

(vii) 症例記録に関する記録用紙等の様式

一般入院患者同様に、カルテに患者の容態、治療内容、検査内容と結果および、家族への説明などを記載し、保存する。

(viii) 記録の保存及び成績の公表方法

カルテに準じて実施施設内で保存される。また成績の公表は院内審査委員会の判断の基に行われる。

13. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

遺伝子治療臨床研究は北海道大学医学部附属病院 3 階遺伝子治療臨床研究室にて行う。この研究室は前室を有しているため、関係者以外の人や昆虫、げっ歯類等の侵入を防ぐ事が出来る。さらに実験室内にはクラスⅡ安全キャビネット、遠心器や高圧滅菌器を備えており、その物理的封じ込めレベルは P2 である。

「9.これまでの研究成果」の項で述べた研究の成果はこの実験施設にて行われたものであり、現在に至るまで安全性上問題はない。

14. 当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況

既に記載したように ADA 欠損症における遺伝子治療臨床研究は 10 数症例に行われている。D. Kohn 博士らのグループでは ADA 欠損症の出生前診断がなされた新生児に対する臍帯血 CD34 陽性細胞を標的としたレトロウイルスベクター LASN による遺伝子治療を実施して、末梢血単核球、好中球に ADA 遺伝子の発現を認めているが、PEG-ADA 療法は継続されている²⁹⁾。

米国以外では 1992 年 3 月イタリアで骨髓血細胞と末梢血リンパ球の両者を標的とする遺伝子治療が行われており、PEG-ADA 療法併用下に臨床的効果を見出している⁴⁾。1993 年 3 月にオランダで骨髓細胞を標的に遺伝子治療が行われているが、PEG-ADA 療法は継続されて、遺伝子発現は一時的であったがことが報告されている⁵⁾。

F. Candotti 博士（米国 NIH）とロサンゼルス小児病院は共同で ADA 欠損症における血液幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究を 4 名の患者に実施した。この計画では、我々が使用を予定しているベクター；GCsap M-ADA ともう一つのベクター；MND-ADA の二種類が同時に使用された。我々のプロトコールは GCsap M-ADA のみを使用し、遺伝子導入方法や培養条件等はほぼ同一である（添付資料 2-3）。この遺伝子治療臨床研究では PEG-ADA 療法を継続しながら実施することが前提になっており、その点我々の計画と異なっている。治療開始後、1 年を過ぎた時点では臨床効果が得られていないことが報告されている。

最近、イタリアで PEG-ADA 療法をしていない症例で、さらに非骨髄破壊コンディショニングをした血液幹細胞標的の遺伝子治療が実施された⁷⁾。詳細な報告は 2 例で行われているが、最新の情報では既に 4 例で実施され有効な治療経過が得られている。2 例は 7 ヶ月と 2 歳 6 ヶ月の症例で、自己の骨髄血を採取し、CD34 陽性細胞を選別して遺伝子導入処理を行った。ベクターは Gp+Aml2 細胞でパッケージングされた LASN に準じたベクターで、CH-296 存在下に SCF, FLT3L, TPO, IL3 のサイトカインを使用して一日刺激、遺伝子導入操作 3 回を 3 日間にわたって行った。移植の 3 日、2 日前にブスルファン(2mg/kg/day)で前処理の後、遺伝子導入した細胞を投与した。それぞれ CD34 陽性細胞で $8.6 \times 10^6/\text{kg}$ と $0.9 \times 10^6/\text{kg}$ で、CFU-C (Neo) で評価した遺伝子導入効率は 25% と 21% であった。遺伝子導入細胞の違いの為か、リンパ球数の増加としての遺伝子治療の効果確認の時期は異なったが、2 例とも経過とともに種々の免疫機能の再建が得られている。大きな副作用は認めなかった。しかし、明らかな臨床的有効性を得るために、PEG-ADA 療法のない症例にさらに危険性の高いコンディショニングが必要かどうかは不明である。

15. 研究者の略歴、研究業績

総括責任者：崎山幸雄

略歴：

- 昭和 43 年 4 月 北海道大学医学部小児科学教室入局
同 48 年 4 月 北海道大学結核研究所（現遺伝子病制御研究所）病理部門にて研修
同 51 年 7 月 ハーバード大学医学部付属小児病院医学センター免疫部門に留学
同 53 年 8 月 帰国
同 54 年 11 月 北海道大学医学部附属病院小児科助手
同 58 年 9 月 同 講師
平成 6 年 4 月 北海道大学医学部小児科助教授
同 10 年 1 月 同退職
2 月 手稲溪仁会病院小児センター長
同 11 年 4 月 北海道大学医学部遺伝子治療講座客員教授（寄付講座）

専門：原発性免疫不全症、小児感染免疫学、アレルギー学

研究業績：アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する polyethylene glycol-modified adenosine deaminase 酵素補充療法

アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究

16.文献

- 1) Blaese R.M, Culver K.W, Miller A.D et al.
T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years.
Science, 270: 475-480, 1995
- 2) Onodera M, Ariga T, Kawamura N et al.
Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency.
Blood, 91: 30-36, 1998, (添付資料 1-1)
- 3) Kohn D.B, Weinberg K.I, Nolta J.A et al.
Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency.
Nat Med, 1: 1017-1023, 1996
- 4) Claudio B, Luigi D, Notarangelo N.N et al.
Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA-Immunodeficient Patients.
Science, 270: 470-474, 1995
- 5) Hoogerbrugge P.M, Van Beusechem V.W, Fischer A et al.
Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency.
Gene Ther, 3: 179-183, 1996
- 6) Kiem HP, Andrews R.G, Morris J et al.
Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor.
Blood, 92: 1878-1886, 1998
- 7) Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., et al.
Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning.
Science. 296, 2410-2413, 2002

- 8) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G et al.
Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.
Science, 288: 669-672, 2000
- 9) Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M. et al.
A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined
Immunodeficiency
N Engl J Med, 348:255-256, 2003
- 10) Marshall, E.
Second child in French trial is found to have leukemia.
Science, 299, 320, 2003, (in News of the week).
- 11) Department of Health & Human Service, National Institute of Health.
Serious adverse event in a study of gene transfer in X-linked severe combined
immunodeficiency. Fact Sheet, January 14, 2003.
<http://www4.od.nih.gov/oba/x%2Dscid3.htm>
- 12) Kaiser, J.
Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial.
Science, 299, 495, 2003, (in News of the week).
- 13) Friedmann, T.
Gene Therapy's New Era: A Balance of Unequivocal Benefit and Unequivocal Harm.
Mol Ther, 8:5-7, 2003, (添付資料 1-2)
- 14) Hirschhorn R.
Adenosine deaminase deficiency.
Immunol Rev, 2: 175-198, 1990
- 15) Regina Resta, Linda F. Thompson
SCID: the role of adenosine deaminase deficiency.
Immunology Today, 371-374, 1997

- 16) Hirschhorn R.
Immunodeficiency disease due to deficiency of adenosine deaminase, in Ochs HD, Smith CIE, Puck JM(eds): Primary Immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach. New York, NY, Oxford University Press, p121-139, 1999
- 17) Giblett E.R, Anderson J.E, Cohen F et al.
Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. Lancet, 2: 1067-1069, 1972
- 18) Hirschhorn R.
Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency.
Pediatr Res, 33: s35-s41,1993
- 19) Arredondo-Vega, F.X, Santisteban I, Daniels S et al.
Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles.
Am J Hum Genet, 63: 1049-1059, 1998
- 20) 小田展子、有賀 正、小野 暁、他。
アデノシンデアミナーゼ欠損症の2家系における遺伝子解析と興味ある保因者の検出。
アレルギー 49: 1173-1180, 2000,(添付資料 1-3)
- 21) Ariga T, Oda N, Sanstisteban I, Arredondo-Vega F.X et al.
Molecular basis for paradoxical carriers of adenosine deaminase (ADA) deficiency who show extremely low level of ADA activity in peripheral blood cells without immunodeficiency.
J Immunol, 166: 1698-1702, 2001, (添付資料 1-4)
- 22) Silber G.M, Winkelstein R.C, Moen S.D et al.
Reconstitution of T- and B-cell function after T-lymphocyte-depleted haploidentical bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency.
Clin Immunol Immunopath, 44: 317-320, 1987

- 23) Stephan J.L, Vlekova V, Deeist F.L et al.
Severe combined immunodeficiency: A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients.
J Pediatr, 123: 564-572, 1993
- 24) Fisher A, Gricelli C, Friedrich W et al.
European experience of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency.
Lancet, 336: 850-854, 1990
- 25) Hilman B.C, Sorensen R.U.
Management options: SCID with adenosine deaminase deficiency.
Annals of Allergy, 72: 395-403, 1994
- 26) Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B et al.
Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients.
Blood, 91: 3646-3653, 1998
- 27) Buckley R.H, Schiff S.E, Schiff R.I et al.
Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency.
N Engl J Med, 340: 508-516, 1999
- 28) Hershfield M.S, Buckley R.H, Greenberg M.L.
Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase.
N Engl J Med, 316: 589-596, 1987
- 29) Hershfield M.S.
PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years.
Clin Immunol Immunopathol, 76: S228-232, 1995

- 30) Hershfield M.S.
PEG-ADA An Alternative to Haploidentical Bone Marrow Transplantation and an Adjunct to Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency.
Human Mutation, 5: 107-112, 1995
- 31) 有賀正、崎山幸雄
ADA 欠損症に対する遺伝子治療の現状。
蛋白質・核酸・酵素 40: 2772-2780, 1995
- 32) Kohn D.B, Hershfield M.S, Carbonaro D et al.
T-Lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates.
Nature Medicine, 4: 775-780, 1998
- 33) Mullen C.A, Snitzer K, Culver K.W et al.
Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency: long-term expression in vivo of genes introduced with a retroviral vector.
Hum Gene Ther, 7: 1123-1129, 1996
- 34) Egashira M, Ariga T, Kawamura N et al.
Visible Integration of the Adenosine Deaminase (ADA) Gene Into the Recipient Gene Therapy.
American Journal of Medical Genetics, 75: 314-317, 1998 (添付資料 1-5)
- 35) Misaki Y, Ezaki I, Ariga T et al.
Gene-transferred oligoclonal T cells predominantly persist in peripheral blood from an adenosine deaminase-deficient patient during gene therapy.
Mol Ther, 3: 24-27, 2000, (添付資料 1-6)
- 36) Kawamura N, Ariga T, Ohtsu M et al.
Elevation of serum IgE level and peripheral eosinophil count during T lymphocyte-directed gene therapy for ADA deficiency: implication of Tc2-like cells after gene transduction procedure.
Immunology Letters, 64: 49-53, 1998

- 37) Kawamura N, Ariga T, Ohtsu M et al.
In vivo kinetics of transduced cells in peripheral T cell-directed gene therapy: role of CD8+ cells in improved immunological function in an adenosine deaminase (ADA)- SCID patient.
J Immunol, 163: 2256-2261, 1999 ,(添付資料 1-7)
- 38) 崎山幸雄、有賀正、川村信明
遺伝子が変わる 21 世紀の医療現場。
治療 83: 166-169, 2001
- 39) Onodera M, Nelson D.M, Yachie A et al.
Development of improved adenosine deaminase retroviral vectors.
J Virol, 72: 1769-1774, 1998, (添付資料 1-8)
- 40) Onodera M, Nelson D.M, Sakiyama Y et al.
Gene Therapy for Severe Combined Immunodeficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency: Improved Retroviral Vectors for Clinical Trials.
Acta Haematol, 101: 89-96, 1999
- 41) Williams D.A, Smith F.O.
Progress in the use of gene transfer methods to treat genetic blood diseases.
Hum Gene Ther, 11: 2059-2066, 2000
- 42) Miller A.D, Garcia J.V, Von Suhr N et al.
Construction and Properties of Retrovirus Packaging Cells Based on Gibbon Ape Leukemia Virus.
J Virol, 65: 2220-2224, 1991
- 43) Hanenberg H, Xiao X.L, Dilloo D.
Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells.
Nat Med, 2: 876-882, 1996

- 44) Dao M.A, Hannum C.H, Kohn D.B et al.
FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction.
Blood, 89: 446-456, 1997
- 45) Tisdale J.F, Hanazono Y, Sellers S.E et al.
Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability.
Blood, 92: 1131-1141, 1998
- 46) Anderson W. F.
The Best of Times, the Worst of Times.
Science, 288: 627-629, 2000
- 47) Fisher A, Hacein-Bey S, Le Deist F et al.
Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies.
Immunity, 15: 1-4, 2001
- 48) 吉田重慶、大津 真、有賀 正、 他。
血液幹／前駆細胞を標的とする ADA 欠損症における遺伝子治療基礎研究：至適化遺伝子導入後の骨髓再構築能の検討。
北海道歯学雑誌。23, 19-28, 2002, (添付資料 1-9)
- 49) Kohn DP, Sadelain M, Dunbar C et al.
American Society of Gene Therapy (ASGT) Ad Hoc Subcommittee on Retroviral-Mediated Gene Transfer to Hematopoietic Stem Cells.
Mol Ther, 8: 180-187, 2003, (添付資料 1-10)

付帯資料1

遺伝子導入フローシート

患者名：_____

前処置：

患者骨髓血採取日：

総採取量：

全単核球数：

生細胞率：

検査提出細胞数：

CD34陽性細胞分離

分離前単核球数：

CD34陰性細胞数：

CD34陽性細胞数：

生細胞率：

CD34陽性率：

遺伝子導入前培養日：

培養条件：細胞濃度； 細胞/ml、培養液量； ml/バック

培養液：X-VIVO10ロット番号；

ヒトアルブミン；

サイトカイン； SCF TPO Flt-3L IL-6 sIL-6

遺伝子導入日 遠心操作 実施者 日付（時間）

一回目

二回目

三回目

四回目

レトロネクテンコーティング：濃度 $\mu\text{g/ml}$ ；ロット番号：

ベクター：PG13/GCsapADA(MPSV) 、ロット番号：

使用容量

遺伝子導入細胞回収日：

全回収細胞数：

回収率：

生細胞率：

CD34陽性細胞率：

検査提出細胞数：

患者投与細胞数（静脈内投与）：

記載者

付帯資料2

分析証明書 (遺伝子導入細胞)

患者名：
 使用ベクター：
 ロット番号：
 遺伝子導入日：1回目； 2回目；
 3回目； 4回目；

試験	方法	許容範囲	結果
生細胞率	トリパンブルー染色	>80%	
無菌試験	グラム染色	細菌陰性	
	好気性培養	陰性	
	真菌培養	陰性	
	マイコプラズマ培養	陰性	
エンドトキシン	エンドスペシー法	<5 pg/ml	
増殖生ウイルス検査	S+L-法	陰性	
	PCR法	陰性	
ベクターDNA検査	PCR法	陽性	
	定量PCR法	>非導入細胞	
ADA活性	TLC法	>非導入細胞	
細胞表面マーカー	FACS法	特になし	

署名： 日付：

付帯資料3

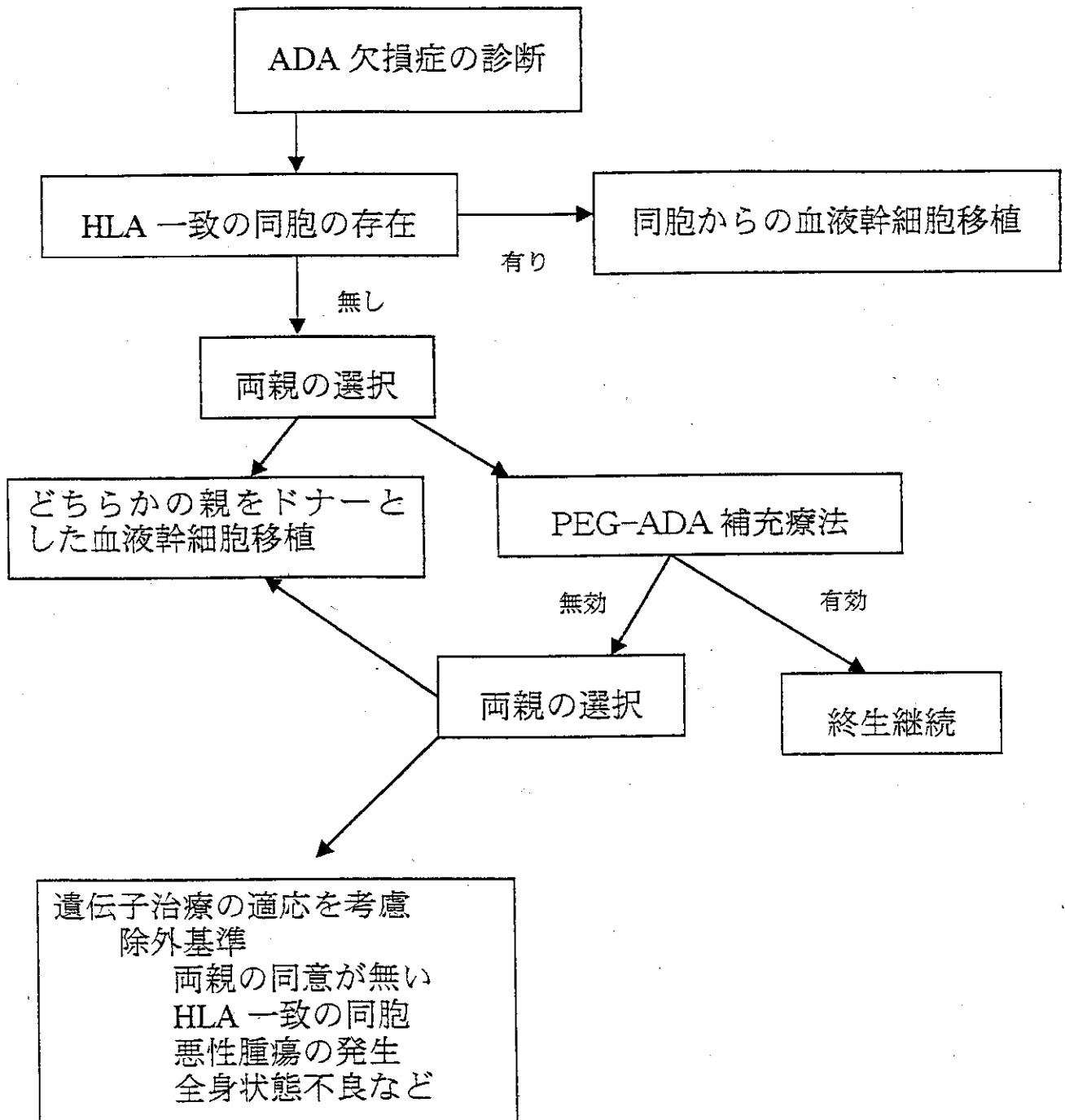
遺伝子治療臨床プロトコール：チェックリストー1

患者名：	署名	日付
1週間前： 血液検査； 血液一般	_____	_____
生化学検査	_____	_____
血清IgG, IgA, IgM, IgE値	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
芽球化反応	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____
治療前のADA酵素活性用検体保存	_____	_____
単核球、赤血球、血漿	_____	_____
ベクター分析証明書のチェック	_____	_____
骨髄採取日までに行う検査；血液検査；血液一般	_____	_____
生化学検査	_____	_____
凝固系検査	_____	_____
心電図	_____	_____
呼吸機能検査	_____	_____
胸部X線	_____	_____
骨髄採取日；	_____	_____
骨髄細胞採取	_____	_____
CD34陽性細胞分離	_____	_____
前培養のセット	_____	_____
培養2日目	_____	_____
培養液採取、検査提出	_____	_____
グラム染色	_____	_____
細菌培養検査	_____	_____
エンドトキシン検査	_____	_____
RCR検索（検体保存）	_____	_____
遺伝子導入操作	_____	_____
1-4回	_____	_____
フローシートの記載	_____	_____
培養終了日；遺伝子導入細胞の回収、洗浄、細胞数算定	_____	_____
フローシートの記載	_____	_____
培養液の採取、検査提出	_____	_____
グラム染色	_____	_____
細菌培養検査	_____	_____
マイコプラズマ検査	_____	_____
エンドトキシン検査	_____	_____
RCR検索（検体保存）	_____	_____
細胞の一部検査提出	_____	_____
グラム染色	_____	_____
細菌培養検査	_____	_____
エンドトキシン検査	_____	_____
RCR検索（検体保存）	_____	_____
導入ADA遺伝子検査	_____	_____

遺伝子治療臨床プロトコール：チェックリストー2

	署名	日付
患者名：	_____	_____
遺伝子導入細胞の静脈内投与	_____	_____
投与3日後：血液検査；	_____	_____
血液一般検査	_____	_____
生化学的検査	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
ADA関連検査（保存）	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____
投与1週間後：血液検査；	_____	_____
血液一般検査	_____	_____
生化学的検査	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
ADA関連検査（保存）	_____	_____
RCR検索	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____
投与2週間後：血液検査；	_____	_____
血液一般検査	_____	_____
生化学的検査	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
ADA関連検査（保存）	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____
投与3週間後：血液検査；	_____	_____
血液一般検査	_____	_____
生化学的検査	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
ADA関連検査（保存）	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____
投与1ヶ月後：血液検査；	_____	_____
血液一般検査	_____	_____
生化学的検査	_____	_____
血清IgG, A, M, E価	_____	_____
細胞表面マーカー	_____	_____
ADA関連検査（保存）	_____	_____
RCR検索	_____	_____
血清保存	_____	_____
一般検尿	_____	_____

付帯資料 4 被験者の選択基準と除外基準



付帯資料 5-1

遺伝子治療臨床研究適応・評価小委員会

委員長	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座講師	渥美達也先生
委員	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座講師	天崎吉晴先生
	札幌医科大学第一内科教授	今井浩三先生
	市立札幌病院免疫血液内科	向井正也先生
	北海道大学大学院医学研究科小児発達医学講座助手	小林良二先生
	国家公務員共済組合連合会幌南病院小児科主任医長	高橋 豊先生
	札幌医科大学医学部小児科講師	沼崎 啓先生

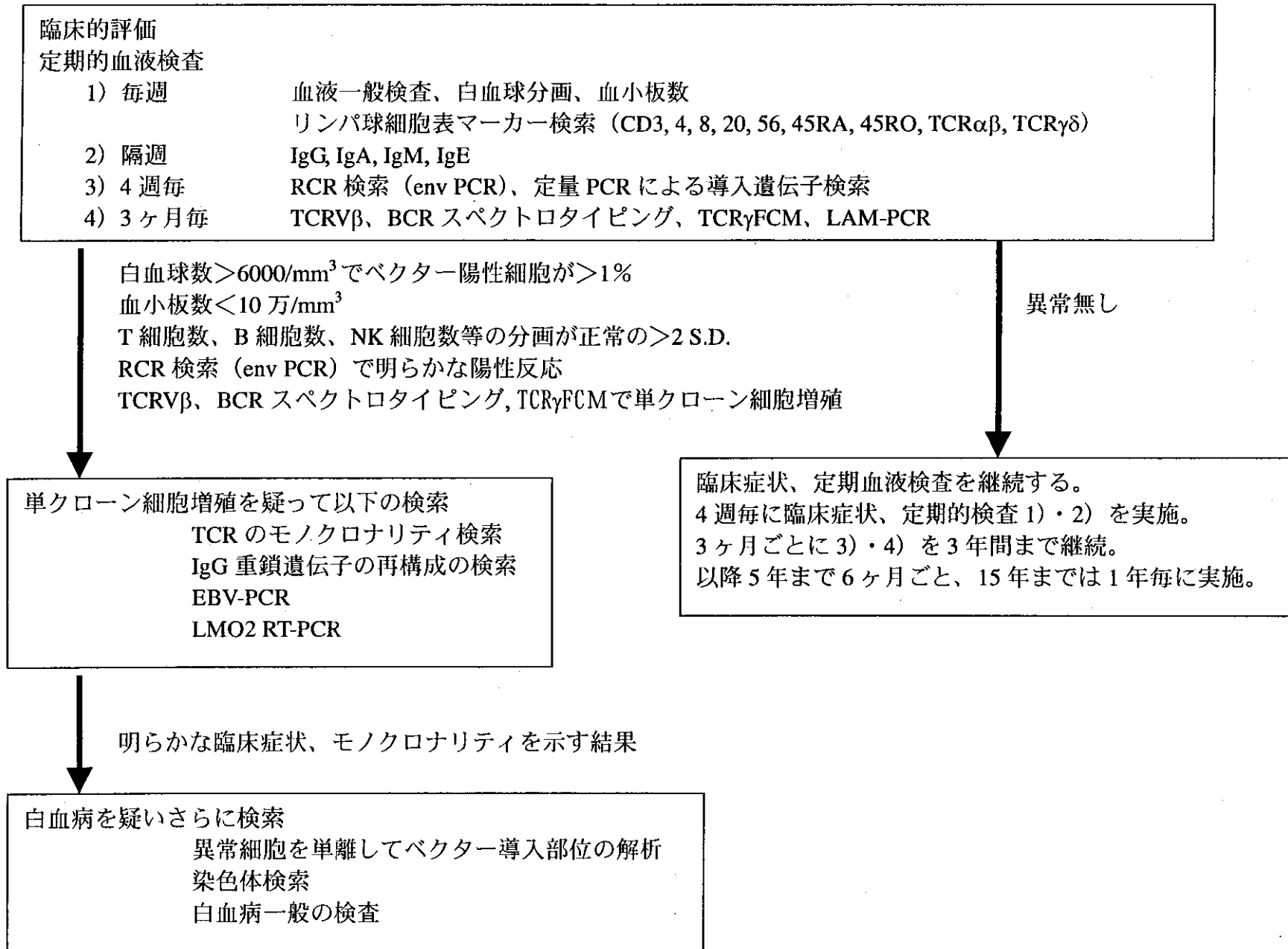
付帯資料 5-2

PEG-ADA 療法再開の基準

下記のいずれかの場合には PEG-ADA 療法を再開する。

1. 抗生物質（抗真菌剤を含む）、静注用 γ グロブリン製剤などの治療下に1週間以上持続する感染症の発症。
1. 上記期間未満でも生命予後に拘わると判断される重症感染症の発症。
1. ADA 代謝物（dAXP）の蓄積に基づく考えられる重篤な肝障害などの発症。
1. 両親（本人）が再開を希望した場合。

付帯資料 6-1 遺伝子治療後のモニタリング (北大)



北海道大学遺伝子治療臨床研究モニタリングプラン一覧

年 月 週	1												2	3	4	5	6年目以降 15年まで					
	1				2				3									4 5 6 7 8 9 10 11 12				
	72 h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						12				
一般診察	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	4週毎	6ヶ月毎	1年毎		
血液一般検査	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○					
生化学 (ADA活性含む)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○					
リンパ球 FCM 解析 IgG/IgA/IgM	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○					
リンパ球芽球化反応	○				○				○					○			○	3ヶ月毎			6ヶ月毎	1年毎
同種血球凝集阻害	○				○				○					○			○					
特異抗体価の測定	○				○				○					○			○					
RCR (env/PCR)	○				○				○					○			○					
RBC ADA, dAdo	○				○				○					○			○					
ADA 遺伝子導入評価	○				○				○					○			○					
TCRVb spectratyping									○					○			○					
BCR spectratyping									○					○			○					
TCRg FCM									○					○			○	適応・評価小委員会	6ヶ月毎	1年毎		
IAM-PCR									○					○			○					
適応・評価小委員会				○				○						○			○					