

分担研究報告書

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
研究者分担者 奥山 虎之 国立成育医療センター臨床検査部

研究要旨：ライソゾーム病に対する新規遺伝子・細胞治療として肝移植の有効性をモデル動物を用いて検証した。本研究では、正常ラットの肝臓移植したムコ多糖症 VI 型モデルラットの酵素活性値、尿中ウロン酸値の測定を行い、治療効果を評価した。移植後、モデルラットの尿中ウロン酸排泄量の低下を確認した。また移植 5 カ月後のモデルラットの肝臓における酵素活性値は正常ラットとほぼ同じレベルであったが、脳・肺・腎臓などの他の臓器においては酵素活性の上昇は見られなかった。本研究からはライソゾーム病に対する肝臓移植の効果は限定的であり、より効果的な肝臓移植のためには移植前あるいは移植後の肝臓に遺伝子導入を行い、移植肝臓が目的酵素を大量に分泌することを可能にすること、また移植された肝臓から分泌される酵素の各臓器の取り込みを検討すること、などが必要であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、ライソゾーム病に対する遺伝子・細胞治療の可能性をモデル動物を用いて検証し、将来の遺伝子・細胞治療臨床研究に資する基礎的なデータとすることである。ライソゾーム病のひとつであるムコ多糖症に対する造血幹細胞移植は、一定の治療効果を認めるが、同時に造血幹細胞移植は生着不全、安全性、ドナー不足などの問題を抱えている。これらの問題を克服するための治療法のひとつとして肝臓移植が考えられる。先天代謝異常症に対する病肝臓移植の技術は、ほぼ確立しており、造血幹細胞移植よりも生着率が高い、ドナー組織適合性の厳密な一致が必要でない、生体肝移植が可能である、などの利点がある。昨年度までに肝移植後のムコ多糖症 VI 型ラットの脾臓病理所見組織の改善、骨病変の不変などの結果を得た。本年度の研究では、肝移植後ラットにおける、尿中のムコ多糖（ウロン酸）排泄量、アリルスルファターゼβ活性値を測定し、ライソゾーム病に対する肝臓移植の治療効果を検討した。

B. 研究方法

1) 対象

研究対象となった MPR ラットは、ラット *arsb* 遺伝子における一塩基挿入により、ライソゾーム酵素のひとつである正常アリルスルファターゼβが欠損している。その結果、MPR ラットはヒトムコ多糖症 VI 型患者と同様に、尿中ウロン酸高値、顔貌異常、関節拘縮、骨病変、各臓器組織における空胞化などの症状を呈する。

2) 同所性肝臓移植

生後 3 ヶ月の MPR ラットに対して、月同齢の正常ラットをドナーとして同所性肝臓移植を行った。

3) 治療効果評価

肝移植後 MPR ラットの尿中ウロン酸および各臓器におけるアリルスルファターゼβ酵素活性測定を行った。

C. 研究成果

1) 尿中ウロン酸値

尿中ウロン酸値は図 1 で示したように、非移植 MPR ラット (Mut) では、正常ラット (wild) に比べ著しい高値を示していたが、肝移植後 4 ヶ月経過した MPR ラット (LTx) では、尿中に排泄されるウロン酸値が移植前および同週齢の罹患ラットと比べて、顕著に低下することが示された。

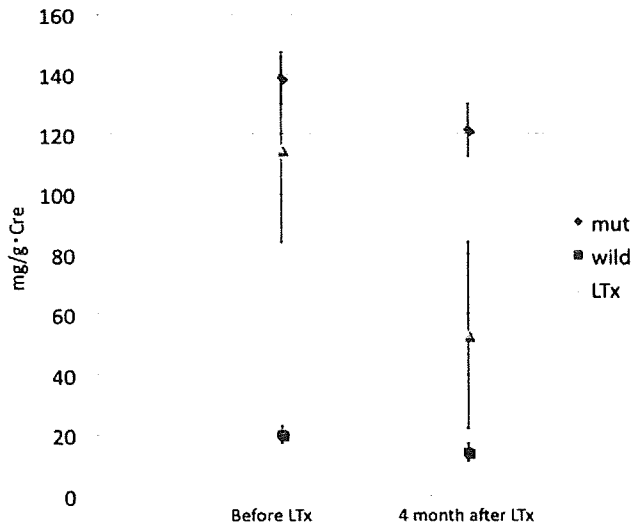


図 1. ラットの尿中ウロン酸測定値

2) アリルスルファターゼ β 活性値測定
 MPR ラット、正常ラット、肝臓移植後 MPR ラットの脳、脾臓、腎臓および移植肝におけるアリルスルファターゼ β 活性を測定した。移植 5 カ月後でも移植 MPR ラットの肝臓は、正常とほぼ同じアリルスルファターゼ β 活性値を保っていた。しかし脳、脾臓、腎臓におけるアリルスルファターゼ β 活性値の上昇は見られなかった。

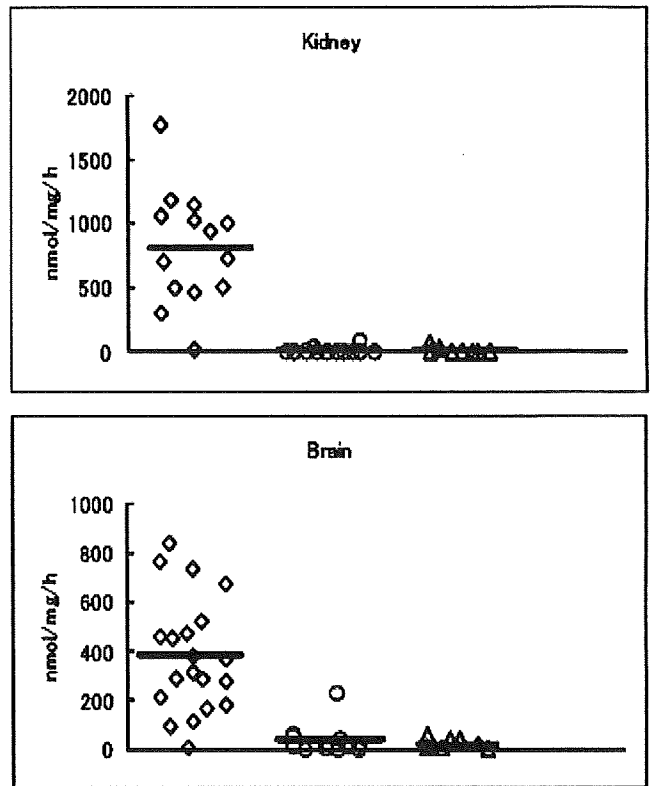
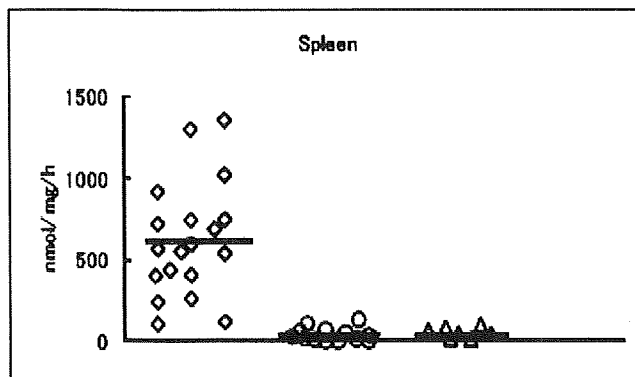
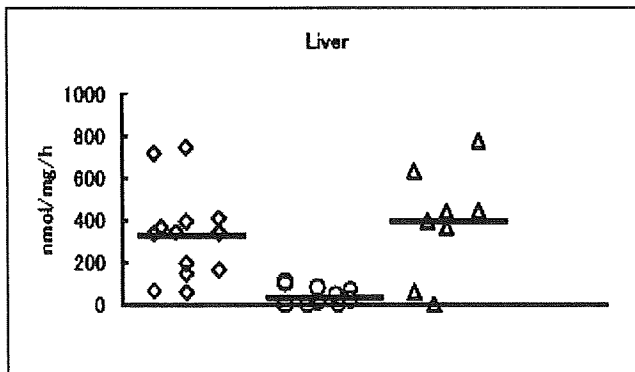


図 2. 移植 5 カ月後における各臓器のアリルスルファターゼ β 活性値 (\diamond 正常、 \square MPR、 \triangle 移植)

D. 考察

今回の研究で、肝移植によりムコ多糖症 VI 型ラットの尿中ウロン酸値の改善に有効であることが示された。しかし移植後の各臓器におけるアリルスルファターゼ β 酵素活性の著明な上昇は見られなかった。このことは、移植肝臓から分泌されたアリルスルファターゼ β を罹患ラットの臓器細胞が十分に取り込むことができないか、血液中への酵素の分泌量が不十分であったことが理由として考えられる。この点を検証するためには遺伝子導入によりアリルスルファターゼ β 高発現した遺伝子導入肝臓を罹患ラットに移植する方法、あるいは移植後のラットの移植肝に遺伝子導入を行い、血清中のアリルスルファターゼ β 分泌能を上げて各臓器の活性値を評価する方法が有効であると考えられる。また移植肝臓で産生されたアリルスル



ァターゼβのマンノース 6 リン酸レセプターを介した各臓器細胞の取り込み能力を *in vitro* で検討することが必要である。ライソソーム病に対する肝臓移植において他臓器への目的酵素の効率的な移動が可能となるならば肝細胞遺伝子治療は有効な治療手段となる可能性があると考えられる。

E. 結論

ムコ多糖症モデルラットを用いて肝臓移植による治療効果を検討し、限定的ではあるが有効性が示された。他臓器への目的酵素の効率的な移動が可能となるならばライソソーム病の治療手段として、肝細胞遺伝子治療が有効である可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprase((R)) Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). Mol Genet Metab. 2009:Aug 24.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

フローサイトメトリー法による CGD 病型診断

研究分担者小林信一
国立成育医療センター膠原病・感染症科

研究要旨

CGD の病型はこれまで伴性劣性遺伝形式の gp91phox 欠損型、常染色体劣性遺伝形式の p22phox 欠損型、p47phox 欠損型、p67phox 欠損型の 4 型が知られていた。しかし最近、細胞質成分の p40-phox 欠損型が新たに報告され 5 型に分類される。いずれも NADPH oxidase を構成する成分が欠損するものであるが、臨床症状はやや異なっている。gp91phox 欠損型、p22phox 欠損型は例外もあるが基本的には重症型であり、重症感染症や重篤な感染症を反復することが多い。これに対し他の病型は前者の病型と比較すると重症感染の頻度は低い。この違いは活性酸素産生能の違いから生じる可能性がある。この違いをフローサイトメトリーで検出することが可能かどうかを検討する。

A. 研究目的

CGD は好中球の活性酸素の産生が低下して殺菌能が障害される結果、重篤な細菌感染や真菌感染を反復する先天性免疫不全症である。乳児期より細菌、真菌感染を反復し、長期の入院を余儀なくされる。生命的予後は新しい抗生剤、抗真菌剤が使用可能となったことより以前と比べ、改善している。しかし、重症型では長期の入院、感染症による臓器障害などにより、通常的生活を送ることは困難である症例が多い。早期に重症型と診断することにより、骨髄移植や遺伝子治療を重篤な感染症を発症する前におこなうことが可能となり予後の改善が期待される。

B. 研究方法

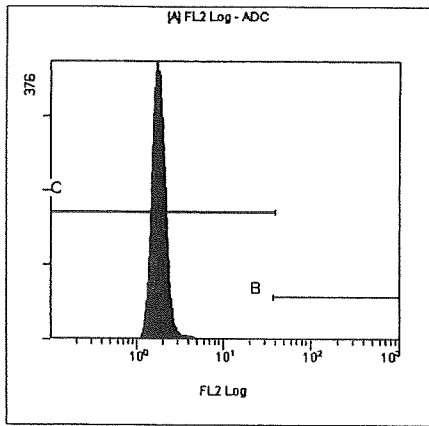
1. Lysis buffer10ml をチューブにいれへパリン血 500-600 μ l を加える。
2. 回転機で 5 分混合する。
3. 1500rpm、5 分で遠心後、上清を捨てる。
4. WBC を Wash and suspension buffer3ml に再浮遊し、1500rpm、5 分で遠心。
5. 5 μ l の Catalase(最終 1000U/ml)を加えておいたスピッツ 2 本に 400 μ l ずつ分

注する。

6. 蛍光色素の DHR をそれぞれに 1.8 μ l を加える。
7. 37°C、5 分間、shaking bath で振盪。
8. 1 本には 100 μ l の PMA を加える。他の 1 本には suspension buffer100 μ l を加える。
9. さらに 15 分 shaking bath で振盪。
10. FACS(FC500) で測定。設定は FL1(530nm)、FL2(580nm)。

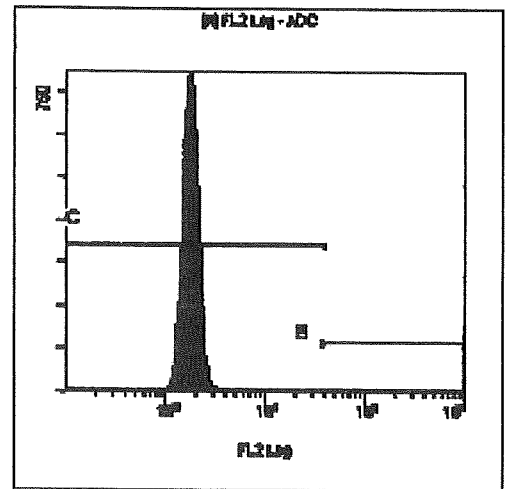
C. 研究結果

前の図は PMA 刺激前、後の図は PMA 刺激後。いずれの病型でも同様。縦軸は細胞数、横軸は発光量を示す。



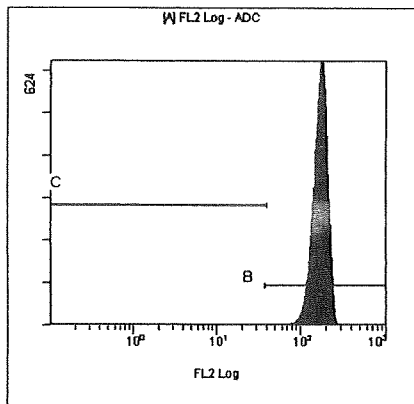
A) FL2 Log

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	18467	100.00	2.78	###
B	161	0.87	91	###
C	18310	99.15	2.02	###



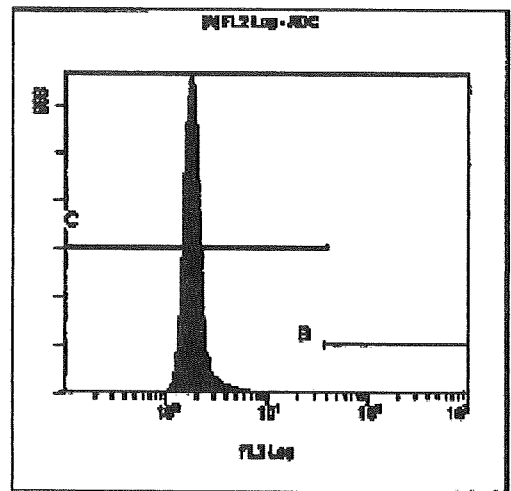
A) FL2 Log

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	35941	100.00	1.81	###
B	0	0.00	0	###
C	35941	100.00	1.81	###



A) FL2 Log

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	31330	100.00	1.70	###
B	30933	98.73	1.72	###
C	401	1.28	8.84	###

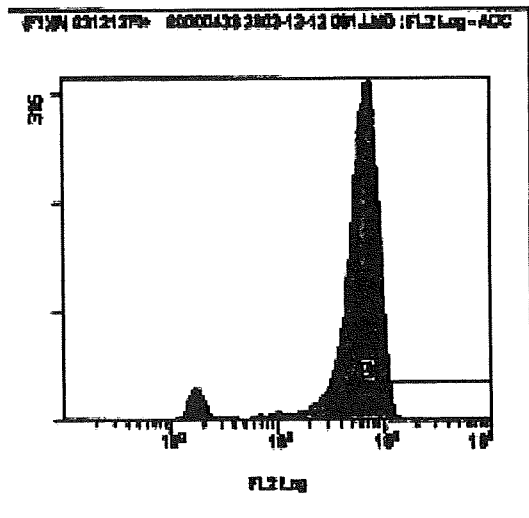
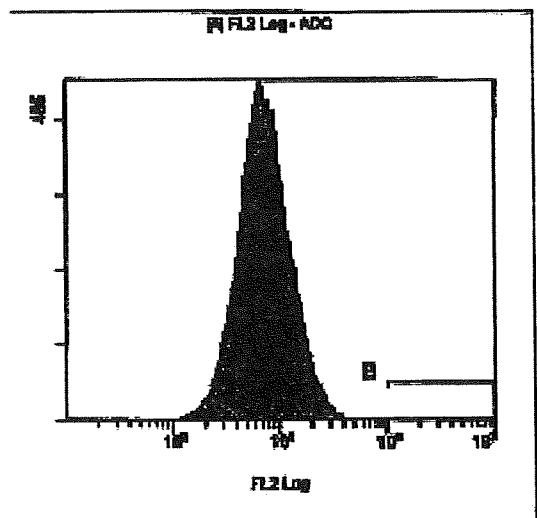
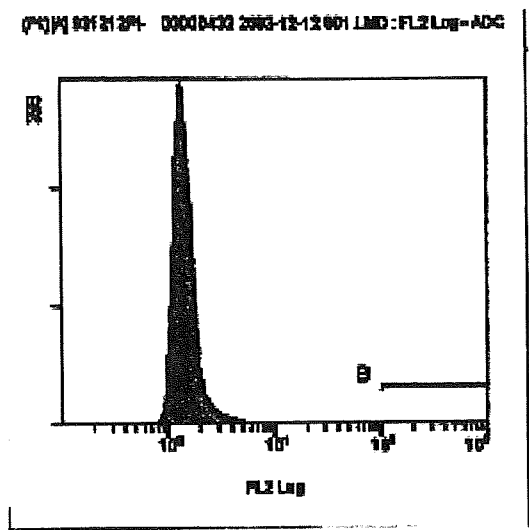
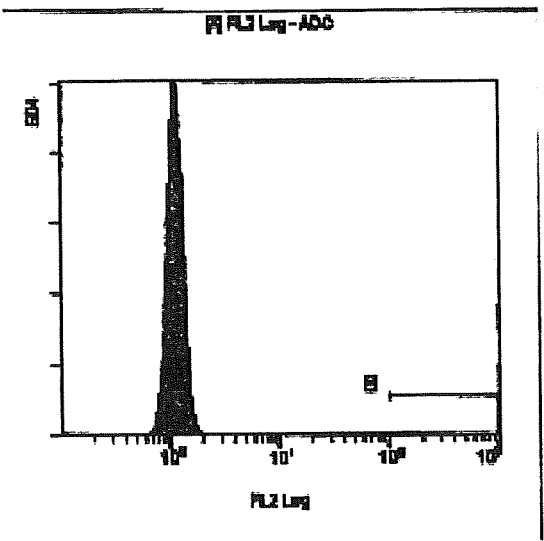


A) FL2 Log

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	31289	100.00	1.99	###
B	0	0.00	0	###
C	31289	100.00	1.99	###

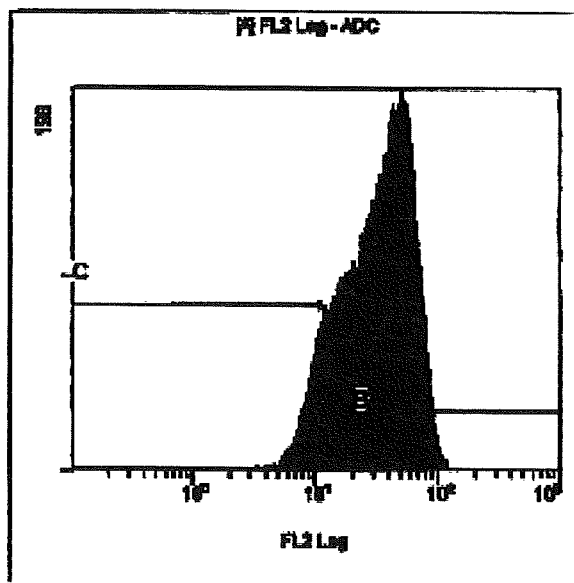
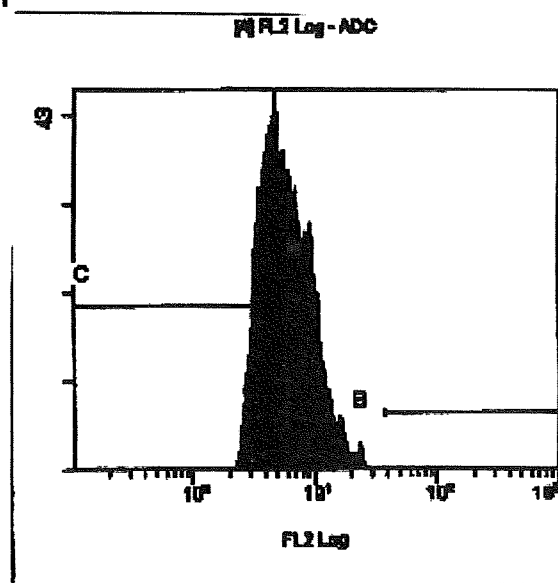
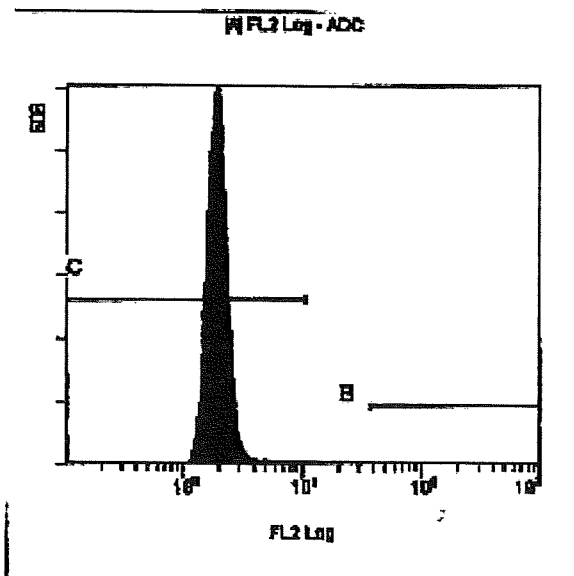
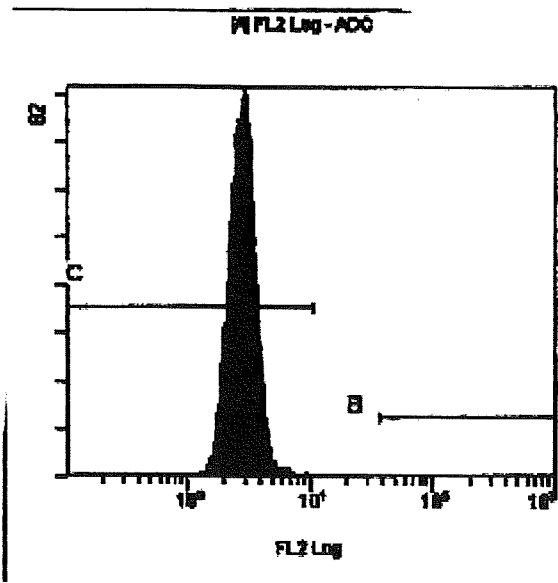
正常

典型的 gp91phox 欠損型



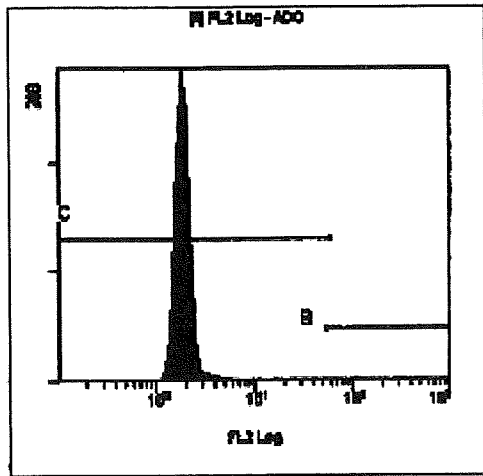
典型的 p47phox 欠損型

典型的 p67phox 欠損型

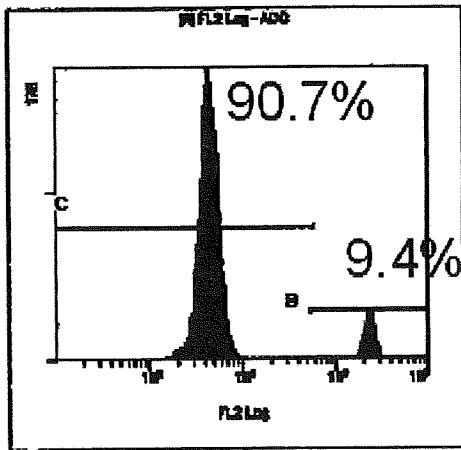


gp91phox variant

p22phox variant



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	12313	100.00	1.97	0.00
B	1	0.01	1.98	0.00
C	12314	99.99	1.96	0.00



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	21133	100.00	2.51	0.00
B	2137	9.37	2.29	0.00
C	18996	90.63	4.51	0.00

gp91 キャリア

(肝膿瘍をきたした時は正常細胞は 5%。
age-related skewing of lyonization が原因と思われる)

D. 考察

重症型である gp91phox および p22phox 欠損型では、蛍光を発する細胞集団は全くみられなかったのに対し、細胞質因子である p67phox、p47phox の欠損型では蛍光を軽度発する細胞集団がみられ、欠損蛋白をある程度代償する機構の存在が示唆された。こ

れが軽症化の原因と思われた。

E. 結論

重症型、軽症型では本法で検出される活性酸素に相違があり、これが臨床症状と関係がある。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況 (予定を含む)

なし

遺伝子治療臨床研究における倫理性に関する検討

研究分担者 掛江 直子 国立成育医療センター研究所 成育政策科学研究部

研究要旨

「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」研究班では、平成 19 年度から X 連鎖慢性肉芽腫症（X linked-CGD）の遺伝子治療臨床研究を立案し、具体的な準備を進めてきた。本分担研究では、「被験者保護」観点からのみならず医学的観点からももっとも重要である安全性、すなわち人に投与される物質の品質等の保証について、国内の法令指針等を参照し、その適正なあり方についての検討を行った。

A. 研究目的

「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」研究班では、平成 19 年度から X 連鎖慢性肉芽腫症（X linked-CGD）の遺伝子治療臨床研究を立案し、具体的な準備を進めてきた。本年度本分担研究では、被験者保護といった倫理的観点からのみならず医学的観点からももっとも重要である安全性、すなわち人に投与される物質の品質等の保証について、その適正なあり方についての検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子治療臨床研究を実施するにあたり、被験者（遺伝子治療対象者）に投与される物質の品質等の保証について定められている国内の法令指針等を参照し、どのような法令指針によってどのような手続きが求められているかを整理し、当該遺伝子治療臨床研究を実施に資する検討を行う。

（倫理面への配慮）

当該分担研究はヒト被験者ならびにヒト資料等を対象としていない文献研究であることから、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

遺伝子治療臨床研究の実施に際しては、「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、平成 14 年 3 月 27 日策定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正）を遵守することが原則である。本指針の中で、被験者に投与する物質の安全性について書かれている項目は、以下の通りである。

第一章 総則 第五 品質等の確認
遺伝子治療臨床研究に使用される遺伝子その他の人に投与される物質については、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年厚生省令第 28 号）第 17 条第 1 項において求められる水準に達している施設において製造され、その品質、有効性及び安全性が確認されているものに限る。

第一章 総則 第五 品質等の確認

すなわち、その具体的な品質等の保証の基準については、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（新 GCP）第 17 条第 1 項に委ねられているのみで、具体的な手続きについては明記されておらず、また新 GCP 第 17 条第 1 項でも具体的な品質管理方法についての記載はない。

一方、治験の枠組みの中でも、人から採取された細胞や組織を加工した上で、人に対して移植又は投与を行う場合の医薬品等の品質管理、安全性の保証についての具体的な検討が進められてきた。平成 7 年 11 月 15 日には当時の厚生省薬務局長通知として「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」（薬発第 1062 号）が示され、この指針の中で安全性試験については「医薬品の

製造（輸入）承認申請に際して添付すべき安全性試験成績の取扱いについて」（平成3年2月15日薬審第43号及び平成4年6月30日薬審第413号）の別紙2「安全性試験実施方法のガイドライン」及び「安全性試験ガイドラインについて」（平成6年4月21日薬新薬第30号）を参照することとしている。この品質管理に関する項目については、平成14年「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（文部科学省・厚生労働省告示第1号，平成14年3月27日）が告示されたことに伴う改正、ならびに平成16年の同指針全部改正に伴う改正においても変更はない。

さらに、ヒト又は動物由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器については、「細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について」（厚生省医薬安全局長通知 医薬発第906号 平成11年7月30日）により治験計画の届出を行う前に安全性及び品質の確認申請を行うこととしており、さらに平成21年の一部改正において、品質及び安全性に関する指針の明確化するために「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」（厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第0208003号 平成20年2月8日）を参考とすべきとしている。これは、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（厚生省医薬安全局長通知 医薬発第1314号 平成12年12月26日）の別添2「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」（以下、平成12年指針）に代わり定められたものである。

D. 考察

遺伝子治療臨床研究の実施に際して、被験者に投与される物質の品質等の保証については、その具体的な手続きは示されていない。しかし、同様の遺伝子治療研究を治験の枠組みで実施する際の品質等の保証については、具体的かつ詳細な手続きが示されている。倫理的な視座からは、被験者保護の点から臨床研究であっても治験で必要とさ

れているのと同等の品質管理が求められるべきと考える。したがって、必要に応じて前述の各種指針等を参照の上、品質の管理を行うことが重要であろう。

さらに、当該遺伝子細胞治療について、臨床研究が終了し、治療として医療の中で提供される段階に移る際には、臨床研究・治験といった研究における被験者保護の枠組みではなく、医療における患者保護という別の枠組みを遵守することとなる。すなわち、医師法、薬事法、医療法等による法的規制枠組みの中で実施されることになるのであるが、「再生医療・細胞医療」といった新しい領域に対応した枠組みの整備はされていなかった。このような状況に対し、新たな枠組みを検討するため、平成21年4月より厚生労働省「再生医療における制度的枠組みに関する検討会」での議論に基づき、「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について（案）」（平成22年2月23日意見募集開始）が作成されたところである。

E. 結論

本研究では、被験者保護の観点から、被験者に投与される細胞の品質管理に着目し、臨床研究の際も「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」等を適用することが望ましいと考える。また品質管理についてだけでも複数の法令指針等が関係していることが明らかとなったことから、関連する様々な法令指針等を踏まえ、これらの枠組みの中で適正に遺伝子治療臨床研究を実施するためには、これらの枠組みを理解した上で研究者ならびに医療者を支援する専門家等を有する部門等が各医療機関に整備される必要があるかもしれないと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

炎症性腸疾患を合併した X-連鎖慢性肉芽腫症に対する臍帯血移植実施の経験

研究分担者 有賀 正

北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 教授

研究要旨

慢性肉芽腫症 (CGD) の遺伝子治療は、様々な点から別の根治的治療；血液幹細胞移植と比較されて検討されるべきである。本件研究では X-連鎖 CGD (X-CGD)症例で炎症性腸疾患 (IBD) を合併していた症例に対する臍帯血移植の結果を紹介し、現時点での遺伝子治療適応の基盤情報として考察した。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症 (CGD) は長期的には予後不良の疾患であり、根治的治療をどのようなタイミングで行うかが臨床上問題になっている。遺伝子治療は将来的には極めて有望な根治治療であるが、現時点ではその適応はコントロール不能な感染症を有する症例を対象とすべきという意見が多い。これに対し、血液幹細胞移植 (HST) には強力な前処置が必要であり、活動性のある感染症を有する症例への実施は困難である。一方、炎症性腸炎 (IBD) はCGDの好発する合併症として知られているが、一部の症例ではIBDのコントロールが容易ではなくステロイドの使用が長期に及んでしまうこともある。このような症例に対してのアプローチとして HST と遺伝子治療のどちら

が現時点で優れているかはっきりとした結論は出ていない。我々は、炎症性腸疾患 (IBD) を合併した X-連鎖 CGD (X-CGD)に対する臍帯血移植を経験した。移植によって IBD がどのように経過するかを観察し、現時点での遺伝子治療適応の項目の参考情報となるかを検討した。

B. 研究方法

1年以上に及ぶ IBD を合併した 9 歳の X-CGD 症例に対して臍帯血移植を行った。プレドニンの使用が長期に及んでいたが、幸い重大な感染症の存在はなかった。血縁者に HLA 一致するドナーが不在で、非血縁者で一座不一致の臍帯血移植を実施した。前処置は BU (16mg/kg)+ CY (200mg/kg) +ALG (60mg/kg)で行い、GVHD 予防は CsA+mPSL とした。移植前に両親

に十分な説明をした後に同意を得ている。

C. 研究結果

投与した細胞数は CD34 陽性細胞として $1.1 \times 10^5/\text{kg}$ と少なめであったが、生着（好中球 $> 500/\text{ul}$ ）は day21 に認め、100%ドナー型であることが確認されている。IBD は移植の前処置の段階から改善が認められた。急性 GVH は stage III であったが、MTX の投与にてコントロールされた。移植後既に2年近く経過しているが、重症感染症はなく、IBD の症状もなく経過良好である。

D. 考察

今回、IBD を長期に合併し、ステロイドの使用が長期にわたってコントロールが良くない X-CGD に対し、非血縁の一座不一致臍帯血移植を行い、根治的効果を得、IBD の症状も軽快した症例を経験した。重症感染症の合併している症例に関しては、強力な前処置が必要な移植はその実施が困難とされているが、IBD の場合には強力な前処置そのものも IBD の治療となる可能性があり、移植による二重の効果を期待することが可能と思われた。

近年、CGD における IBD はその機構が活性酸素産生不全による炎

症のコントロール不全というメカニズムが研究されてきており、現状の遺伝子治療のプロトコルでこのメカニズムがどの程度矯正されるのか基礎的な研究が必要と思われる。当初の遺伝子治療の適応をコントロール不良の重大な感染症を有する症例に限って実施するプロトコルを支持したい。

E. 結論

IBD を長期に合併した X-CGD に対して一座不一致の臍帯血移植を実施し、良好な治療効果を確認できた。現時点での遺伝子治療のプロトコルと成績を考慮すると、遺伝子治療の適応をコントロール不良の重大な感染症を有する症例とすることを支持したい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Maekawa K, Yamada M, Okura, Sato Y, Yamada Y, Nobuaki Kawamura N, Ariga T. X-linked agammaglobulinemia in a 10-year-old boy with a novel non-invariant splice-site mutation in *Btk* gene. *Blood Cell Mol. Dis.* in press.

有賀 正：アデノシンデアミナーゼ欠損症・プリンヌクレオチドホスホリラーゼ欠損症。小児内科増刊号 40 小児疾患診療のための病態生理 1 1318-1321, 2008

有賀 正：巻頭言 遺伝子治療の最近の動向：2008 年の ASGT と JSGT に参加して。北海道小児科医会会報 第 24 号 2-3, 2008

有賀 正：Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP). 日本臨床。広範囲血液・尿化学検査、免疫学検査 (1) 67, 505-507, 2009

有賀 正：原発性免疫不全症にみられる自己免疫病態。日本小児リウマチ学会雑誌 印刷中

有賀 正：原発性免疫不全症。遺伝子診療学：遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望。4。膠原病・アレルギー疾患に対する遺伝子治療。1) 原発性免疫不全症。印刷中。日本臨床

有賀 正；全身に見られる症候易感染症、今日の診断指針第六版 金澤一郎、永井良三、総編、医学書院、東京都 印刷中

有賀 正：原発性免疫不全症。今日の治療指針 2011 年度版。私はこう治療している。印刷中 医学書院 東京都

2. 学会発表

有賀 正 Wiskott-Aldrich 症候群の診断・治療・トピックス。コーヒーブレイクセミナー I 第 60 回北日本小児科学会。9/14、2008、秋田

有賀 正 原発性免疫不全症に伴う自己免疫疾患。会長講演。第 18 回日本小児リウマチ学会。10/3-5、2008、札幌

有賀 正 Wiskott-Aldrich 症候群の病態・診断・治療・トピックス北海道免疫不全講演会 特別講演(平成 21 年 7 月 24 日;札幌市)

有賀 正 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と問題点教育講演 第 16 回日本遺伝子診療学会 (平成 21 年 7 月 31 日 ;

札幌市)

有賀 正 日常診療と免疫不全症
教育講演 第一回北海道男女共同
参画会議 (平成 21 年 11 月 21
日 ; 札幌市)

有賀 正 遺伝子治療について
高校生メディカル講義 平成 21
年 12 月 5 日 札幌西高校

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

日本の慢性肉芽腫症の死亡原因の検討

研究分担者 布井 博幸（宮崎大学医学部小児科教授）

研究協力者 水上智之¹⁾ 鈴木信寛²⁾ 藤原 亨³⁾ 望月一広⁴⁾ 土田昌宏⁵⁾ 石和田稔彦⁶⁾ 村山静子⁷⁾
小林信一⁷⁾ 冠木智之⁸⁾ 鹿間芳明⁹⁾ 黒木文子¹⁰⁾ 矢部普正¹¹⁾ 渡辺千英子¹²⁾ 野村恵子¹³⁾
森本哲¹⁴⁾ 迫正広¹⁵⁾ 岸本朋子¹⁶⁾ 三木瑞香¹⁷⁾ 寺岡いづみ¹⁸⁾ 田内久信¹⁸⁾ 長谷川大一郎¹⁹⁾ 武市京子²⁰⁾
足立壮一²¹⁾ 中畑龍俊²¹⁾ 小林正夫¹⁷⁾

- 1)宮崎大学小児科 2)札幌医科大学小児科 3)東北大学加齢医学研発達病態 4)福島県立医大小児科
5)茨城県立こども病院 6)千葉大学小児科 7)国立成育医療センター 8)埼玉県立小児医療センター
9)神奈川県立こども病院 10)横浜市立大学小児科 11)東海大学小児科 12)浜松医科大学小児科
13)富山大学小児科 14)京都府医大小児科 15)大阪市立総合医療センター 16)奈良県立医大小児科
17)広島大学小児科 18)愛媛大学小児科 19)兵庫県立こども病院 20)愛媛県立中央病院
21)京都大学小児科

研究要旨 慢性肉芽腫症に対する治療は、近年新しい抗生物質や抗真菌剤の登場、日常生活指針の発刊や、重症感染の予防に努めることによりかなり改善してきた。日本では1992年から2006年末までに国内でCGDに対する造血幹細胞移植が32例に実施されているが、そのうちで死亡者7名が報告されている。骨髄移植例のうちCY+Flu前処置では死亡例なかったが、BU+CY前処置で4例、CY単独またはTBI(11Gy)の前処置で各々1例、Flu+VP16で1例の計8名が亡くなっている。この間骨髄移植以外で死亡された方は我々が知る範囲では9例であった。各々の死亡原因や術前の状態について詳述した。**結論**：最近慢性肉芽腫症の骨髄移植が可能になってきたが、移植自身による危険性と移植出来ずに亡くなられた症例が実際おられることから、遺伝子治療により一時的な軽快を得ようとする試みも、現時点では選択肢の一つとして重要な方法ではないかと考えている。

A. はじめに

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、国内患者数270名以上で原発性免疫不全症候群の中でも最も多い疾患の一つである。近年抗真菌剤の進歩が著しいが、十分な治療効果が得られない症例もあり、根治療法としての骨髄移植の確立が期待されていた。日本では1992年に慢性肉芽腫症患者へ骨髄移植が行われて以来、15年間に34名の移植症例が把握され、その移植経過および成績について多施設の先生方のご協力を得て調査解析を報告した（厚労省科学研究補助金、原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成19年度 総括・分担研究報告書p17-22)。しかし、7名の死亡者が骨髄移植でも認められ、細胞療法としての遺伝子治療の可能性も選択肢の一つとして考えられている。今回、骨髄移植による死亡原因とその間に死亡された慢性肉芽腫症患者についての解析を行った。

B. 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った。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たと

ころ、32例について回答を得た。全症例とも、連結可能匿名化した後に解析を行った。この間亡くなられた症例については研究会などで報告された施設に問い合わせさせていただいた。回答を頂きました北海道大学小児科有賀正教授、成育医療センター小林信一先生に深謝いたします。

C. 結果

慢性肉芽腫症患者に対する骨髄移植の概要

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。詳細についてはH19年度厚労省報告をしたので概要に留めるが、移植患者数は2001年以降急速に増えており、3年間で16例と、全移植症例の約半数が実施されている。

男女比は31:1、移植時の平均年齢は12.2歳(2~28歳)。27例は状態が十分安定したとは言えない状態で移植が実施されていた。初回移植後に6例が死亡し、拒絶例もその後1例死亡したため、2007年の現状調査時点で生存は25名であった。全例移植後1年以上経過していた時点での、Karnofsky scoreによるperformance status (PS) 評価は、慢性GVHDは、GVHDなしが19例、limited typeが5例、extensive typeが1例であった。PSは100%が21例、90%が2例、80%と70%が各1例であった。

移植の実情(表1):

骨髄移植は26例で実施され、HLA一致同胞12例とHLA一致非血縁8例とでは同等に良好な成績であったが、HLA不一致ドナーでは、移植前処置などまだ検討すべき課題が多いと思われた。同胞末梢血幹細胞移植と臍帯血幹細胞も3例と少なく評価が難しい。後者では死亡者が多かったが、調査以降成功例が2例(1例は再移植)報告された。

前処置法としては32例中BU+CYが12例、CY+Fluが14例で採用され、この2つで全体の8割強を占めた。移植結果では、BU+CY前処置(12例中8例成功、4例死亡)より、CY+Flu前処置(14例全例成功)が成績良好と考えられた。しかしCY+Flu前処置では、ドナー型への置換が完全には進まず、DLIが14例中7例で実施された。

死亡例(表2)

初回移植では6例が死亡、2例は生着不全で、4例は生着にもかかわらず感染症などで死亡され、内1例は移植5年後に横紋筋肉腫で亡くなっている。死亡例は6例とも15歳以下であった。一方16歳以上の10例は全員生着していた。

生着不全で亡くなった症例5、18の原因としては、移植時点での潜在的感染巣の存在、HLA不一致ドナーからの移植、直前までのIFN- γ 投与などが考えられる。

生着後の死亡では、前処置の影響と考えられる症例が2例有り、症例9は1座不一致同胞からCY+TBI12Gy前処置で移植され成功したが、移植4年後に横紋筋肉腫を併発して死亡され、症例32は、HLA一致同胞(骨髄)からBU+CY前処置による移植であり、低リスクと考えられたが、VOD、TMA、間質性肺炎を併発し、移植後157日で死亡されている。その他、十分なGVHD予防に関わらず、症例6はGVHD+TMA(+77日)、症例9は多臓器不全(+22日)などで死亡しておられ、原因としては、薬剤による臓器障害、慢性肉芽腫症による潜在病変からのflare-up(再活性化)などが考えられる。

晩期障害としては症例9が横紋筋肉腫で亡くなっている。CGDは非悪性腫瘍疾患であり、晩期障害(不妊・低身長など内分泌学的異常、二次癌など)をできるだけ避けられる前処置法の確立が必要である。

再移植がされた症例15Dは、初回移植は1座不一致母親からBU+Flu+ATG前処置にて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死亡されている。

慢性肉芽腫症患者の死亡年齢(図2)

これまでの死亡45例の報告を図2の左側に年齢と病因別に示した。右側には移植を行っている間に報告された移植関連死亡者6名とこの期間中の死亡者9例の年齢を示した。

後者は具体的に、0歳児の侵襲性肺カンジダ、8歳男が水痘後、17歳男がキノコ収穫後にアスペルギルス肺炎による肺肉芽腫の増悪で、17歳男がアスペルギルス肺炎、胸椎浸潤で、19歳男が硬膜外膿瘍(Acremonium)で、19歳男性が肺炎、呼吸不全(緑膿菌、アスペルギルス)、21歳男性が敗血症、血球貪食症候群、24歳男性が肺肉芽腫、突然死、

30歳男性が肺肉芽腫、敗血症で各々死亡されていた。また、gp91欠損形の幼児の突然死も報告されているが詳細がわかっていない。

D. 考察

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植に対する考察は、以前に報告したので、簡略に結論だけ繰り返すと、1) 近年症例数が急速に増加し、2) 難治例でも欧州とほぼ同様の成績で、3) 移植患者の Quality of life についても良好で、3) HLA 一致同胞骨髄と HLA 一致非血縁骨髄でも成績良好で、5) 全体としての移植成績も向上している。

初回移植時の前処置レジメンについては、表1のように、BU+CYを中心とした骨髄破壊的前処置とBU+CYを中心とした骨髄非破壊的前処置が主体であり(表1)、骨髄破壊的前処置による移植では15症例中6例が死亡されているのに比べ、骨髄非破壊的前処置17例では全例生着していた。しかし、骨髄非破壊的前処置では半数の症例でDLIが必要で、その危険性や、適応と投与細胞などまだ十分に検討すべきである。一方で、ドナー顆粒球が十分優位になるような骨髄抑制剤の追加も考慮すべく新しい前処置レジメン(案)を提示した。

今回特に死亡6例に注意して解析すると(表2)、1) 生着不全の原因としては、移植時点での潜在的感染巣の存在、HLA不一致ドナーからの移植、直前までのIFN- γ 投与などが考えられ、2) 生着後の死亡では、薬剤による臓器障害、慢性肉芽腫症による潜在病変からのflare-up(再活性化)などが考えられる。3) 晩期障害をできるだけ避けられる前処置法の確立が必要であると考えられた。

しかし、図2のように、この間、骨髄移植を行わずに死亡された症例も9例と多く、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が、それが実行出来ない症例が多く存在する事を示している。そこで、まだ、技術的にも十分な効果を示せているとは言えないが、ドイツの Grez 教授や米国の Harry 博士、韓国の Kim 教授が示している様に、retoro virus vector を用いた遺伝子治療で活性酸素産生能の再構築された好中球が数ヶ月という短期ではあるが、末梢血に10%と出現し、

重症感染の改善を得られている事から、遺伝子治療により一時的な軽快を得ようとする試みも、現時点では選択肢の一つとして重要な方法ではないかと考えている。

図表の説明

表1. HLA と移植前処置レジメン

Squares; Bu/Cy, triangles; Cy/TBI, circles; Cy/Flu, hexagons; Flu/L-PAM/Bu regimen, Open; alive, solid; deceased, shaded; re-transplanted, Numbers; registered patient's number, PB; peripheral stem cell, CB; cord blood stem cell, †/‡ symbols; regimen-related toxicity and infections, dashed lines; DLI.

表2. 骨髄移植による死亡例の検討

MRD; HLA 一致血縁ドナー、MMUD5/6; HLA 不一致非血縁ドナー、BM; 骨髄、CB; 臍帯血、PB; 末梢血、Bu; Busulfan, Cy; cyclophosphamide, Flu; Fludalavine, VP-16; Etoposide, ATG; anti-T cell globuline, MTX; methotraxate, CyA; cyclosporine A, FK; FK506, TMA; Thromboticmicroangiopathy, VOD; Veno-occlusive Hepatic Disease

図1. 慢性肉芽腫症患者の死亡年齢

■ 肺アスペルギルス症、● 肺カンジダ症、◆ 敗血症、
□ 肝膿瘍、★ 肺炎▲ その他の原因による死亡(髄膜炎、腎不全) ○ 生着後死亡 ○ 生着不全、● 移植期間中の他の原因による死亡

G. 研究発表

<2008 年度論文>

1. Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab. Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe K, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T, Adachi S. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):329-31.

2. Cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia showing hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

Moritake H, Ikeda T, Manabe A, Kamimura S, Nuno H.

Pediatr Blood Cancer. 2009 ;53(7):1324-6.

3. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. Kawachi S, Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TT, Phan PH, Nuno H, Nguyen LT, Suzuki K.

J Infect Dis. 2009;200(4):510-5.

H. 知的財産権の出現・登録状況、参考文献

なし

挿入発癌リスクフリー非組込み型ベクター用組織特異的プロモータの検討

分担研究者 久米晃啓 自治医科大学准教授

研究要旨

ベクター挿入発癌リスクのない非組込み型ベクターの一つであるアデノ随伴ウイルスベクターの安定保持のため、組織特異的プロモータの検討を行った。培養細胞における比較検討では、筋クレアチンキナーゼプロモータの組織特異性と高発現が認められた。しかし、アデノ随伴ウイルスベクターとしてマウスに筋注した後の *in vivo* 活性では汎用プロモータに対する優位性が確認されず、さらなる高発現をめざして検討が必要であることがわかった。

A. 研究目的

現在、幹細胞遺伝子治療において問題となっている染色体挿入発癌を回避するには、染色体外で安定に存在する非組込み型ベクターの開発や、染色体上の安全な部位に遺伝子を組込む技術の確立が望まれる。野生型アデノ随伴ウイルス (AAV) は、非構造蛋白質 Rep の働きによりヒト第 19 番染色体長腕端部 (AAVS1 領域) にゲノムを組込む。ベクター化された AAV ではこの組込み活性は失われているが、標的組織にて長期間安定に存在する。ベクター保持細胞が免疫系の攻撃を避けて安定に存在するためには、目的組織以外で遺伝子が発現しないように組織特異的プロモータを用いる必要があり、今回骨格筋をモデルとして検討を行った。

B. 研究方法

筋特異的プロモータとして筋クレアチンキナーゼ (MCK) を、比較検討には汎用プロモータであるサイトメガロウイルス (CMV) と肝特異的プロモータ (LP1) を用い、各々とヒト凝固第 IX 因子 (FIX) レポーター遺伝子を AAV ベクターに組込んだ。予備的検討としてこれらの発現プラスミドを腎上皮細胞 (293)、肝癌細胞 (Huh7)、筋芽細胞 (C2C12) にトランスフェクトし、上清中の FIX を ELISA とイムノブロットで測定した。組換え AAV ベクターはこれらベクタープラスミドと AAV1 型キャプシドを用いて作製し、マウス後肢筋に注射したのち、定期的に採血して血漿中 FIX を ELISA で定量した。7ヶ月追跡した後、動物は屠殺して筋組織中のベクター残存量を定量的 PCR で解析した。

C. 研究結果

培養細胞における検討では、293 や Huh におい

て CMV が最も強く MCK は殆ど活性がなかった。

未分化な C2C12 でも CMV が最も強かったが、C2C12 を誘導培地にて筋管細胞に分化させると MCK の活性が上昇し、CMV を凌駕する FIX 発現が得られた。そこで、AAV/CMV-FIX と AAV/MCK-FIX をマウス後肢筋に注射し、経時的に FIX の発現を追跡した。ヒト FIX はこれらマウスにおいて緩やかに上昇し、筋注後 8-10 週で定常状態に達した。筋注 28 週後の血漿中 FIX は、CMV 群 ($1.7 \pm 2.5\%$; $n=4$) が MCK 群 ($5.7 \pm 4.0\%$; $n=4$) より高かった (有意差なし)。ベクター残存量は、MCK (0.03 ± 0.02 copy/diploid genome) 群より CMV 群 (0.20 ± 0.19 copy/diploid genome) が小さかった (有意差なし)。

D. 考察

CMV プロモータと MCK プロモータの *in vivo* (マウス後肢筋) 活性が、培養細胞 (C2C12 分化後筋管細胞) を用いた実験結果を反映しなかった理由は今のところ不明である。定量的 PCR の結果は、むしろ発現と逆相関していた。ただし、いずれのアッセイにおいても測定値は検出限界近くの低値でばらつきも大きく、ベクター投与量を増やして再検討する必要がある。一方、かねてより我々が研究を進めている AAV の染色体部位特異的組込み機能の利用については、2009 年 11 月の欧州遺伝子細胞治療学会にて Zn-finger nuclease や Sleeping Beauty トランスポゾンを用いて AAVS1 領域に外来遺伝子を組込む研究が発表され、トピックとなっていた。

E. 結論

AAV 搭載用組織特異的プロモータの開発には、更なる検討を要する。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 16:383-391, 2009.
- 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) Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med* 11:373-381, 2009.
- 4) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyakawa N: Kinetics and effect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 20:777-783, 2009.

2. 学会発表

- 1) 久米晃啓、八木洋也、小倉剛、水上浩明、ト部匡司、小澤敬也：改良型アデノ随伴ウイルスベクターによるフェニルケトン尿症遺伝子治療。第112回日本小児科学会小児科学会学術集会、2009年4月、奈良（日児誌113：275, 2009）
- 2) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Ogura T, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa H, Ozawa K, Kume A: Improvement of monoamine metabolism in phenylketonuria mouse brain treated with a self-complementary adeno-associated vector. The 12th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, May 2009, San Diego, CA, USA (*Mol Ther* 17 Suppl 1:S70, 2009)
- 3) Okada MI, Okuyama T, Kobayashi S, Kawai T, Horiuchi Y, Kiyakawa N, Li XK, Fujimoto J, Otsu M, Kume A, Ariga T, Mizukami T, Nunoi H, Kuratsuji T, Malech HL, Kang EM, Onodera M: A report of the progress for X-linked CGD gene therapy in Japan. 第15回日本遺伝子治療学会、2009年7月、吹田 (Abstract #093)
- 4) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji

- T, Kiyokawa N: Kinetics and defect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. 第15回日本遺伝子治療学会、2009年7月、吹田 (Abstract #095)
- 5) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Ogura T, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa K, Ozawa K, Kume A: Liver-targeted gene therapy with a self-complementary AAV ameliorated brain aminergic deficit in phenylketonuria mice. 第15回日本遺伝子治療学会、2009年7月、吹田 (Abstract #105)
- 6) 久米晃啓、八木洋也、水上浩明、ト部匡司、塚原智典、実近翔、一瀬宏、小澤敬也：フェニルケトン尿症遺伝子治療による神経伝達モノアミン代謝の改善。日本人類遺伝学会第54回大会、2009年9月、東京（抄録集 p145）
- 7) Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Ishiwata A, Mimuro J, Madoiwa S, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K: Promoter selection for muscle-directed self-complementary AAV toward hemophilia B gene therapy. 第71回日本血液学会学術集会、2009年10月、京都（臨床血液 50:929, 2009）
- 8) Kume A, Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K: Liver-targeted gene therapy with a self-complementary AAV ameliorates brain aminergic deficit in phenylketonuria mice. XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, November 2009, Hannover, Germany. (*Hum Gene Ther* 20:1480, 2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当せず