

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。

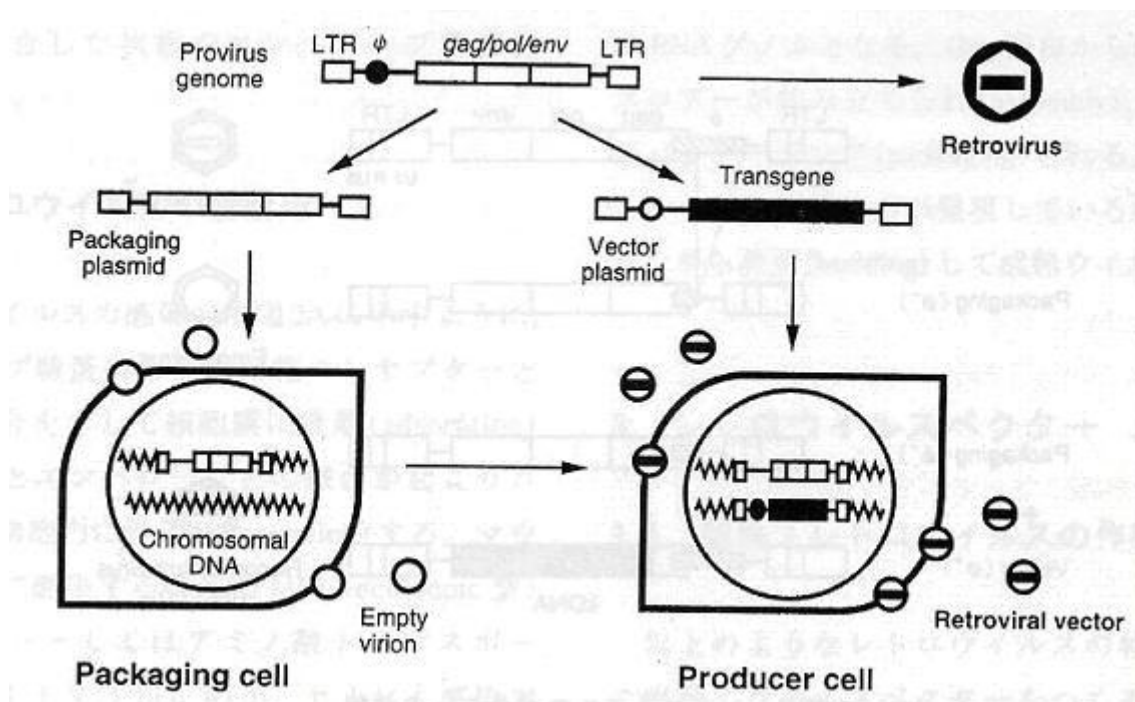


図 17 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 71 より転載)

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 の構造	RCR 出現の機構
第 1 世代パッケージング細胞 (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 (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 (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。

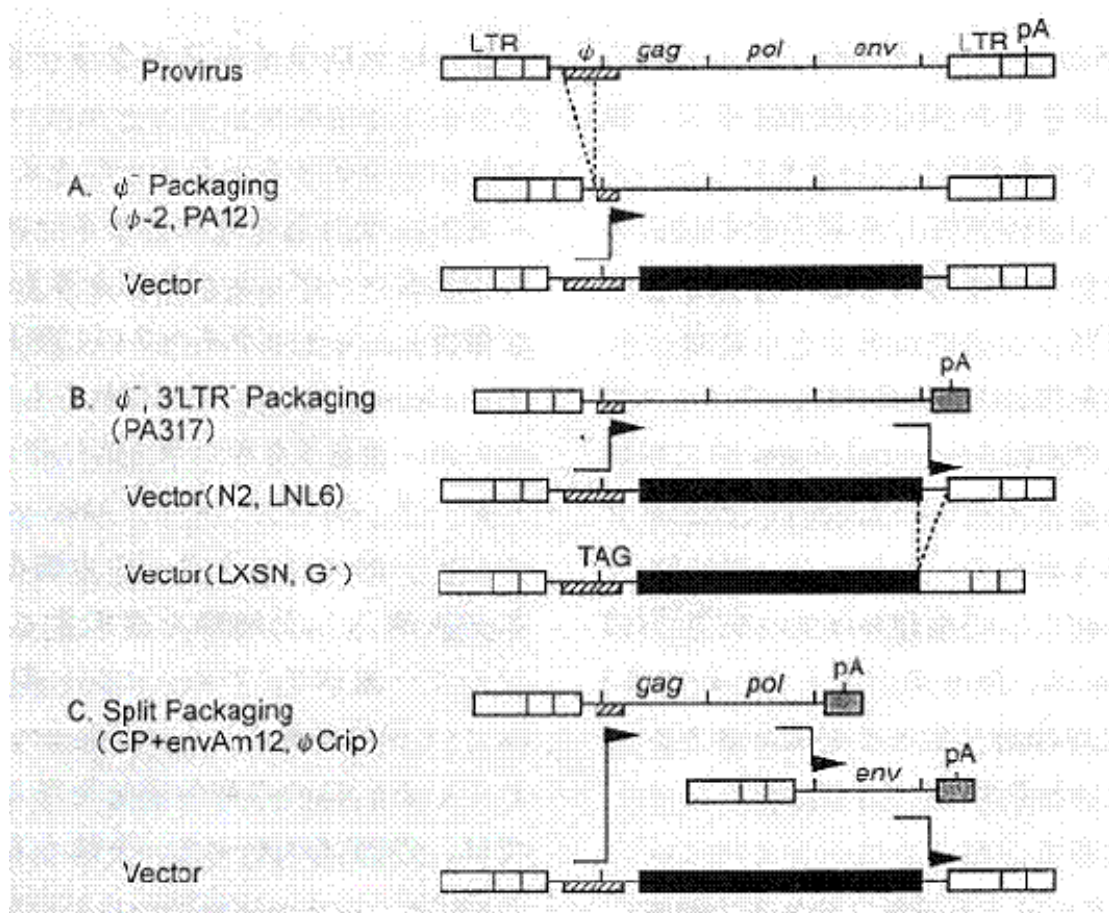


図 18 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 71 より転載)

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。

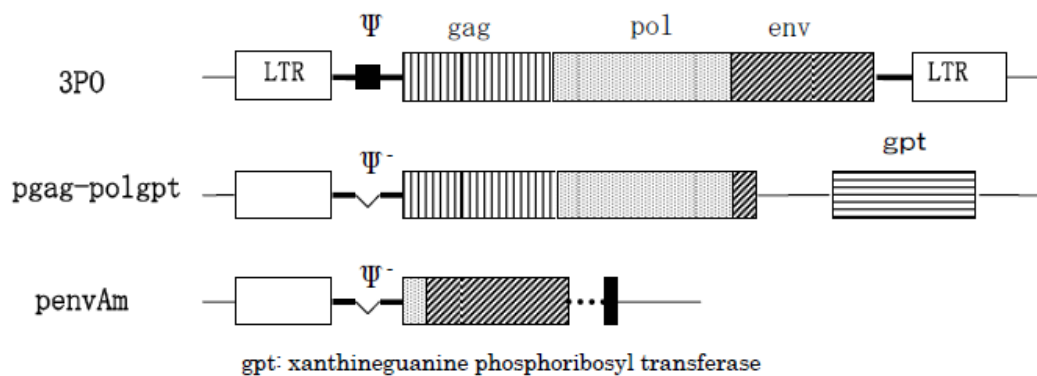


図 19 MoMLV ウイルス全塩基配列を含む 3P0 プラスミドとパッケージング細胞構築用プラスミド pgag-polgpt 及び、penvAm の比較

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ておらず、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い、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 γ_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 γ_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 Δ 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) ^{*12} 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、 Δ 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。