

## VI. 1. 2 人に導入する遺伝子の性質

LNGFR は主に神経系細胞に発現する膜貫通型の神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) に対する受容体で、神経細胞以外では筋肉、精巣で発現しているが、ほとんどの造血系細胞には発現していない(47)。現在、tropomyosin-related kinase (Trk) と結合することで高親和性の神経成長因子受容体を形成すると報告されており、LNGFR 単独では NGF の刺激を細胞内に伝播することはない(48)。

HSV-TK はウイルス特有のチミジンキナーゼで、ヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なった基質特異性を有し、グアノシンの類似物質である ACV や GCV をリン酸化することが可能である(49, 50)。ACV や GCV は生物活性が低いプロドラッグ (prodrug) と呼ばれ、HSV-TK を発現していない細胞に対しては何ら毒性を示さないが、ウイルス感染等により HSV-TK が発現している細胞では ACV や GCV がリン酸化され、最終的に細胞を死に至らしめる。このように HSV-TK は ACV や GCV との組み合わせにより生物活性を示す特異な酵素である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、標的細胞上の受容体にウイルス粒子の外皮表面に存在するエンベロープが結合することにより、ウイルスと細胞の膜融合が起こり、ウイルスゲノム RNA 及び逆転写酵素等のウイルスの感染に必要な酵素が細胞内へ侵入する。細胞内に入った後、逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA から 2 本鎖 DNA が合成され、核内に移行する。5'-LTR と 3'-LTR ではさまれた DNA はウイルスが持っているインテグラーゼによって細胞染色体に組み込まれ (プロウイルス)、細胞ゲノムの複製に伴って複製されて安定的に娘細胞へ受け継がれる。このために継続的な遺伝子発現が可能である。

細胞染色体に組み込まれた  $\Delta$ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子は、SFCMM-3 内部のプロモーターである SV40 初期プロモーター及びウイルス末端反復配列 (long terminal repeat: LTR) プロモーターによってそれぞれ発現し、その発現はいずれも持続的である。

## VI. 1. 3 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性

### VI. 1. 3. 1 $\Delta$ LNGFR の生物活性

$\Delta$ LNGFR は、細胞内領域のほとんど (LNGFR の第 277 アミノ酸から最終第 427 アミノ酸まで) が除去されているため、シグナルを細胞内に伝達することはない。in vitro 及び in vivo において、 $\Delta$ LNGFR の機能活性は観察されず(45)、また Bonini C らの報告(51)により、本研究で用いるレトロウイルスベクター-SFCMM-3 と同じ  $\Delta$ LNGFR 遺伝子を別のレトロウイルスベクター-SFCMM-2 により活性化ヒト T リンパ球に導入し、NGF 濃度依存的な、i) 細胞増殖、ii) CD25 発現、及び iii) 腫瘍壊死因子 (TNF)  $-\alpha$  産生による細胞傷害活性を経時的に調査した結果、遺伝子導入ヒトリンパ球は、遺伝子非導入ヒトリンパ球と同様に、NGF に対する反応を示さないことが確認された。なお、 $\Delta$ LNGFR 遺伝子が導入される T リンパ球は、通常、LNGFR を殆ど発現していないことが確認されている(45)。

$\Delta$ LNGFR は細胞膜でたん白発現するため細胞表面マーカーとして利用され、特異的抗体を用いて in vitro で発現細胞を迅速に分離することができ、ex vivo での発現細胞の検出や

生存状態、増殖状態等のキャラクタリゼーションを行うことができる。

### VI. 1. 3. 2 HSV-TK の生物活性

HSV-TK は 376 アミノ酸からなるたん白質であり、本剤により遺伝子導入した細胞において自殺遺伝子産物として機能する。自殺遺伝子が導入された細胞では、その遺伝子産物により非毒性のプロドラッグが毒性型ドラッグに変換され、細胞が傷害を受ける。HSV-TK はガンシクロビル (GCV) をリン酸化することにより GCV 一リン酸を生成し、GCV 一リン酸は細胞由来のキナーゼにより GCV 三リン酸に変換される。GCV 三リン酸は dGTP に代わって合成中の DNA に取り込まれることにより DNA 合成を阻害し、細胞は死に至る (52)。ほ乳類のチミジンキナーゼで GCV はリン酸化されないが、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞では GCV 三リン酸が生成するので、HSV-TK 遺伝子導入細胞は *in vitro* 及び *in vivo* で選択的に死滅させることができる (53, 54)。

## VI. 2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では使用しない。

## VI. 3 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

移植片対悪性腫瘍 (graft-versus-malignancy: GVM) 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T リンパ球であることが多くの実験から支持されている一方、当該細胞が GVHD の原因となることが知られている。T リンパ球は組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) の存在下で培養可能であり、抗 CD3 抗体の刺激により活性化され、活発な増殖を開始する。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は増殖中の細胞を標的としており、活性化された T リンパ球に対しても高い遺伝子導入効率が得られることが過去の臨床研究により証明されている (55, 56)。したがって、レトロウイルスベクター SFCMM-3 を用いた遺伝子治療においては、ドナーリンパ球を rhIL-2 存在下、抗 CD3 抗体で刺激することにより得られる活性化 T リンパ球が標的細胞として使用される。

## VI. 4 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

### VI. 4. 1 遺伝子導入方法の概略

ドナー末梢血リンパ球への  $\Delta$ LNGFR 及び HSV-TK 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクター SFCMM-3 を含むウイルス産生細胞の培養上清中にドナー末梢血リンパ球を加え、遠心することで行う。遺伝子導入工程を含む遺伝子導入細胞の調製方法の詳細を VII. 3. 1 「遺伝子導入細胞の調製方法」に記載する。

### VI. 4. 2 当該導入法を選択した理由

ドナー末梢血 T リンパ球への  $\Delta$ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子を導入する方法としてレ

トロウイルスベクターを選択した理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されていること (55-59)、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。また安全性に関して、CD34 陽性細胞を標的とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療では白血病発症の報告がされているが、過去の T 細胞遺伝子治療において重篤な副作用は報告されていない (55-58, 60)。

#### VI. 4. 3 レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターや Naked DNA ベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。例えば、Naked DNA が細胞染色体に組み込まれる確率は  $1.5 / 1 \times 10^4$  (61) 又は  $1 / 1 \times 10^4$  (62) 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は  $1 / 1 \times 10^3 \sim 5$  程度であると報告されている (63)。すなわち、細胞染色体に組み込まれ、長期にわたって導入遺伝子が安定して発現する効率は、これらベクターでは非常に低いものである。

一方、レトロウイルスにより遺伝子導入された細胞において、導入遺伝子はすべて細胞染色体に組み込まれている。例えば、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が 50% 以上であるとの報告もあり、他の方法に比べると格段に高く (64)、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、基になる SFCMM-3 DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全てもしくは一部を欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞\*10 株 GP+envAm12 は、すでに世界的に広く使用されているパッケージング細胞株であり、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である。本パッケージング細胞株は、gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて導入されているため、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる (65)。

#### VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

##### VI. 5. 1 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、以下のようないウイルス学的特徴を持つ (66, 67)。

形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが

囲っている。ウイルスゲノムは分子量約  $3 \times 10^6$  の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス (orthoretrovirus) 及びスプーマレトロウイルス (spumaretrovirus) の 2 つの亜科に分類される。MoMLV はオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血病ウイルスの一種である。

マウス白血病ウイルスは AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであるが、MoMLV は実験室内での継代により病原性の高いウイルス株として単離されたものである。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血病ウイルスはウイルスと細胞の間での遺伝子の組換えにより形成されるが、MoMLV は細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血病所見を示し、脾臓への浸潤が顕著に認められる。AKR マウスの自然発症白血病に対しては抗 AKR MLV 血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLV に対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

## VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法

### VI. 5. 2. 1 SFCMM-3 DNA ベクターの構築

本臨床研究で用いられる SFCMM-3 DNA ベクターは、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。すなわち、ベースとなるレトロウイルスベクターは pLXSN (68) で、その遺伝子概略を図 12 に示す。

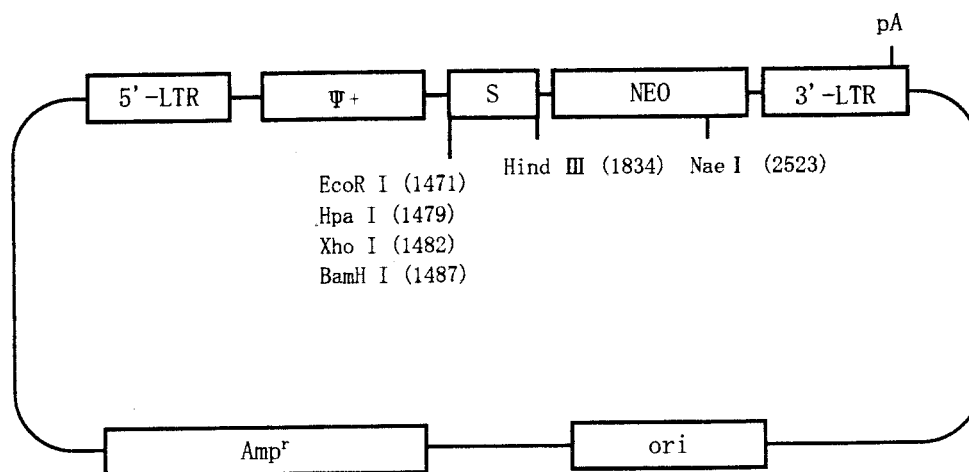


図 12 pLXSN の遺伝子構造の概略

LTR: Long Terminal Repeat、Ψ+: パッケージングシグナル、S: SV40 初期プロモーター、NEO: ネオマイシン耐性遺伝子、pA: poly A 付加シグナル

このベクターから制限酵素 Hind III と Nae I を用いてネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除き、SV40 初期プロモーターの下流に  $\Delta$ LNGFR 遺伝子を組み込み、さらに制限酵素 Hpa I で切断して HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。その遺伝子概略を図 13 に示す。SFCMM-3 DNA ベクターにおいて、LXSN 由来の配列部分は、5' -LTR 及び、パッケージングシグナル、SV40 初期プロモーター、3' -LTR、poly A 付加シグナルである。SFCMM-3 DNA ベクターはウイルス粒子形成に必須な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、この DNA ベクターのみを通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。

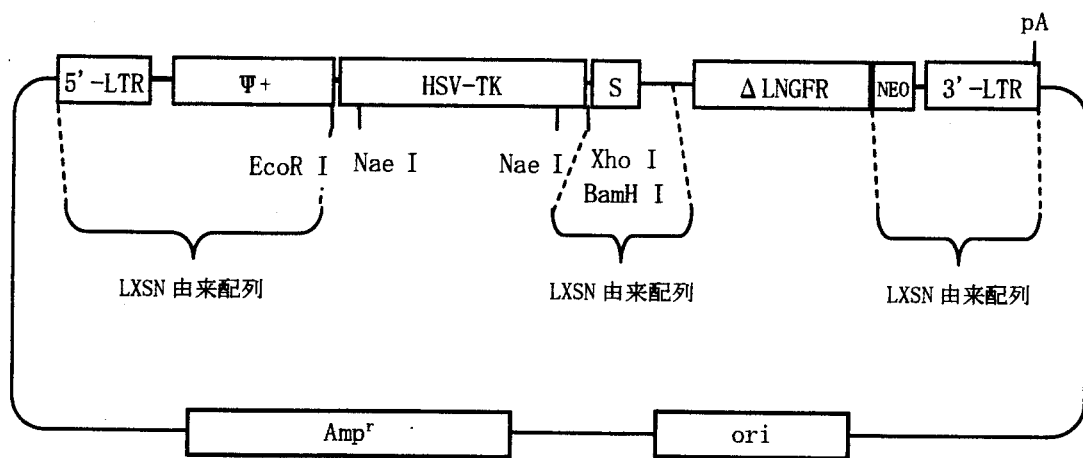


図 13 SFCMM-3 DNA ベクターの遺伝子構造の概略

| 配列名                                 | 塩基数           | 由来              |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|
| 5' -LTR : 5' -Long Terminal Repeat  | (1 - 594)     | MoMSV           |
| Ψ+ : パッケージングシグナル                    | (664 - 1473)  | MoMSV、<br>MoMLV |
| HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子 | (1498 - 2628) | HSV             |
| S : SV40 初期プロモーター                   | (2636 - 2992) | SV40            |
| $\Delta$ LNGFR : 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子  | (3113 - 3955) | ヒト              |
| NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部                | (3960 - 4123) | 大腸菌             |
| 3' -LTR : 3' -Long Terminal Repeat  | (4183 - 4776) | MoMLV           |
| pA : poly A 付加シグナル                  | (4678)        | MoMLV           |

#### VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築

SFCMM-3 DNA ベクターは、ウイルス粒子形成に必須な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このベクター DNA のみではウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本臨床研究において使用する

パッケージング細胞株は、GP+envAm12 (ATCC CRL-9641) (65)で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を2種類のプラスミド(ひとつは gag と pol で、もうひとつは env 遺伝子)で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このアプローチはRCR出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

以下にパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12) 及び GP+E-86 (69)の構築手順を示す。

- 1) MoMLV の gag 遺伝子、pol 遺伝子及び選択マーカーの gpt 遺伝子配列を持ち、かつ $\Psi$ パッケージングシグナルと 3'-LTR を持たないプラスミド pgag-polgpt を、マウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 にエレクトロポレーション法にてトランスフェクションし、薬剤 (Hypoxanthine、Xanthine、Mycophenolic acid) で遺伝子導入細胞を選択した。
- 2) 選択した細胞株に、マウスアンフォトロピックウイルス<sup>11</sup>4070A 由来の env 遺伝子を持ち、かつ $\Psi$ パッケージングシグナルと 3'-LTR を持たないプラスミド penvAm、及び Hygromycin 耐性遺伝子を持つプラスミド pRSVhyg を共にトランスフェクションし、Hygromycin B で env 遺伝子導入細胞を選択する。使用した全てのプラスミドは、 $\Psi$ パッケージングシグナルと 3'-LTR を持たないため、この方法により、ウイルス由来の gag、pol、env は発現するが RCR を産生しないアンフォトロピック (ヒトを含む多くの哺乳類に感染性を有する) パッケージング細胞株 Am12 を樹立した。
- 3) 前述の pgag-polgpt と、MoMLV の env を発現するプラスミド pEnv を NIH 3T3 細胞に導入することにより、エコトロピック (マウス細胞にのみ感染性を有する) パッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) を構築した。

### VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、48 時間後の培養上清を回収した。この培養上清には、効率よく Am12 に感染するレトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 が含まれる。回収した上清をアンフォトロピックパッケージング細胞株 Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞が構築され、ヒトを含む多くの哺乳類細胞に感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターが産生される。

レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 感染 Am12 細胞から、良好な生育性と T リンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。

### VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造

本遺伝子治療臨床研究において使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、バンキン

グされたウイルス産生細胞株〔MCB、又はワーキングセルバンク (WCB)〕を培養し、その上清中にウイルス粒子の状態が存在する。

製造は全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。

### VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略を図 14 に、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 DNA の全塩基配列を図 15 に示す。HSV-TK は 5'-LTR により、 $\Delta$ LNGFR は内在性プロモーターである SV40 初期プロモーターにより転写が誘導される。SFCMM-3 はパッケージングシグナルとして  $\Psi^+$  を有し、gag、pol、env をコードする遺伝子は除かれている。



図 14 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略

5' : 5'-LTR、 $\Psi^+$  : パッケージングシグナル、S : SV40 初期プロモーター、HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子、 $\Delta$ LNGFR : 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子、NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部、3' : 3'-LTR

|   |      |
|---|------|
| <b>LTR</b>  |      |
| AATGAAAGAC CCCACCTGTA GGTTTGGCAA GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC | 60   |
| ATGGAAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA AGGTCAGGAA CAGATGGAAC | 120  |
| AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGGCC | 180  |
| AAGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC AAACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG | 240  |
| CCCCGGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGTCC CCAGATGCGG TCCAGCCCTC AGCAGTTTCT | 300  |
| AGAGAACCAT CAGATGTTTC CAGGGTGCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT | 360  |
| TGAACTAACC AATCAGTTCG CTTCTCGCTT CTGTTGCGGC GCTTCTGCTC CCCGAGCTCA | 420  |
| ATAAAAGAGC CCACAACCCC TCACTCGGGG CGCCAGTCTT CCGATAGACT GCGTCGCCCG | 480  |
| GGTACCCGTA TTCCAATAA AGCCTCTTGC TGTTTGCATC CGAATCGTGG TCTCGCTGTT  | 540  |
| CCTGGGAGG GTCTCCTCTG AGTGATTGAC TACCCACGAC GGGGGTCTTT CATTGGGGG   | 600  |
| <b>LTR</b>  |      |
| CTCGTCCGGG ATTTGGAGAC CCCTGCCAG GGACCACCGA CCCACCACCG GGAGGTAAGC  | 660  |
| <b>Ψ+</b>   |      |
| TGCCAGCAA CTTATCTGTG TCTGTCCGAT TGCTAGTGT CTATGTTTGA TGTTATGCCG   | 720  |
| CTGCGTCTGT ACTAGTTAGC TAACTAGCTC TGTATCTGGC GGACCCGTGG TGGAAGTAC  | 780  |
| GAGTTCTGAA CACCCGGCCG CAACCCTGGG AGACGTCCCA GGGACTTTGG GGGCCGTTTT | 840  |
| TGTGGCCCGA CCTGAGGAAG GGAGTCGATG TGAATCCGA CCCCCTCAGG ATATGTGTT   | 900  |
| CTGGTAGGAG ACGAGAACCT AAAACAGTTC CCGCTCCGT CTGAATTTTT GCTTTCGGTT  | 960  |
| TGGAACCGAA GCCGCGCTC TTGTCTGCTG CAGCGCTGCA GCATCGTTCT GTGTTGCTC   | 1020 |
| TGTCTGACTG TGTTTCTGTA TTTGTCTGAA AATTAGGGCC AGACTGTTAC CACTCCCTTA | 1080 |



|   |      |
|---|------|
| AGTTTGACCT TAGGTCCTG GAAAGATGTC GAGCGGATCG CTCACAACCA GTCGGTAGAT                        | 1140 |
| GTCAGAAGA GACGTTGGGT TACCTTCTGC TCTGCAGAAT GGCCAACCTT TAACGTCGGA                        | 1200 |
| TGGCCGCGAG ACGGCACCTT TAACCGAGAC CTCATCACCC AGGTTAAGAT CAAGGTCTTT                       | 1260 |
| TCACCTGGCC CGCATGGACA CCCAGACCAG GTCCCCTACA TCGTGACCTG GGAAGCCTTG                       | 1320 |
| GCTTTTGACC CCCCTCCCTG GGTCAGGCC TTTGTACACC CTAAGCCTCC GCCTCCTCTT                        | 1380 |
| CCTCCATCGG CCCCGTCTCT CCCCTTGAA CCTCCTCGTT CGACCCCGCC TCGATCCTCC                        | 1440 |
| CTTTATCCAG CCCTCACTCC TTCTCTAGGC GCGGGAATC GTTGATCCGC CGCCACCATG                        | 1500 |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ψ+</div>     |      |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">HSV-TK</div> |      |
| GCTTCGTACC CCTGCCATCA ACACGCGTCT GCGTTCGACC AGGCTGCGCG TTCTCGCGGC                       | 1560 |
| CATAGCAACC GACGTACGGC GTTGGCCCTT CGCCGGCAGC AAGAAGCCAC GGAAGTCCGC                       | 1620 |
| CTGGAGCAGA AAATGCCAC GCTACTGCGG GTTTATATAG ACGTCTCA CGGGATGGGG                          | 1680 |
| AAAACCACCA CCACGCAACT GCTGGTGGCC CTGGGTTTCG GCGACGATAT CGTCTACGTA                       | 1740 |
| CCCAGCCGA TGACTIONTGC GAGGTGCTG GGGGCTCCG AGACAATCGC GAACATCTAC                         | 1800 |
| ACCACACAAC ACCGCCTCGA CCAGGTGAG ATATCGGCCG GGGACGCGGC GGTGGTAATG                        | 1860 |
| ACAAGCGCCC AGATAACAAT GGGCATGCCT TATGCCGTA CCGACGCCG TCTGGCTCTT                         | 1920 |
| CATGTCGGGG GGGAGGCTGG GAGTTCACAT GCCCCGCCC CGGCCCTCAC CCTCATCTTC                        | 1980 |
| GACCGCCATC CCATCGCCGC CCTCCTGTGC TACCCGGCCG CGGATACCT TATGGGCAGC                        | 2040 |
| ATGACCCCC AGGCCGTGCT GGCCTTCGTG GCCCTCATCC CGCCGACCTT GCCCGGCACA                        | 2100 |
| AACATCGTGT TGGGGGCCCT TCCGGAGGAC AGACACATCG ACCGCCTGGC CAAACGCCAG                       | 2160 |

|  |      |
|--|------|
| CGCCCCGGCG AGCGGCTGA CCTGGCTATG CTGGCCGCGA TTCGCCGCGT TTACGGGCTG         | 2220 |
| CTTGCCAATA CGGTGCGGTA TCTGCAGGGC GGCGGGTCGT GGTGGGAGGA TTGGGGACAG        | 2280 |
| CTTTCGGGGA CGGCCGTGCC GCCCAGGGT GCCGAGCCCC AGAGCAAACGC GGGCCCACGA        | 2340 |
| CCCCATATCG GGGACACGTT ATTTACCCTG TTTCGGGCC CCGAGTTGCT GGCCCCAAC          | 2400 |
| GGCGACCTGT ATAACGTGTT TGCCTGGGCC TTGGACGTCT TGGCCAAACG CCTCCGTCCC        | 2460 |
| ATGCACGTCT TTATCCTGGA TTACGACCAA TCGCCCGCCG GCTGCCGGGA CGCCCTGCTG        | 2520 |
| CAACTTACCT CCGGGATGGT CCAGACCCAC GTCACCACCC CAGGCTCCAT ACCGACGATC        | 2580 |
| TGCGACCTGG CGGCACGTT TGCCCGGGAG ATGGGGGAGG CTAAGTGA GA ATTAAGTGA         | 2640 |
| <b>HSV-TK</b>  |      |
| <u>GGATCCGGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG</u> | 2700 |
| <u>GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG</u> | 2760 |
| <u>GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC</u> | 2820 |
| <u>CGCCCCTAAC TCCGCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCAG TCCGCCCAT TCTCCGCC</u>      | 2880 |
| <u>ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT</u> | 2940 |
| <u>TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTAATTCGGG</u> | 3000 |
| CCGCGGCCAG CTCCGGCGGG CAGGGGGGGC GCTGGAGCGC AGCGCAGCGC AGCCCCATCA        | 3060 |
| GTCCGCAAAG CGGACCGAGC TGAAGTCGA GCGCTGCCG GGGAGGCGGG CGATGGGGGC          | 3120 |
| <b>Δ LNGFR</b>   |      |
| AGGTGCCACC GGCCGCGCCA TGGACGGGCC GCGCCTGCTG CTGTTGCTGC TTCTGGGGGT        | 3180 |
| GTCCCTTGGA GGTGCCAAGG AGGCATGCC CACAGGCCTG TACACACACA GCGGTGAGTG         | 3240 |

CTGCAAAGCC TGCAACCTGG GCGAGGGTGT GGCCAGCCT TGTGGAGCCA ACCAGACCGT 3300  
 GTGTGAGCCC TGCTGGACA GCGTGACGTT CTCCGACGTG GTGAGCGCGA CCGAGCCGTG 3360  
 CAAGCCGTGC ACCGAGTGG TGGGGCTCCA GAGCATGTCG GCGCCGTGCG TGGAGGCCGA 3420  
 CGACCCGTG TGCCGCTGCG CCTACGGCTA CTACCAGGAT GAGACGACTG GCGCTGCGA 3480  
 GCGCTGCCGC GTGTGCGAGG CGGGCTCGG CCTCGTGTC TCCTGCCAGG ACAAGCAGAA 3540  
 CACCGTGTGC GAGGAGTGCC CCGACGGCAC GTATTCCGAC GAGGCCAACC ACGTGGACCC 3600  
 GTGCCTGCC TGCACCGTGT GCGAGGACAC CGAGCGCCAG CTCCGCGAGT GCACACGCTG 3660  
 GGCCGACGCC GAGTGGGAGG AGATCCCTGG CCGTTGGATT ACACGGTCCA CACCCCAGA 3720  
 GGGCTCGGAC AGCACAGCCC CCAGCACCCA GGAGCCTGAG GCACCTCCAG AACAAGACCT 3780  
 CATAGCCAGC ACGGTGGCAG GTGTGGTGAC CACAGTGATG GGCAGCTCCC AGCCCGTGGT 3840  
 GACCCGAGGC ACCACCGACA ACCTCATCCC TGTCTATTGC TCCATCCTGG CTGCTGTGGT 3900  
 TGTGGGCCTT GTGGCCTACA TAGCCTTCAA GAGGTGGAAC AGGGGGATCC TCTAGAGTCG 3960  
Δ LNGFR  
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 4020  
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCTT CGTGCTTAC GGTATCGCCG CTCCCGATT 4080  
 GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 4140  
 GATAAAATAA AAGATTTTAT TTAGTCTCCA GAAAAGGGG GGATGAAAG ACCCCACCTG 4200  
LTR  
 TAGGTTGGC AAGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGAAG GCATGAAAA ATACATAACT 4260  
 GAGAATAGAG AAGTTCAGAT CAAGTCAGG AACAGATGGA ACAGCTGAAT ATGGGCCAAA 4320

|   |      |
|---|------|
| CAGGATATCT GTGGTAAGCA GTTCCTGCCC CGGCTCAGGG CCAAGAACAG ATGGAACAGC | 4380 |
| TGAATATGGG CCAAACAGGA TATCTGTGGT AAGCAGTTCC TGCCCCGGCT CAGGGCCAAG | 4440 |
| AACAGATGGT CCCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT | 4500 |
| TCCAGGGTGC CCAAGGACC TGAAATGACC CTGTGCCTTA TTTGAACTAA CCAATCAGTT  | 4560 |
| CGCTTCTCGC TTCTGTTGCG GCGCTTCTGC TCCCCGAGCT CAATAAAAGA GCCACAACC  | 4620 |
| CCTCACTCGG GGGCCAGTC TTCGATAGA CTGCGTCGCC CGGGTACCCG TATTCCAAT    | 4680 |
| AAAGCCTCTT GCTGTTTGA TCCGAATCGT GGTCTCGCTG TTCCTGGGA GGGTCTCCTC   | 4740 |
| TGAGTGATTG ACTACCCACG ACGGGGTCT TTCATT                            | 4776 |

LTR

**図15 SFCMM-3 DNAの全塩基配列**

LXSN と相同な配列を下線で示す。

#### VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 GP+envAm12 は、アンフォトロピック系のパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。レトロウイルスは増殖中の細胞にのみ感染するので、遺伝子導入に先立って標的細胞を組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) と抗 CD3 抗体 (OKT3) で刺激する。これにより高い遺伝子導入効率が期待できる。また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。

VI. 4. 3 「レトロウイルスベクターの選択根拠」の項で述べたように、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べてより効率よく遺伝子を導入し、細胞染色体に組み込むことが可能であると言える。

## Ⅶ. 安全性についての評価

### Ⅶ.1 遺伝子導入方法の安全性

#### Ⅶ.1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

ウイルス産生細胞には、セルバンクシステムを使用する。セルバンク作製に使用した培地及び試薬は、組成と品質の確認されたものを使用している。また、マスターセルバンク (MCB) は品質試験を行うことにより、バクテリア、真菌、マイコプラズマ及びウイルスの混入がないこと、並びにエコトロピックとアンフォトロピックの RCR が無いことを確認している (MCB 及びワーキングセルバンク (WCB) の品質試験の詳細を参考資料 1 に、MCB、WCB の品質試験項目と保存中の監視計画を参考資料 2 に記載する)。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造フローを図 16 に示す。

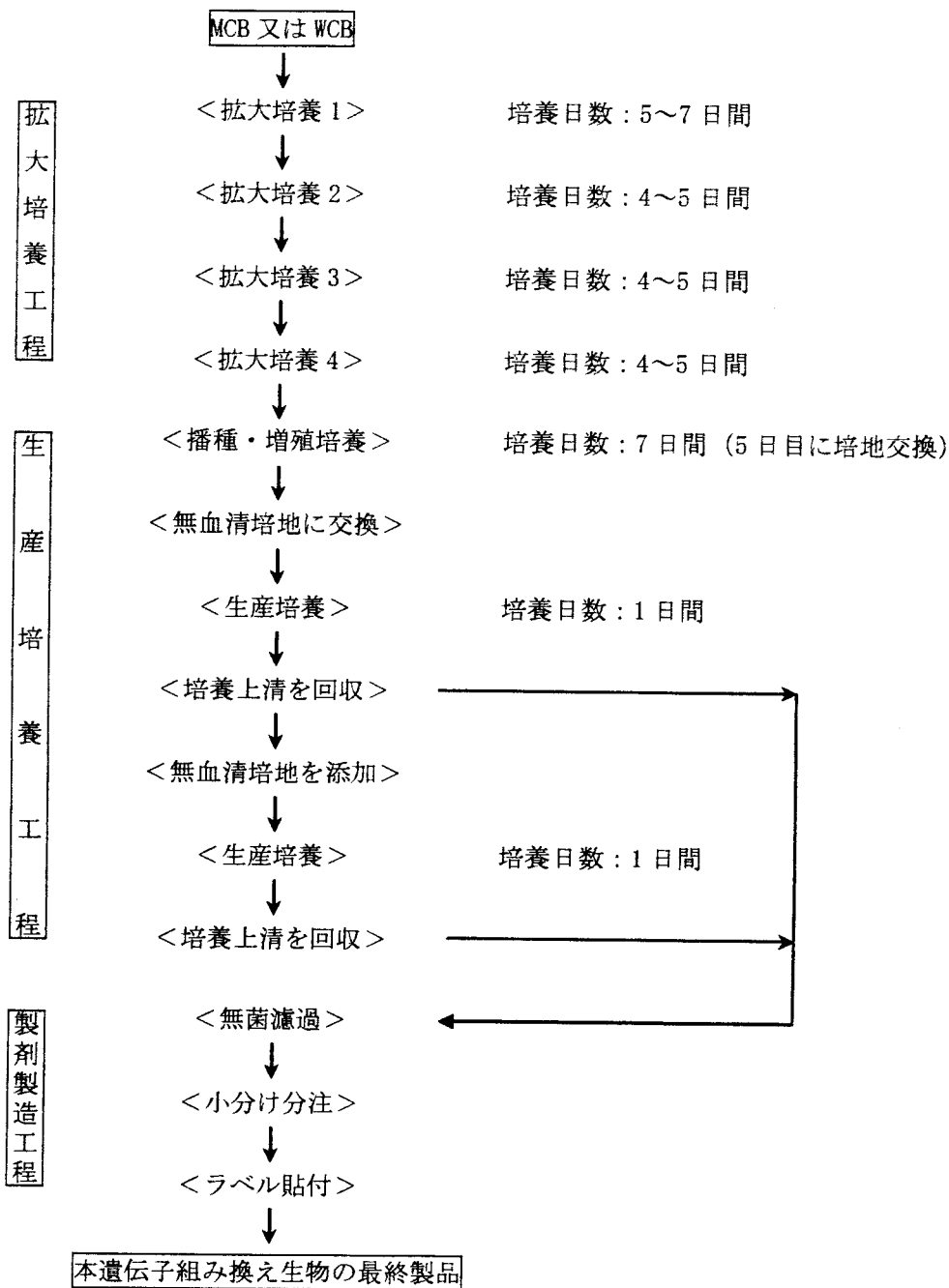


図 16 レトロウイルスベクターSFCMM-3 の製造フロー

レトロウイルスベクターSFCMM-3 は、MCB 又は WCB から培養を開始し拡大培養した後、生産培養工程の培養上清に回収される。拡大培養工程及び生産培養工程の播種・増殖培養には 10%ウシ胎児血清含有培地を用い、生産培養には無血清培地を用いる。レトロウイルスベクターSFCMM-3 の製造に使用する培地及び試薬並びにその規格を参考資料 3 に記載する。回

収した培養上清は、保管、また精製することなく引き続き製剤製造工程に用いる。製剤は、この培養上清を無菌ろ過した後、規定液量に小分け・ラベル貼付して製造する。製造は、全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。製剤は、ロットごとにウイルス安全性を含め品質試験を行う。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の品質は以下の試験を行うことにより確認する（レトロウイルスベクターの品質試験の詳細を参考資料 4 に記載する）。

1. 無菌試験（欧州薬局方）
2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
3. in vitro ウイルス試験
4. in vivo ウイルス試験
5. RCR 試験
6. エンドトキシン試験（欧州薬局方）
7. 感染効率試験
8. 組み込まれたベクター遺伝子の完全性試験
9. GCV 感受性試験
10. HSV-TK スプライス型否定試験

HSV-TK スプライス型否定試験は、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞において、227 塩基短くなっているスプライス型の HSV-TK 遺伝子を持つものがあり、GCV に対する感受性に影響を与えると報告されていることによる(70)。スプライシングに作用する酵素の基質となりうる潜在的なスプライスサイトが HSV-TK 遺伝子中に予測されており、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 により遺伝子導入したヒトリンパ球のゲノム DNA について、このサイトが正常であるものの割合を規格設定している。

本邦での臨床研究に使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、上記の品質を有し、感染性因子に対する危険性の低い生物由来成分をはじめとする培地、試薬等を用いていること、及び、モルメド社にて確立した製造方法により製造を行う予定であることから、その品質は、安全性の高いものとする。

#### Ⅶ. 1. 2 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与する物質は、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球及びその懸濁媒である RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液（CP-1）である。ウシ血清は患者にとっての異種たん白質を含有しており抗原性の問題が生じる可能性があるため使用せず、ドナー血漿を培地添加剤として用いる。細胞調製の際に用いられる培地の成分、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 懸濁液の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に生理食塩水でじゅうぶんに洗浄されるので、患者に影響を及ぼすことはない。

と考えられる。さらに懸濁媒である RPMI 1640 及び CP-1 については、本臨床研究と同様、細胞を凍結保存する目的で造血幹細胞移植等の臨床現場で広く使用されている。これらは医薬品としての承認は得ていないものの、CP-1 は移植用細胞の凍結用に使用され、また RPMI については、公式骨髄バンクレポート中に使用した浮遊液の一つとして記載されている。現時点ではこれらに由来する重篤な有害事象の報告は確認されておらず、本臨床研究における使用に関する安全性についても問題はないと考えられる。

細胞調製終了後、以下の試験を行うことにより品質を担保する。

1. 細胞生存率（トリパンブルー）
2. エンドトキシン試験（日本薬局方）
3. ΔLNGFR 発現試験
4. RCR 試験（RT-PCR 法）
5. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
6. 無菌試験（日本薬局方）
7. 細胞及び上清の RCR 試験（Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S+L-テスト）
8. マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
9. GCV 感受性試験
10. IL-2 依存的増殖試験

### Ⅶ. 1. 3 増殖性レトロウイルス（RCR）出現の可能性

#### Ⅶ. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性

本研究で使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全部、若しくは一部を欠如している。また、用いるパッケージング細胞株 GP+envAml2 において、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片とが染色体上の異なった位置に挿入されているので、RCR の出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 上清の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性の製剤だけを臨床使用する。また、治療開始後には患者末梢血中の RCR を RT-PCR 法により、最終 add-back 後、1 ヶ月後の 14 日目及び 28 日目、3 ヶ月後の 14 日目、6 ヶ月後の 28 日目並びにそれ以後の患者生存期間中は 1 年ごとに測定する。

#### Ⅶ. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性

パッケージング細胞は一般に、ウイルス粒子を構成するたん白質の遺伝子を有さない増殖能欠損型レトロウイルスベクターを生産するために使用される。組換えレトロウイルスベクターを作製するために、パッケージングプラスミド（ウイルスたん白質をコードする gag、pol、env 遺伝子を含む）をあらかじめ NIH 3T3 細胞に組み込んだパッケージング細胞が作られている。この細胞に遺伝子治療用レトロウイルスベクターのゲノム配列を含む DNA



を導入したプロデューサー細胞を樹立することにより、高力価のレトロウイルスベクターを大量に調製することが可能になった(71)。図 17 にその概念図を示す。

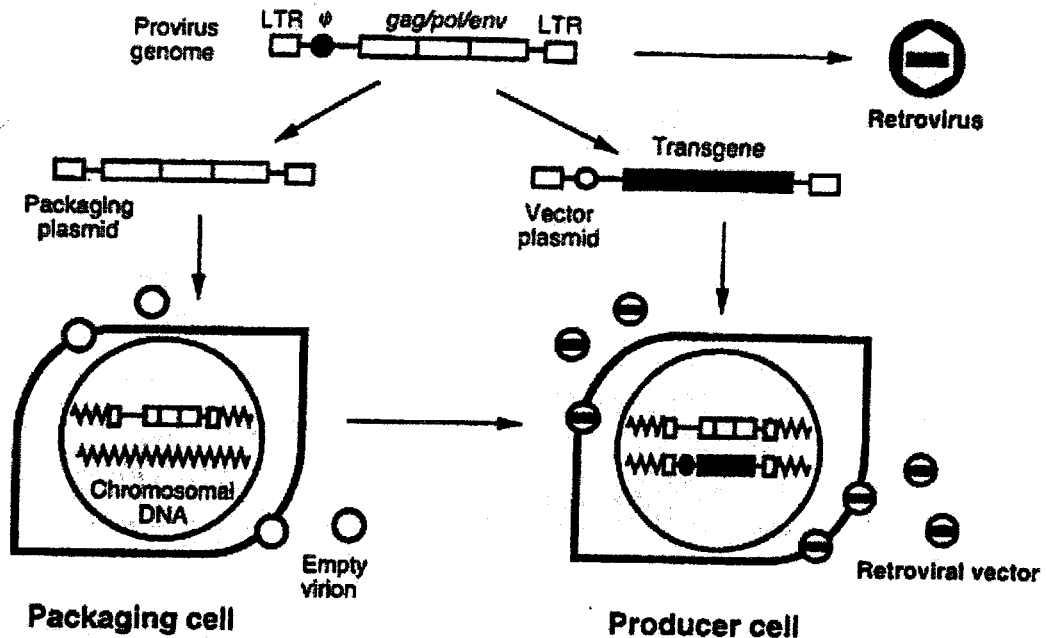


図 17 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 71 より転載)

SFCMM-3 DNA ベクターは、ウイルス粒子形成に必須な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このプラスミドを通常の細胞に導入しただけではウイルス粒子を産生することはない。さらに、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を作製する際に使用されるパッケージング細胞 GP+envAm12 は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミドで別々に導入した第 3 世代のパッケージング細胞株であり、野生型レトロウイルスを産生する可能性は、第 1 世代及び第 2 世代パッケージング細胞株と比較して極めて低い。従って、SFCMM-3 DNA ベクターとパッケージング細胞株 GP+envAm12 の組み合わせにより作製されたウイルス産生細胞株を使用してレトロウイルスベクター-SFCMM-3 を製造する過程で RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。

表 14 に各世代のパッケージング細胞の特徴を、図 18 に各世代のパッケージング細胞と対応するレトロウイルスベクターの構造をそれぞれ記載する(71)。

表 14 各世代のパッケージング細胞の特徴

|   | パッケージングプラスミド<br>の構造  | RCR 出現の機構   |
|---|--|---|
| 第 1 世代パッケージング細胞<br>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の A) | パッケージングシグナルだけを除いたもの。効率よくベクターを作るために、ベクタープラスミド側に gag 遺伝子の一部を残しておく必要がある。                                  | パッケージング配列とベクター配列に共通する gag 部分で相同組換えが起こると RCR が出現する。                                  |
| 第 2 世代パッケージング細胞<br>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の B) | パッケージングシグナルを除去し、さらに 3'-LTR をポリ A 付加シグナルで置換したもの。  | RCR が出現するためには、gag 部分と 3'-LTR 部分の 2 ヶ所で同時に相同組換えが起こる必要があり、その可能性は非常に低いと考えられている。        |
| 第 3 世代パッケージング細胞<br>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の C) | パッケージングシグナルを除去して 3'-LTR をポリ A 付加シグナルで置換し、さらにウイルスタンパク質のコーディング領域を gag-pol と env の 2 種類に分割して発現させるようにしたもの。 | RCR が出現するためには、gag 部分と pol 部分と 3'-LTR 部分の 3 回の相同組換えが同時に起こる必要があり、その可能性は極めて低いと考えられている。 |

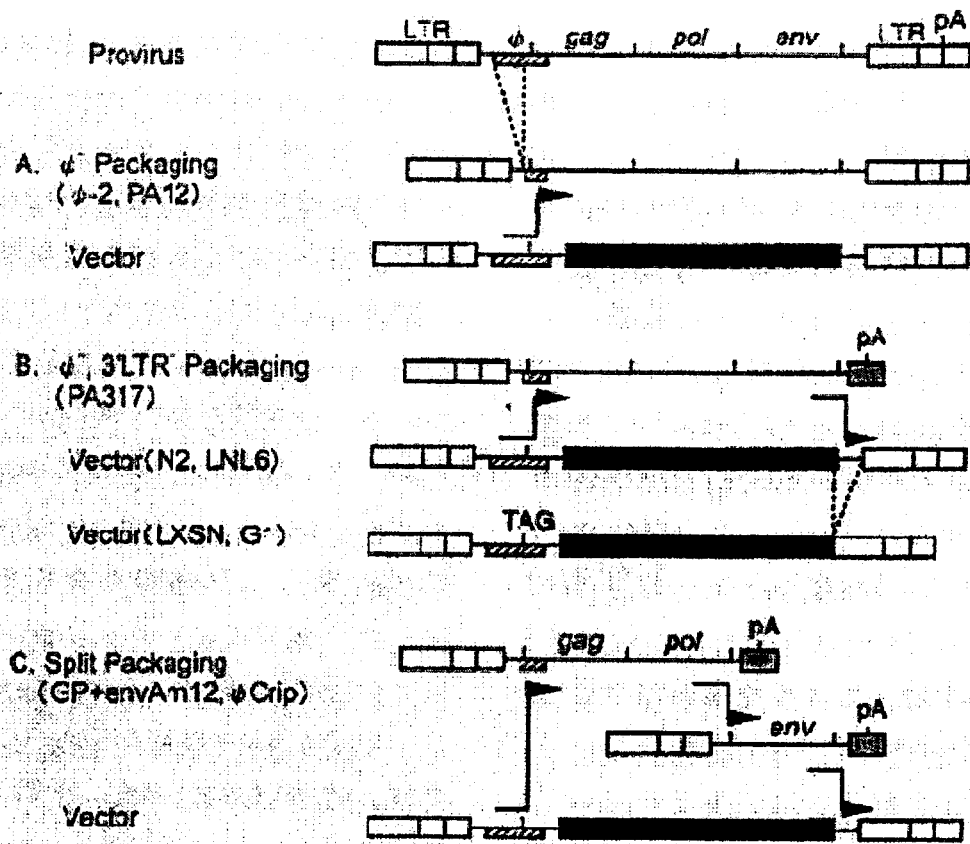


図 18 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 71 より転載)

続いて図 19 に、パッケージング細胞株 GP+envAm12 を作製するために用いた 2 種のプラスミド、pgag-polgpt と penvAm の構造、及び MoMLV ウイルス全塩基配列を含むプラスミド 3P0 を示す。

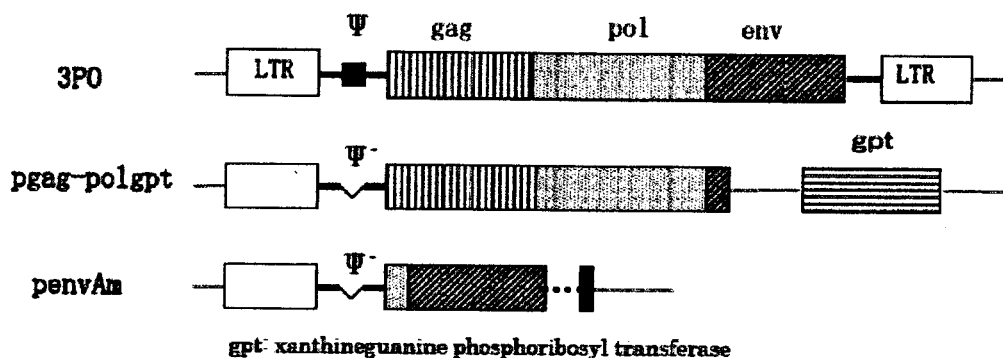


図 19 MoMLV ウイルス全塩基配列を含む 3P0 プラスミドとパッケージング細胞構築用プラスミド pgag-polgpt 及び、penvAm の比較

pgag-polgpt と penvAm は、どちらも Ψ パッケージングシグナルと 3' -LTR を持たないので、GP+envAm12 細胞が内在性のパッケージングシグナルと 3' -LTR を持つことはなく、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞の作製途上で使用されるパッケージング細胞株 GP+E-86 も同様に、NIH 3T3 細胞に pgag-polgpt プラスミド DNA と pEnv プラスミド DNA をエレクトロポレーションにより遺伝子導入し、薬剤選択により株化して樹立されたものである。

以上のことから、パッケージング細胞株 GP+E-86 と GP+envAm12 で作製したウイルスが RCR を含む可能性は極めて低く、これらのパッケージング細胞株は安全であると考えられる。

1996 年に、Chong H ら (72) によりパッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが初めて報告された。このことは、GP+envAm12 を用いても RCR 出現の可能性を完全には否定できないことを示唆している。その頻度を正確に推定することは不可能であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されおらず、極めて低い頻度と考察されている (73)。

#### Ⅶ. 1. 4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必要な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうる。しかしながら、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。

#### Ⅶ. 1. 5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としてのドナー T リンパ球に ex vivo で HSV-TK 遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経たあと患者に投与する。使用したレトロウイルスベクター-SFCMM-3 はこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化されるため、たとえわずかに混入したレトロウイルスベクター粒子が患者体内に投与されたとしても、それが原因で患者体内において遺伝子が導入される蓋然性は低い。

また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入したドナー T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入されることはない。

#### Ⅶ. 1. 6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作にじゅうぶんな知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

遺伝子導入操作はP2レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で、また開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラスⅡ安全キャビネット内で行う。更にレトロウイルスベクターを含む全廃液は高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクター-SFCMM-3の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3は、増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は、大量のRCRが患者体内に存在しない限り非常に低い。

#### Ⅶ. 1. 7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その位置によって生存や増殖等の細胞機能に影響を及ぼすことがある。挿入変異と呼ばれる事象で、細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合にはその細胞は死に至る可能性がある。しかしながらこのような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの末端反復配列(LTR)が有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、当該細胞が無限増殖する可能性がある。

#### Ⅶ. 1. 8 がん原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおりがん原性の問題が出現する。実際にCD34陽性細胞を標的としたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)のフランスでの遺伝子治療において合計4例のT細胞白血病の発症が報告されている(74-76)。報告された事象は、1)免疫系が未熟な幼少の患者を対象としていること、2)遺伝子導入細胞が、分化・増殖能が旺盛な造血幹細胞であること、3)導入遺伝子(IL-2受容体 $\gamma$ c)は細胞増殖に直接関与する機能を有すること、等、特殊な事情が重なって重篤な副作用を招いた可能性が示唆されている。このような背景より、欧米ではX-SCID以外のレトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療臨床応用は、既に再開されている。なお、同様にX-SCIDに対し、レトロウイルスベクターによりIL-2受容体 $\gamma$ c鎖遺伝子をCD34陽性細胞に導入するイギリスでの遺伝子治療においても、10例中1例に白血病が発症したことが2007年12月に報告された(77,78)。また、CD34陽性細胞を標的とした慢性肉芽腫症(CGD)のド

イツでの遺伝子治療において、2例中2例の骨髄異形成症候群（MDS）の発症が報告されている(79,80)。一方、CD34陽性細胞を標的としたアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10例中8例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいてがん化が見られなかったと報告されている(81)。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで白血病化の報告はない(55-58,60)。

本遺伝子治療は、1) 対象が造血幹細胞移植を要する成人の白血病患者であること、2) 分化した成熟リンパ球への遺伝子導入であること、3) 導入遺伝子(HSV-TK 及び  $\Delta$ LNGFR)は、安全装置及びマーカーであること、と言ったより安全性が高い臨床計画と考えられている。なお、本臨床研究の実際においては、IL-2 依存的増殖試験により遺伝子導入 T リンパ球が *in vitro* で異常増殖しないことを確認する。また、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖性を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) <sup>\*12</sup> によってモニタリングすることにより、評価する予定である。

なおこれまでに 17 の独立した研究機関による動物モデル試験及び計 31 例の白血病又は再発白血病の患者を対象とした臨床研究の結果をまとめたレトロスペクティブなデータ解析により、 $\Delta$ LNGFR 遺伝子を導入した細胞を投与しても、がん化の誘導を支持するようなデータが得られなかったことが Bonini Cらにより報告されている(51)。

## **VII. 2 遺伝子産物の安全性**

### **VII. 2.1 HSV-TK 遺伝子の異常発現**

導入遺伝子の構成分子である HSV-TK 遺伝子の発現産物である HSV-TK は、ウイルス特有のチミジンキナーゼで、ヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なった基質特異性を有している。すなわち、通常のヒト細胞内ではリン酸化されず、ヌクレオシドアナログとして既に臨床上の安全性が認められている GCV や ACV をリン酸化することが知られている。すなわち、GCV 又は ACV がプロドラッグとして投与された場合、HSV-TK 発現細胞では、GCV 又は ACV は細胞内でリン酸化され、更に内在性グアニル酸キナーゼとチミジンキナーゼにより二、三リン酸化物へと変換され、この最終産物の三リン酸化物が DNA ポリメラーゼ阻害や DNA 伸長傷害を起こし、細胞死を誘導する(49,53)。図 20 に HSV-TK/GCV 自殺システムを図示する。