

# 遺伝子治療の画期的発展と規制状況

2019年9月28日

山口照英  
金沢工業大学  
日本薬科大学



# 本日の話題

- 遺伝子治療について
  - 遺伝子治療の光と影
- 遺伝子治療の開発状況と評価
- 遺伝子治療に関する指針等の改定
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待

# 遺伝子治療

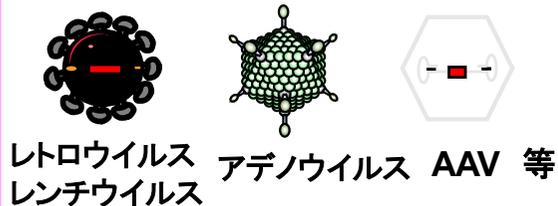
## 遺伝子を外から補充・付加する治療法

体内 ( In vivo ) 遺伝子治療  
( 遺伝子を組み込んだベクターの投与 )

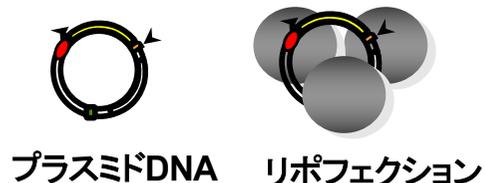
体外 ( ex vivo ) 遺伝子治療  
( 遺伝子導入細胞の投与 )

### ベクターの例

#### ◆ ウイルスベクター



#### ◆ プラスミドベクター



#### ◆ 腫瘍溶解性ウイルス

直接投与



腫瘍内、  
筋肉内、  
眼内、肝臓  
内、脳内、  
皮内 等

標的細胞を取り出す  
( 自己、同種 )

造血幹細胞  
T細胞 等

培養、増幅

ベクターによる遺  
伝子導入

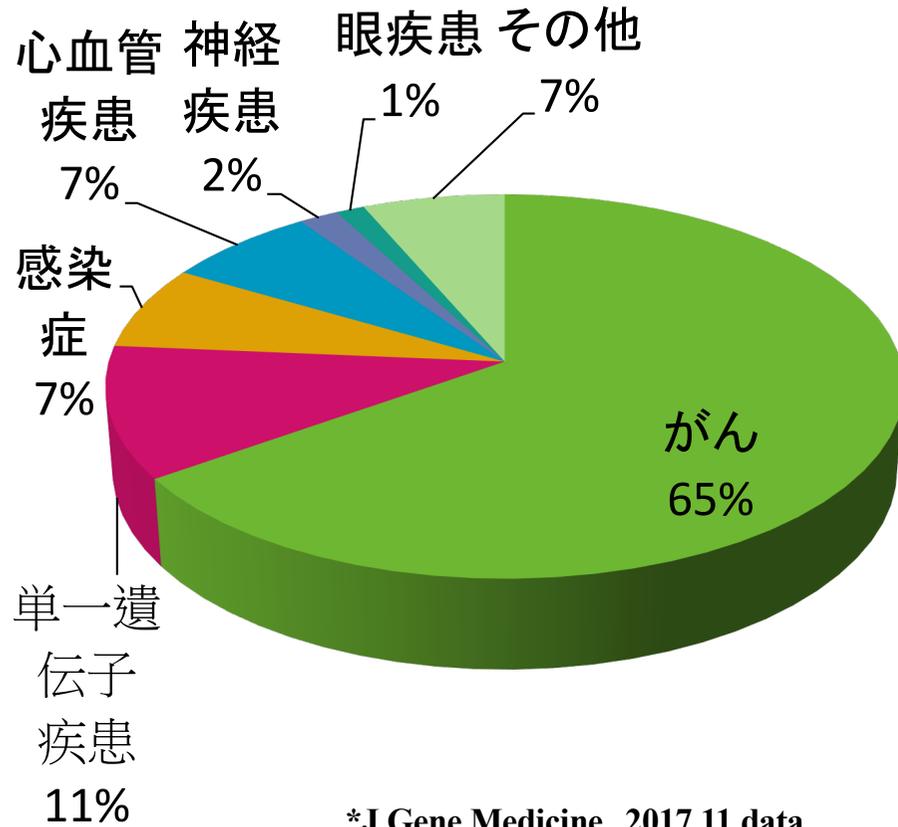
培養、増幅

投与

遺伝子導入細胞

- 遺伝子の変異が原因の病気では、正常な遺伝子を補充することで治療効果
- がんなどの難病に対しても開発が進んでいる
- 欧米では既に計8品目が上市、日本は2品目承認

# 遺伝子治療の対象疾患



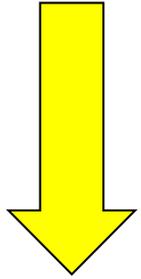
\*J Gene Medicine 2017.11 data

- **がん**(メラノーマ、B細胞性白血病)、前立腺癌、肺癌、脳腫瘍、頭頸部癌など
- **単一遺伝子疾患**: 先天性免疫不全症(ADA欠損症)、レーバー病、LPL欠損症、血友病、 $\beta$ サラセミア、副腎白質ジストロフィーなど
- ウイルス感染症: HIV/AIDS、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなど
- 心血管疾患: 閉塞性動脈硬化症、狭心症、心筋梗塞等
- 神経疾患: パーキンソン病、アルツハイマー病、ALSなど
- 眼疾患: 網膜色素変性、加齢黄斑変性など

遺伝子疾患だけでなく様々な疾患を対象として開発研究が行われている  
初期には重篤な疾患を対象としたためにがん疾患の比率が高い

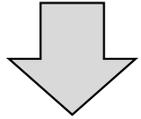
# 遺伝子治療の歴史

創世期



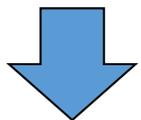
- 1970年代: 組換えDNA技術の発展
- 1990年: **世界で初めての遺伝子治療実施(米): ADA欠損症**
- 1995年: **日本で初めての遺伝子治療実施: ADA欠損症**
- 1999年: **アデノウイルスベクターの大量投与による死亡事故(米)**
- 2000年: **X-SCID遺伝子治療で初めての成功例が報告される(仏)**
- 2002年: **X-SCID遺伝子治療の副作用で白血病発症(仏)**

停滞期



- 2008年頃から単一遺伝子疾患を中心に成功例の報告が相次ぐ
- 2012年: ASGCTがTarget 10 (**5-7年以内に実用化が期待される遺伝子治療対象疾患**)を発表

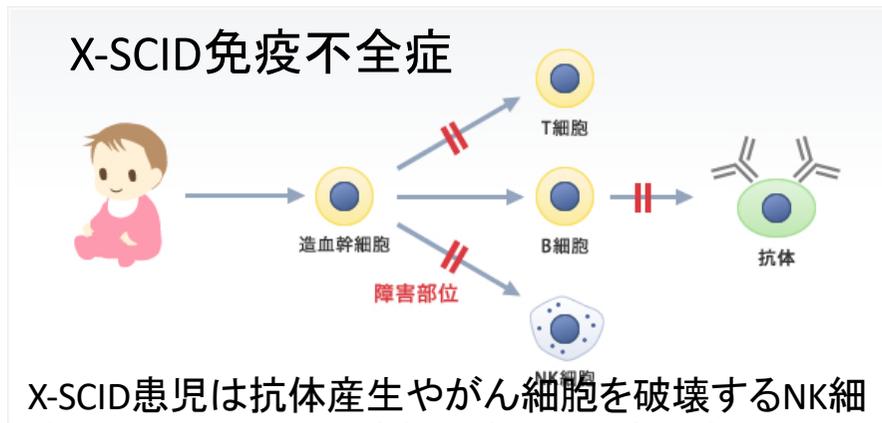
再興期



実用化

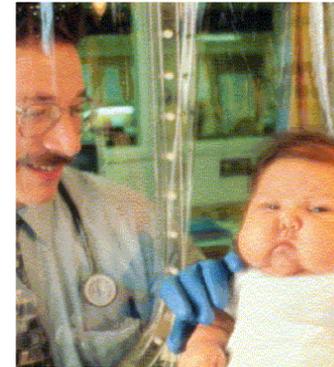
- 2012年: 先進国で初めての遺伝子治療製品(AAV)が欧州で承認
- 2015年: 欧米で初めての腫瘍溶解性ウイルス製品(HSV)が欧米で承認
- 2016年: 欧州で遺伝子導入細胞製品2品目承認(ADA欠損症、GVHD予防)
- 2017年: 米国でCAR-T細胞製品2品目、遺伝子治療製品(レーバー病)1品目承認
- 2019年: 日本でCAR-T細胞製品とHGFプラスミド製品の承認

# 遺伝子治療の成功例と副作用



X-SCID患児は抗体産生やがん細胞を破壊するNK細胞などのリンパ球の成熟不全により感染症を繰り返す

From 原発性免疫不全症候群情報サイトe-免疫.com



無菌室でしか生きられないX-SCID患児が普通の生活を

## 重篤な副作用

- アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡 (米・1999年)
- X-SCID遺伝子治療でレトロウイルスベクターによる遺伝子の染色体挿入により、20名中5名にT細胞白血病様症状発症 (仏英・2002年～)

- 単一遺伝子疾患では目覚ましい成果が得られている。またCARTや腫瘍溶解性ウイルスのように非遺伝的疾患に対する製品で著効を示す事例がでてきた。
- 予想外の重篤な副作用も生じるなど、遺伝子治療はまだ医療として克服すべき点が多いが、安全性・有効性を高めるための研究が進められている

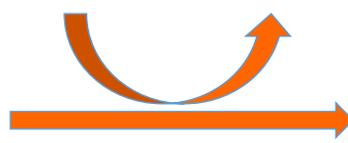
現在X-SCIDレンチウイルスベクターを用いた臨床試験で好成績が得られている

# レトロウイルスベクターの挿入変異によるがん化

X-SCID遺伝子治療:造血幹細胞を使用した理想的な遺伝子治療



CD34陽性細胞



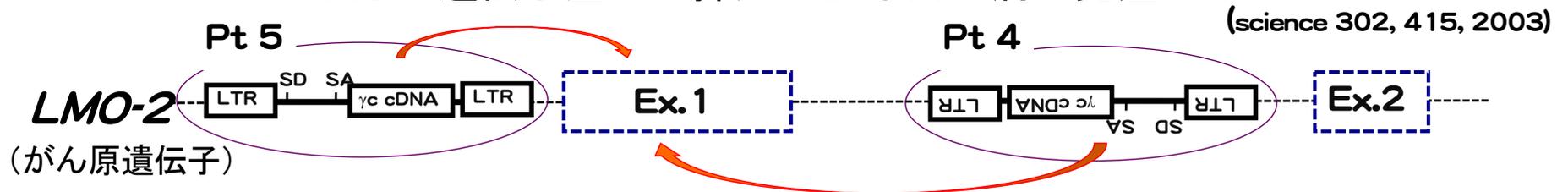
retroviral vector



After his gene therapy, he was running around at home

- He is a normal little boy now - (science, 2000)

## LMO-2遺伝子座への挿入による白血病の発症



急性T細胞白血病の原因遺伝子であるTAL-1のコファクターとして機能し、TAL-1と同時にLMO-2が発現するとT細胞白血病を発症する。さらにTAL-1とLMOファミリーはGATA3のコファクターとして働き、その下流の転写活性化因子として機能する

現在より安全とされるレンチウイルスを用いた臨床試験で好成績が得られている

# 医薬品規制調和国際会議 (ICH)

ICH

- **正式名称 (英文) : The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**
- **目的 : 日米EU 3を中心として新医薬品の承認審査関連規制の調和を図ることにより、データの国際的な相互受入れを実現し、臨床試験や動物実験等の不必要な繰り返しを防ぎ、承認審査を迅速化するとともに、新医薬品の研究開発を促進し、もって優れた新医薬品をより早く患者の手元に届けること**
- **遺伝子治療に関しては、「遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group; DG)」が設置 (2001~2009)**
- **ICH M6 ガイドライン (Viral shedding) の作成途中で2009PhRMAの反対でEWGが解散**
- **その後、規制当局のみの国際活動として継続**

2019年11月シンガポールで遺伝子治療製品製品のBiodistributionに関するガイドラインを正式課題にするかのICH会合が開催  
遺伝子治療ICHWGが組織されれば遺伝子治療の国際的な調和が可能

# ICHの場で造腫瘍性に関する議論を実施

2004年ワシントン会議

- ベクターや導入細胞ごとのリスク分類
  - Retro-, Lentivirus > AdV, AAV > SeV
- 患者の年齢（6ヶ月）
- 細胞当たりの平均的ベクターコピー数/挿入数 > 1
- 導入された細胞数に依存
- 投与量
- 導入された細胞種によるリスクはT細胞や他の細胞より、造血幹細胞がより高い
  
- 結論：リスクはあるものの造血幹細胞移植が適用できない場合は患者のメリットはリスクを上回る



FDAは長期ホローアップガイドラインの策定

FDAの提案によりICH専門家会議で議論（FDAガイドラインに反映）

# 本日の話題

- 遺伝子治療について
  - 遺伝子治療の光と影
- 遺伝子治療の開発状況と評価
- 遺伝子治療に関する指針等の改定
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待

# 欧米で承認された遺伝子治療用製品

製品名 (会社名)	製品の種類	導入遺伝子	適応症	承認国
Glybera (UniQure)	AAV1	リポ蛋白質リパーゼ <sup>a</sup> (S447Xノバ リアント)	LPL欠損症	欧州 2012 (2017承認整理)
Imlygic (Amgen)	腫瘍溶解性HSV1	GM-CSF	メラノーマ	米・欧 2015
Strimvelis (GSK)	レトロ-造血幹細胞	ADA	ADA欠損症	欧州 2016
Zalmoxis (MolMed)	レトロ-T細胞	HSV-TK Mut2 /ΔLNGFR	ハプロー致造血幹細胞移 植のGVHD予防	欧州・条件付承認 2016
Kymriah (Novartis)	レンチ-T細胞 (CAR-T細胞)	抗CD19 キメラ抗原受容体	B細胞性 急性リンパ芽球性白血病	米国2017 日本 <b>0219</b>
Yescarta (Kite Pharma)	レトロ-T細胞 (CAR-T細胞)	抗CD19 キメラ抗原受容体	B細胞性 リンパ腫	米国2017
Luxturna (Spark Therapeutics)	AAV2	RPE65	レーバー 先天性黒内障	米国2017
Zynteglo (blurbird bio)	レンチウイルス-造血幹細胞	ヘモグロビンHbA <sup>T87Q</sup>	βサラセミア	欧州・条件付承認 2019
AMG0001	HGF-プラスミド	HGF	下肢動脈梗塞 バージャー病	日本2019
Zolgensma (Novartis)	scAAV9	SMN1	脊髄性筋萎縮症	米国2019

# 実用化が期待される遺伝子治療対象疾患Target 10

January 6, 2012

From: the American Society of Gene & Cell Therapy and all the Society's past Presidents

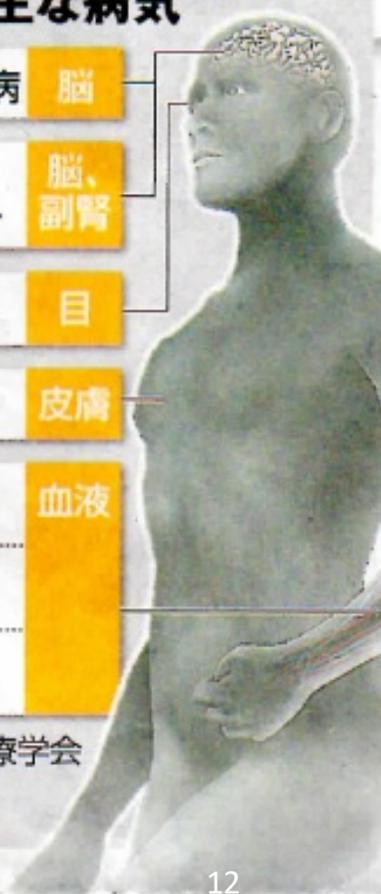
To: NIH Director, Francis S Collins

Target 10 group of disease and disorder

2012年に発表されたTarget 10中  
5品目が2019までに承認

1. レーバー先天性黒内障⇒ **Spark** 米国で承認 (2017)
2. **ADA-SCID**⇒ **GSK** 欧州で承認2016
3. 血友病B⇒ **Baxter、Sparks** Phase I/II
4. **X-SCID** (Phase I/II)
5. パーキンソン病 (Phase I)
6. 加齢黄斑変性⇒ **Sanofi-Genzyme** (Phase I)
7. 副腎白質ジストロフィー⇒ **Bluebird Bio** (Phase II/III)
8. **サラセミア(溶血性貧血)** ⇒ **Bluebird Bio** (EU条件付き承認)
9. **リンパ腫**⇒**Novartis, Kite Pharma**米国で承認 (2017)
- 10.**メラノーマ**⇒ **Amgen** 欧米で承認 2015

5~7年以内に実用化が期待される主な病気

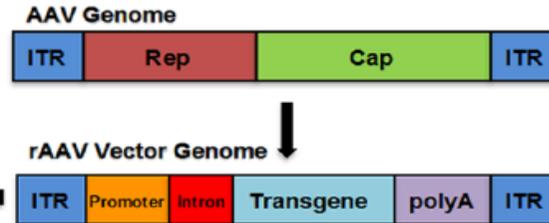
- 
- |               |      |
|---------------|------|
| • パーキンソン病     | 脳    |
| • 副腎白質ジストロフィー | 脳、副腎 |
| • 加齢黄斑変性      | 目    |
| • メラノーマ       | 皮膚   |
| • 血友病         | 血液   |
| • ADA欠損症      |      |
| • サラセミア       |      |

米遺伝子細胞治療学会による

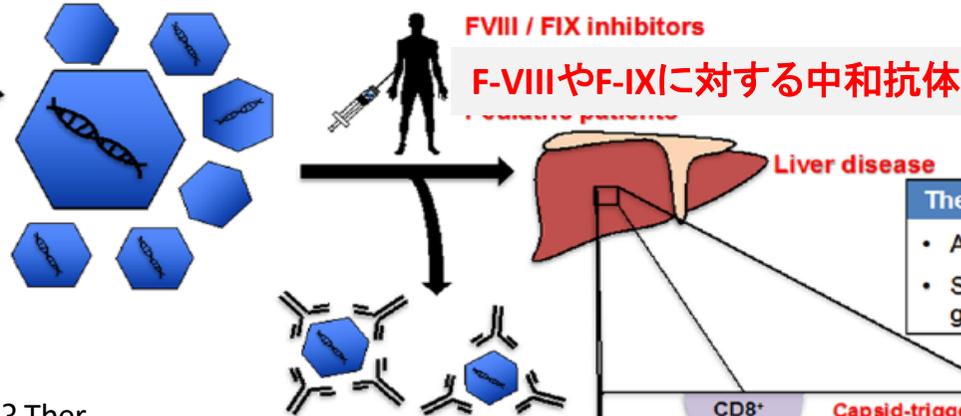
# 血友病AAV遺伝子治療

効率的な産生  
遺伝子コドンの最適化  
CpG含量

AAVベクターの結  
成型の選択  
空ベクター  
最適な製造



- 十分な効果を得ることが難しい
- いかに効率よく発現させるか



- Therapeutic Options**
- Antiviral therapy
  - Skeletal muscle gene therapy

Doshi & Arruda : Gene therapy for hemophilia: what does the future hold? Ther Adv Hematol 2018, Vol. 9(9) 273–293

## 中和抗体との戦い

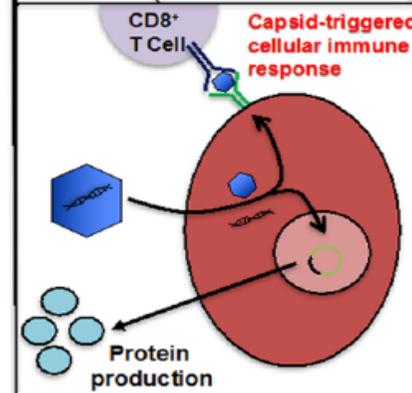
血友病では補充するF-VIIIやF-IXは異種タンパク質として認識され中和抗体(インヒビター)ができてしまう。製剤量やバイパス製剤を活用しながら出血を制御する必要がある。

Pre-existing neutralizing antibodies to AAV serotype

**Therapeutic Options**

AAVに対する中和抗体

- Empty capsids
- Immunosuppression
- Novel serotype
- Regional delivery



- Therapeutic Options**
- Lower vector dose
  - Immunosuppression

# 血友病A及びBを対象とした遺伝子治療薬の開発

## 血友病

- 従来のベクターでは十分な効果が認められていなかった

十分な第8因子の供給が可能な  
AAVベクターを開発

## Hemophilia A

Pfizer/Sangamo: SB-525 is a gene therapy that uses an AAV vector to deliver a new therapeutic copy of the Factor VIII gene to the patient's liver cells, designed to enable the liver to produce and secrete functionally active Factor VIII protein into the bloodstream.

## 遺伝子治療によるヘモフィリア治療の長所と欠点

- 新しい技術であり、**長期に亘る有効性や安全性が課題**
- 挿入変異のリスク、全身投与した場合に生殖細胞の改変リスク**
- 一回の投与で何年にも亘って効果が持続(第8因子や第9因子の高産生性があれば)
- 単回での薬剤費は高いと想定されるが生涯にわたる医療費は抑制可能
- 幼少期(新生児期)に投与することにより免疫応答が抑えられインヒビター発生が抑制



- Biodistribution
- 長期に亘る発現の持続性評価
- F-VIIIやF-IXに対する抗体(中和抗体)産生の評価
- 生殖細胞の改変リスクの評価(ICH見解)

# CAR-T: リンフォーマに対する画期的製品

## 遺伝子改変したCART019

Emma Whitehead は2010年に急性白血病になり、抗がん剤治療も効かず余命半年と宣告されCART療法に最後の望みを託す。CART療法では重篤な副作用も出たが白血病細胞が駆除され、現在もALLサバイバーとして元気に生活している。

## CAR T細胞療法製剤の開発

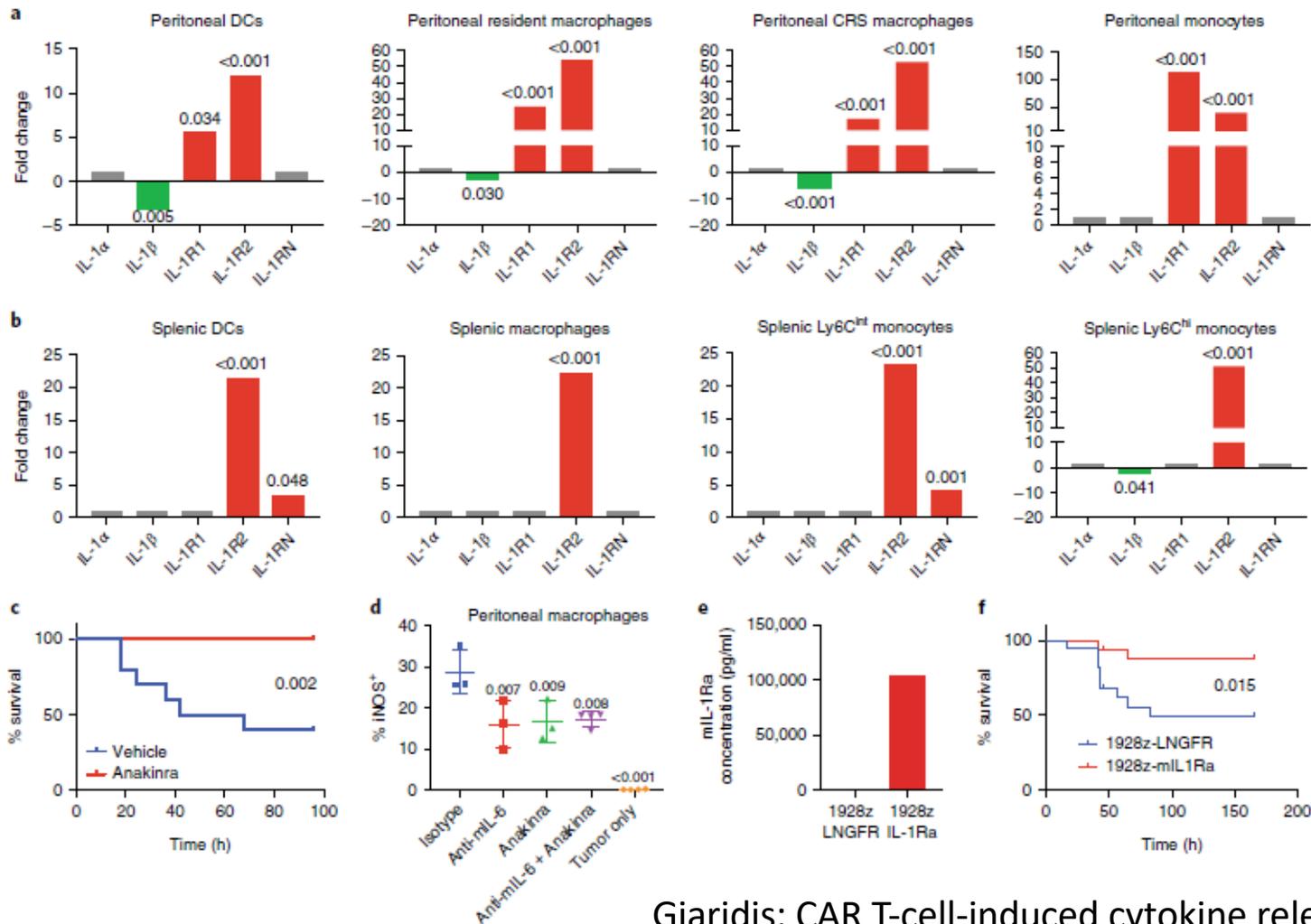
- FDA 2017年に2つの抗CD19 CARを発現する自己CTL細胞を承認
- Novartis社のCART製品KymriahがFDAから承認。小児・若年r/r B-ALL適応。2017年10月9日
- 米Kite Pharma社の**CART製品である**Yescarta (axicabtagene ciloleucel)が**FDAから承認**。2種以上の全身療法でも有効性が得られなかった再発/難治性の**大細胞型B細胞性リンパ腫**の成人患者。2017年10月18日
- がん治療を受けた患者ではCARTの製造が困難なことが多い
- ユニバーサルCART製品の開発 (FDAが同種由来CARTの治験を承認。2018)
- 2019年2月20日 Kymriah: 再生医療等製品・生物由来技術部会が製造販売を承認

- 重篤な副作用: 血中抗体価の低下や**サイトカインストーム症、毛細管漏出症、脳症**などの致死的副作用
- 開発中のユニバーサルCARTや固形がんなどのCART製品の評価は？

# CAR T細胞療法製剤の開発

- FDA 2017年に2つの抗CD19 CARを発現する自己CTL細胞を承認
- Novartis社のCART製品KymriahがFDAから承認.小児・若年r/r B-ALL適応. 2017年10月9日
- 米Kite Pharma社のCART製品であるYescarta (axicabtagene ciloleucel)がFDAから承認. 2種以上の全身療法でも有効性が得られなかった再発/難治性の大細胞型B細胞性リンパ腫の成人患者. 2017年10月18日
- がん治療を受けた患者ではCARTの製造(増幅)が困難なことが多い
- ユニバーサルCART製品の開発(FDAが同種由来CARTの治療を承認.2018) ⇒ 高額治療費の課題への対応
- サイトカインストーム症、毛細管漏出症、致死的脳症などの重篤な副作用をどのように制御していくかが課題

# CART開発とバイオ医薬品



Giariadis: CAR T-cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophage and abated by IL-1 blocked.

Nature . 2018

抗IL-1受容体アンタゴニスト(Anakinra)が致死的脳症に効果がある可能性

**CARTのような先端医薬品の副作用の抑制とバイオ医薬品  
Anakinraが脳症に有効である場合その投与タイミングは？**

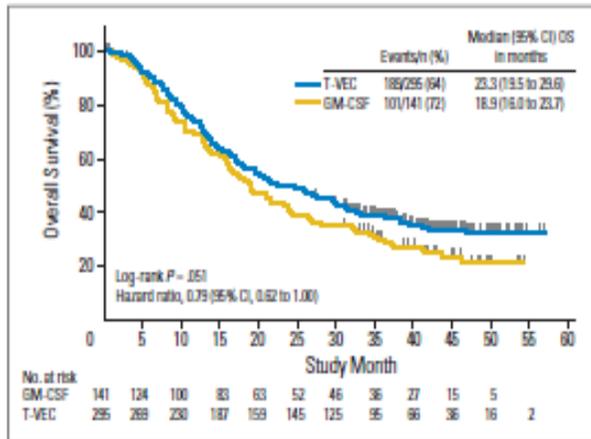
# FDA: メラノーマの治療に対し、初めて腫瘍溶解性ウイルス療法薬 talimogene laherparepvec を承認 (2015-11-7)

腫瘍溶解性ウイルスの臨床有効性の概念の変更:  
腫瘍溶解によるバイスタンダー効果の重要性

Oncolytic virotherapy

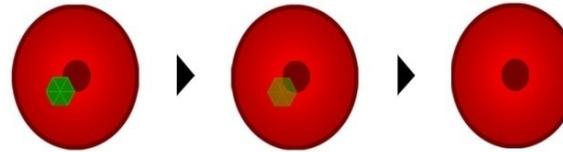


oncolytic immunotherapy



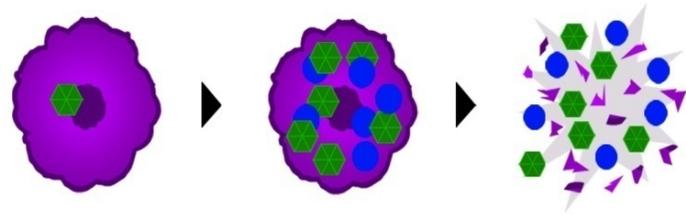
遅延型の有効性: 免疫応答が認められるまで時間を要する

1) Inside a healthy cell, the virus (●) is unable to replicate, leaving the cell unharmed.

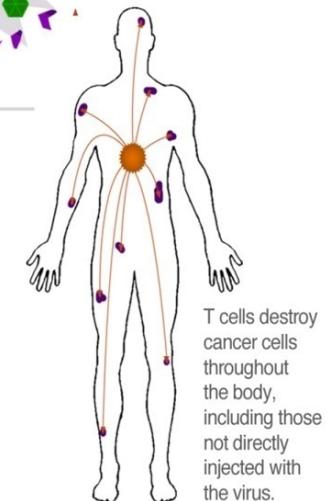
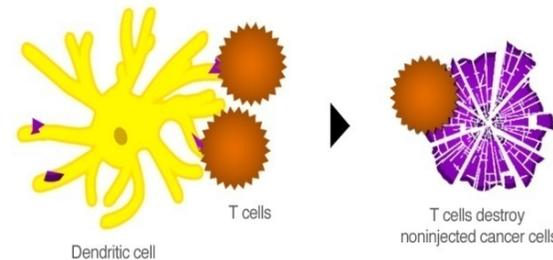


Talimogene laherparepvec: proposed mechanism of action for systemic immunological effect

2) Inside a cancer cell, the virus replicates and secretes GM-CSF (●) until the cell lyses, releasing more viruses, GM-CSF, and antigens (▲).



3) GM-CSF attracts dendritic cells to the site, which process and present the antigens to T cells. The T cells are now "programmed" to identify and destroy cancer cells throughout the body.



がんを効率的に死滅させる機能以上にがん免疫応答が重要な役割を担っていると期待

日本でも複数の腫瘍溶解性ウイルスが開発中  
有効性評価におけるがん免疫応答に役割は？

# 腫瘍溶解性ウイルス(OV)

- 品質特性からの安全性評価
- 製造工程での相同組換え等
- 目的外の組換えOV(検出法の課題)
- ウイルス安全性評価(OV中和抗体の利用)
- 製造に用いたプラスミドを持つOVの評価
- 非臨床安全性試験
  - Biodistribution(正常組織への分布、持続性)

ICH 見解 腫瘍溶解性ウイルス(2009年9月17日) 腫瘍溶解性ウイルスの治療上の有用性と複製能を有するウイルスを使用することによるリスクとのバランスが重要. 本文書では、腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発のための一般的原則を示す

# A new ICH guideline on Biodistribution

•**ICH S12 A new Guideline on Non-clinical Biodistribution Studies for Gene Therapy Products, which will “recommend types of the nonclinical studies with which collection of biodistribution data is considered informative and/or necessary to support dosing in early clinical trials, and which will provide guidance on the design of the studies. This will result in streamlined development of the gene therapy products with higher scientific rigor while minimising the unnecessary use of animals.”**

Concept Paper for ICH Biodistribution guideline as ICH S12 will be approved in 2019 ICH Singapore meeting.

### 遺伝子治療製品の品質・安全性に関する指針 生体内分布

遺伝子治療用製品の安全性及び有効性を評価するための基礎データとして、適切な動物を用いて遺伝子治療用製品の生体内分布を明らかにすること。生体内分布の解析から、目的とする生体組織への分布だけでなく、目的としない生体組織及び生殖細胞への分布を明らかにすることにより、ヒトでの安全性や生殖細胞への意図しない組込みリスクを評価する際に着目すべき器官を明らかにすることが可能になる。ベクターの分布や消失を含めた持続性を明らかにすることにより、ヒトでの適切な解析時期に関する情報が得られる。

# 本日の話題

- 遺伝子治療について
  - 遺伝子治療の光と影
- 遺伝子治療の開発状況
- **遺伝子治療に関する指針等の改定**
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待

# ゲノム編集を見据えた遺伝子治療臨床研究指針の改定

- タンパク質やmRNA 導入によるゲノム編集技術は、従来の遺伝子治療の定義に合致しない可能性。特にゲノムを切断し改変するという特性から、短期のみならず長期の安全性について遺伝子治療と同等の評価が必要と考えられる
- EU及びFDA: タンパク質やmRNAを用いたゲノム編集技術も遺伝子治療
- 現時点で想定されるゲノム編集技術を用いた遺伝子改変を遺伝子治療とみなすためには、現行の指針の定義等を変更する必要がある。ヒト胚への適用も従来の遺伝子治療と同様に禁止する必要がある。

## 遺伝子治療臨床研究指針の改正

- 多様なゲノム編集技術 (Gene Editing Tools) について、遺伝子治療と定義に適合するように改正。海外規制当局との動向と調和した改正としている。

# 「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の問題点

## 第一章 総則

### 第七 生殖細胞等の遺伝的改変の禁止

人の生殖細胞又は胚の遺伝的改変を目的とした遺伝子治療等臨床研究及び人の生殖細胞又は胚の遺伝的改変をもたらすおそれのある遺伝子治療等臨床研究は、行ってはならない。

これまでCRISPR-Cas9により実施されたヒト受精卵のゲノム編集は、

「遺伝的改変」ではあるが、指針の「遺伝子治療等」には該当しない可能性

## 内閣府生命倫理専門調査会

- ヒト受精胚へのゲノム編集技術を用いる研究について議論
- 2016年3月中間報告:ヒト受精胚のゲノム編集は基礎研究に限定し、臨床利用は容認できない
- ヒト受精胚ゲノム編集の基礎研究に関する倫理指針等作成の予定はなく、学会等に依存
- 臨床利用できないとする規定は「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」を根拠

ヒト胚への適用については「ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会」で法的規制を含めた議論がスタート

# 厚生労働省「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の改正発出(2019. 3.28)

## 改正の方向性

- 「遺伝子治療等」及び「最終産物」の定義として、外部から遺伝子を導入せずに行うゲノム編集技術を用いる場合を追加。
- 研究計画書の記載事項として、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療等臨床研究に対応するため、研究計画書に記載すべき事項として、遺伝子の改変に用いるタンパク質、核酸等の情報に関する事項を追加。

改正の方向性	現行
<b>「遺伝子治療等」の定義（第二の一）</b>	
この指針において「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的として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、 <u>及び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又は遺伝子を改変した細胞を人の体内に投与すること</u> をいう。	この指針において「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的として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をいう。
<b>「最終産物」の定義（第二の十六）</b>	
この指針において「最終産物」とは、被験者に投与する最終的に作製された疾病の治療又は予防のための遺伝子が組み込まれたDNA及びこれを含むウイルスその他の粒子（以下「組換え遺伝子等」という。）、 <u>又は特定の塩基配列を標的として遺伝子を改変するために用いるタンパク質若しくは核酸等</u> をいう。	この指針において「最終産物」とは、被験者に投与する最終的に作製された疾病の治療又は予防のための遺伝子が組み込まれたDNA又はこれを含むウイルスその他の粒子（以下「組換え遺伝子等」という。）等をいう。
<b>研究計画書の記載事項（第十八）</b>	
①～⑦ （略） ⑧ 導入する遺伝子及び遺伝子の導入方法 (1) 開発の経緯 (2) 導入する遺伝子 (3) 遺伝子の導入方法 (4) 被験者に投与する最終産物の組成 ⑨ <u>遺伝子の改変に用いるタンパク質又は核酸等の情報</u> <u>(1) 開発の経緯</u> <u>(2) 導入するタンパク質や核酸等</u> <u>(3) 遺伝子の改変の方法</u> <u>(4) 被験者に投与する最終産物の組成</u> ⑩～⑳ （略）	①～⑦ （略） ⑧ 導入する遺伝子及び遺伝子の導入方法 (1) 開発の経緯 (2) 導入する遺伝子 (3) 遺伝子の導入方法 (4) 被験者に投与する最終産物の組成 （新設） ⑨～⑳ （略）

# 医薬品医療機器法に基づく遺伝 子治療製品の開発に関する指針

# 遺伝子治療用製品の品質及び安全性の確保に関する指針

2019年7月9日

治験指針(案)	臨床研究指針(通知別表1別添)
第1章 総則 第2章 開発の経緯及びこれまでの臨床試験の実施状況 第3章 製造方法 1. 遺伝子発現構成体 2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 1) ウイルスベクター 2) 非ウイルスベクター 3. 標的細胞 (ex vivo、in vivo)	8. 導入する遺伝子及び遺伝子の導入方法 (1) 開発の経緯 (2) 導入する遺伝子 (3) 遺伝子の導入方法 1) ウイルスベクター 2) ウイルスベクター以外の方法 3) 体外で目的細胞に遺伝子導入を行う場合 (4) 被験者に投与する最終産物の組成
第4章 品質管理	9. 特性解析と品質試験
第5章 安定性試験 (治験開始時と承認申請時との書き分け)	
	10. 遺伝子治療等臨床研究で投与に用いられる特殊な機器や医療材料
第6章 非臨床試験 第7章 治験の実施が可能であるとした理由	11. 非臨床における安全性及び有効性の評価
第8章 治験の概要	
第9章 倫理性への配慮	臨床研究と薬事法での開発の整合性を目指した

# 改正案第6章 非臨床試験

旧指針別記	治験指針	臨床研究指針
V.非臨床安全性試験 (1) 増殖性ウイルス出現の可能性 (2) 細胞傷害性 (3) 染色体への遺伝子組込み (4) 発現産物の異常発現に起因する安全性 (5) がん原性 (6) 免疫原性 (7) 一般毒性試験	第6章 非臨床試験 1. ヒトでの有効性を示唆するための試験 2. 生体内分布 3. 非臨床安全性試験 (1) 一般毒性評価 1) 動物種の選択 2) 試験デザイン (2) 遺伝子組込み評価 (3) 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価 (4) 生殖発生毒性評価 (5) ベクターに関する考慮事項 (免疫原性と免疫毒性評価) (8) 増殖性ウイルス出現の可能性	非臨床における安全性及び有効性の評価 (1) 臨床的有効性を予測するための試験 (2) 生体内分布 (3) 非臨床試験における安全性の評価 1) 一般毒性 2) その他 ① 免疫原性 ② 造腫瘍性 (遺伝子導入細胞) ③ 生殖細胞への意図しない組込みリスク ④ 併用療法における安全性評価
VI 効能試験		
VII 体内動態等		
VIII 非臨床試験結果等の総括	VI.非臨床試験結果等の総括	(4)非臨床試験の総括

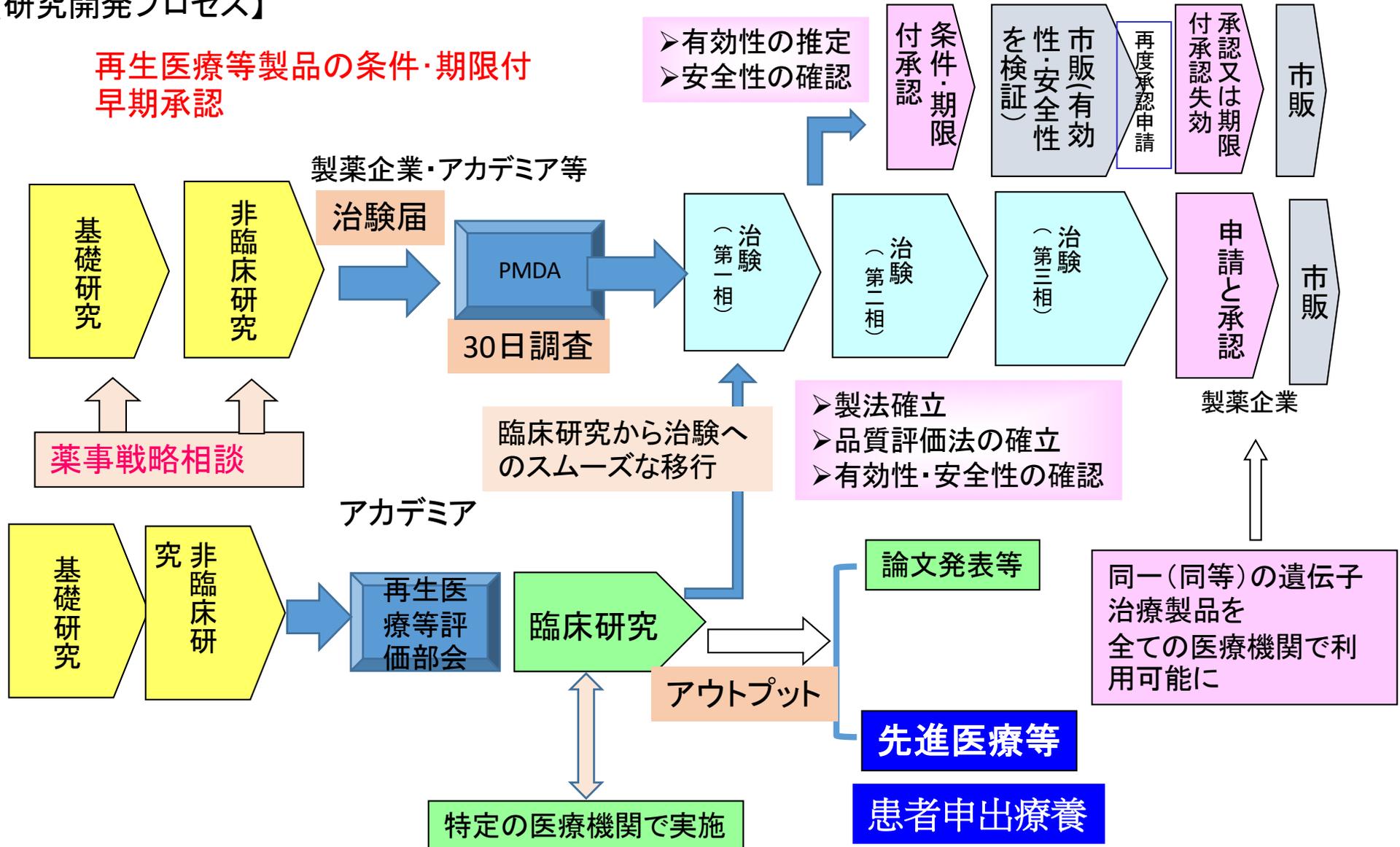
ほとんど項目名のみ

FIHに入るための非臨床試験要件、特に新規ベクターを用いる場合に求められるデータを明確に示す、臨床研究指針との整合

# 品質・安全性(別表を含む):薬機法に基づく開発との整合性

## 臨床研究で得られた成果を薬事法での開発に活用

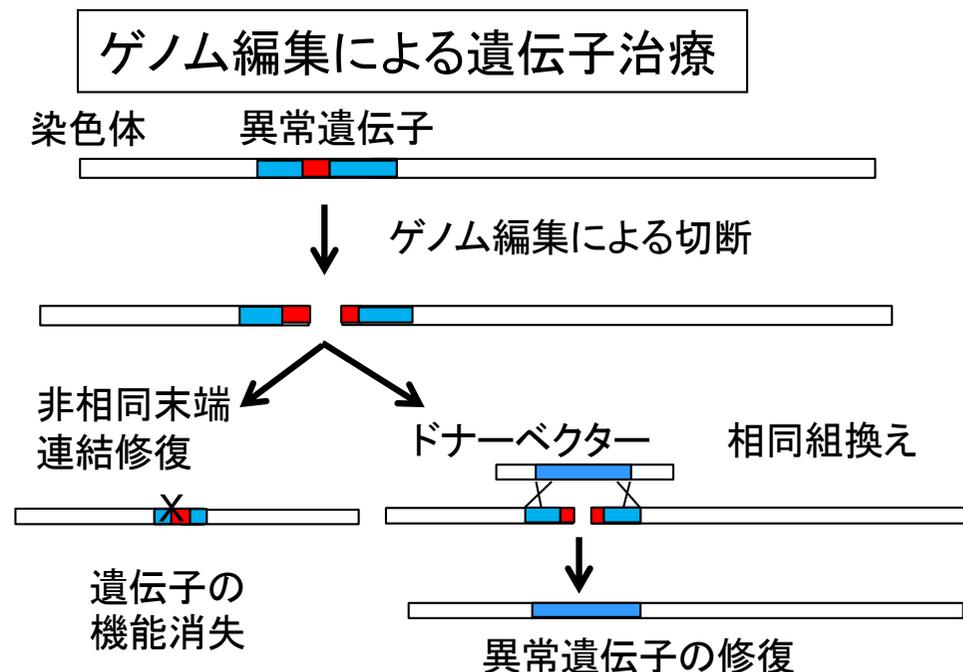
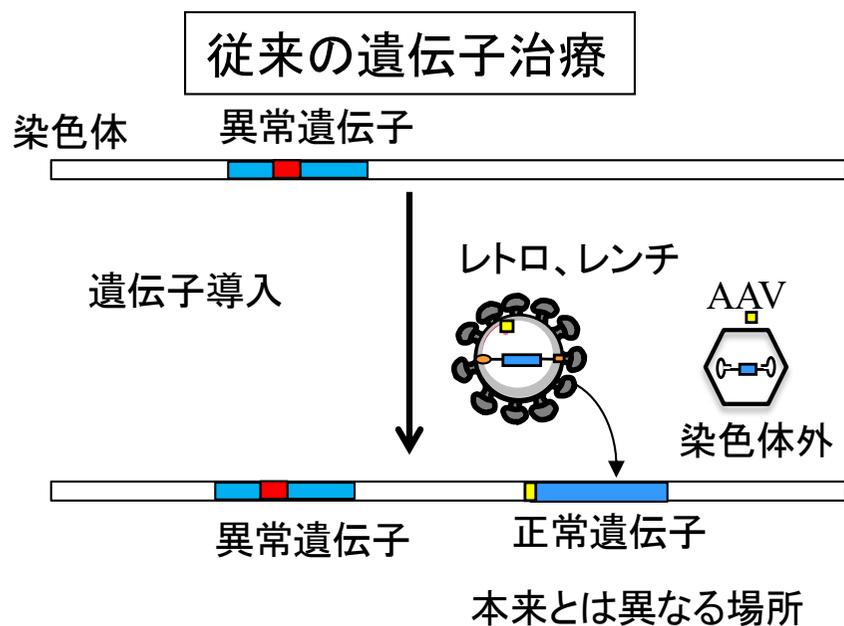
### 【研究開発プロセス】



# 本日の話題

- 遺伝子治療について
  - 遺伝子治療の光と影
- 遺伝子治療の開発状況と評価
- 遺伝子治療に関する指針等の改定
- ゲノム編集技術により遺伝子治療開発への期待

# 遺伝子治療とゲノム編集による治療の違い



- 遺伝子を補充・付加する治療法
- 異常遺伝子は残る
- 正常遺伝子の組み込み部位は制御不能  
→がん化の可能性
- 導入遺伝子の発現調節は困難

- 異常遺伝子や特定の**遺伝子の機能消失** (優性遺伝病の治療)
- 異常**遺伝子の変異を修復** (究極の遺伝子治療)
- **がん化を生じない安全な部位への遺伝子導入**
- 遺伝子の**発現調節も可能**

従来の遺伝子治療では実現できない治療が可能

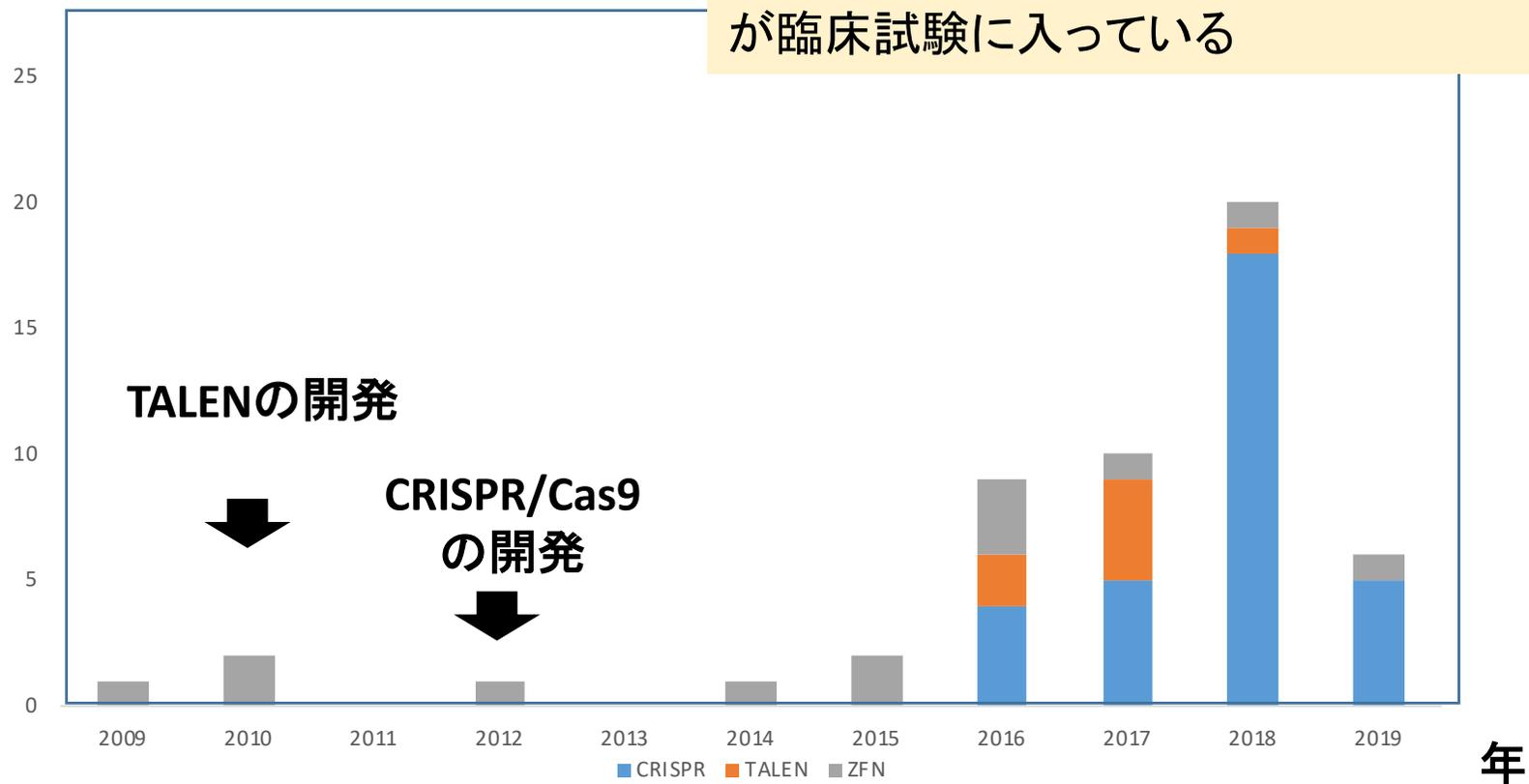


しかし開発が進むにつれて課題も明らかに

# ゲノム編集治療の臨床試験登録件数

(ClinicalTrials.gov, 2019.6)

件数



日本ではまだ実施されていないが、海外ではゲノム編集の臨床試験が急増

# Clinicaltrial.govに登録済のゲノム編集臨床試験

受理年	対象疾患	状況	ゲノム編集の種類、導入法			標的細胞・組織・臓器	標的遺伝子	ゲノム編集目的	治験段階
			ZFN	アデノ	ex vivo				
2009	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2010	HIV	終了	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2012	HIV	実施中	ZFN	アデノ	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2014	HIV	実施中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1/2
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	造血幹細胞	CCR5	KO	Phase 1
2015	HIV	リクルート中	ZFN	mRNA	ex vivo	T細胞	CCR5	KO	Phase 1
2016	血友病B	リクルート中	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ムコ多糖症1型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2016	ALL、CML	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	非小細胞肺癌	実施中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	子宮頸部前がん病変	未実施	ZFN	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV	KO	Phase 1
2016	小児ALL	リクルート中	TALEN	mRNA (CARはレンチ)	ex vivo	T細胞	TCR, CD52	KO (UCART19)	Phase 1
2016	膀胱がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	腎細胞がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2016	前立腺がん	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	ムコ多糖症2型	未実施	ZFN	AAV	in vivo	肝臓	アルブミン座	遺伝子導入	Phase 1
2017	EBウイルス性腫瘍	未実施	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 1
2017	パピロームウイルス性子宮頸部上皮内腫瘍	未実施	TALEN, CRISPR	plasmid	in vivo	子宮頸部	HPV16, HPV18 E7	KO	Phase 1
2017	食道がん	リクルート中	CRISPR		ex vivo	T細胞	PD-1	KO	Phase 2

# ZFN/TALEN/CRISPRによるゲノム編集

**1996年～**

**Zinc finger nucleases (ZFNs)**

FokI nuclease

Zinc finger binding motifs

Zinc finger binding motifs

FokI nuclease

**2010年～**

**TALE nucleases (TALENs)**

Transcription Activator-Like Effectors

FokI nuclease

5'-TAGCCATCAGGTTTTATGTGATGGAACACCTGAGGGACCACTATTACGTA-3'

3'-ATCGGTAGTCCAAAATACACTACTCTGTGGACTCCCTGGTGATAATGCAT-5'

FokI nuclease

Transcription Activator-Like Effector

**2012年～**

**CRISPR/Cas9**

20-bp target sequence

TCCAGGATTATGTAATAG

TGG PAM

UUUCCAGGAAUAGGUAUAG

AAAGTCTAATACATTATC

Cas9

UAGGCUAGUCCGUUAUCAACULG

UUUU GUGAAA

guide RNA



**non-homologous end joining (NHEJ)**



**ノックアウト(破壊)**

**homologous recombination (HR)**



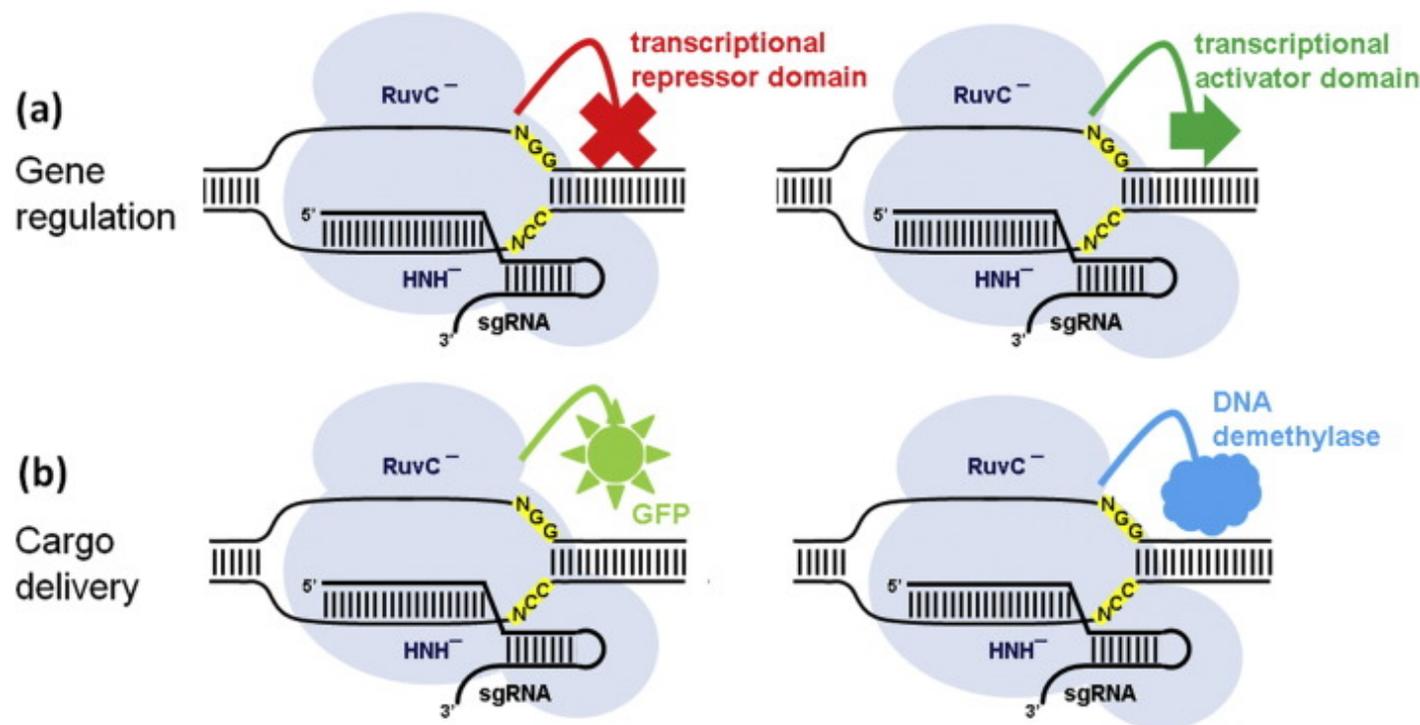
**ノックイン(挿入)**

遺伝子暗号はATGCの4つの塩基からなり、ヒト染色体は30億塩基からなる  
 目的遺伝子を確実にとらえるには特異的な遺伝子配列を認識する設計が必要⇔in silico

# CRISPR/Casの改良の取り組み

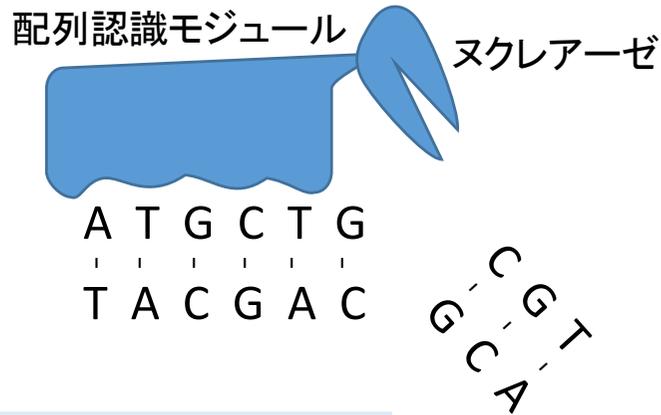
## dead Cas9 (dCas9)

- 切断しないCas9 (dead Cas9やbase-editing)が開発されている。
- dead Cas9は、リプレッサードメイン又はアクチベータードメインを結合させたCas9が、遺伝子発現を調節するプロモーター領域等に結合し、遺伝子の発現を抑える (CRISPRi)、又は遺伝子の発現を上げる (CRISPRa) ものや、緑色蛍光タンパク (GFP) を結合して狙った遺伝子を光らせたり、メチラーゼ、デメチラーゼを結合させてメチル化、脱メチル化したりするものもある。



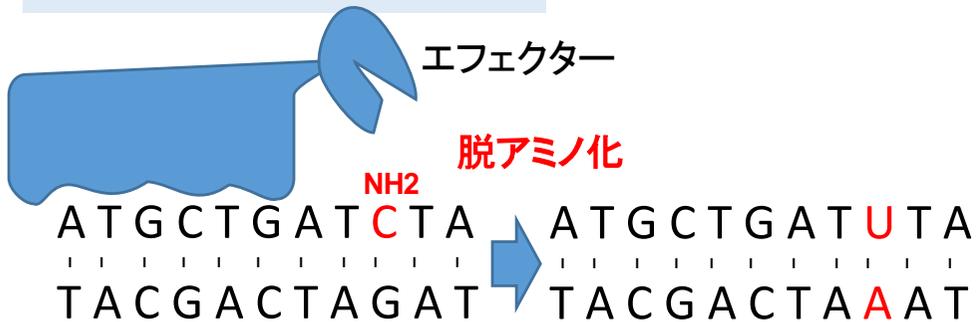
# ゲノム編集遺伝子治療の定義と適用範囲

## ゲノム編集による遺伝子切断



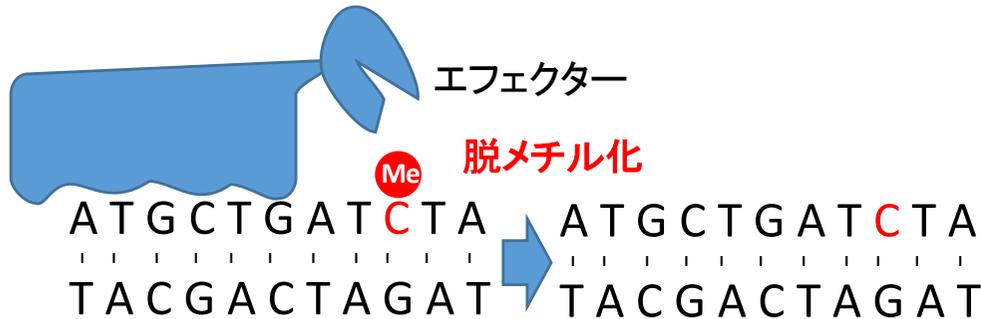
DNA二本鎖切断 → 欠失／挿入  
相同組換え

## 切断しないゲノム編集



脱アミノ化  
(デアミナーゼ) → 点変異  
リコンビナーゼ → 組換え

遺伝子改変  
に該当



DNAメチル化/  
脱メチル化

ゲノム以外の  
修飾

DNAの特異的修飾は  
遺伝子治療の範囲

遺伝子発現制御

現時点では含めないが  
今後の検討課題

# ゲノム編集／遺伝子治療医薬品の定義

- ゲノム編集は生物のDNAの改変を可能とする技術である。これらの技術を用いることによりゲノム上の特定部位への遺伝子の挿入、除去、改変が可能である。(NIH National Library of Medicine)
- ゲノム編集とは、ゲノムDNAの特定配列に意図する改変を導入すること (Komor et al, Cell 2017)
- 遺伝子治療医薬品(GTMP)とは、次のような特性を持つバイオ医薬品である (Commission Directive 2009/120/EC)
  - a. 有効成分として組換え核酸を含む製品から構成され、遺伝子配列の制御、修復、置換、挿入、欠失をヒトに引き起す製品  
It contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used it of administered to human beings with a view to regulating, repairing, replacing, adding or deleting a genetic sequence
  - b. 治療、予防、診断の効果が製品に含まれる組換え核酸配列に依存するもの、または組換え核酸からの発現産物が寄与するもの
  - c. 遺伝子治療医薬品には感染症予防のためのワクチンは含まれない

# EMAの遺伝子治療ガイドライン

## ● 遺伝子治療用製品の品質・非臨床・臨床ガイドライン

Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (2018.3)

- **ゲノム編集も考慮した改正**
- This guideline is applicable to GTMPs containing recombinant nucleic acid sequences (e.g. DNA vectors) or genetically modified micro-organisms or viruses. **This may including gene editing tools, listed above if they contain recombinant elements, e.g. delivery vectors.**
- EU規制上の遺伝子治療用医薬品(GTMP)の定義からはずれるゲノム編集ツールもあるが、遺伝子治療としての考え方が適用できる

## ● 遺伝子改変細胞製品の品質・非臨床・臨床ガイドライン(改正案)

Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (Draft, 2018.7 )

- **ゲノム編集とCAR-T/TCR-Tを考慮した改正案**
- Genetic modification can be obtained through a variety of methods (e.g. viral & non-viral vectors, mRNA, **genome-editing tools**).

# CCR5を改変してHIVに感染しないようにする

HIV感染するリスクの高い人のなかで感染しない人がいることが発見



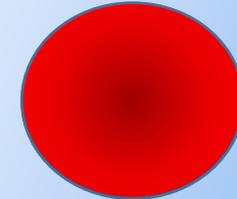
HIVが感染するリンパ球のCCR5に変異があることがわかる  
CCR5に変異を入れるとHIVに感染なくなり、HIV陽性患者のCCR5を改変することにより治療が可能では



HIVはCCR5を介してCD4+リンパ球に感染



CCR5



CD4陽性リンパ球

CCR5への結合を阻害するHIV治療薬が開発中

David Cyranoski & Heidi Ledford: Genome-edited baby claim provokes international outcry. - The startling announcement by a Chinese scientist represents a controversial leap in the use of genome editing. Nature NEWS 26 NOVEMBER 2018 563, 607-608 (2018)

# 体内ゲノム編集の臨床試験

- **血友病B**: 血液凝固第9因子の遺伝子変異により、出血が止まらなくなる遺伝性疾患
- **ムコ多糖症1型、2型**: 代謝酵素の欠損により、様々な臓器障害、脳の障害が進行する遺伝性疾患
- 現在の治療法は不足している血液凝固因子/欠損酵素の注射(週1、2回、一生涯)

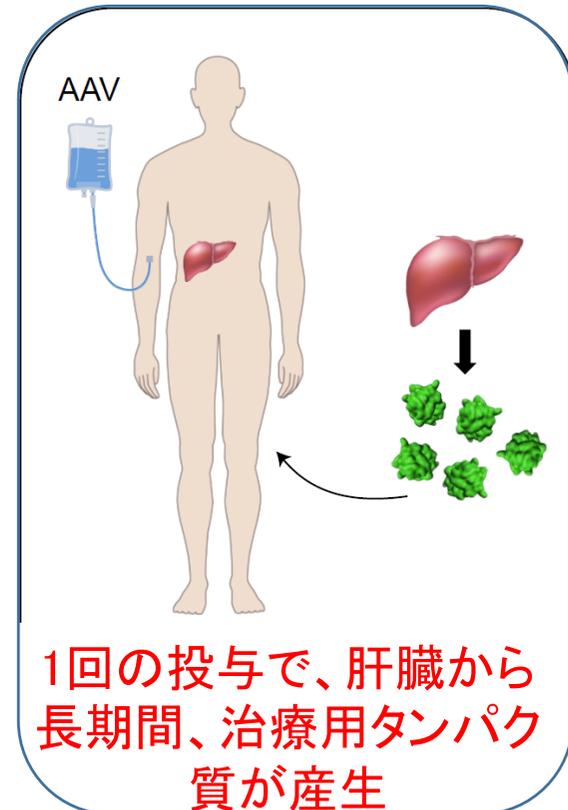
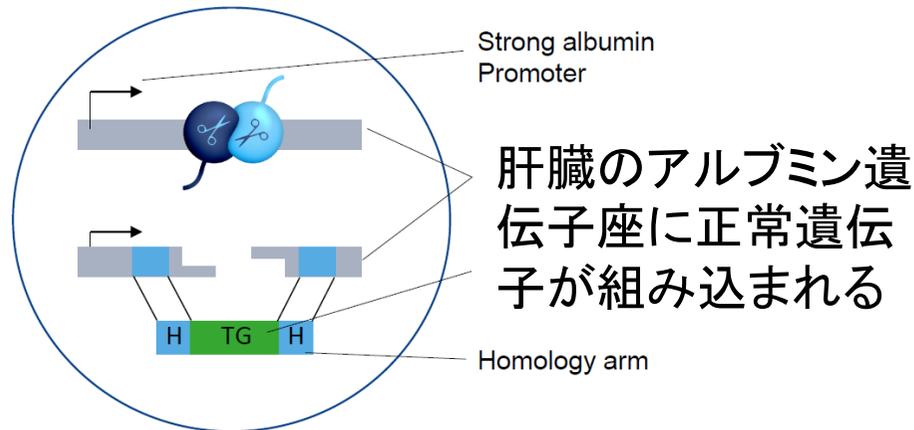


## 体内ゲノム編集(2017投与開始)

AAV2/6ベクターにゲノム編集コンポーネントを搭載



ZFN1, ZFN2  
治療用正常遺伝子



# 体内ゲノム編集の臨床試験

- **血友病B**: 血液凝固第9因子の遺伝子変異により、出血が止まらなくなる遺伝性疾患
- **ムコ多糖症1型、2型**: 代謝酵素の欠損により、様々な臓器障害、脳の障害が進行する遺伝性疾患
- 現在の治療法は定期的な輸血(注射)



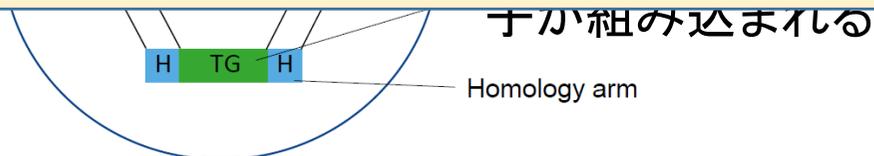
## 現状分析

ゲノム編集と従来型の遺伝子導入型治療が並行して開発が進む  
多様な製品の開発が進むことは患者にとってメリットと言える

## 開発でのキーポイント

十分な治療効果が得られること(F-VIIIやF-IXの十分な発現)  
中和抗体が出現しないこと  
ベクターやゲノム編集酵素に対する免疫原性の回避

AAV2/6  
ノム編  
ントを挿



1回の投与で、肝臓から  
長期間、治療用タンパク  
質が産生

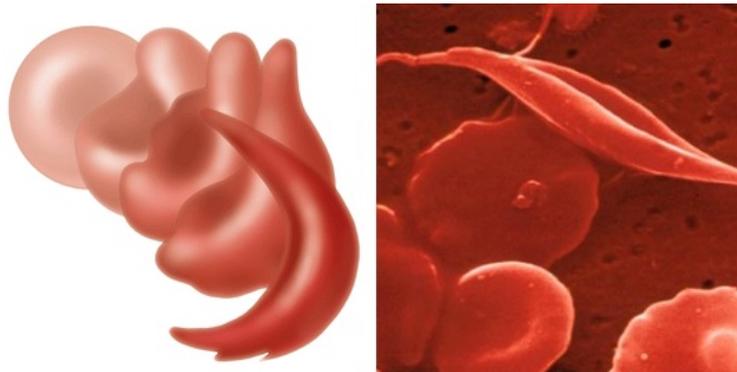
# 鎌形赤血球症

- アフリカ、地中海沿岸、中近東、インド北部に高発現する遺伝的疾患
- 赤血球の酸素運搬を担うβヘモグロビンの遺伝子(11番染色体)の6番目の遺伝子がグルタミンからバリンに変っているために起こる先天性疾患
- 毛細血管内でヘモグロビンが重合し三日月のように変形して詰まらせる。同時に溶血も起こり重度の貧血を起こす

鎌型赤血球症の患者はマラリアに抵抗性があったために熱帯マラリア蔓延地域で選択圧がかからなかったと想定される

正常型遺伝子 3'-GGA CTC CTC-5'  
アミノ酸配列 -Pro Glu Glu

鎌型赤血球症 3'-GGA CAC CTC-5'  
アミノ酸配列 -Pro **Val** Glu



ヘモグロビンの6番目の遺伝子をCACからCTCに戻すことができれば治療効果が期待できる  
ただし赤血球の元になる造血幹細胞を全て改変するのは至難

# CRISPR/Casを用いた鎌形赤血球の臨床試験

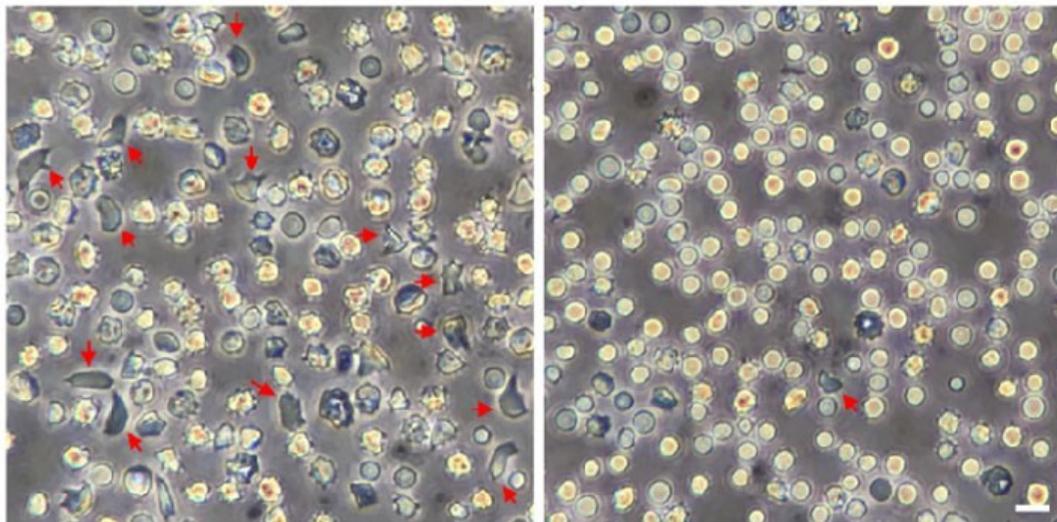
A CRISPR Approach to Treating Sickle Cell

Posted on April 2nd, 2019 by Dr. Francis Collins



Unedited

Edited



鎌形赤血球患者のヘモグロビン遺伝子をCRISPR/Casで破壊し、胎児型ヘモグロビン(HbF)を誘導



胎盤  
臍帯  
羊水  
卵膜

お母さんの赤血球はヘモグロビンA(HbA)  
胎児の赤血球はヘモグロビンF(HbF)  
HbFはHbAより酸素への親和性が高いため  
HbAの酸素を効率よく受け取れる

# ゲノム編集の医療応用の課題点

## 1. 従来の遺伝子治療の問題

- (主に) ベクターの免疫原性、細胞毒性
- ベクターの挿入変異による造腫瘍性等 (レトロウイルス、レンチウイルス)

遺伝子治療の研究 = delivery, 安全性, 免疫の研究

## 2. ゲノム編集に固有の問題

- 人工制限酵素 (細菌由来!) の免疫原性、細胞毒性
- 人工制限酵素の遺伝毒性 (オフターゲット変異)
  - がん関連遺伝子の変異リスク
- 染色体切断による転座や欠失
- 遺伝子ノックイン時のP53の変異

# 問題その1：人工制限酵素の免疫原性

- 人工制限酵素の免疫原性

- 65%に抗spCas9抗体、79%に抗SaCas9抗体、46%に抗SaCas9 T細胞 (Charlesworth *et al.*, *BioRxiv*, 2018)
- 2.5%に抗spCas9抗体、10%に抗SaCas9抗体 (ELISA) (Simhadri *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018)
- AAV-CRISPRのマウス骨格筋投与後、Cas9に対する液性・細胞性免疫応答 (Chew *et al.*, *Nature Methods*, 2016)
- 免疫原性の決定因子：ベクターの血清型、投与経路、投与量、プロモーター特異性、宿主、*etc.*
- *ex vivo* vs. *in vivo*、タンパクで導入
- 患者スクリーニング

- 免疫抑制？

- 本当に遺伝子付加治療よりも有利か？

- 遺伝子（付加）治療も大型動物への移行が困難だった

## 問題その2：オフターゲット以外のDNA変異

	変異/バリエーション	細胞あたりの頻度	
頻度	酵素の オフターゲット変異	<0.001 (0.1%)?	<ul style="list-style-type: none"> <li>検出法</li> <li>転座、large deletion?</li> </ul>
	ドナーDNAのランダム ム部位への組み込み	~0.05 (5%)?	<ul style="list-style-type: none"> <li>相同組換え修復</li> <li>検出困難 ・ dsDNA</li> </ul>
	DNA 複製エラー	>10 (1→10 <sup>8</sup> 細胞として)	<ul style="list-style-type: none"> <li>iPS細胞</li> </ul>
	個人間の DNAバリエーション Cosmic Cancer Gene Census list	>10 <sup>6</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>オフターゲット変異との区別</li> </ul>

- 外来DNAが残らない → 変異を見つけにくい

- in vivo*法： オフターゲット変異の蓄積

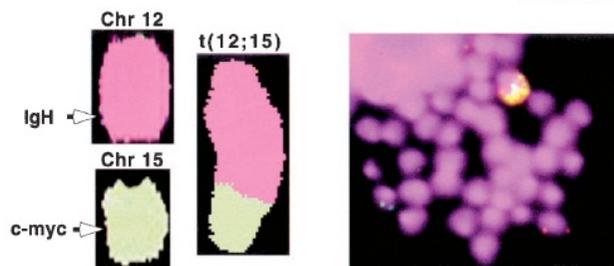
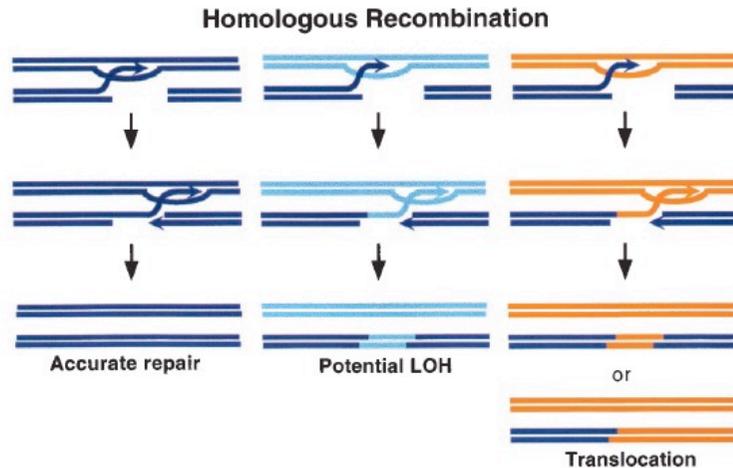
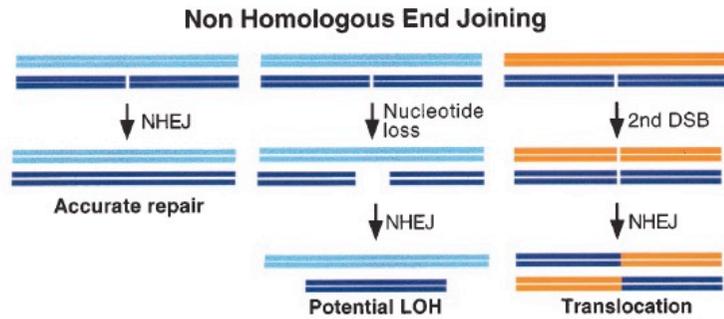
使用する動物とヒトゲノムとの違い

→ オフターゲット配列が予測不可

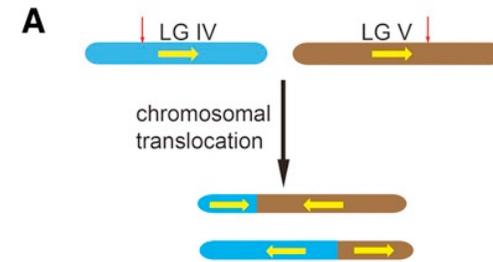
変異は必ず生じる → がん化に関係する変異かが重要. 多くの変異は細胞死をまねく

Cosmic Cancer Gene Census list

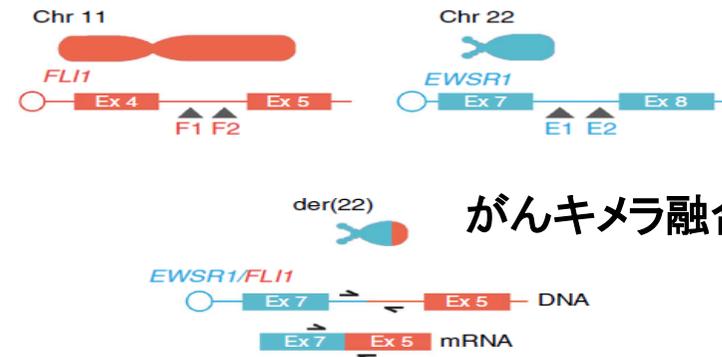
# 問題その3 : ゲノム編集の安全性評価 : 染色体転座リスク



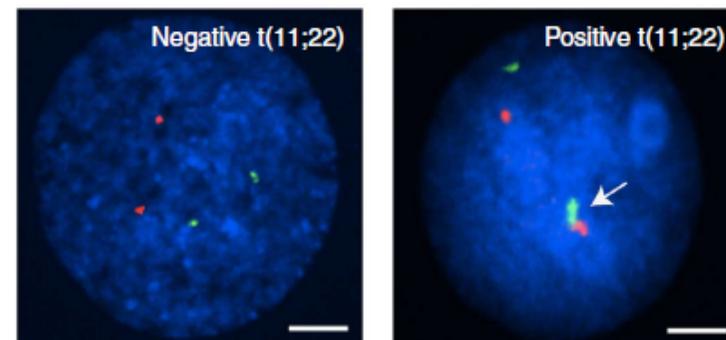
Ferguson & Frederick :DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572 (2001)



Chen et al: Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 2017

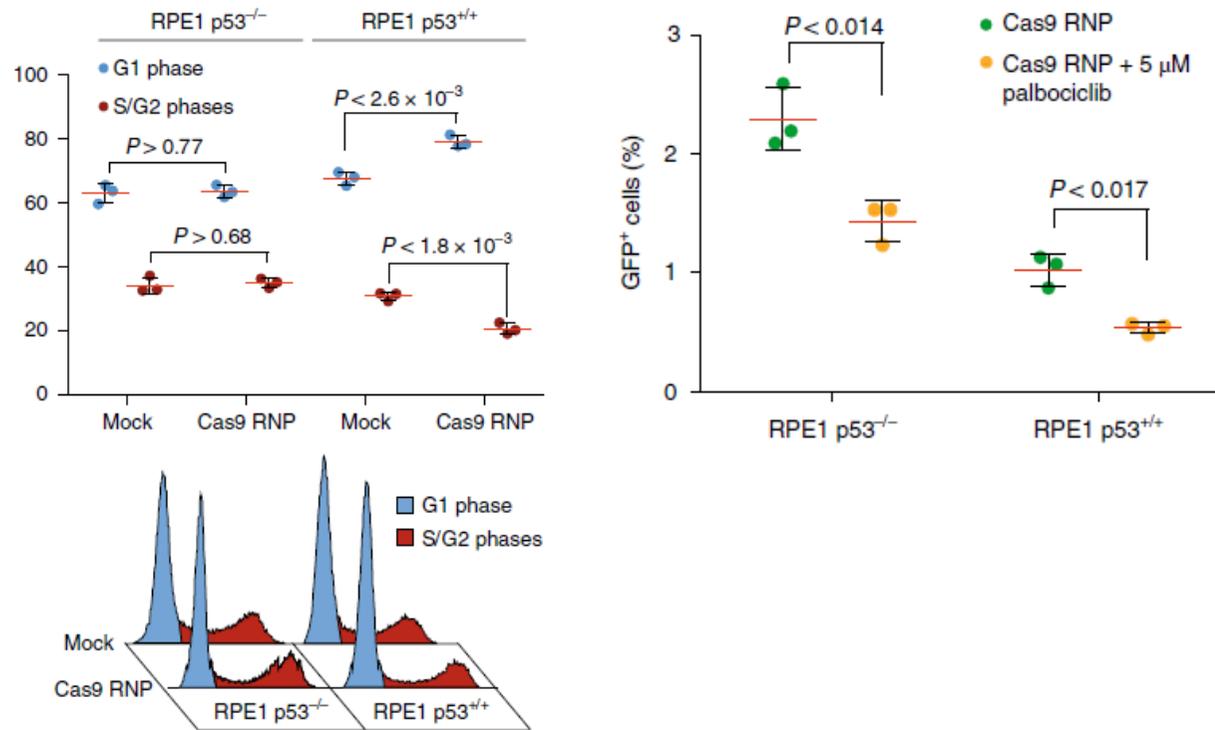


がんキメラ融合遺伝子



Torres et al: Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nature Communications* 2014

# 問題その4：CRISPR・CAS9によるゲノム編集はp53によるDNAダメージを引き起す



CRISPR/Cas9によるゲノム編集をがん抑制遺伝子であるp53KOヒト網膜細胞に適用すると効率よくゲノム編集できるが、正常細胞ではクリスパーに対抗してがん抑制遺伝子が働き、編集に失敗しやすいことを報告。P53の影響で細胞が死んだり、増殖が停止するという。著者らは、結果としてがん化の恐れが高い細胞が多く残る可能性がある」と指摘

Haapaniemi et al: CRISPR/Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat. Med. 2018  
Ihry et al: p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells Nat. Med. 2018

# 医薬品医療機器総合機構(PMDA)の動き

- PMDAの科学委員会(Scientific Board)に**ゲノム編集専門部会**が設置(2018年)
- ゲノム編集専門部会においてゲノム編集という新しいToolについて品質や安全性について議論を行いコンセプトペーパー(CP)の発出を目指す(2019)
- 従来のウイルスベクターやプラスミドによらないタンパク質やmRNAを用いて遺伝子改変を行う場合の品質や安全性に関しても明らかにすべき特性解析データや安全性上の懸念について明確にすることとしている。In vivo臨床適用での生殖細胞への影響を回避する対策についても言及
- CPによりゲノム編集を利用した遺伝子治療の開発を促進すると共に安全性を確保する

	FDA	EMA	日本	
			臨床研究	治験等
対応するガイドライン等	Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) (Draft, 2018.7) Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products (Draft, 201.7)	Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (2018.3) Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (Draft, 2018.7)	遺伝子治療臨床研究指針	遺伝子治療の定義やゲノム編集による遺伝子の改変の定義は臨床研究指針が適用される(指針第1章)
ゲノム編集	ゲノム編集に用いるツールについての記載はない。	有効成分として組換え核酸を含む製品から構成され、遺伝子配列の制御、修復、置換、挿入、欠失をヒトに引き起す製品	特定の塩基配列を標的として人の遺伝子の改変 遺伝子を改変した細胞の投与	ゲノム編集ツールごとに議論
ゲノム編集を含めて製品及びその原材料	ウイルスベクターやプラスミドに加えて、mRNAによるゲノム編集について遺伝子治療に含まれる	改変用酵素をコードするベクター(mRNAを含む)、改変用酵素タンパク質、ゲノム編集に用いられる核酸、ノックインするための核酸テンプレート、改変を行うための細胞	ウイルスベクターやプラスミドに加え、特定の塩基配列を遺伝子を改変するためのタンパク質、核酸等	
ゲノム編集の重要課題	ゲノム編集はゲノムに永続的な変化 遺伝子発現の異常や染色体の転座、悪性腫瘍の誘導リスク 組挿入変異リスク ゲノム編集コンポーネントや発現産物に対する免疫応答性	オンターゲット効果及びオフターゲット変異の解析 遺伝子改変と提案されている治療効果との相関 ゲノム編集した細胞のポリクローナリティーや造腫瘍性 免疫原性	オフターゲット効果 評価 遺伝子改変に用いるタンパク質等による免疫反応 p53の変異や染色体転座リスクについては言及なし	オフターゲット作用の評価に当たってのポイント(がん遺伝子の改変リスク) ゲノム編集酵素の免疫原性 p53の変異や染色体転座リスクについて

# まとめ

- 遺伝子治療は重篤な副作用発現という大きなハードルを越えて実用化の時代に入っている
- 国際的な調和がとられようとした時期があったがICH活動は一時停滞。昨年からBiodistributionの調和活動が再開されようとしている
- 新たな遺伝子治療法としてゲノム編集技術の開発が進む。ゲノム編集技術は従来の遺伝子治療にない技術要件を備えており、指針等の改定が必要であった
- 遺伝子治療製品の指針が改定されたが、ゲノム編集に評価法について今後の課題。PMDAの科学委員会でゲノム編集についての議論が続いている
- ゲノム編集は技術的には未完成の部分もあり、考え方を整理することによりその開発が促進されることが望ましい