

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：至適化遺伝子導入法での  
遺伝子導入効率および遺伝子導入後の骨髄再構築能の検討

学位論文内容の要旨

緒言

現在、臨床で行われている遺伝子治療は体細胞を標的として、病気を持った個体の細胞に正常遺伝子を導入して治療を行おうとするものである。対象疾患としては先天性代謝異常症や悪性新生物などが挙げられるが、口腔領域疾患を対象とした基礎研究も近年盛んに行われている。

今回の研究における対象疾患であるアデノシン・デアミナーゼ (ADA) 欠損症は体細胞に発現する核酸代謝経路の触媒酵素 ADA が欠損する先天性代謝異常症である。患児は蓄積する代謝産物の細胞毒性のため、リンパ球の増殖および分化抑制、細胞死が誘導され、重篤な複合免疫不全症を呈する。

治療としては主要組織適合抗原 (HLA) の一致する血縁ドナーからの骨髄移植のほか、適合ドナーがいない患児では、HLA ハプロタイプ一致の骨髄移植やポリエチレングリコール処理 ADA (PEG-ADA) による酵素補充療法が選択されている。しかし、どちらも治療法として完全とはいえ、永続的な治療効果が期待される遺伝子治療が、これらに代わる根治療法として注目されている。

ADA 欠損症における遺伝子治療の試みは末梢血 T 細胞を標的としたものでは、一定の臨床効果が認められている。しかし、末梢血 T 細胞を標的とした治療では、治療効果の永続性に制限が生じること、T 細胞以外の免疫細胞が補正されないことや T 細胞レセプターレパトアの多様性の限界などの問題が残る。一方自己複製能および多分化能を持った血液幹／前駆細胞が含まれている CD34 陽性細胞分画を標的とした治療では、理論的に以上の問題が克服され、理想的な標的と考えられる。

本施設では、ADA 欠損症患児 2 例に対して自己骨髄血 CD34 陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究が計画されている。実施にあたり、CD34 陽性細胞の採取、至適サイトカインによる刺激、使用予定のベクターを用いた遺伝子導入操作、操作後の細胞の骨髄への生着能および成熟細胞への分化能の解析等の検討が必要不可欠である。

本研究では、健常人臍帯血および骨髄血から CD34 陽性細胞を分離し、2 種類のレトロウイルスベクター (GCsapM-ADA、LASN) による遺伝子導入を行い、比較検討を行った。さらに、遺伝子導入操作後の CD34 陽性細胞が生着能および多分化能を保持しうるかを Nonobese diabetic (NOD) / SCID マウスを用いた SCID Repopulating Cells (SRC) assay にて検討した。最後に治療対象である ADA 欠損症患児 2 例の骨髄血 CD34 陽性細胞への遺伝子導入を試み、ADA 欠損細胞の機能的修復が可能であるかを検討した。

## 結 果

健常人の臍帯血および骨髄血より得られた CD34 陽性細胞に対して、遺伝子導入を行い、リアルタイム定量 PCR 法で遺伝子導入効率を定量した。

GCsapM-ADA の臍帯血および骨髄血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率は、それぞれ  $0.41 \pm 0.11$  コピー数/細胞、 $0.44 \pm 0.10$  コピー数/細胞であった。一方、LASN の臍帯血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率は  $0.10 \pm 0.03$  コピー数/細胞であった。

GCsapM-ADA 遺伝子導入操作後の CD34 陽性細胞が骨髄生着能および多分化能を保持しうるかを検討するため、遺伝子導入操作後の CD34 陽性細胞を用いて、SRC assay を行い、マウス骨髄血の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。

臍帯血および骨髄血 CD34 陽性細胞を用いた解析では、白血球共通抗原マーカー CD45 陽性細胞群の出現 (0.6~41.9%) が認められ、このうち一部の細胞ではヒト血液幹/前駆細胞マーカー CD34 抗原の共発現 (0.2~9.2%) が認められた。さらに B 細胞系マーカー CD19 および骨髄球系細胞マーカー CD33 陽性細胞の出現 (0.3~35.0% および 0.2~1.8%) が認められた。

また、NOD/SCID マウス骨髄に生着、分化したヒト細胞群における導入遺伝子の存在を確認する目的で nested PCR 法を行い、各々のマウスの骨髄および脾臓より、導入遺伝子が検出された。

次いで、ADA 欠損症患児の骨髄血 CD34 陽性細胞に対して、遺伝子導入を行った。GCsapM-ADA による遺伝子導入効率は患児 1 で 0.29 コピー数/細胞、患児 2 で 0.20~0.39 コピー数/細胞であった。ADA 酵素活性は遺伝子導入前では 0.5~1.2U であったが、導入後には患児 1 で 20.5U、患児 2 で 9.2~15.6U と増加を認めた。

患児骨髄血 CD34 陽性細胞を遺伝子導入後に SRC assay を行い、遺伝子導入された患児骨髄血 CD34 陽性細胞の骨髄生着能および多分化能を確認するため、細胞表面マーカー解析を行った。いずれのマウスにおいても、ヒト CD45 陽性細胞が検出され (0.2~1.0%)、患児骨髄細胞の生着が確認された。またそれらの細胞の一部は CD19 (0.1~0.6%)、CD33 (0.1~0.8%)、CD34 (0.1~0.5%) を共発現していた。

さらに、移植後 8 週において、患児骨髄細胞を移植されたマウス骨髄および脾臓中に、導入遺伝子が nested PCR 法で検出された。

## 考 察

まず、健常人臍帯血および骨髓血 CD34 陽性細胞を標的とした遺伝子導入法 GCsapM-ADA ベクターが LASN ベクターと比較して明らかに高効率の遺伝子導入を可能にすることを示した。導入効率が改善された理由としては、使用したパッケージング細胞によって産生されるウイルスエンベロープタンパクの違いが挙げられる。GCsapM-ADA は Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) 由来のエンベロープを有しており、Glvr1 はそれに対する受容体である。一方 LASN は amphotropic エンベロープを有しており、Glvr2 がその受容体である。ヒト血液幹/前駆細胞では Glvr1 の発現が Glvr2 と比較して高いことが知られており、GCsapM-ADA は LASN に比して、高い効率を持って CD34 陽性細胞に導入されると考えられる。

次いで、我々の今回の実験では組換え型フィブロネクチン断片 CH296 をコートしたプレートを使用している。この分子はレトロウイルスに結合するドメインと血液幹/前駆細胞に結合するドメインを持ち、両者を同一分子上に引き合わせる事が可能であり、遺伝子導入効率を上昇させる。

血液幹/前駆細胞を標的とする遺伝子治療においては操作後の細胞が移植後に骨髓に生着し、分化して成熟細胞を産生し続ける能力、すなわち骨髓再構築能を損失することなく遺伝子導入が行われることが望ましい。今回の研究においては、遺伝子導入操作後の血液 CD34 陽性細胞の骨髓再構築能の保持を、SRC assay を行い、細胞表面マーカーの解析および nested PCR 法にて検討した。細胞表面マーカーの解析ではヒト CD45 陽性細胞群の出現により、移植した細胞の一部がマウス骨髓に生着していることが示された。

このうち一部の細胞では CD34 抗原の共発現が認められ、生着した細胞群中の血液幹/前駆細胞の存在が示され、さらに CD19 および CD33 陽性細胞の出現は生着した細胞の B 細胞および骨髓球系細胞への分化を示すことから、遺伝子導入操作後の血液 CD34 陽性細胞集団の中に骨髓再構築能を有する細胞が存在することが証明された。

また、nested PCR 法でマウス骨髓および脾臓より導入遺伝子の検出が認められたことにより、骨髓再構築能を有する細胞群の一部は遺伝子導入された細胞であることが証明された。

## 結 論

GCsapM-ADA により、至適化された遺伝子導入法の下で臍帯血および骨髓血 CD34 陽性細胞に対する導入効率は、LASN と比較して明らかに優れていた。

NOD/SCID マウスを用いた検討で、遺伝子導入操作後の臍帯血および骨髓血 CD34 陽性細胞における骨髓再構築能の維持が示された。また、レシピエントマウスの造血系に導入遺伝子の検出が可能であった。

患児骨髓血 CD34 陽性細胞においても、健常人骨髓血 CD34 陽性細胞と同程度の遺伝子導入が可能であり、導入操作後に ADA 酵素活性の上昇と骨髓再構築能の保持が確認された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久  
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎  
副 査 教 授 田 村 正 人  
副 査 教 授 崎 山 幸 雄

### 学位論文題名

## 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：至適化遺伝子導入法での 遺伝子導入効率および遺伝子導入後の骨髄再構築能の検討

審査は柴田、田村両名合同、崎山および小口審査委員それぞれ個別に、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、アデノシン・デアミナーゼ (ADA) 欠損症に対して自己骨髄血 CD34 陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究の実施にあたり、血液幹・前駆細胞群の含まれる CD34 陽性細胞の採取、至適サイトカインによる刺激、使用予定のベクターを用いた遺伝子導入操作、操作後の細胞の骨髄への生着能および成熟細胞への分化能の解析等の検討を行った。

健常人臍帯血および骨髄血から CD34 陽性細胞を分離し、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行い、比較検討を行った。さらに、遺伝子導入操作後の CD34 陽性細胞が生着能および多分化能を保持しうるかを Nonobese diabetic (NOD) / SCID マウスを用いた SCID Repopulating Cells (SRC) assay にて検討した。最後に治療対象である ADA 欠損症患児 2 例の骨髄血 CD34 陽性細胞への遺伝子導入を試み、ADA 欠損細胞の機能的修復が可能であるかを検討した。

以上の方法によって得られた結果は次のようである。レトロウイルスベクター GCsapM-ADA の臍帯血および骨髄血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率は、それぞれ 0.41 コピー数／細胞、0.44 コピー数／細胞であった。一方、LASN の臍帯血

CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入効率は 0.10 コピー数/細胞であった。

さらに、遺伝子導入操作後の CD34 陽性細胞を用いて SRC assay を行い、マウス骨髄血の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した結果では、白血球共通抗原マーカー CD45 陽性細胞群の出現が認められ、このうち一部の細胞ではヒト血液幹/前駆細胞マーカー CD34 抗原の共発現が認められた。さらに B 細胞系マーカー CD19 および骨髄球系細胞マーカー CD33 陽性細胞の出現が認められた。

また、NOD/SCID マウス骨髄に生着、分化したヒト細胞群における導入遺伝子の存在を確認する目的で nested PCR 法を行い、各々のマウスの骨髄および脾臓より、導入遺伝子が検出された。

次いで、ADA 欠損症患児の骨髄血 CD34 陽性細胞に対して、遺伝子導入および SRC assay を行い、健常人由来骨髄血 CD34 陽性細胞と同様な結果が得られた。

以上のことにより、健常人臍帯血および骨髄血 CD34 陽性細胞を標的とした遺伝子導入法では GCsapM-ADA ベクターが LASN ベクターと比較して明らかに高効率の遺伝子導入を可能にすることを示した。

また、血液幹/前駆細胞を標的とする遺伝子治療においては操作後の細胞が移植後に骨髄に生着し、分化して成熟細胞を産生し続ける能力、すなわち骨髄再構築能を損失することなく遺伝子導入が行われることが望ましい。今回の研究においては、遺伝子導入操作後の血液 CD34 陽性細胞の骨髄再構築能の保持を、SRC assay を行い、細胞表面マーカーの解析および nested PCR 法にて検討した。細胞表面マーカーの解析ではヒト CD45 陽性細胞群の出現により、移植した細胞の一部がマウス骨髄に生着していることが示されたことにより、遺伝子導入操作後の血液 CD34 陽性細胞集団の中に骨髄再構築能を有する細胞が存在することが証明された。また、nested PCR 法でマウス骨髄および脾臓より導入遺伝子の検出が認められたことにより、骨髄再構築能を有する細胞群の一部は遺伝子導入された細胞であることが証明された。

さらに、ADA 欠損症患児の骨髄血 CD34 陽性細胞に対する遺伝子導入の結果により、ADA 欠損細胞の機能的修復が可能であることが示された。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われたが、これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、また、本研究は ADA 欠損症患者の遺伝子導入細胞における機能回復による免疫能再建の可能性を示唆するもので、諸疾患の究明、治療法の確立において基本となる研究であり、将来の展望についても評価された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。