

(別紙1)

総 括 研 究 報 告 書

課題番号：2019A-2

課 題 名：小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療の開発とその普及

小野寺雅史 国立成育医療研究センター
成育遺伝研究部・部長

(研究成果の要約)

現在、欧米では様々な小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療が行われ、劇的な治療成績を上げている。一方、我が国には遺伝子細胞治療を包括的に推し進めていく体制が整っていない。そこで、本研究では当センターが中心となり、小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療を治験として実施し、遺伝子細胞治療におけるアカデミック臨床研究機関（ARO）を目指す体制構築を目指す。具体的には、ウィスコット・アルドリッチ症候群に対する造血幹細胞遺伝子治療の医師主導治験実施を目指して PMDA との薬事戦略相談を受け、また、これまでに造血幹細胞遺伝子治療を受けたアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症や慢性肉芽腫症患者に対する安全性フォローアップの体制整備を行ってきた。さらに、被検者確保並びに患者登録拡大を目指した新生児スクリーニングの実施や代謝異常症等の新たな小児疾患に対する遺伝子治療の実施可能性を検討してきた。特に、平成 31 年 4 月には企業やアカデミア等の小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療の実施支援に向けた遺伝子細胞治療推進センター（GCP センター）を当センター内に開設し、現在、B 細胞性白血病に対するキムリアや血友病に対する *in vivo* 遺伝子細胞治療の実施支援を行っている。

1. 研究目的

現在、欧米では様々な小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療が行われ、劇的な治療成績を上げている。ただ、我が国には遺伝子細胞治療を包括的に推し進めていく体制が整っていない。本研究では当センターが中心となり、小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療を治験として実施し、遺伝子細胞治療におけるアカデミック臨床研究機関（ARO）を目指す。本研究の必要性及び独創性に関しては、小児難治性疾患の多くは単一遺伝子病であり、機能的な遺伝子を患者細胞に導入することで劇的な治療効果を期待することでもあるが、遺伝子細胞治療自体がいまだ開発途上であるためその安全性には十分な留意が必要である。よって、臨床研究品質確保体制整備事業を担う当センターが中心となり Nation Wide での遺伝子細胞

治療実施体制を構築することは小児医療行政において重要であり、また、そこに集約される貴重なデータは今後の小児難治性疾患に対する革新的医療法の開発に大いに役立つ。なお、本研究では対象となる疾患をウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）として当該疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療を医師主導治験として行い、その過程を通して治験実施に必要なインフラ整備を行っていく。

なお、本年度は 1) ウイルスベクターを使用した遺伝子細胞治療において患者から排出される治療用ベクターの使用規程に関するガイダンスの作成、2) イタリアにて造血幹細胞遺伝子治療を受けた WAS 患者でのフォローアップ経過、3) 実際に遺伝子治療を受けた患者の遺伝子挿入部位解析、4) 他の難治性遺伝性疾患として先天代謝異常

症の対する遺伝子治療の在り方の検討、5) 当センターへの B 細胞性白血病に対するキムリア導入に関する体制整備の構築を行った。

2. 研究組織

研究者	所属施設
小野寺雅史	研・成育遺伝研究部部長
内山 徹	研・成育遺伝研究部室長
中林 一彦	研・周産期病態研究部室長
奥山 虎之	病・臨床検査部部長
松本 公一	病・がんセンターセンター長

3. 研究成果

1) ウイルスベクター排出に関するガイダンスの作成 (小野寺)

現在、国内でウイルスベクターを用いた遺伝子治療を実施する場合、拡散防止措置を執らずに遺伝子組換え生物を使用することとなり、カルタヘナ法に基づく第一種使用規程申請書を提出する必要がある。ただ、使用するウイルスベクターの患者排泄に対する経験不足から過度な患者隔離が要求され、治療を受ける患者にとっては精神的、身体的負担が大きいものとなっている。このため、合理的な管理体制を定めることは喫緊の課題であり、各ウイルスベクターの排出レベルと排出されたウイルス感染能の有無を検証し、これまで得られた知見と合わせて遺伝子組換えウイルスの影響評価ガイダンスを作成することは必須である。

本研究においては遺伝子治療に主に使用されるアデノ随伴ウイルス (AAV) とヘルペスウイルス、アデノウイルス由来ベクターに対する管理体制に関するガイダンスを作成した。また、海外規制当局や欧米の遺伝子組換えウイルスベクター開発者と情報交換を行うことで遺伝子組換え生物の環境影響評価に対する欧米との違いをまとめたが、米国及び欧州において国により審査の対応に差異があることが明確となり、国際共同治験においての遺伝子治療の開発の妨げに

なることが問題視された。

2) 造血幹細胞遺伝子治療を受けた WAS 患者のフォローアップ (内山)

Wiksott-Aldrich 症候群 (WAS) は、易感染、湿疹、血小板減少を三主徴とし、その他にも自己免疫や悪性疾患を合併する疾患であり、根治的治療は造血幹細胞移植であるが、実施が困難な患者に対しては造血幹細胞遺伝子治療の開発が行われてきた。

今回、我々が当センターにて診療している 6 歳の WAS 患者に対し TIGET : San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (イタリア・ミラノ) にて造血幹細胞遺伝子治療が実施された。遺伝子治療後の経過では、血小板数の上昇が治療後 5 ヶ月の段階で $7.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ まで増加し、血小板減少による出血傾向は改善と易感染性の改善が認められた。また、フローサイトメトリによるリンパ球解析にても T 細胞新生を表す recent thymic emigrant (RTE) CD4+T 細胞、naïve CD8+T 細胞が出現し、T 細胞の増殖性を表す PHA/ConA でもその幼若化指数 (SI) が 100 を越えている。なお、移植片対宿主病 (GVHD) を含めた移植合併症などは認めていない。

ドナーや年齢の問題から造血幹細胞移植が困難な WAS 患者において、遺伝子治療は極めて有効な治療であると考えられた。

3) 遺伝子治療用ベクターの挿入部解析 (中林)

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療におけるベクター挿入部位解析に分子バーコード法を導入することでより高い定量性が担保されることが考えられる。

今年度は、STAT3 遺伝子 exon9 の特定部位を標的としたゲノム編集実験系をデザインし、K562 細胞ならびにヒト末梢血由来 T 細胞に対してオフターゲット評価用のゲノム編集実験を実施した。具体的には、GUIDEseq 法によりゲノム切断点を検出する際の標識配列となる二本差鎖オリゴ DNA

(34 塩基対) を guideRNA ならびに Cas9 発現ベクターと共に細胞に導入した。それらのゲノム編集細胞からゲノム DNA を抽出し、GUIDEseq ライブラリを作製した。ライブラリを複数回試作し、出発材料ゲノム DNA 量、PCR サイクル数などを最適化し、作製したライブラリから MiSeq シーケンサーで配列データを取得し、データ解析系のテストに用いた。The GUIDEseq Analysis Package に導入し、成育内で配列データをインプットとしてオフターゲット部位リストとサマリー図を自動的に出力する解析パイプラインを構築した。

GUIDEseq ライブラリ作製条件の最適化やデータ解析系構築を通じて、その長所・短所を把握し、そこで採用されている分子バーコード付加方式・Nested PCR によるシーケンスアダプター付加方式がベクター挿入部位解析にも応用可能であることを確認した。これらの成果を基盤に、今後、定量性と簡便性を両立させた改良型ベクター挿入部位解析の確立を目指す。

4) 先天代謝異常症の対する遺伝子治療の在り方の検討 (奥山)

先天代謝異常症の中の代表的疾患であるムコ多糖症 II 型 (MPSII) の中枢神経治療効果を評価するうえで重要な発達年齢の推移について検討した。酵素の静脈内投与を実施している 13 例の MPSII 型患者を遺伝子バリエーションのパターンで 2 グループに分けた。グループ MS は、ミスセンス変異を有する重症型 MPSII6 症例で、グループ NT はヌル型変異を有する重症型 MPSII7 症例でそれぞれ構成されている。いずれのグループも発達期、停滞期、退行期を認めたが、グループ NT はグループ MS に比べて退行が急速に進行していることが支援された。

5) キムリア導入に関する体制整備の構築 (松本)

がんに対する免疫療法の一つとして患者由来 T 細胞に腫瘍関連抗原受容体を発現さ

せ、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞として利用するキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T 療法) が開発され、特に抗原を B 細胞特異抗原である CD19 とした CAR-T 療法が B 細胞性白血病やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する有効な治療法として再生医療等製品としての承認を受けた。ただ、この再生医療等製品の最も重要な原材料は患者由来末梢血リンパ球であることから、その採取に際しては細心の注意を払わなければならない、特に医薬品製造に関する GMP/GCTP を如何に医療機関に導入するかが問題となる。特に、製造において最重要課題は「如何に情報を一元化するか」であるが、医療機関ではこれは分業制になっており (たとえば、医師、看護部、薬剤部、臨床検査部、ME など)、各々が同一の情報管理を行わない限り GMP/GCTP の導入は極めて困難な状態となっている。

このため、当センターでは新たな試みとしてキムリア治療を受ける患者のすべての工程を一枚の sheet で対応することで情報の一元化を目指した。これにより各工程作業が明確になり、たとえ、逸脱行為が発生してもその事項が速やかに製造管理者に上がり、迅速な対応が行えることが期待できるようになった。

6) ARO への GCP センターの取り組み

(1) 当センターでの遺伝子治療患者の経緯 ・慢性肉芽腫症患者 1 名

上記患者に対する造血幹細胞遺伝子治療は平成 26 年 7 月 22 日に実施され、その結果、これまでの抗菌剤に抵抗性を示した頸部リンパ節炎及び胸部肺膿瘍が治癒し、通常の生活を送れる程まで改善した。ただ、治療後 2 年半が経った段階で、使用したベクターの MECOM 部位挿入による MDS が発症し、父親をドナーとした post-CY (移植後に cyclophosphamide の投与) によるハプロ移植が実施されたが、重度の GVHD はなく患者骨髄においてドナー細胞の生着を確認された。現在、移植後約 3 年が経つがキメリ

ズムは 100%であり、MDS の再発も認めておらず、患者は通常に日常生活を送れている。

・ADA 欠損症患者 1 名

上記患者に対する造血幹細胞遺伝子治療は平成 15 年 12 月に実施され、その結果、重度の感染症等は落ち着いた。ただ、BU 等の前処置を行わなかったため、免疫系の回復は部分的であり、結果、治療後 10 年目にて PEG 包埋ウシ由来アデノシンデアミナーゼによる酵素補充療法（Adagen）を開始した。ただ、この段階では Adagen は医薬品として承認されておらず、安定供給のためには治験実施の上、医薬品としての承認が必要となった。これに対し、平成 25 年 3 月に開催された未承認薬検討会議にて採択され、最終的には帝人ファーマ社が当センターとともに治験を開始した。結果、国内で 4 名の ADA 欠損症患者のデータを基に令和元年 5 月にレブコビとして医薬品として承認され、現在、国内で 3 名の ADA 患者がレブコビによる酵素補充療法を受けて生活している。

・WAS 患者 1 名

上記患者に対する造血幹細胞遺伝子治療は令和元年 10 月に San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy（TIGET：イタリア・ミラノ）実施され、その結果、共同研究者の内山が示すように良好である。

ただ、本 WAS に対する造血幹細胞遺伝子治療は、本体、医師主導治験として当センターにて実施するもので、これまでに複数回、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談があり、平成 29 年 10 月の成育 IRB の承認後同年 11 月に PMDA に治験届を提出したもので、今回、遺伝子治療を受けた患者は将に平成 29 年 1 月に一例目として登録した患者である。確かに、結果的には患者に対して遺伝子治療を提供することができ、さらにその結果も良好であるから患者に対しての責務は一定範囲で果たしたと考えられるが、このような状況ではいまだ国内で遺伝子治療を待望する患者には対応できない。

い。よって、今後も WAS 遺伝子治療の権利を有する Orchard Therapeutics 社と話し合いを進め、当該治験を早々に再開する予定である。

(2) ARO として実施体制の構築

当センターが小児医療の中心的な存在であることから、ここに示した原発性免疫不全症や先天代謝異常症のみならず、神経疾患や血液疾患、白血病に対する CAR-T 療法などの遺伝子細胞治療を今後も包括的に進めていく必要がある。ただ、遺伝子細胞治療自体がいまだ開発中の治療法であり、そのためあまりにも多くの不確定要素が存在することも事実である。一方、遺伝子組換えウイルス等が治療薬となるこの分野において指針や法律の遵守は必須であり、その不遵守は単に患者が被害を被るだけでなく、周囲のヒトや環境にも悪影響を及ぼす。同時に、遺伝子治療自体がこれまでに無かった概念での治療法であることから、治験を含めた臨床試験や長期フォローアップを含めた市販後臨床試験を実施する上で適正なインフラを提供できる医療機関は限られ、さらに企業やアカデミアが試験実施計画書を作成する際や治験等を実施する際に、その相談、支援あるいは教育（研修）を提供できる組織もない。

当センターでは、企業、研究者、医師、患者等を対象に日本国内で遺伝子細胞治療の開発、臨床研究・試験、治療を適切に実施することを目的として遺伝子細胞治療推進センター（GCP センター）を立ち上げた。これは、医師のみならず看護部、薬剤部、臨床検査部、放射線部と連携し、また、治験に関しては当センター臨床開発センターと共同で行い、当センターが小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療のアカデミック臨床研究機関（ARO）として機能する体制を備えることも目的としている。

現在、B 細胞性白血病に対するキムリア、神経筋萎縮症（SMA）に対するゾルゲンツマ、ならびに血友病 A、B 等の治験実施の支援を行っている。

4. 研究内容の倫理面への配慮

遺伝子治療臨床研究に向けた実施計画書の作成は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成 16 年 2 月 19 日）に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正）に基づいて作成した。

実施計画書作成に必要な前臨床試験の一部では、臍帯血から採取した造血幹細胞を用いるが、この一連の実験については、すでに施設内の倫理審査委員会および臍帯血バンクの倫理審査委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。今回の研究における挿入部位同定は、一部、患者の遺伝子情報を解析する可能性もあることから、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行い、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行う。なお、取り扱う患者データには、遺伝子解析結果なども含まれるため、組織的安全管理措置（国立成育医療研究センターの保有個人情報管理規定など）のもとで、人的安全管理措置（データ管理業務担当者との個人情報非開示契約の締結、個人情報の取扱いにかかわる教育など）、物理的安全管理措置（二重ロックのデータセンター内イントラネット、入退室管理、無停電装置設置など）、技術的安全管理措置（システムのファイアウォールによる保護、ユーザー認証、不正ソフトウェア対策、データの定期的バックアップなど）を講じ、指針に従った臨床データ管理を行った。