

図2 量的PCR法 (Ct 値)

C. 研究成果

Q-PCR法を用いた検査手法の確立をめざし、TaqMan法によるCt値の測定と、Ct値から鑄型DNA中の遺伝子コピー数を推定できることを確認した。

gp91phox遺伝子を1コピー有するHT1080細胞をスタンダードとして、遺伝子導入されていないHT1080細胞と混合して、ゲノムDNAを精製後、Q-PCR法を実施し、遺伝子導入細胞の割合とよく相関するデータを得ることを表および図3に示す。したがって、Ct値から遺伝子挿入効率が推定されることを確認した。

さらに、この方法を用いて、gp91phox遺伝子をもつレトロウイルスベクターにより遺伝子導入されたHT1080、K562、293T等細胞株、ヒト臍帯血CD34陽性幹細胞などで遺伝子導入効率を検討することもできた。

D. 考察

一遺伝子異常による先天異常症候群、とくに先天性免疫不全症候群や、代謝疾患では、骨髄移植や酵素補充によって病因に対する治療が可能になってきた。なかでも、XCGDは、NADPH酸化酵素の異常により、好中球での活性酸素産生に障害を生じる。

表 gp91phoxコピー数割合とCt値から推定される導入率

gp91phox1コピー細胞の割合 (%)	Ct値	Ct値より導入率 (%) *実測値
50.0	2.760	43.75
25.0	3.553	27.05
12.5	4.610	14.26
6.25	5.897	6.54
3.13	7.337	2.73
1.56	8.240	1.58

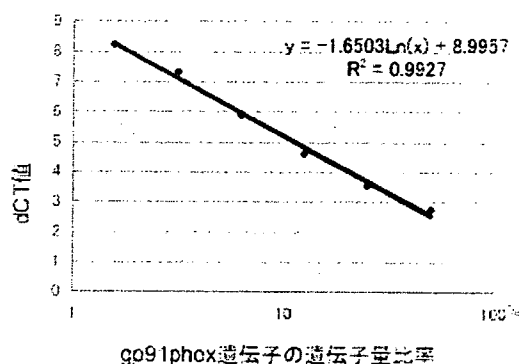


図3 dCT値と遺伝子導入効率

このため、乳児期より好中球の殺菌が阻害されるため重症感染を繰り返す先天性免疫不全症である。さまざまな感染を繰り返し、感染それ自体と抗菌薬の副作用とにより、消化器、呼吸器、腎臓などの多臓器にわたる機能不全を引き起こし最後には死にいたる疾患である。骨髄移植は本疾患の治療のひとつではあるが、組織適合性のあうドナーがない、重篤な感染症のため骨髄移植が選択肢となりえない場合など、誰にでも可能な治療法ではない。さらには、骨髄移植後のGvHDの発症率が高く、その制御が極めて難し

いことから、骨髄移植は治療自体によって命を落とすリスクもある。一方、遺伝子治療は、自己の骨髄或いは末梢血中の造血幹細胞を用いることで、免疫による拒絶反応がなく、重篤な感染症への治療効果が確認されつつあり、骨髄移植にかわる重要な選択肢の一つとなりうるものと考えられる。

遺伝子治療実施は、新規治療であり、未知の危険がある。遺伝子導入された幹細胞の挙動を把握することは遺伝子治療による治療効果および直接的な副反応の把握と早期発見のために重要である。本分担研究は、成育医療センター遺伝子治療への基礎データとなるとともに、将来の遺伝子治療にも応用されうる基礎的システム構築である。

遺伝子導入による遺伝子治療では、導入遺伝子の発現による欠損遺伝子の補充・代替が治療の根幹である。したがって、今回明らかにした導入遺伝子の量的な把握だけではなく、補充・代替された遺伝子の発現効率にいたるまでの転写・翻訳についての量的な把握法の検討が今後の課題である。

E. 結論

遺伝子導入効率および、導入遺伝子の挙動を把握するために TaqMan 定量 PCR 法による遺伝子定量検出システムを確立した。本システムは、遺伝子導入の検証方法として、ほかの遺伝子導入の際にも応用可能であるため、本研究は小児難治性疾患の遺伝子治療臨

床研究の発展に大いに寄与するものである。

謝辞 最後に、本分担研究に協力してくださった国立成育医療センター病院遺伝子診療科右田王介先生、研究所移植・外科研究部北沢祐介先生に感謝の意を表す。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

TOWARDS CLINICAL GENE THERAPY FOR CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE: OPTIMIZATION OF GENE TRANSDUCTION INTO HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS. Yasuomi Horiuchi, Makoto Otsu, Nobutaka Kiyokawa, Osuke Migita, Tsutomu Ogata, Xiao-Kang Li, Masafumi Onodera, Akihiro Kume, Torayuki Okuyama, Junichiro Fujimoto, Hiromitsu Nakauchi, Tadatoshi Kuratsuji. 第13回日本遺伝子治療学会 平成19年6月28日～30日 名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科研費補助金（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 小野寺 雅史 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 講師

研究要旨

近年、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究において、治療ベクターの染色体挿入により近傍遺伝子の発現異常が起こり、その結果として造血系腫瘍が発症したとの報告がある。本研究では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 (positional effect) を解析するため、ウイルスベクター (プロウイルス) を染色体上に1コピーしか有さない遺伝子改変マウスを4系統作出し、その挿入部位近傍遺伝子を改良 LAM-PCR にて同定した。同定された近傍遺伝子は、サイクリン D1 遺伝子 (CCND1)、Mlt11 遺伝子、ドーパミン受容体 3 遺伝子 (D3)、および 5 番染色体上の未同定遺伝子であり、現在、これらマウスの造血系変化を経時的に解析することでウイルスベクター挿入による positional effect の一端を解明しようとしている。

A. 研究目的

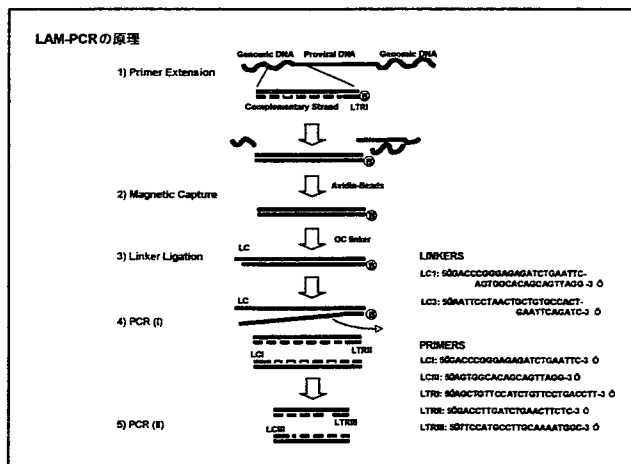
レトロウイルスベクターの染色体挿入による近傍遺伝子への発現影響 (positional effect) を解析するため、染色体上にプロウイルスを1コピー有する遺伝子改変マウスを作出し、それら挿入部位近傍遺伝子を改良 LAM-PCR にて同定して、マウスの造血系細胞変化を近傍遺伝子と関連づけ経時的に解析する。

B. 研究方法

1. レトロウイルスベクターを用いてマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) に緑色蛍光色素タンパク (EGFP) 遺伝子を導入し、それら EGFP 発現 ES 細胞を 3.5 日胚盤胞に移入することで遺伝子改変マウスを作出する。次に、生殖細胞が生じるには減数分裂が必要なことを利用し、C57BL/6 マウスを掛け合わせることで、プロウイルスのコピー数が減少した F1、F2 マウスを作出し (各プロウイルスは一方の対立遺伝子にしか挿入されていないので、減数分裂によりその絶対数は理論的には半減する)、最終的に染色体上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する。

2. 改良 LAM-PCR はプロウイルスであるレ

トロウイルスベクターの 5'LTR に逆向き (anti-sense oligo) に biotin 化 primer を設計する。これを用いて 3' → 5' に primer extension し、プロウイルスの 5'LTR の franking region (ベクターの挿入部位近傍) を増幅する。Primer extension 後、avidin ビーズにて増幅した fragment を回収する。回収された PRC 産物に linker を ligation し、nested PCR を行うことで挿入部位遺伝子を増幅する。その後、各産物を cloning、sequence することで、マウスゲノム配列より染色体挿入部位を決定する。

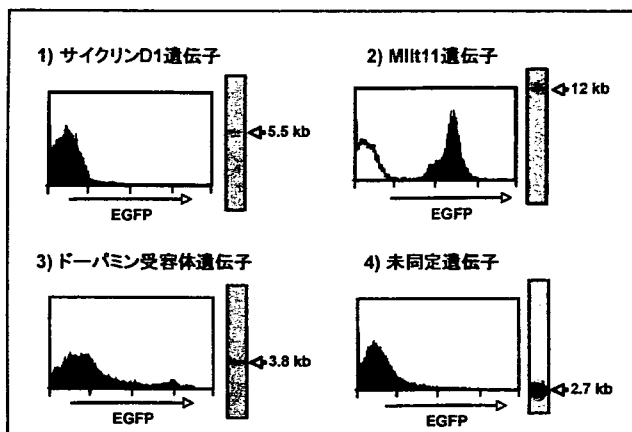


(倫理面の配慮) 今回使用した検体はすべて

マウス由来であり、また、同実験は筑波大学より承認された「遺伝子組換え実験計画書」ならびに「動物実験計画」に基づいて行われている。

C. 研究結果

1. EGFP 遺伝子導入 ES 細胞より遺伝子改変マウスを作出し、各臓器において EGFP の発現を確認できた遺伝子改変キメラマウスより F1、F2 マウスを作出した。これらマウスにおいても EGFP の発現を確認している。
2. 遺伝子改変マウスにおいてプロウイルスは一方の対立遺伝子にしか挿入されていないので、生殖細胞が生ずる減数分裂の際には、そのコピー数は減少する。このことを利用し、プロウイルスが 10 コピー以上有する遺伝子改変キメラマウスより C57BL/6 マウスと掛け合わせることでプロウイルス数が減少した F1、F2 マウスが作出した。そして、最終的に Southern blot 法にて染色体上に 1 コピーのみを有する遺伝子改変マウスを 4 系統樹立した。
3. 上記、4 系統マウスより genomic DNA を抽出し、改良 LAM-PCR にて挿入部位を同定し、その配列を基にマウスゲノム配列より近傍遺伝子を同定した。その結果、1) 第 7 染色体上のサイクリン D1 遺伝子 (CCND1)、2) 第 3 染色体上の myeloid/lymphoid or mix-lineage leukemia translocated to 11 遺伝子 (Mlt11)、3) 第 16 染色体上のドーパミン受容体遺伝子 (D3)、および 4) 第 5 染色体上の未同定の遺伝子近傍に挿入されていた。



4. 考察

現在、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は原発性免疫不全症を中心とした各種疾患に対し行われているが、その最大の問題点はレトロウイルスベクターが原癌遺伝子近傍に挿入した場合、positional effectにより癌原遺伝子を活性化し、白血病を発症する可能性があるということである。ただ、実際にはあまりにも多くのプロウイルスが複数の遺伝子内に挿入されるため、挿入部位と白血病化の一対一の関係を明確に解析するのは困難である。このため、本研究の染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有するマウスを解析することは、挿入部位の positional effect を明確に解明できる点で重要であり、また、得られた情報からより安全な造血幹細胞遺伝子治療を構築できる可能性を秘めている。今後は活性化プロウイルスの存在を示す EGFP の発現を有する Mlt11 ならびに D3 遺伝子マウスを中心に各遺伝子の発現状況を解析して行く予定である。

D. 結論

染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有するマウスを 4 系統樹立し、また、その挿入部位ならびに近傍遺伝子も同定した。今後は腫瘍等が発症を含め、これらマウスの動態を造血系細胞を中心に経時的に解析していく。

E. 健康危険情報

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Onodera M: Gene and cell therapy for relapsed leukemia after allo-stem cell transplantation. *Frontiers in Bioscience* 13: 3408-3414, 2008.
2. Nabekura T, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M: An Immunotherapy Approach with Dendritic Cells Genetically Modified to Express the Tumor-Associated Antigen, HER2. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (in press)
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

2. 学会発表

Masafumi Onodera

Gene Therapy for Hematologic Malignancy

American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting

May 30-June 3, 2007

Washington State Convention & Trade Center, Seattle,

WA, USA

Tsukasa Nabekura, Toshiro Nagasawa, Hiromitsu Nakauchi, and Masafumi Onodera

FEASIBILITY OF VACCINE THERAPY WITH DENDRITIC CELLS GENETICALLY MODIFIED TO EXPRESS THE TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN HER2

第13回日本遺伝子治療学会

2007.6.28~2007.6.30

国際医学交流センター (愛知がんセンター)

Masafumi Onodera

Opposite effects of an integration site on expression of the transgene-Genesilencing or Leukemogenesis

IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy

September 13-September 17, 2007

Thessaloniki, Halkidiki, Greece

Tsukasa NABEKURA, Toshiro NAGASAWA, Hiromitsu NAKAUCHI, and Masafumi ONODERA

An immunotherapy approach with dendritic cells genetically modified to express the tumor-associated antigen, HER2

日本免疫学会

2007.11.20~2007.11.22

東京

- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 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 久米晃啓 自治医科大学准教授

研究要旨

複数の細胞系に分化しうる骨髄間葉系幹細胞への遺伝子導入に際し、アデノ随伴ウイルスの Rep 蛋白を利用して、ベクター挿入発癌の危険がない染色体部位（ヒト第 19 番染色体長腕端部）に特異的に治療用遺伝子を組み込むことができた。ただしこの組み込みに際しては、本部位に存在するインシュレータ配列の破壊を伴うことが多く、導入遺伝子の安定的発現を担保するためには、ベクターに本配列を搭載するなど、さらなる工夫が必要と考えられた。

A. 研究目的

遺伝子治療ベクターの染色体組み込みによる挿入発癌を回避するため、近傍に癌関連遺伝子のない安全な部位への遺伝子組み込み法を開発する。組み込まれた遺伝子が安定に発現するための方策も考慮する。

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、非構造蛋白質 Rep の働きにより、ヒト第 19 番染色体長腕端部 (AAVS1 領域) にゲノムを組み込む性質がある。この領域には癌関連遺伝子がなく安全であり、しかも遺伝子の不活化を防ぐインシュレータ配列があつて治療用遺伝子を組み込むのに好適と考えられる。この系を利用した遺伝子導入の有用性を検討する。

B. 研究方法

複数の細胞系列に分化しうる骨髄間葉系幹細胞を遺伝子導入のプラットフォームとし、これに治療用遺伝子（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トランスフェクトした。得られた遺伝子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。同領域に遺伝子が組み込まれたクローンについては、組み込み部位の塩基配列を決定した。また、それぞれのクローンおよび対照のランダム挿入クローンについて、長期培養下 (in vitro) およびヌードマウス移植下 (in vivo) での第 IX 因子発現量を追跡した。

C. 研究結果

第 IX 因子発現ベクター単独のトランスフェクションで得られた 62 クローン中、AAVS1

領域に遺伝子が組み込まれたものは 1 個もなく、ランダムな挿入のみと判定された。一方、Rep プラスミドと同時にトランスフェクトした実験では、解析した 58 クローン中 6 クローンで第 IX 因子遺伝子が AAVS1 領域に組み込まれていた。ただしそのうち 5 クローンでは AAVS1 領域に存在するインシュレータ配列が破壊されていた。これらのクローンでは、染色体にランダムに挿入されたクローンと同様、プロモータの CpG 配列が広範にメチル化され、これに伴って第 IX 因子の発現は長続きしなかった。

D. 考察

Rep の利用により、染色体特異的遺伝子組み込みが可能であることが示唆された。今後は、Rep 発現タイミングや量を制御するなど、さらに効率よく部位特異的組み込みを起こさせるための改良が必要である。また、AAVS1 領域に組み込まれた遺伝子を長期にわたり安定して発現させるには、インシュレータ配列をベクター側に搭載するなどして、導入遺伝子の不活化を防ぐ必要がある。

E. 結論

染色体部位特異的遺伝子組み込み法は、遺伝子治療の安全性を高める技術として期待されるが、その実用化に向けては、解決すべき技術的課題も多い。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

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: Promoter 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)

2. 学会発表

1) 久米晃啓, 松下卓, 小倉剛, 小澤敬也: 自己相補型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療. 第110回日本小児科学会小児科学会学術集会, 2007年4月, 京都. (日児誌 111: 220, 2007)

2) 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, May-June 2007, Seattle, WA, USA.

(*Mol Ther* 15 Suppl 1:S43, 2007)

3) 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年6月, 名古屋. (Abstract #004)

4) Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, 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, 2007年6月, 名古屋. (Abstract #020)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。

（分担）研究報告書

「小児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」に関する研究
研究者名 国立成育医療センター 臨床検査部 奥山 虎之

研究要旨：小児先天異常症には酵素が欠失することによって発症する代謝異常症がある。これら代謝異常疾患の病因に対する治療法として、酵素補充療法があるが、費用、治療頻度、体内での酵素分布に問題がある。より根治的な治療として、遺伝子治療や造血幹細胞移植療法が試みられているが、いずれの治療法も効果と安全性については議論がある。我々は、ムコ多糖症齧歯類モデルを用いて、造血幹細胞移植より安全とされる肝臓を用いた臓器移植の治療効果を検討した。同様の手法が酵素欠損に伴う先天代謝異常症に対する有効な治療の選択肢となりえ、今後の小児難治性代謝疾患の治療の発展に寄与できるものと考えている。

A. 研究目的

先天異常症のうち、先天代謝異常症は先天的に代謝酵素に異常をもつ疾患群である。いくつかの疾患では病因治療として、酵素補充療法が可能となってきた。しかし、一回の酵素補充の効果は限定的であり、また、酵素治療薬が高価であるため、毎週～2週に1回程度の頻回通院と、高額な医療費が生涯にわたって必要となる。このため、酵素補充療法は究極の治療とはいえ、さらなる治療法の開発が待たれている。

現在、酵素補充療法以外の病因治療として、細胞治療や遺伝子治療が試みられている。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るため、先天異常症での治療も増加している。しかし、適合ドナーがない場合には実施は不可能であり、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が、発ガン性といった未知の問題については議論のあるところである。

ムコ多糖症は、ムコ多糖を分解するライソゾーム酵素を、先天的に欠損する先天異常症のひとつである。ムコ多糖を分解する酵素は多種であり、欠損している酵素により病型が異なる。欠損したたったひとつの分解酵素を永続的に体内に回復できれば、症状の進展に対する効果が期待できる。本症の患者に対する造血幹細胞移植では、治療効果がえられないものが2割、さらに死亡率が2割程度あるとされる。また、遺伝子治療はその開発が端緒に終わったばかりであり、今後の検討が必要である。

肝移植は、肝細胞を中心とした細胞群をドナーから疾患レシピエントに移す技術である。メチルマロン酸血症やプロピオン酸血症など代謝疾患の一部では、肝臓の臓器移植が一定の効果が得られることが示唆されている。肝移植も細胞移植の一種と考えられ

るが、造血幹細胞移植の死亡率にくらべ、より安全性は高いとされ、さらに造血幹細胞移植に比ベドナーの適合性も厳格である必要がない。酵素治療薬が得られない、あるいは造血幹細胞移植の適合ドナーが得られない患者に対して、肝移植による酵素補充効果を確認できれば、治療法のひとつとして有望である。

B. 研究方法

ムコ多糖症の病型のひとつであるVI型を発症するMPRラットに対して、肝移植とその治療効果を検討する。

MPRラットは、ラット *arsb* 遺伝子(アシルスルファターゼβ)の一塩基挿入による異常により発症する近交系のラットである。MPRラットは、異常 *arsb* 遺伝子をホモ接合体でもつときに疾患を発症し、ラットの疾患罹患については、症状と遺伝子型を用いて確認できる。

生後3ヶ月のラットを用いて、ムコ多糖症VI型である遺伝子型正常のMPRラットをドナーとして、罹患ラットへの肝臓移植を実施した。

肝移植後ラットの症状経過を確認するために、尿中ウロン酸の定量を実施する。ウロン酸は、ムコ多糖症で蓄積する、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸などを含み、ムコ多糖症VI型では、デルマタン硫酸を基質とする酵素欠損であるため、尿中に排泄されるデルマタン硫酸、ひいてはウロン酸量が増加する。この値はARSB活性を反映し、治療効果判定の一助となる。さらに、移植後半年の経過をフォローし、各組織での治療効果を病的に解析することを予定している。

C. 研究成果

昨年11月に移植を実施し、現在経過フォロー中である。

ラットの尿中ウロン酸の測定結果は表1の通りであった。この結果は、罹患MPRラットでは、尿中ウロン酸が正常MPRラットに比べ増加することを示している。

表1 MPRラット尿中ウロン酸値

ラット	尿中ウロン酸値 (mg/g・Cre)
罹患ラット	111
罹患ラット	128
罹患ラット	167
平均	135.3
標準偏差	28.7
正常ラット	52.9
正常ラット	69.3
正常ラット	50.4
平均	57.5
標準偏差	10.3

治療後の経過は表2の通りであった。移植後のラットでは、尿中に排泄されるウロン酸量が低下することを確認できる。

#	尿中ウロン酸値 (mg/g・Cre)	術後日数
203	97.8	33
213	24.4	29
239	42.9	32
231	45.2	27
204	30.3	31
平均	48.1	
標準偏差	29.1	

表2 肝臓移植後の尿中ウロン酸推移

D. 考察

一遺伝子異常による先天異常症候群、とくに代謝疾患では、酵素補充や

造血幹細胞移植によって病因に対する治療が可能になってきた。

ムコ多糖症は、酵素補充療法がムコ多糖症 I 型 II 型、VI 型で可能になったが、患者に通院と費用といった過大な負担をしいている。これらの負担の解決には、永続的な効果の期待できる病因治療法の開発が必要である。

造血幹細胞移植は、移植細胞が生着し順調に酵素の産生がはじまれば、生涯にわたって治療効果が持続することも期待できる治療のひとつではあるが、組織適合性のあうドナーがえられず造血幹細胞移植が選択肢となりえない場合もある。さらには、白血病といった骨髄性疾患に比べ、移植後の生着不全や造血幹細胞移植後の GvHD の発症率が高いと考えられている。GvHD は発症するとその制御が極めて難しいことから、造血幹細胞移植治療自体によって命を落とすこともある。一方、遺伝子治療は、新規治療であり、未知の危険があり、ムコ多糖症ではヒトに実施されたものはない。

本分担研究は、既存の治療法を改善した新規治療開発の資料となる研究である。肝臓移植後の期間がまだまだ短いため効果の判定にはなお日数を要するが、ムコ多糖の蓄積に一定の効果が得られていると考えている。今後の治療効果判定を継続し、検討する。

本研究により、肝移植が小児難治性代謝疾患の新規治療法になりえること、また造血幹細胞移植以外の細胞療法も代謝疾患の治療となりうることを示されると考えている。

E. 結論

ムコ多糖症齧歯類モデルを用いて

肝移植治療を検討した。尿中ムコ多糖の排泄量をモニターし、肝臓移植後の排泄量低下を確認し、移植肝臓が酵素を産生し、一定の治療効果があることを確認した。今後、長期的な治療効果について検討する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

TOWARDS CLINICAL GENE THERAPY FOR CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE: OPTIMIZATION OF GENE TRANSDUCTION INTO HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS. Yasuomi Horiuchi, Makoto Otsu, Nobutaka Kiyokawa, Osuke Migita, Tsutomu Ogata, Xiao-Kang Li, Masafumi Onodera, Akihiro Kume, Torayuki Okuyama, Junichiro Fujimoto, Hiromitsu Nakauchi, Tadatoshi Kuratsuji. 第13回日本遺伝子治療学会 平成19年6月28日～30日 名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

研究課題 単一医療機関における慢性肉芽腫症の予後調査

分担研究者 立澤 宰 国立成育医療センター膠原病・感染症科医長

研究要旨

慢性肉芽腫症（CGD）の予後は改善したとされているが、根拠となるデータは背景の異なる多施設のデータを集計したものであった。ここでは疾患の特性をより明確にするため、単一医療機関における慢性肉芽腫症の予後調査をおこなった。

小児期の治療・管理法が進歩したためか、小児期の予後は改善が見られるが、その改善傾向には限界があり、思春期以後の予後にはアスペルギルス肺炎が問題となり、これ以上の改善は期待できない。一方、骨髄移植の治療成績は良好であることから、CGDの予後改善には根治療法が不可欠であり、さらに積極的に推進すべきである。

研究協力者

小林 信一(成育医療センター膠原病・感染症科)

河合 利尚(成育医療センター膠原病・感染症科)

A. 研究目的

治療法の進歩に伴い慢性肉芽腫症（CGD）の予後は改善したとされているが、状況や環境因子が大きく異なる多施設のデータを根拠として集計したものであった。ここでは疾患の特性をより明確にするため、単一医療機関における慢性肉芽腫症の予後調査をおこなった。

B. 研究方法

1986年からの2006年までの21年間に、国立小児病院感染科並びに移行した国立成育医療センター膠原病・感染症科を受診したCGD患者は30名で、このうち定期的に治療と経過観察をおこなってきた23名について、罹患した感染症を主体とした予後調査をおこなった。

C. 研究結果

調査終了時点で23名中、87%20名が生存していた。平均年齢は19.6歳であった。病型はgp91-phox欠損が78%、p22-phox欠損が13%、p67欠損が4%であった。診断された年齢は平均で2.8歳、観察期間の総計は343.3患者・年で、患者あたりの平均観察期間は14.9年であった。死因は2名がアスペルギルス肺炎、1名が肝膿瘍であった。2名が抗真菌薬の長期使用による腎不全で血液透析中である。

抗生薬の静脈注射をするため入院したものを重症感染症とすると、入院総計は174回で、感染部位は203箇所であった。一人当たりの平均感染回数は8.2回、平均入院回数は7.6回であった。すなわち2年に1回は重症感染に罹患したことになる。

肺感染症は23名中20名に81回みられた。原因微生物は重症感染203回中47回に同定され、アスペルギルス属が21回であった。その他化膿性リンパ節炎が31回、腸

管感染が 29 回、骨髄炎が 14 回、膿瘍 14 回が主な感染部位であった。

これまでに 5 例の患者に骨髄移植をおこなった。4 例は gp91-phox 欠損であり、1 例が男子の p22-phox 欠損である。これらの患者も易感染性があり、重症感染罹患頻度もその他の患者より平均値は高いものであった。前処置には busulfan と cyclophosphamide を使用し、2 例は同胞、3 例は骨髄バンクより骨髄が提供された。骨髄移植後の経過は現在までのところ順調である。

なお、集計後の 2007 年に 20 歳代と 30 歳代の 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た。

D. 考案

かつては 7 歳までに死亡することから致死性肉芽腫症と呼ばれていた CGD ではあるが、治療や診断方法の進歩に伴い 8 歳での生存率が 70.5%(1978 年以前に出生した場合)から 92.9%(1979 年以後に出生した場合)に改善したと Muoy らは報告した。しかし Winkelstein らは CGD の死亡率は年間 5%と高いものであるとしており、患者数に比較して治療法や環境などの患者背景は多様なこともあり、予後改善が明らかだとの一定の見解には至っていないと思われる。ここでは疾患の特性をより明確にするため、単一医療機関における慢性肉芽腫症の予後調査をおこなったが、10 歳までの予後では前者の報告に近い値であり、今回の調査した期間内では後者の報告よりも良い予後と思われた。しかし調査後の出来事を考えると、小児期の予後改善が本疾患のこれからの更なる改善を保障するものではないこと

を示している。

アスペルギルス肺炎は潜行性に発症進行することから、その早期発見と早期治療のために当科では年 2~3 回の CT 検査を定期的に行っているが、それでも発症を早期に発見することが出来ない場合もあり、進行すれば内科的治療さらには外科的治療も奏功しない場合も身近に再確認された。

抗菌薬の長期使用による腎障害により 2 名が血液透析を受けており、これらの治療による個人的な生活の質的障害あるいは社会的経済負担もおおきなものである。

これらの CGD の予後を悪くする諸要因が残されている現状と対比して、骨髄移植による根治療法のこれまでの経過はきわめて順調であった。

E. 結論

診断・治療法の進歩に伴い小児期の CGD の予後は著しく改善したが、思春期以後の本疾患の予後は楽観を許さず、その問題の解決には積極的な根治療法の推進が必要であり、そのためには骨髄移植の適応が得られない持続感染症例や臓器障害のある患者への移植に向けた補助療法の開発が必要である。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

Kobayashi S, Tatsuzawa O, et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. Euro J Paediatr. in press

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

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の適応に関する研究

分担研究者 布井博幸 宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野

研究要旨：慢性肉芽腫症に対する子治療は、近年種々の新しい薬剤の発達に関わらず、依然全身の難治性肉芽腫症や敗血症などに依然悩まされている。慢性肉芽腫症に対する骨髄移植は大きく進歩し、CY+Flu前処置によるミニ移植が導入され、成果もあげてきている。一方、ドイツのGrez博士らがBusulfanの前処置を施す遺伝子治療を行い、成功を収めたことで、日本でも骨髄移植ができない症例で、遺伝子治療を施行すべく成育医療センターを中心に研究班が立ち上げられた。今回我々はこれまでの日本における骨髄移植症例のまとめと主治医、患者および家族へのアンケート結果を元に、慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の適応について検討し、1) 感染病巣を鎮静できず、2) HLA一致骨髄ドナー（同胞・非血縁を問わない）が見つからず、3) 前処置のRISTにも危険が伴うと考えられる患者（表4）が遺伝子治療の対象になるのではないかと考えた。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症の登録は270名を超え、近年種々の治療法新しい抗生物質や抗真菌剤の登場、日常生活の手引きの発刊などもあり、患者さんの予後も改善してきている。慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療は1990年半ばより、前処置なしに試みられ、安全性について問題は提起されなかったが、効果については大きな成果をあげたとは言えずにいた。一方、慢性肉芽腫症に対する骨髄移植は2000年に入って、cyclophosphamide (CY) + fludarabine (Flu)前処置によるミニ移植(Reduced-Intensity Stem cell Transplantation: RIST)が導入され、大きく進歩した。骨髄移植の適応が広がる中、移植前処置にも耐えられない症例やHLA一致ドナーが見つからない症例に対して、ドイツのOtto, GrezらがBusulfan (BU) 8mg/Kgの前処置を施す遺伝子治療を開始し、脚光を

浴びることになった(1)。そこで、日本でも同様の患者に対する遺伝子治療を施行すべく基礎的分野から臨床分野までにわたるプロジェクトチームが倉辻成育医療センター長を中心に立ち上げられた。我々は主に、慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の適応について骨髄移植の適応の広がりや安全性について検討し、現段階における遺伝子治療の適応が有効性と安全性の点からどのようなべきかについて検討を行った。

B. 研究方法

1) 造血幹細胞移植症例登録：食細胞機能異常症研究会に登録された造血幹細胞移植症例34例について、主治医に移植経過および現状に関する調査票を送付したところ、32例について回答を得た。全症例とも、連結可能匿名化した後に解析を行った。解析はSeegerらの文献(2)に沿い、移植時点での活動性感染症や炎症の有無によって以下の3群(1群: 移

植時に難治性活動性感染を有していた群、2群: 移植時に活動性炎症や臓器障害を有していた群、3群: 移植時に明らかな感染症や炎症がなかった群)に分け解析した。また、2007年の現状調査時点で生存中の25例について、各主治医の先生に、慢性GVHDおよびKarnofsky scoreによるperformance status (PS) 評価を依頼した。

2) 担当医師を通じて、慢性肉芽腫症患者本人および家族に慢性肉芽腫症に対する骨髄移植と遺伝子治療に関するアンケートを配布してもらい、回答を得た。

(倫理面への配慮)

本研究は、前回と同様に宮崎大学医学部医の倫理委員会の承認を得て行った。症例の統計解析に当たっては、連結可能な匿名化を行った。

C. 研究結果

移植時患者状態からみた移植結果

移植時点での活動性感染症や炎症の有無による分類では、約2/3が1群で、反対に3群は約1/6であり、ほとんどが移植時に難治性活動性感染を有しておられ、これまでの骨髄移植は他の選択ない状態のものであったことがわかった(図1)。

移植症例の年齢分布

年齢的にも、15歳以下が22名、15歳以上が10名と小児が多く、死亡者はいずれも15歳以下の小児が多かった(図2)。

死亡例・拒絶例

死亡者の打ち明けでは、2名が拒絶、2名が重症感染症、1名が薬剤による臓器不全、1名が5年後の骨肉腫であった(表1)。

幹細胞ソースからみた移植結果

移植ドナーについては、骨髄移植が26例

で行われており、一番多かった。HLA一致骨髄ドナーであれば、同胞、非血縁ドナーでも結果に変わりなかったが、HLA不一致ドナーからの移植では6例中3例は生着したものの、2例死亡、1例拒絶という状況であった(図3)。

末梢血幹細胞および臍帯血造血幹細胞ドナーでは図4のように、まだ数も少なく、結果の解釈は出来ない状態である。

前処置法の推移(図5、表2)

移植前処置については、2001年からCY+Flu法が急速に増加してきていた。前処置の中で多かったBU+CY法およびCY+Flu法について検討したところ、BU+CY前処置(BU:16mg/kg、CY:160-240mg/kg)は、12例中8例成功、4例死亡され、生着までの期間は11~35日(平均19.6日)であった。DLI(Donor lymphocyte infusion)は1例で実施されていた。

CY+Flu前処置(CY:75-200mg/kg、Flu:100-200mg/m²)は、全例生着し、生着までの期間は6~24日(平均15.6日)と、BU+CYより短縮されていた。しかしCY+Flu前処置では、ドナー型への置換が完全には進まず、DLIが14例中7例で実施された。

キメリズム

初回移植が成功し、2007年に生存を確認した24例について、直近のキメリズムについて調査した。BU+CY前処置の8例は、1例にDLIが実施されているが、直近の解析では、いずれも完全ドナー型であった。

CY+Flu前処置の14例は、DLI実施7例、未実施7例であった。DLI実施7例中5例は完全ドナー型に置換されたが、2例は混合キメラ状態のままであった。直近の解析では11例が完全ドナー型、3例が混合キメラ(DLI未実施1例含む)であった。

CY前処置の1例とFlu+LPAM前処置の1例は、いずれも完全ドナー型であった。

予後 (図6)

調査時点で、全例移植後1年以上経過していた。慢性GVHDなしが19例、limited typeが5例、extensive typeが1例であった。よる performance status (PS) 評価は、21例が100%、2例が90%、各1例が80%と70%と回答されている。晩期障害に関しては、生殖能力や身長に関する報告がまだ得られていない。

主治医および患者、家族の回答

78施設80診療科の主治医と173名の患者および家族に対してのアンケート調査では、24施設(30%)の主治医から、また30名の患者(17%)から回答をいただいた。

主治医から、遺伝子治療の対象になると回答された患者は7名であった。ほか主治医からは、遺伝子治療についてはより詳細な比較研究が必要であるという意見や、もっと早期の段階で遺伝子治療の適応とすべき、という意見もみられた。

患者および家族の大半は、根治療法としての移植や遺伝子治療について、すでに説明を受けたり、自分で調べたりしていた。年齢の高い患者では、移植を避けるか、患者がよりリスクが低いと感じた治療(遺伝子治療)を希望する傾向にあった。

D. 考案

今回の調査では、治療抵抗性病変に対してやむを得ず実施された移植が大半であった。このため移植適応基準(時期・臓器障害など)を作るための比較検討が十分できていない。しかし、比較的安全と考えていた3群の5名中3名が死亡されていることから、

活動性感染症や炎症の有無と関わりなく、移植が危険であるかという疑問も湧いてくる。

このことに関しては慎重に考えなくてはならない。第3群の死亡例について検討してみると(表1)、末梢血幹細胞移植または臍帯血造血幹細胞移植が用いられた症例や、BU+CY法によるVOD、TMAなどの薬剤性臓器障害が原因と考えられた症例であった。活動性感染症や炎症が無い方がかえって危険なのではなく、移植前に何らかの潜在性の感染巣が残存していたのかもしれない。移植前にはPET-CT等による慎重な解析が必要だと考えている。

これまでの日本における骨髄移植結果から、表3の様な慢性肉芽腫症に対する骨髄移植ガイドラインを表3にしめた。1)移植前に可能な限り感染病巣を鎮静させ、2)ドナーはHLA一致ドナー(同胞・非血縁を問わない)を第1選択とし、3)前処置はRISTを選択する。また4)移植後の混合キメラ状態に対してはDLIを考慮するが、DLIを回避するためにはより骨髄抑制的な処置(例えばLPAM)を追加すべきとも考えた。

遺伝子治療については、骨髄移植などのより詳しい説明・周知をした上で、再度検討する必要がある。実際昨年末にGrez博士らから遺伝子治療を行った患者2名に汎血球減少症と骨髄低形成が認められ、患者で増殖したクローンはMDS/Evi1遺伝子近傍に使用したレトロウイルス遺伝子が導入されていた。患者骨髄細胞から染色体異常(Monosomy 7)が証明されており、前白血病状態になっているのではないかと報告されたが、まだ正式の論文などにはなっておらず、今後とも遺伝子治療の適応基準については十分な情報により、その安全性と有効性について注意を払う必要で

ある。

遺伝子治療の対象者(表4)は、1) 感染病巣が鎮静されておらず、2) HLA一致骨髄ドナー(同胞・非血縁を問わない)が見つからない、3) 前処置のRISTにも危険が伴う患者になるのではないかと考えている。

一部の患者では骨髄移植と遺伝子治療のどちらを選択すべきか選択できないケースもあると考えられるが、現場の先生、成育医療センターの遺伝子治療チームと患者さんとの話し合いが必要だと考えられる。

E. 結論

慢性肉芽腫症に対する骨髄移植症例の解析から、ガイドライン(案)を示した。このガイドラインに含まれない患者さんについて遺伝子治療の適応が考慮される。

すなわち、1) 感染病巣を鎮静されず、2) HLA一致骨髄ドナー(同胞・非血縁を問わない)が見つからず、3) 前処置のRISTにも危険が伴うと考えられる患者が遺伝子治療の対象になるのではないかと考えている。

一部の患者では骨髄移植と遺伝子治療のどちらを選択すべきか選択できないケースもあると考えられるが、関係者間での話し合いが必要である。

<図表の説明>

図1. 移植前の患者状態

図2. 移植患者年齢分布

図3. 移植結果(骨髄)

図4. 移植結果(骨髄以外)

図5. 移植前処置

図6. 現在の患者状態

表1. 移植後死亡症例の解析

表2. 前処置法による移植結果の解析

表3. CGD移植ガイドライン(案)

表4. 遺伝子治療対象の選択基準(案)

<参考文献>

- 1) Ott MG, et al., Nat Med. 12(4):401-9.2006
- 2) Seger RA, et al., Blood. 100(13):4344-50.2002

F. 健康危険情報

G. 文献と研究発表

1) 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

2) 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

3) Shigeo Uezono, et al., Outcome of ANCA-Associated primary Renal Vasculitis in Miyazaki Prefecture, INTERNAL MEDICINE 46 : 815-822, 2007

4) 高木 純一ら、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

5) 布井 博幸、慢性肉芽腫症一基礎と臨床一、臨床検査51 : 1059-1065, 2007

6) H.Nunoi, Chapter 11. Diseases with abnormal actin and actin-binding proteins in leukocyte and nonmuscle cells. Protein Reviews "Actin-Binding Proteins and Disease" ed by Crisdos Remedios and Deepak Chhabra. 2008 Springer Science 278-289.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

<2007年度論文>

図1

初回移植前の患者状態

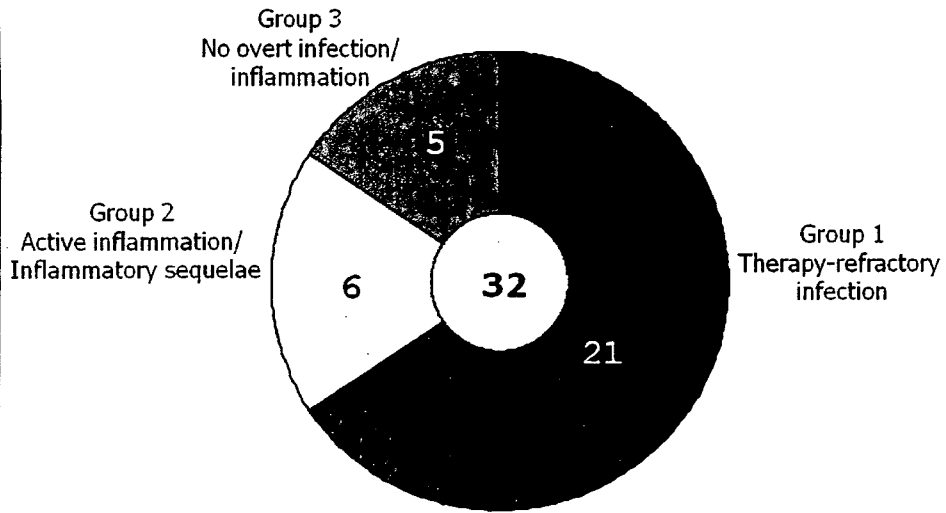


図2

移植患者の年齢分布

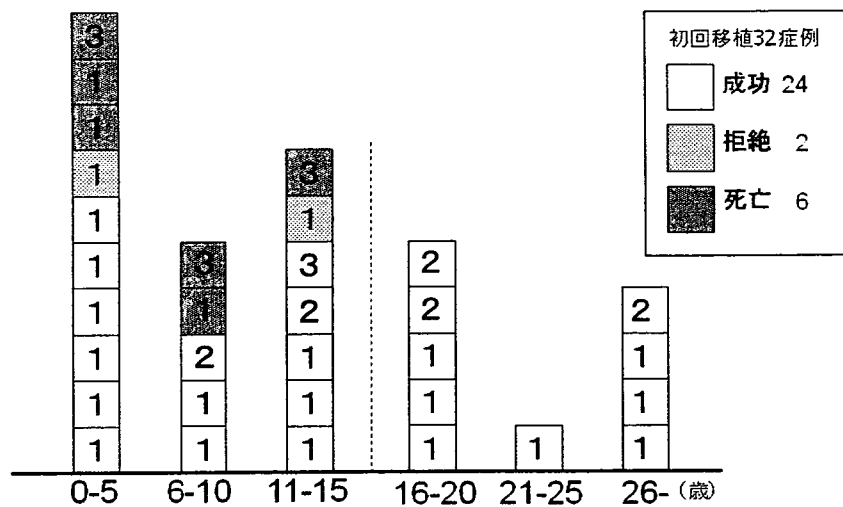
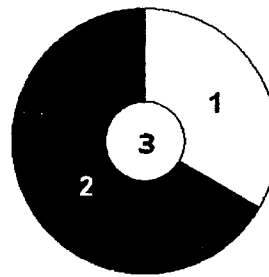
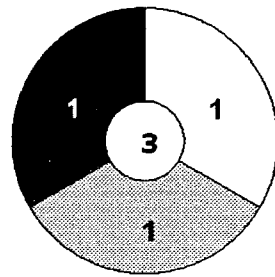


圖4

移植結果

PBSC

CBSC



□ 成功 ▨ 拒絕 ■ 死亡

圖5

移植前処置

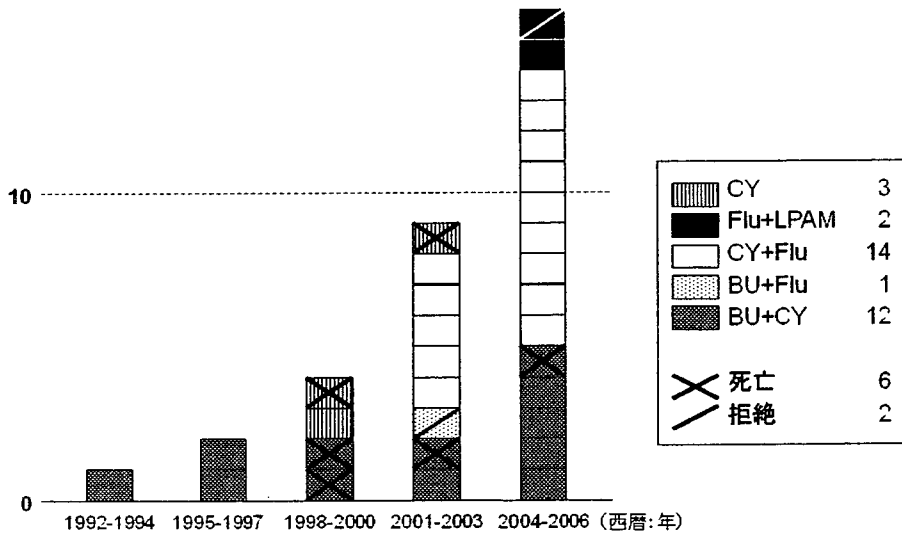


表1

死亡6例の解析

Pt	Age	risk	Donor	Conditioning	GVHD prophylaxis	Date of death	Cause of death	ref
09	8	1	Mismatched sibling BM	CY (TBI12Gy)	MTX CyA	+5 y	Osteosarcoma	
06	5	1	Mismatched sibling PBSC	BU CY VP16	MTX CyA	+77	aGVHD, TMA	
18	4	1	Mismatched mother BM	BU CY	MTX FK	+47	Non engraftment Fungal pneumonia	
32	11	3	Matched sibling BM	BU CY	MTX FK	+157	Interstitial pneumonia	
08	5	3	Matched sibling CBSC	BU CY	CyA	+22	Multiple organ failure	
05	8	3	Mismatched Unrelated CBSC	CY	MTX CyA	+52	Non engraftment Rupture of aneurysm	

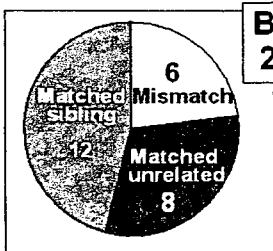
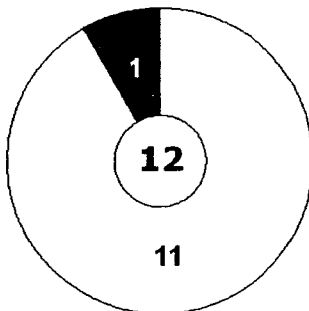


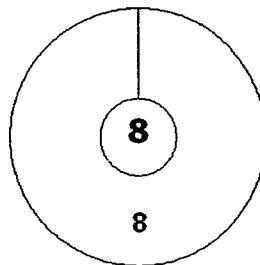
図3

移植結果(骨髄)

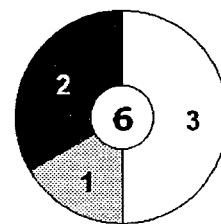
Matched sibling



Matched unrelated



Mismatched



□ 成功 ▨ 拒絶 ■ 死亡