

6 遺伝子の種類及び遺伝子導入方法

6-1. ヒトに導入する遺伝子の構造と性質

本遺伝子治療臨床研究においてヒトに導入する遺伝子は、ヒト CYBB 遺伝子である。この導入遺伝子は gp91^{phox} をコードしている。

なお、導入されるが発現しないベクター-DNA などの構造と性質は、6-4 の「ウイルスベクターを用いた遺伝子導入」の項で述べられる。

6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造

6-1-1-1. ヒト CYBB 遺伝子

ヒト CYBB 遺伝子は、1986 年、Orkin らによって初めて単離された遺伝子である。この遺伝子は、4339 塩基対の糖タンパク質である gp91^{phox} をコードしており (17)、翻訳開始コドン ATG の上流にある 61 塩基対の非翻訳領域のほか、570 アミノ酸をコードする 1710 塩基対と TAA を終止コドンとする 1713 塩基対によりなっている。その位置は X 染色体短腕 (Xp21.1) にあり、大きさは 33.5kb である (GenBank NM_000397)。

本遺伝子治療臨床研究において、ベクターに組込まれるのは gp91^{phox} の open reading frame (ORF) の 1713 塩基対とベクター挿入の際に加えられた人工的な配列の合計 1723bp である。次頁に CYBB 遺伝子の塩基配列並びにベクターに挿入される CYBB 遺伝子の模式図を示す。なお、ベクターの全 DNA 塩基配列上 (別添 X)、X-Y に相当する塩基対がヒト CYBB 遺伝子の領域である。

CYBB がコードする gp91^{phox} のアミノ酸配列

ATGGGGAAGTGGGCTGTGAATGAGGGGCTCCATTTTTGTCATTCTGGTTGGCTGGGGTTGAACGCTTCCTCTTGTCTGGTATTACCGGGTTATG 100
MetGlyAsnTrpAlaValAsnGluGlyLeuSerIlePheValIleLeuValTrpLeuGlyLeuAsnValPheLeuPheValTrpTyrTyrArgValTyr

ATATTCACCTAAGTCTTTTACACAAGAAAACCTCTGGGTCAGCACTGGCACTGGCCAGGGCCCTGCAGCCTGCCTGAATTTCAACTGCATGCTGAT 200
AspIleProProLysPhePheTyrThrArgLysLeuLeuGlySerAlaLeuAlaLeuAlaArgAlaProAlaAlaCysLeuAsnPheAsnCysMetLeuIle

TCTCTTGCCAGTCTGTGAAATCTGTGCTTCTCAGGGTTCAGTGGCTGCTCAACAAGAGTTCGAAGACAACCTGGACAGGAATCTCACCTTT 300
LeuLeuProValCysArgAsnLeuLeuSerPheLeuArgGlySerSerAlaCysCysSerThrArgValArgArgGlnLeuAspArgAsnLeuThrPhe

CATAAAATGGTGGCATGGATGATTGCACTTCACTCTGCGATTCAACATTGCACATCTATTAATGTGGAATGGTGTGTAATGCCCGAGTCAATAAT 400
HisLysMetValAlaTrpMetIleAlaLeuHisSerAlaIleHisThrIleAlaHisLeuPheAsnValGluTrpCysValAsnAlaArgValAsnAsn

CTGATCCTTATTCAGTAGCACTCTGAACTTGGAGACAGGCAAAATGAAAGTATCTCAATTTTGTCTGAAAGAGAATAAAGAACCTGAAGGAGGCT 500
SerAspProTyrSerValAlaLeuSerGluLeuGlyAspArgGlnAsnGluSerTyrLeuAsnPheAlaArgLysArgIleLysAsnProGluGlyGlyLeu

GTACCTGGCTGTGACCTGTTGGCAGGCATCACTGGAGTGTCAACGCTGTGCCTATATTAATTACTCTCCACCAAAACCTCCGGAGGCT 600
TyrLeuAlaValThrLeuLeuAlaGlyIleThrGlyValValIleThrLeuCysLeuIleLeuIleIleThrSerSerThrLysThrIleArgArgSer

TACTTTGAAGTCTTTGGTACACATCATCTTTGTGATCTTCTATTGGCCTTGCCATCCATGGAGCTGAACGAATGTACGTGGGCAGACCCGAG 700
TyrPheGluValPheTrpTyrThrHisLeuPheValIlePhePheIleGlyLeuAlaIleHisGlyAlaGluArgIleValArgGlyGlnThrAla

AGAGTTTGGCTGTGCATAATAACAGTTTGTGAACAAAAATCTCAGAATGGGGAATAAAGGAATGCCCAATCCCTCAGTTTGTGGAAACCTCC 800
GluSerLeuAlaValHisAsnIleThrValCysGluGlnLysIleSerGluTrpGlyLysIleLysGluCysProIleProGlnPheAlaGlyAsnProPro

TATGACTTGGAAATGGATAGTGGTCCCATGTTTCTGTATCTCTGTGAGAGTGTGGGTTTTGGCGATCTCAACAGAAGTGGTCAACCAAGGTG 900
MetThrTrpLysTrpIleValGlyProMetPheLeuTyrLeuCysGluArgLeuValArgPheTrpArgSerGlnGlnLysValValIleThrLysVal

GTCACTCACCTTTCAAACCATCGAGCTACAGATGAAGAAGAAGGGTTCAAATGGAAAGTGGGACAATACATTTTTGTCAAGTGCCAAAGGTGTCCA 100
ValThrHisProPheLysThrIleGluLeuGlnMetLysLysLysGlyPheLysMetGluValGlyGlnTyrIlePheValLysCysProLysValSer

AGCTGGAGTGGCCCTTTTCACTGACATCGCCCTGAGGAAGACTTCTTAGTATCATATCCGCACTGTTGGGACTGGACAGAGGGGCTGTTCAA 110
LysLeuGluTrpHisProPheThrLeuThrSerAlaProGluGluAspPhePheSerIleHisIleArgIleValGlyAspTrpThrGluGlyLeuPheAsn

TGCTTGTGGCTGTGATAAGCAGGAGTTTCAAGATGCGTGGAACTACCTAAGATAGCGGTTGATGGGCCCTTTGGCACTGCCAGTGAAGATGTTTCAG 120
AlaCysGlyCysAspLysGlnGluPheGlnAspAlaTrpLysLeuProLysIleAlaValAspGlyProPheGlyThrAlaSerGluAspValPheSer

TATGAGTGGTGTGTTAGTGGGAGCAGGATTGGGGTCAACCTTGCATCCATTCTCAAGTCAAGTCTGGTACAATATTGCAATAACGCCCAATC 130
TyrGluValValMetLeuValGlyAlaGlyIleGlyValThrProPheAlaSerIleLeuLysSerValTrpTyrLysTyrCysAsnAsnAlaThrAsn

TGAAGCTCAAAAGACTACTTCTACTGCTGTGCCGGACACACATGCCTTTGAGTGGTTTGCAGATCTGCTGCAACTGCTGGAGGCCAGATGCAAGGA 140
LeuLysLeuLysLysIleTyrPheTyrTrpLeuCysArgAspThrHisAlaPheGluTrpPheAlaAspLeuLeuGlnLeuLeuGluSerGlnMetGlnGlu

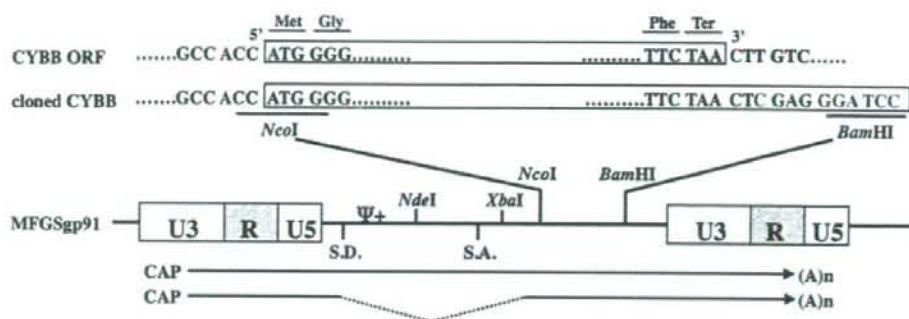
AAGGAACAATGCCGCTTCTCAGCTAACATCTACTCTACTGGCTGGATGAGTCTCAGGCCAATCACTTTGCTGTGCACCATGATGAGGAGAAAGAT 150
ArgAsnAsnAlaGlyPheLeuSerTyrAsnIleTyrLeuThrGlyTrpAspGluSerGlnAlaAsnHisPheAlaValHisHisAspGluGluLysAsp

GTGATCAGCCCTGAAACAAAAGACTTTGTATGGACGGCCCAACTGGGATAATGAATTCAGACAAATGCAAGTCAACACCTTAATACCAAGATAGGAG 160
ValIleThrGlyLeuLysGlnLysThrLeuTyrGlyArgProAsnTrpAspAsnGluPheLysThrIleAlaSerGlnHisProAsnThrArgIleGly

TTTTCTCTGTGGACTGAAGCTTGGTGAACCTGAGTAAACAAGCATCTCAACTCTGAGTCTGGCCCTGGGGAGTGCATTTTCAACAA 170
ValPheLeuCysGlyProGluAlaLeuAlaGluThrLeuSerLysGlnSerIleSerAsnSerGluSerGlyProArgGlyValHisPheIlePheAsnLys

GGAAAACCTTCTAA 1713
GluAsnPheter

CYBB 遺伝子の末端配列と MFGSgp91 の構造



CYBB のアミノ酸をコードする領域 (open reading frame; ORF) をレトロウイルスベクター-MFGS にクローニングするため、3' 側に *Bam*HI 認識配列を含む人工配列 (CGAGGGATCC) を挿入し、*Nco*I-*Bam*HI fragment として CYBB 遺伝子をレトロウイルスベクターに挿入し、MFGSgp91 を作製した。

6-1-2. 導入する遺伝子の性質ならびに導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性

導入された遺伝子 (CYBB) により発現される gp91^{phox} は、p22^{phox} と会合することで膜タンパク質のシトクロム b558 を構成し、また、菌体成分等の刺激により細胞質内タンパク質の p47^{phox}、p67^{phox}、p40^{phox}、rac を会合して、superoxide anion の産生に関わる酵素の NADPH oxidase を生成する。一般に休止状態では細胞質因子はシトクロム b558 と乖離しているため NADPH の活性は起こらないが、刺激により細胞内因子が細胞膜へと移行しシトクロム b558 と会合することで、活性型 NADPH oxidase が産生される。本酵素は分子酸素を直接還元することで superoxide anion (O₂⁻) を生成し、食胞内へと放出して、さらに強力な活性酸素種 (H₂O₂、HClO) が生成され、強力な殺菌作用を発揮する(2)。

6-2. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴ならびに標的細胞と理由

本遺伝子治療臨床研究における標的細胞は、患者由来の造血幹細胞である末梢血 CD34 陽性細胞である。

現在、根治療法を目指して、患者以外 (ドナー) の骨髓あるいは末梢血に由来した造血幹細胞 (前駆細胞) を用いた同種造血幹細胞移植が広く行われてきている。これは、CGD が造血幹細胞を起源とする食細胞の異常であるから、患者以外 (ドナー) の正常な造血幹細胞によって患者の造血幹細胞を置換することで、正常に機能する食細胞が患者末梢血中に出現し、CGD の臨床症状が軽快するためである。

よって、本該遺伝子治療臨床研究においても、従来行われてきた同種造血幹細胞移植と同様に、標的細胞を患者造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) とすることとしている。

一方、造血幹細胞の由来としては、骨髓血あるいは末梢血由来が挙げられるが、近年、顆粒球刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) の使用によって効率良く末梢血由来 CD34 陽性細胞を採取することが可能となったこと、また、末梢血の方が骨髓血に比して移植後の造血能回復が速やかであることから、患者の末梢血に由来する CD34 陽性細胞を本遺伝子治療臨床研究における標的細胞とする。

6-3. 遺伝子導入方法の概略及び当導入法を選択した理由

患者末梢血由来の CD34 陽性細胞への gp91^{phox} 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクターを含むウイルス産生細胞の培養上清中で CD34 陽性細胞を培養することで行う。遺伝子導入法の詳細は 9-5-2 の「遺伝子導入方法」の項で示される。

CD34 陽性細胞への遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを選択した理由は、レトロウイルスベクターが、細胞感染後に宿主染色体に挿入する性質を有することから、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することが可能であり、また、他のベクターシステムと比較してレトロウイルスベクターが CD34 陽性細胞に対し高い遺伝子導入効率を示すことが過去の遺伝子治療臨床研究において示されていることによる。また、安全性に関しても、宿主染色体癌原遺伝子近傍への挿入による造血系悪性腫瘍の発症（後述）という危険性があるものの、レトロウイルスベクター自体の安全性に関しては、毒性、免疫原性などの有害事象が、過去の遺伝子治療臨床研究では報告されていないためである。

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

使用するウイルスベクターはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。この MoMLV は sarcoma 37 細胞より分離され、同種指向性のレトロウイルスで、マウスの年齢および系統に関わらず感染する。また、発癌遺伝子を持たないが、感染後、長時間経ってから感染マウスにリンパ性白血病を発症することが知られている (18)。

MoMLV のゲノムは 5' LTR (long terminal repeat) - パッケージング(Ψ) シグナル - gag - pol - env - 3' LTR より構成されている。ウイルス LTR にはエンハンサー/プロモーター活性化があり、ウイルスゲノムは 5' LTR より転写、翻訳される。gag はウイルスのコア構造タンパク質をコードする遺伝子で、pol は逆転写酵素ならびにインテグラーゼをコードする遺伝子、env はウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子である。Ψ シグナルはウイルスゲノム RNA がコア構造タンパク質や pol 遺伝子産物により構成される正二十面体の複合体に取り込まれるのに必要な配列であり、ゲノム RNA がこれら複合体に取り込まれることでウイルス粒子が形成され、細胞膜表面より萌芽する。この際、宿主細胞膜の一部を自らの外被として持ち込む。

レトロウイルスの生活環は、ウイルス粒子の外被表面に存在する外被タンパク質 (Env) が標的細胞の細胞膜表面上に存在する Env に対する受容体に結合するこ

とにより始まる。ウイルス粒子が受容体を介して細胞膜表面に結合した後、ウイルスはエンドサイトーシスにて細胞質内へと取り込まれる。その後、自らが持ち込んだ逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA を 2 本鎖 DNA へと変換し、核へと移行した後にウイルスが持つインテグラーゼにて宿主染色体へと組込まれる。この状態のウイルスゲノムをプロウイルスとよぶ。染色体に組込まれたプロウイルスはあたかも宿主の遺伝子であるかのように振る舞い、宿主の転写機構を利用してウイルスゲノム (RNA) を転写する。ウイルスゲノムの一部は Gag、Pol、Env を転写するためのメッセンジャー RNA (mRNA) として働き、ウイルスの構成タンパク質を産生する。このようにして新たに生成されたウイルス粒子は細胞外へと萌芽し、周囲の細胞に感染していく (19)。

本遺伝子治療臨床研究における標的細胞は患者末梢血由来の CD34 陽性細胞であるため、MoMLV 由来の Env ではこれら細胞に感染しない。このため、ヒト細胞にも感染性を有する 4070A 由来のアンフォトロピック系ウイルスの Env に変更して用いることとする。

6-4-2. ウイルスベクターの作製方法

レトロウイルスベクター DNA は野生型ウイルスゲノムの 5' -LTR、primer binding site、 Ψ シグナル、ポリプリン領域および 3' -LTR を保存し、ウイルス粒子の構造タンパク質遺伝子 (gag、pol、env) を削除して作製しているため、ウイルスベクター DNA のみではウイルスベクター粒子にはなり得ない。

ウイルスベクター粒子産生のためには、後で述べられるパッケージング細胞株が必要となるが、さらに安全性を高めるために、種々の工夫がレトロウイルスベクター DNA 自体になされてきた。本遺伝子治療臨床研究で用いられるウイルスベクター DNA は、レトロウイルスベクター-MFG-S に CYBB 遺伝子を挿入した MFGSgp91 であり、米国国立衛生研究所 (NIH) の Harry L. Malech 博士らによって作製されたものであるが、以下にその作製過程を示す。

1) MFG の作製

MFGSgp91 の基となるベクターは MFG であり、MFG は MoMLV ゲノム断片を pBR322 プラスミドベクターに挿入して作製された (全配列を別紙 X で示す)。すなわち、MoMLV ゲノムの 5' LTR から 1038 塩基対 (bp) 番目の *NarI* 部位までの DNA 配列 (ただし、*NarI* 配列は MFG では *NdeI* 配列に変換されている)、splice acceptor を含む 5401bp 番目の *NdeI* 配列から 5674 番目の *XbaI* 配列の DNA 配列、合成 DNA 配列 CTAGACTTGCCATGGCGCGATC (二重鎖) 及び 7672bp 番目の *ClaI* (*BamHI* 配列に変換) か

ら 3' LTR までの DNA 配列まで含んでいる。

MFG が宿主染色体に挿入された後、プロウイルス（宿主染色体に挿入された MFG）は 5' LTR から 396bp 番目の転写開始点より転写が開始され、3' LTR から 696bp 番目まで転写される。MFG では、gag、pol、env のウイルスゲノムはほぼ全て欠失しているが、gag の一部（5' 側）の約 400bp、env 5' 側のスプライスアクセプター領域の約 400bp、env の一部（3' 側）の約 90bp は残されている。

MFG のパッケージングシグナル Ψ は gag の一部まで及んでおり、この gag 配列の一部を含むパッケージングシグナルを拡張パッケージングシグナル (Ψ^*) とよび、ウイルスゲノムのパッケージング効率を著しく向上させている。また、MFG は MoMLV 由来の splice donor/ acceptor 配列を有し、さらに導入遺伝子の開始コドン MoMLV の env 開始コドンに合わせることで、導入遺伝子の転写効率を高めている。なお、MFG は薬剤耐性の選択マーカー遺伝子を有してはいない。

2) MFGS の作製

MFG は Ψ^* としてパッケージングシグナル内に gag の一部を有している。この部分はウイルス粒子膜表面や粒子内にある 2 つの重複した Gag-Pol ポリペプチドのアミノ酸末端側をコードするもので、これがパッケージング細胞株にある gag-pol と相同組換えを起こし、複製可能なレトロウイルス (replication competent virus; RCR) を産生する危険性がある。同時に、このポリペプチドがウイルス由来のタンパク質であるため、宿主の免疫反応を惹起する可能性もあり、MFG の gag 配列に以下のような変異を挿入し、遺伝子組換え率の低下と免疫原性の軽減を図ったものが MFGS である。

・ 5' LTR より 1256bp 番目の A を T に、1478bp 番目の C を T に変換することで、Gag-Pol の重複翻訳フレームを 84bp と 15bp に短縮させた。

・ 5' LTR より 1273bp 番目の T を A に変換することで、重複翻訳フレームには影響を与えず、パッケージング機能のためのステムループの形成能力を保持させた。

以上の変異により、導入遺伝子の発現は低下させず、p15Gag の発現は消失した。

3) MFGSgp91 の作製

MFGSgp91 は、MFGS 内の *NcoI*-*Bam*HI の配列とその両端に相当する配列を有するヒト由来 CYBB 遺伝子を挿入して作製された。

4) パッケージング細胞の作製

MFGSgp91 はウイルス粒子形成に必須の遺伝子 gag、pol、env を有していないため、これ自体では完全なウイルス粒子を形成することはない。このため、MFGSgp91

に相当する遺伝子組換え生物を作製するためには、パッケージング細胞株が必要となる。本遺伝子治療臨床研究において、遺伝子組換え生物の作製に使用されるパッケージング細胞株は 293-SPA であるが (20)、以下のその作製方法を示す。

- ・ ① MoMLV ゲノム DNA よりパッケージングシグナル、env 及び 3' LTR のゲノム配列を取り除いた 5' LTR、② gag-pol 配列を含む pCRIPenv-ベクター、③ SV40 early promoter より大腸菌由来 gpt 遺伝子を発現する pSV2gpt ベクターの 3 ベクターを、リポフェクション法にてヒト由来胎児腎細胞 293 細胞 (ATCC CRL 1573) に導入し、薬剤 (mycophenolic acid) にて Gag-Pol 発現細胞を選択した。
- ・ これら Gag-Pol 発現細胞に、マウスアンフォトロピックウイルス由来 4070A env を発現する pCRIPAMgag-と大腸菌由来 hyg 遺伝子を発現する PSV2hyg を導入し、薬剤 (hygromycin) にて Env 発現細胞を選択した。
- ・ 最終的に、Gag-Pol 及び Env を高発現し、レトロウイルスベクターを導入することで高力価のウイルスを産生する細胞株をパッケージング細胞株 293-SPA として樹立した。

この 293-SPA はパッケージングシグナルを有していないため、パッケージングシグナルを有するレトロウイルスベクターを導入しない限り、遺伝子組換え生物 (レトロウイルス) は生じない。

4) パッケージング細胞の作製

作製された MFSGsp91 を、上記 293-SPA にリポフェクション法にて導入し、クローニング後に NIH3T3 を用いたウイルス力価測定にて高力価を示した株が最終的に選択された。この産生細胞 293-SPA-gp91-155 は、患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に対して、70%を越える感染効率を示すことがわかっている。

6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造

MFSGsp91 の概容を 17 ページに、また全塩基配列を別添 6 に示す。なお、CYBB 遺伝子は 5' LTR より転写が誘導される。

6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

293-SPA はアンフォトロピック系のパッケージング細胞株であり、このパッケージング細胞株より産生されるレトロウイルスは、マウス、ラット、サル、ヒト等の広範囲の感染宿主域を有する。ただし、本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロ

ウイルスは、前述のように Gag、Pol、Env をコードする遺伝子が削除されているため、新たなウイルス粒子を形成することは不可能で、感染細胞より周囲の細胞に再感染することはない。

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

本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスベクターMFGSgp91 を産生するウイルス産生細胞株 293-SPA-gp91-155 は、共同研究者である NIH の Harry L. Malech 博士らによって樹立され、同博士が所属する National Institute of Allergy and Infectious Diseases との契約に基づき、米国 Magenta 社 (Rockville, MD) が臨床用ベクター (GMP) として管理・保管しているものである。そして、本遺伝子治療臨床研究においては、Magenta 社が製造した 293-SPA-gp91-155 のマスターセルバンク (Master Cell Bank) より作製した MFGSgp91 のウイルス上清を使用する。

ウイルスベクター上清の大量産生は、上記 MCB より 1 パイアルを融解し、Magenta 社内の管理された製造エリアで GMP 準拠のもと行われる。ウイルス上清の大量産生の方法は以下の通りである。

225cm²のプラスチックフラスコに単位あたり 8x10⁴個の細胞を 10%の胎仔牛血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dulbecco's (DMEM) にて播種して培養する (1.8x10⁷個)。6日間の培養により細胞数はおよそ 10 倍になると予想されるので、1%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む X-vivo 10 に培地を交換し、さらに 10 時間培養する。その後、培養上清を回収し、新しい培地 (X-vivo 10/ 1% HSA) に交換してから、さらに 14 時間培養を続け、培養上清を回収する。この操作 (14 時間培養後の培養上清の回収) を計 3 回繰り返した後、回収したすべての培養上清をひとつにまとめ、無菌濾過した後、小分けに分注して凍結する。

Magenta 社において製造されたウイルスベクター上清に適切な拡散防止措置を講じた上で、ドライアイス詰めで日本まで空輸し、国立成育医療センター研究所において受け入れ試験を実施する。検査の結果、適切と判断されたウイルスベクター上清のみを、同研究所の管理区域内にある超低温フリーザーにて凍結・保管する。なお、次頁以降に、MCB、大量産生によるウイルス上清並びに受け入れ試験において行われる品質検査項目を示し、詳細は別添として添付する。

レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目
(293-SPA-MFGSgp91-155 Master Cell Bank #2037-0022)

検査	方法	基準値	結果
核型検索	アイトザイム	ヒト	ヒト
細胞状態	トリパンブルー染色	30%以上	90%以上
細菌・真菌 (無菌性)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ	FDA points to consider	陰性	陰性
〈ヒトウイルス〉 EBウイルス サイトメガロウイルス B型肝炎ウイルス HTLV 1/2 アデノ随伴ウイルス パルボB19 HIV	PCR PCR PCR PCR PCR PCR 共培養法	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性
偶発的ウイルスの確認	In vivo法 In vitro法	陰性 陰性	陰性 陰性
ウシ由来ウイルス (使用ロット)	ウシウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
ブタウイルス (使用ロット)	ブタウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
ベクターコピー数	Southern blot法	1コピー	1コピー
gp91 ^{phox} 配列	DNA sequence法	存在	存在
MFGS配列	DNA sequence法	存在	存在
パッケージング ベクターコピー数	Southern blot法	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag- > 1copy	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag-> 1copy
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562に よるgp91 ^{phox} の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現

293-SPA-MFGS91-155 レトロウイルス (#1059-0001)

ウイルス上清と産生細胞の最終産物

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	FDA法	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562による gp91 ^{phox} の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

国立成育医療センター研究所におけるウイルス上清の受け入れ試験

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	FDA法	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Flow cytometry	10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	Envに対するPCR法	陰性	陰性
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性

患者に投与する物質は、CYBB 遺伝子が導入された患者末梢血由来 CD34 陽性細胞である。通常、本細胞を培養する際にはウシ胎仔血清を用いるが、これは患者にとって異種タンパク質であり、抗原となり得るため、本遺伝子治療臨床研究においては、CYBB 遺伝子を導入する際に用いるウイルス上清を無血清にて調製するとともに、また、患者 CD34 陽性細胞の培養においても、1% ヒト血清アルブミンを含む無血清培地にて行う。

また、遺伝子導入に際して使用された各種試薬に関しては、1% ヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝液 (PBS) 等にて十分に細胞を洗浄し、取り除いてから患者に投与する。無菌性・無毒性に関しては、下記の検査の 1 と 5 を行い、安全性が確認された段階で遺伝子導入細胞 (末梢血由来患者 CD34 陽性細胞) を患者に投与する。

なお、安全性の観点からは、野生型ウイルス (replication competent retrovirus; RCR) が混入していないことを確認する必要がある、この RCR の検出方法には複数あるが、PG-4 S+L 法 (21) による検出では 4 週間程度時間がかかることや今回の全培養期間が 72 時間と短時間であることを考慮し、回収前日の細胞について PCR 法を用いて検査し、Env 遺伝子を検出しないことを確認してから患者に投与するものとする。

ただし、入念的に、投与する細胞については同時並行で、後に他の RCR 検査も行うこととし、それらの検査結果が陽性であると判明した時点で、HIV 治療で用いられる逆転写酵素阻害剤等を用いて治療を始めることとする。そして、全ての RCR 検査結果が陰性化するまで患者状態を注意深く観察し、その間、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号) に基づき、患者を外部との接触を断った個室にて厳重に管理する。また、その過程でリンパ腫を含む異常細胞の増殖を確認した場合には、種々の検査を行い、その結果を基に最適な治療法を選択し、治療を開始する。なお、これら RCR 検査は、患者に投与する細胞が陰性と判断された場合でも、定期的に患者から細胞を採取して行うこととする。

患者に投与する細胞及び患者の細胞を用いて行われる検査一覧

1. 無菌性 (細菌、真菌、マイコプラズマ)
2. 遺伝子導入細胞の RCR 検出試験 (PG-4 S+L-試験、逆転写酵素活性の測定、PCR 法による Env 遺伝子の検出)
3. 培養上清中の RCR 検出試験 (PG-4 S+L-試験、逆転写酵素活性の測定、PCR 法によ

る Env 遺伝子の検出)

4. FACS を用いた遺伝子導入細胞における gp91^{phox} の発現
5. エンドトキシン (LAL)
6. コロニーアッセイによる遺伝子導入効率の測定
7. サイトカイン非存在下での増殖能試験
8. LAM-PCR 法によるプロウイルスコピー数ならびに挿入部位の同定

7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスベクター MFGSgp91 は野生型ウイルス由来の Gag、Pol、Env をコードする遺伝子の全てあるいは一部を欠失しており、また、使用されるパッケージング細胞株 293-SPA においても Gag-Pol を発現する DNA 断片と Env を発現する DNA 断片は異なったベクターによる発現させられることから、本遺伝子治療臨床研究において当ベクターを使用する限り RCR の出現は極めて少ないものと考えられる。また、過去の 300 を越える同様な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も、RCR の出現を見た症例は無い。

本遺伝子治療臨床研究で使用される MFGSgp91 上清は米国 Magenta 社により RCR が存在しないことが確かめられたものを使用し、さらに使用前の受け入れ試験においても RCR が存在しないことを確認する。さらに、治療開始後も、患者細胞や血清を用いて、患者体内での RCR 出現の有無を定期的に確認する。

7-1-4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターが感染細胞に外来遺伝子を導入する過程において、細胞に傷害を与えることはないと考えられており、事実、現在までの遺伝子治療臨床研究において細胞傷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、標的細胞として患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に体外で CYBB 遺伝子を導入し (ex vivo 遺伝子治療)、これら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 CYBB 遺伝子が導入される可能性は極めて少ない。また、たとえベクター粒子が遺伝子導入細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されたとしても、頻回なる細胞洗

浄によりその量は微量であり、多くは血清等にて不活化すると考えられることから、標的細胞以外への新たな感染の可能性は極めて低い。

7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は試験管内で行われるため、患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は否定できない。このため、遺伝子導入に十分な知識と経験を有する研究者のみが P2 レベルの遺伝導入専用施設で、十分な注意をもってレトロウイルスベクターを含む上清を扱う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧滅菌か次亜塩素酸によるウイルスの不活化操作の後に廃棄される。しかし、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、ウイルス上清を直接触れた程度では遺伝子の導入は成立しない。また、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こりうる可能性は大量の RCR が患者体内に存在しない限りありえない。

7-1-7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

最近の報告で明らかにされたところによると (X)、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入した場合、その挿入部位は細胞増殖に関わるような遺伝子の promoter/ enhancer 領域などの特に染色体が活性化している部位に挿入されやすいことがわかっている (22)。ただ、その部位は特定ではなく、染色体全体に及んでいるため、ベクターの染色体挿入による問題は特にはない。

ベクターの染色体挿入で問題となるのは、その挿入部位近傍にある遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼした場合である。ただ、ベクターの染色体挿入が細胞増殖に関わる遺伝子に対して負の影響を与えた場合は、その細胞は増殖できず細胞は死滅することになるため、患者への影響はない。一方、挿入部位近傍に癌原遺伝子が存在し、それがベクター挿入により発現誘導を起こし、増強した場合、すなわちベクター挿入が癌原遺伝子の発現に対し正に働いた場合は遺伝子導入細胞ががん化する可能性はある。実際、フランスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療において使用されたレトロウイルスベクターが患者染色体の LMO-2 遺伝子近傍に挿入され、その結果、導入細胞が白血病化 (T 細胞白血病) したとの報告がある (23, 24)。現在、これに対して種々の方法が検討されているが、いまだ完全に白血病等造血系異常を誘発しないベクターシステムが存在しないため、本遺伝子治療臨床研究においても何からの造血系異常が発症する可能性は否定できない。よって、本遺伝子治療臨床研究では、遺伝子治療により得られると推測される患者利

益が白血病等造血系異常の発症の危険性の程度を十分に越えると推測される症例に対してのみ、これら造血系異常の危険性を十分に説明し、自由意思による同意のもとに本遺伝子治療臨床研究を行うものとする。

7-1-8. 癌原性の問題

ウイルス感染による癌原性は RCR が存在しない限り、その可能性は極めて低い。一方、前項で述べたように挿入部位近傍の遺伝子が活性化することによるがん化の可能性は決して低いものではない。これは本遺伝子治療臨床研究と同一の疾患を扱ったドイツ・スイスでの遺伝子治療臨床研究においても造血系異常を発症したことから推測される。

ただし、ドイツ・スイスの症例で使用されたベクターはマウス急性白血病ウイルスに属する Friend spleen focus-forming virus (SFFV) に由来するものである。これは本遺伝子治療臨床研究で使用される MoMLV 由来ベクターとは異なり癌遺伝子を有し、数十倍も転写活性が高く、そのために造血系異常を発症したと考えられている。とはいえ、本遺伝子治療臨床研究と同じ MoMLV 系のベクターを使用した、同じ先天性免疫不全症である X-SCID を対象とした遺伝子治療臨床研究においても同様に造血系異常（白血病）を発症したことから、本遺伝子治療臨床研究においても同様に造血系異常が発症する可能性は否定できない。

なお、現在まで MoMLV 由来の同一ベクターで行われた CGD に対する遺伝子治療臨床研究において造血系異常を示した症例はない。

7-2. 遺伝子産物の安全性

レトロウイルスベクター MFGSgp91 の遺伝子導入により、感染細胞であるヒト造血細胞は CYBB 遺伝子産物である gp91^{phox} を獲得する。gp91^{phox} は前述のようにヒト由来のタンパク質で、細胞膜表面で p22^{phox} を会合し、菌体成分等の刺激にて細胞内構成タンパク質と結合することで活性酸素産生等の機能を発揮する性質を有している。そのため、gp91^{phox} を過剰発現しても、過剰な p22^{phox} の発現がない限り、活性酸素産生等の機能は発揮せず、それ自身では細胞に傷害を与えないと考えられる。また、現在まで gp91^{phox} による細胞傷害性は報告されていない。

7-3. 細胞の安全性

7-3-1. 培養細胞の純度

使用するレトロウイルスベクター上清はMagenta社において微細孔フィルター (0.22 μ m) を通しており、ウイルス産生細胞株や細胞破砕物等の混入はない。また、国立成育医療センター研究所においては、培養期間中に異なる患者同士の細胞が混入することを防ぐために、同一時期に複数の患者細胞を扱わないこととするとともに、微生物等の汚染を防ぐために、全ての操作をP2レベルの施設内で行うこととし、特に細胞に取り扱いに関してはクラスIIaの安全キャビネット内で操作することとしている。なお、細胞の安全性に関する検査は遺伝子導入前と患者投与前に行われ、その主な検査項目は好気性細菌、嫌気性細菌、真菌、マイコプラズマとRCRの検査であり、これら検査はSRL社に対して委託して実施することとしている。

7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

前述のように、レトロウイルスベクターの染色体挿入部位は一定でなく、また、感染細胞よりあらたなウイルスが出現しないため、患者細胞の特定遺伝型への変化は起こらない。ただ、過去の報告でその挿入部位は全染色体にわたり、少なからず導入部位近傍遺伝子の発現に何らかの変化を与えることがあるとの報告もあることから、微細な遺伝型の変化、表現型の変化をきたしている可能性は否定できない。ただ、これら変化は臨床症状等の変化を伴わないようなごくわずかなものであり、一般的な臨床検査では異常を示さない。

7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞はレトロウイルスベクターMFGSgp91を導入した患者由来の末梢血 CD34 陽性細胞である。現在、リンパ腫や固形腫瘍に対して自家幹細胞移植が一般的に行われていることを考えると、自家 CD34 陽性細胞の投与が患者に対して重大な影響を及ぼすとは考えにくい。また、細胞培養に使用するサイトカイン等の細胞増殖因子の残存濃度についても、細胞を患者に再投与する前に頻回なる洗浄を実施するため、生体への影響は極めて低い濃度まで低下しているものと考えられる。

8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

以下の理由により本遺伝子治療臨床研究は実施可能と判断される。

1. 近年行われている、X-CGD に対する骨髄非破壊的前処置による HLA 一致同種造血幹細胞移植について、適当なドナーの存在する例では完治する例が多くみられるようになるなど、X-CGD に対する造血幹細胞移植の知見が多く得られていること。
2. 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世界的にみて現在まで数多く行われ、本邦においても、既に 3 件実施されている。具体的には、ADA 欠損症患者に対する遺伝子治療臨床研究として、① 1995 年：末梢血リンパ球を用いた研究、② 2002 年：骨髄造血幹細胞を用いた研究、③ 2004 年：同種造血幹細胞移植におけるドナーリンパ球を用いた研究、が行われ、これら研究により、遺伝子治療自体の安全性と有効性が確認されていること。
3. 本遺伝子治療臨床研究で使用を予定しているレトロウイルスベクター MFGSgp91 は、共同研究者である Malech 博士が NIH において複数の患者に対して使用しているベクターで、その安全性と有効性を確認していること。
4. 先行研究である「難治性先天性異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究(平成 18 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)」において、現在、『安全性を鑑みたととき X-CGD に対する第一選択肢は移植医療であるが、ドナー不在など何からの理由により移植医療が行えない重症患者に対しては、治療の候補として遺伝子治療を考慮することも十分に妥当である』との結論を得たこと。
5. 実施施設である国立成育医療センターが、成育医療（小児医療、母性・父性医療及び関連・境界領域を包括する医療）に特化した高度専門医療センターであり、その使命が先天性疾患を含む小児の難治性疾患の機序解明とその論理を応用した診断・治療法の開発ならびに臨床研究の実践であること。

なお、本遺伝子治療臨床研究には、本研究に賛同し、その実施に尽力を注ぐ意志のある多くの小児科医、免疫学者、細胞治療関係者、遺伝子治療関係者が参加する。

9. 遺伝子治療臨床研究の計画

9-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本研究の治療計画は大きく3項目より成り立っており、また、各項目は以下のように評価される。

1. 移植医療の適応とならない重篤な X-CGD 患者に対し、レトロウイルスベクターにて正常 CYBB 遺伝子を導入した患者末梢血由来 CD34 陽性細胞を輸注することが、患者にとって安全であるか。

遺伝子導入操作の安全性に関しては、エンドトキシン、マイコプラズマを含む無菌性、RCR の存在、細胞状態により判定され、患者への輸注安全性に関しては、ブスルファン投与による骨髄機能への影響、患者体内での遺伝子導入細胞の動態や増殖性及び RCR の存在によって判定される。

2. 上記、CYBB 遺伝子を導入した患者末梢血由来 CD34 陽性細胞が、患者体内で治療効果を示すか。

「治療効果の判定基準（別添）に基づき、各々の症例に対して CYBB 遺伝子導入細胞が示す治療効果を、治療前後の臨床症状や検査所見を比較することで判定される。

3. 造血幹細胞遺伝子治療が造血幹細胞移植より安全であるか、また、有効であるか。

長期間フォローアップを行い、本遺伝子治療臨床研究と同一のプロトコールにて当該遺伝子治療臨床研究を行っている他施設とのデータも集積することで、統計学的に現行の X-CGD 造血幹細胞移植の治療成績と比較することで判定される。

9-2. 被験者の選定基準及び除外基準（添付資料三-5-1）

移植医療の適応とはならない重篤な X-CGD 患者のうち「9-2-1. 被験者の選定基準」の 1-7 の全ての条件を満たし、かつ「9-2-2. 被験者の除外基準」の 1-10 のいずれにも該当しない症例を対象とする。なお、遺伝子治療適応患者の選定にあたって