

(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
遺伝子細胞治療推進センター・センター長

(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し遺伝子細胞治療が精力的に進められ、劇的な治療成績のから一部の疾患においては医薬品として承認されている。一方、我が国で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、本研究では遺伝子細胞治療推進センター（以下、当センターと略）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、原発性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子治療とその有効性・安全性に関する長期フォローアップの実施を行ってきた。なお、当センターは平成31年4月に開設し、現在までにB細胞性白血病に対するCAR-T療法、血友病及び脊髄筋萎縮症に対するAAVベクター*in vivo* 遺伝子細胞治療の実施支援を行っており、その経験や知見を習得している。

1. 研究目的

現在、WileyのGene Therapy Clinical Trials Worldwide (<http://www.abedia.com/wiley>)によれば2021年の段階で3180の臨床試験が登録され、その大部分(2144例 67.4%)はがん・悪性腫瘍であるが、次に単一遺伝病が続き、その数は370例 11.6%である。また、実際に医薬品として承認された遺伝子治療用製品も複数あり、LPL欠損症に対するGlybera（但し、2017年に販売中止）、ADA欠損症に対するStrimvelis、レーバー先天性黒内障に対するLuxturnaがあり、最近では脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するZolgensma、 β -サラセミアに対するZyntegloならびに異染性白質ジストロフィーに対するLibmeldy等があり、今後もウスコットアルドリッチ症候群(WAS)や慢性肉芽腫症(CGD)、血友病A、B等に対する遺伝子治療用製品が承認されていくものと思われる。

一方、我が国でも遺伝性疾患であるアデノシン・デミナーゼ欠損症やCGD、AADC欠損症に対して遺伝子細胞治療は行われて

いるが、これら遺伝子細胞治療は臨床研究として行われたもので医薬品（この場合、再生医療等製品）の開発を目指したものではない、さらに国内で遺伝子治療用製品として承認されたものでは海外からのZolgensmaのみである。よって、我が国の重篤な遺伝性疾患患者に対し安全性で有効な遺伝子細胞治療の普及は急務であり、その観点からこれら遺伝子細胞治療の実施体制の構築は必須と考える。よって、本研究では、当センターが中心となり国立成育医療研究センターにおいて小児難治性疾患に対する遺伝子細胞治療を企業治験を含め数多く実施することで経験や知見を習得し、それに立脚した遺伝子細胞治療でのARO体制構築を目指す。

なお、本年度は1) 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、2) 実際に遺伝子治療を受けた患者の遺伝子挿入部位解析、3) 院内での治療用AAVベクターの使用規程に関するガイドランスの作成、4) 当センターでのキム

リアにおける細胞調製 SOP の作成、5) 遺伝子治療を受けた患者のフォローアップ体制の開発ツール等の研究を行った。その詳細に関しては各分担研究者の実績報告にて確認して欲しい。

2. 研究組織

研究者	所属施設
小野寺雅史	病・GCP センターセンター長
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・臨床検査部部长
松本 公一	病・がんセンターセンター長

3. 研究成果

(1) 当センターでの遺伝子細胞治療

1) 造血幹細胞遺伝子治療

・ ADA 欠損症患者 1 名

患者は 4 歳時 (2003 年)、北海道大学にてガンマレトロウイルス (γ RV) ベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療を受け、その後一定期間重度の感染等の罹患はなかったが、実施時ブスルファンによる前処置を行わなかったため、免疫能の回復は不十分であり、結果、治療後 10 年を経て難治性肺炎等を発症し、成育医療研究センターにて PEG 包埋ウシ由来アデノシン (PEG-ADA) による酵素補充量 (ADAGEN) を開始した。

ただ、当時 ADAGEN は医薬品としては承認させておらず、安定供給の観点から治験実施の下、医薬品としての承認が必要となった。これに対し、2013 年 3 月に開催された未承認薬検討会議に当製剤を推薦し、そこでの採択を得たため最終的に帝人ファーマ社と当センターが治験を開始した。結果、国内で 4 名の ADA 欠損症患者に対する PEG-rADA (遺伝子組換え ADA を polyethylene glycol にて包埋した製剤) の臨床データを基、レブコビ®として 2019 年 5 月に当該酵素製剤が医薬品として製造販売された。現在、患者は PEG-rADA 及び皮下注ガンマグロブリン製剤のハイゼントラの

使用にて重篤な感染症もなく、通常の日常生活を送っている。なお、年に一度の定期検査においても造腫瘍性を疑わせるクロールな遺伝子導入細胞の増加は認めていない。また、レブコビ®に関しては、現在、国内で 3 名の ADA 欠損症患者が酵素補充療法として投薬されている。

・ CGD 1 名

患者は *gp91phox* 遺伝子が欠損した X 連鎖 CGD 患者であり、これまで複数の抗菌剤や抗真菌剤の治療を行ったが、頸部リンパ節炎や肺膿瘍は改善せず、また、造血幹細胞移植における適切なドナーも存在しなかったため、2014 年、27 歳時に国立成育医療研究センターにて γ RV ベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療が行われた。治療内容は患者より G-CSF の刺激の下、末梢血造血幹細胞を採取し、そこに治療用の γ RV ベクターを用いて *gp91phox* 遺伝子を導入し、再び、患者に投与するもので、同法は米国国立衛生研究所 (NIH) の臨床プロトコルをもとに実施された。その結果、これまでの抗菌剤等に抵抗性を示した頸部リンパ節炎や肺膿瘍は軽快し、通常の生活が送れるまで回復した。ただ、治療後 2 年半が経った段階で使用したウイルスベクターの MECOM への挿入変異にて骨髓異形成症候群 (MDS) が発症し、父親をドナーとした post-CY (移植後に cyclophosphamide の投与) によるハプロ移植を実施した。その後は重度の GVHD 発症もなく患者骨髓においてドナー細胞の生着が確認され、現在、移植後 4 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、患者は通常の日常生活を送っている。

・ WAS 患者 1 名

患者は 4 歳の男児で、2019 年 10 月に San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET: イタリア・ミラノ) にて造血幹細胞遺伝子治療を受け、治療後 1 年半が経過したが臨床症状を含めて治療経過は順調で

ある。ただ、元々、当該遺伝子治療は国立成育医療研究センター内で計画された医師主導治験であり、複数回の医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事戦略相談の下、2017年12月に治験届が受理され、2018年より開始の予定であったが、販売元の製薬企業が急遽当該治験から撤退したために中止せざるを得なかった臨床試験である。確かに、当該患者は TIGET にて造血幹細胞遺伝子治療を受け、その経過も良好であることから結果的には良しとするべきところではあるが、このような海外の企業の動向に国内患者の安全性が脅かされることは決して許されることではない。そのためにも国内でのウイルスベクターの生産を含む独自の遺伝子治療実施体制の構築が望まれる。なお、現在、WAS 遺伝子治療の権利を有する Orchard Therapeutics 社と話し合いの下、早急に国内で当該治験を開始できるように準備を進めている。

2) 当センターでの CAR-T 療法

CAR-T 療法は腫瘍細胞膜表面上に発現する腫瘍関連抗原 (TAA) を認識する T 細胞を作製し、担がん患者に投与するもので、その方法は TAA に対する抗体認識部位の Fab 重鎖、軽鎖をヒンジを用いて一本鎖 (single chain variable fragment : scFv) とし、その下流に TCR の膜貫通領域 (transmembrane domain : TMD)、細胞内シグナル領域として副刺激シグナルの 4-1BB ならびに TCR ζ 鎖を配置した CAR (scFv-TMD-CD28 or 4-1BB- ζ chain) をウイルスベクターにて患者由来 T 細胞に導入するものである。現在、承認されている CAR-T 療法としては TAA として B 細胞系腫瘍の CD19 を標的とした Tisagenlecleucel (キムリア®) や Axicabtagene Ciloleucel (イエスカルタ®) 等があり、2021 年になって承認された多発性骨髄腫の BCMA (B cell maturation antigen) を標的とした Idecabtagene vicleucel (ide-cell) がある。

当センターでは小児 B 細胞性白血病に対するキムリアが実施機関として承認され、

これまでに治験 1 例を含む 7 例が実施されている。ただ、このキムリアにおいては遺伝子導入 T 細胞の元となる細胞がアフェレーシスにて回収された患者由来リンパ球であるため、その原材料としての品質担保は GCTP とよばれる基準の則って行わなければならない。これに関しては、小野寺の分担研究報告書を参考にして頂きたいが、そのための機器を含めた施設整備はもとより、標準作業手順書 (SOP) 等の dry な部分の構築も重要であり、当センターが有する細胞調製室 (CPC) が中心となってこの作業を進めている

3) 当センターでの *in vivo* 遺伝子治療

当センターで行われた *in vivo* 遺伝子治療は血友病 B に対するものと SMA に対するものがある。

・血友病 B

患者は 40 代の男性であり、2020 年 10 月に IX 因子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) 由来ベクターを体重 1kg 当たり 1×10^{11} vg 静脈内投与した。なお、この AAV ベクターは肝細胞指向性を高めるためカプシドは 8 型 AAV 由来を使用し、また、導入遺伝子として IX 因子活性が高値となる Pauda 変異を有している。治療後半年を経過した段階でも一定量の IX 因子活性を有しており、遺伝子治療が関連する重篤な副作用 (不具合) の現時点では観察されていない。

一方、これら遺伝子組換え生物由来の遺伝子治療用製品はカルタヘナ法第一種使用規程に準じた使用方法が求められ、使用に際しては病院全体の部署を含めた管理運用規程やマニュアル等の作成が必要となる。

・SMA

SMA は第 5 番染色体上にある *SMN1* 遺伝子変異により脊髄運動神経細胞 (脊髄前角細胞) が障害されて神経原性の筋萎縮をきたす疾患で、その最も重症なタイプが乳児期に発症する I 型 Werdnig-Hoffmann 病 (重

症型)である。SMA に対しこれまで有効な治療法はなかったが、2017 年になり国内初となるアンチセンスオリゴ核酸医薬品の nusinersen sodium (スピンラザ髄注®) が乳児型 SMA に対して承認された。ただ、その治療法は、初回、2 週目、4 週目、9 週目、その後 4 ヶ月間隔で髄腔内投与が必要であり、また、一回の投与が約 1,000 万円と高額である。

ゾルゲンスマは SMA に対する運動神経細胞生存遺伝子 (survival motor neuron : SMN) 発現 9 型 AAV カプシドを有する 2 型 AAV ベクター由来遺伝子治療用製品であり、患者体重 1kg あたり 1×10^{14} vg 静脈内投与する。当センターでは 7 ヶ月となる SMA 患者に対して 2021 年 3 月にゾルゲンスマ静脈内投与を行った。治療効果は良好であるが、投与量が血友病時の約 1000 倍多く、治療後に AST/ALT 等の肝逸脱酵素が上昇し、そのため大量のステロイド療法を必要とする症例であった。元来、AAV はヒトに対して毒性はないとされていたが、このように大量なウイルスベクターを投与した場合、自然免疫を含めた患者免疫反応を惹起することが示された。なお、現在は患者の肝機能は落ちているおり、その経過も良好である。

(2) 当センターでの ARO として実施体制

当センターが小児医療の中心的な存在であることから、ここに示したように原発性免疫不全症のみならず、神経疾患や血液疾患、白血病に対する CAR-T 療法など多く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まだ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はなく、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、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) として機能することを目的として設立されたものである。よって、ここに示したように当センターで行われた遺伝子治療を通して多くの経験や治験を習得し、最終的には国内での企業治験実施に対応できる ARO 機能を備えた体制整備を目指していく。

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。