

表2

移植結果

移植前状態, ドナー細胞, 前処置

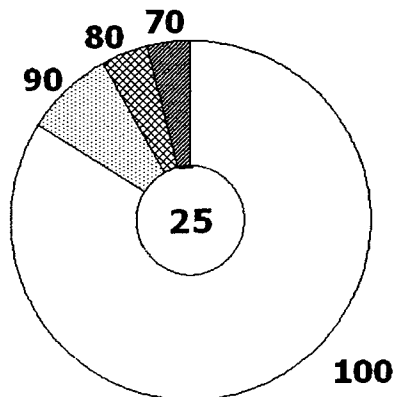
○: Alive (□: DLI), ●: Died, ◇: Radiation, ★: ATG or ALG, Inner number: age at transplant

| Donor | BU+CY (12) | | | CY+FLU (14) | | | | | |
|----------|------------------|-------|-------------|------------------------------|--|-------|---|---|--|
| | Group 1 | 2 | 3 | 1 | | | 2 | 3 | |
| MSD | ○(3) ◇(10) □(14) | | ○(12) ●(11) | ○(26) ◇(27) □(6) ◇(20) ◇(21) | | ○(15) | | | |
| MUD | ○(4) | | ○(4) | ○(3) ◇(4) ◇(13) | | ○(10) | | | |
| Mismatch | ○(14) ●(4) | ○(16) | | | | ○(28) | | | |
| PBSC | ●(5)★ | | | ○(18) | | | | | |
| CBSC | ●(5)★ | | | ◇(20) | | | | | |

図6

現在の患者状態

Performance status (Karnofsky)



慢性GVHD

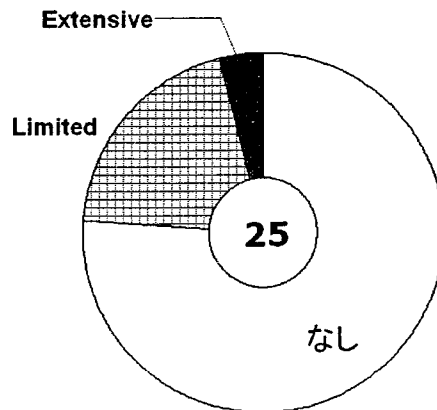


表3

CGD移植ガイドライン案

| | |
|---------|--|
| Donor | Bone Marrow 1st: Matched sibling donor (MSD) 2nd: Matched unrelated donor (MUD) |
| Regimen | CY: 25mg/kg x 4days Flu: 25mg/m ² x 5days TBI: 3Gy ±ATG MSD: ATGを除いてもよい MUD: +ATG±LPAM 70mg/m ² x 1day (40mg/m ² x 2days) |
| DLI | 30日ごとにキメリズムを測定し, 60%以下であればDLIを考慮する. 3ヶ月以降はなるべく早く免疫抑制剤を中止し, DLIを行う |

表4

遺伝子治療対象の選択基準(案)

1. 難治性感染症・炎症や臓器障害があり, この1-2年で骨髄移植が必要と考えられる
 - (a) アスペルギルス感染症
 - (b) ステロイド依存性感染(腸炎, 肺炎)
 - (c) 進行性臓器障害(肺または腎障害)
2. HLA一致ドナーがない(ただし臍帯血を除く)
3. 臓器障害などのために, 移植の適応が危ぶまれる
4. 造血幹細胞移植を実施したが, 持続した効果が得られなかった

1の状態にあり, さらに2~4のいずれかの項目に該当する症例について, 成育医療センターで評価を行う. そのうち遺伝子治療の適応があるか否かを検討する外部委員会会議を開き, 決定する.

研究要旨：ADA 欠損症 2 症例に対する血液幹細胞遺伝子治療の実施から約 4 年が経過している。症例 1 は 2006 年 4 月から小学校へ入学し、大きなトラブルもなく通学している。症例 2 は現在高校生になっており、制限のない学校生活が可能である。両者とも ADA 酵素補充は中断している。まだ、リンパ球数の増加が不十分であり、γグロブリンの補充が必要な状況ではあるが 1 例では補充間隔の延長が可能になってきている。遺伝子治療に関する大きな副作用もなく、一部の特異免疫の再構築も確認されている。

A. 研究目的

原発性免疫不全症に対する血液幹細胞遺伝子治療は、多くの遺伝子治療臨床研究の中において数少ない治癒効果を示す報告として、社会に大きなインパクトを与えてきた。実際、X-連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) と、ADA 欠損症による重症複合免疫不全症 (ADA (-) SCID) では、遺伝子治療によって治癒効果を示す症例が数多く示されてきている。しかし、一方では X-SCID の治療において、ベクターの染色体挿入に起因すると思われる白血病様副作用が報告され、長期にわたる安全性の確認の重要性と、安全なベクター開発の必要性などが再認識されている。

一方、当初の ADA (-) SCID に対する血液幹細胞遺伝子治療では、安全性のために ADA 酵素補充療法下で実施され、有意な臨床効果を示さなかった。イタリアのグループはこれらを配慮して ADA (-) SCID の治療に際し、ADA 酵素を中断してさらに骨髄抑制化学療法を加えた前処置下で血液幹細胞遺伝子治療を実施し、治癒効果を得たことを報告した。これを契機に ADA (-) SCID に対する血液幹細胞遺伝子治療の主流は酵素補充の中断とさらに骨髄抑制化学療法による前処置を前提としたものになっている。我々は、安全性を第一に考え、酵素補充は中断するが骨髄抑制化学療法をしない状況下で 2 例の ADA (-) SCID 患者に血液幹細胞遺伝子治療を実施し、現在治療後約 4 年を経過している。本研究の目的は、本疾患に対する血液幹細胞遺伝子治療において骨髄抑制化学療法による前処置が本当に必要かどうか、また、ベクター挿入に関わる副作用が起こらないか、長期的な観点から治療効果と安全性を評価する事にある。

B. 研究方法

血液幹細胞遺伝子治療を実施した 2 例

の ADA (-) SCID を対象とした。

症例 1 は実施時 4 歳の女児で、3 ヶ月より ADA 酵素補充療法を開始していたが、重症型で酵素に対する反応が十分ではなく、末梢血中のリンパ球は酵素補充療法下においても 100/uI 前後を推移していた (Blood, 97: 2896, 2001)。

症例 2 は実施時 1 3 歳の男児である。この症例は 1 歳から ADA 酵素補充を開始され、1995-97 年にかけて酵素補充継続下で LASN レトロウイルスベクターを用いて末梢血 T 細胞を標的とした遺伝子治療を受けていた (Blood, 91: 30, 1998)。

血液幹細胞遺伝子治療は、あらかじめ治療の 4-5 週前から酵素補充を中断し、その後骨髄血を採取し、CD34 陽性細胞を分離して遺伝子導入標的細胞として行った。CD34 陽性細胞はサイトカインカクテル (SCF, TPO, FL, IL-6, IL-6sR) 存在下で培養し、レトロネクチン共存下にて GCsapM-ADA/PG13 レトロウイルスベクターにて遺伝子導入した。遺伝子導入効率は 40-50% であり、正常骨髄細胞の約 3 倍の ADA 酵素活性を示した CD34 陽性細胞をそれぞれの患者の静脈内へ点滴投与した。投与細胞数は、それぞれ 1.38×10^6 /kg, 0.92×10^6 /kg であった。

治療後、臨床症状、一般臨床検査ならびに免疫学的諸検査を継続的におこない、またベクターの挿入変異に関連する重大な副作用の監視を長期間にわたり実施して、血液幹細胞遺伝子治療の臨床効果と安全性を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（文部科学省、厚生労働省）に準じて作成、申請し、学内及び上記の両省で承認されたものである。経過中、他のグループによる X-SCID に対する遺伝子治療臨床研究にて重大な副作用が報告された

が、それに対する倫理的な配慮も申請書に逐一追加改訂している。また、カルタヘナ申請も（第一種使用規程；大臣承認）行い、承認されている（05-36V-0001）。

C. 研究結果

両者とも酵素補充の中断後、いわゆるADA欠損に伴う全身症状（食欲不振、全身倦怠、体重減少）を示し、検査上も白血球著減、肝酵素の上昇、ADA関連毒性代謝産物の上昇などを呈した。治療後は、酵素補充無し状態で、臨床症状、検査所見も改善を示した。末梢血のリンパ球数は漸増を示したが、正常数にはまだ達していない。特にB細胞の改善は緩慢であり、血清免疫グロブリンの値は低く、定期的なガンマグロブリンの補充を必要としている（症例2では補充間隔の延長が可能となっている。）。しかし、リンパ球中のADA酵素活性は保因者のレベルを維持し、リンパ球機能では、マイトジェンに対する反応を有意に認めた。症例1は治療後に水痘に罹患、症例2も治療後に帯状疱疹を発症したが、両者とも重症化する事なく経過した。水痘や、アロ抗原に対する反応も確認できている。

レトロウイルスベクターの挿入部位に起因する重大な副作用報告が他の疾患の血液幹細胞遺伝子治療で報告されているが、本治療を受けたいずれの患者においてもベクターが危険な部位に挿入されているリンパ球の優位なクローンは検出されていない。また、T細胞レセプターのレポーター解析でも優位なクローンの増殖は認めていない。

E. 結論

治療後約4年経過した時点において、両患者とも酵素補充無しで制限のない学校生活が可能状況である。末梢血リンパ球数がまだ不十分であり、ガンマグロブリンの補充、感染予防の抗菌薬内服は継続しているが、我々の実施したADA酵素を中断し、骨髄抑制化学療法を実施しない条件でのADA(-)SCIDに対する血液幹細胞遺伝子治療は、安全で一定の臨床効果が期待できる方法と考えられた。今後も長期的な治療評価の継続が必要であるが、現在主流となっている骨髄抑制化学療法を加えた前処置が本治療に必須であるかどうかを再検討する必要がある。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato T, Kobayashi R, Toita N, Kaneda M,

Hatano N, Iguchi A, Kawamura N, Ariga T: Stem cell transplantation in primary immunodeficiency disease patients. *Pediatr Int.* 49:795-800, 2007

2) Kobayashi R, Kaneda M, Sato T, Suzuki D, Ichikawa M, Ariga T. Evaluation of risk factors for invasive fungal infection after allogeneic stem cell transplantation in pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29:786-91. 2007

3) Toita N, Hatano N, Ono S, Yamada M, Kobayashi R, Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Satoh A, Nakagawa A, Ohshima K, Shindoh M, Takami T, Kobayashi K, Ariga T. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma in a patient with DNA ligase IV (LIG4) syndrome. *Am J Med Genet Part A* 143A:742-745, 2007

4) 有賀 正：神経疾患に対する遺伝子治療の可能性-現状と問題点-。発達障害研究、29、36-39、2007

5) 有賀 正。原発性免疫不全症に対する遺伝子治療について。北海道日独協会会報。24、46-50、2007

6) 有賀 正：原発性免疫不全症とリバージョン；適応の破綻とその修復のモデルとして。J Adaptation Med (適応医学)、11、27-33、2007

2. 学会発表

1) Ariga T: International Symposium: Gene Therapy Clinical Trials from Around the Globe, Hematopoietic stem cell gene therapy for two patients with Adenosine Deaminase (ADA) deficiency without myeloablative conditioning; a suggestion for the optimal protocol for HSC gene therapy for ADA deficiency. The 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Seattle, USA, May 30-June 3, 2007

2) Ariga T: Hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy for two patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency without cytoreductive conditioning; a suggestion for the optimal protocol for HSC gene therapy for ADA deficiency. Symposium VI Immune deficiency syndromes. The IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy. Halkidiki, Thessaloniki, Greece, September 13-17, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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

分担研究者 藤本 純一郎 国立成育医療センター研究所 副所長

研究要旨

慢性肉芽腫症の根治療法として、遺伝子治療に使用する予定の SF71gp91 ベクターを用いて前臨床研究、及び臨床研究計画書を作成していたところ、ドイツから有害事象が報告された。本ベクターは既にドイツ、スイス、イギリスの3カ国の6人に使用されており、その内2人から7番染色体モノソミーを伴った骨髄異形成症が発症した。開発者のドイツ国フランクフルト大学の Grez 博士から詳細な臨床的、遺伝子・細胞学的検討のデータを得、SF71gp91 ベクターと密接な関係が判明したため、厚生労働省に「健康危険情報」として報告した。また、本研究では、SF71gp91 ベクターは使用しないことを決めた。

研究協力者

Manuel Grez：ドイツ・フランクフルト大学・教授

Marion Ott：ドイツ・フランクフルト大学・医師

Reinhart Seger：スイス・チューリッヒ大学小児病院・教授

Adrian Thrasher：英国国立小児病院・教授

布井博幸：宮崎大学医学部小児科・教授

小野寺雅史：筑波大学大学院・講師

大津真：東京大学医科学研究所・助手

掛江直子：国立成育医療センター研究所・室長

岡田真由美：国立成育医療センター遺伝診療科・レジデント

療を実施した、ドイツ国フランクフルト大学病院 Marion Ott 博士、スイス国チューリッヒ大学小児病院 Reinhart Seger 教授、英国小児病院 Adrian Thrasher 教授を訪問し、医学論文に記載されていない臨床情報、遺伝子・分子・細胞学的情報を収集し、検討・分析した。

C. 研究成果（資料1）

有害事象発症は6名中ドイツの26歳（P1）および25歳（P2）の2名である。情報が入った時点で厚生労働省に報告（資料1-1）に示す。Grez 博士からの詳細な臨床経過、遺伝子分子・細胞学的分析の報告書を手に入れているが、まだ正式な学術報告書が印刷される前のため confidential 扱いであるため、内容を以下に記載し、カバーレターを資料1-2とした。以下に概略を示す。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症は、先天性免疫不全症の中で、最も患者数の多い疾患である。また、その3分の2以上がX染色体連鎖型の重症型で、致死率が高い。根治療法として造血幹細胞移植があるが、ドナーが限られていることから、自家の幹細胞を用いる遺伝子治療が有望である。ドイツで骨髄非破壊的前処置を行って実施した遺伝子治療臨床研究で用いた SF71gp91 ベクターを用いて、開発者の Grez 博士と挙動研究を行ってきたが、有害事象が報告された。ベクターと有害事象の関係の詳細を調査することを目的とした。

B. 研究方法

ベクターの開発者 Manuel Grez 博士、現在まで SF71gp91 ベクターを使用して遺伝子治

1) 臨床経過と診断

P1 は、遺伝子導入細胞移植後 50 日で重症肝膿瘍が治癒した後一年半は良好で安定し、抗菌薬及び抗真菌薬の使用もなかった。18 病月の定期検査で汎血球減少が見られた他、異常は指摘されていない。462 病日の骨髄生検で 70% の骨髄低形成が見られ、547 病日では 20% の低形成に進行したが、異形成や芽球は陰性であった。その後 G-CSF 治療を受けている。729 病日に歯科治療を受けた後、顎骨膿瘍から敗血症、多臓器不全に進展し 820 病日に死亡した。病理所見、免疫組織学的検査で血球貪食像、敗血症性ショック像であった。

P2 も、遺伝子治療後重症感染症が軽快し、2年以上臨床上、検査上にも異常は認められなかった。28 病月で軽度の汎血球減少が見られたが、G-CSF 治療は必要としなかった。777

病日まで骨髄生検も正常であった。982 病日の骨髄で軽度 (70%) の低形成が見られたが、異常細胞を認めない。1240 病日の定期検査における骨髄生検で高度の低形成、赤血球系過形成、芽球 5%以下の多系統の異形成が見られ、WHO 分類の **Refractory anemia with multilineage dysplasia=RCMD** と診断した。

2) 遺伝子発現と機能活性

P1, P2 ともに CD15+細胞の遺伝子導入効率は高く安定し、両者とも **gene marking** は 40% から 60%の間の高レベルであった。しかし、半年以上経過した時点から次第に活性酸素生成は低下し始め、P1 は 26 病月、P2 は 35 病月に急激に 5%以下に低下した。一部は LTR のプロモーター部分のメチル化が高度に起こり、サイレンシングを起こした。

3) 遺伝子導入細胞のクローン分布

P1, P2 とも末梢血では遺伝子導入細胞の高度な多クローン性を認めた。しかし、P1 では 157 病日に MDS1/EVI1 遺伝子座にレトロウイルスが組み込まれたクローンが優位性を占め、その後優位なクローンは変動したが、820 病日では 70-80%を占めた。

一方 P2 では単一クローンの優位性は見られず、いくつかの優位クローンが入れ代わった。第 1 クローンは 343 病日の 13%から 1240 病日の 55%に増加した。第 2 クローンは 18%から 1134 病日に 30%まで増加したがその後減少した。982 病日のコロニー形成細胞 113 の解析で、80.5%が gp91phox 陽性で、その 44%が第 1 の組み込みで、15%が第 2 の組み込みであった。その後もクローンの優位性は変動を続けた。

4) クローン優位性と 7 番染色体モノソミー

P1 におこったクローンの徐々な置換を SNP アレイを用いた染色体コピー数変動分析 (CNV) を後方視的に実施した。0 病日と 416 病日では大きな CNV は見られず、381 病日の染色体核形と I-FISH 分析でも異常は認めない。しかし 646 病日で 7 番染色体 1 本のみの細胞が SNP アレイ法で検出され、その頻度は 820 病日 80%に増加した。この時点のクローン優位性を比較すると関連性が示唆される。

P2 は、777 病日まで I-FISH 分析では末梢血でも骨髄でも異常を認めなかったが、982 病日に I-FISH 法と中期染色体分析により骨髄単核球の 25%~50%の頻度でモノソミー 7 が検出され、1240 病日でも同様であった。骨髄の

単一コロニー形成細胞分析では、モノソミー 7 と優位クローンと関連している。

以上の結果から、モノソミー 7 が生じる細胞は、MDS1/EVI1 がレトロウイルス挿入により転写活性化された骨髄系前駆細胞に限定される

従って、SF71gp91 ベクターが挿入変異を起し、骨髄異形成症候群を発症した可能性が非常に高い。

D. 考 察

レトロウイルスベクターは、遺伝子がランダムに挿入されるが、時に挿入変異を起す。これまで X 連鎖重症複合型免疫不全症において 4 例に LOM2 近傍に挿入されたクローンが増殖優位性を獲得し、白血病を発症した報告がある。SF71gp91 の骨髄異形成症発症も、これに近似した減少で、有効性が高まることとがん化の危険性が強くなることと裏腹である。遺伝子の特異的部位への挿入技術がない現在、SIN ベクターなどの早急の開発が必要である。

E. 結 論

SF71gp91 ベクターは、MDS1/EVI1 近傍に挿入されたクローンが増殖優位性を獲得し、挿入変異を起こす可能性が高い。従って、本研究の臨床研究では使用しないことを決めた。

F. 健康危険情報 (資料 1)

SF71gp91 ベクター使用の遺伝子治療における「骨髄異形成症候群の発症 2 例」につき、厚生労働省に報告した。ただし、本件は等研究でまだ研究計画書を提出する前で、しかも日本国内の他の施設で使用していない、また使用計画がないため、参考としての「健康危険情報」である。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究者 岡田真由美 国立成育医療センター レジデント

研究要旨 本研究の主任研究者らは、平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業「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」において、慢性肉芽腫症(CGD)の患者のうち、重症感染症があるため根治療法である造血幹細胞移植の実施が困難な者については、移植に代わる治療法として遺伝子治療を積極的に考慮すべきという結論に達し、被験者選定基準を検討した。本研究では、日本でも CGD に対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療臨床研究を行うため、昨年度の研究成果と先行する欧州の CGD 遺伝子治療臨床研究を元に、実施計画書を作成した。モデルとしたドイツの臨床研究で有害事象の発生が確認されたため、その詳細について調査するため、ベクターの開発者 Grez 博士と担当医の Ott 博士と協議した。その結果、ドイツの有害事象は、レトロウイルスベクターのがん遺伝子近傍へのゲノムの挿入に起因する染色体異常に深く関与すると考えられた。日本でもドイツと同じベクターを使用する予定であったため、レトロウイルスベクターの変更が必要となった。レトロウイルスベクター変更の可能性について、これまで重大な有害事象が起こっていない米国立衛生研究所(NIH)の Malech 博士と協議した結果、NIH との国際多施設共同臨床研究を提案された。現在その準備を行っている。

A. 研究目的

X連鎖慢性肉芽腫症に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実施計画書および臨床研究の参加候補者に対する説明書類（同意書を含む）を作成し、わが国の難治性小児先天異常症に対する遺伝子治療実施体制の基盤を確立する。

B. 研究方法

1) ドイツの Manuel Grez 博士の開発したレトロウイルスベクター-SF71gp91 を、EUFETS 社（ドイツ）より購入し、遺伝子導入、マウスへの移植実験などの前臨床試験を行う。GMP グレードの SF71gp91 ベクターは、欧州での X 連鎖

慢性肉芽腫症（X-CGD）に対する遺伝子治療臨床研究に使用され、長期にわたり有効性が確認されたものである。

2) SF71gp91 ベクターの安全性および臨床効果について調査する。

3) 遺伝子治療に必要な GCP グレードの機器、設備について調査・選定を行う。

4) 先天性免疫不全症の家族と患者の会（つばさの会）の会員と交流を持ち、臨床研究についての意見を求める。

5) 以上を踏まえ、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守し、実施計画書「慢性肉芽腫症における造血幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究」および説明文書「慢性肉芽腫症の

「遺伝子治療臨床研究」参加のしおりを作成する。

(倫理面への配慮)

本研究で作成実施計画書および説明文書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいて作成し、国立成育医療センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会で科学的および倫理的妥当性について慎重に審議される。

C. 研究結果

1) 前臨床研究において、閉鎖式ガス透過性培養バッグを用いた遺伝子導入法、安定した遺伝子導入効率などを達成し、本邦においても X-CGD に対する遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると結論した。その研究結果をもとに遺伝子治療臨床研究実施計画書、遺伝子治療臨床研究実施計画概要書、参加候補者説明文書「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究」参加のしおりを作成した。

2) 本研究で使用する予定であったレトロウイルスベクターSF71gp91 のマスターセルバンク (MCB) および安全性に関する情報の入手の過程で、Greig 博士より、先行するドイツの遺伝子治療臨床研究の被験者 2 名において、有害事象が発生したという情報を得た。

3) ドイツの有害事象について、詳細な調査をするため、Greig 博士および担当医の Ott 博士と協議を行い、以下の情報を得た。

4) ドイツの被験者の臨床経過

①症例 1 は、26 歳男性。2004 年 1 月に遺伝子治療を受けた。治療後 50 日に肝膿瘍の消失を確認している。定期検査において、485 日頃から汎血球減少症がみられ、547 日頃から骨髄の低形成がみられたが、重症感染症の罹患はなかった。729 日に顎骨膿瘍の摘出術を受けた後敗血症になり、820 日に死亡した。死亡時の骨髄細胞および剖検組織細胞には、芽球は見ら

れていない。

②症例 2 は、25 歳男性。2004 年 7 月に遺伝子治療を受けた。治療後 53 日で肺アスペルギルス症が消失した。抗生物質の予防投薬を必要としたが、2007 年春までスポーツをするほど体調は良好であった。治療後 982 日 (2007 年 3 月) 頃から末梢血の汎血球減少症が見られたが 2007 年夏に肺炎のため 3 日間入院するまでは入院を要する感染症罹患はなかった。1134 日の定期骨髄検査でモノソミー 7 (50%)、芽球 (1-3%) を検出し、骨髄異形成症候群 (MDS) の WHO 分類の RCMD (多血球系統の異形成を伴う不応性血球減少症。骨髄の芽球が 5%未満) の状態であることが判明した。遺伝子治療実施時には、HLA 適合ドナーがいなかったが、今般見つかри、2008 年 1 月に造血幹細胞移植を施行と聞いている。

5) ドイツの被験者の遺伝子導入細胞におけるベクター挿入部位の解析 (LAM-PCR)

症例 1、2 とも治療後約 6 ヶ月までは、レトロウイルスベクターのゲノムが挿入されたクローンは多数存在していた。経過とともにクローン数が減少し、特定のクローン由来の好中球が活性酸素を産生しかつ増殖優位性を持つようになった。特定のクローンは時期により変化し、挿入部位は MDS1/EVI1 遺伝子の近傍のものが多かった。症例 1 の死亡後に保存検体で、後方視的に染色体の SNP アレイと FISH 検査を行ったところ、646 日の骨髄で 7 番染色体が 1 本 (モノソミー 7) の細胞が検出された。死亡日の骨髄細胞は 80% がモノソミー 7 であった。症例 1 のモノソミー 7 検出を受けて、症例 2 でも、SNP アレイと FISH 検査を行ったところ、982 日の骨髄単核球の 25-50% がモノソミー 7 であったが、この時点では骨髄の芽球は見られていない。骨髄のコロニー形成アッセイでは、MDS1/EVI1 遺伝子近傍にレトロウイル

スのゲノムが挿入して増殖優位性を獲得したクローン由来細胞からモノソミー7 が検出され、遺伝子が導入されていない細胞ではモノソミー7 は見られていない。

6) ドイツで発生した有害事象はレトロウイルスベクターSF71gp91 による insertional mutagenesis である可能性が高いため、Grez 博士より SF71gp91 ベクターを使用しないよう要請された。

7) この時点で、X-CGD の遺伝子治療に使用できるレトロウイルスベクターは米国立衛生研究所 (NIH) の Malech 博士らが開発した MFG-S-gp91 ベクターのみとなった。そこで、これまで Malech 博士が遺伝子治療を行った 12 症例について臨床経過を調査するとともに、Malech 博士に共同研究の申し込みをした。

8) Malech 博士側は、米国食品薬品局 (FDA) や臨床研究の専門家と討議の結果、国際多施設共同臨床研究が適当であると判断がなされ、日本側にその旨提案があった。

9) 多施設共同研究を行うためには、実施計画書はお互い承認できるものでなければならない。現在日米の実施計画書を比較、調整中である。ベクターの変更以外は、大きな変更はない予定である。

D. 考察

フランスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療臨床研究では、大きな成果を出しながら、レトロウイルスベクターの insertional mutagenesis が原因で白血病になった症例がある。その後、レトロウイルスベクターを使用する遺伝子治療の実施基準は、国によって多少の違いはあるものの、欧米では危険と利益を慎重に検討し、利益が大きい場合は実施している。本邦で、これまでにレトロウイルスベクターを使用して

造血系細胞に遺伝子導入する遺伝子治療臨床研究の実施申請をしたのは 4 施設 (癌研究会病院、筑波大学附属病院、北海道大学病院、東北大学病院-うち東北大学病院は被験者の登録を保留中) で、フランスの有害事象発生後に申請承認された計画はない。

本研究班の研究者らは、遺伝子導入細胞が長期にわたり機能し、良好な臨床効果を認めたドイツの臨床研究をモデルに実施計画を立てていたが、申請直前にベクターの使用中止を要請された。Grez 博士らの研究結果から、MDS1/EVI1 近傍へのレトロウイルスの挿入が、モノソミー7 と MDS の発生に深く関与していることが示唆されたため、SF71gp91 ベクターは使用不可と判断し、ベクターの変更を決定した。

安全性の高い次世代のベクターは、いまだ開発中で X-CGD の遺伝子治療臨床研究に使用できるものはない。現在使用できるもので重大な有害事象が発生していないベクターは、NIH の Malech 博士のグループが開発した MFG-S-gp91 のみである。このベクターを使用して国際多施設共同臨床研究を実施することは、標準治療では制御困難な感染症をもつ X-CGD の新規治療法の開発に貢献するのみならず、諸外国と比較して整備の遅れている、本邦の難治性小児先天異常症に対する遺伝子治療実施体制の構築に大きな役割を果たすことが期待される。

E. 結論

研究の途中で、レトロウイルスベクターの変更を余儀なくされたが、別のベクターで国際多施設共同研究が実施することになった。

ベクターは変更するが、実施方法の大幅な変更はない。

本研究で計画している X-CGD に対する遺伝

子治療臨床研究の実施は、他の難治性小児先天異常症に対する遺伝子治療臨床研究の推進につながる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載のとおり。

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田真由美, 奥山虎之:慢性肉芽腫症の遺伝子治療への取り組み, 臨床検査, 51 巻 10 号 : 1106-10 頁, 2007 年

2. 学会発表

1) 岡田真由美, 奥山虎之, 立澤宰, 小林信一, 清河信敬, 大津真, 藤本純一郎, 倉辻忠俊, X 連鎖慢性肉芽腫症(X-CGD)に対する遺伝子治療臨床研究, 第 15 回食細胞機能異常症研究会, 東京, 2007 年 12 月 14 日

2) 岡田真由美, 奥山虎之, 立澤宰, 小林信一, 清河信敬, 藤本純一郎, 倉辻忠俊, 大津真, 有賀正, 久米晃啓, 小野寺雅史, 布井博幸, 世界の慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究と日本の現状, 第 1 回日本免疫不全症研究会, 東京, 2008 年 1 月 19 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
小児難治性先天異常症に対する幹細胞遺伝子細胞治療法の開発と臨床応用
分担研究報告書

分担研究課題 遺伝子治療対象患者に対する倫理的配慮に関する検討

分担研究者 掛江 直子 国立成育医療センター研究所 成育保健政策科学研究室長

研究要旨

本研究班において計画を進めてきた慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究において使用を検討してきたオイフェッツ社製のベクター（ドイツの Dr. Grez により開発・提供されたもので、イギリスにおける慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究においても提供を受け使用されている）を用いてドイツならびにオーストリアにて実施されてきた慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究において、最近になり、被験者 3 名のうち 2 名で重要な遺伝子変化（モノソミー 7）が見つかり、骨髄異形成症候群（MDS）様の症状にあるとの有害事象報告を受けた。そこで、この報告を踏まえて、関係各国がどのような対応をしたのかについて調査を行なった。また、各国の遺伝子治療臨床研究の審査体制についても併せて調査し、本邦における遺伝子治療臨床研究の適正な実施に関する検討を行なった。

研究協力者

藤本純一郎 国立成育医療センター研究所
副所長

A. 研究目的

本研究班において計画を進めてきた慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究において使用を検討してきたオイフェッツ社製のベクター（ドイツの Dr. Grez により開発・提供されたもので、イギリスにおける慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究においても提供を受け使用されている）を用いてドイツならびにオーストリアにて実施されてきた慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究において、最近になり、被験者 3 名のうち 2 名で重要な遺伝子変化（モノソミー 7）が見つかり、骨髄異形成症候群（MDS）様の症状にあるとの有害事象報告を受けた。そこで、この報告を踏まえて、関係各国がどのような対応をしたのかについて把握することを目的とした。

なお、この情報は、本研究班において当該ベクターによる計画を進めるか否かを検討するた

めにも必要な情報と考えるものである。

B. 研究方法

本分担研究では、CGD 患者に対する遺伝子治療臨床研究において、最近報告された有害事象発生情報に対する各国の対応について、情報収集を行なった。具体的な方法は、以下の通りである。

1) ドイツの状況について

平成 19 年 10 月 27 日から 29 日に、オランダ・ロッテルダムで開催された欧州遺伝子・細胞治療学会にて、Grez 博士と会談し、ドイツで報告された有害事象に対する具体的な対応について情報を収集した。

2) イギリスの状況について

平成 19 年 10 月に、イギリス保健省 Scientific Development and Bioethics Division の Genetics Science Safety & Regulation の Preuss 博士に対し、今回のドイツで報告された有害事

象に基づくイギリス国内での議論の有無ならびにその対応をメールにて問い合わせ、情報収集を行なった。

3) オランダの状況について

平成19年10月30日に、オランダの中央倫理委員会（Central Committee on Research involving Human Subjects; CCMO）の Executive Director である Dr.Kenter、ならびに CCMO/MREC member である Dr. Vermeij と会談し、今回のドイツで報告された有害事象に基づくイギリス国内での議論の有無ならびにその対応と、オランダにおける遺伝子治療臨床研究の倫理審査体制等についての情報収集と意見交換を行なった。

C. 研究結果

1) ドイツの状況について

今回の有害事象の発生については、ベクター開発者である Grez 博士の立場では、国の規制当局への報告義務は課されていないとのことであった。しかしながら、今回の有害事象発生を受けて、自主的に規制当局に当該有害事象の発生ならびに当該ベクターの今後の使用の取りやめについて報告をしたということであったが、それに対して特に当局の対応はなかったという。

当該プロトコルは1999年に作成されたものであることから、Directive 2001/20/EC relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use（以下、Clinical Trials Directive (2001/20/EC)）に基づく有害事象の報告システムの対象には含まれていないと推察される。この点から、ドイツ規制当局としては、情報を把握して上記報告システムに対して報告する義務を有しておらず、ドイツの国内規制においてもこの当時は報告義務を課していなかったため、今回の有害事象報告について特に対応がなかったと推察される。

なお、Grez 博士はベクター開発の研究者ではあるが、当該臨床研究の責任者ではないことから、上記の説明は Grez 博士の一研究者としての理解の範囲の内容であると考えられる。したがって、本件についてのドイツ国内での公的な対応、ならびにドイツにおける審査システムの詳細については、別途ドイツ規制当局への確認調査が必要と考える。さらに、当該臨床研究におけるベクターの製造元であるオイフェッツ社の役割（規制当局への責任・義務）ならびに対応についても、別途調査が必要と考える。

ドイツにおける CGD 患者に対する遺伝子治療臨床研究の今後については、今回の有害事象発生によって中止される予定はなく、ベクターをドイツ・オイフェッツ社製のものからアメリカ合衆国 NIH によるものへ変更して継続される予定であるという。

2) イギリスの状況について

イギリス保健省 Scientific Development and Bioethics Division の Genetics Science Safety & Regulation の Preuss 博士によると、イギリスの慢性肉芽腫遺伝子治療臨床研究においては、英国政府によって設置された遺伝子治療倫理審査（諮問）委員会（Gene Therapy Advisory Committee; GTAC）は、プロトコル審査のみならず、症例をエントリーする際に各症例についての適切性についても審査（case-by-case assessment of each patient to be enrolled into the UK CGD study）も行なっている。これは、フランスで2002年に発生したX連鎖重症複合免疫不全症（X-linked Severe Combined Immunodeficiency; X-SCID）患者における白血病発症の有害事象報告を受けて整備された規定に拠る対応である。

今回のドイツでの有害事象の発症については、ドイツの規制当局からの正式な報告はなく、ドイツの研究者とイギリスの研究者から直接イギリスの規制当局に対する報告があったとのこと。イギリスでの慢性肉芽腫遺伝子治療臨床研究

は、現段階ではまだ終了しておらず、また今回の有害事象発生報告を受けて当該研究を中止する予定はないとのこと。進行中の臨床研究であることから、被験者のフォローアップ状況等、詳細情報は公開できないということであるが、今後も被験者のリスクとベネフィットを比較衡量し、ベネフィットが上回ると判断できれば、新たな被験者のエントリーもあるという。

また、2002年のX-SCID患者における白血病発症の有害事象報告を受けた際は、GTACとMHRA (Medicines and Healthcare product Regulatory Agency、註: 医学研究や治療に用いる製品・製剤の安全性に関する審査を行なうために英国政府によって設置された委員会) による緊急合同委員会が開催されたが、今回のCGD患者における有害事象報告については、同様の委員会は開催されなかったという。

3) オランダの状況について

オランダCCMOには、今回のCGD患者における有害事象の発生についての情報は届いていなかった。Dr.Kenterによると、Clinical Trials Directive (2001/20/EC) に基づく有害事象の報告システムはEU全体で共有している (EU-database or European database) ため、そこには登録されている可能性もあるが、当事国が報告しなければ不明のままだろうとのこと。(これは、Grez博士との会談において、ドイツ当局が何らコメントを発表しなかったことが明らかになっているので、そのことと符合している。)

フランスのX-SCIDのALL発症の件では、第1例目がオランダ人患者であったため研究責任者であるDr. Alan Fisherとの個人的な情報交換によって情報を得て、公表したとのこと。その結果、多くの問い合わせがあったが、その後、X-SCID 遺伝子治療臨床研究では複数例に有害事象が発生する事態となり、当該遺伝子治療臨床研究の実施国であるフランスが話題の中心となった。X-SCID 遺伝子治療臨床研究はオランダ

によるプロトコルではなかったので特にオランダ当局としてのコメントはしていない。

オランダではCGDに対する遺伝子治療臨床研究は実施されていないが、仮に当該プロトコルが申請された場合、中央倫理委員会 (Central Committee on Research involving Human Subjects; CCMO) にて審査されることとなる。一般論として、安全性と有効性の審査がポイントとなるであろうとの見解を得た。

なお、CCMOは月1回の定期開催で、遺伝子治療の他に 1) 小児や同意能力のない被験者を対象とした非治療的な研究、2) GMOsを用いた研究、3) 細胞治療、4) ワクチン研究、5) 異種移植、6) ヘロイン試験、7) 配偶子母細胞や余剰胚を用いる研究などの審査を行なう。

オランダでの遺伝子治療臨床研究承認システムは表1の通りで、CCMO、VWS (Ministry of Health, Welfare and Sport; 厚生省)、VROM (Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment; 環境省) の3者の承認が必要であり、担当窓口としてGene Therapy Officeを設置し3者間の調整に当たっている (詳細は資料1を参照のこと)。

D. 考察

今回の遺伝子治療臨床研究における有害事象報告を受けて、主要な諸外国 (ドイツ、イギリス、オランダ) の対応を調査したが、国により臨床研究の審査体制が異なることから、その対応もひとつではないことが明らかとなった。しかしながら、同時にClinical Trials Directive (2001/20/EC) に基づく有害事象の報告システムがEUとして設置することにより、今後の新しい臨床研究の有害事象報告が直ちに共有できる体制が整備されたことも明らかとなった。

また、イギリスならびにオランダでは、遺伝子治療臨床研究については、国による中央審査体制をとっており、本邦で実施している中央審査についても、当面、妥当であると考えられる。しかしながら、いずれの国も施設IRBによる審

査（二十審査）は求めておらず、その点は、日本独自の審査システムをもっていると言えるが、これは審査手続きを慎重にすることにより、より一層の被験者保護に寄与しているのか、もしくは審査手続きを煩雑にして、審査効率を下げているのか等、本邦の審査体制について、被験者の適正な保護（臨床研究の安全かつ倫理的な実施）という視点から、再度検討していくことが望まれるだろう。

E. 結論

本調査研究の結果、有害事象が発生したとの情報を得て、ベクターを変更するか否かの判断については、国により判断が異なることが明らかとなった。つまり、ドイツの研究者の判断としては、まだ有害事象が発生していないアメリカ合衆国 NIH のベクターに変更するとしているが、イギリスの研究者ならびに規制当局の判断としては、ベクターの変更もプロトコルの中止もしないとしているのである。

この結果は、本邦で計画してきた研究プロトコルを、このまま推進するが、変更するかについて、いずれの選択もあり得ることを示唆している。この結果も踏まえて、研究班ならびに規制当局との慎重な協議に基づき、判断していくことが重要であろう。

本邦における最終的な判断としては、有害事象報告があった時点では、まだ遺伝子治療臨床研究についての国の中央審査へのプロトコル申請前であったことから、実際に有害事象が発生するリスクが明らかなベクターを引き続き使用する計画で進めることよりも、将来有害事象が発生しないか否かは不明であるが、現段階ではまだ発症していない NIH のベクターに変更し、改めてプロトコルを準備しなおす方向への方針転換を行なうとの結論に至った。

NIH のベクターの供与を受ける場合には、その前提条件として NIH のプロトコルを使用する（NIH のプロトコルに参加する）ことが求められるため、当初予定していたプロトコルとは

遺伝子治療の際の前処置の有無ならびに薬剤の選択や容量設定等も異なることから、再度、プロトコルに関する慎重な検討が進められることが必要であろう。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

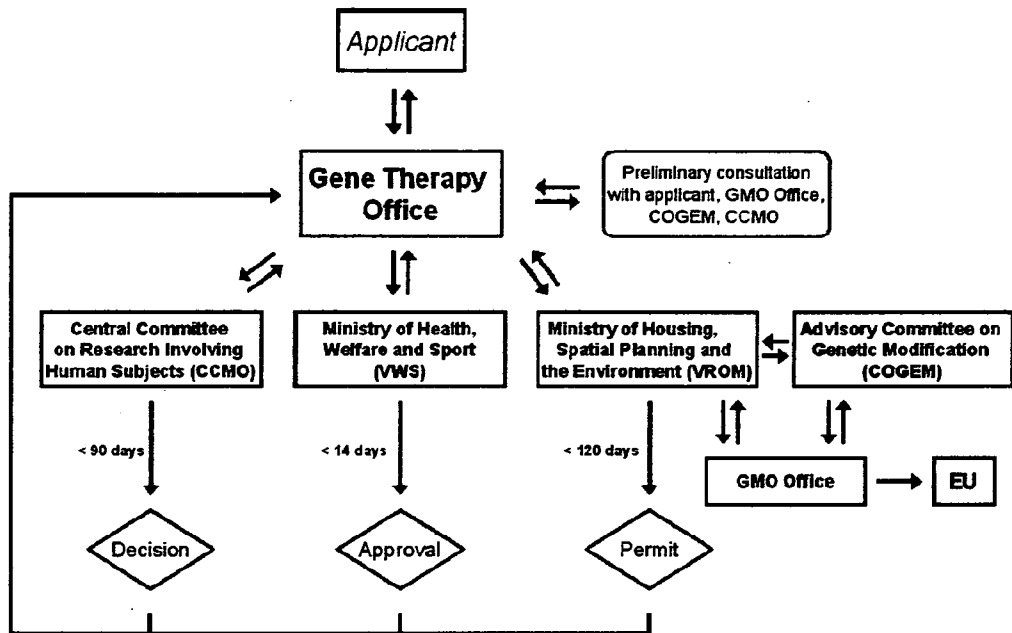


図 1. オランダの遺伝子治療臨床研究における審査体制

研究要旨

X染色体連鎖型慢性肉芽腫症の根治療法として、遺伝子治療の国際共同研究の準備を進めている。米国 NIH の Malech 博士が開発した MFSGsp91 ベクターの安全性は確認されているが、有効性を高めるために、骨髄非破壊的前処置を行う。プロトコルの大半は相互理解で合意したが、busulfan の投与方法と、総投与量に関して、データと意見の相違があり、製薬会社の基礎データやその他の情報を集め、さらに検討する必要性が残った。

研究協力者

Harry L. Malech: 米国 NIH, 国立アレルギー感染症研究所生体防御研究部長・遺伝免疫不全分野主任

Elizabeth Kang: 米国 NIH, 国立アレルギー感染症研究所生体防御研究部・X-CGD 遺伝子治療主任研究者

Susan: 米国 NIH/NIAID・CRC

藤本純一郎: 国立成育医療センター研究所・副所長

布井博幸: 宮崎大学医学部小児科・教授

小野寺雅史: 筑波大学大学院・講師

岡田真由美: 国立成育医療センター遺伝診療科・レジデント

C. 研究成果

MFGS ベクターは、既に 1995 年から臨床研究で使用しており、現在まで既に 11 患者（内 1 名は 2 回）に達している。最初の 5 名は p47phox 欠損型で、後の 5 名は gp91phox 欠損型である。また始めの 9 症例（2000 年まで）は前処置を行わずに実施している。この 9 症例では、遺伝子治療後 8 年～13 年経過しているが、挿入変異を起したり、モノクローン化の増殖優位性を認めておらず、ベクターの安全性は確認されている。しかし、前処置を行わなかったためか、長期生着が 1%以下と低く、有効性が十分でなかった。そこで 2007 年に骨髄非破壊的前処置を busulfan の中等量使用により、新たな臨床研究を開始した。

研究の主目的は、busulfan の安全性である。副目的を、X-CGD 患者の難治性感染症の軽快、MFGS ベクターの有効性確認等としている。我々のプロトコルの違いは、以下の 4 点である。(1) busulfan の投与方法を 5mg/kg を 2 時間で点滴静注し、2 日間投与、総量を 10mg/kg としている。これに対し、我々は 1mg/kg を 2 時間以上かけて 6 時間毎に静注し、総量を 8mg/kg としている。(2) 標的細胞が G-CSF 誘導末梢血 CD34 陽性細胞で、我々は骨髄由来 CD34 陽性細胞の方が優るとしている。(3) 遺伝子導入の際のサイトカインカクテルは IL-3 に対し、我々は IL-6/sIL-6R としている。(4) 対象患者を HLA 抗原 5 ペア 10 ローカス一致の同胞がいない患者としているが、我々は HLA 抗原 3 ペア 6 ローカス一致の同胞及び家族外ドナーがいない患者としている。

各々のデータと情報を基に協議し、(2)は、末梢血から十分量得られない場合は骨髄血も用いること、(3)に関しては IL-3 で少し顆粒球系に刺激が傾いた方が良いであろうというこ

A. 研究目的

小児難治性先天異常症のうち、患者数が多く、致死的な重症感染症に脅かされている X 染色体連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) の根治療法として、MFSGsp91 ベクターを用いた遺伝子治療に関する国際共同臨床試験の可能性を追求し、実施への問題点を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

米国予防衛生研究所 (National Institute of Health=NIH) の国立アレルギー感染症研究所 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases=NIAID) の生体防御研究部長、遺伝免疫不全部門長の Harry L. Malech 博士、及び同研究部で X-CGD 遺伝子治療臨床研究の主任研究者 Elizabeth Kang 博士と事前に情報を交換、問題点を明らかにした上で、詳細を検討し、データを基に直接ディスカッションを行い、共同研究の可能性を確認した。

とから IL-3 を用いること、(4)に関しては、日本の方が HLA 一致同胞と MUD で成績に差がなく造血幹細胞移植の適応が広いこと、遺伝子治療の対象が狭められるが、疫学研究と異なるので問題とはならない、という結論になった。

(1)の busulfan の投与方法と総投与量に関しては、骨髄抑制は濃度依存性であること、1日1回点滴静注の方が血中濃度が異常に高くなる場合があること、AUC を確保する方が理にかなっていること、その他一般的な副作用の頻度が不明である等から、さらに製薬会社の基礎データを得た上で検討することとなった。尚、米国 NIH が共同研究を行う予定のドイツでは8時間ごとの点滴静注である。

もう一つの問題は、インフォームドコンセントの日本語訳と、それに対する英語への再翻訳である。国際共同研究の場合、日本の審査委員会で説明する文が、米国 NIH の IRB の承認を受ける手続きを必要とする。

D. 考察

当初我々が使用を予定していた、ドイツ国 Grez 博士が開発した SF71gp91 ベクターは、使用の6名中2名に7番染色体モノソミーを伴う骨髄異形成症候群を発症したため、使用リストから外した。米国 NIH の Malech 博士が開発した MFGS ベクターは、まだ有効性は十分でないが、挿入変異の優位増殖性を認めず、安全性は確認されている。

多施設国際共同研究では、プロトコルを併せることが原則であるが、考え方の違い、人種的・遺伝学的薬物代謝の違いなど、考慮すべき点が多い。Kang 博士の展開している臨床研究は、骨髄非破壊的前処置に用いる busulfan の安全性確認が第1目的である。日本のデータでは、血中濃度は $2,500 \mu\text{mol/m}$ 以下が安全という結果になっているが、自家細胞生着のための条件は、不明である。より多くの基礎データを集め、検討してから決定することとした。

E. 結論

X-CGD に対する遺伝子治療について、米国 NIH との多施設国際共同臨床研究の形で実施する方向で準備を進めている。最大の問題点は、骨髄非破壊的前処置に使用する busulfan の投与方法の違いである。第1の研究目的が busulfan の安全性確認であるが、予測し得る危険を最大限防ぐ方法を追求する必要がある。また、審査にひつよな書類の日本語訳の英語再翻訳の必要部分も認識した。

F. 健康危険情報 (資料1)

SF71gp91 ベクター使用の遺伝子治療における「骨髄異形成症候群の発症2例」につき、厚生労働省に報告した。ただし、本件は等研究でまだ研究計画書を提出する前で、しかも日本国内の他の施設で使用していない、また使用計画がないため、参考としての「健康危険情報」である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ①岡田真由美, 奥山虎之, 立澤空, 小林信一, 清河信敬, 藤本純一郎, 倉辻忠俊, 大津真, 有賀正, 久米晃啓, 小野寺雅史, 布井博幸, 世界の慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床研究と日本の現状, 第1回日本免疫不全症研究会, 東京, 2008年1月19日
- ②岡田真由美, 奥山虎之, 立澤空, 小林信一, 清河信敬, 大津真, 藤本純一郎, 倉辻忠俊, X連鎖慢性肉芽腫症(X-CGD)に対する遺伝子治療臨床研究, 第15回食細胞機能異常症研究会, 東京, 2007年12月14日
- ③堀内保臣, 清河信敬, 宮川世志幸, 中島英規, 斉藤洋平, 右田王介, 片桐洋子, 大喜多肇, 岡田真由美, 大津真, 小野寺雅史, 久米晃啓, 大飼岳史, 奥山虎之, 杉田完爾, 藤本純一郎, 倉辻忠俊. ヒト造血幹細胞に対する組換えファイブプロネクチンを用いたレトロウイルス感染の分子機構に関する検討. 第49回日本小児血液学会総会・第23回日本小児がん学会学術集会合同開催, 仙台, 12月14日・16日, 2007
- ④Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, Ogata T, Li XK, Onodera M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Nakauchi H, Kuratsuji T; Towards clinical gene therapy for chronic granulomatous disease: Optimization of gene transduction into hematopoietic stem/progenitor cells. 第13回日本遺伝子治療学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資 料

2007.11.8

母子保健課長 殿
厚生科学課健康危機管理対策室長 殿

慢性肉芽腫症遺伝子治療に関する有害事象調査(2007年10月27-29日、オランダロッテルダム)の結果をご報告いたします。

H19-子ども一般-003
主任研究者 倉辻忠俊

有害事象の事実関係(Dr. Grezが厚生労働省への正式文書作成中)

1. ドイツで行われた成人のCGD患者2例の経過

遺伝子治療後直後から4-5か月後にかけて、末梢血の遺伝子導入細胞の比率は20%前後から50-60%まで徐々に増加した。遺伝子導入細胞の比率は、患者1では死亡するday 820まで、患者2では現在(day 1200すぎ)も50-60%と安定しているにもかかわらず、活性酸素産生能をもった好中球の割合は1-10%前後にまで減少した。臨床症状は、肝膿瘍や肺アスペルギルス症の消失など、治療効果が見られた。

患者1(P1)は、day 485ころから、末梢血汎血球減少症がみられ、day 547以降、異形成や芽球を伴わない骨髄低形成が認められた。day 730ころに歯科治療を受けた後敗血症を起こし、day 820(2006年4月10日)に死亡した。芽球の出現はなかった。

患者2(P2)は、day 982ころから汎血球減少症を呈したが、芽球は認めていなかった。day 1200には、骨髄血の約10%に芽球が認められて、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome; MDS)になっている。

レトロウイルスの挿入部位の検索を経時的に保存してあった試料でLAM-PCRで行った。挿入部位はポリクローナルであったが、治療後5か月頃ころから、MDS1-EVI1遺伝子近傍に遺伝子挿入をしているクローンで増殖優位性が観察された。特に、P1のday 542以降優位になったクローンでは、レトロウイルスベクターのLTRのプロモーター領域のCpGがメチル化され治療遺伝子gp91phoxのmRNAの発現が抑制されていることが判明した。

2. P1とP2の遺伝子導入細胞に見られた染色体異常

ドイツがん研究センター、ハイデルベルグ大学及びハノーバ医科大学の3機関で詳細に検査した。

P1の死亡後、保存検体(骨髄血)でSNPアレイを行ったところ、day 642以降、増殖優位なクローンにおいて7番染色体のコピー数が半減しモノソミー7になった細胞が観察された。死亡時day820の骨髄単核細胞を用いたinterphase FISHでは、80%の細胞がモノソミー7であった。ただし、全経過において骨髄所見で芽球は認めなかった。

P2についても、同様の解析を行ったところ、ウイルスゲノムが挿入して増殖優位性を獲得したクローンにおいて、モノソミー7を確認した。ウイルスゲノムの挿入が見られないクローンや、MDS1近傍以外に挿入したクローンの染色体は全て正常核型であり、MDS1遺伝子近傍への遺伝子挿入とモノソミー7との因果関係は明白と考えられる。day 982の時点では、末梢血のmetaphase FISHで5%のモノソミー7の細胞を認めたが、芽球の出現が見ていない。day 1200に行ったinterphase FISHの結果、骨

髄単核細胞で 50%のモノミー7 の細胞を検出し、骨髄細胞の 10%が芽球となっており、MDS と判断される。

Grez 博士の意見と今回の有害事象を受けてとった対応

ウイルスベクターのゲノムが MDS1 近傍に挿入された細胞の一部が造血において増殖優位性を獲得し、MDS1-EVI1 と EVI1 の mRNA の過剰発現、転写が活性化されたことにより、モノミー7 になると推測される。遺伝子導入細胞がモノミー7 になっても、ただちに芽球/白血病細胞になるわけではないが、将来的に白血病になる可能性は、非常に高いと考えられるため、SF71gp91 は、今後の遺伝子治療に使うべきではない。

レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞に遺伝子導入をする場合、挿入部位を制御することはできないため、遺伝子変異による白血病発症の可能性が問題になる。特に、強力なレトロウイルスベクターを用いて、遺伝子修復(導入)した造血幹細胞を生着させ、完全治癒を目指す場合、白血病が発症する可能性はより高いかもしれない。逆にあまり強力でないベクターを用いると、生着し、完全治癒にいたる可能性は低いかもしれないが、白血病の発症は生じない可能性が高く、その点では安全と言えるかもしれない。

2 症例の状況を有害事象として報告し、また、自主的に SF71gp91phoX ベクターの患者治療への使用を不可と判断・決定し、その旨をドイツ保健省に文書で通知した。Grez 博士らのプロトコルは、現在の EU の臨床試験に関する規制 (EU Clinical Trial Directive 2001/20/EC) が適用される以前の 1999 年に承認されたものであり、今回の件について保健省からは SFFV ベクターの使用や臨床研究の中止について指示、指導や規制は受けていないため、現在も臨床研究自体は中止していない。))

将来的には、現在前臨床試験を行っている SIN ベクターを治療に使用する予定であるが、2009 年 1 月以降になりそうである。それまでの間は、米国 NIH の Malech 博士から MFG-S ベクターの Master Cell Bank を譲渡してもらい、臨床研究を続行する予定である。その際、新規のプロトコルを作成するのではなく、もとのプロトコルの使用ベクターと遺伝子導入期間の部分のみの変更を申請する。

以上のディスカッションをまとめると、

1. Dr. Grez の開発した SFFV ベクターは、骨髄異形成症候群 (MDS) 発症の可能性が高く、このままでは臨床に使用しない。
2. 遺伝子導入効率、増殖力が高いと、治療効果は高まるが、逆に安全性は低くなる。レトロウイルスベクターの中でもそれぞれ加工に伴う特色があり、一長一短である。米国 NIH の Prof. Malech の開発した LMV ベクターは、導入効率が SFFV ベクターより低い、現在の所 (10 症例、最長 12 年経過) 有害事象は起こっていない。
3. 現在治療法のない先天異常症の中で、とくに免疫不全症候群と脳神経系に恒久的な重篤な障害をおこす先天性代謝異常症に関しては、遺伝子治療の開発が必須である。

出席者: Manuel Grez (Institute of Biomedical Research, Georg-Speyer-Haus, ドイツ)

藤本純一郎、清河信敬、掛江直子、岡田真由美 (国立成育医療センター)

大津 真 (東京大学医科学研究所)