

下に 24 時間培養する。培養液は 1 % ヒトアルブミンを加えた X-VIVO 15™ (BioWhittaker 社) を使用する。24 時間培養後、ベクターを含む上清を 12 時間おきに 4 回加え、遺伝子導入を行う。培養後の細胞を生理食塩水で洗浄後、生細胞数を算定し、無菌テストなどの安全性を確認した後、患児の静脈内に投与する。

CH-296 は血液幹細胞とレトロウイルスベクターを橋渡しする事により感染効率を増加させる事が多くの研究で明らかである。また、血液幹細胞の多くが細胞周期の静止期にあるため、活性化させベクターが染色体に組み込まれる条件を満たすために上記のサイトカインの組み合わせを用いる。これらのサイトカインの組み合わせが有効であることも多くの研究から判明している。我々も基礎実験で、CH-296 とこれらのサイトカインの組み合わせによる遺伝子導入でその導入効率の改善を確認している。

GCsap M-ADA を用いた血液幹細胞への遺伝子導入実験は繰り返して実施し、その遺伝子導入効率、発現の状況を検討し、LASN に比較して明らかな改善を認めている。また、免疫不全マウスを用いて *in vivo* での分化・増殖に伴う遺伝子発現状況も確認している。

また、米国 NIH、F. Candotti 博士らによる GCsap M-ADA と MND-ADA を併用して CD34 陽性細胞を標的とする ADA 欠損症の遺伝子治療プロトコールが既に、FDA、Recombinant DNA Advisory Committee(RAC)にて承認されて進行中である。(添付資料 2-3)

## 9. これまでの研究成果

### 1) 方法

#### ①ウイルスベクター。

LASN、GCsap M-ADA を用いた。

#### ②標的細胞

臍帯血あるいは健常ボランティア骨髓血から CD34 陽性細胞を分離し、その純度を FACS で確認の上、使用した。また、患児から骨髓血を採取後、同じ方法で CD34 陽性細胞を採取

して使用した。他に患児由来 EB ウイルス樹立 B 細胞株、ADA 欠損 T 細胞株である TJF-2 株 (NIH, M.Blaese 博士供与)、正常人末梢血単核球等を標的として使用した。

### ③ 遺伝子導入方法

#### i) CD34 陽性細胞

培養プレートを組み換え型フィブロネクチン CH-296 (20-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) でコートし、ヒトアルブミンでブロックした。そのプレート内で 1% ヒトアルブミン添加 X-VIVO 15™ 培地に浮遊した CD34 陽性細胞 ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) に SCF と TPO は最終濃度 50ng/ml、Flt-3L は最終濃度 150ng/ml でそれぞれ添加、24 時間培養した。その後、ウイルスベクターを含む上清を加え、プロタミン: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下で遠心操作 (2500rpm, 30min, 32°C) 後、12 時間、37°C で培養した。この遺伝子導入操作を計 4 回実施して最終の遺伝子導入操作 12 時間後に細胞を回収、遺伝子導入細胞として使用した。

#### ii) 末梢血単核球

10% FCS 添加 RPMI (Gibco) に  $0.5-1.0 \times 10^6/\text{ml}$  濃度の単核球を抗 CD3 抗体 (OKT-3; Ortho 社): 100ng/ml、IL-2: 100U/ml を加えた条件で 48 時間培養した。その後、ウイルスベクターを含む上清を加え、プロタミン: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下で遠心操作 (2500rpm, 30min, 32°C) 後、12 時間、37°C で培養した。この遺伝子導入操作を計 4 回実施して最終の遺伝子導入操作 12 時間後に細胞を回収、遺伝子導入細胞として使用した。

#### iii) 患児由来細胞株

TJF-2, EBV 樹立 B 細胞株に対する遺伝子導入は、ii) と同様の培地を使用し  $1 \times 10^6/\text{ml}$  濃度の細胞に 12 時間間隔で計 2 回ベクター上清を加え、プロタミン/遠心操作を上記同様に行って実施した。

### ④ 導入遺伝子の確認方法

#### i) PCR 法

導入遺伝子の確認は、ベクター由来の ADAcDNA を検出し、ゲノム由来の ADA を増幅させないプライマーを用いて PCR 増幅にて行った。遺伝子導入前後の細胞から DNA を抽出し、

0.1 µg を鋳型とした。プライマーは、ヒト ADA 遺伝子の cDNA の配列からイントロンをはさむ形で設定し (ADA1: 5'-CCCGCCTTCCCGCCTTCGACAAGCCCAA-3', ADA7: 5'-TGTAGTAGTCAAACCTTGGCC-3'), DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) を用いて PCR を行った。反応条件は、変性: 94°C、30 秒、アニーリング: 58°C、30 秒、鎖伸長反応: 72°C、30 秒として 30 サイクル行った。反応産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色でバンドを確認した。微量の導入遺伝子を検出する方法として、nested-PCR 法を確立した。これは、上記の PCR 産物を鋳型とし、内側にもう一組のプライマー ADA1-1: 5'AGAACTGCATGTCCACCTAGACG3', ADA7-1: 5'TCCATGCCAATGACGTTTCAG3' を設定して PCR を実施した。検出感度は従来の PCR 法では 0.07 コピー/cell、nested PCR 法では 0.00012 コピー/cell であった。

#### ii) リアルタイム定量 PCR 法

遺伝子導入効率を評価する方法の一つとして定量 PCR 法を確立した。それぞれのベクター特異的なもの、共通の ADAcDNA を検出する三通りの系を設計した。

目的の ADAcDNA、ベクター DNA の一部を特異的に認識するプライマーと Taqman-probe を primer express を用いて次のようにそれぞれ設定した。ADAcDNA を検出するプライマーは前述の ADA1 と ADA7 を使用し、プロブは 5'CCCTCCCAGCTAACACAGCAGAGGG3' とした。LASN を検出するプライマー/プロブは 5'TCATCGAGAAGGCGTCTGC3', 5'TTTCAGGCTTGATGGATCCG3' / 5'TCGACAAGCCCAAAGTAGAACTGCATGTC3'、GCsap M-ADA を検出するプライマー/プロブは 5'GGTGGACCATCCTCTTAGACCG3', 5'GGTTTCAGGCTTGATGGATCC3' / 5'CCCGCCTTCGACAAGCCCAA3' である。それぞれの PCR フラグメントを TA cloning ベクター (PCR2.1; Invitrogen) に組み込んで増幅・精製し、正確に定量、希釈系列を作製してスタンダードに使用した。定量 PCR 反応は GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で行った。この系により、既に遺伝子治療を受けた一症例では導入遺伝子がどちらのベクターに由来するのか定量的に評価でき、またそれぞれの系の結果を比較することによりお互いの結果の精度も確認できた (研究成果 1)。

### iii) ADA 酵素活性測定

目的の細胞を PBS で洗浄し、 $10^6/200\mu\text{l}$  の濃度で Tris-BSA buffer に浮遊後、凍結融解を 5 回繰り返した。その後に遠心し、細胞破片を除いた細胞上清を測定に用いた。放射線ラベルアデノシン( $^{14}\text{C}$ -Adenosine; Amersham)を細胞上清と一定時間 (5-10 分) 反応後、熱処理をして反応を止め、薄層クロマトグラフィーで展開した。画像処理にてヒポキサンチン、イノシンに代謝された割合を算出して時間あたりに換算し ADA 酵素活性とした。単位は  $\text{nmol}/\text{min}/10^8 \text{ cell}$  で便宜上これを(U)として表記した。

### iv) NOD/SCID マウスへの CD34 陽性遺伝子導入細胞の移植

放射線 250-320 cGy を照射した週令 8-12 の nonobese diabetic/Shi-scid Jic (NOD/SCID) mice (Nihon Clea) を用いた。遺伝子導入操作をした CD34 陽性細胞  $0.5-1 \times 10^6$  細胞をマウス尾静脈へ静注した。移植後 6-8 週にマウス末梢血リンパ球中のヒトリンパ球をヒト CD45 陽性を指標として FACS にて確認後、骨髄、脾臓から単核球を分離し、細胞表面マーカー、導入遺伝子の有無を検索した。

## 2) 結果 (研究成果 2 - 8)

### ① 遺伝子導入

GCsap M-ADA による CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率はリアルタイム定量 PCR 法による評価の結果 0.2-0.8 コピー/cell であった。

正常人から得た臍帯血 CD34 陽性細胞 (97%以上の純度) を用いた遺伝子導入実験の結果、GCsap M-ADA の導入効率は LASN に比し、有意に優れていた (研究成果 2A)。患児由来 EBV 樹立 B 細胞株を用いた結果では、GCsap M-ADA は LASN に比しほぼ 2 倍の導入効率で、導入後の ADA 活性は 5 倍以上を示した (研究成果 2B)。骨髄血 CD34 陽性細胞でも GCsap M-ADA の導入効率は臍帯血 CD34 陽性細胞とほぼ同程度に認められた (研究成果 3, 4)。

### ② マウスへの移植実験

NOD/SCID マウスへの CD34 陽性遺伝子導入細胞の移植実験を正常人臍帯血・骨髄血、また患児骨髄血を用いて実施した。遺伝子導入には GCsap M-ADA を用いた。移植 6-8 週後にマウス末梢血でのヒトリンパ球の存在 (ヒト CD45 陽性) と、骨髄、脾臓でいくつかのリネージ (CD19 陽性、CD33 陽性、CD34 陽性) の細胞群が確認された (研究成果 5, 6)。更に、

ヒト ADA に特異的なプライマーを用いた PCR 解析で、臍帯血 CD34 陽性細胞移植マウスの骨髄及び脾臓に導入遺伝子の存在が確認された（研究成果 7）。症例 1 から骨髄血 CD34 陽性細胞を分離・採取し遺伝子導入後 NOD/SCID マウスへの移植を行った。その結果、マウスの体内で分化したヒト B 細胞に導入遺伝子を確認した（研究成果 8）。

### 3) 考察

GCsap M-ADA は LASN に比し、リアルタイム定量 PCR 法による CD34 陽性細胞への導入効率、患者細胞内での ADA 酵素活性測定による遺伝子発現効率において明らかに優れていることが示された。また、CD34 陽性遺伝子導入細胞が、マウスの体内でいくつかのリネージのヒト細胞へ分化可能であることが示された。これらの結果から少なくとも多分化能を有する血液幹細胞に遺伝子を導入することが可能であると考えられた。

## 10. 安全性についての評価

### (1) 遺伝子導入方法の安全性

#### ①遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

遺伝子導入に用いる GCsap M-ADA は米国 NIH において作製され、FDA 基準に従った純度を含む安全項目がそれぞれ laboratory cell vial, master cell bank, end of production cells, final GCsap M-ADA supernatant において確認されたものである（添付資料 2-4）。

#### ②患児に投与する物質の純度及び安全性

患児に投与する物質は、遺伝子導入された患児骨髄由来の CD34 陽性細胞のみで、それ以外の物質は投与しない。遺伝子導入に使用する GCsap M-ADA については、上述のごとく FDA の基準に従って純度および安全性に関する項目すべての検査が終了し、保証されたものを使用する。それらの項目には、ウイルス力価、ベクター遺伝子配列、無菌性試験、マイコプラズマ検査、一般安全性試験、RCR 検査などが含まれる。

前遺伝子治療では、培養液中に牛胎児血清(FCS)が含まれており、治療の後半には患児に FCS 中セルロプラスミンに対する抗体が認められ、これに関連する可能性のある発熱・悪寒等の症状を認めた。そのため、今回の遺伝子導入操作の際の培養では臨床的に使用されてい

るヒトアルブミンを使用し、FCS を使用しない系を確立したが、念のため治療前にウシセルロプラスミン抗体の検出と、プリックテストを実施する。また、体外での遺伝子導入に使用される培養液やその他種々の試薬については、培養細胞を体内に戻す前に十分に洗浄するため、実際上の問題はないと考えられる。培養中に混入する危険性のある細菌、マイコプラズマ、エンドトキシンなどについては、患児に投与する前に検査を行う。

### ③ RCR 出現の可能性

PA317/LASN の安全性は既に臨床研究においても確認されている。PG13/GCsap M-ADA はパッケージング細胞の改良の結果、PA317/LASN よりも RCR が発生する確率が、理論上より低いと考えられている。我々の基礎実験においても GaLV 由来の env 遺伝子に対する PCR 法を用いて RCR の発生は認められない事を確認した。実際の治療に使用する PG13/GCsap M-ADA については、米国において RCR の検査 (S+L-法を含む) を通過した後に入力し、治療開始前後にもその都度 RCR が存在しないことを確認する。なお S+L-法については検体を SRL に輸送し、測定を依頼する。

### ④ 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性

レトロウイルスは RNA ウイルスであり、感染後細胞内で逆転写酵素にて 2 重鎖 DNA となり宿主の DNA に組み込まれる。この過程において宿主の DNA に障害を及ぼすことはないと考えられている。今回使用する GCsap M-ADA もレトロウイルス由来であり、理論的には他のレトロウイルスベクターと同様と考えられるが、現在までレトロウイルスベクターによる細胞障害性の報告はない。

### ⑤ 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子治療臨床研究計画は患児の骨髄由来の血液幹細胞を標的細胞とし、ex vivo で遺伝子導入を行うものである。遺伝子が導入された細胞を介して他の細胞への遺伝子導入が体内で起こる可能性は RCR が存在しない限りありえない。また、レトロウイルスベクターは細胞外では非常に不安定であるので、患児に遺伝子導入細胞を投与する際に細胞外のレトロウイルスベクターが同時に体内に入り、標的細胞以外の細胞へ遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

## ⑥患児以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は *ex vivo* で行われるので、遺伝子導入に携わる関係者は細胞外のレトロウイルスベクターを含む上清の扱いに注意が必要であり、レトロウイルスベクターを含む廃液のすべては高圧滅菌後に廃棄する。しかし、前項で述べた様に、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、レトロウイルスベクターを含む上清に直接触れたりしても感染が成立するとは考えられない。また、患児を介して他の人へ感染することは、RCR が存在しない限りありえない。

## ⑦染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターが宿主の DNA に組み込まれる場合、導入部位は一定ではないので、レトロウイルスベクターが組み込まれた部位の近傍に血液幹細胞にとって重要な遺伝子や癌原遺伝子が存在した場合に問題となる。レトロウイルスベクターの組み込みが血液幹細胞の増殖にとって負に働く場合は感染細胞は死滅し、生体には問題は起こらないと考えられる。レトロウイルスベクターの組み込みが増殖にとって正に働くときは問題となり得るが、その可能性は極めて低いとされている。本遺伝子治療の標的細胞は血液幹細胞であり、遺伝子導入された細胞が長期間にわたって患児の体内で生存すると予測され、その安全性は長期間にわたって評価されることが必要である。

## ⑧癌原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く時には癌原性の問題が出現する。例えば癌原遺伝子の upstream にウイルスの LTR が存在すれば、強力なプロモーター活性を有する LTR により癌原遺伝子が発現し、腫瘍化する可能性も否定できない。また、組み込まれる事によって癌抑制遺伝子を分断し、その後他の allele の同じ遺伝子の変異を誘導することも否定できない。しかし、このような部位に組み込まれる可能性は極めて低く、これまでの細胞周期のより早い末梢血リンパ球への繰り返す遺伝子導入によっても実際に問題になった事は無い。

## (2) 遺伝子産物の安全性

GCsap M-ADA の保有する遺伝子はヒト ADA のみであり、LASN と異なり Neo<sup>R</sup> 遺伝子を保有しない。本来ヒトには無い遺伝子の導入が無く、その点で安全である。

### (3) 細胞の安全性

#### ①培養細胞の純度

GCsap M-ADA による遺伝子導入操作後の骨髓血 CD34 陽性細胞には、ベクター産生細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。

#### ②細胞の遺伝型、発現型の安全性

GCsap M-ADA の遺伝子導入は ADA 遺伝子の相同領域に起きるのではなく、その部位は一定でもない。すなわち遺伝子導入によって標的細胞中のゲノム ADA 遺伝子座には変化は起きない。

ADA 欠損症は ADA の絶対的不足が原因であり、異常蛋白質による細胞障害が原因でない。従って、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により ADA 欠損の血液幹細胞へ ADA を補充することは1つの治療戦略となりうる。また ADA は触媒酵素であるので過剰産生されても基質がなくなるとその作用はなく、仮に遺伝子導入によって過剰に発現されても細胞の安全性において問題はないと考えられる。

#### ③被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞は ex vivo で GCsap M-ADA による遺伝子導入を行った自己の血液幹細胞（骨髓血 CD34 陽性細胞）であり、投与する細胞の安全性は極めて高いものと思われる。GCsap M-ADA 産生細胞株と導入操作後の細胞の無菌性は血液培養用培地を用いた培養により確認する。

細胞培養に使用した各種サイトカインは、繰り返す洗浄後にその生物活性を示す濃度以下に十分希釈されており、また本来ヒト生体内に存在する物質であることからこれらの生体におよぼす影響はほとんど無いものと考えられる。

### 1 1. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

既にレトロウイルスを用いた遺伝子治療は様々な疾患に対し、2001年9月までに1755症



例(J. Gene Med ; Genomics Website)に実施され、その安全性はほぼ確立している。今回使用するベクターについてはFDAにより臨床応用が安全性の点からも承認されている。

我々は、末梢血単核球を標的としたADA欠損症に対する遺伝子治療臨床研究を学内、旧文部省、旧厚生省の審査・認可を受け、1995年8月から1997年3月まで実施した。その結果、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有効性と安全性を確認している。この経験は今回の遺伝子治療の実施に大変役立つ。事実、前回使用した器機、機材が使用可能であり、ほぼ同様の細胞分離等の技術は修得している。また、検査や治療に関わる施設内の協力も前回同様に得る事が可能である。

今回のGCsap M-ADAを用いた血液幹細胞への遺伝子導入に関しては、これまでに臍帯血や、健常人ボランティアの骨髄血を用いて繰り返し基礎実験を行っている。また、対象患者から試験的に骨髄血を採取し遺伝子導入基礎実験を行っている。一方、遺伝子導入・発現等に関する評価法は、以前の方法に加え、遺伝子導入を定量的に解析できるシステムを新たに開発した。また、NOD/SCIDマウスを用いた系において遺伝子導入細胞が生体内で増殖分化し、遺伝子を保持し、発現を継続することを確認している。

一方、骨髄血CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療はフランスでX-SCIDを対象とし、レトロウイルスベクターを用いて1999年に実施された。長期的な評価はまだできないが、既に7症例に臨床的な有効性を認めている。

## 1.2. 遺伝子治療臨床研究の計画

### (1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

ADA欠損症の2症例を対象とする。一例は1995年8月～1997年3月までPEG-ADA療法との併用下に末梢血リンパ球を標的とし、LASNを用いた遺伝子治療臨床研究を実施した男児である。遺伝子治療によって臨床的、免疫学的に治療効果を認めたが、その遺伝子発現は限られ、PEG-ADA療法は継続されている。他の一例は、1999年4月生まれの女児でPEG-ADA療法を実施されているが、著明な末梢血リンパ球数の低値が持続し、静注用免疫グロブリンの補充が必要であるなどその効果は不十分である。

患児は PEG-ADA 療法（症例 1, 2）と共に、静注用免疫グロブリン製剤の投与、カリニ肺炎に対するスルファメトキサゾール・トリメトプリム（ST）合剤の予防内服を継続している（症例 2）。治療前に逆隔離下で PEG-ADA の中断もしくは可及的に減量を行う。症例 1 においては PEG-ADA 療法中断によって、免疫能の快復が得られた場合には本遺伝子治療臨床研究を実施しない場合もありうる

遺伝子導入はそれぞれの症例の骨髓血 CD34 陽性細胞を標的として行う。全身麻酔下で患児から骨髓血を採取し、Isolex300i にて CD34 陽性細胞を分離する。この細胞に対し ex vivo で遺伝子導入を行い、良く洗浄後、静脈内へ遺伝子導入 CD34 陽性細胞を投与する。ベクターは GCsap M-ADA を使用する。このベクターは共同研究者の米国 NIH の F. Candotti 博士より供与され、安全性に関して米国 FDA で既に承認されたものである（添付資料 2-1, -2, -4）。

投与後は患児の末梢血単核球または骨髓細胞を用いて導入遺伝子の存在、ADA 遺伝子の発現、免疫機能、RCR などを検索しながら患児の状態を経過観察する。導入遺伝子の検索は LASN と GCsap M-ADA を区別して検出する系を用いて検討する。

## (2) 被験者の選択基準及び除外基準

現時点では HLA の一致した血縁骨髓ドナーによる移植が ADA 欠損症の第一選択の治療法であり、この条件が満たされる場合は遺伝子治療の対象にはならない。この条件を満たす骨髓提供者がない場合、PEG-ADA 療法かもしくはハプロタイプ一致の HST が選択される。PEG-ADA はその有用性が確認されているが、必ずしも免疫機構の再建は完全ではなく、長期的な臨床効果には限界がある場合も存在する。従って ADA 欠損症において HLA 一致の骨髓提供者が存在せず、PEG-ADA 療法が選択されて、その効果が不十分もしくはその維持が困難な症例は、遺伝子治療の対象となる。今回の 2 症例はいずれも上記の基準を満たすものである。既に悪性腫瘍の発症が認められる症例は除外される。

### (3) 被験者の同意の取得方法

被験者は小学生と乳幼児であり、具体的な治療方法、予想される効果と副作用等を書面をもとに両親に説明し、同意を得る（添付資料 3-1）。小学生の被験者に対しては具体的な手順を主体に説明書を作成して十分な説明を行い、理解を得る。

### (4) 実施期間及び目標症例数

許可が得られた時点から 3 年間。目標症例数：2 例。

### (5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

#### ①群の設定方法

##### 対象患者

(i)末梢血単核球を標的として本邦初の遺伝子治療臨床研究の対象となった現在 10 才の男児；症例 1

生後 8 ヶ月頃から呼吸器症状が出現、生後 10 ヶ月でリンパ球減少、低 $\gamma$ グロブリン血症が検出され複合免疫不全症が疑われた。検査の結果、単核球、赤血球中の ADA 酵素は極めて低値で、赤血球中の毒性代謝産物 dATP 等の著増も認め、ADA 欠損症と診断されている。遺伝子解析の結果、R211H（父由来）とイントロン 2 における G+1→A の変異（母由来；その結果、スプライスの異常が生じて不安定なメッセージとなる）を検出した<sup>2)</sup>。診断時に間質性肺炎に罹患しており、HLA 一致の血縁骨髄ドナーがいなかったため PEG-ADA 療法（46U/kg/week）が開始された。当初著効した PEG-ADA 療法の効果が漸減してきたため、本学、旧厚生省、旧文部省の承認を得、PEG-ADA 療法下に 1995 年 8 月～1997 年 3 月の期間に末梢血リンパ球を標的とした計 11 回の遺伝子導入細胞の投与が行われた。治療中断後、4 年を経て、有効性と安全性を確認している。末梢血リンパ球数は微増し、抗原特異的な免疫能の獲得を認めた。末梢血単核球中に遺伝子導入細胞を 5%前後で認め、単核球中の ADA 酵素活性は最大で正常の約 20%ほどまで上昇した。血清の免疫グロブリン値も安定し、ガンマグロブリン製剤による定期的補充療法も中断された。経過中に水痘に罹患したが、通常の経過で治癒した。また、ごく最近麻疹にも罹患しその経過が危惧されたが重篤な症状無しに治癒し、麻疹特異抗体反応の獲得を確認した。安全性の面では発熱と牛血清セルロプラスミンに対する免疫反応を治療後半に認めた以外は、特記すべき副作用はなく、この遺伝子治療臨床研究の安全性を確認している。しかし、遺伝子治療中断後はゆっくりではあるが、末梢血リンパ球数の減少、遺伝子導入細胞の比率の低下を認めており、永続する効果をもたらす

治療が望まれる状況になってきている。現状の末梢血リンパ球数は 500-1000/ $\mu$ l で、単核球中の ADA 活性は 5-10U (正常の約 10%) である (臨床経過図 1)。現在も PEG-ADA (14U/kg) を毎週継続している。全身状態は良好で、生活の制限なしに二卵性の兄と同等の成長を確認している。

#### (ii) 平成 11 年 4 月生まれの ADA 欠損症女児; 症例 2

生後 1 ヶ月で重度の呼吸器感染症、驚口瘡、体重増加不良等で発症し、末梢血リンパ球数の著減で免疫不全を疑われ、検査の結果 ADA 欠損症と診断された。家族歴は無い。末梢血単核球中、赤血球中の ADA 活性は極めて低値であり、関連の毒性代謝産物 dAXP は赤血球中で著増していた。遺伝子解析の結果、Q119X (ナンセンス変異) と R235Q (ミスセンス変異) をそれぞれ両親から受け継いだ compound heterozygote であった<sup>38)</sup> (研究成果 9、添付資料 1-6)。ADA を欠損した *E. coli* を用いた *in vitro* の系で R235Q の ADA 活性を測定したところ極めて低い活性値を示し<sup>42)</sup> (添付資料 1-7)、病的変異として矛盾しなかった。患児には HLA 一致の血縁骨髄ドナーがいなかったため、両親によく説明して同意を得、PEG-ADA 療法 (45U/kg/week) を開始した。治療により末梢のリンパ球数は増加し、毒性代謝産物の減少も認められた。しかし、治療効果は十分ではない。患児の全身状態は良好であるが、リンパ球数の増加は不確実で 300-500/ $\mu$ l を推移しており、定期的な免疫グロブリン補充も必要な状況である (臨床経過図 2)。尚、患児には妹が出生した。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。HLA タイピングでは患児との適合は否定された (研究成果 10)。

#### ② 遺伝子導入方法 (付 1-1)

患児骨髄血 CD34 陽性細胞を標的とし、GCsap M-ADA を用いて *ex vivo* で遺伝子導入を行う。

##### i) 標的細胞の調整

全身麻酔下で患児の腸骨を数回穿刺し、一カ所につき 5-10ml の骨髄血を採取する (全量で 10-15ml/kg を越えないようにする)。骨髄血からパuffyコート分離し、更に Isolex300i にて CD34 陽性細胞を採取、その純度と数量等を検査後、生理食塩水で洗浄して標的細胞とする。一部を検査用に保存する。