

- 2) 細菌・真菌否定試験
- 3) マイコプラズマ否定試験

#### 最終産物の品質管理試験

- 1) 細胞と上清の RCR (Replication Competent Retrovirus) テスト
- 2) ヒト MRC-5 細胞及びサル VERO 細胞との共培養による細胞溶解性及び赤血球吸着性ウイルス存在否定試験
- 3) ウイルス存在否定 *in vivo* 試験
- 4) MAP 試験 (Mouse Antibody Producing Test)
- 5) アイソザイムによる細胞確認試験

#### 遺伝子発現、導入率

解凍後のウイルス上清を用いた 3T3 細胞の形質導入能を、免疫蛍光法 ( $\gamma c$  鎖の細胞膜への発現) とサザンブロット法で評価する。

MFG/B2- $\gamma c$  の最終製品は、凍結した状態で日本に空輸され、本臨床研究実施責任者の所属機関である東北大学加齢医学研究所・発達病態分野にて受け入れ試験を行う。具体的には、変性の有無を確認する外観試験、無菌テスト、MFG/B2- $\gamma c$  の生物学的活性を確かめるための 3T3 細胞への形質導入能試験を行う。

#### 8-1-2. 増殖性ウイルス出現の可能性

使用したレトロウイルス MFG/B2- $\gamma c$  は構造タンパク質をコードしている遺伝子を欠損しているため複製能を持たない。実際臨床研究に用いる MFG/B2- $\gamma c$  レトロウイルスは Texcell 社において施行される RCR 否定試験 (Mus dunni 細胞を用い、レトロウイルスを増幅後に行う  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子伝達能試験) に合格した後、日本に空輸される。実際、フランスで本臨床研究と同じクリニカルロットのウイルス上清を用いて遺伝子治療が行われた患者では、複製能力のあるウイルス粒子は今のところ出現していない。さらに、レトロウイルスを用いた遺伝子治療において、現在までにレトロウイルス導入細胞が個体に戻された後に増殖性レトロウイルスが発生したという報告はない。よって本臨床研究において増殖性ウイルスが患者の体内に出現する可能性は希有であろう

と思われる。

### 8-1-3. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性

一般にレトロウイルス遺伝子は標的細胞の染色体にランダムに組み込まれる。もしレトロウイルスが細胞の生存に必須な部位に組み込まれた場合には、その細胞が死に至ることもある。しかしながらその可能性はわずかであり、レトロウイルスが導入された細胞のほとんどは正常に機能すると考えられる。

### 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

プロウイルスは、遺伝子治療が行われた患者の造血細胞由来の細胞ゲノムに組み込まれて保持される。*ex vivo* で行われる遺伝子導入は造血細胞由来の細胞に限られ、組み込まれたウイルスは増殖能を持たない。ゆえに造血細胞由来の細胞以外にウイルス粒子が拡がるという事態は考えにくい。

### 8-1-5. 患者以外のヒトに遺伝子が導入される可能性

MFG/B2- $\gamma$ c レトロウイルスを用いた患者細胞への遺伝子導入は、東北大学加齢医学研究所 2 階にあるクラス 10,000 の清浄度を持つクリーンルームにおいて施行される。このクリーンルームは本臨床研究のみに使用される部屋であり、レトロウイルス導入に携わる研究者以外は入室できない。従ってその他の人がレトロウイルスに接触する可能性はない。また、遺伝子導入細胞を患者に戻す前に培養上清中に存在する MFG/B2- $\gamma$ c レトロウイルスを除くため 3 回洗浄を繰り返すので、最初に遺伝子導入に用いた MFG/B2- $\gamma$ c レトロウイルスが臨床の場に持ち込まれる可能性は極めて低い。また、これまでのところ治療を受けた患者から増殖性ウイルスは検出されていないことから、二次的にウイルスが拡がる可能性もほとんどないといえる。同様に患者との接触で組み換えウイルスがほかの人（特に看護をしている人）に感染するということも考えにくい。

### 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癌原性の有無

レトロウイルス遺伝子は標的細胞の染色体にランダムに取り込まれる。本研究は標的細胞の染色体に  $\gamma$ c 鎖遺伝子が組み込まれることを目的としており、そのこと自体は問題とならない。問題となるのは、レトロウイルスベクターが

組み込まれた近傍に細胞にとって重要な遺伝子や癌原性遺伝子が存在する場合である。レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖に関わる遺伝子に障害を及ぼした場合、感染細胞は死に到り、患者本人には影響を及ぼさない。一方、レトロウイルスの組み込み部位近傍に癌原性遺伝子が存在し、遺伝子挿入によりその癌原性遺伝子の発現が誘導された場合に細胞癌化の可能性が出てくる。最近、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入したマウスが白血病を発症したとする報告があり、導入する遺伝子によっては腫瘍化の危険性があることが示された (44)。しかし、現在までヒトに対して行われた 2000 例近くの遺伝子治療では、遺伝子導入細胞の癌化の報告はみられず、その他の数多くの動物実験の結果からもその可能性は低いものと推定されている。

## 8-2. 遺伝子産物の安全性

本臨床研究において導入される  $\gamma c$  鎖遺伝子から産生される  $\gamma c$  鎖蛋白は、本来正常のヒト造血細胞に発現しているものと同じで、生理的な蛋白質である (13)。さらに遺伝子治療対象患者は重症の免疫不全状態にあり、抗体を産生できない (1)。また、CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子を導入するので、T 細胞は前駆細胞の段階から  $\gamma c$  鎖蛋白を発現する。そのため遺伝子導入後新しく胸腺内で分化する T 細胞は、この蛋白質に寛容となる。以上のことから新たに遺伝子導入された  $\gamma c$  鎖蛋白によって免疫反応は起こらないと考えられる。

$\gamma c$  鎖は既知の癌遺伝子と類似の遺伝子配列を持たず、 $\gamma c$  鎖遺伝子の変異による癌原性は知られていない。既知のすべての自然変異あるいは導入変異は機能の欠損である。

$\gamma c$  鎖の発現は造血細胞に限られ、細胞周期に入っている CD34 陽性細胞でも発現がみられ、リンパ球系、骨髄球系、巨核球系、赤芽球系細胞（成熟赤血球を除く）のすべての分化段階を通して広く発現している (13、15)。 $\gamma c$  鎖は 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が、 $\gamma c$  鎖単独ではどのサイトカインとも結合できない (15)。このため機能的な  $\gamma c$  鎖の発現は IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 及び IL-21 の各サイトカイン特異的受容体の発現量と関連し、結果として  $\gamma c$  鎖以外のサイトカイン受容体サブユニットの量で調節されることになる (15)。さらに、本臨床研究に用いるのと同じベクターを用いた  $\gamma c$  鎖欠損リンパ芽球及び造血前駆細胞への  $\gamma c$  鎖遺伝子導入実験では、遺伝子導入後、 $\gamma c$  鎖の細胞膜上の発現は生理的なレベル

となった (8, 36)。このことから、本臨床研究に用いるベクターによる $\gamma c$ 鎖の過剰発現はないと考えられる。たとえ過剰に発現しても、上述のように機能的 $\gamma c$ 鎖の数は他のサイトカイン特異的受容体サブユニットの数で調節されることになるので、生物学的意義を持たない。

### 8-3. 細胞の安全性

#### 8-3-1. 培養細胞の純度

遺伝子導入される細胞は、患者の骨髄細胞より純化された CD34 陽性細胞である。この細胞の中に CD34 陰性骨髄細胞が混入していても問題とはならない。

#### 8-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

導入された遺伝子はプロウイルスの形で 1 つの細胞につき 1 コピー、細胞ゲノムにランダムにインテグレーションする。ベクターを産生する MFG-96B2 $\gamma c$  クローンのプロウイルスは 2 年間のあいだ変異が見られず、安定であった。 $\gamma c$ 鎖を欠損している患者から樹立した EBV トランスフォーム B 細胞株は $\gamma c$ 鎖遺伝子導入後、1 年以上にわたり安定して $\gamma c$ 鎖を発現していた (36)。造血前駆細胞は *in vitro* での LTC-IC 細胞培養条件下で、6~8 週間生存するが、 $\gamma c$ 鎖遺伝子導入後もこの細胞の寿命に変化はみられなかった (37)。 $\gamma c$ 鎖を欠損している細胞で遺伝子導入後観察された表現型の変化は、 $\gamma c$ 鎖の細胞表面への発現と $\gamma c$ 鎖に結合するサイトカインに対する反応性の変化のみであった (36, 37)。 $\gamma c$ 鎖を用いて実際に行われた遺伝子治療でも、T 細胞表面の $\gamma c$ 鎖発現は 2 年以上にわたり維持され、PHA 等のマイトोजェンに対する反応性も回復した状態が続き、表現型も安定していた (8)。

#### 8-3-3. 被験者に投与する細胞・試薬類の純度及び安全性 (添付資料 4)

投与する細胞は、レトロウイルス MFG/B2- $\gamma c$  を感染させた自己骨髄細胞由来の CD34 陽性細胞である。この細胞に遺伝子導入後新たに発現する蛋白は $\gamma c$ 鎖のみである。遺伝子治療の対象は $\gamma c$ 鎖を先天性に欠損している患者であるため、初めから重篤な免疫不全状態にあり抗体産生能はなく、さらに $\gamma c$ 鎖遺伝子導入後、この蛋白を発現する T 細胞は胸腺で分化するので、 $\gamma c$ 鎖は患者自身の蛋白であると認識される (1, 8)。このため $\gamma c$ 鎖遺伝子を導入し発現させても免疫学的反応を起こさないと考えられる。遺伝子導入に使用するレトロ

ウイルス MFG/B2- $\gamma$ c については、8-1-1 に記した安全性に関する項目全ての検査を行い、その安全性が確認されたものを使用する。培養に用いるウシ胎仔血清 (FBS、Stem Cell 社製) は、フランスで実際に遺伝子治療に用いられたものと同じのバッチを用いる。この FBS は狂牛病発症の報告が無い米国产のウシから採取されたもので、その生産者である Stem Cell 社により細菌、マイコプラズマ、真菌、エンドトキシン、ウイルスなどの安全検査が済んでおり、さらに INSERM U429 において遺伝子治療臨床研究のための安全検査を行っている。CD34 陽性細胞の培養に使用するサイトカイン類は遺伝子組み換えによって生産されたものである。臨床研究には GMP 条件下で生産されたものを用いる。これら FBS、サイトカインを含む *ex vivo* での遺伝子導入に使用される培養液や試薬については、細胞を患者に戻す前に十分に洗浄されるため、患者に実際に投与される量はきわめて少なく、その直接作用による問題は極めて少ないと考えられる。また、細胞の培養と遺伝子導入はクラス 10,000 のクリーンルームで行われるため、細菌、マイコプラズマ、真菌などが混入する可能性は低いと考えられる。しかしながらその可能性は完全には否定できないので、遺伝子導入後の細胞浮遊液について細菌、マイコプラズマ、真菌、エンドトキシンなどの検査を行って安全性を確認する。

## 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

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

東北大学医学部附属病院小児病棟では原発性免疫不全症患者を含め、年間約 10~15 例の同種造血幹細胞移植を施行しており、無菌的治療管理法について習熟している。また、そのための治療管理ユニットとして確立している。

X-SCID の発症頻度は約 15 万人に 1 人とまれな疾患であるが、本臨床研究の実施責任者の所属施設である東北大学加齢医学研究所・発達病態研究分野は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において、X-SCID の中心的診断施設として機能し、年間 5~6 例の X-SCID 患者の  $\gamma$ c 鎖の遺伝子変異を同定している (43)。本臨床研究の実施にあたり、同研究班原発性免疫不全症候群分科会会長で、本研究の共同研究者でもある小宮山淳教授を介し同分科会の協力を得て、東北大学医学部附属病院小児病棟を本臨床研究の中心施設とする予定である。

本臨床研究の共同研究者である Alain Fischer 博士らは、既にフランスの Necker

小児病院にて HLA 一致同胞の存在しない 5 例の X-SCID 患者に対して、本臨床研究と同じレトロウイルスベクターを用いた方法で遺伝子治療を施行している。結果は 5 例中 4 例で免疫不全状態の改善を認めている (9)。そのうち、最初に報告された 2 例では、2 年以上にわたり T 細胞および NK 細胞に  $\gamma c$  鎖が発現し、それらの機能が維持され、さらに B 細胞の一部にも正常  $\gamma c$  鎖が発現し、免疫グロブリンの補充なしで普通の生活を送ることができている (9)。

本臨床研究で使用されるベクターは、フランスの Génopoletic 社から供与される。副総括責任者である菅村和夫と研究医師の久間木悟は 2000 年 8 月、Necker 小児病院を訪問し、Alain Fischer 博士と本研究について詳細な打ち合わせを行った。さらに、久間木悟は文部省在外研究員として 2001 年 4 月から 5 月にかけて同病院に 1 か月間半滞在し、実際に行なわれている X-SCID 患者の遺伝子治療を体験し、その具体的な手順を習得した。

X-SCID の基礎的研究においても、副総括責任者である東北大学医学部細菌学教室（現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）菅村和夫教授のグループが、1992 年に X-SCID の責任遺伝子である  $\gamma c$  鎖遺伝子のクローニングを世界に先駆けて成功している。また、現在までに本研究グループには、X-SCID の発症原因についての膨大な基礎的研究の積み重ねがある。

## 10. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

### 10-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本遺伝子治療臨床研究では、家族内に HLA の一致するドナーが存在しない X-SCID 患者を対象とする。患者は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および X-SCID 遺伝子診断を依頼された病院の主治医の協力を得て、日本全国から東北大学医学部附属病院小児病棟へ搬送する予定である。インフォームド・コンセントによる同意を取得後、野生型  $\gamma c$  鎖遺伝子を用いた遺伝子治療を開始する。まず、X-SCID 患者から骨髓液を採取し、CD34 陽性細胞を免疫磁気ビーズによるポジティブセレクション法で回収後、*ex vivo* でフィブロネクチンフラグメント CH296 をあらかじめコートしてあるバックを用い、SCF、TPO、Flt3-L、IL-3 を添加した培地中で 24 時間培養する。その後、 $\gamma c$  鎖遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター (MFG/B2- $\gamma c$ ) を含むウイルス産生細胞の培養上清を 3 日間連続で加え、遺伝子導入を行う。遺伝子導入した CD34 陽性細胞は洗浄後経静脈的に X-SCID 患者に戻す。

また、遺伝子導入した細胞の一部を用いて遺伝子導入効率と $\gamma c$ 鎖発現の検討、増殖性レトロウイルスの検索、無菌試験、エンドトキシン試験などを行う。その後、定期的に T 細胞、B 細胞、NK 細胞の数およびその機能を検査し、それぞれの細胞分画における $\gamma c$ 鎖発現の割合について経時的変化を追う。また、長期的な患者の予後、QOL 及び安全性についても検討を加える。

## 10-2. 被験者の選択基準及び除外基準

### 10-2-1. 被験者の選択基準

診断が確定している典型的な X-SCID 患者で家族内に HLA 一致ドナーが存在しない者。かつ、過去に造血幹細胞移植の既往がない患者で、骨髄採取のための全身麻酔に耐えうる者。

典型的な X-SCID 患者とは、本人由来の T 細胞及び NK 細胞が欠損あるいは著減し、 $\gamma c$ 鎖タンパク質をコードする遺伝子に変異が確認され、さらに $\gamma c$ 鎖の発現または機能に異常が認められた者。対象の年齢制限はない。

### 10-2-2. 除外基準

血中の自己 T 細胞が 500/ $\mu$ l 以上存在する非典型例。

HIV-1/2 または HTLV-1 に感染している患者。

既に血液細胞系の悪性腫瘍が発症している者。

造血幹細胞移植を受けたことがある者。

書面のインフォームドコンセントに記入することを拒否した場合や良好な条件で移植が行えるような HLA 一致血縁ドナーがいる場合。

この治験に年齢制限はないが、診断がつくのは通常生後 1 年以内である。

## 10-3. 被験者の同意の取得方法

通常この病気は、生後 1 年以内に発症するため、担当医師は親権者（両親がいる場合は両親、片親の場合は片親のみ）に対し十分な説明を行った上で、文書による説明同意を得る（添付資料 3）。患者本人が理解可能な年齢に達している場合には、患者本人にも医師から年齢に応じた説明を、保護者あるいは第三者の立ち会いのもとに行う。具体的には患者本人が読み書き可能な場合は、本

人からの同意を親権者の文書同意とともに文書で得る。患者本人が読み書き不能な場合は、年齢に応じた説明を口頭で行い、本人からの口頭による承諾を親権者の同意とともに得る。但し、両親の一方が遠方にいる、外国に居住しているなど、両親から文書による説明同意を得ることが著しく困難な場合には、両親の一方から同意を得る。なお、親がいない場合は親権者から文書による説明同意を得る。

患者（親権者）が本臨床研究参加を決定する前に、患者（親権者）と担当医師が2部の同意書にサインを行う。1部の同意書は患者（親権者）に渡し、もう1部は本臨床研究者が10年間以上保管する。

#### 10-4. 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は承認が得られた時点から2年間、目標症例数は5例とする。

#### 10-5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

##### 10-5-1. 対照群の設定方法

特に設けない。

##### 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。）

*ex vivo* で行われる操作の手順

###### 1. 細胞の採取

X-SCID 患児から採取した骨髓細胞を用いる。骨髓細胞は全身麻酔下に後腸骨稜から穿刺、吸引により採取する。細胞を通常の骨髓移植と同じ方法でバッグに集め、CD34陽性細胞を分離する輸血部に運ぶ。

###### 2. 遺伝子導入細胞の選択法とその性状の確認

骨髓液の入ったバッグの重量を測定し、有核細胞数を数える。細胞数を数えるための試料はクリーンベンチ内でバッグから採取する。

単核球は以下の手順で分離する。

細胞を0.9% NaClで1/3に希釈し、Ficoll-Hypaqueによる密度勾配法で分離した後、0.9% NaClで2回洗浄し、PBSに浮遊する。浮遊した単核球細胞をISOLEX 300i (Nexell) でポジティブセレクションし、CD34陽性細胞を濃縮する。



CD34 陽性細胞の純度はフローサイトメーターで評価する。この方法で 80～90% (70～80%の回収が目標である) の CD34 陽性造血幹細胞を含む細胞浮遊液が得られる。

### 3. CD34 陽性骨髓細胞の培養

上記のようにして CD34 陽性細胞を集め、 $1 \times 10^5$  cells/ml の細胞濃度でウシ血清を含む X-vivo10 培地に再浮遊し、SCF (100 ng/ml)、Flt3-L (300 ng/ml)、TPO (300 ng/ml)、IL-3 (60 ng/ml) の存在下で 24 時間培養し活性化する。この“活性化”の段階は造血幹細胞の一部を細胞周期に入れるために行う。培養は 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞培養用バッグを用いて行う。

24 時間後細胞を遠心し、細胞数を数え、 $1 \times 10^5$  cells/ml の細胞濃度に再浮遊する。

### 4. 標的細胞とベクターを共局在させる工夫

#### a) 遺伝子導入法

研究室の-80°Cの冷凍庫で保管していたレトロウイルス上清を解凍し、100 ml のバッグに分注する。サイトカインで活性化した CD34 陽性細胞の総細胞数で必要なバッグ数が決まる。細胞 1 個につきウイルス 6 粒子という比率を目安としてウイルス上清を用いる。 $1 \times 10^5$  個の細胞に対しウイルス粒子約  $6 \times 10^5$  を含むレトロウイルス上清 1 ml で再浮遊する。レトロウイルス上清は 37°Cで素早く解凍する。目的遺伝子を含むレトロウイルスを造血細胞に効率よく感染させるために、組み換えフィブロネクチンフラグメント CH296 をコートした無菌バッグを用いて細胞培養を行う。このフィブロネクチンフラグメント CH296 は造血細胞とレトロウイルス粒子との共局在を可能にし、遺伝子導入の効率をあげることができる。

b) 24 時間毎にレトロウイルス上清を交換し、造血細胞の培養を 3 日間連続で行い、感染を成立させる。感染サイクル毎に、細胞を含む上清を 50 ml のチューブに移して遠心し、上清を取り除いた後、細胞のペレットを解凍したレトロウイルス上清で再浮遊する。

c) このプロトコールでは目的遺伝子を含むレトロウイルスベクター産生パッケージング細胞との共培養は行わない。

3 サイクルの感染後、上清中に残ったウイルス粒子、サイトカイン、硫酸プロタミンを可能な限り除去するために、集めた造血細胞を 2%ヒトアルブミンを含む PBS バッファーで 3 回洗浄する。

洗浄後、細胞を 4%ヒトアルブミン 100 ml に再浮遊し、細胞数を数えてから患者へ戻す。

患者へ戻す前に細胞数を数え、さらに直接免疫蛍光染色法による表現型の解析を行う。この解析では、患者に戻す CD34 陽性細胞と CD34 陽性 $\gamma$ c 鎖陽性のダブルポジティブ細胞の総数を調べる。

既に実施された遺伝子治療臨床研究の結果から 3 サイクルの感染後、30~40% の CD34 陽性細胞が $\gamma$ c 鎖を発現すると予測される。培養 3 日目の細胞の一部は凍結保存し、上清は細菌及び真菌の混入がないことを確かめるための検査を行う。

### 10-5-3. 前処置及び併用療法の有無

前処置は施行しない。併用療法は感染症対策など子供の状態に合わせて必要となる対症療法。

本臨床研究期間中（4 カ月間）、骨髄移植は原則として行わない。

### 10-5-4. 臨床検査項目及び観察項目（添付資料 6）

#### 1. 治療前の評価

活動性感染があるかどうかについて臨床的、微生物学的評価（微生物の分離同定、免疫抗体法、免疫酵素法、PCR 法による検出）および画像診断学的評価を行う。必要に応じ、感染による心臓、肺、肝臓、腎臓、中枢神経系への影響を評価するための検査も実施する。

末梢血中 T 細胞（CD4、CD8 細胞）、B 細胞、NK 細胞数測定、免疫グロブリン IgG、A、M、E 値の測定、純化した T 細胞の HLA タイピングまたはマイクロサテライト多型性マーカー検出による母親由来の T 細胞存在の有無についてなどを検査し、総合的に免疫学的評価を行う。

$\gamma$ c 鎖の細胞表面への発現は免疫蛍光法で解析する。 $\gamma$ c 鎖の変異は RT-PCR、必要に応じて genomic PCR を行い、直接シーケンス法によってその塩基配列を決定する。

#### 2. 治療中および長期間における評価

##### 1) 登録の際の検査

-主要なバイタルサインのチェック、一般臨床検査及び微生物学的検査。

-末梢血中 CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞、CD56 陽性 NK 細胞、CD19 陽性 B 細胞

胞の細胞数測定。

-細胞膜上への $\gamma c$ 鎖の発現および変異の解析。

-HLA タイピングと多型マーカーを用いた母親由来の T 細胞の検出。

-骨髓細胞中の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、その他の有核細胞の細胞数測定。

-血清、尿中の逆転写酵素の活性試験。

-血清、尿中及び血液細胞から抽出した DNA を用いた PCR 法によるレトロウイルスゲノムの検出。

-血清中の複製能のあるレトロウイルスの検出 (RCR テスト)。

## 2) モニター目的の検査

### a) 骨髓細胞試料を用いた検査

骨髓系、リンパ球系、赤芽球系細胞及び CD34 陽性細胞の $\gamma c$ 鎖発現を二重染色法等の手法を用いて検出する。MFG/B2- $\gamma c$  レトロウイルスベクターのゲノムへのインテグレーションを PCR 法で調べる。 $\gamma c$ 鎖転写産物の発現は、RT-PCR 法で調べる (遺伝子治療前と治療後 3 カ月目)。

### b) 末梢血を用いて治療前から 3 カ月目まで 15 日間隔で行う検査

MFG/B2- $\gamma c$  レトロウイルスが好中球、単球、リンパ球へインテグレーションしたかどうかについて PCR 法、必要に応じてサザンブロット法にて確認する。 $\gamma c$ 鎖転写産物については RT-PCR 法で検討する。さらに $\gamma c$ 鎖の細胞表面への発現を免疫蛍光抗体法で調べる。

### c) その他の検査

CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞、T 細胞受容体 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 鎖を発現しているリンパ球、NK 細胞、B 細胞の数を免疫蛍光法にて算定する (遺伝子治療前と治療後 2 及び 3 カ月目)。もし $\gamma c$ 鎖を発現している自己 T 細胞数が 500/ $\mu$ l を超えたら、*in vitro* で PHA および抗 CD3 抗体によるリンパ球増殖能試験を行う。また患者にジフテリア/破傷風/百日咳ワクチンを 3 から 8 週間隔で 3 回免疫し、最後の注射から 2 週間後、*in vitro* で上記抗原存在下における T 細胞の増殖能を検討する。血中の $\gamma c$ 鎖を発現している B 細胞の数が一定以上 (50/ $\mu$ l 以上) に達したら免疫グロブリン補充療法を終了し、3 ヶ月後 (投与された IgG が消失した頃) IgG、IgA、IgM 及び IgE を測定し、ジフテリア毒素、破傷風毒素、百日咳毒素や A 型、B 型血液型抗原に対する抗体価も測定する。

必要に応じて主要臓器を評価する臨床検査を実施する。

血清中の複製能を持つレトロウイルスの検査を行う (RCR テスト ; 遺伝子治

療前と治療後 1 及び 3 カ月目)。

遺伝子治療 4 カ月以降についても添付資料 6 の検査スケジュールに従い検査を実施する予定。また、2 年目以降も定期的経過観察を行っていく。

#### 10-5-5. 予測される副作用及びその対処方法

1. 腫瘍の危険性を伴う複製能のあるウイルスの出現。

血清、血液細胞の RCR 検査 (遺伝子治療前及び 1、3 及び 12 カ月後)。

2. 附随した治療の副作用

特になし。

3. 疾患に関連した副作用とその対策

免疫不全症の持続。感染症による死亡の危険性。

患者は無菌室で管理する。

一般的な臨床的及び微生物学的基準で感染症に対する検査と治療を行う。

#### 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

1. 評価方法及び評価基準

##### 主な評価方法及び評価基準

遺伝子導入した正常  $\gamma$ c 鎖が X-SCID 患者の造血細胞に発現したか否かにより治療効果を評価する。骨髓細胞と末梢血細胞を用い、細胞表面への  $\gamma$ c 鎖発現を免疫染色法で解析する。骨髓細胞については 3 カ月目に、末梢血細胞については遺伝子治療前から 3 カ月の間は 15 日間隔で、以降 6 カ月目までは 1 カ月間隔で、12 カ月目までは 3 カ月ごとに測定する。

副作用が無いことについての評価を以下のように行う。臨床研究に起因すると考えられる臨床的変化、特に腫瘍の発生などが見られないこと。Ex vivo で遺伝子導入を行った造血細胞以外では導入遺伝子 ( $\gamma$ c 鎖) の発現がみられないこと。体液、組織で複製能のあるウイルスの増幅が見られないこと。

##### 臨床研究の二次的評価

免疫不全症の状態が改善したかどうかについては、末梢血中の T、B、NK 細胞の割合を最初の 3 カ月は毎月、以降も添付資料 6 に従い定期的に 1 年間解析を続ける。十分な量の T 細胞 (500/ $\mu$ l 以上の T 細胞) が検出されるようになったら、in vitro で機能試験 (マイトージェンや抗原存在下における増殖能試験) を行い、次いで in vivo で皮下の遅延型過敏反応と抗体産生能の検査を行う。

## 2. 遺伝子治療臨床研究の中止判断基準

### 4 カ月目の評価

遺伝子導入した自己骨髄幹細胞を移入してから 4 カ月後  $\gamma c$  鎖を発現している T 細胞が一定数 ( $500/\mu l$ ) 以上みられなかった場合、本臨床研究による治療は無効であったと見なす。患者は非血縁 HLA 一致ドナー (4 カ月の研究期間があるのでそのようなドナーを見つける時間的余裕がある)、または家族内の HLA ハプロタイプ不一致ドナーなど可能な範囲内で最善のドナーから骨髄移植を受けることになる。

### 1 年目の評価

遺伝子導入自家細胞の移植から 4 カ月後、免疫学的検査が陽性 ( $\gamma c$  鎖を発現している T 細胞が  $500/\mu l$  以上) であった場合、本臨床研究を続行し、1 年目に治療効果の評価を行う。治療効果の評価基準を以下に記す。

a)  $\gamma c$  鎖を発現している機能的自己 T 細胞および NK 細胞の持続的検出。

b) T 細胞について

*In vitro* での PHA、抗 CD3 抗体存在下における増殖能

*In vitro* での抗原 (ワクチン由来) 存在下における増殖能

*In vitro* での破傷風毒素に対する皮下の遅延型過敏反応

c) ワクチン抗原 (破傷風、ジフテリア毒素、百日咳毒素) に対する B 細胞の抗体産生能

d) K562 腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞障害活性

e) 治療に伴う合併症がないこと

f) 患者の状態に臨床的、生物学的な悪化がみられず、感染症が改善し十分にコントロールされており、無菌室外でも生活できるようになること。

無菌室を退出する基準：

T 細胞数が  $500/\mu l$  以上末梢血中に存在すること (15 日間隔で 2 回以上)。そしてそれらの T 細胞は患者本人の由来で遺伝子導入した正常  $\gamma c$  鎖を発現していること。

### 10-5-7. 症例記録に関する記録用紙等の様式

一般入院患者と同様に、カルテに患者の容態、治療内容、検査内容と結果及び家族への説明などを記載する。

#### 10-5-8. 記録の保存及び成績の公表の方法

本臨床研究に関するすべての文書はインフォームドコンセントの書類と同様に東北大学医学部附属病院に少なくとも10年間保管する。

本臨床研究の結果を医学雑誌や学会で報告する場合にも被験者のプライバシーは守られる。また、実施施設の長である東北大学医学部病院長は、遺伝子治療臨床研究審査委員会が判断した基準のもと、本研究に関する適切かつ正確な情報の公開などの措置を講じるよう努める。

#### 11. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

東北大学医学部附属病院小児病棟では、1980年代より骨髓移植術を施行している。現在は月1~2例の割合で造血幹細胞移植を行っており、特殊治療ユニットとして、その体制は確立されている。自己骨髓採取は当施設附属病院手術室において麻酔科医師の管理下に施行される。CD34陽性細胞の分離は東北大学医学部附属病院輸血部内クラス10,000の無菌室で行い、その後の遺伝子導入は、東北大学加齢医学研究所2階の発達病態研究分野クリーンルーム内にて行う。このクリーンルームは安全キャビネット1台、CO<sub>2</sub>インキュベーター2台をはじめ、遺伝子治療の無菌操作に必要な機器類、設備を擁しており、また、クラス10,000の清浄度を保持している。

東北大学加齢医学研究所・分化発達医学研究部門発達病態研究分野及び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では、本研究に必要な各種検査を行うのに必要な設備が完備している。また、PCRを始めとする分子生物学的解析も頻回に行われている。本臨床研究におけるウイルスの精製、増殖は当研究室では行わず、ベクターはGenopoetics社で生産され、各種検査の後、空輸される。

治療用病室は病院新西病棟5階に2室あり、室内は水平層流方式によるクラス100の無菌病室である。食事、ミルクは加熱滅菌食が供され、必要に応じ各種日常雑貨も中央医療材料室にてオートクレーブ滅菌、ガス滅菌等の処理後、供給される。

以上主たる実施設備・装備について不足はなく、本研究を完遂し得る状態にあると考えられる。

#### 12. 当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の状況