

骨髓から末梢血中に CD34 陽性細胞を誘導するための G-CSF 投与に関する有害事象と血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関する有害事象がある。

#### 1) G-CSF 投与に関連する有害事象

##### 軽微なもの

臨床症状：腰痛、胸痛、骨痛、背部痛、関節痛、筋肉痛、発疹、紅斑、悪心、嘔吐、発熱、倦怠感、頭痛、食思不振、動悸、など

血液検査：白血球増加、血小板減少、肝機能異常、尿酸値の上昇、腎機能異常（血清クレアチニン値の上昇）、など

上記、症状は一過性の反応であり、G-CSF 投与後 2、3 日で正常に回復するが、必要に応じて鎮痛解熱剤等を使用し、また、過度な白血球増加や血小板の減少に関しては G-CSF の減量や中止も検討する。

##### 重大なもの

G-CSF に対するアレルギー性ショック、間質性肺炎、血圧低下などがあり、稀な有害事象として、心筋梗塞、脳血管障害、脾臓破裂などがある。なお、投与後の長期的な観察期間において、G-CSF 投与を受けたドナー 2 例（移植症例）に骨髓増殖性疾患と急性骨髄性白血病が発症したとの報告があるため、本遺伝子治療臨床研究においても、慎重に観察を行う。

#### 2) 血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関連する有害事象

CD34 陽性細胞の採取に際しては、血管確保の際に出血、感染症の危険性がある。また、採取中に全身倦怠、手足のしびれ、血管迷走神経反射に伴うめまい、嘔気、嘔吐などがみられることがあり、また、終了時に血小板減少による出血傾向を示す場合もある。

#### 2. ブスルファン投与に関連する有害事象

骨髓造血能抑制効果が強いブスルファンを投与することにより、種々の造血系異常が観察され、必要に応じて輸血や血小板輸注を含め迅速に対応する。また、悪心、嘔吐に関しては 5-HT<sub>3</sub> 拮抗剤である塩酸グラニセトロン（商品名 カイトリル）を投与し、ブスルファンの髄液移行による痙攣誘発に関してはクロナゼパムを使用する。

なお、重大な副作用として肝中心静脈閉塞症（VOD）があり、晩期副作用と

して不妊が上げられる。

### 3. 移植した細胞が生着不全を起こす危険性

遺伝子を導入する細胞は被験者の末梢血由来 CD34 陽性細胞であるが、何らかの理由によりこれら細胞が生着せず、被験者自身の骨髄造血能が回復しない場合がある。これに対しては、被験者末梢血由来 CD34 陽性細胞を採取する際に移植用の CD34 陽性細胞も保存しておき、骨髄生着が見られないときには、これら細胞を投与する。また、保存した細胞の投与によっても骨髄造血能の回復が認められない場合は、緊急的な事態と考え、同種幹細胞移植（HLA 不完全一致）を含めた処置を講ずる。

### 4. 遺伝子導入細胞の投与に伴う有害事象

遺伝子導入細胞投与時に、被験者に発熱、悪寒、筋肉痛などが認められた場合は鎮痛解熱剤などにて適切に対処する。

### 5. RCR 発生の危険性

本臨床研究において RCR が出現する可能性は極めて低い。また、たとえ RCR が PCR などで検出されても、レトロウイルス血症は補体などにより一過性で収束する可能性は高い。ただ、免疫機構が再構築されていない段階での RCR が時に悪性リンパ腫などを引き起こす可能性もあり、細胞投与後は PCR などを用いた検査にて RCR の出現をモニターし、陽性の場合は逆転写酵素阻害剤などにより適切に対応する。

### 6. 染色体へのレトロウイルスベクター挿入による白血病発症の危険性

挿入部位近傍の遺伝子が活性化することによって遺伝子導入細胞ががん化する可能性は否定できないため、抗 gp91<sup>phox</sup> 抗体（7D5）を用いた FACS や定量 PCR 法にて、患者体内の遺伝子導入細胞の動態を追跡し、必要に応じて（増加傾向が確認された場合など）、遺伝子導入細胞のクローン数を確認できる LAM-PCR を行い、その挿入部位を pyrosequence 法にて同定する。

## 9-6-6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

### 9-6-6-1. 遺伝子治療臨床研究の評価方法と評価基準

別表 7 に基づき、本遺伝子治療臨床研究の評価を行う。

#### 1. 被験者への遺伝子導入細胞投与前の評価方法と評価基準

- 1) PCR 及び抗 gp91<sup>phox</sup> 抗体 (7D5) 染色による投与細胞の遺伝子導入効率の解析  
5%以上の遺伝子導入細胞の存在
- 2) 無菌性検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査  
上記検査項目陰性による無菌性等の確認
- 3) RCR 出現に対する Env 遺伝子の PCR  
上記検査項目の陰性による RCR の存在の否定

## 2. 被験者への遺伝子導入細胞投与後の評価方法と評価基準

### 1) 安全性に関して

遺伝子導入細胞投与後より 12 ヶ月目までは 4 週ごと、それ以降 5 年目までは 3 ヶ月ごと、5 年目以降は最低でも 1 年ごとの臨床症状の観察。ただし、何らかの異常を認めた場合は、速やかに分子生物学的検査を含めた詳細な解析。

薬物有害反応判定基準 (別添 9) で grade II を越えない

### 2) 有効性に関して

難治性感染症の改善程度を指標とし、治療前 12 ヶ月間と投与後の CGD 特有の感染症 (皮膚化膿症、膿瘍、細菌・真菌性肺炎、化膿性リンパ節炎、肝膿瘍、肛門周囲膿瘍など) の罹患回数の比較。具体的には、治療前後の発熱日数、外来受診回数、入院回数、入院日数、感染症に対する使用薬剤の種類 (抗菌剤、抗真菌剤)、用量、治療日数、学校・職場などへの欠勤数の比較。また、患者末梢血の遺伝子導入細胞数や好中球活性酸素産生能 (DHR 検査、NBT 検査、ケミルミネッセンス) の比較。

上記難治性感染症の改善、末梢血中に遺伝子導入細胞の確認あるいは好中球活性酸素産生能の上昇

## 9-6-6-2. 中止判定基準

### 9-6-6-2-1. 症例の中止判定基準

治療中およびその後の経過中に下記のような理由で治療の継続が困難になった場合は、総括責任者が治療の中止を決定する。

1. 被験者又は代諾者から離脱の申し出があった場合
2. 観察期間中に被験者との接触が困難となり、経過観察が不可能となった場合
3. 観察期間中に造血幹細胞移植を施行した場合
4. その他、総括責任者が治療の継続を困難と判断した場合

なお、上記の場合であっても、有害事象の発症により被験者の安全が損なわれると考えられる場合は、積極的に経過観察のみなどの追跡調査を患者に依頼する。

#### 9-6-6-2-2. 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準

1. 予測できない有害事象の発生した場合
2. 予測可能な有害事象であっても、その有害事象が重大と考えられる場合
3. 適当・評価判定委員会からの中止要請があった場合

なお、上記理由にて本遺伝子治療臨床研究の継続が困難となったと考えられる場合は、総括責任者は速やかに実施施設長にその旨を報告し、本遺伝子治療臨床研究の新規登録中止を申し出る。

#### 9-6-7. 症例記録に関する記録用紙の様式

担当医師は、「国立成育医療研究センター診療情報諸記録管理規定」（平成14年3月1日施行。以下、「診療情報管理規定」と略）に基づき、臨床研究被験者以外の患者同様、診療録に被験者の容態、診療内容、検査内容、結果、および家族への説明などを記載する。一被験者一診療録として、その管理は国立成育医療研究センター病院運営部調査課の診療録管理担当者が担当する。また、診療録とは別に本遺伝子治療臨床研究の症例記録用紙を作成し、観察項目と臨床検査項目について記録する。

#### 9-6-8. 記録の保存及び成績の公表方法

診療録に準じて実施施設内で保存される。また、成績の公表は被験者の個人情報に十分に留意しながら、2-3に掲げた、本遺伝子治療臨床研究に参加する研究者全員の合意のもとに行われる。

## 10. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報について

### 10-1-1. 個人情報の定義

本遺伝子治療臨床研究における「個人情報」とは、「行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律」（平成 15 年法律第 58 号。以下「個人情報保護法」と略）、「行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律施行令」（平成 17 年 4 月 1 日施行。以下「個人情報保護法施行令」と略）および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づく情報を示すものとし、本遺伝子治療臨床研究に含まれる氏名、生年月日、カルテ番号、住所など、その他の記述により特定の個人を識別できることが可能なものを指す。

なお、本遺伝子治療臨床研究は、遺伝情報を明らかにすることを目的としない。

### 10-1-2. 個人情報の利用目的の特定及び利用目的の通知

本遺伝子治療臨床研究における個人情報の利用目的については、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいて作成された本実施計画の「9-1. 遺伝子治療臨床研究の概要」ならびに「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究の参加のしおり」の「IV 今回の遺伝子治療臨床研究について 1. 目的」（16 頁）に基づくものとする。また、個人情報保護法 第 3 条第 3 項の規定において認められる範囲の利用目的の変更については、改めて本人に通知し、書面によって被験者（未成年者の場合は代諾者）の同意を得る。

## 10-2. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報保護に関する取り組み

本遺伝子治療臨床研究における個人情報は、国立成育医療研究センターが定める保有個人情報管理規定（別添 2）に基づき保護される。

### 10-2-1. 個人情報の正確性の確保

治療結果を含めた個人情報は、「適当・評価判定委員会」で検証されるものとし、その内容の正確性を確保するとともに、常に最新の内容に保つように努める。

### 10-2-2. 安全管理処置

個人情報の組織的、人的、物理的及び技術的安全管理処置については、「個人情報保護法」、「個人情報保護法施行令」および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいた処置を講ずる。

### 10-2-3. 第三者への提供の制限

本遺伝子治療臨床研究は、複数の機関に在籍する研究者による共同研究であり、本遺伝子治療臨床研究に関わる研究者が在籍する機関（以下、「共同研究機関」と略）と得られた結果を共有する可能性がある。このことについては、予め「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究参加のしおり」に記載・説明し、本項についても合わせて書面での同意を得るものとする。また、原則として、共同研究機関以外への被験者個人情報の提供は行わないものとするが、やむを得ず研究・解析などの目的で提供が必要な時は、改めて書面での通知を行い、本被験者の同意を得るものとする。

### 10-2-4. 開示

個人情報の開示手続きについては、「診療情報管理規定」に基づき行うものとする。また、「診療情報管理規定」に基づいて「開示しないことができる場合」に該当する場合は開示をしない。

### 10-2-5. 訂正について

被験者などから、国立成育医療研究センターが保有する、被験者が識別される個人情報の内容が事実ではないとの理由にて、当該情報に対し訂正・追加、または削除を求められた場合には、「診療情報管理規定」に定められた診療情報開示委員会が調査を行い、その調査結果に基づき、実施施設長が必要な内容の訂正を行い、被験者などに通知する。なお、法定代理人などから同様の申し出があった場合は、その事実性などに関し、実施施設長は診療情報開示委員会の答申に基づき、慎重に判断するものとする。

### 10-2-6. 利用停止について

被験者から、国立成育医療研究センターが保有する、被験者が識別される個

人情報を識別できるような個人情報の取り扱いに違反があるとの理由にて利用の停止、あるいは削除を求められた場合は、「診療情報管理規定」に定められた診療情報開示委員会が調査を行い、その調査結果に基づいて、実施施設長が必要な是正処置を講ずるものとする。なお、法定代理人などから同様の申し出があった場合は、その事実性などに関し、実施施設長は診療情報開示委員会の答申に基づき、慎重に判断するものとする。

#### 10-2-7. 開示、訂正、利用停止などができない場合の理由説明

開示、訂正、利用停止などについての申し立てがあった場合、個人情報の開示、訂正、利用の停止などが出来ない場合には、その理由を被験者などに説明する。

#### 10-2-8. 参照、質問

本遺伝子治療臨床研究における個人情報に関する照会方法ならびに質問の受付先などに関しては、「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究参加のしおり」に記載する。

### 11. 利益相反に関して

今回の遺伝子治療臨床研究に関わる全ての研究者、医師はいかなる企業とも利益相反関係にないことをここに示す（当センターにおける COI 委員会に申請済）

## 12. 参考文献

1. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med.* 1957;40:309-312.
2. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA J Dis Child.* 1959;97:387-408.
3. Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics.* 1957;20:431-438.
4. Kang EM, Malech HL. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 2009;43:77-84.
5. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-1476.
6. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2000;343:1703-1714.
7. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature.* 1987;327:717-720.
8. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet.* 1966;1:1225-1228.
9. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:578-584.
10. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000;79:155-169.
11. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, et al. Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients. *Clin Immunol.* 2008;129:103-114.
12. Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N, et al. First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J Clin Immunol.* 2009;29:215-230.
13. Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev.* 1994;138:121-157.
14. Bjorgvinsdottir H, Ding C, Pech N, Gifford MA, Li LL, Dinauer MC.

Retroviral-mediated gene transfer of gp91phox into bone marrow cells rescues defect in host defense against *Aspergillus fumigatus* in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1997;89:41-48.

15. Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, et al. Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study. *Mol Immunol*. 2009;46:1935-1941.

16. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:170-200.

17. al-Tawil YS, Abramson SL, Gilger MA, Paul ME. Steroid-responsive esophageal obstruction in a child with chronic granulomatous disease (CGD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996;23:182-185.

18. Marciano BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, et al. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics*. 2004;114:462-468.

19. Francke U, Ochs HD, de Martinville B, et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet*. 1985;37:250-267.

20. Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. 1989;114:555-560.

21. Kobayashi S, Murayama S, Takanashi S, et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. *Eur J Pediatr*. 2008;167:1389-1394.

22. Finn A, Hadzic N, Morgan G, Strobel S, Levinsky RJ. Prognosis of chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child*. 1990;65:942-945.

23. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324:509-516.

24. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2003;348:2416-2422.

25. Weening RS, Leitz GJ, Seger RA. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study. *Eur J*

Pediatr. 1995;154:295-298.

26. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis.* 2004;39:692-699.

27. Ohga S, Okamura J, Nakayama H, Nagatoshi Y, Ueda K. Interferon-gamma therapy for infection control in chronic granulomatous disease. *Acta Paediatr Jpn.* 1995;37:315-320.

28. 崎山幸雄, 倉辻忠俊, 布井博幸, 他. 慢性肉芽腫症におけるインターフェロン- $\gamma$  長期投与の感染抑制効果-国内 32 施設共同研究報告-. *日本小児科学会雑誌.* 1994;98:1048-1056.

29. Sato T, Kobayashi R, Toita N, et al. Stem cell transplantation in primary immunodeficiency disease patients. *Pediatr Int.* 2007;49:795-800.

30. Filipovich A. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42 Suppl 1:S49-S52.

31. Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood.* 2002;100:4344-4350.

32. Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med.* 2001;344:881-888.

33. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 2006;12:401-409.

34. Seger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol.* 2008;140:255-266.

35. Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M. Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. *Transfus Med.* 2009;19:105-108.

36. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature.* 1986;322:32-38.

37. Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells.* 2003;16:271-277.

38. Porter CD, Parkar MH, Collins MK, Levinsky RJ, Kinnon C. Efficient retroviral transduction of human bone marrow progenitor and long-term culture-initiating cells: partial reconstitution of cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease by gp91-phox expression. *Blood*. 1996;87:3722-3730.
39. Li F, Linton GF, Sekhsaria S, et al. CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1994;84:53-58.
40. Gunzburg WH, Salmons B. Mouse mammary tumor virus mediated transfer and expression of neomycin resistance to infected cultured cells. *Virology*. 1986;155:236-248.
41. Adam MA, Miller AD. Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions. *J Virol*. 1988;62:3802-3806.
42. Goff S. *Retroviridae: the retroviruses and their replication*. Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007:1999-2069.
43. Rosenzweig M, MacVittie TJ, Harper D, et al. Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood*. 1999;94:2271-2286.
44. Davis JL, Witt RM, Gross PR, et al. Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1459-1467.
45. Chen J, Reeves L, Cornetta K. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2001;12:61-70.
46. Fehse B, Roeder I. Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther*. 2008;15:143-153.
47. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:415-419.
48. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118:3132-3142.

49. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:477-488.
50. Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, et al. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest*. 2007;117:2241-2249.
51. Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*. 2007;117:1456-1465.
52. Moreno-Carranza B, Gentsch M, Stein S, et al. Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. *Gene Ther*. 2009;16:111-118.
53. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12133-12138.
54. Sekhsaria S, Fleisher TA, Vowells S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34+ progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase--deficient severe combined immunodeficiency disease patients. *Blood*. 1996;88:1104-1112.

## 資料

1. 実施施設の施設設備の状況 ..... 181
2. 実施施設における本遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、  
動物実験を用いた研究成果 ..... 182
3. 国立成育医療研究センターの CGD に対する治療実績 ..... 185
4. 本遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況 .. 186

添付資料 1	実施施設の施設設備の状況
添付資料 2	培養細胞を用いた至適条件決定実験
添付資料 3	遺伝子導入プロトコル
添付資料 4	患者情報及び臨床経過

## 1. 実施施設の施設設備の状況

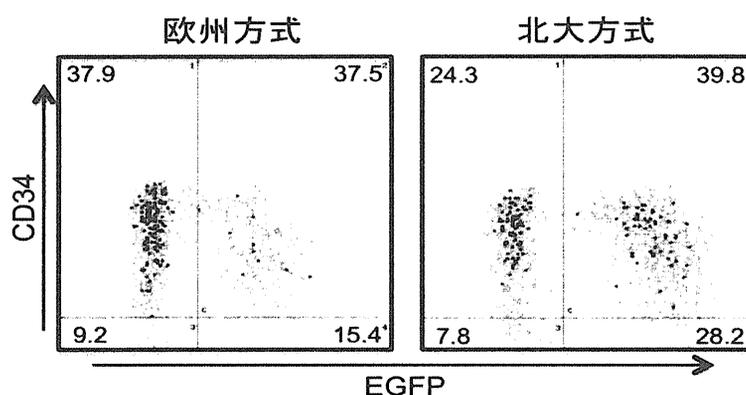
本遺伝子治療臨床研究は国立成育医療研究センター遺伝子・細胞準備室（研究所内）及び治療室（病院内）にて行う。この準備室にはクラス II 安全キャビネット、遠心機、高圧滅菌器を備えており、その物理的封じ込めレベルは P2 である。また、病院内にある治療室は、本遺伝子組換え生物の環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（クリーンルーム）であり、同時に本遺伝子組換え生物（あるいは導入細胞）に直接接触した医療器具等はクリーンルーム内で適切に消毒して、感染廃棄物処理規程に従い廃棄する。実施施設の位置及び概略図を添付資料 1 に示す。

## 2. 実施施設における本遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、動物実験を用いた研究成果

本遺伝子治療臨床研究の実施に向け、以下のような実験を行い、本遺伝子治療臨床研究で行われる患者末梢血 CD34 陽性細胞への遺伝子導入プロトコルの作成に利用した（添付資料 2 参照）

### 2-1 使用するサイトカインの検討

ヒト CD34 陽性細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入には、遺伝子導入前にヒト CD34 陽性細胞を複数の造血系サイトカインにて刺激する必要がある（前刺激）。このサイトカインに組み合わせには、IL-3 を用いる欧州方式（SCF、TPO、FL、IL-3、pre-loading 法）と IL-6、IL-6R を用いる北大方式（SCF、TPO、FL、IL-6、sIL-6R、上清法）があり、本実験では各サイトカインの組み合わせによる CD34 陽性細胞の未熟性の維持と遺伝子導入効率を比較した。

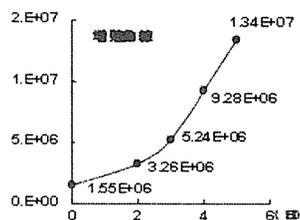
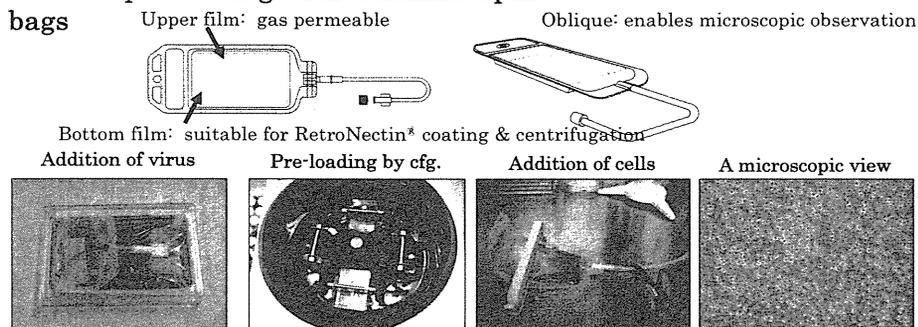


導入遺伝子として緑色蛍光色素タンパク質である EGFP を用い、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に、欧州方式、北大方式にて遺伝子を導入したところ、造血幹細胞維持能（CD34 陽性率）に関しては欧州方式、遺伝子導入効率（EGFP 陽性率）に関しては北大方式が良好な結果を示した。ただ、CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率（CD34<sup>+</sup>EGFP<sup>+</sup>細胞）に関しては同等の結果を示し、いずれの遺伝子導入方法でも使用可能と思われた。

## 2-2 培養バッグの検討

ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入を閉鎖培養系にて行うため、タカラバイオ株式会社が供給しているレトロネクチンコート培養バッグ CultiLife Spin Bag の有効性を検討した。

### ・ Vector pre-loading with CultiLife Spin® bags



### 導入効率

実験 #1 21.4%

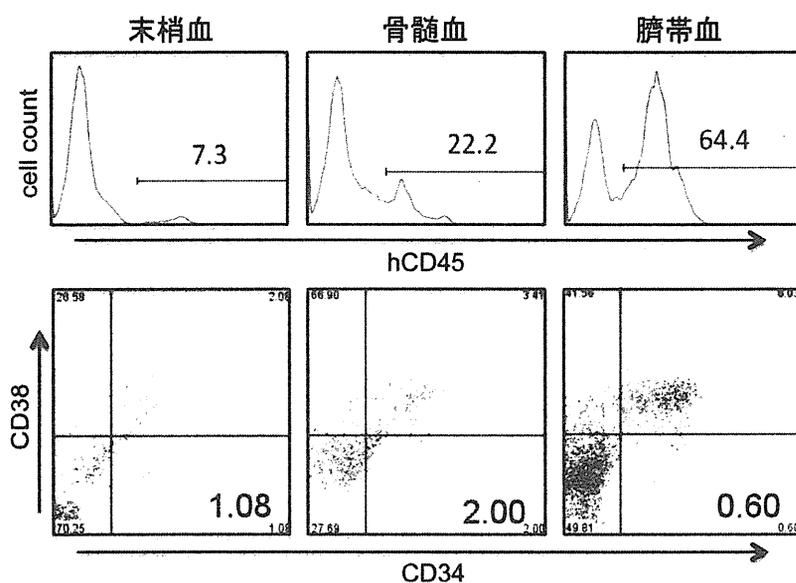
実験 #2 13.6%

実験 #3 19.6%

ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入に関する操作を培養バック（最上段）にて行った。中段左より、ウイルス上清のバッグへの添加、遠心操作によるコーティング、バッグへの細胞投与、顕微鏡下の細胞状態。これら操作にて、生細胞数（cell viability）は 90% 以上であり、また、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率は約 18% であった。

## 2-3 骨髓、臍帯血、末梢血由来 CD34 陽性細胞の性状

遺伝子導入細胞のヒト CD34 陽性細胞の至適ソースを検討するために、ヒト骨髓、臍帯、末梢血由来の CD34 陽性細胞の未熟性を、免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた移植実験にて検討した。



NOG マウスに  $2.5 \times 10^5$  個の CD34 陽性細胞を移植し、移植後 6 ヶ月後のマウス末梢血中に存在するヒト造血細胞 (hCD45 陽性細胞、上段) とその内のヒト未熟造血細胞 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞、下段) の割合を FACS にて解析した。マウス中にヒト造血細胞数は臍帯血が最も多く、また、ヒト未熟造血細胞数 (ヒト造血細胞数  $\times$  CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞の割合) も臍帯血が最多であった。末梢血と骨髓血を比較した時、ヒト未熟造血細胞数は骨髓血の方が多かった。

### 3. 国立成育医療研究センターの CGD に対する治療実績

成育医療研究センターでは、1988 年から 2009 年 1 月までに 35 名の慢性肉芽腫症患者へ診療をおこなった。病型は gp91phox 欠損型 28 名、p22phox 欠損型 3 名、p47 欠損型 1 名、p67 欠損型 2 名、不明 1 名で gp91phox 欠損型は全体の 80% を占めた。死亡例は 7 名、骨髄移植は gp91phox 欠損型 4 名と p22phox 欠損型 1 名に対して行なわれ、全例が完全キメラとなり通常的生活をおくっている。移植例と死亡例を除いた 23 例は 1 歳から 45 歳（平均年齢  $23.3 \pm 12.5$  歳）で、当施設での経過観察中に延べ 203 回の感染症を発症した（図）。Kaplan-Meier 法による 20 年生存率は 80%であったが、成人例の生活の質をみると生存 13 人中常勤として勤務しているのは 2 名、学生 1 名、既婚 2 名であり自立している患者は非常に少ない。

当院経過観察中の慢性肉芽腫症 23 症例における重症感染症の発症頻度および部位

	総数 (%)	年齢 (歳)				
		<1	1-7	8-13	14-17	≥18
肺感染症 (肺炎/気管支炎/胸膜炎)	81 (39.9)	5 (29.4)	21 (33.9)	25 (53.2)	10 (41.7)	20 (37.7)
膿瘍						
肝臓	8 (3.9)	1 (5.9)	5 (8.1)	1 (2.1)	1 (4.2)	0 (0)
皮下/頭蓋内	6 (3.0)	0 (0)	1 (1.6)	0 (0)	1 (4.2)	4 (7.5)
リンパ節	31 (15.3)	2 (11.8)	16 (25.8)	6 (12.8)	3 (12.5)	4 (7.5)
骨髄	14 (6.9)	0 (0)	5 (8.1)	3 (6.4)	2 (8.3)	4 (7.5)
消化管感染症						
大腸炎	9 (4.4)	0 (0)	2 (3.2)	2 (4.3)	1 (4.2)	4 (7.5)
肛門周囲膿瘍	11 (5.4)	4 (23.5)	0 (0)	0 (0)	2 (8.3)	5 (9.4)
その他	9 (4.4)	0 (0)	2 (3.2)	2 (4.3)	1 (4.2)	4 (7.5)
尿路感染症	11 (5.4)	0 (0)	2 (3.2)	5 (10.6)	1 (4.2)	3 (5.7)
敗血症	3 (1.5)	1 (5.9)	1 (1.6)	0 (0)	0 (0)	1 (1.9)
心膜炎	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)
その他	19 (9.4)	4 (23.5)	7 (11.3)	3 (6.4)	1 (4.2)	4 (7.5)
合計	203	17	62	47	24	53

## 4. 本遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況

### 4-1 本遺伝子治療に関連する症例

現在まで欧米（イギリス、ドイツ、スイス、アメリカ）及び韓国において本遺伝子治療臨床研究に関連する臨床研究が実施され、その結果が、論文及び学会等で報告されている。

本臨床研究は、アメリカ国立衛生研究所（National Institutes of Health; NIH）の Harry L. Malech 博士らが行った遺伝子治療とほぼ同一のプロトコルで国際多施設共同研究として行われるため、まずアメリカでの遺伝子治療臨床研究の結果を示す。次に欧州と韓国で行われた遺伝子治療臨床研究の経過を「4-2 関連する研究の成果」の項に示す。

#### 4-1-1 アメリカの症例

1995 年 Malech 博士らは、MFGS-p47 レトロウイルスベクターを用いて p47<sup>phox</sup> 欠損型 CGD 患者 5 名に遺伝子治療を実施した。症例により相違はあるものの、単回の遺伝子導入細胞の投与で、1 ヶ月後頃から活性酸素産生能をもった好中球が末梢血中に 0.01% 程度出現したが、1~2 ヶ月間持続したのち消失したと報告されている（Malech HL et al. Proc Natl Acad Sci USA. 94, 12133-8, 1997）。その後末梢血幹細胞の動員方法およびフィブロネクチンの使用などの改良がなされ、1998 年に再び Malech 博士らは、当該遺伝子治療で使用されるレトロウイルスベクターと同じ MFGS-gp91 を用いて、gp91<sup>phox</sup> 欠損型患者 5 名に遺伝子治療を実施したが、活性酸素産生能は最高でも 1% 以下であった（Malech HL et al. Jpn J Infect Dis 57: 27-8, 2004）。

2006 年末から、当該遺伝子治療とほぼ同一のプロトコルの遺伝子治療が開始された。1998 年に実施された遺伝子治療と同じレトロウイルスベクター MFGS-gp91 を使用し、前処置薬として静注用ブスルファン 10mg/kg を使用した。1 症例では、ロット番号 1 のウイルス上清が使用され、遺伝子導入効率は 73% で、投与後 6~8 週に 1% 程度に減少した。治療 3 週間までの末梢血活性酸素産生細胞は 24% であったが、その後漸減し、6 か月後に 1.12% まで減少したが（第 49 回米国血液学会報告）、治療 2 年後も約 1% を維持している（私信）。治療後 1 年半時点の遺伝子マーキングの結果は、骨髄細胞の定量 PCR が 1% であったが、染色体異常は見られていない。レトロウイルスの挿入部位の検索を経時的に行っており、70 カ所の挿入部位が検出されたが、MDS 遺伝子近傍への挿入は一度認めただのみである。その継続性は不明で、MDS1 近傍への挿入が認められたクローンが優位に増殖するという現象は今のところ見られていない。臨床的には、治療後 4 ヶ月でブドウ球菌による肝膿瘍が縮小し、現在も健在である。もう 1 例は、使用したロット番号 2 のベクターのタイターが低く、遺伝子導入効率が約 30% であった。活性酸素産生細胞も最高で治療後 2 週間に 5.2% までしかあがらず、3 週後に急速に消失した。遺伝子治療後約 4 か月に、重症感染症のため死

亡したが、レトロウイルスの insertional mutagenesis を疑わせる所見はなく、遺伝子治療との因果関係はないと考えられている。

## 4-2 関連する研究の成果

### 4-2-1 ドイツの症例

2004 年にはドイツの Grez らがブスルファン (8mg/kg) を使って骨髄非破壊的前処置を行い、26 歳(症例 1)と 25 歳(症例 2)の患者にレトロウイルスベクター SF71gp91 を用いた遺伝子治療を実施した。活性酸素産生細胞は、それぞれ 55% と 35% の再構築が達成された。症例 1 は治療後 50 日に黄色ブドウ球菌による肝膿瘍が消失し、症例 2 は 53 日に肺アスペルギルス症が消失し、臨床症状の著明な改善を認めた。治療後約 2 年で 2 症例とも、活性酸素産生能が徐々に低下し、導入遺伝子の陽性率と相関しなくなった。LAM-PCR によるベクター挿入部位の解析では、治療後 6 ヶ月までベクターゲノムが挿入されたクローンが多数存在していたが、経過とともにクローン数が減少し、特定のクローン由来の好中球が活性酸素を産生し、かつ増殖優位性を持つようになった。特定のクローンは時期によって変化し、骨髄性白血病発症に関連するがん原性遺伝子 *MDS/Evi1* と *PRDM16* 近傍へ挿入されたクローンが多く認められた(Ott MG, et al. Nat Med 12: 401-9, 2006)。症例 1 は、485 日頃から汎血球減少症が見られ、547 日頃から骨髄の低形成が見られたが重症感染症の罹患はなかった。729 日の顎骨膿瘍摘出術後に敗血症になり、820 日に死亡した。死亡時の骨髄および剖検組織からは、芽球細胞は検出されなかったが、保存検体を用いて染色体の SNP アレイと FISH 検査を行ったところ、646 日の骨髄で 7 番染色体が 1 本(モノソミー7)の細胞が検出された。死亡時の骨髄細胞は 80% がモノソミー7であった。症例 2 は、777 日に汎血球減少症を認め、982 日の骨髄では単核球の 50% がモノソミー7であったが、芽球は認めなかった。1240 日に骨髄で 5% の芽球を認め骨髄異形成症候群と診断された。症例 2 は、その後 HLA 適合ドナーが見つかり移植を受け、造血障害も CGD も治癒し、良好な経過をたどっている (私報)。

### 4-2-2 スイスの症例

2004 年、スイスの Seger らは、ドイツとおなじプロトコルでアスペルギルス脊椎炎により対麻痺を呈した 5 歳の男児 (症例 3) に治療を行った。活性酸素産生能は、治療後 3 週間には 16% あったが、その後急速に減少し 1% 前後となった。しかし麻痺が回復し、臨床的には著効であったという(私報)。この症例は、遺伝子マーキングも最高 5% で、その後 1% 以下になっており、特定のクローンの増殖もなく、造血障害は起っていない。スイスでは、ドイツの症例で有害事象が起った後 2008 年に、治療抵抗性の肺感染症のある 8 歳の CGD 患者に対して、SF71gp91 を使った遺伝子治療を行っている。遺伝子導入効率は、当初 30% であったが、その後 90% まで増加しているという。特定のベクターの挿入部位として、CAMTA1 検出されているが、まだ治療後日が浅いため、詳細はまだ不明である(私報)。