

(3) 従来の方法からの改良点

本研究では血液幹細胞への遺伝子導入効率を高めるためにレトロウイルスベクター GCsap M-ADA を新規に開発した。GCsap M-ADA 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 細胞を用いて産生されており、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³⁹⁾ (添付資料 1-8)^{40) 41) 42)}。また PG13 細胞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)^{43) 44)} 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, IL-6, sIL-6 R 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⁴⁵⁾。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 20%以上と増加させている⁶⁾。

本遺伝子治療臨床研究では生体内での遺伝子導入細胞の非遺伝子導入細胞に対する選択的生存優位性を維持するめに PEG-ADA 療法の中断のみの前処置を行う。ブスルファンによる非骨髄破壊コンディショニングは僅かに保持されている NK 細胞、単球、骨髄系細胞の抑制をきたして感染防御、腫瘍免疫上も危険性が高まると判断されるので、行われたい。

(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

本遺伝子治療臨床研究は、HLA 一致血縁ドナーが存在しないため PEG-ADA 療法を選択したが、長期にわたる経過観察で十分な効果が得られていない ADA 欠損症患者を対象とする。この時点での治療法を選択として、①HLA 一致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が考えられる。

①と②に関しては、HLA 一致血縁骨髄ドナー以外の HST の成績が現時点では依然として新たな展開に欠けている。PEG-ADA 療法を開始した症例で、その後に効果が不十分と判断

されて HLA 一致非血縁ドナーによる HST を実施した 9 例中生存例 3 例、どちらかの親を骨髄ドナーとした HST では 10 例中生存例 5 例である。このような状況下での HST の生存率は 30-50% であり、また前処置としての免疫抑制等の危険性も考慮しなければならない。

③に関しては、患者が幼少の場合は十分な末梢血単核球を採取する際の動脈血ルート確保の問題、血球分離装置の使用における身体的負荷の問題、PEG-ADA 療法による末梢血リンパ球数増加が不十分な症例では必要量の標的細胞が得にくいことなど、実施に技術的な困難が予想される。また、PEG-ADA 療法の併用が前提であり、遺伝子導入細胞の効果、発現の持続に制限があること、反復治療が必要で長期間を要するなどの欠点もある。

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、実際にイタリアの症例で臨床的な有効性が報告されている⁷⁾。一方、フランスでの X-SCID における重大な副作用と同様の事象のおこる危険性は懸念される。適切な対象患者の選択基準に基づく選定、モニタリングプランの確立、リスク・ベネフィットのバランスを評価した上で、本遺伝子治療臨床研究の実施の妥当性を判断した^{12) 13)}。

6. 遺伝子及び遺伝子導入方法

(1) ベクターの構造と性質

(i) 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。

(ii)ベクターの構造

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^R 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。

(iii)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^R 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からに改善され、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。

(2) 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、量的な差はあるもののほとんどの細胞で常時発現しているため、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

ン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。白血病事象を生じた γ cが細胞増殖・生存を調節するシグナル伝達に直接に関連する受容体のサブユニットであるのと対照的に、ADAは細胞毒作用のあるdADAなどを代謝する解毒作用により細胞の生存に関連する核酸代謝酵素である。

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、特に胸腺内幼若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。即ち血液幹細胞が根治療法としての遺伝子治療の標的細胞となる。

本遺伝子治療臨床研究は、患者骨髓血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HSTに使用され、全ての血液リネージの再構築が認められている。抹消血単核球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T細胞抗原レパートリーしか獲得されないため、反復した遺伝子導入操作が必要であり、尚かつT細胞の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T細胞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ので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療法の継続を余儀なくされている³⁾⁴⁾。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。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。また、その他の理由として併用するPEG-ADA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^{3) 46) 47)}。この可能性は、5(2)に記述した米国 NIH とイタリアで実施された遺伝子治療臨床研究の結果の違いからも支持される。

イタリアでは遺伝子導入細胞の増殖優位性を高めるために、PEG-ADA 療法をしてない症例にさらにブスルファン 2mg/kg/day 二日間のコンディショニングを行って臨床的有効性を示している³⁷⁾。しかし、遺伝子導入細胞が体内で十分な増殖優位性を得るためには、PEG-ADA 療法の中断だけでは不十分で、さらに危険性の高い非骨髄破壊コンディショニングが必要かどうかはまだ証明されていない。我々は偶発的な機会であったが、血液幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究を実施する目的で PEG-ADA 療法を3週間中絶した経験を持った。この間に白血病の有害事象が報告されて治療の延期を余儀なくされ、PEG-ADA 療法を再開したが、この間の酵素中絶による影響を詳細に解析でき、再度の治療実施の際には有用なデータとなると考えている。

8. 遺伝子導入方法の概要及び当導入法を選択した理由

骨髄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 (Stem cell factor; SCF, Fms-like tyrosine kinase-3 ligand; Flt-3L, Thrombopoietin; TPO, Interleukin-6; IL-6, Soluble IL-6 receptor: s IL-6R) 存在下に 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、患者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⁴⁸⁾ (添付資料 1-9)。

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⁴⁸⁾ (添付資料 1-8)。

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 4 症例に実施された(添付資料 2-3)。

9. これまでの研究成果⁴⁸⁾(添付資料 1-9)

(1) 方法

(i) ウイルスベクター。

LASN、GCsap M-ADA を用いた。

(ii) 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、ADA 欠損症患者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。他に患者由来 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。

(iii) 遺伝子導入方法

① CD34 陽性細胞

培養プレートを組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 (1015G, 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。

② 末梢血単核球

10%FCS添加RPMI(Gibco)に $0.5-1.0 \times 10^6$ /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 μ g/mlの存在下で遠心操作(1015G, 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。

③ 患者由来細胞株

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 1×10^6 /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なって実施した。

(iv) 導入遺伝子の確認方法

① 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 μ g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、エチジウムブ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'AGAAGTGCATGTCCACCTAGACG3', 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。

② 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)。

③ 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}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当たりに換算し 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。

④ 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)

(i) 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)。患者由来 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)。骨髓血 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)。

(ii) 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・骨髓血、また患者骨髓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、骨髓、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髓及び脾臓に導入遺伝子の存在が確認された (研究成果 7)。ADA 欠損症患者の骨髓血 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)。

(iii) 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

(i) 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 (ベクター関連資料)。