

(別紙1)

## 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

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)

本研究では、小児難治性遺伝性疾患に対する包括的な遺伝子細胞治療の実施体制の設立に向け、複数の原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植を行い、その有効性・安全性を新たに開発した評価系で解析し、当センター病院における長期フォローアップの体制を構築する。また、患者登録に繋がる新生児スクリーニングの導入を検討する。

具体的には平成26年7月に実施した慢性性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療では患者肺膿瘍等の難治性感染症は治癒したが、治療後2年半目に使用したベクター挿入による骨髄異形成症候群を発症した。しかし、新しく導入された移植プロトコルの post-CY ハプロ移植が成功し、患者健康状態は現在も良好である。一方、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では医師主導治験を計画し1名の患者登録を行ったが、開発途中で担当企業の変更が余儀なくされ、現時点で遺伝子治療が中断となっている。ただ、その後継社と話を進め、その再開を進めている。また、当センターの ADA 欠損症患者を対象とした STM279 の酵素補充療法はリブコビとして医薬品承認され、免疫不全症に対する TREC 測定による新生児スクリーニングではその技術を NPO 団体に移行し、今後の新生児スクリーニング規模拡大を期待している。なお、これら情報・経験を広く企業や他のアカデミアに役立てるため平成31年4月に遺伝子細胞治療推進センター (GCP センター) を当センターに開設した。

### 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) 当センターにおける紙血中の 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。

## 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

### 1) 新生児スクリーニング法の確立 (河合)

新生児免疫不全症スクリーニングは、欧米を中心に重症複合型免疫不全症のスクリーニング検査として有用性が報告されている。原発性免疫不全症のうち、本スクリーニングで異常を認める免疫不全症の頻度は、理論的には1人/1-3万出生と推定される。そのため、今回、異常を認めた症例は確認されなかったが、本スクリーニングを継続することが重要と考える。また、重症複合免疫不全症は生後数ヶ月以内に重篤な感染症に罹患することが多い。その観点から、現在のスクリーニングの体制では、生後約1ヶ月で解析を終了しており、臨床的意義は高いと考える。ろ紙血から検体を採取し結果を送付するまでの期間は約5日であることから、解析開始時期を早めるこ

とで、さらに、迅速なスクリーニングが可能と考える。また、本スクリーニングの解析法は、理論的には WAS など他の T 細胞機能低下症でも異常をきたす可能性がある。本症例は他施設で出生したため、新生児期に免疫不全症マススクリーニングは行われていない。

### 2) 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子治療及び移植の治療法の検討 (松本)

アデノシン・デアミナーゼ (ADA) 欠損症は代謝酵素の ADA が欠損することで細胞内に核酸代謝産物の dAXP が蓄積し、未熟 T 細胞が細胞障害を受けることで重症複合免疫不全症を呈する疾患である。その根治療法は HLA 一致血縁ドナーからの造血幹細胞移植であるが、最近では患者造血幹細胞にウイルスベクターを用いて正常 ADA 遺伝子を導入する遺伝子治療の有効性が高く評価されている。また、ADA 欠損症は先天代謝異常症とも捉えられ、その観点からウシ由来の ADA を筋肉内投与する酵素補充療法を有効な治療法として行われている。本研究では原発性免疫不全症の一型である ADA 欠損症に焦点を当て、安全性・有効性の観点から各治療を比較・検討した。

	HSCT	HSC-GT
治療に必要な月	0.5-1	3-6
ドナー頻度	20%	100%
治療費	中	高
前処置	不要	高
有効期間	40年以上	6~17年
成功率	80~90%	80~95%
GVHD	あり	なし
治療関連死亡	5.6%	0%

以上より HSC-GT は HLA 一致血縁ドナーと同様の治療成績を示している。以上より ADA 欠損症の治療方法を選択の流れは以下の通りである。

- 1) ADA 欠損症の診断
- 2) ERT を開始し、血縁ドナー検索
- 3) 血縁ドナーが存在すれば HSCT
- 4) 血縁ドナーが不在なら HSC-GT
- 5) HSCT/ HSC-GT の実施が困難であれば ERT の継続

ERT の長期化/ERT が行えない場合は MUD/Halpo HSCT を検討

- 3) 遺伝子治療を含む小児の医薬品開発（海外と国内との承認審査体制の違いも調査）  
（土田）

今年度、引き続き、遺伝子治療、小児の医薬品開発の観点から、日本と海外（特に欧州）の現状把握及び比較検討を行った。国内の遺伝子治療では、2018 年（平成 30 年）4 月、政府のアドバイザリーボードで「遺伝子治療の研究開発の推進について」議論が取りまとめられた。難病・希少疾病では最先端の遺伝子工学技術を利用した治療法の開発が期待されることから、今年度中に薬事申請資料の時に必要とされる内容や薬事規制等に関するゲノム編集遺伝子治療の安全性評価ガイドランス策定を予定していること等をはじめ、国内遺伝子治療研究領域の環境整備が進められていること、欧州医薬品庁（European Medicines Agency: EMA）でも 2018 年（平成 30 年）7 月に「遺伝的に改変された細胞の品質、非臨床的・臨床的側面に関するガイドライン」（2008 年（平成 20 年））にゲノム編集に関する事項が新たに盛り込まれたものがドラフトの形で公表されたこと、また国内小児医薬品開発については欧米と違って、未だ法制化はされていないものの、2017 年（平成 29 年）より、日本小児科学会を主体とする日本医療研究開発機構（Japan Agency for Medical Research and Development: AMED）事業で申請品目毎の前向きな検討が続けられていること<sup>4)</sup>等が確認できた。

- 4) 患者の体液に排出される遺伝子組換えウイルス量の測定とその感染性（小野寺）

WAS 造血幹細胞遺伝子治療では、使用するウイルスベクターはレンチウイルス由来のため拡散防止措置を執らずに遺伝子組換え生物を使用するカルタヘナ法第一種使用規程申請書を提出する必要がある。

一方、患者投与前には遺伝子導入細胞を複数回生理食塩水にて洗浄するため、そこに残存するウイルス量は極めて微量であると考えられる。本研究では実際の臨床用ウイルスベクターを用いて患者造血幹細胞への遺伝子導入試験を行い、そこに残存するウイルス量をレンチウイルスベクターに感受性の高いヒト T 細胞株を用いて評価した。その結果、複数回の洗浄工程により使用したウイルス量の 1/1000 まで減少させることができたが、この状態においても感染能は確認でき、実際の造血幹細胞遺伝子治療においてもその取扱いに十分な注意を払う必要があることが示された。

- 5) 遺伝子治療における有効性・安全性の評価系の確立（内山）

レトロウイルスベクターなどの染色体挿入型の遺伝子治療では、ベクターの挿入部位解析と各挿入クローンの追跡は、安全性と有効性の評価に必須である。次世代シーケンサー（NGS）による挿入部位解析法と、挿入部位特異的デジタル PCR 法（ddPCR）を用いて、国内で遺伝子治療が行われた ADA 欠損症患者と X 連鎖慢性肉芽腫症（X-CGD）患者の評価を実施した。ADA 欠損症患者への遺伝子治療では、現在遺伝子導入細胞の生着に必須とされる前処置化学療法がおこなわれなかったものの、末梢血におけるリンパ球系、骨髄球系の細胞に共通の挿入部位が認められ、造血幹細胞／前駆細胞レベルでの遺伝子導入細胞の生着が認められた。X-CGD 患者への遺伝子治療では、

遺伝子治療 32 か月で骨髄異形成症候群を発症し、ベクター挿入部位解析の結果、MECOM 遺伝子の IVS2 へのベクターの挿入が認められた。デジタル PCR による解析では、治療後 6 か月より MECOM 挿入クローンが出現し、12 か月でほぼすべての骨髄球系細胞（好中球、単球）に同じ挿入を認め、単一クローンによる造血が行われていたことが判明した。

NGS と ddPCR を組み合わせは、遺伝子治療におけるベクター挿入をより高精度にかつ定量的に同定することが可能である。各血球分画における遺伝子導入細胞の分布を特定することは、遺伝子治療の有効性の評価に非常に重要である。また、特定の挿入クローン（がん原遺伝子への挿入）の定量は、がん化クローンの出現時期やその頻度を明らかにし、特に挿入発がん変異の発症までの経時的な変化が明らかになった。

#### 6) ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病における遺伝子治療の有用性に関する検討（奥山）

欧米を中心に進められているライソゾーム病やペルオキシゾーム病の遺伝子治療の臨床研究の現状を調査した。方法はライソゾーム病やペルオキシゾーム病の中樞神経症状の改善を目的とした遺伝子治療法の開発状況を論文や関連学会の報告から抽出である。結果は、レンチウイルスベクターを用いた ex vivo 遺伝子治療臨床試験で一定の効果が確認されている。特に、造血幹細胞移植による効果が不十分は MLD においても、遺伝子治療は明らかな効果を認めている。欠損酵素を高いレベルで発現する遺伝子改変細胞が得られることが遺伝子治療の大きな利点であるといえる。一方、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた in vivo 遺伝子治療も試みられてはいるが、現在のところ大きな成果は得られていな

い。脳全体にウイルスベクターを到達させる技術の開発が必要と思われた。

#### 7) 遺伝子治療臨床試験

##### (1) CGD 臨床研究に向けた取り組み

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度まで改善した。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、患者骨髄においてドナー細胞の生着を確認した。現在、移植より 2 年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。なお、現在、CGD 遺伝子治療で使用されるベクターがレンチウイルスベクターに変更されてきているため、今後はレンチウイルスベクターによる遺伝子治療の開発を目指し本遺伝子治療の中止届を H30 年 11 月 厚生労働省に提出した。

##### (2) WAS 治験開始に向けた取り組み

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い、実施前のスクリーニング試験において当該治験が実施可能と判断して同年 3 月 7 日に前処置としてのリツキシマブを投与した。

ただ、3月21日になって開発予定のGSK社がスクリーニング試験での遺伝子導入効率の低さを理由に製造工程の見直しを要求して、結果、本患者における遺伝子導入細胞の投与は延期された。ただ、患者は既にリツキシマブを投与されており、患者末梢血中のB細胞が消失していることからB細胞の完全な回復を確認して平成30年12月に患者の登録を抹消した。なお、患者はイタリアミラノでOrchard Therapeutics社が実施している治験に参加予定であり、令和元年10月のイタリアでの遺伝子治療を予定している。また、WAS遺伝子治療であるが、当初、開発予定のGSKが撤退し、その権利をOrchard Therapeutics社が引き継いだため、今後はOrchard Therapeutics社と契約し、当該治験を早々に再開する。

### (3) 遺伝子治療実施体制の構築

本研究を通して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GCP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ある程度立ち上げた。ただ、その機能を幅広く役立てるため企業や他のアカデミアも利用できるように平成31年4月遺伝子細胞治療推進センター(GCPセンター)を当センターに開設した。

## 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。