

学 位 論 文 題 名

末梢血 T 細胞を標的として遺伝子導入を実施した
ADA 欠損症例の 4 年後における導入 T 細胞の解析と、
遺伝子再導入に関するシミュレーション研究

学位論文内容の要旨

背景と目的

adenosine deaminase (以下 ADA) 欠損症は常染色体劣性遺伝形式の重症複合免疫不全を呈する疾患である。申請者らは 1995 年から、北大医学部附属病院において 4 歳男児症例に対しレトロウイルスベクター PA317/LASN (以下 LASN) による末梢血 T 細胞を標的細胞とした遺伝子治療を施行し、一定の臨床効果を得た。しかし末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療は遺伝子導入された T 細胞の寿命による死滅減少により、期間を経るにつれ効果が減弱していくことが予想される。理想的な追加治療は血液幹細胞を標的とした遺伝子治療であるが、近年 X-SCID に対するこの治療で白血病様副作用の報告があり、安全面での再評価が必要となっている。他の追加治療の選択として (一度遺伝子治療がなされた患者の) 安全性が認められている末梢血 T 細胞を標的として前回と同種または異なった種類のベクターを用い再度遺伝子治療を行うことが想定されるが、その場合治療遺伝子の導入効率や新たに上乘せされる ADA 活性がどの程度になるか、ベクター同士の干渉はないのかなど、不明な点が多い。そこで申請者は、遺伝子治療を受けた患児に再度末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を実施した際の治療効果を予測することを目的とし、採取した患児末梢血単核球に対し LASN または改良されたレトロウイルスベクター (FLYRD18/GC_{sap}M-ADA, 以下 RD18/ADA) を用いて追加遺伝子導入のシミュレーション研究を行い、治療遺伝子の導入効率、ADA 活性の推移などについて検討した。

方法

1995 年より LASN を用いて末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を受けた ADA 欠損症患児を対象とした。対象から末梢血単核球を分離し、細胞あたり導入遺伝子コピー数 (定量 PCR を用い算出)、ADA 活性を測定した。次に、対象から分離した末梢血単核球を 48 時間前培養 (最初の 24 時間は抗 CD3 抗体添加下で培養) 後、LASN または RD18/ADA を用い追加遺伝子導入を行い、細胞あたり導入遺伝子コピー数、ADA 活性を測定しそれぞれ評価した。また既に導入されている LASN の有無が RD18/ADA による遺伝子追加導入に及ぼす影響を検証するために、LASN 保有量が異なる 3 つの患児末梢血単核球培養

系を作成, RD18/ADA による遺伝子導入を行い, 導入前後で ADA 遺伝子コピー数, ADA 活性を比較検討した. 実験結果の比較検討に際し, 対応する 2 群間には paired two group t-test を, 対応しない 2 群間には Welch's t-test を用いた.

結果

1. 遺伝子治療 4 年後の患児末梢血単核球の細胞あたり ADA 遺伝子コピー数と ADA 活性は, 0.076 ± 0.020 コピーおよび $7.6 \pm 2.9U$ であった.
2. 前培養終了後の細胞数, 細胞あたり ADA 遺伝子コピー数と ADA 活性は, 0.633 ± 0.197 (培養開始時を 1 とした時の相対数), 0.234 ± 0.132 コピーおよび $16.9 \pm 5.9U$ であり, 採血時と比較してそれぞれ有意に ($p=0.0027$) 減少, 増加傾向 (有意差はなし) および有意に ($p=0.0458$) 増加していた.
3. 患児末梢血単核球に対し RD18/ADA を用い遺伝子再導入を行ったところ, 細胞あたり ADA 遺伝子コピー数と ADA 活性は 0.404 ± 0.097 コピーおよび $107.0 \pm 42.3U$ となり, 遺伝子導入なしの群と比較してそれぞれ有意に ($p=0.0333/0.0030$) 増加した. LASN を用いた群では 0.408 ± 0.162 コピーおよび $41.4 \pm 10.0U$ であり, 遺伝子導入なしの群と比較して両者とも増加傾向であった. 遺伝子再導入で上乗せされた ADA 遺伝子コピー数および ADA 活性は RD18/ADA で 0.144 ± 0.138 コピーおよび $78.7 \pm 43.2U$, LASN で 0.178 ± 0.212 コピーおよび $9.7 \pm 9.1U$ であり, 2 種類のベクター間での比較で ADA 遺伝子コピー数増加分は有意差を認めなかったが, ADA 活性増加分は RD18/ADA の方が有意に ($p=0.0045$) 大きい値をとっていた.
4. 患児末梢血単核球を用いた 3 つの培養系, すなわち A 群; 培養 2 日目から RD18/ADA 遺伝子導入, B 群; 11 日目まで培養継続, 11 日目から RD18/ADA 追加遺伝子導入, C 群; 培養 2 日目から LASN 遺伝子導入, 2'-deoxyadenosine で LASN をもつ細胞を選別後, 11 日目から RD18/ADA 追加遺伝子導入, を作成した. RD18/ADA 追加遺伝子導入前の ADA 活性と細胞あたり ADA 遺伝子コピー数は, A 群で $8.5U$ および 0.098 コピー, B 群で $31.2U$ および 0.300 コピー, C 群で $81.2U$ および 0.414 コピーと, いずれも A 群 < B 群 < C 群であった. RD18/ADA 追加遺伝子導入後の RD18/ADA コピー数と ADA 活性増加分は, A 群で 0.190 コピーおよび $67.5U$, B 群で 0.166 コピーおよび $75.1U$, C 群で 0.173 コピーおよび $66.5U$ で, どの群もほぼ同様の値を示した.

考察

患児末梢血単核球は遺伝子治療中断後約 4 年経った時点においても LASN ベクター遺伝子を保有し ADA を発現していた. これは LASN が組み込まれた末梢血 T 細胞が患児体内で長期間相当数生存していることを示すとともに, 漸減傾向はあるものの遺伝子治療の効果が比較的長期間残存し, これまでの患児の安定した臨床経過に相当程度寄与していたことを裏付けるものであった. 患児末梢血単核球を抗 CD3 抗体により刺激すると, 細胞数は一度減少に転じたが ADA 活性は上昇し, LASN 遺伝子を持つ細胞は持たない細胞と比べて生存・増殖に関し優位性を持っていることが示唆された. 改良型レトロウイルスベ

クターRD18/ADA を用いて追加遺伝子導入を施行したところ、ADA 遺伝子は標的細胞内に相当量導入され、ADA 活性も著明に増加した。また RD18/ADA は、既に標的細胞に組み込まれている LASN 遺伝子の有無にかかわらず、一定量の ADA 遺伝子を上乘せして導入する能力を有していた。以前導入された LASN ベクター遺伝子との干渉によって RD18/ADA 導入効率や ADA 遺伝子発現効率が低下する現象は観察されなかった。一方 LASN による追加遺伝子導入では、ADA 活性の増加分は RD18/ADA と比べはるかに少なかった。以上より LASN を用い末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を受けた患者に対し、再度同種細胞を標的とした遺伝子治療を行う場合、RD18/ADA は遺伝子導入効率、ADA 遺伝子発現効率ともに優れており、またその効果も以前の治療で組み込まれた LASN の有無にかかわらず期待できる可能性が、実際の患児の細胞を用いたシミュレーション研究により示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

末梢血 T 細胞を標的として遺伝子導入を実施した ADA 欠損症例の 4 年後における導入 T 細胞の解析と、 遺伝子再導入に関するシミュレーション研究

ADA 欠損症は常染色体劣性遺伝形式の重症複合免疫不全を呈する疾患であり、申請者らは 1995 年から、北大医学部附属病院において 4 歳男児症例に対しレトロウイルスベクター PA317/LASN (以下 LASN) による末梢血 T 細胞を標的細胞とした遺伝子治療を施行し一定の臨床効果を得た。しかし末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療は遺伝子導入された T 細胞の寿命による死滅減少により、期間を経るにつれ効果が減弱していくことが予想される。理想的な追加治療は血液幹細胞を標的とした遺伝子治療であるが、近年 X-SCID に対するこの治療で白血病様副作用の報告があり、安全面での再評価が必要となっている。他の追加治療の選択として末梢血 T 細胞を標的として前回と同種または異なった種類のベクターを用い再度遺伝子治療を行うことが想定されるが、その場合治療遺伝子の導入効率や新たに上乗せされる ADA 活性がどの程度になるか、ベクター同士の干渉はないのかなど、不明な点が多い。そこで申請者は、遺伝子治療を受けた患児に再度末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を実施した際の治療効果を予測することを目的とし、採取した患児末梢血単核球に対し LASN または改良型レトロウイルスベクター FLYRD18/GCsapM-ADA, 以下 RD18/ADA を用いて追加遺伝子導入のシミュレーション研究を行い、治療遺伝子の導入効率, ADA 活性の推移などについて検討した。

対象は 1995 年より LASN を用いて末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を受けた ADA 欠損症患児である。まず患児末梢血単核球を分離し、ADA 遺伝子コピー数, ADA 活性を測定したところ、遺伝子治療中断後約 4 年経った時点においてもベクター遺伝子が検出され ADA 発現が認められた。これは LASN が組み込まれた末梢血 T 細胞が患児体内で長期間相当数生存し、遺伝子治療の効果が比較的長期間残存し、これまでの患児の安定した臨床経過に相当程度寄与していたことを裏付けるものであった。前培養後、患児末梢血単核球の ADA コピー数, ADA 活性ともに上昇し、LASN 遺伝

子を持つ細胞は持たない細胞と比べて生存・増殖に関し優位性を持っていることが示唆された。追加遺伝子導入では、LASN, RD18/ADA とともに同程度の遺伝子コピー数増加が認められた。しかし ADA 活性については、LASN では小幅な上昇にとどまったのに対し、RD18/ADA では著明な上昇が得られた。導入遺伝子コピー数と ADA 活性の相関を見たところ、RD18/ADA を含む細胞群は高い ADA 活性を呈しており、RD18/ADA ベクターが高い遺伝子発現効率を有していることが示された。また、LASN の有無が RD18/ADA 追加導入に際しどのような影響を及ぼすかを検証するために、前培養期間の延長や 2'-deoxyadenosine による LASN 保有細胞の選択により LASN 保有率が異なる 3 つの培養系を作成し、RD18/ADA による追加遺伝子導入を行った。結果、追加導入後の RD18/ADA コピー数および ADA 活性の増加分は LASN 保有細胞の多少にかかわらずほぼ同様の値を示した。よって RD18/ADA は、既に標的細胞に組み込まれている LASN 遺伝子の有無にかかわらず、一定量の ADA 遺伝子を上乗せして導入し、ADA を発現する能力を有することが示された。

以上より LASN を用い末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を受けた患者に対し、再度同種細胞を標的とした遺伝子治療を行う場合、RD18/ADA は遺伝子導入効率、ADA 遺伝子発現効率ともに優れており、またその効果も以前の治療で組み込まれた LASN の有無にかかわらず期待できる可能性が、実際の患児の細胞を用いたシミュレーション研究により示された。

口頭発表において、吉木教授より以前遺伝子導入を受けた T 細胞が実際の患児生体内でどの程度残存していると考えられるかとの質問があった。つづいて小林教授より以前導入された LASN と追加導入された LASN との識別は可能かとの質問があった。また加藤紘之教授より RD18/ADA による追加遺伝子導入の効果の持続性、想定される副作用についての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し誠意ある回答をしていた。

本研究は ADA 欠損症に対する末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療における新たな知見を提示し、他疾患に対する遺伝子治療にも適応しうることが期待され、審査員一同この成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有する者と判断した。