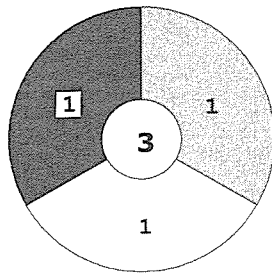
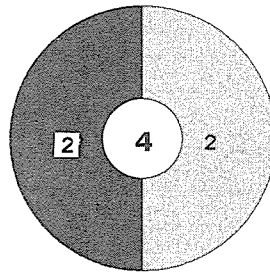


PBSC, CBSC 成績

PBSC

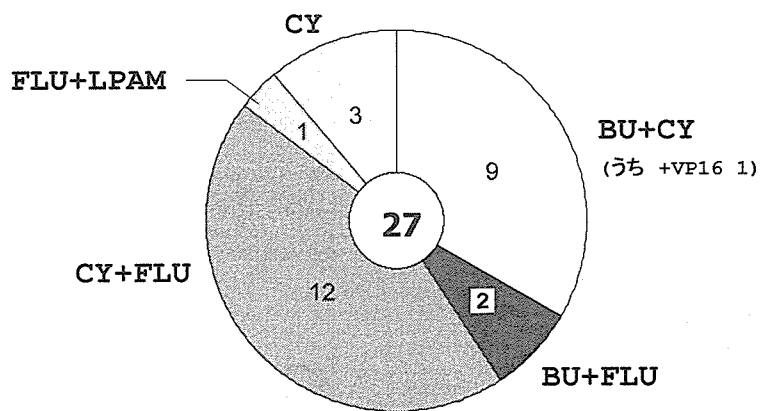


CBSC



Alive
 Rejected
 Died

前処置



ドナーと前処置による分類

○: Alive (◎: DLI) ●: Died △: Rejected

	BU+CY	BU+FLU	CY+FLU	CY	FLU+LPAM
MSD	○○○		○○◎◎◎◎		
MUD	○○		○○◎◎	○	
Mis	○●		○	○	△
PBSC	●	△	○		
CBSC	●	○	○	●	

リスク, ドナー, 前処置による分類

○: Alive (◎: DLI) ●: Died △: Rejected *: ATG or ALG

	BU+CY			CY+FLU		
	Group 1	2	3	1	2	3
MSD	○○		○	○○◎◎◎ * * *	◎	
MUD	○*		○	○○◎◎ *	○*	
Mismatch	●	○			○*	
PBSC	●*			○		
CBSC	●*			○		

	Standard risk (SR)	High risk (HR)
Risk factor	Group 2/3	Group 1 Therapy refractory infection
Regimen	CY+Flu (±ATG±TBI) or BU+CY (±ATG±TBI)	CY+Flu (±ATG±TBI)
DLI		CY+Fluでは考慮する MUDはDLIできない場合も考慮して レジメンを選択
Donor	Bone Marrow	
	1st: Matched sibling donor (MSD) 2nd: Matched unrelated donor (MUD)	

- Standard risk (SR)と, High risk (HR)に分けてみる.
- SR, HRとも骨髄を用いる.
- ドナーは, 第1選択はMatched Sibling Donor (MSD), 第2選択はMatched Unrelated Donor (MUD).
- SRはCY+Flu(±ATG±TBI)かBU+CY.
- HRはCY+Flu(±ATG±TBI). ただしDLIを考慮せざるを得ない.
- Campath 1HはATGと同等であろう. ただし国内では手に入りにくい
- 混合キメラになるのは, CYの量が少ないのではないかと. CY量を調節する必要があると思う.
- BUは晩期合併症として, 内分泌的な問題が生じる. Total 600mgでは精子数減少が見られる.

欧州の骨髄移植基準 (Guidelines for BMT in PAEDIATRIC CGD, 2004)

Patients with HLA-identical donor plus one of the following:

- ≥ 1 life-threatening infection in the past
- Severe granulomatous disease with progressive organ dysfunction
- Steroid-dependent granulomatous disease (e. g. colitis)
- Ongoing therapy-refractory infection (e. g. aspergillosis)

リスクと前処置による分類

○: Alive (◎: DLI) ●: Died △: Rejected

	BU+CY	BU+FLU	CY+FLU	CY	FLU+LPAM
1	○ ○ ○ ● ● ●	○ △	○ ○ ○ ○ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎	○	△
2	○		○ ○ ◎	○	
3	○ ○			●	

BU(16) + CY(200)												
#	Age	Risk	Donor				En-graft	acute	chronic	DLI	Outcome	
02	3	MSD		BU16 CY240	CyA		FK	+11	II	Extensive	-	ALIVE
03	10			BU16 CY160 TLI 7.5	CyA			+20	III	Extensive	-	ALIVE
13	12			BU16 CY200	CyA	MTX		+21	-	Extensive	-	ALIVE
25	4	MUD		BU16 CY200		MTX	FK	+29	I	-	-	ALIVE
28	14			BU* CY200 ATG 5		MTX		+19	-	-	-	ALIVE
24	16	Mismatched sibling:5/6		BU16 CY200		MTX	FK	+35	I	Extensive	-	ALIVE
18	4	Mismatched Mother		BU* CY200 ATG 10		MTX	FK	-	-	-	-	DIED
08	5	CBSC		BU16 CY200 ATG 45	CyA			+20	-	-	-	DIED
06	5	PBSC		BU20 CY200 VP900	CyA	MTX		+15	IV	-	-	DIED

BU * : BU 600mg/m²

BU + Flu												
#	Age	Risk	Donor								Outcome	
15	12	Mis mother PBSC		BU8 Flu180 ATG30	CyA	MTX	FK	+14	-	-	DLI	REJECT
21B	2	CBSC		BU8 Flu180 TBI2		MTX		+17	-	-	-	ALIVE

Flu + L-PAM												
#	Age	Risk	Donor								Outcome	
21A	2	Mismatched Mother		Flu150 L-PAM140 ATG20	PSL	MTX	FK	+15	-	-	-	REJECT

CY+Flu±ATG												
#	Age	Risk	Donor					En-graft	acute	chronic	DLI	Outcome
10	6	MSD		CY200 FLU150 ATG60	CyA	MTX		+12	-	-	DLI	ALIVE
19	27			CY80 FLU180 TLI7	CyA	MTX		+15	-	-	-	ALIVE
23	20			CY75 FLU125 ALG45 TBI3	CyA	MTX		+19	I	-	DLI	ALIVE
26	15			CY120 FLU180 TBI3	CyA	MTX		+20	-	-	DLI	ALIVE
14	21	MUD		CY100 FLU100 TBI3		MTX	FK	+6	-	Limited	DLI	ALIVE
16	13			CY120 FLU120 TLI7		MTX	FK	+14	-	-	DLI	ALIVE
17	4			CY120 FLU180 ATG10 TBI3		MTX	FK	+10	I	-	DLI	ALIVE
20	10			CY120 FLU180 ATG10 TBI3		MTX	FK	+17	III	Extensiv	-	ALIVE
29	3			CY120 FLU125 TBI4		MTX	FK	+17	III	-	-	ALIVE
22	28	Mismatched sibling:3/6		CY100 FLU125 ALG60 TBI3		MTX	FK	+13	I	-	-	ALIVE
12	18	MSD PBSC		CY 120 FLU 150		MTX	FK	+9	-	-	-	ALIVE
27	20	Unrelated CBSC		CY50 FLU200 TBI4	CyA	MMF		+24	I	-	-	ALIVE

CY												
#	Age	Risk	Donor								Outcome	
07	20	MUD		CY120 TBI12	CyA	MTX		+17	II	Limited	-	ALIVE
09	8	Mismatched Sibling 5/6		CY120 TBI12	CyA	MTX		+13	-	-	-	ALIVE
05	8	Unrelated CBSC		CY200 ATG10 TAI10	CyA	MTX		+14	-	-	-	DIED

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

難治性先天異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科教授

研究要旨： 遺伝子治療臨床研究の審査体制を検討するに当たり、世界の臨床プロトコル状況として致命的疾患以外を対象としたものも多くなってきており、またモデルマウスなどに対する有効性も多数報告されており、再び臨床研究推進の機運も高まりつつある。今後計画されるプロトコルに対しては、ベクターの性能と安全性、対象疾患、対象年齢などの点に十分な配慮がなされているかを従来どおり審査していくことに加え、以前実施された実際の臨床研究からは体制の整備、情報の共有、ウイルス排泄処理、患者のQOL、データ解析に考慮を払う必要が示唆され、これらの点に関しても十分審査し、有効で安全性の高い臨床プロトコルが多数、積極的に研究されるよう配慮されるべきと考えられた。

研究協力者

小林博司（東京慈恵会医科大学講師）

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究の審査体制に関する検討をするため、日本を含めた世界の遺伝子治療の現状を分析し、更に慈恵医大での遺伝子治療基礎研究、肺癌での臨床遺伝子治療の経験も踏まえて今後の臨床応用プロトコルに対する審査体制の確立へ向け解析していく。

B. 研究方法

- (1) 現在世界で施行されている臨床プロトコルはwww.Wiley.co.ukのサイト(Journal of Gene Medicine 関連サイト)でリアルタイムに確認できるが、更に詳しい文献学的考察を加えた。
- (2) 慈恵医大での遺伝子治療基礎研究は主にマウスなどを用いた先天代謝異常モデルの中樞神経系への遺伝子導入を目標に行われており、本年度は Krabbe 病への遺伝子治療に向けてレンチウイルスベクターを作成した。
- (3) 更に 慈恵医大で施行された非小細胞肺癌へのアデノウイルスベクターを用いた臨床プロトコルを再検討する。
(倫理面への配慮)
(1) 臨床プロトコルは無記名、実施場所も特定できない形でサイトに公開されている。

- (2) 動物実験は全て慈恵医大動物実験センター委員会の倫理指針に従っている。
また組み換えウイルスベクター作成に関しても慈恵医大組換えDNA委員会、および倫理委員会の承認を得ている。
- (3) 厚生労働省の指針に従い疾患及び治療に関する本人、家族説明を十分行った上で、慈恵医大倫理委員会の承認を経て施行された。

C. 研究結果

- (1) 臨床で使用されているベクターはadenovirus, retrovirus, naked DNA が上位を占め、対象は悪性疾患が67%、単一遺伝子病、血管性疾患が8.7%、感染症が6.6%を占めた。Phase I 62% Phase II 2.1%であった。我が国の臨床プロトコルでは悪性腫瘍13、免疫不全3 (ADA2, X-SCID1)、血管性疾患3であった。
- (2) 先天代謝異常 (ALD, MPS, Krabbe) に対して骨髄移植、および酵素補充療法が奏功する例が多く、これらは遺伝子治療により遺伝子導入され酵素蛋白が発現することにより症状が改善する理論的根拠となりうる。これらを踏まえ我々は今回Krabbe病への遺伝子治療に向けて欠損酵素GALC発現遺伝子を包含したレンチウイルスベクターを作成し、新生児静脈注射を試みたところ肝などの臓器で酵素活性の上昇が見られた。
- (3) 慈恵医大での非小細胞肺癌へのアデノウイルスベクターを用いた臨床遺伝子治療ではまず病院長の下で遺伝子治療

委員会、および感染対策委員会が設置され、この二つの委員会と連絡をとりながら呼吸器内科・外科中心の医師団が実際の診療を行っていくという体制がとられた。実際の遺伝子治療に先立ち治療希望患者へデータシート記入、遺伝子診断(p53変異の有無)などで候補者を絞っていった結果対象は一人となった。プロトコル開始後、CDDPと併用してアデノウイルスベクター10e10PFUを投与し複数回の腫瘍生検、RT-PCRによるベクターDNA定量などで評価したが、最終的にはプロトコルから脱落となった。

D. 考察

- (1) 世界で行われている遺伝子治療は悪性腫瘍に次いで血管性疾患、単一遺伝子病が多くなって来つつあり、Phase IIIまで進んだものも2.1%出てきた。X-SCIDでの事例からもベクター開発に改善の余地は多分にあるが(site specific integrationなど)、臨床上対象疾患も悪性腫瘍やAIDSなどの致命的疾患一辺倒からは脱却しつつあるといえる。
- (2) Krabbe病モデルマウスに対する遺伝子治療は肝臓への導入には成功したが、今後ベクターウイルスのタイター、プロモータ、投与方法を変えることで神経系への導入、更に症候発現の改善を目標としていく。
- (3) 慈恵医大での臨床遺伝子治療の経験から、次のことが重要な留意点と考えられた。
 1. 遺伝子治療を進めるにあたり、多くの関連各科との連携医療が大切である。(体制の整備、情報の共有)。
 2. ウイルスの排泄はかなりの長期間排泄されることから、排泄の処理をきちんとする必要がある。安全性に関する長期フォロー体制の充実
 3. 患者はかなりの遺伝子治療に伴うストレスがあることから患者のQOLをしつかり考えることが大切。
 4. 学問的なデータの解析、関係省庁、外部委員会への報告。

E. 結論

遺伝子治療臨床研究の審査体制を検討するに当たり、世界の臨床プロトコル状況、および研究報告状況から、近年再び臨床研究が推進される機運が高まりつつある。今後、計画されるプロトコルに対し、選択されたベクターの性能と安全性、対象疾患、対象年齢、実際の体制の整備、情報の共有、ウイルス排泄処理、患者のQOL、データ解析

報告などの点において十分な配慮が為されているか、審査体制を確立していくことが重要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

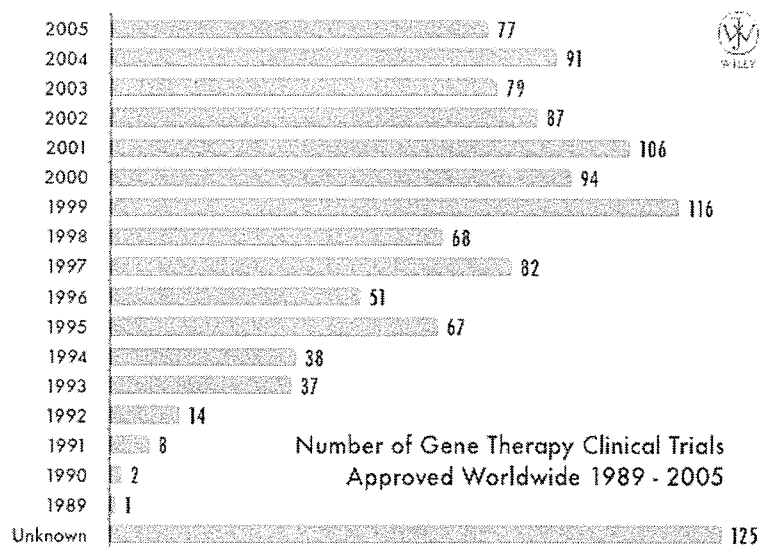
1. Kobayashi H, Watabe K, Izuka S, et al: Successful Transduction of Mammalian Astrocytes and Oligodendrocytes by Pseudotyped Baculovirus Vector in Vitro and in Vivo. *Jikei Medical Journal*53(2):55-62,2006
 2. Shiba H, Okamoto T, Futagawa Y, et al: Adenovirus vector-mediated gene transfer using degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma in rats. *J Surg Res*133(2):193-196,2006
 3. Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, et al: Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*24(11):1689-1699, 2006
- ##### 2. 学会発表
- 【特別講演、講演会、シンポジウム】
1. Eto Y. Gene Therapy and Cell Therapy in neurogenetic disorders. 第2回ヨーロッパ神経遺伝学会. Rostock, Oct. 2006
 2. 衛藤義勝. 成人にみられる代謝異常症—最近の治療の進歩. 熊本医師会. 熊本, 2006.10
 3. Eto Y. Novel treatment for neurogenetic disorders. T The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Sep. 2006

4. Eto Y. Gene Therapy and Cell Therapy in Lysosomal Storage Disease. The 12th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, Aug. 2006
 5. 衛藤義勝. 脳を治すー遺伝性神経疾患の治療は可能か. 第48回日本小児神経学会. 舞浜, 2006.6
 6. 衛藤義勝. ファブリー病の最近の治療に関して. 日本ファブリー病研究会. 新潟, 2006.5
 7. Eto Y. Female Fabry disease. International Symposium of Lysosomal Disease. Stockholm, April. 2006
 8. Eto Y. Cell Therapy and Gene Therapy Lysosomal disease. Taipei, March. 2006
 9. Ohashi T. Fabry Workshops, Decision Factors in Treating Patients. The 9th Annual Asia LSD Symposium. Chiba, Sep. 2006
 10. Ohashi T. Measurement of globotriaosylceramide in urine for long term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba, Sep. 2006
- 【学会発表】
1. Qiu WJ, Izuka S, Ohashi T, Eto Y. Correction of The alpha-Galactosidase A deficiency and Reduction of Glycolipid Storage in Fabry Mice Receiving Transduced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sep. 2006
 2. 月花環, 林孝彰, 竹内智一, 久保朗子, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝, 北原健二. 新規OAT遺伝子変異を認めたビタミンB6非反応性脳回状脈絡網膜萎縮の同胞例, 第60回臨床眼科学会. 京都, 2006.10
 3. 小林博司, 森田麻子, 大橋十也, 衛藤義勝. レンチウイルスを用いたKrabbe病モデルマウスの遺伝子治療. 第48回日本小児神経学会総会. 舞浜, 2006.6
 4. Kobayashi H, Morita A, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Sept. 2006
 5. Kobayashi H, Morita A, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. The 12th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, August.2006
 6. 小林博司, 有賀賢典, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝. ムコ多糖 I 型日本人女性の継続的な酵素補充による治療経過について. 第12回日本ライソゾーム研究会. 東京, 2006.11
 7. 小林博司, 井田博幸, 大橋十也, 船塚真, 宍倉啓子, 鈴木よう子, 大澤真木子, 衛藤義勝. 遅発型Pompe病日本人男性に対する酵素補充療法. 第1回日本ポンペ病の会. 東京, 2006.11

世界の遺伝子治療の動向

The Journal of Gene Medicine,
John Wiley and Sons Ltd.

Updated January 2006



The Journal of Gene Medicine, © 2006 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Updated January 2006

遺伝子治療実施数	Country	Gene Therapy Clinical Trials	
		Number	%
	Australia	17	1.5
	Belgium	18	1.6
	Canada	13	1.1
	China	4	0.3
	France	19	1.7
	Germany	74	6.5
	Israel	6	0.5
	Italy	13	1.1
日本	Japan	15	1.3
	Netherlands	7	0.6
	Norway	4	0.3
	South Korea	4	0.3
	Spain	4	0.3
	Sweden	2	0.2
	Switzerland	40	3.5
	UK	134	11.7
	USA	742	64.8
	Multi-country	11	1
	Total	1145	

Updated January 2006

遺伝子治療の 適用疾患	Indications	Gene Therapy Clinical Trials	
		Number	%
	Cancer diseases	762	66.6
	Gene marking	52	4.5
	Healthy volunteers	19	1.7
	Infectious diseases	75	6.6
先天異常	Monogenic diseases	100	8.7
	Others	37	3.2
	Vascular diseases	100	8.7
	Total	1145	

Phase	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Phase I	714	62.4
Phase I/II	234	20.4
Phase II	161	14.1
Phase II/III	12	1
Phase III	24	2.1
Total	1145	

Updated January 2006

使用ベクター

Vector	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Adeno-associated virus	38	3.3
Adenovirus	287	25.1
Adenovirus + Retrovirus	3	0.3
Flavivirus	5	0.4
Gene gun	5	0.4
Herpes simplex virus	38	3.3
Lentivirus	5	0.4
Lipofection	95	8.3
Listeria monocytogenes	1	0.1
Measles virus	2	0.2
Naked/Plasmid DNA	192	16.8
Naked/Plasmid DNA + Adenovirus	1	0.1
Newcastle disease virus	1	0.1
Poliovirus	1	0.1
Poxvirus	59	5.2
Poxvirus + Vaccinia virus	21	1.8
Recombinant Poxvirus	1	0.1
Retrovirus	276	24.1
RNA transfer	14	1.2
Saccharomyces cerevisiae	2	0.2
Salmonella typhimurium	2	0.2
Semliki forest virus	1	0.1
Simian virus 40	1	0.1
Vaccinia virus	51	4.5
Unknown	43	3.8
Total	1145	

Updated January 2006

●米国の遺伝子治療プロトコール表 (Totalプロトコール数)

INFECTIOUS DISEASES	45
MONOGENIC DISEASES	64
OTHER DISEASES / DISORDERS	93
CANCER (BY THERAPEUTIC APPROACH)	511
TOTAL GENE TRANSFER PROTOCOLS (THERAPY, MARKING, and NON-THERAPEUTIC)	763

遺伝病の遺伝子治療プロトコール数

MONOGENIC DISEASES	Review Level 1	Review Level 2	Review Level 3	Review Level 4	Review Level 5	Review Level 6	Review Level 7	TOTAL
1. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency	1	0	0	0	0	1	1	3
2. Chronic Granulomatous Disease	1	0	1	0	0	1	0	3
3. Cystic Fibrosis	10	1	5	0	0	6	2	24
4. Familial Hypercholesterolemia	1	0	0	0	0	0	0	1
5. Fanconi Anemia	1	0	0	0	0	3	0	4
6. Gaucher Disease	3	0	0	0	0	0	0	3
7. Hunter Syndrome	1	0	0	0	0	0	0	1
8. Ornithine Transcarbamylase Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
9. Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency	1	0	0	0	0	0	0	1
10. SCID	1	0	1	0	0	3	1	6
11. Leukocyte Adherence Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
12. Canavan Disease	0	0	0	0	0	1	2	3
13. Hemophilia	0	0	0	0	0	0	5	5
14. Muscular Dystrophy	0	0	0	0	0	0	2	2
15. Amyotrophic Lateral Sclerosis	0	0	0	0	1	0	0	1
16. Junctional Epidermolysis Bullosa	0	0	0	0	0	0	1	1
17. Retinal Disorders (e.g. LCA)	0	0	0	0	0	0	2	2
18. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis	0	0	0	0	0	1	0	1
19. Mucopolysaccharidosis	0	0	0	0	1	0	0	1

Review Level 1 = Full RAC review + NIH Director Approval + FDA Investigational New Drug approval. This review process is no longer in effect.
 Review Level 2 = Accelerated RAC Review + NIH Office of Recombinant DNA Activities (ORDA) + FDA IND Approval. This review process no longer in effect.
 Review Level 3 = Sole FAD Review Recommended by NIH/ORDA. Simultaneous submission to NIH (ORDA) required for purpose of data monitoring and adverse event reporting
 Review Level 4 = Sole FAD Review [submission to NIH (OBA) not required]. This is only for non-NIH funded (either direct or collaborative) institutions who elect to submit to NIH (OBA) under voluntary compliance.
 Review Level 5 = Received by NIH (OBA). Review level pending.
 Review Level 6 = Not Selected for RAC Public Review. Submission to HIH (OBA) required for the purpose of data monitoring and adverse event reporting. This review process is currently in effect.
 Review Level 7 = Full RAC discussion + FDA approval. This review process is currently in effect.

その他の遺伝子治療プロトコール数

OTHER DISEASES / DYSORDERS	Review Level 1	Review Level 2	Review Level 3	Review Level 4	Review Level 5	Review Level 6	Review Level 7	TOTAL
1. Peripheral Artery Disease	1	0	0	1	0	29	5	36
2. Arthritis	1	0	0	0	0	1	3	5
3. Arterial Restenosis	0	0	1	0	0	1	1	3
4. Heart Failure	0	0	0	0	1	2	3	3
5. Cubital Tunnel Syndrome	0	0	1	0	0	0	0	1
6. Coronary Artery Disease	0	0	0	1	0	15	5	21
7. Alzheimer's Disease	0	0	0	0	0	0	2	2
8. Ulcer	0	0	0	0	0	1	2	3
9. Bone Fracture	0	0	0	0	1	0	0	1
10. Peripheral Neuropathy	0	0	0	0	0	1	1	2
11. Parkinson's Disease	0	0	0	0	0	0	3	3
12. Epilepsy	0	0	0	0	0	0	1	1
13. Eye Disorders	0	0	0	0	0	1	4	5
14. Erectile Dysfunction	0	0	0	0	0	0	1	1
15. Intractable Pain	0	0	0	0	0	0	1	1
16. Autoimmune Disease	0	0	0	0	1	1	1	3
17. Salivary gland hypofunction	0	0	0	0	0	0	1	1
18. Overactive Bladder Syndrome	0	0	0	0	1	0	0	1

Review Level 1 = Full RAC review + NIH Director Approval + FDA Investigational New Drug approval. This review process is no longer in effect.
 Review Level 2 = Accelerated RAC Review + NIH Office of Recombinant DNA Activities (ORDA) + FDA IND Approval. This review process no longer in effect.
 Review Level 3 = Sole FAD Review Recommended by NIH/ORDA. Simultaneous submission to NIH (ORDA) required for purpose of data monitoring and adverse event reporting
 Review Level 4 = Sole FAD Review [submission to NIH (OBA) not required]. This is only for non-NIH funded (either direct or collaborative) institutions who elect to submit to NIH (OBA) under voluntary compliance.
 Review Level 5 = Received by NIH (OBA). Review level pending.
 Review Level 6 = Not Selected for RAC Public Review. Submission to HIH (OBA) required for the purpose of data monitoring and adverse event reporting. This review process is currently in effect.
 Review Level 7 = Full RAC discussion + FDA approval. This review process is currently in effect.

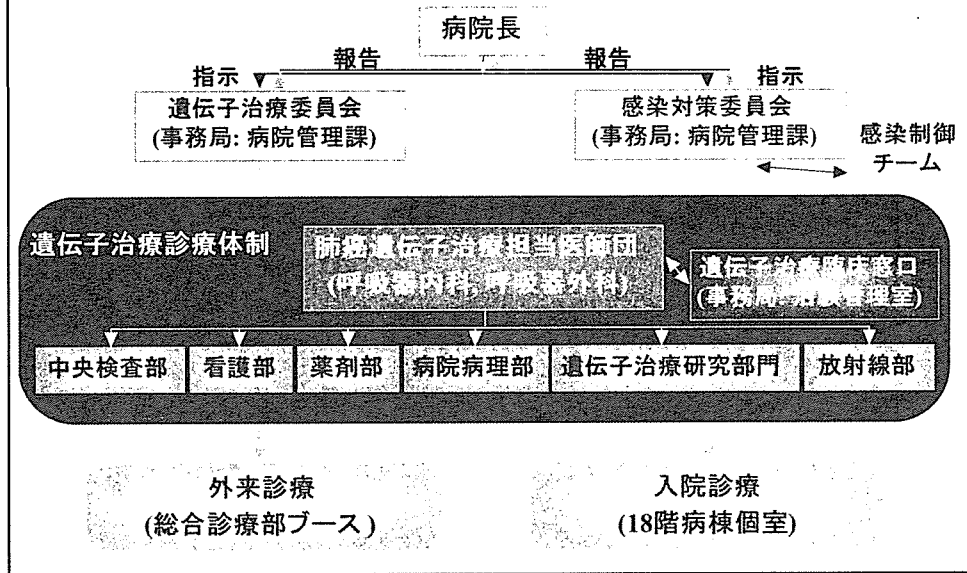
わが国の遺伝子治療プロトコール (1)

実施承認年	実施施設/企業名	対象疾患	導入遺伝子	ベクターの種類/導入方法	実施症例数(予定症例数)	治験	
1995	北海道大学医学部付属病院	アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症[免疫不全症]	ADA	レトロウイルスベクター/ ex vivo(患者T細胞)	1 [終了]	—	
1997	ミドリ十字	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症	HIV env/rev	レトロウイルスベクター/ in vivo(患者腎がん細胞)	0(4) [開始前に終了]	○	
1998	東京大学医学研究所付属病院	腎がん	顆粒球マクロファージ刺激因子(GM-CSF)	レトロウイルスベクター/ ex vivo(患者腎がん細胞)	4(4)	—	
	岡山大学医学部付属病院/PRPジェンセル	非小細胞肺癌	正常型p53	アデノウイルスベクター/ in vivo (がん組織局所投与)	9 [終了]	(15)	○
	東京医科大学病院/PRPジェンセル				3		○
	東北大学医学部付属病院/PRPジェンセル				2		○
	東京慈恵会医科大学付属病院/PRPジェンセル				1 [終了]		○
2000	名古屋大学医学部付属病院	悪性グリオーマ	インターフェロンβ	正電荷リポソーム/ in vivo (がん組織局所投与)	5(25)	—	
	癌研究会付属病院/同 癌化学療法センター	乳がん[大量化学療法施行時の骨髄抑制防止]	多剤耐性遺伝子MDR1	レトロウイルスベクター/ ex vivo (患者造血幹細胞)	3(10)	—	
	千葉大学医学部付属病院/PRPジェンセル	進行食道がん	正常型p53		10(10) [終了]	○	
	岡山大学医学部付属病院	前立腺がん	ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)	アデノウイルスベクター/ in vivo(がん組織局所投与)	6(12)	—	

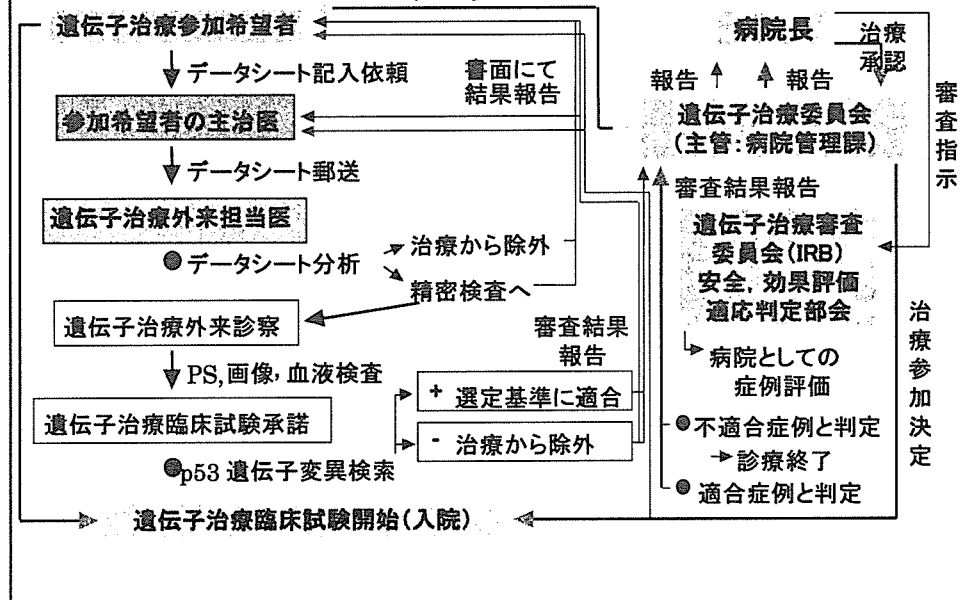
わが国の遺伝子治療プロトコール (2)

実施承認年	実施施設/企業名	対象疾患	導入遺伝子	ベクターの種類/導入方法	実施症例数(予定症例数)	治験
2001	大阪大学医学部付属病院	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー病	肝細胞増殖因子(HGF)	プラスミドベクター/ in vivo (大腿部筋肉内投与)	22(22)	—
2002	筑波大学医学部付属病院	再発性白血病[移植片対宿主病(GVHD)の重症化防止]	HSV-TK/低親和性神経成長因子受容体膜貫通領域及び細胞外領域	レトロウイルスベクター/ ex vivo (ドナー末梢血単核球)	1(10)	—
	東京大学医学研究所付属病院	神経芽腫	インターロイキン-2/リンフォタクチン	アデノウイルスベクター/ ex vivo (患者神経芽腫細胞)	0(6) [終了]	—
	北海道大学医学部付属病院	ADA欠損症	ADA	レトロウイルスベクター/ ex vivo (患者造血幹細胞)	2(4)	—
	東北大学医学部付属病院	X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)	サイトカイン共通受容体γc鎖	レトロウイルスベクター/ ex vivo (患者造血幹細胞)	未実施(5) [自主的に保留中]	—
2003	神戸大学医学部付属病院	前立腺がん	HSV-TK	アデノウイルスベクター/ in vivo(がん組織局所投与)	5(6)	—
	信州大学医学部付属病院	悪性黒色腫	インターフェロンβ	正電荷リポソーム/ in vivo (がん組織局所投与)	3(5)	—
	アンジェスMG	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー病	HGF	プラスミドベクター/ in vivo (大腿部筋肉内投与)	実施中(約100) 実施中(15)	○ ○
2006	九州大病院	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー病	線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)	センダイウイルスベクター/ in vivo (大腿部筋肉内投与)	0(12)	—

東京慈恵会医科大学における肺癌遺伝子治療の診療体制



遺伝子治療候補症例診療フローチャート



難治性先天異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究

分担研究者 島田 隆 日本医科大学教授

研究要旨

Arylsulfatase A (ASA) 欠損症である異染性白質ジストロフィー (MLD) をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。レンチウイルスベクターにより ASA 遺伝子を導入した神経幹細胞を ASA 欠損マウスの脳内に移植し ASA の発現とスルファチドの減少を確認した。AAV ベクターを脳内海馬領域に直接注入し、長期に渡る ASA の広範囲の分布と、脳全体でのスルファチドの減少を確認した。運動機能の改善にも有効であった。これらの方法は今後難治性の神経変性疾患を治療するための重要な選択肢になると考えられる。

研究協力者

久安早苗 (日本医科大学助手)
川畑建 (日本医科大学大学院生)
倉井年幸 (日本医科大学大学院生)

A. 研究目的

異染性白質ジストロフィー (MLD: Metachromatic leukodystrophy) はライソゾーム酵素 Arylsulfatase A (ASA) の遺伝的欠損により、全身の臓器、特に神経組織、にスルファチドが蓄積し、広範囲の脱髄が進行する重篤な遺伝性神経変性疾患である。有効な治療法がないことから、遺伝子治療や細胞治療などの先端技術を応用した新しい治療法の開発が待たれている。本研究では、神経幹細胞をキャリアーとする細胞遺伝子治療と AAV ベクターの直接投与による遺伝子治療の可能性を、MLD モデルマウスを使って検証したものである。

B. 研究方法

安全なレンチウイルスベクターにより ASA 遺伝子を導入したマウス胎児由来神経幹細胞をモデルマウス脳内に移植し、その後の経過を分子生物学的及び組織学的に検討した。

高力価 AAV ベクターを作製し、MLD モデルマウスの海馬の部分に導入し、ベクターや ASA の分布、スルファチドの減少を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は日本医科大学実験動物倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

マウス胎児から、神経幹細胞を含むニューロスフェアを調整する方法を確立した。移植された神経幹細胞は脳内に生着し、その一部はニューロンやアストロサイトに分化して、ASA を発現・分泌した。細胞移植部位ではスルファチドの減少が確認された。

AAV ベクターを海馬領域に注入すると、ASA が脳組織全体に分布することが明らかになった。これは神経細胞内で大量発現した活性型 ASA が神経軸索経路に遠隔部位にまで運ばれ (Axonal transportation)、更に一部が細胞から分泌し、周囲細胞に取り込まれた (Cross correction) ことによると考えられる。ASA 活性の上昇に伴い蓄積していたスルファチドも著明に減少し、治療後 7 ヶ月ではほぼ正常値に回復していた。又、ロタロッドテストにより運動機能の改善も確認された。

D. 考察

神経幹細胞移植による遺伝性神経変性疾患の治療の可能性を示した。移植された幹細胞の一部は神経系細胞に分化したが、多くは同定不能の細胞として脳内に存在した。これらの細胞は移植が 1 ヶ月は存在が確認されたが、2 ヶ月後には消失していた。神

経幹細胞を長期に生存させることが課題であると考えられた。

ベクターを脳内に注入する直接遺伝子治療は最も現実性の高い治療法であるが、脳内に広く分布させる方法が課題である。今回標的とした海馬は神経線維を介して反対側の神経終末でも高率に遺伝子を発現できることが明らかになった。更にASAは細胞から分泌されるため、注入部位から離れた小脳でもASA活性が確認された。細胞間隙や脳室経由に遠隔に移送されたと考えられた。これらの結果はヒト脳においても少ない注入部位や回数で広範囲の治療効果が得られる可能性を示唆している。

E. 結論

遺伝性神経変性疾患の治療法として、神経幹細胞の移植及びウイルスベクターの直接脳内投与の可能性が示された。臨床応用を目指し、現在、カニクイザルを使った前臨床研究を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurai, T., Hisayasu, S., Kitagawa, R., et al., AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase A efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 15: 38-43, 2007
2. Yasuda, T., Miyachi, S., Kitagawa, R., et al., Neuronal specificity of α -synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience* 144:743-745, 2007
3. Kitagawa, R., Miyachi, S., Hanawa, H., et al., Differential Characteristics of HIV-based vs. SIV-based lentiviral vector systems: gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neuroscience Res.* In press
4. Miyake, K., Miyake, N., Shimada, T., Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. *J. Biotech.* In press

5. Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., et al., Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human α -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.* 51:341-52, 2006

6. Kawabata, K., Migita, M., Mochizuki, H., et al., Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res.* 1094: 13-23, 2006

2. 学会発表

- 1) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Suzuki, H., Shimada, T. A single unilateral injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in bilateral expression and widespread distribution of ASA and prevention of sulfatide storage in the whole brain of MLD model mice American Society of Gene Therapy 9th Annual Meeting (Baltimore) 2006. 6
- 2) Kurai, T., Hisayasu, S., Hirai, Y., Migita, M., Shimada, T. Co-injection of AAV1-ASA and AAV1-FGE vectors into the hippocampus results in wide spread distribution of ASA and correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (Makuhari) 2006. 9
- 3) Shimada, T. Local and systemic gene therapy for metachromatic leukodystrophy. 3rd annual world symposium of Lysosomal disease network (Orlando) 2006, 12
- 4) Kurai, T., Shimada, T. Correction of metachromatic leukodystrophy in a mouse model by AAV1 mediated co-expression of ASA and FGE. The 12th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2006. 8

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

難治性先天異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究

分担研究者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 教授

研究要旨

酵素補充を中断し、前処置を施さない条件でアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症2症例に対して血液幹／前駆細胞を標的とし、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療を実施した。その後の経過を臨床的に評価して当該治療の安全性および治療効果を検討し、その有効性が確認された。

A. 研究目的

ADA欠損症患児2例より骨髓幹／前駆細胞を採取し、基礎検討により至適化された方法により臨床試験グレードのレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った後、遺伝子導入細胞を患児体内に輸注する血液幹細胞遺伝子治療を行った。本研究は、本治療の安全性、有効性を客観的に評価することを目的とする。本研究の実施条件として酵素補充を中断し、骨髓抑制を目的とした前処置を行わない事とした。本研究では、欧米で行われている前処置を行った方法と安全性と効果を比較する事も目的としている。

B. 研究方法

1) 倫理面への配慮

対象は ADA 欠損による重症複合免疫不全症 (SCID) の4才女児 (Pt. 1: 現在7才) と 13才男児 (Pt. 2: 現在16才) である。本臨床研究の方法、意義、安全性、危険性について、第3者の立ち会いのもと両親 (Pt. 2 においては本人にも) に対する十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得た。

2) 遺伝子導入方法

骨髓採取に先立ち、PEG-ADAの投与を中断し、生体内の残存するADAが十分に減少した時点で全身麻酔下に骨髓を採取した。全骨髓液からISOLEX 300™を用いてCD34陽性細胞分画を採取した。前刺激として、サイトカイン (SCF, TPO, flt3-ligand, IL-6, soluble IL-6 receptor) 存在下に2日間培養後、遺伝子導入はフィブロネクチン断片CH296 (レトロネクチン™) 存在下に1日1回、3日間行なった。初日のみ細胞の混入前にレトロウイルスベクターPG13/GcsapM-ADAをバッグ内にプレロードした。以降はウイルス液と上述した無血清培地の1:1混合培地にて培養した。全培養期間6日間の後、細胞を回収、洗浄し、生理食塩水の浮遊液として患児の末梢静脈より輸注した。

3) 評価方法

①安全性の評価

遺伝子導入細胞における安全性: 一般細菌検査、マイコプラズマ感染の有無、エンドトキシン定量、逆転写活性。

患児のモニタリング: 一般血液検査、生化学検査、

細菌学的検査、免疫学的検査、フローサイトメトリー解析によるクロナリティー検索。増殖能獲得野生型ウイルス(RCR)の出現のモニタリング。導入遺伝子陽性リンパ球の増加後には遺伝子挿入部位の解析。

②有効性の評価

遺伝子導入細胞の解析:導入遺伝子の検索、ADA活性測定による機能評価、前駆細胞のコロニー形成能の評価。マイトジェン刺激に対する増殖反応。

患児のモニタリング:一般血液検査、生化学検査。免疫学的検査。血漿中ADA値および赤血球中代謝毒性産物(dAXP)濃度の測定。成長発達の評価。

C. 研究結果

1) 臨床経過

両患児ともにPEG-ADAの最終投与から5週間後に遺伝子導入細胞の輸注を行った(Pt. 1: 2003年12月22日、Pt. 2: 2004年2月2日)。PEG-ADA中断後3週目頃よりリンパ球数が著減し、好中球数の低下も観察された。4週目頃から肝機能障害を反映して血中トランスアミナーゼ値(AST, ALT)が上昇し、軽度の嘔気、食欲不振、活動性の低下がみられた。遺伝子導入細胞輸注後からAST, ALT値は改善し、患児1においては細胞輸注後6週で、患児2においては10週でそれぞれ正常化した。肝機能の改善に伴い上記臨床症状も軽快した。個室管理下にて重症感染症の罹患なく、細胞輸注から約6ヶ月後に退院し、現在(Pt. 1で3年2ヶ月、Pt. 2で約3年)まで両患児ともPEG-ADA非投与下で良好な健康状態を維持している。

2) 遺伝子導入

両患児ともに全身麻酔下に約15 ml/kgの骨髓血を採取し、骨髓採取に伴う副反応はみられなかった。計画通りの操作を行い、それぞ

れ $1.2 \times 10^6/\text{kg}$, $5.7 \times 10^5/\text{kg}$ のCD34陽性細胞が得られた。培養および遺伝子導入操作はバッグを用いた閉鎖系で行い、細胞は良好な生細胞率を保ち、それぞれ $1.4 \times 10^6/\text{kg}$, $9.2 \times 10^5/\text{kg}$ のCD34陽性細胞の輸注が可能であった。両者ともにコロニー解析と定量PCR法の評価で40-50%の良好な導入効率が得られた。導入細胞におけるADA活性はPt. 1では遺伝子導入前 1.9 U、導入後318.2 U、Pt. 2ではそれぞれ1.4 U、299.4 U(正常者は90.1-162.5U)と正常者以上の値を示しており、ADA機能蛋白の発現が確認された。

3) 患者のモニタリング

両患児ともにADA欠損による代謝毒性の顕性化と考えられる肝機能異常を認めたが(前述)、遺伝子導入細胞輸注後に改善した。血液検査では、両患児ともにPEG-ADA中断後の急激なリンパ球数の減少に引き続き、緩徐なリンパ球数の増加を認めたが、細胞輸注後20週頃から安定し始め、Pt. 1では200-400/ μl 、Pt. 2では400-600/ μl で経過している。増加の主体はTリンパ球であり、BおよびNK細胞の増多は極めて緩徐である。現在までに特定のTリンパ球サブセットのクローナルな増殖を認めていない。好中球数は最低500/ μl 程度にまで減少したが、Pt. 1では1000-2000/ μl 、Pt. 2では1000-1500/ μl で経過しており、異常増殖はみられていない。

免疫グロブリン値は低値のままであり、検査値を見ながら免疫置換療法を継続しているが、Pt. 2においては徐々に投与間隔が開いてきており(10-12週間隔)、抗体産生能の改善が示唆される。骨髓採取および採血手技に伴い軽度の貧血を認めたが改善し、血小板数は正常のまま経過している。その他、腎機能、電解質等にも異常を認めていない。

Duke大学に依頼し、赤血球中 %dAXP 値を測定したところ、PEG-ADA中断後1週めから代謝毒性産物の蓄積を反映して急激な上昇が観察されたが、遺伝子導入細胞輸注後2-3週から漸減に転じ、現在はPt. 1 では約10%、Pt. 2では約15% で安定しており、HLAハプロ一致の骨髄移植成功例と同等の値で経過していることが確認された。

導入遺伝子の検索では、治療後6ヶ月でリンパ球にごく低頻度で導入遺伝子が検出される程度であったが、Pt. 1では10ヶ月の時点で導入遺伝子コピー数の明らかな増加が観察されており、好中球においても同様の傾向がみられている。これに一致してPt. 1の末梢血単核球中のADA活性も10ヶ月でキャリアである両親と同等の値まで改善していた。

遺伝子導入部位の検索から見た血液細胞のクロナリティー解析(LAM-PCR;タカラバイオとの共同研究)は、これまで治療後の経時的4点においてで行っている。患者1において、いくつかの有意なクローンの存在が治療後一年半頃から示唆され、その導入部位の解析を行った。その結果、癌遺伝子等のリスクのある遺伝子は挿入近傍には認めなかった。また、患者2では有意なクローンの存在は否定的である。また、T細胞表面マーカー解析や、T細胞レセプター解析でも有意なクローンは両患児において認めていない。成長に関しては両患児とも正常な発達を示しており、通常の学校生活を支障なく過ごしている。

治療後にPt. 1は水痘に罹患、Pt. 2では帯状疱疹を発症したため、水痘に対するリンパ球芽球化反応を東海大学加藤先生に依頼して実施した所、Pt. 2では反応は認めなかったが、Pt. 1では有意の反応をみとめ、抗原特異的な免疫能の獲得が示唆された。

D. 考察

治療に先立つPEG-ADAの中断により次の点が明らかになった。まず、PEG-ADA中断に伴う血漿ADA値および赤血球中 dAXP値の動向である。両患児ともに中断前には正常人血漿ADA値をはるかに越える値を維持していたが、中断後急速に値は減少し、最終投与から5週目に最低値となり現在までの観察期間中ほぼその値が維持されている。今回の臨床研究においてはこの5週目の時点で遺伝子導入細胞が輸注されたが、これより早期での遺伝子導入操作では、酵素中断により期待される治療効果の増強が損なわれ、またこれより遅い導入スケジュールでは患児の免疫能、体力の低下による骨髄採取に伴うリスクの増加が懸念される。今後さらに検討の余地はあるものの、PEG-ADA 中断から遺伝子導入陽性細胞輸注までを5週間とする日程は術前術後のトラブルもなく2例とも安全に施行することができ、妥当であると考えられた。

次に、PEG-ADA中断によってADA欠損に起因する血液、免疫系以外の症状が顕性化したことである。全身へのアデノシン関連代謝毒性産物dAXPの蓄積を反映して、肝機能障害、食欲不振、嘔気、活動力低下が両患児に共通して観察され、体重も減少した。しかし、遺伝子導入細胞輸注後にdAXPレベルは低下し、肝機能および上記症状ともに改善したため、特別な治療は不要であった。通常、年長児においてのADA欠損症の無治療での症状を観察する機会のごく稀であるため、今回の結果はADA欠損症が全身性代謝性疾患である事実を年長児において示したという点で意義があると同時に、その治療においては血液、免疫系の再建のみならず全身における代謝毒性の改善をも目標とする必要性を再認識させるも

のである。

遺伝子導入手技についてはバッグを用いた閉鎖系を用いることで無菌操作を確実に行うことが可能であった。ISOLEX™によるCD34陽性細胞分離、無血清培地、IL-6, soluble IL-6 receptorを含んだ特長あるサイトカインカクテルの使用、バッグへのレトロネクチン™コート、ウイルス上清によるバッグのプレロード等、基礎検討により至適化された方法を用いることによって、前駆細胞での検討で50-70%の高効率の遺伝子導入が可能であった。さらには輸注細胞サンプル中でADA活性の正常化が観察され、遺伝子導入による患児骨髄細胞の機能的修復も確認された。

治療後約3年の時点での臨床効果については、次のように評価される。

1) 通常の生活を送るに十分な免疫能の維持をほぼ完全にPEG-ADAに依存していた両患児において、およそ3年間その投与をせずに問題なく経過していることの意義は大きいと考えられる。幹細胞への遺伝子導入についてはまだ確実ではないものの、少なくとも多分化能を有し、ある程度の寿命を持った前駆細胞への遺伝子導入、その細胞の骨髄への生着、および導入遺伝子の継続的発現が本研究において達成されていると考えられる。

2) 本研究においては、リンパ球数の増加は酵素補充を中断/未使用でbuslfanによる前処置を行ったにイタリアの遺伝子治療例に比較して緩慢であり、またBおよびNK細胞数の増多も極めて緩徐である。このことが両者の臨床経過の差に影響しているものと考えられた。臨床効果の面からは前処置の施行がより早期の免疫能の再建には必要に思えるが、本研究においても今後の免疫能再建は十分に期待でき、またイタリアの症例では化学療法による晩期障

害の発現等の懸念もあることから、より長期に渡り経過をみることでより効果的かつ安全性の高い治療法の確立を目指す必要があると考えられる。英国、米国も何らかの骨髄抑制前処置を行った同様の血液幹細胞遺伝子治療を報告しているが、特殊なケースとは言え、米国の症例では前処置によって骨髄不全をきたし、結局血液幹細胞移植を実施した症例も報告され、安全性を重視した場合、前処置の必要性の有無を改めて検討する必要があると考えられる。

E. 結論

1. PEG-ADA中断に伴い、リンパ球減少等の免疫能の低下のみならず肝機能障害、食欲不振などADA欠損に起因する症状が顕性化した。
2. 上記症状は遺伝子導入細胞輸注後に改善し大きな問題とならず、今回の臨床研究においては、酵素補充の中断、骨髄採取から細胞輸注までの一連の手技を比較的安全に行うことが可能であった。
3. 遺伝子導入細胞の解析から、遺伝子導入操作は無菌的に行われ、少なくとも血液前駆細胞のレベルで高い導入効率と機能修復が可能であったことが示された。
4. 患児は、造血細胞より供給されるADAによりADA欠損に起因する毒性代謝産物レベルが低下し、PEG-ADA非投与下に日常生活が可能となった。
5. Tリンパ球は緩徐に増加し、導入遺伝子陽性細胞の割合、末梢血単核球中ADA活性も増加傾向にあり、また好中球にも導入遺伝子の検出が可能となったことから、多分化能を有する造血細胞への遺伝子導入と骨髄への生着が強く示唆された。
6. 観察期間中、重篤な有害事象は観察され