

201219003A

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24年度総括・分担研究報告書

平成25年（2013年）3月

研究代表者

小 野 寺 雅 史

平成 24 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・・・	1
II. 分担研究報告			
1. 海外での遺伝子治療の現状と日本との相違点		小野寺雅史・・・	9
2. 慢性肉芽腫症における次世代遺伝子治療開発に向けた基礎的研究		大津 真・・・	13
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・・・	16
4. PKU 遺伝子治療におけるコドン最適化の試み		久米 晃啓・・・	20
5. 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 脂肪細胞を用いた遺伝子治療の臨床応用について		福島 敬・・・	25
6. 慢性肉芽腫症腸炎における血中サイトカインの検討		布井 博幸・・・	31
7. 北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) の 集計結果からみた 慢性肉芽腫症の死亡要因		有賀 正・・・	36
8. 副腎白質ジストロフィーのマス・スクリーニングシステム確立に関する研究		奥山 虎之・・・	39
9. 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		岡田(岩田)真由美・・・	43
10. 造血幹細胞遺伝子治療の実施に向けた病院環境整備と 閉鎖回路系遺伝子導入の実施		河合 利尚・・・	46
11. 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・・・	49
III. 研究成果の刊行に関する一覧表			53
IV. 研究成果の印刷物・別刷			61

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

研究代表者 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行うことで、その安全性と有効性を評価し、これら結果を基に我が国の独自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。

遺伝子治療の実態調査として、1. 海外の遺伝子治療の現状調査と日本との比較、前臨床研究として、2. 疾患モデルマウスを用いてサイトカイン・キモカインからみたCGD造血幹細胞機能解析、3. 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子導入部位解析、4. PKU遺伝子治療における治療遺伝子のコドン最適化に関して、5. LCAT欠損症に対する遺伝子改変脂肪を用いた遺伝子治療の検討などを行った。臨床研究としては、6. 慢性肉芽腫症腸炎における血中サイトカインの検討、7. 原発性免疫不全症患者データベース（PIDH）からみた慢性肉芽腫症の死亡要因に関しての検討、8. 副腎白質ジストロフィーにおけるマススクリーニング法の確立、当センターにおける遺伝子治療実施体制に関しては、9. 当センター病院における相互連携を含めた環境整備と細胞調製室の整備ならびに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の整備を行った。

なお、CGDに対する遺伝子治療臨床研究は、厚生労働大臣により平成25年6月14日付で了承され、現在、対象患者を選定中である。

研究分担者・所属機関・職名

河合 利尚
国立成育医療研究 C 成育遺伝研究部・室長
中林 一彦
国立成育医療研究 C 周産期病態研究部・室長
奥山 虎之
国立成育医療研究 C 臨床検査部・部長
瀧本 哲也
国立成育医療研究 C 臨床研究 C・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
自治医科大学分子病態治療研究 C 遺伝子治療
研究部・准教授
大津 真
東京大学医科学研究所幹細胞治療研究 C・
特任准教授
福島 敬
筑波大学人間総合科学研究科小児内科学分野
・准教授
岡田 真由美
東京都立東大和療育 C 小児科・医長

A. 研究目的

近年の分子生物学的進歩により数多くの小児先天性・難治性疾患の診断や病態解明が可能となってきたが、治療法に関しては造血幹細胞移植が有効な疾患もあるものの、その多くが根治療法に乏しい疾患である。また、造血幹細胞移植に関してもドナーのHLA適合性に一定のハードルがあり、また、たとえ造血幹細胞移植が有効な疾患であったとしても、感染症等の合併から全ての症例が造血幹細胞移植の対象となるわけではない。さらに、小児先天性疾患の場合、その症例数は決して多くはなく、これら難治性疾患に対する安全で有効な治療法の開発は当センターのような国立の小児病院が全国規模で行っていく必要がある。

本研究では、小児先天性・難治性疾患である原発性免疫不全症や先天性代謝異常症に対する造血幹細胞遺伝子治療の確立に向け、対象疾患を原発性免疫不全症の中で最も頻度の高いX連鎖性慢性肉芽腫症（X-CGD）とし、1. 遺伝子治療の実態調査、2. 前臨床研究としてCGDにおける造血幹細胞の特性や染色体のベクター挿入部位の網羅的解析法の確立、発現効率を高めた

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。

(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

<遺伝子治療の実態調査>

1. 海外での遺伝子治療の現状と日本との相違点(小野寺)

我が国の遺伝子治療臨床研究は欧米のそれと比べて大きな遅れを取っているが、その理由は単に技術の遅れに起因するのではなく、包括的に遺伝子治療を支えていくインフラ整備の不足が原因と考えられる。特に、臨床用ウイルスを製造する点はその最たるもので、欧州では Genethon(フランス)と HSR-TIGET(イタリア)が中心となって臨床用ウイルスを精力的に製造している。驚くべきことは、この両機関を支えているのが慈善活動を通して募金活動を行う Telethon であることであり、逆に、このように希少性疾患に対して遺伝子治療を行う両

機関の存在はその設立趣旨(遺伝性難治性疾患の克服)から考えて極めて理想的と思われる。

<前臨床的研究>

2. 慢性肉芽腫症における次世代遺伝子治療開発に向けた基礎的研究(大津)

triplicate で測定を行い、5 pg/ml 以上の濃度を示したサイトカイン/ケモカインを中心に検討を行った。結果、1) 造血幹細胞レベルで一定感度以上の濃度で検出されたサイトカイン 4 種、2) 造血前駆細胞レベルで有意な産生を認めたサイトカイン/ケモカイン 16 種、3) 2) と比べると濃度は低いものの 50pg/ml 相当の濃度で検出されたサイトカイン/ケモカイン 5 種、4) CGD 細胞で野生型と比して高濃度で検出されたサイトカイン/ケモカイン 7 種、5) ウイルス暴露による誘導が明らかなサイトカイン/ケモカイン 8 種を認め、このうち、IL-1 α および IL-1 β に着目して、刺激後の移植における骨髄再建能を検討している。

3. 遺伝子治療臨床研究における分子生物学的解析(中林)

1) 特定ゲノム部位濃縮ライブラリー作製系・データ解析系の構築に関しては、標的遺伝子である *IHH* 遺伝子エクソンには多数(平均約 1000 リード)の配列が貼り付いているのに対し、対象遺伝子ではない *CCDC108* 遺伝子領域に張り付いた配列はほぼ 0 に近かった。よって、SureSelect DNA キャプチャー法の特異性は高く、ベクター挿入部位解析へ応用が可能であると判断した。

2) ウイルスベクター配列を標的とするカスタム SureSelect ベイトライブラリーをデザインとして、MPSV 由来 LTR (444bp) と MoMLV 由来 LTR (589bp) を標的としたベイトライブラリーを作製した。

4. PKU 遺伝子治療におけるコドン最適化の試み(久米)

マウス PAH のアミノ酸配列は保ったまま、そのコード領域 1362 塩基中 282 塩基に変異を導入した人工遺伝子(野生型との相同率 79%)を合成し、3 種類のプロモーターと組み合わせて発現プラスミドを構築し、3 種のヒト細胞株にトランスフェクションしてイムノブロットで PAH 発現量を量ったところ、最大 5.5 倍の発現量増加を見出した。フェニルケトン尿症遺伝子治療に向けて、治療用ヒト PAH 遺伝子のコドン最適化の効果も検討する予定である。

5. 脂肪細胞を用いた遺伝子治療の臨床応用について(福島)

ccdPA と adipose stem cell および bone marrow mesenchymal stem cells との生化学的・生理学的特徴の差が明らかになった。また、ccdPA にレトロウイルスベクターを用いて LCAT 等の遺伝子を導入し、試験管内で LCAT の発現を確認した。遺伝子導入した ccdPA を LCAT 欠損マウスに移植して、その有効性と安全性を確認している。

<臨床研究>

6. 慢性肉芽腫症腸炎における血中サイトカインの検討 (布井)

CGD 腸炎の診断時には IL-1 β 、IL-18、IFN γ 、TNF- α 、IL-6、IL-12 が健常者と比較して有意に上昇し、治療前後でも指標になっていた。1 症例の経過では、発熱の時期に一致して CRP と IL-18 が変化した。活性酸素種は IL-1 β と IL-18 の活性化に関わる caspase-1 抑制、NF- κ B を介してサイトカイン産生に関わる Nrf2 や Scramblase の活性化を介して、pyroptosis、酸化ストレス、eferocytosis などによる炎症抑制に関わっているが、慢性肉芽腫症では活性酸素産生が出来ないため、これらの経路を介しての炎症抑制が十分でなく、肉芽腫形成や炎症性腸炎を起こっているのではないかと考えられた。

7. 北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) の集計結果からみた慢性肉芽腫症の死亡要因 (有賀)

14 例の慢性肉芽腫症患者が登録されており、9 例が生存中、5 例が死亡していた。6 例に血液幹細胞移植が実施され、5 例が生存している。死因の多くは真菌感染症などの制御不能な感染症であった。予後の改善のためには良い条件での血液幹細胞移植の重要性が示唆された。また、移植の実施が困難である症例に対し、遺伝子治療の適用を正しく評価する必要性を痛感した。

8. 副腎白質ジストロフィーのマス・スクリーニングシステム確立に関する研究 (奥山)

ALD に対する新生児マススクリーニングの開発にむけ、1) 分子内脂肪酸鎖長の異なる LysoPC のクロマトグラフィーによる分離系の確立、2) LC-MS による検体の分離分析、3) LysoPC の [D]LysoPC26:0 を内標準物質とした場合の定量、4) スループット性向上の検討を行い、ALD で過剰蓄積される極長鎖脂肪酸を含むリゾホスファチジルコリン (Lyso PC) を液体クロマトグラフィーが接続されたタンデムマス質量分析装置 (LC-MS) で高精度に定量する方法を開発した。

<実施体制>

9. 造血幹細胞遺伝子治療の実施に向けた病院環境整備と閉鎖回路系遺伝子導入の実施 (河合)

病院環境整備として、遺伝子治療に対応するカルテシステムの追加を行った。また、病院における詳細な手順として、以下の SOP を作成した。1) 自家末梢血幹細胞採取の手順、2) 病棟管理の手順、3) 患者排泄物の処理手順、その他、入院後の被験者への説明の際に用いる「入院のしおり」や、「遺伝子治療パンフレット」などを作成した。また、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」とあるので、研究所 5 階に細胞調製室を設置し、臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた遺伝子導入を行い、その工程を SOP としてまとめた。

10. 遺伝子治療臨床研究における臨床データの管理 (瀧本)

CGD に対する遺伝子治療研究は、厚生科学審議会承認され、現在ホームページその他で被験者を募集している。実施直前の最終的なチェック作業の一環として、臨床データ収集について症例登録時の同意のあり方や有効性・安全性評価等の面から検討を行い、これまでの改訂作業とも併せて、本年度中にも実施される遺伝子治療のデータ記録媒体として、各種の審査の資料としても耐えられる形の Case Report Form (CRF) を作成した。

遺伝子治療臨床研究の現状 (岡田)

本遺伝子治療は、平成 19 年度の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、骨髄移植が実施困難な X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対しては幹細胞遺伝子治療の適応があると結論し、その後米国立衛生研究所 (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遺伝子治療臨床研究の実現に向け準備してきた。平成 23 年 2 月に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において承認された遺伝子治療臨床研究実施計画書および申請書を平成 23 年 9 月に厚生労働省に提出した。平成 24 年 3 月

末に厚生科学審議会科学技術部会にて審査が行われ、今年度平成 24 年 6 月 14 日に厚生労働大臣より実施して差し支えない旨通知が出た。現在実施に向け被験者募集を行っている。

D. 考 察

本研究は本年度が最終年度である。まず、本研究において実施を予定していた慢性肉芽腫症に対する患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療臨床研究の進捗状況を考え（詳細は分担研究者 岡田博士の報告書を参照して欲しい）、その評価を行いたいと思う。平成 18 年度、「慢性肉芽腫症に対する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」として始まった本研究であるが、当初、ドイツ Grez 博士との共同研究において使用を予定していた SFFV 由来 SFgp91 ベクターが、その使用例での造血異常を発症したため、研究開始 2 目においてその臨床プロトコルを変更せざるを得なくなった。ただ、幸運にも同様の遺伝子治療臨床研究を行っていた米国立衛生研究所 Malech 博士との共同研究が可能となったため、使用するベクターを MoMLV 由来の MFGSgp91phox に変更し、遺伝子治療実施計画を全面的に変更した。そして、その実施計画書を持って当センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会に申請したのが平成 22 年 1 月 22 日である。その後、平成 23 年 2 月 24 日付で当センター遺伝子治療臨床研究審査委員会により承認され、国の審査においては平成 24 年 3 月 28 日、厚生労働省厚生科学審査会科学技術部会での了承、最終的には平成 24 年 6 月 14 日付で厚生労働大臣により承認された。ただ、今回の遺伝子治療臨床研究において標的細胞となるヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞が、「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 380 号）におけるヒト幹細胞にあたるのではという意見があり、ヒト幹細胞臨床研究審査委員会に対して疑義照会を行う必要が生じ、結果、平成 24 年 10 月 18 日付で審査委員会より「今回の遺伝子治療臨床研究における患者 CD34 陽性細胞はヒト幹細胞指針が定める幹細胞の対象とはならない」の回答を得、本遺伝子治療は実施可能となり、現在、Umin (UMIN000008235) などを通して、広く対象患者を募集中である。確かに、当初予定していた期間内の遺伝子治療実施は難しいようであるが、現時点で複数名の候補者がいることを考えると近々に遺伝子治療は実

施され、その実施体制の整備を併せると、本研究の目標は大方達成できたのではないかと自負している。

さて、本年度も多くの分担研究の先生に様々な慢性肉芽腫症に関する研究をお願いし、貴重な研究成果を提示して頂いたが、特に記述すべきは中林博士が行った次世代シーケンサーを用いた治療ベクター染色体挿入部の網羅的解析法であろう。これは、現在、染色体挿入タイプベクター（レトロウイルスやレンチウイルスベクター）を使用した場合、その染色体挿入部位を決定する必要があるため、以前は LN-PCR や LAM-PCR と呼ばれる制限酵素を用いた方法が行われていた。ただ、この方法では制限酵素の種類により核酸配列に偏位（バイアス）が起り、一部の挿入部位のみが強調されたり、全く検出されない挿入部位も出現することになる。一方、DNA:RNA ハイブリッドキャプチャー法ではこれら制限酵素を使用しないことからこのようなバイアスが起りにくく、欧米ではこの方法が採用されつつある。もちろん、その信頼性の観点から、現在も LAM-PCR は並行して行われているが、複数の検出法を併せて最終的に遺伝子治療の安全性を評価することは極めて重要である。ただ、このようなシステムを導入することは時間的にも経費的にも負担が大きく、特に、次世代シーケンサーの投入はなかなか一般の研究事業としては難しい。一方、当センターは小児難治性疾患のゲノム拠点であることから、その利点を大いに活かすことが可能で、実際、その専門家である中林博士に依頼し、この研究課題を担当して頂いている。現在、複数の遺伝子治療サンプルを用いて本解析系の信頼度を確認しているところであり、今後、この系が確立することで、汎用的に遺伝子治療の安全性を評価する系に応用でき、遺伝子治療のセンター化という観点から本研究は本研究事業の重要な研究課題となっている。

次に特記すべき点として、分担研究者の河合博士が行った病院環境の整備事業を上げたい。このような仕事は科学研究の側面から考えると論文化しにくく、なおざりにされている分野ではある。ただ、このような環境整備こそが臨床研究を行ううえで極めて重要なインフラの整備の一つと言える。一例をあげれば、遺伝子治療を円滑に進めるため、院内に遺伝子治療準備委員会を作り、そこに病院内の医師（腫瘍科、感染症科）、看護部、薬剤部、臨床検査部、臨床研究センターなど遺伝子治療を行う上で関

与するすべての部署が参加し、連携を深めている。また、病棟管理の手順や患者排泄物の処理手順患者管理に関する種々の SOP を作成し、遺伝子治療の標準化を目指している。この点も遺伝子治療のセンター化（均てん化）に重要な要因と思われる。

遺伝子治療の準備を始めてからおよそ 8 年が経ち、ようやく遺伝子治療のゴーサインを得ることができた。ただ、実際の遺伝子治療はこれからであり、また、単に臨床研究に留まらず遺伝子治療を如何にして本来の治療として確立してくかが重要で、治験への応用を含めた様々の課題を克服していかなければならない。ただ、そのスタートラインに立てたことも事実であり、今後も小児先天性・難治性疾患に対する遺伝子・細胞治療の開発と実施に尽力する所存である。

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、以下のような実態調査、前臨床研究ならびに臨床研究、実施体制の整備を行った。

- ・遺伝子治療の実態調査に関しては、海外の遺伝子治療の現状調査と日本との比較

- ・前臨床研究に関しては、疾患モデルマウスを用いてサイトカイン・キモカインからみた CGD 造血幹細胞機能解析、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子導入部位解析、PKU 遺伝子治療における治療遺伝子のコドン最適化に関して、LCAT 欠損症に対する遺伝子改変脂肪を用いた遺伝子治療の検討

- ・臨床研究に関しては、慢性肉芽腫症腸炎における血中サイトカインの検討、原発性免疫不全症患者データベース（PIDH）からみた慢性肉芽腫症の死亡要因に関する検討、副腎白質ジストロフィーにおけるマススクリーニング法の確立

- ・実施体制整備に関しては、当センター病院における相互連携を含めた環境整備と細胞調製室の整備ならびに Dry Run に基づく SOP の作成、遺伝子治療臨床研究における臨床データ管理の整備

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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

海外での遺伝子治療の現状と日本との相違点

研究分担者 小野寺雅史 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部部長

研究要旨

現在、国立成育医療研究センターでは、慢性肉芽腫症に対してレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療を計画しているが、欧米では同様の遺伝子治療が数多く行われ、実際に免疫不全症、血液系疾患、代謝異常症などの難治性疾患に対する有効な治療法として認識されつつある。さらに、最近では LPL 欠損症に対する Glybera が欧州初の遺伝子治療薬として認可され、遺伝子治療は今後もさまざまな難治性疾患に対して有効な治療法として実施されていくことが予想される。本研究では、現在までに公開されている文献や論文ならびに実際に遺伝子治療に関係する数多くの研究者・医師あるいは企業の担当者と直接面会すること貴重な情報を入手し、それを基に海外における遺伝子治療の現状と日本との相違点を比較・検討した。

A. 研究目的

近年の大型シーケンサーの台頭によりヒトゲノム情報が大幅に整理され、それに基づく医療イノベーションが急速に進歩している。具体的には、2000年の従来型キャピラリーシーケンサーによるヒトゲノムの概要配列の決定と2003年の精密配列決定によるヒトゲノム計画の終了である。さらに、その流れは現在まで続き、その後出現した次世代シーケンサーによる遺伝子解析の高速化と大容量化、さらには従来の遺伝子解析では叶わなかった広範囲な遺伝子発現解析や転写開始部位の同定、DNA・タンパク質の相互関係ならびにエピジェネティック変化とよばれるDNA塩基修飾の解析が可能となってきた。そして、その流れは単に基礎研究分野に留まらず、疾患の遺伝子診断の観点から患者個人レベルでの遺伝子解析がなされ、今後はさらなるバイオインフォマティクスの充実により、究極のオーダーメイド治療が実施可能になることが予想される。

遺伝子治療は「疾患の治療を目的に遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する治療法」と定義され、これら急速に進歩する遺伝子情報の解析結果を最も強く受ける分野であり、事実、最近の遺伝子治療は長足の進歩を遂げ、複数の疾患に

関しては有効で安全な一治療法として認識されつつある。このように、今後も遺伝子治療は遺伝子情報の解析が進むにつれ、さらなる展開を見せる可能性を秘めているが、我が国には欧米と比較して遺伝子治療臨床研究を支えていくインフラが整備されておらず、我が国独自の遺伝子治療臨床研究を実施することが困難な状況となっている。

本研究ではこれまでの遺伝子治療臨床研究の流れを振り返り、また、公開されている文献や直接担当者と面会することで遺伝子治療に関する様々な情報を入手し、なぜ欧米における遺伝子治療が先行するかを欧米諸国が持つ遺伝子治療の支援体制から検討してみる。

B. 研究方法

1. 文献・論文調査

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) にて遺伝子治療に関連ある論文・文献を検索した。

2. 研究者、医師、企業との面会

San Raffaele 研究所、MolMed 社（イタリア）、Necker 小児病院、Genethon NPO（フランス）、Great Ormond Street Hospital（イギリス）、NIH、Sigma Tau 社（アメリカ）などを訪問し、そこで各担当者と話

し合いを持った。

(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. 遺伝子治療の流れ

遺伝子治療が始まった1989年から現在までの遺伝子治療全体の経過を *Journal of Gene Medicine* のホームページからまとめると以下のようになる。

(<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>)

・2011年の段階で登録されている遺伝子治療の総数は1741であり、その増加率は1990年から1999年までは増加傾向にあったが、その後は年間100件程度で推移している。

・実施国に関しては、米国が最も多く、1095件で全体の63.9%を占める。次に英国の197件(11.5%)を始めとする欧州が続く(489件、28.5%)、アジアに関しては中国の20件(1.2%)、日本の19件(1.1%)、韓国の13件(0.8%)と全体としても63件(3.7%)と少数である。ただ、以前はその多くが米国で行われてきたが、ここ10年間では欧州が遺伝性疾患に対する遺伝性治療臨床研究が広く行われてきたため、その比率が変化しつつある。

・対象疾患に関しては、がんが1107件(64.7%)と最も多い。ただ、数年前までは心血管系疾患に対する遺伝子治療が比較的多数であったが、最近では遺伝性疾患(monogenic disease)やHIV等の感染症に対する遺伝子治療が増え、2011年では心血管系疾患が146件(8.5%)、遺伝性疾患が143件(8.3%)、感染症が138件(8.1%)と肉薄している。

・使用するベクターに関しては、アデノウイルスベクターが406件(23.7%)と最も多く、次のレトロウイルスベクターが352件(20.5%)、非ウイルス系であるNaked/Plasmid DNAが318件(18.6%)と続く。ただ、最近では遺伝子治療臨床研究におけるレトロウイルスベクターのgenotoxicity(染色体挿入による発がん誘発)により、安全性の高いレンチウイルスベクターの使用頻度が増えてきている(40件、2.3%)。

・臨床状況に関しては、いまだ遺伝子治療が実験的

医療の範疇を超えないためか、phase I、phase I/IIが全体の8割を占める(phase I: 1040件、60.7%、phase I/II: 314件、18.3%)。ただ、多数の患者を対象に実際の治療に近い形でその有効性や安全性を標準療法との比較試験にて評価するphase IIIが60件(3.5%)あり、製造販売後臨床試験とよばれるPhase IVが2件(0.1%)登録されている。

2. 欧米における実施支援体制

遺伝子治療では治療遺伝子を細胞内で発現させることが遺伝子治療の基本となるため、治療遺伝子を細胞内に運び、そこで治療遺伝子を発現させることが重要となるが、それを行うのが「遺伝子の運び屋」ともよばれるベクターであり、現在まで数多くの種類のベクターが開発され、臨床応用化されている。ただ、実際に効率良く遺伝子を細胞に運び、そこで十分量の遺伝子を発現させるためにはウイルスを基本骨格にしたベクターが用いられることが多く、特にアデノウイルス、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノ随伴ウイルス(AAV)などのウイルスベクターは使用頻度が極めて高い。

問題は如何にしてこれらウイルスベクターを臨床場で使用可能なものとして製造するかであるが、実際、これら臨床用ウイルス製造には安定してウイルスベクターを産生する細胞(vector producer cells: VPC)が必要であり、これには単一細胞(組織)より増殖させ、その安全性を確認したMaster Cell Bank(MCB)とこのMCB 1バイアルより培養を開始し、およそ100バイアルの細胞保存になるように増殖させたWorking Cell Bank(WCB)が必要となる。そして、このWCB 1バイアルをVPCとして培養し、ウイルスベクターを回収することになるが(transient transfectionの場合、WCBの細胞にDNA plasmidを導入し、一過性に発現するウイルス上清を回収することになる)、その全ての段階で厳しい検査を行い、その安全性を担保する必要がある。また、それにかかる費用は莫大で、一研究者あるいは一研究機関が通常の研究補助金にて行うのは不可能に近い。よって、これらを克服する手段・体制が必要であり、その体制の有無こそが欧米と日本での遺伝子治療の差となっている。ここではフラ

ンス Genethon とイタリア HSR-TIGET について説明するが、いずれの機関もその体制を支えているのは慈善活動を通して募金活動を行う Telethon というシステムである。なお、Telethon とは Television + Marathon の合成語で、日本においては日本テレビ系列が行っている「24 時間テレビ 愛は地球を救う」がそれに相当する。

2-1 Genethon

Genethon はフランス筋障害協会 (AFM) が Telethon にて得た資金を基に 1990 年に設立した NPO 団体で、その設立の目的は遺伝性疾患の病態解明に役立つツールを開発することである。Genethon は設立当初はヒトゲノムの mapping を主に行い、遺伝性疾患の原因遺伝子の探索を行っており、1997 年より遺伝子治療用ベクターの開発を開始した。その後、臨床用ベクターの製造を行い、2010 年からは本格的に遺伝性疾患に対する遺伝子治療臨床研究を開始している。Genethon は医療機関ではなく、あくまでも臨床で使用可能な GMP 準抛ウイルスベクターを製造する研究機関であり、実際の遺伝子治療臨床研究はここで製造されるベクターを使用し、複数の医療機関がコンソーシアムを形成することで行われる。現在計画している遺伝子治療臨床研究は、AAV ベクターを用いたガンマサルコグリカン異常症やレンチウイルスベクターを用いたウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS)、慢性肉芽腫症 (CGD) などがある。

Genethon の特異な点は、NPO 団体として年 30 億円程度かかる運営費の 85% をフランス Telethon より補填されている点で、これだけの多額の経費が寄付金により賄われていることは驚くに値する。また、2011 年には Genethon での雇用は 220 名を数え、その 8 割以上がバイオ関係、臨床研究の研究者であり、広大な敷地に巨大な研究所が複数建ち、特に、世界最大の GMP 準抛ウイルス製造プラント Genethon Bioprod は目を見張る。この Bioprod にはウイルス製造工場と品質管理部門があり、前者には 2,500m² のレベル 3 封じ込め実験室、500m² の 4 つのウイルス製造室、class A isolator を持つ無菌的ウイルス上清充填室があり、後者には 500m² の GMP 準抛品質

管理実験室がある。そして、この Bioprod は AAV ベクターで 800L、レンチウイルスベクターで 100L の臨床用ベクターの製造が可能で、これにより年間 20 の遺伝子治療臨床研究をサポートすることができる。なお、これら維持費には年 10 億程度かかるが、これらもフランス Telethon により賄われている。

2-2 HSR-TIGET

San Raffaele Scientific Institute (SRSI) はイタリア San Raffaele del Monte Tabor Foundation により革新的な治療法を開発することを目的に設立され、その一部門として San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET) がある。この HSR-TIGET は遺伝性疾患に対する基礎・臨床研究のために SRSI と Telethon Foundation が、1995 年に合同で設立したものであり、その方向性は遺伝子・細胞治療の推進とそれを支える基礎的研究にある。現在まで行われている遺伝子治療は ADA 欠損症、異染性白質ジストロフィー、WAS などがあり、現在も CGD やサラセミア、IPEX などの研究が進められている。ただ、この HSR-TIGET において最も注目すべき点は、最近、海外大手製薬メーカーの GlaxoSmithKline (GSK) と連携し、遺伝子治療の実施に関する資金提供を受け始めたことである。HSR-TIGET は以前より ADA 欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療を行っていたが、GSK は自社の掲げる難治性稀少疾患に対する治療法の一環として、この遺伝子治療を支援し、そこで使用する臨床用ベクターを GSK2696273 として Phase I/II の臨床研究を開始した。同時に、他の難治性稀少疾患 6 疾患 (異染性白質ジストロフィー、WAS、β-サラセミア、ムコ多糖症 I 型、クラッペ型白質ジストロフィー、CGD) に対する造血幹細胞遺伝子治療にも支援を開始している。ただ、注目すべきは今回の連携が単純に GSK と HSR-TIGET との直接のものではなく、そこに Telethon が関与していることである。すなわち、GSK は Telethon に対し当座の資金とし 1,000 万ユーロを寄付し、その後、各々の遺伝子治療の進捗状況に応じてさらなる資金を提供するもので、これは GSK が稀少疾患治療法の開

発における自らの立場を揺るぎないものにするのみではなく、これら多額の資金を Telethon に寄付することで、Telethon 自体を保護し、延いてはイタリア全体の稀少疾患に対する支援も保護するからである。

D. 考察

遺伝子治療の分野に限るものではないが、我が国の基礎研究のレベルは十分に誇れるものの、それらを臨床の場に応用する臨床研究は欧米のそれと比較して大きな遅れをとっている。これは、ここで示したように、単に資金だけの問題ではなく、臨床研究を包括的に支える体制が欠如していることが最大の要因であると思われる。たとえば、現在、レトロウイルスベクターなど宿主染色体に組み込まれるタイプのウイルスベクターを使用した場合、投与後、長期にわたり患者体内の遺伝子導入細胞の状態を確認する必要があり、その検査として遺伝子導入部位を同定する LAM-PCR 等などの実施が求められている。ただ、これら検査は極めて特殊であり、また、その検査費用も高額であることから我が国において独自に実施することは容易ではない。一方、米国では Indiana 大学内に NIH の助成を受けた National Gene Vector Biorepository (NGVB) があり、国の内外を問わず、これら技術が無償で提供している。また、本稿で述べたようにフランス Genethon やイタリア HSR-TIGET はともに Telethon への募金を通じた寄付により維持されており、その設立趣旨から考えると極めて理想的な姿と思われる。

今後、遺伝子治療を始め、我が国の臨床研究はどのように進んでいくのであろうか。ただひとつ言えることは、これら臨床研究は単に一つの技術開発により急速な進歩を遂げるのではなく、それら技術革新を包括的に支える体制が必須であり、それを誰が、如何に、どのような形で構築していくかが最大の課題で、それ無くして我が国の臨床研究の発展はないと言っても過言ではない。

E. 結論

これまでの遺伝子治療臨床研究の流れと欧米における遺伝子治療の現状を調査した。特に、イタリ

ア、フランスには臨床用ベクターを製造する施設が存在し、これらを利用することで比較的容易に遺伝子治療臨床研究が開始できると思われた。今後は、単に一つの技術革新ではなく、包括的に遺伝子治療を支援していく体制整備が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, Yoshimura A, Onodera M, Itoh H. Loss of PDK1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 61: 1935-1948, 2012.
- 2) 堀内清華、石黒 精、中川 智子、庄司健介、永井 章、新井勝大、堀川玲子、河合利尚、渡辺信之、小野寺雅史. 甲状腺機能低下症と1型糖尿病に難治性下痢症を合併し、Foxp 低下を認めた IPEX 症候群の女兒例. *Jpn J Clin Immunol* 35: 526-532, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

慢性肉芽腫症における次世代遺伝子治療開発に向けた基礎的研究

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：本研究班において慢性肉芽腫症(CGD)に対しての遺伝子治療臨床研究の実施に向けた準備を継続してきた結果、研究計画の実施が承認され現在は患者の選定を待つ段階にまで進捗がみられている。本臨床研究においては、欧米における実施例にならい同様のプロトコールでの治療の施行を計画しているが、まずは十分な安全性が確保されることと、機能修復細胞の少なくとも一過性の出現によって難治性の感染症の治癒が得られることが重要な到達目標である。本研究課題においては、これに引き続き実現が期待される次世代の遺伝子治療法として、さらなる有効性の強化、すなわち末梢血中における機能修復好中球の維持と、それによる永続的な免疫能の構築を目指した基礎研究を展開している。本年度は、前年度までの成果を受けて CGD 造血幹細胞機能についてさらに詳細な検討を行った。特に造血幹・前駆細胞の培養条件下でのサイトカイン・ケモカイン産生に着目し、マルチプレックスアッセイを行い新たな知見を得ることに成功した。

A. 研究目的

遺伝子治療においては、造血幹・前駆細胞は標的細胞として無血清培地中で培養され、ウイルスベクターにより遺伝子導入が行われる。本研究においては、培養メディアに添加する至適化されたサイトカインカクテル以外にも、細胞自体から産生される液性因子が培地中に存在し、細胞の骨髄再構築能に影響しうるとの仮説に基づき、検証を行う。特に CGD 細胞特異的に産生される液性因子、ウイルス感染により誘導される因子に着目し、CGD 造血幹細胞の機能低下の原因の特定を目指す。

B. 研究方法

野生型および CGD マウス骨髄より造血幹細胞、造血前駆細胞分画を純化し、無血清培地にて SCF, TPO 存在下に培養した。レトロウイルス上清を添加する直前、添加後 24 時間、以後さらに 2 点の time points を設定し、各ウェルより培養上清を採取しサンプルとした。少量のテスト液中の複数の微量液性因子を同時に測定可能なマルチプレックスシステムを使用し、32 種類のサイトカイン/ケモカインについて定量し比較検討した。

C. 研究結果

triplicate で測定を行い、5 pg/ml 以上の濃度を示したサイトカイン/ケモカインを中心に検討を行った。結果、以下のカテゴリーに分類することが可能であった。

1) 造血幹細胞レベルで一定感度以上の濃度で検出されたサイトカイン。全部で 4 種あり、いずれもウイルス上清への暴露で明らかな誘導パターンを示した。2 種で 50 pg/ml 以上、他 2 種は 5 pg/ml 前後の低濃度であった。

2) 造血前駆細胞レベルで有意な産生を認めたサイトカイン/ケモカイン。16 種で有意な産生を認めた。最高で 10,000 pg/ml 以上、すなわち 10 ng/ml 以上の濃度に達するものも観察された。

3) 2) に比較すると濃度は低いものの培養後半には 50 pg/ml 相当で認められ、biological effect が想定されたサイトカイン/ケモカイン。計 5 種がこのパターンを示した。

4) CGD 細胞で野生型に比して高濃度で検出されたサイトカイン/ケモカイン。全て造血前駆細胞レベルであり、計 7 種がこのパターンを示した。特にケモカインにおいてその差が顕著であった。

5) ウイルス暴露による誘導が明らかなサイトカイン/ケモカイン。造血前駆細胞レベルで明らかなものを計8種認めた。このうち暴露後24時間での誘導が明らかなものは4種であった。

以上から、何らかの biological effect が予想されるサイトカイン/ケモカインを複数種スクリーニングすることに成功した。このうち、IL-1 α および IL-1 β にまず着目し、野生型造血幹細胞と CGD 造血幹細胞に関して *in vitro*におけるそれぞれのサイトカインに対する反応性の比較を行った。得られた結果をもとに濃度を設定し、刺激後に移植を行い骨髄再構築能の検討を開始した。

D. 考察

遺伝子治療以外にも、幹細胞増幅等の目的で無血清培地で造血幹・前駆細胞が培養されるケースは多いが、通常、加えるサイトカイン以外の液性因子の存在を重要視することは少ない。しかしながら細胞自身が種々のサイトカイン等の活性物質を産生することは良く観察される現象であり、これらの培養系においても造血幹細胞の骨髄再構築能や、分化の運命決定に、それらの液性因子が影響を与える可能性は否定できない。本研究においては、マウスの造血幹細胞、造血前駆細胞をテスト細胞として *in vitro*で培養を行い、産生される液性因子を網羅的に定量することを試みた。結果として多くのサイトカイン、ケモカインが特に培養後期において一定以上の濃度で検出されたことから、これらが造血幹細胞、前駆細胞に影響を与える可能性が示唆された。いくつかのサイトカイン/ケモカインは、CGD 細胞において産生が増強されることが示され、中には造血幹細胞の幹細胞活性維持にとって不利に働くと予想されるものも含まれていた。またウイルスへの暴露により産生が誘導されるサイトカインもいくつか見出すことができ、これらはいずれも造血幹・前駆細胞での産生は報告されておらず新規の知見であった。

E. 結論

造血・前駆細胞においては、無血清培地中であっても培養液中に自身の産生する種々の液性因子が含まれ、その機能や運命決定への影響を考慮すべきであるとの結論を得た。今後の検証を待たねばならないが、CGD 細胞でより多く産生されるサイトカインの存在が、CGD 細胞特異

的な反応性の異常と協調することで、造血幹細胞活性の培養中での維持を損なう可能性が示唆された。

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, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, 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.
- Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Current gene therapy*. 2012;12(5):410-6.
- Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 2012;119(26):6234-42.
- Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1609):20110334.

2. 学会発表

- Protection of hematopoietic stem cells from stress-induced functional impairment by very low-dose interleukin-1 stimulation. Makoto Otsu et al. The 20th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2012, Paris.
- Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment. Makoto Otsu. The 2nd Joint Global COE Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE,

The Univ of Tokyo and Chiba Univ
Global COE. 2013, Tokyo

- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

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解析が極めて有効である。昨年度までに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た。今年度は、DNA キャプチャー法による特定ゲノム部位の選択的濃縮の有効性を検討した。続いて、レトロウイルスベクターの LTR 配列を標的としたベイトライブラリーをデザインすることで、ベクター挿入部位解析を開始するための体制を整備した。

A. 研究目的

ベクター挿入部位同定解析系の構築：

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。例えば、レトロウイルスの一種であるマウス白血病ウイルス（MoMLV: Moloney murine leukemia 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。本年度は、全ゲノム DNA から任意の配列を選択的に濃縮できる DNA:RNA ハイブリッドキャプチャー法によるベクター挿入部位同定法の確立に

着手した。

B. 研究方法

1. 特定ゲノム部位濃縮ライブラリー作製系・データ解析系の構築

使用するゲノム DNA の濃度は picogreen 定量キット(Invitrogen)により定量し、1-3 ug をゲノムライブラリー作製に供した。アジレント社 SureSelect^{XT} all exon 50Mb キットを用いてエクソームライブラリーを作製した。DNA ライブラリーの評価（サイズ確認・濃度推定）にはアジレント社バイオアナライザーを用いた。エクソーム濃縮ライブラリーの定量にはアジレント社 QPCR NGS ライブラリー定量キットならびに Kapa Biosystems 社 Library Quantification キットを用いた。ABI HT7500 を用いて定量データを取得した。

イルミナ社 HiSeq1000 を用いたペアエンド法(100bp x2)で配列データを取得した。シーケンシング試薬には TruSeq SBS Kit v3-HS キットを用いた。画像データをイルミナ社ソフトウェア CASAVA で配列データ (fastq 形式) に変換し、オープンソースソフトウェア BWA を用いて配列データをヒトリファレンスゲノムにマッピングした。

続いて、特定の 50 遺伝子のみのコーデ

イングエクソンを対象としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーを作製し、上記と同様の要領でエクソーム解析を実施した。

2. ウイルスベクター-LTR 配列を標的としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーのデザイン

解析対象予定の遺伝子治療ベクターで実際に使用されている二種類のウイルス LTR 配列ならびに Sonic hedgehog(*SHH*) 遺伝子コーディングエクソン配列を対象としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーを作製した。

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. 特定ゲノム部位濃縮ライブラリー作製系・データ解析系の構築

図 1 に SureSelect 法によるエクソーム解析の概要を示した。*IHH* 遺伝子を含む特定の 50 遺伝子を対象としたカスタム SureSelect ライブラリーで作製したエクソーム濃縮ライブラリーの配列データのマッピング結果例を図 2 に示す。標的遺伝子である *IHH* 遺伝子エクソンでは多数（平均約 1000 リード）の配列が貼り付いているのに対し、対象遺伝子ではない *CCDC108* 遺伝子領域に張り付いた配列はほぼ 0 に近い。On-target 率の検討結果などから、SureSelect DNA キャプチャー法の特異性は高く、ベクター挿入部位解析への応用が十分に可能であると判断した。

2. ウイルスベクター-LTR 配列を標的としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーのデザイン

ウイルスベクターの LTR 配列を標的とするベイトライブラリーをデザインした。汎用性を考慮し、以下の二種類のウイルス LTR 配列を標的とした。

- ① myeloproliferative sarcoma virus (MPSV)-LTR_配列：444 bp
- ② Moloney murine leukemia virus long terminal repeat (MoMLV)-LTR 配列：589 bp

これらはいずれもマウスに感染するウイルスとして同定されたもので、ヒトゲノムにはこれら LTR と高い相同性を示す配列は含まれていないことを確認した。

RNA ベイト長は 120bp で、隣接するベイト同士が 60bp の冗長部分を持つようにベイトを配置した。MSPV-LTR に対して 12 個、MoMLV-LTR に対して 17 個の RNA ベイトを設定した。なお、これらの二つの LTR の塩基配列相同性は 92%程度であり、インフォマティクス解析により両配列を明確に区別できることを確認している。

図 3 に LTR 配列に対するベイトによりキャプチャーされると予想されるゲノム DNA 断片を示した（ライブラリー作製時のゲノム DNA 断片長が 300bp の場合と 1000bp の場合）。

また内在性コントロールとして *SHH* 遺伝子のコーディングエクソン配列を対象とする RNA ベイト 21 個も加えた（これらのベイトにより *SHH* エクソン領域が効率的に濃縮されることを既に確認している）。この遺伝子の細胞当りのコピー数は通常は 2 コピーであることが予想されることから、データ標準化のための基準として使用できると考えられる。

D. 考察

これまでの全遺伝子ならびに部分的遺伝子群を対象としたエクソーム解析において、SureSelect 方式の DNA キャプチャー法で、標的ゲノム部位を特異的に濃縮できることが確認された。SureSelect のカスタムベイトライブラリーでは任意の配列を対象とするデザインが可能であることから、遺伝子治療ベクターに汎用される 2 種類のウイルス LTR 配列を対象とするベイトライブラリーをデザインした。

慢性肉芽腫瘍における遺伝子治療対象である造血幹細胞集団の一部に遺伝子治療ベクターが安定的に挿入される。ベクター挿入部位が異なる細胞クローンが複数種類混在し、その比率が経時的に変動することが知られている。従って、ベクターのゲノム挿入部位解析においては、細胞集団中における複数のベクター挿入部位を同定し、さらに個々の挿入部位の細胞集団内での存在比率を定量的に解析することが必要とされる。本研究デザインに於いては今のところ相対的定量は可能と思われるが、絶対的定量の実現には更なる工夫・改良が必要であると思われる。

E. 結論

エクソーム解析に使用されている選択的 DNA キャプチャー技術を応用することで効率的な遺伝子治療ベクター挿入部位解析を開始する体制が整備された。

G. 研究発表

右田王介・中林一彦

「次世代シーケンサー・アレイ技術を用いた遺伝子診断」小児科診療 (2013)

印刷中

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし