

メド社から輸入したレトロウイルスベクターを用いて HSV-TK 遺伝子導入細胞を GMP 基準に準拠して調製し、品質試験を行う (図 8)。また、ハプロタイプ一致ドナーからの造血幹細胞の G-CSF 製剤による動員 (mobilization) 後のアフエレーシス*6 及び同一ドナーからの遺伝子導入用リンパ球アフエレーシスは、国立がんセンター中央病院で行われる計画である (図 8)。

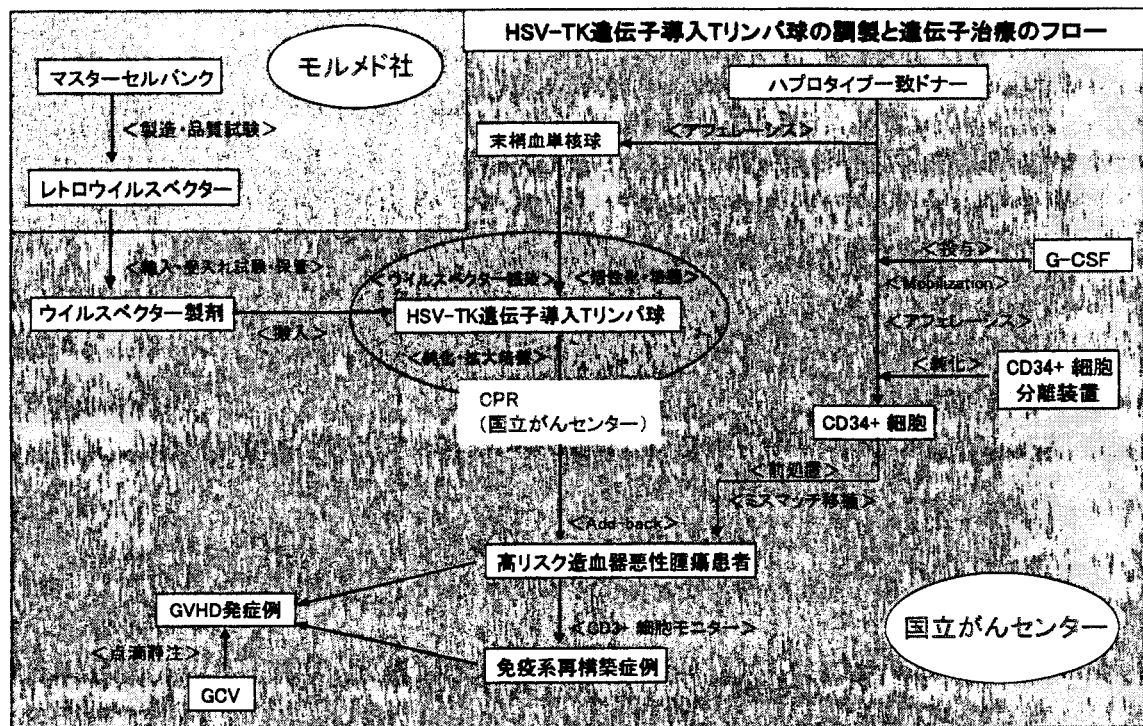


図 8 HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の調製と遺伝子治療のフロー

V.1.2 当該遺伝子治療臨床研究の概要

当該遺伝子治療臨床研究は、以下の選択基準に合致した患者を対象とし、前出図1に示した全体計画フロー（プロトコル概要）に基づいて行われる。

<患者仮登録時選択基準の概要>

- 1) 予後不良の高リスク造血器悪性腫瘍患者（詳細は別途規定）
- 2) HLA 適合又は HLA 1 座不一致の適切なドナーがいない
- 3) 末梢血幹細胞提供可能な HLA 2~3 座不一致の血縁ドナーがいる
- 4) 年齢が 20 歳以上 60 歳以下
- 5) ECOG の Performance Status が 0 又は 1
- 6) 主要臓器の機能が保たれている（詳細は別途規定）
- 7) ドナー及び患者の両者から文書での同意が得られている

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の調製】

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、モルメド社で GMP 基準に則って作製され、品質規格に適合したものを輸入して受け入れ、国立がんセンター中央病院内の CPR に搬入する。なお、当該レトロウイルスベクターは、モルメド社が実施中の治験（TK007）及び本邦における筑波大学付属病院での遺伝子治療臨床研究で使用されているものと同じベクター^{*7}である。

国立がんセンター中央病院内において、T 細胞除去ミスマッチ移植ドナーと同一のドナーに由来する PBMC をアフエレーシスにより採取する。IL-2 存在下で抗 CD3 抗体により PBMC を刺激して活性化し、当該レトロウイルスベクターにより HSV-TK 遺伝子及び ΔLNGFR 遺伝子を ex vivo 遠心法により導入する。その後、抗 LNGFR 抗体と二次抗体結合磁気ビーズ及び細胞分離装置による純化、IL-2 存在下での拡大培養を経て HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 液を調製する。当該 Add-back 液の品質試験項目は次頁のとおりであり、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の<品質試験項目-1>に合格したことを確認した後に用いる。また、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の<品質試験項目-2>は Add-back 後に試験を開始するが、試験に日数を要するために結果の判明が Add-back 後になる場合がある。万一、Add-back 後に不合格であることが判明した項目があればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。つまり、化学療法や移植幹細胞ソースの再検索といった臨床現場において現時点で HLA 適合又は HLA 1 座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者に行われている治療法の中で、患者の状態に応じ総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）が最も適切と考える治療法を行う。なお、ドナーアフエレーシスに際しては、担当医師からドナーへのじゅうぶんなインフォームドコンセントを行い、文書による同意を取得する。

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-1>

- ・ 細胞生存率
- ・ エンドトキシン試験（日本薬局方）
- ・ ΔLNGFR 発現試験
- ・ 増殖性レトロウイルス（replication competent retrovirus: RCR）^{*5}試験（RT-PCR 法）
- ・ マイコプラズマ否定試験（PCR 法）

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-2>

- ・ 無菌試験（日本薬局方）
- ・ RCR 試験（増幅法）
- ・ マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
- ・ GCV 感受性試験
- ・ IL-2 依存的増殖試験

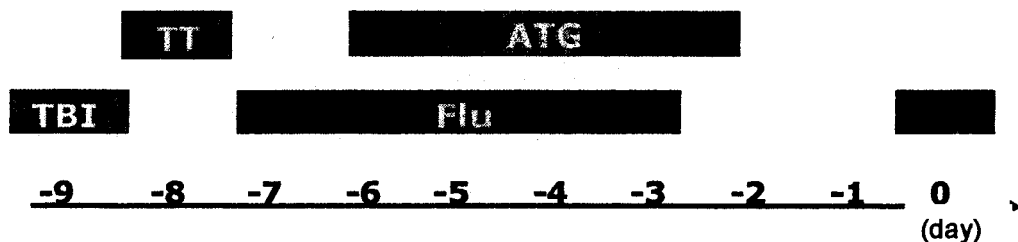
【T 細胞除去ミスマッチ移植】

ハプロタイプ一致ドナーからの末梢血幹細胞は、G-CSF 製剤投与により動員し、10 L 規模で2～3回アフエレーシスをすることにより採取する。その後、CD34 陽性細胞分離装置（ミルテニーバイオテック社製 CliniMACS 又は同等のもの）を用いて CD34 陽性細胞を分取し、 4×10^6 個/kg を最少量として患者に移植する。その際、CD3 陽性細胞の混入量についても確認する。

T 細胞除去ミスマッチ移植時の前処置は、モルメド社の治験（TK007）と同様の内容で実施する計画である（図9）。また、移植後のGVHD 予防に対する処置は行わないものとし、感染時には速やかに抗ウイルス剤や抗菌剤を処方することとする。なお、アシクロビル（aciclovir: ACV）製剤及びGCV 製剤は、後に Add-back する HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の自殺機能を惹起することから、本臨床研究で感染予防・治療には使用しないこととする。もし、CMV 感染が問題となった場合には、ホスカルネットナトリウム製剤を使用する予定である。

Conditioning regimen

- Ⓔ TBI : Total Body Irradiation 7.5 Gy
- Ⓕ TT : Thiotepa 13mg/kg
- Ⓖ Flu: Fludarabine 40mg/m²
- Ⓗ ATG: Anti-Thymocyte Globuline(Fresenius®) 5 mg/kg



Ⓔ HCT: hematopoietic cell transplantation

図9 T細胞除去ミスマッチ移植における前処置

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 及びフォローアップ】

自発的な免疫系再構築の開始が確認されない場合には、T細胞除去ミスマッチ移植後の造血幹細胞の生着が見込まれる移植後42日目に、上記により調製したHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球 1×10^6 個/kgを追加輸注(Add-back)する。その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後72日目の時点で、 1×10^7 個/kgのHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球を再度Add-backする。更に、その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後102日目の時点で 1×10^7 個/kgをAdd-backする。最終のAdd-back実施の6ヵ月後に本臨床研究のフォローアップを終了する。Grade II~IVのGVHDの発症が認められた場合には、通常のCMV感染症治療に用いられる用法・用量に従ってGCV製剤を投与し、末梢血中のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球をモニターすると共にGVHD症状の沈静化能を評価する。この場合、患者の状態によっては、それまでのAdd-backの回数が1回または2回の場合、医師の判断により、GCV製剤投与後に1回のみHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球(1×10^6 個/kg)のAdd-backを許すものとする。

フォローアップ期間における臨床モニタリング実施項目は、表12に示すとおりである。

表 12 臨床モニタリング実施項目

評価事項	モニタリング実施項目
治療全体の安全性	血液学的検査、血液生化学検査、免疫学的検査、感染症検査、尿定性検査、有害事象
遺伝子治療安全性	RCR、LAM (linear amplification-mediated)-PCR (polymerase chain reaction)
移植生着	骨髓像、キメリズム
免疫系再構築	リンパ球免疫表現型 (CD3+、CD4+、CD8+等)
血中動態	フローサイトメトリー解析、PCR
GVHD 発症に対する GCV 製剤による鎮静効果	GVHD 症状、血中動態、免疫組織染色
副次的エンドポイント	再発までの時間、死亡に至るまでの時間、感染症の種類・発症件数・発症時期

V.1.3 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

本遺伝子治療の対象患者は、HLA 適合又は HLA 1 座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者である。この患者においては、移植治療は必須かつ急務であり、ミスマッチ移植および臍帯血移植が候補として考えられる。

① ミスマッチ移植

以下に、ミスマッチ移植の課題の解決策を段階的に、他の治療手段との比較を示しながら示す。

【ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植】

ミスマッチ移植における T 細胞除去の利点は、上述のとおり [V.1.1「対象疾患に関する現時点での知見」【ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植（ミスマッチ移植）の現状と課題】の項参照]、重篤な GVHD 予防に最も有効な手段であり、近年の細胞分離装置の進歩により混入する CD3 陽性細胞の少ない高純度の CD34 陽性細胞が得られるようになったため、移植後の重篤な GVHD 発症をほぼ完全に回避できるまでになっている。ただし、その反面、移植後の免疫抑制状態が感染症を引き起こすリスクを高めており、また再発などの問題も指摘されているため、早期の免疫系再構築、及び GVM 効果が課題となる。

【T細胞除去ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植+Tリンパ球 Add-back】

前項に記載のとおり、T 細胞除去ミスマッチ移植においては、移植後の早期免疫系再構築が、重篤な感染症等による移植関連死を防御する上で最大の課題であり、T 細胞除去ミスマッチ移植時と同じドナーに由来する T リンパ球の Add-back は、理論的に有効な手段と考えられる。しかし、Aversa Fらの報告(22)にあるとおり、少量の T リンパ球の Add-back でも致死的な GVHD を発症した例があり、この点での改善が必須である。

【Tリンパ球 Add-back vs HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back】

本遺伝子治療では、T細胞除去ミスマッチ移植後の早期に免疫系を再構築するために、同一ドナー由来の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する計画である。これは、前項に示したとおり、Add-back した T リンパ球が直接要因となる致死性 GVHD 発症に対する対策として、安全装置である自殺機能を当該 T リンパ球に付与するという考えに基づく。GVHD 発症に対する治療手段としては、シクロスポリン製剤又はタクロリムス製剤といった免疫抑制剤や副腎皮質ステロイド製剤の併用が考えられるが、移植後の Grade II 以上の急性 GVHD に対して標準的なステロイド治療を含む種々の治療法を行っても、部分反応 (PR) 以上の効果が認められる確率は 50%に至っていない(38, 39)。また、いずれも非特異的に免疫系を抑制することから、急速に易感染性を高め、重度の感染症頻度が

顕著に増加するリスクを伴う。一方、本遺伝子治療では、GCV 製剤投与により HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球のみを選択的に抹消でき、理論的には移植した造血幹細胞由来の免疫系には影響を与えずに GVHD を選択的に沈静化できる可能性が期待される。実際、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を移入した後に GCV 製剤が投与された臨床試験例では、ほぼ全例で自殺機能が確認され、GVHD 沈静化に至っている。また、遺伝子治療に関連する有害事象報告は皆無である(40-42)。

② 臍帯血移植

臍帯血移植については、上述したとおり（「V.1.1 対象疾患に関する現時点での知見」【造血器悪性腫瘍患者に対する造血幹細胞移植の現状】の項参照）、近年、その件数が増大し、その評価は定まりつつある。事実、国立がんセンター中央病院においても、2006 年度に適応があると判断された患者計 8 例の臍帯血移植を施行している、しかし一方では、成人に適用する場合の細胞数不足及び移植後療法としてのドナーリンパ球輸注などの細胞療法が不可能であることなどが問題点として挙げられている。細胞数不足に対しては複数臍帯血移植や臍帯血体外増幅といった試みもなされているが、未だ研究段階であり最終的な評価は定まっていない。臍帯血移植と HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 療法である本遺伝子治療の比較を表 13 に示す。

表 13 臍帯血移植と本遺伝子治療の比較

視点	臍帯血移植	本遺伝子治療
<ul style="list-style-type: none"> ●HLA 一致度 ●GVHD によるリスク ●移植までの時間 ●ドナーの負担 	<ul style="list-style-type: none"> ●1-2 座の HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、重症例は少ない。 ●ドナープールに適合するものがあれば、検索開始から最短 7～10 日間で施行することが可能。 ●なし。 	<ul style="list-style-type: none"> ●3 座までの HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、自殺機能で制御可能。 ●血縁ドナーが原則であるため、遺伝子導入 T リンパ球の調製期間も含め、最短 2～3 週間で施行することが可能。 ●他の移植*と同等の負担に加え、遺伝子導入 T リンパ球調製のための末梢血単核球及び血漿の採取が行われる。遺伝子導入 T リンパ球調製後に、細胞が規格を満たさないことが判明した場合、本遺伝子治療が行えない可能性がある。
<ul style="list-style-type: none"> ●移植スケジュールの調整 ●ドナーからの感染症 ●GVM 効果 ●拒絶・生着不全 	<ul style="list-style-type: none"> ●患者の都合のみで調整可能。 ●リスクは低い。 ●期待できる。 ●報告によっては 15%前後の症例で見られ、移植する細胞数の不足に関連して不全の頻度が高まる。生着しても時間のかかる場合が多い。 ●複数臍帯血移植の検討が開始されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ●ドナー、患者の双方の都合を調整する必要がある。 ●他の移植*と同等であるが、事前に確認することで回避可能。 ●期待できる。 ●他の移植*と同等。
<ul style="list-style-type: none"> ●治療関連毒性 ●再発時の対応 ●遺伝性疾患伝播 	<ul style="list-style-type: none"> ●生着不全・造血回復の遅延に伴う、治療関連毒性が多い。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注ができない。 ●可能性は否定できない。 	<ul style="list-style-type: none"> ●移植後、免疫系再構築までの期間は感染症のリスクが高まる。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注が可能。 ●可能性は否定できないが、血縁ドナーが原則ゆえに排除しやすい。

*：臍帯血移植を除く

参考資料：・高橋 聡. 成人に対する臍帯血移植の現況. 医学のあゆみ, 218(4):271-275, 2006.

・甲斐俊朗. 成人への臍帯血移植. 今日の移植, 19(3):250-255, 2006.

・高橋 聡, 浅野茂隆. 臍帯血移植. 癌と化学療法, 31(3):307-313, 2004.

・加藤俊一. 臍帯血移植, 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会教育講演 5, 2006.

臍帯血移植の利点である「ドナーの負担がない」という点では、本遺伝子治療は通常の移植以上にドナーへの負担を強いるものであり、臍帯血移植のほうが優れている。しかしながら、臍帯血移植の代表的な問題点である移植細胞数の不足、造血回復の遅延、生着不全の頻度の高さについては、本遺伝子治療では解決策を見出せる可能性がある。その他にも、特に高リスク造血器悪性腫瘍患者を対象とする場合には、GVM 効果を有することやドナーリンパ球輸注が可能であることは重要であると考えられる。臍帯血移植と比較すると本遺伝子治療では GVM 効果の発現が早期に期待できると考えられ、かつ状況に応じてドナーリンパ球輸注が実施可能であり、これらの点においても本遺伝子治療は有効な治療となりうる。

以上から、臍帯血移植と本遺伝子治療を比較した場合、本遺伝子治療は悪性度の高い疾患において、臍帯血移植を凌駕する可能性のある治療法になりうると考えられる。

ドナーの負担という点では、本遺伝子治療の個々の症例への適応については、治療効果や得られる利益等について慎重かつじゅうぶんな検討が必要である。しかしながら、本遺伝子治療は、一連の治療法の課題に対する解決策を模索した上で計画されたものであり、これまでの臨床実績からも安全性及び有効性が見込まれるものとして妥当な手法と考え選択した。

VI. 遺伝子の種類及びその導入方法

VI. 1 人に導入する遺伝子の構造と性質

本臨床研究において発現する遺伝子は Δ LNGFR 遺伝子と HSV-TK 遺伝子である。導入されるが発現しないベクターDNA等の構造と性質は、VI. 5「ウイルスベクター⁴⁹を用いた遺伝子導入」の項で述べられている。

VI. 1. 1 人に導入する遺伝子の構造

VI. 1. 1. 1 細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子 (Δ LNGFR 遺伝子)

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (truncated low-affinity nerve growth factor receptor: Δ LNGFR) をコードする遺伝子である(43-45)。ヒト低親和性神経成長因子受容体 (human low affinity nerve growth factor receptor: LNGFR) 遺伝子は、1986年 Johnson らによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離され(43)、427アミノ酸からなるポリペプチドをコードする1,281塩基対と終止コドン TAG より成り立っている。N末端から、28アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして6個のシステイン残基を保存位置とする40アミノ酸からなるポリペプチドの4回繰り返し配列、セリン/スレオニンリッチ領域、1回膜貫通領域、及び155アミノ酸を有する細胞内領域という構造からなっている。今回使用する Δ LNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子の cDNA から細胞内領域をコードする塩基対を除去したもので、翻訳開始コドン ATG の上流に113塩基対の非翻訳領域を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の280アミノ酸からなるポリペプチドをコードする956塩基対の遺伝子である。図10に Δ LNGFR 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。下線部分が細胞内領域の変更部位である。

LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA		
Δ LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA		
LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG		
Δ LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG		
LNGFR	CTGCCGCGGGAGGCGGGCG	M G A G A T G R	8 AA
Δ LNGFR	CTGCCGCGGGAGGCGGGCG	ATG GGG GCA GGT GCC ACC GGC CGC	137 b
		M G A G A T G R	8 AA
LNGFR	A M D G P R L L L L L L L G V		23 AA
Δ LNGFR	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG		182 b
	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG		182 b
	A M D G P R L L L L L L L G V		23 AA
LNGFR	S L G G A K E A C P T G L Y T		38 AA
Δ LNGFR	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA		227 b
	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA		227 b
	S L G G A K E A C P T G L Y T		38 AA
LNGFR	H S G E C C K A C N L G E G V		53 AA
Δ LNGFR	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG		272 b
	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG		272 b
	H S G E C C K A C N L G E G V		53 AA
LNGFR	A Q P C G A N Q T V C E P C L		68 AA
Δ LNGFR	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG		317 b
	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG		317 b
	A Q P C G A N Q T V C E P C L		68 AA
LNGFR	D S V T F S D V V S A T E P C		83 AA
Δ LNGFR	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC		362 b
	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC		362 b
	D S V T F S D V V S A T E P C		83 AA
LNGFR	K P C T E C V G L Q S M S A P		98 AA
Δ LNGFR	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG		407 b
	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG		407 b
	K P C T E C V G L Q S M S A P		98 AA
LNGFR	C V E A D D A V C R C A Y G Y		113 AA
Δ LNGFR	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC		452 b
	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC		452 b
	C V E A D D A V C R C A Y G Y		113 AA
LNGFR	Y Q D E T T G R C E A C R V C		128 AA
Δ LNGFR	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC		497 b
	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC		497 b
	Y Q D E T T G R C E A C R V C		128 AA
LNGFR	E A G S G L V F S C Q D K Q N		143 AA
Δ LNGFR	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC		542 b
	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC		542 b
	E A G S G L V F S C Q D K Q N		143 AA

		T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA	
LNGFR		ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b	
Δ LNGFR		ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b	
		T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA	
		N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA	
LNGFR		AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b	
Δ LNGFR		AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b	
		N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA	
		E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA	
LNGFR		GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b	
Δ LNGFR		GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b	
		E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA	
		E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA	
LNGFR		GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b	
Δ LNGFR		GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b	
		E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA	
		G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA	
LNGFR		GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b	
Δ LNGFR		GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b	
		G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA	
		P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA	
LNGFR		CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b	
Δ LNGFR		CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b	
		P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA	
		T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA	
LNGFR		ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b	
Δ LNGFR		ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b	
		T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA	
		D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA	
LNGFR		GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b	
Δ LNGFR		GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b	
		D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA	
		細胞外領域 ←			1 回膜貫通領域							細胞内領域 →						
		V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	S	C	278 AA	
LNGFR		GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGC	TGC	947 b	
Δ LNGFR		GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGG	GGG	947 b	
		V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	R	G	278 AA	
		K	Q	N	K	Q	G	A	N	S	R	P	V	N	Q	T	293 AA	
LNGFR		AAG	CAG	AAC	AAG	CAA	GGA	GCC	AAC	AGC	CGG	CCA	GTG	AAC	CAG	ACG	992 b	
Δ LNGFR		<u>ATC</u>	<u>CTC</u>	<u>TAG</u>													956 b	
		<u>I</u>	<u>L</u>	<u>*</u>													280 AA	
		P	P	P	E	G	E	K	L	H	S	D	S	G	I	S	308 AA	
LNGFR		CCC	CCA	CCA	GAG	GGA	GAA	AAA	CTC	CAC	AGC	GAC	AGT	GGC	ATC	TCC	1037 b	
		V	D	S	Q	S	L	H	D	Q	Q	P	H	T	Q	T	323 AA	
LNGFR		GTG	GAC	AGC	CAG	AGC	CTG	CAT	GAC	CAG	CAG	CCC	CAC	ACG	CAG	ACA	1082 b	

LNGFR	A S G Q A L K G D G G L Y S S	338 AA
	GCC TCG GGC CAG GCC CTC AAG GGT GAC GGA GGC CTC TAC AGC AGC	1127 b
LNGFR	L P P A K R E E V E K L L N G	353 AA
	CTG CCC CCA GCC AAG CGG GAG GAG GTG GAG AAG CTT CTC AAC GGC	1172 b
LNGFR	S A G D T W R H L A G E L G Y	368 AA
	TCT GCG GGG GAC ACC TGG CGG CAC CTG GCG GGC GAG CTG GGC TAC	1217 b
LNGFR	Q P E H I D S F T H E A C P V	383 AA
	CAG CCC GAG CAC ATA GAC TCC TTT ACC CAT GAG GCC TGC CCC GTT	1262 b
LNGFR	R A L L A S W A T Q D S A T L	398 AA
	CGC GCC CTG CTT GCA AGC TGG GCC ACC CAG GAC AGC GCC ACA CTG	1307 b
LNGFR	D A L L A A L R R I Q R A D L	413 AA
	GAC GCC CTC CTG GCC GCC CTG CGC CGC ATC CAG CGA GCC GAC CTC	1352 b
LNGFR	V E S L C S E S T A T S P V *	427 AA
	GTG GAG AGT CTG TGC AGT GAG TCC ACT GCC ACA TCC CCG GTG TGA	1397 b

図 10 LNGFR 遺伝子と ΔLNGFR 遺伝子の塩基配列比較

下線部分は細胞内領域の変更部位

VI. 1. 1. 2 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK 遺伝子)

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ (herpes simplex virus 1-thymidine kinase: HSV-TK) をコードする遺伝子であり、1981 年、Wagner MJ らによりヒト単純ヘルペス 1 型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされた(46)。単一エクソンからなり、翻訳開始コドン ATG の上流に 107 塩基対の非翻訳領域を有し、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。今回使用する HSV-TK 遺伝子は、CL101 株の DNA を BamH I と EcoR I で処理した後平滑末端化して LXS N の Hpa I サイトにクローニングされた 1,128 塩基対を含む 1,131 塩基対の遺伝子であり、翻訳開始コドン ATG の上流に 14 塩基対の非翻訳領域を有する。図 11 に HSV-TK 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

GATCCGCCGCCACC	ATG	GCT	TCG	TAC	CCC	TGC	CAT	CAA	CAC	GCG	TCT	47			
	M	A	S	Y	P	C	H	Q	H	A	S				
GCG	TTC	GAC	CAG	GCT	GCG	CGT	TCT	CGC	GGC	CAT	AGC	AAC	CGA	CGT	92
A	F	D	Q	A	A	R	S	R	G	H	S	N	R	R	
ACG	GCG	TTG	CGC	CCT	CGC	CGG	CAG	CAA	GAA	GCC	ACG	GAA	GTC	CGC	137
T	A	L	R	P	R	R	Q	Q	E	A	T	E	V	R	
CTG	GAG	CAG	AAA	ATG	CCC	ACG	CTA	CTG	CGG	GTT	TAT	ATA	GAC	GGT	182
L	E	Q	K	M	P	T	L	L	R	V	Y	I	D	G	
CCT	CAC	GGG	ATG	GGG	AAA	ACC	ACC	ACC	ACG	CAA	CTG	CTG	GTG	GCC	227
P	H	G	M	G	K	T	T	T	T	Q	L	L	V	A	
CTG	GGT	TCG	CGC	GAC	GAT	ATC	GTC	TAC	GTA	CCC	GAG	CCG	ATG	ACT	272
L	G	S	R	D	D	I	V	Y	V	P	E	P	M	T	
TAC	TGG	CAG	GTG	CTG	GGG	GCT	TCC	GAG	ACA	ATC	GCG	AAC	ATC	TAC	317
Y	W	Q	V	L	G	A	S	E	T	I	A	N	I	Y	
ACC	ACA	CAA	CAC	CGC	CTC	GAC	CAG	GGT	GAG	ATA	TCG	GCC	GGG	GAC	362
T	T	Q	H	R	L	D	Q	G	E	I	S	A	G	D	
GCG	GCG	GTG	GTA	ATG	ACA	AGC	GCC	CAG	ATA	ACA	ATG	GGC	ATG	CCT	407
A	A	V	V	M	T	S	A	Q	I	T	M	G	M	P	
TAT	GCC	GTG	ACC	GAC	GCC	GTT	CTG	GCT	CCT	CAT	GTC	GGG	GGG	GAG	452
Y	A	V	T	D	A	V	L	A	P	H	V	G	G	E	
GCT	GGG	AGT	TCA	CAT	GCC	CCG	CCC	CCG	GCC	CTC	ACC	CTC	ATC	TTC	497
A	G	S	S	H	A	P	P	P	A	L	T	L	I	F	
GAC	CGC	CAT	CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	CGA	542
D	R	H	P	I	A	A	L	L	C	Y	P	A	A	R	
TAC	CTT	ATG	GGC	AGC	ATG	ACC	CCC	CAG	GCC	GTG	CTG	GCG	TTC	GTG	587
Y	L	M	G	S	M	T	P	Q	A	V	L	A	F	V	
GCC	CTC	ATC	CCG	CGG	ACC	TTG	CCC	GGC	ACA	AAC	ATC	GTG	TTG	GGG	632
A	L	I	P	P	T	L	P	G	T	N	I	V	L	G	
GCC	CTT	CCG	GAG	GAC	AGA	CAC	ATC	GAC	CGC	CTG	GCC	AAA	CGC	CAG	677
A	L	P	E	D	R	H	I	D	R	L	A	K	R	Q	
CGC	CCC	GGC	GAG	CGG	CTT	GAC	CTG	GCT	ATG	CTG	GCC	GCG	ATT	CGC	722
R	P	T	E	R	L	D	L	A	M	L	A	A	I	R	
CGC	GTT	TAC	GGG	CTG	CTT	GCC	AAT	ACG	GTG	CGG	TAT	CTG	CAG	GGC	767
R	V	Y	G	L	L	A	N	T	V	R	Y	L	Q	G	
GGC	GGG	TCG	TGG	TGG	GAG	GAT	TGG	GGA	CAG	CTT	TCG	GGG	ACG	GCC	812
G	G	S	W	W	E	D	W	G	Q	L	S	G	T	A	
GTG	CCG	CCC	CAG	GGT	GCC	GAG	CCC	CAG	AGC	AAC	GCG	GGC	CCA	CGA	857
V	P	P	Q	G	A	E	P	Q	S	N	A	G	P	R	
CCC	CAT	ATC	GGG	GAC	ACG	TTA	TTT	ACC	CTG	TTT	CGG	GCC	CCC	GAG	902
P	H	I	G	D	T	L	F	T	L	F	R	A	P	E	
TTG	CTG	GCC	CCC	AAC	GGC	GAC	CTG	TAT	AAC	GTG	TTT	GCC	TGG	GCC	947
L	L	A	P	N	G	D	L	Y	N	V	F	A	W	A	
TTG	GAC	GTC	TTG	GCC	AAA	CGC	CTC	CGT	CCC	ATG	CAC	GTC	TTT	ATC	992
L	D	V	L	A	K	R	L	R	P	M	H	V	F	I	
CTG	GAT	TAC	GAC	CAA	TCG	CCC	GCC	GGC	TGC	CGG	GAC	GCC	CTG	CTG	1037
L	D	Y	D	Q	S	P	A	G	C	R	D	A	L	L	
CAA	CTT	ACC	TCC	GGG	ATG	GTC	CAG	ACC	CAC	GTC	ACC	ACC	CCA	GGC	1082
Q	L	T	S	G	M	V	Q	T	H	V	T	T	P	G	
TCC	ATA	CCG	ACG	ATC	TGC	GAC	CTG	GCG	CGC	ACG	TTT	GCC	CGG	GAG	1127
S	I	P	T	I	C	D	L	A	R	T	F	A	R	E	
ATG	GGG	GAG	GCT	AAC	TGA	1145									
M	G	E	A	N	*										

図 11 HSV-TK 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列