ott 博士、スイス国 Seger 博士、英国 Thrasher 博士から臨床情報、遺伝子学的情報を得て、検討した。

⑭ 米国 NIH・国立アレルギー感染症研究所との多施設国際共同臨床研究 (倉辻・布井・小野寺・藤本)

米国 NIH・国立アレルギー感染症研究所 Harry L. Malech 博士の開発した MFGSgp91 ベクターの評価を調査・検討し、主任研究者である Elizabeth Kang 博士と実際のプロトコルを比較検討した。

⑮ 国際共同臨床研究における有害事象の対応 (掛江・藤本)

欧州における遺伝子治療国際共同臨床研究において発生した有害事象の対応を調査し、日本の臨床試験における規程等と比較検討した。

(倫理面への配慮)

アンケート調査: 連結可能な匿名化の管理を行い個人情報保護法を遵守、また一般研究は臨床研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守した。動物実験では、3R の原則を遵守

し、動物愛護に心がけ、遺伝子組換え実験安全管理規程も遵守した。遺伝子治療臨床研究に関する指針(文部科学省・厚生労働省)、有害事象報告による一部改訂、カルタヘナ第二種に関し、研究所全体で研修会をもった。

C. 研究結果

1) 前臨床研究

① gp91 遺伝子効率

培養液、培養プレートへの固層化、遠心、培養条件を検討し、指摘条件の下で導入効率は、13.6~21.4%であった。gp91 遺伝子導入 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスに移植し、骨髄、脾臓で、生着ヒト血球系に導入した gp91 遺伝子が保持されているのを確認した。NOD/SCID/IL-2R γ null マウス(NOG)への移植条件は 2.0Gy の照射条件が生着への必要であることを明らかにした。

遺伝子導入効率を高めると期待されているレトネクチンのヒト CD34 陽性細胞への作用を、使用するサイトカインカクテルとの相互作用を検討し、インテグリン VLA4 の発現が重要な役割を担っていることを見出した。また、レトロウイルスの感染効率を高める最低条件は、SCF+TPO であった。

② CGD 造血幹細胞の骨髄再構築能

移植後 4 週および 8 週で解析を行ったところ、Ly5.2/Ly5.1+Ly5.2 キメリズムを指標とすると、明らかなキメリズム変動は見られなかった。

③ 閉鎖系システムの確立

新規バッグを用いた閉鎖系システムでヒト骨髄 CD34 陽性細胞への遺伝子導入を実施、細菌侵入などの汚染は見られず、細胞培養もディッシュ法と比較して導入効率も良好であった。

④ 遺伝子検出のための Q-PCR 法の確立

作成したプライマーにより増幅されたアンプリコンに蛍光プローブが結合し、PCR 産物量に応じた蛍光シグナルと PCR サイクル数から得た Threshold cycle 値から鋳型 DNA 中の遺伝子量を測定する方法を確立し、gp91 レトロウイルスベクターにより遺伝子導入された HT1080, K562 等の細胞株、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞などで測定を行った。

⑤ 抗 gp91phox 抗体測定系の確立

遺伝子発現細胞と、機能発現の乖離の原因の一つに、新たに生成された gp91phox に対する抗体の出現が考えられる。gp91phox の細胞外露出

部分の親水性部分のペプチドを選定し、抗体測定法を検討中である。

⑥ 遺伝子挿入変異の検出

レトロウイルスベクターの染色体挿入による近傍遺伝子の発現変化を、ウイルスベクターを染色体上に1コピーしか有しない遺伝子変異マウスを作出し、改良 LAM-PCR により挿入部位近傍遺伝子を同定した。同定された近傍遺伝子は、サイクリン D1 遺伝子、Milt11 遺伝子、ドーパミン受容体 3 遺伝子、及び 5 番染色体上の未同定遺伝子である。これらを用いて positional effect の一端を解明中である。

⑦ 遺伝子の特異的部位導入法の開発

第 IX 因子発現ベクター単独の場合、得られたクローン中 AAVS1 領域に組み込まれたものは1個もなく、ランダム挿入と判定したが、Rep プラスミドと同時にトランスフェクトの場合、58クローン中6クローンが AAVS1 領域に第 IX 因子遺伝子が組み込まれていた。しかしその内 5 クローンではインシュレータ配列が破壊され、プロモータの CpG 配列が広範にメチル化されていた。

⑧ 先天代謝異常症への肝細胞移植法の開発:

VI 型ムコ多糖症のモデルである arsb 遺伝子異常 MPR ラットへ、正常 MPR ラット肝細胞を移植したところ、モデルラットの尿中ウロン酸値は術後 27~33 日に正常化した。

2) 臨床研究

⑨ 慢性肉芽腫症の臨床的評価

成育医療センターで診療している慢性肉芽腫症 30 名中、長期フォローアップ可能であった 23 名について分析した。総観察期間 343.3 患者・年、平均年齢 19.6 歳であった。病型は gp91phox 欠損型が 78%を占めた。診断年齢は 2.8 歳で、患者あたりの平均観察期間 14.9 年。死亡は 3 例で、その死因はアスペルギルス肺炎が 2 名、肝膿瘍が 1 名であった。集計後更に 3 名がアスペルギルス肺炎と弱毒菌による敗血症で死亡している。2 名が抗真菌薬の長期による腎不全である。重症感染症による入院総計 174 回、感染部位 203 箇所、患者 1 人当たり平均 2 年に 1 回重症感染に罹患している。造血幹細胞移植は 5 名に実施され、経過は順調である。アスペルギルス症は潜行性に発症進行し、さらに抗真菌薬の腎障害の問題も有り、その早期診断と対処が重要であることを裏付けた。

⑩ 慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植の評価と遺伝子治療の適応

移植時点で 67%に難治性活動性感染症を有していた。移植時に感染症のなかった群は 1/6 であり、これまでの造血幹細胞移植は他に選択のない状態であることが判明した。死亡例は 15 歳以下の小児に多かった。欧米では HLA5 ペア 10locus の一致同胞からのみの移植しか実施していないが、本邦では HLA 一致ドナーは同胞、非血縁ドナーで結果は同等であった。しかし HLA 不一致ドナーからの移植は 3/6 に生着したものの、2 例が死亡、1 例が拒絶であった。前処置は CY+Flu が一番良い成績であった。1 年以上経過した時点での 25 例中 19 例が慢性 GVHD なしであった。performance status は、21 例が 100%であったが、晩期障害の評価はまだ行っていない。これらの結果および欧州での遺伝子治療結果から、本邦での X-CGD 遺伝子治療の適応は、(1)通常の治療で感染病巣が鎮静できない、(2)HLA 一致ドナーが見つからない、(3)前処置の RIST にも危険が伴う患者、とする。

患者及び家族へのアンケート調査では、回答の大半で既に主治医から遺伝子治療の可能性について説明を受けたり、自分で調べて知識を持っていた。

⑪ ADA欠損症に対する遺伝子治療の安全性・有効性評価

1名は以前に末梢血 T細胞を標的とした LASN レトロウイルスベクターによる遺伝子治療を受けている。2名とも骨髓血 CD34 陽性細胞を標的とし、GCsapM-ADA/PG13 レトロウイルスベクターで遺伝子導入し、前処置をせずに遺伝子治療を実施したものである。

2人とも4年以上経過し、ADA 酵素補充は必要なく、ADA 欠損に伴う全身症状の改善、一般検査所見も改善している一方 B 細胞の改善は緩徐で、ガンマグロブリンの補充はまだひつようであるが、制限のない学校生活など社会生活は著しく改善している。挿入変異に関しては、ベクターが危険な部位に挿入されている細胞の増殖優位性や T 細胞レセプターのレポーター解析でも優位なクローンの増殖を認めていない。

⑫ X-CGD 遺伝子治療臨床研究計画書

日本全国の慢性肉芽腫症分析及び欧米の現状分析により、遺伝子治療の適用を上記⑩の結果を踏まえ、gp91phox 欠損型慢性肉芽腫症 (X-linked Chronic Granulomatous Disease = X-CGD)を対象とし、SF71gp91 ベクターを用い

た遺伝子治療臨床研究計画書および患者・家族への説明書を作成した。(資料1)

⑬ ベクターの安全性・有効性(藤本・岡田):

ドイツ国フランクフルト大学 Manuel Grez 博士の開発し SF71gp91 ベクターを使用した遺伝子治療を実施の3医療施設6名の内、ドイツの2名において(1)遺伝子発現と機能発現の乖離を認め、更に(2)経過と共に汎血球減少を認め、2年経過した時点で7番染色体のモノソミーを伴った骨髓異形成症候群を発症したことが9月に判明した。ベクター開発者の Grez 博士と詳細を検討し、分子学的分析を併せ、日本語訳を併せ書類として有害事象として研究費許である厚生労働省雇用均等・子ども家庭局および大臣官房厚生科学課健康被害安全管理室に報告した。(資料2)

⑭ 米国 NIH・国立アレルギー感染症研究所との多施設国際共同臨床研究

米国 NIH では 1995 年から MFGS ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を実施しており、その経過の一覧は(資料3)に示すとおりである。始めの 5 名は p47phox 欠損型 CGD、次の 5 名は X-CGD であるが、いずれも前処置無しである。数年から 10 年以上経過をしており、挿入変異の増殖優位性は認めておらず、安全性は確認されているが、生着細胞数も 1%以下で、有効性は不満足である。2006 年から busulfan による前処置を行い X-CGD の 2 名に遺伝子治療臨床試験を開始した。Malech 博士から多施設国際共同研究の提案があり、詳細に討議し、共同研究実施の方向で準備を開始した。米国では患者・家族への説明文書を重視しており、日本語にした物の再英訳を NIH の IRB で承認する必要がある。NIH のプロトコルおよび患者・家族への説明文書は(資料4)として添付した。

⑮ 国際共同臨床研究における有害事象の対応

2007 年 9 月に発症がドイツ国フランクフルト大学 Grez 博士から成育医療センター倉辻へメールで報告を受けた。直ちに厚生労働省に口頭報告すると共に、当地に分担研究者を派遣し、詳細を調査・検討した。

ドイツ、スイス、英国、オランダにおいては、有害事象発生は、当局に対して報告するが、当局から関連各国の厚生省・保健省等の関連当局への報告のシステムはない。共同研究者間の連絡を基に、夫々の国で対応する。医学的因果関係がある場合でも、臨床研究は実験的治療であり、常に大なり小なりの有害事象が発生するが、あく

までも「リスク」対「便益」のバランス情報を研究者が臨床試験参加者に公開し、その上で決めている。今回も、英国では MDS 発症を承知の上でインフォームド Consent の上で新たな患者登録を行っている。

D. 考察

小児難治性先天異常症の多くは単因子遺伝であり、乳幼児早期に発症あるいは進行性に徐々に発症し、恒久的な障害を起こすものが多い。特に免疫不全症候群のように直接生命を脅かされるもの、あるいはある種の代謝異常症のように発症を著しく阻害されるものなどは、辛うじて対症療法あるいは保存的治療しかない疾患である。

間葉系あるいは造血幹/前駆細胞移植療法は、その技術の著しい進歩により、これらの疾患の根治療法として適用あるいは期待されているが、ドナーが限られている問題、前処置の合併症の問題等、まだまだ解決すべき問題点が多い。

本研究課題はこれらの問題点を踏まえ、幹細胞遺伝子細胞治療法の基礎的および臨床的研究を追求し、安全性と有効性の高い、更に効率的な治療法の開発を行い、臨床応用に結びつけるものである。

先天性免疫不全症や代謝異常症など、小児難治性先天異常症は、診断はについても有効な根治療法がない疾患が多い。また、ひとつ一つの疾患の患者数は少ないが、種類が多いため、治療法開発と共に実施体制の整備が重要である。

造血幹/前駆細胞移植、間葉系幹/前駆細胞移植は、ドナーが限られていることから、また、生体防御能も脆弱になり、移植の前処置に耐えられない例が多いことから、自家造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の開発が必要である。

遺伝子治療の前臨床試験として、①遺伝子導入標的細胞の検討、②遺伝子導入効率、③NODマウスを用いての、ヒト造血幹細胞の移植効果、④定量 PCR の確立、⑤LAM-PCR の確立、⑥発がん性検出のための遺伝子改変マウス作成、⑦抗ヒト gp91phox 抗体測定のための抗原部位選定、⑧特定部位への遺伝子挿入法の開発、等を検討した。

特に問題になるのは、以前の X 染色体連鎖重症複合型免疫不全症の遺伝子治療臨床試験で起った急性白血病の LOM2 挿入変異、慢性肉芽腫症の遺伝子治療で起った骨髓異形成症候群の MDS1 近傍の挿入変異、などによるがん化の可能性である。レトロウイルスをベクターとした場合の遺伝子のランダム挿入とその増殖優位性によるモノクローン化増殖の問題は避けて通れない。

先天異常症の遺伝子治療の目標は、がん等の遺伝子治療の一時的な効果と異なり、生体内で長く増殖分化を維持することであるため、リスクと有効性にも関係する。そのため、遺伝子治療にかかわる Q-PCR、LAM-PCR 法の確立、発がん検出のための遺伝子改変マウスの作成は、安全性の確保の上から重要である。

一方、レトロウイルスの SIN ベクター (self-inactivated) 等の開発や特定部位への遺伝子挿入法の開発も同時に進めている。Rep 蛋白を利用したアデノ随伴ウイルスへの特定部位挿入は可能となったものの、その確率および不活化防止配列の破壊など、まだまだ解決すべき問題は多い。

これに対し、米国 NIH で開発した MFGSgp91 ベクターは、遺伝子治療第 1 例以来 10 年以上経過し、また症例も 10 例に達するが、挿入変異の問題は生じていない。しかし前処置しないで実施したため、生着が 1% 内外と少なく、有効性はいまひとつである。今回、busulfan の骨髓非破壊的前処置を行う臨床試験に加わる方向で検討している。

E. 結論

小児難治性先天異常症の根治的治療法として、幹細胞遺伝子細胞療法の前臨床研究、及び遺伝子治療を行った ADA 欠損症の臨床・社会・分子学的評価と、遺伝子治療候補対象疾患としての慢性肉芽腫症の長期予後と代替治療法としての造血幹細胞移植の評価を検討した。

① 標的細胞への遺伝子導入効率を高める方法の確立、閉鎖系回路を用いての操作確立、② 遺伝子発現の定量 PCR 検出法確立、遺伝子挿入変異・がん化検出の検出のための LAM-PCR 法確立およびモデルラットの作成、抗 gp91phox 抗体検出のための抗原部位選定と作成、遺伝子特定挿入法の開発等を行った。

② 成育医療センターで長期経過観察している慢性肉芽腫症患者 23 症例の評価を行い、造血幹細胞移植の有効性を検出した。また全国で造血幹細胞移植を実施した 34 症例の評価を行い、CY+Flu の前処置の有効性・安全性を認めた。さらに、遺伝子治療を行った ADA 欠損症の 2 症例は共に 4 年以上経過している現在、遺伝子挿入変異の優位増殖性は起っておらず、安全性と有効性が確認された。

③ SF71gp91 ベクターによる gp91phox 欠損型慢性肉芽腫症 (X-CGD) の遺伝子治療臨床研究の計画書を作成した。しかしその後 SF71gp91 ベクターの有害事象発症の検討から、本研究には

用いないことを決めた。安全性を確認されている MFGSgp91 ベクターを用いる米国 NIH との共同臨床試験の準備を始めた。

F. 健康危険情報(資料1)

日本では前臨床研究のみで、まだ臨床試験の段階にはいないが、SF71gp91 ベクターの有害事象:ドイツ・フランクフルト大学の Grez 博士が開発し、ドイツ、スイス、イギリスの3国で6人の慢性肉芽腫症患者に臨床試験を行ったところ、2例に7-モノソミーの染色体異常を伴った骨髄異形成症候群が発症した。Grez 博士からのメール報告のあった時点で厚生労働省母子保健課及び厚生科学課健康危機管理室へ文書で報告するとともに、その後 Grez 博士から送られた正式の臨床データ及び分子遺伝学的分析の報告書の原本及びその邦訳を提出した。(資料2)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu Y, Okada T, Nomoto T, Ke X, Kume A, Ozawa K, Xiao S: Prpmoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Exp Mol med* 39:170-175, 2007
- 2) Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S: Soluble ST2 blocks IL-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282:26369-26380, 2007
- 3) Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Sakata Y, Shimada K, Ozawa K: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50:531-536, 2007
- 4) Ito T, Okada T, Miyashita H, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101:734-741, 2007
- 5) Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* (Epub Jan 8, 2008)
- 6) Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, Nomoto T, Hojo Y, Shimpo M, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med* (Epub Jan 21, 2008)
- 7) Onodera M: Gene and cell therapy for relapsed leukemia after allo-stem cell transplantation. *Frontiers in Bioscience* 13: 3408-3414, 2008.
- 8) Nabekura T, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M: An Immunotherapy Approach with Dendritic Cells Genetically Modified to Express the Tumor-Associated Antigen, HER2. *Cancer Immunol Immunother* (in press)
- 9) Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H: Enhanced Self-Renewal Capability in Hepatic Stem/Progenitor Cells Drives Cancer Initiation. *Gastroenterology* 133: 937-950, 2007.
- 10) Oka N, Soeda A, Inagaki A, Onodera M, Maruyama H, Hara A, Kunisada T, Mori H, Iwama T: VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. *BBRC* 360: 553-559, 2007.
- 11) Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Namiki H, Seki T: Postnatal neurogenesis in hippocampal slice cultures: Early in vitro labeling of neural precursor cells leads to efficient neuronal production. *J Neurosci Res* 85: 1704-1712, 2007.
- 12) Nishinakamura H, Minoda Y, Saeki K, Koga K, Takaesu G, Onodera M, Yoshimura A, Kobayashi T: An RNA binding protein aCP-1 is involved in the STAT3-mediated suppression of NF-kB transcriptional activity. *Int Immunol* 19: 609-619, 2007.
- 13) Seki T, Namba T, Mochizuki H, Onodera M: Clustering, migration and neurite formation of neural precursor cells in the

- adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 502: 275-290, 2007.
- 14) Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, Yoshida H, Nagata M, Usui J, Takahashi S, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M: Stable transgene expression in mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Mol Ther* 15: 560-565, 2007.
 - 15) Onodera M: Gene and cell therapy for relapsed leukemia after allo-stem cell transplantation. *Gene Therapy* 2007 (21st Century's Center of Excellence Program of Japanese Ministry of Education and Science), 286-295, 2007.
 - 16) Maruyama H, Watanabe S, Kimura T, Liang J, Nagasawa T, Onodera M, Aonuma K, Yamaguchi I: Granulocyte colony-stimulating factor prevents progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation J* 71: 138-143, 2007.
 - 17) Otsu M, Ariga T: Stem cell gene therapy for ADA-deficiency without myeloablative preconditioning. Roger Bertolotti and Keiya Ozawa: Autologous and cancer stem cell therapy, World Scientific, Singapore, p1-18, 2008
 - 18) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J: Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol* 85:384-389, 2007.
 - 19) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N: Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol* 35:1398-1407, 2007.
 - 20) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N: A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun Hematol* 364: 838-843, 2007.
 - 21) Sato T, Kobayashi R, Toita N, Kaneda M, Hatano N, Iguchi A, Kawamura N, Ariga T: Stem cell transplantation in primary immunodeficiency disease patients. *Pediatr Int.* 49:795-800, 2007.
 - 22) Kobayashi R, Kaneda M, Sato T, Suzuki D, Ichikawa M, Ariga T: Evaluation of risk factors for invasive fungal infection after allogeneic stem cell transplantation in pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29:786-91. 2007.
 - 23) Toita N, Hatano N, Ono S, Yamada M, Kobayashi R, Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Satoh A, Nakagawa A, Ohshima K, Shindoh M, Takami T, Kobayashi K, Ariga T: Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma in a patient with DNA ligase IV (LIG4) syndrome. *Am J Med Genet Part A* 143A:742-745, 2007.
 - 24) Uezono S, Sato Y, Hara S, Hisanaga S, Fukudome K, Fujimoto S, Nakao H, Kitamura K, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Nunoi H: Outcome of ANCA-Associated primary Renal Vasculitis in Miyazaki Prefecture, *Int Med* 46: 815-822, 2007.
 - 25) Nunoi H: Chapter 11. Diseases with abnormal actin and actin-binding proteins in leukocyte and nonmuscle cells. *Protein Reviews "Actin-Binding Proteins and Disease"* ed by Cris dos Remedios and Deepak Chhabra. 2008 Springer Science 278-289.
 - 26) Kobayashi S, Murayama S, Takanashi S, Takahashi K, Miyatsuka S, Fujita T, Ichinohe S, Koike Y, Kohagizawa T, Mori H, Deguchi Y, Higuchi K, Wakasugi H, Sato T, Wada Y, Nagata M, Okabe N, Tatsuzawa O: Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. *Euro J Paediatr* 2008 (Epub)

- 27) Kobayashi S, Murayama S, Tatsuzawa O, Koinuma G, Kawasaki K, Kiyotani C, Kumagai M: X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) with high blood levels of immunoglobulins and Aspergillus pneumonia successfully treated with micafangin followed by unrelated cord blood stem cell transplantation. *Eur J Pediatr* 166: 207-210, 2007.
- 28) 有賀 正: 神経疾患に対する遺伝子治療の可能性—現状と問題点—. *発達障害研究* 29:36-39, 2007.
- 29) 有賀 正: 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療に付いて。北海道日独協会会報。24:46-50, 2007.
- 30) 有賀 正: 原発性免疫不全症とリバージョン; 適応の破綻とその修復のモデルとして。J *Adaptation Med (適応医学)*, 11:27-33, 2007.
- 31) 布井 博幸: 慢性肉芽腫症研究の新展開。日本臨床免疫学会雑誌 30:1-10, 2007.
- 32) 布井 博幸: 好中球機能の分子機構に関する最近の展開、血液フロンティア 7:695-705, 2007.
- 33) 高木 純一、布井 博幸: 迅速測定系 BNP 値の異常高値(2000pg/mL 以上)をみとめた ASD-PDA complex の新生児例、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 循環器症候群(第2版)1 その他の循環器疾患を含めて 4:429-431, 2007.
- 34) 布井 博幸: 慢性肉芽腫症—基礎と臨床—、臨床検査 51:1059-1065, 2007.
- 35) 岡田真由美、奥山虎之: 慢性肉芽腫症の遺伝子治療への取り組み、臨床検査, 51: 1106-1110, 2007.
2. 学会発表
- 1) Kume A, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Long-term efficacy of a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May30-June3, 2007, Seattle, WA, USA.
- 2) Onodera M: Gene Therapy for Hematologic Malignancy. American Society of Gene Therapy. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May30-June3, 2007, Seattle, WA, USA.
- 3) Ariga T: International Symposium: Gene Therapy Clinical Trials from Around the Globe, Hematopoietic stem cell gene therapy for two patients with Adenosine Deaminase (ADA) deficiency without myeloablative conditioning; a suggestion for the optimal protocol for HSC gene therapy for ADA deficiency. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May30-June3, 2007, Seattle, WA, USA.
- 4) Onodera M: Opposite effects of an integration site on expression of the transgene-Genesilencing or Leukemogenesis. IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy. Sep13-17,2007 Thessaloniki, Halkidiki, Greece.
- 5) Ariga T: Hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy for two patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency without cytoreductive conditioning; a suggestion for the optimal protocol for HSC gene therapy for ADA deficiency. Symposium VI Immune deficiency syndromes. The IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy. Halkidiki, Thessaloniki, Greece, Sep13-17, 2007
- 6) Otsu M, et al. A novel hematopoietic stem cell transplantation strategy utilizing pre-infusion of donor lymphocytes. The 15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, the Netherlands, 27-30 October 2007
- 7) Kume A, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Okada T, Ozawa K: Efficient and stable liver transduction by a self-complementary adeno-associated virus vector for phenylketonuria gene therapy. 第13回日本遺伝子治療学会, 2007.6.28-6.30 名古屋
- 8) Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, Ogata T, Li XK, Onodera M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Nakauchi H, Kuratsuji T: Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第13回日本遺伝子治療学会 2007.6.28-6.30 名古屋
- 9) Nabekura T, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M: Feasibility of vaccine therapy with dendritic cells genetically modified to express the tumor-associated antigen HER2. 第13回日本遺伝子治療

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

（分担）研究報告書

遺伝子治療臨床研究に必要な予備実験の実施

（分担）研究者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 成育医療センターでの慢性肉芽腫症（CGD）に対する幹細胞遺伝子細胞治療実施を目指し、実際の治療に用いるウイルスベクターを使用して実際の実施条件のもとでgp91遺伝子をヒトCD34細胞に導入した結果、治療効果が期待される感染効率が得られることが確認された。今後、さらに感染効率を高めるための条件検討を行なう。また、幹細胞遺伝子細胞治療全般に対する基盤研究として、レトロネクチンがヒトCD34陽性細胞に対するレトロウイルス導入に対して有効であることを分子機構のレベルで確認し、レトロウイルス導入に対して必要最少限のサイトカインの組み合わせを特定した。この知見は、今後の種々の疾患に対する幹細胞遺伝子細胞治療における造血幹細胞培養法確立の上で有用な所見と考えられる。

A. 研究目的

多くの小児遺伝性疾患はいまだ有効な治療手段に乏しい難治性疾患である。原発性免疫不全症候群や先天代謝異常症の一部では、酵素補充療法や造血幹細胞移植のような高度先駆の治療法が開発され、その有用性が報告されているが、治療自体の副作用によって死に至る場合もあり、より安全な治療法の開発が必要である。一方、これまで停滞気味であった遺伝子治療法は、幹細胞生物学の進歩や遺伝子導入用ベクターの改良により、小児難治性疾患の有望な治療法として急速に再認識されつつある。しかも、遺伝子治療法は、基本的に自家骨髄移植であることからアロ造血幹細胞移植に伴う重篤なリスクやドナー選択の問題を回避できる点で、安全性が高い治療法と考えられる。また、酵素補充療法に伴う頻回の通院などの煩雑さや膨大な医療費の支出を回避することが可能であり、経済的なメリットも大きい。しかし、わが国において幹細胞遺伝子治療の臨床研究が可能な小児医療施設はほとんど皆無であり、小児医療を担当するナショナルセンターとして国立成育医療センターがその機能を果たすことが期待されている。

本研究では、成育医療センターを中心にした遺伝子治療臨床研究体制を整備し、難治性小児先天性疾患治療の現状を劇的に改善するための研究の一環として、特に慢性肉芽腫症（CGD）を対象とした遺伝子治療実

施を目指した前臨床試験の施行と、フォローアップに必要な検査技術の確立を目的とする。また、幹細胞遺伝子細胞治療法全般に応用可能な、効率的な遺伝子導入法の検討や造血幹細胞の生物特性解析等の基盤研究を合わせて実施する。

B. 研究方法

CD34陽性細胞は、米国Lonza社からインフォームドコンセントを得た上で市販されている骨髄、臍帯血、G-CSFによって誘導した末梢血由来の分離精製済みもの、および東京臍帯血バンクから提供された臍帯血（倫理審査承認済み）よりマグネットビーズ法（MACS Magnetic Cell Separation System, Miltenyl Biotec社）により分離したものをを用いた。

Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子導入用ウイルスは、パッケージング細胞の培養上清を回収して、フィルターをかけた上で使用した。gp91遺伝子導入用のレトロウイルスベクターは、調製済みのものをドイツEufets社から購入して用いた。ウイルス感染の方法としては、標的細胞へのウイルス吸着促進のため、遺伝子改変ファイブプロネクチン（レトロネクチン）コート培養プレートへウイルスを固層化させる方法を用いた。CD34陽性細胞については、融解あるいは分離後、ただちにサイトカインカクテル（SCF, TPO, FLT3L, IL6, sIL6Rの5者併用）添加無血清培地で培養を開始、

48時間の前培養の後、72時間ウイルスを感染させた。

コロニーアッセイは、レトロウイルス感染後のCD34陽性細胞をサイトカイン添加メチルセルロース培地に播種して行い、1-2週間の間に単一コロニーをパスツールピペットを用いて回収し、常法によってゲノムDNAを抽出した。

GFP導入用ベクターの感染効率はフローサイトメトリーを用いて測定した。gp91導入用ベクターの感染効率は、ウイルス骨格の部分とgp91のcDNA内の塩基配列から設計したプライマーを用いたゲノムPCRで検討した。

インテグリンの発現は、蛍光標識した特異抗体を用いてフローサイトメトリーによって解析した。

C. 研究結果

(1) コロニーアッセイによるgp91遺伝子のCD34陽性細胞への導入効率の検討

gp91遺伝子の導入効率の検討を目的として、CD34陽性細胞にgp91遺伝子導入用ウイルスベクターを感染後コロニーアッセイを行い、シングルコロニーを個々に回収してゲノム遺伝子を抽出し、PCRで導入されたgp91遺伝子を検出するための至適条件を決定した。

(2) 実際の治療に用いる条件でのウイルスの感染効率の検討

これまでのレトロウイルス感染効率に関する検討により、1) 培養液としてはX-VIVO10を用いた場合が最も効率が良く、2) ウイルスの培養プレートへの固層化については静置よりも遠心を行なう方が感染効率を高められること、をすでに明らかにしている。そこで以上の知見を考慮し、成育医療センターで遺伝子治療を行なう場合に実際に使用する予定の試薬、培養条件、培養器具等 (TAKARA BIO社の細胞培養用バッグ CultiLife Spin bagを含む) を用いて、治療用と同等のgp91遺伝子導入用ベクター (ドイツGeorg-Speyer-HausのGrez博士が作製し、Eufets社が調整したものを購入) を臍帯血由来CD34陽性細胞に導入し、その効率を上記のコロニーアッセイによるゲノムPCR法によって検討した。この結果、3回の実験で、それぞれ21.4%、13.6%、19.4%の導入効率が得られた。

また、実際にgp91遺伝子を導入したCD34陽性細胞をNOD/SCIDマウスに移植した後、骨髄および脾臓細胞を回収してゲノムPCRを行い、移植後の生着ヒト血球系細胞に導入したgp91遺伝子が保持されていることを

確認した (東京大学医科学研究所 大津真博士らとの共同研究)。

(3) 免疫不全NOGマウスを用いた幹細胞遺伝子細胞治療法の評価に関する検討

従来、遺伝子導入を行なったヒトCD34陽性細胞のin vivoでの機能解析については、NOD/SCIDマウスに移植する方法が一般的に用いられてきた。しかし、同マウスでは、移植したヒトCD34陽性細胞は主に単球系細胞およびB細胞にしか分化しないと報告されており、顆粒球を標的とするCGDの遺伝子治療研究には適していないと考えられた。そこで、ヒトCD34陽性細胞を移植した場合に、より多系統の血球への分化が期待されるNOD/SCID/IL-2R γ nullマウス (NOGマウス) を用いた移植系について検討を行なった。通常、NOGマウスへの移植を行なう場合は分離直後のヒトCD34陽性細胞を用いるため、遺伝子導入操作のためにサイトカインカクテルを添加して培養した後のCD34陽性細胞を移植することが可能か否かについてはこれまで不明であったが、NOGマウスに対する放射線前照射の条件を2.0Gyに設定することで、同細胞が生着可能であることを確認した。

(4) レトロネクチンを用いたレトロウイルス導入法におけるヒトCD34陽性細胞のインテグリンの機能に関する検討

現在、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法には、組み換えレトロネクチンが必須のウイルス導入補助剤として用いられている。レトロネクチンは、レトロウイルスを吸着するとともに、インテグリンとの結合によってヒト細胞とも接着するため、ウイルスの感染効率を高めると考えられているが、ヒトCD34陽性細胞における実際の作用については明らかではない。

そこで、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞に対するGFP遺伝子導入用レトロウイルス感染について、レトロネクチン存在下、非存在下での感染効率を比較したところ、後者ではほとんど感染が成立しないことが明らかとなった。さらに、同CD34陽性細胞もにおけるインテグリンVLA4およびVLA5の発現について検討した。この結果、1) 分離直後のCD34陽性細胞ではいずれのインテグリンも発現が非常に弱いものの、サイトカインカクテル (5者併用) 添加培養の間にその発現が著しく増強すること、2) レトロネクチン存在下では、発現増強したインテグリンのうち特にVLA4の発現がダウンレギュレーションされること、が明らかとなった。また、CD34陽性細胞のVLA4の発現を増強させレトロネクチンの感染効率を高めるため

には、個々のサイトカインをそれぞれ単独の作用では不十分であるが、SCF+TPOのみの組み合わせで添加した場合には5者併用のサイトカインカクテルと同等の効果が得られることが明らかとなった。

D. 考察

今回の検討で、コロニーアッセイによってヒトCD34陽性細胞に対するgp91の導入効率の測定系を確立し、国立成育医療センターにおける設備環境の中で、実際にgp91遺伝子を導入した場合、概ね15-20%程度の感染効率が得られることが明らかとなった。従来の報告から推測すると、この感染効率でも治療効果は期待できると予想されるが、今後さらに感染効率を向上させるための検討を行なっていく。

また、現在レトロウイルスベクターの導入には不可欠と考えられているレトロネクチンがヒトCD34陽性細胞についても実際に効果を示していることを分子機構のレベルで確認した。同細胞に対するレトロウイルス感染操作の際のサイトカインカクテル添加培養は、従来から言われている細胞分裂を促進してレトロウイルス感染効率を高める作用以外にも、インテグリンの発現を増強することによってレトロネクチンとの接着を増強することで感染効率を高める作用を示すことが示唆され、インテグリンのうち特にVLA4を介してより強い接着が起こっているものと推測される。インテグリンの発現増強とレトロウイルス感染効率の増強にはSCF+TPOが必要最少限の組み合わせであることが示唆され、今後種々の小児遺伝性疾患に対する幹細胞遺伝子細胞治療について、それぞれ適切なレトロウイルス導入のための造血幹細胞培養法を確立する上で、有用な知見と考えられる。

E. 結論

gp91遺伝子導入によるCGDの遺伝子治療について、実際の治療で用いるものに近い感染条件で遺伝子導入効率の検討を行い、治療効果が期待されるだけの感染効率を得られることを確認した。今後さらに感染効率を高めるための条件検討を行なう。また、レトロネクチンがヒトCD34陽性細胞に対するレトロウイルス導入に対して有効であることを分子機構のレベルで確認し、レトロウイルス導入に対して必要最少限のサイトカインの組み合わせを特定した。この知見は今後の種々の疾患に対する幹細胞遺伝子細胞治療における造血幹細胞培養法確立の上で有用な所見と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol* 85:384-389, 2007.
- 2) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol* 35:1398-1407, 2007.
- 3) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun Hematol* 364:838-843, 2007.

2. 学会発表

- 1) Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, Ogata T, Li X-K, Onodera M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Nakauchi H, Kuratsuji T. Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第13回日本遺伝子治療学会, 名古屋, 6月28日-30日, 2007.
- 2) 田口智子, 宮川世志幸, 堀内保臣, 斎藤洋平, 竹野内寿美, 北村紀子, 松井淳, 佐藤伴, 鈴木恭子, 斎藤正博, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. oncostatin Mの造血調節作用に関するin vitroでの検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 合同開催, 横浜, 10月11日-13日, 2007.
- 3) 堀内保臣, 清河信敬, 宮川世志幸, 中島英規, 斎藤洋平, 右田王介, 片桐洋子, 大喜多肇, 岡田真由美, 大津真, 小野寺雅史, 久米晃啓, 犬飼岳史, 奥山虎之, 杉田完爾, 藤本純一郎, 倉辻忠俊. ヒト造血幹細胞に対する組換えフィブロネクチンを用いたレトロウイルス感染の分子機構に関する検討. 第49回日本小児血液学会総会・第23回日本小児がん

学会学術集会 合同開催, 仙台, 12月14
日-16日, 2007.

- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 該当なし
 2. 実用新案登録
 該当なし
 3. その他
 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

（分担）研究報告書

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用

分担研究者 大津 真 東京大学医科学研究所

研究要旨：1) 慢性肉芽腫症（CGD）に対する遺伝子治療の基礎および前臨床研究を行った。CGD 遺伝子治療臨床研究の多くの例で導入遺伝子陽性細胞が一過性の出現に終わる原因を明らかにする目的で、マウス骨髄競合的再構築アッセイを用いて、CGD 造血幹細胞の骨髄再構築能を評価したところ、正常細胞との間に差を認めず、遺伝子治療において機能修復された”正常”造血幹/前駆細胞が、機能修復されなかった CGD 造血幹/前駆細胞からの競合によって、増殖の場を徐々に失うという仮説は否定的であった。今後は移植系を改変することで、治療遺伝子産物に対するホストからの免疫拒絶反応の可能性について明らかにすることが可能であると考えられる。2) 新たな閉鎖系バッグシステムを用いて臨床試験に応用可能なヒト骨髄 CD34 陽性細胞への遺伝子導入法の検討を行った。結果、バッグシステムを用いた完全閉鎖系での作業が可能であり、ヒト造血幹/前駆細胞への良好な遺伝子導入と造血再構築能の保持が達成された。今後、最終プロトコールの決定に向けて本システムを用いた試行による更なる条件検討が繰り返される必要がある。

A. 研究目的

1. マウスモデルを用いた研究から、慢性肉芽腫症（CGD）の遺伝子治療における有効性および安全性の改善を可能にするための知見を得ることを目的とする。

2. ヒト遺伝子治療臨床試験で使用可能な造血幹/前駆細胞への遺伝子導入方法を至適化、確立し、その有効性および安全性を確認することを目的とする。

B. 研究方法

1. マウスモデルとして gp91phox 遺伝子を欠損した CGD マウスを使用した。CGD 遺伝子治療の臨床試験において、導入遺伝子陽性細胞が一過性の生着にとどまり、経時的に消失する現象に着目し、以下の2つの可能性を考慮し実験系を構築した。

1) 遺伝子陽性細胞、すなわち機能的に修復された細胞に比較して、CGD 細胞が造血幹/前駆細胞レベルにおいて増殖優位性を有するため、徐々に CGD 細胞キメリズムが優位に変移する可能性。

2) 導入遺伝子産物に対する免疫反応により、遺伝子陽性細胞が排除される可能性。

以上を明らかにするため、競合的骨髄再構築アッセイ（CRA）を行った。上記1.を検証する目的で、C57BL/6（B6）Ly5.1/Ly5.2 F1 マウスをレシピエントとし、半致死量の放射線照射を加え、group-1 として wild type（wt）B6 Ly5.2 bon

e marrow（BM）細胞と wt B6 Ly5.1 BM 細胞の 1:1 mixture を、group-2 として CGD マウス（Ly5.2）BM 細胞と wt B6 Ly5.1 BM 細胞の 1:1 mixture をそれぞれ移植した。上記 2. を検証する目的では、レシピエントに Ly5.1/5.2 F1 CGD マウスを用いることを計画しているが、現在この strain を作製中である。

移植マウスより4週ごとに血液を採取し、末梢血中における Ly5.1 細胞と Ly5.2 細胞の割合をフローサイトメーターを用いて解析した。

2. ヒト骨髄 CD34 陽性細胞を標的とし、clinical grade レトロウイルスベクターにより遺伝子導入を行った。閉鎖系システムを構築するため、新規に開発された gas 透過性培養バッグを使用した。培養液、細胞の移動は全てバッグ間を無菌的に結合したチューブを通して行い、ファブロネクチン断片でコートしたバッグ内でレトロウイルス上清を混合培養することで2-3日間の遺伝子導入操作を行ったのち、細胞生存率、細胞増殖、遺伝子導入効率および免疫不全移植モデル、NOD/Scid マウスでの再構築能を評価した。

C. 研究結果

1. 計画に従い、移植実験を行った。group-1 として7匹、group-2 として8匹のレシピエントマウスを用いた。マウスは全例生存し、現在まで4週および8週時点での解析が可能であった。結果

、両グループにおいて各マウス 40-60% の Ly5.2/Ly5.1 + Ly5.2 キメリズムが観察され、8 週までの解析ではキメリズムの明らかな変動はみられなかった。

2. ヒト骨髄 CD34 陽性細胞への遺伝子導入を計 3 回行った。3 回の試行で細菌の混入などの細胞の汚染はみられず、新規バッグを用いた閉鎖系システムの有用性が示された。遺伝子導入効率は ~20% で、細胞増殖もカルチャーディッシュでの培養時と比較して遜色ない良好な増殖を示した。NOD/Scid マウスの移植においては 5 日間培養後の細胞を移植したマウスで血液中で 6.1%、骨髄で 15.2% のヒト細胞の生着を確認した。

D. 考察

1. CGD マウス骨髄細胞 (Ly5.2) と wt Ly5.2 マウス骨髄細胞は、競合的骨髄再構築アッセイにおいて、競合相手である wt Ly5.1 マウス骨髄細胞と同等の再構築能を示し、8 週までの解析では構築能の拮抗は安定していた。レシピエントマウスに Ly5.1/Ly5.2 strain を用いることでコンジェニック strain の差による免疫反応の違いを排除しているため、得られた結果は少なくとも骨髄前駆細胞レベルでの再構築能は CGD マウスでは正常と変わらないことを示している。しかしながらマウスの骨髄移植においては、HSC レベルでの再構築能は 16 週以降でのキメリズムにより評価するべきであることから、さらに経過を追って解析を続ける必要がある。

2. 臨床応用可能な閉鎖系バッグシステムを用いて、ヒト骨髄 CD34 陽性細胞に遺伝子導入が可能であった。得られた導入効率は ~20% であり、我々の ADA 欠損症遺伝子治療の臨床試験で導入効率 (40-50%) に比して高くはないものの、使用したクリニカルグレードベクターのタイターが比較的低いことを考慮すると臨床試験での使用には十分なシステムであると考えられた。さらに、遺伝子導入後の細胞の高い骨髄再構築能が NOD/Scid アッセイで示されたことから、本システムを用いることで CGD における遺伝子治療での安全で有効な遺伝子導入操作が可能であると考えられた。

E. 結論

1. CGD マウス骨髄細胞は、正常骨髄細胞と比較して同等の再構築能を有することが示され、遺伝子治療において導入遺伝子陽性細胞が経時的に減少する原因を

説明しうる「再構築における優位性」は証明されなかった。

2. 新規閉鎖系バッグシステムは、レトロウイルスベクターによるヒト CD34 陽性細胞の遺伝子導入を臨床応用に可能なレベルで、有効かつ安全に施行しうる有用な手段であることが示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

M Otsu and T Ariga. Stem cell gene therapy for ADA-deficiency without myeloablative preconditioning. Roger Bertolotti and Keiya Ozawa: Autologous and cancer stem cell therapy, World Scientific, Singapore, pl-18, 2008

Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, et al. Stable transgene expression in mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. Mol Ther 15: 560-5, 2007

2. 学会発表

M Otsu, et al. A novel hematopoietic stem cell transplantation strategy utilizing pre-infusion of donor lymphocytes. The 15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, the Netherlands, 27-30 October 2007

大津 真. ADA 欠損症における日本独自の遺伝子治療. 第 49 回日本小児血液学会, 仙台, 2007 年 12 月

大津 真, 他. アロ T 細胞先行投与による新規造血幹細胞移植法. 第 69 回日本血液学会, 横浜, 2007 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

（分担）研究報告書

先天異常症に対する遺伝子・細胞治療法の開発と臨床応用
における遺伝子検出システムの確立に関する研究

分担研究者 梨井 康
国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 移植免疫研究室

研究要旨： 遺伝子治療後その治療効果を追跡するために、臨床的な症状の把握とともに、遺伝子導入細胞の挙動および遺伝子の発現量を解析する必要がある。本研究は、X 染色体連鎖性慢性肉芽腫症（XCGD）を対象疾患とする遺伝子治療臨床研究実施の一環として、導入遺伝子の検出方法の検討を行い、TaqMan 定量 PCR 法による遺伝子定量検出システムを確立した。

A. 研究目的

先天異常症に対する病因治療として、遺伝子治療や細胞治療がある。造血幹細胞移植は白血病や再生不良性貧血などへの治療法として臨床的な蓄積があり、先天異常症での治療も増加している。しかし、GvHD の発症、生着不全といったリスクがある。遺伝子治療は、自家造血幹細胞を用いる移植が基本となるため、拒絶反応が起きない安全な治療法として期待されている。

国立成育医療センターを中心とした全国的な遺伝子治療コンソーシアムにより、対象疾患として欧州を中心に遺伝子治療が実施されている X 染色体連鎖性慢性肉芽腫症（XCGD）を選択し、XCGD に対する遺伝子治療臨床研究の実施とその有効性と安全性を検証することが計画されている。本分担研究は、遺伝子治療臨床研究の際に、治療前後においてその遺伝子導入細胞をモニターする方法の確立を目的とする。遺伝子治療では、導入遺伝子が治療対象細胞集団に存在するこ

とが治療には不可欠である。研究の実施にむけ、遺伝子治療実施後のフォローアップ・プロトコルを立案し、遺伝子治療時の特殊検査のシステムの確立を目指す。本研究で検討する検査法は XCGD のみならず、ムコ多糖症等の小児先天異常症の遺伝子治療実施の際にも、応用されることが期待できる。

B. 研究方法

すでに先行して遺伝子治療臨床研究が実施されているヨーロッパの XCGD 遺伝子治療でのプロトコルおよび、わが国で実施された先天免疫不全症候群に対する遺伝子治療である北海道大学におけるアデノシンデアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究のプロトコルをもとに遺伝子治療コンソーシアム・メンバーらとともに検討し、本研究におけるフォローアップ・プロトコルを立案した。遺伝子導入細胞の動向をモニターするため、立案したフォローアップ・プロトコルに、導入遺伝子の定量を

行う検査項目をいれた。これは、初期には遺伝子導入の効率を測定し、長期的には、導入遺伝子の数を量的にフォローすることを目的としている。実際の手法として、定量的 PCR (Quantitative PCR, Q-PCR) の測定法を実施するため、本臨床治療研究で実施する遺伝子に対する検出方法を検討・確立した。

Q-PCR 法による検討では、蛍光プローブを用い、PCR 法の初めに存在した鋳型遺伝子量に応じた蛍光量が観察されるため、PCR の増幅効率に左右されるものの、導入遺伝子の量的差異を検討できる。図 1 で示した Q-PCR のひとつである TaqMan 法を用いた

今回我々は、遺伝子治療の標的疾患である XCGD の原因遺伝子 (*gp91phox*) をレトロウイルスベクターにより導入後、ゲノム DNA に存在する *gp91phox* 遺伝子を増幅せずウイルスベクターのもつ *gp91phox* 遺伝子 cDNA を特異的に検出するプライマーとして、*gp91phox* 遺伝子 exon8 内に 5'-GGTTTGCGCATCTCAACAGAA-3' と、*gp91phox* 遺伝子 exon9 内に 5'-TGTATTGTCCCATCCATTTTGAA-3' を作成した。cDNA を鋳型として用いた場合にプライマーセットで増幅される産物は、114bp である。ゲノム DNA には両 exon 間に 2,582 bp のイントロンがあり、通常の PCR 反応では増幅しえない。プローブとして、5'-TCATCACCAAGGTGGTCACTCACCTTTC-3' を用いる。このプローブは FAM でラベルされており、前半 11bp が exon 8 後半、18bp は exon9 に由来しており、ゲノム DNA の増幅断片では蛍光を発しない。

また、ヒト *EPO* レセプター遺伝子を内在コントロールに用いる。*EPO* レセ

プター遺伝子増幅のプライマーとして 5'-CTGCTGCCAGCTTTGAGTACACTA-3' と 5'-GAGATGCCAGAGTCAGATACCACAA-3' を使用する。PCR 産物サイズは 138bp である。VIC ラベルした 5'-ACCCAGCTCCCAGCTCTTGCGT-3' をプローブに用いる。定量 PCR 反応は、GeneAmp7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) でおこなう、反応条件は、熱変性 94°C 15 秒、鎖伸長反応 60°C 1 分である。

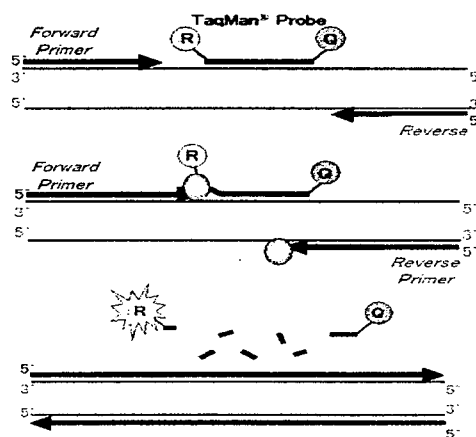


図 1 TaqMan 法の反応原理

これらのプライマーによって増幅されたアンプリコンに蛍光プローブが結合し、PCR 産物量に応じた蛍光シグナルが観察できる。

増幅産物と反応したプローブの蛍光シグナルは、図 2 に示すように、アンプリコン量に伴って増強するため、PCR のサイクル数 (増幅回数) に応じて、次第に増加する。一定の蛍光シグナル値をとった PCR サイクル数は Ct (Threshold Cycle: 蛍光強度が閾値に達したサイクル数) と呼び、この値は、鋳型 DNA 中の遺伝子 DNA のコピー量に応じた値となる。従って、Ct 値から鋳型 DNA 中の遺伝子量を推定できる。