

## 04. 成育遺伝研究部

部長：小野寺雅史

## 【ミッション・目標】

成育遺伝研究部の最大のミッションは、難治性の小児遺伝性疾患に対する遺伝子医療の確立である。次世代シーケンサーの登場は、小児の遺伝性疾患における原因遺伝子の解明に大きな進歩をもたらし、さらにこれに引き続く病態解析によって、新たな診断法や治療法の開発がなされるようになった。当研究部では、小児遺伝性疾患患者の予後の向上を最大の目的として、病態に基づいた早期発見・診断から遺伝子細胞治療などの最先端医療の開発を目指して活動を行なっている。

これらの疾患では、症状の不可逆的な経過を取ることが多く、発症前もしくは発症早期の治療の開始が極めて重要であり、新生児スクリーニングの確立と実施が強く望まれている。さらに、近年の劇的な遺伝子治療技術の進展は、現在有効な治療法が存在しない遺伝性疾患に対しても、根治的治療法の可能性をもたらすものと考えられる。このような背景から、我々は小児遺伝性疾患の中でも原発性免疫不全症を中心として、早期発見のための新生児スクリーニングや根治的治療である造血幹細胞移植が実施できない患者に対する造血幹細胞遺伝子治療法の確立と実施を目指している。

新生児スクリーニングでは、最も緊急性の高い重症複合免疫不全症（severe combined immunodeficiency: SCID）を対象にし、T細胞の新生の際に産生されるT cell receptor excision circles (TREC) によるスクリーニングを実施している。これまでに当センター出生の新生児に対して紙血を用いたTREC測定を行い、測定技術や精度管理方法を確立した。平成31年度より、関東におけるスクリーニングを開始する予定であり、現在準備を進めている。

造血幹細胞遺伝子治療の開発と実施に当たっては、様々な分野での専門知識を有する医師や研究者が参画するnation-wideの遺伝子治療実施体制の構築を目指している。これまでに、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療の臨床研究、医師主導治験を計画、実施しており、これらを通して国内における遺伝子治療導入を加速させるべく活動している。また、CRISPR/Cas9などのゲノム編集技術の発展は、従来ウイルスベクターでは対応が難しい疾患に対する遺伝子治療法の可能性をもたらし、当研究部においても、関連研究機関との共同研究の下、臨床応用を見据えたゲノム編集技術による新規遺伝子治療法の開発を実施している。

このように、当研究部では日本における将来の遺伝子医療の発展を見据えた研究活動を行なっているほか、同時に病院生体防御系内科部免疫科における併任業務をもって原発性免疫不全症の診断・治療に積極的にあたっている。各研究内容に関しては、下記の研究概要を参照されたい。

## 【研究プロジェクト】

1. 原発性免疫不全症に対する遺伝子・細胞治療法の確立
  - 1) X連鎖慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究の実施
  - 2) Wiskott-Aldrich 症候群に対する遺伝子治療臨床試験（治験）の実施
  - 3) 遺伝子治療におけるレギュレーションに関する研究
  - 4) 遺伝子治療におけるレトロウイルスベクター挿入に関する解析
  - 5) ゲノム編集技術による遺伝子治療法の開発
2. 重症複合免疫不全症の新生児スクリーニング法の開発
3. 原発性免疫不全症の原因解明に向けた研究
  - 1) 原発性免疫不全症患者における遺伝子診断
  - 2) iPS 細胞を用いた原発性免疫不全症の病態解明
  - 3) 原発性免疫不全症の患者細胞における機能評価
4. ニーマンピック病 C 型の発症メカニズムの解明
5. ADA 欠損症に対する未承認薬 ADAGEN の治験に向けた研究

## 【研究体制】

構 成 員

部 長：小野寺雅史

室 長：内山徹

流動研究員：安田徹

非常勤職員：三浦茜、渡辺信之、安藤由希子、枝澤佳織、志村真里香、秋葉由美

共同研究員：岡田真由美、河合利尚

病院医師：田村英一郎、石川尊士

事 務：橋井晶子、近藤直子、桜山ちづる

## 【共同研究体制】

## 1. 研究所

梅澤明弘再生医療センター・センター長、阿久津英憲部長（生殖医療）、清河信敬部長、大木健太郎室長、加藤元博室長（小児血液・腫瘍）、深見真紀部長（分子内分泌）、要匡部長（ゲノム医療）、高田修治部長（システム発生・再生医療）、田上昭人部長、中村和昭室長（薬剤治療）、秦健一郎部長、中林一彦室長（周産期病態）、今留謙一室長（高度先進医療研究室）

## 2. 病院

奥山虎之部長（臨床検査部）、松本公一小児がんセンター・センター長、石黒精教育研修センター・センター長、窪田満統括部長、中舘尚也診療部長（総合診療部）、新井勝大診療部長（器官病態系内科部）

## 3. 臨床研究センター

斉藤和幸センター長、中村秀文主幹（企画運営部）、栗山猛室長、佐古まゆみ室長（開発推進部）、瀧本哲也室長、小林徹室長（データ管理部）

## 4. センター外（国内）

東京大学医科学研究所	大津真准教授
東京大学大学院理工系研究科	濡木理教授
慶應義塾大学理工学部	佐藤智典教授
東京医科歯科大学小児科	森尾友宏教授
筑波大学医学医療系小児科	高田英俊教授
産業技術総合研究所	中西真人博士

## 5. センター外（国外）

Harry Malech 博士、National Institutes of Health (NIH、米国)

Alessandro Aiuti 博士、San Raffaele Telethon Institutes for Gene Therapy (TIGET、イタリア)

## 【研究の概要】

## 1. 原発性免疫不全症に対する遺伝子・細胞治療の実施と解析

## 1) X連鎖慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究の実施

原発性免疫不全症のひとつである慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease: CGD）は、NADPH オキシダーゼの異常によって活性酸素が産生されず、細菌や真菌（カビ）の殺菌が障害される疾患である。NADPH オキシダーゼの構成タンパク質である gp91<sup>phox</sup> に異常のある X連鎖慢性肉芽腫症（X-linked chronic granulomatous disease: X-CGD）がその約 80%を占める。難治性の細菌・真菌感染症に加えて、過剰な炎症性サイトカインにより腸管や肝臓、肺などに肉芽腫を形成する。根治療法は HLA 適合ドナーからの造血幹細胞移植であるが、HLA が不一致の場合にはその成績は悪く、このような患者に対して造血幹細胞遺伝子治療の開発が進められてきた。自家造血幹細胞（CD34 陽性細胞）に対してレトロウイルスベクターにより治療遺伝子を導入し、再び患者に投与する造血幹細胞遺伝子治療は、様々な原発性免疫不全症に対して有効な治療成績を上げているが、その一方で、X連鎖重症複合免疫不全症（SCID-X1）でみられたような重大な有害事象（白血病）の発症も報告されている。このことを踏まえて、本遺伝子治療臨床研究の実施に関しては、症例ごとに患者の risk and benefit balance を十分に考慮し、血液学、免疫学、遺伝子治療学を専門とする多くの医師、研究者が参画する nation-wide project として行なっている。なお、本研究は「日本医療研究開発機構研究費（難治性疾患実用化研究事業、平成 28～30 年度）」を受けて行われている。

### ① 承認までの経過

本研究は、米国国立衛生研究所（NIH）の共同研究の下行われ、使用するレトロウイルスベクターMFGSgp91は、品質評価書とともに米国から提供を受けた。平成22年より当センター遺伝子治療臨床研究審査委員会での審議が開始され、平成23年2月に承認を受けた。その後審査の場が厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会に移り、平成24年3月28日開催の厚生科学審議会科学技術部会にて本遺伝子治療臨床研究は了承された。同年6月14日付けで厚生労働大臣にて本遺伝子治療臨床研究は承認されている。

### ②患者の選定と遺伝子治療の実施

造血幹細胞移植ドナー不在の20代のX-CGD患者が対象患者として選択され、平成26年3月に一次同意を取得後、遺伝子治療臨床研究評価判定委員会の承認を経て、同年5月に最終同意が取得された。作成した臨床プロトコルに従い、患者末梢血より顆粒球コロニー刺激因子により動員された造血幹細胞（CD34陽性細胞）が採取され、MFGSgp91により70%の効率で遺伝子導入が行われた。ブスルファンによる骨髄非破壊的前処置の後に、同年7月22日に遺伝子導入細胞（CD34陽性細胞にして $6.2 \times 10^6/\text{kg}$ ）が患者に投与された。投与後2週間より末梢血に遺伝子導入細胞の出現が認められ、またそれに伴い、治療抵抗性であった感染病巣の縮小が得られ、遺伝子導入の有効性が確認された。一方で、欧米での報告に一致して患者末梢血における遺伝子導入細胞は徐々に減少し、18カ月の時点で活性酸素産生好中球の消失が認められた。しかし、治療前と比較して感染症に対する治療反応性は保たれており、患者は通院での経過観察が可能であった。

### ③ベクター挿入変異の発症

遺伝子治療から32ヶ月経った平成29年3月に血小板減少とともに末梢血及び骨髄に芽球の出現が認められた。ベクター挿入部位解析の結果、がん原遺伝子であるMECOMへのレトロウイルスベクターの挿入が明らかになり、挿入発がん変異による骨髄異形成症候群と考えられた。同時に、詳細な細胞学的・遺伝学的解析から発がんの機序を解析し、厚生労働省に報告した（現在投稿準備中である）。なお、患者は父親をドナーとする造血幹細胞移植を速やかに実施し、再発なく経過している。

## 2) Wiskott-Aldrich 症候群に対する遺伝子治療臨床研究の実施

Wiskott-Aldrich 症候群（WAS）は、易感染性、血小板減少、湿疹を3主徴とし、その他に自己免疫疾患や悪性疾患も合併する原発性免疫不全症である。その原因はX染色体に存在するWAS遺伝子であり、細胞骨格やシグナル伝達に関与している。感染症や出血による死亡、悪性疾患の発症から根治的治療である造血幹細胞移植が必要と考えられており、HLA一致同胞が存在する場合や、HLA一致非血縁ドナーで1歳までに移植が行なわれた場合にはその成績は良好である。一方、年長でHLA不完全一致ドナーによる移植の場合にはその予後が悪くなり、造血幹細胞遺伝子治療の対象と考えられている。2006年～2009年にドイツで行なわれたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療では有効性が示されたものの、SCID-X1と同様に白血病の発症が報告された。これを踏まえて、安全性を高めた自己不活型のレンチウイルスベクターによる遺伝子治療（第I/II

相試験)が2010年にイタリアのAiuti博士(TIGET: The San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy)によって開始された。現在までに8例に施行され、ほぼ全ての症例で症状の改善を認めており、また5年以上の経過を経て白血病の発症は認められず、高い有効性と安全性が示されている。この結果を踏まえて、当研究部ではAiuti博士らの協力のもと、日本における遺伝子治療医師主導治験の準備を進めた。GlaxoSmithKline(GSK)社との契約の締結の下、ウイルスベクター、治験概要書(IB)、治験薬概要書(IMPD)及びプロトコルを入手した。さらに、タカラバイオ社にて複数回のDry Runを実施し、遺伝子導入法の確立と、遺伝子導入細胞の品質評価を行なった。これらのデータをもとに、PMDAとの対面助言を複数回行い、平成29年10月に当センターIRBにて臨床プロトコルの承認、同年11月に治験計画届の提出を行った。その後、同疾患への遺伝子治療事業がGSK社からOrchard therapeutics社へ移譲されたことや、細胞調整方法の変更などを受け、現在当センターとOrchard therapeutics社との契約締結および治験の変更届の準備を鋭意すすめている。なお、本事業は「日本医療研究開発機構研究費(難治性疾患実用化研究事業、平成28~30年度)」の助成を受けて行われている。

### 3) 遺伝子治療におけるレギュレーション(カルタヘナ法)に関する研究

欧米とは異なり日本における遺伝子組換えウイルスベクターの使用には、カルタヘナ法の第一種使用規定の下、適切な患者管理が必要である。特に、ウイルスベクターの種類や投与方法によって、体内(体液中)におけるウイルスの残存や排出も異なることから、適切な患者管理のための指針の作成は急務である。今後の国内における遺伝子治療開発の推進のため、これらの指針の作成を進めている。

①レンチウイルスベクターの残存に関する解析:臨床グレードのウイルスベクターを用いた遺伝子導入の各工程において、排出されるウイルス排液、細胞洗浄液、培養上清中の残存ウイルスに関して、ドロップレットデジタルPCR(ddPCR)によるウイルスゲノムの定量、C8166細胞を用いた感染性実験などにより評価する。

②ウイルス高感受性マウスの作製:臨床試験において使用頻度の高いレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターに対する高感受性のマウスを作製した。これらのマウスに対して、上述の排液での検出レベルの微量ウイルスを投与し、その感染性を評価する。

これらの結果を基に、組換えウイルスの第一種使用における適切な患者管理の指針の作製を進める。本事業は「日本医療研究開発機構研究費(医薬品等規制調和・評価研究事業、平成28~30年度)」の助成を受けて行われている。

### 4) 遺伝子治療におけるレトロウイルスベクター挿入に関する解析

レトロウイルスやレンチウイルスベクターなどの染色体挿入型ベクターによる遺伝子治療では、その安全性の評価にあたって、染色体上のベクター挿入部位の特定が必須である。従来のLinear amplification mediated PCR(LAM-PCR)を用いた解析法では、制限酵素処理などのバイアスが大きくなることから、今回我々は、ウイルスベクター内の配列に対する相補的なベイトによるキャ

プチャー法を用いた解析法を確立した。次世代シーケンサーを用いることで、1 検体から数百～数千の挿入部位を特定することが可能である。この方法を用いて、これまでに国内で遺伝子治療を受けた ADA 欠損症患者と X-CGD 患者に対して解析を行った。ADA 欠損症患者では、各血球系統における挿入部位の違いから、患者体内における遺伝子導入細胞の詳細な生着パターンが判明した。さらに、X-CGD 患者においては、挿入発がん変異の原因となるベクター挿入部位と、これらの挿入クローンの出現時期を特定した。

遺伝子治療の有効性の評価にあたっては遺伝子導入効率を正確に評価する必要があり、ddPCR による遺伝子レベルでの遺伝子導入細胞の定量法を確立した。この方法では1 個のドロップレットに解析対象の細胞1 個を封入し、ドロップレット内での細胞融解とベクター配列に対する蛍光 PCR を行なう。蛍光ドロップレット数を測定することで対象細胞群の中の遺伝子導入細胞数の絶対定量が可能となる。この方法を用いて、遺伝子治療を受けた ADA 欠損症患者 2 名を解析したところ、T 細胞では遺伝子導入細胞の高い生着率を占める一方で、B 細胞や NK 細胞ではわずかな生着しか認めず、また、骨髄の CD34 陽性分画では、いずれの症例も 2%前後と、造血幹細胞レベルでの不十分な生着が判明した (*Mol Ther Methods Clin Dev* 6: 8-16, 2017.)。また、この方法を single cell ddPCR 法として、特許の米国出願を行った。本研究は「日本医療研究開発機構研究費 (難治性疾患実用化研究事業、平成 28～30 年度)」の助成を受けて行われている。

#### 5) ゲノム編集技術による遺伝子治療法の開発

造血幹細胞遺伝子治療では、遺伝子導入後の細胞 (造血幹細胞) が分裂後も遺伝子を発現することから染色体挿入型ウイルスベクターが用いられるが、これらは上述のようにベクター挿入変異を引き起こす可能性を抱えている。また、遺伝子の発現はベクター内に組み込まれた外因性プロモーターによることから、非生理的な遺伝子発現をもたらす危険も懸念されている。近年の CRISPR/Cas9 などのヌクレアーゼによる切断と相同組換えによるゲノム編集技術は、変異遺伝子の直接の修復を可能にしたが、ベクターの挿入変異の危険性を回避できることに加えて、ゲノム上の内因性プロモーター領域による生理的発現となることから、次世代の遺伝子治療として研究が進められている。当研究部では現在、X 連鎖高 IgM 症候群、I 型高 IgE 症候群を対象にゲノム編集技術による遺伝子治療の開発を行なっている。これらの疾患では、治療遺伝子の強発現による発がんの可能性あることから、従来のウイルスベクターに替わる新規の治療法が求められている。さらに、今後の治験開始を念頭に置き、安全性や費用の課題を克服すべく、従来のウイルスによらない導入方法を開発中である。本研究は「日本医療研究開発機構研究費 (難治性疾患実用化研究事業、平成 30～32 年度、X 連鎖高 IgM 症候群)」、「日本医療研究開発機構研究費 (難治性疾患実用化研究事業、平成 30～32 年度、I 型高 IgE 症候群)」の助成をそれぞれ受けて行われている。

#### 2. 重症複合免疫不全症の新生児スクリーニング法の開発と実施

重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency: SCID) は、T細胞の欠損を中心と

して、B細胞やNK細胞の異常を伴い、出生後早期からウイルス、細菌、真菌に対して易感染性を示す疾患群である。救命には造血幹細胞移植が必須であるが、出生後早期（3か月未満）の感染症罹患前の実施が、治療予後の向上に重要である。胸腺におけるT細胞の新生の際には、環状DNAであるTREC（T cell receptor excision circles）が産生されるが、新生児のろ紙血においてTREC値を測定することでSCIDスクリーニングが可能であり、欧米ではすでに、SCIDが重症感染の罹患ではなく、スクリーニングによって同定される疾患となりつつある。一方で、未だ日本においては導入がなされていないことから、SCIDスクリーニングの普及に向けて活動を行っている。

#### 1) SCIDスクリーニングの実施

当研究部では、これまでに（平成27-28年度）当センターにて出生し、同意を得られた544人に対して、従来のリアルタイムPCR法を用いたろ紙血におけるTRECの測定を実施している。1名の陽性患者を特定したが、1ヶ月後の再検査ではリンパ球数の上昇とそれに伴うTREC値の上昇を認め、一過性のリンパ球減少症と診断された。引き続き平成29年度からは、新たな方法として、TR-FRET法による測定を開始した。PerkinElmer社より販売されているこのTREC測定システム（ARVO-Enlite）は、米国FDAより承認を受けた測定システムであり、パンチャーから測定までの全工程に専用の機器を使用するが、リアルタイムPCR法に比べて半分程度の測定時間の短縮が可能である。まず、リアルタイムPCR法にてスクリーニングを実施した100検体をSCID症例とともに測定し、精度の確認を行った後、引き続き287検体に対してTR-FRET法によるスクリーニングを行った。カットオフ値付近の値を取った検体を含めて7検体を再検とし、うち1検体が明らかな低値を認め、陽性と判断した。1カ月健診での再検査では、TRECの上昇を認め、またフローサイトメトリー解析でもT細胞の新生を認め、同じく、一過性のTリンパ球減少症と判断した。

#### 2) 測定法の検討とスクリーニングの拡大

現在当研究部では、平成31年度より関東圏内でのスクリーニングの開始に向け準備を進めている。今後の普及を考えた場合には、作業の簡略化と精度管理を同時に達成する必要があるが、特に検体調整時の作業に関しては、TR-FRET法（キット）のように、ろ紙を投入後に、そのままPCR反応液を添加し測定することで、リアルタイムPCR法におけるDNAの抽出とPCR反応を別個のプレートで行うことによる時間的ロス、作業の複雑化による値の変動などの課題を防ぐことができる。これらの理由を踏まえ、次年度からのスクリーニングにはTR-FRET法を用いて実施する方針とした。一方で、機器の普及の点を考慮すると、同様に精度管理様コントロールなどを含んだキットを製品化することで、リアルタイムPCR法によるスクリーニングも普及の可能性は高いと考えられ、現在関連企業（積水メディカル）との共同開発としてリアルタイムPCR法によるTREC測定キットの開発を行っている（平成31年度の販売を予定）。なお、本研究の一部は「成育医療研究開発費（平成29-30年度）」の助成を受けて行われている。

### 3. 原発性免疫不全症の原因解明に向けた研究

#### 1) 原発性免疫不全症患者における遺伝子診断

原発性免疫不全症は、好中球、リンパ球、単球など様々な免疫担当細胞の機能異常が原因で引

き起こされ、現在 350 を超える原因遺伝子が同定されている。中でも、SCID など一部の疾患は重症感染が致死的となることから、迅速かつ正確な診断法の確立が望まれている。当研究部は、部長小野寺が病院生体防御系内科部免疫科の医長として、積極的にこれら免疫患者の診療に当たっており、倫理審査委員会の承認の下で遺伝子解析による診断を行っている。特に、原因遺伝子の解明が急速に進む現在、これらに対応するためにも、従来のサンガー法によるシーケンスに加え、周産期病態研究部の協力のもと次世代シーケンスを用いた SCID の原因遺伝子 49 個のターゲットリシーケンスや、エクソーム解析を積極的に行なっている。

## 2) iPS 細胞を用いた原発性免疫不全症の病態解明

近年の次世代シーケンス技術などの発達により、原発性免疫不全症の原因遺伝子の数は急激に増えており、詳細な病態解析が必要な疾患も多くなっている。これらの病態解析ツールとして、産業技術総合研究所、中西真人博士との共同研究のもと、センダイウイルスベクターによる疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行なっている。X 連鎖重症複合免疫不全症、アデノシン・デアミナーゼ欠損症、慢性肉芽腫症、Bloom 症候群、PEX 症候群、毛細血管拡張性小脳失調症、Wiskott-Aldrich 症候群、活性化 PI3K $\delta$ 症候群などの免疫不全症患者からの iPS 細胞の樹立を常時行なっている。さらに、原因が同定できない免疫不全症患者からの iPS 細胞と、エクソーム解析などの組み合わせることで、新規原因遺伝子の同定も目指している。

## 3) 原発性免疫不全症の患者における機能評価、病態解析

原発性免疫不全症には、従来の獲得免疫や食細胞の機能低下を呈する疾患だけでなく、自己炎症性疾患や自然免疫の異常を呈する疾患も含まれるようになった。また、幅広い疾患において免疫学的機序が病態の主体を担うことも明らかとなり、狭義の免疫不全症以外の疾患でも免疫学的解析が必要とされるようになった。当センターおよび外部の関連施設の患者に対して、当センター倫理委員会で承認された「先天性免疫不全症の診断ならびに病態解析に関する研究」(研究責任者 小野寺雅史)の研究手順を遵守し、フローサイトメトリー解析 (FACS) やサイトカイン・ケモカイン解析、細胞株の樹立などを通して免疫学的な細胞機能評価を実施している。FACS 解析は、当研究部内にフローサイトメトリーコアを設置し、常時患者血液の解析を行なっている。解析数は平成 29 年度 : 442 検体、平成 30 年度 : 346 検体であり、これらの解析を通じて当センターの臨床業務に貢献している。

## 4. ニーマンピック病 C 型の発症メカニズムの解明

ニーマンピック病 C 型はライソゾーム病の一つであり、NPC1 または NC2 蛋白の異常によって、肝脾腫や多彩な神経症状を呈する疾患である。効果的な治療法の開発には神経変性を誘発する病因メカニズムの解明は必須であり、我々はこれまでに末梢血中の単球・マクロファージの脳内浸潤が神経変性を誘導することを確認している。また、疾患マウスモデルにおいて、リンパ球を欠損させることで神経症状が増悪すること、CD4 陽性 T 細胞を移植することで神経症状の変性



が抑制できることを確認し、現在、神経保護作用を示すリンパ球サブセットの同定を試みている。

## 5. ADA 欠損症に対する未承認薬アダジェンの治験に向けた研究

アデノシン・デアミナーゼ (ADA) は、細胞分裂の際に生ずる核酸代謝産物のデオキシアデノシンをデオキシイノシンに変換する代謝酵素である。ADA が欠損することで有害物質である dATP が蓄積しリンパ球が障害を受けることから、生下時より重症複合免疫不全の病態を呈してしまう。造血幹細胞移植が唯一の根治的治療であるが、これまでの報告から HLA 一致血縁ドナーが不在の場合には、良好な移植成績が得られないことが多い。1986年にウシ由来の ADA をポリエチレン・グリコールにて包埋した PEG-ADA (ADAGEN) が開発され、1990年に FDA で承認を受けた。米国をはじめとする海外の多くの患者が ADAGEN による酵素補充療法を行っており、移植ドナーが不在の ADA 患者に対する治療の一つとして確立されている。一方で我が国では依然として未承認薬であることから、たとえ HLA 一致血縁ドナーが不在の場合でも、危険性が高い HLA 不一致の造血幹細胞移植を選択せざるを得ない状況が多く、このような背景から、厚生労働省が開催した未承認薬使用問題検討会議に ADAGEN を申請し、平成 24 年 3 月 23 日に開催された会議において「医療上の必要性の高い未承認薬点適応外薬」として承認された。これまでに当センター病院免疫科では ADA 欠損症患者 2 名に対して、臨床研究として ADAGEN の投与を行い、重症感染症を回避することが可能であった。これらの経過を経て、平成 27 年度より帝人ファーマによるリコンビナント PEG-ADA (STM-279) の治験に参加し、平成 28 年～30 年度にかけて合計で 3 例の ADA 欠損症患者の治療を行った。ともに、酵素補充療法の効果を認め、近く本製剤の承認がなされる予定である。

### 【平成 29 年度研究業績】

#### 1. 誌上発表

##### (1) 英文原著

1. Osumi T, Kato M, Ouchi-Uchiyama M, Tomizawa D, Kataoka K, Fuji Y, Seki M, Takita J, Ogawa S, Uchiyama T, Ohki K, Kiyokawa N. Blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia caused by the copy number gain of oncogenic KRAS. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 doi: 10.1002/pbc.26496
2. Goto F, Uchiyama T, Nakazawa Y, Kawai T, Imai K, Onodera M. Persistent impairment of T cell regeneration in a patient with activated PI3K d syndrome. *J Clin Immunol* 37: 347-350, 2017.
3. Igarashi Y, Uchiyama T, Minegishi T, Takahashi S, Watanabe N, Kawai T, Yamada M, Ariga T, Onodera M. Single cell-based vector tracing in patients with ADA-SCID treated with stem cell gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 6: 8-16, 2017.
4. Kawamura F, Inaki M, Katafuchi A, Abe Y, Tsuyama N, Kurosu Y, Yanagi A, Higuchi M, Muto S, Yamaura T, Suzuki H, Noji H, Suzuki S, Yoshida MA, Sasatani M, Kamiya K, Onodera M, Sakai A.

Establishment of induced pluripotent stem cells from normal B cells and inducing AID expression in their differentiation into hematopoietic progenitor cells. *Sci Rep* 7:1659, 2017.

5. Nakazawa Y, Kawai T, Arai K, Tamura E, Uchiyama T, Onodera M. Fecal Calprotectin Rise in Chronic Granulomatous Disease-Associated Colitis. *J Clin Immunol* 2017 Sep 6. doi: 10.1007/s10875-017-0441-3.

(2) 英文総説・著書

該当なし

(3) 和文総説

1. 小野寺雅史：「遺伝子治療って何ですか？どんな種類がありますか？」小児内科 49 巻 7 号：926－940, 2017
2. 内山徹：「遺伝子治療で承認されたものはありますか？承認に近いものも含めて教えてください」小児内科 49 巻 7 号：936－939, 2017

(4) 著書

1. 内山徹：小児希少疾患に対する遺伝子治療の現状と問題点. 先端治療技術の実用化と開発戦略 (核酸医療、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)、(株) 技術情報協会、2017 年；411－417

2. 学会発表

(1) 国際学会講演・シンポジウム・招待講演

1. Masafumi Onodera Gene therapy in Japan. The 7<sup>th</sup> International Collaboration Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease. Tokyo. 2017.1.17
2. Toru Uchiyama Current status of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in Japan. The 7<sup>th</sup> International Collaboration Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease. Tokyo. 2017.1.17

(2) 国際学会一般演題発表

該当なし

(3) 国内学会講演・シンポジウム・招待講演・教育講演・特別講演

1. 小野寺雅史 ゲノム編集による遺伝子治療のさらなる展開 第 39 回日本造血細胞移植学会総会 松江 2017. 3. 3
2. 小野寺雅史 我が国の造血幹細胞遺伝子治療における医師主導治験の現状と問題点 第 16 回日本再生医療学会総会 仙台 2017. 3. 9
3. Onodera M. Gene therapy for primary immunodeficiency in Japan. JSH-EHA Joint Session in the 8<sup>th</sup>

## JSH International Symposium. Miyazaki, 2017.5.19-20

4. 小野寺雅史 遺伝性疾患に対する遺伝子細胞治療の現状と展望 第65回日本輸血・細胞治療学会 シンポジウム 千葉 2017.6.22-24
5. 小野寺雅史 小児遺伝性疾患に対する遺伝子治療の現状と展望 第15回 東北・北海道代謝異常症研究会 仙台 2017.6.30
6. 小野寺雅史 遺伝子治療開発 第2回 神経代謝病研究会 東京 2017.7.5
7. 内山徹 Progress in gene therapy for primary immunodeficiencies. 第23回日本遺伝子細胞治療学会 岡山 2017.7.20
8. 小野寺雅史 着実に実り始めた遺伝子治療 第23回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会 一般公開フォーラム 岡山 2017.7.20
9. 小野寺雅史 当センターにおける原発性免疫不全症の診断と治療 第8回 中四国免疫不全症研究会 岡山 2017.7
10. 小野寺雅史 遺伝性疾患に対する臨床用ベクター開発の現状とゲノム編集技術への展開 第59回 ヒューマンサイエンス・バイオインターフェース 東京 2017.9.30
11. 小野寺雅史 遺伝子治療におけるカルタヘナ法の第一使用規程の考え方に関する研究 AMED 再生医療・研究交流会 東京 2017.9.30
12. Masafumi ONODERA Stem cell gene therapy for primary immunodeficiencies in Japan. 第8回アジア細胞治療学会学術集会 東京 2017.10.27-29
13. 小野寺雅史 北海道の生まれの小児科医に何がしたいのか? 第300回 日本小児科学会北海道地方会 札幌 2017.12.03
14. 小野寺雅史 難治性遺伝性疾患に対する遺伝子治療の現状と展望 生命科学系学会合同年次大会 神戸 2017.12.6-9

## (4) 国内学会一般演題

10題

## 【研究費】

公的研究費 (研究代表者)

1. 日本医療研究開発機構研究費・難治性疾患実用化研究事業 原発性免疫不全症に対する ex vivo 遺伝子・細胞治療の治験実施体制の構築 (代表) 小野寺雅史 (52,210千円;研究班全体)
2. 日本医療研究開発機構研究費・医薬品等規制調和・評価研究事業 遺伝子治療におけるカルタヘナ法の第一種使用規程の考え方に関する研究 (代表) 小野寺雅史 (12,480千円;研究班全体)
3. 日本学術振興会 学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) (一般) 免疫不全症への造血幹細胞遺伝子治療における新規エンベロープによる幹細胞の維持 (代表) 内山徹 (1,040千円)

公的研究費 (研究分担者)

1. 日本医療研究開発機構研究費 創薬基盤推進研究事業 慢性肉芽腫症腸炎に対する小児用サリドマイド製剤の実用化に向けた研究 (分担) 小野寺雅史(代表者一括、5,000 千円)
2. 日本医療研究開発機構研究費 成育疾患克服等総合研究事業 先進的治療法が確立した新たな成育疾患のスクリーニング法の開発とその適応基準の作成に関する研究 (分担) 小野寺雅史 (代表者一括 10,000 千円)
3. 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業 原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの確立に関する研究 (分担) 小野寺雅史 (1,200 千円)
4. 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 B 究極の遺伝子治療法確立に必要な WASP の特性解明および移植造血幹細胞の制御法開発 (分担) 小野寺雅史 (700 千円)
5. 日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (B) (一般) 非典型小児白血病を対象とした体細胞変異と生殖細胞系列変異の統合解析 (分担) 内山徹 (1,820 千円)

私的研究費 (研究代表者)

1. 積水メディカル 共同研究費 原発性免疫不全症スクリーニングにおける測定システム開発のための研究 (代表) 内山徹 (1,000 千円)

【特許】

内山徹

1. 特願 2017-166151 「TREC 又は KREC の量を評価する方法、当該法に用いる粒子、並びにこれらの利用」

【その他】

[教育活動]

小野寺雅史

1. 厚生科学審議官遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員
2. 筑波大学人間総合科学研究科 非常勤講師
3. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 専門委員
4. 東京医科歯科大学 連携大学院教授
5. 大阪大学第二特定認定再生医療等委員会 委員
6. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会 再生医療等製品・生物由来技術部会 臨時委員

内山 徹

1. 東北大学医学部小児科 非常勤講師

[社会貢献]

小野寺雅史

1. 日本遺伝子細胞治療学会 理事
2. 日本免疫不全自己炎症学会 理事

[荣誉・表彰] 該当なし

[社会活動] 該当なし

[海外活動] 該当なし

[研究所運営への貢献]

#### 小野寺雅史

1. 遺伝子組換え実験委員会 委員
2. 倫理予備審査委員会基礎医学研究部会 副部長
3. 研究所バイオバンク細胞管理室長
4. 輸血療法委員会 副委員長

[倫理委員会承認研究課題]

1. 乾燥ろ紙血を用いた免疫不全症のスクリーニング法の開発
2. 免疫機能異常症における遺伝的要因の探索
3. ヒト臍帯血を用いたヒト血液細胞の機能解析とその臨床応用を目指した基礎的研究
4. 先天性免疫不全症の診断並びに病態解析に関する研究
5. 活性化 PI3K $\delta$ 症候群に対するシロリムス製剤 (Rapamune) による治療効果の検討
6. 肝炎後再生不良性貧血の病態解析に関する研究
7. 肝障害患者の免疫病態解析に関する研究

【平成 30 年度研究業績】

1. 誌上発表
  - (1) 英文原著
    1. Kamei K, Miyairi I, Ishikura K, Ogura M, Shoji K, Funaki T, Ito R, Arai K, Abe J, Kawai T, Onodera M, Ito S. Prospective Study of Live Attenuated Vaccines for Patients with Nephrotic Syndrome Receiving Immunosuppressive Agents. *J Pediatr*. S0022-3476 (17) 31756-0, 2018.
    2. Nishi K, Kawai T, Kubota M, Ishiguro A, Onodera M. X-linked agammaglobulinemia complicated with pulmonary aspergillosis. *Pediatr Int* 1: 90-92, 2018.
    3. Osumi T, Tsujimoto S, Nakabayashi K, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida M, Uchiyama T, Nagasawa J, Goyama S, Yoshida T, Tomizawa T, Kurokawa M, Matsubara Y, Kiyokawa N, Hata K, Kato M. Somatic MECOM mosaicism in a patient with congenital bone marrow failure without a radial abnormality. *Pediatr Blood Cancer*. 65: e26959, 2018
    4. Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, Shirai R, Moriyama T, Nishii R, Yamada Y, Kudo K, Sekiguchi M, Arakawa Y, Yoshida M, Uchiyama T, KTerui, Ito S, Koh K, Takita J, Ito E, Tomizawa D, Manabe

- A, Kiyokawa N, Yang J, Kato M. Diplotype analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 32: 2710-2714, 2018.
5. Okano T, Imai K....., Uchiyama T (56人中38番目), ....., Morio T. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive combined immunodeficiency and lymphoproliferation in Activated PI3K $\delta$  syndrome type 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 (in press)
  6. Osumi T, Tsujimoto S, Tamura M, Uchiyama M, Nakabayashi K, Okamura K, Toshida M, Tomizawa D, Watanabe A, Takahashi H, Hori T, Yamamoto S, Hamamoto K, Migita M, Ogata-Kawata H, Uchiyama T, Kizawa H, Ueno-Yokohata H, Shirai R, Seki M, Ohki K, Inukai T, Ogawa S, Kitamura T, Matsumoto K, Hata K, Kiyokawa N, Goyama S, Kato M. Recurrent RARB translocation in Acute Promyelocytic leukemia lacking RARA translocation. *Cancer Res*. 78: 4452-4458, 2018
  7. Osumi T, Tomizawa D, Kawai T, Sako M, Inoue E, Takimoto T, Tamura E, Uchiyama T, Imadome KI, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida M, Ando R, Tsumura Y, Fuji H, Matsumoto K, Shioda Y, Kiyotani C, Terashima K, Onodera M, Matsumoto K, Kato M. A prospective study of allogeneic transplantation from unrelated donors for chronic granulomatous disease with target busulfan-based reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Jun 29. doi: 10.1038/s41409-018-0271-9
  8. Shoji K, Kawai T, Onodera M, Tsutsumi Y, Nosaka S, Miyairi I. Multiple osteolytic lesions on the skull of a girl with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Pediatr Int*. 60: 1043-1044, 2018.
  9. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 11: 180-190, 2018. 32:2710-2714, 2018
  10. Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, Shirai R, Moriyama T, Nishii R, Yamada Y, Kudo Km Sekiguchi M, Arakawa Y, Yoshida M, Uchiyama T, Terui K, Ito S, Koh K, Takita J, Tomizawa D, Manabe A, Kiyokawa N, N. Yang JJ, Kato M. Diplotype analysis of NUD15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia*, 32:2710-2714, 2018
  11. Narumoto S, Sakamoto S, Sasaki K, Hirata Y, Fukuda A, Uchiyama T, Irie R, Yoshioka T, Kasahara M. ABO-incompatible liver transplantation for children under 2 years of age: A case report and a single center review. *Pediatr. Transplant*. Doi: 10.1111/petr.13308. 2018

(2) 英文総説・著書  
該当なし

(3) 和文総説

1. 小野寺雅史 原発性免疫不全症の遺伝子治療 医薬ジャーナル 54:59-66, 2018.

2. 小野寺雅史 遺伝子治療の新局面 - はじめに- 医学のあゆみ 265: 323, 2018.
3. 内山徹 レトロウイルス、レンチウイルスベクター：特徴と作製法、最近の話題 医学のあゆみ 265: 337, 2018.
4. 小野寺雅史 毛細血管拡張性運動失調症 産科と婦人科 85:649-653, 2018.
5. 小野寺雅史 ヘモグロビン異常症に対する造血幹細胞遺伝子治療 -  $\beta$ サラセミン、鎌状赤血球症 - 血液フロンティア 28:768-774, 2018.

## 2. 学会発表

### (1)国際学会講演・シンポジウム・招待講演

### (2)国際学会一般演題発表

### (3)国内学会講演・シンポジウム・招待講演・教育講演・特別講演

1. 小野寺雅史 Stem cell gene therapy for primary immunodeficiencies in Japan. 第8回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム 東京 2018.1.18
2. 小野寺雅史 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と展望 第1回 日本免疫不全・自己炎症学会総会 東京 2018.1.20
3. 小野寺雅史 遺伝性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療 第17回 日本再生医療学会総会 横浜 2018.3.21-23
4. 小野寺雅史 皮膚科領域における遺伝子治療の現状とその未来 富山デルマ学術講演会 富山 2018.3.
5. 小野寺雅史 Gene and cell therapy, to take one step forward. 第24回日本遺伝細胞治療学会学術集会 東京 2018.7.26-28
6. 内山徹 Blastic transformation of retrovirus-transduced cells in X-CGD gene therapy. 第24回日本遺伝子細胞治療学会 東京 2018.7.26-28
7. 小野寺雅史 熱を繰り返す子にどう対処するか 世田谷医師会小児科医会 東京 2018.9
8. 小野寺雅史 小児難治性遺伝性疾患に対する新規治療法の開発. 日本小児アレルギー学会第55回学術集会 岡山 2018.10.20-21
9. 小野寺雅史 カルタヘナ法対応を含めたレンチウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療の実施要件 平成30年度プログラム連携シンポジウム 東京 2018.11
10. 小野寺雅史 難治性遺伝性疾患に対する遺伝子細胞治療の現状と今後の展開 第33回阪大医療組織工学フォーラム 大阪 2018.11.27
11. Masafumi ONODERA Operation and issues of Cartagena law in Japan. 3<sup>rd</sup> DIA Cell and Gene Therapy Products in Japan, Tokyo 2018.12.13-14
12. 小野寺雅史 講演2 遺伝子改変技術の必要性・今後の展開 平成30年度産官学連携秋季シンポジウム 東京 2018.12.21
13. 内山徹 遺伝性難病に対する ex vivo 遺伝子治療の現状と展望 第3回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー 招待講演 東京 2018.12.14

## (4)国内学会一般演題

13 題

## 【研究費】

公的研究費（研究代表者）

1. 日本医療研究開発機構研究費・難治生疾患実用化研究事業 原発性免疫不全症に対する *ex vivo* 遺伝子・細胞治療の治験実施体制の構築（代表）小野寺雅史（9,112 千円；研究班全体）
2. 日本医療研究開発機構研究費・医薬品等規制調和・評価研究事業 遺伝子治療におけるカルタヘナ法の第一種使用規程の考え方に関する研究（代表）小野寺雅史（1,073 千円；研究班全体）
3. 日本医療研究開発機構研究費・難治性疾患実用化研究事業 STAT3 変異により発症する高 IgE 症候群に対する改良型 Cas9 を用いた造血幹細胞遺伝子治療の開発（31,200 千円研究班全体）
4. 日本医療研究開発機構研究費・難治性疾患実用化研究事業 X 連鎖高 IgM 症候群に対する新規遺伝子治療法の開発（代表）内山徹（18,200 千円）
5. 公益財団法人小児医学研究振興財団研究助成金 Indel 挿入を利用した原発性免疫不全症に対する新規遺伝子治療法の確立 内山徹（1,000 千円）

公的研究費（研究分担者）

1. 日本医療研究開発機構研究費 創薬基盤推進研究事業 慢性肉芽腫症腸炎に対する小児用サリドマイド製剤の実用化に向けた研究（分担）小野寺雅史（代表者一括、38,000 千円）
2. 日本医療研究開発機構研究費 成育疾患克服等総合研究事業 先進的治療法が確立した新たな成育疾患のスクリーニング法の開発とその適応基準の作成に関する研究（分担）小野寺雅史（代表者一括 20,000 千円）
3. 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業 原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの確立に関する研究（分担）小野寺雅史（1,400 千円）
4. 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 B 究極の遺伝子治療法確立に必要な WASP の特性解明および移植造血幹細胞の制御法開発（分担）小野寺雅史（400 千円）
5. 日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (B) (一般) 非典型小児白血病を対象とした体細胞変異と生殖細胞系列変異の統合解析（分担）内山徹（1,690 千円）

私的研究費（研究代表者）

該当なし

## 【特許】

米国特許 US patent application NO. 62/675,888

「ドロップレットデジタルPCRシステムを利用した単一細胞（シングルセル）PCR法」



【その他】

[教育活動]

小野寺雅史

1. 厚生科学審議官遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員
2. 筑波大学人間総合科学研究科 非常勤講師
3. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 専門委員
4. 東京医科歯科大学 連携大学院教授
5. 大阪大学第二特定認定再生医療等委員会 委員
6. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会 再生医療等製品・生物由来技術部会 臨時委員

内山 徹

1. 東北大学医学部小児科 非常勤講師

[社会貢献]

小野寺雅史

1. 日本遺伝子細胞治療学会 理事
2. 日本免疫不全自己炎症学会 理事
3. 第24回日本遺伝子細胞治療学会 大会長

内山徹

1. 日本小児血液・がん学会 血小板委員会 委員

[荣誉・表彰] 該当なし

[社会活動] 該当なし

[海外活動] 該当なし

[研究所運営への貢献]

小野寺雅史

1. 遺伝子組換え実験委員会 委員
2. 倫理予備審査委員会基礎医学研究部会 副部会長
3. 研究所バイオバンク細胞管理室長
4. 輸血療法委員会 副委員長

[倫理委員会承認研究課題]

1. 乾燥ろ紙血を用いた免疫不全症のスクリーニング法の開発
2. 免疫機能異常症における遺伝的要因の探索
3. ヒト臍帯血を用いたヒト血液細胞の機能解析とその臨床応用を目指した基礎的研究
4. 先天性免疫不全症の診断並びに病態解析に関する研究
5. 活性化PI3Kδ症候群に対するシロリムス製剤（Rapamune）による治療効果の検討
6. 肝炎後再生不良性貧血の病態解析に関する研究

7. 肝障害患者の免疫病態解析に関する研究