

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-2

課題名：小児の難治性疾患に対する遺伝子治療における安全性の管理基準の創出を目的とした高精度の遺伝毒性モニタリング法の開発

主任研究者 (所属施設) 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
(所属・職名 氏名) 成育遺伝研究部・室長 内山 徹

(研究成果の要約) 小児の難治性遺伝病に対する遺伝子細胞治療医において、ベクター挿入などのゲノム解析およびウイルスベクターの体内分布に関して解析を行い、安全性や有効性の評価のための基礎技術の開発を行った。Ex vivo 遺伝子治療においては、造血幹細胞遺伝子治療を実施した患者における遺伝子導入細胞のクローナルな増殖を同定した。ゲノム編集におけるオフターゲット解析では、Cas9の形態がオフターゲットの頻度に影響を与えることが判明した。また、CAR-T細胞療法における遺伝子導入細胞の体内動態に関して検討した。In vivo 遺伝子治療におけるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの残存解析では、血漿中では比較的早期にウイルス量の低下が認められるものの、有核細胞分画では長期のウイルスゲノムの残存が認められた。また、サイトカイン解析では、AAV 投与後早期の肝機能障害が、自然免疫系の活性化によって引き起こされることが判明した。

1. 研究目的

近年、小児の難治性疾患に対する遺伝子細胞治療は急速に発展し、当センターにおいても遺伝子細胞治療推進センターの設立に伴い、実施数が増えていくと考えられる。そのような中、有効性と同時に安全性を正確に評価していくことは、今後の遺伝子治療の発展に非常に重要である。これらの評価には、①ベクターの挿入変異などに起因する遺伝子毒性、②ウイルスベクターおよび遺伝子導入細胞の体内分布、の二つが重要な要素である。一方で、これらの評価には専門的な分子生物学的解析が必要となるが、我が国においてはこれらの基礎開発研究がほとんどなされておらず、本開発では国内における遺伝子細胞治療の発展のため、遺伝子細胞治療固有の安全性・有効性の評価系の確立をおこなう。

2. 研究組織

研究者	所属施設
内山 徹	国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部
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
石黒 精	国立成育医療研究センター 教育研修センター

小児がんセンター血液内科

加藤 元博 国立成育医療研究センター
小児がんセンター小児がんゲノム診療科
中林 一彦 国立成育医療研究センター
周産期病態研究部

3. 研究成果

本年度は、遺伝子細胞治療特有の安全性評価として、ex vivo 遺伝子治療におけるベクター挿入部位解析、in vivo 遺伝子治療における患者体内におけるウイルスベクターの残存や排出、さらに今後臨床応用が期待されるゲノム編集技術におけるオフターゲット効果 (標的部位以外のゲノム DNA の編集) に関して、解析法を確立した。その他、CAR-T細胞療法での有効性に関連して、遺伝子導入細胞の体内動態に関して解析を行った。

(1) ベクター挿入部位解析

原発性免疫不全症へのレトロウイルス (RV) ベクターによる遺伝子治療では、複数の疾患で挿入発がん変異が報告されている。我々は、今回、RV ベクターの long terminal repeat (LTR) 配列に対するキャプチャーベイトを用いた、ベクター挿入部位解析法を確立した。国内において造血幹細胞遺伝子治療を受けた2名のアデノシン・デアミナ

ーゼ (ADA) 欠損症患者に対して、ベクター挿入解析を実施したところ、1名でクロノルなベクター挿入パターンを示した。これまでに白血病の発症を示す所見は無いものの、引き続き慎重なフォローが必要である。

(2) ゲノム編集におけるオフターゲット解析

Cas9ヌクレアーゼによるゲノム編集技術の開発では、安全性の確保という観点からオフターゲット効果(標的配列以外のゲノムDNA配列の切断)が大きな問題となる。今年度は、代表的なオフターゲット解析法であるGUIDEseq法を確立し、現在我々が開発しているCas9を用いたゲノム編集技術による遺伝子治療法においてオフターゲット解析を実施した。オフターゲットの頻度は、Cas9の導入形式に大きく依存することが判明し、DNAによるCas9の導入では、オフターゲットがオンターゲット(標的部位の切断)を大幅に上回るのに対して、タンパクによるCas9は最もオフターゲットを抑制できることがわかった。

(3) CAR-T細胞療法における遺伝子導入細胞の分布解析

CAR-T細胞療法を受けた4名の難治性B細胞性白血病患者に関して、フローサイトメトリー(FCM)およびデジタルドロップレット(ddPCR)によるCAR-T解析を実施した。全例で投与後1-2週間をピークにCAR-T細胞の増殖を認めたが、以後数は減少し、2-3ヶ月でCARの検出はできなくなった。その多くは、エフェクターメモリーCD8分画であったことから、CD19抗原による活性化後は、アポトーシスの報告に向かうことが考えられた。4例とも再発を認めたが、いずれも2-4ヶ月での再発であり、長期にCAR-Tが存在する症例では寛解を長く保つという報告もあることから、セントラルメモリー分画もしくは、ナイーブ分画へのCARの導入などへの導入が治療効果を高める可能性が考えられた。

(4) in vivo 遺伝子治療における AAV ベクターの残存解析

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるin vivo 遺伝子治療を受けた脊髄性筋萎縮症患者の血液検体を用いて、体内におけるウイルス粒子の残存に関して検討した。血漿

分画では、投与後2週間移行で大幅な減少を認めた一方、血球細胞においては2ヶ月の段階でも高いウイルス量を認めた。一般的に、投与後4週間以降は尿中などへの分泌は大きく減少するとされているものの、患者の血液に関しては長期間にわたって、取り扱いに注意が必要であることが示唆された。

(5) in vivo 遺伝子治療における患者の免疫応答の解析

脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるin vivo 遺伝子治療では、ウイルスの投与後に高率に肝機能障害などを起こすことがわかってきた。そこで、関連医療機関の協力のもと、遺伝子治療を受けた2名のSMA患者のサイトカインプロファイルを解析した。すると、投与後5日をピークに肝逸脱酵素とフェリチンの著しい上昇を認めたが、T細胞を中心とした獲得免疫系の変化は少なく、主に単球・マクロファージなどの自然免疫系の反応によることが判明した。一方で、投与後1ヶ月-2ヶ月の段階で、再度肝機能障害を発症する症例も存在するが、自然免疫系のサイトカイン上昇は認められず、ウイルスに対する獲得免疫系の反応が強く疑われた。現在、後期の肝機能障害におけるT細胞などの関与に関して、解析系を確立中である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本開発を含めた遺伝子細胞治療における解析を行うにあたって、当センター倫理委員会が承認した研究計画「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」「In vivo 遺伝子治療におけるウイルスベクターの検出および免疫反応の評価系の確立のための基礎的研究」に基づき、患者および家族に文書と口頭による同意を取得した上で行う。患者の個人情報の取り扱いは、匿名化を行ったうえで対応表は別途保管し、その保護に努める。患者検体(血液、ろ紙血)の利用に関しては「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年12月22日告示)」に、また、遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」に準拠してそれぞれ実施する。