

## 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

小野寺 雅史

国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝研究部・部長

遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、実施計画書の作成及び実施施設長への提出、遺伝子治療臨床研究の適正実施の確認、遺伝子治療臨床研究の進行状況及び研究結果の実施施設長及び審査委員会への報告

### 2-2 副総括責任者の氏名及びその担当する役割

奥山 虎之

国立成育医療研究センター病院・臨床検査部・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・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、患者の選定基準の作成、遺伝カウンセリング

### 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

氏名	所属	役職	役割
藤本 純一郎	国立成育医療研究センター臨床研究センター	センター長	遺伝子治療臨床研究環境整備
河合 利尚	国立成育医療研究センター研究所	成育遺伝研究部・室長	遺伝子治療臨床研究に必要な病棟体制の整備、患者の診療
熊谷 昌明	国立成育医療研究センター病院	固形腫瘍科・医長	患者幹細胞細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与
森 鉄也	国立成育医療研究センター病院	血液腫瘍科・医長	患者幹細胞細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与

清河 信敬	国立成育医療研究センター研究所	小児血液腫瘍研究部・部長	治療遺伝子導入法の検討
梨井 康	国立成育医療研究センター研究所	RI 管理室・室長	遺伝子導入細胞の解析、遺伝子導入効率及び遺伝子挿入部位の検討
緒方 勤	国立成育医療研究センター研究所	分子内分泌研究部・部長	遺伝子導入細胞の解析、遺伝子導入効率及び遺伝子挿入部位の検討
瀧本 哲也	国立成育医療研究センター臨床研究センター	臨床研究推進室・室長	臨床データの管理
掛江 直子	国立成育医療研究センター研究所	成育保健政策科学研究室・室長	遺伝子治療臨床研究の倫理性と個人情報保護の管理及び評価の実施
土田 尚	国立成育医療研究センター病院	第一診療部・医師	遺伝子治療に関する文書作成と情報収集
加藤 俊一	東海大学医学部	基盤診療学系再生医療科学・教授	患者の選定、幹細胞移植の指導
有賀 正	北海道大学大学院医学研究科	生殖発達医学講座 小児科学分野・教授	患者の選定、免疫学検査の管理と指導
布井 博幸	宮崎大学医学部	生殖発達医学講座 小児学分野・教授	患者の選定、免疫学検査の管理と指導
水上 智之	宮崎大学医学部	生殖発達医学講座 小児学分野・助教	患者管理
久米 晃啓	自治医科大学	分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部・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	幹細胞治療センター・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	小児科・医師	臨床データの管理

## 2-4 海外共同研究者

本遺伝子治療臨床研究は、米国国立衛生研究所・国立アレルギー・感染症部門・宿主防御研究室 (Laboratory of Host Defenses, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health) の Malech 博士 (Dr. Harry L. Malech)、Kang 博士 (Dr. Elizabeth Kang)、及び過去に同様の遺伝子治療臨床研究を行った実績のあるドイツ Georg-Speyer-Haus 生物研究所の Grez 博士 (Dr. Manuel Grez)、スイス Zurich 大学小児病院の Seger 博士 (Dr. Reinhard Seger)、英国小児保健研究所の Thrasher 博士 (Dr. Adrian J. Thrasher) より多くの有益な情報を得て行うものである。なお、本研究で使用されるレトロウイルスベクターは、NIH の Malech 博士より供与されるため、同博士の本研究に対する同意書を添付する (同意書を別添 3 に示す)。

### 3 遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在地

名称：国立成育医療研究センター病院及び研究所  
所在地：東京都世田谷区大蔵 2-10-1 〒157-8535

電話：03-3416-0181 FAX：03-3416-2222

## 4 遺伝子治療臨床研究の目的

本遺伝子治療臨床研究の目的は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) のうち、特に CGD としては最も症例数が多い NADPH オキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質 gp91<sup>phox</sup> に変異にある 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。

具体的には、レトロウイルスベクターを用いて gp91<sup>phox</sup> をコードするヒト cytochrome b245 beta polypeptide (CYBB) 遺伝子 (NM\_000397) を患者由来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 (臨床検査的有効性と症状改善等の臨床的有効性) を別添 7 に基づいて評価する。なお、PCR 法やフローサイトメトリ法を用いた患者体内での遺伝子導入細胞の動態やクロナリティーの変動なども同時に解析する。

## 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

CYBB 遺伝子 (gp91<sup>phox</sup>) に変異を持つ X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD)

### 5-2 対象疾患に関する現時点での知見

#### 5-2-1 慢性肉芽腫症の病因と頻度

CGD は、乳幼児期より重篤な細菌性あるいは真菌性感染症を反復罹患し、諸臓器に肉芽腫を形成する先天性免疫不全症候群の一疾患である<sup>1-4</sup>。

好中球をはじめとする食細胞は、活性酸素種 ( $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $HC1O^-$  など) を産生し、体外から侵入してきた細菌や異物を殺菌する機構を有している。この活性酸素産生を担う主要な分子が NADPH オキシダーゼ酵素複合体であり、本酵素は細胞膜上の gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup> のヘテロ 2 量体と、細胞質内の p67<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、Rac p21 より構成されている<sup>5-7</sup>。

CGD はこれらのうち gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup> の 4 分子のいずれかが先天的に機能していないため、活性酸素を産生できず、体内に侵入した微生物を殺菌することができないことにより発症する<sup>8,9</sup>。特に、ブドウ球菌、クレブシエラ菌、大腸菌、カンジダ、アスペルギルスなどの過酸化水素非産生・カタラーゼ陽性菌を殺菌することができないため、乳幼児期から細菌や真菌による全身性難治性感染症を反復し、しばしば致命的経過をとる<sup>6</sup>。

わが国の先天性免疫不全症の患者数は、CGD が最も多く、約 18% を占める (平成 18 年度厚生労働省原発性免疫不全症候群研究班)。CGD の発症頻度は 22.5 万出生に 1 人程度であり<sup>10</sup>、国内では 2006 年 12 月現在、200 家系以上、270 名以上が登録されている。男女比はおよそ 6.9:1 で、国内の分布には地域による偏りはない。日本人の病型別の患者割合を見ると X 連鎖遺伝の gp91<sup>phox</sup> 欠損型 (X-CGD) が 79.7% と最も多く、常染色体劣性遺伝の 3 病型は p22<sup>phox</sup> 欠損型 (8.3%)、p67<sup>phox</sup> 欠損型 (6.3%)、p47<sup>phox</sup> 欠損型 (5.7%) であり、諸外国に比べて p47<sup>phox</sup> 欠損型が少ない。病型の違いによって重症度が異なることが報告されており<sup>11,12</sup>、米国では gp91<sup>phox</sup> 欠損型が常染色体劣性遺伝型の 3 病型に比べて死亡率が高かったとの報告がある<sup>10,13</sup>。また、国内でも、gp91<sup>phox</sup> 欠損型が最も重症のようである。

gp91<sup>phox</sup> 欠損型は X 連鎖遺伝のため患者の大部分は男性である。多くはその

母親がヘテロ接合体の保因者であるが、両親とも変異を持たず子に新規変異が生じる場合もある。保因者の末梢血食細胞は、正常食細胞と異常食細胞が混在するモザイクを呈するが、その程度はX染色体の不活化の程度により個人差がある。ただ、正常食細胞が全体の5%以上存在すれば、感染症が重症化しにくいことが明らかにされている<sup>14</sup>。また、これまでに行われた国内のX-CGDの遺伝子変異の解析結果によると、ナンセンス変異24例、ミスセンス変異12例、スプライス部位変異17例、欠失10例、挿入7例であり、特に変異が集積するhot spotは存在せず、変異は翻訳領域全体に散在している。なお、同一変異であっても生活環境により重症度は異なる<sup>15</sup>。

### 5-2-2 慢性肉芽腫症の症状と経過

CGDの一般的な症状として、乳幼児期より繰り返す全身諸臓器の難治性細菌・真菌感染症が上げられている。細菌性感染症としては、化膿性皮膚炎、リンパ節炎、肺炎、中耳炎、肛門周囲膿瘍などがよくみられ、感染症が重症化・遷延化し、抗生物質の多剤併用療法により入院期間が長期化する<sup>16</sup>。一方、真菌による感染症としては肺アスペルギルス感染症が最も多く、多種の抗真菌剤を用いても改善しない場合は致死経過をとる<sup>6</sup>。一方、軽症例では、10歳を越えてから肝膿瘍などを契機に初めてCGDと診断される場合がある。

他の特徴として、諸臓器に形成される肉芽腫性病変がある。肺や消化管、肝臓などに多くみられ、ときに頭蓋内にもみられる<sup>17</sup>。肉芽腫形成の詳細な機序は不明だが、一般には細菌などを貪食した好中球を周囲の単球が処理できず、単球の活性化状態が持続し、多種のサイトカインが放出されることで周囲の炎症細胞が集結し、結果、肉芽腫を形成していくと考えられる。肉芽腫性病変は内科的治療だけでは改善しないことが多く、外科的切除の対象になることもある。消化管に肉芽腫が形成されると通過障害をきたす。また、CGD腸炎では腸管の粘膜下組織に非乾酪性肉芽腫を形成し、クローン病様症状を呈する<sup>18</sup>。McLeod症候群は、gp91<sup>phox</sup>遺伝子と隣接遺伝子のXKやRP3を共に欠失しており、有棘赤血球症や網膜色素変性症を合併する<sup>19</sup>。

X-CGD患者に抗生物質の予防投与を行わない場合、患者一人あたりの重症感染症罹患回数は平均年2回であり<sup>20</sup>、こうした罹患頻度の高さからこれまでの国内X-CGD患者の多くは敗血症やアスペルギルス感染症により30歳までに死亡していた<sup>21</sup>。しかし、最近は新たな抗生物質や抗真菌剤が開発され、30歳を越え延命する患者もみられている<sup>21</sup>。

### 5-2-3 従来の治療法

CGD 治療の基本的方針として、合併する感染症のコントロールが上げられる。その治療方針としては、抗生物質や抗真菌剤といった抗菌療法が主体となり、大きく対処療法と予防投薬に分けられる。対処療法に関しては、近年、効力のある抗生物質や抗真菌剤（ミカファンギンやボリコナゾール）が開発され、従来は治療困難であった感染症も軽快する例が増えてきた。ただ、X-CGD の場合、一旦、感染症に罹患すると重症化し多剤併用療法を必要とすることが多く、入院期間も長期化しやすい。このため CGD では、日常の感染予防が重要であり、現在はトリメトプリム/スルファメトキサゾール（ST 合剤）やイトラコナゾールなどの予防投薬を行う場合が多い<sup>22-24</sup>。抗菌剤投与以外の感染症予防としては、インターフェロン・ガンマ（IFN- $\gamma$ ）投与が上げられる<sup>25-27</sup>。IFN- $\gamma$  は、約 3 分の 1 の症例で重症感染症に対する予防効果があると報告され<sup>23,28</sup>、国内患者の約 4 割に投与されている。ただ、これら抗菌剤や IFN- $\gamma$  の投与を行っても、重症感染症や合併症による年間死亡率は 2~5%<sup>10</sup>であり、国内でも毎年死亡例が報告されている<sup>21</sup>。

CGD は造血幹細胞を起源とする食細胞の機能異常であるため、造血幹細胞移植により根治が可能である。ただ、CGD の場合、患者 T 細胞機能が正常であるため強力な前処置が必要で、たとえ HLA 一致幹細胞移植を行っても、移植関連合併症が発症しやすく、治療成績は他の重症複合免疫不全症（SCID）と比べて不良である<sup>29,30</sup>。また、移植医療を受ける患者の多くは活動性の感染症を罹患しており、前処置を含む移植治療によりその感染症が増悪する危険性もある。欧州、米国、我が国の CGD に対する造血幹細胞移植のまとめを別添 8 に示すが、スイスの Segar らは、欧州において CGD 患者 27 名に対し、主にブスルファン（Bu）とシクロフォスファミド（Cy）を前処置とした造血幹細胞移植を行い、移植関連の死亡が 4 名で、特に、移植時に活動性感染症を罹患している症例では危険度が高いと報告している（別添 12）<sup>31</sup>。また、米国では 10 名の CGD 患者に対し、Cy、フルダラビン（Flu）、抗胸腺細胞グロブリン（ATG）を前処置とした T 細胞除去 HLA 一致ドナーからの末梢血幹細胞移植が行われ、10 名中 3 名の死亡例が確認され、1 名は生着不全をきたしている<sup>32</sup>。

我が国では 2008 年までに、34 名の患者に対し 38 回の幹細胞移植が行われた。その内訳は、下記の表に示すように骨髄由来の造血幹細胞移植が 27 例、臍帯血由来の移植が 7 例、末梢血由来が 4 例で、HLA 完全一致例が 24 例、5/6 一致例が 8 例、4/6 一致以下で 6 例であった。治療成績（無イベント生存率）は、移植時の感染症の有無や前処置の違いにより大きく左右されるが、血縁、非血縁を問わず HLA が完全一致した骨髄幹細胞を用いた移植では、20 例中 19 例で移植が成功している。一方、HLA が



一遺伝子異なる場合 (5/6 一致例)、治療成績は 50~60%と低下し、この値は小児非腫瘍性疾患に対する臍帯血移植の成績 (51±8%) と大方一致する (日本さい帯血バンクネットワーク・移植データ管理小委員会 2007 年度解析結果)。

HLA	血縁									非血縁									計
	6/6			5/6			4/6 以下			6/6			5/6			4/6 以下			
ソース	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	
症例数	12	1	2	2	0	1	4	0	1	8	1	0	1	4	0	0	1	0	38
死亡例	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7
拒絶例	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
生着 (%)	92	0	50	50	0	0	25	0	0	100	0	0	100	75	0	0	100	0	71

HLA	6/6			5/6			4/6 以下			計
ソース	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	
症例数	20	2	2	3	4	1	4	1	1	38
死亡例	1	1	1	1	1	0	1	0	1	7
拒絶例	0	1	0	0	0	1	2	0	0	4
生着 (%)	95	0	50	67	75	0	25	100	0	71

このように、慢性肉芽腫症に対して造血幹細胞移植を考慮する場合、少なくとも HLA が 5/6 以上一致するドナーからの移植が望ましい。さらに、慢性肉芽腫症の場合、他の免疫不全症とは異なり、患者 T 細胞機能が正常であることから移植に際して強力な前処置が必要である。ただ、移植時に重症感染症を罹患していることも多いため、移植関連合併症を併発しやすく、移植成績は他の重症複合免疫不全症と比較して不良である。

### 5-3 本遺伝子治療臨床研究の背景と概要

前述のように CGD に対する根治療法は、HLA が一致した造血幹細胞移植のみであるが、ドナーの関係からこの移植医療を受けられない症例は全体の 3 割で、また、たとえ適当なドナーが存在したとしても、移植のための前処置に耐えられない程の重篤な感染症に罹患している患者も多く、幹細胞移植が、現時点で CGD に対する最適な治療法とは言い難い。このようなことから、CGD は遺伝子治療開始当初より造血幹細胞遺伝子治療の最適な対象疾患と考えられていた。

1995 年、世界初の CGD に対する遺伝子治療臨床研究が、米国国立衛生研究所の Malech 博士らによって報告された (別添 10)。対象は、NADPH オキシダーゼ酵素の p47<sup>phox</sup> が欠損した症例で、遺伝子導入細胞として患者末梢血造血幹細胞が使用された。その後も、本研究の対象疾患である gp91<sup>phox</sup> 欠損型 CGD (X-CGD) に対しても行われた

が、その治療効果は短期間（6ヶ月以下）であり、長期的な治療効果を示すには至らなかった。これは、これは、患者骨髓腔がもともと存在する患者骨髓細胞で満たされているため、投与された遺伝子導入細胞の生着する空間が確保されていないことが原因と考えられた。

このことを実証したのが、2003年、ドイツの Grez 博士らが行った造血幹細胞遺伝子治療であり、この中で、同博士は難治性感染症があり、適当な移植ドナーのみ見つからない2名の X-CGD 患者に対して、体重 1kg あたり 8mg のブスルファンの投与を前処置として投与し、その後に遺伝子導入細胞を投与した（別添 11）<sup>33</sup>。その結果、骨髓への生着率が増加し、患者体内で活性酸素産生好中球（正常遺伝子が機能している好中球）が全好中球の 10～57%を占め、臨床的にも肝膿瘍や肺アスペルギルス症が軽快した。また、スイスで行われた同一の遺伝子治療においても、肉芽腫による脊髄圧迫が軽減し、患者が歩行可能になったと報告されている（Segeer 博士 私信）。同様に 2006年から 2007年にかけて、Malech 博士（米国）や Kim 博士（韓国）らもブスルファンを前処置とする遺伝子治療臨床研究を行った。Grez 博士のような高い活性酸素産生好中球数は得られなかったものの、臨床的にはブドウ球菌による肝膿瘍の縮小など一定の治療効果が確認された（両博士からの私信）。

これら結果を受け、本遺伝子治療臨床研究でも、レトロウイルスベクターを用いた患者造血幹細胞への CYBB 遺伝子導入と、前処置をしてのブスルファン投与を遺伝子導入細胞投与前に患者に対して行う。詳細は後述するが、本研究では、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）にて末梢血中に誘導した造血幹細胞を患者から回収し、生体外でレトロウイルスベクターを用いて CYBB 遺伝子を造血幹細胞に導入して、あらかじめブスルファン投与された患者に対し、これら遺伝子導入細胞を静脈内より輸注する。

#### 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

CGD は、重篤な細菌・真菌感染症を反復罹患し、青年期までにその多くの患者が死亡する予後不良な疾患である。患者の一部には軽症例も見受けられるが、特に本遺伝子治療臨床研究が対象とする gp91<sup>phox</sup> 欠損型の X-CGD は、幼児期より重症感染症を反復するため、早期に根治療法を実施することが望ましい<sup>4</sup>。

近年は、治療効果が増強した抗生物質や抗真菌剤が開発され、重症感染症に対しても一定の治療成績を上げつつあるが、完全に感染症を沈静化することは困難である。また、IFN- $\gamma$  や顆粒球輸血も限定的な治療効果しかもたらしていないこともあ

り、現時点で確立された根治療法は同種造血幹細胞移植のみである<sup>34</sup>。

しかし、同種造血幹細胞移植であっても、適当な移植ドナーの不足により全症例へ移植医療を実施することは困難であり、さらに、移植に関連した原因で死亡する例も少なくなく、いまだ移植医療が安全な治療法とは言い難い。特に、CGDの場合、移植時に難治性感染症に罹患している場合が多く、また、肝、腎、肺機能に障害のある症例も多いことから、同種造血幹細胞移植のリスクは他の疾患と比べて大きい<sup>35</sup>。

一方、遺伝子治療でも遺伝子導入細胞の生着のためにブスルファンなどの前処置を必要とするが、その量は、同種造血幹細胞移植に比べて少量であり、また、移植後に免疫抑制剤を使用しないため、造血能回復までの日数の短縮が期待できる。さらに、患者自身の造血幹細胞を用いるため、移植片対宿主病（GVHD）発症の危険性も回避できる。このようなことから、ドナー不在あるいは全身状態不良など、なんからの理由で移植の実施が困難であり、かつ、重篤な感染症のため生命の危機にあるCGD患者にとって、本遺伝子治療臨床研究における造血幹細胞遺伝子治療は意義のある治療法と言える。ただ、過去の遺伝子治療において発症した造血系異常などの有害事象を考えると、その実施は患者の利益と危険を十分に検討した上で慎重に決定されなければならない。たとえ、今回使用するベクターではそのような有害事象が報告されていなくとも、実施に際しては注意深い経過観察が求められる。

以上の点をふまえ、下記の理由によりX-CGDに対する遺伝子治療は実施するに値すると判断した。

- ・ X-CGDは単一遺伝性疾患であり、その病態が分子レベルで十分に解明されていること。
- ・ 現時点で確立されている根治療法は同種幹細胞移植であるが、実施困難な症例も多く、また、適応になったとしてもその危険性は小さくないこと。
- ・ 治療遺伝子を導入するヒト造血幹細胞の採取法、ならびにこれら細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法はすでに確立していること。
- ・ 治療遺伝子（CYBB 遺伝子）導入により機能が回復した患者食細胞が、全好中球の1%程度あれば、重症感染症に対する治療効果が見込まれること。
- ・ 本遺伝子治療臨床研究で使用されるベクターの過去の事例（トレーサビリティ）を勘案したとき、有害事象である白血病の発症の危険性は決して高くないこと。

## 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<sup>phox</sup> タンパク質をコードしている。

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り、この遺伝子は、4339塩基対 (bp) の糖タンパク質である gp91<sup>phox</sup> をコードしており<sup>36</sup>、翻訳開始コドン ATG の上流にある 61 bp の非翻訳領域のほか、570 アミノ酸をコードする 1710 bp と TAA を終止コドンとする 1713 bp 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<sup>phox</sup> の open reading frame (ORF) の 1713 bp とベクター挿入の際に加えられた人工的な配列の合計 1723 bp である。次頁に CYBB 遺伝子の塩基配列なら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 5)、2278~3990 bp 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<sup>phox</sup> のアミノ酸配列

ATGGGGAACGGGCTGTGAATGAGGGGCTCCATTTTTGTCATTCTGGTTGGCTGGGGTTGAACGCTTCCTCTTTGTCTGGTATTACCGGGTTATG 100  
MetGlyAsnTrpAlaValAsnGluGlyLeuSerIlePheValIleLeuValTrpLeuGlyLeuAsnValPheLeuPheValTrpTyrTyrArgValTyr

ATATCCACCTAAGTCTTTTACACAAGAAAACCTCTGGGTCAGCACTGGCACTGGCCAGGGCCCTGCAGCCTGCCTGAATTTCACTGCATGCTGAT 200  
AspIleProProLysPhePheTyrThrArgLysLeuLeuGlySerAlaLeuAlaLeuAlaArgAlaProAlaAlaCysLeuAsnPheAsnCysMetLeuIle

TCTCTGCCAGTCTGTGAAATCTGCTGCCTTCTCAGGGTTCAGTGCCTGCTCAACAAGAGTTCGAAGACAACCTGGACAGGAATCTCACCTTT 300  
LeuLeuProValCysArgAsnLeuLeuSerPheLeuArgGlySerSerAlaCysCysSerThrArgValArgArgGlnLeuAspArgAsnLeuThrPhe

CATAAAATGGTGGCATTGGATGATTGCACCTCACTCTGCGATTACACCACTGCACATCTATTTAATGTGGAATGGTGTGTAATGCCGAGTCAATAATT 400  
HisLysMetValAlaTrpMetIleAlaLeuHisSerAlaIleHisThrIleAlaHisLeuPheAsnValGluTrpCysValAsnAlaArgValAsnAsn

CTGATCCTTATTAGTAGCACTCTGAACTTGGAGACAGGCAAAATGAAAGTTATCTCAATTTTGTCTGAAAGAGAATAAAGAACCTGAAGGAGGCT 500  
SerAspProTyrSerValAlaLeuSerGluLeuGlyAspArgGlnAsnGluSerTyrLeuAsnPheAlaArgLysArgIleLysAsnProGluGlyGlyLeu

GTACCTGGCTGTGACCCCTGTTGGCAGGCATCACTGGAGTTGTCATCACGCTGTCCTCATATTAATTATCACTTCTCCACAAAACATCCGGAGGTCT 600  
TyrLeuAlaValThrLeuLeuAlaGlyIleThrGlyValValIleThrLeuCysLeuIleLeuIleIleThrSerSerThrLysThrIleArgArgSer

TACTTTGAAGTCTTTTGGTACACATCATCTCTTTGTGATCTTCTTATTGGCCTTGCATCCATGGAGCTGAACGAATGTACGTGGGAGACCCGAG 700  
TyrPheGluValPheTrpTyrThrHisHisLeuPheValIlePhePheIleGlyLeuAlaIleHisGlyAlaGluArgIleValArgGlyGlnThrAla

AGAGTTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAACAAAAATCTCAGAATGGGAAAAATAAAGGAATGCCCAATCCCTCAGTTTGTGAAACCCCTCC 800  
GluSerLeuAlaValHisAsnIleThrValCysGluGlnLysIleSerGluTrpGlyLysIleLysGluCysProIleProGlnPheAlaGlyAsnProPro

TATGACTTGGAAATGGATAGTGGGTCATGTTTCTGTATCTGTGAGAGTTGGTGGGTTTTGGCGATCTCAACAGAAGGTGGTATCCCAAGGTG 900  
MetThrTrpLysTrpIleValGlyProMetPheLeuTyrLeuCysGluArgLeuValArgPheTrpArgSerGlnGlnLysValValIleThrLysVal

GTCACCTACCCCTTCAAACCATCGAGTACAGATGAAGAAGAAGGGTTCAAATGGAAGTGGGACAATACATTTTGTCAAGTCCCAAAGGTGTCCA 100  
ValThrHisProPheLysThrIleGluLeuGlnMetLysLysLysGlyPheLysMetGluValGlyGlnTyrIlePheValLysCysProLysValSer

AGCTGGAGTGGCACCCCTTTTACTGACATCCGCCCTGAGGAAGACTCTTTAGTATCCATATCCGCATCGTTGGGACTGGACAGAGGGGCTGTCAA 110  
LysLeuGluTrpHisProPheThrLeuThrSerAlaProGluGluAspPhePheSerIleHisIleArgIleValGlyAspTrpThrGluGlyLeuPheAsn

TGCTTGTGGCTGTGATAAGCAGGAGTTTCAAGATGCGTGGAACTACCTAAGATAGCGGTTGATGGGCCCTTGGCACTGCCAGTGAAGATGTGTTCAAG 120  
AlaCysGlyCysAspLysGlnGluPheGlnAspAlaTrpLysLeuProLysIleAlaValAspGlyProPheGlyThrAlaSerGluAspValPheSer

TATGAGGTGGTGTGTTAGTGGGAGCAGGATTGGGGTACACCCTTCGCATCCATTCTCAAGTCACTGTTGACAAATATTGCAATAACGCCCAATC 130  
TyrGluValValMetLeuValGlyAlaGlyIleGlyValThrProPheAlaSerIleLeuLysSerValTrpTyrLysTyrCysAsnAsnAlaThrAsn

TGAAGCTCAAAAAGATCTACTTCTACTGGCTGTCCGGGACACACATGCCTTGTAGTGGTTGCAGATCTGCTGCAACTGCTGGAGAGCCAGATGCAGGA 140  
LeuLysLeuLysLysIleTyrPheTyrTrpLeuCysArgAspThrHisAlaPheGluTrpPheAlaAspLeuLeuGlnLeuLeuGluSerGlnMetGlnGlu

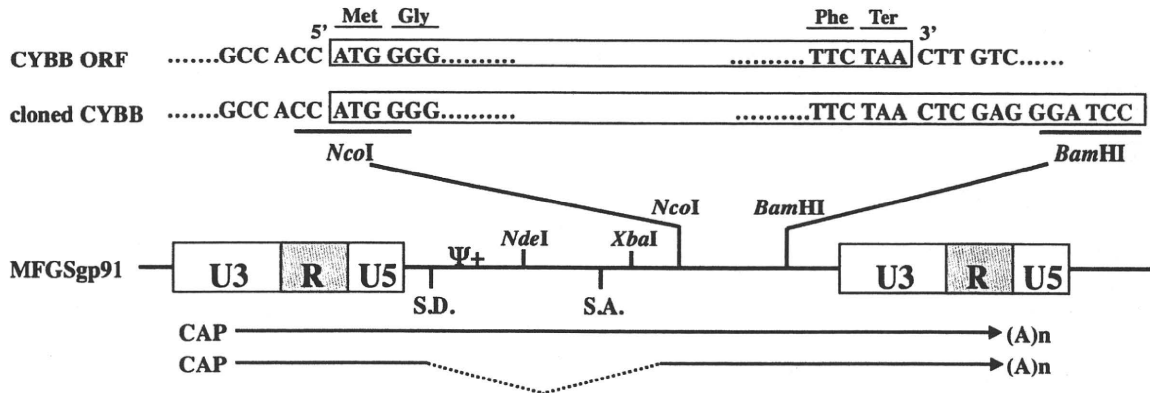
AAGGAACAATGCCGGCTTCTCAGCTACAACATCTACTGCTGGTGGGATGAGTCTCAGGCCAATCACTTTGCTGTGCACCATGATGAGGAGAAAGAT 150  
ArgAsnAsnAlaGlyPheLeuSerTyrAsnIleTyrLeuThrGlyTrpAspGluSerGlnAlaAsnHisPheAlaValHisHisAspGluGluLysAsp

GTGATCACAGGCTGAAACAAAAGACTTTGTATGGACGGCCAACTGGGATAATGAATTCAGACAATTGCAAGTCAACACCCTAATACAGAATAGGAG 160  
ValIleThrGlyLeuLysGlnLysThrLeuTyrGlyArgProAsnTrpAspAsnGluPheLysThrIleAlaSerGlnHisProAsnThrArgIleGly

TTTTCTCTGTGGACCTGAAGCCTTGCTGAAACCCTGAGTAAACAAAGCATCTCAACTCTGAGTCTGGCCCTCGGGAGTGCATTTTCAATTTCAACAA 170  
ValPheLeuCysGlyProGluAlaLeuAlaGluThrLeuSerLysGlnSerIleSerAsnSerGluSerGlyProArgGlyValHisPheIlePheAsnLys

GGAAAACCTCTAA 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<sup>phox</sup> は、p22<sup>phox</sup> 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、菌体成分などの刺激により細胞質内タンパク質の p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、rac と会合して、superoxide anion の産生に関わる酵素の NADPH oxidase を生成する<sup>37</sup>。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。本酵素は酸素分子を直接還元することで superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) を生成し、食胞内へと放出して、さらに強力な活性酸素種 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HClO<sup>-</sup>) が生成され、強力な殺菌作用を発揮する<sup>6</sup>。

## 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

本遺伝子治療臨床研究における標的細胞は、患者由来の末梢血 CD34 陽性細胞である。これは、自己複製能と多分化能 (血球系全ての細胞に分化する能力) を有する細胞で、前処置にて骨髓破壊を行った患者の骨髓造血能を再構築することができる<sup>33</sup>。

本遺伝子治療臨床研究で末梢血 CD34 陽性細胞を標的細胞とする理由は、CYBB 遺伝子を導入した患者 CD34 陽性細胞が、移植により患者骨髓造血を再構築し、結果、正常な顆粒球の末梢血出現を期待するためである。

## 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 CD34 陽性細胞への CYBB 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 9-6-2 の「遺伝子導入方法」の項で示す。

CD34 陽性細胞へ遺伝子を導入するために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、感染後に宿主染色体に挿入される性質を有し、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現するためである。また、他のベクターシステムと比較して CD34 陽性細胞に対して高い遺伝子導入効率を示すことによる<sup>38,39</sup>。

## 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ヒトに対する影響

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、マウスの週令及び系統に関わらず感染するが、ヒトには感染しない。また、発癌遺伝子を持たないが、感染後、長期を経て、感染マウスにリンパ性白血病を発症する<sup>40,41</sup>。

MoMLV のゲノムは 5' LTR (long terminal repeat) - パッケージング ( $\Psi$ ) 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。 $\Psi$  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須な配列であり、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<sup>42</sup>。

### 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、 $\Psi$  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) を削除して作製され、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 自体になされている。本遺伝子治療臨床研究で用いられるウイルスベクターのプラスミド DNA は、レトロウイルスベクター MFGS 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。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 である。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 5 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  $\Psi$  は gag の一部を含んでおり、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型パッケージングシグナル ( $\Psi'$ ) 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をも 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  $\Psi'$  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 retrovirus;

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*-*BamHI* 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、それ自体で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のために使用されるパッケージング細胞株は 293-SPA であり<sup>44,45</sup>、以下にその作製方法を示す。

- ・ 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 と gag-pol 配列を含む pCRIPenv-ベクター、ならびに SV40 early promoter より大腸菌由来 gpt 遺伝子を発現する pSV2gpt 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、マウス両種性 (amphotropic) ウイルス由来 4070A env を発現する pCRIPAMgag-と大腸菌由来ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg) 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 MFGSgp91 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。このウイルス産生細胞株 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。

#### 6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造

MFGSgp91 の概略図を「CYBB 遺伝子の末端配列と MFGgp91 の構造」(21 頁)に、また全塩基配列を別添 5 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、ヒトなどの細胞に感染し、感染宿主域は広範囲である。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、感染細胞で新たなウイルス粒子を形成することはなく、感染細胞から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 Malech 博士らによって樹立され、米国 Magenta 社 (Rockville, MD) が、同博士が所属する National Institute of Allergy and Infectious Diseases との契約に基づき、GMP (Good Manufacturing product) ベクターとして管理・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: MCB) よりワーキングセルバンク (Working Cell Bank: WCB) を作製し、そこから産生したウイルス上清を使用する。

Working Cell Bank からのウイルスベクター産生法は、上記、MCB より 1 バイアルを融解し、Magenta 社内で管理された製造エリアで GMP 準拠のもとで以下のように行われる。

225cm<sup>2</sup> のプラスチックフラスコに 1cm<sup>2</sup> あたり  $8 \times 10^4$  個の細胞を 10% の胎仔牛血清 (FBS) を含む Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMEM) にて播種して培養する ( $1.8 \times 10^7$  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・保存する。

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、国立成育医療研究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 (資料 2 に参照) 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ならびに受け入れ試験において行われる品質検査項目を示す。