

4-2-3 イギリスの症例

2001年、英国 Institute of Child Health の Thrasher 博士らが gp91^{phox} 欠損型 CGD 患者 1 名にメルファラン(140mg/m²)による骨髄非破壊的前処置の後、米国 NIH の Malech 博士から供与された MFGS-gp91 ベクターを用いた遺伝子治療を行った。治療によって再構築された活性酸素産生細胞は 1%程度であったが、肺アスペルギルス感染症が改善し、臨床的に有効であった。治療 1 年後には活性酸素産生細胞は検出できなくなったが、遺伝子マーキングは長期にわたり検出され、2007 年 12 月時点で、1%未満だが認めている。患者は、CGD 腸炎に罹患しているが、現在も健在である(私報)。

その後、2005-6 年に、前処置にメルファランを使った SF71gp91 ベクターによる遺伝子治療が 2 例に行われたが、遺伝子マーキングが 1%以下で臨床的効果もなかったという(私報)。また、イギリスでも、2007 年のドイツの有害事象の報告後に、重症感染症で治癒の見込みのない患者に対し、患者の利益と危険性について十分に検討した上で、SF71gp91 ベクターを使って遺伝子治療を行い救命しえたという(私報)。

4-2-4 韓国の症例

韓国では、ソウル国立大学の Kim 博士らによって開発された MT-gp91 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究が 2007 年より開始された。前処置薬としてブスルファン 6.4mg/kg とフルダラビン 120mg/m²が使用され、2009 年 1 月現在までに 2 例(18 歳と 9 歳)に実施している。活性酸素産生細胞は、それぞれ 2 週間後に 6.4%と 14.6%、であった。3 か月後には 1%まで減少し(第 14 回日本遺伝子治療学会報告)、治療後 1 年半と 1 年の現在 1%以下となっている(第 50 回米国血液学会報告)。治療効果についての詳細は明らかにされていないが、2 症例とも生存しており、造血障害はおこっていない。

4-3 当該遺伝子治療関連症例の臨床結果のまとめ

前述のように、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究は、アメリカ、ドイツ、スイス、イギリス、韓国において行われ、その臨床結果が学会等にて報告されている。使用されたレトロウイルスベクターは、欧州 3 カ国、アメリカ、韓国で異なっていた。表 1 に、現在までに遺伝子治療が実施された 23 例のベクター、前処置、治療効果、造血異常の有無についてまとめた。

開始年	実施国	病型	ベクター	症例数	前処置	治療効果	造血異常
1995	アメリカ	p47(-)	MFGS-p47	5	なし	なし	なし
1998	アメリカ	X-CGD	MFGS-gp91	5	なし	なし	なし
2001	イギリス	X-CGD	MFGS-gp91	1	メルファラン	あり	なし
2004	ドイツ	X-CGD	SF71gp91	2	ブスルファン	あり	あり
	スイス	X-CGD	SF71gp91	1		あり	なし
	イギリス	X-CGD	SF71gp91	3		一部あり	なし
2006	アメリカ	X-CGD	MFGS-gp91	3	ブスルファン	あり	なし
2007	韓国	X-CGD	MT-gp91	2	ブスルファン フルダラビン	-	なし
2008	スイス	X-CGD	SF71gp91	1	ブスルファン	あり	なし

欧州で使用されている SF71gp91 は、プロモーターに工夫がなされており、骨髄系細胞において効率良く導入遺伝子を発現させる特性がある。ただ、この特性により白血病などの造血系腫瘍を発症しやすいことも報告されている。ドイツでの患者で見られた造血異常は、SF71gp91 ベクターが癌原遺伝子の MDS1 近傍に挿入されたことにより誘発されたと考えられている。

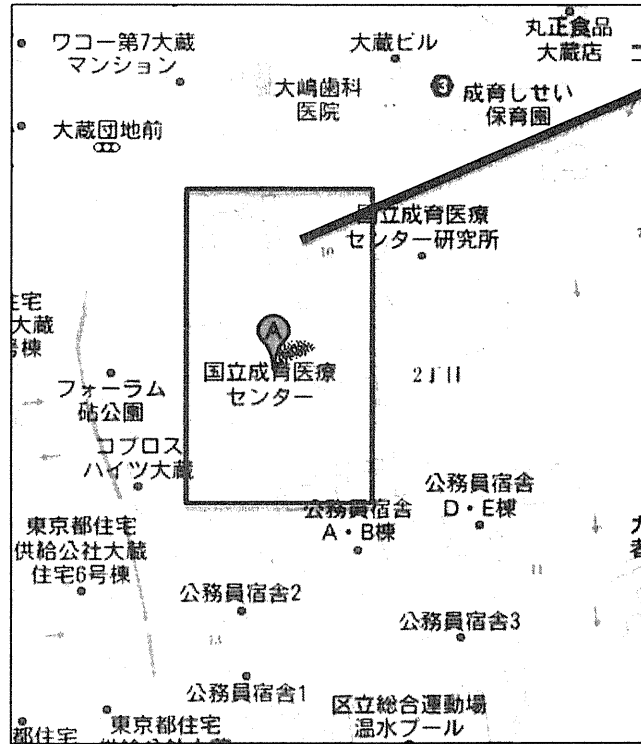
本遺伝子治療臨床研究で使用される MFGS-gp91 は、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターで、SFFV に比べて導入遺伝子の発現効率は悪いが、白血病等の造血異常は発症しにくい。ただ、レトロウイルスベクターである以上、宿主染色体挿入による白血病発症の危険性は避けることは困難である。したがって、被験者の利益と危険性について十分な検討がなされた上で遺伝子治療臨床研究がなされるべきものと考えられる。

添付資料 1 :

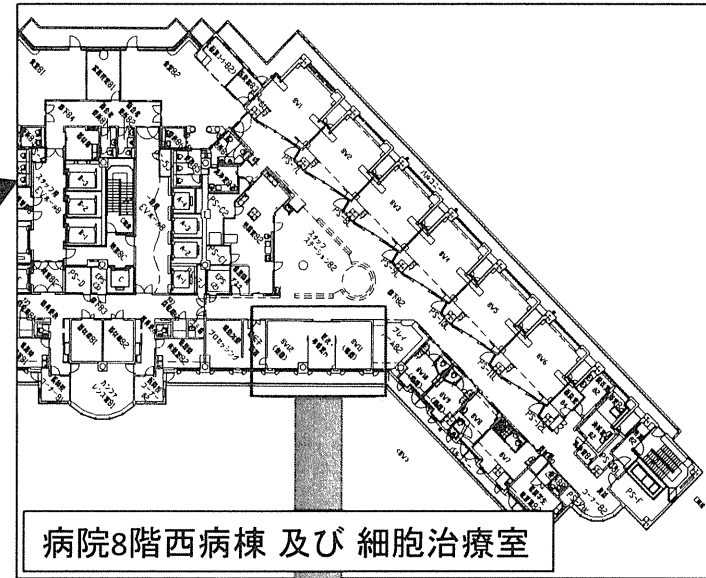
実施施設の施設設備状況

(独) 国立成育医療研究センター病院・8階西病棟・細胞治療室

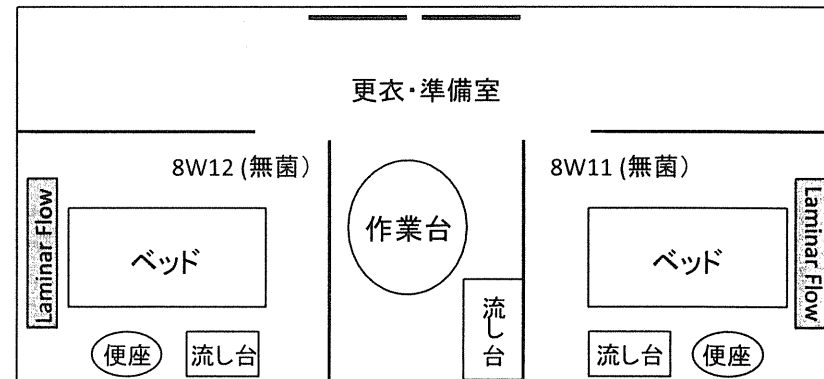
(独) 国立成育医療研究センター病院
東京都世田谷区大蔵2-10-1



(Google mapより)

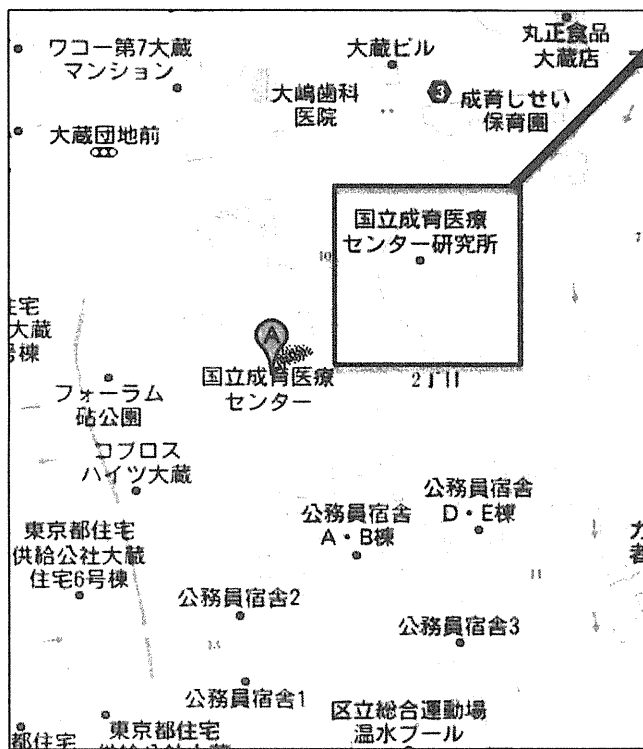


病院8階西病棟 及び 細胞治療室

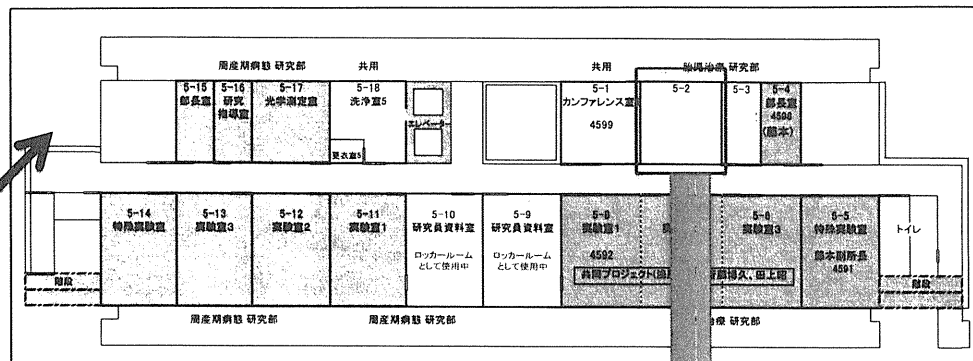


(独) 国立成育医療研究センター研究所・5階・遺伝子細胞調製室

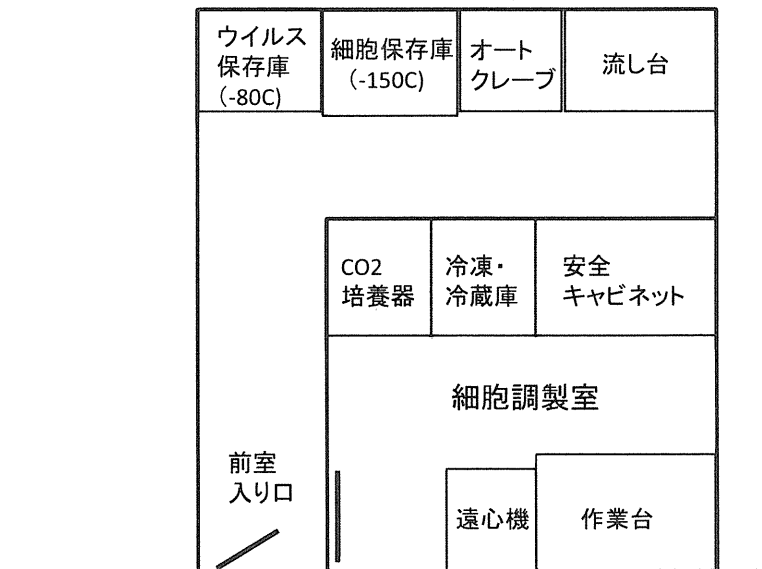
(独) 国立成育医療研究センター研究所
東京都世田谷区大蔵2-10-1



(Google mapより)



研究所5階5-2 遺伝子細胞調製室



廊下

添付資料 2 :

培養細胞を用いた至適条件決定実験

CGD 遺伝子治療のための前臨床研究

国立成育医療研究センター研究所

実験材料、および器具

- 1) ヒトリンパ球
 - 骨髄 CD34+細胞 (LONZA)
 - 臍帯血 CD34+細胞 (東京臍帯血バンクより分与)
- 2) 培地
 - DMEM(SIGMA)
 - RPMI1640(SIGMA),
 - StemPro-34
 - SFM(GIBCO.BRL),
 - X-Vivo10(LONZA),
- 3) 血清、血漿
 - ウシ胎仔血清
 - 献血アルブミン-wf (田辺三菱製薬)
- 4) サイトカイン
 - ヒトリコンビナント SCF (R&D systems)
 - ヒトリコンビナント IL-3 (R&D systems)
 - ヒトリコンビナント Flt3/Flk2 ligand (R&D systems)
 - ヒトリコンビナント TPO (R&D systems)
- 5) 抗体
 - CD19-FITC (Beckman Coulter)
 - CD38-FITC (eBioscience)
 - CD33-PE (Beckman Coulter)
 - CD34-PE (Beckman Coulter)
 - CD45-PC5 (Beckman Coulter)
 - CD38-PC5 (Beckman Coulter)
 - CD3-PC7 (Beckman Coulter)
 - The CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec)
- 6) FN (Retronectin, Takara Bio)のコーティング
 - (1) Retronectin 2.5mg を蒸留水 (DDW) 2.5ml で溶解する (1mg/ml)
 - (2) さらに、PBS を加え 125ml に希釈する (20mg/ml)
 - (3) 3.5cm dish では 2ml、CultiLife Spin では 40ml を用いて、4 度でオーバーナイトでコートする。
 - (4) Retronectin 溶液を回収し、2%HSA/PBS を 40ml 加え、室温で 30 分放置。
 - (5) 2% HAS/PBS を回収し、40ml の PBS で 2 回洗浄しコート完了。
 - (6) 使用するまで 4 度で保存。
- 7) 機器
 - (1) 安全キャビネット

- (2) 冷却遠心機 (EX-125、TOMY)
 - (3) フローサイトメーター (FC500、Beckman Coulter)
 - (4) AutoMACS (Miltenyi Biotec)
- 8) マウス
- (1) NOG マウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug/Jic})
- 9) その他
- (1) CullitiLife Spin (TAKARA Bio)

遺伝子導入プロトコルの比較検討

(目的) ヒト造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) への遺伝子導入法として、欧州で用いられている IL-3 を用いるプロトコルと北海道大学大で行われた ADA 欠損症に対する遺伝子治療の際に用いられた IL-6、sIL-6R を用いるプロトコルがある。いずれのプロトコルが至適かを検討する。両者の違いは、サイトカインの組み合わせとウィルスの感染方法にある。

欧州 : SCF(300ng/ml), TPO(100 ng/ml), FL(300 ng/ml), IL-3(60 ng/ml)

Pre-loading 法

北大 : SCF(50 ng/ml), TPO(50 ng/ml), FL(300 ng/ml), IL-6(100 ng/ml), sIL-6R(500 ng/ml)

Supernatant infection 法

(実験方法) 使用した細胞は臍帯血 CD34+ 細胞、使用したウィルス上清は PG13/GCDNsapEGFP、レトロネクチンは RetroNectin[®] Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mmφ) を使用した。遺伝子導入操作は以下のように行った。

欧州方式

Day 0: 臍帯血より Ficoll 比重遠心法にて単球画分を分取、この画分から The CD34 MicroBead Kit を用いて CD34+細胞を分取し、X-Vivo10 に 1×10^6 cells/dish となるように調整し、欧州サイトカインの組み合わせにより培養開始

Day 2: RetroNectin[®] Dish に 1ml のウィルス上清を加え、室温で 4 時間振盪しウィルスをコートした dish を用意する。細胞を回収しサイトカインを添加した新たな培地に懸濁、用意しておいたウィルコート済みの dish に捲き 32 度、1000g の条件で 30 分遠心を行い感染を行う。遠心終了後そのまま 37 度、5% CO₂ の条件で培養。

Day 3: Day 2 と同様の操作を行う。

Day 4: Day 2 と同様の操作を行う。

Day 5: 細胞を回収し FCM で解析

北大方式

Day 0: 臍帯血より Ficoll 比重遠心法にて単球画分を分取、この画分から The CD34 MicroBead Kit を用いて CD34+細胞を分取し、X-Vivo10 に 1×10^6 cells/dish となるように調整し、欧州サイトカインの組み合わせにより培養開始

Day 2: 細胞を回収、2 倍量のサイトカインを添加した培地と同量のウィルス溶液に細胞を懸濁し RetroNectin[®] Dish 捲く。32 度、1000g の条件で 30 分遠心を行い感染を行う。遠心終了後そのまま 37 度、5% CO₂ の条件で培養。

Day 3: 細胞を回収し Day 2 と同様の操作を行う。ただし細胞をまくのは Day 2 に使用した dish と同じものをしようする。

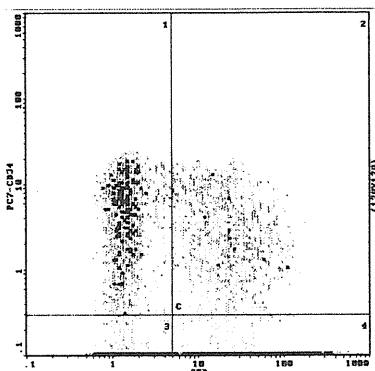
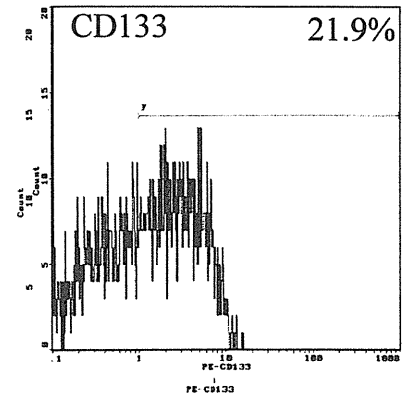
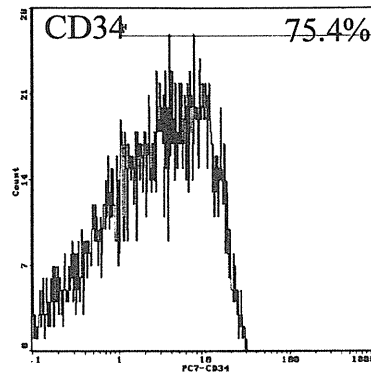
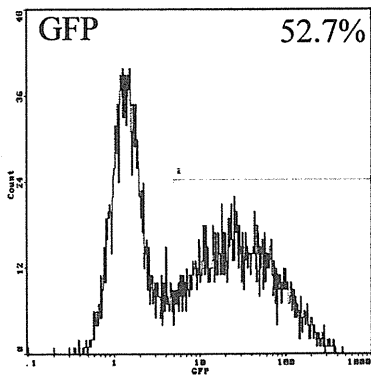
Day 4: Day 3 と同様の操作を行う。

Day 5: 細胞を回収し FCM で解析

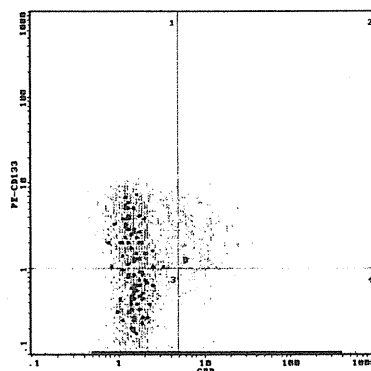
(結果)

遺伝子導入効率は北大方式が 68%、欧州方式が 52.7%と若干であるが北大のカクテルが高い効率をしめした。造血幹細胞が含まれると考えられている CD34+,CD133+各分共に約 21%の割合であった。

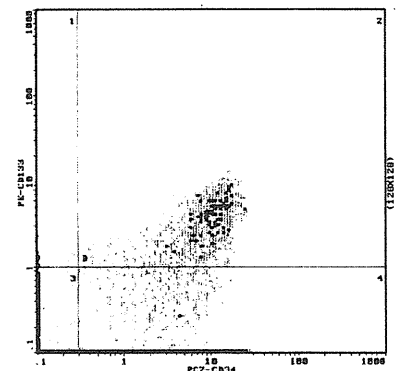
欧州



ID	%	Count	Mn X	Mn Y
C1	37.9	3559	1.49	3.58
C2	37.5	3515	25.4	2.88
C3	9.22	865	1.39	0.128
C4	15.4	1442	43.9	0.115

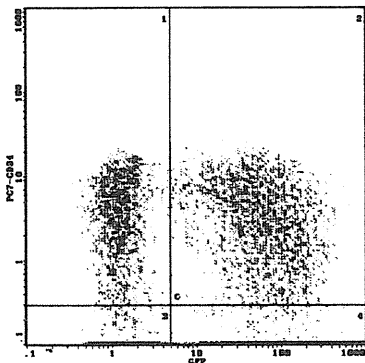
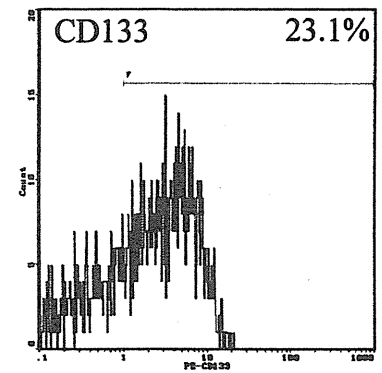
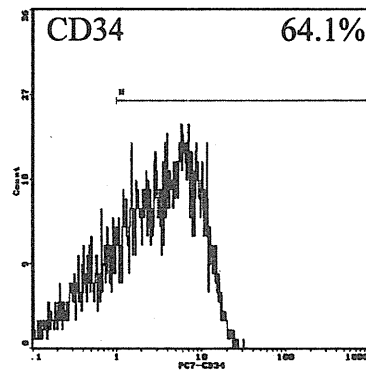
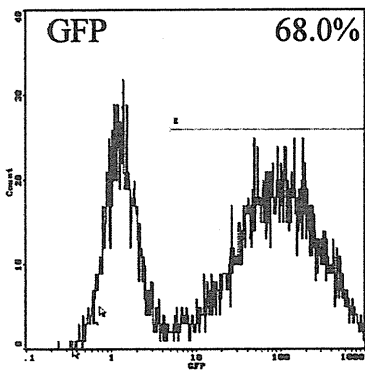


ID	%	Count	Mn X	Mn Y
B1	16.1	1586	1.52	3.85
B2	5.85	549	11.8	2.94
B3	31.1	2918	1.45	0.169
B4	47.8	4488	33.7	0.118

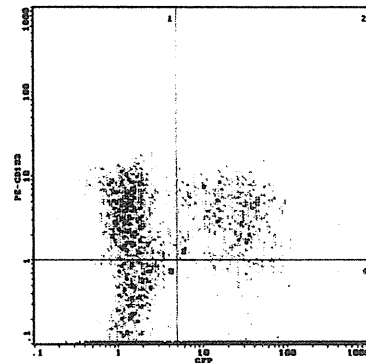


ID	%	Count	Mn X	Mn Y
D1	0.59	55	0.136	1.44
D2	21.3	2000	7.18	3.88
D3	24.8	2252	0.117	0.123
D4	54.1	5874	2.31	0.134

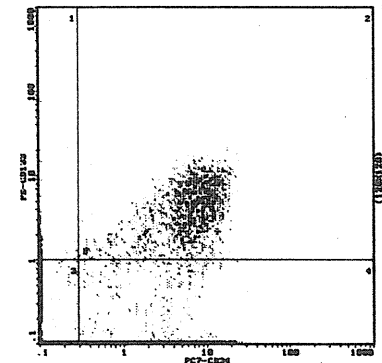
北大



ID	%	Count	Mn X	Mn Y
C1	24.3	2319	1.26	3.88
C2	39.8	3889	57.3	2.84
C3	7.69	735	1.45	0.117
C4	28.2	2697	166.2	0.108



ID	%	Count	Mn X	Mn Y
B1	13.8	1323	1.35	3.67
B2	9.23	892	23.1	3.88
B3	18.1	1731	1.26	0.178
B4	58.8	5624	110.1	0.108



ID	%	Count	Mn X	Mn Y
D1	1.17	112	0.121	1.85
D2	21.9	2093	5.54	3.86
D3	34.7	3328	0.110	0.118
D4	42.2	4035	2.10	0.122

(考察) IL-6, siIL-6R を用いる北大のサイトカインカクテルが IL-3 を用いた欧州のサイトカインカクテルとほぼ同様の幹細胞維持効果を示し、より効率よい遺伝子導入効率を示した。これらのことから、IL-6, siIL-6R を用いる北大のサイトカインカクテルが有用であると考えられる。レトロネクチンコートを用い方に関しては欧州方式が良いと考える。これは、ウイルスは 37°C の条件下では約 2 時間で失活するためである。以上のことより、サイトカインカクテルは北大方式を用い、レトロネクチンの用い方は欧州方式を取り入れるのが有用であると考えられた。

バックの評価

(目的) 無菌的に感染操作を行うには医療用バックの使用が必須になるが、日本で入手できレトロネクチンコートが可能なものとしてはタカラバイオから発売予定(現在は発売中)の CultiLife Spin Bag だけである。その有用性を検討する。

(実験方法) 使用した細胞は骨髄 CD34+細胞、使用したウイルス上清は SF71gp91phox、レトロネクチンは凍結乾燥 RetroNectin[®]を使用した。遺伝子導入操作は以下に示す。

Day 0: CultiLife Spin 2 枚をレトロネクチンコートし 4℃に保存。

骨髄 CD34+細胞を X-Vivo10 に 1% HSA, SCF(50 ng/ml), TPO(50 ng/ml), FL(300 ng/ml), IL-6(100 ng/ml), sIL-6R(500 ng/ml)添加した培地で 1×10^5 cells/ml となるように調整しバックで培養開始

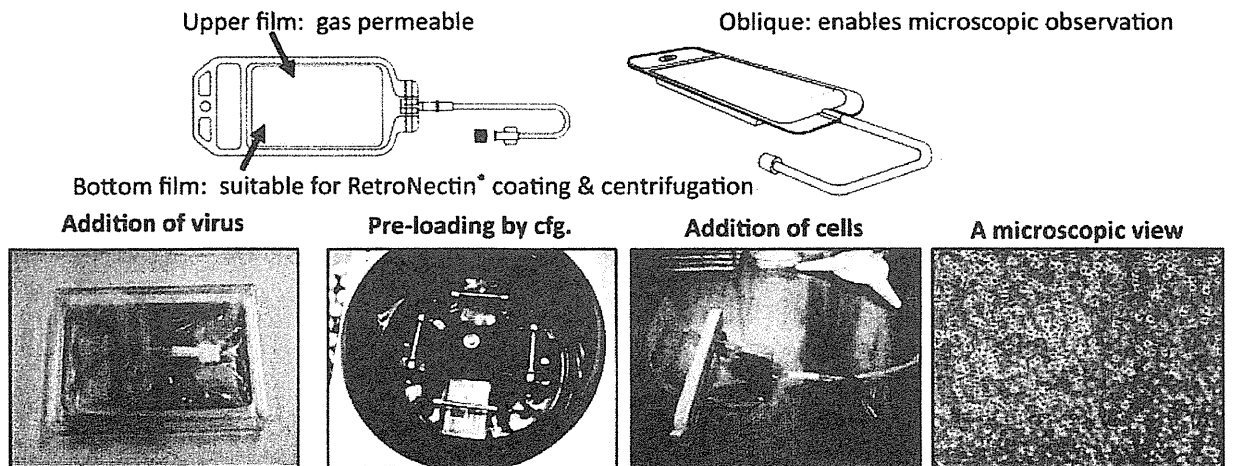
Day 2: レトロネクチンコートしたバッグに 40ml のウイルス液をいれ、チューブの中央付近をシールし、その両脇 5mm ほどの場所もシールです。最初にシールした部分でチューブを切断し、遠心用の補助容器にいれ 32℃, 1000g, 2hr 遠心する。遠心後、40ml の 1% HAS/PBS で wash しウイルスのプレコート完了。

感染: バッグから培養液を回収、10ml の 1% HAS/PBS で 2 回、wash し、その wash 液も回収、32℃ 200g 15min 遠心を行う。できるだけ上清を取り除き、サイトカイン入りの X-VIVO 10 (1% HAS)に懸濁する。細胞数をカウントし 1×10^5 cells/ml となるように培地を加え、ウイルスをプレコートしたバッグに移し感染開始

Day 3: 2 日目と同様の感染操作を行う。

Day 4: 細胞を回収し FCM 解析を行う。感染効率を評価するためコロニーアッセイを行った。

• Vector pre-loading with CultiLife Spin[®] bags



(結果) 4日目の回収時点での細胞数は $\sim 3.0 \times 10^6$ 個 ($\sim 60\% \text{ CD34}^+$), 生細胞率 $\sim 100\%$ であった。SF71gp91^{phox} 陽性コロニーは21.4%であった。

(考察) 比較的低力価 ($\sim 1 \times 10^5$ ifu/ml) のウイルスを用いて2回だけの感染ということ を考慮すると今回の結果は妥当なものとする。遠心操作を行ってもバックの破れ等確認されなかったことから耐久性も問題ないとする。

骨髄、末梢血、臍帯血由来 CD34+細胞の性状の比較

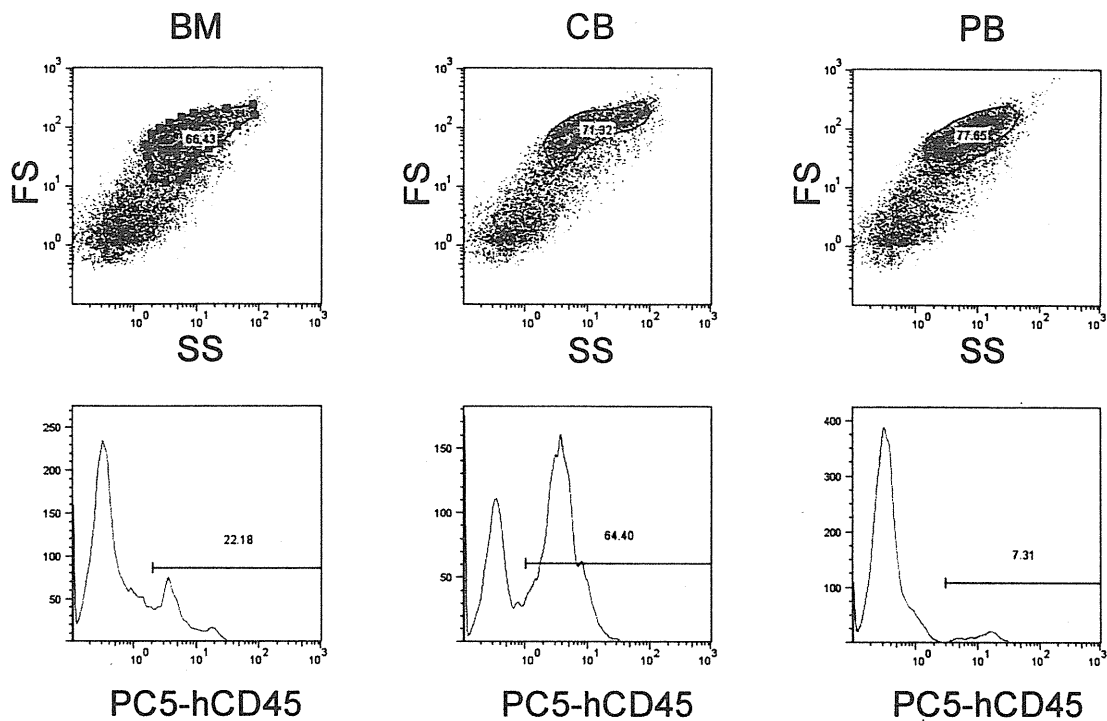
(目的) 造血幹細胞遺伝子治療において、その組織由来の CD34 陽性細胞を利用するかは重要な問題である。特に、高い未分化性を持った幹細胞の利用が重要であるが、現在、利用可能な造血幹細胞として、骨髄、末梢血、臍帯血由来の CD34 陽性細胞が考えられる。ここでは、マウスを用いた移植実験により各々の細胞の未熟性を検討する。

(実験方法) 骨髄、末梢血、臍帯血、各由来の CD34+細胞を 2.5×10^5 cells/mouse の割合で NOG マウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/Jic) に移植する。移植する NOG マウスは事前に 2.5Gy の X 線照射を行ったものを用いる。移植後 6 か月目に解剖し解析を行う。

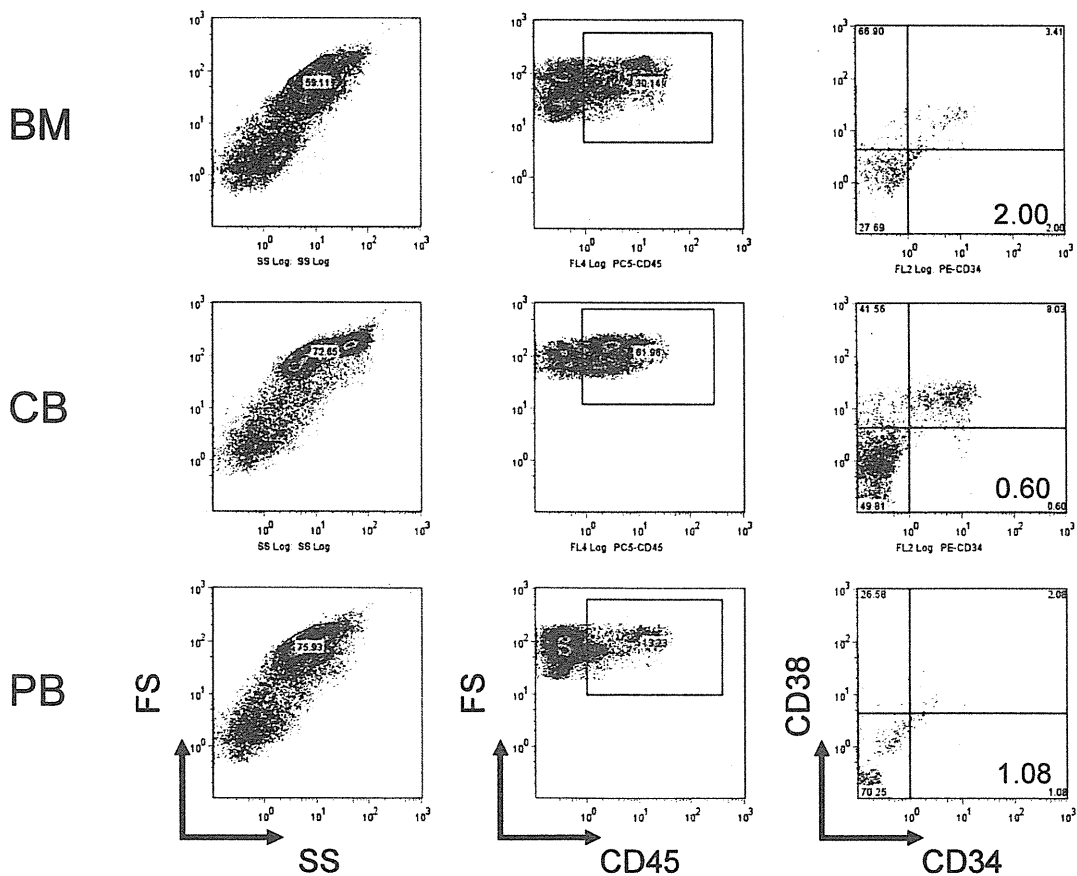
(結果) 下記の解析図を参考。移植後 6 ヶ月目の骨髄におけるヒト CD45 細胞のキメリズムは臍帯血 約 68%、骨髄 約 22%、末梢血 約 7%であった。造血幹細胞が含まれると考えられる CD34 陽性 CD38 陰性画分の割合は臍帯血 約 0.6%、骨髄 約 2%、末梢血 約 1.08%であった。

(考察) 移植マウスの骨髄のキメリズムは、臍帯血>骨髄>末梢血の順であった。また造血幹細胞が含まれる CD34 陽性 CD38 陰性画分の割合は骨髄>末梢血>臍帯血>の順に高いが、細胞数という要因を考慮すると臍帯血>骨髄>末梢血の順でより多くの幹細胞が維持されていることが考えられる。これらの結果からも臍帯血が CD34+細胞のソースとしては最適であると考えられる。しかし遺伝子治療という観点から考えた場合、その選択は骨髄か末梢血由来と考えられるため、現時点では骨髄由来の CD34+細胞が適当と考えられる。

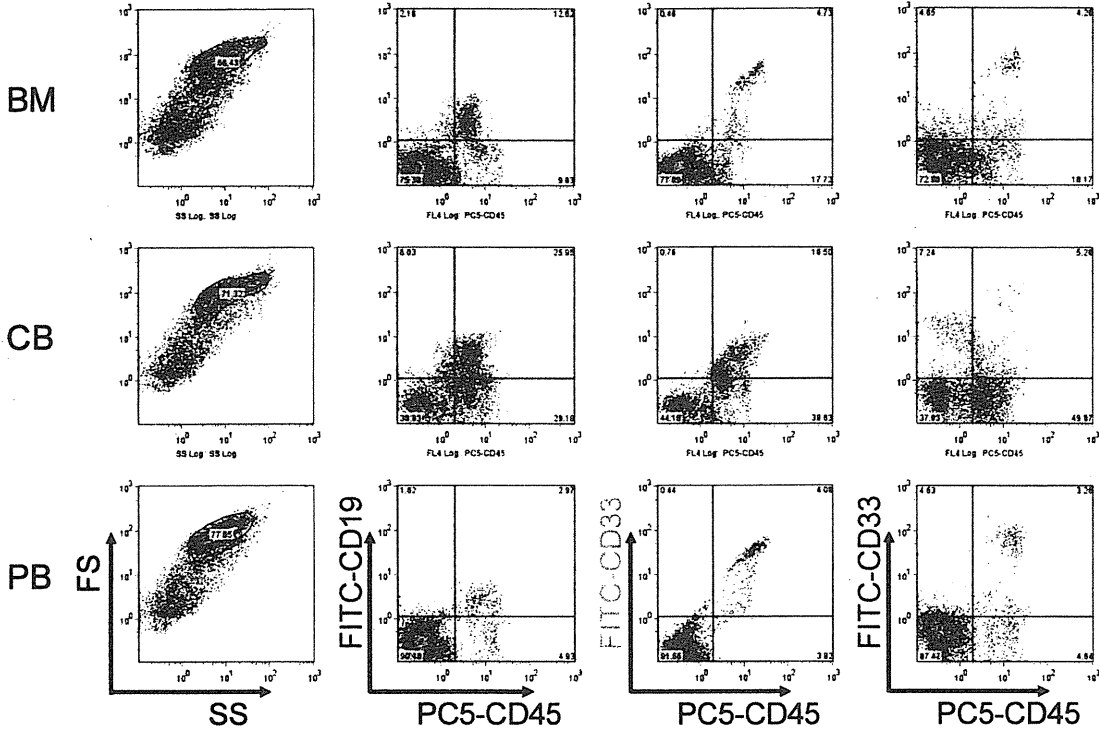
NOG miceキメラ率の比較(移植後6カ月)



NOG mice BM 解析比較1



NOG mice BM 解析比較2



添付資料 3 :

遺伝子導入 SOP

細胞調製部門 (CELL PROCESSING SECTION) 用

標準操作手順書 (STANDARD OPERATING PROCEDURE)

DTM-SOP-

改訂年月日: _____

運用開始日: _____

運用終了日: _____

操作手技名: X-連鎖慢性肉芽腫症の治療を目的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入 (Retroviral Gene Transfer for Treatment of X-Linked Chronic Granulomatous Disease)

執筆者: Elizabeth Kang

改訂者: Elizabeth Kang

承認者: _____ 承認年月日: _____

Elizabeth Read, MD 医療ディレクター, CPS

Charles S Carter, BS 技術ディレクター, CPS

Jo L Procter, MEd, MT(ASCP)SBB QA Officer, CPS

年次校閲:

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

校閲者 _____ 年月日 _____ 医療ディレクター _____ 年月日 _____

**X-連鎖慢性肉芽腫症 (XCGD) の治療を目的とした
レトロウイルスベクターによる遺伝子導入
(フィブロネクテン断片をコートしたガス透過性バッグ内における
CD34+ 造血幹細胞への遺伝子導入)**

基本概念

造血幹細胞を標的とする体外 (*ex vivo*) 遺伝子治療は、造血細胞の発生分化または機能に異常を有する多くの先天性または後天性疾患を治療しうる実験的治療手段である。ここで述べる造血幹/前駆細胞への正常遺伝子の導入手技は、X-連鎖慢性肉芽腫症 (好中球がその機能に必須のオキシダーゼを欠損することで免疫システムに異常をきたす先天性の免疫不全症) の治療を目的として行うものである。遺伝子導入の標的は、アフレーシスにより採取し、cGMP グレードの機器と試薬を用いて分離した末梢血動員自己 CD34+ 細胞である。CD34+ 幹細胞は、生物工学により作製され X 連鎖 CGD を治療するための Gp91phox 正常遺伝子を発現する自己複製能欠損型のレトロウイルスベクターにより、*ex vivo* の培養系で4日間に渡り遺伝子導入される。第4日めの午後 (初回遺伝子導入から 3.5 日後)、細胞は回収、洗浄され、(一部は) 検査され、(残りは) 経静脈的に患者へと投与される。患者は、長期間にわたって末梢血での Gp91phox 遺伝子発現と機能修復された好中球の出現について観察される。

目的

CGD 患者の (治療の) ために Gp91phox 遺伝子の修復された末梢血幹細胞を作製すること。遺伝子修復された (造血) 幹細胞の投与後、患者 (血液) 中に分化・出現する正常好中球を評価すること。

方針

アンフォトロピックエンベロープにより被覆された自己複製能欠損型の MFGS-Gp91 phox ベクターを遺伝子導入に用いる。

適用範囲

この手技は次のプロトコールにおける使用を目的としている : Protocol 05-I- entitled "AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF GENETICALLY MODIFIED CELLS FOR THE TREATMENT OF X-LINKED CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE", FDA IND-BB-6100, an investigator-held IND. 主任研究者は Dr. Elizabeth Kang (NIAID, NIH) である。