

れた。

5-2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本研究では共同研究者である Alain Fischer 博士らの協力を得て、既にフランスで施行された X-SCID 患者に対する遺伝子治療と同一ベクターを用い、同じ手順に従って患児骨髄由来の CD34 陽性細胞に正常 γ c 鎖を遺伝子導入し、患児体内に戻す予定である (8)。以下にその概要を記す (添付資料 5)。

対象は家族内に HLA 一致ドナーの存在しない X-SCID 患者で過去に造血幹細胞移植を受けたことのない者。全身麻酔下で腸骨から採取した骨髓液約 100ml から、CD34 を発現している造血幹細胞をポジティブセレクションし、4 種類のサイトカイン SCF、TPO、Fl3-L、IL-3 を加え、24 時間インキュベーションすることで、あらかじめ活性化しておく。これらの細胞に γ c 鎖 cDNA を含む欠損レトロウイルス MFG/B2- γ c の上清を 3 日間連続で加える。この感染ステップは、フィブロネクチンフラグメント CH296 をコートした密封バッグ内で 4 種類のサイトカイン、SCF、TPO、Fl3-L、IL-3 存在下に行う。3 日間の感染の後、細胞を十分に洗浄してから経静脈的に患者へ戻す。

患者は正常な機能を持ったリンパ球が出現するまでの間、重篤な免疫不全状態が続くので、無菌室で過ごすことになる。遺伝子治療後、骨髓細胞及び末梢血白血球を用いて、1) 遺伝子導入した正常 γ c 鎖のインテグレーション、2) その転写産物、3) 細胞表面への蛋白発現などの有無について定期的に検査を行う。血液サンプルについても、複製能力のある組み換えウイルス出現の可能性を含め、様々な副作用を迅速に把握できるように定期検査を実施する。

遺伝子治療の効果については、X-SCID 患者で欠損している T 細胞や NK 細胞の出現とリンパ球機能の改善で評価する。さらに、ワクチン接種後の特異抗原に対する反応性についても検討する。

登録期間は 2 年間、登録患者数は 5 人の予定である。入院期間は少なくとも 3~4 カ月間と予想される。無菌室からの一般病室への転室基準は T 細胞数 500/ μ l 以上が 15 日間隔の検査で 2 回以上続くことである。

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

生後早期より X-SCID 患者は様々な種類の重症感染症 (細菌、寄生虫、真菌、ウイルス) に繰り返し罹患し、治療を施されなければ乳幼児期に死亡する。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骨髄移植の成績は、長期生存率が 90%以上と良好である。しかし、家族内に HLA 一致ドナーが存在しない場合は、非血縁 HLA 一致ドナー (通常は骨髄バンクに登録しているドナー) か血縁 HLA ハプロタイプ不一致ドナー (HLA が半分しか合致していないドナーで通常は父親か母親) から移植を受けることになる。患者は重篤感染症に罹患する危険性が高いため非血縁 HLA 一致ドナーを確保する時間的余裕がなく、血縁 HLA ハプロタイプ不一致ドナーからの移植が標準的な治療法となる。本治療法による X-SCID 患者生存率は 50~70%台であり、以下に掲げるいくつかの問題点が存在する (2-7)。

- 1) 非自己のリンパ球が移入され移植片対宿主病 (GVHD) を起こす可能性がある。
- 2) T 細胞の生着が遅延し 3~4 カ月間免疫不全の状態が持続するため、その間致死性的ウイルス感染症の危険にさらされる。
- 3) 生着後も B 細胞機能不全が続き、半数近くの患者で生涯にわたるガンマグロブリン補充療法が必要となる。
- 4) NK 細胞は生着しないことが多い。
- 5) 約 20%の症例で生着が認められず再移植が行われている。
- 6) 自己免疫性溶血性貧血が約 20%の症例に発症する。

最近非血縁者間の臍帯血移植も行われるようになったが、移植が行われるようになってからまだ日が浅いこと、さらに対象となる SCID 患者の数が少ないことなどから、まだ SCID に対する移植成績に関する統計は出ていない。なお、本邦における X-SCID 患者の骨髄移植後の成績は、HLA 一致同胞間の移植を含めても長期生存率が 55%と低値であった (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 例の X-SCID 患者に対して γc 鎖を用いた遺伝子治療を施行し、うち 4 例で T 細胞の数と機能がほぼ完全に正常化し、免疫不全状態の改善を認めている (8、9)。その結果から本遺伝子治療と上述の HLA ハプロタイプ一致骨髄移植を比較すると、本遺伝子治療の利点として次のことがあげられる (参考文献 8、9、添付資料 7)。

- 1) T 細胞が治療後 1~2 カ月めと早期に出現した。

- 2) 血清中の免疫グロブリン値は正常域となり免疫グロブリンの補充療法を中止できた。
- 3) NK 細胞の出現が認められた。
- 4) GVHD や自己免疫性溶血性貧血などの合併を認めなかった。
- 5) 遺伝子治療による副作用は特に認められなかった。

一方、以下の3点が遺伝子治療の問題点として提示された。

- 1) NK 細胞の数が時間経過と共に減少傾向にある。
- 2) B 細胞全体における γ c 鎖陽性細胞の割合は5%以下と少ない。
- 3) 1 症例で遺伝子治療後に播種性 BCG 感染症による巨大な脾腫を伴い、末梢血で γ c 鎖を発現した T 細胞が検出されなかった。

播種性 BCG 感染症による脾腫に伴う生着不全については、SCID に対する血縁 HLA ハプロタイプ不一致骨髄移植でも同様の報告があることから、遺伝子治療の副作用であるとは考えにくい(35)。このように、家族内に HLA 一致ドナーの存在しない X-SCID 患者に対する γ c 鎖を用いた遺伝子治療は現行の造血幹細胞移植と比較しても、同等以上の効果が期待でき、より安全に施行できる治療法であると考えられた。このため、我々は、本遺伝子治療臨床研究を計画した。

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

6-1. ヒトに導入する遺伝子の構造と性質

6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造

本臨床研究で導入を計画している遺伝子はヒト γ c 鎖の野生型・完全長 cDNA である。この cDNA の翻訳領域は 1,107 塩基対で構成され、開始コドンであるメチオニンからストップコドンまでの全コーディング領域を含んでおり、遺伝子配列は公表されているものと同じであることが確認されている(参考文献 13、添付資料 2-2)。Moloney murine leukemia virus (MLV) 由来で複製能を取り除いてある MFG ベクターにこの γ c 鎖 cDNA を組み込んだ組み換えレトロウイルス MFG/B2- γ c が患者の細胞に導入される(26、36-38)。

6-1-2. ヒトに導入する遺伝子の性質

ヒト γ c 鎖 cDNA は MLV 由来である組み換えレトロウイルス MFG/B2- γ c に

よって標的細胞内に導入された後、MFG/B2- γc の long terminal repeat (LTR) 内のプロモーターによって mRNA に転写され、 γc 鎖遺伝子の開始コドン ATG よりヒト γc 鎖が翻訳される。

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

ヒト γc 鎖は 22 アミノ酸のシグナル配列を含む 369 アミノ酸から成り、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域がそれぞれ 232、29、86 のアミノ酸から構成される (13)。また γc 鎖は IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 及び IL-21 の高親和性受容体の一部を形成するサイトカイン受容体複合体のサブユニットである (15、16)。細胞表面に発現した γc 鎖は、他の受容体サブユニットと共にサイトカインに対し生理的な高親和性受容体を形成することにより、細胞増殖または特定のステージにおける細胞分化に必要なシグナルを伝達できるようになる。 γc 鎖は造血系細胞にのみ発現し、造血系由来の有核細胞全てに分化の初期段階から発現している。

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

本臨床研究の標的細胞は X-SCID 患者で欠損している T 細胞と NK 細胞、及び機能的に異常な B 細胞などのリンパ球に分化できる能力を有する造血系の前駆細胞である (39)。ヒトの造血幹細胞は、CD34 抗原を細胞表面に発現している細胞集団に含まれており、この CD34 陽性細胞から好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球、赤血球、巨核球等のすべての血球系細胞が分化してくることは既に証明されている。実際、CD34 陽性細胞に純化した造血幹細胞移植の臨床研究は世界中で広く行われており、CD34 陽性細胞の移植によって患者のリンパ球系を含めた造血系細胞全体が再構築されることが示されている。このように CD34 陽性細胞の中に存在する造血幹細胞は、末梢血細胞を構成する全ての細胞への分化増殖能と自己複製能を有すると考えられている。CD34 陽性細胞を標的として遺伝子導入を行えば、造血幹細胞のゲノム中に導入した遺伝子が組み込まれることになり、造血幹細胞から供給される末梢血細胞中に導入遺伝子が持続的に発現することになる (39)。これらのことから本臨床研究では骨髄由来の CD34 陽性細胞を標的とした。

歴史的には、M. Blaese や Coll らがアデノシンデアミネース欠損症の 2 女兒

例に末梢血 T 細胞を標的とする遺伝子治療を行い成功しているが、典型的な X-SCID 患者では末梢血中に T 細胞が存在しないためこの方法は不可能である (40)。それゆえ X-SCID 患者においては上記造血幹細胞を標的とする遺伝子導入法が唯一可能な方法である。自己造血幹細胞を得るには二通りの方法がある。一つは骨髓液の採取であり、もう一つは *in vivo* で G-CSF 投与により末梢血中に造血幹細胞を誘導し採取する方法である。ADA 欠損症や慢性肉芽腫症に対する末梢血幹細胞移植の経験から、先天性免疫不全症においては末梢血幹細胞の動員はうまく行かないことが示されている (41)。以上のことを総合的に考え、我々は骨髓細胞を用いて遺伝子治療を行うことにした。

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

本臨床研究の目的は γ_c 鎖遺伝子を造血幹細胞に導入し、機能を回復させることにある。遺伝子導入に用いるレトロウイルスベクターは γ_c 鎖 cDNA を組み込んだモロニーウイルス由来のレトロウイルスベクターで、ウイルス構造蛋白をコードする遺伝子を欠損させてあり、 γ_c 鎖 cDNA の発現はウイルス LTR でコントロールされている。患者から採取した骨髓細胞から CD34 陽性細胞を選択的に分離し、サイトカインによる前刺激を加えた後、レトロウイルスベクターを含むウイルス産生細胞の培養上清を用いて 3 日間連続、計 3 サイクルの感染を行う。遺伝子導入された自家 CD34 陽性細胞は十分に洗浄した後、経静脈的に患者に再び戻される。

本臨床研究の目的は免疫機構の欠損を補正することにある。この目的のためには造血前駆細胞中に γ_c 鎖遺伝子が存続し、様々なリンパ球ポピュレーションが産生され続けなければならない。言い換えれば、導入した遺伝子が宿主細胞遺伝子中に取り込まれ、細胞分裂を起こしてもそのまま存続することが必要である。現在この目的にかなうウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクターとアデノ関連ウイルス (AAV) ベクターの 2 種類が挙げられる。現時点ではレトロウイルスベクターの方が AAV ベクターよりも複製効率が良いこと、さらにフランス Necker 小児病院における X-SCID の遺伝子治療プロトコールとしてフランス食品医薬品局庁にて既に承認され、その有用性も確かめられていることから、本臨床研究ではレトロウイルスベクターを選択した (8)。

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

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

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; Mo-MLV) に感染したマウス細胞のゲノム DNA から得られたプロウイルスで構成される。野生型 Mo-MLV は年齢及び系統に関係なくマウスに感染し、発癌遺伝子は持たないが、ウイルスに長期間感染したマウスからリンパ性白血病が発症することが報告されている。人に感染することはない (42)。

Mo-MLV のゲノムは 5'LTR-パッケージ (Ψ) シグナル-gag-pol-env-3'LTR より構成されている。ウイルス LTR にはエンハンサー・プロモーター活性があり、ウイルスゲノムは 5'LTR により転写、翻訳される。gag はウイルスのコア構造タンパク質をコードする遺伝子で、pol は逆転写酵素並びにインテグラーゼをコードし、env はウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子である。 Ψ シグナルによりウイルスゲノム RNA が構造タンパク質により構成される正二十面体複合体のキャプシド (コア) に取り込まれることで、ウイルス粒子が形成される。

レトロウイルスの生活環は、ウイルス粒子の膜表面 (エンベロープ) に存在する糖蛋白質に対する受容体に結合することにより始まる。ウイルス粒子の受容体を介した細胞膜表面への結合後、エンベロープと細胞膜の融合によって、キャプシドが細胞質内へと取り込まれる。その後、キャプシドが破壊され、自らの逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA を DNA (プロウイルス) へと変換する。このプロウイルスが核へと移行し、ウイルスが持っているインテグラーゼによって宿主の染色体へと組み込まれる。染色体に組み込まれたウイルスはあたかも宿主の遺伝子のように振る舞い、宿主の転写、翻訳機構を用いてウイルスゲノムを転写する。ウイルスゲノムの一部は gag、pol、env を転写するメッセンジャーRNA として働き、ウイルスの構造タンパク質を産生する。このようにして新たに産生されたウイルス粒子は細胞外へと発芽機構によって放出され、周囲の細胞に感染していく。

6-4-2. ウイルスベクター (組み換えウイルス MFG/B2- γ c) の作成方法 (図1)

MFG レトロウイルスベクターは Mo-MLV に感染したマウス細胞のゲノム DNA から分離したプロウイルス配列から作製された。ウイルスの構造タンパク

質をコードしている gag、pol、env 遺伝子は除いてある。組み換えウイルスゲノムの転写産物の生産と成熟、逆転写、感染細胞ゲノムへのウイルス遺伝子の組み込みに必須なウイルス遺伝子の cis エlementは保持されている (38)。

γ c 鎖の cDNA はレトロウイルスベクター-MFG の NcoI site (メチオニンをコードする ATG に一致する) と BamHI site に組み込まれ、転写はレトロウイルス LTR により調節されている。MFG/B2 ベクターは以下の 2 種類の異なるベクターから構成されている。1) B2 変異 (ベクターの 1005 番目の核酸が A から G への変異) と 5'側 LTR を含む MFG/B2-ADA (Mo-LTR) ベクターの NcoI-HindIII-NdeI 断片と 2) MFG - GC (Mo - LTR) ベクターの BamHI-EcoRI-NdeI 断片。上記 MFG/B2 ベクターの NcoI/BamHI site に γ c 鎖 cDNA の 1.13 kb の断片 (AFLIII-BamHI) を組み込むことにより MFG/B2- γ c ウイルスベクターを作製した。

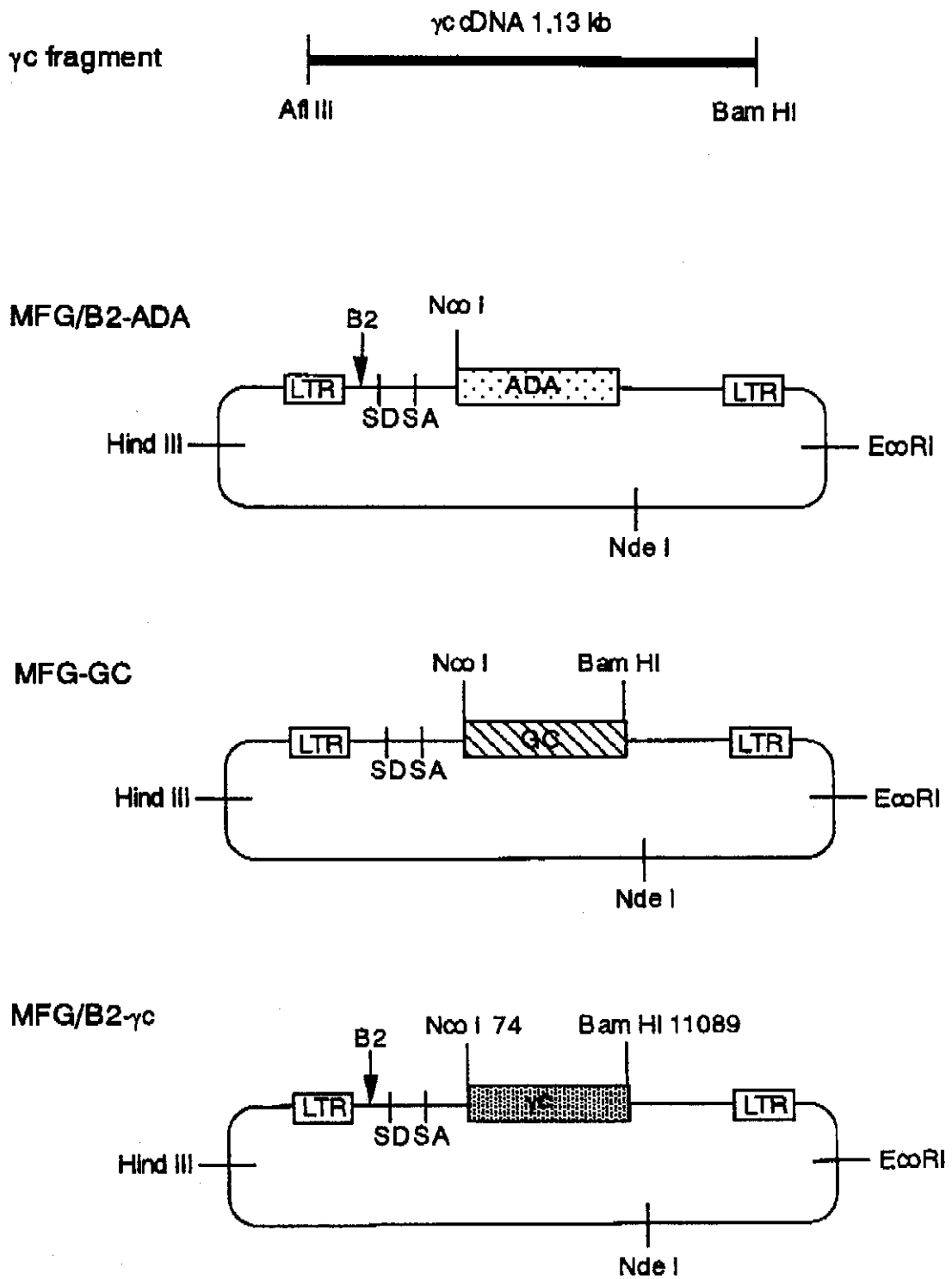


図 1. ウイルスベクターの構造

6-4-3. ウイルスベクターの構造

MFG/B2 ベクターの全塩基配列（添付資料 2-1）の構成を以下に記す。

-1~398 マウスゲノムの塩基配列。

-399~2274 5'LTR、1005 番目の塩基の B2 変異 (G→A)、gag 遺伝子の一部を含む Ψ と Ψ +パッケージング配列を持つ Mo-MLV 塩基配列。

2275 番目と 2285 番目の塩基はそれぞれ NcoI と BamHI に特異的な site であり、目的遺伝子の挿入部位。挿入遺伝子の発現はウイルス LTR で制御される。

-2286~3021 3'LTR を含む Mo-MLV の塩基配列。

-3022~3714 マウスのゲノム配列。

-3715~8042 β -ラクタマーゼの遺伝子を含むプラスミド pBR322 (4363~29) の塩基配列。5775 番目と 7702 番目の NdeI と BamHI site はつぶしてある。

このようにして作成された MFG/B2- γ c ベクターは Généthon 社 (Evry, France) により全塩基配列が確認されている。その結果は添付資料 2-1 と 2-2 に記載した。

6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

MFG/B2- γ c ベクターはウイルス粒子形成に必須のタンパク質をコードする gag、pol、env 遺伝子を欠いているため、ベクターのみではウイルス粒子を産生することはできない。代わりに、導入する γ c 鎖 cDNA を組み込んである。組み換えウイルスゲノムからの転写産物の生成と成熟、ウイルス粒子へのパッケージング、逆転写、感染細胞のゲノムへのインテグレーションに必要な cis レトロウイルスの塩基配列は保持されている。ウイルス粒子産生のためにはパッケージング細胞株が必要となる。本臨床研究で使用するパッケージング細胞株はマウス NIH3T3 由来の細胞で、ヒト細胞に感染性を有するウイルスを産生するアンフォトロピックパッケージング細胞株 Ψ CRIP である。

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

7-1. 培養細胞を用いた研究の成果

7-1-1. X-SCID 患者の B 細胞への γ c 鎖遺伝子導入

細胞表面上に γ c 鎖を発現していない X-SCID 患者から樹立した、Epstein-Barr ウイルスでトランスフォームした B 細胞株 (B-LCL) に、レトロウイルスベク

ターMFG/B2- γ c を用いて γ c 鎖遺伝子導入を行ったところ、 γ c 鎖発現は一年以上経っても安定で、 γ c 鎖を発現する B 細胞の割合は培養している間に増加していった (36)。

IL-2 受容体 (IL-2R) は IL-2R α 鎖、 β 鎖及び γ c 鎖の 3 種類のサブユニットからなり、低親和性受容体 ($K_d=10^{-9}$ M) は IL-2R α 鎖から、中間親和性受容体 ($K_d=10^{-9}$ M) は IL-2R β 鎖および γ c 鎖または IL-2R α 鎖および β 鎖から、高親和性受容体 ($K_d=10^{-11}$ M) は IL-2R α 鎖、 β 鎖及び γ c 鎖の 3 種類すべてのサブユニットから構成される (13)。 β 鎖と γ c 鎖はリンパ球の細胞表面に常に発現しており、活性化時一過性に α 鎖の発現が誘導され、高親和性受容体が形成されるよう巧妙に制御されている。MFG/B2- γ c レトロウイルスによる遺伝子導入後のサイトカインに対する親和性と受容体数は、正常コントロールの B-LCL と同等であった (36)。

IL-2 とその高親和性受容体が結合すると、リガンド/受容体複合体の速いインターナライゼーション ($t_{2/1}=15$ min) がみられるが、遺伝子導入した細胞でもコントロール細胞株と同様のインターナライズパターンを示した。 γ c 鎖は IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 及び IL-21 のシグナル伝達において、受容体の一部として中心的な役割を果たしている。 γ c 鎖は固有のキナーゼ活性を持たず、リガンドからのシグナル伝達はリン酸化反応を担う細胞内キナーゼを介して行う。具体的には、 γ c 鎖は JAK3 チロシンキナーゼと直接会合し細胞内へシグナルを伝達する。JAK3 キナーゼが一度活性化されると、STAT ファミリー分子と呼ばれるタンパク質を介して一群の遺伝子の転写活性が促進される (15)。STAT ファミリー分子はリン酸化を受けた後、ホモあるいはヘテロ 2 分子複合体を形成して核内に移行する。核において STAT ファミリー分子は複数の遺伝子のプロモーターに存在する特異的塩基配列と結合し作用を発揮する (15)。血清非存在下において、 γ c 鎖遺伝子を導入した細胞でのみ IL-2 刺激による JAK3 のチロシンリン酸化が検出された。このことから遺伝子導入した γ c 鎖が機能的であることが証明された (36)。

γ c 鎖遺伝子が導入された B-LCL を 15 日間培養した後、単離した DNA を用いたサザンブロット解析で、MFG/B2- γ c プロウイルスのインテグレーションが証明された。同様にこの細胞の RNA を用いたノーザンブロット解析で、レトロウイルス特異的 RNA が検出された。

結論としては MFG/B2- γ c ウイルスベクターを用いた遺伝子導入により B-

LCL 中の γc 鎖発現細胞の割合が増え続け、6ヶ月後には 100%に達したことから、 γc 鎖を発現した B リンパ球は試験管内で増殖優位性を獲得したといえる。遺伝子導入した γc 鎖の発現は培養中安定で、発現量もコントロールの B リンパ球と同等であった。また、IL-2 に高親和性で結合する受容体数が正常細胞と同じ程度となり、リガンド/受容体複合体のインターナリゼーション及び JAK3 チロシンキナーゼのリン酸化能も回復した。以上より本臨床研究で使用するレトロウイルスベクター-MFG/B2- γc で遺伝子導入した γc 鎖は機能的であることが示された。変異 γc 鎖を細胞表面に発現している B-LCL にこのレトロウイルスベクターを用いて正常 γc 鎖を遺伝子導入した場合でも、異常 γc 鎖によるドミナントネガティブな効果は観察されなかった (36)。

7-1-2. X-SCID 患者の骨髓細胞への γc 鎖遺伝子の導入

骨髓単核球細胞を IL-3、IL-6、SCF を含む培地で 48 時間活性化した後、パッケージングライン Ψ CRIP-MFG-96 B2 γc と共に 3 日間ポリブレンを含む培地で培養した。サイトカイン (SCF、IL-2、IL-7 または SCF と IL-15) 存在下で 3 週間培養した後でも、60%の細胞が細胞表面に γc 鎖を発現していた (17)。

7-1-3. NK 細胞への分化能に関する研究

X-SCID 患者の骨髓細胞を 30Gy 照射後のパッケージングライン (Ψ CRIP-MFG-96 B2 γc) と共培養した後、SCF、IL-2 と IL-7 または SCF と IL-15 を含んだ培地で 3~6 週間培養した。 γc 鎖遺伝子導入前の骨髓細胞は NK 細胞や T 細胞特異抗原 (CD16、CD56、CD3) を細胞表面に発現していなかったが、 γc 鎖遺伝子導入後、かなりの割合で骨髓細胞が NK 細胞特異抗原 (CD7、CD2、CD16、CD56) を発現するようになった。培養開始から 2 週間後、15%の造血細胞が CD16、CD56 を発現するようになった。SCF 及び IL-15 の存在下では、6 週間後にその割合は 40%に達した。

In vitro で得られた NK 細胞は、 ^{51}Cr で標識した K562 ターゲット細胞、または抗体で覆った P815 ターゲット細胞に対し細胞傷害作用を持ち、その細胞傷害活性は臍帯血由来のコントロール CD34 陽性細胞から *in vitro* で分化させた NK 細胞と同等であった (26)。

7-1-4. T 細胞への分化能に関する研究

マウス胎仔の胸腺を胎生 14 日目に取り出し、2'-deoxyguanosine を用いて内因性のリンパ球を除去する。この胸腺と、臍帯血由来の CD34 陽性細胞、または γc 鎖遺伝子導入を行った 2 人の X-SCID 患者の骨髄細胞を、SCF、Flt3-L、IL-7、IL-1 α 、IL-15 存在下で共培養し比較検討した。この培養系では 5 週間後に骨髄細胞数が約 6 倍になり、CD4+CD8+ダブルポジティブ細胞及び CD4+TCR $\alpha\beta$ +シングルポジティブ細胞が、臍帯血由来の CD34 陽性細胞及び γc 鎖遺伝子導入後の X-SCID 患者の骨髄細胞で確認された。さらに、これらの細胞では TCR がポリクローナルに再構成を起こしていた。このことから、X-SCID 患者の γc /JAK/STAT シグナル系が回復すると、胸腺細胞発生の初期段階で起こっていた T 細胞の分化障害も正常化されることが示された (37)。

7-2. 実験動物を用いた X-SCID に対する遺伝子治療研究の成果

7-2-1. 正常骨髄細胞と共通 γc 鎖欠損骨髄細胞との *in vivo* における競合についての研究

マウスの骨髄移植の実験系を利用して、正常骨髄細胞と X-SCID 患者由来の骨髄細胞との間でどのように競合が起こるかについて研究を行った。ここで用いた X-SCID モデルマウスは東北大学医学部免疫学教室で作成された、細胞内領域を欠失した γc 鎖を細胞表面に発現するマウスである。キメリズム解析を容易にするため、enhanced green fluorescent protein (EGFP)発現レトロウイルスベクターを用い、C57BL/6 雄の正常骨髄細胞を遺伝子マーキングした。正常骨髄細胞、X-SCID 骨髄細胞及び遺伝子マーキングをした正常骨髄細胞を様々な割合で混合し、致死量照射 (900 rad) した 8 週令の C57BL/6 雌に経静脈的に投与した。その結果、骨髄系細胞の生着については X-SCID 骨髄細胞と正常細胞とが用量依存性に競合したが、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞については正常骨髄細胞が選択的に分化増殖した。このことから、リンパ球系細胞の分化増殖に関しては、正常骨髄細胞が X-SCID 患者由来の骨髄細胞に対して選択的優位性があると言える (32)。

7-2-2. γc 鎖ノックアウトマウスに対するヒト γc 鎖を用いた遺伝子治療

Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV)-LTR を持つ pMMP ベクターにヒトの γc 鎖 cDNA を組み込み、Phoenix パッケージング細胞株に遺伝子導入すること

により、レトロウイルスベクター産生細胞を作製した。5-fluorouracil を投与した γc 鎖ノックアウトマウスの骨髓を採取し、IL-3、IL-6、SCF で 48 時間前刺激した後、ウイルスベクター産生細胞とポリブレイン存在下で 48 時間共培養した。その骨髓細胞をファイブロネクチンフラグメント CH296 でコートしてあるプレートに移し、ウイルスを含む培地中で 24 時間感染を行った。その後 24 時間新鮮な培地で培養し、致死量 (800rads) の照射を受けた γc 鎖ノックアウトマウスに経静脈的に移入した。その結果、6~10 週間には T 細胞、B 細胞、NK 細胞及び腸管上皮リンパ細胞 (IEL) の数が増え、CD4:CD8 比が正常化し、免疫グロブリン値も正常値となった。さらに、IL-2 に対する増殖反応性も獲得した。これらの結果から、遺伝子治療は有効であると考えられた (32)。

7-2-3. RAG2/ γc 鎖ダブルノックアウトマウスに対するマウス γc 鎖を用いた遺伝子治療

Moloney murine leukemia virus (MoMLV)-LTR を持つ pMX ベクターにマウス γc 鎖 cDNA を組み込み、BOSC23 パッケージ細胞株に遺伝子導入することでレトロウイルスベクター産生細胞を作製した。5-fluorouracil を投与した γc 鎖ノックアウトマウスの骨髓を採取し、SCF、IL-6、Flt3-L 存在下にファイブロネクチンでコートしてあるプレート中でポリブレインを加え、ウイルス上清を用い 3 日間連日感染を行った。非付着性の骨髓細胞を 0.3 Gy 照射した RAG2/ γc 鎖ダブルノックアウトマウスに尾静脈から移入した。末梢血中のリンパ球は移植後 4 週間頃から出現し、8 週間には安定した。移植したマウスに存在する成熟リンパ球には導入した γc 鎖遺伝子がインテグレートされているのが確認され、 γc 鎖蛋白が発現し、 γc 鎖依存性のサイトカインに正常に反応できるようになった。これらのマウスでは免疫グロブリン値が正常化し抗原特異的 T 細胞依存性の抗体反応が起こるようになり、腸管上皮リンパ細胞 (IEL) が出現した。さらに、 γc 鎖遺伝子導入細胞を移植してから約 1 年間後にも末梢血中の B 細胞、T 細胞は正常の割合で存在した。移植後 8-12 週の時点で、別の RAG2/ γc 鎖ダブルノックアウトマウスに移入した γc 鎖遺伝子導入骨髓細胞は、生着し、遺伝子治療をした初代のマウスと同様にリンパ球系の再構築が可能であった。 γc 鎖ノックアウトマウスの造血前駆細胞に正常 γc 鎖遺伝子を導入すると、免疫異常が正常化することから、遺伝子治療は X-SCID に対する治療法として有用であることが示唆された (33)。

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

MoMLV-LTRを持つMNDベクターにマウス γ c鎖cDNAを組み込み、GP+E-86パッケージング細胞株に遺伝子導入することでレトロウイルスベクター産生細胞を作製した。5-fluorouracilを投与した細胞内領域欠失 γ c鎖を発現する免疫不全マウスの骨髄を採取し、IL-3、IL-6、SCF存在下で48時間前刺激した後、ウイルスベクター産生細胞と48時間共培養した。非付着性の骨髄細胞を、致死量(9 Gy)の照射を受けた細胞内領域欠失 γ c鎖発現免疫不全マウスに経静脈的に移入した。末梢血中のリンパ球は移植後8週間には回復し、リンパ球組織も遺伝子導入した細胞で再構築され、*in vivo*での正常 γ c鎖発現細胞の増殖優位性が示された。これらの結果から、細胞表面上に細胞内領域を欠失した γ c鎖を発現するX-SCIDのモデルマウスではドミナントネガティブ効果は認められず、変異 γ c鎖を発現するX-SCID患者に対する遺伝子治療も可能であると考えられた(34)。

8. 安全性についての評価

8-1. 遺伝子導入方法の安全性

8-1-1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの安全性

レトロウイルスベクターMFG/B2- γ cを産生するパッケージング細胞株MFG-96B2 γ cは共同研究者のAlain Fischer博士の研究所で樹立された。MFG-96B2 γ cのmaster cell bank(MCB)はフランスParisのINSERM U429にあり、同じ継代数の36アンプルが液体窒素に保存されている。さらにワーキングセルバンクとして100アンプルが保存されている。今回の遺伝子治療臨床研究に使用されるレトロウイルスベクターMFG/B2- γ cを含むウイルス上清は、現在フランスのGenopietics社がクリニカルグレードベクターとして管理している。

レトロウイルスベクターの調製に使用するMFG-96B2 γ cのマスターセルバンクに対して、以下の品質管理試験が施行され、各項目における安全性が確認されている。

MFG-96B2 γ cマスターセルバンクの品質管理試験

- 1) 各アンプルを解凍する際に、細胞の生存率が70%以上であることを確認し、細胞数を数える。