

200822009A

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に関する研究

(H19-子ども一般-003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野寺 雅史

平成21年(2009)年 3月

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に関する研究

(H19-子ども-一般-003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野寺 雅史

平成21年(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	研究代表者 小野寺 雅史	… 3
II. 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	… 13
2. 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	梨井 康	… 17
3. ライソゾーム病に対する肝細胞遺伝子治療の可能性について	奥山 虎之	… 22
4. 国立成育医療センターにおける CGD 患者の現況	小林 信一	… 24
5. 遺伝子治療対象患者に対する倫理的配慮に関する検討	掛江 直子	… 27
6. 正常細胞分画を検出した X 連鎖性慢性肉芽腫症(X-CGD)モザイク 2 症例の解析	有賀 正	… 39
7. CGD 造血幹細胞移植ガイドライン 2008 (案) について	布井 博幸	… 43
8. ベクター挿入発癌リスク低減のためのクロマチンインシュレータの検討	久米 晃啓	… 46
9. 先天性免疫不全症の遺伝子・細胞治療における移植細胞の 生着制御に関する研究	大津 真	… 48
10. 遺伝子治療臨床研究実施に関する法律、契約、対外交渉の実施	藤本純一郎	… 51
11. 慢性肉芽腫症に対する幹細胞遺伝子治療	岡田真由美	… 54
12. 造血幹細胞遺伝子治療におけるベクター挿入部位の同定と その機能解析に関する研究	小野寺雅史	… 58
III. 資料		
1) 遺伝子治療臨床研究実施計画書		
2) 同意書・同意説明書		
3) 生物多様性評価書		
4) 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の実績一覧		
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		
V. 研究成果の刊行物・別刷		

I . 總括研究報告

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 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所

成育遺伝研究部遺伝子診断治療研究室室長

研究要旨

小児難治性先天異常症に対する根治療法としての造血幹細胞遺伝子・細胞治療の確立に向け、その安全性及び有効性の向上に繋がる前臨床研究ならびに実際の遺伝子治療臨床研究に向けた実施計画書等の作成及びその実施体制を構築した。

前臨床研究としては、①標的となるヒト造血幹細胞のソースの未熟性の検討、②ヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の確立、③慢性肉芽腫症造血幹細胞の特性の検討、④異所性 gp91phox の抗原性の検討、⑤ベクター挿入部位近傍遺伝子の発現異常により発症したリンパ腫の解析、⑥挿入部位近傍遺伝子への影響を軽減するための insulator 導入ベクターの構築、⑦先天性代謝異常症のライソゾーム病に対する遺伝子・細胞治療法の有効性の検討、などを行った。

臨床的研究では、①特異な病態を有した CGD 2 症例の解析と遺伝子治療臨床研究の可能性の検討、②国立成育医療センターにおける 21 年間の CGD 患者の病歴の検討、③我が国において行われた造血幹細胞移植のまとめとその結果に基づいた遺伝子治療臨床研究に対するガイドラインの作成、④現在までの諸外国の CGD に対する遺伝子治療臨床研究の情報収集、⑥米国国立衛生研究所より入手する MFGSgp91 ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施計画書等の作成、⑦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

小林 信一

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

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

都立東大和療育センター小児科・医師

A. 研究目的

近年の分子生物学的進歩により数多くの小児先天性異常症の診断や病態解明が可能となってきたが、治療法に関しては、造血幹細胞移植が有効である疾患もあるが、その多くは根治療法に乏しい難治性疾患である。また、移植に関してもドナーの HLA 適合性の問題があり、たとえ造血幹細胞移植が有効である疾患だとしても、全ての症例が移植の対象となるわけではない。さらに、小児先天性異常症の場合、その症例数は決して多くはなく、これら難治性疾患に対して、安全で有効な治療法の開発と全国規模での実施体制の構築が求められている。

本研究では、小児難治性先天性異常症、特に原発性免疫不全症や先天性代謝異常症に対する造血幹細胞遺伝子・細胞治療の確立に向け、対象疾患を原発性免疫不全症の中で最も頻度の高い X 連鎖性慢性肉芽腫症(X-CGD)とし、1. 前臨床研究として CGD における造血幹細胞の特性や遺伝子導入法の検討、使用する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と造血能への対する影響、安全性を高めて新規ベクターの構築などを行い、2. 臨床的研

究として、実施場所である国立成育医療センターのCGDに対する治療実績や国内のCGDに対する造血幹細胞移植の結果を集計、現在までに諸外国で行われたCGD造血幹細胞遺伝子治療の情報の収集等を行った。そして、実際のCGD遺伝子治療臨床研究の実施に向けた実施計画書等の作成とその実施体制を構築した。

B. 研究方法

1. 前臨床的研究

1) 標的となる造血幹細胞のソースの評価(清河・小野寺):

CD34陽性細胞は、米国Lonza社から市販されている骨髓、臍帯血、及びG-CSFによって誘導された末梢血由来のCD34陽性細胞を使用した。これらCD34陽性細胞の表面抗原を、サイトカイン(SCF、TPO、FLT3L、IL6、sIL6R、及びIL3)との共培養前後で、flow cytometryで解析した。また、長期にわたる造血能の維持(stemness)を評価するため、各CD34陽性細胞をNOD/SCID/IL-2Ry null (NOG)マウスに移植し、マウス造血中のヒト血液細胞の割合を評価した。

2) CD34陽性細胞への遺伝導入法の確立(大津・小野寺)

米国Lonza社から購入したCD34陽性細胞に緑色蛍光色素(EGFP)遺伝子を発現するレトロウイルスを、直接ウイルス上清を用いて感染させる上清法とウイルスをコートしたプレートにて感染させるプレコート法にて感染させ、EGFP発現細胞の割合を算定し、至適導入法の検討を行った。

3) 慢性肉芽腫症の造血幹細胞の骨髓造血能の検討(大津)

gp91phox欠損造血幹細胞の骨髓造血能を検討するために、Ly5.1/Ly5.2 F1 CGDマウスに、Ly5.1マウス骨髓と同数のLy5.2 CGDマウス骨髓を移植し、その後のキメリズムを検討した。また、CGDマウス骨髓にレトロウイルスベクターにてgp91phox遺伝子を導入し、遺伝子導入効率と活性酸素能の関係を検討した。

4) ヒトgp91phoxに対する抗体の作製(梨井)

抗ヒトgp91phox抗体を作製するために、抗体認識部位と予想される細胞内・外のドメイン配列を決定し、そのアミノ酸配列、疎水性、親水性、抗原性、アクセシビリティなどを検討した。

5) 導入部位近傍遺伝子の発現変化の解析(小野寺)

レトロウイルスベクターにてEGFP遺伝子を導入したES細胞より作出したマウスより、プロウイルスを1コピーしか有さないマウスを選出し、挿入部位

近傍遺伝子の発現変化とその発現変化が造血能に与える影響を、マウス個体を介して検討した。

6) 新規ウイルスベクターの開発(久米)

染色体挿入ベクターによる発がん性の軽減ならびに治療遺伝子の発現低下をもたらすgene silencingに抵抗性を示す、ヒト第19番染色体長腕にコードされるinsulatorを挿入したベクターを構築し、その機能をヒト白血病細胞株であるK562細胞を用いて解析した。

7) 先天性代謝異常症への肝細胞遺伝子治療の開発(奥山)

ライソゾーム病の遺伝子治療の可能性を検討するために、ムコ多糖症VI型モデルラットに正常ラットの肝臓を移植し、その効果を尿中ウロン酸排泄量ならびに骨病変を解析することで検討した。

2. 臨床的研究

1) 特異な病態を呈したCGD患者2名の解析(有賀)

北海道大学医学部小児科で治療を受けているX-CGD患者のうち、患者体内に活性酸素能に関して正常分画を有する患者が2名いることがわかり、その病態解析を行った。

2) 国立成育医療センターにおけるCGDの治療実績(小林)

国立成育医療センターにおいて1998年から2008年までの21年間に治療してきたCGD患者23名について、臨床的解析とその治療法を評価し、その問題点を明らかにした。

3) CGD造血幹細胞移植ガイドライン2008の作成(布井)

本邦において現在まで行われてきたCGDに対する造血幹細胞移植34例に対し、情報が得られた32症例の移植条件やその後の臨床経過を解析し、遺伝子治療の適応症例選択のガイドラインの作成を試みた。

4) 諸外国のCGD遺伝子治療の現状(岡田)

現在までCGDに対して造血幹細胞遺伝子治療を行っている米国、英国、ドイツ、韓国の情報を入手し、遺伝子治療臨床研究の安全性及び有効性を検討した。

5) NIH・国立アレルギー感染症研究所との共同研究(布井、藤本、小野寺)

NIH国立アレルギー感染症研究所のHarry L. Malech博士の開発したMFGSgp91ベクターのquality control(QC)に関する書類を入手し、主任研究者であるElizabeth Kang博士と実際のプロトコルの比較検討を行った。

6) X-CGD遺伝子治療臨床研究実施計画書等の作成(掛江、小野寺)

X-CGD 遺伝子治療臨床研究に必要な書類である「実施計画書」、「患者説明書・同意書」、ならびに遺伝子組換え生物等の使用等の規程による生物の多様性の確保に関する法律に基づく「第一種使用規程承認申請書」を作成した。

7) 実施に向けた準備 (藤本、掛江)

センター内の専用実験室を整備及び遺伝子治療を行う人員の確保を行った。

(倫理面への配慮)

アンケート調査に関しては、連結可能な匿名化による管理を行い、個人情報保護法を遵守し、また、一般研究にあたって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。動物実験に関しては、3R の原則を遵守し、動物愛護に心がけ、遺伝子組換え実験に関しては、遺伝子組換え実験等の規則に関わる法律、省令、告示を遵守した。また、実際の遺伝子治療臨床研究の実施に関しては、「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)に基づき、準備を進めている。

C. 研究結果

1. 前臨床研究

1) 標的となる造血幹細胞のソースの評価

① レトロウイルスベクターによる治療遺伝子導入の際に必要なサイトカインの影響を、骨髄、臍帯血、G-CSF 誘導末梢血由来 CD34 陽性細胞を用いて検討した。骨髄 CD34 陽性細胞では、CD133、CD38、CD90 など他の骨髄系マーカーが発現しており、また、T 細胞系のマーカーである CD3 や B 細胞のマーカーの CD19 陽性細胞も混在していることがわかった。一方、末梢血、臍帯血由来 CD34 陽性細胞では、比較的細胞集団は均一 (CD34 陽性細胞のみ) であった。サイトカインの影響に関しては、SCF、TPO、FLT3L、IL6+sIL6R と IL6+sIL6R の代わりに IL3 を用いた組み合わせにて、表面抗原の変化を解析したところ、いずれの場合もほぼ全ての細胞が CD33 陽性となり、*in vitro* での変化は確認されなかった。

② 骨髄、臍帯血、G-CSF 誘導末梢血由来 CD34 陽性細胞の未熟性 (stemness) を確認するため、これら細胞を NOG マウスに移植し、6 ヶ月後のマウスにおけるヒト造血細胞 (CD45 陽性細胞) の割合を算出したところ、骨髄、臍帯血、末梢血の順で、22、64、7% であり、臍帯血由来 CD34 陽性細胞の頻度が最も高かった。

2) CD34 陽性細胞への遺伝子導入法の確立

骨髄 CD34 陽性細胞に、EGFP を発現するレトロウイルスベクターを添加して感染したところ、およそ 72% の細胞が EGFP 陽性細胞となった。一方、EGFP 発現レトロウイルスベクターを予め dish にコートし、その dish を用いた感染実験を行ったところ、その感染効率率は 46% であった。以上のことから、遺伝子導入操作に関しては、直接ウイルス上清と共培養する上清法の方が、高い遺伝子導入効率を得られると考えられた。

3) 慢性肉芽腫症の造血幹細胞の骨髄造血能の検討

① レシピエントとして Ly5.1/Ly5.2 F1 CGD マウスに、同量の Ly5.1 マウス骨髄と Ly5.2 マウス骨髄あるいは Ly5.2 CGD マウス骨髄を移植した。結果、全例で生存し、Ly5.2/ (Ly5.1 + Ly5.2) のキメリズムに関して個体差はあるものの、Ly5.2 マウス骨髄と Ly5.2 CGD マウス骨髄移植マウスに有意な差を認めなかった。このことは、CGD 造血幹細胞の骨髄再建能は正常幹細胞と同程度であることが示された。

② CGD マウスより得られた骨髄細胞に、赤色蛍光色素 (huKO) がマーカーとなるレトロウイルスベクターにて正常 pg91phox 遺伝子を導入し、これら遺伝子導入細胞を致死量の放射線照射した CGD マウスに移植したところ、KO が高発現している細胞においては、新規活性酸素測定色素である APF を用いた系で、強く活性酸素を産生していた。一方、KO が弱陽性の細胞では APF による活性酸素産生能を検出することはできなかった。このことは、たとえ、治療遺伝子が発現しても、活性酸素産生には一定のタンパク質レベルでの閾値があることが示唆された。

4) ヒト gp91phox に対する抗体の作製

① ヒト gp91phox の細胞外ドメインを、#1 30-48 (48aa)、#2 124-169 (46aa)、#3 222-261 (40aa) に分け、これらアミノ酸の一次配列より、親水性、疎水性、抗原性ならびにアクセスビリティーを検討したところ、特異的な領域を含めて 40 アミノ酸以上の領域を設計できれば問題がないことがわかった。

② これらアミノ酸をコードする配列をバキュロウイルスベクターの pMO4 に挿入し、リコンビナントタンパクを発現させた。ただ、その多くは不溶性分画に分泌することがわかったため、可溶性剤入りのバッファー (100mM NaP、10mM Tris-HCl、8M Urea、pH8.0) を用いて、不溶性分画からこれらタンパク質を抽出した。

5) 導入部位近傍遺伝子の発現変化の解析

① 染色体上にプロウイルスを1コピーしか有さない遺伝子組換えマウスを作成し、その挿入部位を同定したところ、挿入部位はサイクリン D1 遺伝子 (CCND1)、myeloid/ lymphoid or mix-lineage leukemia translocated to 11 遺伝子 (MLL11)、ドーバミン受容体 3 (D3) 遺伝子と第 5 染色体の未同定遺伝子の 4 領域であった。

② 特に、D3 遺伝子近傍にプロウイルスが挿入されたマウスでは出生後 28 週目に D3 強発現のリンパ腫を発症し、D3 の発現解析から、このリンパ腫では D3 遺伝子が強発現していることがわかった。これらのことは、ベクター挿入による近傍遺伝子の発現変化が、正常造血に何らかの影響をもたらす、腫瘍発症という現象に結びついたことが示唆された。

8) 新規ウイルスベクターの開発

① ヒト第 19 番染色体長腕端部の AAVS1 領域から、insulator 活性をもつ 0.3kb の断片をクローニングし、サイトメガロウイルスプロモーターの下流に EGFP とネオマイシン耐性遺伝子を同時に発現し、poly A シグナルを有する発現カセットの 5' 側あるいは 3' 側に組み込んだ。この全カセットを自己不活性型 (SIN) レトロウイルスベクターに組み込み、パッケージング細胞株に transfection してウイルス上清を回収した。

② これらウイルス上清を K562 細胞株に感染し、G418 耐性及び EGFP の発現強度を確認したところ、insulator 無しでは 27% であったのに対し、発現カセットを順・順、順・逆、逆・逆、逆・順で挿入したところ、その発現程度が各々 45%、40%、82%、50% と上昇した。以上のことから、insulator を逆向きに発現カセットに挿入する方法が最も有効であることが示唆された。

9) 先天性代謝異常症への肝細胞遺伝子治療の開発

ムコ多糖症 VI 型のモデルラットである MPR ラット (arsb 遺伝子の一塩基挿入ラット) の生後 3 ヶ月時に、正常ラットから得られた肝臓を移植したところ、尿中ウロン酸値は術後 27~33 日に正常化し、4 ヶ月を越えてもその値を維持した。しかし、移植ラットの全身骨を X 線にて観察したところ、骨変化に対する改善は認められなかった。

2. 臨床的研究

1) 特異な病態を呈した CGD 患者 2 名の解析

北海道大学医学部小児科にて加療中の CGD 患者のうち、活性酸素産生能に関して正常分画を有する患者が 2 名いることがわかった。正常な活性酸素を有する分画は、各々 0.9% と 3.7% であり、gp91phox に対する抗体の 7D5 でも 1.9% と 5.9% との陽性率を示した。EBウイルス感染による B 細胞株樹立により得られた細胞株のうち、活性酸素を有する細胞株の HLA は患者と同一であり、それら細胞から得られた CYBB 遺伝子は正常タイプであった。以上のことから、X-CGD 患者においても正常遺伝子を有する細胞が混在するモザイク状態が起こりうることを示唆していた。

2) 国立成育医療センターにおける CGD の治療成績

① 1988 年から 2008 年までの 21 年間に国立成育医療センターで加療した CGD 患者 34 名の病歴等を解析した。内訳は gp91 欠損 29 名 (85.3%)、p22 欠損 2 名 (5.9%)、p47 欠損 1 名 (2.9%)、p67 欠損 2 名であり、生存 22 名 (64.7%)、死亡 7 名 (20.6%)、幹細胞移植 5 名 (14.7%) で、移植を受けた患者 5 名は全例で生存し、通常の生活を送っている。

② 重症感染症は 203 回で、一人あたりの平均入院回数は 8.2 回、重症感染症の頻度は 2 年に一回程度であり、生存 20 名において低身長、低体重 (10 パーセントタイル以下) はそれぞれ 22%、17% であった。

③ 移植例を除く 29 名の Kaplan-Meier 法による 20 年生存率は 75.9% であり、移植例を除く生存例 22 名の Karnofsky Index (%) は、20 歳以下 9 名で平均 96.7%、20 歳以上 13 名では平均 87.7% と低下していた。20 以上の 13 名のうち、学生は 1 名、常勤者は 4 名、既婚者は 2 名と、生命予後は改善しているが、健常人と同等の生活を送ることが困難であることが明らかとなった。

3) CGD 造血幹細胞移植ガイドライン 2008 の作成

本邦において行われた CGD に対する移植例 32 例を解析したところ、血縁、非血縁間での CY+Flu+Low TBI 前処置による造血幹細胞移植の成績は良好であった。一方、この前処置には、その半数 (10 例中 5 例) でドナーリンパ球輸注療法 (DLI) が必要であり、移植片対宿主病 (GVHD) の増悪や有効性の問題が指摘された。このため、DLI を必要としない L-PAM を加えた新しい前処置の導入も検討されている。

4) 諸外国での CGD 遺伝子治療の現状

現在まで CGD に対して造血幹細胞遺伝子治療を行っている研究者より遺伝子治療臨床研究の治療経過に関する情報を入手した。それによると、Malech 博士 (NIH) らは 3 名の患者に対して遺伝子治療を行い、2 名の患者に難治性感染症の治療等の治療効果を確認している。Thrasher 博士 (英国) らは 4 名の患者に対して遺伝子治療を行い、2 名の患者で治療効果を確認している。Grez 博士 (ドイツ) らは 4 名の患者に対して遺伝子治療を行い、全例で治療効果を確認している。また、Kim 博士 (韓国) らは 2 名の患者に遺伝子治療を行っている。有害事象に関しては、ドイツの症例で monosomy 7 を伴う MDS を発症しており、その原因として使用したレトロウイルスベクター (SFFV 由来ベクター) が他の医療機関で使用されているベクター (MoMLV 由来ベクター) より promoter/ enhancer 活性が強いことが原因であると報告された。

5) NIH・国立アレルギー感染症研究所との共同研究

米国 NIH では、CGD に対して 1995 年から MFSG ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を行っており、その経過一覧は資料 4 に示すとおりである。遺伝子治療開始当初は前処置を行わずに遺伝子導入細胞を患者に投与していたために、その治療効果は全く確認されなかった。その後、遺伝子治療においても前処置が必要であることが認識され、2006 年以降の遺伝子治療臨床研究では、遺伝子導入細胞の生着のための骨髓間隙をつくるために体重あたり 10mg の busulfan を投与するプロトコルに変更された。現在、国立成育医療センターで実施を計画している遺伝子治療臨床研究では、NIH Malech 博士らが使用している MFSG ベクターをしようするため、本ベクターの quality check (QC) リストを入手した。

6) X-CGD 遺伝子治療臨床研究実施計画書

本研究開始当初は、ドイツ Grez 博士らと共同研究のもと SFFV 由来ベクターの SFgp91 ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を計画していたが、前述のように遺伝子治療を受けた患者において MDS という造血系異常を発症したため、現在までこのような造血系異常を発症していない NIH Malech 博士らの MFSG ベクターに治療ベクターを変更し、そのベクターに実施計画書 (資料 1)、患者説明書と同意書 (資料 2) ならびに遺伝子組換え生物等の使用等の規程による生物の多様性の確保に関する法律に基づく「第一種使用規程承認申請書」 (資料 3) を作成した。

7) 実施に向けた準備

研究所内に安全キャビネット、インキュベータ、遠心器等を備えるクラス 1 万程度の培養室及び前室、器材等保管スペース等を有する遺伝子治療専用の培養室 (8mx6m) の設置、遺伝子治療専任者として流動研究員 1 名の配置と行った。

D. 考察

小児難治性先天性異常症の多くは単一遺伝子疾患であり、乳幼児期早期より発症し、急速あるいは緩徐であるが不可逆性の病変の進行により恒久的な障害をもたらす。殊に、原発性免疫不全症の場合、重篤な感染症に罹患し、根治療法が HLA の一致した造血幹細胞移植しか治療法がないため、適当なドナーの見つからない患者においては、早晩、死に至る。また、疾患においては、適当なドナーが見つかっていても、重篤な感染症による臓器不全により前処置に耐えきれず、移植医療自体を行えない患者もいる。

このような点を鑑み、本研究では、幹細胞遺伝子細胞治療法の基礎的ならびに臨床的な研究を行い、安全で有効な治療法を開発し、実際の治療の場である臨床に結びつけるものである。特に、原発性免疫不全症や先天性代謝異常症においては、その症例数が極端に少ないことから、医療の均てん化に関しては、地域医療格差が著しく、本研究においては、これら新規治療法の開発のみではなく、全国規模でのネットワーク体制を構築することも目標の一つとなっている。

遺伝子治療臨床研究に対する前臨床研究として、① 標的となるヒト造血幹細胞のソースの未熟性の検討、② ヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の確立、③ 慢性肉芽腫症造血幹細胞の特性の検討、④ 異所性 gp91phox の抗原性の検討、⑤ ベクター挿入部位近傍遺伝子の発現異常により発症したリンパ腫の解析、⑥ 挿入部位近傍遺伝子への影響を軽減するための insulator 導入ベクターの構築、⑦ 先天性代謝異常症のライソゾーム病に対する遺伝子・細胞治療法の有効性の検討、などを行った。

特に重要な問題としては、CGD 患者の造血幹細胞の骨髓再構築能の検討である。現在、造血幹細胞遺伝子治療の成功の重要な要因として、遺伝子導入細胞の非導入細胞に対する増殖優位性と導入細胞が生着するための骨髓間隙 (niche) の創造と言われている。およそ、SCID-X1 や ADA 欠損症で見られる遺伝子改変細胞の非導入細胞に対する増殖優位性は CGD

では認められないため、如何にして骨髓間隙を創造するかが問題となり、本研究にて明らかにされた CGD 幹細胞の正常幹細胞と同程度の増殖能の結果から、やはり強力な前処置の必要性が伺える。また、遺伝子導入部位近傍遺伝子の発現変化からリンパ腫が発症した事例から、たとえ 1 コピーのベクター挿入にても造血異常を発症することを示唆しており、本研究で示された insulator 等を組み込んだ新しいベクターの開発が必要と考えられた。

また、臨床的研究として、① 特異な病態を有した CGD 2 症例の解析と遺伝子治療臨床研究の可能性の検討、② 国立成育医療センターにおける 21 年間の CGD 患者の病歴の検討、③ 我が国において行われた造血幹細胞移植のまとめとその結果に基づいた遺伝子治療臨床研究に対するガイドラインの作成、④ 現在までの諸外国の CGD に対する遺伝子治療臨床研究の情報収集、⑤ 米国国立衛生研究所より入手する MFGSgp91 ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施計画書等の作成、⑥ 院内及び全国規模の臨床研究体制の確立 等を行った。

これらの結果から、たとえ同様の遺伝子治療臨床研究を行おうとも、得られる臨床結果は施設ごとで大きく異なり、特にドイツの症例では MDS の発症との重篤な有害事象も報告されている。このように考えると、マウス等の実験で得られた結果はヒト遺伝子治療の方向性を示す一助とはなるも、最終的にはヒト臨床研究にて得られた研究から判断するしかないことが考えられる。今後も、患者の risk balance に基づき遺伝子治療を実施していくことが必要であり、そこから得られた臨床結果の積み重ねが新たな治療法の開発に結びつくと思われた。

E. 結論

小児難治性先天異常症の根治的治療法としての幹細胞遺伝子細胞療法に関し、慢性肉芽腫症をその対象疾患として、前臨床研究及び臨床研究を行った。その結果、

1. 基礎的研究として

標的となるヒト造血幹細胞のソースとして骨髓幹細胞の優位性、ヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の確立、慢性肉芽腫症造血幹細胞の特性の解明、抗 gp91phox 抗体検出系の道筋、ベクター挿入部位近傍遺伝子の発現異常による造血系への影響、挿入部位近傍遺伝子への影響を軽減するための insulator 導入ベクターの構築、などの知見が得られた。

2. 臨床研究として

特異な CGD 症例からの CGD 造血幹細胞の増殖能の情報、国立成育医療センターを含む我が国の CGD に関する状況、諸外国の CGD に対する遺伝子治療臨床研究の情報、などが得られた。

今後はこれらの情報を基に、NIH Malech 博士より供与される MFGS ベクターを用いた CGD に対する遺伝子治療臨床研究を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

ドイツ・フランクフルト大学の Grez 博士が開発し、ドイツ、スイスで行われた 4 例の SF71gp91 ベクターによる慢性肉芽腫症遺伝子治療において、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(昨年、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)、その他の 2 例においても造血系異常は認めないが、単クローン性の細胞増殖を認めている (Grez 博士からの私信)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology*. 125;(12):570-590,2008.
- 2) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro. *Acta Haematologica*. 120(3):134-145,2008.
- 3) Kitazawa Y, Fujino M, Sakai T, Azumu H, Kimura H, Isaka Y, Takahara S, Hünig T, Abe R, Li X-K. Foxp3-expressing regulatory T-cells expanded with CD28 superagonist antibody prevent rat cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 27(4):362-371,2008.
- 4) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Kimura H, Takahara S, Nakayama T, Ezaki T, Li X-K. Survival of skin allografts is prolonged in mice with a dominant-negative H-Ras. *Transpl Immunol* 18(4):302-306,2008.
- 5) Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. *Am J Med Genet A*. 15;

- 146A(16):2145-51.2008.
- 6) Sugawara K, Saito S, Ohno K, Okuyama T, Sakuraba H. Structural study on mutant alpha-L-iduronidases: insight into mucopolysaccharidosis type I. *J Hum Genet.* 2008; 53: 467-74.
 - 7) Kobayashi S, et al. Clinical features and prognosis of 23 patients with chronic granulomatous disease (CGD) followed by a single hospital in Japan for 21 years. *Eur J Pediatr.* 167:1389-1394, 2008.
 - 8) Nakajima M, Yamada M, Yamaguchi K, Sakiyama Y, Oda A, Nelson DL, Yawaka Y, Ariga T. Possible application of flow cytometry for evaluation of the structure and functional status of WASP in peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Haematol* 87, 223-230, 2009.
 - 9) Suzuki Y, Kobayashi R, Iguchi A, Sato T, Kaneda M, Kobayashi K, Ariga T. The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone associated with SCT: clinical differences following SCT using cord blood and BM/peripheral blood. *Bone Marrow Transplantation.* 42:743-748, 2008.
 - 10) Kuribayashi F, Tsuruta S, Yamazaki T, Nunoi H, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Nakamura M. Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells.* 13:1249-1256, 2008.
 - 11) Ikeda T, Kanmura K, Kodama Y, Sawada K, Nunoi H, Hasegawa K. Segawa disease with a novel heterozygous mutation in exon 5 of the GCH-1 gene (E183K). *Brain Dev.* 31:173-175, 2008.
 - 12) Gono T, Yazaki M, Agematsu K, Matsuda M, Yasui K, Yamaura M, Hidaka F, Mizukami T, Nunoi H, Kubota T, Ikeda S. Adult onset X-linked chronic granulomatous disease in a woman patient caused by a de novo mutation in paternal-origin CYBB gene and skewed inactivation of normal maternal X chromosome. *Intern Med.* 47(11):1053-1056, 2008.
 - 13) Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 30:121-127, 2008.
 - 14) Kawaguchi H, Okamoto S, Sikdar D, Kume A, Li F, Mohafez OM, Shehata MH, Hiraga K: Genomic organization of regions that regulate chicken glycine decarboxylase gene transcription: Physiological and pathological conditions. *Gene* 432:7-18, 2009.
 - 15) Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K: Systemic delivery of IL-10 by an AAV-vector presents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther*, in press.
 - 16) Otsu M, Ariga T. Stem cell gene therapy for ADA-deficiency without myelopreparative preconditioning. Roger Bertolotti and Kei-ya Ozawa: Autologous and cancer stem cell therapy, World Scientific, Singapore, p1-18, 2008.
 - 17) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, and Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts, can be used as an effective immunogen. *Glycoconjugate J.* 25(6):495-501, 2008.
 - 18) Nakata Y, Kondoh K, Fukushima S, Hashiguchi A, Dua W, Hayashia M, Fujimoto J, Hata J, and Yamada T. Mutated D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor is found in human leukemic cells and promotes leukemic cell invasion. *Exp Hematol.*, 36(1):37-50, 2008.
 - 19) Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M. The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. *Exp dermatol* (in press).
 - 20) Matsunari H, Onodera M, Tada N, Mochizuki H, Karasawa S, Haruyama E, Nakayama N, Saito H, Ueno S, Kurome M, Miyawaki A, Nagashima H. Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange. *Cloning stem cells* 10: 313-323, 2008.
2. 学会発表
- 1) 堀内保臣, 宮川世志幸, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 免疫不全マウスを用いたヒト造血細胞に対する放射線照射生物影響の生体内解析系. 第50回日本小児血液学会, 千葉, 11月14-16日, 2008.
 - 2) 恩田恵子, 片桐洋子, 藤本純一郎, 清河信敬. BAFFによるB細胞のCD20/BCRを介するアポトーシスの抑制. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1-3日, 2008.
 - 3) Ozawa F, Shimomura M, Miyagawa Y, Hiroshima M, Lazic A, Kiyokawa N, Umezawa A, Nakatsura T, Tanaka S. A new approach for drug discovery and differentiation study using cutting-edge 3D cell culture system. The

American Society of Cell Biology (ASCB)
48th Annual Meeting, San Francisco, Dec
13-17, 2008.

- 4) 小林信一他： 国立成育医療センターにおける CGD 患者の死亡例の検討. 第 16 回食細胞機能異常症研究会. 2008. 12. 19
- 5) Ariga T: Hematopoietic stem cell gene therapy for two patients with adenosine deaminase deficiency without cytoreductive conditioning: Clinical evaluation after 4 years. 8th East Asian Union of Human Genetics (EAUGH). July 19, 2008: Sapporo, Japan.
- 6) Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Ito T, Ozawa K: Complete restoration of in vivo oxidative capacity for phenylalanine in self-complementary AAV vector-treated phenylketonuria mice. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting, May-June, 2008, Boston, USA. (Mol Ther 16 Suppl 1:S325, 2008)
- 7) Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, et al. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. Cytokine. 2009.
- 8) Suzuki S, Otsu M, et al. A novel strategy of hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency diseases. 日本遺伝子治療学会, 札幌, 2008 年 6 月
- 9) Otsu M, et al. Development of a safe and effective stem cell transplantation strategy for chronic granulomatous disease (CGD) by the use of antibody-based minimum intensity preconditioning and delayed infusion of suicide-gene transduced donor T lymphocytes. Annual meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, May 28, 2008.
- 10) Iwata-Okada M, Okuyama T, Kobayashi S, Kawai T, Horiuchi Y, Kiyokawa N, Li X, Fujimoto J, Otsu M, Kume A, Ariga T, Mizukami T, Nunoi H, Onodera M, Kang EM, Malech HL, Kuratsuji T. Progress toward clinical trial of gene therapy for chronic granulomatous disease in Japan. Japan Society of Gene Therapy, The 14th Annual Meeting, Sapporo, June 12, 2008.
- 11) 小野寺雅史. How do we advance stem cell gene therapy in Japan? 第 14 回日本遺伝子治療学会総会, 札幌, 2008 年 6 月 12-14 日.

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

Ⅱ. 分担研究報告

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

研究分担者 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

骨髄、臍帯血、末梢血の3つのソースに由来するCD34陽性細胞の造血幹細胞/前駆細胞の細胞特性について、表面抗原の観点からみた場合もそれぞれ異なった特徴を有することが明らかとなり、今後の遺伝子幹細胞治療では、対象疾患ごとに適した造血幹細胞のソースを選択していくことが必要であるとともに、新たな観点から造血幹細胞を維持、増幅可能な培養系の開発を行ってゆくことが必要と考えられる。また、レトロネクチンを用いたヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入において、インテグリンの機能が必須であることが確認され、今後より高い効率の導入法を確立する上で、インテグリンの発現にも着目した導入法開発が必要であると考えられる。

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性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。

レトロウイルスは、標的細胞が分裂する過程でそのゲノム遺伝子に自己のゲノム遺伝子を組み込ませることによって感染するため、同ウイルスをベクターとして利用する遺伝子導入では、ウイルスが標的となる細胞に対して効率的に結合するとともに、標的細胞が細胞周期に入っていることが必要条件となるが、現状では、造血幹細胞を試験管内で、未分化性を保ったまま増幅させることは困難である。そこで、本研究では、造血幹細胞の未分化性を最大限維持しつつ、その増殖をうながし、かつ、効率的にウイルスを吸着させるための培養条件について検討を行っている。

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のもの、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ネクテン(レトロネクテン)コート培養プレートへウイルスを固着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, TP0, FLT3L, IL6, sIL6R)の5者併用、あるいは後2者の代わりにIL3を用いた4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(Methocult™ GF+H4435 (Stem Cell Technologies Inc.))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。また、21日後に50細胞以上のコロニー数を算定した。

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。

インテグリンおよび細胞表面抗原の発現は、蛍光標識した各抗原に対する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) レトロウイルス導入のためのサイトカイン添加培養が造血幹細胞に及ぼす効果についての検討: 骨髄、臍帯血、G-CSFによって誘導した末梢血、の3つの異なるソースに由来するCD34+CD45+細胞をサイトカイン添加培養した際の細胞特性の変化について比較した。培養開始前の細胞に対して、CD34以外に、CD133、CD38、CD90等の造血幹細胞関連マーカーと、B細胞マーカーCD19、骨髄単球マーカーCD33を指標にその特性を比較した場合、骨髄由来のCD34+細胞は、比較的多様な抗原の発現様式を示しており、その一部にはすでにCD33あるいはCD19が発現していることから、この細胞集団には、多能性の造血幹細胞から、各血球系統の前駆細胞まで、多様な細胞集団を含んでいる

可能性が考えられた。これに対して、末梢血あるいは臍帯血に由来するCD34+陽性造血細胞はより均一性が高かった。末梢血由来のものはCD38の発現の均一性が非常に高いものの、ごく弱くCD33を発現する細胞集団を認めた。臍帯血由来のものは、CD38の発現量にはバラツキがあるものの、CD133の発現量とその均一性は3者の中では最も高く、CD33やCD19を発現する細胞はほとんど認められなかった。

次に、サイトカイン添加培養後の細胞について同様の検討を行った。培養後のマーカーの発現状況の比較においても、骨髄由来のものが最も多様性を示し、特にCD34とCD38の発現に着目すると、双方の発現の状況によって、CD34-bright/CD38-bright、CD34-bright/CD38-dim、CD34-dim/CD38-bright、CD34-dim/CD38-dim、の4群が明確に区別され、特にCD34-dim/CD38-bright細胞が最も多く、一部CD19陽性細胞も認められた。これに対し、末梢血あるいは臍帯血のものはCD34およびCD38の発現が比較的均質に保たれてCD34-bright/CD38-brightの細胞群が最も多く、CD19+細胞はほとんど認められなかった。また、CD133の発現については、臍帯血>末梢血>骨髄由来の順に維持されており、臍帯血由来のものでは、培養後も約半数にその発現が認められた。しかし、3者いずれにおいても、ほとんどの細胞はCD33を発現してしまうことが明らかとなった。CD33の発現強度で比較した場合、このうち、臍帯血由来のものが3者の中で最も低かった。また、サイトカインカクテルの中のIL6 + sIL6RとIL3の比較において、表面抗原の発現からみた場合に大きな違いは認められず、いずれの場合もほとんどの細胞でCD33が陽性となってしまふ点は全くといっていいほど同様な結果であった。

(2) レトロネクテ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テンが必須のウイルス導入補助剤として用いられている。レトロネクテンは、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。

昨年度の検討で、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞に対するGFP遺伝子発現用レトロウイルスベクター導入について、レトロネクテンが存在しないと、ほとんど導入されな

いこと、分離直後のCD34陽性細胞ではVLA4、VLA5いずれも発現が非常に弱いものの、サイトカインカクテル添加培養の間にその発現が著しく増強すること、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。そこで、この導入系に対して、インテグリンとフィブロネクチンの結合を阻害する作用をもつ抗VLA-4抗体、および抗VLA-5抗体、を添加したところ、導入率が優位に低下し、かつ両者を同時に添加することで協調的な抑制作用が認められた。

D. 考察

現在、造血幹細胞のソースとしては、骨髄、臍帯血、G-CSFによって誘導した末梢血の3者がある。それぞれの造血幹細胞の特性には差がある可能性が推測されているが、その詳細については不明な点が多い。今回の検討で、表面抗原の発現様式においても3者に差が認められることが明らかとなった。

臍帯血や末梢血は、造血幹細胞が本来局在する場ではないので、ここに存在するCD34陽性細胞は幹細胞あるいは前駆細胞の中の特定の細胞集団であり、均一性が高いのではないかと考えられる。これに対し、骨髄は造血幹細胞が未分化性を維持しつつ、自己複製するとともに各系統の血液系細胞に分化していく場なので、ここから回収されるCD34+細胞には、本来の造血幹細胞から各系統の前駆細胞まで、多様な細胞集団が含まれると考えられ、またその多様性は、骨髄液を採取する際のドナーの造血の状態や個人差を強く反映する可能性が考えられる。

以上のように、臍帯血や末梢血由来のCD34+細胞の方がより均一性が高いが、これらの細胞が、血球分化における全能性の造血幹細胞であるか否かは不明であり、その点からは、逆に骨髄に由来するものの中にこそ確実に真の造血幹細胞が含まれているという可能性も考えられる。造血幹細胞を用いた遺伝子幹細胞治療を考えた場合、対象疾患によって、造血幹細胞でなくはないのか、あるいは生着する能力があれば特定の系統に運命づけられた前駆細胞の方がより適しているのかは、対象疾患によって異なってくるため、今後は、疾患ごとにより有用性の高い造血幹細胞のソースを検討していく必要があると考えられる。また、必要に応じては、CD34とその他の幹細胞関連マーカーを組み合わせた細胞選択を

行って遺伝子幹細胞治療に用いることも有用であると考えられる。

また、今回の検討で、レトロウイルスベクターの導入のためのサイトカイン添加培養の過程で、大部分の細胞は骨髄球系等への分化が開始されてしまうものと考えられ、この点については、IL6 + sIL6RとIL3の両者について意義のある差は認められなかった。現状における理解では、造血幹細胞の未分化性維持には、nichに局在することが必要であって、液性因子のみによる作用では未分化性の維持は困難であることが推測される。未分化性を保ったまま造血幹細胞にレトロウイルスベクターを導入するためには、今後さらに、添加するサイトカインの組み合わせを検討するとともに、立体的な細胞局在や、固層化した接着因子の添加など、あらたな試みによってnich環境をex vivoで再現できる培養法の確立が必要と考えられる。

一方、今回の検討で、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の作用について、ヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入の場合も、インテグリンの発現とその機能が重要であることが示された。今後さらに、CD34陽性細胞の導入過程におけるインテグリンの発現について解析を進め、より効率的にインテグリンを誘導する培養環境を設定していくことによって、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子幹細胞治療法の改良に寄与できることが期待される。

E. 結論

骨髄、臍帯血、末梢血の3つのソースに由来するCD34陽性細胞の造血幹細胞/前駆細胞の細胞特性について、表面抗原の観点からみた場合もそれぞれ異なった特徴を有することが明らかとなり、今後の遺伝子幹細胞治療では、対象疾患ごとにより適した造血幹細胞のソースを選択していくことが必要であるとともに、新たな観点から造血幹細胞を維持、増幅可能な培養系の開発を行ってゆくことが必要と考えられる。また、レトロネクチンを用いたヒトCD34陽性細胞へのレトロウイルスベクターの導入において、インテグリンの機能が必須であることが確認され、今後より高い効率の導入法を確立する上で、インテグリンの発現にも着目した導入法開発が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology*. 2008 Dec 125;(12):570-590.
- 2) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro. *Acta Haematologica*. 2008 ;120(3):134-145.
- 3) Katagiri YU, Sato B, Miyado K, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Kiyokawa N. Functional significance of stage-specific embryonic antigens in the development of preimplantation embryos. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 2008 Sep;20:131-139.

2. 学会発表

- 1) 堀内保臣, 宮川世志幸, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 免疫不全マウスを用いたヒト造血細胞に対する放射線照射生物影響の生体内解析系. 第50回日本小児血液学会, 千葉, 1月14-16日, 2008.
- 2) 恩田恵子, 片桐洋子, 藤本純一郎, 清河信敬. BAFFによるB細胞のCD20/BCL-2を介するアポトーシスの抑制. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1-3日, 2008.
- 3) 深渡瀬嘉洋, 豊田雅士, 宮川世志幸, 阿久津英憲, 大喜多肇, 清河信敬, 梅澤明弘. ヒト胎児肺組織線維芽細胞 (MR C-5) 由来多能性幹細胞の特性解析. 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月9日-11日, 2008.
- 4) Ozawa F, Shimomura M, Miyagawa Y, Hiroshima M, Lazic A, Kiyokawa N, Umezawa A, Nakatsura T, Tanaka S. A new approach for drug discovery and differentiation study using cutting-edge 3D cell culture system. The American Society of Cell Biology (ASCB) 48th Annual Meeting, San Francisco, Dec 13-17, 2008.
- 5) 廣山眞巳, 坂本るり子, 小澤ふじ子, 宮川世志幸, 金井彰彦, 窪田宣夫, 清河

信敬, 大喜多肇, 梅澤明弘, 宮崎達也, 宮内聡, 田中寛. ナノカルチャープレートを使用した初代前駆脂肪細胞の三次元培養. アディポサイエンス研究会シンポジウム, 大阪, 12月22日, 2008.

- 6) Ozawa F, Shimomura M, Miyagawa Y, Hiroshima M, Kiyokawa N, Umezawa A, Tanoue A, Nakatsura T, Tanaka S. A new approach for drug discovery and differentiation study using cutting-edge 3D cell culture system. The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 福岡, Dec 24-27, 2008.

H. 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

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： CGD の遺伝子幹細胞治療において、遺伝子導入細胞と活性酸素産生能の乖離が治療後重要な問題とされている。本研究はその発症に関わる抗 gp91 抗体を検出するため、遺伝子・タンパク質情報やパイオインフォマティクス技術を利用し、高精度・簡便な gp91 抗体診断用キットの開発を目的とする検討を行った。

A. 研究目的

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、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及びその有効性と安全性を検証することが計画されている。欧州を中心に遺伝子治療が実施されていた患者において、遺伝子導入細胞と活性酸素産生能細胞の乖離が治療後の重要な問題とされている。一方、CGD 患者は、gp91 遺伝子欠損による好中球の機能が障害されているが、T、B、樹状細胞を含めた他の免疫細胞が機能しているため、導入遺伝子により発現された gp91 蛋白質に対する特異的な抗体が出来ても、gp91 蛋白質発現細胞の排除によるものの可能性が否定できない。本分担研究は、その発症に関わると予測される抗 gp91 抗体を検出するため、遺伝子・タンパク質情報やパイオインフォマティクス技術を利用し、高精度かつ簡便な gp91 抗体診断用キットの開発および抗体産生機序の解明を目的とする。

B. 研究方法

抗 gp91 抗体診断用キットの開発のため、gp91phox に関する遺伝子情報を元に、抗原特異性、抗原性、安定性などを考慮し、検出に最適な gp91 の抗原領域の決定を行い、そのタンパク質の生産、精製、クオリティーチェックを行った。

1) gp91phox 遺伝子情報の収集とアライメント

抗原設計のために、公表されている gp91 アミノ酸配列を用いてマルチプルアライメントを行い、当該分子の構造および細胞内・外ドメインの配列を決定した。

2) アミノ酸一次配列からの適正評価
ターゲット gp91phox のアミノ酸配列の親水性、疎水性、抗原性、アクセシビリティなどを調査し、抗原としての適正を有しているかどうか確認した。

3) タンパク質発現系の検討

設計した抗原のリコンビナントタ

タンパク質をどのような手段で作製するのか検討を行った。

4) コドン最適化と発現ベクター構築

設計した抗原のアミノ酸配列を元に、選択した発現系（バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系）用のコドン最適化および遺伝子合成を行い、発現ベクターを構築した。

5) タンパク質の生産および精製

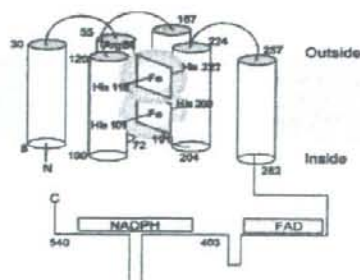
遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹より、タンパク質発現を確認し、ニッケルカラムにて精製後、抗 gp91 抗体診断用キットに利用できるかどうか検討した。

C. 研究成果

1) gp91phox 遺伝子情報の収集とアライメント

細胞外ドメインの部分を下記図 1 のように三つに分けた (#1, 30-48 (19aa) : YRVYDIPPKFFYTRKLLGS ; #2, 124-169 (46aa) : EWCVNARVNSDPYSVALSELG DRQNESYLNFAFKRIKNPEGGLYL ; #3, 222-261 (40aa) : HGAERIVRGQTAESLAVHNITVCEQKISEWGWKIKECPIPQ)。

図 1. gp91phox の分子構造



2) アミノ酸一次配列からの適正評価

前述の特異的な領域およびその近傍に関して、アミノ酸一次配列をもとに、親水性、疎水性、抗原性、アクセシビリティなどを考慮し、抗原としての適正を有しているかどうか確認したところ、特異的な領域を含めて、40 アミノ酸以上の領域を設計すれば、特に問題が無いことが確認できた (図 2)。

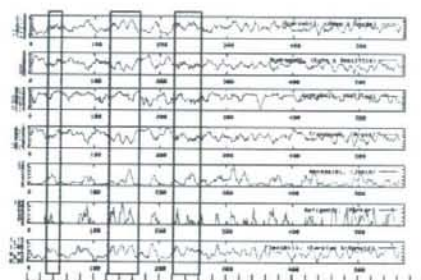


図 2. 抗原特異的領域

3) タンパク質発現系の検討

哺乳類のタンパク質構造に類似したリコンビナントタンパク質を、短期間で大量に得るための手段として、表 1 で示したような発現にて、それぞれの長短所において検討した結果、昆虫細胞の発現系を利用することを決めた。

発現系	長所	短所	対応策
大腸菌	遺伝子発現、大量発現可能 システムが容易 発現コストが低い	動物由来タンパク質の糖鎖付与が困難 タンパク質の折りたたみ効率低下	糖鎖付与 タンパク質の折りたたみ効率向上
酵母	分泌発現可能 大量発現可能 糖鎖付与可能 タンパク質の折りたたみ効率向上	動物由来タンパク質の糖鎖付与が困難 タンパク質の折りたたみ効率低下	糖鎖付与 タンパク質の折りたたみ効率向上
昆虫	動物由来タンパク質の糖鎖付与が可能 タンパク質の折りたたみ効率向上	動物由来タンパク質の糖鎖付与が困難 タンパク質の折りたたみ効率低下	糖鎖付与 タンパク質の折りたたみ効率向上
哺乳類	動物由来タンパク質の糖鎖付与が可能 タンパク質の折りたたみ効率向上	動物由来タンパク質の糖鎖付与が困難 タンパク質の折りたたみ効率低下	糖鎖付与 タンパク質の折りたたみ効率向上

糖鎖付与効率: 動物由来タンパク質の糖鎖付与効率 (100%)

表 1. 主な組み換えタンパク質発現系の特徴

4) コドン最適化と発現ベクター構築
タンパク質発現ベクターを構築するために、上記3種類の細胞外ドメインの二種類#2(124-169), #3(226-261)を選択し、図3で示したタンパク質発現ベクターを構築した。

設計したタンパク質抗原を、より多く、より安定に生産するために、昆虫細胞の発現系に最適なコドン配列を設計し、その塩基配列を有する遺伝子を合成し、バキュロウイルスベクターである His タグ付の pM04 ベクターに挿入した。

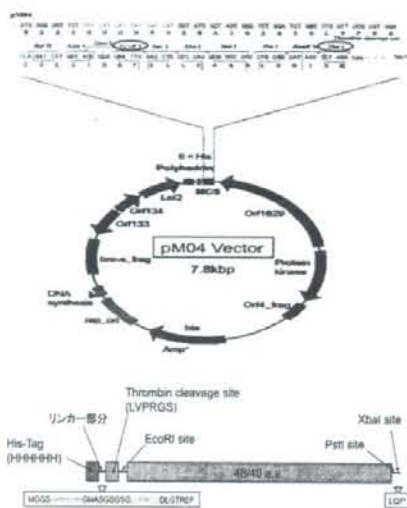


図3. タンパク質発現ベクター

5) タンパク質の生産および精製

遺伝子組換えウイルス感染カイコ蛹を、磨砕・可溶性処理後に超遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分を分離し、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで、目的のタンパク質の量や質の確認を行った。その結果、図4で示したように#2(124-169)、#3(226-261)

のいずれにおいても、SDS-PAGEおよび抗His抗体によるウェスタンブロットで結果目的のバンドと推測されるものの確認できた。しかし、予想と反して、その大半が不溶性画分から検出された。

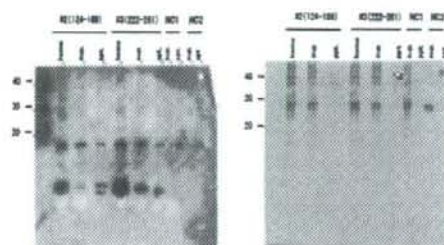


図4. カイコ蛹磨砕物でタンパク質の確認

生産できたタンパク質が不溶性画分に多く含まれていたため、不溶性画分を可溶化剤入りのバッファー(100mM NaP, 10mM Tris-HCl, 8M Urea, pH8.0)にて可溶化後、ニッケルカラムにて精製を行った。尚、精製は図5で示したフローにて行った。



図5. タンパク質精製フロー