

members of eight Japanese A-T families, including three sibling pairs (JPAT4/5, 8/9, and 11/12). The families came from different geographical regions. Clinical descriptions of patients from these families have been reported previously [Morio et al., 2009].

### Short Tandem Repeat (STR) Haplotype Analysis

Standardized STR (short tandem repeat/microsatellite) genotyping for the *ATM* gene region was performed as previously described [Mitui et al., 2003]. Briefly, we used four fluorescently labeled microsatellite markers located within a 1.4 cM region of chromosome 11q22-q23: D11S1819, NS22, D11S2179, and D11S1818. Markers NS22 and D11S2179 are located within the *ATM* gene, in introns 45 and 62, respectively [Udar et al., 1999; Vanagaite et al., 1995]. Allelic sizes were detected with an ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems Inc, Carlsbad, CA) and standardized to a reference sample (CEPH 1347-02).

### Identification of Mutations

Total RNA was isolated from patient-derived T-cell lines using RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA), and cDNA was synthesized using random primers and the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The entire *ATM* coding region was divided into eight overlapping fragments (Regions 1–8) ranging from 1,500 to 1,800 bps [Du et al., 2008]. These regions were PCR amplified and then sequenced using 19 different primers. Mutations on the cDNA level were confirmed in genomic DNA (gDNA) by sequencing relevant exon and intron boundaries. Mutation analysis is based on the same *ATM* reference sequence used for *ATM* mutations in the Leiden Open Variation Database ([www.LOVD.nl/ATM](http://www.LOVD.nl/ATM); NCBI reference sequence:NM\_000051.3).

### Maximum Entropy Scores and Search for Exonic Splicing Enhancers (ESEs)

The strength of the 5' and 3' splice sites (ss) was determined by calculating and comparing the wild-type and mutant 5' and 3' ss using the Maximum Entropy software available at [http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) [Eng et al., 2004; Mitui et al., 2009; Yeo and Burge, 2004]. We scanned for putative binding motifs for serine/arginine-rich (SR) proteins using the ESEfinder software available at <http://rulai.cshl.edu/tools/ESE> [Cartegni et al., 2003; Smith et al., 2006].

### Long-Range PCR and Breakpoint Regions for Genomic Deletions

To amplify large gDNA fragments, 500 ng of gDNA was used as template, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 68°C for 10 min, and extension at 72°C for 15 min using EX Taq polymerase according to the manufacturer's protocol (Takara Bio Inc, Shiga, Japan). Fragments containing large genomic deletions (LGDs) were isolated from agarose gels and sequenced to determine the breakpoints.

### Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

A total of 100 ng of gDNA was used as starting material for the SALSA MLPA P041 and P042 *ATM* kits (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands, [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)) [Schouten et al., 2002]. The P041 probe mix contained probes for 33 of the 65 exons as well as three probes for exon 1. The P042 *ATM* probe mix contained probes for the remaining *ATM* exons. Both probe mixtures also contained

probes for control genes. After hybridization, ligation, and amplification, according to the instructions of the manufacturer, 1  $\mu$ l of PCR product was mixed with 0.2  $\mu$ l of ROX-500 labeled internal size standard, separated on an ABI Prism 3100 Avant automatic sequencer (Applied Biosystems, Norwalk, Connecticut, CA), and analyzed using the GeneScan software ver.3.1. For MLPA data analysis, we used Coffalyser MLPA DAT software developed by MRC-Holland. For each probe, a range from  $1 \pm 0.2$  was considered as a normal exon dosage, while a deletion was determined as being between 0.3 and 0.7.

### Antisense Morpholino Oligonucleotide (AMO) Design and Treatment

A 25-mer antisense morpholino oligonucleotide (AMO) was designed to target the 5' aberrant splice site of a pseudoexon mutation in pre-mRNA of JPAT11/12. The AMO-J11 sequence was: CCTG-GAAAAATACTTACAATTAAAC. AMO748C (ATTCACACACTC-GAATTCGAAAAGTT) and AMO4956GC (CTTGATAACTGCAACAAATTGACA) were designed to target wild-type sequences to determine potential regulatory elements at the site of a mutation(s). AMOs were synthesized by Gene-Tools (Philomath, OR). Treatment of LCLs with AMOs was performed as previously described [Du et al., 2007]. Cells were suspended in 5% FBS/RPMI medium and the AMO was added directly to medium at the concentrations indicated. Endo-Porter (Gene-Tools) was added to the medium to assist in intracellular incorporation of the AMO. Cells were collected after 48 hr for RNA analysis, and after 84 hr for *ATM* protein detection. Vivo-AMO was also used to treat JPAT 11 to enhance cellular delivery (Gene-Tools).

### Irradiation Induced *ATM*-Ser1981 Foci Formation (IRIF)

Immunostaining of nuclear foci of *ATM*-Ser1981 was performed as described [Du et al., 2007, 2009]. In brief, LCLs were first treated with the relevant compounds for 4 days before being irradiated with 2 Gy and then incubated at 37°C for 30 min. Next, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized on cover slips. The cover slips were blocked for 1 hr and incubated with mouse anti-*ATM* pSer1981 for 1 hr (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After a second blocking, cells were stained with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (1:150; Invitrogen) for 1 hr and mounted onto slides.

### Flow Cytometry Analysis of *ATM*-Ser1981 Autophosphorylation (FC-*ATM*-pSer1981)

FC-*ATM*-pSer1981 was used to verify the restoration of Ser1981 autophosphorylation by readthrough compounds (RTCs) [Du et al., 2009; Nahas et al., 2009]. The cells were treated for 4 days with RTCs, resuspended in PBS, and irradiated with 10 Gy. After 1 hr, the cells were fixed and permeabilized using FIX & PERM (Invitrogen). The cells were then incubated with 1  $\mu$ l of mouse *ATM*-s1981 antibody (Cell Signaling Technology) for 2 hr at room temperature. After this time, cells were washed and resuspended in 100- $\mu$ l PBS with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen) for 45 min, and then washed and resuspended in PBS with 0.2% paraformaldehyde, before being analyzed using a FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ).

### Western Blotting

Nuclear extracts were prepared by following the NE-PER protocol (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Proteins were separated

on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Western blots were prepared as described [Du et al., 2007], and probed with anti-ATM (Novus Biologicals, Littleton, CO), -SMC1, or -KAP1 antibodies (Novus Biologicals).

## Results

### Mutation Analysis

We initially screened our A-T patients for two previously reported Japanese mutations, c.4776(IVS33)+2T>A and c.7883\_7887delTTATA [Ejima and Sasaki 1998; Fukao et al., 1998]. Neither of these mutations was detected.

STR genotyping of the *ATM* genomic region was performed for 11 JPAT patients, but since parental gDNAs were unavailable, we could only verify that one patient was homozygous for all markers (JPAT2): [S1819, 131; NS22, 165; S2179, 143; S1818, 162] [Mitui et al., 2003]. As a result, we set out to directly sequence the entire *ATM* coding region after PCR amplifying eight partially overlapping fragments from patients' cDNA [Du et al., 2008]. We identified 12 of the 16 expected mutations (75%) and confirmed them upon sequencing gDNA (Table 1). Only one patient (JPAT2) was homozygous, suggesting that most JPAT patients do not result from consanguineous marriages. The 12 mutations included four frameshifts (counting the homozygous JPAT2 twice), two nonsense, and six splice variants (Table 1). The remaining mutations (4/16; 25%) were four LGDs, which we identified after performing long-range PCR using gDNA as template. Fourteen mutations were novel; two had been previously reported: c.748C>T in JPAT6 [Teraoka et al., 1999] and c.2639-384A>G in JPAT11/12 [Sobek 2001]. All mutations resulted in the absence of ATM protein (Supp. Fig. S1 and data not shown).

### Splicing Mutations

The six splicing mutations identified were analyzed by using Maximum Entropy software (MaxENT) to estimate the strength of the splice sites [Yeo and Burge, 2004] and type of splice defect [Eng et al., 2004]. The mutations found are described below, and diagrams for potential splicing mechanisms are shown in Figure 1.

- (1) c.331+5G>A (IVS6): This mutation changed the MaxENT score of the 5' ss from 9.8 to 3.6. A shorter PCR product compatible with exon 6 skipping was observed at the cDNA level in patient JPAT1 using primers for exons 4 and 7 (Figs. 1 and 2A, lane 3).
- (2) c.748C>T: cDNA from patient JPAT6 showed skipping of exon 9 (Figs. 1 and 2B, lane 5). This allele with substitution c.748C>T predicted an amino acid change from Arg to a stop codon (CGA >TGA). Given that c.748C>T did not affect the scores for consensus splice sites, nor affect an ESE site, we hypothesized that it affected an as yet unknown splicing regulatory element. To test this idea further, we designed an AMO targeting the wild-type sequence at the site of the mutation in order to block the interaction between any regulatory molecule(s) and the wild-type sequence. Wild-type cells treated with increasing concentrations of AMO748C (Fig. 2G) showed skipping of exon 9, supporting idea model that the region around nucleotide 748 most likely contains a regulatory splicing motif.
- (3) c.2639-384A>G (IVS19): The c.2639-384A>G variant in patient JPAT11/12 creates a novel splice acceptor site within IVS19 (Fig. 1), thereby creating a cryptic splice and "pseudo-exon" of 58 bp is created in intron 19 (Fig. 2C, lanes 5 and 6).

**Table 1. Mutations of Eight Japanese Families**

Ex/Int	Patient	cDNA change	Genomic DNA mutation	Consequence
IVS6	JPAT1 <sup>a</sup>	c.186_331del146 (deletes exon 6)	c.331+5G>A (5' ss 9.81>3.58)	Aberrant splicing (IV)
7	JPAT6 <sup>a</sup>	c.397_398insT	c.397_398insT	Frameshift
9	JPAT6 <sup>b</sup>	c.663_901del239 (deletes exon 9)	c.748C>T (R>X)	Aberrant splicing (III)
10	JPAT8/9 <sup>a</sup>	c.902_1065del164 (deletes exon 10)	c.902-19_1065+869del1052	Large genomic deletion
IVS19	JPAT11/12 <sup>a</sup>	c.2639_2640ins58	c.2639-384A>G (5' ss 0.36>8.54)	Aberrant splicing (II)
IVS19	JPAT3 <sup>a</sup>	c.2639_2838del200 (deletes exon 20)	c.2639-19_2639-7del13 (3' ss 8.8>3.4)	Aberrant splicing (IV)
20	JPAT8/9 <sup>b</sup>	c.2877C>G	c.2877C>G (Y>X)	Nonsense (TAG)
35	JPAT4/5 <sup>a</sup>	c.4910_5005del96 (deletes exon 35)	c.4956G>C>TT (IQ>FX)	Aberrant splicing (III)
38	JPAT1 <sup>b</sup>	c.5415G>A	c.5415G>A (W>X)	Nonsense (TGA)
IVS48	JPAT11/12 <sup>b</sup>	c.6808_7515del708 (deletes ex 49-52)	c.6807+272_7516-275del5350	Large genomic deletion
55	JPAT4/5 <sup>b</sup>	c.7925_7926del2(GA)	c.7925delGA	Frameshift
60	JPAT10 <sup>a</sup>	c.8419_8584del166 (deletes exon 60)	c.8419-643_8507del732	Large genomic deletion
61	JPAT10 <sup>b</sup>	c.8585_8671del87 (deletes exon 61)	c.8585-1G>C (5' ss 10.2>2.0)	Aberrant splicing (IV)
61	JPAT2 <sup>b</sup>	c.8624delA	c.8624delA	Frameshift
IVS63	JPAT3 <sup>b</sup>	c.8851_9697del847	c.8852-2kdel17kb (CRAT [B] mutation?)	Large genomic deletion

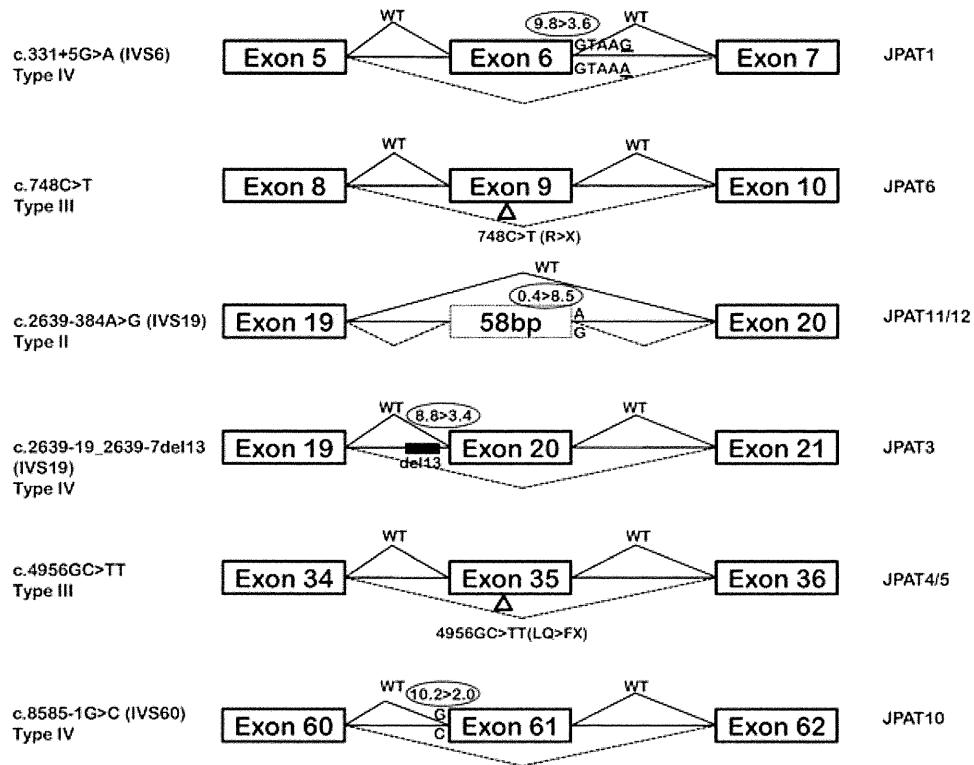
Bolded mutations have not been reported previously.

<sup>a</sup>First allele.

<sup>b</sup>Second allele.

<sup>c</sup>Homozygote.

Nucleotide numbering is based on +1 being the A of the first translation start codon in exon 4 (NCBI reference sequence: NM\_000051.3).



**Figure 1.** *ATM* splicing mutations. Genomic mutations causing splicing mutations were analyzed for changes in splicing scores calculated by Max ENT. Classification of splicing mutations is reported accordingly to Eng et al. [2004]. See text for additional details.

This results in a frameshift and a predicted secondary premature stop codon.

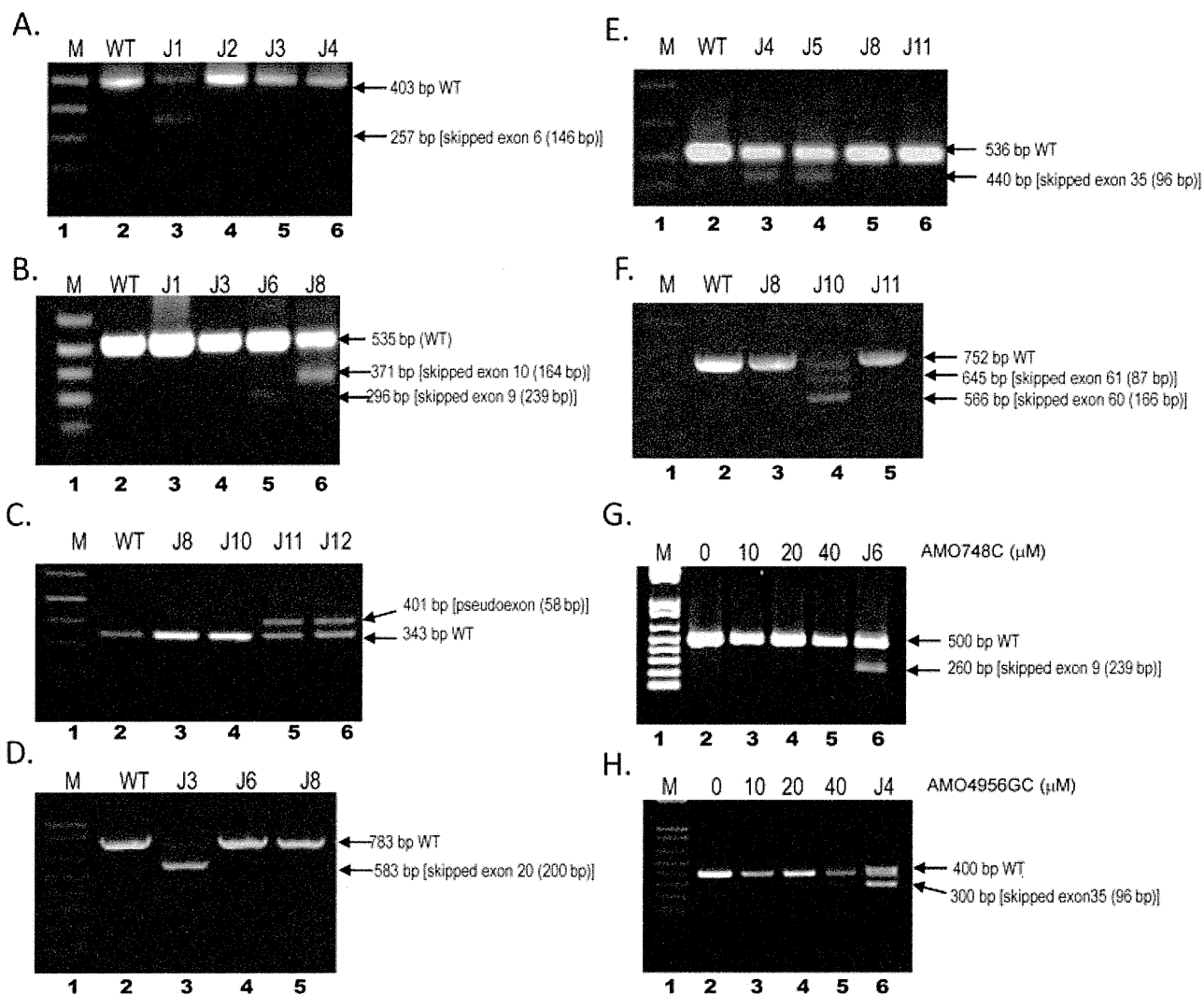
- (4) c.2639-19\_2639-7del13 (IVS19): In Figure 2D (lane 3), the PCR products from JPAT3 cDNA showed a normal and an additional prominent lower band (783 bp and 583 bp, respectively). Sequencing of the 583-bp band revealed skipping of exon 20. gDNA sequencing identified a 13 nt deletion in intron 19 at position c.2639-19\_2639-7. The 3' MaxENT score changed from 8.8 to 3.4 (Fig. 1).
- (5) c.4956GC>TT: In family JPAT4/5, we identified a c.4956GC>TT substitution within exon 35 (p.LQ1652\_1653FX) that leads to skipping of exon 35 without affecting an ESE or canonical splice sites (Figs. 1 and 2E, lanes 3 and 4). Exposing wild-type LCLs to increasing concentrations of AMO4956GC, targeting the mutation site, revealed skipping of exon 35 (Fig. 2H); these results suggest that nucleotide 4956 is part of a regulatory protein binding site, which when disrupted influences the aberrant splicing observed in JPAT4/5.
- (6) c.8585-1G>C (IVS60): JPAT10 harbors the IVS60-1G>C mutation that changed the MaxENT score of the 3' ss from 10.2 to 2.0, resulting in a skipping of the exon 61 (Fig. 2F, lane 4). Interestingly, the second allele of this patient was a splicing mutation that is predicted to result in exon 60 skipping (Fig. 2F, lane 4). We sequenced gDNA for exons 59–62 but failed to find a mutation that would account for the skipping of exon 60 (however, see additional results on JPAT10 below).

### Large Genomic Deletions (LGDs)

- (1) c.902-19\_1065+869del1052 (del ex10): Two siblings (JPAT8/9) yielded an abnormal 369-bp fragment when cDNA

was amplified from exon 9 to 11 (Fig. 3A, cDNA gel, lanes 3 and 4). When this band was isolated and sequenced, we found a deletion of exon 10. No mutation was observed in exons 9–11, ruling out a conventional splicing mutation. Using long-range PCR to amplify the genomic region from exon 9 to 11, we obtained a 3.3 kb fragment (Fig. 3A, gDNA gel lanes 3 and 4), whose sequence revealed a 1,052-bp deletion from IVS9-19 to IVS10+869; this deletion included exon 10 (164 bp).

- (2) c.6807+272\_7516-275del5350 (del ex49-52): Two siblings (JPAT11/12) showed an abnormal PCR fragment of 1.1 kb when cDNA was amplified from exon 48 to 53 (Fig. 3B, cDNA gel). The sequence of the PCR product showed a deletion of exons 49–52. A long-range PCR performed on gDNA using primers for exons 48 and 53 produced a 1.1 kb band instead of the expected 6.4 kb (Fig. 3B, left). Sequencing of the 1.1 kb band revealed a 5,350-bp genomic deletion that starts in intron 48 and ends in intron 52.
- (3) c.8419-643\_8507del732 (del ex 60): In patient JPAT10, we suspected that skipping of exon 60 might reflect an LGD. We amplified the gDNA surrounding exons 59–61 and found a 732-bp genomic deletion extending from IVS59-643 to nucleotide 89 of exon 60 (Fig. 3C).
- (4) c.8851-2kdel17kb (del ex64-65): When mutation screening failed to identify a second pathogenic mutation in JPAT3, we were prompted to search for an LGD mutation with Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). We observed a significant decrease in peak height for the final exons 64 and 65, indicative of a deletion carried in heterozygous state (Fig. 4A). Previous studies have demonstrated two LINE-1 sequences between IVS63 and downstream of exon 65, as well as a 17 kb genomic deletion in the *ATM* gene of A-T patients



**Figure 2.** Effect of splicing mutations on cDNA. Agarose gel images of PCR products showed aberrant spliced products. Patient cDNA were used as templates for PCR amplifications in the regions displaying splicing mutations. M (lane 1) is 1 kb plus ladder (Invitrogen), wild-type cDNA was used as control (lane 2). **(A)** Skipped exon 6 in JPAT1 (lane 3). **(B)** Skipped exon 9 in JPAT6 (lane 5) and skipped exon 10 in JPAT8 (lane 6). **(C)** Pseudoexon of JPAT11 and JPAT12 (lanes 5 and 6). **(D)** Skipped exon 20 in JPAT3 (lane 3). **(E)** Skipped exon 35 in JPAT4 and JPAT5 (lanes 3 and 4). **(F)** Skipped exons 60 and 61 in JPAT10 (lane 4). **(G)** AMO-treated wild-type lymphoblastoid cell line (LCL) produced alternative spliced product that skipped exon 9. JPAT6, carrying the c.748C>T mutation, showed a skipped exon 9 product (lane 6), **(H)** AMO 4956GC treated wild-type LCL produced alternative spliced product that skipped exon 35. JPAT4 that has 4956GC>TT mutation showing skipped exon 35 products as a control (lane 6). See text for additional details.

with Costa Rican, Dutch, and Brazilian backgrounds [Broeks et al., 1998; Coutinho et al., 2004; Mitui et al., 2003; Telatar et al., 1998b].

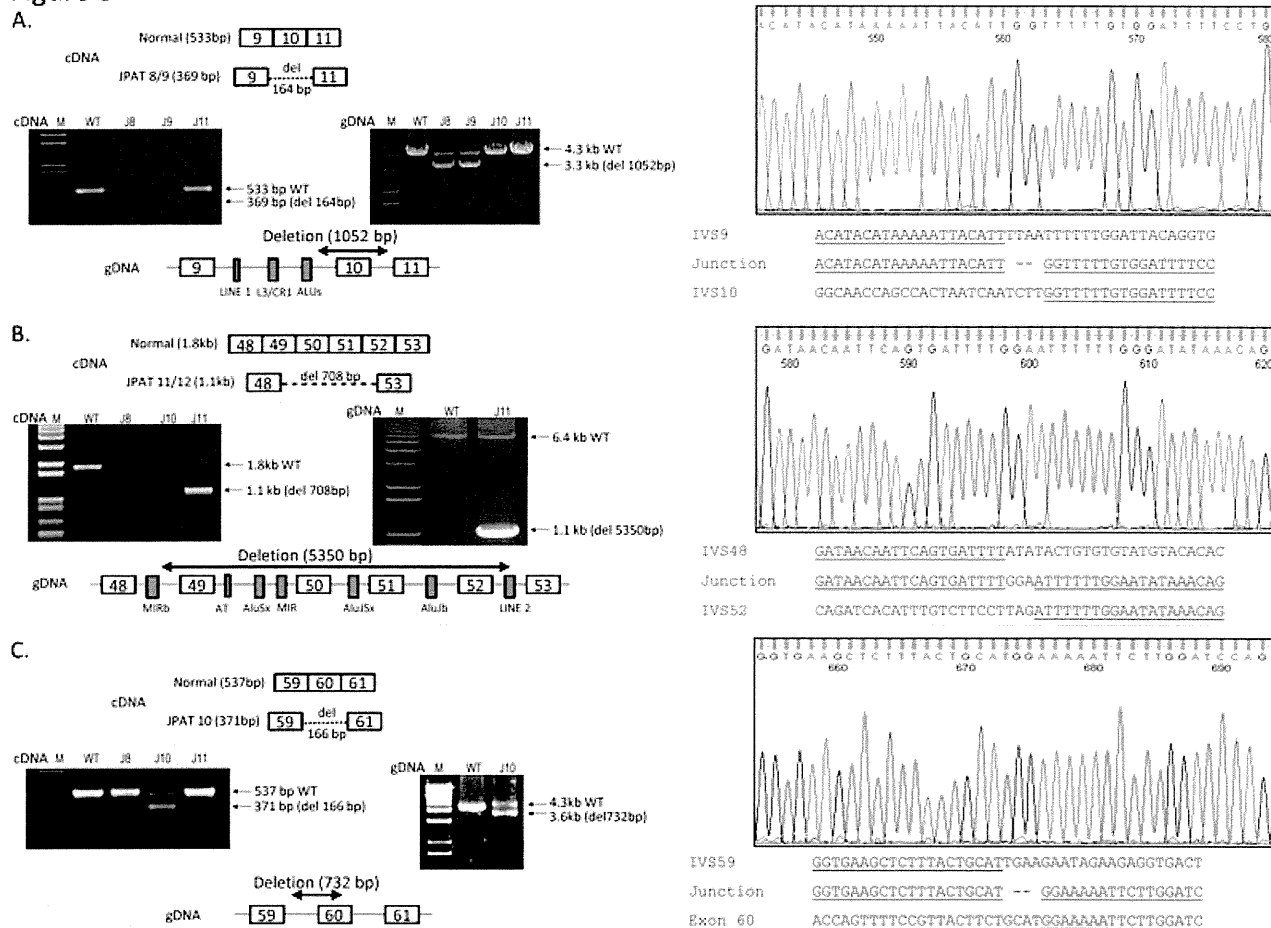
Figure 4B summarizes the locations of primers, LINE-1 sequences, and an LGD for this region.

We used two sets of primers: Primer set #1 (P1Fw and P4Rev) was 23 kb apart, flanking the 17 kb deletion. Because of the nature of our PCR conditions, no PCR product was anticipated from the wild-type allele, while the mutant allele should yield a 6 kb fragment. Primer set #2 (P2Fw and P3Rev) was placed within the 17 kb deletion, which should have produced a 2.4 kb fragment from only the wild-type allele [Telatar et al., 1998b]. Figure 4B (lane 2) shows that wild-type gDNA produced the 2.4 kb fragment, while CRAT [B] (a Costa Rican patient homozygous for a 17 kb deletion) produced the 6 kb fragment (lane 4). A CRAT [B] heterozygote

produced both the 2.4 kb fragment and the 6 kb product from the deletion (Fig. 4B, lane 5). The CRAT [B] band pattern was also observed in the gDNA of JPAT3, suggesting the presence of an LGD between two LINE-1 sequences (Fig. 4B, lane 3). Available breakpoints and surrounding sequences were analyzed using Repeat Masker software to search for flanking repetitive elements [Babushok and Kazazian, 2007; Kazazian and Goodier, 2002; Telatar et al., 1998b] (see Fig. 3). Because the breakpoint was in a highly homologous repeat sequence, the ends could not be accurately determined. The other Japanese patient (JPAT8) who did not have a deletion in this region showed a pattern identical to the wild type (Fig. 4B, lane 6).

The STR haplotypes for JPAT3, CRAT [B], and BRAT3 differed. JPAT3: S1819 [131,133]; NS22 [173,175]; S2179 [137,137]; S1818 [160,168]; CRAT [B]: S1819 [131]; NS22 [171]; S2179 [141]; S1818 [160] [Mitui et al., 2003]; BRAT 3: S1819 [133]; NS22 [155]; S2179

**Figure 3**



**Figure 3.** Large genomic deletions (LGDs). **(A)** Schematic representation of cDNA showing deletion of exon 10 and agarose gel image of PCR products (using primers GFw and GRev) (left): Lane 1 is 1 kb plus ladder (Invitrogen), lane 2 is wild-type control, lane 3 (JPAT8) and lane 4 (JPAT9) showing deletion of exon 10, lane 5 is JPAT control. Agarose gel image (right) for genomic DNA (gDNA) PCR products (using primers EX9Fw and EX11Rev) showing deletion of 1 kb in JPAT8/9. Schematic representation of DNA shows LGD, as well as repetitive elements within the region (at bottom). Sequence data with junction sequences are shown on right. **(B)** Schematic representation of cDNA change in JPAT11/12 between exon 48 and exon 53, which are analyzed by PCR (using primers FATFw and FATRev). Agarose gel image (left) for cDNA shows aberrant spliced products of JPAT11 (lane 5). Lane 1 is 1 kb plus ladder, lane 2 is wild-type, lanes 3 and 4 are JPAT control. Agarose gel image (right) for gDNA shows deletion of 5.3 kb (using EX Taq polymerase with LREX48Fw and LREX53Rev primers). Schematic representation of gDNA (at bottom) shows large deletion. Sequence data with junction sequences are shown on right. **(C)** Schematic representation of JPAT10 cDNA shows deletion of exon 60. Agarose gel image (left) shows aberrant spliced products. Agarose gel image (right) for gDNA PCR products (using primers EX59Fw and EX61Rev) show reduced size in JPAT10 (3.6 kb) compared to wild type (4.3 kb) and schematic representation of gDNA showing deletion at c.8269-643del732, which includes the first 89 bp of exon 60. Sequences are shown at right.

[147]; S1818 [146] [Mitui et al., 2003]. These results suggested that the c.8851-2kdel17kb mutations in the three patients were not ancestrally related.

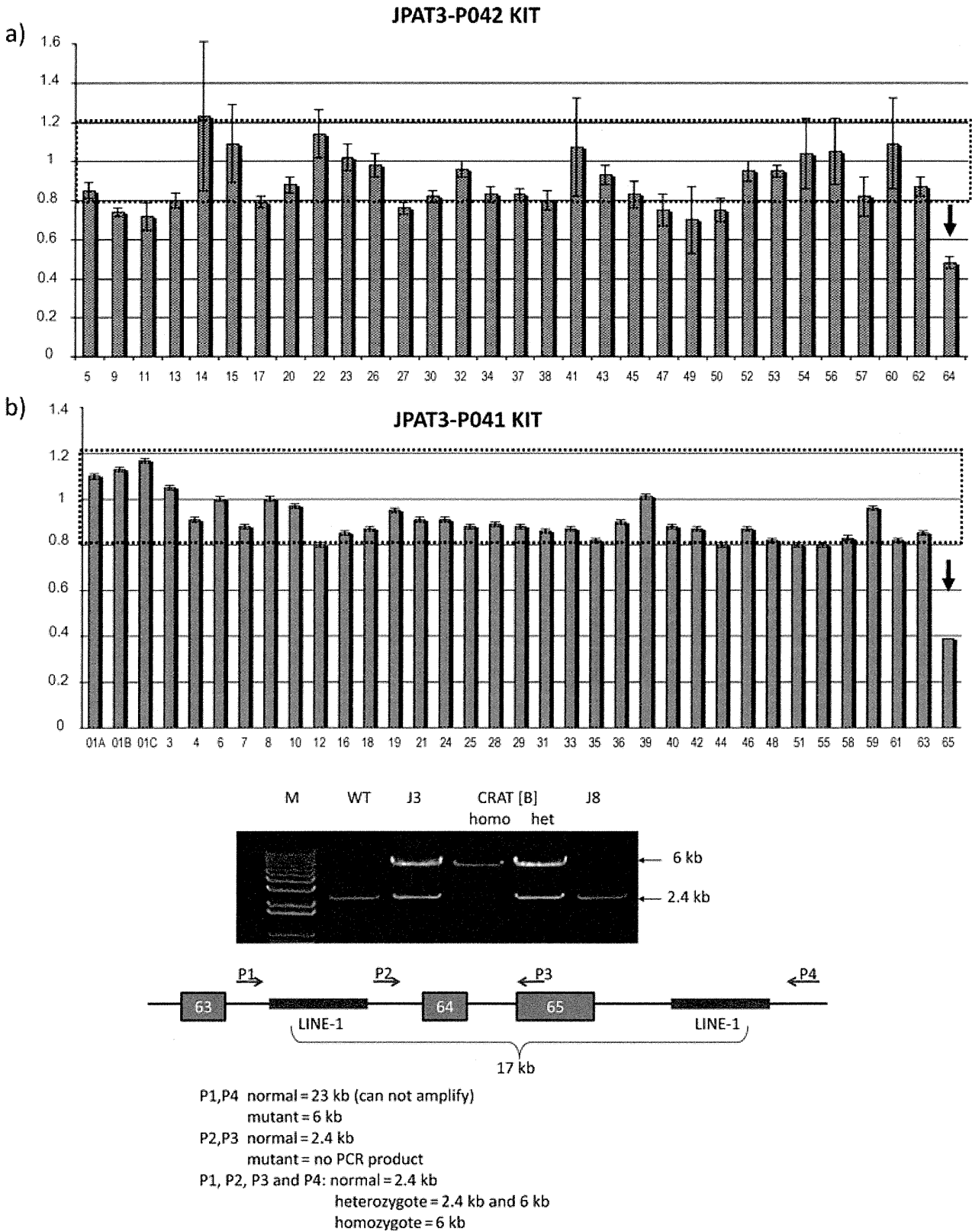
### Correction of Type II Pseudoexon Splicing Mutation using an AMO

In family JPAT11/12, we identified a type II splicing mutation [Eng et al., 2004] c.2639-384A>G, which created a cryptic acceptor splice site resulting in the inclusion of 58 bp of intronic sequence (Figs. 2C and 5A). We designed AMO-J11 to target the cryptic 5' splice site (Fig. 5A) [Du et al., 2007; Eng et al., 2004]. The LCL of JPAT11 was treated with AMO-J11 for 4 days followed by RT-PCR analysis. Mutant splicing was almost completely abrogated in an AMO dose-dependent manner and normal transcript was restored (Fig. 5B). Nuclear extracts from treated JPAT11 cells also showed a

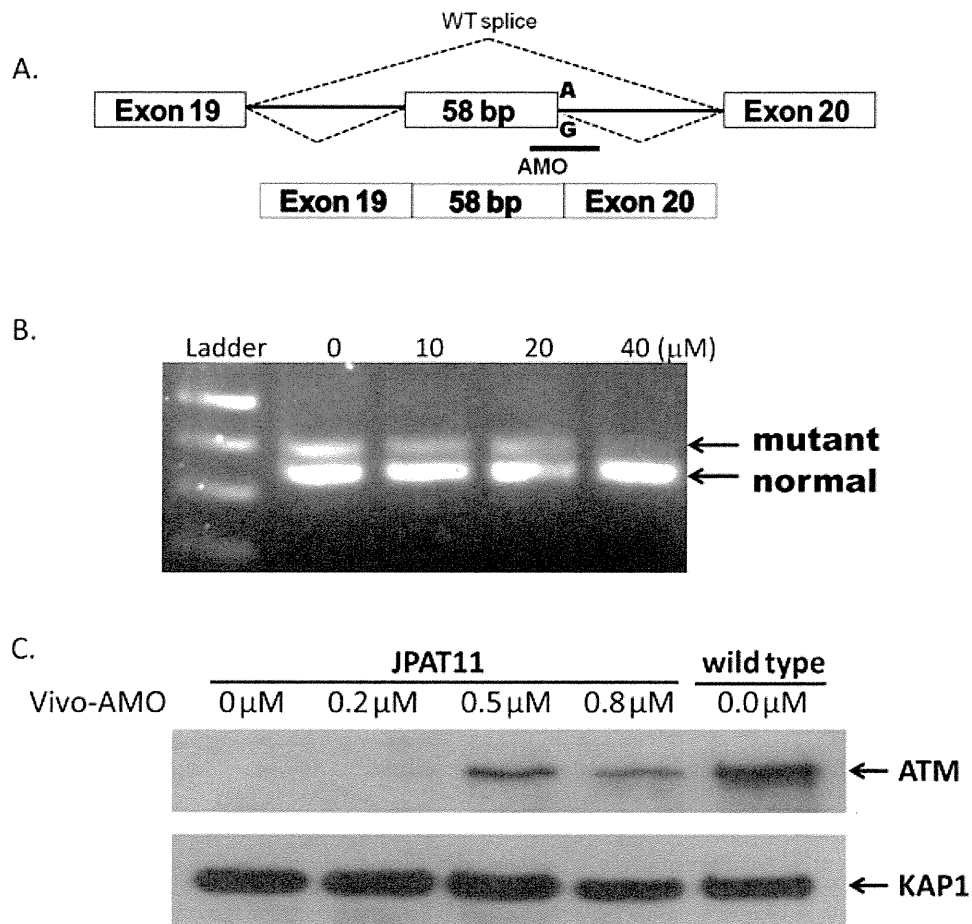
full-length ATM protein (data not shown). In order to enhance the delivery and efficiency of the AMO, we also designed a structurally modified AMO referred as “Vivo-AMO” [Morcos et al., 2008; Moulton and Jiang, 2009]. Notably, a significant amount of functional ATM protein was induced by 0.5  $\mu$ M Vivo AMO-J11 (Fig. 5C). However, “Vivo-AMO” started to show possible cytotoxicity at 0.8  $\mu$ M (Fig. 5C, lane 4).

### Correction of Nonsense Mutation in JPAT8 using RTCs

The JPAT8/9 siblings lack ATM protein because they carry an LGD and a nonsense mutation (c.2877C>G, p.Tyr959X). Functional ATM protein is inducible with compounds that readthrough premature termination codons [Du et al., 2009] even when the LCL carries the nonsense mutation in a heterozygous state [Lai et al., 2004]. We treated JPAT8 LCL with the readthrough compound RTC13 for 4



**Figure 4.** Analysis of LGD in patient JPAT3. **(A)** Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) analysis using MLPA P041 **(A)** and P042 **(B)** kits. For each of the two analyses normalized peak area histograms of JPAT3 are shown. The dotted lines indicate the normal exon dosages between 0.8 and 1.2. The heavy black arrows indicate the exon probes of decreased signal, corresponding to the genomic deletion of exons 64 and 65. **(B)** PCR products depicting a LGD between two LINE-1 sequences. Lane 1 is 1 kb plus ladder, lane 2 is wild-type control, lane 3 is JPAT3, lane 4 is homozygous CRAT [B] patient with a very similar mutation, lane 5 is a heterozygous individual with CRAT [B] mutation, lane 6 is JPAT8. Schematic diagram (below) shows the relative locations for four different primers at the region of the LGD.



**Figure 5.** Correction of a splicing mutation in JPAT11 using AMO-J11. **(A)** Schematic representation of inclusion of pseudoexon (type II) and location of designed AMO. **(B)** JPAT11 cells were treated with 0, 10, 20, and 40  $\mu\text{M}$  AMO for 4 days and RNAs were isolated and analyzed for corrected splicing products. **(C)** JPAT11 cells were treated with 0.2, 0.5, and 0.8  $\mu\text{M}$  of Vivo-AMO-J11 for 4 days and nuclear lysates were isolated for western blotting. KAP1 antibody was used as a loading control.

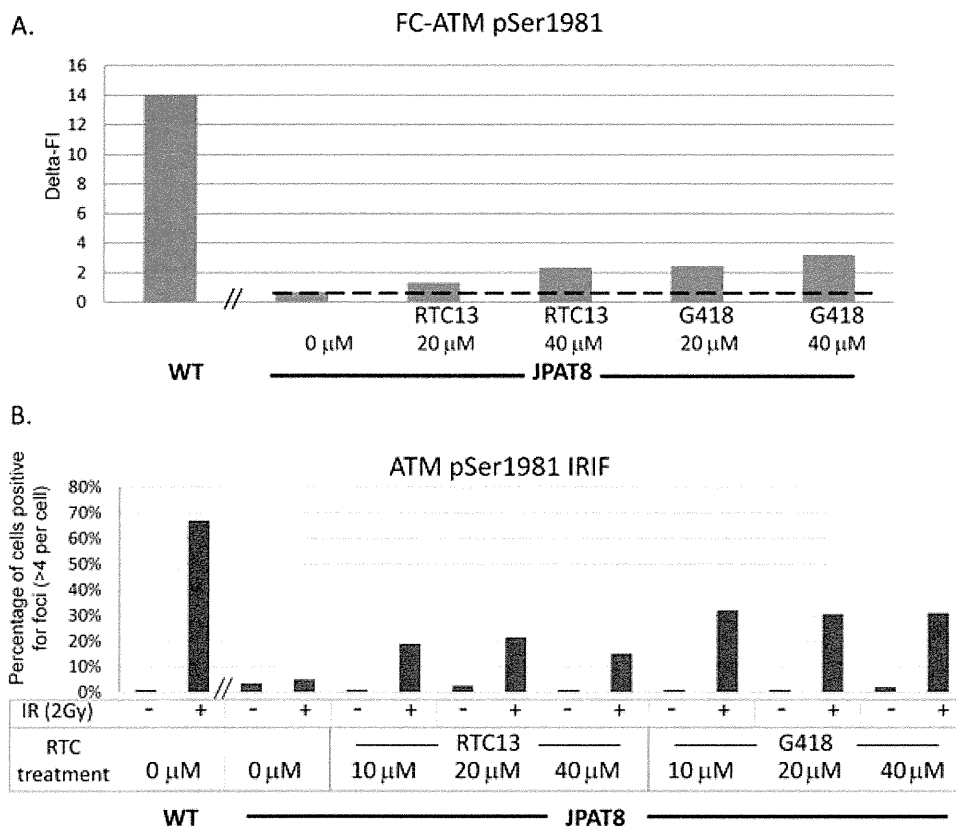
days, and measured ATM autophosphorylation after DNA damage induced by IR. An aminoglycoside RTC, G418, served as a positive control. Both G418 and RTC13 successfully induced ATMpSer1981 autophosphorylation as shown by (A) FC-ATMpSer1981 and (B) IRIF ATMpSer1981 assays (Fig. 6), thereby demonstrating a potential therapeutic approach for these siblings, despite the presence of a nonsense mutation in only one allele.

## Discussion

Whereas a high (0.5%) coefficient of inbreeding had been recorded for the Japanese population [Pattison, 2004], the *ATM* mutation spectrum identified in our JPAT patient cohort included almost no homozygous mutations and no founder mutations. The c.4776+2T>A and c.7883\_7887del5 mutations reported by Ejima and Sasaki [1998] and Fukao et al. [1998] were not observed. In fact, all mutations detected in the JPAT families—four frameshift, two nonsense, four LGDs, and six affecting splicing—were new except for a previously identified c.748C>T splicing mutation in an Irish-American family [Teraoka et al., 1999] and the c.2639-384A>G mutation [Sobeck, 2001]. It is noteworthy that only three of the six splicing mutations involved canonical sites (c.331+5G>A, c.2639-19\_2639-7del13, c.8585-1G>C). In the other mutations: (1)

c.748C>T (exon 9) and 4956GC>TT (exon 35) presented as nonsense mutations in gDNA, but at the cDNA level caused skipping of the exon in which they were located; and (2) JPAT11/12 had a deep-intronic mutation (c.2639-384A>G) in intron 19 that seemed to activate a cryptic acceptor splice site resulting in the insertion of a 58-bp pseudoexon in the transcript (Figs. 1, 2C, and 5).

Nonsense mutations frequently alter the splicing of the exon containing them, an observation that has been termed nonsense-associated altered splicing (NAS) [Valentine, 1998]. In most cases of NAS, the mutation disrupts an ESE critical for exon inclusion [Liu et al., 2001]. AMOs usually act by covering/masking a mutated site in the pre-mRNA, but cannot be used to correct splicing mutations at canonical sites. Thus, AMOs are most effective in correcting type II and IV splice mutations [Eng et al., 2004]. Most relevant here, AMOs can be applied to the functional analysis of *ATM* mutations. By using AMOs designed to bind the wild-type exon 9 and exon 35 sequences located around the mutation sites, we were able to induce alternative splicing (Fig. 2G and H). These results suggest that unknown regulatory elements are probably located near or at the sites of the mutation and are necessary for modulating normal splicing events in these exons. Furthermore, as described earlier, the deep-intronic mutation (c.2639-384A>G) in intron 19 is among the most attractive candidates for AMO therapy (Fig. 5) [Du et al., 2007].



**Figure 6.** Readthrough compounds (RTCs) restored ATMpSer1981 autophosphorylation in JPAT8 LCL with a nonsense mutation. Cells were treated with readthrough compounds RTC13 and G418 for 4 days and then analyzed for ATMpSer1981. **(A)** ATMpSer1981 autophosphorylation level measured by FC-ATMpSer1981. Delta FI (fluorescence intensity) reflects the difference in FI between nonirradiated and irradiated cells. The data represent one of three independent experiments and results were consistent. **(B)** ATMpSer1981 foci formation by IRIF assay. The data are an average of two independent experiments.

LGDs and duplications within the *ATM* gene account for approximately 2% of reported mutations [Cavaliere et al., 2006, 2008; Coutinho, et al., 2004; Ejima and Sasaki, 1998; Gilad et al., 1996b; Mitui et al., 2003; Telatar et al., 1998b]. Few LGDs have been found in a homozygous state in A-T patients [Mitui et al., 2003]. The recent introduction of the MLPA technique has greatly improved the detection of genomic rearrangement mutations, including LGD and duplications in the *ATM* gene [Cavaliere et al., 2008].

Using MLPA, we identified the c.8851-2kdel17kb mutation in JPAT3. While it was possible that this LGD mutation was ancestrally related to the previously reported CRAT [B] [Telatar et al., 1998a] and BRAT3 [Mitui et al., 2003] mutations, this now seems unlikely, since all three alleles are carried on different STR haplotypes. Given that homology between repetitive sequences is thought to underlie the formation of some genomic deletions and duplications [Kazazian and Goodier, 2002; Telatar et al., 1998a], we carried out an in silico analysis of DNA sequences flanking genomic deletions and were able to identify several repetitive sequences. The presence of microhomology (GGA in JPAT11) suggests that the recently described microhomology-mediated break-induced replication FoS-TeS/MMBIR mechanism could be responsible for generating these deletions [Hastings et al., 2009].

Readthrough of PTCs was first described almost 50 years ago when it was noticed that certain aminoglycosides, such as streptomycin and gentamicin, "suppressed" the mutated phenotype of auxotrophy in strains of *Escherichia coli* suggesting that the drug interfered with accurate translation of the RNA code into protein

[Davies et al., 1965]. Later, crystallography studies elegantly demonstrated that aminoglycosides bind to the internal loop of helix 44 (the decoding site) of the 16 S ribosomal RNA [Dibrov et al., 2010; Lynch et al., 2003]. More recently, we identified two new nonaminoglycoside small molecules with readthrough activity on both *ATM* and *dystrophin* genes [Du et al., 2009].

Based on the mutation spectrum of *ATM*, it is estimated that approximately 30% of *ATM* mutations in A-T patients are potentially treatable by mutation-targeted therapy using either RTCs or AMOs. This includes A-T patients who are compound heterozygotes, since RTCs and AMOs restore significant amounts of ATM protein even when only one allele is targeted. We identified three such examples amongst the eight Japanese families. In fact, in vitro, we were able to correct (1) abnormal splicing for JPAT11/12 (Fig. 5A), using a custom-designed AMO to mask the cryptic splice site created by the pseudoexon mutation (c.2639-384A>G); (2) a nonsense mutation in cells from JPAT8/9 using RTCs (Fig. 6). Thus, our results demonstrate that mutation-targeted treatment of cells carrying poorly understood DNA variants can extend our understanding of the consequences of such changes and may also have important therapeutic potential.

#### Acknowledgments

S.C. received a fellowship from "Associazione Gli Amici di Valentina." We thank Drs. Shareef Nahas, Hailiang Hu, and Mark Ambrose for helpful discussions.



## References

- Babushok DV, Kazazian HH, Jr. 2007. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* 28:527–539.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499–506.
- Birrell GW, Kneebone K, Nefedov M, Nefedova E, Jartsev MN, Mitsui M, Gatti RA, Lavin MF. 2005. ATM mutations, haplotype analysis, and immunological status of Russian patients with ataxia telangiectasia. *Hum Mutat* 25:593–601.
- Boder E, Sedgwick RP. 1958. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 21:526–554.
- Bolderson E, Richard DJ, Zhou BB, Khanna KK. 2009. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res* 15:6314–6320.
- Broeks A, de Klein A, Floore AN, Muijtens M, Kleijer WJ, Jaspers NG, van 't Veer LJ. 1998. ATM germline mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population. *Hum Mutat* 12:330–337.
- Campbell C, Mitui M, Eng L, Coutinho G, Thorstenson Y, Gatti RA. 2003. ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects. *Hum Mutat* 21:80–85.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568–3571.
- Cavalieri S, Funaro A, Pappi P, Migone N, Gatti RA, Brusco A. 2008. Large genomic mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20. *Ann Hum Genet* 72(Pt 1):10–18.
- Cavalieri S, Funaro A, Porcedda P, Turinetto V, Migone N, Gatti RA, Brusco A. 2006. ATM mutations in Italian families with ataxia telangiectasia include two distinct large genomic deletions. *Hum Mutat* 27:1061–1070.
- Coutinho G, Mitui M, Campbell C, Costa Carvalho BT, Nahas S, Sun X, Huo Y, Lai CH, Thorstenson Y, Tanouye R, Raskin S, Kim CA, Llerena J Jr, Gatti RA. 2004. Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: seven new mutations. *Am J Med Genet A* 126:33–40.
- Davies J, Gorini L, Davis BD. 1965. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1:93–106.
- Dibrov SM, Parsons J, Hermann T. 2010. A model for the study of ligand binding to the ribosomal RNA helix h44. *Nucleic Acids Res* 38:4458–4465.
- Du L, Damoiseaux R, Nahas S, Gao K, Hu H, Pollard JM, Goldstine J, Jung ME, Henning SM, Bertoni C, Gatti RA. 2009. Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J Exp Med* 206:2285–2297.
- Du L, Kayali R, Bertoni C, Fike F, Hu H, Iversen PL, Gatti RA. 2011. Arginine-rich cell-penetrating peptide dramatically enhances AMO-mediated ATM aberrant splicing correction and enables delivery to brain and cerebellum. *Hum Mol Genet* 20:3151–3160.
- Du L, Lai CH, Concannon P, Gatti RA. 2008. Rapid screen for truncating ATM mutations by PTT-ELISA. *Mutat Res* 640:139–144.
- Du L, Pollard JM, Gatti RA. 2007. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6007–6012.
- Ejima Y, Sasaki MS. 1998. Mutations of the ATM gene detected in Japanese ataxia-telangiectasia patients: possible preponderance of the two founder mutations 4612del165 and 7883del5. *Hum Genet* 102:403–408.
- Eng L, Coutinho G, Nahas S, Yeo G, Tanouye R, Babaei M, Dork T, Burge C, Gatti RA. 2004. Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM Gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths. *Hum Mutat* 23:67–76.
- Fukao T, Song XQ, Yoshida T, Tashita H, Kaneko H, Teramoto T, Inoue R, Katamura K, Mayumi M, Hiratani M and others. 1998. Ataxia-telangiectasia in the Japanese population: identification of R1917X, W2491R, R2909G, IVS33+2T→A, and 7883del5, the latter two being relatively common mutations. *Hum Mutat* 12:338–343.
- Gatti RA. 2001. Ataxia-telangiectasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Edition 8. New York: McGraw-Hill 677–704.
- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charnley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K and others. 1988. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22–23. *Nature* 336:577–580.
- Gilad S, Bar-Shira A, Harnik R, Shkedy D, Ziv Y, Khosravi R, Brown K, Vanagaite L, Xu G, Frydman M, and others. 1996a. Ataxia-telangiectasia: founder effect among north African Jews. *Hum Mol Genet* 5:2033–2037.
- Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, Uziel T, Ziv Y, Savitsky K, Rotman G, Smith S, Chessa L, Jorgensen TJ and others. 1996b. Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 5:433–439.
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 5:e1000327.
- Kazazian HH, Jr., Goodier JL. 2002. LINE drive. Retrotransposition and genome instability. *Cell* 110:277–280.
- Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF. 2006. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* 25:3504–3514.
- Laake K, Telatar M, Geitvik GA, Hansen RO, Heiberg A, Andresen AM, Gatti R, Borresen-Dale AL. 1998. Identical mutation in 55% of the ATM alleles in 11 Norwegian AT families: evidence for a founder effect. *Eur J Hum Genet* 6:235–244.
- Lai CH, Chun HH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA. 2004. Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15676–15681.
- Lange E, Borresen AL, Chen X, Chessa L, Chiplunkar S, Concannon P, Dandekar S, Gerken S, Lange K, Liang T and others. 1995. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to an approximately 500-kb interval on chromosome 11q23.1: linkage analysis of 176 families by an international consortium. *Am J Hum Genet* 57:112–119.
- Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR. 2001. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 27:55–58.
- Lynch SR, Gonzalez RL, Puglisi JD. 2003. Comparison of X-ray crystal structure of the 30S subunit-antibiotic complex with NMR structure of decoding site oligonucleotide-paromomycin complex. *Structure* 11:43–53.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y and others. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160–1166.
- McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR. 1996. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 59:320–330.
- Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T and others. 2006. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25:745–755.
- Mitui M, Bernatowska E, Pietrucha B, Piotrowska-Jastrzebska J, Eng L, Nahas S, Teraoka S, Sholty G, Purayidom A, Concannon P and others. 2005. ATM gene founder haplotypes and associated mutations in Polish families with ataxia-telangiectasia. *Ann Hum Genet* 69(Pt 6):657–664.
- Mitui M, Campbell C, Coutinho G, Sun X, Lai CH, Thorstenson Y, Castellvi-Bel S, Fernandez L, Monros E, Carvalho BT and others. 2003. Independent mutational events are rare in the ATM gene: haplotype prescreening enhances mutation detection rate. *Hum Mutat* 22:43–50.
- Mitui M, Nahas SA, Du LT, Yang Z, Lai CH, Nakamura K, Arroyo S, Scott S, Purayidom A, Concannon P and others. 2009. Functional and computational assessment of missense variants in the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene: mutations with increased cancer risk. *Hum Mutat* 30:12–21.
- Morcos PA, Li Y, Jiang S. 2008. Vivo-Morpholinos: a non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *Biotechniques* 45:613–614, 616, 618 passim.
- Morio T, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K and others. 2009. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int J Hematol* 90:455–462.
- Moulton JD, Jiang S. 2009. Gene knockdowns in adult animals: PPMOs and vivo-morpholinos. *Molecules* 14:1304–1323.
- Nahas SA, Butch AW, Du L, Gatti RA. 2009. Rapid flow cytometry-based structural maintenance of chromosomes 1 (SMC1) phosphorylation assay for identification of ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 55:463–472.
- Pattison JE. 2004. A comparison of inbreeding rates in India, Japan, Europe and China. *HOMO—J Comp Hum Biol* 55:113–128.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S and others. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749–1753.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.
- Shiloh Y. 2006. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31:402–410.
- Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 15:2490–2508.
- Sobeck A. 2001. Caretaker-Gen-Syndrom: Molekulargenetische und Funktionelle Studien. PhD Thesis, Wuerzburg: Julius-Maximilians-University Wuerzburg.
- Svedmyr EA, Leibold W, Gatti RA. 1975. Possible use of established cell lines for MLR locus typing. *Tissue Antigens* 5:186–195.

- Telatar M, Teraoka S, Wang Z, Chun HH, Liang T, Castellvi-Bel S, Udar N, Borresen-Dale AL, Chessa L, Bernatowska-Matuszkiewicz E and others. 1998a. Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet* 62:86–97.
- Telatar M, Wang S, Castellvi-Bel S, Tai LQ, Sheikavandi S, Regueiro JR, Porras O, Gatti RA. 1998b. A model for ATM heterozygote identification in a large population: four founder-effect ATM mutations identify most of Costa Rican patients with ataxia telangiectasia. *Mol Genet Metab* 64:36–43.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengut S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA and others. 1999. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64:1617–1631.
- Udar N, Farzad S, Tai LQ, Bay JO, Gatti RA. 1999. NS22: a highly polymorphic complex microsatellite marker within the ATM gene. *Am J Med Genet* 82:287–289.
- Valentine CR. 1998. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat Res* 411:87–117.
- Vanagaite L, James MR, Rotman G, Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Ziv Y, Uchenik V, Sartiel A, Collins FS and others. 1995. A high-density microsatellite map of the ataxia-telangiectasia locus. *Hum Genet* 95:451–454.
- Westbrook AM, Schiestl RH. 2010. Atm-deficient mice exhibit increased sensitivity to dextran sulfate sodium-induced colitis characterized by elevated DNA damage and persistent immune activation. *Cancer Res* 70:1875–1884.
- Yeo G, Burge CB. 2004. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11:377–394.

#### 第4章 生物製剤医薬品、再生医療、遺伝子治療におけるウイルス安全性

### 1) 細胞治療のウイルス安全性確保に関する取り組み

#### はじめに

米国で初のES (embryo stem) 細胞を利用した臨床研究が開始され、我が国でもiPS (induced pluripotent stem) 細胞の基礎的研究や再生医療への応用などを目指した研究が国策として進められている。さらに、我が国では癌の免疫療法として活性化培養したTリンパ球を投与する活性化T細胞療法が多くの医療施設で実施されている。これら様々な細胞治療を新しい医療として確立・実施していくためには、患者に投与される細胞製剤の品質を保証し治療の安全性を確保することが極めて重要である。培養細胞が直接患者に投与されることを考えれば、初期の臨床研究の段階から実用化段階と同等の安全性確保策が講じられていることが求められる。再生医療の実用化が遅れている原因として、細胞製剤製造の安全基準・規制が不明確と指摘されていたが、2006(平成18)年9月1日に再生医療の臨床研究に関する指針「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が公布され明確化された。その後、指針は2010(平成22)年11月1日に全面改定され(以下;改定版の指針を「幹細胞指針」と記載する。また表3にウイルス安全性に関係する部分を抜粋した)、対象とするヒト幹細胞にES細胞とiPS細胞が加えられた。ただし、ES細胞については、細則に「ヒト胚の臨床利用に関する基準が定められるまではヒトES細胞を用いる臨床研究は実施しないこととする」と規定されており、現時点では対象外となっている。幹細胞指針には、原材料となる細胞・組織や調製細胞の安全性確保の基準が示されているが、同指針の幹細胞には、臨床研究に用いられる全ての培養細胞が含まれると解釈されているため(幹細胞指針改正に伴うパブリックコメントの回答案にも「単核球等も、培養などの調製工程を経た場合は、ヒト幹細胞等に含まれます」との記載がある)、培養操作を伴う再生医療・細胞治療の臨床研究は、この幹細胞指針の要求項目を満たしつつ調製した細胞製剤を用いて実施することが必要である。

細胞治療の安全性を確保する上で、微生物混入のリスクを避けることは極めて重要な問題である。医療用具・機器であれば滅菌操作により感染リスクをなくすことができ、血液など生物材料を用いた生物学的製剤でも放射線照射あるいは加熱処理などによりそのリスクを十分に低下させることが可能である。しかし、細胞治療製剤は生きた生体材料を原材料とし、増幅・分化誘導などの調製操作後に簡単な洗浄操作を行い患者に投与するのが一般的であり、原材料、培養工程の中間体、最終製造物のいずれに対しても十分な消毒・滅菌処理を施すことが不可能であるとの本質的な問題を抱えている。表2に示すように、ヒトには多くのウイルスが持続感染しているため、特にウイルス汚染に関する問題は治療の安全性確保において、避けては通れない重要な課題である。

なお、改定前の幹細胞指針では、ウイルス安全性に関わる項目は“「ヒト又は動物由来成分を原

表1 再生医療・細胞治療の安全性確保に関連する指針・通知

- ・ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針
- ・細胞・組織利用医薬品等の品質および安全性確保について(医薬発第906号)
- ・細胞・組織利用医薬品等の取り扱い及び使用に関する基本的考え方  
(医薬発第1314号：平成20年に下記2つの指針が公布されたことにより、廃止)  
ヒト(自己)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(薬食発第0208003号)  
ヒト(同種)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(薬食発第0912006号)
- ・生物由来製品及び特定生物由来製品の指定ならびに生物由来原料基準の制定等について(医薬発第052001号)
- ・生物由来製品に関する感染症定期報告制度について(医薬発第051508号)
- ・ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価(ICHQ5Aガイドライン：医薬審第329号)
- ・血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン(薬食発第0803002号)

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」(平成12年12月26日付け医薬発第1314号厚生省医薬安全局長通知)の規定するところによるものとする”とされている(以下；1314号通知)。2008(平成20)年に1314号通知が改定され、「ヒト(自己)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；自己指針)と「ヒト(同種)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；同種指針)の2つの指針が公布され1314号通知は廃止された。改定後の幹細胞指針では自己および同種指針に記載されている内容がほぼそのまま取り込まれた形になっている。幹細胞指針、自己指針、同種指針に記載されているウイルス安全性に関する規定は具体的に以下に記述するが、今後はこれらの指針で規定されている事項を順守して再生医療・細胞治療を行うことが必要である。

表1に再生医療・細胞治療の安全性確保に関連する指針・通知をまとめた。

## 1. 再生医療・細胞治療のウイルス安全性確保に関する規制

### 1) 原材料のウイルス検査

ヒトには多くの持続感染ウイルスが存在することが知られている。表2に示すように、ほとんどの成人は多数の持続感染ウイルスに感染しており、その多くは末梢血からも検出される。再生医療の原材料となる生体材料は末梢血の混入が避けられないため、ウイルス汚染は事実上不可避の問題である。加えて、生きた原材料を培養操作後に用いるため滅菌処理することができない特質があるため、原材料の段階でウイルス汚染の可能性を排除して安全性を担保することは不可能である。そのような認識に立った上で、原材料のウイルス汚染の可能性を正しく評価し安全性確保につなげていくことが求められる。実際には、臨床研究を行う前に混入の可能性のある既知のウイルスの混入率、混入した際のウイルスコピー数を正確に測定し、ウイルス混入の危険性を評価した基礎データを収集しておくことが望まれる。

同種指針の第2章 製造方法の第1の1(1)にドナーの感染症に対する留意点として、「採取細胞・組織を介して感染する可能性がある感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること」と規定されている。具体的には、“B型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)およびパルボウイルスB19”が問診および検査により感

表2 主なヒトに持続感染するウイルスと血液により伝播するウイルス

ウイルス名	関連疾患	感染細胞(存在部位)	成人の陽性率(%)	備 考
B型肝炎ウイルス(HBV)	B型肝炎	肝実質細胞(肝臓、血液、体液)	0.9	輸血による感染および母子感染が減り、若年者の陽性率が低くなりつつある
C型肝炎ウイルス(HCV)	C型肝炎	肝実質細胞(肝臓、血液)	1~1.5	医療行為による新たな感染が激減し、中高年層が主なウイルスキャリアーである
単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)	口唇ヘルペス、ヘルペス脳炎	上皮細胞、神経細胞(唾液、血液)	80~100	性器ヘルペスの原因にもなる(主な原因は2型)
サイトメガロウイルス(CMV)	先天性サイトメガロウイルス感染症	マクロファージ(血液)	70~95	代表的な日和見感染症の原因ウイルスで、間質性肺炎、腸炎、網膜炎などの原因
水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)	水痘、帯状疱疹	上皮細胞、神経細胞(渗出液、血液)	90~95	水痘発症時に体内に潜伏し、加齢などが誘因となり帯状疱疹を発症
EBウイルス(EBV)	伝染性単核球症、Burkittリンパ腫、胃癌	B細胞、上皮細胞(唾液、血液)	70~90	T細胞、NK細胞に感染することがある
ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)	突発性発疹	T細胞(唾液、血液)	95~100	ほとんどが、乳幼児期に感染し、日和見感染症の原因となる
ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)	成人T細胞性白血病、HTLV-I関連脊髄症	T細胞(血液、母乳)	1	九州(特に南部)に多く5~7%が陽性、一部地域では30%以上が陽性
ヒト免疫不全ウイルスI型(HIV-1)	エイズ、エイズ関連症候群	T細胞、マクロファージ(血液、体液)	僅少	我が国では、感染者、エイズ患者ともに増えつつある
JCウイルス(JCV)	出血性膀胱炎、進行性多巣性白質脳症	尿管上皮細胞(尿、稀に血液)	70以上	無症状でも時々尿中からウイルスが検出され、時に末梢血からも検出される
バルボウイルスB19型(PVB19)	りんご病、赤芽球癆	赤芽球(血液)	-	通常は一過性に症状が出た後治癒するが、持続感染患者は稀にだが存在する

染が否定されること、そして“サイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barrウイルス(EBV)およびウエストナイルウイルス感染”が必要に応じて検査により否定する項目として挙げられている。幹細胞指針の第3章 ヒト幹細胞の採取の「第2 採取段階における安全対策等」に同様の規定がある。

一方、自己指針では、「患者、製造従事者及び医療従事者の安全性を確保する観点等から、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症を考慮して感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること、特にHBV、HCV、HIV、HTLVに留意すること」と規定されているが、幹細胞指針の細則では自己由来の幹細胞を用いる場合には「HBV、HCVまたはHIV等のウイルスに対する検査の実施を考慮すること」となっており、自己指針で記載されているHTLVが明示されていない。

また、同種細胞を利用する場合にはHBV、HCV、HIV、HTLVによる感染が否定されなければいけないとなっているが、各々100万人以上存在するHBV、HCVあるいはHTLVのキャリアを治療対象から外すことは患者の「治療を受ける権利」を侵害することになるため、自己由来の細胞を用いる場合には、製造・医療従事者の危険に配慮した上で、治療対象としてよいことになっている。

また、幹細胞指針および同種指針に記載されている CMV、EBV は大多数の成人に持続感染しているため、原材料に CMV、EBV が混入する危険性は非常に高い。したがって、CMV、EBV 陽性検体そして HBV、HCV、HTLV キャリア由来の細胞を製造施設に受け入れることを前提に、受け入れ時、細胞プロセッシング中や最終調製物のウイルス検査基準を定めることが必要である。再生医療のような新しい医療を実用化するためには、利益と不利益のバランスを正しく評価することが大切である。原理的に避けられないウイルス汚染の問題は、治療法の開発段階において、原材料採取段階でのウイルス汚染の実態、製造段階でのウイルス増殖の有無、最終調製物への混入の実態などを定量的に測定したデータを蓄積し、科学的に妥当な自主基準を作成することが望ましい。

我々は自主基準作成のためのデータ収集を目的として、積極的にウイルス陽性検体のパイロット培養やウイルス添加試験を行ってウイルス動態に関するデータを取得している（詳細は後述）。

## 2) 製造工程におけるウイルス検査

製造工程におけるウイルス安全性に関しては、幹細胞指針の「第4章 ヒト幹細胞の調製段階における安全性対策等」に記載されている。

細胞調製中のウイルス混入の可能性は、作業員、フィーダー細胞、トリプシンなどの細胞分散剤、培地・血清、に由来のものが考えられる。フィーダー細胞として使用されるマウスなどげっ歯類由来の細胞株には内在性レトロウイルスの遺伝子が存在し、ウイルス粒子を産生している場合もある。また、トリプシンへのブタウイルス混入やウシ胎児血清へのウシウイルス混入の危険性もあり、そのようなリスクに十分に配慮してフィーダー細胞を選択する、安全性に配慮して飼育されている動物から採取する、十分なウイルスクリアランスを行って安全性が保証された細胞分散剤・血清を使用する、などの点を考慮する必要がある。さらに、新興・再興感染症の発生を念頭に置いた対処法を予め考えておくことも必要である。一方、作業員からのウイルス混入は、細菌や真菌の汚染を起こさないような作業環境と作業手順を順守していれば問題とされないと考えられるが、作業員への感染事故が起きる可能性があるため（特に HBV などの強い感染性をもつウイルス）、ドナーに持続感染しているウイルス種とその量に関する情報を作業員に与えるとともに、ワクチン接種の励行や汚染事故および感染事故を防止できるような作業環境と作業手順を定めておくことが重要である。

幹細胞指針には、「第4章 ヒト幹細胞の調製段階における安全対策等 1 品質管理システム」に、「(4) 研究者等は、調製工程において複数の提供者からのヒト幹細胞等を同一培養装置内で同時期に扱わないこと、また、交叉汚染を引き起こすような保管方法を採らないこと等により、取り違えや微生物等の伝播の危険性を避けなければならない」と規定されており、同時に同一の作業空間で複数の提供者からの細胞を扱うことを禁じ、クロスコンタミネーションの危険性を排除することとしている。また、表3に示すように「6 微生物等による汚染の危険性の排除」として、4つの方策を掲げ「適宜組み合わせることにより、微生物等による汚染の危険性を排除するものとする」と規定されている。4つの方策の中には、「(3) 調製の各段階における必要性に応じた試験及び検査」とウイルス検査を求めると考えられる記述があるが、具体的な検査方法や対象ウイルスは明記されておらず、ここでも自己・同種指針を参考にしたウイルス検査が求められていると理解される。

旧指針では、「(5) 異種移植及び血清の取扱いに関する記載」として培養に用いる血清の要件が記載されていたが、改定された幹細胞指針には血清に関する記載は全くない。一方、自己・同種指針

表3 ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成22年11月改定版)抜粋

<p>第3章 ヒト幹細胞又はヒト分化細胞の採取</p> <p>第2 採取段階における安全対策等</p> <p>1 提供者の選択基準及び適格性</p> <p>(1) 研究者等は、ヒト幹細胞又はヒト分化細胞の採取に当たっては、提供者の適格性を確認するために、利用の目的に応じて既往歴の確認、診察、検査等に基づく診断を行うものとする。特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病及びバルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験、核酸増幅法等を含む。)により感染が否定されなければならない。また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については、必要に応じて、検査により感染が否定されなければならない。</p> <p>&lt;細則&gt;</p> <p>自己由来のヒト幹細胞を用いる場合は必ずしも提供者のスクリーニングを必要としないが、調製工程中での交差汚染の防止、製造者への安全対策等の観点からHBV、HCV又はHIV等のウイルスに対する検査の実施を考慮すること。</p> <p>(3) 検査方法及び検査項目については、その時点で最も適切とされる方法及び項目を選定するものとする。なお、当該検査方法及び検査項目については、感染症等に関する新たな知見及び科学技術の進歩を踏まえ、随時見直しを行うものとする。</p> <p>(4) 研究者等は、提供者のスクリーニングに当たっては、検査方法、検査項目等に応じて、ウインドウ・ピリオドを勘案し、可能な限り適切な時期に再検査を実施するものとする。</p> <p>第4章 ヒト幹細胞等の調製段階における安全対策等</p> <p>第1 調製段階における安全対策等</p> <p>5 最終調製物の試験検査</p> <p>(2) 最終調製物の品質管理の試験として、例えば、次に掲げるような項目について実施するものとする。なお、これらの試験項目はあくまで例示であり、一律に必要とされるものではなく、ヒト幹細胞等の特性、研究目的、科学的知見等に応じて、必要な試験項目を設定するものとする。規格値(判定基準)は、研究初期段階では暫定的なもので良いが、当該臨床研究の進展に応じて適切に見直し、臨床上の有効性及び安全性に関連する品質特性を適切に把握するものとする。</p> <p>⑧ウイルス等の試験</p> <p>6 微生物等による汚染の危険性の排除</p> <p>研究責任者は、調製するヒト幹細胞等の由来、特性及び調製方法に応じて次に掲げる方策を適宜組み合わせることにより、微生物等による汚染の危険性を排除するものとする。</p> <p>(1) ヒト幹細胞又はヒト分化細胞の受入れ時における提供者のスクリーニング記録の確認</p> <p>(2) 調製の目的にかなう培地又は試薬の使用等の調製工程における汚染防止</p> <p>(3) 調製の各段階における必要性に応じた試験及び検査</p> <p>(4) 妥当性の確認された方法による不活化及び除去法の導入</p> <p>9 最新技術の反映</p> <p>研究者等は、調製工程や試験検査については、必要に応じて見直しを行い、最新の知見、技術等を反映させるものとする。</p> <p>第5章 ヒト幹細胞等の移植又は投与</p> <p>第2 移植又は投与段階における安全対策等</p> <p>1 ヒト幹細胞等に関する情報管理</p> <p>研究責任者は、提供者のスクリーニング、最終調製物の試験及び検査の結果、調製番号、ロット番号その他のヒト幹細胞等に関する情報を管理するものとする。</p> <p>&lt;細則&gt;</p> <p>研究責任者は、特に自己細胞以外の同種細胞、又はヒト以外の動物に由来する材料等を使用して共培養を実施する場合においては、その危険性について十分に把握し、必要に応じてウイルス等の感染因子に対する検査を実施するものとする。</p>
---

には血清に関することが細かく記載されている(表4)。第2章 製造方法の第1の2(1)③に「異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと」とし、使用が避けられない場合の考慮点が5つ挙げられている。これまで、再生医療に関連して細胞培養を行う際の血清使用の可否に関しては多くの議論があったが、改定前の幹細胞指針や自己・同種指針で使用する際の基準が明確化された。血清の使用に関する記述は改定後の幹細胞指針からは削除されたが、今後も自己・同種指針に記載された内容が参考になるだろう。

なお、自己血清の使用は問題とはされていないが、血清の使用に際しては血清にも持続感染ウイルスが含まれる可能性があることに十分に配慮し、作業者の安全性を確保するとともに血清の取り

表4 ヒト(自己・同種)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(抜粋)

<p><b>第2章 製造方法</b></p> <p><b>第1 原材料及び製造関連物質</b></p> <p>1 目的とする細胞・組織</p> <p>(2) ドナーの感染症に対する留意点(自己)</p> <p>患者、製造従事者及び医療従事者の安全性を確保する観点等から、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症を考慮して感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること。特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)に留意すること。</p> <p>(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性(同種)</p> <p>② ドナーの選択基準、適格性</p> <p>ドナーが倫理的に適切に選択されたことを示すこと。また、年齢、性別、民族学的特徴、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、免疫適合性等を考慮して、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすること。特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、パルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法等)により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染及びEBウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。</p> <p>2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質(自己・同種)</p> <p>(1) 細胞の培養を行う場合</p> <p>③ 異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。特に繰り返して使用する可能性のある製品では可能な限り使用を避けるよう検討すること。血清等の使用が避けられない場合には、以下の点を考慮し、血清等からの細菌、真菌、ウイルス及び異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに、最終製品から可能な限り除去するよう処理方法等を検討すること。</p> <p>ア 血清等の由来を明確にすること。</p> <p>イ 牛海綿状脳症発生地域からの血清を極力避ける等感染症リスクの低減に努めること。</p> <p>ウ 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用すること。</p> <p>エ 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌及びウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理又は紫外線処理等を組み合わせて行うこと。</p> <p>オ 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター及び異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、使用した血清の一部を保管すること。</p> <p><b>第2 製造工程</b></p> <p>(2) 細菌、真菌、ウイルス等の不活化・除去(自己・同種)</p> <p>原材料となる細胞・組織について、その細胞生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法について明らかにすること。</p> <p><b>第3 最終製品の品質管理</b></p> <p>(8) ウイルス試験(自己)</p> <p>HBV、HCV、HIV、HTLVを増殖させる可能性のある細胞の場合には、中間製品、最終製品等について、増殖可能性のあるウイルスについてその存在量に関する試験を実施し、細胞・組織加工医薬品等の投与が患者の不利益にならないことを確認する必要がある。また、製造工程中で生物由来成分を使用する場合には、最終製品で当該成分由来のウイルスについての否定試験の実施を考慮すべき場合もあるかも知れない。しかし可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい。</p> <p>(8) ウイルス等の試験(同種)</p> <p>バンク化されておらず、ウインドウ・ピリオドが否定できず、HBV、HCV、HIV等を製造工程中に増殖する可能性のある細胞を用いる際には、中間製品、最終製品等についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること。また、製造工程中で生物由来成分を使用する場合には・・・(以下、「自己」と同文)</p>
---

違いによる感染事故の発生を防止する管理体制の構築が必要である。さらに、血清を使用する前に加熱あるいは放射線照射によるウイルスの不活化工程を加えることも検討するべきであろう。

### 3) 最終調製物のウイルス検査

調製工程が終了した細胞は、細胞分散処理や洗浄などの工程を経た上で細胞浮遊液あるいは細胞シートなど患者へ投与する形態へと加工されるのが一般的である。治療の安全性を確保するために



は、投与形態の細胞の一部を検査用として分取し予めウイルス検査を行うことが理想である。

しかし、自己細胞を利用したオーダーメイド型の再生医療では患者に投与される細胞はロットを形成せず、また、一般に投与形態にした細胞はできる限り速やかに患者に投与する必要があるため、最終調製物を直接検査することは困難な場合が多い。次善の策として、細胞を回収する前日に一部の細胞を分取してウイルス検査を行い、安全性を確認した上で細胞を回収し投与する方法が採用されている。また、投与形態にした調製細胞の一部を分取してウイルス検査を行い、データを取得しておく取り組みも行われている。このような場合、検査結果がでるのは投与後になるため、検査陽性となった際の対処方法を予め決めておき、患者の安全確保に適切に対処できる体制を構築しておくことも必要である。

幹細胞指針には、「第4章 ヒト幹細胞等の調製段階における安全対策等 第1 調製段階における安全対策等 1 品質管理システム 5 最終調製物の試験検査」の(2)⑧に「ウイルス等の検査」としてウイルス検査が最終調製物の品質管理試験として例示されている。しかし、検査すべきウイルス種などの詳細は明示されておらず、自己・同種指針を参考に検査項目を決めることになるだろう。

後述するように、ウイルス陽性検体の試験培養やウイルススパイク試験により培養中に持続感染ウイルスが増幅する場合があるとの結果が得られており、そのような可能性を十分に配慮したウイルス検査体制を構築することが求められる。そうした意味でも、混入する可能性のある持続感染ウイルスに関し、原材料中への混入の実態や培養工程での動態を臨床研究開始前に十分に検討した上で、品質管理システムを構築しておくことが望まれる。

## 2. 再生医療・細胞治療のウイルス安全性確保に関する取り組み

### 1) 新しいウイルス検査系の開発と再生医療への応用

細菌、真菌と違いウイルスはその増幅に特定の生細胞を必要とし、また培養法が確立されていないウイルスも多数存在するため、培養法により多くのウイルスを同時に検査することは事実上不可能であり、核酸増幅法により検査することが必要となる。自己・同種指針に挙げられているHBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV-1、HTLV-2、パルボウイルスB19(PVB19)、CMV、EBVの9種類は最低限として、表2に示す他の持続感染ウイルスを含めた検査を行うためには、十数種類のウイルスを同時・迅速・高感度・簡便・安価に検査できる新しいウイルス検査系が必要である。我々は、20種類程度の検査項目を2時間程度で検査でき、反応系に存在する10コピーのウイルスゲノムを検出できる感度を有し、プローブを用いて検出することにより標的ウイルス以外の配列を誤って増幅・検出する危険性を回避するシステムの開発を目指して研究を行った。また、HBV、HCV、HIV、HTLVには多くのサブタイプがあることが知られており、可能な限り検出漏れを回避できるように、より多くのサブタイプを検出できる共通プライマーの開発も併せて行った。開発した新規ウイルス検査系は、東京医科歯科大学医学部附属病院で行う再生医療・細胞治療の安全性検査法として実用化されている。開発した検査法の詳細に関しては、本書第7章「5) 病原微生物の網羅的検査系の開発と応用」を参照いただきたい。

表5 ウイルススパイク試験法の開発

対象ウイルス	HIV-1, EBV, CMV, PVB19
ウイルスストックの作成に使用した細胞株とウイルス定量法	HIV-1 : 293T cell line, p24 の測定 (ELISA) EBV : B95-8 cell line, B-cell transformation CMV : HFL-1 cell line, Plaque assay PVB19 : KU812Ep6 cell line, Immunofluorescence (IF)
ウイルスの感染の検出法	Viral mRNA (RT-PCR) HIV-1 : Multi-spliced mRNA (rev, tat, nef, env protein) EBV : EBNA1 (latent protein), BZLF-1 (lytic protein) CMV : Multi-IE1&2 (immediate early, late), UL89 (early, late) PVB19 : Multi-spliced mRNA (VP-1, VP-2, など8種類) Viral protein (IF) HIV-1 : p24 EBV : EA-D (p52/50), LMP1 CMV : IE antigen pp65, ICP36 (DNA binding protein) PVB19 : VP1&2 (structural protein)

## 2) 細胞培養工程におけるウイルス動態の検討

再生医療に使用する細胞の品質管理は血液製剤や生物学的製剤の安全管理基準に準じて行うことが求められている。自己・同種指針によれば、ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の原材料は肝炎ウイルス (HBV, HCV)、レトロウイルス (HIV-1, -2, HTLV-1, -2) および PVB19 陰性のドナーから採取し、さらに必要に応じて CMV や EBV も検査により否定することとされているが、①ほとんどの成人は、初感染後に終生持続感染状態が続く CMV, EBV に既感染である、②治療の実用化段階では、各々100万人以上存在する肝炎ウイルスや HTLV-1 キャリアを治療対象から除外することには問題がある、③最終製造物からウイルスを完全に不活化・除去する方策がない、④オーダーメイド医療の細胞製剤はロットを形成しない場合が多く、抜き取り検査などにより安全管理を行うことができない、などウイルスに関しては従来の医薬品製造の安全管理とは考え方が根本的に相違する点が多い。したがって、臨床研究を行う前にウイルス混入の危険性や培養段階でウイルスが増幅する危険性を明らかにし、臨床研究開始前にリスク情報として患者に十分に説明して同意を得ることが必要である。そのためには、原材料のウイルス検査やウイルス陽性の原材料を積極的に培養し、ウイルスが細胞培養に与える影響やウイルス動態に関するデータを蓄積しておくことが重要である。

我々の研究室では、再生医療の実用化を目指している研究者や企業との共同研究として、ウイルス陽性患者由来細胞の実験的培養や培養系に積極的にウイルスを添加するウイルススパイク試験を行い、ウイルス汚染の頻度、細胞培養に与える影響、培養系でのウイルス動態に関するデータを取得する試みを進めている。

ウイルススパイク試験を行うためには、ウイルス株およびウイルスの感染増殖を許容する細胞株を入手し、ウイルスゲノムの定量的検査法、感染性をもつウイルス液の作製、ウイルス感染価の測定、ウイルス感染細胞検出法 (ウイルス mRNA 検出法, ウイルスタンパク質検出法) などを確立する必要がある。スパイク試験を行えるウイルス種は限られている。我々は HIV-1, CMV, EBV, PVB19 のウイルススパイク試験系を構築し、臍帯血由来造血幹細胞および骨髄由来間葉系幹細胞培養系へのウイルススパイク試験を実施した (表5)。その結果、臍帯血由来造血幹細胞培養系では

表6 細胞治療センターで実施しているウイルス検査

A set	HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, PVB19, BKV, JCV
B set	EBV, HHV-7, HHV-8, HBV
R1 set	HIV-1, HCV
R2 set	HIV-2, HTLV-1, HTLV-2

東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで使用されているウイルス検査系。4本のキャピラリーを使用して16種類のウイルスの検査を行っている。

PVB19が、骨髄由来間葉系幹細胞培養系ではCMVの感染が成立し、ウイルス増幅が起きることが明らかとなり、これらの細胞培養を実施する際にはPVB19やCMVのウイルス検査が極めて重要であることが示された。

また、癌の免疫療法として行われている活性化T細胞療法に使用する末梢血由来活性化T細胞(抗CD3抗体+IL-2により活性化培養したT細胞)の調製過程における品質管理システムを構築するため、種々のウイルス陽性患者の末梢血から活性化T細胞を調製し、原材料、調製過程、最終調製細胞のウイルス検査を行い、混入しているウイルス量と培養系におけるウイルス動態を解析した。その結果、①HHV-6, HHV-7, EBVゲノムコピー数が増殖する場合がある、②HIV-1, HBV, HCV陽性患者由来の活性化T細胞中ではウイルスは増幅せず培養の拡大とともに希釈される、との結果を得ている。

### 3) 東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターの取り組み

東京医科歯科大学医学部では、2002年に他の大学・医療機関に先駆けて再生医療・細胞治療の臨床研究用無菌培養施設である細胞治療センターが医学部附属病院の中に設置された。細胞治療センターはクラス1万の無菌培養室4室をもち、そのうちの1室は危険な病原体陽性の検体も扱うことができるP3対応の無菌培養室である。細胞治療センターは2004年に我が国では初のISO9001の認証登録施設(JQA-QMA11047)となり、国際基準に則った安全管理の基に治療用細胞製剤の作製が行われている。細胞治療センターで調製した活性化T細胞を使用した細胞治療法は、厚生労働省から先進医療「活性化Tリンパ球移入療法(原発性若しくは続発性の免疫不全症の難治性日和見感染症又は慢性活動性EBウイルス感染症に係るものに限る)」として認可されている。

細胞治療センターではウイルス安全性の確保を大きな研究課題としており、筆者の研究室で開発した新しいウイルス検査系(詳細は本書第7章5)を参照)により、センターで培養する全ての細胞に対し、表6に示す16種類のウイルス検査を実施している。昨年度は、活性化T細胞69例、軟骨再生用の培養滑膜細胞11例のウイルス安全性検査を実施した。これまでの検査では、活性化T細胞培養の原材料である末梢血からHBV, HCV, CMV, HHV-6, HHV-7, EBV, JCV, BKV, PVB19が検出されており、HHV-6, HHV-7, EBVのウイルスゲノムコピー数が活性化T細胞の培養過程で増殖する場合があることが明らかとなった。細胞治療センターでは、ウイルス増幅が検出された場合には不適合品として出荷を停止している。多くの医療機関で実施されている癌の免疫療法に使用する活性化T細胞の培養過程でも同様に持続感染ウイルスが増殖する例があると推定されるが、ウイルス検査体制が不備な医療機関も多いと思われる。治療の安全性を確保する上で、患者に投与する治療用細胞製剤は全てウイルス検査を実施すべきであり、検査体制の整備が求められる。さらに、検査実施に際しては、指針に記載されているウイルスに加えて他の潜伏感染ウイル

スに関しても十分に注意を払うことが望まれる。

## おわりに

本節で記したように、ほとんどの成人には様々な持続感染ウイルスが複数感染しており、時として末梢血中からも検出されるため、再生医療・細胞治療の原材料にウイルスが混入する可能性が高いことを前提に対策を考えておく必要がある。筆者が開発した検出系を用いた検査により HBV, HCV, CMV, HHV-6, HHV-7, EBV, JCV, BKV, PVB19 が末梢血から検出された例があるが、HHV-6 と EBV はその検出頻度が高い。さらに、生細胞からなる細胞製剤から完全にウイルスを除去・不活化することはできないため、完全にウイルスフリーを保証した細胞製剤を調製することは不可能である。したがって、治療用細胞製剤の中にどのようなウイルスがどの程度混入しているのかいないのかを明らかにし、リスク情報として患者に情報提供し、治療の有用性と危険性を勘案した上で治療に対する患者の同意を得ることが必要になる。そのような過程を経ないで治療の有効性と不利益のバランスを検討することは不可能であり、再生医療・細胞治療を実用化・普及していくためには避けては通れないステップである。そうした意味で、簡便・迅速・安価に多数の感染因子の検査を実施できる新しい検査系が必要となる。筆者らが開発したウイルス検査系はその一つの回答になりえると考えているが、今後も検査デバイスや検査系などのさらなる開発を進めていく必要がある。

(清水則夫, 渡邊 健)

## 文 献

- 1) 厚生労働省医政局長：ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針。平成 22 年厚生労働省告示第 380 号，平成 22 年 11 月 1 日 <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousaisei06/pdf/03.pdf>
- 2) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針新旧対照表。 <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousaisei06/pdf/05.pdf>
- 3) 厚生労働省医薬食品局長：ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針。薬食発第 0208003 号，2008 年 2 月 8 日 <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/0208003-200912-b2.pdf>
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 医療機器審査管理室：ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性確保に関する指針に関わる Q&A について。2008 年 3 月 12 日 <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/03122008.pdf>
- 5) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長：ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について。薬食監麻発第 0327025 号，2008 年 3 月 27 日 <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/0327025.pdf>
- 6) 厚生労働省医薬食品局長：ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針。薬食発第 0912006 号，2008 年 9 月 12 日 <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/0208003-200912-b2.pdf>
- 7) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針に関わる Q&A について。2008 年 10 月 3 日 <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/03122008.pdf>