

遺伝子解析に関しては学内の倫理委員会承認されており、家族への十分な説明と同意のもとに行なわれている。

C. 研究結果

好中球の活性酸素産生能検査を注意深く確認した頃、わずかなポピュレーションであるが活性酸素を産生する好中球を検出した (図 1)。

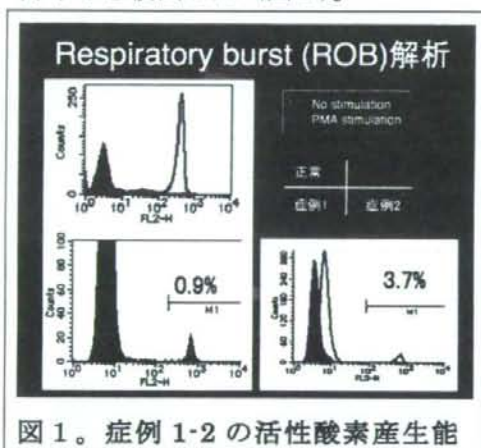


図 1. 症例 1-2 の活性酸素産生能

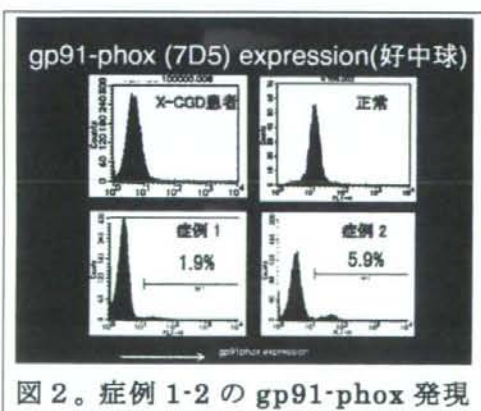


図 2. 症例 1-2 の gp91-phox 発現

また、責任分子である gp91-phox を検出したところ、同様の割合で陽性細胞

を認めた (図 2)。

正常細胞の性状を検索するため、細胞株を樹立 (EBV による細胞株、HVS による細胞株) して検討した。

EBV 細胞株の検索では症例 1,2 とも正常と思われる gp91-phox 陽性細胞の割合が、最終的に 50%、ほぼ 100% をそれぞれ示していた (図 4)。

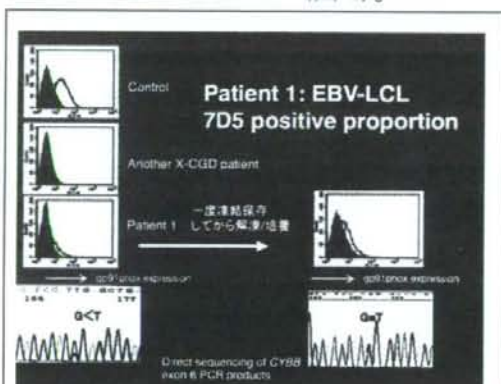


図 4-1. 症例 1

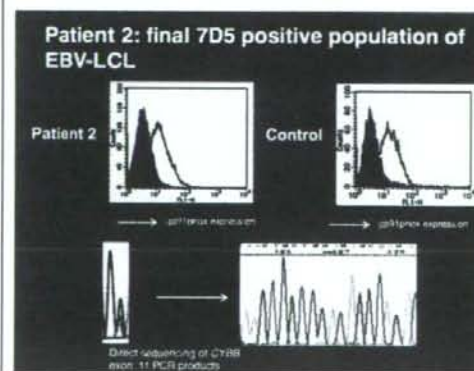


図 4-2. 症例 2

図 4. 症例 1-2 の EBV 細胞株の性状細胞のオリジンを確認する為に gp91-phox 陽性細胞の HLA 型を陰性細胞と比較したところ同一の細胞で

ある事が判明した。血液細胞以外でのモザイク状況を判定するため頬粘膜の状況をクローン解析した結果、両者ともに血液細胞よりもやや高率に性状の塩基配列を持つクローンが検出された(表2)。

表2. 頬粘膜でのモザイク状況

	症例1		症例2	
ROB陽性好中球	0.9%		3.7%	
TA cloning におけるCYBB WTの割合				
好中球	0%	(0/211)	7.3%	(4/55)
PBMC	0%	(0/10)	1.6%	(1/61)
頬粘膜	1.6%	(2/108)	18.8%	(8/32)

D. 考察

2症例のX-CGDにおいて活性酸素を産生するわずかの細胞集団を認め、モザイクによる現象である事が判明した。正常細胞は患者本人の細胞であり、変異部分が正常の塩基配列となっていた。これまで、いくつかの原発性免疫不全症などで親由来の変異が患者の一部の細胞にて解消し、その細胞集団が増加して検出されるリバージョンという現象が認められている。正常化した細胞の方が変異を持つ細胞よりも増殖優位性/生存優位性があるためにその細胞集団が検出可能となる現象と理解され、Wiskott-Aldrich症候群ではかなりの頻度で認められる事が判明している。しかし、X-CGDでは保因者の検討から正常/変異細胞の間には優位性の差がなく、このような現象は認めがたいと思われている。

本2症例は母が非保因者でもある事からもリバージョンではなく、受精卵からの胚形成の過程で一群の細胞に de novo で変異が生じた結果と考えられる。しかし、変異を持った細胞群がなぜ圧倒的な優位になったのか機序は不明である。逆の現象:ほんの一部の細胞にのみ gp91-phox に異常がある様な個体は検出困難であるのでこのような現象は稀ならず起こっている可能性は否定できない。

二症例ともにEBV細胞株を樹立して継代培養したところ陽性細胞が優位になった事は極めて興味深い。ある細胞種においてある条件ではgp91-phoxの存在が増殖/生存に優位に働く可能性を示唆しており、もしこのような条件がX-CGDの幹細胞遺伝子治療に応用可能であれば、遺伝子導入細胞に優位性を持たせ、より効率的に治療効果を引き出せる事を示唆している。

E. 結論

一部の細胞が活性酸素を産生するX-CGDモザイク2症例を検出した。細胞株においては正常細胞が増殖優位性を示し、これらの現象解明は遺伝子治療の治療効果の改善に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) Kida M, Fujioka H, Kosaka Y, Hayashi K, Sakiyama Y, Ariga T. The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the *C3* gene; a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency. *Blood Cell Mol. Dis.* 40. 410-413, 2008

2. 学会発表

1) 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.

2) Ariga T: HEMATOPOIETIC STEM

CELL GENE THERAPY FOR TWO PATIENTS WITH ADA DEFICIENCY WITHOUT CYTOREDUCTIVE CONDITIONING; 14th JSCT, 6-12-14, Sapporo, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

CGD造血幹細胞移植ガイドライン2008（案）について

研究分担者 布井 博幸 宮崎大学医学部小児科分野教授

研究協力者 水上智之¹⁾ 足立壮一²⁾ 中畑龍俊²⁾ 小林正夫³⁾

1) 宮崎大学小児科 2) 京都大学小児科 3) 広島大学小児科

研究要旨:慢性肉芽腫症の根治治療としては、造血幹細胞移植と遺伝子治療が模索されている。諸外国の造血幹細胞移植では血縁者でHLA一致ドナーが見つかった場合を適応と考え実施されている。しかし、日本の移植32症例での検討では、血縁、非血縁者間でのCY+Flu+low TBI前処置による造血幹細胞移植成績は良好であった。一方、この前処置には、その半数（5/10）でDLIが必要であり、GVHDの増悪や有効性の問題があった。今回全国移植施設の先生方との検討でこれらのことが問題となり、DLIが必要にならない様なL-PAMを加えた新たな前処置法（CGD造血幹細胞移植ガイドライン2008（案））を提案することになったので報告する。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症は難治性肉芽腫をきたす予後不良の疾患であり、根治療法としての遺伝子治療や、骨髄移植の確立が期待されている。骨髄移植については欧米の Seger ら (1) と Mitchell ら (2) の報告があるが、兄弟間または従兄弟間での HLA 一致ドナーでないと非常に移植成績が悪いため、遺伝子治療の開発が盛んである。2009 年 2 月の韓国ソウルでの CGD workshop でも、Joong-gon Kim ソウル大学医学部小児科教授も骨髄移植の危険性を強調されていた。しかし、特に骨髄非破壊的造血幹細胞移植法が導入されたことにより (3) (図 1)、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植は、近年症例数が急速に増加し、移植成績も向上している。

日本ではこれまで、1992 年から 15 年間で全 34 名移植行われた。この調査では、特に統一したガイドラインは無く、はじめは Bu+Cy を用いた骨髄破壊的造血幹細胞移植が、後半は種々の工夫を加えた Cy+Flu による骨髄非破壊的造血幹細胞移植が行われていた。これらの結果を踏まえて、日本では血縁 HLA 一致ドナーと HLA 一致の非血縁バンクドナーからの成績と変わらないことを明らかにし、これからの日

本での慢性肉芽腫症患者への骨髄移植に向けた移植ガイドライン案を報告してきた。しかし、この CY+Flu 前処置は、その半数 (7/14) でキメリズムの低下があり Donor lymphocyte infusion (DLI) が実施されていた。今回全国移植施設の先生方と DLI による副作用について検討を行い、更に世界での DLI の位置づけと、今後の日本で CGD 造血幹細胞移植ガイドライン 2008 (案) を提案することとした。

B. 研究方法

患者登録:本研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会の承認を得て行われた。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、32例について回答を得た。図表では移植が行われた時期の早い症例の順に番号をつけている。

回答のあった32例の初回移植について解析した。うち2例に再移植されていた。

C. 研究結果

図2に前回検討した「前処置法とHLA一致度による移植結果のまとめ」を示している。Busulfanを前処置

に用いた骨髄破壊的前処置で行われた移植は15症例であった。この前処置移植群では初回移植で6例が死亡している。2例（患者5、18）は生着不全で、3例（患者6、8、32）は生着にもかかわらず感染症で、1例（患者9）は途中順調であったが、移植4年後に横紋筋肉腫を併発して死亡された。

Fludarabinを用いた非骨髄破壊的前処置で行われた初回移植は17例で、死亡例はなかった。ただ、拒絶のため再移植された症例が2例あり、患者15は、BU+Flu+ATG前処置にて1座不一致母親から末梢血幹細胞移植されたが、2年で拒絶された。再移植が3回行われたが生着せず感染にて死亡された。患者21はBU+Flu+TBI前処置で、非血縁臍帯血の再移植され成功している（図2）。

移植症例の内、Cy+Flu処置を行った症例は14例であった。そのうち、Irradiation前処置なしの症例は患者10、12の2例で、total lymphoid irradiation (TLI)前処置が行われていた患者16、19である。Low dose total body irradiation (low TBI)前処置を行った症例については、DLIに関する問題は有ったが、いずれも結果的に完全ドナータイプになっている。

これらの移植成績結果から（図3）、low TBI がキメラ解消には必要であることが明らかであった。

しかし、low TBIを行った10例でも、患者14、17、23、26、33の5例でDLIが必要であった。その内、患者14、23、26、33の4例では比較的早い段階で（1ヶ月～5ヶ月）単球細胞でのキメリズムが低下したため、DLIを行い、効果が認められていた（図4）。しかし、患者26ではDLI後にドナー有為に出来たものの、重度のGVHDが誘発されている。効果が認められなかったのは患者17であり、1年以上に渡って、単球細胞のキメリズムが60%を下らなかつたため、顆粒球のキメリズムが低下しているに関わらず、DLIを行わず、経過を見た症例である。結果1年以上経ってからDLIを行っているが、あまりはっきりした効果は得られていない。汎血球減少症を伴っており、自己抗体の確認がされたため、Rituximabが使用され、full donor typeに回復し

ている。以降良好な状態を保っている。

このようにDLIはCy+Flu+low TBIを受けた10症例中5例で実施された、3例が有効に作用したようだが、1例は副作用が著明に現れ、他の2例では1年以上経ってDLIが実施されており、ほとんど効果がなかった。

D. 考察

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植は、近年症例数が急速に増加し、移植成績も向上している。日本では、抗真菌剤および抗生物質治療抵抗例に対してやむを得ず移植した症例が多く、年齢別では15歳以下の低年齢者に死亡例が多くなっていった。移植前に現存の感染症を可能な限り鎮静化させることが重要である。

非血縁からの造血幹細胞移植も同胞からの移植結果と遜色がないこと、Cy+Flu+low TBIにより、良好な移植結果が得られていることを、昨年報告した。しかし、上記の様に、Cy+Flu+low TBI前処置を受けた10症例中5例でDLIが実施された、3例が有効に作用したようだが、内1例は副作用が著明に現れ、1年以上経ってDLIが実施され他の1例では、ほとんど効果がなかった。Mackinnon S.ら(4)は慢性骨髄性白血病の治療にBMTにつづきDLIを行うと70%の沈静化が得られるが、DLIの評価は効果と副作用の割り合いから考えられるべきであると述べている。これまでの報告ではDLI関連死は20%で、二次的なaplasiaやGVHDが各々50%、90%に見られるとされている。10⁷ cell/KgのDLIは副作用を1/10に低減出来るし、CD8+を除いたDLIではGVHDの発生率を軽減出来る。しかし、その治療のスケジュールについてはまだはっきり決まっていなし、副作用に関連する因子は病気の時期、インターフェロンの使用、非血縁、HLA、T細胞の量、移植後のタイミングなどによっているとも言われている。DLIに関しては移植後のT細胞療法の一つとして種々の可能性が考えられており、もっと工夫が必要だと考えられた(5)。

DLIの効果がそれ程著明でなかったこと、また副作用も認められたことから、DLIに頼らない非骨髄破壊的前処置 (Cy+Flu+low TBI)に代わる前処置レジメが

必要だと、各施設からの反省の声が上がり、今後、慢性肉芽腫症の造血幹細胞移植の手助けになればと考へ、L-PAMを加えた新たなCGD造血幹細胞移植ガイドライン2008(案)を提出した。

E. 結論

慢性肉芽腫症の根治療法の一つとして造血幹細胞移植法が急速に発達している。一方遺伝子治療法についてはまだ約20名に近い患者に実施されたところである。競うい合う様な両治療法の発達を臨床でどう取り入れていくのか、常に情報を共有しながら進んでいきたいと考えている。

図表の説明

図1. 骨髄非破壊的造血幹細胞移植前処置法

略語: NST; Non myeloablative stem cell transplantation, RIST; Reduced intensity stem cell transplantation, myeloablative; myeloablative stem cell transplantation, Flu; fludarabine Cy; cyclophosphamide Mel; melphalan BU; busulfan Giralt Sら(5)による

図2. 前処置法とHLA一致度による移植結果のまとめ

図3. 放射線照射方法による移植結果

図4. DLIを行った症例のまとめ 矢印はDLIを行った時期を示す。

図5. CGD造血幹細胞移植ガイドライン2008(案)

参考文献

- 1) Seger RA, et al. *Blood* 100:4344, 2002
- 2) Mitchell E, Horwitz et al. *New Engl J Med.* 344:881, 2001
- 3) Giralt S, *Int J Hematol.* 76 Suppl 1:368-75. 2002
- 4) Mackinnon SB., *Clin Haematol.* 10(2):357-67. 1997
- 5) Kennedy-Nasser AA, et al. *Bone Marrow Transplant.* 40: 93-104. 2007

その他の研究協力者:

- 1) 札幌医科大学小児科 鈴木信寛、2) 東北大学加齢医学研発達病態 藤原 亨、3) 福島県立医大小児科 望月一広、4) 茨城県立こども病院 土田昌宏、5) 千葉大学小児科 石

和田稔彦、6) 国立成育医療センター 村山静子 小林信一、7) 埼玉県立小児医療センター 冠木智之、8) 神奈川県立こども病院 鹿間芳明、9) 横浜市立大学小児科 黒木文子、10) 東海大学小児科 矢部普正、11) 浜松医科大学小児科 渡辺千英子、12) 富山大学小児科 野村恵子、13) 京都府医大小児科 森本哲、14) 大阪市立総合医療センター 迫正広、15) 奈良県立医大小児科 岸本朋子、16) 広島大学小児科 三木瑞香、17) 愛媛大学小児科 寺岡いづみ 田内久信、18) 兵庫県立こども病院 長谷川大一郎、19) 愛媛県立中央病院 武市京子

F. 研究危険情報

G. 研究発表

<2008年度論文>

1. Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase. Kuribayashi F, Tsuruta S, Yamazaki T, Nunoi H, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Nakamura M. *Genes Cells.* 13:1249-1256. 2008.
2. Segawa disease with a novel heterozygous mutation in exon 5 of the GCH-1 gene (E183K). Ikeda T, Kanmura K, Kodama Y, Sawada K, Nunoi H, Hasegawa K. *Brain Dev.*31:173-175. 2008.
3. 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. Gono T, Yazaki M, Agematsu K, Matsuda M, Yasui K, Yamaura M, Hidaka F, Mizukami T, Nunoi H, Kubota T, Ikeda S. *Intern Med.* 47(11):1053-6. 2008.
4. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, Morio T, Kosaka Y. *Int J Hematol.* 87(1):88-90. 2008.
5. 水上智之、原発性免疫不全症候群の感染予防と感染症治療 *小児科臨床* 91(9):1751-1755,2008.

H. 知的財産圏の出現・登録状況、参考文献

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

分担研究者 久米晃啓 自治医科大学准教授

研究要旨

染色体へのベクター挿入による発癌リスクを低減するため、ヒト第19番染色体長腕に存在するクロマチンインシュレータ配列の利用を検討した。インシュレータで挟んだ遺伝子発現カセットを逆向きに搭載すると、レトロウイルスベクターのタイターは著しく低下した。一方、導入遺伝子のヘテロクロマチン化を防ぐのに有効なインシュレータの配置方向は、発現カセットの上流側・下流側とも同方向で良いことがわかった。従って、通常の自己不活化型レトロウイルスベクター作製法に準じ、本インシュレータ配列を利用して順方向のベクターを構築するのが良いと考えられる。

A. 研究目的

現在、幹細胞遺伝子治療において長期効果が期待できるのは遺伝子組込み型ベクターに限られるが、染色体挿入部位近傍遺伝子の異常活性化に基づく発癌が問題になっている。これを回避するための一方策として、遺伝子間の干渉を防ぐシスエレメントであるクロマチンインシュレータの活用があげられる。そこで、ヒト第19番染色体長腕端部に存在するインシュレータ配列について、レトロウイルスベクターに搭載する際の配置自由度、および導入遺伝子の発現持続性について検討した。

B. 研究方法

ヒト第19番染色体長腕端部のAAVS1領域から、インシュレータ活性をもつ0.3kbの断片をクローニングした。導入遺伝子として、サイトメガロウイルスプロモータ支配下に緑色蛍光蛋白質(GFP)とネオマイシン耐性遺伝子(G418耐性を賦与)を同時に発現し、ポリAシグナルを有する発現カセットを構築した。このカセットの5'側と3'側に、それぞれ順方向(5'テロメア側-3'テロメア側)または逆方向(5'セントロメア側-3'セントロメア側)にインシュレータを接続したもの(2x2=4通り)を自己不活化型(SIN)レトロウイルスベクター骨格に組込んだ。比較対照用に、インシュレータ配列をもたない、発現カセットのみを組込んだレトロウイルスベクターも作製した。いずれの場合も、発現カセットの独立性を保つためと、ポリAシグナルの影響を避けるため、カセットはレトロウイルスゲノムの転写とは逆方向に挿入した。これら5種類

のベクターをレトロウイルスパッケージング細胞にトランスフェクトし、得られたウイルス上清を用いてK562白血球細胞への遺伝子導入を試みた。並行して、5種のベクタープラスミドを、電気穿孔法にて直接K562細胞にトランスフェクトし、G418耐性クローンを分離してGFP蛍光強度の推移を長期観察した。

C. 研究結果

発現カセットを挟むインシュレータ配列の有無や方向によってベクタープラスミド構築中に組換えや欠失が起こることはなく、5種のプラスミドは作製できた。しかし、これらをパッケージング細胞にトランスフェクトしたところ、上清中のウイルスタイターは極めて低く、多数のK562細胞への感染が成立したのはインシュレータなしのベクターのみで、他のベクターで得られたクローンはごく少数だった。

一方、ベクタープラスミドの直接トランスフェクションでは、それぞれ多数のG418耐性細胞を得た。これらK562細胞からGFP高発現クローンを多数選んだ後、培地からG418を除いて選択圧のかからない状況で、導入したGFP遺伝子の発現を長期追跡した。インシュレータなしで中等度以上の発現を維持した頻度(27%)に比べ、インシュレータで発現カセットを挟むと発現を維持する率が上昇する傾向にあった(順-順45%、順-逆40%、逆-逆82%、逆-順50%)。すなわち、発現カセットの逆向きインシュレータ配列ではさんだものが最も発現維持に有効であった。

D. 考察

今回構築を試みたレトロウイルスベクターのタイターが著減したのは、(1) 一般に SIN ベクターは高タイターを得にくい、(2) 発現カセットの転写とレトロウイルスゲノムの転写とは逆向きであるためアンチセンス効果によりタイターが低下する、という2つのマイナス要因が重なったためと考えられる。ベクターの安全性向上のために SIN 化は必要であり、(1) は容認せざるを得ない。一方、「逆方向インシュレーター-発現カセット-逆方向インシュレーター」という配置の成績が良かったという実験結果から、(2) は回避可能である。すなわち、3' LTR の一部を逆方向インシュレーター配列で置き換え、逆転写に伴うコピー&ペースト現象を利用して発現カセット(レトロウイルスゲノム転写と同じ方向にしてポリ A シグナルを除く)を挟めばよい。このようにして、ベクターの SIN 化とインシュレーターの利用を同時に実現しつつ、タイター低下を最小限に押さえることが出来ると考えられる。

E. 結論

レトロウイルスベクターの挿入変異・発癌リスクを低減する改良策の一つとして、ヒト19番染色体に存在するクロマチンインシュレーター配列が有効との示唆が得られた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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*, 1-9, 2008

2. 学会発表

- 1) 小倉剛、水上浩明、濱田洋実、吉川裕之、小澤敬也、久米晃啓: AAV ベクター腹腔内投与によるフェニルケトン尿症に対する新生仔遺伝子治療。第60回日本産婦人科学会学術講演会、平成20年4月、横浜。(日産婦誌60:723, 2008)
- 2) 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)
- 3) Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Ito T, Ozawa K: Full restoration of in vivo oxidative activity for phenylalanine in self-complementary AAV vector-treated phenylketonuria mice. 第14回日本遺伝子治療学会、2008年6月、札幌。(Abstract #070)
- 4) 久米晃啓、八木洋也、水上浩明、卜部匡司、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。日本人類遺伝学会第53回大会、2008年9月、横浜。(抄録集 p127)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。

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

研究分担者 大津 真 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 助教

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、半致死量放射線照射におけるマウス骨髄競合的再構築アッセイを利用して、CGD 原因遺伝子産物 gp91phox 蛋白への CGD 個体による免疫拒絶に関する検討を行った。長期における検討にはまだ日を要するものの、移植後 8 週目の時点においては、導入遺伝子産物に対する免疫拒絶を示唆するデータは得られていない。2) 遺伝子導入細胞における機能修復の程度と導入遺伝子の発現量の関係についての検討も開始した。CGD 好中球における PMA 刺激下での活性酸素産生量を評価する系として、従来の DHR ではなく、新たな色素 APF を用いたアッセイについて至適化を行った。結果、APF 法では自家蛍光による発色が少なく、長時間のアッセイにおいても安定した蛍光強度を保つことが判明した。興味深いことに、マウスモデルを用いた遺伝子治療モデル移植において末梢血好中球を解析したところ、導入遺伝子の高発現集団は APF 陽性、導入遺伝子の低発現遺伝子集団では APF 陰性を示し、導入遺伝子発現量と活性酸素産生量との間に直線的な相関は認めず、むしろ機能修復に必要な gp91phox 蛋白の発現量における閾値の存在を示唆するデータが得られた。以上より、CGD 遺伝子治療における治療効果改善の方策として、1) 免疫拒絶は大きな障壁とはならない可能性があり、移植時に必要最低限の骨髄前処置を用いて、2) 導入遺伝子の発現量を個々の細胞において必要レベル以上に保つよう、使用するベクターの種類、および導入コピー数を至適化する、ことが重要と考えられた。

A. 研究目的

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。

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。

以上の 1) を明らかにするため、競合的骨髄再構築アッセイ (CRA) を行い、前年度に概要を報告した。2008 年度は、上記 2) を検証する目的で、レシピエントに Ly5.1/5.2 F1 CGD マウスを用いて、半致死量放射線照射を行い、Ly5.1 マウス骨髄細胞と同数の a) Ly5.2 野生型マウス骨髄細胞、b) Ly5.2 CGD マウス 骨髄細胞を移植した。

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. マウス遺伝子治療モデルとして、CGD マウス骨髄より幹/前駆細胞を採取し、レトロウイルスベクターにより、gp91phox 遺伝子を導入した。導入細胞の同定

は、マーカーとしての kusabira orange (KO) の発現を用いた。コントロールとして KO 単独発現ベクターを用いた。4 週目以降に末梢血を採取し、APF を用いて染色を行い、PMA により刺激を行った。A PC-Gr-1 抗体で同時染色を行い、Gr-1 陽性細胞における活性酸素産生能を APF 染色強度と KO 蛍光強度の多重解析により評価した。

C. 研究結果

1. 計画に従い、移植実験を行った。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における Ly5.2/Ly5.1 + Ly5.2 キメリズムは 10-70% であり、個体間での比較的大きなばらつきが観察されたが、個々のマウスにおいては、8 週までの解析ではキメリズムの明らかな変動、特に免疫拒絶で予想される、b) 野生型骨髓細胞移植群における Ly5.2 キメリズムの低下はみられなかった。

2. CGD マウス骨髓より採取した幹/前駆細胞へのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率は 90% 以上であり、致死量放射線照射 CGD マウスに移植することで良好な造血再構築が観察された。8 週時点での末梢血の解析ではコントロールベクター導入群における好中球での KO 発現陽性率はほぼ 100% であった。一方、gp91phox ベクター導入群では KO 蛍光強度はやや減弱したものの、KO 非導入細胞との比較からは、同様にほぼ 100% の遺伝子導入効率が得られたものと考えられた。これらのマウスの末梢血において新規活性酸素測定色素である APF を用いたアッセイを行った。結果、興味深いことに、gp91phox ベクター導入 CGD マウスにおいては、APF 陽性好中球と APF 陰性好中球の 2 つの分画が観察された。APF 陽性好中球における APF 蛍光強度は、遺伝子非導入またはコントロールベクター導入 KO 陽性正常マウス好中球と同等であり、また、APF 陰性 KO 弱陽性好中球における APF 強度は、遺伝子非導入またはコントロールベクター導入 CGD マウス好中球と同等であった。

D. 考察

1. 前年度までの検討で、CGD マウス骨髓造血幹細胞と、野生型造血幹細胞との間には、競合的骨髓再構築アッセイにおける骨髓再構築能の差を認めなかった。今回、CGD マ

ウスによる gp91phox 発現細胞の拒絶の可能性を考えて、移植系を構築し、実験を行ったが、まだ観察期間は十分とは言えないものの、免疫拒絶を示唆する結果は得られていない。このことより、CGD 遺伝子治療において、機能修復され活性酸素産生能を獲得した好中球の割合が経過とともに低下する現象の原因として、1) CGD 造血幹細胞における再構築能優位性、2) gp91phox 発現細胞に対する免疫拒絶、のいずれの可能性も否定的であると言える。

2. CGD 遺伝子治療の有効性の向上を検討する場合、遺伝子導入陽性細胞の割合と機能修復細胞の割合との不一致について考慮する必要がある。単純には、導入遺伝子の発現がサイレンシングにより停止する現象が理解しやすいものの、これらの発現停止が想定されるより早い時期での機能修復細胞数の低下がしばしば観察される。このことから、導入遺伝子より発現される gp91phox の発現量がある閾値を越えないと活性酸素産生能の獲得には至らないのではという仮説をたてて実験を行った。従来の活性酸素産生の検出試薬 DHR においては、自家蛍光が強く、マルチカラー解析には適していなかったことから、新規の色素 APF を用いて多重解析を至適化した。結果、KO 陽性で APF 陽性好中球と、KO 弱陽性で APF 陰性好中球の 2 つの分画を観察することが可能であった。APF 陽性集団内では、APF 強度は一定であり、集団内での KO 蛍光強度による活性酸素産生能の差は認めなかった。一方、KO 弱陽性集団では一様に APF 陰性であり、機能修復に必要な gp91phox 産生量に閾値が存在することを示唆した。KO 弱陽性集団における gp91phox 発現量の評価、確認等、検討中である。

E. 結論

1. 至適化した移植モデルにおいて、CGD マウスは gp91phox 発現細胞に対する免疫拒絶を示さなかった。

2. レトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療モデルにおいて、新規蛍光色素 APF を用いることによって、活性酸素産生能再構築に必要な gp91phox 発現量に閾値が存在する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Otsu M and 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

Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, et al. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. Cytokine. 2009.

2. 学会発表

S Suzuki, M Otsu, 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

M Otsu, 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

Y Takeuchi, M Otsu et al. Development of a Safe and Effective Stem Cell Transplantation Strategy by the Use of Antibody-Based Minimum Intensity Preconditioning and Delayed Infusion of Suicide-Gene Transduced Donor T Lymphocytes in the Mouse Model of X-linked Chronic Granulomatous Disease (X-CGD). Annual Meeting of European Society of Gene and Cell Therapy. Brugge, Nov 13, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

分担研究者 藤本純一郎 国立成育医療センター研究所副所長

研究要旨

難治性疾患に対する遺伝子治療を推進する基盤として、細胞培養室ならびに専用実験室を整備した。また、遺伝子治療実施の前提となる基礎研究を実施するための人員を確保するとともに、国立成育医療センター内でのプロジェクトチーム構築を図った。

A. 研究目的

国立成育医療センターにおいて遺伝子治療を実施するための基盤整備を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 専用培養室等実験室整備

研究所長等幹部ならびに予算委員会等と協議しながら整備を進めた。

2) 専従研究者配備

研究所長と協議しながら進めた。

3) 国立成育医療センター内体制整備

関係診療科医長等と協議し実施体制整備について一定の見解を出した。

C. 研究結果

1) 専用培養室等実験室整備

研究所内に遺伝子治療専用の培養室を整備した。広さ約 8mx6m の実験室を改装し、バイオハザード、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、前室、器材等保管スペース等を設置した。

2) 専従研究者配備

研究所長との協議の結果、平成19年度より研究所に所属している流動研究員1名を遺伝子治療専任者として配置したが、平成20年度も引き続

き1名を配置した。当該研究員は、発生・分化研究部長ならびに成育遺伝研究部遺伝子診断治療研究室長の指導の下に遺伝子治療に係る予備的研究を実施した。

3) 国立成育医療センター内体制整備

今回、慢性肉芽腫症患者に対し、自己の造血幹細胞への遺伝子の導入と移植による遺伝子治療を実施するためのセンター内体制整備について関係診療科と協議を行った。その結果、今回の遺伝子治療実施に関する責任医師について候補者を決めた。

D. 考察

遺伝子治療に実施にあたっては、施設全体として支援する体制整備が必要である。本年度、患者由来細胞を操作する培養室ならびに予備実験に供するための実験室を確保するとともに、主として予備実験を担当する研究員を配置することができた。また、施設内の責任体制についても一定の合意が形成された。以上のごとく、着々と施設内体制整備は進んでいる。

E. 結論

遺伝子治療専用培養室の確保、人員の確保ならびにコンセンサス形成に進捗が見られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Kikuchi A, Mori T, Fujimoto J, Kumagai M, Sunami S, Okimoto Y, and Tsuchida M. Outcome of childhood B-cell non-Hodgkin's lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with the Tokyo Children's Cancer Study Group NHL B 9604 protocol. *Leukemia and Lymphoma.* 49(4):757-62, 2008.

Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A and Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol. Cell Biol.* 28(7):2125-37, 2008.

Tsuji Y, Kogawa K, Imai K, Kanegane H, Fujimoto J and Nonoyama S. Evans syndrome in a patient with Langerhans cell histiocytosis: possible pathogenesis of autoimmunity in LCH. *Int. J. Hematol.* 87(1):75-77, 2008.

Nonomura C, Kikuchi J, Kiyokawa N, Ozaki H,

Mitsunaga K, Ando H, Kanamori A, Kannagi R, Fujimoto J, Muroi K, Furukawa Y, Nakamura M. CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL-1. *Cancer Res.* 68(3):790-9, 2008.

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(4):570-90, 2008. Epub 2008 Jun 6.

Yang L, Fujimoto J, Qiu D, Sakamoto N. Childhood cancer in Japan: focusing on trend in mortality from 1970 to 2006. *Ann Oncol.* 20(1):166-74, 2009. Epub 2008 Aug 20.

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 Haematol.* 120(3):134-145, 2008. Epub 2008 Nov 28.

Yang L, Fujimoto J, Qiu D, Sakamoto N. Trends in cancer mortality in Japanese adolescents and young adults aged 15 to 29 years, 1970-2006. *Ann Oncol.*, in press. [2009 Jan 15 Epub ahead of print]

藤本純一郎、堀江 弘. 小児腫瘍のグループスタディーと病理. *病理と臨床*, 26(9) : 969-974, 2008.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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

慢性肉芽腫症に対する幹細胞遺伝子治療法の開発と臨床応用

分担研究者 岡田（岩田）真由美 東京都立東大和療育センター小児科 医師

研究要旨 本研究の主任研究者らは、平成19年度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」において、慢性肉芽腫症(CGD)を対象疾患として、遺伝子治療臨床研究の被験者選定基準を定め、実施計画書を作成した。モデルとしたドイツの臨床研究で重大な有害事象の発生が確認されたため、使用するレトロウイルスベクターを含め、実施計画の変更が必要となった。結局、過去に重大な有害事象が見られていない米国国立衛生研究所(NIH)の Malech 博士らが作製したベクターを用いて、日本・米国・欧州の国際多施設共同臨床研究を行うことになった。本年度は、新しい実施計画書の作成のために、当該遺伝子治療に関する内外の情報を収集し、実施計画書および臨床研究参加候補者に対する説明書類を作成した。

A. 研究目的

X連鎖慢性肉芽腫症に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実施計画書および臨床研究の参加候補者に対する説明書類（同意書を含む）を作成し、わが国の難治性小児先天異常症に対する遺伝子治療臨床研究実施体制を確立する。

B. 研究方法

- 1) これまでに、米国、欧州、韓国において慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究が実施されている。各国の遺伝子治療の実施状況、治療効果、有害事象発生の有無、被験者の経過等について、当該国の研究者と討議を行い、情報収集する。
- 2) 収集した情報をもとに、遺伝子治療実施計画書および被験者説明書類を作成する。
- 3) Malech 博士らが作製したレトロウイルスベクターMFGS-gp91の安全性および効果については、米国の臨床研究において既に検証されているが、ウイルスの安全性試験について

は、本邦でも実施するため、その実施体制を確立する。

（倫理面への配慮）

本研究で作成する実施計画書および説明文書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守し、国立成育医療センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会で科学的および倫理的妥当性について慎重に審議される。

C. 研究結果

- 1) 米国の遺伝子治療臨床研究：1995年 Malech 博士らは、MFGS-p47レトロウイルスベクターを用いて p47^{phox}欠損型 CGD 患者5名に遺伝子治療を実施した。単回の遺伝子治療で、約1ヶ月後に活性酸素産生能をもった好中球が末梢血中に0.01%程度出現し、1~2ヶ月間持続したのち消失したと報告されている (Malech HL et al. Proc Natl Acad Sci USA. 94, 12133-8, 1997)。その後末梢血幹細胞の動員方法や遺伝子導入方法の改良を経て、1998年に再び Malech 博士らは、当該遺伝子治

療で使用されるレトロウイルスベクターと同じ MFSG-gp91 を用いて、gp91^{prox} 欠損型患者 5 名に遺伝子治療を実施した。遺伝子導入効率は、目覚ましい改善が見られたが、遺伝子導入細胞に Selective advantage がないために、活性酸素産生能は最高でも 1% 以下であった (Malech HL et al. Jpn J Infect Dis 57: 27-8, 2004)。

2006 年末から、本研究で計画している遺伝子治療とほぼ同一のプロトコルの遺伝子治療が開始された。1998 年実施の遺伝子治療と同じレトロウイルスベクター MFSG-gp91 を使用し、前処置薬として静注用ブスルファン 10mg/kg を使用した。1 症例では、ロット番号 1 のウイルス上清を使用し、遺伝子導入効率は 73% で、投与後 6~8 週に 1% 程度に減少した。治療後 3 週の末梢血活性酸素産生細胞は 24% であったが、その後漸減し、6 か月後に 1.12% まで減少した (第 49 回米国血液学会報告)。治療後 2 年となる現在も約 1% を維持している。治療後 1 年半の遺伝子マーキングでは、骨髓細胞の定量 PCR の結果は 1% であったが、染色体異常は検出されていない。レトロウイルスの挿入部位の検索を経時的に行っており、70 か所の挿入部位を検出したが、MDS 遺伝子近傍への挿入は一度のみであった。その継続性は不明で、MDS1 近傍へ挿入したクローンの増殖優位性は今のところ見られていない。臨床的には、治療後 4 ヶ月でブドウ球菌による肝膿瘍が縮小し、現在も健在である。もう 1 症例は、使用したロット番号 2 のベクターのタイターが低く、遺伝子導入効率は 30% であった。活性酸素産生細胞も最高で治療後 2 週に 5.2% までしかあがらず、3 週後に急速に消失した。遺伝子治療後約 4 か月に、重症感染症のため死亡したが、レトロウイルスの insertional mutagenesis を疑わせる所見はなく、遺伝子治療との因果関係はないと考えられている。

2)-1 ドイツで行われた臨床研究: 2004 年にはドイツの Grez らがブスルファン (8mg/kg) を使って骨髓非破壊的前処置を行い、26 歳 (症例 1) と 25 歳 (症例 2) の患者にレトロウイルスベクター SF71gp91 を用いた遺伝子治療を実施した。活性酸素産生細胞は、それぞれ正常細胞の 55% と 35% の機能が再構築された。症例 1 は治療後 50 日に黄色ブドウ球菌による肝膿瘍が消失し、症例 2 は 53 日に肺アスペルギルス症が消失した。治療後約 2 年で 2 症例とも、活性酸素産生能が徐々に低下し、導入遺伝子の陽性率と相関しなくなった。LAM-PCR によるベクター挿入部位の解析では、治療後 6 ヶ月までベクターゲノムが挿入されたクローンが多数存在していたが、経過とともにクローン数が減少し、特定のクローン由来の好中球が活性酸素を産生し、かつ増殖優位性を持つようになった。特定のクローンは時期によって変化し、骨髓性白血病発症に関連するがん原性遺伝子 *MDS/Evi1* と *PRDM16* 近傍へ挿入されたクローンが多く認められた (Ott MG, et al. Nat Med 12: 401-9, 2006)。症例 1 は、485 日頃から汎血球減少症が見られ、547 日頃から骨髓の低形成が見られたが重症感染症の罹患はなかった。729 日の顎骨膿瘍摘出術後に敗血症になり、820 日に死亡した。死亡時の骨髓および剖検組織からは、芽球細胞は検出されなかった。保存検体で、染色体の SNP アレイと FISH 検査を行ったところ、646 日の骨髓で 7 番染色体が 1 本 (モノソミー 7) の細胞が検出された。死亡時の骨髓細胞は 80% がモノソミー 7 であった。症例 2 は、777 日に汎血球減少症を認め、982 日の骨髓で単核球の 50% がモノソミー 7 であったが、芽球は認めなかった。1240 日の骨髓で 5% の芽球を認め骨髓異形成症候群と診断された。症例 2 は、その後 HLA 適合ドナーが見つかり移植を受け、造血障害も CGD も治癒し、良好な経過をたどっている (私報)。

2)-2 スイスの臨床研究：2004年、スイスの Seger らは、ドイツとおなじプロトコールでアスペルギルス脊椎炎により対麻痺のある5歳の男児に遺伝子治療を行った。活性酸素産生能は、治療後3週には16%あったが、その後急速に減少し1%前後となった。しかし麻痺は解消され、臨床的には著効であった(私報)。この症例は、遺伝子マーキングも最高5%で、その後1%以下になっており、特定のクローンの増殖もなく、造血障害は起っていない。スイスでは、ドイツの症例で有害事象が起った後に、治療抵抗性の肺感染症のある8歳のCGD患者に対して、SF71gp91を使った遺伝子治療を行っている。遺伝子導入効率は、当初30%であったが、その後90%まで増加しているという。特定のベクターの挿入部位として、CAMTA1 検出されているが、まだ治療後日が浅いため、詳細はまだ不明である(私報)。

2)-3 イギリスの臨床研究：2001年、英国 Institute of Child Health の Thrasher 博士らがX-CGD患者1名にメルファラン(140mg/m²)による骨髄非破壊的前処置の後、米国 NIH の Malech 博士から供与された MFGS-gp91 ベクターを用いた遺伝子治療を行った。治療によって再構築された活性酸素産生細胞は1%程度であったが、肺アスペルギルス感染症が改善し、臨床的に有効であった。治療1年後には活性酸素産生細胞は検出できなくなったが、遺伝子マーキングは長期にわたり検出され、2007年12月時点で、1%未満だが認めている。患者は、CGD腸炎に罹患しているが、現在も健在である(私報)。

その後、2005-6年に、前処置にメルファランを使ったSF71gp91ベクターによる遺伝子治療が2例に行われたが、遺伝子マーキングが1%以下で臨床的効果もなかったという(私報)。さらに、イギリスでも、ドイツの有害事象の報告後に、重症感染症で治癒の見込みのない

患者に対し、患者の利益と危険性について十分に検討した上で、SF71gp91ベクターを使って遺伝子治療を行い救命しえた(私報)。

3) 韓国の遺伝子治療：韓国では、ソウル国立大学のKim博士らによって開発されたMT-gp91レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究が2007年より開始された。前処置薬としてブスルファン6.4mg/kgとフルダラビン120mg/m²が使用され、2009年1月現在までに2例(18歳と9歳)に実施している。活性酸素産生細胞は、それぞれ2週間後に6.4%と14.6%であった。3か月後には1%まで減少し(第14回日本遺伝子治療学会報告)、治療後1年半と1年の現在1%以下となっている(第50回米国血液学会報告)。治療効果についての詳細は明らかにされていないが、2症例とも生存しており、造血障害はおこっていない。

4) 日本の遺伝子治療臨床研究：平成19年度の本研究の報告書に記した通り、当初、本研究は、ドイツの遺伝子治療臨床研究をモデルにSF71gp91レトロウイルスベクターを使用する予定であったが、ベクターに関連する重大な有害事象が発生した。使用するウイルスベクターの変更が必要となり、米国 NIH の Malech 博士に共同研究の申し込みをした。米国食品薬品局(FDA)や臨床研究の専門家とも討議を重ね、日米欧の国際多施設共同臨床研究を実施することになった。昨年度に作成した実施計画書および被験者説明文書・同意書を国際共同臨床研究に適合するように変更を加え、作成した。大きな変更点は、使用するウイルスベクターがMFGS-gp91となったこととブスルファンの使用量が10mg/kgになったことである。また、ブスルファン投与方法が、米国では5mg/kg/日(1回で投与)×2日間に対し、日本では、体重別に以下のように投与する。

体重 (kg)	一回の投与量	総投与量 (回数)
10 ≤ 体重 ≤ 23	1.00mg	10mg (10回)

23 < 体重 ≤ 34	0.95mg	9.5mg (10回)
34 < 体重	0.80mg	9.6mg (12回)

D. 考察

前述のように、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究は、米国、ドイツ・スイス・イギリス、韓国において行われ、その臨床結果は学会等で報告されている。使用したベクターは欧州3カ国、アメリカ、韓国で異なっていた。これまで、フランスの X 連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療やドイツの X-CGD の臨床研究でレトロウイルスベクターが関連する重大な有害事象が発生しているが、レトロウイルスベクターを使用する遺伝子治療の実施基準は国によって違いがある。特に、欧州では危険と利益を慎重に検討し、患者にとって利益が大きい場合は実施している。

本研究では、これまで重大な有害事象が発生していない NIH の Malech 博士らが開発した MFSGS-gp91 ベクターを使用して国際多施設共同臨床研究を実施する。これまでの諸外国の臨床研究の結果から、CGD の遺伝子治療では、遺伝子導入幹細胞が生着し、長期間機能を発揮するためには、何らかの前処置が不可欠と考えられるが、どの方法が最適かは未だ解明されていない。前処置をしても、遺伝子導入細胞が長期に高発現したのは、有害事象が起こったドイツの例のみである。当該遺伝子治療臨床研究で使用される MFSGS-gp91 は、MoMLV 由来で、SFFV に比して白血病等の造血障害を起こす確率は低いと考えられるが、レトロウイルスベクターである以上、ベクターゲノムの挿入は避けられない。

標準治療では制御困難な感染症を持ち造血幹細胞移植の適応でない X-CGD の患者は少な

からずいも⁸被験者の利益と危険性について十分に検討した上で遺伝子治療を実施することは重要であるし、他の先天異常症に対する遺伝子治療臨床研究の推進にもつながると考えられる。

E. 結論

本研究で実施予定の X-CGD に対する遺伝子治療では、根治は望めないが、致死的な重症感染症からの回避が期待できる。この臨床研究によって得られる知見は、日本では未実施の他の先天異常症に対する遺伝子治療臨床研究の推進に寄与する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

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

研究分担者 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

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る造血系腫瘍の発症が問題となっている。本研究では、染色体上に1コピーしかプロウイルスを有さない遺伝子改変マウスを作出し、そのマウスにおける造血能を解析することで、染色体へのベクター挿入による近傍遺伝子の発現変化が造血に与える影響（positional effect）を検討した。特に、ベクターがドーパミン受容体3遺伝子（D3）の第2イントロンに逆向きに挿入されたマウスでは、生後28週目にリンパ腫が発症し、細胞表面抗原や転写因子の解析から、これらリンパ腫はIgM陽性Bリンパ腫であることがわかった。このリンパ腫はD3が高発現しており、正常の脾臓B細胞がD3をほとんど発現していないことから、ウイルスベクターの挿入が近傍遺伝子のD3の発現を強く誘導し、その結果、今回のBリンパ腫の発症に繋がったことが示唆された。

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コピーしか有しない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LAM-PCRにて同定して、挿入部位近傍遺伝子の発現変化がマウス造血系に与える影響を経時的に解析する。

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質（EGFP）遺伝子を導入し、それらEGFP発現ES細胞を3.5目の胚盤胞に移入することで遺伝子改変マウスを作出した。次に、生殖細胞形成時に減数分裂が必要であることを利用し、C57BL/6マウスと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、最終的に染色体上に1コピーのプロウイルスしか有さない遺伝子改変マウスを4ライン樹立した。
- 2) 上記の方法で作出したマウスライン

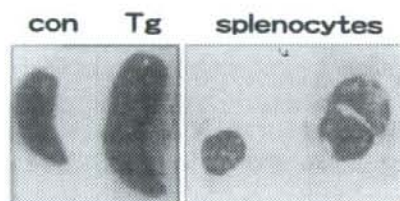
のうちD3遺伝子の第2イントロンに逆向きにプロウイルスが挿入されたマウスより発症したリンパ腫の特性を、FACSや分子生物学的手法にて解析した。

3) 造血系細胞に対するD3発現の影響を解析するため、D3発現レトロウイルスベクターを作製し、マウス造血幹細胞に導入して、分化に対する影響を解析した。

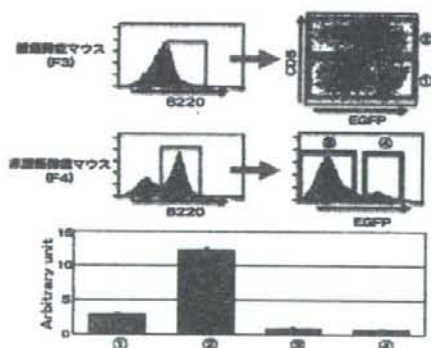
C. 研究結果

- 1) 染色体上に1コピーしかプロウイルスを有さないマウスのベクター挿入部位は、サイクリンD1遺伝子（CCND1）、myeloid/lymphoid or mix-lineage leukemia translocated to 11遺伝子（Mllt11）、D3遺伝子、第5染色体の未同定遺伝子の4領域であった。
- 2) 上記マウスのうち、D3近傍に挿入されたマウスにおいて、生後28週目で貧血や脾腫が発症した。また、増殖していた脾細胞（splenocyte）の表面抗原解析から、これら細胞はB220/CD5/IgM陽性のBリンパ腫であることがわかった。また、RT-PCRの結果から、これらBリン

パ腫では D3 遺伝子が高発現しており、正常 B 細胞での D3 の発現は確認されなかった。



3) レトロウイルスベクターにて D3 遺伝子を強制発現したマウス造血幹細胞は、in vitro においてリガンド存在下、preB へと分化し、増殖能も亢進した。



下図は、腫瘍発症マウスの B 細胞 (B220 陽性細胞) のうちリンパ腫分画 (CD5 陽性 ②) と非リンパ腫分画 (CD5 陰性 ①)、腫瘍非発症マウスの B 細胞のうち EGFP 陽性 (④) と陰性 (③) の D3 の発現を解析したものである。腫瘍発症マウスのリンパ腫分画のみで D3 の高い発現が確認された。

D. 考察

今回の研究結果から、ウイルスベクターの挿入による近傍遺伝子の発現変化ならびにそれに伴う造血系異常の発症が強く示唆された。現在、遺伝子治療臨床研

究においてレトロウイルスベクターの染色体挿入による造血系異常発症の危険性が強く言及されているが、実際には複数のプロウイルスが染色体に挿入されているため、造血系異常に関する一対一の関連が解明されにくい。このことから、染色体上の 1 コピーしかプロウイルスを有さない今回作出されたマウスの解析は極めて重要であると思われる。今後は、D3 の強制発現のみで腫瘍化 (B リンパ腫の発症) が誘導されるかどうかを、in vivo の骨髄移植の系で解析する予定である。

E. 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 系統樹立した。うち、一系統で、生後 28 週目に B リンパ腫を発症した。また、D3 の強制発現が造血幹細胞の B 細胞への分化誘導がもたらすことが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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).

2) 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.