

201018017A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児先天性・難治性疾患に対する  
遺伝子・細胞治療の開発と実施

平成22年度総括・分担研究報告書

平成23年（2011年）3月

研究代表者

小 野 寺 雅 史

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子・細胞治療の開発と実施

目 次

I. 総括研究報告	研究代表者 小野寺雅史 … 3
II. 分担・協力研究報告	
1. 遺伝子治療の改善を目的とした慢性肉芽腫症モデルの応用	大津 真 … 11
2. 慢性肉芽腫症における免疫学的変化と臨床症状に関する研究	河合 利尚 … 14
3. 非組込み型ベクターによる挿入発癌リスクフリー遺伝子治療	久米 晃啓 … 17
4. 遺伝子治療臨床研究における分子生物学的解析	中林 一彦 … 19
5. 濃厚な治療が奏効せずに死亡したアスペルギルス肺炎の慢性肉芽腫症症例	有賀 正 … 23
6. 大腸ファイバー検査で発見された慢性肉芽腫症腸炎(CGD colitis)3 例	布井 博幸 … 25
7. 遺伝子治療臨床研究における前処置等の検討とそのフォロー	福島 敬 … 30
8. 慢性肉芽腫症の遺伝子検査の倫理的配慮について	奥山 虎之 … 49
9. 遺伝子治療臨床研究における臨床データの管理	瀧本 哲也 … 51
10. 慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療実施体制の構築	小野寺雅史 … 55
11. 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	岡田真由美 … 58
III. 遺伝子治療臨床研究審査委員会関係	… 63
IV. 資料	… 173
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	… 383
VI. 研究成果の印刷物・別刷	… 389

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

総括研究報告書

小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子・細胞治療の開発と実施に関する研究  
（H22-次世代-一般-003）

研究代表者 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

小児先天性・難治性疾患に対する有効な治療法確立に向け、患者細胞を用いる遺伝子・細胞治療法の開発とその実施を目指す。具体的には、本研究センターにおいて慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を行うことであり、以下のような遺伝子治療に関わる基礎的研究、患者診療に関する臨床研究ならびに実施計画書等の作成や実施体制構築などの環境整備を積極的に行った。

基礎的研究としては、1. 疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療の有効性の評価、2. 慢性肉芽腫症における免疫学的変化とその臨床症状の関連に関する研究、また、新規治療用ベクターの開発を目指した 3. 非組込み型ベクターの開発や 4. 挿入部位近傍からの影響を抑えるインシュレータ開発などの研究を行った。臨床研究として、5. 特異な症状を呈した慢性肉芽腫症の症例報告、6. 造血幹細胞遺伝子治療における前処置に関する検討、7. 遺伝子疾患に対する遺伝子診断の倫理的配慮に関する研究などであり、環境面の整備としては 8. 実施計画書等の作成に関する支援、9. 当研究センター内の実施体制に関する環境整備を図った。

なお、慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究は、当研究センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会にて慎重な審議がなされ、最終的に平成 23 年 2 月 24 日付けで承認された。今後は審議の場を厚生労働省厚生科学審議会に移し、そこでの審議を経て厚生労働大臣の承認の下、遺伝子治療臨床研究は開始される。

## 研究分担者・所属機関・職名

小野寺 雅史

国立成育医療研究 C 成育遺伝研究部・部長

河合 利尚

国立成育医療研究 C 成育遺伝研究部・室長

中林 一彦

国立成育医療研究 C 周産期病態研究部・室長

奥山 虎之

国立成育医療研究 C 臨床検査部・部長

瀧本 哲也

国立成育医療研究 C 臨床研究 C・室長

有賀 正

北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授

布井 博幸

宮崎大学医学部生殖発達学講座小児科分野・教授

久米 晃啓

自治医科大学准教授

大津 真

東京大学医科学研究所・助教

福島 敬

筑波大学人間総合科学研究科・講師

岡田 真由美

都立東大和療育センター小児科・医師

## A. 研究目的

小児難治性疾患の多くは、一遺伝子異常により病気が発症する単一遺伝病であり、病因（遺伝子変異）と病状との関連が比較的容易の解析できる。このため、遺伝子を用いて疾患の治療にあたる遺伝子治療は劇的な治療効果を上げると期待され、遺伝子治療開始当初より様々な疾患に対して行われてきた。その結果、現在では原発性免疫不全症を含む数多くの小児難治性疾患に対して遺伝子治療が行われ、感染症の治療など一定の治療効果を上げている。特に、アデノシン・デアミナーゼ欠損症では、適当な造血幹細胞移植ドナーのいない患者に対する治療の選択肢として認識されるようになっており、今後も数多く小児難治性疾患に対して遺伝子治療は行われていくものと思われる。

ただ、我が国の実情を鑑みたとき、治療用ベクター開発など遺伝子治療に関わる一定の基礎的研究は進んでいるが、それらを臨床の場で応用する体制が整っておらず、欧米のそれと比較すると著しく遅れていると言わざるを得ない。そこで、本研究では我が国における小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子・細胞治療法

の実施体制を構築するため、当研究センターが中心となって原発性免疫不全症の中で最も頻度の高い X 連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対する造血幹細胞遺伝子治療を計画し、その実施過程で生ずる様々な問題を解決することで、包括的に遺伝子治療臨床研究を支える実施体制を構築する。なお、これら研究を推進するためには、基礎研究者、臨床医ならびに倫理面やデータ管理に関する専門家が必要であり、本研究ではそれらの面で活躍している研究者を研究分担者として招聘し、本研究を進めている。

## B. 研究方法

### <前臨床的研究>

1. 疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療の有効性の評価 (大津)

CYBB 遺伝子 (gp91<sup>phox</sup>) 欠損マウス (CGD マウス) より骨髓細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いて CYBB 遺伝子を導入した後、同時に導入した蛍光色素 (Kusabira Orange, KO) にてその発現強度により 2 群 (高発現、低発現) に分けて CGD マウスに移植した。

2. 慢性肉芽腫症における免疫学的変化とその臨床症状の関連に関する研究 (河合)

CGD は好中球の NADPH オキシダーゼの異常により重篤な感染症を頻発する免疫不全症であるが、これら異常は単に好中球のみに留まらず、単球・マクロファージなど免疫担当細胞にも影響を与え、炎症性腸炎等の原因にもなっていると考えられている。そこで、腸炎併発例と非併発例 CGD 患者のリンパ球分画を解析した。

3. 非組込み型ベクターの開発 (久米)

アデノ随伴ウイルスベクターが染色体に組み込まれないことを利用し、先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症モデルマウスを用いて、肝臓及び骨格筋を標的とした遺伝子導入実験を行った。肝臓あるいは筋肉特異的プロモータを組み込んだ AAV ベクターを作製し、肝臓の場合は欠損酵素 PAH を AAV8 で、骨格筋の場合は PAH の加え、補酵素合成系 2 酵素 (GCH と PTPS) を AAV1 ベクターで投与した。ベクター投与後、各 PKU マウスの血中フェニルアラニン (Phe) 濃度を経時的に測定し、必要に応じて安定同位体 <sup>13</sup>C-Phe を用いた Phe 代謝活性も測定した。

4. 挿入部位近傍から影響を抑えるインシュレータ開発 (中林)

インスレーターには、二つの機能が知られて

おり、一つは「エンハンサーの遮断効果」であり、他方は「バリアー活性 (ポジション効果の抑制)」である。今回、我々が独自に同定したインスレーターのエンハンサー遮断効果をルシフェラーゼ遺伝子レポーター・アッセイにて評価した。さらに、バリアー活性に関してはトランスフェクション法にて評価した。

### <臨床研究>

5. 特異な症状を呈した慢性肉芽腫症の症例報告 (有賀、布井)

1) CGD はその食細胞の機能異常から約 3~4 割の患者で真菌感染症に罹患し、そのうちアスペルギルス種が最も頻度が高く、主な死亡原因となっている。今回、生後 7 か月でアスペルギルス肺炎を発症した男児例を経験し、その臨床症状を報告する。

2) CGD に対する治療方針としては感染対策が最も重要視されるが、その約 3~4 割で非炎症性腸炎を発症する。今回、腸炎症状が乏しいにも関わらず、全身のスクリーニングにて CGD 腸炎を発症した 3 例を報告する。

6. 造血幹細胞遺伝子治療における前処置に関する検討 (福島)

CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療においては、遺伝子導入細胞が生着・増殖するための“すきま” (ニッチェ) が必要とされ、多くの研究においてブスルファン (ブスルフェクス®) が使用されている。そこで、CGD 移植症例においてブスルファンを用いることのメリットおよびデメリットを検討する。

7. 遺伝子疾患に対する遺伝子診断の倫理的配慮に関する研究 (奥山)

CGD は NADPH オキシダーゼを構成するタンパク質の異常により発症するが、今回の対象は gp91<sup>phox</sup> をコードする CYBB 遺伝子に変異のある X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) であり、選定基準として遺伝子診断が必要となる。ただ、これら遺伝子検査は倫理的配慮からリスク面が強調され、時に迅速な治療に対する障壁ともなっている。そのため、今回、遺伝子疾患に対する遺伝子診断の倫理的配慮を検討する。具体的には、日本医学会が 2011 年 2 月に発表した新ガイドライン (医学会ガイドライン) の下、慢性肉芽腫症に対する遺伝子学的検査の有用性を検討する。

### <環境整備>

8. 実施計画書等の作成に関する支援 (瀧本)

今回の遺伝子治療臨床研究における使用さ

れる Case Report Form (CRF) を、その研究の特異性に応じて作成した。作成した CRF は「登録票のほか計 15 種であり、その他、「検査スケジュール」、「患者用スケジュール」も作成した。作成にあたっては、通常の臨床試験の場合と同様の注意事項とともに、遺伝子治療特異的な事象（登録プロセス、特殊検査、有害事象）にも対応するように作成された。

9. 当研究センター内の実施に関する環境整備（小野寺）

今回の慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を円滑に進めるには、病院、研究所、臨床研究センター間の密なる連携体制が必要となる。このため、専従研究者の配備と病院関係者との連携を図った。

10. 遺伝子治療臨床研究の現状（岡田・小野寺）

（倫理面への配慮）

遺伝子治療臨床研究に向けた実施計画書の作成は、「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 16 年 2 月 19 日）に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正）に基づいて作成した。実施に関しては、国立成育医療研究センター内の「遺伝子治療臨床研究審査委員会」や関連政府機関で審査を受けた後、厚生労働大臣からの承認が得られた時点で開始される。

実施計画書作成に必要な前臨床試験の一部では、臍帯血から採取した造血幹細胞を用いるが、この一連の実験については、すでに施設内の倫理審査委員会および臍帯血バンクの倫理審査委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。今回の研究における挿入部位同定は、一部、患者の遺伝子情報を解析する可能性もあることから、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行い、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行う。

## C. 研究結果

<前臨床的研究>

1. 疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療の有効性の評価

CGD マウスより得られた造血幹細胞への遺伝子導入は KO の発現によって確認された。これら細胞を KO の発現強度により 2 群に分け、致死量放射線照射したマウスに移植したところ、いずれの群も骨髄造血は再構築した。ただ、活性酸素量を示す APF と KO の発現強度に直線的な相関関係は認めなかった。

2. 慢性肉芽腫症における免疫学的変化とその臨床症状の関連に関する研究

非感染性腸炎（CGD 腸炎）を合併した症例 8 例（A 群）と非合併例 6 例（B 群）について、遺伝子解析、臨床症状およびリンパ球サブセットについて検討した。CGD 腸炎発症例に関して特異的な遺伝子変異は見つからなかった。CGD 腸炎は免疫学的に未熟な 10 歳未満の患者に好発したが、ステロイド療法に良好に反応した。リンパ球サブセットの解析では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>活性化 T 細胞と CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリー B 細胞が A、B 両群で健常者群と比較的有意に低下していた。また、両群において臨床症状やリンパ球解析に明らかな相違は見られず、排便回数が増加していることから、全ての CGD 症例で CGD 腸炎を発症する可能性が示唆された。

3. 非組込み型ベクターの開発

肝臓を標的とした場合、治療効果は投与後 1 週間目から現れ、血中 Phe がほぼ正常域（< 2mg/dl）に保たれた。一方、骨格筋を標的した場合、一時的には血中 Phe 値は有意に低下したが、治療域までには低下せず、体毛色等も改善しなかった。今回、骨格筋を対象とした理由は、マウス肝への遺伝子導入にて肝がんが発症したことで、より安全な投与部位の発掘が求められているためであるが、今回の研究では骨格筋における十分な治療遺伝子の発現は得られなかった。この理由としては、骨格筋における治療用遺伝子の発現が低いことが考えられ、プロモータ・エンハンサーを含め、さらなるベクターの開発が必要であることを示唆している。

4. 挿入部位近傍から影響を抑えるインシュレータ開発

今回解析するインシュレータは C57BL/6 系統の 9.5 日胚で高メチル化し、JF1 系統の 9.5 日胚で低メチル状態の 1.8kb 長の配列である。この配列を Luc 発現ベクターに挿入し、Cos7 にてレポーター・アッセイを行ったところ、この配列のエンハンサー活性とその遮断効果が確認された。その責任部位を同定するために、deletion mutant を作成し、同 Luc アッセイを行ったところ 242bp のインシュレータと 185bp

のエンハンサーを同定した。バリアー活性に関しては、JPAC インスレーターをネオマイシン耐性遺伝子の両端に挿入したベクターを作製し、それを Cos7 に導入したところ、JPAC インスレーターを挿入していないベクターと比較して、ネオマイシン耐性コロニーが約 2 倍獲得できた。このことから、JPAC インスレーターは周囲から影響を遮断し、ネオマイシン耐性遺伝子をより有効に発現させることを示唆している。

#### <臨床研究>

#### 5. 特異な症状を呈した慢性肉芽腫症の症例報告

1) 症例：10 ヶ月男児。7 ヶ月時に発熱、咳嗽、鼻汁にて発症し、腋窩リンパ節の腫脹と肺炎にて BCG 菌の関与を疑い、抗結核剤の投与が開始される。しかし、改善傾向を認めず、活性酸素値の低下にて X-CGD と診断された。また、血清アスペルギルス抗原が陽性なため MCFG が開始されたが、治療効果を認めず、L-AMB、VRCZ、ステロイド、 $\gamma$  インターフェロンの併用療法を行ったが、感染症は改善せず、呼吸不全にて生後 27 ヶ月目に死亡した。剖検所見では正常な肺組織はなく、肉芽腫形成と破壊像を認め、多数の巨細胞と巨細胞内に多数の真菌を認めた。

2) 症例 1：20 歳男性 CRP4.5 と上昇し、抗生物質、抗菌剤に反応せず解熱せず、大腸ファイバー検査にてアフタ性腸炎と診断された。

症例 2：23 歳男性 CRP の持続陽性を伴う不明熱にて大腸ファイバーを施行した。その結果、回腸末端にわずかにびらんがあり、また、同部の粘膜の絨毛構造は破壊されており、小さな鱗状の粘膜が見られた。

症例 3：18 歳男性 痔瘻にて大腸ファイバーを施行した。その結果、回腸末端、盲腸周囲、下行結腸に小アフタ部位では、粘膜下層を中心に表層近傍に至るリンパ濾胞様の炎症性細胞集簇を認めた。

治療に関しては、大腸ファイバーと生検・組織検査にて、クローン病類似の難治性腸炎と考え、全例でペンタサを使用している。

#### 6. 造血幹細胞遺伝子治療における前処置に関する検討

現在、我が国では 296 例の原発性免疫不全症に対して移植が行われ、そのうち 22 症例の CGD が登録されている（日本造血細胞移植学会の報告による）。治療成績が最も良好なのは Wiscott-Aldrich 症候群 (WAS) で、SCID と CGD

は同程度である。ただ、症例間でのばらつきが大きい。ブスルファンに関しては、経口 Bu と静注 Bu 間に有効性や二次性悪性腫瘍の発症率に有意な差を認めない。一方、現時点では、身長に対する影響は不明であるが、性腺障害では男女とも Bu 経口、静注に影響はないと思われる。遺伝子治療の選択とその後のフォローに関しては「適当な SCT ドナーが得られないこと」が主要な要件であり、同種 SCT 実施後の拒絶例（または生着不全例）も、予め自家骨髄や自家末梢血細胞の保存することで、遺伝子治療の対象になる可能性がある。

#### 7. 遺伝子疾患に対する遺伝子診断の倫理的配慮に関する研究

今回の医学会ガイドラインでは、遺伝子学的検査は発症者の確定診断として有効あり、医学会ガイドラインによる適切なインフォームド・コンセントの下に行えば、その診断方法は適切であると判断された。なお、これまでの遺伝関連 10 学会による遺伝学的検査ガイドライン（10 学会ガイドライン）では、検査を行うまでに十分な遺伝カウンセリングを必要とされ、原発性免疫不全症などの迅速な診断・治療を必要とする疾患には不向きとされていたが、今回の医学会ガイドラインではこれら疾患にも十分に対応できることが示唆された。

#### <環境整備>

#### 8. 実施計画書等の作成に関する支援

今回の慢性肉芽腫に対する遺伝子治療臨床研究の実施計画書作成にあっては、国が定める法律あるいは指針を遵守し、対象疾患や被験者の選定、実施の可能性、同意の取得、有効性や安全性の評価、有害事象への対応などに留意して作成した。特に、今回の遺伝子治療臨床研究への登録には、主治医の判定や患者の同意に加えて遺伝子治療臨床研究適応判定委員会による適応判定が必要であることや野生型ウイルス混入の確認、ウイルスベクターの病原性や癌化など通常の臨床研究では生じない有害事象や長期的観察が必要であることなどから、遺伝子治療臨床研究に特異的な事項も多かった。

なお、データの管理に関しては、組織的安全管理措置（国立成育医療研究センターの保有個人情報管理規定など）のもと、人的安全管理措置、物理的安全管理措置、技術的安全管理措置を講じる予定である。

#### 9. 当研究センター内の実施に関する環境整備

#### 1) 専従研究者の配備

当研究センター研究所では、平成 19 年度よ

り研究所に所属する流動研究員の1名を遺伝子治療の専任研究者の配置している。また、その研究をサポートする研究補助員を2名雇用しており、遺伝子治療実施に向けた準備を進めている。

## 2) 病院関係者との連携

今回の遺伝子治療では病院との連携は不可欠である。同時に、通常の慢性肉芽腫症患者の診断・治療も、その患者選定において重要である。このため、研究分担者の小野寺(当センター研究所・成育遺伝研究部部長)が病院内科系診療部免疫科の医長を、研究分担者の河合(同研究部室長)が同免疫科の医員を併任して、これら患者の外来診察ならびに入院診療に積極的に関わっている。なお、小野寺は、現在、病院臨床検査部輸血・組織検査部の医長を併任しており、病棟・外来看護師、薬剤部などのco-medicalとの連携を強めている。

## 10. 遺伝子治療臨床研究の現状

今回の慢性肉芽腫症に対する患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療臨床研究の実施に向け、平成22年1月22日、同実施計画書を含む必要書類を当研究センター政策医療企画課に提出した。これを受け、同年5月31日に第一回の遺伝子治療臨床研究審査委員会(委員長 大橋十也慈恵会医科大教授)が開催され、本遺伝子治療の概要等が説明された後、申請書に基づく種々の科学的、倫理的質疑がなされた。そして、これら質疑に対する一問一答の回答集を作成することで、第二回目の遺伝子治療臨床研究審査委員会が同年12月20日に開催された。大方の回答は了とされ、追加の質問に関しては文書による回答をもって可とされた。そして、最終的には平成23年2月24日付けで本遺伝子治療臨床研究は当委員会にて承認された。今後は、審議の場を厚生労働省科学技術部会に移し、そこでの承認をもって遺伝子治療臨床研究が開始される。

## D. 考察

平成19年度より始まった当該遺伝子治療臨床研究に関する研究(「小児難治性先天性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」(平成19~21年)と本研究)は、今年で4年目となる。研究自体が遅々として進まぬことに自責の念に駆られるが、この期間内に種々の問題が発生した。最も難題だったのが、平成19年に報告されたドイツ・スイスで行われていた慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療にて造血系異常(骨髄異形

性症候群)の発症である。当初、ここで使用されていたベクターを用いて遺伝子治療臨床研究を計画していたため、この有害事象発症後は、ベクター変更を含む治療全体の内容を変更せざるを得なかった。現在では、この造血系異常の原因は単にレトロウイルスが持つ転写活性化部位への挿入(特に癌原遺伝子近傍への挿入)のみによるのではなく、使用したベクター(SFFV型ベクター)の強力な転写活性が大きく関与していると考えられている。ただ、当時はこれらのことは解明されておらず、我々は異なるベクターシステムを求めて米国国立衛生研究所(NIH)のMalech博士らとの共同研究を開始した。そして、使用するベクターを同博士らが使用していた転写活性がSFFV型ベクターと比べて弱いMoMLV型のベクター(MFGSgp91phox)に変更し、実施計画書を作成しなおした。そして、その実施計画をもって平成22年1月22日に当研究センターの政策医療企画課に遺伝子治療臨床研究を申請し、第一回目の遺伝子治療臨床研究審査委員会が同年5月31日に開催された。その中で、多くの質疑がなされたが、そのうち主なものは、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植に関するドナー選定基準と未成年者に対するアセント文書の作成に関する事項である。

慢性肉芽腫症におけるドナー選択に関しては、現時点でもその移植数が極端に少なく、明確な基準は定まっておらず、特に、最近では臍帯血移植も行われるようになってきたことから、幹細胞のソース、HLAの一致度ならびに前処置の方法を含めて論議する点が多い。このため、研究分担者である布井と研究協力者の水上が中心となって全国の慢性肉芽腫症に対する移植症例を集積し、その結果を下に当班会議にて慎重な討議がなされ、さらには加藤俊一先生(東海大教授)、小林正夫先生(広島大教授)らの意見を伺いながら最終的に「アレル検査(DNA typing、遺伝子検査)にてHLAの一致度が5/6以上のドナーがいる場合は幹細胞移植を優先すべき」との結論に至った。すなわち、遺伝子治療が対象となる患者は、その血縁あるいは骨髄・臍帯血バンクにおいて5/6以上のHLA一致ドナーが見つからない場合に限定されることを意味している。これは、遺伝子治療における白血病発症の危険性を考慮したもので、HLA一致度が5/6未満による移植の危険度が遺伝子治療における白血病の発症危険度と比べて同等かあるいはそれ以上であると考えられことによる。ただ、当然のことながら、慢



性肉芽腫症の場合、移植時の患者状態（重篤な感染症の有無）はその患者ごとで大きく異なり、そこで得られる移植成績も大きく変わってくる。よって、今回の基準は暫定的なものと考えられ、今後は症例を重ねていくことで、適応基準をより適正なものに変更していく必要があると思われる。

第二点目は未成年者に対するアセントの問題である。今回の遺伝子治療ではその対象者の年齢を3歳以上としており、また、我々が診療している慢性肉芽腫症患者においても多くの20歳以下の患者がいる。そして、当然のことながらこれら患者の中にも今回の遺伝子治療臨床研究の対象者となる可能性は十分にある。ただ、これまでの遺伝子治療が癌などの成人向けのものであり、小児を対象としたものは少なく、このため、現時点でこれら未成年者に対して遺伝子治療をわかりやすく説明している説明文書はない。しかし、最近の動向では小児に対しても十分な説明を行い、出来る限りアセント（同意）を取得するべきであると報告されている（ICH ガイドラン、E11 小児集団における医薬品の臨床試験に関するガイダンス <http://www.pmda.go.jp/ich/efficacy.htm>）。

このため、本研究では、16歳以下の未成年者を「小学校低学年とそれ以下」及び「小学校高学年」と「中学生」に分け、その各々に応じて理解できる文書による説明書を作成して、積極的にアセントを取得するように試みる。

なお、これら修正点を含む改訂実施計画書等は再提出され、最終的には平成23年2月24日付けで本遺伝子治療臨床研究は遺伝子治療臨床研究審査委員会にて承認された。今後は、その審議が厚生労働省科学技術部会でなされるが、その期間中に実際の臨床研究を模倣したDry Runを複数回行う予定であり、ここで示したような各分担研究者の弛まぬ研究成果を今後も集積し、より安全性で有効な遺伝子治療が実施するように努力する。

## E. 結論

小児先天性・難治性疾患の根治的治療法としての幹細胞遺伝子細胞療法に関し、慢性肉芽腫症をその対象疾患として、以下のような基礎的研究及び臨床研究ならびに環境整備を行った。

1. 基礎的研究：活性酸素産生能とその発現に直線的な相関が見られないこと、炎症性腸炎の有無では末梢血リンパ球分画に差異を認めないこと、AAV ベクターを用いて骨格筋に治療遺伝子を導入した場合、その発現は不十分であ

ること、我々が同定したインシュレータが一定の遮断効果を持つことなどを明らかにした。

2. 臨床研究：乳児のアスペルギルス肺炎の症例や臨床症状を伴わない腸炎の症例、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植の検討、遺伝子疾患に対する遺伝子診断の倫理的配慮に関する研究を行った。

3. 環境整備：実施計画書等作成の支援、実施場所の環境整備などを行った。

今後は国の機関による審議の上、厚生労働大臣による承認をもって慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を開始する。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 分担研究報告

**研究要旨:** 慢性肉芽腫症 (CGD) に対して遺伝子治療臨床研究が行われているが、末梢血における機能修復好中球の維持が困難であり、永続的な治療効果を得られるに至ってはいない。その原因を明らかにし、遺伝子治療改善の方策を確立する目的で、前臨床試験を行った。1) CGD マウスモデルを用いて造血幹細胞において遺伝子導入を行い、長期にわたって末梢血好中球の活性酸素産生能が維持されるかの検討を行った。導入遺伝子のマーカーとして蛍光色素を用いて、遺伝子導入後のサンプルにおいて低発現細胞と高発現細胞とに分取して移植することで新たな知見を得ることに成功した。活性酸素産生能を蛍光色素 APF によってモニターしたところ、低発現細胞移植群、高発現細胞移植群、いずれにおいても機能修復の良好な好中球と機能修復のなされない好中球の2つの集団が観察され、活性酸素産生能の再構築を規定する因子の存在が示唆された。2) CGD 遺伝子治療において化学療法剤による骨髓前処置が行われる。独自の実験系を構築し、前処置による宿主骨髓における環境変化が移植される造血幹細胞に対して負の影響を与えることを明らかにした。炎症性サイトカインが主要な働きを演ずるとの確証を得ており、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と仮説をたてて、さらなる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問題点を抽出し、改善するための方策を見出して臨床試験に供することを目的とする。

#### B. 研究方法

1. 疾患モデルとして gp91phox 遺伝子を欠損した CGD マウスを使用した。遺伝子治療モデルとして、CGD マウス骨髓より幹/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。KO 蛍光強度により、低発現細胞集団と高発現細胞集団とに FACS ソーターを用いて分画し、致死量放射線照射した CGD マウスに移植した。末梢血を4週ごとに採取し、PMA 刺激による APF 蛍光強度によって活性酸素産生能をモニターした。

2. 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時間後に骨髓を採取して、骨髓中に含まれる Ly5.1 細胞に由来する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と変えて比較を行い、骨髓環境中で異なる炎

症状態が造血幹細胞に与える影響について評価した。CGD 造血幹細胞について、野生型造血幹細胞との性状比較を行うべく、サイトカイン刺激による *in vitro* 培養を行った。マウスを用いた実験に関しては、医科学研究所動物実験委員会の承認のもとに施行した。

#### C. 研究結果

1. 計画に従い、移植実験を行った。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によって、KO 陽性細胞が明確に認められた。FACS ソーター MoFlo を使用して、培養4日めに蛍光強度により弱陽性細胞と強陽性細胞とに分画してさらに3日間培養した。これらを致死量放射線照射 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好中球における機能評価を行ったところ、興味深いことにどちらの群においても 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 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。

2. 放射線照射後0-24時間の骨髓環境に暴露された造血幹細胞と比較して、照射後48-72時間の骨髓環境に暴露された造血幹細胞で明らかな機能低下を認めた。この機能低下は、移植後短時間の骨髓環境内への暴露で招来されること、生着完了後には環境暴露に対して抵抗性となること、照射骨髓中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等が明らかとなった。また、炎症性サイトカインのシグナルを一過性に抑制することで機能回復が得られることも示され、臨床応用に向けた戦略に目処がたった。CGD細胞と正常細胞とで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ず、またCGDマウスによるgp91phox発現細胞の拒絶の可能性を考慮し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。CGD 遺伝子治療の問題点は機能修復細胞が高い割合で末梢血に維持されにくいという点に尽きる。造血幹細胞活性がCGDでは野生型細胞に比較して失われやすい、という可能性は今まで行われてきた多くの基礎・前臨床研究においてほぼ否定的されている。次に、機能修復効率が不十分であり、導入遺伝子の発現があるにも関わらず有効な活性酸素産生に結びつかない可能性が考えられる。CGDモデルにおいて、遺伝子陽性細胞を発現量に応じて分画して移植する実験はまだ報告がないが、本研究によって低い発現量の造血幹細胞からも活性酸素を産生する好中球は産出され、逆に高い発現量の細胞からも機能非修復細胞が産出される現象が観察された。これらの機能修復および非修復好中球の間には、導入遺伝子の発現量が同等である細胞集団が含まれることから、活性酸素産生能の獲得を規定する細胞側の因子が存在する可能性を示唆している。移植マウスを増やし、細胞ソーティング技術を駆使して遺伝子発現等の網羅的解析を行うことでこの細胞因子の特定が可能になると期待される。

2. 放射線照射骨髓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。この炎症性サイトカインによるシグナルを一過性に

抑制することで造血幹細胞の機能低下が阻止されたことから、ヒト幹細胞においても同様の処理によって移植後の造血再構築能が改善される可能性を示した。CGD造血幹細胞が定常状態や通常移植においては野生型と変わらない再構築能を示すことは本研究においても確認されているが、よりストレスのかかる条件において造血幹細胞活性を急速に失う可能性はいまだ否定されていない。次年度以降の解析でこの仮説を検証する予定である。

## E. 結論

1. 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、遺伝子導入好中球における活性酸素産生能の再構築には、gp91phox 発現量によらない、細胞側の規定因子が存在する可能性が示唆された。

2. 放射線照射骨髓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。この効果には炎症性サイトカインが主たる役割を演じており、そのシグナルの遮断によって造血幹細胞機能の回復が観察された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Takayama, N., et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 207, 2817-2830 (2010).
- Ogawa, S., et al. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res* 16, 3825-3831 (2010).
- Ogawa, S., et al. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle* 9(2010).
- Kaneko, S., Otsu, M. & Nakauchi, H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol* 17, 271-275 (2010).
- Hayashi, Y., et al. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder-

and serum-free defined conditions.  
PLoS One 5, e14099 (2010).

## 2. 学会発表

- Update of Stem Cell Gene Therapy Clinical Trial for ADA-Deficiency in Japan  
Otsu, M., et al. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2010, Washington DC.
- Update on a Japanese clinical trial of Stem Cell Gene Therapy for ADA-Deficiency.  
Otsu, M., et al. The 17th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2010, Milan.
- Irradiated bone marrow environment impairs hematopoietic stem cells by exposure to tumor necrosis factor  $\alpha$ .  
Suzuki, S., Otsu, M., Nakauchi, H. The 52nd ASH Annual Meeting, 2010, Orland.
- Stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficiency: a report of six-year outcomes in 2 treated patients.  
Otsu, M., et al. The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
- Characterization of iPS cells generated from murine hematopoietic cells.  
Okabe, M., Otsu, M., et al. The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
- Role of CXCR4 Signaling in Hematopoietic Stem Cell Repopulation.  
Lai, CY., et al. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

慢性肉芽腫症における免疫学的変化と臨床症状に関する研究

研究分担者 河合 利尚

国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部 遺伝子診断治療研究室 室長

**研究要旨** 慢性肉芽腫症（CGD）は、NADPHオキシダーゼの異常により活性酸素産生能が障害される原発性免疫不全症である。近年、殺菌能以外にも免疫学的異常が CGD の病態に関与する可能性が指摘されてきたが、その詳細は明らかでない。そこで、非感染性炎症疾患（CGD 腸炎）を合併した 8 例（A 群）と非合併例の 6 例（B 群）について、遺伝子解析、非感染性炎症疾患の臨床所見およびリンパ球サブセットについて検討した。CGD 腸炎症例に特徴的な遺伝子の変異はなかった。CGD 腸炎は免疫学的に未成熟な 10 歳未満に好発したが、ステロイド治療に対して良好な反応を示した。非炎症状態のリンパ球解析では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>活性化 T 細胞と CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリー B 細胞が A, B 両群で健常群よりも有意に減少していた。CGD では、常に T 細胞が活性化された状態ではないが、感染などの刺激によって炎症反応が遷延することが示唆された。また、A, B 両群の臨床所見やリンパ球解析に明らかな相違は認めず、排便回数が増加が共通していることから、全ての CGD 症例で CGD 腸炎をきたす可能性があることが示唆された。

#### A. 研究目的

慢性肉芽腫症（以下 CGD）は、好中球の NADPH オキシダーゼ（NOX）の異常によって活性酸素が産生されず、殺菌能が低下する原発性免疫不全症である。NOX は単球やマクロファージなど免疫担当細胞にも発現するが、その働きについて詳細は不明である。近年、CGD では活性酸素産生障害により、これらの免疫担当細胞に疾患特異的な変化をもたらす免疫制御システムの異常をきたしている可能性が指摘された<sup>1, 2</sup>。そこで、感染症以外の原因で炎症疾患を合併した CGD 症例の臨床経過を後方視的に検討する。さらに、非炎症状態での免疫学的変化を明らかにするために、CGD 腸炎合併 CGD と非合併 CGD のリンパ球分画を解析する。

#### B. 研究方法

これまで当院で、X連鎖性慢性肉芽腫症（X-CGD）と診断された症例は 30 例で、そのうち 8 例が非感染性炎症疾患（CGD 腸炎）を合併した。この 8 例について遺伝子解析、活性酸素産生能、CGD 腸炎の臨床所見を検討した。また、CGD 腸炎を合併しなかった X-CGD 症例 6 例とともに、リンパ球分画、免疫グロブリン産生能、排便回数を調べた。なお、あらかじめ本人及び家族へ書面にて説明を行い、インフォームドコンセントを得られた場合のみ、本研究を実施した。ただし、本研究に参加することで病状の悪化が強く示唆される場合は、対象から除外した。

#### C. 研究結果

##### (1) CGD 腸炎を合併した CGD 症例の解析

X-CGD の責任遺伝子である CYBB 遺伝子について遺伝子解析を行ったところ、ミスセンス変異 1 例、ナンセンス変異 1 例、欠損 3 例、挿入 2 例であった。変異部位はエクソン 1、2、4、6、10、11 で、特定の領域に集中することはなかった。DHR123 を用いたフローサイトメトリー法により、PMA 刺激に対する好中球の活性酸素産生能を検出したところ全例が 0%であった。

##### (2) CGD 腸炎の臨床的特徴

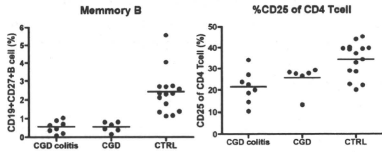
腸炎と診断された症例で、各種培養、ウイルス抗体/抗原検査、内視鏡、病理所見にて感染性腸炎と診断された症例は除外した。

発症年齢は 5.9±4.5 歳であった。初発症状は発熱 67%、下痢 67%、腹痛 44%、血便 33% で全例に何らかの消化器症状を認めた。血液検査上、非特異的な炎症所見を認めた。病理所見では肉芽腫形成は 67% でみられ、非特異的な慢性炎症所見だけの症例もあった。全症例が、ステロイド治療（局所投与 2 例）によって改善がみられた。初発症状からステロイド治療開始までの期間は約 2 ヶ月で、ステロイド治療を中止するまでの期間は 460.8±166.2 日であった。再発率は 22% で、再発までの期間は全身投与例が 1-3 ヶ月であった。

##### (3) 免疫学的検討

CGD 腸炎を合併した CGD 症例 8 例（A 群）と CGD 腸

炎非合併 CGD 症例 6 例 (B 群) について、フローサイトメトリによるリンパ球分画の解析を行った。CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD19<sup>+</sup>B 細胞、T/B 比、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Naive T 細胞、CD4/CD8 比、制御性 T 細胞 (CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞)、CD3<sup>+</sup>D56<sup>+</sup> NK 細胞では、A 群と B 群とも健常コントロール (健常群) と明らかな有意差は認めなかった。



CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞について、A群は0.56±0.12%、B群は0.56±0.11%で健常群(2.42±0.30, n=15)と比較して、A、B群ともに有意に減少していた(A群;p=0.0002, B群;p=0.0011)。血清IgG値は年齢相応の範囲であり、明らかな低下はみられず、ワクチン接種後の特異的抗体産生能にも異常を認めない。

また、CD4<sup>+</sup>T細胞におけるCD25<sup>+</sup>活性化T細胞の割合は、A群が20.99±2.57%、B群は25.50±2.45%と、健常群(34.36±2.10, n=15)と比較してA、B群ともに有意に減少していた(A群;p=0.0008, B群;p=0.026)。A群とB群の間では、有意差を認めなかった。リンパ球活性化試薬であるCytoStim (Miltenyi Biotec, Germany)によって、分離したA、B両群のリンパ球を刺激し、16時間後にフローサイトメトリを用いてCD25(IL-2受容体α鎖)発現細胞を測定したところ、96-99%のCD4<sup>+</sup>T細胞がCD25を発現していた。

#### (4) CGDにおける消化器症状

CGD腸炎発症前A群とB群に対し、消化器症状の有無について調査した。嘔吐、腹痛、食不振などの症状が続くことはなかった。排便回数について、A群では全例が3-4回/日、B群は5例が3-4回/日、1例が1-2回/日であった。なお、A群については、CGD腸炎改善後も3-4回/日の頻度で排便がみられる。

## D. 考察

CGDにおいて、NOXの異常が好中球を中心とした食細胞の殺菌能に障害を与えることは、周知のことである。ところが、殺菌能以外に、NOXによって産生される活性酸素の生理的作用の詳細は明らかでない。

### CGD腸炎合併CGD症例の臨床的特徴

- (i) 遺伝子変異の形式によらず、CGD腸炎を発症する。
- (ii) 抗炎症剤であるステロイドが有効である。
- (iii) 再燃することがある

- (iv) 好発年齢は10歳未満である。
- (v) 病理組織学的に、肉芽腫を形成しない症例もあるが、炎症細胞浸潤と慢性炎症所見を呈する。
- (vi) 初発症状として、何らかの腹部症状を認める。

CGD腸炎の発症において、感冒症状などの先行感染は認められない。一般に、下痢の定義は水様便を1日3回以上排出した場合を下痢とする。必ずしも水様便ではないが、CGD腸炎の合併の有無にかかわらずCGD症例の排便回数が1日3回以上であることから、ステロイド治療を必要としない軽症例を含めると、大半のCGD症例で慢性炎症性腸炎を合併している可能性が唆される。そのため、遺伝子変異の形式によらず、NOX活性が障害され、活性酸素産生能異常を認めることがCGD腸炎の病態形成に深く関わっていると考えられる。

CGD腸炎の第一選択薬であるステロイドは、投与後、細胞膜を通過して細胞質内受容体であるグルココルチコイドレセプターと結合する。この複合体は、炎症性タンパクの転写を促すAP-1やNFκBと相互作用することで、遺伝子転写を抑制し炎症性タンパクの合成を阻害する。そのため感染症に対しては、ステロイド治療は症状の増悪をもたらす。しかし、CGD腸炎では、ステロイド治療が有効であることから、感染症の病態とは全く異なる炎症疾患の発症機序が存在すると推測できる。さらに、CGD腸炎の好発年齢が、免疫学的に未熟な10歳未満であることから、マクロファージやリンパ球を中心とした免疫担当細胞の関与が唆される。

### CGDにおけるリンパ球解析

CGD腸炎の臨床的特徴から、CGD患者における末梢血中の免疫担当細胞に注目した。CGD症例において、メモリーB細胞はCYBB遺伝子の変異形式、年齢、CD5<sup>+</sup>B細胞の増減に関わらず減少していた。これまでの報告では、CGDのメモリーB細胞から遊離するCD27やメモリーB細胞におけるCD27 mRNAの発現レベルに明らかな変化は認められないことから<sup>3</sup>、CGDにおけるメモリーB細胞の減少はその分化・増殖に関与する因子によって生じた間接的変化の可能性が推測される。一般に、成熟B細胞はろ胞中に局在し、ろ胞中のメモリーB細胞の近傍にはろ胞樹状細胞と活性化T細胞が存在する。これまでの報告から、メモリーB細胞の増殖・分化は活性化ヘルパーT細胞との相互作用によって生じることが知られている。

IL-2受容体α鎖(CD25)は、活性化T細胞に発現するIL-2受容体のサブユニットのひとつである。CGDにおいて、CD25を発現する活性化CD4<sup>+</sup>T細胞は、健常群と比較して有意に減少していた。CGDにおいて、重篤な感染症や他の炎症疾患に罹

患していない状態では、活性化 T 細胞が減少し、二次的にメモリー B 細胞の増殖が低下する可能性が示唆された。一方、*in vitro* 実験系で T 細胞を活性化すると、健常群と同レベルで CD25 を発現する活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞が出現することから、T 細胞の活性化自体が障害されている可能性は低い。実際に、CGD 患者では抗原刺激（ワクチン接種やウイルス感染症）に対する抗体産生能に臨床的な異常は認められず、末梢血中の免疫グロブリンレベルは年齢相当に維持される。

単球やマクロファージでは、Toll-like レセプター (TLR)、TNF レセプター (TNFR)、IL-1 レセプター (IL-1R) の刺激は、NADPH オキシダーゼから産生される活性酸素を介して NF $\kappa$ B を活性化する。活性化された NF $\kappa$ B は炎症誘発性サイトカイン、ケモカイン、炎症性酵素および接着分子のような炎症性遺伝子の発現を促進し炎症反応を誘導する。CGD では、NOX が障害されるため、活性酸素が産生されず NF $\kappa$ B の活性化が起りにくいと推測される。そのため、炎症反応を認めない状態では、活性化 T 細胞の割合が低下していると考えられる。

ところが、何らかの原因で炎症反応がおこると、CGD では、炎症反応が遅延し生体内のあらゆる部位で肉芽腫が形成される。病原体が単球やマクロファージで貪食されると、NLRP3 インフラマソームに結合するカスパーゼ I が、炎症初期サイトカインである IL-1 $\beta$  の前駆体を IL-1 $\beta$  へ変換する。通常、カスパーゼ I の活性化は活性酸素で抑制されるが、CGD ではカスパーゼ I の活性化を抑制できないため<sup>2, 4</sup>、IL-1 $\beta$  が過剰に産生されることが推測される。その結果、マクロファージでは TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の細胞内シグナルが NOX を介さない刺激伝達経路によって NF $\kappa$ B を活性化すると思われる。そこで、CGD における単球、マクロファージの機能障害について検討を続ける。

#### 参考文献:

1. Brown KL, Bylund J, MacDonald KL, et al. Clin Immunol. 2008;129(1):90-102.
2. Meissner F, Seger RA, Moshous D, et al. Blood. 2010;116(9):1570-1573.
3. Bleesing JJ, Souto-Carneiro MM, Savage WJ, et al. Journal of immunology. 2006;176(11):7096-7103.
4. Latz E. Blood. 2010;116(9):1393-1394.

#### E. 結論

慢性肉芽腫症では、遺伝子変異の形式によらず、活性酸素産生能が障害されることで、全 CGD 症例に CGD 腸炎を発症する可能性が示唆された。文献的に、マクロファージの機能異常が示唆されるが、本研究からマクロファージで制御されるリンパ球について、活性化 T 細胞が減少し、関連する B

細胞のサブセットも影響されることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M. Osteomyelitis due to trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection*. 2011.

##### 2. 学会発表

村山静子、田村英一郎、河合利尚、井田博幸. 非感染性腸炎を合併した慢性肉芽腫症の検討. 第 42 回小児感染症学会. 2010  
明城和子、藤本慎一郎、河合利尚. 慢性腸炎からマクロファージ活性化症候群を合併した慢性肉芽腫症の 1 例. 第 42 回小児感染症学会. 2010

#### G. 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



非組込み型ベクターによる挿入発癌リスクフリー遺伝子治療

研究分担者 久米晃啓 自治医科大学准教授

研究要旨

アデノ随伴ウイルスベクターは基本的に染色体に組み込まれず、ベクター挿入発癌リスクは非常に低い。本ベクターを用いて代表的な先天代謝異常症であるフェニルケトン尿症モデルマウスに対し、肝と骨格筋を標的とした遺伝子治療実験を行い、長期の効果判定と副作用を検討した。肝を標的とした遺伝子導入が優れた治療効果を見せたのに対し、骨格筋に対するベクター投与の効果は不十分であった。いずれの系においても1年以上の経過観察において腫瘍発生などの副作用は観察されず、安全性は確認された。

A. 研究目的

遺伝子・細胞治療法の開発と実施にあたり、リスク対ベネフィット評価の中で近年重視されているのが染色体挿入発癌の問題である。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。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、標的組織の染色体外で長期間安定に存在する。フェニルケトン尿症（PKU）モデルマウスを用いて、肝と骨格筋を標的としてそれぞれ AAV ベクターを投与した後の長期効果と安全性について検討した。

B. 研究方法

肝特異的プロモータとしてアポリポ蛋白 E/C-I エンハンサー- $\alpha$  アンチトリプシンプロモータを、筋特異的プロモータとして筋クレアチンキナーゼプロモータを組み込んだ AAV ベクターを構築した。PKU マウスの治療には、肝と標的とする場合は欠損酵素（PAH）をコードする AAV8 ベクターを単独で、骨格筋を標的とする場合は PAH ベクターに加えて補酵素合成系 2 酵素（GCH と PTPS）をコードするベクターと合わせて 3 種の AAV1 ベクターを混合投与した。ベクター投与後、各 PKU マウスの血中フェニルアラニン（Phe）濃度を経時的に測定し、必要に応じて安定同位体  $^{13}\text{C}$ -Phe を用いた Phe 代謝活性も測定した。組織の残存ベクター量は定量的 PCR にて測定した。

C. 研究結果

肝を標的とする遺伝子治療では、ベクター投与後 1 週から効果が現れ、血中 Phe がほぼ正常域（ $< 2 \text{ mg/dL}$ ）に保たれたまま 1 年以上経過

した。経過中および遠隔期における Phe 代謝能も多くの個体にて正常域にあった。

$1 \times 10^{12} \text{ vg}$  のベクター投与群における肝のベクター残存量は投与後 8 週の平均  $27.3 \text{ vg/細胞}$  から 1 年後には  $3.1 \text{ vg/細胞}$  へと低下していた。

骨格筋を標的とする遺伝子治療では、ベクター投与後血中 Phe は有意に低下したものの（投与前  $30.3 \pm 2.5 \text{ mg/dL}$  から投与 4 週後  $19.7 \pm 2.4 \text{ mg/dL}$ 、 $P = 3 \times 10^{-8}$ 、 $n = 11$ ）、治療域（ $< 10 \text{ mg/dL}$ ）までは下がらず、体毛色等他の指標も改善しなかった。

D. 考察

これまで、AAV ベクターを用いてマウス肝へ遺伝子導入後、肝癌が発生したという報告もあり、本ベクターの安全性について諸外国でも精力的に検討されてきた。癌発生の一因として、遺伝子発現効率を高めるためベクターに組み込んだ肝癌ウイルス由来のシスエレメント（WPRE）が指摘された。これを含まないベクターを使用した場合、諸外国の研究者の報告を総合しても、肝癌発生率が上昇するという結果は得られておらず、我々の追跡でも肝癌発生は認められなかった。効果については、肝を標的とする AAV8 ベクター投与は目覚ましい治療成績を上げ、同種のベクターを用いた血友病 B 遺伝子治療臨床試験（英国）の報告からも有望である。遠隔期におけるベクター含有量低下は、本ベクターが染色体に組み込まれず挿入発癌リスクが低いことを支持するが、さらに長期間効果を維持するには、ベクターの再投与が必要になる可能性もある。

骨格筋に対する scAAV1 ベクター投与は十分な

治療効果を上げることはできなかったが、そのprimate colonies. American Society of Gene  
主な理由は治療用遺伝子の発現効率が低いためand Cell Therapy 13th Annual Meeting, May 2009,  
と考えられ、更なるベクター改良が必要である。Washington, DC, USA. (Mol Ther 18 Suppl 1:S214,  
2010)

## E. 結論

ベクター自身の安全性および挿入発癌リスクの低さから、AAV ベクターの安全性が再確認された。肝を標的とする AAV 投与が著効を示されたのに対し、骨格筋を標的とする AAV 遺伝子治療の効果は不十分だった。骨格筋への投与はより安全に行えるので、ベクター自体の効率改善により実用化を目指すべきである。

## 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) Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. Mol Ther 18:1731-1735, 2010.

2) Yagi H, Ogura T, Mizukami H, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa H, Ozawa K, Kume A: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. J Gene Med, in press (doi: 10.1002/jgm.1543).

### 2. 学会発表

1) 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 AAV vector-mediated factor IX expression in skeletal muscle. American Society of Gene and Cell Therapy 13th Annual Meeting, May 2009, Washington, DC, USA. (Mol Ther 18 Suppl 1:S163, 2010)

2) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Robust and sustained factor IX expression by IV administration of AAV8-based vectors in macaques. American Society of Gene and Cell Therapy 13th Annual Meeting, May 2009, Washington, DC, USA. (Mol Ther 18 Suppl 1:S210, 2010)

3) Yagi H, Mizukami H, Tsukahara T, Urabe M, Hamada H, Kume A, Yoshikawa H, Ozawa K: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus 2, 8 and 9 in non-human

4) Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Ishiwata A, Mimuro J, Madoiwa S, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K: Choice of small-sized promoter for AAV-mediated factor IX expression in skeletal muscle. 第16回日本遺伝子治療学会、2010年7月、宇都宮(抄録 PO-139)

5) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Successful factor IX expression by IV administration of AAV8 vectors in macaques. 第16回日本遺伝子治療学会、2010年7月、宇都宮(抄録 OR-60)

6) Mizukami H, Yagi H, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Ozawa K: Improved assay system for Nab against AAV vectors and prevalence in non-human primates. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月、横浜(臨床血液 51:962, 2010)

7) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Unswerving factor IX expression in Nab-negative macaques following IV administration of AAV vector. XVIIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 2010, Milan, Italy. (Abstract p62)

8) Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K: Validation of anti-tumor effects mediated by anti-CD19CAR T-cells for B cell lymphoma. XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 2010, Milan, Italy. (Abstract p216)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。

## 遺伝子治療臨床研究における分子生物学的解析

研究分担者 中林 一彦

国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 合併症妊娠管理研究室 室長

### 研究要旨

遺伝子治療は、有効な治療法が殆ど無い先天性遺伝病や癌に対して、革新的な治療法になると期待されている。組織・個体へ遺伝子を高効率で導入し、安定な発現を持続させる技術の確立・改良は、遺伝子治療を成功させる上で極めて重要である。インスレーターは遺伝子導入において問題となるポジション効果を回避する手段として注目されている。哺乳類で保存された内在性インスレーター配列を新規に同定し、同配列のエンハンサー遮断効果ならびにバリアー活性（ポジション効果の抑制）について検討した。

### A. 目的

組織・個体へ遺伝子を高効率で導入し、安定な発現を持続させる技術の確立・改良は、遺伝子治療を成功させる上で極めて重要である。遺伝子導入において頻繁に問題となるのがそのポジション効果で、導入遺伝子が挿入された位置のクロマチン環境の影響により、導入遺伝子の発現が時間の経過とともに抑制・不活性化される現象である。ポジション効果を回避する手段として注目されているのがインスレーターである。

インスレーター配列を搭載したベクターの開発がこれまでに複数のグループによってなされており、一定の成果は上がっている。しかし、インスレーター機能の効率が期待する程高くない場合や、その効果の組織特異性が問題となる場合も多い。哺乳類において既知のインスレーター配列は限られており、新規インスレーターの同定・性状解析により、より効果の高いインスレーター搭載ベクターが開発できる可能が生まれる。

本年度は、我々が独自に同定したインスレーター候補配列の性状解析を行い、遺伝子治療ベクターへの応用の可能性について検討することを目的とした研究を実施した。

### B. 方法

インスレーターには、二つの機能が知られている。一つは、「エンハンサー遮断効果」で、インスレーター配列をエンハンサーとプロモーターの間に挿入すると、エンハンサーのプロモーターへの影響を遮断する。二つ目は「バリアー活性（ポジション効果の抑制）」で、導入遺伝子の両側をインスレーター配列で挟んだ時、ゲノム上で導入遺伝子が挿入された位置に影響されず、(理想的には)常に安定な遺伝子発現が保証される。

当該インスレーター候補配列のエンハンサー遮断効果を、ルシフェラーゼ遺伝子レポーターアッセイにより評価した。さらに、バリアー活性（ポジション効果

の抑制)をトランスフェクション(ネオマイシン耐性クローンの出現頻度を指標とする)により評価した。

倫理面への配慮：上記の方法に必要な動物実験ならびに遺伝子組換え実験は、国立成育医療研究センター研究所・動物実験委員会ならびに組換え DNA 実験安全委員会の承認(承認番号 2010-002 および 10-1)を得た上で、法令等を遵守し、十分な対策と措置を講じた上で実施した。

### C. 結果

MeDIP-chip 法により取得したゲノムワイド DNA メチル化データセットの解析から、C57BL/6 系統の 9.5 日胚では高メチル化、JF1 系統の 9.5 日胚では低メチル化状態のゲノム領域を同定し、JF1 系統特異的 1.8kb 挿入配列を同定した。この挿入配列をルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし、Cos7 を用いてレポーターアッセイを行った結果、この挿入配列中にエンハンサー活性ならびエンハンサー遮断効果(インスレーター活性)が存在することが確認された(図 1)。この挿入配列中に存在するインスレーターを JPAC インスレーター(JF1 insertion between Parp2 and Cnblip1 insulator)、エンハンサーを JPAC エンハンサーと命名した。それぞれのコア配列は JPAC インスレーターが 242bp、JPAC エンハンサーが 185bp であった。

JPAC インスレーターが JPAC エンハンサー以外のエンハンサーに対してもエン

ハンサー遮断活性を示すか検討するために、SV40 エンハンサーと JPAC インスレーターをルシフェラーゼ発現 vector にクローニングし、同様にレポーターアッセイを行った。その結果、JPAC インスレーターを SV40 エンハンサーとルシフェラーゼ遺伝子の間にクローニングした場合のみ、SV40 エンハンサーの活性が遮断された(図 2)。つまり、JPAC インスレーターは SV40 エンハンサーに対してもエンハンサー遮断活性を示すことが示された。また JPAC インスレーターは、既知インスレーター配列である cHS4 と同程度のエンハンサー遮断活性を示した。

次にインスレーターのもう一つの機能であるバリアー活性を JPAC インスレーターが示すか検討した。まず、JPAC インスレーターをネオマイシン耐性遺伝子の両端にクローニングした vector を作製した。それらを Cos7 にトランスフェクションし、G418 を加えた培地中で 13 日間培養し、得られたネオマイシン耐性 Cos7 のコロニーを数えた。その結果、JPAC インスレーターをクローニングしていない vector をトランスフェクションした場合と比較すると、JPAC インスレーターをネオマイシン耐性遺伝子の両端にクローニングした vector をトランスフェクションした場合のほうが、得られたコロニー数が約 2 倍に上昇した(図 3)。この結果は、JPAC インスレーターをネオマイシン耐性遺伝子の両端にクローニングすることによって、ゲノム中に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子が不活性化される割合が減少したためだと考えられる。