

GEORG-SPEYER-HAUS
Institute for Biomedical Research

affiliated with the
Johann Wolfgang Goethe-University
Frankfurt am Main

Paul-Ehrlich-Str. 42-44
D-60596 Frankfurt am Main
Germany

Dr. Manuel Grez
Phone: +49 (69) 63395-113
FAX: +49 (69) 63395-297
E-mail: grez@em.uni-frankfurt.de

Frankfurt, 9.12.2007

┌ Georg-Speyer-Haus • P.O. Box 70 02 51 • D-60522 Frankfurt • ┐

Tadatoshi KURATSUJI, M.D.,Ph.D.
Director-General, Research Institute
National Center for Child Health & Development
2-10-1 Ookura, Setagaya-ku
Tokyo 157-8535

└ JAPAN ┘

Dear Prof. Kuratsuji,

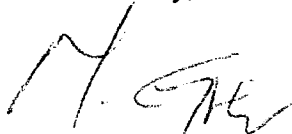
Please find enclosed my report on the two CGD patients treated in Frankfurt with gene therapy.

The report is confidential and intended only for your information. Therefore I would appreciate if you don't distribute the report without our approval.

I understand that you have to communicate our results to the Japanese authorities. For this purpose you may use our report if you wish.

I hope the report will be useful for you.

Sincerely,



Manuel Grez
Georg-Speyer-Haus
Frankfurt, Germany

厚生労働省への報告

日時：平成19年12月21日午前10:05-10:55

場所：厚生労働省雇用均等・児童家庭局 母子保健課

出席者：母子保健課 千村浩 課長、母子保健課 小林秀幸 課長補佐

大臣官房厚生科学課健康危機管理対策室 坂西義史 主査

国立成育医療センター：倉辻忠俊、藤本純一郎、岡田真由美

1. ドイツの臨床研究で起こった有害事象（染色体異常：モノソミー7）

本研究班が臨床研究に使用予定であったSF71gp91レトロウイルスベクターを使って遺伝子治療を受けたドイツの患者において有害事象が確認された。この件について記載されたドイツのGrez博士より送付された署名入り報告書を基に、有害事象に関わる検査結果の経過と患者の臨床経過について説明。SFベクターの使用に関しては、ベクター開発者のGrez博士（医師ではない）と医師であるThrasher博士（イギリス）、Ott博士（ドイツ）とは違う考えである。リスクとベネフィットのバランスで、1例ずつ遺伝子治療実施を検討するイギリスの例を紹介。イギリス、ドイツともに臨床研究は中止されておらず、新規の患者登録は継続している。

2. 米国との共同研究

これまで欧米で実施された慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の実績一覧表を基に、米国での研究の経過を説明。NIHのMalech博士のMFG-Sベクターを使った共同研究を申し込んだところ、多施設共同研究で行うことを提案されていることを報告。NIHと国立成育医療センターとの共同研究であれば、規制等について米国FDAの援助も得られ、国対国のレベルの話になる。

3. ウイルスの安全性

坂西技官より、ドイツの有害事象がSF71ベクター特有のものかレトロウイルスベクター全般の特徴によるものか質問。レトロウイルスであれば、宿主のゲノムのいろいろな場所に挿入され、しかも活性化しているがん遺伝子の近傍に入りやすいことがわかっている。しかし、特にSF71ベクターは、MDS1-Evi1近傍に挿入したクローンが増殖優位性を獲得して、良好な治療効果がみられたが、同時にMDS1-Evi1の活性化も見られた。MDS1-Evi1の活性化がモノソミー7を引き起こす機構は完全には解明されていないが、MDS1-Evi1の活性化により染色体が不安定になることが推測されている。ちなみに米国のMFG-Sベクターではベクターに関係した有害事象は起こっていない。将来的には、遺伝子治療は、レンチウイルス、SINベクターや遺伝子相同組換えの方向に進むだろうが、5-10年先のことである。

4. 今後の厚労科学研究班の研究計画について

SF71ベクターの使用は中止しなければいけないが、遺伝子治療臨床研究の実施申請前であるので、研究の中止ではなく研究計画の変更でよい。今年度の研究計画書の変更申請と継続申請書（提出済未審査）の書き換えを至急行う。

以上

慢性肉芽腫症における造血幹細胞を標的とする
遺伝子治療臨床研究

国立成育医療センター

1 研究の名称

慢性肉芽腫症における造血幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究

2 研究者の氏名及び担当する役割

2-1 総括責任者の氏名及びその担当する役割

倉辻 忠俊

国立成育医療センター研究所長

遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、実施計画書の作成及び実施施設長への提出、遺伝子治療臨床研究実施の適正実施の確認、遺伝子治療臨床研究の進行状況及び研究結果の実実施施設長及び審査委員会への報告

2-2 副総括責任者の氏名及びその担当する役割

奥山 虎之

国立成育医療センター病院 臨床検査部長

総括責任者の補佐、遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、患者の選定基準の作成、遺伝カウンセリング

2-3 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

氏名	所属	役職	役割分担
藤本 純一郎	国立成育医療センター 研究所	研究所副所長	遺伝子治療臨床研究に使用する機器の整備
立澤 幸	国立成育医療センター 病院	膠原病・感染症 科医長	遺伝子治療臨床研究に必要な病棟体制の整備、対象患者の選定、患者の診療
小林 信一	国立成育医療センター 病院	膠原病・感染症 科医員	遺伝子治療臨床研究に必要な病棟体制の整備、患者の診療
熊谷 昌明	国立成育医療センター 病院	血液科医長	患者骨髄細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与
森 鉄也	国立成育医療センター 病院	小児腫瘍科医長	患者骨髄細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与
岡田 真由美	国立成育医療センター 病院	遺伝診療科 レジデント	遺伝子治療臨床研究の実施、遺伝子導入細胞のクロナリティーの解析
清河 信敬	国立成育医療センター 研究所	研究所部長	遺伝子導入に関する予備実験の実施
緒方 勤	国立成育医療センター 研究所	研究所部長	遺伝子導入細胞の解析、遺伝子導入効率及び遺伝子挿入部位の検討
梨井 康	国立成育医療センター 研究所	研究所室長	遺伝子導入細胞の解析、遺伝子導入効率及び遺伝子挿入部位の検討
掛江 直子	国立成育医療センター 研究所	研究所室長	遺伝子治療臨床研究の倫理性と個人情報保護の管理及び評価の実施
加藤俊一	東海大学	教授	患者の選定
布井 博幸	宮崎大学	教授	患者の選定、免疫学検査の管理と指導
有賀 正	北海道大学	教授	患者の選定
久米 晃啓	自治医科大学	准教授	遺伝子治療後の検査体制の確立
小野寺 雅史	筑波大学	講師	ウイルスベクター全般に関する情報の収集及び安全管理
大津 真	東京大学医科学研究所	助教	遺伝子治療臨床研究の実施、高効率遺伝子導入法の確立

2-4 研究協力者

本臨床研究実施計画を立案するにあたり、過去に同様の遺伝子治療をおこなった、ドイツ Georg-Speyer-Haus 生物医学研究所の Manuel Grez 博士、スイスチューリッヒ大学小児病院の Reinhard Seger 博士、イギリス小児保健研究所の Adrian J. Thrasher 博士より多くの有益な情報を得た。

3 遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在地

名称：国立成育医療センター 病院及び研究所
所在地：東京都世田谷区大蔵 2-10-1 〒157-8535
電話：03-3416-0181 FAX: 03-3416-2222

4 遺伝子治療臨床研究の目的

慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease; CGD）は、生命を脅かす感染症をくりかえす先天性免疫不全症候群のひとつである。これまでに確立された根治治療として、HLA の一致する血縁骨髄ドナーなどによる血液幹細胞移植がある。しかしながら、HLA 一致ドナーが存在しない患者や、ドナーの候補者が存在しても骨髄移植のための前処置に耐えることができない難治性感染症に罹患している患者に対する根治療法は確立していない。

本臨床研究の目的は、gp91^{phox}欠損によるX連鎖慢性肉芽腫症（X-CGD）に対する根治療法としての造血幹細胞遺伝子治療の安全性と有効性を検証することである。

本臨床研究では、食細胞のNADPHオキシダーゼ酵素複合体を構成する蛋白質のうちgp91^{phox}遺伝子を欠損するX-CGDを対象とする。欠損遺伝子の修復を行う標的細胞

として、患者自家骨髄造血幹細胞を用いる。対象患者の骨髄血を採取し、抗CD34抗体を利用して、造血幹細胞のマーカーのひとつとされるCD34細胞膜表面抗原を発現している造血幹細胞を精製し、標的細胞として使用する。得られた患者の骨髄CD34陽性細胞に対して、自己複製能を欠いたレトロウイルスベクターSF71gp91^{phox}を用いて、無血清の条件下で遺伝子導入を行う。本臨床研究では、遺伝子導入細胞の投与前に移植細胞の生着改善のため前処置（ブスルファン投与）を行った後、適量の遺伝子導入細胞を患者に投与する。遺伝子導入細胞の一部は、遺伝子導入効率や自己複製可能型レトロウイルス（replication competent retrovirus ; RCR）発生の有無について評価するために使用する。遺伝子導入細胞の投与後、患者末梢血中の好中球におけるgp91^{phox}の発現の程度、好中球の活性酸素産生能、臨床症状の変化などを長期にわたり注意深く観察することによって、遺伝子治療の安全性と有効性について検証する。

5 対象疾患及び対象疾患として選定した理由

5-1 対象疾患

対象疾患は、X連鎖慢性肉芽腫症とする。

5-2 対象疾患に関する現時点での知見

5-2-1 CGDの病因と頻度

CGDは、乳幼児期より重症な細菌及び真菌感染症に反復して罹患し、諸臓器に肉芽腫を形成する先天性免疫不全症候群の一疾患である。好中球をはじめとする食細胞は、活性酸素種（O₂⁻、H₂O₂、HClO⁻など）を産生し、体外から侵入してきた細菌や異物を殺菌する機構を有している。この活性酸素産生を担う主要な分子がNADPH オキシダーゼ酵素複合体である。本酵素は細胞膜上のgp91^{phox}、p22^{phox}のヘテロ2量体と、細胞質内のp67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}、Rac p21 から構成される。

CGDではこれらのうちgp91^{phox}、p22^{phox}、p67^{phox}、p47^{phox}の4分子のうちいずれかの蛋白質が先天的に欠損しているため、活性酸素を産生できず、体内に侵入した微生物を殺菌することができない。とくにブドウ球菌、クレブシエラ菌、大腸菌、カンジダ、アスペルギルスなどの過酸化水素非産生・カタラーゼ陽性菌を殺菌することができず、

乳児期より全身性難治性感染症を反復し、しばしば致命的となる。

わが国の先天性免疫不全症の患者数は、CGD が最も多く約 18%を占める（平成 18 年度厚生労働省原発性免疫不全症候群研究班）。CGD の発症頻度は 22.5 万出生に 1 人程度であり、国内では 2006 年 12 月現在、200 家系以上、270 名以上が登録されている。男女比はおよそ 6.9:1 で、国内の分布には地域による偏りはない。

日本人の病型別の患者割合を見ると X連鎖劣性遺伝の gp91^{phox}欠損型（X-CGD）が 79.7%と最も頻度が高く、常染色体劣性遺伝の 3 病型は、p22^{phox}欠損型（8.3%）、p67^{phox}欠損型（6.3%）、p47^{phox}欠損型（5.7%）で、諸外国に比べ p47^{phox}欠損型が少ない。

病型の違いによって重症度が異なることが報告されており、米国では gp91^{phox}欠損型が常染色体劣性遺伝型に比べて死亡率が高かった（1）。国内でも gp91^{phox}欠損型の重症度が高い傾向にある。

gp91^{phox}欠損型は X連鎖劣性遺伝のため患者の大部分は男性である。多くはその母親がヘテロ接合体の保因者であるが、両親とも変異を持たず子に新規変異が生じる場合もある。保因者の末梢血食細胞は、正常食細胞と異常食細胞が混在するモザイクを呈するが、Lyon効果の程度により正常食細胞と異常食細胞の割合に個人差がある。保因者であっても、正常食細胞が全体の 5%以上存在すれば、感染症に罹患しても重症にはなりにくいことが明らかにされている（2）。

これまでに行われた国内の X-CGD の遺伝子変異の解析結果を見てみると、ナンセンス変異 24 例、ミスセンス変異 12 例、スプライス部位変異 17 例、欠失 10 例、挿入 7 例であった。特に変異が集積するホットスポットは存在せず、変異は翻訳領域全体に散在している。同一変異であっても、他の遺伝要因や生活環境などの影響により、重症度が異なる。

5-2-2 慢性肉芽腫症の症状と経過

症状は、乳児期より繰り返す全身諸臓器の難治性細菌・真菌感染症を特徴とする。化膿性皮膚炎、リンパ節炎、肺炎、中耳炎、肛門周囲膿瘍などがよく見られ、感染症が重症・遷延化して、抗生物質や抗真菌剤の多剤併用や長期入院が必要になることが多い。肺の真菌感染症、とくにアスペルギルス感染症は頻度も高く、強力な抗真菌剤を用いても無効なことが多く致命的になりやすい。時に 10 歳を越えてから肝膿瘍な

どではじめて見つかる場合もある。

第二の特徴は、諸臓器に形成される肉芽腫性病変である。肺や消化管、肝臓などに多く見られ、ときに頭蓋内にも見られる。肉芽腫形成の機序は解明されていないが、貪食した菌を処理できない単球が活性化状態を持続して多種のサイトカインを放出し、炎症細胞を集結させる結果と考えられている。肉芽腫性病変は薬物に反応しにくく、外科的切除の対象になることも多い。消化管に肉芽腫を形成すると通過障害を起こしやすい。またクローン病様の症状を呈する場合、腸管生検で粘膜下組織に非乾酪性肉芽腫を伴う CGD 腸炎を併発している場合がある。

CGDの特殊型としてMcLeod症候群を合併する例がある。gp91^{phox}遺伝子と隣接遺伝子のXKやRP3を共に欠失し、有棘赤血球症や網膜色素変性を合併する。

X-CGD 患者に抗生物質の予防投与を行わない場合、患者一人あたりの重症感染症の年間発症回数は平均2回である(3)。CGD患者の死因は、敗血症やアスペルギルス感染症が多く、これまで国内の患者の多くは30歳までに死亡していた(4)。最近、新たな抗生物質や抗真菌剤の登場などにより、30歳を越えて生存する患者が増加してきている。

5-2-3 従来の治療の限界と遺伝子治療の必要性

CGD の治療の基本は感染症対策である。すなわち抗生物質と抗真菌剤の投与を、感染症罹患時には対症療法として、罹患していない時には予防投薬として行う。一旦感染症に罹患すると、重症化、長期化しやすく難治性であり、多剤併用や長期入院を要する場合が多い。最近新世代の抗生物質や効力の強い抗真菌剤（ミカファンギン、ボリコナゾールなど）の新薬が登場し、従来は治療困難であった感染症が軽快する場合も増えてきた。しかし重症例では薬剤効果が及ばないことが多く、しばしば治療に困難をきたす。予防投薬として用いられるトリメトプリム/スルファメトキサゾール及びイトラコナゾール内服によって、感染症の年間発症回数は患者一人あたり 0.43 回ないし 1.2 回まで減少すると報告されている(5、6)。

抗菌剤治療に次ぐ二番目の治療法としてインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) の投与がある。IFN- γ は、約3分の1の症例で重症感染症に対する予防効果があり(6、7)、国内患者の約4割に投与されている。

以上のように、抗菌剤や IFN- γ の投与によって一定の予防効果は得られているが、

重症感染症や合併症による年間死亡率は2~5% (米国、1) とされ、国内でも毎年死亡例がある。したがって、対症療法と予防療法だけでは限界があり、根治療法の確立が急務とされてきた。

CGD は、造血幹細胞から分化した食細胞の異常が原因であるから、造血幹細胞移植によって完治が可能である。1968年に重症複合型免疫不全症に対する骨髄移植が成功して以来、CGD を含む先天性免疫不全症に対する根治療法として造血幹細胞移植が行われ、多くの知見が得られてきた。以前は HLA 一致血縁者間移植でも生着率が低く、成績不良であったが、最近では骨髄非破壊的前処置の導入や、移植後管理技術の進歩などにより成功率が改善し、症例数も増加している。造血幹細胞移植は、これまでに確立した CGD の唯一の根治療法である。

スイスの Seger らの報告 (8) によると、欧州の造血幹細胞移植 27 症例のうち、HLA 一致同胞からの移植が 25 例、骨髄幹細胞移植が 24 例であった。大半はブスルファン (Bu)、シクロフォスファミド (Cy) による前処置を行い、27 例中 23 例が生存、4 例が死亡した。また移植時点での活動性感染症を有していた群では、より危険度が高かった。

米国で行われた 10 例の骨髄非破壊的末梢血幹細胞移植 (9) では、Cy、フルダラビン (Flu)、抗胸腺細胞グロブリン (ATG) による前処置後、HLA 一致同胞の T 細胞を除去した末梢血幹細胞を移植した。その結果、10 例中 6 例に生着し、1 例が生着不全 (生存、自己骨髄再構築)、3 例が死亡した (生着不全 1 例、移植合併症 2 例)。

2007年3月現在までに、国内で移植を実施された患者は34症例で、生存例が27例、死亡例が7例であり、移植後の生存率は約8割である。ドナーの種類別の成績は、HLA 一致同胞骨髄と HLA 一致非血縁骨髄とでは、ともに成績良好で差はなかったが、臍帯血移植は4例中2例が死亡している。前処置法は Bu+Cy または Cy+Flu で全体の約7割を占めていた。Bu+Cy 法では、生着までの期間が長く、感染などの合併症に罹患する機会が多くなる。Cy+Flu 法は、生着までの期間が短い、移植後に混合キメラ状態が持続し、徐々にドナー細胞が減少する症例が多く見られ、ドナーリンパ球輸注を行った場合に重度の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) を発症する症例もある。したがって、Bu+Cy 法・Cy+Flu 法ともに残された課題は多い。国内の移植の結果でも、Seger らと同様に、移植時点で活動性感染症を有していた群に比較的死亡例が多く、移植時の活動性感染症は危険因子と考えられる。HLA 不一致ドナーか

らの移植は、生着不全例や拒絶例が見られ、成績良好とは言えない。CGD では、患者により過去の臨床経過、感染症の重症度、治療反応性の差が大きいため、これまで移植適応基準の確立が容易でなかった。34 例の経験をふまえた新たなプロトコールが検討されているところである。

造血幹細胞移植は、現段階において国内で施行可能な唯一の根治療法ではあるが、移植時の難治性感染症の有無、前処置法の選択、移植後の合併症などが転帰を左右する。HLA 適合ドナーがいない患者やドナーがいても前処置の骨髄抑制に耐えられない患者にとっては、治療を受ける機会がないため、造血幹細胞移植以外の安全かつ有効な根治療法の確立が望まれている。

これに対し遺伝子治療は、患者自身の骨髄または末梢血造血幹細胞に治療遺伝子を導入して患者本人に投与するものであるから、ドナーを必要とせず、GVHD 発症の危険もない。ただし、CGD のように治療用遺伝子が増殖優位性を持たない疾患では、移植細胞が増殖できる空間を作るために、何らかの前処置が必要と考えられる。一方、T細胞の分化増殖障害に基づく重症複合免疫不全症の遺伝子治療では前処置は不要である。(国内での基礎的実験及び国外での遺伝子治療臨床研究の結果については、添付書類三-3 を参照)。本臨床研究で計画している骨髄抑制前処置は、同種造血幹細胞移植の骨髄破壊的前処置と比較して Bu の使用量も少ないため、薬剤の副作用も軽度で、移植後の免疫抑制期間も短いため感染症併発の危険性が低いと考えられる。

2003 年より、ドイツの Grez 博士らが行った遺伝子治療臨床研究では、難治性感染症があり骨髄移植のドナーがいない 2 例の X-CGD 患者に対して、Bu 8mg/kg の前処置を行った。前処置による骨髄抑制で好中球数が 500 個/ μ L 以下となった期間は、10 日間と 6 日間であった。遺伝子治療後に、機能を回復した活性酸素産生好中球が、好中球全体の 10~57% 検出され、ブドウ球菌による肝膿瘍や肺アスペルギルス症が軽快したと報告されている (10)。また、スイスにおいて、Grez らと同じレトロウイルスベクターを用いて行われた遺伝子治療を受けた患者は、治療によって感染症が軽快するとともに、脊椎を圧迫していた肉芽腫が縮小した。その結果、対麻痺が軽快して歩行可能になった (Seger 博士との私信及び学会発表)。さらに、2006 年末から 2007 年にかけて、米国 Malech 博士らと韓国の Kim 博士らのグループも、Bu による前処置を行う遺伝子治療臨床研究を開始している。米国の研究では、Bu 10mg/kg を使用した。治療 2 週間後の活性酸素産生末梢血好中球は 24% であったが、治療後 6 か月後 (2007 年 5 月末現在) には 1.12% まで減少したが、臨床的には、ブドウ球菌による肝膿瘍が縮小

し、治療効果がでている（第 10 回米国遺伝子治療学会報告）。

遺伝子治療は、同種造血幹細胞移植と異なり、移植後の免疫抑制剤投与が不要である。また、骨髄抑制期間が短く、移植関連合併症を軽減できる点においても患者利益が多い。難治性感染症や HLA 一致ドナー不在などの理由で移植が困難と考えられる CGD 患者は少なからずいるが、遺伝子治療はこれらの患者にも治療適応が拡大できる可能性がある。本疾患の遺伝子治療で得られる知見は、他の遺伝性疾患の治療研究にも応用可能であり、将来の他遺伝子治療の実施やその改良、安全性確立などにおいて重要な礎石になると考えられる。

5-3 従来の方法からの改良点

本臨床研究では、①遺伝子導入効率を高めたレトロウイルスベクターの採用、②骨髄造血幹細胞への導入、③遺伝子導入プロトコールの改変、④添加サイトカイン内容の改変、⑤新たに開発されたCO₂透過性バッグの採用、⑥ブスルファン（Bu）を用いた骨髄抑制前処置の採用などの改良を行った。

血液幹細胞への遺伝子導入効率を高めるために改良されたレトロウイルスベクター SF71 gp91^{phox} は、gibbon ape leukemia virus (GALV) 由来のエンベロープ蛋白質 (*env*) を発現する PG13 細胞を用いて産生されている。PG13 細胞は、NIH3T3 細胞を基にして作られたパッケージング細胞である。骨髄細胞は GALV Env の受容体である Pit-1 を多く発現しているとされ、造血幹細胞への感染効率の改善が期待される。また、PG13 細胞には、*env* 遺伝子と構造蛋白質遺伝子 (*gag*) -逆転写酵素遺伝子 (*pol*) が別々のプラスミドで導入されており、ベクター産生の過程において細胞間で感染したり増幅したりしないと考えられ、RCR 産生の可能性は低い。

これまで海外で実施された CGD に対する遺伝子治療では、それぞれの施設で実施可能な細胞採取法を取ってきたため、G-CSF で動員した末梢血幹細胞が遺伝子導入標的細胞として使用されてきた。海外でのアデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase; ADA) 欠損症の遺伝子治療臨床研究でも、初期には末梢血リンパ球が使用された。2000 年頃より、ADA 欠損症と X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID) において自家骨髄造血幹細胞を使用した遺伝子治療臨床研究が行われ、その有効性が示された (11, 12)。2002 年に日本で行われた ADA 欠損症に対する遺伝子治療でも骨髄造血幹細胞が使用されたが、安全に施行され、有効性

も確認されている（学会報告）。本臨床研究でも増殖・分化能が強い未熟な造血幹細胞への遺伝子導入を目指し、患者本人の骨髓血を採取して CD34 陽性細胞を分離し、これに遺伝子導入を行うものとする。

遺伝子導入には、組換えヒトフィブロネクチンCH-296 (RetroNectin®; タカラバイオ) を固相化したCO₂透過性バッグCultiLife Spin (タカラバイオ) にウイルス上清を加え、標的細胞のCD34 陽性細胞に感染させる。細胞培養液は、ヒトアルブミンを添加 (1%) した無血清培地X-VIVO10 (Lonza社) を用いる。細胞培養液に添加するサイトカインは、これまでの基礎実験の結果に基づき、CD34 陽性細胞の分化を抑制し、かつ細胞増殖を促すと考えられるSCF、Flt-3L、TPO、IL-6、sIL-6 Rを使用する。

本臨床研究では、生体内で遺伝子導入細胞が非遺伝子導入細胞に伍して増殖できるように、遺伝子導入細胞が生着する空間を確保するため、Bu による骨髓抑制前処置を行う。遺伝子導入細胞を骨髓に生着させるために骨髓抑制が有用という知見は、動物実験及びヒトへの臨床研究で得られている。イヌの実験において、前処置を行わなかった群では、遺伝子導入細胞の生着が見られなかったが、少量の Cy 投与によって骨髓を抑制した群では、遺伝子導入細胞の生着が確認された (13)。また、Malech らはマウスにおいて、放射線全身照射なしでは多数の細胞を移植しても生着せず、照射線量と移植細胞数に依存して生着率が改善することを明らかにしている (14)。ヒト CGD に対する遺伝子治療では、イギリスの Thrasher らがメルファランで前処置を行った (私信)。ドイツの Grez らは Bu で前処置を行い、1年以上の長期にわたって末梢血中に活性酸素を産生する好中球が観察され、臨床症状の改善も見られている (10)。

5-4 他の治療法との比較及び遺伝子治療臨床研究を実施する適応があると判断した理由

CGDは重症細菌・真菌感染症を反復し、青年期までに多くが死亡する予後不良な疾患である。一部軽症の経過をたどる患者も存在するが、とくにgp91^{phox}欠損型患者の大半は重症感染症を反復しやすいため早期に根治療法を実施することが望ましい。

これまでに強力な抗生物質や抗真菌剤の新薬が市販されたが、本疾患で見られる感染症の多くはこれらの治療薬を用いても治療困難である。IFN- γ や顆粒球輸血の効果も限定的である。現在までに確立された根治療法は造血幹細胞移植のみであるが、移植関連死亡の頻度は高く、現在でも 2 割程度である。また生存例でも移植合併症や

GVHD などの治療に難渋することも少なくない。移植時点で難治性感染症を有する場合や腎機能・肺機能障害などを伴う場合は、さらに同種造血幹細胞移植のリスクは高く、適応となりにくい。

遺伝子治療は、前処置に使用する薬剤量が少ないため、①造血能回復までの日数短縮が可能であること、②移植後の免疫抑制期間が短いこと、③晩期副作用の軽減が可能であること、さらに本人の造血幹細胞を用いるため、④GVHD の危険性がないなど多くの利点を持つ。このため、遺伝子治療は、同種造血幹細胞移植の実施が困難な患者に対しても、実施可能な治療法である。

以上をふまえて、次のような理由で CGD は遺伝子治療を実施する適応があると判断した。

- (1) CGD は単一遺伝子疾患であり、その病態が分子レベルでよく解明されている。
- (2) 現時点において確立されている根治療法である造血幹細胞移植は危険性が高い。
- (3) 遺伝子導入により機能を回復した食細胞の割合が低くても、末梢血で 5%以上あれば、重症感染症を回避可能であり、治療効果が見込まれる。
- (4) 遺伝子導入標的細胞の骨髓造血幹細胞採取は、手技的に確立されている。

これまでの基礎的研究による遺伝子導入効率の向上やベクター自体の改良などにより、遺伝子導入と治療効果に関する問題点は改善され、実際にドイツやスイスの症例で臨床的な有効性が報告されている (10)。一方、フランスでの X-SCID に対する遺伝子治療後に白血病が発症した例もある (15)。X-CGD と X-SCID は疾患が異なるため、同様の事象が同程度の頻度で起こりうるとは言えないが、後述する遺伝子治療後の遺伝子挿入部位の確認やクロナリティーの確認、定期的な血液検査などによって、モニタリングを実施していく必要がある。

以上のような見地から、本治療の適応がある患者に対する遺伝子治療は、利益と不利益の均衡を考慮しても早急に臨床応用が確立される必要のある治療法と考えられ、本遺伝子治療臨床研究の実施は妥当性があるものと判断した。

6 遺伝子の種類及び遺伝子導入方法

6-1 ベクターの構造と性質

6-1-1 野生型ウイルスの生物学的特長及びヒトに対する影響

本臨床研究において患者細胞に治療用遺伝子を導入するために用いられるベクターは、レトロウイルス科 (retroviridae) 単純型レトロウイルスに分類されるガンマレトロウイルス属 (gammaretoviruses) のウイルスを改変した組換えレトロウイルスである。ガンマレトロウイルスのゲノムは一本鎖 (+鎖) RNA で、両端に繰り返し配列 (long terminal repeat; LTR) があり、その間に 5'側からリーダー配列と構造蛋白質遺伝子 (*gag-pol-env*) が並んでいる。C型ウイルスのコア粒子は、Gag 蛋白質が作る正 20 面体構造の中にゲノム RNA と逆転写酵素 (Pol 蛋白質) を含むヌクレオカプシドである。さらにその外側を Env 蛋白質と脂質からなるエンベロープが包み、総体として直径約 100nm の球状ウイルスを形成する (16)。

細胞へのウイルス感染は、ウイルス粒子上の Env 蛋白質が細胞膜表面に存在する受容体分子に結合し、ウイルスエンベロープと細胞膜が融合することから始まる。感染によってウイルスが細胞内に取り込まれると、ウイルス粒子の内容物 (ウイルスゲノム RNA・逆転写酵素など) が放出される。ウイルスの RNA ゲノムは逆転写酵素により DNA に変換され、その両端にある LTR 配列を介して宿主細胞染色体に組み込まれる。組み込まれたウイルスゲノムをプロウイルスと呼ぶ。プロウイルス DNA 上にコードされる遺伝子情報は宿主細胞の転写機構を使って RNA となり、その一部は新たなウイルスのゲノムとして利用される。それ以外の RNA はメッセンジャー RNA (mRNA) として働き、宿主細胞の翻訳機構を使ってウイルス蛋白質が合成される。複製されたゲノム RNA 及びウイルス蛋白質からウイルス粒子が再構成され、宿主細胞より放出される。放出されたウイルスはさらに別の細胞に感染し、同じ生活環を繰り返す (16)。

本臨床研究で使用するベクターは、ゲノムの LTR に spleen focus forming virus (SFFV) に由来する配列を、また構造蛋白質として Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来の Gag・Pol と gibbon ape leukemia virus (GALV) 由来の Env をもつ (10)。野生型の SFFV・MoMLV・GALV は発癌にかかわる遺伝子を持たないが、長期感染によって自然宿主 (SFFV・MoMLV はマウス、GALV はサル) に血球増多症や白血病を起こし得ることが知られている。ただし、これらのウイルスが、ヒトに感染して発病した

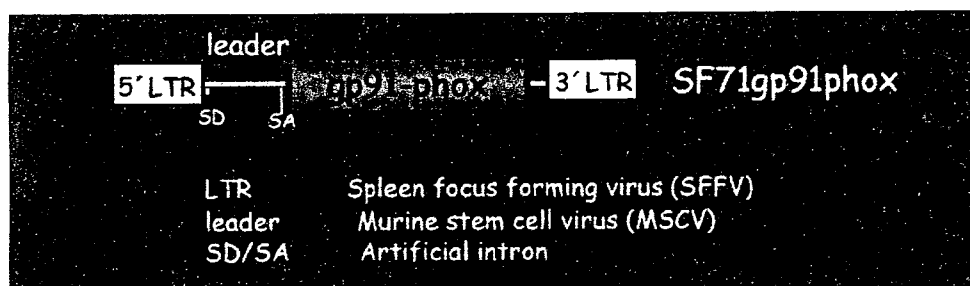
事例は報告されていない (17)。

6-1-2 ベクターの構造

本臨床研究で用いるレトロウイルスベクターSF71gp91^{phox} (10) は、SFFVのLTRを有する組換えレトロウイルスゲノム骨格SF71 (18) に、ヒトgp91^{phox} cDNAの翻訳領域全長、開始コドンから終止コドンまで 1,713 塩基 (19) を組み込んだものである。治療用遺伝子 (CYBB) のみをコードし、低親和性神経成長因子受容体遺伝子 (LNGFR) やネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*^R)、多剤耐性遺伝子 (*MDR1*) など選択に使用される遺伝子は含まない (図 1)。

SF71 は、SFFVのLTRと、頻用される組換えレトロウイルスベクターの一つである murine stem cell virus (MSCV, 20) のリーダー領域を改変した 5'非翻訳領域から構成されている (18)。SFFV LTRは、骨髄球系細胞において発現の高いエンハンサー・プロモーターを有する (21)。リーダー配列は、MSCVのパッケージングシグナルとスプライシング供与部位 (SD) を保持しているが、RCRの発生を抑えるために *gag-pol* 遺伝子の配列を全て除去してある。この除去操作に伴って失われたスプライシング受容部位 (SA) を補うため、人工的なSAを付加してある。このSD-SA、すなわち人工的イントロンを置くことにより、プロウイルスDNAからの転写産物の一部は他の mRNAと同様のプロセッシングを受けて (サブゲノムRNAと呼ばれる) 核外輸送経路にのるため、gp91^{phox} 遺伝子の発現効率が上がる。プロセッシングを受けないRNA (ゲノムRNA) からもgp91^{phox}が翻訳される。

(図 1 SF71gp91^{phox}のウイルス構造)



6-1-3 ベクターの性質

組換えレトロウイルスベクターはウイルス構造蛋白質遺伝子を持たないため、感染性のあるウイルス粒子を得るためには、Gag・Pol・Env蛋白質を発現している細胞 (パ

パッケージング細胞) を別に用意する必要がある。本研究で用いるPG13 パッケージング細胞は、マウスNIH3T3 線維芽細胞に、MoMLV由来Gag・Pol発現プラスミドとGALV由来Env発現プラスミドを組み込んで樹立した細胞株で、いわゆるスプリット・タイプのパッケージング細胞である(22)。この細胞にSF71gp91^{phox}のプラスミドDNAをトランスフェクトすると、その転写産物がゲノムRNAとして構造蛋白質が作る粒子に取り込まれ、感染性のある組換えウイルスができる。ベクタープラスミドがパッケージング細胞の染色体に組み込まれると、恒常的に目的の組換えウイルスを産生するようになり、本研究で用いるSF71gp91^{phox}ベクターも、このようにして樹立したウイルス産生株から得たものである。

ウイルスがどのような細胞に感染できるか、すなわち宿主細胞のスペクトルは、ウイルス Env 蛋白質が結合できる受容体分子が細胞表面に存在するか否かで決まり、その存在量が感染効率を左右する。従来の造血幹細胞遺伝子治療臨床研究で頻用されてきたアンフォトロピック型 MoMLV の Env を持つ PA317 パッケージング細胞を用いてウイルスが作られた場合、標的となる CD34 陽性細胞表面での受容体分子(リン酸トランスポーター; Pit-2) の発現レベルが低く(23)、感染効率が上がらなかった(24)が、GALV の Env を持つパッケージング細胞を用いると、造血系細胞では、GALV Env の受容体分子(リン酸トランスポーター; Pit-1) の発現レベルが Pit-2 より高いため、感染効率が高くなったという報告がある(23)。

上述のように、組換えウイルスはゲノム中にウイルス構造蛋白質遺伝子をもたないので、感染細胞内で新たなウイルス粒子を作ることができない。このようなウイルスを複製不能型ウイルスと呼ぶ。これに対し、野生型ウイルスのような RCR が生じた場合、長期感染によって腫瘍発生などの有害事象が起こりうる(25)。従って、RCR 発生の予防対策は安全上必須であり、本臨床研究で用いるベクターにおいても下記のような対策が講じられている。

RCR の発生メカニズムとして考えられるのは、ベクター作製過程においてパッケージング細胞内で遺伝子組換えが起こり、*gag・pol・env* 遺伝子がベクターゲノム上に並ぶ場合である。しかし、PG13 細胞に組み込まれた *gag-pol* 遺伝子と *env* 遺伝子は別々のプラスミドにコードされているため(スプリット・タイプ)、このような事象が起こるには最低3回の組換えが必要であり、その確率は極めて小さい。SF71 ベクターゲノムからは *gag・pol・env* 遺伝子の配列が全て除かれており、リーダー配列も MSCV 由来で MoMLV との相同性が低いため、ベクターゲノムと *gag・pol・env* 遺伝子の組換え自体が極めて起こりにくい構造である。たとえ RCR が発生したとしても、GALV Env をもつウイルスはマウスの細胞に感染できないため、培養中にウイルス産生細胞間で RCR が伝播・増幅されにくい。ウイルス産生細胞やその培養上清については定

期的に、臨床グレードのウイルス標品については全ロットについて、RCR 混入の有無を厳重にチェックしている。万一検査をすり抜けて RCR が被験者に注射された場合でも、マウス由来のパッケージング細胞で作られたウイルスは、ヒト血中の補体で速やかに不活化されるため、*in vivo* 感染は起こらない。

SFFV 及び GALV は、わが国の「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」第三条の表第二号(クラス 2)に登録されている。PG13 細胞は、米国の食品医薬品局 (FDA) に臨床試験用として、ドイツの生物学的安全性中央委員会 (ZKBS) にも遺伝子工学用として承認されており、これを用いた遺伝子治療臨床試験は日本 (北海道大学)・米国・英国・ドイツ・スイス・韓国等において実施されており、重篤な有害事象は報告されていない。

6-2 導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性

ヒト gp91^{phox} 遺伝子は、X染色体短腕 (Xp21.1) に位置し、ゲノム上のサイズは、およそ 33.5kb である (GenBank NM000397)。この蛋白質は 569 個のアミノ酸残基からなる分子量約 91kDa の糖蛋白質で、血液食細胞の分化・成熟に伴って発現し、細胞増殖とは関係しないと考えられている (GenBank NP000388)。食細胞の中でも特に好中球で多く発現しており、膜上で p22^{phox} 蛋白質と会合してチトクロム *b*₅₅₈ (Cytb₅₅₈) を形成する。Cytb₅₅₈ はフラビンを補酵素とし、極めて低い酸化還元電位を有する特異な分子で、食細胞の殺菌作用において中心的役割を果たす NADPH オキシダーゼの活性を担っている。1957 年に初めて CGD が報告され (26)、やがてその本態が NADPH オキシダーゼの欠損や機能異常であることが明らかとなった。以来、活性酸素産生に関わる細胞膜蛋白質 (gp91^{phox}、p22^{phox}) 及び細胞質蛋白質 (p67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}、Rac p21 など) の構造や機能が明らかにされてきた (2)。休止状態の食細胞では、細胞質因子が Cytb₅₅₈ とは離れて存在するため、NADPH オキシダーゼの活性はない。食細胞が病原体や異物を認識すると、細胞質因子が細胞膜へ移行して Cytb₅₅₈ と会合し、活性型 NADPH オキシダーゼが構築される。本酵素は分子酸素を直接還元してスーパーオキサイド (O₂⁻) を生成し、食胞内に放出する。これが引き金となってさらに強力な活性酸素種 (H₂O₂、HClO[•] など) が生成され、殺菌作用を発揮する。

7 安全性についての評価

7-1 遺伝子導入方法の安全性

7-1-1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

レトロウイルスベクターSF71gp91^{phox}を産生するパッケージング細胞株PG13はドイツEUFETS社においてGMPグレードにて管理・保存されている。今回の遺伝子治療臨床研究で使用されるウイルスベクター上清はEUFETS社により作成されたSF71gp91^{phox}のマスターセルバンク (MCB) より供給される。

MCB の作成法

MCB より使用する PG13 の作成法

ウイルス回収法

7-1-2 患者に投与する物質の純度及び安全性

患者に投与する物質は、gp91^{phox}遺伝子が導入された患者自家骨髄CD34陽性細胞のみである。一般的に細胞培養に使用されるウシ胎仔血清は、患者にとって異種蛋白質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、CD34陽性細胞の培養に際しては1%ヒトアルブミンを使用する。CD34陽性細胞の回収、培養、遺伝子導入に際して用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前にウシ胎仔血清を含まない培地で洗浄されるが、遺伝子導入後に細胞の一部をSRL社に送付し、以下に示す1~6の検査を行うことで安全性を確認する。

なお、野生型ウイルスに対するRCRテストであるPCRによるenv遺伝子の増幅は遺伝子導入後の細胞の一部ならびにその上清を用いて行う。細胞の培養期間は短期間（ウイルスと接する時間が72時間以下）だが、鮮度を保つため、細胞は、RCRの結果を待たずに患者に投与される。もし、後に判明するRCRテストのいずれかでも陽性と確認された場合は、即座に患者末梢血ならびに血漿を用いてRCRテストを行い、その後、全ての検査が陰性化するまで患者を外界との接触を断った個室にて管理する（「遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく）。その過程でリンパ腫を含む異常細胞の増殖が確認された場合、種々の検査結果に基づ

いて最適な治療法を選択し、治療を開始する。患者細胞を用いた検査にて陰性と判明した場合でも定期的に野生型ウイルスの存在を確認する。

1. 無菌性（細菌、真菌、マイコプラズマ）
2. 細胞の RCR テスト (*env* 遺伝子)
3. 上清中の RCR テスト (*env* 遺伝子)
4. FACS による gp91^{phox} の発現の確認
5. エンドトキシン（リムルステスト、ゼラチンテスト）
6. 細胞の状態

7-1-3 RCR 出現の可能性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターSF71gp91^{phox}は野生型レトロウイルス由来のGag、Pol、Envをコードする遺伝子の大部分を欠如しており、また用いるパッケージング細胞株PG13 においてもGag、Polを発現するDNA断片とEnvを発現するDNA断片とは異なったベクターより発現されることからRCRの出現は極めて少ないと考えられる。また、過去の症例においてもPG13 細胞よりRCRが出現したとの報告はなく、本臨床研究においても使用されるウイルス上清はEUFETS社においてRCRの存在が否定されたものを使用する。さらに、遺伝子導入前のウイルス上清や患者投与後の患者体内においてRCRが存在しないことも、SRL社にサンプルを送付して確認する。

7-1-4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性

レトロウイルスベクターが細胞に遺伝子を導入する過程で細胞障害をきたすことはないと考えており、また、過去の多くの症例においても細胞障害性は報告されていない。

7-1-5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としての患者自家骨髄CD34 陽性細胞に体外でgp91^{phox}遺伝子を組み込み、遺伝子導入細胞のみを患者に投与する。したがって、RCRが存在しない限り、標的細胞以外の細胞に上記遺伝子が導入される可能性はない。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞PG13 より産生されるレトロウイルスベ