

2014/0015A

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

(成育疾患克服等総合研究事業)

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する  
遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備

平成26年度総括・分担研究報告書

平成27年(2015年)3月

研究代表者

小野寺雅史

平成 26 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（成育疾患克服等総合研究事業）

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備

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. 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植と 造血幹細胞遺伝子治療の治療成績の比較	小野寺雅史…	11
2. 原発性免疫不全症への遺伝子治療に関する研究	内山 徹…	15
3. 遺伝子・細胞治療のための分子生物学的解析	中林 一彦…	19
4. ブスルファン薬物血中濃度モニタリングによる適正投与量設計に関する研究	大森 栄…	23
5. TREC/KREC測定の原発性免疫不全症 診断と治療への応用	野々山恵章…	26
6. 原発性免疫不全症に対する新生児マススクリーニング のパ イロット研究	今井 耕輔…	32
7. 遺伝子治療対象疾患のハイリスクスクリーニング法の確立とその臨床応用	奥山 虎之…	37
8. ファブリー病患者 $\alpha$ ガラクトシダーゼA遺伝子の遺伝子変異解析	大橋 十也…	41
9. リソゾーム病患者（LAL欠損症並びにニーマン-ピックC病患者）の スクリーニングに関する研究	衛藤 義勝…	44
10. 単球・マクロファージに NADPH oxidase 活性を有した X-CGD 症例の検討	有賀 正…	49
11. 日本におけるp47phox欠損型慢性肉芽腫症の遺伝子解析	布井 博幸…	56
12. 遺伝子・細胞治療実施に係る基盤整備	藤本純一郎…	58
13. 遺伝子治療における ICH-GCP に準拠したデータ管理	瀧本 哲也…	60
III. 班会議 プログラム・議事録・発表スライド		65
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		127
V. 研究成果の印刷物・別刷		135

# 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

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備  
(H25-次世代-一般-007)

主任研究者 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

日本において小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療を保険医療として実施するため、全国の免疫不全症ならびに先天代謝異常症の専門家と共に臨床研究中核病院である成育医療研究センターが中心となり、国内企業との連携の下、欧米で行われている遺伝子治療臨床試験に共同研究として参加し、そこで得られる情報や経験を基に我が国独自の治験実施体制を整備する。なお、本年度は以下の研究を実施した。

1. 実態調査としては原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の成績を造血幹細胞移植のそれと比較した。2. 前臨床研究としては臨床用ベクターの安全性評価系としての *in vitro* immortalization アッセイを確立し、また、次世代シーケンサーを用いた治療用ベクターの染色体挿入部位網羅的解析法ならびに前処置として使用するブスルファン血中モニタリング法を確立した。3. 治験実施のために必要となる診断や患者登録に関しては、免疫不全症、代謝異常症に関するマス・スクリーニングの確立を目指した。4. 当センターにおける実施体制に関しては臨床研究中核病院における遺伝子・細胞治療の基盤整備や ICH-GCP に基づくデータ管理体制を準備した。

実際の治験実施に関しては、対象疾患をウィスコット・アルドリッチ症候群とし、現在、欧州で治験を行っている企業との契約との下、必要書類を入手し、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の事前面談を受けた。

#### 分担研究者・所属機関・職名

小野寺 雅史  
国立成育医療研究 C 成育遺伝研究部・部長  
内山 徹  
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  
藤本 純一郎  
国立成育医療研究 C 臨床研究センター長  
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  
野々山 恵章  
防衛医科大学校小児科学講座・教授  
今井 耕輔  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座・寄附講座准教授  
衛藤 義勝  
脳神経疾患研究所先端医療研究 C・センター長  
大橋 十也  
東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター・センター長  
大森 栄  
信州大学医学部附属病院薬剤部・教授

#### A. 研究目的

現在、欧米を中心に原発性免疫不全症などの小児稀少難病に対し数多くの遺伝子治療が行われ、その有効性、安全性の面から遺伝子治療がこれら疾患に対する有効な治療法と認識されている。また、重症肺炎を頻発するリポタンパクリパーゼ（LPL）欠損症に対して LPL 発現アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが欧州初の遺伝子治療薬として承認されたことから、企業間で遺伝子治療製品の開発機運が急速に高まり、活発な開発研究が進められている。

一方、我が国では多くの遺伝子治療が「医薬品としての承認取得を目的としないアカデミアの研究者による臨床研究」に留まり、また、臨床用ベクターを含め遺伝子治療で使用される製剤の品質が医薬品の開発につながる医薬品医療機器総合機構（PMDA）の審査を受けていないため、海外企業が行う遺伝子治療の国際共同治験への参加や日本発の国際共同治験の実施を困難にしている。

これに対し、我が国でも医師主導治験を積極的に推進しようとする動きがあり、幸運なことに国立成育医療研究センターも平成 25 年に「小児難病治療開発のオールジャパン体制」の構築を目指した臨床研究中核病院に採択された。そこで、本研究では、対象疾患を原発性免

疫不全症や先天性代謝異常症とし、全国のこれら疾患に対する専門家と共に臨床研究中核病院である当研究センターが中心となり、遺伝子治療においては十分な実績を有する国内企業のタカラバイオ社と連携し、現在、イタリア San Raffaele 研究所において行われている原発性免疫不全症のウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) に対する造血幹細胞遺伝子治療を医師主導治験として実施することを目的としている。そして、この過程に通じて得られる様々な知識や経験を基に我が国に適した遺伝子治療 (治験) の実施体制を整備する。また、これら稀少疾患に対する遺伝子治療を継続して実施していくには、全国規模の患者登録体制や発症早期あるいは発症前診断を可能にする簡便なスクリーニング法も重要となり、本研究において合わせて研究を進める。

## B. 研究方法

### <遺伝子治療の実態調査>

#### 1. 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療と造血幹細胞移植との治療成績の比較

公開されている学術論文や資料ならびに日米欧の規制当局のホーム・ページにて情報を入手し、また、いまだ未発表当のデータに関しては、直接、海外の遺伝子治療関連の施設を訪問し、その担当者に会い、情報を入手した (小野寺)。

### <前臨床試験>

#### 1. in vitro 不死化アッセイの確立

遺伝子臨床研究で使用されるウイルスベクターの安全性を評価するため in vitro 不死化アッセイ (in vitro immortalization assay: IVIM assay) を確立する。使用するベクターは強力なプロモーター活性を有する spleen focus forming virus (SFFV) とし、より安定なウイルス産生を確保するためウイルスエンベロープとして VSV-G を発現する 293pgg に遺伝子を導入することで stable line を樹立した。標的細胞を C57BL/6 マウス骨髄より得られた lineage negative 細胞とし、サイトカインの刺激にて EGFP 遺伝子を導入し、その後、96 well plate にて 2 週間培養することで不死化の頻度を測定した。また、同様の実験をヒト臍帯血より得られた CD34 陽性細胞を用いて行った (内山)。

#### 2. 次世代シーケンサーによるベクター挿入部位の網羅的解析

遺伝子治療用ベクターの染色体挿入部位を、

次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析するため、実際の遺伝子治療で使用された二種類のレトロウイルスベクターの LTR 配列 (MoMLV、MPSV) とコントロール遺伝子として Sonic hedgehog (*SHH*) 遺伝子をコードするエクソン配列を対象とした。RNA ベイト長を 120bp とし、隣接するベイト間が 60bp の冗長性を持つようベイトを設計した。ベイト数は MoMLV で 17 個、MPSV で 12 個であり、これら 2 つの LTR の塩基配列相同性は 92% である。使用する細胞を HEK293SPA と K562MFGS とし、3 $\mu$ g ゲノム DNA を断片化してイルミナ社シーケンサー対応アダプターを付加し、PCR 増幅にてゲノムライブラリーを作製した。上記、SureSelect ベイト RNA ライブラリーを用いた DNA:RNA ハイブリッド法にてウイルスベクター配列を含む DNA を濃縮した。各濃縮ライブラリーについてイルミナ社 HiSeq1500 システムによりシーケンスデータを取得した (中林)。

#### 3. プスルファン薬物血中濃度モニタリングによる適正投与量の設定

造血幹細胞遺伝子治療の前処置として用いられるプスルファン (BU) の血中濃度を測定し、その薬物体内動態を予測する系を確立するため、低速注入後 3~4 点で BU の血漿中の濃度を測定し、その値を 1-コンパートメントモデル式に当てはめ、薬物速度論的パラメータを算出した。算出したパラメータを基に患者ごとの目的とする  $C_{ss}$  濃度を得るための適正投与量の設定を行った (大森)。

### <疾患スクリーニング>

#### 1. PID に対するマス・スクリーニング

原発性免疫症に対する発症前診断のための新生児スクリーニングを確立するため、TREC/KREC の絶対定量法の開発、健常新生児の測定による基準値の設定、ならびに SCID 及び無 $\gamma$ グロブリン血症患者の TREC/KREC の測定を行った。対象は、臍帯血 87 例、臍帯血ろ紙血 78 例、新生児ろ紙血 60 例、健常者末梢血 53 例 (男 25、女 28)、無 $\gamma$ グロブリン血症 12 例 (男 10、女 2)、SCID 患者 21 例 (IL2RG 15、JAK3 2、LIG4 2、ADA 欠損症 2) である (野々山)。

#### 2. PID に対する NBS の体制

原発性免疫症に対する発症前診断のための新生児スクリーニングを確立するため、その体

制に関して地方自治体等と話し合いを持ち、同時に経費的に運営が可能かを調査した（今井）

### 3. ポンペ病に対する NBS

ポンペ病は、ライソゾーム酵素のひとつである酸性グルコシダーゼの先天的欠損を原因とする常染色体劣性遺伝病であり、乳児型の心筋肥大や小児・成人期の近位筋の筋力低下、呼吸筋の障害で発症する。今回、採取や輸送が簡便で侵襲の少ない乾燥ろ紙微量血検体を用いて、ポンペ病の責任酵素である酸性グルコシダーゼの測定法を確立した。また、原因不明の心筋肥大、筋力低下や高 CK 血症を呈する患者の乾燥ろ紙微量血検体を用いて、ポンペ病のハイリスク・スクリーニングを行い、活性低値を呈した症例については、ポンペ病と pseudo-deficiency（偽欠損）の鑑別のための GAA 遺伝子解析を行った（奥山）。

### 4. ファブリー病に対する遺伝子解析

ファブリー病（FD）は $\alpha$ ガラクトシダーゼ（GLA）の欠損により、四肢疼痛、腎障害、心筋肥厚、脳血管障害を呈する X 連鎖劣性遺伝病で、NBS による早期診断で遺伝子治療等の早期治療につながる疾患でもある。平成 26 年度に慈恵大学を受診した患者は 14 名であり、FD 様症状と FD 家族歴の有無、GLA 酵素活性測定と Gb3 蓄積解析などによる簡易スクリーニングを行い、スクリーニング陽性例と女性 FD 疑い例に対して GLA 遺伝子解析を行った。方法は gDNA を用いた GLA exon の direct sequence と白血球中の GLA 酵素活性測定、尿中 Gb3 蓄積解析、GLA cDNA cloning、SNP 解析等である（大橋）。

### 4. リソゾーム病のスクリーニング

ライソゾーム病であるライソゾーム性酸性リパーゼ（LAL）欠損症やニーマンピック C（NPC）病に対するスクリーニングを確立するため、LAL 欠損症に対しては、4-methylumbelliferyl palmitate を基質として、Dairaku N らの方法（Mol. Genet. Metab., 2013）に従い LAL 活性を測定した。NPC 病に関しては、バイオマーカーとして血清オキシステロールを Q-TOFMS で測定する方法を確立し、7-ケトコレステロール（7KS）を測定した（衛藤）。

<症例報告・患者解析>

#### 1. 慢性肉芽腫症（gp91<sup>phox</sup>欠損）

X 連鎖慢性肉芽腫症（X-CGD）は NADPH

oxidase の構成タンパクである gp91<sup>phox</sup> の異常により食細胞の活性酸素産生が障害される疾患である。今回報告する患者は 31 歳の男性で、好中球における活性酸素酸性能は認めないものの単球においてはほぼ正常に同等の活性酸素産生能を認めていて、ST 合剤と ITCZ の予防投与によりこれまでに明らかな細菌、真菌感染症や過炎症病態を認めていない症例である。この症例に対して、種々の免疫学的検査を行った（有賀）。

#### 2. 慢性肉芽腫症（p47<sup>phox</sup>欠損）

我が国における慢性肉芽腫症の全体像とその病態分類を明らかにするために、p47<sup>phox</sup>欠損 CGD 患者 16 名についてアンケート調査を行い、重症度とその遺伝子変異を調査した。病型分類としては、DHR123 法にて活性酸素産生能の低下を確認し、その後、本人及び両親の gp91<sup>phox</sup>/p22<sup>phox</sup> の発現を 7D5 抗体にて検査した。両親（特に母方）の gp91<sup>phox</sup>/p22<sup>phox</sup> の発現が陽性の場合には CYBA（p22<sup>phox</sup>）遺伝子検査を、2 相性の場合には CYBB（gp91<sup>phox</sup>）遺伝子検査を行った。P47<sup>phox</sup>/p67<sup>phox</sup> の発現は western blot か FACS 解析（J Clin Immunol 33: 857, 2013）にて検査した。p47<sup>phox</sup>欠損患者の遺伝子解析はこれまでの Sanger 法で行われ、過去のデータベースと比較した（布井）。

<遺伝子治療の基盤整備関係>

#### 1. 基盤整備

遺伝子・細胞治療の臨床研究開発に係る基盤整備を行い、医師主導治験等の開発を促進するため、当センターは厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業の指定を受けた。そこで本事業の中での当該研究への推進支援について昨年度に引き続き、研究代表者、関連企業の担当者、社会・臨床研究センター担当者等との協議を行い、その方向性や計画等を定めた。また、外国企業からの契約書等の内容確認については当センターの顧問弁理士に相談しつつ検討を行った（藤本）。

#### 2. データ管理

遺伝子治療における ICH-GCP 準拠のデータ管理にむけて、標準業務手順書（SOP）を整備する。また、source document verification（SDV）モニタリングが可能な体制を構築するためモニタリング専門家を雇用し、モニターの養成に向けた作業を開始する（瀧本）。

### (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. 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療と造血幹細胞移植との治療成績の比較

現在、造血幹細胞遺伝子治療は原発性免疫不全症に対する有効な治療法と考えられるが、その治療概念が、およそ使用する細胞の違いはあれ(自己か同種か)、基本、正常に機能する造血幹細胞の移植であることから、その評価は根治療法である造血幹細胞移植との比較によってなされるべきである。よって、アデノシン・デアミナーゼ(ADA)欠損症、X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)、WAS、慢性肉芽腫症(CGD)の焦点を当て、これまでの造血幹細胞移植ならびに造血幹細胞遺伝子治療の治療成績を比較した。結果、ADA欠損症ではHLA一致血縁ドナーがいれば造血幹細胞移植であり、適当なドナーがいなければ酵素補充療法かレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が選択される。ただし、その際に前処置としてのlow dose BUは必要である。X-SCIDに関しては、HLA一致ドナーがいれば造血幹細胞移植(臍帯血を含む)であり、不在の場合はレン

チウイルスによる遺伝子治療が望まれる。WASに関しては、HLA一致ドナーがいれば造血幹細胞移植であり、適当なドナーがいなかった場合あるいは症例が5歳以上の場合はレンチウイルスによる遺伝子治療が望まれ、その際、ある程度強力な前処置(RIST)は必要である。CGDに関しては、現時点で長期間の有効性が示せていないことから、基本、造血幹細胞移植が選択される。ただ、重度の感染症を有する年長者に対しては短期的な治療効果を目的とした遺伝子治療も検討されてもよい(小野寺)。

### <前臨床試験>

#### 1. PIDに対する前臨床試験

SFFVベクター産生株としてマウス細胞のみにも感染するSFFV-ecoとヒト細胞にも感染するSFFV-vsugを樹立し、マウス造血幹細胞に感染し、その不死化率(replating frequency: RF)を測定した。結果、SFFV-ecoの方がSFFV-vsugよりRF値は高く、また、ベクターコピー数(VCN)も高値を示した。このことは、IVIM assayではベクターの構造以外の要素として、エンベロープの違い(毒性)もその結果に影響を与えることが示唆された。さらに、不死化した細胞クローンの表現型をFCMにて解析したところ、顆粒球系マーカーのGr-1とMac1及びIL3受容体を発現しており、stem cell factorの受容体であるc-KITは発現していなかった。このことは、これらクローンがSCF依存性ではなく、IL-3依存性であることから支持される。次に、実際の遺伝子治療臨床試験に即した評価系の確立を目指し、研究用のヒト臍帯血を利用したIVIM assayを行なった。amphotropicエンベロープによるSFFVベクターにより遺伝子導入を行なったところ、マウス骨髄同様にヒト臍帯血由来CD34陽性細胞の不死化が認められ、今後はこれら不死化したヒト細胞の特性を解析していく(内山)。

#### 2. 次世代シーケンサーによるベクター挿入部位の網羅的解析

約750万断片の両端について101bpのシーケンスを行うことで、各ライブラリーについて1.5Gb程度の配列データを得た。また、各リードをトリミングした後、ヒトゲノム及びベクター配列を含むリファレンスに対しマッピングし、高カバレッジ領域の探索、リードの向きを考慮した解析、さらにはde novoアセンブリを行うことで、それぞれ100塩基対程度、10塩基対程度、1塩基対の解析度で挿入部位を同定

し、HEK293SPA で一カ所、K562MFGS で 47 カ所のベクター挿入部位を同定できた (中林)。

### 3. ブスルファン薬物血中濃度モニタリングによる適正投与量の設定

骨髄抑制を目的としたブスルファン投与設計を確立してからこれまでに 49 症例の投与設計を行った。本研究班においても今年度は 1 症例に投与設計を実施した。Css,av を 900 ng/ml を目標として 0.8mg/kg の投与を実施し、実測値が 926 ng/ml となった。投与後 2 週間後から急激に各造血系細胞の減少が認められ、血小板は回復までに約 3 ヶ月程度を要した (大森)。

### <疾患スクリーニング>

#### 1. PID に対するマス・スクリーニング

健常新生児から得られた検体のうち gDNA が 5ng/μl 未満を除外して TREC/KREC を測定したところ、内因性コントロールの RNaseP は年齢による差はなく、TRECs、cjKRECs、sjKRECs で RNaseP に対し正の相関を示した。cjKRECs、sjKRECs とも新生児時期で他の年齢層より低く、乳児期 (2 歳未満) で最高値を示し、その後は徐々に低下した。無γグロブリン血症患者では、RNaseP、TRECs は全て健常人と同等の値を示したが、cjKRECs、sjKRECs ともに新生児期紙血で感度以下であり、2 歳未満で cjKRECs、sjKRECs とも低値を示し、それ以降は検出感度以下まで減少した。SCID 患者では、sjKRECs、cjKRECs とも検出感度以下であり、TRECs は全例で低値ないしは検出感度以下であった。ただ、IL2RG 欠損や JAK3 欠損 SCID では sjKRECs、cjKRECs とも正常であった。AT あるいは Nijmegen では全例 KRECs が陰性であった (野々山)。

#### 2. PID に対する NBS の体制

新生児マス・スクリーニングについては、千葉県について、かずさ DNA 研究所、千葉県立こども病院と方法、体制等について、意見交換を行った。TREC、KREC 解析についても、当科に紹介された症例全例で検討し、新しく Roche 社から TREC、KREC、MSTN のマルチカラーによる定量キットが発売されたため、少数の検体で、従来法との比較を行い、良好な相関が得られた (今井)。

#### 3. ポンペ病に対する NBS

2014 年 1 月から 12 月末までに 540 件のポンペ病ハイリスク・スクリーニングを行い、5

例 (0.9%) のポンペ病を診断した。また pseudo-deficiency (偽欠損) を 4 例 (0.7%) で認めた (奥山)。

#### 4. ファブリー病に対する遺伝子解析

今回同定した GLA 遺伝子変異のうち、特徴的な遺伝子変異は以下の通りである。1) GLA cDNA にて exon 4-5 間に IVS 4 の purine-rich 配列が挿入、2) L1 挿入による exon 4 の完全欠損、3) GLA cDNA にて exon 3-4 間に IVS 3 の一部が挿入し、その配列に no-SNP 点変異、などである。今回の症例で exon 上に変異が存在しない場合でも、IVS の挿入により遺伝子異常を来す場合があり、GLA cDNA の解析の必要性が示唆された (大橋)。

#### 4. リソゾーム病のスクリーニング

LAL 欠損症に対しては、原因不明の肝機能障害や肝腫大を示す患者 487 名を対象に乾燥ろ紙血を用いた LAL 活性の測定を行った。結果、保因者の可能性が疑われる 13 名と LAL 欠損症が疑われる患者 1 名を発見した。今後はこの 1 名の詳細な解析を行う。NPC 患者におけるオキシステロール測定では、著明に 7-KC が上昇していた。また、DBS を用いた 7-KC の測定では NPC1 患者において高値を示したため、DBS による NPC1 のマススクリーニングが可能であることを示唆している (衛藤)。

### <症例報告・患者解析>

#### 1. 慢性肉芽腫症 (gp91<sup>phox</sup> 欠損)

患者解析の結果、好中球、単球における gp91<sup>phox</sup> の発現に関して、モザイクや mRNA の安定性の違いによる可能性は否定的であった。また、患者で同定された c.1016C>A による X-CGD の報告は 10 家系あるが classical X-CGD であり本症例の臨床像とは明らかに異なっていた。本症例においては好中球の NADPH oxidase の機能は乳児期の自然免疫として重要であるが、加齢とともに単球/マクロファージにおける NADPH oxidase 残存活性が代償しているものと推測された。また、単球/マクロファージの残存活性の評価は X-CGD の長期的予後の予測因子ともなりうる可能性が考えられた (有賀)。

#### 2. 慢性肉芽腫症 (p47<sup>phox</sup> 欠損)

日本における慢性肉芽腫症患者 364 名のうち 280 名で病型が確定しているが、79 名はいまだ病型が確定していない。病型分類が確定してい



る 280 名のうち 16 名が p47<sup>phox</sup> 欠損であり、全体の 5.6%であった。これはほぼ同数の病型分析を行っている NIH の報告 (NEJM 363: 2600, 2010) と米国では p47<sup>phox</sup> 欠損は 24.7%であり、日本に比べて多いことがわかる。一方、日本では p67<sup>phox</sup> 欠損症が多いことがわかる。p47<sup>phox</sup> 遺伝子解析では、3 種類の変異が確認され、delGT 変異が 8/16 (50%)、missense 変異が c269G>A、Arg90His が 2 名、c295G>A、Gly99Ser が 1 名確認された。また、5 例では遺伝子解析がなされていなかった。欧米との比較にて delGT の頻度が高かったが、missense 変異に関しては新規変異であった。

#### <遺伝子治療の基盤整備関係>

##### 1. 基盤整備

臨床研究中核病院整備事業は世界的に通用する ICH-GCP 準拠の質の高い臨床研究を実施するための基盤整備事業であり、今回の遺伝子治療はまさにこの方向性と合致している。本センターでは、治験・医師主導治験の薬事・開発等に精通しているもの、データマネージメントに精通しているもの、ならびに知財・産学連携の担当者らがチームを組んで個別の計画を担当している。また、海外の製薬企業からの契約書等の内容検討も積極的に取り組んでいる (藤本)。

##### 2. データ管理

###### 1) ICH-GCP 準拠データ管理 SOP の作成

ICH-GCP に準拠したデータ管理を実施するため必要と考えられる SOP の作成をすすめた。その概要としては、データマネージメント用語集、症例登録に関する SOP、データ管理に関する SOP およびデータマネージメントマニュアル、データベースおよび Electric Data Capture (EDC)、有害事象の収集と報告である。

###### 2) 施設訪問モニタリング体制

遺伝子治療は現時点では当センター単独での実施となるため、施設訪問モニタリングについては当面不要と考えられるが、施設訪問モニタリングによる Source Document Verification (SDV) が可能な体制の構築は、ICH-GCP 規準を満たすためには必須と考えられる。このため、モニタリングの責任者として外部の CRO でモニタリングの経験が豊富な人材を雇用し、モニターと認定することができるような人材を育成するためのガイドライン、および多施設共同臨床試験のモニタリングに関する SOP を作成した (瀧本)。

#### <WAS 治験の進捗状況>

現在、WAS の遺伝子治療臨床試験 (治験) はイタリア San Raffaele 研究所が中心となって海外企業とともに進められているものとフランス NPO 団体の GENETHON がフランス、イギリス、米国で進めているものがあるが、使用するベクターコンストラクトは同一である。

当初、GENETHON 側と交渉を進めていたが、GENETHON が日本における代理店を有していないため、PMDA との交渉が困難になると考え、イタリア San Raffaele 研究所側と交渉を開始した。これまでところ、当該企業と契約を結び、欧州で行われている治験の臨床プロトコル、IMPD、IB を入手し、それを基に平成 26 年 8 月 11 日に PMDA の事前面談を受けた。また、臨床用ウイルスベクターならびに非臨床試験用の non-GMP ベクターを入手しおり、この non-GMP ベクターを用いて Dry Run をタカラバイオ社と共同で実施している。臨床プロトコルに関しては欧州のものを参考に medical writer に依頼して作成中である。最終的には PMDA との対面助言ならびに当センターにおける治験審査委員会の承認の上、来年度中には WAS に対する遺伝子治療臨床試験 (医師主導治験) を開始したと考えている。

#### D. 考察

本研究も期間 3 年のうち 2 年目が終了し、次年度が最終年度となる。本研究の目的は期間内に小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制整備であるが、特に重要点は、これら遺伝子・細胞治療を治験 (医師主導治験) として行うことにある。確かに、現在、欧米では原発性免疫不全症などの遺伝性難治性疾患に対し数多くの遺伝子治療が行われ、その有効性が実際の臨床の場で証明されている。ただ、およそ、欧米では臨床研究という枠組みを有していないため (類似として hospital exemption 制度はあるが)、すべて遺伝子治療が日本でいう治験に相当する枠組みで実施されている。一方、我が国では遺伝子治療に参画する企業が少なくもあり、多くの遺伝子治療が「医薬品としての承認取得を目的としないアカデミアの臨床研究」に留まり、同時に、審査体制の違いから、日本では臨床ベクターを始め臨床研究で用いる製剤の品質が厚生科学審議会学術部会で評価されるのみで、医薬品開発につながる医薬品医療機器総合機構 (PMDA) での審査を受けておらず、治験で求められるレベルには達成せず、このことが、海外企業が行う遺伝子治

療の国際共同治験への参加や日本初の国際共同治験の実施を困難にしている。

これに対し、政府も全国に早期・探索的臨床試験拠点や臨床研究中核病院を設置し、シーズの探索やそこからの創薬開発につながる医師主導治験を積極的に推進している。さらに、法整備に関しても変化があり、一昨年には新たな法律として再生医療等安全性確保等法律が公布され、昨年11月25日より施行されている。また、薬事法も改正され、加工されたヒト細胞が「再生医療等製品」と初めて薬事法内で定義された（なお、製造承認販売を求めないヒト加工細胞は「特定細胞加工物」と定義されている）。今回の改訂の趣旨は、ヒト細胞は品質的に不均一であり、その有効性を予測するにはあまりにも多くの時間を要し、これまでの医薬品や医療機器に対する基準では承認に向けての審査が困難と判断されたためである。さらに、今回の改正薬事法では、これら「再生医療等製品」に一定の有効性が推定され、さらにその安全性が十分に確認されれば、条件付き、期限付きで早期に承認される「条件・期限付き承認制度」が新たに導入された。これは、欧米では類を見ない制度であり、国内のみならず、海外企業に対しても日本での開発に関して魅力的な制度となっている。ただ、たとえ「条件・期限付き承認制度」が導入されても、これまで同様、「再生医療等製品」の製造には厳しい工程基準が定められ（GMP体制）、さらには臨床現場においてもこれら「再生医療等製品」の使用成績に関する調査や記録の保存などGCPに基づく厳格な安全対策も求められていることから、ここで定義される「再生医療等製品」は、やはり、これまでの比較的容易に行われてきた遺伝子治療臨床研究における「遺伝子導入細胞」とは一線を画するものである。

また、遺伝子治療の場合、通常の細胞治療に加え遺伝子改変のためのウイルスベクターを使用することから、この遺伝子組換えウイルスの安全性評価や品質管理基準の設定が新たな課題となり、同時に、遺伝子治療自体、いまだ発展段階の治療であることから、遺伝子組換えウイルスが起こしうる有害事象を十分に予測することはできず、その長期的フォローをどのように設定してよいかもわからない。さらに、現行の遺伝子治療が稀少難病に対して行われていることを考えると先行する欧米の遺伝子治療とどのようなかたちで歩調を合わせていくかも重要であり、FDAやEMAとの規制調和も重要な課題となってくる。

よって、これらの課題を一元的に解決するためには遺伝子治療を包括的に捉える必要があるような新生児スクリーニングにより早期診断や患者登録、専門企業によるGMP準拠の遺伝子導入細胞調製、臨床中核病院が主体となる患者のフォローアップ体制、さらには最終的な段階での製造・販売・承認を見越した製薬企業との密な連携は重要である。今後も本研究事業ではこれらの課題に対して積極的に取り組んで行く。

## E. 結論

- 1) WAS遺伝子治療臨床試験（治験）に関してはイタリア San Raffaele研究所と共同で実施することにし、現在、IMPD、IB、臨床プロトコルを入手し、さらにタカラバイオ社とともにDry runを行い、その同等性を示すデータ取りを行っている。
- 2) 現在までの原発性免疫不全症における造血幹細胞移植と遺伝子治療の臨床成績を比較・検討した。
- 3) 前臨床試験としてベクターの安全性を評価するin vitro immortalizationアッセイや実際の遺伝子治療臨床研究で使用予定の治療用ベクターの挿入部位解析ならびにブスルファンの血中モニタリング法を確立した。
- 4) PIDあるいは先天性代謝異常症におけるマス・スクリーニング法ならびに患者登録に関する疫学研究を行った。
- 5) 臨床研究中核病院として本研究の支援の仕方を検討し、また、ICH-GCPに準拠したデータマネジメント体制の導入を準備している。同時に床研究中核病院としてARO機能の導入も検討している。
- 6) 健康危険情報  
なし
- 7) 研究発表  
研究成果の刊行に関する一覧表参照
- 8) 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

## 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植と造血幹細胞遺伝子治療の治療成績の比較

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

ここ十余年にわたる造血幹細胞遺伝子治療の臨床成績は、本治療が原発性免疫不全症など遺伝性疾患に対する有効な治療法であることを証明してきた。ただ、およそ、その治療概念が、使用する細胞種の違いはあれ、正常に機能する造血幹細胞の移植であることを考えると、次なる評価は造血幹細胞移植に対する優劣である。そこで、本研究ではこれまでに発表された論文や資料ならびに遺伝子治療関係から入手した情報を基にアデノシン・デアミナーゼ欠損症、X連鎖重症複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、慢性肉芽腫症に焦点を当て、その有効性、安全性を比較、検討した。結果、有効性に関しては慢性肉芽腫症を除き HLA 適合造血幹細胞移植と同等であり、安全性に関しても移植関連合併症がなく安全に行われていた。ただ、染色体挿入型ベクター特有の有害事象である造血器腫瘍の発症がアデノシン・デアミナーゼ欠損症を除く各疾患で見られたため、現在はより安全なレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療が主体となってきた。

### A. 研究目的

本来、理想的な遺伝子治療は疾患の原因となる変異遺伝子を修復すること（gene correction）で疾患の治療にあたるものであろうが、現行の遺伝子治療は国の指針にもあるように変異遺伝子はそのままだに正常遺伝子を加えることで疾患を治療する方法（gene addition）に留まっている。ただ、小児難治性疾患の多くが単一遺伝子の異常により発症する「単一遺伝病」であり、特に、その遺伝形式が劣性遺伝であることを考えると gene addition による遺伝子治療でも十分な治療効果は期待できる。事実、これまでの遺伝子治療の有効例は原発性免疫不全症（primary immunodeficiency: PID）を始めとする小児の遺伝性疾患に対してであり、今後も遺伝性疾患を中心に遺伝子治療の対象範囲は拡大していくものと思われる。

さて、基本的に遺伝子治療では治療遺伝子を患者細胞に加えること（導入）が必要で、その方法としてはウイルスベクターが主に用いられる。ただ、遺伝子が導入される場所により遺伝子治療は二分され、直接ウイルスを患者体内に投与し、そこでの感染メカニズムを通して標的細胞に治療遺伝子を導入する in vivo 遺伝子治療と、一旦、患者細胞を体外の取り出し、培養バッグ等内でウイルスベクター

にて遺伝子を導入し、再び、患者に投与する ex vivo 遺伝子治療に分けられる。この ex vivo 遺伝子治療の治療概念が、使用する細胞種の違い（自己か同種か）こそあれ、基本的に正常に機能する造血幹細胞の移植であることを考えると、現在、造血幹細胞移植の対象となる疾患全ては造血幹細胞遺伝子治療の対象となり得る。

そこで、本研究ではこれまでに発表された論文や資料ならびに遺伝子治療関係者から入手した情報を基にアデノシン・デアミナーゼ（ADA）欠損症、X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、慢性肉芽腫症（CGD）に焦点を当て、造血幹細胞遺伝子治療の有効性、安全性が造血幹細胞移植のそれと比較し、実際に遺伝子治療が今後、治療薬として確立しているのかを検討する。

### B. 研究方法

#### 1. 文献（論文）、資料の調査

学術論文等に関しては PubMed、遺伝子治療臨床研究に関しては The Journal of Gene Medicine が公開している Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (GTCTW)、国内の遺伝子治療臨床研究に関しては 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子遺伝子細胞医薬

部（衛研）のホームページを参考にした。

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

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

衛研: <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/index1-j3.html>

## 2. 遺伝子治療関係者との面会

遺伝子治療に関連する情報は、米国遺伝子細胞治療学会や欧州遺伝子細胞治療学会に参加し、関係者と対談することで入手した。San Raffaele 研究所: Aiuti 博士、Naldini 博士、Bordignon 博士、Necker 小児病院: Cavazzana-Calvo 博士、Fischer 博士、Genethon: Galy 博士、Fulvio 博士、Great Ormond Street 病院: Thrasher 博士、Gasper 博士、NIH: Candotti 博士、Malech 博士

### （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) ADA 欠損症

ADA 欠損症は世界で最初に遺伝子治療が行われた疾患であり、その後も継続して遺伝子治療がなされている。ただ、当時（1990 年代）の遺伝子導入技術は未熟であり、効率良く造血幹細胞に遺伝子を入れることができず、また、治療中も PEG-ADA を継続していたため、遺伝子導入細胞が持つ増殖優位性が発揮できず、その治療成績は極めて不良であった。しかし、2000 年に入り、イタリアの Aiuti らはこの骨髓間隙創出のため遺伝子治療として最初となる前処置としてのブスルファン（体重あたり 4mg）を使用し遺伝子治療を行った。結果、遺伝子導入細胞は効率良く骨髓腔に生着し、naïve T 細胞の出現を含め患者 T 細胞機能は回復した。また、T 細胞のみならず他の系譜の細胞（B 細胞、NK 細胞、顆粒球）にも遺伝子導入細胞が高い割合で確認された。現在までイタリアで 18 名、イギリスで 8 名、アメリカで 14 名の患者が造血幹細胞遺伝子治療を受け、すべての症例が生存しており、また、これら 40 名中 29 名（72.5%）で PEG-ADA の投与が中止となっている。さらに、ADA 欠損症ではこれまでのところベクター挿入による造血系腫瘍の発症をみていないことから比較的安全な遺伝子治療と考えられ、HLA 適合ドナーのいない症例では積極的に遺伝子治療が選択されている。なお、我が国でも 2004 年に 2 名の ADA 欠損症患者に対して造血幹細胞遺伝子治療を行っており、患者は 10 年を経た現在でも

重篤感染症を罹患せず、通常的生活を送っている。

一方、造血幹細胞移植はたとえ HLA が一致した非血縁ドナーがいたとしても、その治療成績は不良であり（70%に達しない）、基本、HLA 一致血縁ドナーが存在した場合は移植を行うが、それ以外は PEG-ADA による酵素補充を検討する。

### 2) X-SCID

X-SCID は全 SCID の 40~50%を占める免疫不全症で、その原因として X 染色体にある共通ガンマ鎖 ( $\gamma_c$ ) 遺伝子に異常があり、この  $\gamma_c$  がインターロイキン (IL) 2、4、7、9、15、21 に対する受容体の共通構成タンパクであることから X-SCID では T 細胞、NK 細胞が欠失する。一方、B 細胞はその増殖にこれらサイトカインを必要としないため細胞数は保たれる。ただ、T 細胞からのシグナルが欠失しているため抗体産生能は著しく低下し B+SCID として発症する。X-SCID に対する治療は臍帯血を含む造血幹細胞移植のみで、HLA 適合血縁ドナー移植の場合で 80~90%の生存率、HLA 適合非血縁ドナー移植で 70~80%の生存率と比較的良好な成績であるが、HLA 不適合移植の場合は生存率が 50%程度と低下する。

1999 年、フランス Cavazzana-Calvo らのグループは患者骨髓 CD34 陽性細胞を用いて造血幹細胞遺伝子治療を行った。ただ、X-SCID の場合、前述の ADA 欠損症とは異なり患者体内に T 細胞が欠失していることからこの遺伝子治療ではブスルファン等を用いた前処置は行っていない。これまでにフランスで 9 名、イギリスで 10 名の X-SCID 患者に対して造血幹細胞遺伝子治療が行われ、19 名中 17 名で naïve T 細胞を含む末梢血 T 細胞が回復している。一方、B 細胞や NK 細胞の回復は不完全で、患者の半数でいまだガンマグロブリンの補充療法を必要としている。さらに、 $\gamma_c$  の部分的機能低下 (hypomorphic mutation) や造血幹細胞移植後の比較的年齢の高い症例（10~20 歳の 5 症例）では T 細胞の新生は認めておらず、X-SCID においても ADA 欠損症同様、骨髓間隙創出のための前処置は必要であることが示唆される。

さて、X-SCID は遺伝子治療による白血病の発症という有害事象 (genotoxicity) においても特記される疾患である。白血病の発症はフランスで 4 名、イギリスで 1 名であり、その全てが T 細胞白血病で、ベクターの挿入部位として *LMO2*、*BMI1*、*CCND2* の近傍と同定されている。ただ、単純にこれら遺伝

子の近傍にベクターが挿入されただけではがん化は起こらず、増殖に伴い複数の遺伝子（染色体）に変異が生じ、結果、腫瘍化に至ることが明らかになっている。また、白血病に関しても患者のうち1名は残念ながら亡くなったが、他の4名は通常の化学療法にて寛解に入り、現時点でも通常の生活を送っている。現在、X-SCIDに対する遺伝子治療はベクターをより安全な self-inactivated (SIN) レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターに変更し、HLA 適合ドナーが見つからない症例や造血幹細胞移植後の年長児に対して行われている。

### 3) WAS

X 染色体上にあるウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク (WASP) 遺伝子は血液系細胞のみに発現するアクチン細胞骨格調節因子をコードする遺伝子で、この遺伝子に変異があると免疫不全症の WAS を発症する。基本的にその症状は易感染症、湿疹、血小板減少の3主徴であるが、WASP の変異型により免疫不全症を伴わず血小板減少のみを発症する X 連鎖血小板減少症 (XLT) や WASP の gain-of-function である X 連鎖好中球減少症 (XLN) としても発症する。治療としては免疫不全症が伴わない症例では造血幹細胞移植の適応とならないこともあるが、基本的には WAS の治療は造血幹細胞移植である。ただ、これら移植に関しても実施時期やその方法は WAS の重症度により異なり、特に5歳を境にその治療成績が大きく異なることから移植時期の決定は重要である。移植成績としては、HLA 適合血縁ドナー移植で 80~90%の生存率、HLA 適合非血縁ドナーで 70~80%の生存率であり、HLA 不適合ドナーでの移植では 40~55%とその生存率が極端に低下する。

WAS に対する遺伝子治療はドイツの Klein らのよって開始された。彼らは10名の患者に対してブスルファンを用いた前処置を行い、レトロウイルスベクターにて WASP 遺伝子を患者 CD34 陽性細胞に導入し遺伝子治療を行った。その結果、ほとんどの患者で易感染性はもとより湿疹や血小板減少の回復をみた。ただ、7名に *LMO2*、*MDS/EVII*、*CCND2*、*PRMD16* 近傍へのベクター挿入による白血病が発症し、その内訳は T 細胞性白血病が6例、急性骨髄性白血病として3例(2症例は T 細胞白血病から二次性発症、1名は初発の急性骨髄性白血病)であり、レトロウイルスベクターによる WAS 遺伝子治療の異常なほど高い腫瘍発生率とその病態の面か

ら注目されている。一方、使用するベクターをレンチウイルスベクターに変更した遺伝子治療がイタリアとフランス、イギリス、アメリカで行われ、イタリアの症例ではレトロウイルスベクターで見られたほどの血小板の増多は見られてはいないが血小板輸注が不要になるなど一定の治療成績は上がっており、今後の長期フォローアップを下、HLA 一致ドナーのいない患者に対する有効な治療法として選択されていくと思われる。

### 4) CGD

CGD は活性酸素産生に必要な NADPH oxidase に異常があり、食細胞である好中球や単球が病原体を貪食した際、殺菌に必要となる活性酸素が産生されないため細胞内に病原体が残存し、炎症が持続する疾患である。この NADPH oxidase は複数のタンパクにて構成され、その構成要素である gp91phox に異常がある X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) が最も頻度が高く、全体の約8割を占める。治療としては抗菌剤や抗真菌剤による内科的治療もあるが、基本的には根治療法の造血幹細胞移植に頼らざるを得ない。ただ、CGD の多くの症例は移植時に重篤な感染症を有しており、さらに T 細胞などの移植に関わる免疫が正常であることから通常の PID に対する移植より難航する。CGD に対する国内の移植成績では HLA 一致ドナーによる移植では90%以上と良好であるが、HLA 不適合移植ではその治療成績が極端に低下する。

さて、CGD に対する遺伝子治療であるが、一般的に CGD に対する遺伝子治療は他の PID に対する遺伝子治療と比べ困難とされる。それは、CGD では X-SCID や ADA 欠損症で見られるような遺伝子導入細胞に増殖優位性がないこと、また、CGD の病態が食細胞の機能異常であるためその細胞数は健常人と変わらなく、骨髓腔に遺伝子導入細胞が生着する骨髓間隙がないこと、さらには持続する炎症のため健常人より免疫系が活性化しているおり、遺伝子導入細胞が拒絶されやすいことなどが上げられる。事実、これまでに比較的強力な前処置を行っても(体重あたり 8~10mg のブスルファン)、長期わたる高い導入遺伝子の維持は困難で、現時点では通常の抗生剤治療では改善しない重篤な感染症(肺や肝脾膿瘍など)に対して短期的治療効果を目指した遺伝子治療という考えかたもある。なお、ドイツやスイスで行われた遺伝子治療で造血系異常(骨髓異形成症候群)を発症したとの報告から、ベクター

をレンチウイルスベクターに変更した遺伝子治療が欧米を中心に計画されている。

#### D. 考案

現在、PID に対する有効性を示す造血幹細胞遺伝子治療であるが、その評価は根治療法である造血幹細胞移植との比較によってなされるべきである。よって、下記のこれまでの造血幹細胞移植および造血幹細胞遺伝子治療の治療成績を示す。

PIDに対する造血幹細胞移植

疾患	ドナー	OS (%)	患者数・文献
ADA欠損症	MSD/MFD	86/86	N = 106 <sup>2)</sup>
	MUD	67	
	MMUD	29	
	Haplo	43	
X-SCID	MSD	92.3	N = 94 <sup>6)</sup>
	MUD	80.5	
	MMUD	52.5	
WAS	MSD	80	N = 57 <sup>2)</sup>
	URCB	80	
	MUD	82	
	MMUD	38	
CGD	MSD	92	N = 29 (国内報告)
	URCB	33	
	MUD	100	
	MMUD	50	

MSD/MFD: matched sibling/ family donor, MUD: matched unrelated donor, MMUD: mismatched unrelated donor, haplo: haploidentical donor, URCB: unrelated cord blood, OS: overall survival.

PIDに対する造血幹細胞遺伝子治療

疾患	国	ベクター	前処置	患者数	結果	行数	挿入部位
ADA欠損症	伊	レトロ	BU 4mg/kg	18	15/18 off ERT	なし	なし
	英	レトロ	Meiselman 1.45mg/m <sup>2</sup> BU 4mg/kg	8	4/8 off ERT	なし	なし
	米	レトロ	BU 4mg/kg	14	10/14 off ERT	なし	なし
X-SCID	仏	レトロ	-	9	良好	+ 4 症例	LMO2, CGD2 Bm1
	英	レトロ	-	10	良好	+ 1 症例	LMO2
	米	レトロ	-	3	生存維持	なし	
	山、英、米	SNレトロ	-	8	T細胞増加	なし	
WAS	日	レトロ	BU 8mg/kg	10	良好	+ 7 症例	LMO2, MDS/EVI1 CGD2 PRMD16
	山、英、伊	SNレトロ	BU/Flu	5	良好	なし	
CGD	米	レトロ	BU 10 mg/kg	3	短期存	なし	
	日	レトロ	BU 8.8mg/kg	4	良好	+ 3 症例	MDS/EVI1
	英	レトロ	Meiselman 1.45mg/m <sup>2</sup>	4	短期存	なし	
	韓	レトロ	Meiselman 1.25mg/m <sup>2</sup> BU 6.4g/kg	2	?	なし	

(Gene 525: 174-181, 2013) 一部変更

これらの結果から、ADA 欠損症では HLA 一致血縁ドナーがいれば造血幹細胞移植であり、適当なドナーがいなければ酵素補充療法かレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が選択される。ただし、その際に前処置としての low dose BU は必要である。X-SCID に関しては、HLA 一致ドナーがいれば造血幹細胞移植（臍帯血を含む）であり、不在の場合はレンチウイルスによる遺伝子治療が望まれる。ただ、その際に low dose BU が必要であるかは今後の結果をみてから判断したい。WAS に関しては、HLA 一致ドナーがいれば造血幹細胞移植であり、適当なドナーがいらない場合あるいは症例が 5 歳以上の場合はレンチウイルスによる遺伝子治療が望まれ、その際、ある程度強力な前処置 (RIST) は必要である。

CGD に関しては、現時点で長期間の有効性が示せていないことから、基本、造血幹細胞移植が選択される。ただ、重度の感染症を有する年長者に対しては短期的な治療効果を目的とした遺伝子治療も一考である。ただし、その際には体重あたり 10mg の BU とある程度強力な前処置は必要となる。

#### E. 結論

- PID に対する造血幹細胞移植と造血幹細胞遺伝子治療の治療成績を比較した。
- 有効性は慢性肉芽腫症を除き HLA 適合造血幹細胞移植と同等であり、安全性に関しても移植関連合併症がなく安全に行われていた。
- 今後は症例を重ね、統計学的処理にてその優劣を評価したい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. Yamazaki Y, et al: Two Novel Gain-of-Function Mutations of *STAT1* Responsible for Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of anti-IL-17F Autoantibody. *J. Immunology* 193: 4880-4887, 2014.
2. Kawai T, et al: Interstitial Lung Disease with Multiple Microgranulomas in Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol* 34: 933-940, 2014.
3. Lai CY, et al: Stage-specific roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells* 32: 1929-1942, 2014.
4. Takeda K, et al: Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon  $\gamma$  in a patient with dominant partial interferon  $\gamma$ . *Clinical Immunology*. 151: 25-28, 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

原発性免疫不全症への遺伝子治療に関する研究

研究分担者 内山 徹 国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 室長  
研究協力者 八木田万里、青木 徹、高橋シリラット  
国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 研究員

研究要旨

原発性免疫不全症への遺伝子治療では、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなどの染色体挿入型のベクターが使用される。これらのベクターは造血細胞における長期の遺伝子発現を可能にするものの、一方で挿入部位近傍の遺伝子を活性化し発がん挿入変異を引き起こす可能性が存在する。本研究では、マウスおよびヒト造血幹細胞による *in vitro* immortalization (IVIM) アッセイによる、発がん挿入変異に対するベクターの安全性の評価方法の確立を目指す。

A. 研究目的

原発性免疫不全症に対する遺伝子治療では、造血幹細胞を標的とした染色体挿入型のレトロウイルスベクターの使用により、長期の遺伝子発現と免疫系の再構築という極めて優れた成果が得られた。しかし、一方で遺伝子の発現に使用するウイルス由来のエンハンサー／プロモーターにより挿入部位近傍のがん原遺伝子が活性化され、白血病が発症するという有害事象が報告された。これを踏まえて、近年欧米では自己不活型 (self-inactivating: SIN) ベクターの使用が主流となってきたが、実際の臨床試験においてベクターの安全性に対する評価系の確立は急務である。本研究では、従来のウイルスベクターや新規に開発されるベクターに対する安全性の評価を目的として、マウスおよびヒト造血幹細胞を利用した試験管内不死化 (*in vitro* immortalization: IVIM) アッセイの確立を目指した。今回確立した IVIM アッセイによって、今後ベクター構造やプロモーターの違いによる発がんへの影響を解析する予定である。

B. 研究方法

①ベクタープラスミドの作製

IVIM アッセイを確立するために、最も不死化を起こしやすいといわれる脾フォーカス形成ウイルス (spleen focus forming virus: SFFV) の LTR を利用したベクター-SFFV-EGFP を作製した。

②ウイルスの作製

レトロウイルスベクターは、ベクタープラスミドと各ヘルパープラスミド (gag/pol, envelop) の一過性トランスフェクション法もしくは、ウイルスの安定産生細胞株により作製した。また、エンベロープはエコトロピック、アンホトロピックのほか、水疱口内炎ウイルス G タンパク (VSV-G: パントロピック) を使用した。

③マウス骨髄細胞による IVIM アッセイ

C57BL/6 マウスより骨髄細胞を採取し、免疫磁気ビーズにより lineage negative 細胞 (Lin-BM) を分離する。サイトカイン (mSCF、hFLT-3L、hIL-11、mIL-3) による刺激下でウイルスベクターにより遺伝子導入を行なう。その後2週間サイトカイン存在下で培養を行ない、10-100 cells/well で 96 well プレートに播種する



(re-plating)。さらに2週間培養を行ない、細胞が増殖した(不死化が起こった)ウェルの数から不死化の頻度(replating frequency)を計算した。

④ヒト臍帯血を利用したIVIMアッセイ  
研究用ヒト臍帯血から免疫磁気ビーズによりCD34陽性細胞を分離する。その後同様の方法によりIVIMアッセイを行なった。

### C. 研究成果

①安定レトロウイルス産生細胞株によるIVIMアッセイを行なった。まず、エクトロピックパッケージング細胞株(Plat-E)およびVSV-Gパッケージング細胞株(293gpg)にSFFV-EGFPを導入し、ウイルス細胞株を作製した。各エンベロープによるウイルス(SFFV-eco、SFFV-vsvg)により、マウス骨髄細胞へ遺伝子導入を行ったところ、細胞の不死化が確認された(図1)。

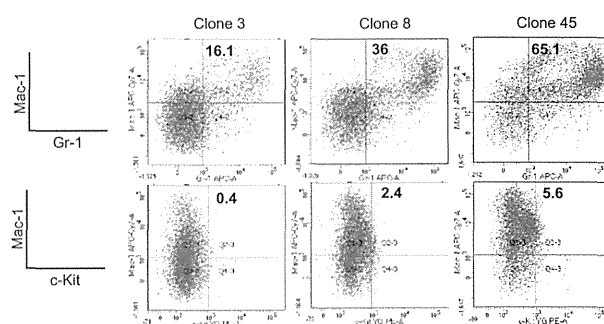
IVIM 遺伝子導入効率が同じであったものの、SFFV-vsvg に対して SFFV-eco 不死化の比率(replating frequency)が高く、またベクターコピー数も高かった。これらの結果から、IVIMアッセイでは、ベクター構造以外の要素として、エンベロープの違い(毒性)もその結果に影響することが示唆された。

図1 安定産生細胞株によるIVIMアッセイ

Env.	#	No. of replating clones/total well	EGFP+ (%)	Replating frequency	CN	Replating index (frequency/CN)	Mice age (month)
VSV-G	1	25/84	82.9	0.03532 (1 in 28)	2.3	0.01342	4.5
	2	0/96	81.8	0	2.63	0	2
Eco	1	50/96	74.9	0.07357 (1 in 14)	5.6	0.01414	5
	2	8/96	83.2	0.00870 (1 in 115)	5.2	0.00167	2

②さらに、不死化した細胞クローンの表現型をフローサイトメトリーによって解析したところ、顆粒球系マーカーであるGr-1、Mac-1を発現していた。SCFの受容体であるc-Kitは発現しておらず、不死化クローンはSCF非依存性であったが、IL-3に対しては依存性であった(図2)。

図2 不死化クローンのマーカー解析



③次に、安定ウイルス産生細胞株または一過性トランスフェクションによりVSV-Gウイルス(SFFV-vsvg)を作製しIVIMアッセイを行なった。一過性トランスフェクション法によるウイルスでは不死化クローンを認めることが出来ず、またコロニーアッセイでもコロニー形成能の低下を認めたことから、一過性トランスフェクションでは混入するエンベロープタンパクの量が影響(毒性)を与えることが示された(図3)。

図3 ウイルス作成方法による影響

14 days after cell plating in Methycellulose	IVIM clone / 96 wells	No. of colonies/10 <sup>3</sup> cells	Colony Type (%)			
			G	M	GM	GEMM
Mock	0	8	37.5	37.5	25	0
Transient MOI 80	0	18	39	22	25	14
Stable MOI 0.5	0	0				
Stable MOI 10	42	36	39	22	11	6.9

④実際の遺伝子治療臨床試験に即した評価法の確立を目指し、研究用のヒト臍帯血を利用したIVIMアッセイを行なった。AmphotropicエンベロープによるSFFVベクターにより遺伝子導入を行なったところ、マウス骨髄同様にヒト臍帯血由来CD34陽性細胞の不死化が認められた(図5)。

図5 臍帯血細胞を用いたIVIMアッセイ

Cells/well	No. of replating clones/total well	Replating frequency	IVIM clone
100	4/96	0.000425	All of them can not be proliferated
200	12/96	0.000667	2 out of 12 seem to be able to proliferate

### D. 考察

第一世代レトロウイルスベクターによる発がん挿入変異の報告以来、遺伝子治療ベクターの安全性の評価は常に重要な課題である。海外ではす

でマウス骨髄を用いたIVIMアッセイによる評価方法が報告されているが、技術的な困難性からドイツのBaumらのグループによる報告がそのほとんどであった (Blood 108: 2545, 2006)。今回申請者らは、これまでの報告と同様の不死化を再現することが出来、今後はこのアッセイ系を使用して新規開発ベクターも含めた様々なウイルスベクターの安全性を評価、解析する予定である。

遺伝子治療による発がんには、染色体に組み込まれるウイルスベクターの構造がその発症の大部分を占めると考えられている。しかし、今回の研究から、IVIMアッセイでは、エンベロープの種類 (ecotropic、VSV-G) やウイルス上清中のエンベロープタンパク量 (安定ウイルス産生細胞株、一過性トランスフェクション法) の違いが不死化の頻度に大きな影響を与えることが確認された。すなわち IVIMアッセイでは、ベクター構造自体が不死化を起こす可能性を持っていても、エンベロープの毒性により不死化が起こらず、ベクターの危険性を過小評価してしまう可能性が示唆された。上記の結果から、レトロウイルスベクターだけでなく、レンチウイルスベクターにおいても毒性を示さないエンベロープによる IVIMアッセイを確立中である。

樹立した不死化クローンは、IL-3 非存在下では増殖することが出来ず、ウイルスベクターによる発がんの initiation 変異に相当する変化が起こったと考えられた。実際の遺伝子治療における細胞のがん化の詳細な機序は未だ不明であるが、この不死化クローンの性質は、遺伝子治療関連白血病におけるベクターの挿入以外の付加変異の必要性を示唆している。

また今回は臍帯血より分離したヒト CD34 陽性細胞においても IVIMアッセイを行なうことが出来た。これまでに同様の報告は存在せず、今後の遺伝子治療において、マウス細胞ではなくヒト細胞による解析は、より実際の臨床試験に即した評価方法になると考えられる。

## E. 結論

①ウイルスベクターの安全性の評価方法である IVIMアッセイを確立することが出来た。

②IVIMアッセイでは、ベクター構造の他に、ウイルス作製に用いたエンベロープの影響が大きいことが判明した。ベクター構造の安全性の評価にはエンベロープの影響を排除した解析が必要である。

③研究用臍帯血から分離したヒト CD34 陽性細胞においても IVIMアッセイが可能であり、従来のマウス骨髄細胞の利用に比べてより臨床に即した評価系になると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 【論文発表】

#### 1. 原著論文

内山徹

1) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Uchiyama M, Wong WF, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and transcription in myeloid cells. Int Immunol. 26: 341-352, 2014.

2) Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Nakazawa Y, Goto F, Uchiyama T, Higuchi M, Maekawa T, Tamura E, Nagasaka S, Hojo M, Onodera M.: Interstitial Lung Disease with Multiple Microgranulomas in Chronic Granulomatous Disease. J. Clin. Immunol. 34: 933-940, 2014.

#### 2. 総説

内山徹 : 原発性免疫不全-複合免疫不全、小児の治療指針 (小児科診療 77 増刊) : 228-230, 2014.

### 【学会発表】

1) 河合利尚、後藤文洋、渡辺信之、横山みどり、中澤裕美子、内山徹、前川貴伸、樋口昌孝、小野

寺雅史：慢性肉芽腫症における過剰炎症と肉芽腫形成。第7回免疫不全症研究会、東京、2014/1/25

2) 中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、内山徹、渡辺信之、前川貴伸、石黒精、奥山虎之、山田雅文、大津真、有賀正、小野寺雅史：酵素補充療法が奏効した造血幹細胞遺伝子治療後アデノシンデアミナーゼ欠損症の一例。第7回免疫不全症研究会、東京、2014/1/25

3) 河合利尚、中澤裕美子、後藤文洋、内山徹、新井勝大、久保田雅也、石黒精、布井博幸、小林正夫、小野寺雅史：慢性肉芽腫症の炎症性肉芽腫に対するサリドマイドの治療効果、第117回小児科学会学術集会、名古屋、2014/4/11

4) 後藤文洋、河合利尚、中澤裕美子、内山徹、原山静子、田村英一郎、亀井宏一、新井勝大、小野寺雅史：慢性肉芽腫症 42 例における肉芽腫性疾患の臨床的検討、第 117 回小児科学会学術集会、名古屋、2014/4/11

5) 中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、内山徹、渡辺信之、前川貴伸、石黒精、奥山虎之、山田雅文、大津真、有賀正、小野寺雅史：酵素補充療法が造血幹細胞遺伝子治療後の ADA 欠損症患者に与える免疫機能改善効果、第 117 回小児科学会学術集会、名古屋、2014/4/11

6) 堀野智史、内山徹、宗孝紀、佐藤美季、孫舒嵐、笹原洋二、土屋滋、呉繁夫、菅村和夫、石井直人：Foamy virus vector を用いた X 連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療モデルの作製、第 117 回小児科学会学術集会、名古屋、2014/4/11

7) 内山徹：原発性免疫不全症への造血幹細胞遺伝子治療の現況。第 4 回関西免疫不全症研究会、特別講演、大阪、2014/7/19

8) 内山徹：原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植、講演、第 5 回遺伝病遺伝子治療フォーラム、東京、2015/1/15

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし。

遺伝子・細胞治療のための分子生物学的解析

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** 特定の遺伝子機能が失われた重篤な遺伝性疾患に対しウイルスベクターを用いて治療遺伝子を導入する遺伝子治療は有効である。ただ、これらベクターの染色体挿入部位は一定しておらず、特にレトロウイルスベクターの場合、転写活性化部位に挿入されやすいことから遺伝子導入細胞の癌化が問題視され、安全性の観点からその遺伝子導入部位を経時的に解析する必要がある。本分担課題研究において今年度は、ウイルスベクターの染色体への挿入部位を迅速かつ網羅的に同定するための実験系・データ解析系を完成させた。

**A. 研究目的**

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。昨年度までに、全ゲノム DNA から任意の配列を選択的にキャプチャーできる DNA:RNA ハイブリッド法によるベクター挿入部位濃縮実験プロトコルを確立したので、本年度はデータ解析系の確立を目指した。

**B. 研究方法**

① ベクター挿入部位同定実験系：

遺伝子治療ベクターに汎用される二種

類のウイルス LTR 配列 (Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) LTR、Moloney murine leukemia virus (MoMLV) LTR)、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。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。

ベクター挿入部位同定系の確立のための解析対象として、MFGSgp91 ウイルスベクターがゲノムに挿入されていることが既に明らかな下記の二種類の細胞を用いた。

- HEK293SPA

(パッケージング細胞・挿入部位少数)

- K562MFGS

(MFGSgp91 導入細胞・挿入部位多数)

3 ug ゲノム DNA を断片化し、イルミナ社シーケンサー対応アダプターを付加し、PCR 増幅を経てゲノムライブラリーを得た。上記の SureSelect ベイト RNA ライブラリーを用いた DNA:RNA ハイブリッド法によりウイルスベクター配列を含む DNA を濃縮した。各濃縮ライブラリーについてイルミナ社 HiSeq1500 システムによりシーケンスデータを取得した。

② ベクター挿入部位の同定ならびにゲ