

# 遺伝子細胞治療開発のための 非臨床安全性試験 ～遺伝子細胞治療における安全性とは？～

国立成育医療研究センター  
成育遺伝研究部  
内山 徹

# 遺伝子細胞治療・再生医療等製品

「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的とした以下の行為

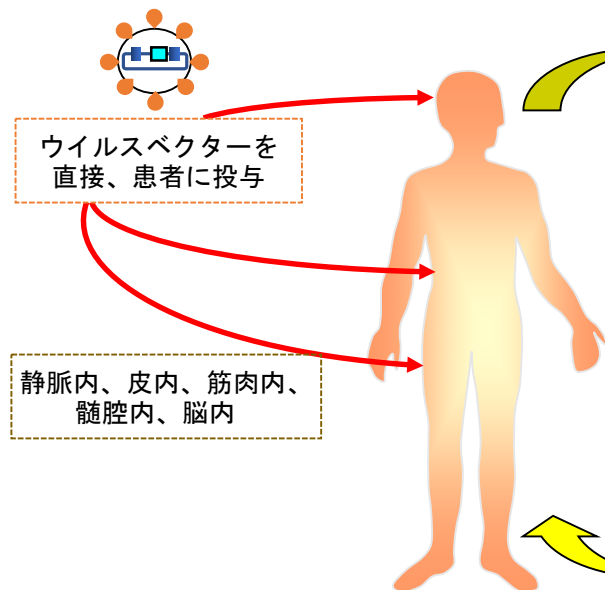
1. 遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること (gene addition)
2. 特定の塩基配列を標的として人の遺伝子を改変すること (gene correction)
3. 遺伝子を改変した細胞を人の体内に投与すること (gene modifications, ex vivo)

1. 13文科振第114号、科発第0327001号 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 平成14年 3月27日

2, 3. 厚生労働省告示第48号 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 平成31年 2月28日

## in vivo 遺伝子治療

血友病、SMA、網膜変性症



## ex vivo 遺伝子治療

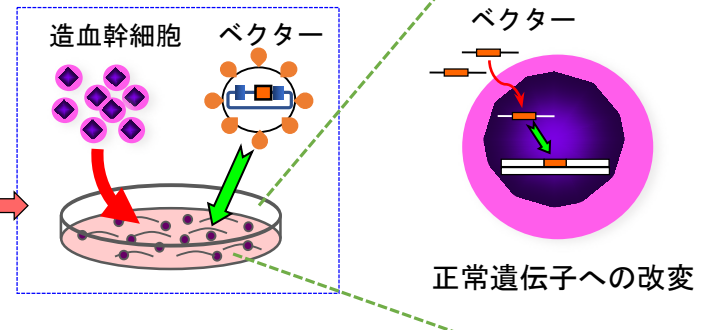
造血幹細胞遺伝子治療：SCID, WAS, 代謝異常症  
末梢血T細胞遺伝子治療：CAR-T

採血、骨髄穿刺、生検

フラスコ内培養

遺伝子改変

フラスコ内培養



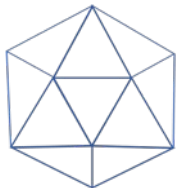
# Ex vivo 遺伝子細胞治療：臨床試験から承認薬へ

	疾患	細胞	導入遺伝子	ベクター	状況	
CAR-T	B-ALL NHL	T細胞	CD19	レンチウイルス	承認	キムリア
	NHL	T細胞	CD19	レトロウイルス	承認	イエスカルタ
	NHL	T細胞	CD19	レンチウイルス	承認	ブレヤンジ
HSC-GT	ALD	CD34陽性細胞	ABCD1	レンチウイルス	承認	eli-cel, Lenti-D
	MLD	CD34陽性細胞	ASA	レンチウイルス	Phase 3	
	WAS	CD34陽性細胞	WASP	レンチウイルス	Phase 1/2	
	SCID-X1	CD34陽性細胞	IL2RG	レンチウイルス	Phase 1/2	
	ADA-SCID	CD34陽性細胞	ADA	レトロウイルス	承認	Strimvelis
	ADA-SCID	CD34陽性細胞	ADA	レンチウイルス	Phase 1/2	
	X-CGD	CD34陽性細胞	CYBB	レンチウイルス	Phase 1/2	
	サラセミア	CD34陽性細胞	b globin	レンチウイルス	承認	ZYNTEGLO
	SCD	CD34陽性細胞	b globin	レンチウイルス	Phase 3	
	MPS-1	CD34陽性細胞	IDUA	レンチウイルス	Phase 1/2	

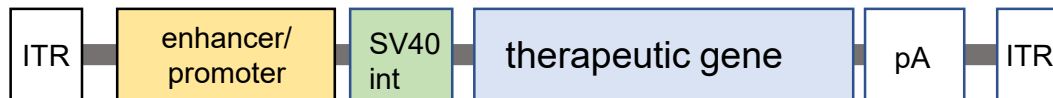
- CAR-T細胞療法は、承認が進んでいる。
- 造血幹細胞遺伝子治療も着実に進んでいる。

# In vivo遺伝子治療：臨床試験から承認薬へ

	疾患	導入遺伝子	ベクター	状況	
In vivo GT	悪性黒色腫	GM-CSF	腫瘍溶解性HSV1 (ICP34. 5, ICP47欠損)	承認	Imlygic Talimogene Laherparepvec
	先天性黒内障	RPE65	AAV2	承認	<b>Luxturna</b> voretigene neparvec コラテジェン
	慢性動脈閉塞症	HGF	プラスミド	承認	Beperminogen perplasmid
	脊髄性筋萎縮症	SMN1	AAV9	承認	<b>ズルゲンスマ</b> onasemnogene abeparvec
	悪性神経膠腫	LacZ	腫瘍溶解性HSV1 (g34.5, ICP6, a47欠損)	承認	デリタクト teserpaturev
	血友病A	FVIII	AAV5,6,8 Spark8011	Phase III	
	血友病B	FIX	AAV5, 8, Spark9001	Phase III	
	筋ジストロフィー	ミニジストロフィン	AAV9	Phase III	

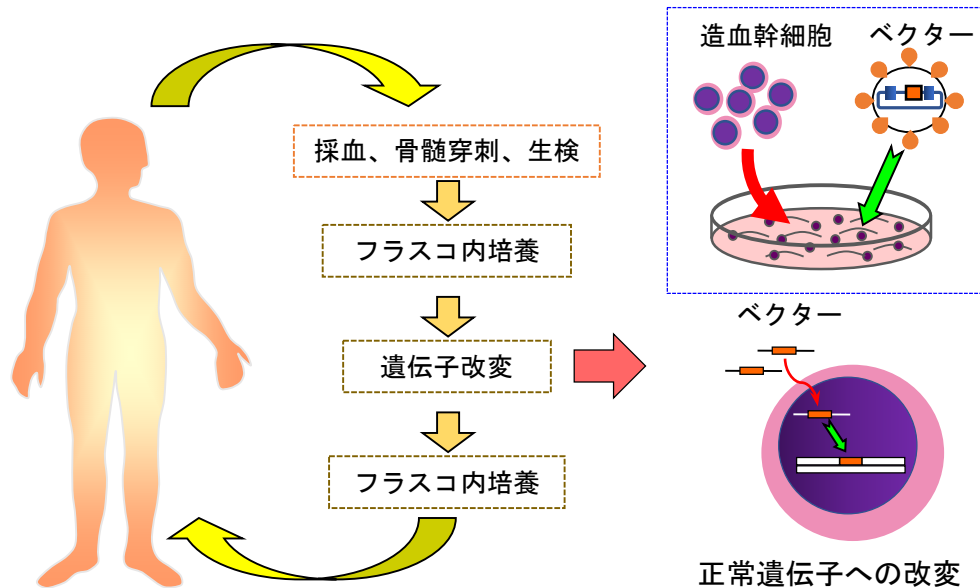


## アデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）



- Ex vivo遺伝子治療のような遺伝子導入細胞の品質・特性解析が不要。
- ウイルスベクターの体内への直接投与に関して安全性の評価が必要。

# Ex vivo 遺伝子治療実施における課題・問題点



## ex vivo 遺伝子治療

「体外で細胞に遺伝子を導入し、患者に戻す」

標的細胞	疾患・治療法
造血幹細胞	原発性免疫不全症 先天性代謝疾患 サラセミアなど
末梢T細胞	CAR-T細胞

## 遺伝子治療の実施における安全性の課題

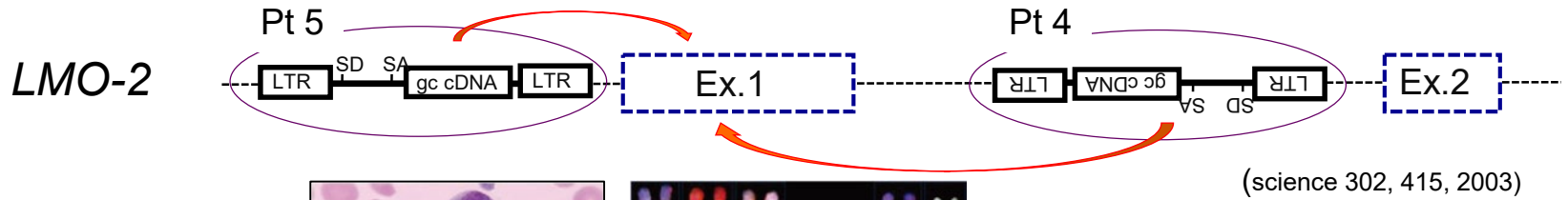
- ex vivo 遺伝子治療（レトロ／レンチウイルスベクター）
  - 染色体へのベクター挿入による挿入発がん変異の問題
  - レトロウイルスベクターでは15年後にも発症（原発性免疫不全症）
  - レンチウイルスベクターにおける特定のクローンの増殖 (sickle cell disease)
  - CAR-T細胞療法におけるクローナルな増殖の報告
- ゲノム編集技術（Cas9ヌクレアーゼ）
  - 臨床試験が開始された。
  - オフターゲット効果による標的部以外での遺伝子の破壊
  - オンターゲットにおける染色体の欠失

→ 遺伝子（染色体）の変化による造腫瘍性は共通の問題である。

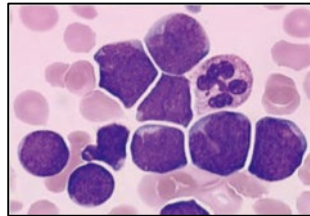
# 遺伝子治療の副反応

## 3. ウイルスベクターによる遺伝子レベルの毒性（造血幹細胞遺伝子治療）

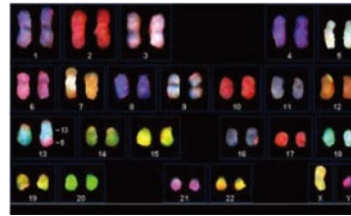
がん原遺伝子へのレトロウイルスベクターの挿入による白血病の発症



Pt4



M-G stain



Spectral Karyotype

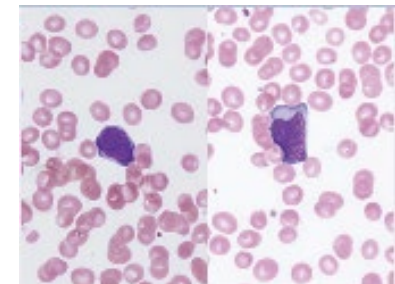
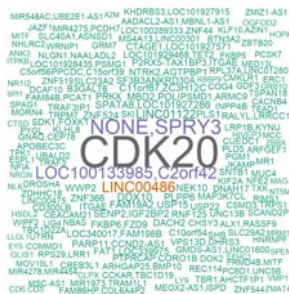
## 国内での慢性肉芽腫症遺伝子治療

芽球の出現

1M

12M

32M



MECOM挿入クローン増殖と発がん

- 現在は安全なレンチウイルスベクターが使用されているが、染色体挿入型ベクターでは依然として長期の観察が必要である。

# Ex vivo遺伝子細胞治療における造腫瘍性

## 1. CAR-T→Clonal な増殖の報告あり。

	疾患	ベクター挿入	Clonal expansion	CARの検出	影響に関して	文献
CD19-CAR	CLL	TET2 gene	Day+120頃から	5年以上	治療効果の向上？	nature, 558: 308, 2018
CD22-CAR	ALL	CBL gene	Day+50頃から	6ヶ月	治療効果の向上？	blood adv. 3: 2317, 2019

- レンチウイルスベクターのinsertional mutagenesisによるクローン性の増殖
- 増殖および長期間の生存に関与 → 治療効果の向上をもたらした可能性。
- 一方で、second hitが入ることで、腫瘍化の可能性も考えられる。

➡ ベクター挿入部位データの収集は重要である。

## 2. HSC-GT →レトロウイルスベクターでは挿入発がん変異が報告

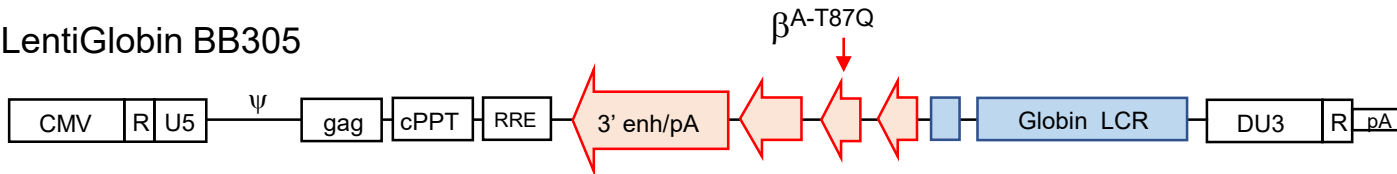
疾患	ベクター	白血病	病型	IS
SCID-X1	レトロ (MFG)	6/23	T-ALL	LMO2, CCND2, BMI1
CGD	レトロ (SFFV)	3/4	MDS	MECOM
	レトロ (MFGS)	1/1	MDS	MECOM
WAS	レトロ (MFG)	9/10	T-ALL, AML	LMO2, MECOM, MN1など
ADA-SCID	レトロ (MND)	1/40	T-ALL	検証中
Sickle cell disease	レンチ	1/47	AML	ベクター挿入は関係ないとの見解 <sup>7</sup>

# Stem cell gene therapy for Sickle cell disease

- SCD
- Vaso-occlusion, hemolytic anemia, inflammation/vascular injury
  - Results in multi-organ failure
  - 2 to 3 decades reduction in life expectancy

(2021 ASGCTより)

## LentiGlobin BB305



### Case 1 MDS/AML (2018)

### Case 2 AML (2021)

	Case 1 MDS/AML (2018)	Case 2 AML (2021)
Mutations at base line	No mutation or cytogenic abnormalities	No mutation or cytogenic abnormalities
Mutations post-treatment prior to AML	NA	No mutations
Mutations at onset of AML	Monosomy 7 Abnormal 19p RUNX1 (p.Asp198Gly) PTPN11 (p.Phe71Leu) KRAS (p.Gly12Ala)	Monosomy 7 Partial loss of 11p RUNX1 Exon 5 stop gained PTPN11 p.A72V
Vector in blast	No	Insertion into intron 4 of VAMP4

- Case 2
- VAMP4 has no known association with cellular proliferation or oncogenesis.
  - VAMP4 insertion did not impact gene expression proximal to the vector insertion.

➡ Unlikely related to vector-mediated insertional oncogenesis.

ベクター挿入部位解析を中心とするゲノム解析は必須



# ゲノム編集における安全性の評価

	疾患	細胞	標的遺伝子	ヌクレアーゼ	状況	
T細胞	HIV	CD4+T細胞	CCR5 (ノックダウン)	ZFN	Phase 1～ 1/2	
	AML	T細胞	PD-1, CD52 (ノックダウン)	TALEN	Phase 1～ 1/2	CD123-CAR-T細胞 (レンチ)でのノックダウン
	B cell malignancy	T細胞	CD19の導入	Cas9	Phase 1～ 1/2	
	B cell malignancy	T細胞	TCR $\alpha/\beta$ , $\beta$ 2MG	Cas9	Phase 1～ 1/2	ユニバーサルCD19-CAR-T細胞の作製
HSC-GT	サラセミア	CD34陽性細胞	Erythroid enhancer to BCL11A gene	Cas9	Phase 1/2	難治性遺伝病に対するゲノム編集による造血幹細胞遺伝子治療
	SCD	CD34陽性細胞	Erythroid enhancer to BCL11A gene	Cas9	Phase 1/2	

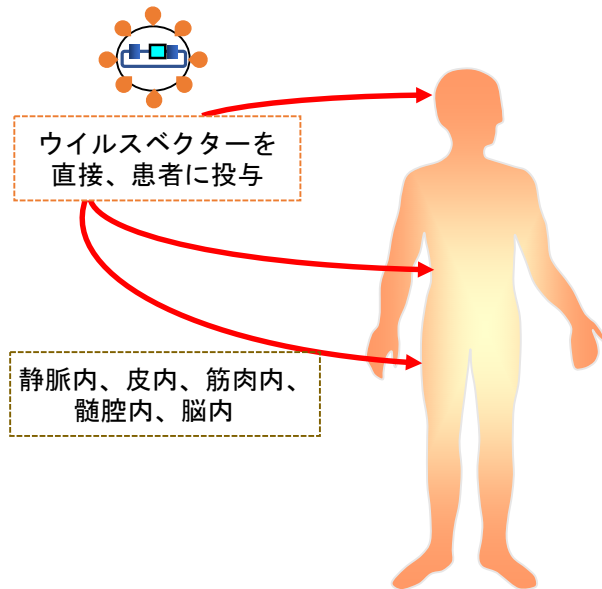
## ゲノム編集における安全性評価

「ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の品質・安全性等の考慮事項に関する報告」

(Human Gene Therapy 31, 2020)

- **オフターゲット効果** : GUIDE-seq, CIRCLE-seq, SITE-seqなど
- **オンターゲット変異 (広範囲の欠失など)** : long-read sequence
- **染色体変異 (転座、欠失、inversion)** : G-band, Q-band, FISH
- P53変異
- Cas9の発現に対する免疫応答
- Germline modification
- AAVベクターを使用する際のベクター挿入

# In vivo 遺伝子治療実施における課題・問題点



## In vivo 遺伝子治療

「直接患者体内にウイルスベクターを投与する」

標的疾患	疾患・治療法
遺伝性疾患	脊髄性筋萎縮症 血友病 慢性動脈閉塞症 先天性黒内障
悪性腫瘍	悪性黒色腫、悪性神経膠腫

## 遺伝子治療の実施における安全性の課題

In vivo 遺伝子治療（アデノ随伴ウイルスベクター：AAVベクター）

- 各細胞・組織におけるベクターの過剰局在
- 宿主免疫の活性化：投与後の臓器障害
- 生殖細胞への伝播：感染、germline transmission
- （宿主ゲノムへの組込みと造腫瘍性：AAVベクターによる挿入変異）
- 患者からのウイルス排出による平行感染：体内の残存期間

# 遺伝子細胞治療に特有の非臨床安全性試験

## 1. 生体内分布

① In vivo遺伝子治療：ウイルスベクター

② Ex vivo遺伝子治療：遺伝子導入細胞

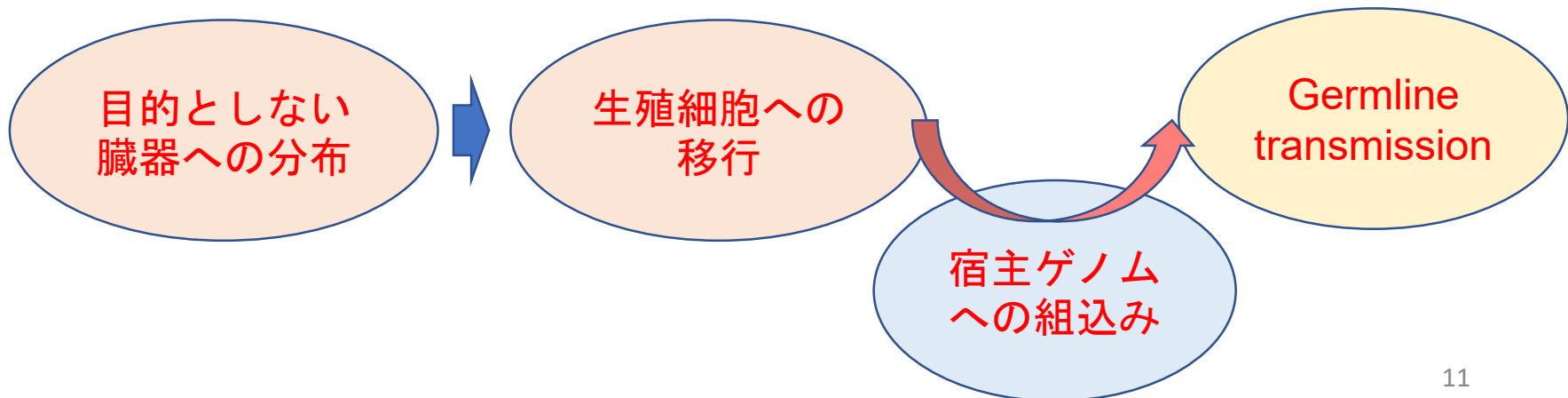
- 目的の組織・細胞における分布（血液、脳脊髄液、肝臓）
- 目的としない組織・細胞における分布（**生殖細胞**）

投与方法も大きく関与

- 静脈内投与
- 局所投与（脳室内投与など）

## 2. 遺伝子の組み込み

### 生殖細胞への組み込み



# 遺伝子細胞治療に特有の非臨床安全性試験

---

## 3. 造腫瘍性：遺伝子導入細胞の造腫瘍性

Ex vivo遺伝子治療：宿主ゲノムへのベクター挿入

- ① がん原遺伝子の活性化
- ② がん抑制遺伝子の破壊

In vivo遺伝子治療：分布組織のゲノムへのベクター挿入の可能性は否定できず。

→ ベクター挿入部位解析

## 4. 免疫毒性

ベクターおよびベクターからの遺伝子産物による免疫系の変化

- ・ ヒトにおける免疫反応の予測は困難？

## 5. ウイルスの残存評価

- ・ 患者体内における感染性ウイルス粒子の残存
- ・ 感染性のウイルス粒子の体外排出

# 遺伝子細胞治療特有の安全性の評価とは？

1. 遺伝子細胞治療の急速な発展の一方で、国内における開発環境は整っていない。

- ① 遺伝子細胞治療が内包する遺伝子毒性を中心とした安全性の解析・評価系の確立がなされていない。
- ② 従前の非臨床安全性試験での枠組みでの取り扱いが困難。

➡ 遺伝子細胞治療固有のリスクを的確に評価できる非臨床安全性試験の確立

- i. 遺伝子の変化を同定 → ゲノム解析法の確立
- ii. 遺伝子導入細胞の造腫瘍性の評価 → 細胞機能解析法の確立

2. 非臨床安全性試験の確立における課題

従来のマウス等を用いた非臨床試験の結果を単純に外挿することは困難。

- ① 造腫瘍性（遺伝子導入細胞における挿入変異）に関する観察期間
  - 一般的な白血病発症には、3-5年の経過である。
  - 動物モデル（マウスなど）自体の腫瘍形成傾向の影響
- ② ウイルスベクターに対するヒト特異的な免疫応答

➡ 非臨床試験に加えて、治験および市販後も引き続き精度の高い解析を積み重ねる必要がある。

# 安全性の評価に必要なことは？

安全性評価をどのようにカバーすべきか？

1. 短期の安全性
2. 長期の安全性
3. ヒトへの外挿性

## 非臨床試験

### 1. 短期の安全性

- 体内分布
- 生殖細胞への伝達
- ウイルスの排出

- 免疫反応：ヒト特異的？

### 2. 長期の安全性

- 造腫瘍性：ベクター挿入

臨床試験、市販後の長期フォロー

# 国立成育医療研究センターでの取り組み

## 遺伝子細胞治療推進センター（国立成育医療研究センター、2021年5月現在）

実施時期	種類	疾患	患者数	臨床研究・治験／承認
2004年2月	レトロウイルスベクター製品	ADA欠損症	2	臨床研究
2014年7月	レトロウイルスベクター製品	慢性肉芽腫症	1	臨床研究
2019年10月	レンチウイルスベクター製品	Wiskott-Aldrich症候群	1	治験
2020年6月	レンチウイルスベクター製品 (CAR-T細胞療法、キムリア)	B細胞ALL	5	治療（承認薬）
		非ホジキンリンパ腫	1	治験
2020年10月	AAVベクター製品	血友病B	1	治験
2021年3月	AAVベクター製品 (ゾルゲンスマ)	脊髄性筋萎縮症	1	治療（承認薬）

### ■ 今後実施予定の治験・治療

- ・ 血友病A（治験、AAV製品）：2021年2月IRB審査
- ・ 血友病Bの小児患者（治験、AAV製品）：2021年IRB審査予定（審査時期未定）

## 遺伝子細胞治療実施患者の臨床研究（成育医療研究センター）

### ① 「Ex vivo遺伝子細胞治療における遺伝子導入細胞の動態および体内への影響に関する解析」

- ・ 対象：CAR-T細胞療法（キムリア）、造血幹細胞遺伝子治療。
- ・ 内容：遺伝子導入細胞の体内動態、ベクター挿入部位解析など。

### ② 「In vivo遺伝子治療におけるウイルスベクターの検出及び免疫反応の評価系の確立のための基礎的研究」

- ・ 対象：脊髄性筋萎縮症（ゾルゲンスマ）血友病B（治験）に対するin vivo遺伝子治療
- ・ 内容：体内におけるAAVの残存、免疫応答などの評価。

# 非臨床安全性試験：ゲノム解析

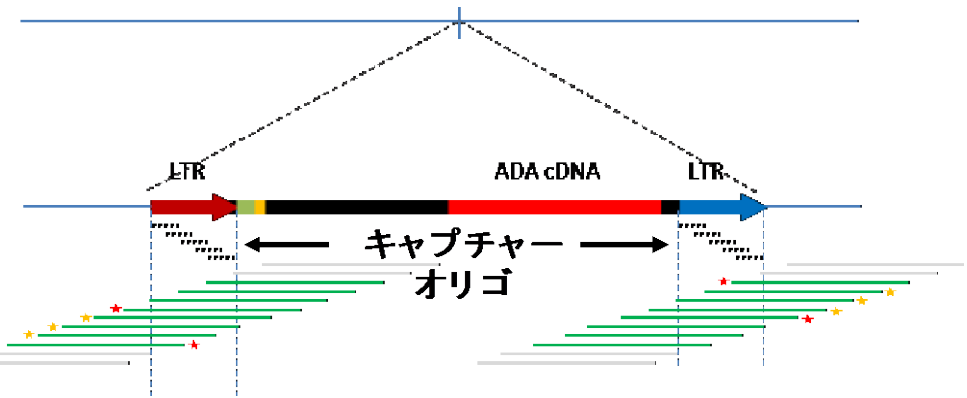
## 造血幹細胞遺伝子治療患者におけるベクター挿入部位解析

### LTRキャプチャー法

ベクター挿入DNA断片の濃縮

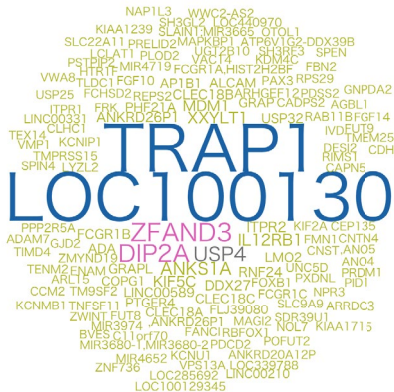


NGSによる挿入部位同定

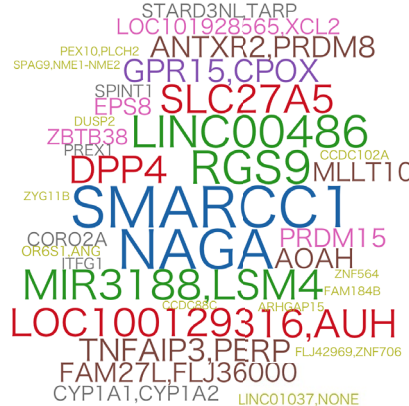


### ① ADA欠損症 (ADA-SCID)

患者1



患者2



### ② X連鎖慢性肉芽腫症

治療後12M



治療後32M



骨髄異形成症候群発症

遺伝子治療後のベクター挿入細胞のクローナルな増殖を同定



# 非臨床安全性試験：ゲノム解析

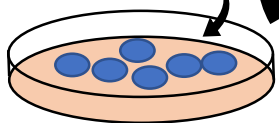
## ゲノム編集技術におけるオフターゲット解析

「X連鎖高IgM症候群に対する改良型Cas9を用いたゲノム編集技術によるT細胞遺伝子治療法の開発」  
 「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」

(AMED難治性疾患実用化研究事業 2018-2021年度)

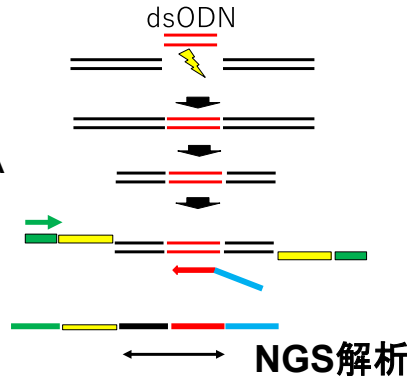
### <GUIDE-seq>

- Cas9
- ガイドRNA
- dsODN



- T細胞
- 造血幹細胞

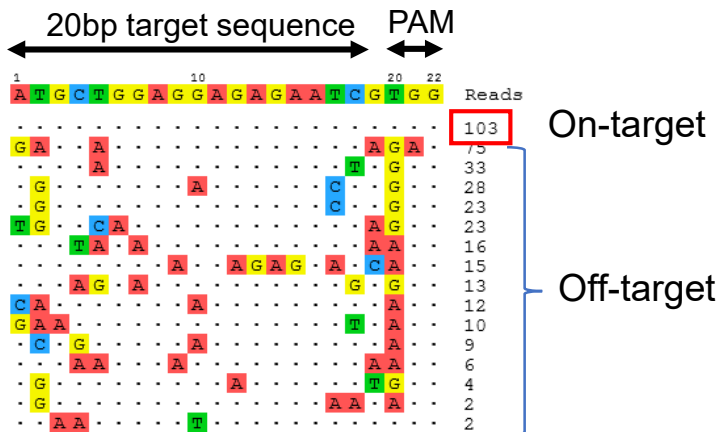
ゲノムDNA



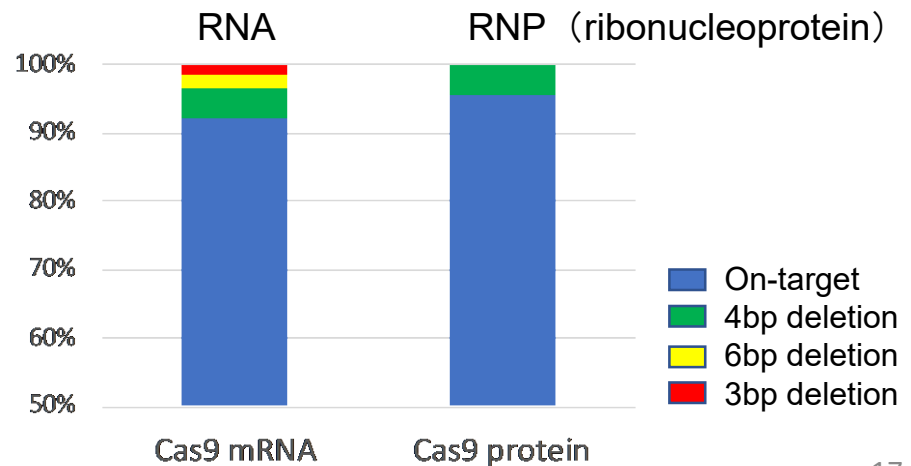
- DNA断片へのアダプター付加
- PCRによるdsODN-アダプター間の増幅
- NGSによる解析

- 従来のGUIDE-seq法は確立済み。
- RAISING法による高感度なGUIDEseq法の確立が可能。

### <オフターゲット解析例>



Cas9 DNA : オフターゲットが多い



# 非臨床安全性試験：ゲノム解析

## 染色体の転座、欠失の検出

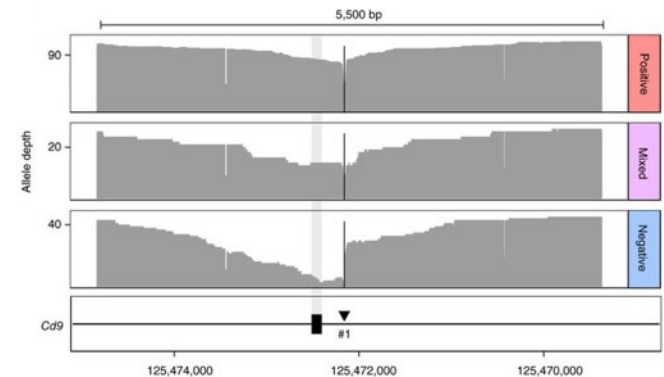
① ウイルスベクター：ベクター挿入によるがん関連遺伝子の強発現→染色体の不安定性

疾患	白血病	病型	ベクター	IS	付随変異
SCID-X1	6	T-ALL	MFG	LMO2, CCND2, BMI1	t(6, 13), trisomy 10, SIL-TAL NOTCH変異, CDK2NA欠失
CGD	3	MDS	SFFV	MECOM	Monosomy 7
	1	MDS	MFG	MECOM	がん抑制遺伝子Aの欠損
WAS	9	T-ALL AML	MFG	LMO2, MECOM, NM1	多数の染色体の異常

② ゲノム編集

- オンターゲット（標的部位）の広範囲欠失
- 相同組換え修復（HDR）の際に生じる染色体転座

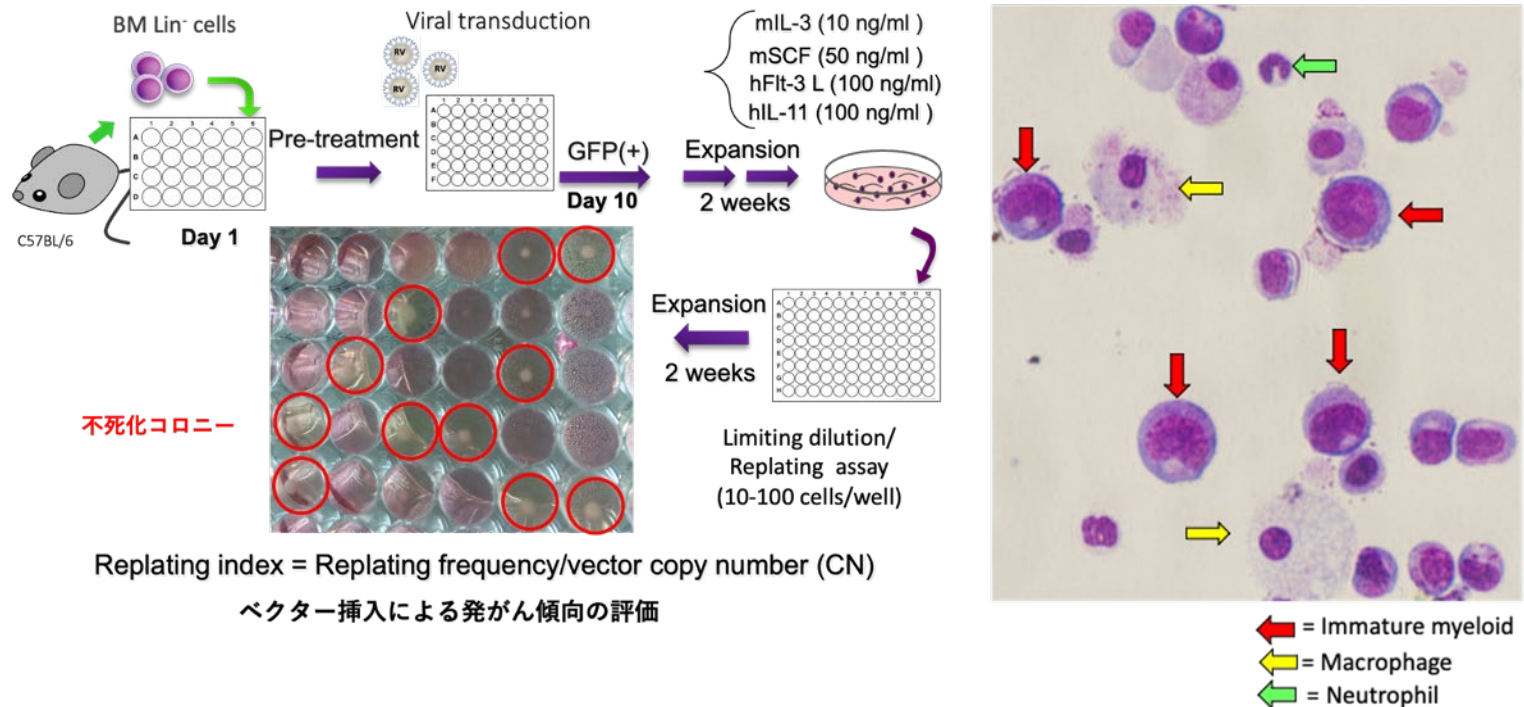
- I. ロングリードシーケンス：欠失の同定
- II. 全ゲノム解析：欠失、転座の同定



Kosicki M, et al. Nat. Biotechnol. 36: 765-771, 2018

# 非臨床安全性試験：細胞機能解析

## 1. In vitro immortalization アッセイ (in vitro 不死化アッセイ)

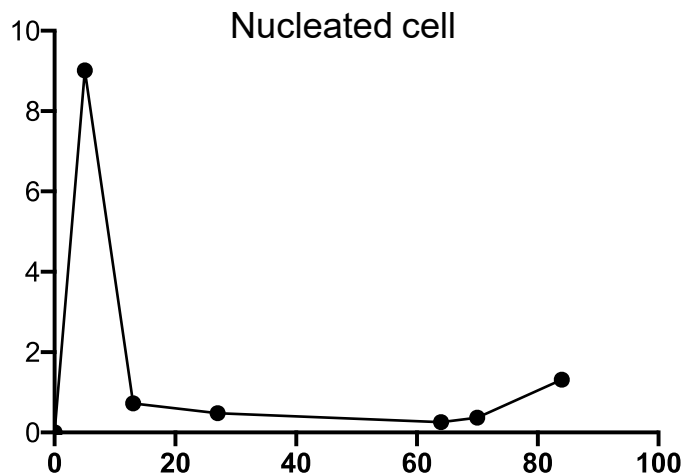
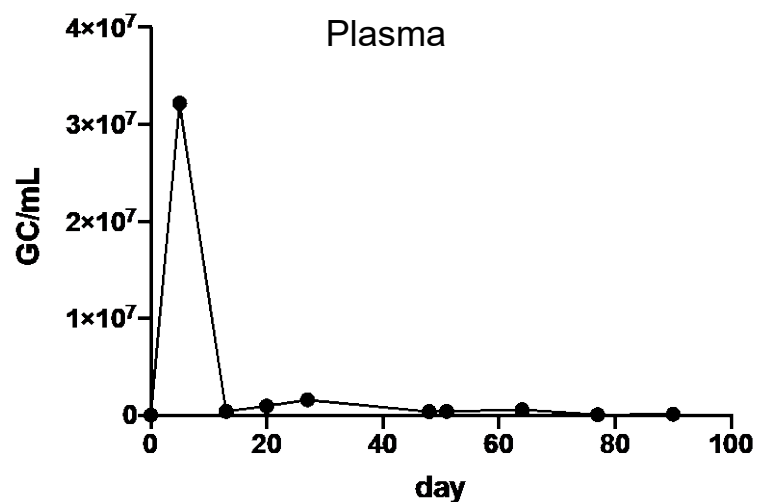
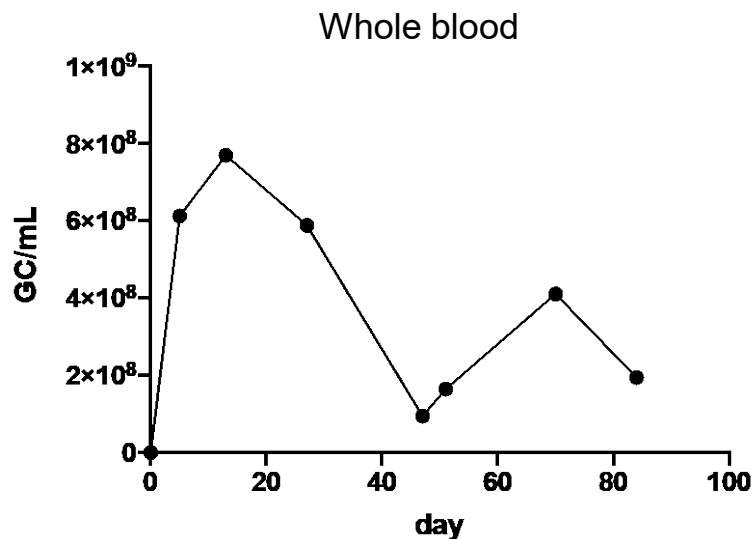


## 2. 免疫不全マウスを用いた評価

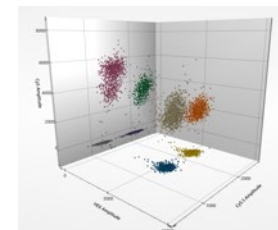
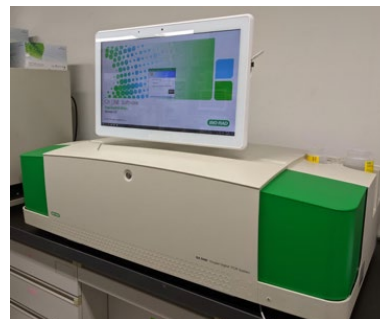
- 遺伝子導入（改変）した疾患患者細胞をNOGマウスまたはNOG-ΔMHCマウスに移植。
- 中長期（2-12ヶ月）での細胞動態（生体内分布）、クローナリティや染色体の変化を評価。
- 各臓器におけるヒト由来細胞の腫瘍変化、ベクターコピー数、ベクター挿入部位などを分析。

ゲノム解析、細胞機能解析により遺伝子導入細胞の造腫瘍性を総合的に評価

# In vivo遺伝子治療における血液中のAAVの推移



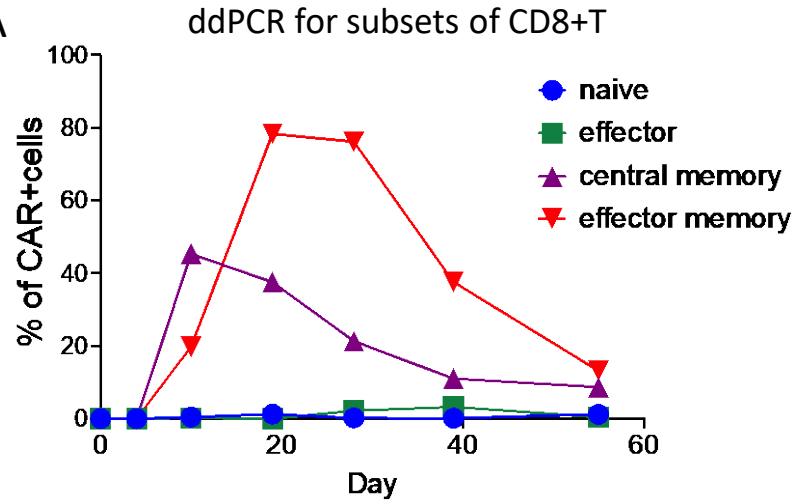
- 血漿中のウイルスは速やかに減少する。
- 有核細胞（白血球）にも、存在？



BIO-RAD QX-ONE

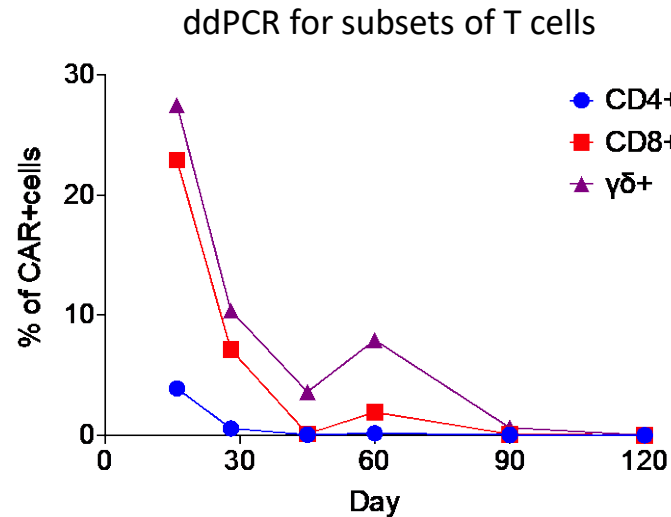
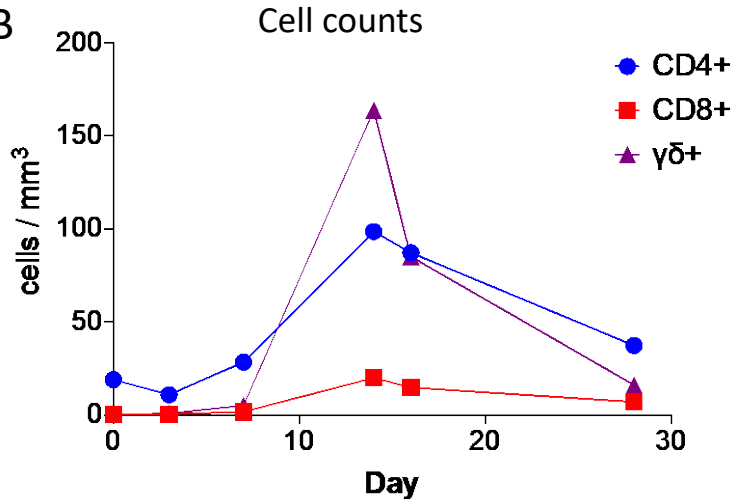
# CAR-T細胞の体内動態

## Case A



- エフェクターメモリーCD8+Tを中心としたCAR-T細胞の増殖
- 投与後、1-2週間での増殖
- $\gamma\delta$  T細胞を中心としたCAR-T細胞の増殖
- CAR-T細胞の増殖が低い。

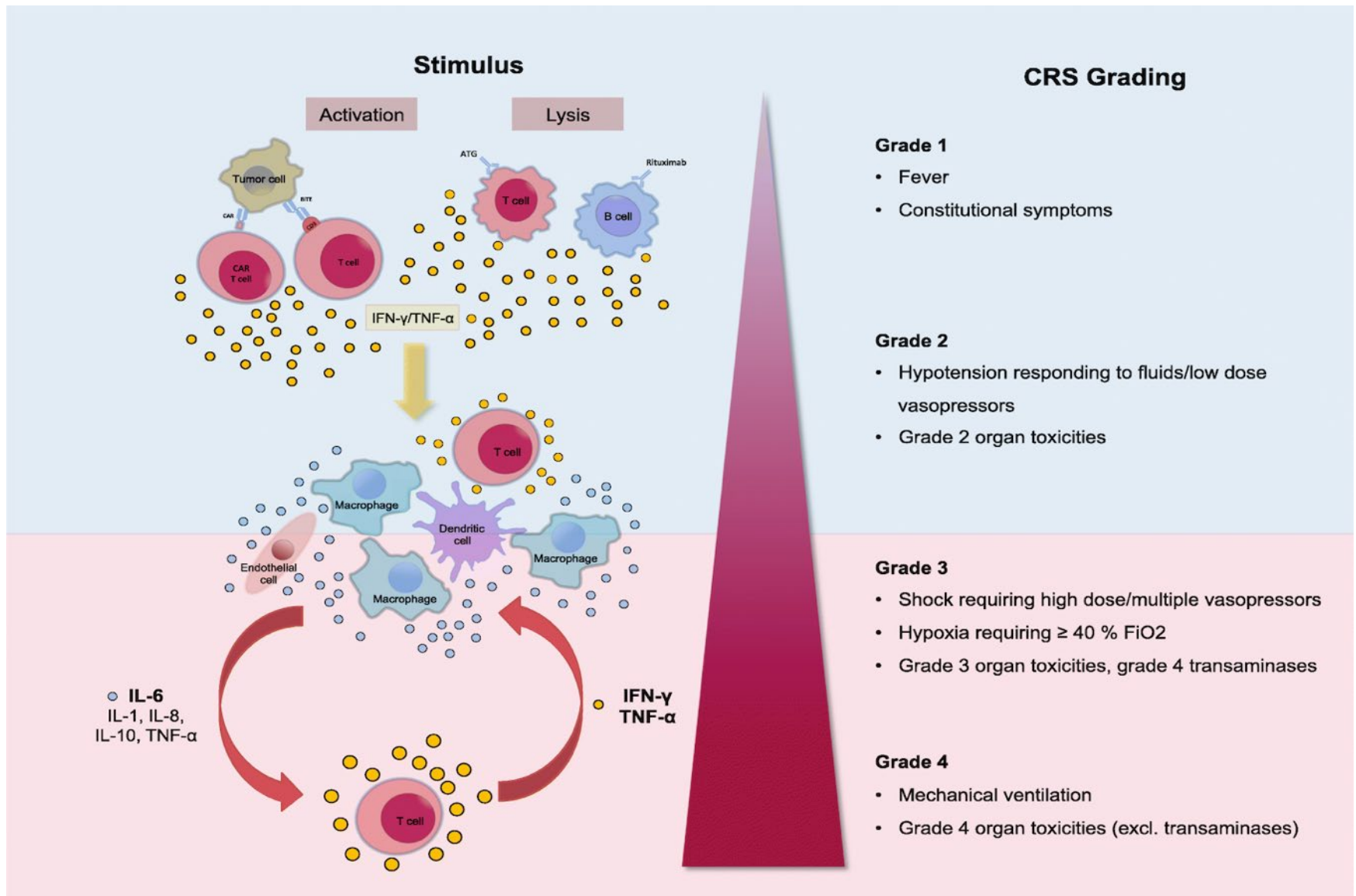
## Case B



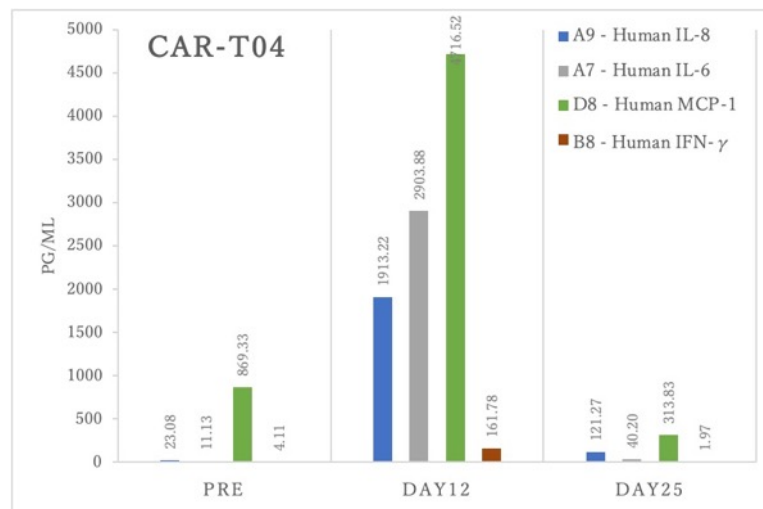
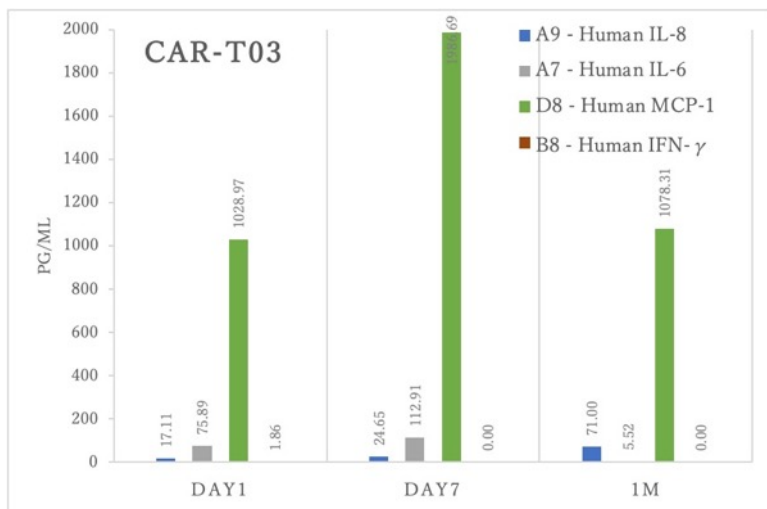
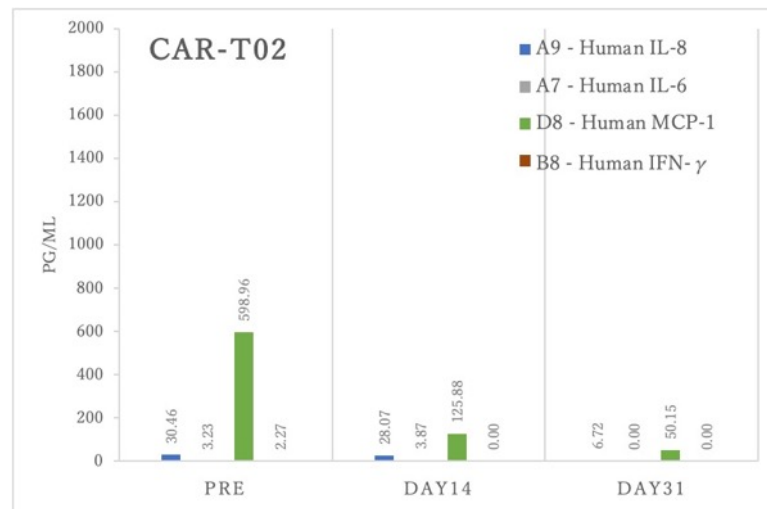
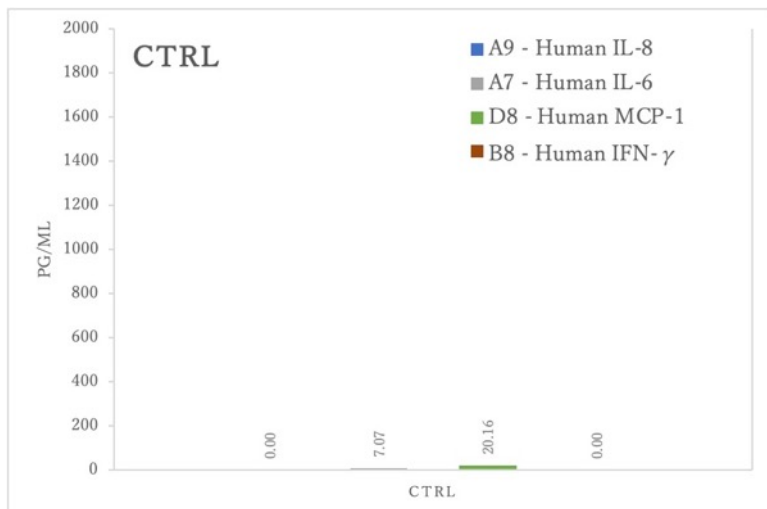
## Responderとpoor responderにおけるCAR-T細胞の品質の違い

- 患者細胞が原材料となることから、正確な特性解析は難しい。
- 有効なCAR-T細胞の作製が可能かどうかについて患者T細胞の評価系の必要性？

# CAR-T細胞療法におけるCytokine Release Syndrome : CRS



# CAR-T細胞療法におけるCytokine Release Syndrome : CRS



- 軽症例 単球・マクロファージ系の活性化
- 重症例 IL-8, IL-6の上昇

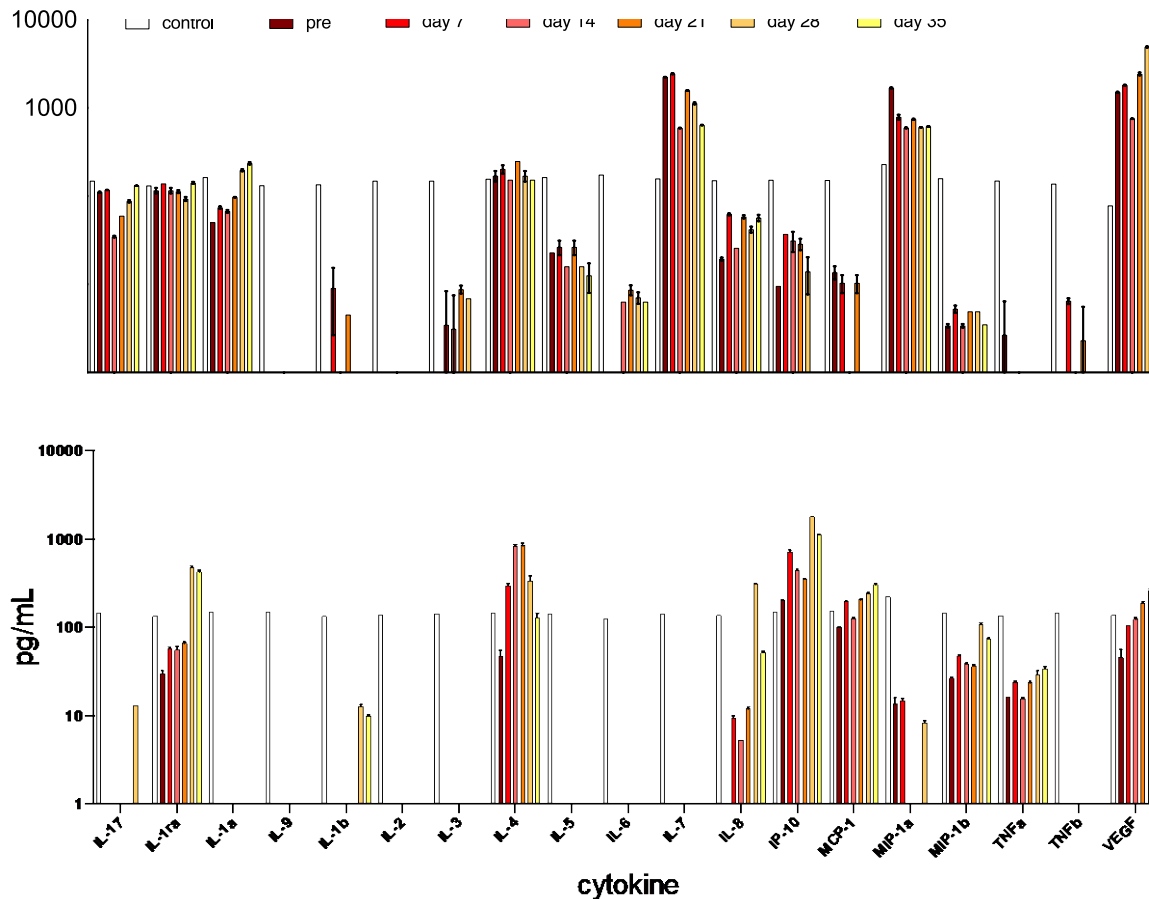
トシリズマブの有効性の裏付け

# 遺伝子細胞治療患者における免疫反応

- AAVベクターによるin vivo遺伝子治療

→ ウイルスベクター投与後の免疫毒性

サイトカインの網羅的解析



AAV投与後早期の肝機能障害は獲得免疫ではなく、**自然免疫系の関与が大きい**。



# NCCHDにおける遺伝子細胞治療の評価体制

臨床研究センター



病院

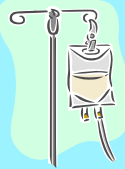


研究所



## 遺伝子細胞治療の実施

- 各診療科
- 遺伝子細胞治療推進センター



臨床検査部

## 臨床研究として実施

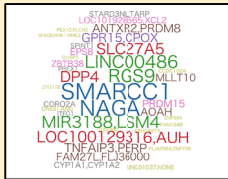
- ベクター挿入部位解析
- 網羅的サイトカイン解析
- ベクター・遺伝子導入細胞の体内動態

## 衛生検査所：保険診療による検査

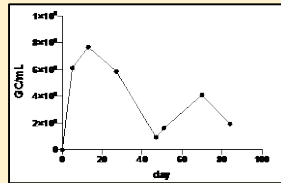
- フローサイトメトリーによる免疫機能検査

## 試験結果

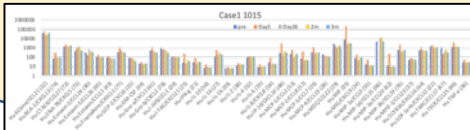
ベクター挿入部位 (造腫瘍性)



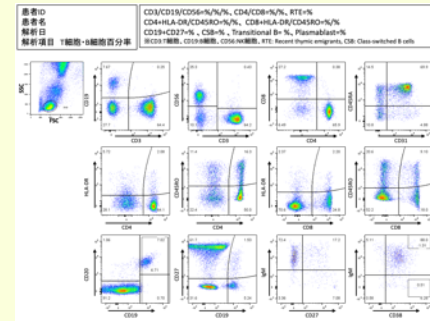
ベクターの残存



免疫応答の評価



## 遺伝子細胞治療特有の安全性試験の実施



# 非臨床試験を含めた安全性試験の課題

実際の開発における非臨床安全性試験

最終的に治験、製造販売承認の際の原資料

- 
- 試験結果の妥当性
  - 極めて高いレベルの精度管理

- ① 実際の遺伝子細胞治療患者の試料を用いた解析系の確立。
- ② 開発の初期段階より企業との連携の下、評価系をstep by stepで構築していく必要性。

治療法の開発だけでなく、非臨床安全性試験法の確立にも、アカデミアと企業の連携が重要となってくる。

