

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

研究要旨: 1) 慢性肉芽腫症(CGD)遺伝子治療臨床研究では、導入遺伝子陽性細胞の出現が一過性に終わることが多いため、その原因を明らかにする目的で、前臨床試験を行った。1) 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における欠損タンパク、gp91phox への CGD 個体による免疫拒絶に関しての検討を行った。長期における検討によって導入遺伝子産物に対する免疫拒絶は CGD 遺伝子治療における修復細胞の消失の主たる原因ではないことが示された。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を行った。新たな蛍光色素 APF を用いた活性酸素産生能の評価法を確立し、検討に用いた。CGD マウスモデルを用いて造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を施行し、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 蛋白の発現量において閾値が存在することを示すデータを得た。3) CGD 遺伝子治療において化学療法剤による骨髄前処置が行われるが、前処置による炎症反応が移植される造血幹細胞に対して与える影響について明らかにした。炎症性サイトカインに暴露される造血幹細胞においては機能低下が誘導されるが、CGD 造血幹細胞と野生型造血幹細胞とで感受性に差がある可能性を考慮し、さらに検討を継続している。

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の向上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、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を考慮して実験系を構築した。

以上を明らかにするため、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、C

GD 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。APC-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。

3. 正常 Ly5.2 マウスに放射線照射を行い、Ly5.1 由来造血幹細胞 400 個を移植し、24 時間後に骨髄を採取して、骨髄中に含まれる Ly5.1 由来細胞の造血再構築能を評価した。放射線照射から造血幹細胞移植までの時間を 24、48、72、96 と変えて比較を行い、骨髄環境中で異なる炎症状態が造血幹細胞に与える影響について評価した。

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、最長 20 週までの解析が可能であった。結果、両グループに

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、個体間でのばらつきが観察されたが、個々のマウスにおいては、解析期間中、キメリズムの明らかな変動、特に免疫拒絶で予想される野生型骨髄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 マウス骨髄より採取した幹/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。これらのマウスの末梢血において新規蛍光色素である APF を用いて好中球における活性酸素産生能の評価を行った。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、両分画において導入遺伝子の存在および発現が確認された。導入遺伝子発現量を示すマーカー KO の蛍光強度と、活性酸素量を示す APF 蛍光強度との間には直線性の相関を認めなかった。

3. 放射線照射後 0-24 時間の骨髄環境に暴露された造血幹細胞と比較して、照射後 48-72 時間の骨髄環境に暴露された造血幹細胞では明らかな機能低下を認めた。この機能低下には骨髄環境内で産生される炎症性サイトカインが主たる原因を担っていることも示され、現在、CGD 細胞と正常細胞とでこの抑制作用に対する感受性に差がある可能性を考慮して検討を継続している。

D. 考察

1. 前年度までの検討で、CGD マウス骨髄造血幹細胞と、野生型造血幹細胞との間には、競合的骨髄再構築アッセイにおける骨髄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、免疫拒絶を示唆する結果は得られなかった。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、gp91phox 発現細胞に対する免疫拒絶の可能性も否定的であると考えられる。

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以上ないと活性酸素産生能の獲得には至らないという仮説をたて実験を行った。結果、遺伝子治療によって造血を再構築した CGD マウスの末梢血中に、KO 陽性 APF 陽性と、KO 弱陽性で APF 陰性の 2 つの分画を観察することが可能であった。APF 陰性細胞集団においては KO 蛍光は弱陽性であるものの、ベクター gp91phox 遺伝子は陽性であり、またその発現も検出可能であったことから、機能修復に必要な gp91phox 発現量には閾値が存在することが示唆された。

3. 放射線照射骨髄中の炎症性サイトカインが造血幹細胞機能の低下を誘導することを実験的に証明した。CGD 造血幹細胞がこの機能低下に対して、野生型、すなわち遺伝子治療においては機能修復細胞と比較して抵抗性が高いとするならば野生型造血幹細胞が徐々に造血への寄与を低下させる現象を説明できる。今後はその可能性と、抗がん剤による骨髄前処置においても同様の造血幹細胞抑制効果があるのか等について検討を加える予定である。

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、活性酸素産生能の再構築に必要な gp91phox 発現量に閾値が存在する可能性が示唆された。

3. 放射線照射骨髄環境は移植される造血幹細胞に対して短期間の暴露での機能低下を誘導することを証明した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. Nature 2009; 460:904-908.

- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009; 15:914-920.
- Okabe M, Otsu M, Ahn DH, et al. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 2009; 114:1764-1767.
- Ogaeri T, Eto K, Otsu M, et al. The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27:1120-1129.
- Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, et al. Kinetics and Effect of Integrin Expression on Human CD34(+) Cells during Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 2009.
- Sogo T, Kawahara M, Ueda H, et al. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine*. 2009.
- affects HSC functions in hematopoietic stem cell transplantation
Sachie Suzuki, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi
71th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH 2009)
Oct 23-25, 2009, Kyoto, Japan
- Functional reconstitution in X-CGD mice established by allogeneic BMT with the use of anti-CD40L mAb
Yasuo Takeuchi, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi
71th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH 2009)
Oct 23-25, 2009, Kyoto, Japan
- Generation of iPS cells from Murine Marrow Hematopoietic cells
Motohito Okabe, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi
71th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH 2009)
Oct 23-25, 2009, Kyoto, Japan
- 「先天性免疫不全症の遺伝子細胞治療」
第 37 回日本臨床免疫学会
平成 21 年 11 月 14 日、東京

2. 学会発表

- A threshold in expression levels of gp91phox transgene limits the degree of functional correction in granulocytes after gene therapy for X-CGD
Yasuo Takeuchi, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi
XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy
Nov 20-25, 2009, Hannover, Germany
- Preclinical studies to improve the efficacy of stem cell gene therapy for X-CGD
Yasuo Takeuchi, Makoto Otsu, Masafumi Onodera, Hiromitsu Nakauchi
XVth Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy
Jul 9-11, 2009, Osaka, Japan
- Irradiated bone marrow environment

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、昨年度に引き続き、研究機器等の整備を行った。特に、本年度から建築が開始された医療クラスターに関連した機能として、遺伝子治療が注目されており、機器等の整備が進んだ。また、研究計画書の作成について定期的な打合せを行い完成への支援を行った。

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) 実験室等整備

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) 計画書作成支援

定期的な打合せを開催し、検討を進めた。

3) 遺伝子治療倫理委員会

委員の任期満了に伴い、新たな委員選定と委嘱を行った。

C. 研究結果

1) 実験室等整備

昨年度までに研究所内に遺伝子治療専用の培養室を整備し、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。本年度は、CD34 陽性細胞分取装置を始め、フローサイトメトリー、ディープフリーザー、液体窒素タンク等の機器整備を進め、必要な機器はすべて揃った。

2) 計画書作成支援

主任研究者を中心として、2週間に一度の定例打合せ会を開催し、研究計画書を完成させた。

3) 遺伝子治療倫理委員会

国立成育医療センターにはすでに遺伝子治療倫理委員会が設置済みだが、今般、委員の任期が終了することを考慮し、委員の選考を実施し委嘱を完了した。なお、委員会の構成は「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に従った。

D. 考察

遺伝子治療に実施に関する機器等の基盤整備は本年度でほぼ終了した。また、研究計画書も完成し、遺伝子治療倫理委員会へ申請済みという段階まで達成した。今後は、施設ならびに国レベルでの各種審査を受ける段階となる。本研究計画を実現することが最重要課題であるが、各段階におけるノウハウを蓄積し、将来につなげるための取り組みも大変重要と考える。平成22年度には臨床研究センターが設置される見込みであるため、そこを中心とした支援体制整備が進むものと期待できる。

E. 結論

遺伝子治療推進の機器等の整備はほぼ完了した。また、研究計画書も完成した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 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(7):777-83,2009.
- 2) Miyagawa, Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. Immunology. 128(3):405-19, 2009.

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臨床応用に関する研究

研究分担者 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年度より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、種々の理由で造血幹細胞移植を受けられないX連鎖慢性肉芽腫症(X-CGD)に対する遺伝子治療臨床研究実施の準備を行ってきた。過去に重大な有害事象が見られていない米国立衛生研究所(NIH)のMalech博士らが作製したレトロウイルスベクターを用いて、日本・米国・欧州の国際多施設共同臨床研究を行う。本年度は、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完成し、遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出した。

A. 研究目的

造血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療をX連鎖慢性肉芽腫症の患者に対して実施し、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) 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究は、海外では1995年から開始され、これまで22名に対し23回行われている。平成20年度に引き続き、各国の遺伝子治療被験者の経過等について情報収集を行い、新規の有害事象の発生がないか調査する。
- 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完成させる。
- 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の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：2006年末より本研究とほぼ同一のプロトコールの遺伝子治療が開始された。1998年の遺伝子治療の際に作製され、保存されていたレトロウイルスベクターMFGS-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。症例1は、治療後3年となる現在も骨髄細胞の定量PCRの結果は1%で、染色体異常は検出されていない。臨床的には、治療後4ヶ月で肝膿瘍が治癒し、大きな有害事象はなく現在も健在である。
- 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)を使って骨髄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。2症例とも最初の2年間は素晴らしい治療効果を示したが、症例1は、顎骨膿瘍摘出術後に敗血症で死亡した。死亡時の骨髄および剖検組織のマクロ標本では芽球細胞は検出されなかったが、骨髄細胞の染色体の8割がモノソミー7だったことが、後に判明した。症例2は、982日の骨髄で単核球の50%でモノソミー7だったが芽球は認めなかった。1240日の定期検査で骨髄中に5%の芽球を認め骨髄異形成症候群と診断された。その後、HLA適合ドナーから造血幹細胞移植を受け、CGDも治癒し良好な経過をたどっている(私報)。臨床研究自体は中止ではないが、ドイツでは同じベクターを使った遺伝子治療は行われていない。

2)-2 スイスの臨床研究：スイスでは、ドイツの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。遺伝子導入細胞の比率は、当初30%だったが90%まで増加している。CAMTA1遺伝子の近傍にベクターゲノムの挿入が検出されているが、患者は生存している(私報)。

2)-3 イギリスの臨床研究：イギリスでは、これまで4例のX-CGDに遺伝子治療が行われた。Institute of Child HealthのThrasher博士らは、前処置薬としてメルファラン(140mg/m²)を使用している。症例1には、Malech博士から供与されたMFGS-gp91が、症例2~4には、ドイツのSF71-gp91が使われた。症例4は、ドイツの有害事象後に患者の利益と危険性について十分に検討した上で、治療が行われた。症例1~4とも遺伝子導入細胞の陽性率は1%以下だったが、症例1は肺アスペルギルス症が改善し、症例4は治癒の見込みのない重症感染症から生還している。症例2、3には無効であった(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が使用されている。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、これまでに2例(18歳と9歳)に実施された。治療効果についての詳細は不明だが、2症例とも造血障害は起こっておらず、健在である。

4) 日本の遺伝子治療臨床研究：平成20年度の本研究の報告書に記した通り、日米欧の国際多施設共同臨床研究を行う準備が進んでいる。なお、使用するウイルスベクターはMFGS-gp91でブスルファンの総使用量が約10mg/kgであることが共通であるが、実施計画書の詳細は各国に事情に合わせる。ブスルファン投与方法は、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)

今年度は、実施計画書、被験者説明文書、その他必要な添付文書を完成させ、国立成育医療センター内の遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出した。

D. 考察

本邦では、これまでレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施申請は4施設(癌研究会病院、筑波大学病院、北海道大学病院、東北大学病院)から出された。そのうち、東北大学病院の臨床研究は、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と同じベクターを使用する計画だったため、重大な有害事象が起こった後申請を取り下げるに至っている。本研究も、平成19年度までドイツのベクターを使用予定で準備をしていたが、ベクター関連の重大な有害事象が

発生し、使用するウイルスベクターを変更することになった。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の実施についての考え方は国によって違いがある。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と判断された場合、たとえ有害事象が起こったベクターであっても使用されている。

当該遺伝子治療臨床研究で使用される MFSGS-gp91 も、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。本研究でも安全性試験を確実に実施していくことが求められる。

本研究では、被験者の選定基準について十分に検討してきた。標準治療で治療困難な重症感染症に罹患しているため造血幹細胞移植を受けられない X-CGD の患者は少なくない。彼らにとって移植以外の治療法が選択できる可能性が出てきたことは一歩前進と言える。もちろん患者の利益と危険性の両方を十分検討した上で実施することが最優先である。

E. 結論

X-CGD 患者は、難治性の重症感染症に反復して罹患し、その寿命は 30 歳前後と言われている。当該遺伝子治療を実施することで、致死的な感染症に罹患している X-CGD 患者を救命が期待できる。また、本研究によって遺伝子

治療臨床研究について知見が増えれば、他の先天性異常症に対する治療法の研究推進にも役立つ。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載のとおり。

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, Kuratsuji T, Malech HL, Kang EM, Onodera M. A report of the progress for X-CGD gene therapy in Japan. Japan Society of Gene Therapy, The 15th Annual Meeting, Osaka, July 10, 2009

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。

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

レトロウイルスベクターの挿入部位が周囲遺伝子に与える影響

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 部長

研究要旨

遺伝子治療において、治療ベクターの染色体挿入による造血系腫瘍の発症は大きな問題となっている。本研究では、染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有する遺伝子改変マウスより発症したリンパ腫を解析することで、ベクターの染色体挿入による腫瘍発症機序を考察した。発症したリンパ腫は細胞表面抗原や転写因子の解析から IgM 陽性 B リンパ腫であり、挿入部位近傍のドーパミン受容体 3 (D3) 遺伝子は高発現していた。また、同マウスの正常脾 B 細胞において D3 の発現を認めなかったことから、今回の腫瘍発症はベクター挿入による D3 高発現が関与していることが示唆された。ただ、正常骨髄に D3 を強発現させてもリンパ腫は発症せず、同細胞に抗アポトーシス遺伝子の Bcl-xL 遺伝子を共発現させた場合に同様のリンパ腫を発症したことから、ウイルスベクター挿入による腫瘍発症の機序は、ベクター挿入による遺伝子変化に加え、固形腫瘍同様 second hit としての他の遺伝子変異も必要であることが示唆された。

A. 研究目的

遺伝子治療において、使用したウイルスベクターの挿入部位近傍遺伝子の発現変化が治療を受けた患者に白血病等の造血系異常を発症することが大きな問題となっている。ただ、一般に遺伝子導入細胞のウイルスコピー数は複数であり、各プロウイルスの挿入部位近傍遺伝子に与える影響 (positional effect) を解析することは困難である。そこで、レトロウイルスを感染させたマウス胚性幹細胞より遺伝子改変マウスを作出し、それらマウスを C57BL/6N マウスと掛け合わせることで、最終的に染色体上に 1 コピーのプロウイルスを有するマウスを 4 ライン樹立した。このうち、レトロウイルスベクターがドーパミン受容体 3 (D3) 遺伝子近傍に挿入されたマウスでは、出生後 1 年を経て B 細胞系のリンパ腫を発症した。本研究では、これら B リンパ腫を解析することで、レトロウイルスベクターの染色体挿入と腫瘍発症のメカニズムを解析する。

B. 研究方法

1) プロウイルスが D3 遺伝子の第 2 インtron に逆向きに挿入されている遺伝子

改変マウスより発症したリンパ腫の細胞表面マーカーや転写因子等を分子生物学的手法にて解析した。

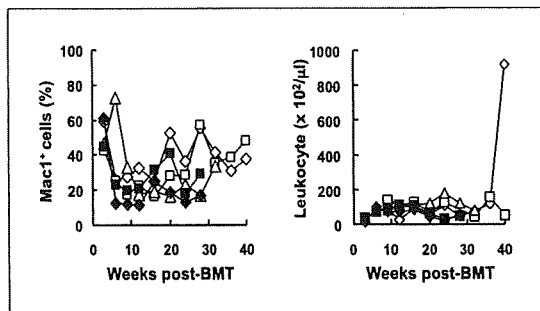
2) マウス正常骨髄にレトロウイルスベクターを用いて D3 遺伝子及び Bcl-xL 遺伝子を導入し、*in vitro*、*in vivo* における遺伝子導入細胞の動態を FACS 等にて解析した。

3) D3 発現リンパ腫の全遺伝子発現パターンを C57BL/6 マウス由来脾細胞 (B220 陽性 IgM 陽性細胞) を対照に microarray 法にて解析した。

C. 研究結果

1) 遺伝子改変マウスより発症したリンパ腫は FACS ならびに転写因子の解析から B220/CD5/IgM 陽性の B リンパ腫であり、また、ベクター挿入部位近傍遺伝子の D3 遺伝子は高発現していた。一方、同マウスの正常脾臓 B 細胞 (B220/IgM 陽性細胞) は D3 をほとんど発現していないことから、レトロウイルスベクター挿入により D3 が高発現した細胞からリンパ腫が発生したことが示唆された。尚、B 細胞受容体の再構成の解析からこのリンパ腫は単クローンな細胞集団であることが示された。

2) D3 遺伝子の高発現が実際に B リンパ腫を発症するかを確認するために、レトロウイルスベクターにて D3 遺伝子を導入したマウス骨髄細胞を致死量の放射線照射したマウスに移植し、移植後の遺伝子導入細胞の動態を経時的に FACS 等にて解析した。しかし、移植後 40 週を経てもなんら変化を示さなかったため、レトロウイルスベクターにて Bcl-xL 遺伝子を共発現させたところ、複数のマウスで 20 週を越えて B 細胞の増加を認め、1 匹のマウスでは 40 週を越えてから遺伝子改変マウスで見られた B 細胞リンパ腫と同様のリンパ腫を発症した。これらのことから、レトロウイルスベクターによる腫瘍の発生は単にベクター挿入による遺伝子変化のみでは十分ではなく、固形腫瘍と同様 second hit としての他の遺伝子変異も必要であることが示唆された。



3) リンパ腫において D3 遺伝子以外の遺伝子変異を確認するために、正常 B 細胞を対照に micro-array 解析を行った。その結果、リンパ腫において細胞周期関連遺伝子やアミノ酸代謝関連遺伝子の発現上昇を認め、逆に免疫反応に関連する遺伝子の発現低下を認めた。

Supplementary table 1. Gene Ontology terms enriched in the genes up-regulated in the lymphoma cells.

Biological process	Up-regulated genes (10587)		Total genes (14977)		Fold enrichment	P-value	Corrected P-value (Bonferroni)
	Number	%	Number	%			
Cell cycle phase	55	5.2%	308	2.0%	3.8	1.8E-16	1.2E-12
Cell cycle	81	8.9%	740	4.9%	2.5	1.5E-15	7.5E-12
Cell cycle process	79	7.4%	598	4.0%	2.7	2.4E-15	1.3E-11
M phase	48	4.5%	256	1.7%	3.6	9.2E-14	4.8E-10
Cell division	45	4.2%	246	1.6%	3.7	9.2E-14	4.8E-10
Mitotic cell cycle	45	4.2%	260	1.7%	3.5	8.9E-13	3.8E-9
Amino acid metabolic process	43	4.0%	258	1.7%	3.4	8.8E-12	4.5E-8
Mitosis	30	2.8%	182	1.2%	3.8	1.8E-11	8.7E-8
M phase and mitotic cell cycle	36	3.4%	193	1.3%	3.7	2.2E-11	1.1E-7
Amino acid and derivative metabolic process	48	4.5%	259	1.7%	2.8	3.5E-11	2.9E-7
Amino acid metabolic process	52	4.9%	305	2.0%	2.7	1.8E-10	8.4E-7

Biological process showing a corrected P-value smaller than 1E-6 are listed.
 * 1052 out of 1182 up-regulated genes were recognized by the Functional Annotation Tool of the DAVID website
 † Number of the genes involved with the biological process among the 10587 up-regulated genes
 ‡ Involved genes/ 10587 up-regulated genes (%)
 § Number of the genes involved with the biological process among the total 14977 genes
 ¶ Involved genes/ 14977 total genes (%)

Supplementary table 2. Gene Ontology terms enriched in the genes down-regulated in the lymphoma cells.

Biological process	Down-regulated genes (10227)		Total genes (14977)		Fold enrichment	P-value	Corrected P-value (Bonferroni)
	Number	%	Number	%			
Innate response	73	7.8%	554	3.7%	3.2	3.4E-19	1.8E-15
Innate system process	95	9.8%	659	5.7%	2.6	3.5E-18	1.8E-14
Intracellular signaling cascade	110	11.1%	1320	8.1%	2.2	1.0E-14	5.3E-11

Biological process showing a corrected P-value smaller than 1E-6 are listed.
 * 1022 out of 1233 down-regulated genes were recognized by the Functional Annotation Tool of the DAVID website
 † Number of the genes involved with the biological process among the 10227 down-regulated genes
 ‡ Involved genes/ 10227 down-regulated genes (%)
 § Number of the genes involved with the biological process among the total 14977 genes
 ¶ Involved genes/ 14977 total genes (%)

D. 考察

今回の研究結果から、ウイルスベクター挿入による近傍遺伝子の発現変化が造血系異常の発症に深く関与することが強く示唆された。ただ、D3 遺伝子強制発現の実験から D3 遺伝子単独ではリンパ腫を発症せず、second hit としての Bcl-xL 遺伝子の発現が必要であった。以上のことから、ウイルスベクター挿入による造血系腫瘍発症も固形腫瘍同様 two-hit theory に従い、ベクター挿入という遺伝子変化の他に細胞増殖過程に新たな遺伝子変異が必要であることが示唆された。今後、今回の D3 を高発現するリンパ腫においてどのような遺伝子変化が second hit として作用しているかを micro-array の結果を基に解析する予定である。

E. 結論

レトロウイルスベクター挿入により近傍遺伝子の D3 遺伝子が高発現し、B 細胞リンパ腫を発症した。ただ、D3 遺伝子の高発現のみではリンパ腫は発症せず、Bcl-xL 等の遺伝子発現を必要としたことから、今回解析したリンパ腫においても D3 以外の遺伝子変異が生じてい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

1) Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, et al: Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian

- brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 299-310, 2010.
- 2) Tamase A, Muraguchi T, Naka K, et al: Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17163-17168, 2009.
 - 3) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, et al: Gain-of-function of mutated c-Cbl tumour suppressor associated with myeloid neoplasms with 11q UPD. *Nature* 460: 904-908, 2009.
 - 4) Okabe M, Otsu M, Ahn DH, et al: Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114: 1764-1767, 2009.
 - 5) Miyamoto N, Tanaka R, Zhang N et al: Crucial role for pCREB signaling in the differentiation and survival of neural progenitors under chronic cerebral hypoperfusion. *Neuroscience* 162: 525-536, 2009.
 - 6) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, et al: Kinetics and effect of integrin expression in human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction using a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 20: 777-783, 2009.
 - 7) Sogo T, Kawahara M, Ueda H, et al: T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine* 46: 127-136, 2009.
 - 8) 小野寺雅史 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の開発 ゲノム医学 3943-46, 2009.
 - 9) 小野寺雅史 小児における遺伝子治療 小児科50 828-833,2009.

2) 小野寺雅史, 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療, 第7回遺伝子治療シンポジウム, 大阪, 2009年1月30日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) 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.

Ⅲ. 資 料

1) 遺伝子治療臨床研究実施計画書

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 概 要 書

平成 年 月 日	(申請年月日)
----------	---------

研 究 の 名 称	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究
研 究 実 施 期 間	厚生労働大臣による了承の日より3年間

総 括 責 任 者	所属部署の所在地	東京都世田谷区大蔵 2-10-1	〒157-8535
	所属機関・部局・職	国立成育医療センター研究所・成育遺伝研究部・部長	
	氏 名	小野寺 雅史	印
実 施 の 場 所	所 在 地	東京都世田谷区大蔵 2-10-1	〒305-8576
	名 称	国立成育医療センター病院	
	連 絡 先	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 TEL: 03-3416-0181、FAX: 03-3416-2222	

	氏 名	所 属 機 関 ・ 部 局 ・ 職	役 割
総 括 責 任 者 以 外 の 研 究 者	奥山 虎之	国立成育医療センター病院・部長	総括責任者の補佐、遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報等の収集、遺伝子カウンセリング
	藤本 純一郎	国立成育医療センター研究所・副所長	遺伝子治療臨床研究環境整備
	熊谷 昌明	国立成育医療センター病院・医長	造血幹細胞採取・導入細胞の患者投与
	森 鉄也	国立成育医療センター病院・医長	造血幹細胞採取・導入細胞の患者投与
	清河 信敬	国立成育医療センター研究所・部長	治療遺伝子導入法の検討
	梨井 康	国立成育医療センター研究所・室長	遺伝子導入効率、挿入部位等の解析
	緒方 勤	国立成育医療センター研究所・部長	遺伝子導入効率、挿入部位等の解析
	瀧本 哲也	国立成育医療センター研究所・室長	臨床データの管理
	掛江 直子	国立成育医療センター研究所・室長	遺伝子治療臨床研究の倫理性、個人情報保護
	土田 尚	国立成育医療センター病院・医師	遺伝子治療の文書作成と情報の収集
	河合 利尚	国立成育医療センター研究所・室長	患者管理
	加藤 俊一	東海大学医学部・教授	患者選定、幹細胞移植の指導
	有賀 正	北海道大学医学研究科・教授	患者選定、免疫学的検査の管理と指導
	布井 博幸	宮崎大学医学部・教授	患者選定、免疫学的検査の管理と指導
	水上 智之	宮崎大学医学部・助教	患者管理
	久米 晃啓	自治医科大学・准教授	遺伝子治療の検査体制の構築
	大津 真	東京大学医科学研究所・助教	造血幹細胞への遺伝子導入と培養
	岡田 真由美	都立東大和療育センター・医師	臨床データの管理

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	別紙（遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の審査結果について） のとおり				
	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="width: 40%;">審査委員会の長の職名</td> <td style="width: 60%;">氏 名</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">(印)</td> </tr> </table>	審査委員会の長の職名	氏 名		(印)
審査委員会の長の職名	氏 名				
	(印)				

研究の区分	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> ① 遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究 </div>
研究の目的	<p>本遺伝子治療臨床研究は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症 (CGD) のうち、特に CGD としては最も症例の多い NADPH オキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質 gp91^{phox} に変異のある X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対して有効な治療法を確立することにある。</p> <p>具体的には、レトロウイルスベクターを用いて gp91^{phox} をコードするヒトヒトクローム b245 ベータポリペプチド (CYBB) 遺伝子 (NM_000397) を患者造血幹細胞に導入し、これら細胞を再び患者に投与する「造血幹細胞遺伝子治療」を行い、その安全性 (遺伝子導入操作及び遺伝子導入細胞の安全性) と有効性 (臨床検査の有効性と症状改善等の臨床的有効性) に基づいて評価する。</p>
対象疾患及びその選定理由	<p>本研究では、その実施目的を十分に理解し、遺伝子検査にて X-CGD と診断の付いた男性 X-CGD 患者で、治療として造血幹細胞移植が望まれるもドナーの問題や合併症等から移植医療の適当とならない症例とする。</p> <p>上記症例を対象とした理由は以下の3点である。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 造血幹細胞移植が CGD に対して根治療法とよべる程の治療成績を上げるも、移植に伴う副作用に耐えられない患者がいること。 2. 造血幹細胞遺伝子治療が CGD を始めとする原発性免疫不全症に対して広く行われ、難治性感染症の治癒等一定の治療成績を上げていること。 3. 造血幹細胞遺伝子治療において造血系異常という重篤な副作用も報告されているが、今回使用するベクターではそのような副作用の報告がなく、また、副作用の発症頻度を考えても、遺伝子治療を行う利益が患者不利益を十分に越えていると考えられること。
遺伝子の種類及びその導入方法	<p>本研究において導入を計画している遺伝子は、ヒト CYBB 遺伝子のアミノ酸をコードする部分 (open reading frame) である。使用するベクターはレトロウイルスベクター MFGS に上記ヒト CYBB 遺伝子を組み込んだ MFGSgp91 であり、CYBB 遺伝子はウイルス LTR によりその発現が誘導される。標的細胞は患者由来末梢血 CD34 陽性細胞であり、これら細胞は G-CSF にて末梢血に誘導された造血幹細胞を、さらに抗 CD34 抗体を用いて純化したものである。得られた細胞は各種サイトカイン (SCF、TPO、FLT3-L、IL-3) にて刺激され、上記 MFGSgp91 の培養上清中で培養されることで染色体内にヒト CYBB 遺伝子が挿入される。複数の検査等にて、最終的に投与可能と判断された細胞は、患者末症静脈より患者体内に戻される。</p>
安全性についての評価	<ol style="list-style-type: none"> 1. レトロウイルスベクターの安全性 本研究で使用されるレトロウイルスベクター MFGSgp91 は、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) 由来のベクター DNA で、ウイルス複製に必要なウイルスの構造タンパク質や逆転写酵素をコードする遺伝子が欠如しているため複製可能なレトロウイルス (RCR) を生ずることはない。また、使用するパッケージング細胞 293-SPA は、MoMLV 由来 gag-pol とマウス・アンフトロピックウイルス 4070A 由来の env が別々のプラスミド DNA より発現するような工夫されているため、組換えによる RCR の出現の可能性は極めて低い。これら臨床用ウイルスベクターは、米国 Magenta 社がクリニカルグレードベクターとして管理、保管しているマスターセルバンクより米国薬品医薬局に基準に従って製造され、凍結保存された状態で国立成育医療センターに空送される。 2. CYBB 遺伝子導入患者造血幹細胞の安全性 CYBB 遺伝子を導入された患者造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) の安全性は、PCR 法による RCR の確認、ならびに細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシン等の汚染がないことにて確かめられる。
遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断される理由	<ol style="list-style-type: none"> 1. 近年、適当なドナーのいる X-CGD の症例では造血幹細胞移植が行われ、根治療法とよべる程の治療成績を上げているが、ドナーの問題や合併症の点から全ての症例が移植医療の対象とはならないこと。 2. 造血幹細胞遺伝子治療が原発性免疫不全症を中心に広く行われ、その手技等に関しては安全性が確認され、さらに難治性感染症の治癒等一定の治療効果も確認されていること。

	<p>3. 本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、すでに共同研究者の米国国立衛生研究所 (NIH) HL. Malech 博士が複数の患者に対して使用しており、その安全性と有効性を確認していること。</p> <p>4. 先行研究 (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) にて、現在、「安全性を鑑みたとき X-CGD に対する治療の第一選択は移植医療であるが、ドナー不在など何らか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をも十分に妥当である」と結論を得たこと。</p> <p>5. 実施施設である国立成育医療センターが、成育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。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 患者選択 本研究においては、遺伝子診断により X-CGD と診断を受け、通常の治療にて病状の回復が望めず、また、なんらかの理由により移植医療を受けられない 3 歳以上の男性患者とする。</p> <p>2. 患者数と実施期間 承認を得られた時点から 3 年間 目標症例数 5 症例</p> <p>3. 臨床研究計画</p> <p>1) 末梢血 CD34 陽性細胞の採取 患者体重あたり 10μg の G-CSF を 5~6 日間皮下投与する。投与終了日に血液分離装置にて末梢血単核球分画を採取し、これら細胞から抗 CD34 抗体を用い CliniMACS にて CD34 陽性細胞を分離する。</p> <p>2) 標的細胞への遺伝子導入 得られた末梢血由来 CD34 陽性細胞は、SCF、TPO、FLT3-L、IL-3 にて刺激し、レトロウイルスベクターMFGSgp91 の培養上清中に浮遊されることで CYBB 遺伝子を導入する。これら操作を 3~4 回程度、感染効率を確認しながら行う。</p> <p>3) 患者への投与 無菌性等安全性を確認した後、遺伝子導入細胞は 1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に浮遊し、末梢静脈から患者に投与される。投与する細胞数の上限は定めないが、最低投与数は体重あたり 5 x 10⁶ 個とし、不足分はあらかじめ保存しておいた自己 CD34 陽性細胞にて補充する。 なお、遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、患者に細胞投与前にブスルファン 10mg/kg を投与する。</p> <p>4) 患者観察 患者体内での CYBB 遺伝子導入細胞の動態ならびに臨床症状 (感染症の改善) 等を経時的に、注意深く観察する。また、遺伝子導入細胞に対する反応や副作用等を日本癌治療学会薬物有害反応判定基準に基づいて評価する。もし、感染症の増悪等を認めた場合は、医学的見地から妥当と考えられる治療法を患者との話し合いに基づき行う。</p>
<p>備考</p>	

遺伝子治療臨床研究実施計画書

[課題名]

「慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした
遺伝子治療臨床研究」

目次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称	- 7
2. 研究者の氏名、所属部局、役職、役割	
2-1. 総括責任者の氏名及びその担当する役割	- 8
2-2. 副総括責任者の氏名及びその担当する役割	- 8
2-3. 総括責任者、副総括責任者以外の研究者の氏名及び その担当する役割	- 8
2-4. 海外共同研究者	- 10
3. 遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在	- 11
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	- 12
5. 対象疾患及び対象疾患として選定した理由	
5-1. 対象疾患	- 13
5-2. 対象疾患に関する現時点での知見	- 13
5-2-1. 慢性肉芽腫の病因と頻度	- 13
5-2-2. 慢性肉芽腫の症状と経過	- 14
5-2-3. 従来の治療法	- 15
5-3. 本遺伝子治療臨床研究の背景と概要	- 16
5-4. 他の治療法との比較及び遺伝子治療臨床研究を実施する 適応があると判断した理由	- 17
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	- 19
6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造	- 19
6-1-1-1. ヒト CYBB 遺伝子	- 19
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	- 22
6-2. 標的細胞の由来ならびに生物学的特徴及び標的細胞とした理由	- 22
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	- 22

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	- 23
6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響	- 23
6-4-2. ウイルスベクターの作製方法	- 23
6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造	- 26
6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴	- 26
7. 安全性についての評価	
7-1. 遺伝子導入方法の安全性	- 27
7-1-1. 遺伝子導入に用いられるウイルスベクターの純度	- 27
7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性	- 31
7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性	- 31
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	- 32
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	- 32
7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性	- 32
7-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	- 33
7-1-8. 癌原性の問題	- 33
7-2. 遺伝子産物の安全性	- 34
7-3. 細胞の安全性	- 34
7-3-1. 培養細胞の純度	- 34
7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	- 34
7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性	- 35
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	- 36
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	- 37
9-2. 被験者の選定基準及び除外基準	- 37
9-2-1. 被験者の選定基準	- 38
9-2-2. 被験者の除外基準	- 38
9-3. 本遺伝子治療臨床研究に関連する各委員会	- 38
9-3-1. 遺伝子治療臨床研究適応判定委員会	- 39
9-3-2. 遺伝子治療臨床研究評価委員会	- 39
9-3-3. 遺伝子治療臨床研究審査委員会	- 39
9-4. 被験者の同意の取得法	- 39

9-4-1. 被験者と家族への心理的支援	- 40
9-5. 実施期間及び目標症例数	- 40
9-6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	- 40
9-6-1. 対照群の設定	- 40
9-6-2. 遺伝子導入方法（安全性及び有効性に関する事項は除く）	- 40
9-6-2-1. 無菌性の確保	- 40
9-6-2-2. ベクターの入手先及び保存法	- 41
9-6-2-3. 被験者からの末梢血 CD34 陽性細胞の採取	- 41
9-6-2-4. 標的細胞への遺伝子導入	- 41
9-6-2-5. 遺伝子導入細胞の患者への投与	- 42
9-6-3. 前処置及び併用療法の有無	- 43
9-6-4. 治療中の観察項目及び臨床研究項目	- 43
9-6-5. 有害事象ならびにその対処方法	- 44
9-6-5-1. 有害事象の定義	- 44
9-6-5-2. 有害事象発症時の対応	- 45
9-6-5-3. 予想される有害事象とその対処法	- 45
9-6-6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	- 47
9-6-6-1. 遺伝子治療臨床研究の評価方法と評価基準	- 47
9-6-6-2. 中止判定基準	- 48
9-6-6-2-1. 症例の中止判定基準	- 48
9-6-6-2-2. 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準	- 49
9-6-7. 症例記録に関する記録用紙の様式	- 49
9-6-8. 記録の保存及び成績の公表方法	- 49
10. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報について	- 50
10-1-1. 個人情報の定義	- 50
10-1-2. 個人情報の利用目的の特定及び利用目的の通知	- 50
10-2. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報保護に関する取り組み	- 50
10-2-1. 個人情報の正確性の確保	- 50
10-2-2. 安全管理処置	- 50
10-2-3. 第三者への提供の制限	- 51
10-2-4. 開示	- 51
10-2-5. 訂正について	- 51
10-2-6. 利用停止について	- 51

10-2-7. 開示、訂正、利用停止等ができない場合の理由説明	- 52
10-2-8. 参照、質問	- 52
11. 参考文献	- 53

- 別添 1 同意取得の際に用いられる説明及び同意書
- 別添 2 個人情報関係
- 別添 3 本遺伝子治療臨床研究に対する Malech 博士の同意書
- 別添 4 略号一覧
- 別添 5 pMFGSgp91 ベクターの全塩基配列
- 別添 6 Performance Status
- 別添 7 本遺伝子治療臨床研究の安全性、有効性の判定基準
- 別添 8 慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植の現状
- 別添 9 薬物有害判定基準
- 別添 10 Malech HL. et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 12133-12138, 1997.
- 別添 11 Ott MG. et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. Nat Med 12: 401-409, 2006.
- 別添 12 Seger RA. et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. Blood 100: 4344-4350, 2002.
- 別添 13 Kobayashi S. et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. Eur J Pediatr 167: 1389-1394, 2008.