

# 遺伝子治療臨床研究 実施計画書

# 目 次

頁 (右下)

遺伝子治療臨床研究実施計画書申請書	1
遺伝子治療臨床研究実施計画書概要書	2
(別紙) 北海道大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究 審査委員会審査結果	
遺伝子治療臨床研究実施計画書	10
臨床経過図 1 ; 症例 1	48
臨床経過図 2 ; 症例 2	49
付 1 遺伝子治療実施上の確認項目	
1-1 遺伝子導入フローシート	51
1-2 分析証明書 (遺伝子導入細胞)	53
1-3 遺伝子治療臨床プロトコール ; チェックリスト 1, 2	55
研究成果	57
研究成果 1 ; 導入遺伝子の定量的評価に用いた三種類の定量 PCR 法	58
研究成果 2 ; 新旧ベクターの比較	
A ; 臍帯血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率の比較	60
B ; 患者由来 EBV 樹立 B 細胞株への遺伝子導入効率と 遺伝子発現の比較	61
研究成果 3 ; 臍帯血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率の評価	62
研究成果 4-1 ; 骨髓血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率の評価	63
4-2 ; 患者骨髓血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子 導入効率の評価	64
研究成果 5-1 ; NOD/SCID マウスへの遺伝子導入臍帯血 CD34 陽性 細胞移植の評価	65
5-2 ; NOD/SCID マウスへの遺伝子導入骨髓血 CD34 陽性 細胞移植の評価	66
研究成果 6 ; NOD/SCID マウスへの遺伝子導入臍帯血 CD34 陽性 細胞の移植実験 ; FACS での解析	67
研究成果 7 ; NOD/SCID への遺伝子導入臍帯血 CD34 陽性 細胞移植実験 ; 導入遺伝子の検出	69

研究成果 8 ; NOD/SCID マウスへの遺伝子導入患児骨髓血	71
CD34 陽性細胞の移植実験	
研究成果 9 ; 症例 2 の変異解析	73
研究成果 10 ; 症例 2 同胞の生前診断	75
A ; 生前診断－その 1 ; 遺伝子解析	
B ; 生前診断－その 2 ; ADA 活性の解析	
添付資料	
添付資料 1 参考文献 7 編	78
1 - 1 Blood 91,30-36,1998	
1 - 2 Am J Med Genet, 75,314-317,1998	
1 - 3 Mol Ther 3,24-27,2001	
1 - 4 J Immunol 163,2256-2261,1999	
1 - 5 J Virol 72,1976-1774,1998	
1 - 6 アレルギー 49,1173-1180,2000	
1 - 7 J Immunol 166,1698-1702,2001	
添付資料 2 共同研究遺伝子治療関連の資料	
2 - 1 共同研究者の同意書	120
2 - 2 同和訳	
2 - 3 共同研究者の遺伝子治療プロトコール	126
添付資料 3 インフォームドコンセント	
3 - 1 説明および同意書	209
3 - 2 米国衛生研究所インフォームドコンセント本文	218
3 - 3 同和訳	226
ベクター関連資料	239

北海道大学医学部附属病院遺伝子治療研究審査委員会委員名簿  
北海道大学医学部附属病院遺伝子治療研究審査委員会内規

# 遺伝子治療臨床研究実施計画書

## 1. 研究の名称

アデノシンデアミナーゼ欠損症における血液幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究

## 2. 研究者の氏名及び担当する役割

### (1) 総括責任者氏名及びその担当する役割

崎山幸雄（北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療客員教授）：遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の総括。患児の家族に対するインフォームド・コンセント。

### (2) 総括責任者以外の研究者氏名及びその担当する役割

小林邦彦（北海道大学大学院医学研究科小児発達医学分野教授）：患児診療全般

有賀 正（北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療客員助教授）：遺伝子導入操作全般、造血幹細胞への遺伝子導入基礎実験

大津 真（北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療特別研究員）：遺伝子発現細胞の解析

川村信明（北海道大学大学院医学研究科小児発達医学分野講師）：患児の免疫機能解析・評価

立沢 宰（国立成育医療センター 厚生労働省技官）：治療前後の患児診療

小野寺雅史（筑波大学基礎医学系免疫学講師）：予備実験用ベクター供与

F. Candotti（米国国立衛生研究所 GMBB/NHGRI）：レトロウイルスベクターの供与に関する米国内での実務。遺伝子治療臨床研究全体の俯瞰

## 3. 遺伝子治療臨床研究の実施施設の名称及びその所在地

北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療、同大学医学部附属病院

札幌市北区北 15 条西 7 丁目、札幌市北区北 14 条西 5 丁目

#### 4. 遺伝子治療臨床研究の目的

アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損による重症複合免疫不全症(SCID)患児に対する根治治療としてはヒト主要組織適合抗原(HLA)の一致する血縁骨髄ドナー等による血液幹細胞移植(HST)があるが、このようなドナーの存在しない患児に対する根治治療は確立されていない。

1990年、米国国立衛生研究所(NIH) M.Blaese 博士らは酵素補充療法(PEG-ADA)下のADA欠損症患児に対し、末梢血リンパ球を標的としてレトロウイルスベクター LASN を用いた遺伝子治療を試み、その有効性を示唆した<sup>1)</sup>。我々も1995年8月から1997年3月までにM.Blaese 博士との共同研究下に同様の方法で「アデノシンデアミナーゼ欠損症における遺伝子治療臨床研究」を実施し、その有効性と安全性を示した<sup>2)</sup>。しかし、末梢血リンパ球を標的とした遺伝子治療では、その効果に制約が予測され、治療後に体内で検出される遺伝子導入細胞は極めて限られている。

一方、永続的な治療効果が期待される血液幹細胞を標的とする遺伝子治療も過去にADA欠損症患児を対象に臍帯血細胞、骨髄血細胞を用いて実施されている<sup>3)4)5)</sup>。しかし、臨床レベルでの有効性がPEG-ADA療法の中断下に確認された報告はまだない。血液幹細胞を標的とする遺伝子導入で臨床効果が確認されていないのは、ヒト血液幹細胞の同定、効率的な分離法が確立されていなかったことと血液幹細胞への遺伝子導入効率の低さが主な理由にあげられる。これに対し、近年、ヒト血液幹細胞としてCD34陽性細胞分離法の確立、レトロウイルスベクターの改良、CD34陽性細胞への遺伝子導入技術の改善等がもたらされ、血液幹細胞への遺伝子導入効率がほぼ20%レベルと明らかに改善されてきている<sup>6)</sup>。さらにA.Fisher博士らはX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)患児に対して、自己骨髄血CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療を実施してその有効性を報告した<sup>7)</sup>。このような研究成果を鑑み、基礎研究を重ねた結果、ADA欠損症患児に対して血液幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究を実施する状況にあると判断した。

本研究は、PEG-ADA療法を継続している2名のADA欠損症患児に対し、PEG-ADA療法を中断もしくは可及的に減量した上で自己骨髄血CD34陽性細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究を実施して、その安全性と遺伝子導入効率を検討し、さらに遺伝子導入血液幹細胞に由来する末梢血T,B,NK細胞、単球での導入遺伝子の存在、発現と免疫機構の再建を評価することを目的とする。

## 5. ADA 欠損症に対する本遺伝子治療臨床研究の理論的根拠

### (1) 対象疾患に関する現時点での知見

#### (i) ADA 欠損症の病態

ADA はリボヌクレオシドであるアデノシンをイノシンへ、デオキシアデノシン(dAdo)をデオキシイノシンへ脱アミノ化させるプリン・サルベージ経路の触媒酵素である。ADA はヒトのほとんど全ての組織・細胞に存在するが、その活性は組織・細胞によって異なり、胸腺で最も高く、次いでリンパ組織・胃腸管・脳皮質で高く、赤血球では最も低いことが知られている。

ADA 欠損は細胞内にアデノシン、dAdo の蓄積をもたらす。アデノシンの増加は細胞内の cAMP 濃度を増加させて、メチル化に関わる S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ (SAHase) を不活化させる。また、dAdo の増加は DNA 修復機構を障害し、一方、主としてリンパ球内でのリン酸化デオキシアデノシン (dATP) の蓄積は、DNA 合成に必須の酵素であるリボ核酸還元酵素を阻害して DNA 複製を障害する。これらの結果、細胞の DNA 合成阻害、機能低下からリンパ球を主体に細胞死を誘導すると考えられている<sup>8) 9) 10)</sup>。

ADA 欠損症は分子レベルでその原因が明らかにされた最初の SCID である<sup>11)</sup>。その定型的な臨床像は生後間もなくより日和見感染症を含む易感染性、リンパ球減少、低 $\gamma$ -グロブリン血症を呈する T、B 細胞の重篤な機能不全症で、他の病因による SCID、すなわち ADA(+)-SCID と臨床的、免疫学的に区別することは出来ない。全 SCID における ADA 欠損症の頻度はおよそ 20-25% である。

ADA 欠損症には臨床像の重篤度から、乳児期早期に発症し急速に致死的となる早期発症型 SCID、乳児期早期には抗体産生能を残し進行性に発症する遅発型 SCID、5-8 歳時までは診断されないことが多い晩発若年型 SCID、赤血球中の ADA 活性は欠損するが他の細胞では正常の 10-80% の活性を保持している部分 ADA 欠損症の異なる 4 型の存在が知られている<sup>12)</sup>。その重症度は赤血球中の dATP の濃度と相関するとも考えられており、早期発症型 SCID では dATP はおよそ 273-1839nmol/ml (正常: <2nmol/ml) と著しく高値となり、遅発型では 100-263nmol/ml、部分 ADA 欠損症では 3-27nmol/ml と正常域より僅かに高値を呈

する<sup>13)</sup>。従って赤血球中の dATP レベルを知ることによって臨床像の重症度、免疫反応の欠陥の程度を推定する事が可能である。

ADA 遺伝子 (20q13.11) の欠陥は ADA 活性の欠損もしくは著しい欠乏をきたす。ADA 遺伝子の病的変異はこれまでに 50 種類以上が報告されて、ミスセンス変異が最も多く、ナンセンス変異、スプライス異常の変異、欠失等様々な変異がある。いずれの遺伝子欠陥も酵素活性の欠損もしくは蛋白質としての不安定をきたすものと考えられる。近年 ADA 活性が欠損した *E. coli* を用いて患児由来の変異 ADA を発現させ *in vitro* にて ADA 酵素活性を測定する研究が報告された。その結果、変異の種類と酵素活性、ひいては臨床像との強い関連が示され、変異の種類と上記病型との関係も明瞭に示された<sup>13)</sup>。

#### (ii) ADA 欠損症の治療

これまで報告されている大部分の ADA 欠損症は早期発症型 SCID で、免疫機構が再建されなければ、他の SCID と同じように 1 歳前後までにそのほとんどの患児が重症感染症で死の転帰をとる。その治療法については、これまでの所、HST が唯一の根治療法で、HLA の一致した血縁骨髄ドナーによる HST では 90% 近い生存率が得られている。しかし HLA 一致の血縁骨髄ドナーの存在する症例は SCID 症例の 20% 前後にすぎないので、ハプロタイプ HLA 一致の両親のいずれか (非血縁者 HLA 一致のドナーによる HST はこれまで数例の報告があるのみで、その有用性は評価できない) を骨髄ドナーとする HST も行われる<sup>14) 15) 16) 17)</sup>。

ハプロタイプ HLA 一致の HST では移植片対宿主反応 (GVHR) を予防するために T 細胞を除去した血液幹細胞を用いた T 細胞除去 HST が行われている。これまでのところ、その生着率は患児の良好な全身状態下で 60-80% と他の SCID に比して低いことが知られている<sup>18) 19)</sup>。これは ADA 欠損症では ADA(+)SCID と異なり拒絶反応に働く免疫能が残存しているため、あるいは体液中にも存在する dAdo が骨髄幹細胞の生着を阻害するためと推察されている。このため、前者に対しては一部の施設で免疫抑制剤による前処置を行ったハプロタイプ HLA 一致の HST も試みられているが、T, B 細胞の生着には差は見出されず、前処置をしない HST よりも長期生存成績が良いのか否か一定した結果は得られていない。

ウシ胸腺由来の ADA をポリエチレングリコール (PEG) で修飾した PEG-ADA が開発され、PEG-ADA の週 1-2 回/筋注投与は血漿中の ADA 値、dAdo 値を正常域に維持し、大部分の患児に少なくとも部分的な、一部にはほぼ完全な免疫機構の再建をもたらすことが報告された<sup>20)</sup>。1990 年には PEG-ADA は米国エンゾン社から orphan drug; ADAGEN™ として供給されるようになっている。今日まで米国、ヨーロッパを中心に HLA 一致血縁骨髄ドナーは存在せず、ハプロタイプ HLA 一致の HST を安全に施行するには状態が良くないと判断された ADA 欠損症の 80 症例以上に PEG-ADA は使用され、6 ヶ月以上にわたって継続されている患者の死亡率は 12% 以下と大部分の患者で有用性が認められている<sup>21)</sup>。PEG-ADA 療法は細胞外液中の dAdo を変換し、リンパ球数増加、免疫機能の改善などの効果が、開始後 2-4 ヶ月で見出される。しかしながら、より重篤な ADA 欠損では患者の 20% はごく一部の効果しか認められず、その有効性には患者間で相違がある。さらに PEG-ADA は、生涯にわたり 1-2 回/週 (45~60U/kg 体重) の継続が必要で、その費用が少なくとも年間 1700 万円前後となる。

ADA 欠損症に対する根治治療をまとめると、HLA 一致血縁骨髄ドナーが存在するときには HST が第一選択の治療法となる。存在しない時には患児の状況に応じて両親あるいは非血縁者で HLA 一致骨髄ドナーによる HST か、もしくは PEG-ADA 療法が選択されることになる。しかしこの二つのいずれの治療法にも問題が残されている。両親もしくは非血縁者からの HST では前処置を行わないと生着率が低く、前処置を行っても生着までの期間の感染症対策は必ずしも容易ではない。さらに前処置 HST 後の PEG-ADA 療法はその効果が抑制されるとの報告もあり、新生児期もしくは乳児期早期で感染因子への暴露が比較的少ない時期以外では、これらの HST は危険度が高いと考えざるを得ない。一方 PEG-ADA 療法は治療法自体に危険性はなく数回の投与後には効果が期待され得る利点があるが、一部の症例では血漿中の dAdo のレベルは同じように減少するにもかかわらずその免疫機構の再建が部分的であったり、治療中に自己免疫疾患の発症例が認められている点などが問題である。また、その経済的な負担は無視できない<sup>22)</sup>。

本邦においてはこれまで 10 家系 11 症例の ADA 欠損症が報告されており、HLA 一致の血縁骨髄ドナーから HST を受けた 3 症例と新生児期にハプロタイプ HLA 一致の HST を受けた姉妹例の計 5 例が移植によって生存している。PEG-ADA での治療例は本研究対象の 2 症例のみである。



## (2) ADA 欠損症における従来までの遺伝子治療臨床研究の概要

1990年、1991年に米国国立衛生研究所において、PEG-ADA療法を受けていた二人のADA欠損症患者に、自己末梢血リンパ球を標的としてレトロウイルスベクターLASNを用いた遺伝子治療臨床研究が行われた<sup>1)</sup>。これを契機として、その後、我々の症例を含めた11例のADA欠損症症例に対し、多施設で遺伝子治療が実施されている<sup>23)</sup>。標的としては末梢血リンパ球、臍帯血細胞、骨髄血細胞が選択されて（一部に末梢血リンパ球と骨髄血細胞の併用）、末梢血リンパ球を標的としたものでは臨床的効果を認めているが、いずれもPEG-ADA療法が併用されている。生前診断された3症例に対し、PEG-ADA療法下に自己臍帯血中の血液幹細胞を標的としてLASNを用いた遺伝子治療が実施され、1-10%の末梢血T細胞に遺伝子導入が確認された。しかし、PEG-ADA療法の中絶時には遺伝子導入T細胞の存続にもかかわらず免疫能の低下をきたして、PEG-ADA療法が再開されている<sup>24)</sup>。以下に、最初に行われた2症例と、我々の経験した症例の経過（添付資料1-1）を紹介する。

1990年9月15日に米国で遺伝子治療が開始された症例（4歳）は、11ヶ月間に8回の反復治療を受けた。その結果、PEG-ADAで治療されていた2年間には認められなかった末梢血T細胞数の正常化、同種血球凝集素価の出現、インフルエンザ菌ワクチン接種後の特異抗体反応の獲得、カンジダ、破傷風トキソイドに対する遅延型皮膚反応の陽転、抗原刺激によるT細胞増殖反応の正常化などの免疫機構の再建が得られた。末梢血T細胞は2回目の治療後より1000/ $\mu$ l以上となり、3-5回目の治療時に減少するもその後は確実に増加して2000/ $\mu$ 以上とほぼ正常化した。3-5回目の治療時のT細胞減少時にも、末梢血単核球のPCRによるADA遺伝子の発現とADA活性は極めて強いことが示されて、ADA遺伝子を発現したT細胞が生体内で優位に生存していることが示唆された。末梢血単核球のADA活性は3回目の治療後に5U（正常値：40-50U）となり、その後も反復治療毎に増加しており、導入されたADA遺伝子の発現が安定していることも示唆された。患児は1992年8月までに11回の治療を受けて、その後は中絶されているが、獲得された免疫機能は維持されている。1991年1月31日に開始された症例は、1992年6月までに12回の反復治療を受け、ほぼ同様の経過である。現在までに二人の臨床経過は順調で、関連した副作用も投与後の一時的な軽度発熱以外は見いだされていない<sup>25)</sup>。

我々は、1995年8月から1997年3月までの期間に末梢血リンパ球を標的とし、レトロウイルスベクターLASN (Genetic Therapy Co. 供与)を用いた遺伝子治療を当時4才のADA

欠損症患者（症例 1）に実施した。4 - 6 週間隔で合計 11 回の遺伝子導入細胞の投与を行い、投与細胞総数は約 850 億個に及んだ。治療による重大な副作用は認められなかった。遺伝子導入細胞の存在は、PCR 法、in situ PCR 法、FISH 法<sup>26)</sup>（添付資料 1-2）等で確認した。治療前後を通して T 細胞のクロナリティーに大きな偏りはなく、in vitro では B 細胞に対する抗体産生の誘導作用も確認された<sup>27) 28) 29)</sup>（添付資料 1-3,1-4）。PEG-ADA 療法との併用下に遺伝子治療臨床研究による以下の効果を確認した。①末梢血リンパ球数は投与期間中は 3000/ $\mu$ l まで増加、中断後は漸減し、500~1000/ $\mu$ l となった。②末梢血単核細胞中 ADA 活性は治療中に 30U まで増加したが、中断後は 5-10U を維持している。③血清 IgG 値の上昇を認めて  $\gamma$ グロブリン補充療法を中断した。④特異抗原に対する免疫応答の改善（特異抗体価の上昇、特異抗原に対する遅延型皮膚反応の改善）を認めた。⑤治療中断後に水痘、麻疹、インフルエンザなどのウイルス感染症に罹患するも通常の臨床経過、ある時は軽症に経過して特異抗体産生能を獲得している。⑥身体的、精神的に正常な成長発達を認めている。

遺伝子導入細胞の投与を中断して 4 年半を経過しているが遺伝子導入細胞は末梢血単核細胞の ~5%、5-10U の ADA 活性の発現が継続している<sup>30)</sup>。

以上の NIH と我々の遺伝子治療臨床研究により、末梢血リンパ球を標的としてレトロウイルスベクターを用いた ADA 欠損症に対する遺伝子治療は PEG-ADA 療法との併用下に少なくとも一定期間、臨床上有用であることを示している。

### (3) 従来の方法からの改良点。

本研究で使用するレトロウイルスベクター GCsap M-ADA は、基本骨格は Gibbon Ape Leukemia virus (GaLV) 由来のエンベロープタンパク質(env)を発現する PG13 細胞を用いており、骨髄細胞にはその受容体 Glvr-1 の発現が高いことから、血液幹細胞への感染効率の改善との関連が示唆されている<sup>34)</sup>。また PG13 には構造タンパク質(gag)/逆転写酵素(pol)遺伝子が別々のプラスミドで導入されており、さらに GaLV env 受容体をマウス細胞は持たないことから LASN 産生細胞と異なりベクターの再感染もなく、野生型レトロウイルス(RCR)産生の可能性は一段と低くなる。

また、フィブロネクチンフラグメント（CH-296; 宝酒造）<sup>35) 36)</sup> 上で CD34 陽性細胞に感染させることにより、さらに感染効率が改善された。また CD34 陽性細胞を活性化させるサイトカインの研究に基づき、SCF, Flt-3L, TPO のサイトカインカクテルが遺伝子導入に有効な組み合わせであることが判明している<sup>37)</sup>。これらの CD34 陽性細胞への遺伝子導入技術の組み合わせは導入効率をほぼ 20%程度までに増加させている<sup>6)</sup>。

#### (4)他の治療法との比較及び血液幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究を選択した理由

症例 1 は、末梢血リンパ球を標的とした遺伝子治療臨床研究を実施され既に 4 年半を経過している。前項に述べた様に、遺伝子治療臨床研究により臨床的、免疫学的効果を認めたが、現時点での末梢血リンパ球数は 500-1000/ $\mu$ l と低値で、毎週の PEG-ADA 療法：1 バイアル投与が継続されている。

症例 2 は、平成 11 年 4 月生まれの女児で、生後 1 ヶ月より気道感染を反復し、遺伝子解析、赤血球中の dAdo 値などから ADA 欠損症による早期発症型 SCID と診断された症例である<sup>38)</sup>（添付資料 1-6）。HLA 一致の血縁骨髄ドナーがいないため、両親と協議し、同意の上で PEG-ADA 療法を開始している。しかし、末梢血リンパ球数 300-500/ $\mu$ l と低値が持続、血清免疫グロブリン値も低値で静注用免疫グロブリン製剤補充の余儀ない状況にありその臨床効果は不十分である。PEG-ADA 療法の経済的負担と、今後の成長に伴う相対的な PEG-ADA 投与量の減少を考慮すると何らかの治療の追加が必要である。

これら 2 症例に対しての治療法の選択として、①非血縁骨髄ドナーからの HST、②どちらかの親を骨髄ドナーとした HST、③末梢血単核球を標的とした遺伝子治療、④血液幹細胞を標的とした遺伝子治療などが考えられる。①と②に関しては、前回の末梢血単核球を標的とした遺伝子治療臨床研究の際にも考慮されたが、HLA の一致した血縁骨髄ドナー以外の HST の成績が依然として新たな展開に欠け、さらに PEG-ADA 療法を開始した症例で HST を実施した前例が無く、結果を予想できず、また前処置としての免疫抑制等の危険性も考慮し、第一選択としては適さないと判断した。また、③に関しては、症例 1 ですでにその臨床効果が確認されているが、その効果に制限があること、治療は反復で長期間を要するなどの欠点がある。症例 2 の場合はまだ幼少のため十分な末梢血単核球を採取する際の血管ルートの問題、PEG-ADA 療法による末梢血リンパ球数増加が不十分であることなどもあり実施に困難

が予想される。一方、④に関しては基礎的な研究によって、遺伝子導入効率やベクター自体の改良など従来の問題点が改善されつつあり、実際にフランスで X-SCID に対しての臨床的な有効性が報告されている。このような背景を鑑み、④の治療が最適であると判断した。なお、症例 2 に関しては妹が出生している。両親と協議・同意を得て出生前検査し、妹が非疾患保有者・非保因者であることを診断した。妹は HLA のタイピングの結果、患児と適合していなかった。

## 6. 遺伝子及び遺伝子導入方法

### (1) ベクターの構造と性質

#### ①野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

使用するウイルスベクターはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。この MoMLV は sarcoma37 細胞より分離され、マウスの年齢および系統にかかわらず感染し、発癌性遺伝子を持たないが、これに長期間感染したマウスはリンパ性白血病を発病することが知られている。人に感染して発病させることはない。

一般に MoMLV はその感染能力の観点から、エコトロピック、アンホトロピック、ゼノトロピックに分類される。このうち、アンホトロピックウイルスはマウスのみならずヒトを含む多くの動物細胞に感染可能である。その感染はウイルス粒子上に存在する env 蛋白質と細胞上に存在するレセプターを介して行われる。感染により細胞内に取り込まれると、ウイルス粒子の内容物が細胞質に放出される。ウイルスの RNA ゲノムはウイルス由来の逆転写酵素により DNA に変換され、DNA の両端にある LTR を介して宿主細胞染色体上に挿入される。挿入された DNA 上にコードされている遺伝子情報は宿主細胞の転写・翻訳機構を使って蛋白質に翻訳される。転写された RNA および翻訳されたウイルス蛋白質からウイルスが再構成され、宿主細胞から放出される。放出されたウイルスは別の細胞に感染し、同じ生活環を繰り返す。一般に、感染により宿主細胞が破壊されることはない。

#### ②ベクターの構造 (添付資料 2-4)

導入を計画しているベクターはヒト ADA 遺伝子の全ての翻訳領域を含む cDNA のみを含むレトロウイルスベクターである。従来の LASN に含まれていた Neo<sup>R</sup> 遺伝子などの選択に

使用される遺伝子は含んでいない。LTRにはLASNと異なり、MPSV (myeloproliferative sarcoma virus)を使用し、splice donor/acceptor siteを保持している。ヒトADA遺伝子の翻訳領域は開始コドンATGから終止コドンまでの1089塩基対で構成されている。パッケージングにはPG13細胞を用いている。

### ③ベクター遺伝子の性質

今回使用するGCsap M-ADAは、従来のLASNに比較し、いくつかの改良がなされた。まず、基本構造を単純化するために基礎実験に有用であった選択遺伝子(Neo<sup>R</sup>遺伝子)を除いた。またベクター内にsplice donor/acceptor siteを持つようにした。そして目的遺伝子ADAcDNAの翻訳開始点を本来のウイルス遺伝子envが来る位置に設定した。更に種々のLTRの中から最も効率が良く、メチル化しにくいMPSVをLTRとして選択した。パッケージング細胞も血液幹細胞にそのレセプターが多いとされるGaLV由来のenvを導入したPG13を用いた。以上の様な改善により、血液幹細胞への感染効率が明らかに改善され、更に導入遺伝子の発現効率も優れている。安全性の面でもPG13使用によりRCRの産生には少なくとも3回の組換えを必要とするため理論的に極めて起こりにくく、臨床的に安全性が確認されたLASNよりも更に優れている。

### ④導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性

ADAは酸性にpIを持ち、363個のアミノ酸からなる約40kDの核酸代謝系酵素で、ほとんどの細胞で発現しているため、血液幹細胞に導入され種々のリネージの血液細胞に発現しても非生理的な発現ではない。ADAは生体内では約200kDの糖蛋白質と2分子のADAが結合し酵素活性のある複合体を形成する。アデノシンとデオキシアデノシンをそれぞれイノシン、デオキシイノシンに変換する酵素活性を有する。

## 7. 自己血液幹細胞の生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

ADA欠損症はADA欠損による障害が主としてT細胞に強く発現されておりHSTにより血液幹細胞が生着すると治癒させることが出来る。即ち血液幹細胞もしくはT細胞が治療の対象細胞となる。

今回の遺伝子治療臨床研究は、患児骨髓血 CD34 陽性細胞を標的とする。CD34 陽性細胞群には自己複製能と多分化能を有する血液幹細胞が含まれると考えられている。実際に多くの症例でこの細胞群を分離して血液幹細胞移植として使用され、全ての血液リネージの再構築が認められている。T細胞を標的とした遺伝子治療の場合、1回の遺伝子導入では限られた抗原レパートリーしか獲得しないため、反復した遺伝子導入操作が必要であり、尚かつ抗原反応性の獲得には限りがあり、その効果に持続にも時間的な制限が予想される。これに対し、血液幹細胞を標的とした遺伝子治療の利点は理論的には一度の遺伝子導入操作であらゆる抗原レパートリーをカバーし、永続した治療効果が期待できることである。ADA は全ての血液細胞で発現しているため血液幹細胞に遺伝子を導入し、あらゆるリネージの細胞に ADA が発現する事は非生理的ではない。このために本来発現しない細胞において治療遺伝子が発現することに基づく副作用の可能性は考え難く、この意味から言っても血液幹細胞は ADA 欠損症に対する遺伝子導入の標的として理想的である。

しかし、過去に実施された ADA 欠損症に対する血液幹細胞を標的とした遺伝子治療の試みでは、末梢血細胞での遺伝子発現が短期間で消失、あるいは遺伝子導入が T細胞の 5-10%とごく一部の細胞に限られることから、末梢血リンパ球を標的とした遺伝子治療臨床研究と同様に PEG-ADA 療法が継続されている<sup>3)4)</sup>。その主な理由は血液幹細胞の分離法、遺伝子導入効率の低さと導入遺伝子の発現が長期間持続していないことが推察される。また、併用する ADA 酵素補充療法が遺伝子導入細胞の生体内での選択的増殖・生存の優位性を損ない、効果の発現を干渉している可能性も指摘されている<sup>3)39)40)</sup>。

これらに対して、血液幹細胞として CD34 陽性細胞の分離法、同細胞への遺伝子導入法の検討、レトロウイルスベクターの改善などが研究され、血液幹細胞に対する導入効率の向上には明らかな成果を上げている。実際に CD34 陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究がこれまでに補充療法を伴わない 8 症例の X-SCID で試みられて 7 症例で末梢血 T細胞の出現を認めて順調な臨床経過を示していることが報告されている<sup>41)</sup>。

これらのことから PEG-ADA 補充療法を中断もしくは可及的減量下に血液幹細胞を標的とする ADA 欠損症における遺伝子治療臨床研究は、ほぼその条件が整ったと考えられる。

## 8. 遺伝子導入方法の概要及び当導入法を選択した理由

骨髓より単核球を分離し、Isolex300i (宝光電) を用いて CD34 陽性細胞を分離する。この細胞を CH-296 をコートした血液バッグ上で各種サイトカイン (SCF, Flt-3L, TPO) 存在