

表 1. 培養細胞におけるルシフェラーゼ活性
($\times 10^4$ RLU/mg protein)

2. Hydrodynamics-based transfection 直後のルシフェラーゼ活性：上記結果 1 より p3CMV-Luc2 と p3CMV-Eluc を選択し、in vivo transfection 翌日のルシフェラーゼ活性を比較した。手技によるばらつきは大きかったが、Luc2 と Eluc の差は 2 倍以内で、培養細胞におけるほどほど顕著ではなかった。IVIS によるイメージングのシグナル強度と摘出肝におけるルシフェラーゼ活性はよく関連していた (表 2)。

表 2. 生体イメージング ($\times 10^9$ photons/sec) とルシフェラーゼ活性 (RLU/mg protein)

ベクター	IVIS	活性
p3CMV-Luc2	16.07	421 \pm 19
p3CMV-Luc2	43.09	939 \pm 25
p3CMV-Luc2	2.07	69 \pm 1
p3CMV-Eluc	49.25	1485 \pm 100
p3CMV-Eluc	2.37	61 \pm 3

3. Hydrodynamics-based transfection 後の生体イメージング：上記結果 2 より p3CMV-Luc2 を基準にとり、ミニサークル DNA (MC07.CMV-luc) が in vivo transfection の効率や発現持続性において優位性をもつか検討した。本実験でも手技により動物間のばらつきが大きかったが、遺伝子導入翌日より基準とした p3CMV-Luc2 の発現が最大で ($>1 \times 10^9$ photons/sec)、3 日後に約 1/10、1 週間後には約 1/100 に低下したが 4 週間後までは IVIS で観察可能だった。次いでミニサークル DNA (MC07.CMV-luc) の発現が高かったが、そのレベルは前者より 1 桁低く、遺伝子導入 1 週間後には IVIS で観察不能になった。MC07.CMV-luc 作製の親プラスミド pCMV-luc の発現は最も低く、遺伝子導入翌日でもミニサークル DNA の 1/10 以下で、3 日後には観察不能となった (図 1)。

D. 考察

生体イメージングのレポーター遺伝子として頻用されるホタル由来ルシフェラーゼ (Luc) は、哺乳類細胞で高発現を得るのが難しく、実用性に限界があった。一方、ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ (Eluc) は Luc に比べ桁違いに活性が高いものの免疫

原性が強く、長期に発現を追跡するためには宿主として免疫不全動物を使わなくてはならない点が問題であった。哺乳類細胞での発現向上のため使用コドンに適正化した Luc2 は、培養細胞レベルでは Eluc よりシグナルが 1 桁低かったものの、個体レベルでの発現は Eluc に近いものであり、生体イメージングのレポーター遺伝子として十分使えると考えられる。

一方、今回使用したミニサークル DNA に搭載されていた Luc 遺伝子は、野生型の、コドンが適正化されていない配列であり、した Luc2 を搭載したベクターに比べて予想外に低い活性しか表さなかった。さらに、本課題で構築したベクターには、我々の長年にわたるアデノ随伴ウイルスベクターの開発を通じて得たベクター構築のノウハウが注がれており、同じ CMV プロモータを用いていながら高発現が得られた一因と考えている。

いずれにせよ、レポーター遺伝子と発現のアッセイ系が確立したので、これを用いて in vivo 遺伝子導入のベクター開発・改良が進められるようになった。

E. 結論

非ウイルスベクター開発に不可欠な in vivo 評価系を確立した。遺伝子導入効率改善とともに、挿入発癌リスクフリーのベクター開発に役立てて行きたい。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi Y, Kume A, Urabe M, Mizukami H, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K: Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells. *J Stem Cells Regen Med* 7:61-68, 2011
- 2) Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Urabe M, Kume A, Suzuki M, Ozawa K: Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci* 102:2272-2277, 2011.
- 3) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K, Kume A: Recovery of neurogenic amine in phenylketonuria mice after liver-targeted

gene therapy. *NeuroReport* 23:30-34, 2012.

2. 学会発表

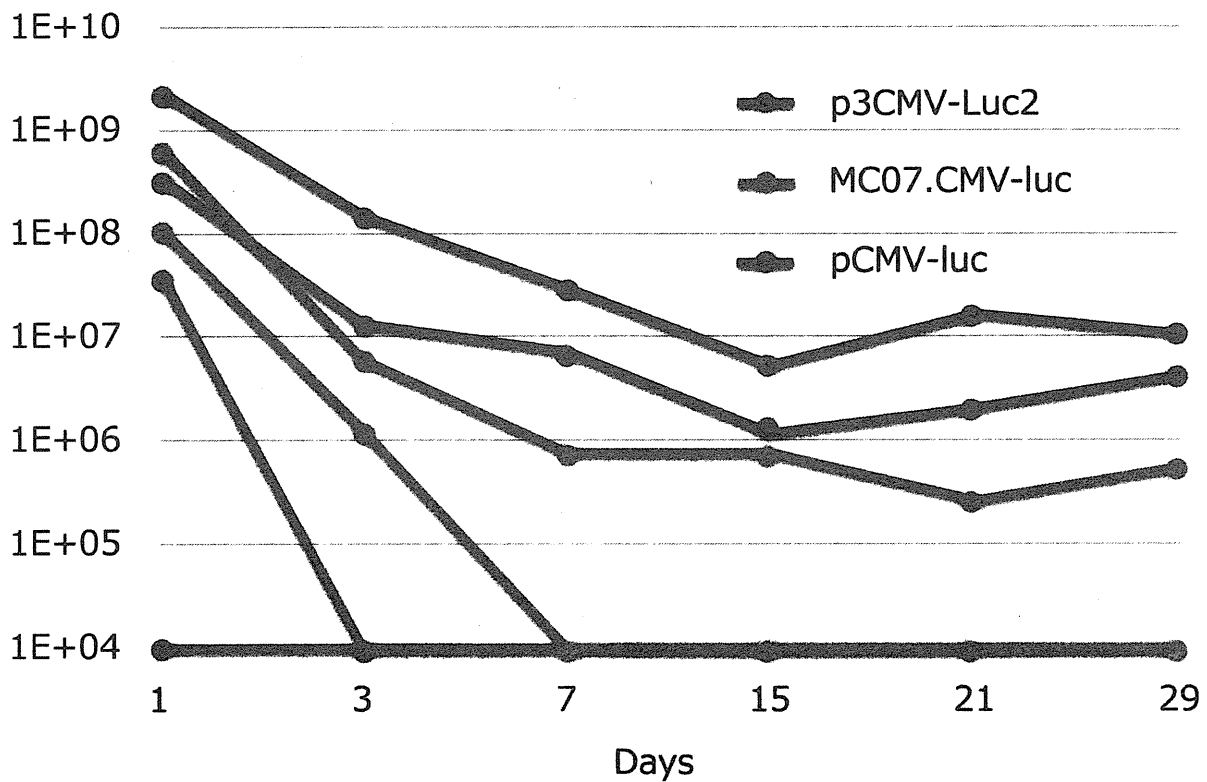
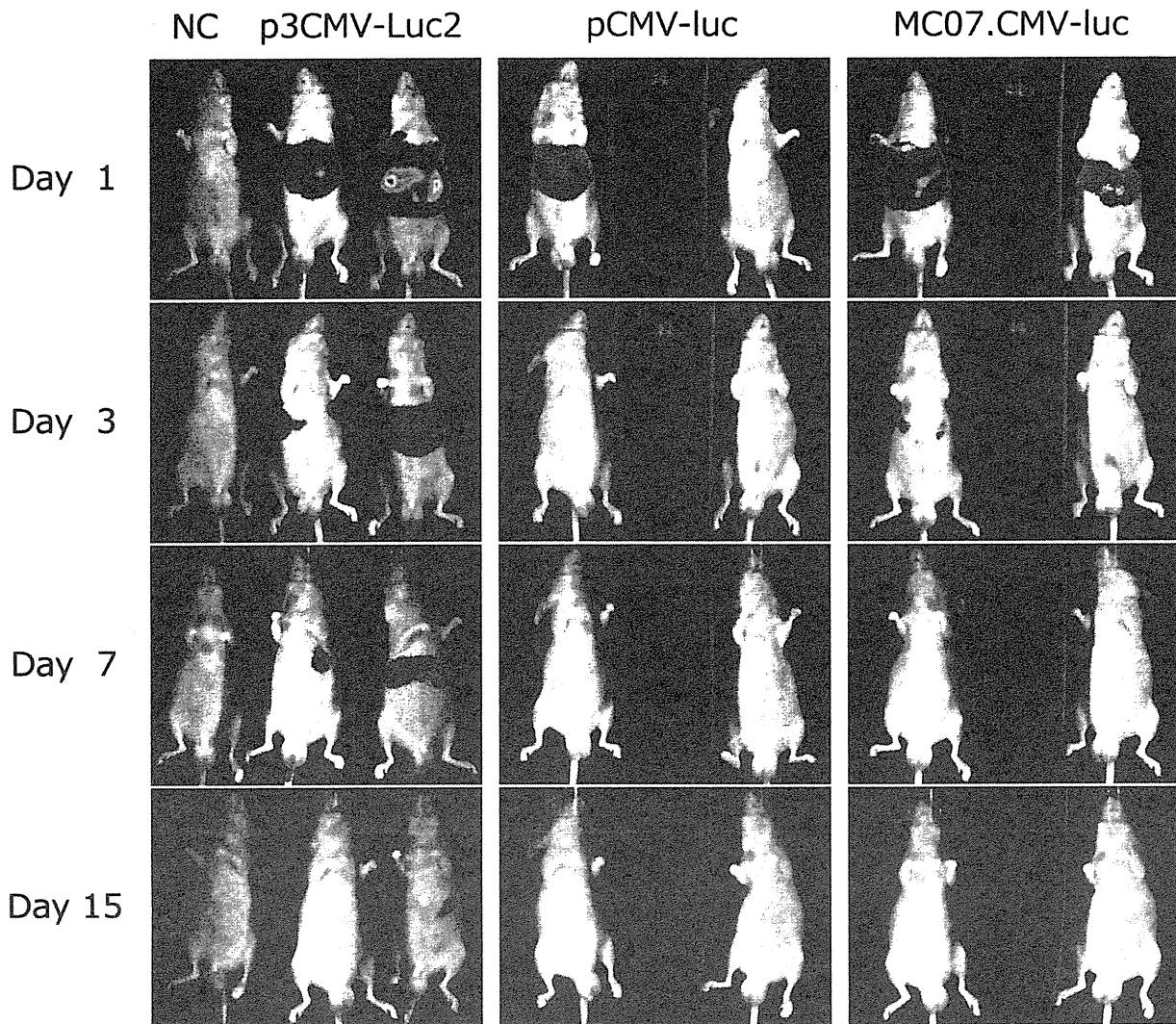
- 1) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Relationship between neutralizing antibody and factor IX expression in non-human primates following iv administration of AAV8 vectors. American Society of Gene and Cell Therapy 14th Annual Meeting, May 2011, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 19 Suppl 1: S73, 2011)
- 2) Uchibori R, Mizuguchi H, Tsukahara T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Enhancement of tumor-killing activity of TRAIL-expressing MSCs by using trichostatin A. American Society of Gene and Cell Therapy 14th Annual Meeting, May 2011, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 19 Suppl 1: S220, 2011)
- 3) Urabe M, Miyata S, Onishi A, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: The p5 promoter sequence of AAV genome regulates the direction of transgene insertion into the AAVS1 site. American Society of Gene and Cell Therapy 14th Annual Meeting, May 2011, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 19 Suppl 1: S266, 2011)
- 4) Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K: Anti-tumor activity of engineered T lymphocytes expressing an anti-CD19 CAR for B cell lymphoma. American Society of Gene and Cell Therapy 14th Annual Meeting, May 2011, Seattle, WA, USA. (*Mol Ther* 19 Suppl 1: S302, 2011)
- 5) Kume A: Gene therapy for phenylketonuria. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p97)
- 6) Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson's disease: Four years of follow-up. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p107)
- 7) Onishi A, Urabe M, Morishita Y,

- Hirahara I, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10 prevents the progression of peritoneal fibrosis. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p120)
- 8) Uchibori R, Mizuguchi H, Tsukahara T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Trichostatin A sensitizes apoptosis induced by soluble TRAIL-expressing MSCs. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p141)
- 9) Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K: Engineered T lymphocytes expressing an anti-CD19 CAR specifically eradicate B-lymphoma cells. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p165)
- 10) Urabe M, Miyata S, Onishi A, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: The role of the p5 promoter of adeno-associated virus in AAVS1-directed integration. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p167)
- 11) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Consistent and robust factor IX expression in Nab-negative macaques by IV administration of AAV vector. 第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月、福岡(抄録 p174)
- 12) Mizukami H, Mimuro J, Ishiwata A, Yagi H, Ohmori T, Madoiwa S, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Consistent factor IX expression in Nab-negative macaques following IV administration of AAV8 vector. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月、横浜(臨床血液 52:998, 2011)
- 13) Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Uchibori R, Ozawa K: Muscle-directed gene therapy for phenylketonuria with self-complementary AAV vectors. XIXth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 28, 2011, Brighton, UK. (*Hum Gene Ther* 22: 49-50, 2011.)
- 14) Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Kume A, Ozawa K: Optimization of efficacy

in AAV-mediated siRNA expression. XIXth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, October 28, 2011, Brighton, UK. Hum Gene Ther 22:104-105, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず

図1. In vivo 遺伝子導入後の生体イメージング



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）
分担研究報告書

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

研究分担者 大津 真 東京大学医科学研究所 特任准教授

研究要旨 慢性肉芽腫症(CGD)に対して遺伝子治療臨床研究が行われているが、末梢血中における機能修復好中球の維持が困難であり、永続的な治療効果を得られるに至ってはいない。その原因を明らかにし、遺伝子治療改善のための臨床応用の可能な方策を確立する目的で、前臨床試験を継続して行った。本年度においては、CGD 造血幹細胞およびCGD 好中球の特性について焦点を絞り研究を展開した。1) CGD マウスモデルを用いた検証：gp91phox 遺伝子欠損マウスにおいて純化した造血幹細胞につき、各種サイトカインへの反応性、骨髄再構築能の評価を行い、定常状態においては野生型とCGD 造血幹細胞に差を認めないものの、ストレス条件下ではCGD 造血幹細胞の能力低下をきたす可能性が示された。2) 人工多能性幹細胞(iPS細胞)モデル：gp91phox 欠損患者由来 iPS細胞を樹立し、造血幹・前駆細胞を経て好中球へと分化し、機能欠損CGD細胞を*in vitro*で再現することに成功した。これによりヒトCGD好中球の遺伝子導入後の機能修復を評価するシステムが確立された。

A. 研究目的

マウスモデルおよびヒト iPS 細胞モデルを用いて、慢性肉芽腫症 (CGD) の遺伝子治療における問題点を抽出し、その問題点を克服するための方策を見出して、得られる知見を遺伝子治療臨床研究に供することを目的とする。

B. 研究方法

1. 疾患モデルとして gp91phox 遺伝子を欠損した CGD マウスを使用した。以下の点につき、野生型マウスとの比較を行った。

- 1) 骨髄中の造血幹細胞の存在比率および絶対数
- 2) 純化した造血幹細胞のサイトカイン反応性（増殖能、コロニー形成能、表現型による未分化細胞維持能）
- 3) 定常状態造血幹細胞における競合的骨髄再構築能力

2. gp91phox 欠損患者より末梢血を採取し、単核球分画より iPS 細胞を樹立した。健康人からも同様に iPS 細胞を樹立し、未分化性の検証を行った。フィーダー細胞上で血球分化を誘導、day 14 に形

成された囊状構造物より造血幹・前駆細胞を採取し、G-CSF 存在下に好中球分化へと終末分化を誘導した。最終産物について、Wright-Giemsa 染色、特殊顆粒染色、活性酸素産生能、NET(nuclear extracellular trap)形成能等における差異を検討した。マウスを用いた実験に関しては、医科学研究所動物実験委員会の承認のもとに施行した。ヒト検体の使用にあたっては、当所の倫理委員会/ゲノム倫理委員会において承認された説明書に沿って同意を取得し研究を遂行した。

C. 研究結果

1. 定常状態成体マウスにおいて野生型、CGD マウス間で、骨髄中造血幹細胞の存在頻度、絶対数ともに差を認めなかった。*in vitro* 培養系においては stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO) 含有基本培地では両者間に増殖能、コロニー形成能の差を認めなかった。しかしながらストレス条件を模倣するために炎症性サイトカインを添加すると、反応性に差が生じることが明らかとなった。定常状態造血幹細胞における骨髄再構築能の評価を競合的移植によって行った

結果、両者間に差を認めなかった。

2. CGD 患者から樹立した iPS 細胞は健康人由来 iPS 細胞と同様に未分化維持培養が可能であった。未分化培養条件下では、未分化発現マーカーの発現等、基本特性に両者間で顕著な差を認めなかった。分化培養系においては、day 14 における造血幹・前駆細胞の産生には特に差を認めなかったが、好中球分化培養系では CGD 細胞において成熟不全を生じる傾向が観察された。活性酸素産生能は CGD 細胞で欠如しており、NET 形成能においても健康人細胞に比較して形成不全が明らかであった。

D. 考察

1. 現行の CGD 遺伝子治療臨床研究における機能修復細胞の低いキメリズムは、移植細胞集団における造血幹細胞活性の低下の可能性を示唆している。しかしながら、マウス CGD モデルでの遺伝子治療モデル等から、現在のところ CGD 造血幹細胞の機能異常は論じられていないのが実状である。確かに今回のマウス研究から定常状態においては CGD 造血幹細胞は野生型と存在頻度、造血再構築能において明らかな差を示さず、CGD 細胞正常説を支持している。しかしながら、まだ preliminary な結果であるが、ストレス条件下においては必ずしも CGD 造血幹細胞は野生型と同等の能力を発揮しない可能性を示唆された。このストレスは遺伝子治療においては、体外操作中および移植後生体内の 2ヶ所において想定され、造血幹細胞に影響を及ぼしうると考えられる。さらに研究を継続することで、CGD 遺伝子治療の有効性を向上させる方策が確立可能であると期待される。

2. 遺伝子治療においては、現行の semi-random な遺伝子挿入を伴う遺伝子付加治療に加え、今後標的箇所への遺伝子挿入、さらには遺伝子修復に至るまで、治療法の多様化が予想されている。一方で新規の治療法の評価には信頼しうる評価系が必要であり、マウスモデルとヒト検体を用いたアッセイ系を総合的に用いることが必要とされる。ヒトの場合、CD34 陽性細胞を用いた評価系が利用されるが、検体を得難いこと、複数回の試行は実行困難であること等の限界は否めない。近年開発された iPS 細胞技術は、遺伝子治療における治療モデルに新たな可能性を付与した。今年度は、gp91phox 欠損患者からの iPS 細胞の樹立に成功し、また

、機能的好中球の分化培養系を工夫することで評価系の確立を行った。結果、遺伝子欠損による活性酸素産生能の欠如が患者 iPS 細胞由来好中球において再現され、治療評価系のプラットフォームが整備された。加えて、本来異常が指摘されてこなかった分化過程において、2株の CGD iPS 細胞が健康人 iPS 細胞に比較して遅延または成熟不全を呈したことから、従来のアッセイ系では見逃されてきた重要な知見が iPS 細胞の分化培養によって初めて明らかにされる可能性が示された。

E. 結論

1. マウスの純化造血幹細胞を詳細に調べることで、ストレス条件下において CGD 細胞の機能異常が露見する可能性が示唆された。

2. CGD iPS 細胞を用いて好中球における機能異常を再現することに成功した。また、CGD 細胞が好中球への分化成熟過程においても異常を有する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 2012;119(8):e45-56.
- Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
- Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, et al. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 2011;13(5):262-268.
- Kawahara M, Chen J, Sogo T, et al. Growth promotion of genetically

modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. Cytokine. 2011;55(3):402-408.

2. 学会発表

- Evidence for the Involvement of CXCR4 Signaling in in vivo Self-Renewal of Transplanted Hematopoietic Stem Cells
CHEN-YI LAI, Sachie Suzuki, Motohito Okabe, Satoshi Yamazaki, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi
The 53rd ASH Annual Meeting, 2011, San Diego.
- Patient Autologous iPSCs in the Modelling and Treatment of Chronic Granulomatous Disease.
Lin Huan-Ting, Makoto Otsu, Taizo Wada, Akihiro Yachie, Naoya Takayama, Hiroshi Endo, Hiromitsu Nakauchi
The 19th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2011, Brighton.
- Lessons from Japanese Clinical Trial of Stem Cell Gene Therapy for ADA-Deficiency.
Makoto Otsu
The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2011, Fukuoka, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

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

分担研究者 福島 敬

筑波大学医学医療系 臨床医学域 小児科学講師

研究要旨：

筑波大学附属病院において実施した「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ HSV-TK 遺伝子導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究」において登録された小児例について、レトロウイルスの安全性の側面から評価する。初回の遺伝子治療から954日間の観察期間を得た。遺伝子治療と直接の因果関係を有する有害事象はなく、定期的に行った野生型ウイルスのチェックにおいても、陽性反応はなかった。また剖検時に得られた各臓器サンプルを用いたPCRによって、ウイルスベクターやHSV-TK遺伝子のDNAは検出されなかった。とりわけ、精巣からもこれらのDNAが検出されなかったことは1個体への遺伝子治療が次世代へも影響する危惧が持たれていることに対する1つの確認事項として重要である。

レトロウイルスベクターおよびHSV-TK遺伝子・タンパク質による有害事象は観察されなかった。

A. 研究目的

レトロウイルスベクターの安全性について、遺伝子治療実施小児例の臨床経過および病理解剖所見を踏まえて検証する。

B. 研究方法

まず、筑波大学附属病院において実施した「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ HSV-TK 遺伝子導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究」において登録された小児例の臨床経過を振り返る。

症例 14歳（遺伝子治療実施時）、男児。
診断：急性リンパ性白血病（Precursor

B-lymphoblastic leukaemia, B-pre ALL)

およびDown症候群

（1）遺伝子治療実施までの経過

2000年8月発症（当時9歳）。東京小児がんスタディグループ TCCSG 超高危険群の化学療法スケジュール（全脳照射18Gyを含む）によって第1完全寛解。

2002年7月に第1骨髄再発。TCCSG再発ALLプロトコールを使用して第2完全寛解。

2003年2月にHLA-Aローカス不一致の父親（hetero to homo）から同種骨髄移植。皮膚グレードIIの急性移植片対宿主病（GVHD）が認められ、シクロスポリンAの投与を継続した。

2005年8月、第2骨髄再発。骨髄中の白血病細胞は93%であった。シクロスポリンAを中止し、プレドニソロン+ビンクリスチン+L-アスパラギナーゼおよびリツキシマブを併用して、化学療法を再開した。

(2) 遺伝子治療の実施

2005年11月21日、骨髄中白血病細胞が9%まで減少した時点で、初回のヘルペスウイルスチミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法（以下TK-DLI）を実施した。輸注細胞数は、 6.7×10^7 /kgであった。末梢血中のHSV-TK遺伝子は輸注後35日間で検出されなくなった。GVHDは発症せず、移植片対白血病（GVL）効果の出現を期待できる時間的余裕なく、12月19日には骨髄中の白血病細胞比率が50%以上に増加し、シタラビン+6メルカプトプリン、プレドニソロン+ビンクリスチン+L-アスパラギナーゼの併用療法を行った。

2006年3月22日に第2回目のTK-DLIを実施した。細胞数は 18.0×10^7 /kgであった。末梢血中のHSV-TK遺伝子は輸注後14日間で検出されなくなった。GVHDおよびGVL効果は観察されなかった。

4月20日の骨髄検査で白血病細胞が20%見られた。プレドニソロン+ビンクリスチン+L-アスパラギナーゼ、またはメソトレキセートの投与によって、骨髄中の白血病細胞は5%以内に制御されていた。

(3) 後療法

2006年10月24日、無処理のリンパ球輸注(DLI)第1回目を実施。細胞数は 5.0×10^7 /kgであった。GVHDは発症せず、また11月8日には骨髄中の白血病細胞が14%と、

増加傾向が確認され、プレドニソロン+ビンクリスチン+L-アスパラギナーゼの併用療法を再開した。本化学療法の反復によって、骨髄中の白血病細胞は、再び1%未満に減少した。

2007年2月14日、骨髄中の白血病細胞0.12%の時に、第2回無処理DLIを実施。細胞数は 1.0×10^8 /kgであった。GVHDは発症せず、3月以降は骨髄中の白血病細胞が再度増加傾向を示し、プレドニソロン+ビンクリスチン+L-アスパラギナーゼの併用療法によって病勢制御を試みた。発症当時から抗白血病療法に関連した副作用（後述）の発症により、投薬スケジュールの制限を余儀なくされ、徐々に白血病の病勢が優位になり、白血病細胞が末梢血中にも出現するようになった。治療不応状態に陥り、化学療法を全面的に休止しても、正常造血機能がほぼ廃絶した状態になった。無顆粒球状態が続き、重症感染症を反復した。

初回のTK-DLIから954日後に原病の増悪によって死亡した。直接死因は肺炎であった。即日、病理解剖を実施した。

C. 研究結果

経過中に発症した合併症の総括

(嘔吐・下痢・血液毒性・脱毛を除く)

易感染性（顆粒球減少症と関連した病巣不明の菌血症、縦隔炎、副睾丸炎、膀胱炎）、耐糖能異常（主にL-アスパラギナーゼ、プレドニソロンによる）、心機能障害（主にアントラサイクリン系薬剤、シクロフォスファミド、骨髄移植前処置による）、腎機能障害（骨髄移植前処置、アミノグリコシド

系抗生剤の多用による)、血液凝固異常症(主にL-アスパラギナーゼによる)、脳梗塞・多発脳動脈狭窄(主に全脳照射、L-アスパラギナーゼによる)が認められたが、これらは全て小児白血病の治療と関連して一定の頻度で発症することが記載されているものであり、遺伝子治療の関与を示す所見はなかった。

本遺伝子治療の安全性の確認

準備した遺伝子導入ドナーリンパ球およびTK-DLI直後に採取した患者血液を用いて施行したS+L-test、env遺伝子のPCR、逆転写酵素活性は全て陰性であった。更に継続して患者末梢血中の逆転写酵素活性、env遺伝子の評価を行ったが、一貫して検出されず、増殖性レトロウイルス(RCR)の出現を示す所見は皆無であった。また、病理解剖時に採取した各臓器(中枢神経、性腺を含む)組織をPCRによって検索した結果、HSV-TK遺伝子およびenv遺伝子は検出されなかった。

剖検時に見られた白血病細胞は、発症時のものと同じ形質を示し、遺伝子治療と関連して新たに発症した白血病であることを示す所見は認められなかった。

D. 考察

レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターは、標的細胞のゲノムにランダムに遺伝子を組み込むと考えられている。1例を挙げれば、フランスのNecker病院で、X-SCID(common gamma chain deficiency)を対象として実施した遺伝子治療の臨床研究において、複数の症例においてT細胞性急性リンパ性白血病が発症し、

特定のがん遺伝子の近傍に遺伝子が組み込まれたこととの関連性が確認された。

我々の実施した遺伝子治療において組み込んだ遺伝子は、HSV-TK遺伝子であり、ガンシクロヴィルの投与によって細胞死に導きことができる点で、上記のような事象に対しても安全弁の役割を果たすことを期待できるものであった。

初回の遺伝子治療から954日間の観察期間を得た。遺伝子治療と直接の因果関係を有する有害事象はなく、定期的に行った野生型ウイルスのチェックにおいても、陽性反応は検出されなかった。また剖検時に得られた各臓器サンプルを用いたPCRによって、ウイルスベクターやHSV-TK遺伝子のDNAは検出されなかった。

とりわけ、精巣からもこれらのDNAが検出されなかったことは1個体への遺伝子治療が次世代へも影響する危惧が持たれていることに対する1つの確認事項として重要である。

E. 結論

レトロウイルスベクターおよびヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子・タンパク質による有害事象は観察されなかった。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当論文なし。

2. 学会発表

該当演題なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当事項なし。
2. 実用新案登録 該当事項なし。
3. その他 該当事項なし。

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）
分担研究報告書

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療臨床応用に関する研究

分担研究者 岡田（岩田）真由美 東京都立東大和療育センター小児科 医長

研究要旨 本研究の主任研究者らは、平成 19 年度より厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業「小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用に関する研究」において、稀少な先天性免疫不全症である X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対する遺伝子治療臨床研究実施に向け準備してきた。過去に重大な有害事象が見られていない米国立衛生研究所 (NIH) の Malech 博士が作製したレトロウイルスベクターを用いた日米の共同臨床研究を行う計画である。今年度は、昨年国立成育医療研究センター内の遺伝子治療臨床研究審査委員会 (Institutional Review Board: IRB) において承認された遺伝子治療臨床研究実施計画書を申請書とともに厚生労働省に提出し、厚生科学審議会にて審査が開始された。

A. 研究目的

造血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療を X 連鎖慢性肉芽腫症の患者に対して実施し、わが国の小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子治療臨床研究を実施する。

B. 研究方法

- 1) 平成 22 年度に遺伝子治療臨床研究実施施設である国立成育医療研究センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会 (IRB) で審査を受け承認された遺伝子治療実施計画書、被験者説明書類 (informed consent: IC) およびその他の関係書類を厚生労働省に申請書とともに提出し厚生科学審議会において審査を受ける。
- 2) 米国 NIH の Malech 博士らが 1998 年に製造したレトロウイルスベクター MFGSgp91 のウイルス上清は米国での臨床研究において既に使用済のため、本研究で使用するウイルスベクターは新たに作製する必要がある。米国との共同出資しウイルスベクターの安定供給のための体制を確立する。

(倫理面への配慮)

本研究の実施計画書および説明文書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守して作成し、国立成育医療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科学的および倫理的妥当性について慎重に審議された。

C. 研究結果

- 1) 平成 22 年度に国立成育医療研究センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会 (IRB) が 3 回にわたり行われ、最終的に平成 23 年 2 月 24 日付けで実施計画書が IRB により承認された。平成 23 年 9 月 29 日に厚生労働大臣に対し遺伝子治療臨床研究実施計画申請書を提出した。その後厚生科学審議会科学技術部遺伝子治療臨床研究作業委員会で審議が開始され、同年 11 月 28 日に申請書に関わる意見と照会があり、同年 12 月 22 日に当該研究の総括責任者より回答を行った。
- 2) 平成 22 年度に米国インディアナ大学の National gene vector biorepository (NGVB)

の Cornetta 教授に本研究で使用するレトロウイルスベクターの製造を NIH と共同出資という形で依頼したが、今までのところ当該研究で必要と考えられる遺伝子導入効率が得られたウイルス上清はできていない。日本国内でのウイルスベクターの製造を目指し、BioReliance 社の保有する Master Cell Bank (MCB) を入手しタカラバイオ社において Working Cell Bank 製造を行っている。

D. 考察

当該遺伝子治療臨床研究で使用される MFGSgp91 はレトロウイルスベクターである以上、ベクターゲノムの挿入は避けられない。過去 10 年間に先天性免疫不全症に行われた遺伝子治療のうち、遺伝子治療としては有効であったフランスの X 連鎖複合型免疫不全症 (X-SCID)、ドイツの X-CGD や Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) の臨床研究で白血病や造血系の異常が見られた症例がある。当該研究でもレトロウイルスベクターの危険性と遺伝子治療による発癌の可能性を否定できないことを被験者にできるだけ正確に説明することが必須である。CGD は造血幹細胞移植で根治可能な疾患であるが、HLA 一致造血幹細胞移植ができない症例に対し、当該研究ではなぜ臍帯血移植ではなく遺伝子治療を選ぶのか、遺伝子治療の方が本当に安全性の点で優位であるかを検証していかなければならない。そのため今後も引き続き日本全国の移植実施施設での臍帯血移植を含む造血幹細胞移植の成績を集計しデータを解析していくことが重要である。

欧米ではレンチウイルスベクター等の新規ウイルスベクターを使用した遺伝子治療臨床研究が開始されており、X-CGD についてもドイツと米国の NIH でも計画が進行しているため、MFGSgp91 を使用した遺伝子治療臨床研究への新たな被験者の参加申し込みはないが、当該遺伝子治療臨床研究ではこれから被験者を選定していくことになる。

E. 結論

来年度以降当該遺伝子治療臨床研究が実施されることによって他の稀少な先天性・難治性疾患に対する治療法研究の推進につながると考えられる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載のとおり。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

Ⅲ. 厚生科学審議会科学技術部会関係

遺伝子治療臨床研究作業委員会

平成 24 年 1 月 13 日（金） 13:00～16:10

2012年1月13日 厚生科学審議会科学技術部会 遺伝子治療臨床研究作業委員会議事概要

厚生労働省大臣官房厚生科学課

○日時 平成24年1月13日(金) 13:00~16:10

○場所 厚生労働省 共用第6会議室(2階)

○出席者

(委員)

【全議題】 島田委員長、荒戸委員、小澤委員、斎藤委員、那須委員、水口委員、山口委員

【九大のみ】 大橋委員、小野寺委員、中澤委員

【成育のみ】 谷委員、野々山委員

○議事

議事概要

(概要は以下のとおり。)

九州大病院より申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画(対象疾患:網膜色素変性)について第1回の審議が行われた。

まず、実施計画について総括責任者より説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性について審議が行われた。その結果、本計画は概ね了承されたが、増殖性レンチウイルスの検出に関する事項、未提出の品質管理試験の結果等を確認した後、科学技術部会に報告することとされた。

引き続き、独立行政法人国立成育医療研究センターより申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画(対象疾患:慢性肉芽腫症)について第1回の審議が行われた。

まず、実施計画について総括責任者より説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性について審議が行われた。その結果、本計画は概ね了承されたが、患者への説明文書の修正、適応・評価判定委員会の委員構成等を確認した後、科学技術部会に報告することとされた。

(各遺伝子治療臨床研究実施計画の内容は別紙1及び2参照。)

(別紙2) 遺伝子治療臨床研究実施計画の内容 平成24年1月13日審議分

研究課題名	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究
申請年月日	平成23年9月29日
実施施設及び 総括責任者	実施施設: 独立行政法人国立成育医療研究センター 総括責任者: 国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 部長 小野寺 隆史
対象疾患	慢性肉芽腫症
導入遺伝子 ベクター	ヒトチトクロームb245ベクターポリペプチド(CYBB) 遺伝子 モロニーマウス白血病ウイルス由来レトロウイルスベクター
実施期間及び 対象症例数	厚生労働大臣による了承の日より5年間 5例
治療研究の概要	本研究は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症(CGD)のうち、特にCGDとしては最も症例数が多いNADPHオキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質gp91phoxに変異のあるX連鎖慢性肉芽腫症(X-CGD)に対して有効な治療法を確立することを目的とした臨床研究である。レトロウイルスベクターを用いてgp91phoxをコードするCYBB遺伝子を患者由来造血幹細胞に導入し、これらの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、その安全性と有効性を評価する。
その他(現在実施中の 臨床研究の状況等)	CGDに対する遺伝子治療臨床研究は、1995年に米国で初めて報告され、その後イギリスやドイツなどでも実施されている。米国では、2006年未から本臨床研究と同一のベクターを用いた、ほぼ同一のプロトコルの臨床研究が開始されており、3名に施行されている。

遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿

【独立行政法人国立成育医療研究センター】
「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」

氏 名 所 属

荒戸 照世 ((独)医薬品医療機器総合機構レギュラトリーサイエンス推進部研修課長)

小澤 敬也 (自治医科大学医学部教授)

斎藤 泉 (東京大学医科学研究所遺伝子解析施設教授)

○島田 隆 (日本医科大学医学部教授)

谷 意三朗 (九州大学生体防衛医学研究所長)

那須 保友 (岡山大学病院新医療研究開発センター教授)

野々山 恵章 (防衛医科大学校小児科学講座教授)

水口 裕之 (大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野教授)

山口 照英 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員)

○委員長 (五十首順 敬称略 平成24年1月13日)

<照会先>

大臣官房厚生科学課
研究企画官 尾崎 (内線3803)
バイオテクノロジー専門官 高畑 (内線3820)

電話 03(5253)1111 (代表)
03(3595)2171 (直通)

(照会 : 平成23年11月28日)

回答 : 平成23年12月22日

実施計画申請書に係る意見・照会事項

(独立行政法人国立成育医療研究センター)

○ 研究の背景

1. CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の有効性と安全性に関し、最新の情報を記載してください。特に米国 NIH の症例については、できるだけ最新のデータを集めてください。また、なぜ 2006 年以降、米国で新たな患者がエントリーしていないのか、理由がわかれば記載してください。

(回答)

・ 最新情報に関して

2011 年 12 月 5 日、NIH にて Malech 先生、Kang 先生にお会いし、以下のような患者情報を入手しました。

患者 1 (最新の診察日 平成 23 年 11 月)

遺伝子治療後 5 年目。遺伝子導入細胞率 (活性酸素能を測定するローダミン DHR123 を用いた活性酸素陽性細胞の比率) は治療後 200 日目ごろまでは 1% 台を推移していたが、その後、徐々に減少し、現在は 0.6% 程度。ただ、臨床的にはこの 5 年間、重篤な感染症はなく、また、感染症に対する抗生剤の反応も良く入院既往がない。予防投薬は継続して行っている。

患者 2

遺伝子治療後 6 ヶ月目で治療前よりある真菌感染にて死亡

患者 3 (最新の診察日 平成 23 年 8 月)

遺伝子治療後 3 年目。遺伝子導入細胞率は治療後 40 日目より 0.1% 以下で推移。最近の導入細胞率も 0.03% と低値。ただ、臨床的にはこの 3 年間、重篤な感染症はなく、また、感染症に対する抗生剤の反応も良く入院既往がない。予防投薬は継続して行っている。

患者 1 と 2 に関しては 6 ヶ月おきに NIH にてフォローしているが、特に血液系に異常を認めないため、5 年を超えた患者 1 においては年 1 回のフォローに変更する予定。

有効性に関しては、1) 治療時にあった重篤感染症 (ブドウ球菌の巨大肝膿瘍、アスペルギルス肺炎) は治癒したことから治療効果あり、2) 長期的感染症予防に関しては何らかの効果はあると思われるが、それを科学的に証明するのは難しく、また、あったとしても十分ではない (対照がないことと遺伝子導入効率が低いため)。

・ 遺伝子治療の現状 (なぜ、新規エントリーがないか?) について Malech 先生に確認しました。

1) 使用するウイルス上清が不足し、National Gene Vector Laboratories (NGVL) にてウイルス上清の製造を試みたが、良いウイルスカバの培養上清が製造できなかった。このた

め、現在 BioReliance 社が保有する Master Cell Bank (MCS) の細胞株 15 バイアルを私たちが入手し、現在、タカラバイオ社に依頼して Working Cell Bank の製造を行っている。

- 2) 患者 1 と 3 (患者 2 も同様) で示すように長期間の遺伝子導入細胞率の低さから、十分な予防効果を期待できず、現在、新規ウイルスベクター (レンチウイルス等) を用いた遺伝子治療を計画している。

新規エントリーがない理由は上記であり、ウイルス上清が不足していることとレンチウイルスを用いた新たな遺伝子治療を計画していることによります。レトロ、レンチウイルスの製造に関しては、私達と共同で行っています。

2. SFFV 由来の SF71gp91 に「内在性の癌遺伝子を有する」(概要書 P. 5 及び計画書 P. 35) という表現が正しいか確認をしてください。

(回答)

SFFV が持つ gp51 envelope がマウス Epo 受容体と結合し、赤白血病を発症する知見から記載した文章ですが、ご指摘を通り gp51 は細胞性原癌遺伝子由来の配列を有していませんので、上記表現は不適切です。よって、以下のように訂正します。

概要書 p5 と計画書 p36

旧) MoMLV 由来ベクターとは異なり癌原遺伝子を有し、

新) MoMLV 由来ベクターとは異なりマウスにおいて急性白血病を発症し、

3. 概要書 P. 8 「実施計画」の「6. 予想される有害事象 3) レトロウイルスベクターの危険性」で、WAS においても LMO-2 活性化による T 細胞型急性リンパ性白血病 (T-ALL) の発症がみられていることを記載してください。(患者への説明文書 P. 11 表中では「重い血液の病気、1 人」として記載されています。)

(回答)

ご指摘ありがとうございます。下記のように変更致しました。

概要書 p8

旧) ただ、下記に示すように、造血系異常を起こしやすい状況は、SCID-X1 のように T 細胞が完全に欠損しており、さらに治療遺伝子が共通ガンマ鎖 (gc) のような増殖に関わる遺伝子を使用した場合とドイツ・スイスでの慢性肉芽腫症で使われた SFFV のような強力な LTR を有するレトロウイルスベクターを使用した場合に限られる。

新) 実際、下記に示すように、SCID-X1 やウイスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) のように T 細胞が欠損しているか、T 細胞機能に異常を示す場合ならびにドイツ・スイスでの慢性肉芽腫症で見られたように SFFV のような強力な LTR を有するレトロウイルスベクターを使用した場合に造血系異常が発症している。

また、計画書 36 ページの上記内容を追記しました。

追) また、ウイスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) においても同様に、治療ベクターが LMO-2 遺伝子近傍に挿入されたことによる白血病の発症が報告されている。

4. 概要書 P. 10「備考」及び資料 5 (P. 18~21) に CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療の成績が示されていますが、治療効果の「あり・なし」だけでは情報量として不十分です。安定した時期 (例えば遺伝子治療を実施してから 1 年後) における治療遺伝子を含む顆粒球の割合 (%) と絶対数、機能を回復した顆粒球の割合 (%) と絶対数を具体的に示すべきと考えます。

(回答)

得られた情報 (論文ならびに私信) をもとに遺伝子導入細胞率と活性酸素産生細胞数のグラフ (資料 1-1) と各々の症例の感染症治癒を示します (資料 1-2)。一見してわかることですが、ドイツ・スイスの症例は遺伝子導入細胞が長期にわたり確認できますが、アメリカ、韓国の例では 6 ヶ月程度で 1% 以下の遺伝子導入細胞率になります。

5. 計画書 P. 15「従来の治療法」で、「HLA が完全一致した骨髓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 1 遺伝子異なる場合 (5/6 一致例)、治療成績は 50~60% と低下し」とありますが、その算出根拠を明らかにしてください。(P. 16 の表では、5/6 で生着だけを見ると BM で 67、CB で 75 であり、どこから「50~60%」が出てくるのか不明。)

なお、P. 16 の表には、症例数、死亡例、拒絶例が示されているが、GVHD、感染症、混合キメラ、その他合併症などの移植関連イベントの発症率が記載されると、この治療成績の低下が明らかになるのではないのでしょうか?

(回答)

誤解を招く表現で申し訳ありません。血縁、非血縁を問わず骨髓、臍帯血、末梢血の 5/6 移植は 8 例で死亡例が 2 名、拒絶例が 1 例で、生着率は $5/8 = 62.5\%$ です。ただ、HLA 一致ドナーがない場合、次の行われる血縁骨髓 5/6 で 2 名中 1 名 (50%) しか成功しなかったことから 50~60% 程度としました。計画書 p17 の「50%」を「60%」と訂正致します。及び概要書 (p3) の「50~60% と」を「60% 程度に」

ただ、慢性肉芽症に関しては移植症例数が極めて少なく、また、ご指摘の通り種々の患者状態（前処置の種類、GVHD、感染症の有無等）によりその治療成績が大きく左右されることからこれら値が正確とは思えません。唯一、言えることはHLA6/6一致ドナー移植が一番良いと言えることだけです。

○ 研究実施体制

6.（計画書 P. 42 には、それぞれ「承認された時点」、「実施された時点」で設置するとありますが、）「遺伝子治療臨床研究適応判定委員会」、「遺伝子治療臨床研究評価判定委員会」の委員名を明示するか、別途定めるとある「選任法」（外部委員の数など）を明示してください。

（回答）

「遺伝子治療臨床研究適応判定委員会」及び「遺伝子治療臨床研究評価判定委員会」は本遺伝子治療が承認された段階で設置されるもので、現時点で構成する具体的な委員は決まっておられません。ただ、実行性が優先されるため（適当症例の決定のみならず、有害事象発症に関する first line として機能するため）、極力、成育医療研究センター内の本研究者以外の医師、研究者ならびに社会学専門家を中心に構成する予定です。また、成育医療研究センターでは当センターの倫理委員会の下部機関として基礎医学研究部会、社会医学研究部会、治療研究部会があり、これら部会（特に、治療研究部会）の併用も考えております。資料 2 に「(独) 国立成育医療研究センター倫理予備審査委員会規程」を示します。