

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

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療研究センター臨床検査部 部長

研究協力者 中島英規、木田和宏、小須賀基通 国立成育医療研究センター

研究要旨

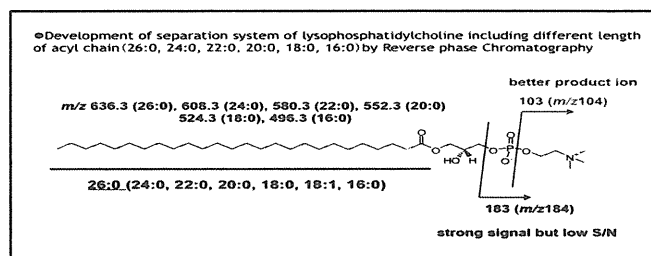
副腎白質ジストロフィー(ALD)に対する新生児マススクリーニングに応用可能な簡便かつ迅速なスクリーニング法の開発を目的とした。本研究では、ALDで過剰蓄積される極長鎖脂肪酸を含むリゾホスファチジルコリン(Lyso PC)を液体クロマトグラフィーが接続されたタンデムマス質量分析装置(LC-MS)で高精度に定量する方法を開発した。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィーの治療法として造血幹細胞移植が有効である。しかし、発症前あるいは発症早期に治療を行わないと、その効果は限定的であることから、本疾患に対する新生児マススクリーニングに応用可能な簡便かつ迅速なスクリーニング法の開発が必要である。

B. 研究方法

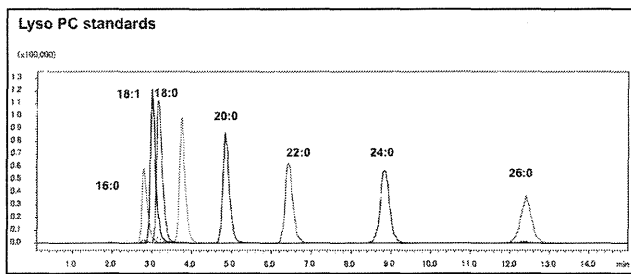
試料は、現行の新生児マス・スクリーニングでも使用されている血液をろ紙にしみこませた血液ろ紙検体を用いた。血液ろ紙を3 mm径に切り出したものから有機溶媒を用いて脂質を抽出した。この抽出の際、定量を行う際の内部標準物質である安定同位体標識(重水素標識)された[D]Lyso PC26:0を添加した。この抽出脂質をLC-MSにより分析した。クロマトグラフィーとしては、GL Science社製逆相カラムInertSustain ODS(50 or 150 mm X 2.1 mmf)を用いた。測定対象の化合物の構造とタンデムマスによる測定イオンの構造、プリカーサーイオン、プロダクトイオンのm/zを次に示す。



検体は、健常者とALD患者2検体を使用した。

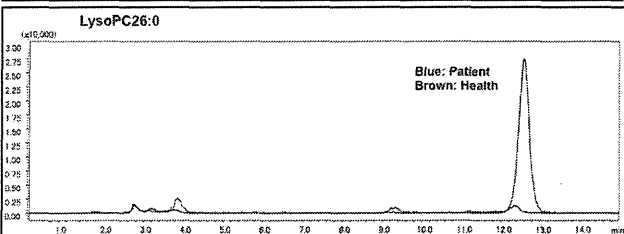
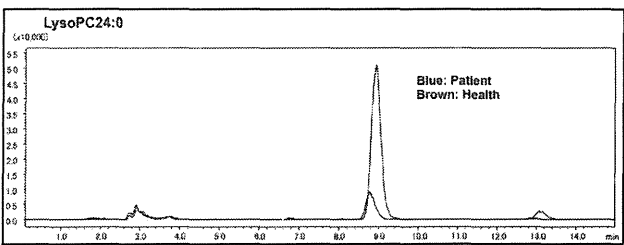
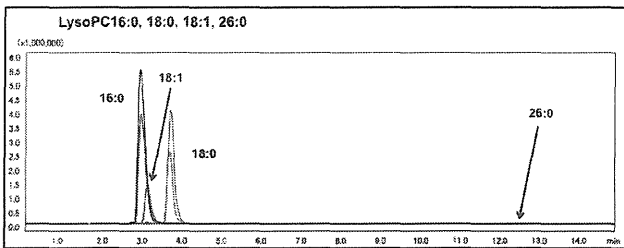
C. 研究結果

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
これまでLysoPCの分離には毒性の強いクロロフォルムが含まれた移動相や理論段数の低い分離のあまり良くないカラムクロマトグラフィーで行われていた(Hubbard, Moser et al. Mol Genet Metab. 2006 89(1-2):185-7.)。本研究では理論段数の高いODSカラムを使用したことに加え、クロロフォルムを使用しない比較的 안전한(水・メタノール系移動相による分離系を開発した。この分離系により下図のように分子内脂肪酸鎖長の異なるLysoPC標準品の分離分析系が確立された。



2. LC-MS による検体の分離分析

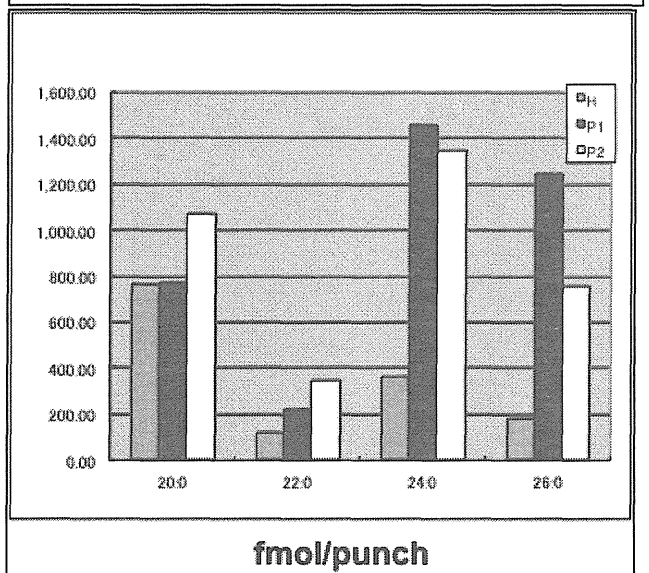
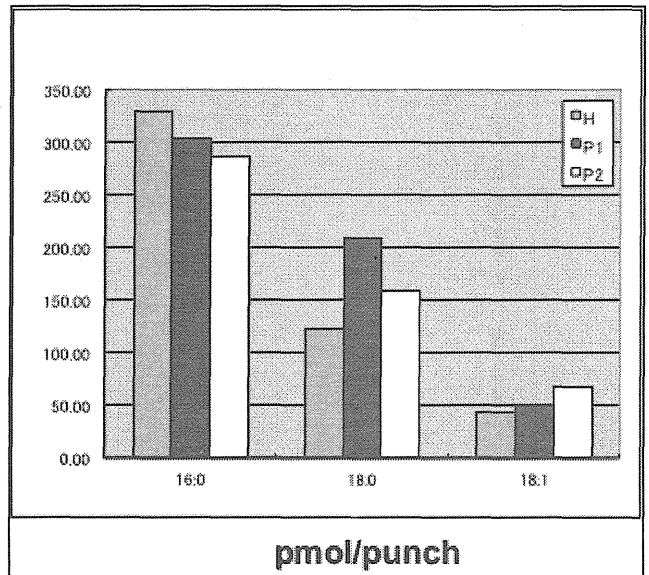
「1. 分子内脂肪酸鎖長の異なる LysoPC のクロマトグラフィーによる分離系の確立」で述べた条件で、健康者検体と 2 つの ALD 患者検体を分析した。



その結果、上記のように 16:0, 18:0, 18:1 の比較的短鎖脂肪酸を分子内に持つ LysoPC では健康者と患者の間に大きな差はなかったが、24:0, 26:0 の場合は健康者と患者の間に有意な差が認められた。

3. LysoPC の [D]LysoPC26:0 を内標準物質とした場合の定量

[D]LysoPC26:0 を内標準物質として各 LysoPC のピーク面積から検量線を作成して定量計算を行った。



その結果、クロマトグラムから得られた結果と同様に 24:0, 26:0 の脂肪酸を分子内に持つ LysoPC では健康者に比べて ALD 患者からは非常に大きい定量結果が得られた。

4. スループット性向上の検討

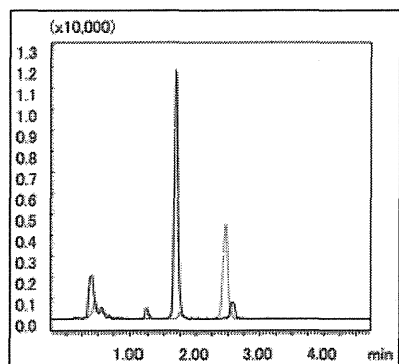
ここまでの結果は各 LysoPC の分離を優先した精度の高い分析系のものであるが、マス・スクリーニングにおいてはスループット性の向上も重要な要素である。そこで (1) 多検体同時試料調製法の確立 (2) LC-MS の分析時間の短縮化 (3) LC を用いないフローインジェクションによる分析法の確立を検討した。

(1) 多検体同時試料調製法の確立

96 well type の PCR plate を用い、そこにパンチアウトした DBS を置いて抽出を行う系を確立した。この方法により 96 検体同時に脂質抽出を行うことが可能になった。

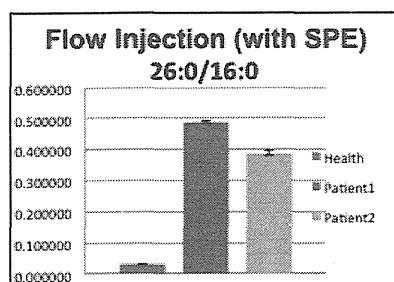
(2) LC-MS の分析時間の短縮化

分析カラムの充填剤粒子径を3 mmから2 mmに変更し、カラム長を50 mm、流速を150 mL/minから400 ml/minとしたところ、1分析3.5分まで短縮可能となった。



(3) LC を用いないフローインジェクションによる分析法の確立

クロマトグラムを見てみると、測定対象化合物の溶出時間以外にもいくつかノイズが見られる。分離過程を経ないフローインジェクションによる分析法ではこれらのノイズも対象化合物分析として拾ってしまう欠点がある。そこで固相抽出により予めこれら夾雑化合物を除去する方法を確立した。すなわち、逆相系固相をメタノール:水=1:1で予め平衡化してから抽出脂質を添加し、メタノール:水=8:2で夾雑物を洗い流した後、メタノールで長鎖脂肪酸を含んだLysoPCを溶出させてフローインジェクション法による分析サンプルとした。この結果、LC-MSで分析した場合と同様に健常者と患者を判別することが可能であった。



D. 考察

ALDは長鎖脂肪酸が蓄積することにより起こる疾患である。本研究では長鎖脂肪酸の代謝物の一つであるLysoPCを測定対象化合物としたが、それ以外にも測定対象となる可能性のある長鎖脂肪酸を含んだ代謝物は多くあると考えられる。それら候補化合物の中にはよりスクリーニングに適した化合物が存在する可能性がある。

本研究で確立した方法はどれも最も避けなければならない患者の見逃しすなわち偽陰性(フォールスネガティブ)の可能性が非常に低いシステムであるが、スループット性については現行タンデムマスによるアミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常のマス・スクリーニング系よりやや劣っている。近年、夾雑物による影響の受けにくいことに加え、スループット性の高い直接イオン化法がいくつか開発されている。今後このようなイオン化法も検討し、マス・スクリーニング系として更に優れた分析系の構築を検討する。

E. 結論

本研究で、ALDに対する非常に精度の高いスクリーニング法が構築された。この方法は、患者と健常者の差は非常に大きいため、最も避けなければならない偽陰性(フォールスネガティブ)の判定となる可能性は低い。今後、更に分析する患者検体を増やし、精度を高めると同時にカットオフ値の設定を行うと有効なスクリーニング法になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab.* 2012;107:513-520.
2. Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, Shiohama A, Hirakiyama A, Okuyama T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Ishiko A, Tanese K, Miyakawa SI, Sakabe JI, Kuwahara M, Amagai M, Okano H, Suematsu M, Kudoh J. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene *SLCO2A1* and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis. *J Dermatol Sci.* 2012;68:36-44.
3. Hwu WL, Okuyama T, But WM, Estrada S, Gu X, Hui J, Kosuga M, Lin SP, Ngu LH, Shi H, Tanaka A, Thong MK, Wattanasirichaigoon D, Wasant P, McGill J. Current diagnosis and management of

- mucopolysaccharidosis VI in the Asia-Pacific region. Mol Genet Metab. 2012;107:136-144.
4. D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, Arn P, Cox GF, Giugliani R, Okuyama T, Wijburg F, Kaplan P. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. Eur J Pediatr. 2012;171:911-919.

(学会発表)

1. 中島英規、木田和宏、小須賀基通、藤本純一郎、奥山虎之. タンデムマスを用いた副腎白質ジストロフィー診断法の開発 日本先天代謝異常学会雑誌 Vol. 28, 164, 2012.

H. 知的財産権出願・登録状況
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

研究分担者 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。

A. 研究目的

難治性先天疾患であるX連鎖慢性肉芽腫症の患者に対して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、平成 23 年 9 月 29 日に厚生労働省に申請書とともに提出し、平成 24 年 3 月 28 日に厚生科学審議会科学技術部会にて審議を受け、平成 24 年 6 月 14 日付けで厚生労働大臣より実施認可が出た。それを受けて今年度は被験者の選定を開始する。

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使い終わったため、本研究で使用するウイルスベ

クターを新たに作製する必要がある。平成 22～23 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 と共同出資の条件で依頼したが、当該研究での使用に十分なウイルス上清を得ることはできなかった。それと平行して国内でも BioReliance 社製の Master Cell Bank (MCB) を使いタカラバイオ社において Working Cell Bank (WCB) を作成してきた。タカラバイオ社で製造されたウイルス上清が臨床研究で使用できるどうか検討する。

(倫理面への配慮)

本研究の実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のおよび倫理的妥当性について慎重に審議された。厚生科学審議会科学技術部会でも審査を受け、科学のおよび倫理的に妥当であると判断された。

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 日に実施施設代表者である国立成育医療研究センター総長より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。それを受け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と遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会が審議がなされた。両作業委員会の意見に基づいて、平成 24 年 3 月 28 日に第 70 回厚生科学審議会科学技術部会にて審議され、同年 6 月 14 日付けで厚生労働大臣より本遺伝子治療臨床研究を実施して差し支えない旨通知が出た。同年 8 月 28 日、本研究がヒト幹細胞臨床研究に該当するか、また改めて審査を受ける必要があるか厚生労働大臣に対し照会を行った。同年 10 月 18 日に第 74 回厚生科学審議会科学技術部会にて審議され、すでに遺伝子治療作業部会でヒト幹細胞の安全性についても評価を行っているため審査は必要ないと判断された。

現在、被験者を国内から広く募集している。

2) タカラバイオ社で製造したウイルスベクターの一部を用い、国立成育医療研究センターで購入したヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験を行い一定の成果を得た。

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対する遺伝子治療に伴って白血病などの造血異常症が発症した頻度は X 連鎖複合型免疫不全症(X-SCID)で 5/26 人、X-CGD で 3/13 人、Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)で 1/10 人で、ADA

欠損症では 0/32 人であった。本研究で使用する MFGSgp91 を用いた遺伝子治療では白血病などの造血障害はこれまで起きておらず、その可能性は低いと考えられる。しかし、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し、理解していただくため説明書類(informed consent)を作成した。本研究では被験者の年齢の適応年基準より被験者が小児となる可能性が高いため、15 歳以下の小児を対象としたアセントを三段階(小学校低学年、高学年、中学生以上)に分けて作成したのも特徴で小児を対象とした臨床研究の先駆となると考えられる。

本臨床研究は、準備段階から数えると実施の許可ができるまでに 6 年かかったが、本邦の他の遺伝子治療臨床研究も同程度の時間がかかっている。近年、海外では遺伝子治療を治験として行う製薬企業も出てきており、早晚それが世界標準となると予想される。日本でも最初から独自では難しいと考えられるが、まず国際共同治験に参加できるとよいと考えられる。

E. 結論

来年度には当該臨床研究の一例目の治療が開始される見込みである。X-CGD 患者の寿命は 30 歳前後と言われており、国内での遺伝子治療実施を待ち望みながら重症感染症で死亡した患者も多い。他の先天性以上症に対する治療法の研究開発推進のためにも当該研究で得られた知見を丁寧に積み重ねていくことが重要である。

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

岡田真由美、江添隆範、重症心身障害児(者)施設におけるヒトメタニューモウイルス感染症のアウトブレイク、第44回日本小児科感染症学会総会・学術集会、北九州市、2012年11月24日

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。

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

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

当センターにおける『慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究』が厚生労働省により承認された。今後、造血幹細胞遺伝子治療臨床研究を安全かつ適切に実施するために、当センター病院の環境整備と臨床研究に対応する遺伝子導入法の準備を行うことが必要とされた。そのため、看護部、臨床検査部、薬剤部など病院で治療に携わる多くの部門と協力し、遺伝子治療について医療スタッフの十分な理解を得ることが不可欠である。今回、造血幹細胞遺伝子治療に関連する Standard Operating Procedures (SOP) を準備し、速やかに遺伝子治療を実施できる病院環境の整備を行った。

また、ヒトに対する遺伝子治療では大量の細胞を安全で効率的に取り扱うことが求められる。そこで検体汚染リスクを軽減するために、末梢血造血幹細胞の採取から遺伝子導入、被験者への遺伝子導入細胞投与まで、被験者細胞が空気に直接触れることの無い閉鎖回路方式を採用した。本研究では、閉鎖回路系を用いた CD34+造血幹細胞分離と large scale の遺伝子導入 SOP を作成し、ヒト造血幹細胞遺伝子治療のシュミレーションを行い安全性と有効性について検討した。

A. 研究目的

2012年、当センターにおける『慢性肉芽腫症 (CGD) に対する遺伝子治療臨床研究』が厚生労働省で承認された。そのため当センターでは、造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実施に向けた準備を加速させている。今回、遺伝子治療臨床研究を安全かつ効果的にすすめるために、当センター病院の環境整備 (Standard Operating Procedures (SOP) 作成) を行った。

また、検体汚染のリスクが軽減される閉鎖回路方式による CD34+造血幹細胞分離と large scale 遺伝子導入の SOP を作成し、そのシュミレーションから安全性と有効性について検討した。

B. 研究方法

(1) 病院環境整備

当センター内に、遺伝子治療準備委員会 (看護部、薬剤部、臨床検査部、院内感染対策チーム (ICT)、臨床研究センター、血液腫瘍科、総合診療部、研究所の代表者で構成) を設置し、SOP、カルテシステム構築などを行った。

(2) 遺伝子導入の SOP 作成と実施

i) 臍帯血由来造血幹細胞への遺伝子導入

研究用ヒト臍帯血 (理化学研究所バイオリソースセンター) から比重遠心法により分離した単核球を、CliniMACS (Milteny Biotec)

を用いて、CD34+造血幹細胞を分離した。細胞は、FACS Aria IIIu (BD) により CD34+細胞の割合、ADAM (Digital Bio 社) により生存率と細胞数を解析した。閉鎖回路にて培養し MSCV-GFP ベクターを用いて GFP 遺伝子を導入した。

ii) Large scale 遺伝子導入

2x10⁷ 個の K562 細胞株を閉鎖回路にて培養し、タカラバイオが精製した MFGS-gp91phox ベクターと、SF71-gp91phox を用いて CYBB 遺伝子を導入し導入効率について比較した。

C. 研究結果

(1) 病院環境整備

当センターでは、電子カルテシステムを採用しているため、遺伝子治療に対応するカルテシステムの追加を行った。プロトコールに従い被験者の記録を明記するために、患者情報、検査結果、有害事象、評価についてテンプレートを作成した。遺伝子治療の候補者については、患者登録表を作成し、紙面の取り込みとして電子カルテに記録する。

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。

i) 自家末梢血幹細胞採取の手順

被験者の末梢血造血幹細胞 (単核球) を採取する際に使用する。

ii) 病棟管理の手順

遺伝子治療の際に、入院病棟等における被験者への対応方法についてSOPを作成した。特に治療直後、ベクターウイルス拡散の可能性がある期間（ウイルス拡散防止期間）の被験者への対応は、本手順に従う。

iii) 患者排泄物の処理手順

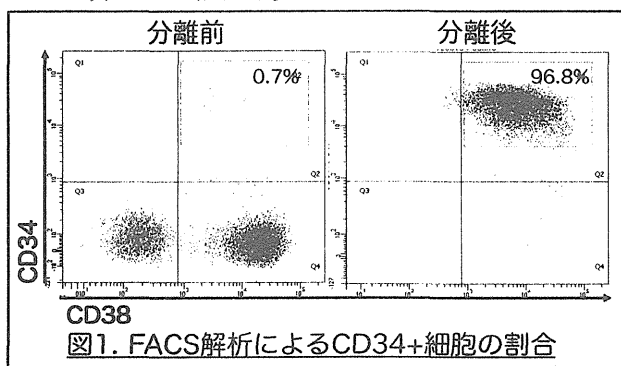
ウイルス拡散防止期間における被験者排泄物、吐物の消毒処理方法について、本手順に従う。

この他、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。

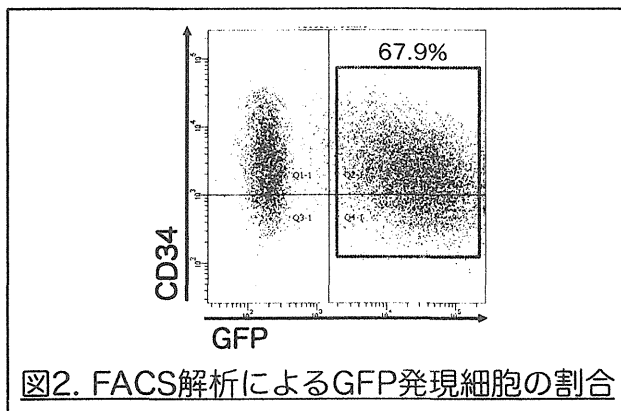
(2) 遺伝子導入

i) 臍帯血由来造血幹細胞への遺伝子導入

冷凍保存された臍帯血を解凍し、 6.33×10^8 個の単核球 (viability 78%) から、CD34+造血幹細胞を分離した。分離前、CD34+細胞は0.7%であったが、CliniMACSによりCD34+細胞の割合は96.8%まで上昇した(図1)。



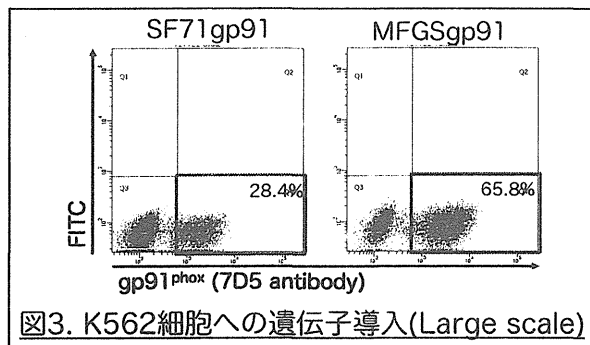
CliniMACSで分離された 1.49×10^6 個のCD34+細胞は、GFP発現ベクターを用いて閉鎖回路系で遺伝子導入を行った。遺伝子導入は、CGDの遺伝子治療臨床研究におけるプロトコールに従った。遺伝子導入操作を2回行ったところ、遺伝子導入効率は67.9%であった。



ii) Large scale 遺伝子導入

大量の細胞 (2×10^7 個のK562細胞株) への遺伝子導入を閉鎖回路系で行った。これまで実際

に欧米の遺伝子治療臨床研究で使用された2種類のgp91phox発現ベクターを用いて遺伝子導入を行った。レトロネクチンでコートした遺伝子導入専用バッグを用いて、遺伝子導入操作を2回繰り返した。その結果、SF71-gp91phoxベクターでは28.4%、MFGS-gp91phoxベクターでは65.8%の細胞がgp91phoxを発現していた(図3)。



D. 考察

『慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究』を含む造血幹細胞遺伝子治療では、生体外で遺伝子を導入し、その造血幹細胞を被験者へ戻す ex vivo 遺伝子治療と呼ばれる方法が実施される。これは、既に欧米で行われている遺伝子治療と同様の方法である。Ex vivo 遺伝子治療は、正常な造血幹細胞を患者へ投与する造血幹細胞移植に類似した原理の治療法である。そこで、日本輸血・細胞治療学会、日本造血細胞移植学会から発行される「院内における血液細胞処理のための指針」を基に、当センターで自家骨髄移植や造血幹細胞移植で行われてきた手順を参考にして、病院環境整備に関するSOPを作成した。

また、ex vivo 遺伝子治療では、被験者がウイルスベクターに直接暴露される可能性は、理論的には無いとされている。しかし、予測困難な事態に備えて、細胞投与直後は、ウイルスベクターの拡散を防止する目的で被験者を一時的に隔離する。これに関して、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ガイドライン等を基に“病棟管理の手順”や“患者排泄物の処理手順”を作成した^{1), 2), 3)}。

造血幹細胞遺伝子治療において、遺伝子導入効率は治療効果に大きく影響する。しかし、小動物を用いた実験室レベルの研究とは異なり、ヒト遺伝子治療臨床研究では大量の細胞を扱うことになる。また、治療の安全性という観点から、検体汚染を回避するために閉鎖回路系で一連の作業を行う方法が選択される。そのため、ヒト遺伝子治療臨床研究に対応した遺伝子導入SOPの確立と実施者のトレーニングが重要となる。そこで、臍帯血単核球をヒト末梢血単核球と想定し、ヒト遺

伝子治療で実施する CD34+細胞分離法を確立した。遺伝子導入 SOP に従って分離を行ったところ、最終的に 95%を超える高純度の造血幹細胞を分離することが可能となった。

また、臍帯血を用いた検討から、CD34+細胞を分離し、生体外で遺伝子を導入する方法を確立することができた。しかし、臍帯血からヒト遺伝子治療で扱う大量の CD34+細胞を確保することは、現実的に困難である。そこで、大量の細胞へ遺伝子を導入する large scale 遺伝子導入法を確立するために、K562 細胞株を使用した。今回、欧州の遺伝子治療臨床研究で使用された SF71 ベクター⁴⁾と、米国の臨床研究で使用され当センターの CGD 遺伝子治療臨床研究で使用する MFGS ベクター⁵⁾を用いて遺伝子導入効率を検討した。SF71 ベクターとタカラバイオで精製した MFGS ベクターのいずれについても、遺伝子導入効率は文献的に報告されている結果と同等であった。さらに、一連の閉鎖回路系における検体の取扱いによって、検体の汚染を認めなかったことから、この遺伝子導入 SOP を用いて、造血幹細胞遺伝子治療を行うことが可能と考える。

参考文献:

- 1) CDC: Guideline for Isolation Precautions (2007) (<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Isolation2007.pdf>)
- 2) 満田年宏: 隔離予防策のための CDC ガイドライン, ヴァンメディカル (2007)
- 3) 日本造血細胞移植学会: 造血幹細胞移植ガイドライン 移植後早期の感染管理 第2版(2012)
- 4) Ott, M: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. Nature Medicine. 2006; 12(4):401-9
- 5) Kang, E: Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. Blood 2010; 115(4): 783-91.

E. 結論

慢性肉芽腫症を含め、単一遺伝子異常に起因する先天性疾患は造血幹細胞遺伝子治療の対象となる。当センターでは『慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究』が承認されており、本研究で作成した SOP に従い速やかに造血幹細胞遺伝子治療を実施することが可能である。今後、SOP をもとに病院スタッフの教育を行い、造血幹細胞遺伝子治療を安全かつ適切に実施できる体制を強化する。

F. 研究発表

1. 論文発表

T Imagawa, S Takei, T Kawai, et al. Efficacy, Pharmacokinetics, and Safety of Adalimumab in Pediatric Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis in Japan. Clin Rheumatol. 2012 Dec;31(12):1713-21

T Kawai, R Nishikomori, T Kawai, et al. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Blood. 2012 Jun 7;119(23):5458-66

堀内清華、石黒精、河合利尚、ほか. 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、Foxp3 低下を認めた IPEX 症候群の女児例. Jpn. J. Clin. Immunol. 2012;35(6):526-532
河合利尚. 慢性肉芽腫症と他の食細胞機能異常症. 小児内科 2012; 44 巻:242-243

2. 学会発表

大林奈穂、清水泰岳、河合利尚、ほか. 小児慢性肉芽腫症関連腸炎の内視鏡的・組織学的検討 2012 第 115 回小児科学会学術集会

宇野光昭、清谷知賀子、増澤亜紀、塩田曜子、中澤裕美子、河合利尚、小野寺雅史、森鉄也. 国立成育医療研究センターにおける慢性肉芽腫症 5 例の造血幹細胞移植. 2012 第 115 回小児科学会学術集会

高橋正貴、田中秀明、河合利尚、ほか. 外科的介入が必要となった慢性肉芽腫症の 3 例. 2012 第 49 回日本小児外科学会

田村英一郎、河合利尚、中澤裕美子、原山静子、清水泰岳、伊藤玲子、井田博幸. 慢性肉芽腫症腸炎における腸内細菌スクリーニング検査. 2012 第 44 回小児感染症学会

吉田仁典、中澤裕美子、河合利尚、ほか. 腸間膜リンパ節炎から Candida glabrata 腹膜炎を発症した慢性肉芽腫症の 1 例. 2012 第 44 回小児感染症学会

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臨床データの管理

研究分担者 瀧本哲也 国立成育医療研究センター臨床研究センター臨床研究推進室長

研究要旨

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease; CGD）に対する遺伝子治療研究は、厚生科学審議会で承認され、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った。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)を作成し得たと考えている。今後は実際の遺伝子治療研究から得られた経験をふまえて、CRF等をさらに改善していくことにより、ひき続いて実施される遺伝子治療のみならず、他の先進的治療研究のデータ管理体制にも役立てることができると考えられる。

A. 研究目的

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease; CGD）に対する遺伝子治療研究は、研究計画書および付属書類の当センター遺伝子治療臨床研究審査委員会承認、および厚労省の遺伝子治療臨床研究作業委員会での審議を経て、平成24年6月に厚生科学審議会で承認された。現在、ホームページその他で被験者を募集しているところである。実験的な要素を含む治療であるため、実施に先立ってこれまでも当センターにおいて種々の議論を行ってきたが、本年度中の実施が見込まれる段階でデータ管理上の問題点について最終的な確認作業を実施した。

B. 研究方法

班会議での議論等をふまえ、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 や同意文書等の改訂を行い、遺伝子治療の実施に備える。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療は、遺伝子治療臨床研究に関する指針を遵守して実施され、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。すなわち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（二重ロックのサーバおよび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。

C. 研究結果

項目別に議論となった点と対応策について述べる。

【症例登録】

症例登録は、遺伝子治療臨床研究適応評価判定委員会（判定委員会）による判定に続いて、被験者（代諾者）に説明を行い、文書による同意を得て行うという手順となっている。班会議では、判定委員会に移植適応についての判定を依頼すること自体に患者の同意を要するかどうか議論となった。判定委員会に臨床データが提出されることを被験者（代諾者）が未然に知っておく必要があることは明らかであるが、判定委員会での判定が「不適合」であれば遺伝子治療を実施することができないことを考慮すれば、その同意はむしろ当センターに受診される前に紹介施設で明確に取得されるべきではないかと考えられた。これについてはすでに説明文書が作成され、

当センターへの紹介施設でも使用が可能な体制になっている。なお、これとは別に同意を行った後も被験者(代諾者)が同意したことについて迷う可能性も指摘され、同意撤回の書式を定めておくとともに、臨床心理学的なサポートの必要性も議論された。

【有効性と安全性評価】

Case Report Form (CRF) には有効性と安全性評価のための用紙が含まれている。一方、研究計画書の付録として「遺伝子治療の安全性、有効性評価基準」が存在している。もちろん両者の項目間には整合性があるが、班会議での議論をふまえて有効性評価の時期や、感染症の5段階評価の根拠をCRFごとに明確にさせた(CRFの再改訂)ほか、短期的・長期的有効性に基いた被験者に対する遺伝子治療の有効性の総合判断について、根拠と併せて記載する用紙も新たに作成した。

安全性についても、規定された評価時期と薬物有害反応判定に準じたグレード判定の根拠をより具体的に記載できるようにCRFを改訂した。

【同意の撤回文書】

先述のように遺伝子治療に対する同意の撤回について明記する文書を作成すべきとの議論に基づき、同意書とは別に作成した。班会議では同意撤回の理由は、遺伝子治療のような特殊な実験的医療においては意義があることを認めつつも、倫理的な理由からやはり問うことは難しいとされた。ただし、遺伝子治療においては、遺伝子導入を行った末梢血幹細胞の輸注に先立つ前処置の開始後の同意撤回は危険を伴うこと、および幹細胞輸注後に治療に対する同意を撤回することには意味がないと考えられるため、遺伝子治療自体に対する同意撤回の時期は前処置開始前までとし、その後の同意撤回は研究への臨床情報の提供に関するものとした。

D. 考察

全身状態不良、適当なドナーが不在などの理由で造血幹細胞移植の適応とならないCGD症例を対象とした遺伝子治療はCGD患者の治療選択肢を拡大するものとして期待されている。遺伝子治療の本年度中の実施は、当センターの目標にも挙げられており、また各種委員会の承認も得て最終段階にある。これに伴い、診療部

や治験コーディネーターらの体制も整い、被験者の選定を待つばかりとなっている。

本年度は、このような実施直前の遺伝子治療のデータ管理体制の最終的な見直しとして、班会議の議論をふまえてさらなるCRFの改訂を行った。特にこのような先進的な医療の場合、生じた結果を記載したCRFが各種の審査の資料としても耐えられる必要がある。CRF原案の作成以降、本年度までに至るセンター内の議論に基づいた改訂により、かなりの程度でこの目的にかなうものができたのではないかと考えている。

しかしながら、遺伝子治療のような実験的治療においては、実際に行うことにより、さらなるデータ管理上の問題点が生じてくるものと予想される。このため、本年度中にさらなるCRF改訂の必要性が生じる可能性もあり、ひきつづき対応することによって、最終的なCRFを確定したいと考えている。このような作業は、今後実施される遺伝子治療のみならず、他の先進的治療研究のデータ管理体制にも役立つものと考えられる。

E. 結論

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療研究の臨床データ収集について症例登録時の同意のあり方、有効性・安全性評価等の面から再検討を行った。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CRFを作成し得たと考えている。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表等
なし
2. 学会発表等
なし

H. 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, Yoshimura A, <u>Onodera M</u> , Itoh H	Loss of PDK1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance.	Diabetes	61	1935-1948	2012
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、 <u>小野寺雅史</u>	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、Foxp3低下を認めたIPEX症候群の女児例	Jpn J Clin Immunol	35	526-532	2012
Lin HT, <u>Otsu M</u> , Nakauchi H	Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence.	Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci	368	20110334	2013
Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, <u>Otsu M</u> , et al	In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling.	Blood	119	e45	2012
Nakanishi M, <u>Otsu M</u>	Development of Sendai Virus Vectors and Their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine.	Curr Gene Ther	12	410	2012
Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, <u>Otsu M</u> , et al	Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples.	Blood	119	6234	2012
Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, <u>Kume A</u> , Muto S, Kusano E, Ozawa K	Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats.	Gene Ther	19	476-482	2012
Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, <u>Kume A</u> , Ozawa K	NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites.	Cancer Res	73	364-372	2013
Fukushima H, <u>Fukushima T</u> , Hiraki A, Suzuki R, Mahmoud SS, Yoshimi A, Nakao T, et al	A case report: Central nervous system lesions due to Juvenile myelomonocytic leukemia progressed in a boy undergoing first line chemotherapy.	Int J Hematol	95	581-584	2012

Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Kikuchi A, Koh K, Kiyokawa N, Fukushima T, Ishida Y, Saito T, Hanada R, Tsuchida M; Tokyo Children's Cancer Study Group	The utility of performing the initial lumbar puncture on day 8 in remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: TCCSG L99-15 study.	Pediatr Blood Cancer	58	23-30	2012
Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, <u>Nunoi H</u> , Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O	A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins.	Curr Chem Genomics	6	27-37	2012
Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, <u>Nunoi H</u>	Efficacy of Temozolomide in a Central Nervous System Relapse of Neuroblastoma With O ⁶ -Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation.	J Pediatr Hematol Oncol	35	e38-41	2013
Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, <u>Nunoi H</u>	Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia.	Pediatr Blood Cancer	60	329-331	2013
Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, ... <u>Nunoi H</u> , et al	Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. Int J	Hematol	96	342-349	2012
Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, <u>Nunoi H</u> , Ihara T	Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections.	Allergol Int	61	507-509	2012
Nakamura H, Fang J, Mizukami T, <u>Nunoi H</u> , Maeda H	PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite.	Exp Biol Med	237	703-708	2012
Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, <u>Nunoi H</u>	Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease.	Am J Hematol	87	447-450	2012
Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, <u>Nunoi H</u> , Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H	Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease.	PLoS One	7	e27782	2012
Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, <u>Nunoi H</u>	Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis.	Pediatr Int	54	147-150	2012

Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, <u>Nunoi H</u>	Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.	J Clin Immunol	32	39-49	2012
中原 彰彦、 <u>布井 博幸</u>	クローズアップ感染症 〈感染症治療の進歩〉 急性脳症と臓器障害 インフルエンザ脳症を中心に	小児内科	44	1104-1108	2012
<u>布井 博幸</u>	インフルエンザ脳症 アポトーシスを伴う多臓器不全	LiSA	19別冊 '12	92-100	2012
Yamada M, Okura Y, Suzuki Y, Fukumura S, Miyazaki T, Ikeda H, Takezaki S, Kawamura N, <u>Ariga T</u>	Somatic mosaicism in two unrelated patients with X-linked chronic granulomatous disease characterized by the presence of a small population of normal cells.	Gene	497	110-115	2012
Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park M-j, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, <u>Ariga T</u>	Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain.	J Immunol	189	1521-1526	2012
Okura Y, Nawate M, Takahashi Y, Kobayashi I, Yamada M, <u>Ariga T</u>	Rheumatoid factor-positive synovitis in a patient with C3 deficiency.	Scand J Rheumatol	41	405-406	2012
Takezaki S, Okura Y, Ichikawa M, Suzuki D, Ohshima J, Kaneda M, Cho Y, Yamada M, Kawamura N, Iguchi A, Kobayashi I, <u>Ariga T</u>	Development of germinoma during the treatment of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis with infliximab.	Modern Rheumatology	22	621-624	2012
Cho Y, Iizuka S, Hatae Y, Kobayashi K, Hattori Y, Yamashiro Y, <u>Ariga T</u>	A 25-year Observation of a Japanese Female Patient with Hb Nottingham Having Two Babies with the Same Disorder.	Hemoglobin	36	446-455	2012
Sato T, Okumura F, Iguchi A, <u>Ariga T</u> , Hatakeyama S	TRIM32 promotes retinoic acid receptor α -mediated differentiation in human promyelogenous leukemic cell line HL60.	Biochem Biophys Res Commun	417	594-600	2012
Sato T, Okumura F, <u>Ariga T</u> , Hatakeyama S	TRIM6 interacts with c-Myc and maintains pluripotency of mouse embryonal stem cells.	J Cell Sci	125	1544-1555	2012
Shibata M, Sato T, Nukiwa R, <u>Ariga T</u> , Hatakeyama S	TRIM45 negatively regulates NF- κ B-mediated transcription and suppresses cell proliferation.	Biochem Biophys Res Commun	423	104-109	2012

Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, <u>Ariga T</u> , Miyawaki T	Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis.	Int J Hematol	95	692-696	2012
Kanegane H, Taneichi T, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, <u>Ariga T</u> , Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T	Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency.	Pediatr Transplant	17	E29-E32	2012
<u>Ariga T</u>	Wiskott-Aldrich syndrome; an X-linked primary immunodeficiency disease with unique and characteristic features.	Allergology Int	61	183-189	2012
Yamada M, Okura Y, Suzuki Y, Fukumura S, Miyazaki T, Ikeda H, Takezaki S, Kawamura N, <u>Ariga T</u>	Somatic mosaicism in two unrelated patients with X-linked chronic granulomatous disease characterized by the presence of a small population of normal cells.	Gene	497	110-115	2012
Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park M-j, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, <u>Ariga T</u>	Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain.	J Immunol	189	1521-1526	2012
小須賀基通、奥山虎之	酵素補充療法	小児科診療	76	145-150	2013
Tanaka A, <u>Okuyama T</u> , Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yab H, et al	Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan.	Mol Genet Metab	107	513-520	2012
Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, Shiohama A, Hirakiyama A, <u>Okuyama T</u> , Seki A, Kabashima K, et al	Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene SLCO2A1 and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis.	J Dermatol Sci	68	36-44	2012
Hwu WL, <u>Okuyama T</u> , But WM, Estrada S, Gu X, Hui J, Kosuga M, Lin SP, Ngu LH, Shi H, Tanaka A, et al	Current diagnosis and management of mucopolysaccharidosis VI in the Asia-Pacific region.	Mol Genet Metab	107	136-144.	2012
D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, Arn P, Cox GF, Giugliani R, <u>Okuyama T</u> , Wijburg F, Kaplan P	Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry	Eur J Pediatr	171	911-919	2012

Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, <u>Kawai T</u> , et al	Efficacy, Pharmacokinetics, and Safety of Adalimumab in Pediatric Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis in Japan.	Clin Rheumatol	31	1713-1721	2012
Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, <u>Nunoi H</u> , Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, <u>Kawai T</u> , et al	Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.	Blood	119	5458-5466	2012
堀内清華、石黒精、 <u>河合利尚</u> 、他	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、Foxp3低下を認めたIPEX症候群の女兒例.	Jpn J Clin Immunol	35	526-532	2012
<u>河合利尚</u>	慢性肉芽腫症と他の食細胞機能異常症.	小児内科	44	242-243	2012

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大津 真、中内 啓光	ES/iPS細胞技術と造血幹細胞移植		日本臨床	日本臨床社	大阪	2012	146
大津 真	夢の万能細胞iPS細胞の臨床応用への道-遺伝病を中心に-		小児内科	東京医学社	東京	2012	1697
有賀 正	原発性食細胞機能不全症	門脇孝、永井良三	内科学	西村書店	東京	2012	1329-1332
有賀 正、大倉有可	補体欠損症	原寿朗	小児の発熱 A to Z	診断と治療社	東京	2012	191-197
小須賀基通、奥山虎之	ムコ多糖症	五十嵐隆	小児疾患の診断基準	東京医学社	東京	2012	168-169

IV. 研究成果の印刷物・別刷