

総括研究報告書

課題番号：28-1

課題名：小児難治性遺伝性疾患に対する遺伝子・細胞治療のための実施体制強化

主任研究者名：小野寺 雅史

国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 部長

研究成果の要約

本研究では、小児難治性遺伝性疾患に対する遺伝子・細胞治療の実施体制の強化を目指しており、平成 26 年 7 月に実施した慢性肉芽腫症（CGD）に対する造血幹細胞遺伝子治療では患者の難治性感染症は治癒し、残念ながら骨髄異形成症候群は発症したもののこれまで培ってきた CGD に対する新たな治療法である post-CY によるハプロ移植が成功し、患者は現在も通常の生活を送れている。また、医師主導治験としてのウイスコット・アルドリッチ症候群（WAS）に対する造血幹細胞遺伝子治療では医薬品医療機器総合機構との薬事戦略相談を終了し、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、翌年 1 月に一例目の患者登録を行った。なお、これら遺伝子・細胞治療を円滑に進めるため院内の実施体制を強化や、発症前診断を可能にする新生児スクリーニングの導入ならびに小児稀少疾患に対する治験薬開発に向けた複数の取り組みも行った。さらに、将来の遺伝子治療に向けたゲノムエディティングにより遺伝子改変操作を可能にする新しいベクター開発も積極的に取り組んでいる。

1. 研究目的

現在、欧米では難治性遺伝性疾患に対する遺伝子治療が広く行われ、根治療法と呼べるほどの治療成績を上げている。ただ、我が国にはこれら遺伝性疾患に対する遺伝子・細胞治療を治験として実施していく体制は整っておらず、たとえ有効な治療法であってもその開発が進んでいない状況にある。よって、本研究では、小児に対する National Center としての当センターがウイスコット・アルドリッチ症候群（WAS）に対する遺伝子治療を治験として行い、その過程を通して治験実施に必要なインフラ等を整備していく。特に、競争的研資金では実施が困難な病院内のインフラ整備や患者フォローのための安全性評価系の確立、データマネジメント等の整備を中心に研究を進める。

なお、本年度は 1) 当センターにおけるろ紙血中の TREC を測定する重症複合免疫不全症（SCID）に対するスクリーニング法の実施、2) アデノシン・デアミナーゼ（ADA）欠損症に対するリコンビナント PEG-ADA（STM279）

による酵素補充療法を含む小児治験の在り方、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とその骨髄生着に関する研究、4) 遺伝子治療臨床研究における臨床データの管理・解析、5) 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等を検討した。なお、慢性肉芽腫症（CGD）に対する遺伝子治療は平成 26 年 7 月 22 日に実施し、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、造血幹細胞移植の実施を余儀なくされた。事実、患者には HLA 一致ドナーが不在であるため当該移植においては父親をドナーとしたハプロ移植が選択された。一般的に CGD に対するハプロ移植は重度の GVHD が発症しやすく移植成績は不良であるが、当センターがこれまで行ってきた移植後に cyclophosphamide を投与する post-CY による移植による重度の GVHD のなく、患者骨髄に

においてドナー細胞の生着を確認した。現在、移植より約9ヶ月がたった段階でもキメリズムは100%であり、MDSの再発を認めていない。一方、WASに対する遺伝子治療では医師主導治験として、これまでも複数回、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談を受け、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、翌年1月に一例目の患者登録を行っている。

このように本研究班の研究者は遺伝子治療を含め免疫不全症の診断・治療に精通しており、当センターの医師やコメディカルならびに臨床研究開発センターと密な連携をとることで治験としての遺伝子治療実施は可能と思われる。そして、本遺伝子治療を通して得られた知見や経験を次なる疾患にも応用でき、当センターが我が国の遺伝子・細胞治療の中核センターとして機能することができると考える。

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
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
河合 利尚	病・免疫科医長
瀧本 哲也	臨セ・臨床研究推進室室長
土田 尚	国立病院機構本部・総合研究センター治験研究部・部長

3. 研究成果とその考案

1) ろ紙血を用いた SCID のスクリーニング法の確立（小野寺、河合）

重症複合免疫不全症（severe combined immunodeficiency: SCID）は、T細胞の分化障害を中心に、B細胞やNK細胞の異常を伴う疾患であり、生下時からの重症感染（ウイルス、細菌、真菌）により、根治的治療である造血幹細胞移植を行わない場合には致死的となる疾患である。本研究では、ろ紙血中のT細胞受容体の再構成によって産生されるTREC（T cell receptor excision circles）を測定することで新生児時期にSCIDを早期に診断する系を確立することを目的としている。

・リアルタイムPCR法からFRET法により測

定法の変更とその精度と簡便性の検討

当センターにて出生し、両親より同意を得た正常体重出生児を対象に、EnLite neonatal TREC kitを用いてTRECの測定を行なった。合計171検体を解析し、1例で初回TREC 6と低値を認め、その後再検査にてTREC 24、ACTB 2590であり、1ヶ月時でのろ紙血による再検では、TREC 48、ACTB 1870であり、低めではあるものの判定基準値を上回った。臨床検査ではリンパ球数3300と低めの値であった。フローサイトメトリーにおいてもCD3+T細胞が24.1%と低下傾向であったが、CD4+T細胞の中でのRecent Thymic Emigrant（RTE）T細胞（CD45RA+CD31+）は77.5%とT細胞の新生は認められ、経過観察となった。以上のことから、FRET法による測定はろ紙におけるTRECの値はリンパ球数を反映していると考えられた。

・成育におけるTREC新生児スクリーニングの結果

平成29年度はスクリーニング試験を説明した人数は171名であり、そのうち参加者が159名であり、同意率は92.8%であった。また、実際に解析した検体数は159検体であり、全ての検体を解析することができた。なお、陽性検体は1検体であったが、免疫不全症症例ではなく、false positiveであり、その割合は0.6%（1/159）であった。成育における新生児スクリーニングは機能していることが示された

2) 慢性肉芽腫症患者に対する骨髄非破壊的移植法の検討（松本）

慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease: CGD）は病原体を殺菌する際に必要となる活性酸素を産生する酵素のNADPH oxidaseが欠損し、幼児期から重篤な細菌や真菌感染症を繰り返す疾患である。CGDの根治療法は造血幹細胞移植であり、HLAが一致したドナーからの造血幹細胞移植ではその治療成績は80%を超えるが、HLAの一致度が低下するに従い治療成績は悪化し、また、CGDでは移植時に重度の感染症を合併している場合が多く、このような状態での移植では移植関連合併症の悪化がする。

本研究では、CGD患者に対する安全で有効

な造血幹細胞移植法の確立に向け、当センターにおいてフォロー中の6名のCGD患者に対し、予めブスルファン(BU)を投与してAUCを測定し、至適BU血中濃度の下での造血幹細胞移植の臨床試験成績を評価した。

患者はgp91phoxが欠損するXCGDが5名、p22phoxが欠損するCYBA欠損のCGDが1名であり、すべて男性である。移植細胞は全て非血縁由来で、3名がHLA一致、3名が一座不一致(A、C、DR)である。また、BUは予め行われた試験投与の結果を基にAUCとして45~65mg/Lxhになるように投与量を決定し、それらをDay-5からDay-2までの4日間6時間間隔で投与した。結果、全ての患者において中間値で18日目に好中球が回復し、うち5例で約1年を超えてのドナー細胞生着を認めている。一方、一名の患者では移植後2ヶ月目にドナー細胞が拒絶され、再移植が検討され、GVHDに関してはgrade III(気管支炎)が1名、grade Iが2名の患者で認めた。

以上の結果からCGD患者に予めBUを投与し、その至適血中濃度の下、造血幹細胞移植を行う臨床試験においてその安全性と有効性を確認した。

3) 小児に対する医薬品開発 (土田)

現在、欧米を中心に、複数の小児難治性疾患に対する遺伝子治療が承認され、なお企業主導治験中と聞いている。一方、日本国内では、本研究主任研究者を軸に、医師主導治験を実施中であるウィスコット・アルドリッチ症候群(Wiskott-Aldrich syndrome: WAS)を含む治験や臨床研究として遺伝子治療が複数実施されているが、薬機法上承認された再生医療等製品としての遺伝子治療はまだ存在しない。

今年度、必ずしも先進的な治療法ではない国内の小児医薬品を含み、それら個々の品目の促進に向けて、国の研究費で事業が開始されたという現状(国立研究開発法人日本医療研究開発機構「臨床研究・治験推進研究事業」の「小児領域における新薬開発促進のための医薬品選定等に関する研究」(研究代表者:公益社団法人日本小児科学会会長:高橋孝雄))を鑑みると、国内の小児医薬品開発という視点でさえも、未だたいへん厳しい途上にあると言わざるを得ず、欧州の遺伝子治

療開発環境を検討するまでもなく、引き続き、小児領域全体での臨床開発(小児医薬品開発)や難病での臨床開発を中心に、海外と国内の規制当局の活動や方策等を調査しつつも、本題の小児難治性疾患に対する遺伝子治療開発に関する検討の一助としたい。

4) 臨床データの解析・管理ならびに臨床研究の推進 (瀧本)

国立成育医療研究センターで平成26年7月に実施されたCGDに対する遺伝子治療研究登録例のデータ管理を行うことによって、当センターにおける遺伝子治療研究をデータ管理面から支援することを目的とした。方法としては、これまでに研究班で作成したCRFを、当センターあるいは関連施設のClinical Research Coordinator(CRC)が作業マニュアル「遺伝子治療臨床研究報告書(CRF)の記入と提出方法について」に従って記入し、データセンターに返送し、データセンターでは受領後ただちに記入内容を確認したうえで、疑義があればCRCあるいは必要に応じて主治医や研究代表者に質問して解決するという手順で運用した。患者は既に九州地区の紹介元施設にてフォローされているため、同施設から当センターに送付されるCRFを対象として上記の手順を実施した。データ管理上の問題点が生じれば、CRFや管理法をより改善していく方針である。

5) 慢性肉芽腫症への遺伝子治療における骨髓異形成症候群の発症 (内山)

2014年7月にMFGSgp91レトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療を実施した治療後の患者において治療32か月に、貧血や血小板減少とともに末梢、骨髓に芽球の出現が出現し、骨髓異形成症候群の発症が認められた。

・活性酸素産生細胞の推移:

遺伝子治療の直後の細胞では、高い効率でのCYBB遺伝子の導入と、活性酸素の産生を認めた。しかし、経過とともにこれらは減少し、1年後からはほぼ検出できないレベルとなった。

・芽球様細胞におけるベクター挿入部位解析 治療後32か月に末梢血に5%程度の芽球

の出現を認めた。同時に貧血や血小板減少を認め、骨髓異形成症候群の診断に至った。ベイトキャプチャーによる挿入部位解析では3番染色体上のMECOM遺伝子のイントロン2への挿入のみが確認された。

・MECOM挿入細胞の頻度

約90%の細胞で、MECOMへのベクター挿入が認められた。また、遺伝子治療後12か月の末梢血においてもすでに約50%でMECOMへの挿入が認められ、MDS発症（芽球化）には、MECOMへのベクター挿入以外の付加変異の必要性が示唆された。

・MECOM発現解析

リアルタイムPCRによる解析では、MDS発症時の芽球ではMECOMの発現が認められた。12か月の段階でもすでに発現の上昇が認められた。

・プロウイルスの変異解析

芽球細胞より抽出したゲノムDNAにおいて、サンガー法にてプロウイルス配列を解析した。LTR領域には変異を認めなかったものの、CYBB cDNAに多くのG to A変異の存在が認められた。またこれらの変異はすべて、12か月の段階でも認められ、段階的な変異の付加ではない可能性が考えられた。

6) 副腎白質ジストロフィーに対する新生児スクリーニングの開発とその実施（奥山）

副腎白質ジストロフィー（ALD）は、副腎不全と脳の脱髄症状を主要症状とするX連鎖性疾患で、責任遺伝子は、ABCD1遺伝子でペルオキシソームに局在する膜タンパクをコードしている。治療法として、造血幹細胞移植やレンチウイルスを用いたex vivo遺伝子治療が有効であるが、発症早期までに実施しないと効果は得られない。今回、乾燥ろ紙血（DBS）の微量サンプルを用いて、本症の特徴的なバイオマーカーである、極長鎖脂肪酸（C26）の誘導体を検出する方法を確立し、新生児スクリーニングパイロット研究を開始した。ALD患者およびその母親（保因者当センターにて出生し、両親より同意を得た正常体重出生児を対象に、DBSサンプルを用いて液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計（LC-MSMS）を用いて、炭素数26のリゾホスファチジルコリン（C26PC）を測定した。ALD患

者のPC26/PC22比およびLysoPC26:0は健常者ではほとんど検出できないが、患者および保因者（母親）では有意に高い値を示していた。母親と患者では、患者の方が高い値を取る傾向は認めしたが、両者を明瞭に区別することはできず、患者を保因者や発症者の区別は困難であるが、世間常時とは有意な差を認めることが示された。今後は、より規模の大きい新生児スクリーニングを実施する予定である。

7) 遺伝子治療臨床試験

(1) CGD臨床研究に向けた取り組み

平成26年7月に実施したCGDに対する造血幹細胞遺伝子治療では患者の難治性感染症は治癒し、残念ながら骨髓異形成症候群は発症したもののこれまで培ってきたCGDに対する新たな治療法であるpost-CYによるハプロ移植が成功し、患者は現在も通常の生活を送れている。なお、厚生労働省における部会においても難治性感染症の治癒が造血幹細胞移植の成功に寄与したことは明らかとのことで、今後もCGDに対する遺伝子治療をbridging therapyとして継続することが認められた。なお、現在、使用するベクターをγレトロウイルスからレンチウイルスに変更した臨床研究が進められ、その安全性と有効性が確認されていることから、今後の遺伝子治療の同方向に進むものと思われる。

(2) WAS治験開始に向けた取り組み

GSK社と複数の秘密保持契約の下、これまでに臨床プロトコル、IMPD及び治験製品概要書等を入手し、PMDAとの対面助言を、臨床プロトコル、遺伝子導入細胞の品質と安定性、ウイルスベクター及び遺伝子導入細胞の生物由来原料に関して対面助言等を行い、また、遺伝子治療に関連するカルタヘナ法に基づく第一種使用規程に関してはH28.6.17に再生医療等製品・生物由来技術部会にて承認されている。そして、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、翌年1月に一例目の患者登録を行っている。現在、遺伝子・細胞治療を円滑に進めるため院内の実施体制の準備の下、早々に遺伝子治療を開始する。なお、対象数は研究期間内で3名（半年1名程度）を計画しており、最終的には欧州での臨床研究の結果（15～20名）と合

わせて製薬企業が製造販売承認申請に臨む予定である。ICH-GCP 治験実施に関しては成育内の臨床研究開発センターが DM 等を含めて担当し、この作業を通して遺伝子治療治験に関する人材育成を on-site learning 形式で行っている。モニタリング及び監査に関しては遺伝子治療を専門とする企業に外部委託する予定である。

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。