

201117008A

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23年度総括・分担研究報告書

平成24年（2012年）3月

研究代表者

小 野 寺 雅 史

平成 23 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. 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 … 11
2. 慢性肉芽腫症腸炎の新たな治療法の開発に関する研究	河合 利尚 … 14
3. 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 … 17
4. 慢性肉芽腫症の遺伝子診断体制に関する研究	奥山 虎之 … 21
5. 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 … 23
6. 乳児期早期に重篤な感染症を発症した X 連鎖性慢性肉芽腫症の兄弟例	有賀 正 … 27
7. 慢性肉芽腫症患者の遺伝子解析報告	布井 博幸 … 29
8. 非ウイルスベクターによる in vivo 遺伝子導入の評価系	久米 晃啓 … 40
9. 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 … 45
10. 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 … 48
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(岩田)真由美 … 52
III. 厚生科学審議会科学技術部会関係 ……	59
IV. 資料 ……	105
V. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	231
VI. 研究成果の印刷物・別刷 ……	237

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
（H23-次世代-一般-003）
主任研究者 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部部长

研究要旨

小児先天性・難治性疾患に対する新規治療法の開発に向け、対象疾患を原発性免疫不全症の中で最も頻度の高い慢性肉芽腫症（CGD）とし、患者造血幹細胞を用いる造血幹細胞遺伝子治療を国立成育医療研究センターが中心となっており、その安全性と有効性を評価することで、我が国の遺伝子治療臨床研究の実施体制を構築する。本年度は、以下のようなCGD遺伝子治療に関わる研究を行った。

前臨床研究としては、1. 疾患モデルマウスや患者由来iPS細胞を用いたCGDの病態解明、2. 非ウイルスベクターによるin vivo遺伝子導入の評価、3. 新規インスレーター同定ならびにその機能解析などを行った。臨床研究としては、4. 乳児期早期から重篤な感染症をきたしたCGD兄弟例の報告、5. CGD腸炎に対するサリドマイドの有効性に関する研究、6. CGDにおける遺伝子変異と臨床症状の相関関係、7. CGDの遺伝子診断体制に関する研究、8. HSV-TK遺伝子治療臨床研究を受けた小児例の報告などであり、実施体制に関しては、9. 遺伝子治療臨床研究で使用される細胞調製室の整備とDry Runに基づくSOPの作成、10. 遺伝子治療臨床研究における臨床データ管理に関する研究等を行った。

なお、CGD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おいて平成23年2月24日付けで承認され、厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会においては平成24年3月28日付けで了承された。今後は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。

分担研究者・所属機関・職名

小野寺 雅史
国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部・部長
河合 利尚
国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部・室長
中林 一彦
国立成育医療研究センター 周産期病態研究部・室長
奥山 虎之
国立成育医療研究センター 臨床検査部・部長
瀧本 哲也
国立成育医療研究センター 臨床研究部・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・助手
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

2011年、AI-Hersらにより公開された原発性免疫不全症の疾患分類（AI-Hers et al: *Frontiers in Immunology* 2011）によるとその総数は現在180を超え、また、これまで易感染性を主症状とする免疫低下による免疫不全症がその大半を占めていたが、今回の分類では免疫調節不全症や自己炎症性疾患など過剰な免疫反応による免疫機能異常症も今回の分類に加えられたため、今後もその数は増加していくと思われる。特に、近年の著しい技術革新を伴う次世代シーケンサーの台頭は、それをいっそう加速させ、より多くの原因不明の原発性免疫不全症が遺伝子レベルで解明される可能性がある。

このように分子レベルでの病態解明が進むにつれ、これら情報を基に新たな治療法が開発が期待され、その最たるものが遺伝子を用いた疾患の治療にあたる遺伝子治療である。事実、欧米では数多くの遺伝子治療が原発性免疫不全症など小児の先天性・難治性疾患を対象に行われ、根治療法とよべる程の治療効果を上げ、一部の疾患に対しては一治療法として認識されるに至っている。ただ、我が国においては、

これら遺伝子治療を実施していくためのインフラ整備が十分ではなく、欧米のそれと比較して大きく遅れていると言わざるを得ない。

本研究では、国立成育医療研究センターが中心となって原発性免疫不全症の中でも最も頻度が高い X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対する造血幹細胞遺伝子治療を行い、その過程で起こりうる様々な問題を解決していくことで我が国の小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子・細胞治療の実施体制を構築していく。

B. 研究方法

<前臨床的研究>

1. 疾患モデルマウスならびに患者由来 iPS 細胞を用いた CGD の病態解明 (大津)

gp91phox 遺伝子欠損マウスの造血幹細胞数や骨髄再構築能を正常マウスと比較した。また、gp91phox 欠損患者の末梢血より iPS 細胞を樹立し、フィーダー細胞上で血液系細胞へ分化・誘導され、その最終産物の特性を解析した。

2. 非ウイルスベクターによる in vivo 遺伝子導入の評価 (久米)

非ウイルスベクターの開発に向け、in vivo において遺伝子導入効率を比較できる系を構築するため、ホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子とコドン最適化したヒカリコメルキムシ由来ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターを Balb/c-nu/nu マウスに hydrodynamics-based transfection 法にて導入し、生体イメージング装置 (IVIS) で画像解析した後、動物を屠殺してルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 新規インスレーター同定ならびにその機能解析 (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「周囲からエンハンサー活性の遮断」であり、他方が「バリア効果 (ポジション効果の抑制)」である。Ccnblip1 インスレーター配列を MoMLV-KO (Kusabira-Orange) ベクターに導入し、導入遺伝子の発現安定化の有効性を評価した。

次世代シーケンシング解析基盤構築として、当研究所に導入された次世代シーケンサーシステム (イルミナ社 HiSeq1000) を稼働させ、複数のタイプのライブラリー作製、配列データ取得、データ解析までを行った。

<臨床研究>

4. 乳児期早期から重篤な感染症をきたした CGD 兄弟例の報告 (有賀)

症例は生後 7 ヶ月時にアスペルギルス肺炎

を発症した兄と生後 10 日目に肝膿瘍を発症した弟であり、ともに遺伝子診断で X 連鎖 CGD と診断された。兄は複数の抗菌剤、抗真菌剤、ステロイド、γインターフェロン等にして治療したが 1 歳 1 ヶ月時に呼吸不全にて死亡した。弟は生後 10 日目に発熱で発症し、CT スキャンの結果、肝膿瘍と診断された。起因菌は便培養から検出された *Serratia Marcescens* と考えられた。抗菌剤の使用の結果、速やかに解熱し、肝膿瘍の縮小傾向にある。

5. CGD 腸炎に対するサリドマイドの有効性に関する研究 (河合)

当研究センターで経過観察中の X 連鎖 CGD 症例 8 例について、単球における caspase-1 と炎症性サイトカイン産生能を検討した。また、難治性のステロイド依存性 CGD 腸炎の 1 症例についてサリドマイド治療を行い、その治療効果と免疫学的評価を行った。

6. CGD における遺伝子変異と臨床症状の相関関係 (布井)

最近、報告した世界 1267 家系 1415 患者の gp91phox 遺伝子変異集計と国内での相関を検討した。日本では 166 名の患者おり、そのうち 82 名が遺伝子解析を終了している。

7. CGD の遺伝子診断体制に関する研究 (奥山)

2011 年 2 月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン (医学会ガイドライン) をもとに、小児を対象とした遺伝学的検査の実施に当たって留意すべき課題を抽出し、それをもとに CGD における遺伝学的検査を含む診断体制を確立する。

8. HSV-TK 遺伝子治療臨床研究を受けた小児例の報告 (福島)

14 歳、男児、急性リンパ性白血病 (Precursor B-lymphoblastic leukemia, B-pre ALL) および Down 症候群。TCCSG による化学療法後に父親からの幹細胞移植を施行 (HLA-A locus 不一致)。骨髄再発し、HSV-TK 導入ドナーリンパ球輸注療法を行う。投与数は $6.7 \times 10^7 / \text{kg}$ であり、治療効果が得られなかったため $18.0 \times 10^7 / \text{kg}$ のドナーリンパ球を輸注した。2 回に HSV-TK 導入ドナーリンパ球輸注においても GVHD および GVL 効果は確認できなかった。

<実施体制>

9. 細胞調製室の整備と Dry Run に基づく SOP の作成 (小野寺)

国立成育医療研究センター研究所 5 階に細胞調製室 (Cell Processing Room: CPR) を設置した。この CPR は前室や書類保管室を有し、

細胞調製室内の清浄度はくらい10,000である。また、同室にHepaフィルターを有するClass IIaのセーフティキャビネットを設置し、その他、遠心機、CO₂ インキュベーター、冷凍・冷蔵庫を室内に準備した。また、室外には輸血用のバッグ用大型遠心機も設置した。

遺伝子導入実験として、健常人末梢血 5×10^7 個の単核球を回収し、IL-2 (600U/ml)、OKT3 (30ng/ml)の存在下、 1×10^7 /mlの細胞濃度でCO₂透過性バッグ (CultiLife Eva、Takara Bio) にて72時間培養した。その後、ファイブロネクチン (FN) コートバッグ (CultiLife Spin) 内でウイルス上清に浮遊させ、2000rpm、2時間の遠心操作にてEGFP遺伝子を導入した。これら操作をDay 3、4で行い、Day 7に細胞を回収し、細胞の状態 (viability) と遺伝子導入効率を解析した。なお、細胞密度は $5 \sim 10 \times 10^5$ /ml 内で維持した。

10. 遺伝子治療臨床研究における臨床データ管理に関する研究 (瀧本)

遺伝子治療では取り扱う患者データに遺伝子解析結果なども含まれるため、データセンターでも指針に従った臨床データ管理を行う必要がある。このため、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) のもとで、人的安全管理措置 (データ管理業務担当者との個人情報非開示契約の締結、個人情報の取扱いにかかわる教育など)、物理的安全管理措置 (二重ロックのデータセンター内イントラネット、入退室管理、無停電装置設置など)、技術的安全管理措置 (システムのファイアウォールによる保護、ユーザー認証、不正ソフトウェア対策、データの定期的バックアップなど) を講じる。

11. 遺伝子治療臨床研究の現状 (岡田・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。また、遺伝子治療臨床研究は平成24年3月28日の厚生科学審議会技術部会にて承認された。

(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. 疾患モデルマウスならびに患者由来 iPS 細胞を用いた CGD の病態解明

正常マウスと比較してCGDモデルマウスであるgp91phox欠損マウスの骨髄中造血幹細胞数やコロニー形成能ならびに骨髄移植により骨髄再構築能に有意な差を認めなかった。ただ、ストレス条件を模倣するため炎症性サイトカインを添加した培養条件ではその反応に差を認めた。

CGD患者から樹立したiPS細胞は健常人由来iPS細胞と同様未分化維持培養が可能であり、G-CSF存在下で誘導した好中球では活性酸素産生能の欠如ならびにNET形成能が健常人細胞と比べて低下していた。

2. 非ウイルスベクターによる in vivo 遺伝子導入の評価

ヒト腎由来HEK293細胞を用いたin vitroのtransfectionの系では、ルシフェラーゼの活性はホタル由来の方がコメルキムシ由来ルシフェラーゼより5~10倍高かった。また、IVISによるイメージングのシグナル強度と摘出肝臓におけるルシフェラーゼ活性は相関していた。

ミニサークルDNA (MC07.CMV-luc) が in vivo transfection の効率ならびに発現持続性に関して優位であるかを検討したところ、現在あるベクターに対して優位性は認められなかった。

3. 新規インスレーター同定ならびにその機能

解析

昨年までの研究で、*Ccnblip1* インスレーター配列のインスレーター活性を確認したが、MoMLV を用いたレトロウイルスベクターによるインスレーター活性を解析した。MoMLV 3'LTR の直下に *Ccnblip1* インスレーター配列を組み込み、HL-60 細胞を標的に KO の発現を基に既存のインスレーター cHS4 と比較したところ、インスレーター活性は認められたもののその活性は cHS4 より低値であった。

なお、当研究センターにおいても次世代シーケンサーシステムが使用可能となり、遺伝子治療臨床研究で行われるベクター挿入部位の網羅的解析系の構築が着手できるようになった。

<臨床研究>

4. 乳児期早期から重篤な感染症をきたした CGD 兄弟例の報告

兄は現在行いうる濃厚治療でもアスペルギルス肺炎を克服できず死亡した。リスクの高い造血幹細胞移植の実施は不可能だった。遺伝子治療・NAPDH 酵素補充療法など、感染症をかかえたまま好中球活性酸素を回復させ、免疫不全状態を改善する治療の臨床適応が待たれる。また弟は生後 10 日という非常に早い年齢で多発性の肝膿瘍を発症した。長期間の抗生剤投与でなんとか感染症は制御できたが、重症感染症を今後も発症する可能性があり、早期の移植が望まれている。しかし、移植の前処置の副作用が乳幼児では強い可能性のため、現在 1 歳を目指して移植待機の状態である。

5. CGD 腸炎に対するサリドマイドの有効性に関する研究

CGD の単球では LPS 刺激による caspase-1 の活性化と活性化 caspase-1 依存性 IL-1 β の産生は健常人と同程度認められ、サリドマイドはその反応を阻害することはなかった。同様に、LPS の刺激による TNF α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカイン産生に関してもサリドマイドは抑制しなかった。一方、単球を TNF α にて刺激した際の NF- κ B シグナルに対してサリドマイドは濃度依存的に抑制した。

難治性のステロイド依存性腸炎を併発していた CGD 患者に対しサリドマイド治療を行ったところ、血便の消失、貧血の改善、2kg 体重増加を認め、小児潰瘍性大腸炎活動指数 (PUCAI) は 45 から 20 へ改善した。内視鏡所見でも腸管粘膜の炎症像は軽快した。

6. CGD における遺伝子変異と臨床症状の相関関係

最も多い変異はナンセンス変異で、その傾向は我が国でも同じであり、c676C>T (5)、c271C>T (3) は正解と共通していた。欠損変異は日本では 11 家系 12 患者であり、3 番目に多い (世界では 2 番目)。ただ、同一変異は少なく、各変異数の患者数は 5 名程度であった。スプライス変異は日本では 9 家系 15 患者で、4 番目に多いが、世界ではミスセンス変異と同程度であり、120 変異 247 家系と同一変異も多い。なお、最多の変異は c252G>A であった。ミスセンス変異は日本では 16 家系 19 患者で 2 番目に多く、世界でも欠失変異に続き 3 番目に多く、145 変異 246 患者が報告されている。なお、ミスセンス変異では一部に gp91phox が陽性になる場合があり、診断に苦慮する場合がある。挿入変異は日本では 6 家系 7 患者で、世界的にみても頻度は少ない。その他、プロモーター変異が日本で 1 例、フランスで 1 例報告されている。

7. CGD の遺伝子診断体制に関する研究

医学会ガイドラインでは「小児の遺伝子検査」の実施上の注意点として「未成年者など同意能力がない者を対象とする遺伝学的検査」という項目を設定し、1. 小児に対して遺伝学的検査を行う場合は、代諾者へのインフォームド・コンセントのほか可能なかぎり本人の了解 (インフォームド・アセント) を取ること、2. 成年期以降に発症する疾患の発症前診断については、原則として本人の同意のもとに行うとしている。ただ、医学会ガイドラインでは、1. 同意能力のある年齢を具体的に定めていない、2. 小児期に代諾された遺伝学的検査を成年期に達した本人に対して結果を開示する際の基準が明確ではないなどの問題点が指摘される。このため、1. 遺伝学的検査の同意は、20 歳未満であれば代諾者から受けるが、加えて 16 歳以上の対象者であれば、本人からの署名による同意 (インフォームド・アセント) を取ること、2. 小児期に代諾により実施された遺伝学的検査については、対象者が 20 歳以上になったとき、その結果の開示に関しての妥当性を検討すること。また、開示の際には適切な遺伝カウンセリングの提供の考慮することが上げられた。ンセリングの提供も同時に考慮する。

8. HSV-TK 遺伝子治療臨床研究を受けた小児例の報告

使用した細胞の安全性に関しては、S+L-アッセイ、env 遺伝子陰性、逆転写酵素活性が確認されなかったことから野生型ウイルス (RCR) の存在は否定された。また、病理解剖時に採取した各臓器 (中枢神経及び性腺を含む) 組織の

より PCR にて HSV-TK 遺伝子および Env 遺伝子は検出されなかった。

<実施体制>

9. 細胞調製室の整備と Dry Run に基づく SOP の作成

現在、厚生労働省が定める「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」では「調製機関は、ヒト幹細胞等の調製に当たり、ヒト幹細胞等を扱う作業区域及び器材について無菌状態であることを確保し、定期的な保守、点検等により、その清浄度を保つように努めるとともに、その記録を作成し保存しなければならない」とあり、このため、新たに研究所 5 階に細胞調製室を設置した。そこで、 5.0×10^7 個の末梢血 T リンパ球細胞を用いた遺伝子導入実験を行い、最終的に 3.6×10^8 個の活性化リンパ球が得られ、その viability は 80% で、遺伝子導入効率も FN coating バッグで 34.2% と small scale で得られる遺伝子導入効率と同等の値が得られた。

10. 遺伝子治療臨床研究における臨床データ管理に関する研究

研究計画書の記載内容の変更や、班会議等での議論をふまえ、想定されるデータ管理上の問題点に対応できるように現存の CRF を改訂した。

11. 遺伝子治療臨床研究の現状

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、主任研究者の小野寺（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、分担研究者の河合（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察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・組織検査部の医長の併任しており、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。

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遺伝子治療臨床研究は平成 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よって承認された。その後、平成 23 年 9 月 29 日に厚生労働省にて受理され、事前コメントに対する回答をもって、平成 24 年 1 月 13 日に遺伝子治療臨床研究作業部会が開催され、部会時のコメントに関しては平成 24 年 2 月 6 日付けで回答し、同年 3 月 28 日の厚生科学審議会技術部会にて承認された。今後はこの了承のもと

適切な患者選定を行って行く予定である。

D. 考察

本研究も期間 3 年の 2 年目を終了し、次年度がいよいよ最終年度となる。本研究では期間内に小児先天性・難治性疾患に対する新たな治療法として、近年、欧米を中心に広く行われている患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療（造血幹細胞遺伝子治療）を我が国でも行い、そこから得られる技術や知見を基に日本での遺伝子治療臨床研究の実施体制基盤を整備し、その基盤の上に新たな遺伝子治療を継続して行くことが当初の目的であった。ただ、ドイツ・スイスで行われた慢性肉芽腫症患者における造血系異常（骨髄異形成症候群）の発症など種々の問題や課題の解決から、計画自体が遅々として進まず、自分の力のなさを嘆き、自責の念に駆られることもあったが、ようやく第一の目的である「慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施」に関しては期間内の達成が可能となった。

ここで、今回の遺伝子治療臨床研究の流れを整理してみる。平成 18 年の「難治性先天性異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究」（代表 倉辻忠俊 H18-子ども-プロ-009）より始まった本研究であるが、当研究はフィージビリティスタディとして慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の実施可能性を評価するもので、最終的には「遺伝子治療は安全面で克服する課題はあるものの、その利益は危険性を十分に上回る」と結論し、次年度より始まる「小児難治性先天性異常症に対する幹細胞遺伝子細胞療法の開発と臨床応用に関する研究」（代表 倉辻忠俊・小野寺雅史 H19-子ども-一般-003）に繋げて、実質的な遺伝子治療臨床研究の準備が開始された。計画当初はドイツ Malech 博士らと共同研究として SFFV 由来レトロウイルスベクター-SFGp91 を用いた造血幹細胞遺伝子治療が計画されていたが、前述のように遺伝子治療を受けた患者において造血異常が発症し、計画 2 年目において計画の全面見直しを余儀なくされ、使用するレトロウイルスベクターを米国国立衛生研究所の Malech 博士から供与される MoMLV 由来レトロウイルスベクター-MFGSgp91phox に変更し、本研究は再スタートした。そして、およそ 1 年の期間でほぼ全ての実施計画書を作成し直し、当センターの政策医療企画課に「慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究」として平成 22 年 1 月 22 日提出した。

平成 22 年度に入り、実際に慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を実施することを目的に「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」（代表 倉辻忠俊・小野寺雅史 H22-次世代-一般-003）の研究が始まった。提出された申請書は、複数の訂正事項の上、正式に受理され、当センター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）にて審議されることになり、第一回の審査委員会が平成 22 年 5 月 31 日に開催された。当審査委員会では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ことで、平成 23 年 2 月 24 日付けで本遺伝子治療臨床研究は当審査委員会にて承認された。

遺伝子治療臨床研究の実施には、実施施設 IRB と厚生労働省の厚生科学審査会科学技術部会の二重審査が必要であり、最終的には厚生労働大臣の承認が必要となる。このため、当申請書は厚生労働省大臣官房厚生科学課に提出され、そこで複数の訂正事項が指摘され、それらを訂正することで改訂申請書が作成され、平成 23 年 9 月 29 日付で正式に受理された。そして、厚生科学審査会科学技術部会の諮問機関である遺伝子治療臨床研究作業委員会の審査に掛けられ、事前コメントとして 35 の質疑が平成 23 年 11 月 28 日になされ、その回答を同年 12 月 22 日に行った。そして、これら事前コメントに対する回答をもって、平成 24 年 1 月 13 日に遺伝子治療臨床研究作業部会が開催され、研究の概要ならびに事前コメントに対する口頭での回答を行った。その後、平成 24 年 1 月 30 日に事後コメントとして 2 つのコメントがなされ、それらコメントに対する回答を同年 2 月 6 日に行った。その回答が了とされ、遺伝子治療臨床研究作業委員会から厚生科学審査会科学技術部会へ「実施可」の意見がなされ、その意見書を基に平成 24 年 3 月 28 日に開催された厚生科学審議会技術部会にて了承された。今後は複数の事務手続きの上、最終的に厚生労働大臣の承認が得られる。

このように、単に申請書承認の流れを示すだけでもその労力が甚大であることがわかり、遺伝子治療自体が単に一研究者が個人の研究として行っているものではなく、この研究班で

示されたように、様々の分野の専門家が参加することで達成できたのだと思う。

慢性肉芽腫症の対する遺伝子治療臨床研究はその第一歩を踏み出した。今後は実際に遺伝子治療を継続して行くことが肝要で、その際にここで培われた know how を十分に活かし、次の遺伝子治療に繋げていきたいと考える。

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、以下のような前臨床研究及び臨床研究ならびに実施体制整備を行った。

1. 前臨床研究

CGD マウスの造血幹細胞は正常マウスと大差がないこと、in vivo での遺伝子導入効率を評価できる系の樹立、同定したインシュレータの一定の遮断効果を明らかにした。

2. 臨床研究

重篤な感染症を呈した CGD 兄弟例、重症 CGD 腸炎に対するサリドマイドの有効性、国内の X 連鎖 CGD の遺伝子変異の解析、CGD 遺伝子診断の倫理的配慮、HSV-TK 導入ドナーリンパ球輸注療法を受けた小児例に関する研究を行った。

3. 実施体制整備

実施場所の環境整備、ヒト大量細胞を用いた Dry Run の実施、遺伝子治療におけるデータ管理に関しての研究などを行った。

今後は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

研究成果一覧表参照

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

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療実施体制の構築

研究分担者 小野寺雅史 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部部长

研究要旨

現在、成育医療研究センター（病院、研究所、臨床研究センター）では、小児難治性疾患の一つである慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を計画している。本年度は、実際の遺伝子治療臨床研究を想定した大量ヒト細胞を用いた Dry Run を複数回行い、無菌性を含む安全性と高い遺伝子導入効率を担保する細胞培養法を検討し、それら結果を基とした標準手順作業書（Standard Operating Procedure: SOP）を作成した。今後は、臍帯血由来大量 CD34 陽性細胞を用いた Dry Run を行い、最終的な SOP を完成させる予定である。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症（Chronic Granulomatous Disease: CGD）は造血幹細胞移植など根治療法が行われな
い限り 30 歳を超えての生存が難しい難治性の疾患
で、さらには重篤な感染症の罹患により安全な造血
幹細胞移植が行えないことも多い疾患である。これ
に対し、近年、欧米では HLA 一致ドナーのいない
患者に対し造血幹細胞遺伝子治療が行われ、抗菌剤
や抗真菌剤等の治療によっても治癒が望めない
肺・肝膿瘍が改善する症例が報告され、CGD に対
する造血幹細胞遺伝子治療の有用性が認識されつ
つある。

これを受け、現在、国立成育医療研究センターで
も NIH Malech 博士と共同研究で CGD に対する造
血幹細胞遺伝子治療を計画しており、その準備を進
めている。そこで、本研究では、実際の CGD に対
する遺伝子治療臨床研究において使用される細胞
調製室の整備とそこで行われる患者造血幹細胞へ
遺伝子導入細胞を想定した大量ヒト細胞を用いた
Dry Run を複数回施行し、その結果を基とした無菌
性や細胞の生存率ならびに高い遺伝子導入効率を
担保する遺伝子導入法を確立し、その工程を文書化
した標準手順作業書（Standard Operating Procedure:
SOP）を作成した。

B. 研究方法

1. 細胞調製室の設置

国立成育医療研究センター研究所 5 階に遺伝子
治療臨床研究で使用される遺伝子導入細胞培養の
ための細胞調製室（Cell Processing Room: CPR）を
設置した。この CPR は前室や書類保管室を有し、
細胞調製室内の清浄度はくらい 10,000 である。ま
た、すべての操作は Bag to Bag 方式で一度も細胞を
バッグ外へ取り出すことはないが、Bag 等へのサイ
トカン注入などの操作に対して室内に Hepa フィル
ターを有する Class IIa のセーフティキャビネット
を設置し、その他、遠心機、CO₂ インキュベータ
ー、冷凍・冷蔵庫を室内に準備した。また、室外に
は輸血用のバッグ用大型遠心機も設置した。

2. ヒト血液細胞への遺伝子導入に関する SOP の 作成

今回の慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子
治療では、体重あたり 5×10^6 個の CD34 陽性細胞を
扱うことになるが、仮に患者体重を 20kg と想定す
ると扱う総細胞数は 1×10^8 個となり、 $10^8 \sim 10^9$ 個の
細胞を調製できるプロトコルが必要となる。今回、
使用したヒト細胞は健康人末梢血 T 細胞であり、
使用したレトロウイルスベクターは緑色蛍光色素
タンパク質（EGFP）を発現する DNsapEGFP であ
る。健康人末梢血 50ml からおよそ 5×10^7 個の単核

球をフィコール (lymphocyte separation solution) にて遠心分離し、それらを IL-2 (600U/ml)、OKT3 (30ng/ml)の存在下、 1×10^7 /ml の細胞濃度で CO2 透過性バッグ (CultiLife Eva, Takara Bio) にて 72 時間培養した。その後、細胞をバッグ遠心にて回収し、ファイブロネクチン (FN) コートバッグ (CultiLife Spin) 内でウイルス上清に浮遊させ、2000rpm、2 時間の遠心操作にて EGFP 遺伝子を導入した。これら操作を Day 3、4 で行い、Day 7 に細胞を回収し、細胞の状態 (viability) と遺伝子導入効率を解析した。なお、細胞密度は $5 \sim 10 \times 10^5$ /ml 内で維持した。

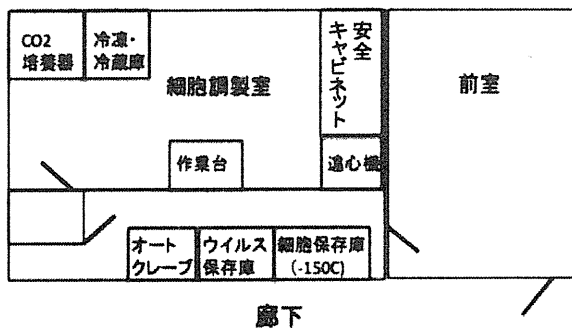
(倫理面への配慮)

本研究では、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 細胞調製室の設置

現在、厚生労働省が定める「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 18 年 7 月 3 日、平成 22 年 11 月 1 日全部改正)によると、「調製機関は、ヒト幹細胞等の調製に当たり、ヒト幹細胞等を扱う作業区域及び器材について無菌状態であることを確保し、定期的な保守、点検等により、その清浄度を保つように努めるとともに、その記録を作成し保存しなければならない」とあり、本遺伝子治療においても当該指針の定める細胞調製室を設置する必要がある。このため、この条件を満たさない旧細胞調製室を破棄し、研究所 5 階に新たに細胞調製室を設置した。

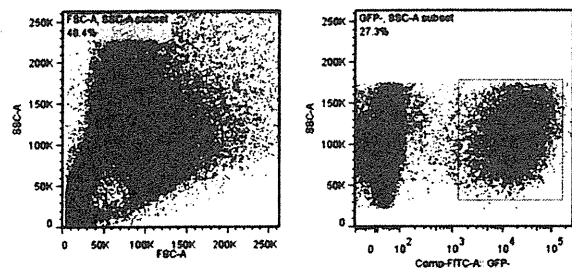


2. ヒト血液細胞への遺伝子導入に関する SOP の

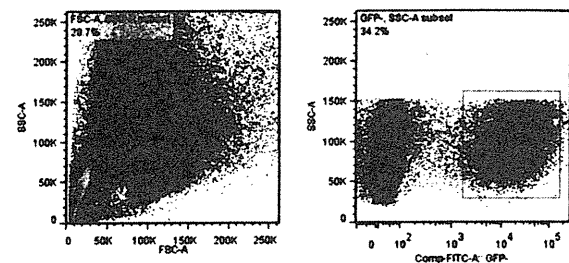
作成

5.0×10^7 個の末梢血 T リンパ球細胞は培養後 3 日目で同定の細胞数であり (一旦、減少したものと思われる)、その後、 $x1.8 \sim 1.9$ /day で増殖し、最終的には 3.6×10^8 個の活性化リンパ球が得られ、およそ 7 日間で 7~8 倍程度の増殖であった。また、細胞の viability は 80% であり、大量のバッグ培養によっても細胞への障害は少ないものと考えられた。この時に遺伝子導入効率は FN non-coating バッグで 27.3%、FN coating バッグで 34.2% であり、この値は small scale で得られる遺伝子導入効率と同等であった。

RetroNectin non-coating



RetroNectin coating



以上のことから、 10^8 オーダーのヒト末梢血 T 細胞を、viability を保ったまま、効率良く遺伝子を導入することができた。なお、ここで行われた遺伝子導入・培養操作は文書化され、ヒト末梢血 T 細胞への遺伝子導入法として SOP 化され、これを基に、次に行われるヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入法の SOP を作成する。

D. 考察

現在、当センターでは慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を計画しているが、その実施に際しては施設全体の支援体制が必須である。本研究では、実際の遺伝子治療の際に使用される細胞調製室

の整備と遺伝子治療臨床研究で使用される患者造血幹細胞への遺伝子導入に関わる SOP 作成について検討した。

1. 細胞調製室の設置

現在、行政機関が定める各指針（「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」や「遺伝子治療臨床研究に関する指針」ならびに「薬事法」（昭和 35 年法律第 145 号）が定める「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」など）により安全性が担保され形で細胞調製がなされなければならない。この点から今回、設置した細胞調製室は国が定める GMP 基準を満たすと思われる。今後は、これら細胞調製室内での Dry Run を複数回行い、その有効性・安全性を確認していく。

2. ヒト血液細胞への遺伝子導入に関する SOP の作成

今回の研究で、無菌性を保ちながら、大量ヒト血液細胞に効率良く外来遺伝子を導入することができた。これは、無菌チューブ接合機やバッグ遠心を可能にする大型遠心機の導入によるところが大きい。これにより、患者からの細胞回収から細胞培養、遺伝子導入、そして再び患者への再投与が全て閉鎖系培養システムにて行うことが可能となった。今後はこれら方法により臍帯血由来 CD34 陽性細胞に治療遺伝子を導入し、その安全性、有効性を検討し、最終的な SOP に作成につなげる。

E. 結論

造血幹細胞のための細胞調製室ならびに大量ヒト細胞への遺伝子導入法とその SOP が準備された。今後は、この研究結果を基に慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究を開始する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T:

Time-lapse imaging reveals symmetric division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS ONE* 6: e25303, 2011.

2. Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T: Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using antibody/ c-Mpl chimera. *Cytokine* 55: 402-408, 2011.
3. Maeyama Y, Otsu M, Kubo S, Yamano T, Iimura Y, Onodera M, Kondo S, Sakiyama Y, Ariga T: Intracellular estrogen receptor-binding fragment associated antigen 9 exerts in vivo tumor promoting effects via its coiled-coil region. *Int J Oncology* 39: 41-49, 2011.
4. Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: Enforced ROR(γ)t expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29: 86-93, 2011.
5. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayam N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, S Hidehiko: Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing a constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117: 5479-5484, 2011.
6. Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46: 779-789, 2011.
7. Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M: Osteomyelitis due to triethoprim/ sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection* 39: 171-173, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

慢性肉芽腫症腸炎の新たな治療法の開発に関する研究

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

原発性免疫不全症である慢性肉芽腫症 (CGD) では、炎症性腸疾患 (IBD) 様の CGD 腸炎が約 50% に認められる。炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ は、CGD 腸炎の病態に深く関与するが、同時に、感染防御機構の中心的な役割も担う。そのため、IBD のように生物学的製剤による抗 $TNF\alpha$ 治療は有効と思われるが、過度の $TNF\alpha$ 阻害療法は CGD 症例において、致命的感染症の危険性を悪化させる。そこで、今回、部分的な抗 $TNF\alpha$ 作用を示すサリドマイド療法について易感染性への影響と CGD 腸炎の治療効果について検討した。

患者単球を用いた検討から、サリドマイドは LPS 刺激に対する炎症シグナルを阻害せず易感染性を増悪しないことが示唆された。一方、サリドマイドは $TNF\alpha$ 依存性の炎症シグナルを抑制したため、 $TNF\alpha$ による過剰な炎症反応を制御することが示唆された。そこで、当センター倫理委員会で承認されたプロトコールに従い、CGD 腸炎症例についてサリドマイド治療を行った。その結果、腸炎症状の改善を認めるとともに、易感染性の増悪もみられなかった。今後、さらなる検討を要するが、サリドマイドは CGD 腸炎の治療法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

免疫不全症に合併した難治性慢性肉芽腫症 (CGD) 腸炎は、過剰免疫反応が原因と考えられており、ステロイド治療と免疫抑制剤の併用療法を必要とする。しかし、CGD では過度の免疫抑制治療により、易感染性の増悪による致命的感染症の危険性が高まる。そこで、炎症性腸疾患 (IBD) で有効性が報告されるサリドマイド治療について、CGD 腸炎における治療効果と易感染性に与える影響 (安全性) について検討した。

B. 研究方法

当センターで経過観察中の X 連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD) 症例 8 例について、単球における炎症性サイトカイン活性化酵素である caspase-1 と炎症性サイトカイン産生能を検討した。また、当センター倫理委員会で承認された臨床研究「慢性肉芽腫症に合併した難治性非感染性腸炎に対するサレド治療の臨床効果に関する検討」に従い、難治性のステロイド依存性 CGD 腸炎の 1 例についてサリドマイド治療を行い、治療効果と免疫学的な評価を行った。

C. 研究結果

(1) CGD 患者由来単球を用いた感染防御作用に

対するサリドマイドの影響

CGD の単球では、lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する caspase-1 の活性化と活性化 caspase-1 依存性 $IL-1\beta$ 産生が健常者と同等に認められた。サリドマイドは、これらの反応を阻害することは無かった (図 1)。

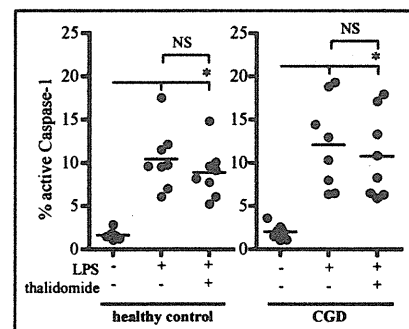


図 1. LPS 刺激に対する caspase-1 活性化

また、LPS 刺激による $TNF\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-8$ など炎症性サイトカイン産生についても、サリドマイドは抑制しなかった (図 2)。

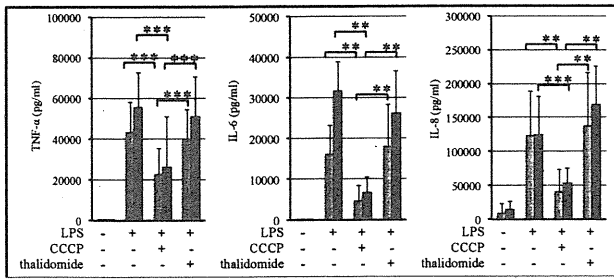


図2. LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生

(2) CGD 患者由来単球を用いたサリドマイドの抗炎症作用

次に、単球を TNF α 刺激した時に生じる NF- κ B 炎症シグナルに対するサリドマイドの影響について検討した。その結果、サリドマイドの用量依存性に TNF α 依存性 NF- κ B シグナルは抑制された。そのため、過剰に産生された TNF α の作用をサリドマイドは調節する働きを有することが示唆された (図3)。

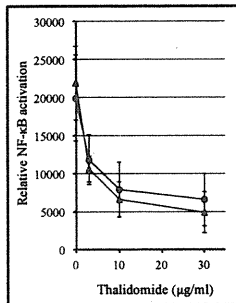


図3. サリドマイドの TNF α 依存性 NF- κ B シグナル抑制効果

(3) CGD 腸炎に対するサリドマイド治療

これまでの検討から、CGD においても炎症性腸疾患と同様にサリドマイドの有効性と安全性が示唆された。そこで、ステロイドや免疫抑制剤に治療抵抗性を示した難治性 CGD 腸炎 1 例に対して、サリドマイド治療を行った。8 週間のサリドマイド治療により、血便の消失、貧血の改善、2kg 体重増加を認め、小児潰瘍性大腸炎活動指数 (PUCAI) は 45 から 20 へ改善した。内視鏡所見でも腸管粘膜の炎症像は軽快した (図4)。また、血清中の TNF α など炎症性サイトカインも低下した。

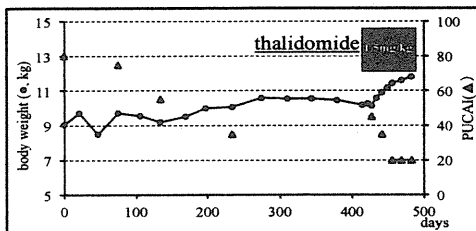


図4. サリドマイド治療による臨床効果

免疫能に関して、サリドマイド治療中に T、B、NK 細胞数に変化なくリンパ球幼若化検査も正常で

あった。胸腺の T 細胞新生を示す CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁺ T 細胞は増加しており、これらの検討では、サリドマイドによる明らかな感染防御抑制作用は認められなかった (図5)。

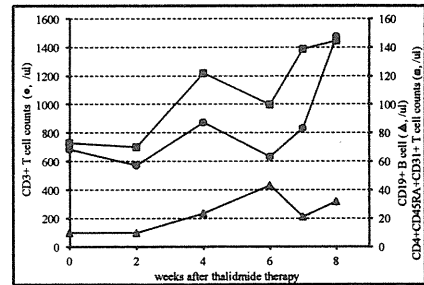


図5. サリドマイド治療中のリンパ球解析

なお、本症例は、サリドマイド治療開始前に BCG リンパ節炎とアスペルギルス肺炎を合併していたため、抗菌治療と抗真菌治療を併用した。サリドマイド治療によりこれらの感染症は増悪することは無く、また、新たな感染症もみられなかった。

D. 考察

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、細菌や真菌に対して易感染性を示すため、乳児期から感染症を繰り返す。また、CGD 患者の約 50% で CGD 腸炎が発症し、当センターにおいても 30 名の CGD 患者のうち 10 名に CGD 腸炎が併発し、その全例で治療を必要としている。

一般に、治療は炎症性腸疾患に準じて行われ、ステロイドが第一選択薬とされるが、ステロイド抵抗性の難治性 CGD 腸炎に対しては免疫抑制剤が用いられる。ただ、免疫抑制剤は CGD において感染症の危険性をさらに高めることから、その使用は炎症性腸疾患と比べ著しく制限される。

最近では生物学的製剤であるインフリキシマブ治療にて改善した CGD 腸炎症例が報告されたが、同報告によると 5 例中 2 例が感染症のために死亡している¹。また、IL-1 受容体アンタゴニスト (アナキンラ) の短期投与では、腹痛発作の回数が減少したものの、その他の症状は改善しなかった²。

サレド[®] (サリドマイド製剤) は、再発又は難治性の多発性骨髄腫の治療薬として国内で承認された製剤であるが、近年その強い免疫調整作用が注目され、クローン病やベーチェット病などの肉芽腫形成腸疾患に対する治療に応用されてきた³。CGD 腸炎においても、難治例 3 例に対して治療が行われ、2 例で消化器症状が軽快したことが報告されている⁴。この 3 例において、サリドマイド治療中に感染症が悪化した症例はなかった。

サリドマイドは、1950年代後半に催眠鎮静薬としてドイツで開発された薬剤であるが、妊娠期に服用した女性の胎児に奇形を生じさせる作用（薬害）が明らかとなり販売が中止された。しかし、その後も薬効の研究は進められ、米国で多発性骨髄腫に対する有効性が報告される等、国際的に薬効の研究が続けられた。2008年9月現在、米国、オーストラリア、ニュージーランド、EU諸国などで厳格な安全管理のもと、薬剤として承認されている。この他、米国では、免疫抑制薬（ハンセン病・サルコイドーシス）としてアメリカ食品医薬品局（FDA）で認可された。国内でも、2008年からサリドマイド製剤安全管理手順（資料1：TERMS）に従い厳密な安全性の管理のもとでサレド®治療が実施されており、これまで催奇形性の報告はなされていない。

本研究から、CGDにおいても炎症性腸疾患症例と同様に、サリドマイドの抗炎症効果が期待される。また、免疫不全症であるCGDでは、TNF α 阻害治療による易感染性の増悪について慎重な評価が求められる。今回、*in vitro*の検討では、健常者と同様にCGDでもサリドマイドの感染防御免疫抑制作用はみられなかった。実際に、今回サリドマイド治療を行った難治性CGD腸炎の1例でも易感染性の増悪はみられなかった。そのため、サリドマイド治療は難治性CGD腸炎の新たな治療法として有用であることが示唆された。

参考文献：

1. Clinical infectious diseases. 2010;51(12):1429-1434.
2. Blood. 2010;116(9):1570-1573.
3. J Pediatr. 2003;143(5):692-694.
4. Am J Gastroenterol. 2009;104(1):117-124.

E. 結論

今回のサリドマイド療法は、当センター倫理委員会で承認後、同製剤の安全管理手順に従い、国内で多発性骨髄腫の治療薬として認可されるサリドマイド製剤を用いて行った。慢性肉芽腫症では、しばしば免疫抑制剤や生物学的製剤の治療に伴う感染症の増悪が問題となる。そのため、本症例で示したように過度の免疫抑制作用を示さないサリドマイドは、感染症のリスクを高めず、非感染性炎症疾患に対して有効な治療法になると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

T Kawai, H Kusakabe, A Seki, S Kobayashi, M Onodera. Osteomyelitis Due to Trimethoprim/Sulfamethoxazole-Resistant

Edwardsiella tarda Infection in a Patient with X-linked Chronic Granulomatous Disease. Infection. 2011 Apr;39(2):171

2. 学会発表

河合利尚、村山静子、新井勝大、小崎里華、奥山虎之、小野寺雅史。慢性肉芽腫症における非感染性炎症疾患の検討。第114回小児科学会学術集会。2011

T Kawai. Gene Therapy for a Patient with Chronic Granulomatous Disease. 第17回遺伝子治療学会。シンポジウム2011

田村英一郎、村山静子、伊藤玲子、河合利尚、井田博幸。X連鎖慢性肉芽腫症における腸内細菌叢の検討。第43回小児感染症学会。2011

村山静子、明城和子、竹澤祐介、石黒精、河合利尚、大石勉、井田博幸。マクロファージ活性化症候群を発症した慢性肉芽腫症の3例。第114回小児科学会学術集会。2011

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

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 周産期病態研究部室長

研究要旨

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、遺伝子治療の完成度を高め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。我々が独自に同定した *Ccnblip1* インスレーター配列についてレトロウイルスベクター系でのバリア活性を評価した。これまでのプラスミドベクター系での結果と一致して、HL60 細胞への遺伝子導入実験で *Ccnblip1* インスレーターはバリア活性を示したが、cHS4 インスレーターのそれと比較すると弱い活性を示すにとどまった。*Ccnblip1* インスレーター活性は細胞種依存的であることが示唆され、遺伝子治療ベクターへの応用のためにはその細胞種特異性をより詳細に検討する必要があることが明確となった。

遺伝子治療においてレトロウイルスベクターのゲノム挿入部位を網羅的に同定することは治療の効果・安全性評価の一手段として重要であり、そのようなデータの取得には次世代シーケンサーによる網羅的解析が極めて有効である。今年度は当研究所に共通機器として導入されたイルミナ社 HiSeq1000 システムを用いた大量配列データ取得系とデータ解析系を構築し、ベクター挿入部位解析を開始するための体制を整えた。

A. 研究目的

1. *Ccnblip1* インスレーター配列の解析

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座位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経過とともに抑制・不活性化される現象である。インスレーターはポジション効果を回避する手段として注目されている。

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性が生まれる。我々がマウス *Ccnblip1* 遺伝子上流に同定した 242bp のインスレーター配列の性状解析を昨年度に引き続いて実施した。

2. 次世代シーケンシング解析基盤の構築

レトロウイルスベクターは細胞における安定的な発現が期待できるベクター系として、遺伝子治療や iPS 細胞誘導などの目的に使用されている。レトロウイルスは一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ウイルス感染細胞では、RNA ゲノムから逆転写された DNA が宿主細胞ゲノムに組み込まれる。レトロウイルスの一種であるマウス白血病ウ

イルス (MoMLV: Moloneymurineleukemia virus) を特別な細胞の中でのみ増殖できるように改変したもの(ウイルス自己増殖能を欠失したもの) がベクター系に利用されている。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、ベクターのゲノム挿入部位を網羅的に同定することは、遺伝子導入された細胞の性質の解析だけでなく、安全性評価等の実用面においても重要な課題である。

本研究事業で実施される慢性肉芽腫瘍症例に対する遺伝子治療の効果や安全性を評価するにあたり、ベクター挿入部位の網羅的解析が有効な手段であると考えられる。そのような解析を実施するための準備として、当研究所に共通機器として導入された次世代シーケンサーシステム (イルミナ社 HiSeq1000) の運用を開始した。

B. 研究方法

1. *Ccnblip1* インスレーターの機能解析

インスレーターには、二つの機能が知られている。一つ目は「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「バリア活性 (ポジション効果の回避)」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、より安定な遺伝子発現が保証される。

Ccnblip1 インスレーター配列のウイルスベクター系におけるバリア活性を評価するために、インスレーター配列を MoMLV-KO (Kusabira-Orange) ベクターに導入し、遺伝子発現安定化の効率を

評価した。

2. 次世代シーケンシング解析基盤構築

当研究所に共通機器として導入された次世代シーケンサーシステム (イルミナ社 HiSeq1000) を稼働させ、複数のタイプのライブラリー作製、配列データ取得、データ解析までを行った。

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. 研究結果

1. 新規インスレーター配列の解析

昨年度までにプラスミドベクター系でのレポーターアッセイとトランスフェクションアッセイにより *Ccnblip1* インスレーターのエンハンサー遮断効果とバリア活性を確認した (平成 22 年度研究報告書参照)。これらのアッセイには Cos7 細胞ならびに HEK293 細胞を用いた。今年度はウイルスベクター系における *Ccnblip1* インスレーターのバリア活性を評価した。蛍光タンパク質 Kusabira Orange(KO) が組み込まれた MoMLV ベクターの 3'LTR 直下に *Ccnblip1* インスレーターをクローニングし、このベクターを用いてレトロウイルスを作製した。このウイルスベクターは宿主ゲノムにインテグレーションされるときに、3'LTR が 5'側にコピーされるため、KO の両端にインスレーターが挿入された状態で宿主ゲノムに組み込まれる。また、比較対象として既知イ

ンスレーター配列 cHS4 を 3'LTR 直下に配置したベクターも作製した (図 1)。調製したレトロウイルスを HL-60 細胞に感染させ、KO 発現細胞の割合を FACS 解析により経時的に測定した。図 1 に示すように、ins(F) および ins(R) の 2 種類の *Ccnblip1* インスレーター組み込みベクターのうち、ins(F) で KO サイレンシング率の軽減がみられた。しかし、この効果は cHS4 インスレーター組み込みベクターと比較すると弱かった。

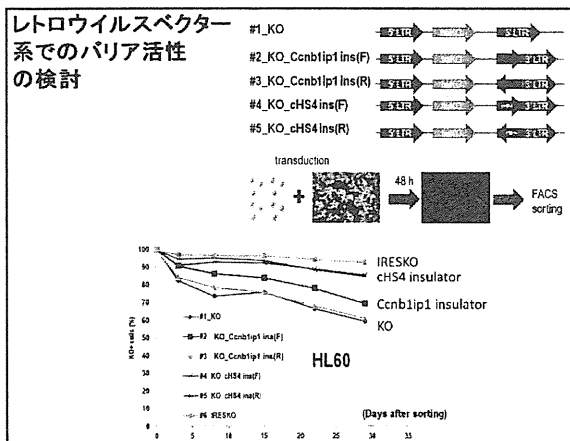
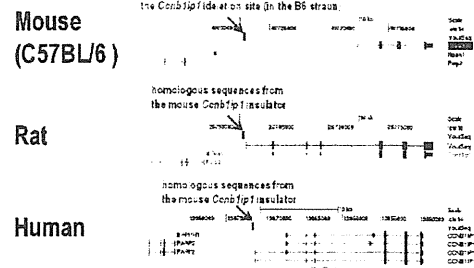


図 1

哺乳類ゲノム配列の比較解析から、*Ccnblip1* インスレーター配列 (244 bp) および隣接するエンハンサー配列 (111 bp) はマウス・ラット・ヒトでよく保存されており、ヒト配列もインスレーター活性を示す可能性が強く示唆される。また、5'RACE 解析や EST 配列解析から、ヒトとラットでは *Ccnblip1* インスレーター・エンハンサー配列の 25-50bp 下流に *CCNB1IP1* 遺伝子の転写開始点が存在するのに対し、マウスでは B6 系統特異的に転写開始点領域が欠失しており、より下流のエクソンが *Ccnblip1* の転写開始点となっていることを明らかにした (図 2)。

Ccnblip1 インスレーター配列は哺乳類で保存されている



Nucleotide sequence identity of *Ccnblip1* insulator sequences

	Mouse (JF1)_242 bp	Rat_233 bp
Rat_233 bp	84%	
Human_244bp	68%	62%

図 2

D. 考察

Ccnblip1 インスレーターは Cos7 や HEK293 細胞でのアッセイ系では明らかかなインスレーター活性を示したが、HL60 細胞でのバリア活性は既知インスレーター cHS4 と比較すると弱かった。インスレーター効果には細胞タイプ特異性があることが知られており、今のところ全ての細胞種において万能に機能するインスレーターは知られていない。*Ccnblip1* インスレーターがどのような細胞種においてエンハンサー遮断効果ならびにバリアー活性を発揮するかをより詳細に決定するのが、遺伝子治療ベクターへの応用に向けての今後の課題であると考えられる。

E. 結論

Ccnblip1 インスレーターのバリア効果は細胞種によって異なることが判明した。遺伝子治療ベクターへの応用のためにはインスレーター活性の細胞種特異性についてより詳細に検討する必要があることが明確となった。

当研究所内で次世代シーケンサーシステムが使用可能となり、ベクター挿入

部位の網羅的解析系の構築に着手できる体制が整った。

G. 研究発表

学会発表

吉田 亘、稲木 誠、小野寺 雅史、秦 健一郎、中林 一彦 エンハンサー遮断効果とバリアー活性を示す*Ccnblip1*インスレーター配列の同定. エピジェネティクス研究会年会 2011年5月 熊本

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし