

遺伝子治療臨床研究実施計画書

X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）に対する 遺伝子治療臨床研究

東北大学医学部附属病院

（小児腫瘍科）

目 次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称	1
2. 研究者の氏名及び担当する役割	1
2-1. 総括責任者の氏名及び担当する役割	1
2-2. 総括責任者以外の研究担当医師氏名及び担当する役割	1
3. 実施施設の名称及びその所在地	2
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	2
5. 対象疾患及びその選定理由	3
5-1. 対象疾患に関する現時点での知見	3
5-2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要	7
5-3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	7
6. 遺伝子の種類及びその導入方法	9
6-1. ヒトに導入する遺伝子の構造と性質	9
6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造	9
6-1-2. ヒトに導入する遺伝子の性質	9
6-1-3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性	10
6-2. 標的細胞の由来、生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由	10
6-3. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由	11
6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	11
6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響	12
6-4-2. ウイルスベクターの作製方法	12
6-4-3. ウイルスベクターの構造	15
6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴	15
7. これまでの当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用	

いた研究成果	15
7-1. 培養細胞を用いた研究の成果	15
7-1-1. B細胞への γ c鎖遺伝子導入	15
7-1-2. X-SCID患者骨髄細胞への γ c鎖遺伝子導入	17
7-1-3. NK細胞への分化能に関する研究	17
7-1-4. T細胞への分化能に関する研究	17
7-2. 実験動物を用いた研究の成果	18
7-2-1. 正常骨髄細胞と共通 γ 鎖欠損骨髄細胞との <i>In vivo</i> における競合 についての研究	18
7-2-2. γ c鎖ノックアウトマウスに対するヒト γ c鎖を用いた遺伝子治療	18
7-2-3. RAG2/ γ c鎖ダブルノックアウトマウスに対するマウス γ c鎖を用 いた遺伝子治療	19
7-2-4. 細胞内領域欠失 γ c鎖を発現する免疫不全マウスに対するマウス γ c鎖を用いた遺伝子治療	20
8. 安全性についての評価	20
8-1. 遺伝子導入方法の安全性	20
8-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの安全性	20
8-1-2. 増殖性ウイルス出現の可能性	21
8-1-3. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	22
8-1-4. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	22
8-1-5. 患者以外のヒトに遺伝子が導入される可能性	22
8-1-6. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点及びがん原性の有無	22
8-2. 遺伝子産物の安全性	23
8-3. 細胞の安全性	24

8-3-1. 培養細胞の純度	24
8-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性	24
8-3-3. 被験者に投与する細胞・試薬類の純度及び安全性	24
9. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	25
10. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	26
10-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	26
10-2. 被験者の選定基準及び除外基準	27
10-2-1. 被験者の選択基準	27
10-2-2. 除外基準	27
10-3. 被験者の同意の取得方法	27
10-4. 実施期間及び目標症例数	28
10-5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	28
10-5-1. 対照群の設定方法	28
10-5-2. 遺伝子導入方法（安全性及び有効性に関する事項を除く。）	28
10-5-3. 前処置及び併用療法の有無	30
10-5-4. 臨床検査項目及び観察項目	30
10-5-5. 予測される副作用及びその対処方法	32
10-5-6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判断基準	32
10-5-7. 症例記録に関する記録用紙等の様式	33
10-5-8. 記録の保存及び成績の公表の方法	34
11. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況	34
12. 当該遺伝子治療研究に関連する国内外の研究状況	34
13. 研究者の略歴及び研究業績	36

添付資料

添付資料 1.

- 1-1. 参考文献リスト
- 1-2. 主要文献の和訳
- 1-3. 文献

添付資料 2.

- 2-1. MFG/ B2 ベクターの全塩基配列
- 2-2. MFG/ B2- γ c ベクターに組み込まれている γ c cDNA の全塩基配列

添付資料 3.

同意取得の際に用いられる説明及び同意書

添付資料 4.

ex vivo で CD34 抗原陽性細胞の培養に使用される機器、試薬、ベクターに関する資料

- 4-1. CD34 抗原陽性細胞の精製に用いるシステム
- 4-2. CD34 抗原陽性細胞の培養及び遺伝子導入に用いる試薬及びベクター
 - 4-2-1. ヒト thrombopoietin (TPO)
 - 4-2-2. ヒト stem cell factor (SCF)
 - 4-2-3. ヒト Flt3-ligand (Flt3-L)
 - 4-2-4. ヒト interleukin 3 (IL-3)
 - 4-2-5. 液体培地 X-vivo 10
 - 4-2-6. ウシ胎仔血清 (FBS)
 - 4-2-7. MFG/ B2- γ c レトロウイルス
 - 4-2-8. 組み換えフィブロネクチンフラグメント

添付資料 5.

CD34 抗原陽性骨髄細胞を用いた遺伝子導入プロトコール

添付資料 6.

- 6-1. 治療前及び治療中における評価項目及び評価スケジュール
- 6-2. 遺伝子導入臨床プロトコールチェックリスト

添付資料 7.

フランス Necker 小児病院で進行中の Phase I study における臨床効果と副作用に

関するデータ.

備考 本文中、文末の（）内の番号は参考文献リスト番号を示す。

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）に対する遺伝子治療の臨床研究

2. 研究者の氏名及び担当する役割

2-1. 総括責任者氏名及び担当する役割

土屋 滋 東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科長 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。

2-2. 総括責任者以外の研究担当医師氏名及び担当する役割

副総括責任者

菅村和夫 東北大学大学院医学系研究科 生体防御学講座免疫学分野 教授
総括責任者の補佐及び研究全体の指導。

研究担当医師

飯沼一宇 東北大学医学部附属病院 小児科長 教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定。

松原洋一 東北大学医学部附属病院 遺伝科長 教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、遺伝子診断、遺伝子相談、効果判定。

久間木悟 東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科 助教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、 γ c鎖遺伝子導入、患者管理、効果判定。

峯岸正好 東北大学医学部附属病院 輸血部副部長 助教授
骨髓細胞からのCD34陽性細胞の分離、 γ c鎖遺伝子導入。

今泉益栄 東北大学大学院医学研究科 小児腫瘍学分野 助教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、患者管理、効果判定。

浅尾裕信 東北大学大学院医学系研究科 生体防御学講座免疫学分野 助教授
 γ c鎖遺伝子導入、免疫機能の評価。

大橋芳之 東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科外来医長 助手

- 患者への説明及び同意の取得、患者からの骨髓採取、患者管理。
浅田洋司 東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科 助手
- 患者への説明及び同意の取得、患者からの骨髓採取、患者管理。
阿南和昭 東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科 助手
- 患者への説明及び同意の取得、患者からの骨髓採取、患者管理。
石井直人 東北大学大学院医学系研究科 生体防御学講座免疫学分野 助手
- γ c 鎖遺伝子導入、免疫機能の評価。
佐藤篤 東北大学医学部附属病院 小児科 助手
- 患者への説明及び同意の取得、患者からの骨髓採取、患者管理。

(3) 共同研究者

- Alain Fischer バリ大学 V 教授 (Necker 小児病院)
Necker 小児病院で実際に行われた X-SCID に対する遺伝子治療
についての情報提供および γ c 鎖を含むレトロウイルスベクター
の供給。
- 小宮山淳 信州大学医学部 小児科学講座 教授
厚生労働省特定疾患血液系疾患調査研究班原発性免疫不全症候
群分科会を介しての本研究の共同研究体制の確立。

3. 実施施設の名称及びその所在地

東北大学医学部附属病院
〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

連絡先：土屋 滋
東北大学医学部附属病院 小児腫瘍科
〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1
電話: 022-717-8490
FAX: 022-717-8495

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

X-SCID は T 細胞と NK 細胞を欠損し、B 細胞の機能にも異常が存在する致死的な原発性免疫不全症であり、現在確立している唯一の有効な治療法は同種

骨髄移植である (1)。HLA 一致ドナーが家族内に存在する場合の予後は良好であるが、それ以外の場合は長期生存率が 50-70%台である。この長期生存率の低下は、移植片対宿主病 (GVHD)、T 細胞の生着遅延による感染症の危険、不完全な免疫再構築による低ガンマグロブリン値の持続、生着不全、自己免疫性溶血性貧血などの合併による (2-7)。

一方、本臨床研究の共同研究者である Alain Fischer 博士らは既にフランスで、家族内に HLA 一致ドナーの存在しない 5 症例の X-SCID 患者に対して γ c 鎖を用いた遺伝子治療を施行している (8、9)。このうち 4 症例では T 細胞の数と機能がほぼ完全に正常化し、免疫不全状態は改善してきている。これらの患者では、T 細胞、NK 細胞が治療後比較的早期に出現し、免疫グロブリン補充療法も中止できた。また、問題となるような副作用は特に認められなかった。本治療で今後の課題としてあげられるのは、NK 細胞の数が時間経過と共に減少傾向にあること、正常 γ c 鎖を発現している B 細胞の割合が 5%以下と少ないことなどである (9)。本遺伝子治療は施行されてからまだ日が浅く、長期予後に関しては未だ判断可能な時期ではない。しかし、現時点では現行の造血幹細胞移植と比較し、勝るとも劣らない効果が得られている。

本遺伝子治療臨床研究では「典型的な X-SCID 患者で家族内に HLA 一致ドナーが存在せず、かつ、過去に造血幹細胞移植の既往がない患者」を治療対象とする。今後、基礎的研究および本プロトコールによる研究成果を踏まえつつ、「家族内に HLA 一致ドナーが存在する症例」や「過去に造血幹細胞移植を受けたが治療効果が十分でなかった患者」に対する遺伝子治療の適応拡大の可能性を検討していく。

これらのことを踏まえ、本研究では以下の 2 点を研究目的とする。

- 1) X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 患者に対する γ c 鎖遺伝子を用いた遺伝子治療の有効性及び安全性を確認する。
- 2) 本邦における X-SCID 患者に対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療を定着させる。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

5-1. 対象疾患に関する現時点での知見

重症複合免疫不全症 (SCID) は、T 細胞と B 細胞の両方に機能異常が存在する原発性の免疫不全症である。患児は生後数カ月以内より感染症を繰り返し、

骨髓移植が行なわれなければ総じて乳幼児期に死亡する (10)。X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) は、末梢血とリンパ組織における T 細胞及び NK 細胞の欠如あるいは著減で特徴づけられる遺伝性疾患であり、伴性劣性の遺伝形式をとる。X-SCID は SCID の約半数を占め、約 15 万人に 1 人の割合で出生する (11)。この疾患の原因遺伝子座は Xq13.1 に存在することが知られていた (12)。一方、1992 年、本臨床研究の副総括責任者である菅村らによって IL-2 受容体 γ 鎖 (IL-2R γ) の遺伝子が、IL-2 受容体の第 3 番目のサブユニットとして単離された。IL-2R γ の遺伝子座が X-SCID の遺伝子座に連鎖することがわかり、IL-2R γ 遺伝子が X-SCID の原因遺伝子であることが判明した (13、14)。この IL-2R γ に変異のある X-SCID 患者では T 細胞数が著減しているが、そのリガンドの異常である IL-2 欠損症の患者では T 細胞が正常な構成を示すことから、IL-2R γ が IL-2 のみならず他のサイトカインの受容体の一部を形成するのではないかと推測された。実際、IL-2R γ は IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 及び IL-21 の受容体の一部として共用されていることがわかり、共通 γ 鎖 (common γ -chain, γ_c 鎖, CD132) と命名された (15、16)。現在までに X-SCID 患者 264 例において 169 種類の γ_c 鎖変異がインターネット上の IL2RBase (<http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LGT/SCID>) に登録されている。 γ_c 鎖変異は細胞内領域遠位側 44 アミノ酸以外の γ_c 鎖のほぼ全長にわたって存在し、いくつかの γ_c 鎖変異のホットスポットが見つかっている。

犬にも同様の病気が存在し、 γ_c 鎖遺伝子の変異が原因で γ_c 鎖が細胞表面に発現できず SCID を発症する (17)。マウスでも遺伝子ノックアウトの技法により γ_c 鎖を不活化すると、ヒトの X-SCID と類似した表現型をとるようになる (18-20)。

γ_c 鎖を細胞表面に発現していない細胞に γ_c 鎖遺伝子を導入すると、 γ_c 鎖を共用するサイトカインはそれぞれの受容体と高親和性に結合できるようになり、細胞増殖に必要な細胞内シグナルを伝達できるようになる (15)。さらに γ_c 鎖にリガンドが結合すると JAK3 キナーゼの活性化が起こる。JAK3 は STAT5 転写因子のリン酸化を介し、活性化シグナルを伝達する (15)。興味深いことに、JAK3 をコードする遺伝子の変異はヒトにおいて X-SCID と全く同一の表現型を呈する SCID になる (21、22)。

X-SCID における T 細胞欠損の原因は基本的には IL-7 による IL-7 受容体を介したシグナルの伝達障害と考えられている。 γ_c 鎖ノックアウトマウスと IL-7

ノックアウトマウスまたは IL-7 受容体 α 鎖ノックアウトマウスとの T 細胞発生の障害点は同一である (18-20、23、24)。おそらく胸線や骨髄間質細胞が産生する IL-7 が pre-thymic と intra-thymic の T 前駆細胞の増殖を誘導すると考えられる。この作用がなければ、T 前駆細胞の増殖が起こらず、完全な T 細胞欠損症となる。ヒトにおいても IL-7 受容体 α 鎖欠損症の患者では、B 細胞、NK 細胞は存在するが、T 細胞を欠く SCID になると報告された (25)。このことから、IL-7 が T 細胞の発生、ひいては X-SCID の発症に重要な役割を果たしていることが示された。

一方、X-SCID における NK 細胞欠損は主に IL-15 受容体の異常と密接に関連している。IL-15 は *in vitro* において造血幹細胞を NK 細胞に分化誘導する主要なサイトカインである。X-SCID 患者の骨髄細胞に γ_c 鎖遺伝子を導入後、*in vitro* において IL-15 および SCF を作用させると NK 細胞への分化誘導が起った (26)。さらに、IL-15 及び IL-15 受容体 α 鎖のノックアウトマウスでは NK 細胞が欠損していた (27、28)。これらのことから、X-SCID 患者における NK 細胞の欠損は γ_c 鎖を介した IL-15 のシグナルの欠如によるものと考えられた。

X-SCID 患者末梢血中には IgM 陽性 B 細胞が存在するが、免疫グロブリンは産生されず、B 細胞は機能的に異常である。一方、X-SCID 保因者の解析で IgM 陽性 B 細胞の X 染色体不活化が random に起こっているのに対し、IgG 陽性 B 細胞では nonrandom に起こっていることから、B 細胞の発生には γ_c 鎖を介したシグナルは必要ないが、IgM 陽性 B 細胞から IgG 陽性 B 細胞への分化に必須である可能性が示唆された (29)。

X-SCID に対する遺伝子治療を考慮する場合に重要な示唆を与えてくれる症例についての知見を書き添える。その症例は X-SCID 患者としては臨床症状が軽度であった。その原因は変異 γ_c 鎖に偶然逆突然変異が生じ、正常の γ_c 鎖を発現するようになった T 細胞前駆体から、多種多様のクローンを持つ機能的な T 細胞ができてきたことであつた。その患児の末梢血中には T 細胞が 500~1000/ μ l 存在し、報告された時点まで 2 年間のあいだ重症の感染症を起こさずにすんでいる (30)。この症例は、*in vivo* における<<自然の遺伝子治療>>とも呼ぶべき逆突然変異によって、正常の γ_c 鎖を発現した細胞が γ_c 鎖を発現していない細胞に対し選択的増殖優位性を示し、機能的免疫を獲得し、さらにそれが維持できた例として非常に重要である。

マウスの正常骨髄細胞と X-SCID 骨髄細胞を様々な割合で混合して致死量の

放射線照射 (900 rad) を行ったマウスに移植した場合、増えてきた細胞の割合がどう変化したかについて検討を行った。その結果、骨髓系細胞の数は両者で同等であったが、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞については、正常骨髓細胞から分化増殖してきた細胞の割合が X-SCID 骨髓細胞から分化増殖してきたものに比して多く、正常骨髓細胞に選択的増殖優位性が認められた (31)。

遺伝子治療の動物モデルとして、 γ_c 鎖ノックアウトマウスに対する γ_c 鎖を用いた遺伝子治療もおこなわれている。 γ_c 鎖ノックアウトマウスの骨髓細胞にヒト γ_c 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターで遺伝子導入し、前処置 (800 rad の放射線全身照射) を施した γ_c 鎖ノックアウトマウスに経静脈的に移入したところ、免疫系が再構築された (32)。また、 γ_c 鎖ノックアウトマウス付随細胞にヒト γ_c 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターで遺伝子導入し、前処置 (300 rad の放射線全身照射) を施した RAG2/ γ_c 鎖ダブルノックアウトマウスに遺伝子導入細胞を経静脈的に移入したところ、免疫系が再構築された (33)。さらに別の RAG2/ γ_c 鎖ダブルノックアウトマウスに、遺伝子治療を行ったマウスの骨髓細胞を移入しても、はじめのマウスと同様にリンパ球系細胞が再構築された (33)。このように造血前駆細胞に γ_c 鎖遺伝子を導入すると、 γ_c 鎖ノックアウトマウスの免疫異常が正常化することから、遺伝子治療は有効な手段と考えられた。また、細胞内領域を欠失した γ_c 鎖を細胞表面に発現する X-SCID のモデルマウスにおいても、遺伝子治療による免疫系の再構築が報告されており、細胞表面に変異 γ_c 鎖が発現している場合でも遺伝子治療の治療効果が認められることが示された (34)。

本臨床研究の共同研究者である Alain Fischer 博士らは、既にフランスで家族内に HLA 一致ドナーの存在しない 5 例の X-SCID 患者に対して γ_c 鎖を用いた遺伝子治療を施行している (8, 9)。このうち 4 例では免疫不全状態の改善を認めている。残る 1 例は遺伝子治療前から BCG ワクチン株感染症による脾腫を認め、遺伝子治療後も T 細胞は生着しなかった。この患者は脾摘術を施行され遺伝子治療 8 カ月後に同種骨髓移植を受けている。BCG ワクチン株感染症による脾腫と生着不全については、SCID 患者に対する血縁 T 細胞除去 HLA ハプロタイプ不一致骨髓移植後の症例でも報告があることから、生着不全が遺伝子治療と直接関係するものではないと考えられた (35)。以上のように遺伝子治療を受けた患者 5 例中 4 例で大きな副作用もなく免疫不全状態の改善が得られたことから、本遺伝子治療法が X-SCID の治療手段として有用であると考えら