

FIGURE 4. Stimulative effects of TPO on induction of CD31^{bright} cells. A, alteration of the cell number of cultivated AC133⁺ cells for 1 week in the combination of growth factors. Mix, VEGF + SCF + TPO. B, the flow cytometric histogram of AC133⁺-derived cells stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody after a 1-week culture. The representing number in the flow cytometric histogram indicates the percentage of the CD31^{bright} cell population. The left panels are peripheral blood, and the right panels are cord blood. C, CD31^{bright}

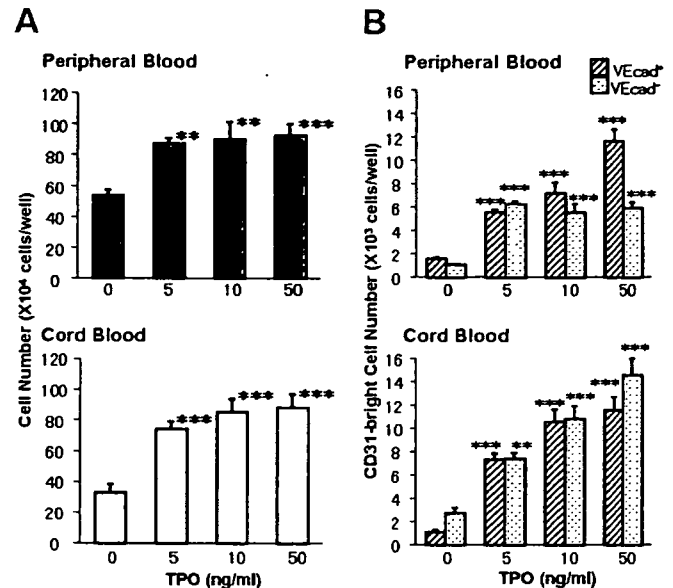


FIGURE 5. Dose-dependent effects of TPO on the induction of CD31^{bright} cells from AC133⁺ cells. AC133⁺ cells were treated with various concentrations of TPO for 1 week. The left panels (A) are the total cell number of cultured AC133⁺ cells from peripheral blood (upper panel) and cord blood (lower panel). The right panels (B) are the calculated CD31^{bright} cell number from peripheral blood (upper panel) and cord blood (lower panel). Columns and bars represent the means \pm S.D. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Striped and dotted columns represent CD31^{bright}VEcad⁺ cells and CD31^{bright}VEcad⁻ cells, respectively.

number of CD31^{bright} cells when compared with the control (Fig. 4D, panel c). The concomitant treatment with both VEGF and TPO showed a synergic increase in the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4D, panel c).

When AC133⁺ cells were cultured with various concentrations of TPO in the presence of constant concentrations of VEGF (50 ng/ml), the total cell number from both peripheral blood (Fig. 5A, upper panel) and cord blood (Fig. 5A, lower panel) significantly increased at 5 ng/ml of TPO when compared with the control, and there was no significant difference in the total cell number from 5 to 50 ng/ml of TPO. However, TPO increased the ratio of CD31^{bright} cells of flow cytometry dose-dependently as follows: control, 0.50%; 5 ng/ml, 1.36%; 10 ng, 1.42%; 50 ng/ml 1.90% in peripheral blood and control, 1.16%; 5 ng/ml, 1.99%; 10 ng, 2.51%; 50 ng/ml 2.96% in cord blood. TPO markedly induced the differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright}VEcad⁺ cells in the case of both peripheral blood (Fig. 5B, upper panel) and cord blood (Fig. 5B, lower panel) in a dose-dependent manner. In the case of cord blood cells, differentiation into CD31^{bright}VEcad⁻ cells was also induced by TPO.

The effects of TPO on total cell number during 6-day culture of AC133⁺ cells were determined. Although the total cell num-

cells numbers were calculated by both the total cell number and the ratio of CD31^{bright} population. D, the effects of TPO alone on EPC differentiation derived from AC133⁺ cells of cord blood. The upper left panel (a) shows the total cell number after a 1-week culture, the right panels (b) show the flow cytometric histogram of AC133⁺-derived cells stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody, and the lower left panel (c) shows the calculated CD31^{bright} cell number. Columns and bars represent the means \pm S.D. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). NS, not significant; Cont, control.

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

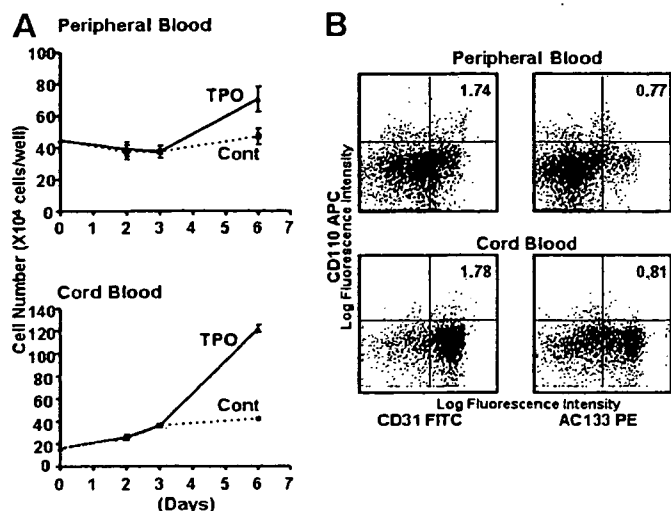


FIGURE 6. Time-course analysis of TPO-treated AC133⁺ cells and expression of TPO receptor (CD110). A, alteration of cell number was counted at 2, 3, and 6 days. Solid and dotted lines indicate TPO-treated cells and control ((Cont) VEGF alone) cells, respectively. The results represent mean \pm S.E. of triplicate wells. B, flow cytometric analysis of CD110 expression on AC133⁺ cells cultured for 3 days was carried out. The y axis represents the log fluorescence intensity of CD110-allophycocyanin (APC), and the x axis represents that of CD31-FITC (left panels) and AC133-PE (right panels). The number in the flow cytometric dot blot indicates the percentage of CD110⁺ CD31⁺ and CD110⁺ AC133⁺ populations, respectively. The upper panels are peripheral blood, and the lower panels are cord blood.

ber from AC133⁺ cells slightly and constantly increased from day 0 to day 6 in the absence of TPO, total cells markedly increased after the third day in the presence of TPO (Fig. 6A). Next, the alternation of TPO receptor (CD110) expression was analyzed during the cultivation of AC133⁺ cells. Although the percentages of both AC133⁺ CD110⁺ cells and CD31⁺ CD110⁺ cells were 0% just after magnetic cell sorting, 3 days after the cultivation, ~2% of CD31⁺ CD110⁺ cells (Fig. 6B, left panel) and 1% of AC133⁺ CD110⁺ cells (Fig. 6B, right panel) appeared from AC133⁺ cells in the peripheral blood and cord blood, respectively. These data indicate the possibility that sorted AC133⁺ cells may differentiate into AC133⁺ CD110⁺ cells and may subsequently proliferate and differentiate into EPCs in response to TPO.

It has been reported that TPO activates the PI3K/Akt pathway (28) or JAK/STAT pathway (20, 29, 30) in target cells. In addition, in the present study, TPO induced a marked proliferation of AC133⁺ cells after 3-day culture, and CD110 expression in cells cultured for 3 days from both cord blood and peripheral blood was also observed (Fig. 6, A and B). We then attempted to determine whether TPO activates Akt or STAT in AC133⁺ cells cultured for 3 days by analyzing the phosphorylation at Ser-473 of Akt or the phosphorylation at Tyr-705 of STAT3, which are the active forms of Akt or STAT3, respectively. As shown in Fig. 7A, phosphorylation at Ser-473 of Akt was stimulated by both VEGF and TPO at 15 min and was more markedly stimulated by concomitant treatment with VEGF and TPO than by a single treatment (Fig. 7A, top panel). Phosphorylation at Tyr-705 of STAT3 was observed only in the presence of TPO, and unlike in the phosphorylation at Ser-473 of Akt, an increased amount of phosphorylation was not observed in the concomitant presence of VEGF and TPO (Fig. 7A, third panel).

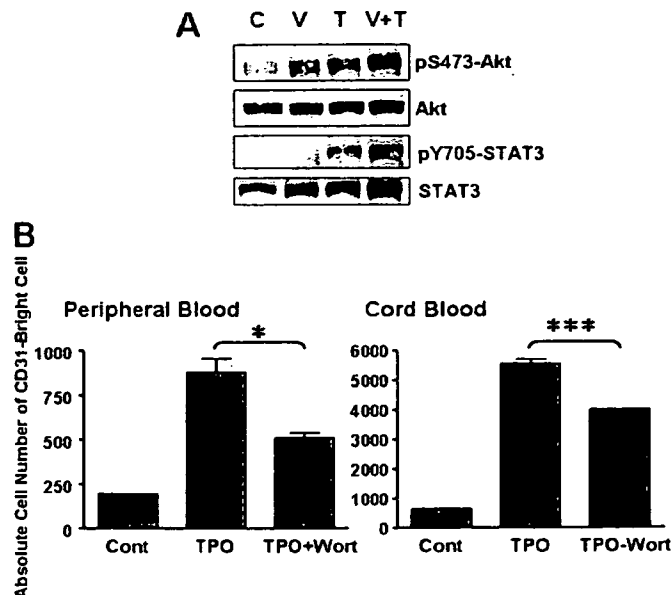


FIGURE 7. Analysis of TPO-induced signal transduction on AC133⁺ cells of cord blood. A, activation of Akt or STAT3 was analyzed by Western blotting with anti-phospho-specific Ser-473-Akt antibody (top panel) and reprobred with anti-Akt antibody (second panel), or with anti-phospho-specific Tyr-705-STAT3 antibody (third panel) and reprobred with anti-STAT3 antibody (lower panel) after stimulation by VEGF, TPO, or both VEGF and TPO for 15 min using 3-day-cultured AC133⁺ cells. C, control; V, VEGF; T, TPO. B, the effects of wortmannin on CD31^{bright} cell induction were investigated. The right panel shows cord blood, and the left panel shows peripheral blood. The y axis represents the CD31^{bright} cell number. Wort, 100 nM wortmannin. Columns and bars represent the means \pm S.E. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Cont, control.

On the other hand, there was no difference in the expression of Akt and STAT3 protein levels (Fig. 7A, second panel and bottom panel, respectively). The induction of CD31^{bright} cells was not perfectly but significantly inhibited by wortmannin, an inhibitor of PI3K, suggesting that the PI3K/Akt pathway plays an important role in TPO-induced EPC differentiation (Fig. 7B).

DISCUSSION

We have previously reported that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells in human peripheral blood are EPCs (25). In the present study, CD31^{bright} cells also appeared from AC133⁺ cells prepared from cord blood, which are a rich source of stem cells during the early period of cultivation (Fig. 1, A and B). When cells were separated in terms of CD31 expression (Fig. 1C), CD31^{bright} cells differentiated into KDR-positive and eNOS-positive adherent cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells in cord blood have some characteristics similar to those of EPCs in peripheral blood. Although these EPCs in both cord blood and peripheral blood could not form tube-like structure by themselves on Matrigel (data not shown), they secreted angiogenic growth factors (Fig. 2) such as VEGF, IL-8 (31, 32), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (33). It has been reported that there are at least two types of EPCs: early EPCs and late EPCs. Early EPCs are unable to form tube-like structures and secrete VEGF and IL-8 showing peak growth at 2–3 weeks (9, 26, 27). Late EPCs with the ability to proliferate and having a cobblestone shape appear late at 2–3 weeks, show exponential growth at 4–8 weeks, and have the ability to form tube-like structures

(26, 27, 34). Rehman *et al.* (9) have reported that EPCs derived from monocytes/macrophages do not proliferate but instead release potent proangiogenic growth factors. In many studies (9, 26, 27, 35–37), because the origin of early EPCs was CD14⁺ cells or was not precluded by monocytic cells, CD14 expression was still observed in the EPCs after cultivation. In our study, in which AC133⁺ cells were used as the origin of the EPCs, CD14 expression was not observed in CD31^{bright} cells induced by TPO (Fig. 3B). Although the CD31^{bright} cells identified as EPCs in this report and in a previous report did not correspond to their cells in terms of the origin of the cells or cell surface markers, these cells may be early EPCs that can release potent proangiogenic growth factors (Fig. 2). In any event, EPCs are thought to be a heterogeneous population, unlike late EPCs, which have a high ability to proliferate.

Circulating EPCs are up-regulated under physiological or pathological conditions and also by 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors (14, 15) and cytokines such as erythropoietin (11–13) and G-CSF (10). In this report, we have revealed the possibility of marked expansion of EPCs *in vitro* by TPO. Brizzi *et al.* (20) have reported that TPO directly stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis. In the present study, TPO may have played a stimulatory role in the differentiation of EPCs from circulating stem cells.

Although both TPO and SCF have the same potency with regard to proliferation of AC133⁺ cells (Fig. 4A), TPO specifically induces an increase in the ratio of the CD31^{bright} cell population when compared with SCF (Fig. 4, B and C). To develop useful cell therapy products for severe ischemia, it has been considered desirable to establish the efficient expansion of EPCs *in vitro*. Thrombopoietin could increase CD31^{bright} cells (EPCs) even in the absence of VEGF. Kirito *et al.* (38) have reported that TPO enhances expression of VEGF in hematopoietic cells through induction of hypoxia-inducible factor 1 α . These observations suggest the possibility that the production of EPCs by TPO may be supported by VEGF production by AC133⁺ cells. However, from the perspective that TPO and VEGF have synergistic effects on the induction of EPCs, TPO seems to induce EPCs through another signaling cascade.

Thrombopoietin is a major regulator of the proliferation, differentiation, and maturation of megakaryocytes (39, 40). The results from recent studies suggest that TPO can act not only as a lineage-specific hematopoietic growth factor but also can affect other hematopoietic cell types. For example, TPO alone does not induce proliferation of long term repopulating hematopoietic stem cells. However, in combination with SCF or IL-3, TPO has several synergistic effects on cell proliferation (19). Our results have revealed a new role of TPO in the production of EPCs.

In the process of differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright} cells, both peripheral blood and cord blood appear to be very similar. AC133⁺ cells of cord blood, however, have a stronger ability to proliferate than those of peripheral blood (Fig. 6A). Moreover, TPO stimulates the induction of CD31^{bright}VEcad⁻ cells only from cord blood (Fig. 5B) at high concentrations. Hur *et al.* (26) have reported that VEcad⁻ EPCs are thought to be an early EPC. It is therefore thought that AC133⁺ cells of cord blood are more immature than those of peripheral blood.

Although the total cell number treated with TPO slightly increased in a dose-dependent manner (Fig. 5A), the CD31^{bright} cell number markedly increased as the TPO concentration increased (Fig. 5B). These data suggest the possibility that a higher concentration of TPO may be needed for CD31^{bright} cell induction from AC133⁺ cells.

When AC133⁺ cells were stimulated by TPO or VEGF, an increase in the phosphorylation of Akt at Ser-473 was observed. This increase was strongly enhanced by concomitant treatment with VEGF and TPO (Fig. 7A). The induction of CD31^{bright} cells by these growth factors (Fig. 4D) was consistent with the increase in the phosphorylation of Akt at Ser-473. TPO but not VEGF could also stimulate the phosphorylation of STAT3 at Tyr-705. We previously reported that the PI3K/p70 S6 kinase pathway and the JAK/STAT3 pathway were important for proliferation and differentiation, respectively, in neutrophilic differentiation (41, 42). Owing to the stimulation of both the PI3K/Akt and the JAK/STAT pathways, we postulated that TPO may be a stronger stimulator of EPC production than VEGF. As shown in Fig. 7B, however, wortmannin could not completely inhibit the induction of CD31^{bright} cells. Therefore, a pathway other than the PI3K/Akt pathway may also work for the proliferation and differentiation of EPCs.

The observation of unfavorable angiogenesis has recently been reported after transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans (43). Moreover, transfer of both spleen cell-derived EPCs and bone marrow mononuclear cells accelerate atherosclerosis in apoE knockout mice, whereas EPC transfer reduces markers associated with plaque stability (44). These observations suggest that transplantation of differentiated cells from EPCs may be useful therapy as regenerative medicine.

In conclusion, we have demonstrated a new role of TPO in enhancing the differentiation of AC133⁺ cells into CD31^{bright} cells (EPCs) *in vitro*. These findings may contribute to further development of cell therapy for critical ischemia.

Acknowledgments—We thank Saitama Red Cross of Japan (Saitama, Japan) and Metro Tokyo Red Cross Cord Blood Bank (Tokyo, Japan) for their kind cooperation. We also thank Kirin-Amgen Inc. for their kind gift of recombinant TPO and recombinant SCF.

REFERENCES

- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999) *Circ. Res.* **85**, 221–228
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997) *Science* **275**, 964–967
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999) *EMBO J.* **18**, 3964–3972
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P. (1998) *Blood* **92**, 362–367
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M., and Asahara, T. (1999) *Nat. Med.* **5**, 434–438
- Nieda, M., Nicol, A., Denning-Kendall, P., Sweetenham, J., Bradley, B., and Hows, J. (1997) *Br. J. Haematol.* **98**, 775–777
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001) *Circ. Res.* **88**, 167–174
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M.,

- Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S. (2000) *Blood* 95, 952–958
9. Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., and March, K. L. (2003) *Circulation* 107, 1164–1169
 10. Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M., and Itescu, S. (2001) *Nat. Med.* 7, 430–436
 11. Bahlmann, F. H., De Groot, K., Spandau, J. M., Landry, A. L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S. M., Menne, J., Haller, H., and Fliser, D. (2004) *Blood* 103, 921–926
 12. Bahlmann, F. H., DeGroot, K., Duckert, T., Niemczyk, E., Bahlmann, E., Boehm, S. M., Haller, H., and Fliser, D. (2003) *Kidney Int.* 64, 1648–1652
 13. Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C., Mildner-Rihm, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2003) *Blood* 102, 1340–1346
 14. Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., and Zeiher, A. M. (2001) *J. Clin. Investig.* 108, 391–397
 15. Llevadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A., Walsh, K., Isner, J. M., and Asahara, T. (2001) *J. Clin. Investig.* 108, 399–405
 16. Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R. D., Broudy, V. C., Lin, N., Bailey, M. C., Forstrom, J. W., Buddle, M. M., Oort, P. J., Hagen, F. S., Roth, G. J., Papayannopoulou, T., and Foster, D. C. (1994) *Nature* 369, 568–571
 17. Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T., and Kaushansky, K. (2002) *J. Clin. Investig.* 110, 389–394
 18. Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D., and Alexander, W. S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1195–1200
 19. Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V., Fox, N., Broudy, V. C., Wolf, N. S., and Kaushansky, K. (1996) *Blood* 87, 4998–5005
 20. Brizzi, M. F., Battaglia, E., Montrucchio, G., Dentelli, P., Del Sorbo, L., Garbarino, G., Pegoraro, L., and Camussi, G. (1999) *Circ. Res.* 84, 785–796
 21. Kaushansky, K., Lin, N., Grossmann, A., Humes, J., Sprugel, K. H., and Broudy, V. C. (1996) *Exp. Hematol.* 24, 265–269
 22. Broudy, V. C., Lin, N. L., and Kaushansky, K. (1995) *Blood* 85, 1719–1726
 23. Kaushansky, K., Broudy, V. C., Grossmann, A., Humes, J., Lin, N., Ren, H. P., Bailey, M. C., Papayannopoulou, T., Forstrom, J. W., and Sprugel, K. H. (1995) *J. Clin. Investig.* 96, 1683–1687
 24. Kobayashi, M., Laver, J. H., Kato, T., Miyazaki, H., and Ogawa, M. (1995) *Blood* 86, 2494–2499
 25. Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., and Hayakawa, T. (2003) *J. Cell. Physiol.* 195, 119–129
 26. Hur, J., Yoon, C. H., Kim, H. S., Choi, J. H., Kang, H. J., Hwang, K. K., Oh, B. H., Lee, M. M., and Park, Y. B. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 288–293
 27. Yoon, C. H., Hur, J., Park, K. W., Kim, J. H., Lee, C. S., Oh, I. Y., Kim, T. Y., Cho, H. J., Kang, H. J., Chae, I. H., Yang, H. K., Oh, B. H., Park, Y. B., and Kim, H. S. (2005) *Circulation* 112, 1618–1627
 28. Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 2494–2502
 29. Drachman, J. G., Sabath, D. F., Fox, N. E., and Kaushansky, K. (1997) *Blood* 89, 483–492
 30. Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu, N. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 8329–8337
 31. Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., and Singh, R. K. (2003) *J. Immunol.* 170, 3369–3376
 32. Mizukami, Y., Jo, W. S., Duerr, E. M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M. A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L. R., Kohgo, Y., Lynch, M. P., Rueda, B. R., and Chung, D. C. (2005) *Nat. Med.* 11, 992–997
 33. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., and Murphy, W. J. (2000) *Blood* 96, 34–40
 34. Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., and Heibel, R. P. (2000) *J. Clin. Investig.* 105, 71–77
 35. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2002) *Circulation* 106, 3009–3017
 36. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3422–3427
 37. Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. M., and Asahara, T. (2001) *Circulation* 103, 634–637
 38. Kirito, K., Fox, N., Komatsu, N., and Kaushansky, K. (2005) *Blood* 105, 4258–4263
 39. Kelemen, E., Cserhati, I., and Tanos, B. (1958) *Acta Haematol. (Basel)* 20, 350–355
 40. Yamamoto, S. (1957) *Acta Haematol. Jpn.* 20, 163
 41. Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Uchida, E., and Hayakawa, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25471–25480
 42. Yamaguchi, T., Mukasa, T., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., and Hayakawa, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 15575–15581
 43. Miyamoto, K., Nishigami, K., Nagaya, N., Akutsu, K., Chiku, M., Kamei, M., Soma, T., Miyata, S., Higashi, M., Tanaka, R., Nakatani, T., Nonogi, H., and Takeshita, S. (2006) *Circulation* 114, 2679–2684
 44. George, J., Afek, A., Abashidze, A., Shmilovich, H., Deutsch, V., Kopolovich, J., Miller, H., and Keren, G. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2636–2641

Gene Therapy Discussion Groupの動向について**

山 口 照 英*

医薬品研究 Vol. 38, No. 2 別刷 (2007年)

財団法人 日本公定書協会

Gene Therapy Discussion Group の動向について**

山 口 照 英*

1. 横浜会議とこれまでの経緯 (Table 1)

遺伝子治療薬は、まだ製品が世の中に出ておらず、ICHにおいても他のEWGと異なる取組みをしています。

本稿では、これまで遺伝子治療専門家会議で行われてきた活動について概説すると共に、横浜会議で取り上げた三つのテーマについて説明します。

一点目は、各極の遺伝子治療に関する最近の進展について、横浜会議で報告し、議論したことがあげられます。

二点目は、この遺伝子治療専門家会議で議論を続けています見解案 (Considerations) についてです。横浜会議ではこの「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列の意図しない伝達リスクを最小にするための方策」見解案のDraft 3の議論を行いました。

三点目は、遺伝子治療の専門家会議で今後取り上げるべき課題についてです。横浜会議で今後の課題について議論し、ステアリングコミッティにいくつかの課題を提案し、了承を得ました。

2. 遺伝子治療について

遺伝子治療とは、様々な遺伝子的疾患あるいは重篤な疾患に対し、目的遺伝子を患者の体内にあるいは体外で患者の細胞に導入して行う治療です (Fig. 1)。

遺伝子治療専門家会議では、例えば新聞で報道されたフランスでの白血病様症状の発症など、有害事象が起きた場合、どのように対処するかも含め、その時点でのサイエンティフィックな到達点に基づき、サイエンスベースのrecommendationを出すといった取組みを行っています。

2.1 遺伝子治療の対象疾患

遺伝子治療の対象疾患は、Table 2に示すように重篤な遺伝性疾患、がん、血管の疾患あるいは神経病などがあげられます。

2.2 遺伝子治療の光と影 (Table 3)

遺伝子治療は、当初なかなか治療効果は得られませんでした。最近になっていくつかの画期的な成果が得られるようになってきました。

例えば、フランスで行われた重度の免疫不全症であるX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞の遺伝子治療において、10人中9人に著効が得られました。この結果、今まで無菌室でしか生活できなかった子供が室外に出られるようになった画期的な治療成果です。その他同じような重度免疫不全症であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症でも有効な治療成績が得られています。更に、最近では白血球による殺菌機能が欠損している慢性肉芽腫症 (CGD) という遺伝子疾患についても、遺伝子治療で極めて有望な結果が得られています。

上記三例は先天性遺伝子疾患ですが、これらは導入効率の上昇等の進歩により、非常に著効が得られるようになった事例です。

一方、影の部分として重篤な副作用の発現があります。例えば、アメリカのペンシルベニア大学では1999年に遺伝子治療においてアデノウイルスベクターを所定以上に大量に投与したために死亡した例があり、これを受けて、アデノウイルスベクターの投与量あるいはベクター粒子数の上限が設定されるようになりました。

また、2002年から、フランスのネッカー病院で、レトロウイルスベクターを用いたX-SCID遺伝子

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 当協会主催の第14回ICH即時報告会 (平成18年7月26日) における講演による。

Table 1 遺伝子治療専門家会議横浜会議とこれまでの経緯

- 遺伝子治療専門家会議のこれまでの活動
- 横浜会議で取り上げられたテーマ
 - 各極の遺伝子治療に関する進展
 - ICH 見解案「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」Draft3の議論
 - 今後取り上げるべき課題

Table 2 遺伝子治療の対象疾患

- 重篤な遺伝性疾患、がんその他の生命を脅かす疾患又は身体の機能を著しく損なう疾患
- 先天性遺伝子疾患（単一遺伝子疾患）：ADA欠損症、X-SCID、血友病、筋ジストロフィーなど
 - ガン：肺ガン、腎ガン、前立腺ガン、食道ガン、脳腫瘍、黒色腫など
 - 末梢性血管疾患：閉塞性動脈硬化症など
 - 虚血性心疾患：狭心症、心筋梗塞など
 - 神経変性疾患：アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）など
 - ウイルス感染症：HIV、B型、C型肝炎ウイルスなど
 - 生活習慣病、慢性疾患：糖尿病、関節リウマチなど

治療で、遺伝子の染色体挿入が原因となり3名にT細胞白血病様症状が発症しました。

このような重篤な有害事象が起こることもあり、遺伝子治療はまだ医療として十分に確立していないといえます。このため、有効性、安全性を慎重に検

Table 3 遺伝子治療の光と影

成功例

- X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）に対する造血幹細胞遺伝子治療（レトロウイルスベクターでIL-2R コモンγ鎖を導入）により10人中9人に著効
- アデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）に有効
- 慢性肉芽腫症（CGD）の遺伝子治療で極めて有望な結果

重篤な副作用の発現

- 1999年 アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡（米・ペンシルベニア大）
- 2002年 レトロウイルスベクターによるX-SCID遺伝子治療で遺伝子の染色体挿入が原因となり3名にT細胞白血病様症状発症（仏・ネッカー病院）
- 遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある

討する必要があるとの姿勢で遺伝子治療専門家会議は行われています。

3. ICH 遺伝子治療専門家会議（GTDG）

2001年5月のICHのステアリングコミッティにおいて、遺伝子治療薬などの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性がある新しい科学的知見に関する情報について、ICH各極間での情報の交換及び共有を積極的に継続して行う必要があるとの認識の

遺伝子治療薬(ベクター)の直接投与

遺伝子導入細胞の投与

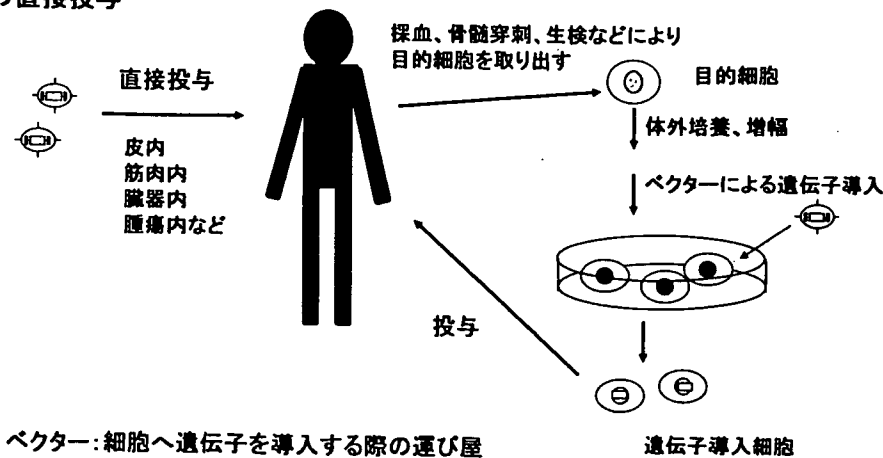


Fig. 1 遺伝子治療とは

と、遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group; GTDG) が ad hoc に新設されました。他の専門家作業グループのように EWG ではない理由は、EWG はガイドラインを作る時に立ち上げる専門家作業グループですが、現時点ではガイドラインに取り上げる取組みをしていないため、遺伝子治療専門家会議となりました。現時点での参加メンバー (Table 4) には、ICH 3 極 6 グループに EFTA とカナダが加わっています。

3.1 遺伝子治療専門家会議の活動 (Table 5)

1997 年及び 2001 年の ICH 会議のバイオテクノロジー専門家会議において遺伝子治療の問題が取り上げられ、2002 年に初めて遺伝子治療専門家会議が正式に発足しました。その後 2003 年は大阪での ICH6, 2004 年はワシントン, 2005 年はブリュッセルとシカゴで遺伝子治療専門家会議が開催されました。

3.2 遺伝子治療専門家会議の目的 (Table 6)

遺伝子治療専門家会議の目的の一つは、遺伝子治療分野は非常に急速に進展しているため、その科学的事項について調査・検討することです。

二つ目は、遺伝子治療用医薬品に関する規制の国

Table 4 ICH 遺伝子治療専門家会議参加メンバー

Klaus Cichutek (EMEA), Stephanie Simek (FDA), Teruhide Yamaguchi (MHLW), Christine-Lise Julou (EFPIA), Wataru Toriumi (JPMA), Alex Kuta (PhRMA), EFTA, Canada

Table 5 ICH 遺伝子治療専門家会議の活動

1997 年ブラッセル:
バイオテクノロジー専門家会議
2001 年東京・舞浜:
バイオテクノロジー専門家会議
2002 年ワシントン:
遺伝子治療専門家会議として正式に発足
2003 年大阪 (ICH6): 遺伝子治療専門家会議
2004 年ワシントン: 遺伝子治療専門家会議
2005 年ブラッセル: 遺伝子治療専門家会議
2005 年シカゴ: 遺伝子治療専門家会議

際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般の原則をあらかじめ公表することです。

三つ目は、ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための社会に向けた新しいコミュニケーション手段として、インターネット等を利用して公開することです。

例えば 2002 年, 2003 年及び 2005 年に公開ワークショップを開催しています。2005 年は、後述する腫瘍溶解性ウイルスに関する公開ワークショップを開催しています。

また、ICH のステアリングコミッティで遺伝子治療専門家会議の公式声明を発表し、その時点での到達点を公開します。更に誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療のホームページを開設し、これを ICH 事務局のホームページ内に開設する了解を得て公開しています。国立医薬品食品衛生研究所 (衛研) の遺伝子細胞医薬部のホームページでは、これを日本語に仮訳して掲載しています。更にこの衛研のホー

Table 6 ICH 遺伝子治療専門家会議の目的

- 研究が進められている科学的事項について調査・検討
 - 遺伝子治療用医薬品に関する規制の国際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般の原則を予め積極的に提示
 - ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための、社会に向けた新しいコミュニケーション手段を開発
- 例: ICH 遺伝子治療公開ワークショップの開催
- 2002 年 9 月, 2003 年 11 月, 2005 年 11 月に開催
ICH SC を介しての ICH GTDG 公的声明の発表
誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療ホームページの開設
 - ICH 事務局ホームページ内 (英語):
www.ich.org/cache/html/1386-272-1.html
国立衛研 遺伝子細胞医薬部ホームページ内 (日本語):
www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/index1-j.html

ムページでは、日本における遺伝子治療の状況について厚生労働省の厚生科学課の協力を得ながら英語で公開し、国際的な情報共有の場としても役立っています。

3.3 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

過去に遺伝子治療専門家会議は専門家会議として発足して6回、合計8回の会議を開きました。その中で取り上げられたトピックをTable 7に示します。

1点目は遺伝子治療で用いるウイルスあるいはウイルスベクターの体外への放出について、患者だけでなく患者をケアする人や患者の家族も遺伝子ベクターが伝播される可能性があるため、どのように検出して防げば良いかの議論です。

2点目は、遺伝子治療のベクター作成時における増殖性の replication confident virus (RCV) の混入についての議論です。

3点目は、Viral SheddingあるいはRCVの測定には適切な参照品が必要なため、現在、アデノウイルス5型の参照品が作られています。この参照品の有用性やどのように利用すべきかについての議論です。

4点目は、生殖腺への遺伝子治療ベクターの伝達に関するリスクを最小にするための方策についての議論で、2005年に見解案としてまとめることが方針とされました。

5点目は、前述したフランスでの事例のように、染色体挿入変異による癌化などのリスクについての評価や評価法についての議論です。

6点目は、腫瘍溶解性ウイルスについて、臨床あるいは非臨床のあり方、あるいは特性解析や品質管

Table 7 ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

- Viral Shedding from patients
- Detection of RCV (RCA or RCR)
- Reference Materials (Adenovirus type5)
- Minimize of the Risk of Germline transmission
- Insertional mutagenesis
- Oncolytic virus (Workshop)
- Long term follow up (FDA Guideline 案)
- Lentiviral vector (EMEA Guideline 案)

理をどのように行うべきかについての議論です。

それ以外には、FDAのLong term follow upあるいはEMEAのLentiviral vectorといった各極のガイドライン案について議論し、各極からのコメントが作成されたガイドラインに取り込まれています。

4. 横浜会議

4.1 遺伝子治療をめぐる各極の最新情報 (Table 8)

EUからは、非常に有効な成績が得られているレトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD) の治療において、スイスとドイツで3名の患者の治療が行われ、そのうちの1名が遺伝子治療の効果が現れる前に原疾患 (感染症) により死亡したことが報告されました。EUは、これは副作用ではないと判断していますが、EFTAでは詳しい情報が得られるまでは、CGDの臨床研究は一時凍結していることが報告されました。

FDAは、臨床研究における遅発性の副作用、すなわちLong termのフォローアップに関するガイドラインを近々発出する予定で、これについていくつかのコメントを提出しました。

また、前述したアデノウイルスベクターの参照品は、遺伝子治療の品質あるいはViral Sheddingを測定するために推奨していますが、その安定性試験

Table 8 遺伝子治療を巡る各極の最新情報

- EU: レトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD: 好中球の活性酸素生成酵素の異常により殺菌能が欠損し、重篤な感染症を繰り返す) の遺伝子治療での死亡例についての現在の見解。スイスとドイツで3名の患者に本遺伝子治療が行われたが一名の患者が死亡。十分な機能回復が得られる前の原疾患 (感染症) による死亡。副作用ではないとの判断。
- EFTA: CGDの臨床研究については詳しい情報が得られるまで一時凍結
- FDA: 臨床研究における遅発性の副作用のフォローアップに関するガイドラインを発出する予定。遺伝子治療用アデノウイルスベクターの参照品の長期安定性に関する情報: -80°Cで50ヶ月の安定性を確認
- Japan: ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて報告。現在まで、ガン化等の重篤な副作用は見られていない

Table 9 ICH遺伝子治療専門家会議見解(案)「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」

報告担当者 (1st)	: Markku Pasanen (EMEA)
同 (2nd)	: Teruhide Yamaguchi (MHLW)
同 (3rd)	: Dan Takefman (FDA)
• 2005年10月	: 欧州医薬品庁が第1次案を作成. 各極に配付
• 2005年11月	: 各極から寄せられた事前コメントを基に, GTDG会議で第2次案を作成
• 2006年1月	: 第2次案に対する各極からのコメントを切り取り(コメントとりまとめ: MHLW) → 第3次案を作成
• 2006年6月	: 横浜 GTDG 会議で検討 → 第4次案を作成
• 2006年7月	: Draft4に対するコメント締め切り (予定)
• 2006年9月	: Draft5作成 (予定)
• 2006年10月	: シカゴ GTDG 会議で Draft5 の検討. 最終案の作成 (予定)

の結果が報告されました。

日本は、北海道大学で行われた ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて、現在までのところガン化等の重篤な副作用は見られていないと報告しました。

4.2 生殖細胞への挿入リスクの問題について (Table 9)

ICH GTDG 見解案は後述しますように、題名が変更されております。

「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則」の最初の見解案は EMEA が作成、次に筆者が Draft 3 を作成し、現在は FDA に交代しています。ほぼ大きな論点はなくなっていますので、2006 年度中に最終案にする予定です。

これまでの経過は Table 9 に示すように、2005 年 10 月に EMEA が第 1 次案作成、11 月のシカゴ会議で各極から寄せられたコメントを基に第 2 次案を作成、更に第 2 次案に対する各極のコメントを基に第 3 次案を作成し、横浜会議ではそれを検討して第 4 次案を作成しました。

現在は第 4 次案のコメントを求めているところで、7 月中に締め切り、FDA に送付することとなっています。

5. 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

5.1 構成

Table 10 に示すように最初に序論があり、次にリスクに影響する因子として、ベクターの種類、投与量、及び投与方法や投与部位について記載されています。3 番目には非臨床試験で実施すべきこととして一般的考慮事項と生体内分布試験について記載され、4 番目は何らかのリスクが想定される場合、患者に対するモニタリングをどのように行っていくべきかが記載されています。

5.2 見解案議論の主なポイント (Table 11)

この見解案のタイトルについては、最初は transmission という言葉を用いて「伝達リスク」という

Table 10 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスク評価における原則

- 序論
- 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組込みリスクに影響する因子
 - ・ベクターの種類
 - ・投与量
 - ・投与方法や投与部位
- 非臨床試験
 - ・一般的考慮事項
 - ・生体内分布試験
- 患者のモニタリング
- 用語

Table 11 見解案議論の主なポイント

- 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策 (Draft3)
 - ↓
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞（染色体）への組込みリスク評価における原則 (Draft4) (遺伝子改変が次世代へ及ぶことを防止するための方策に限定することを明記)
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞（染色体）への組込みリスクに影響する因子
 1. 生体内分布様式, 増殖特性, 組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できる
 2. リスクは次の順で低くなる
 - ① 搭載遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクター
 - ② 搭載遺伝子を核内へ送達するが, 染色体への組込み機能を持たないベクター (非ウイルスベクターを含む)
 - ③ 搭載遺伝子を核内へ送達せず細胞質にのみ局在
 - ④ 体外で遺伝子導入された細胞 (非増殖性ベクター)
 3. 投与量, 投与方法, 投与部位
 - 非臨床試験
 1. 非臨床試験のデザインに関しては, ICH M3 や ICH S6 などの他の GL のスコープには含まれないが, 基本原則は適用できるかもしれない。
 2. 生体内分布試験
 - ・ 生体内分布試験では, 生殖腺への分布を試験すること
 - ・ 生殖腺への分布の検出に当たっては, 定量的 PCR 等の適切な感度をもつ試験法を用いて試験すること
 3. 生殖腺への分布が認められたときにはそのシグナルが持続性があるかを試験すること. 持続性が認められたときには, 生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにすること
 - 患者のモニタリング

非臨床試験において生殖腺に一過性のベクターシグナルが認められたときには, 臨床試験において患者の精子への伝達が無いかモニタリングすることが推奨される

言葉を用いていましたが, 基本的に遺伝子治療用ベクターの生殖細胞の染色体への組込みリスクにおける原則, つまり次世代へ影響が及ぶことを避けるといったことに限定することとし, 例えば卵子の染色体外にベクターが入った場合にも発生に影響が及ぶ可能性があります, それについて発生活性あるいは他の非臨床的試験でカバーすべきであるといったことを明記しています。

5.2.1 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞（染色体）への組込みリスクに影響する因子

染色体への組込みリスクに影響する因子として, ベクターの生体内分布様式, 増殖特性, あるいは組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できます。

リスクの分類として最も高いのは, 遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクターです。

2番目は, 核内には送達するけれども, 通常は組込み能がなく, 高濃度に存在すると組込みが行われ

る場合です。

3番目は遺伝子を核内に送達せず, 細胞質のみに局在する場合です。例えばセンダイウイルスベクターを用いた場合は, ここに該当します。

4番目は体外で遺伝子導入された細胞で治療を行い, かつ非増殖性ウイルスベクターを使う場合で, 非常にリスクは低く, 生殖細胞への組込みリスクに関する非臨床試験を行う必要はないと考えられます。

その他に投与量, 投与方法及び投与部位がリスクに関与します。

5.2.2 非臨床試験 (Table 11)

5.2.1 で述べたようなリスクに基づいて非臨床試験をデザインします。

デザインに関しては, ICH M3 や S6 など他のガイドラインのスコープには含まれません。ただし基本原則については, 適用できる可能性もあると考えています。

遺伝子治療ベクターでは, 当然生体内分布試験が行われます。その試験においては, 必ず生殖腺への分布も試験することが求められます。生殖腺への分

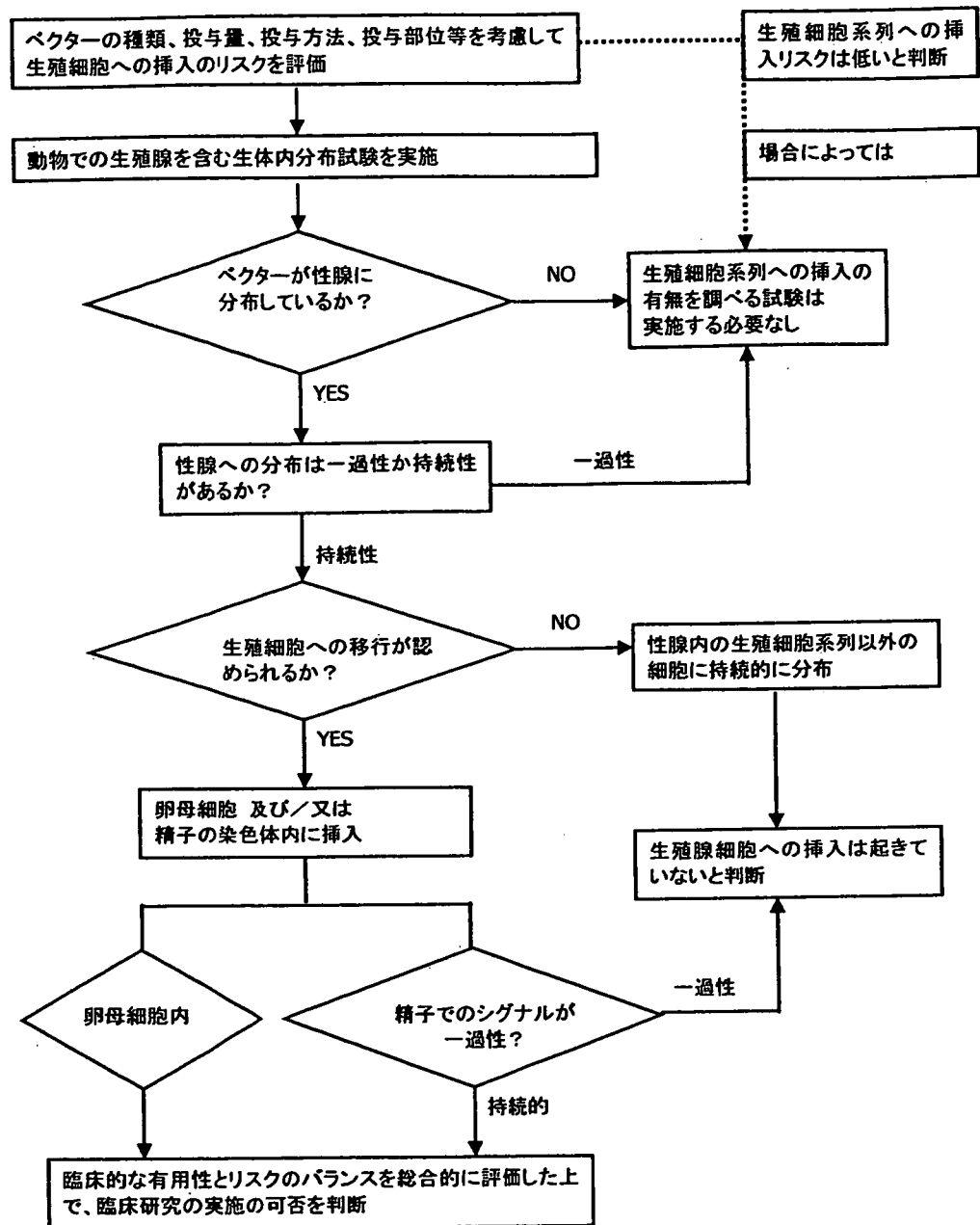


Fig. 2 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への組込みの有無を調べるための動物試験のフロー（案）

布を試験するに当たっては、定量的PCR等の適切な感度を持つ試験法を用いて試験をすることが求められます。

生殖腺への分布が認められた場合、そのシグナルに持続性があるかどうかを試験し、持続性が認められれば更に生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにします。これをフローチャートで表

すと、Fig. 2 のようになります。

まずはベクターに応じてリスクを評価します。生殖細胞への挿入リスクが低いと判断された場合は、もともと生殖細胞の挿入リスクがないと考え、試験を実施する必要がない場合もあります。しかし生体内分布試験を実施してベクターが性腺に分布しないのであれば、それ以上の試験は必要ありません。こ

の評価を全ての製品について行わなければならないについては、例えば対象が非常に高齢であったり、重篤な患者に限定される場合は、次世代への影響を考慮する必要がないことから、試験を実施する必要はないことが記載されています。

一方、ベクターが性腺に分布していた場合は、性腺の分布が一過性か持続性を判断し、一過性であれば組み込みは起きていないと判断できますが、持続性であって、かつ生殖細胞に移行した場合は、精子の染色体内に行っているかどうかを試験し、精子でのシグナルが一過性であれば、生殖腺細胞への挿入は起きていないと判断できます。一過性でない場合、よほどの理由がない限り臨床試験は実施できないこととなります。ただし、先ほど述べたように次世代への影響が起るような患者を対象としていない場合は判断が変わってきます。

5.2.3 患者のモニタリング (Table 11)

非臨床試験において、生殖腺内に例えば一過性のベクターシグナルが認められた場合は、臨床試験において患者の精子への伝達が無いか、特に精子の成熟サイクルの期間を越えて試験をすることが推奨されます。

6. 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定 (Table 12)

ICH 見解の策定を次の二つについても行うべきではないかと議論しました。

まず、「腫瘍溶解性ウイルス」について、2005年のシカゴ会議でオープンワークショップを行った成果を基に ICH としての見解案、もう一つは、ウイルスやウイルスベクターの体外への放出の評価についても見解案を作成すべしどうかといった意見が出ました。

更に、ICH7 での活動予定についても議論をしま

Table 12 ICH 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定

- ICH GTDG 今後の活動予定
 - ・ ICH 見解の策定
 - ・ ICH 見解「腫瘍溶解性ウイルス」
 - ・ ICH 見解「ウイルス/ベクターの体外放出評価」
 - ・ ICH7 での活動予定

した。

6.1 腫瘍溶解性ウイルス

非増殖性のウイルスを用いたがん治療においては、腫瘍部位にベクターが入った部分のみがん細胞は死に、入っていない部分は生き残ります。ところが腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞でのみ増殖できる性質を持っており、がん細胞を破壊し、更に隣のがん細胞も破壊して増殖していくという制限増殖型ウイルスです¹⁾。

世界的に見ると、腫瘍溶解性ウイルスはアメリカ、カナダ、ヨーロッパで多くの製品の開発が行われています。国内では遺伝子治療としてはまだ行われていませんが、野生型あるいは弱毒化されたウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は行われています。名古屋大学で行われている例を Table 13 に示します。

それ以外にも動物実験の段階のステージにある製品を Table 13 に示しています。これらはほとんどが遺伝子組換えのウイルスのタイプです。

6.2 ICH 腫瘍溶解性ウイルスワークショップ (Table 14)

2005年にシカゴにおいて、腫瘍溶解性ウイルスのワークショップが開催されました。その目的は、腫瘍溶解性ウイルスについて以下のような臨床開発に関連する問題点を整理し、意見交換を行うことです。

問題点の一つ目は、腫瘍溶解性ウイルスには、野生型、弱毒型、遺伝子組換え型がありますが、それぞれどのような設計に基づき腫瘍に特異的に作用するかについての検討です。

二つ目は、非臨床試験の有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討です。

三つ目は、腫瘍選択性で、例えば腫瘍にのみ発現しているタンパク質や発現が抑えられているタンパク質をターゲットにしたり、若しくは腫瘍細胞に特異的に発現している抗原をターゲットにするといった選択性が検討されています。

四つ目は、臨床での安全性で、患者体内であれば生きたウイルスが存在し続けることも含めた安全性をどのように評価するかの検討です。

五つ目は、安全性、投与量、あるいはその有効性を評価するためには適切な動物モデルを策定しなければなりませんので、モデル動物の開発についてです。

Table 13 国内開発中の腫瘍溶解性ウイルスの例（2005年4月現在）

<臨床研究段階>

ウイルスの種類	ウイルスの名称	ウイルスの特徴	実施施設/企業名	対象疾患	実施状況	症例数	治験
変異単純ヘルペスウイルス	HF10	弱毒型の自然変異株*	名古屋大学医学部附属病院	皮膚又は皮膚に再発した乳がん	2003年に臨床研究終了	6	—
				頭頸部がん	2004年に臨床研究開始	5 (予定)	
				進行性膵臓がん	2005年に臨床研究終了	6	
				大腸がん, 乳がん	動物実験	—	

*：天然型ウイルスのため、実施前に「遺伝子治療臨床研究指針に関する指針」に基づく厚生労働大臣の確認は不要。また、カルタヘナ法に基づく第一種使用規程承認申請も不要。

<動物実験段階>

ウイルスの種類	実施施設/企業名	対象疾患
遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス	大阪府立成人病センター	平滑筋肉腫
	愛知県がんセンター	卵巣がん
	東京大学医学部	グリオーマ, 前立腺がん
	慶應義塾大学医学部	脳腫瘍, 前立腺がん, 膀胱がん
	九州大学医学部	胆嚢がん, 胆道がん
	和歌山県立医科大学	前立腺がん, 腎がん, 卵巣がん, 乳がん
遺伝子組換えヒトアデノウイルス	岡山大学医学部/オンコリス・バイオファーマ	大腸がん, 非小細胞肺癌
	東北大学医学部	膵臓がん, 膀胱がん
		非小細胞肺癌
	筑波大学	胆嚢がん, 胆道がん
	愛媛大学医学部	卵巣がん
		グリオーマ
	千葉県立がんセンター	肝がん, 肝細胞がん
札幌医科大学	大腸がん, 肝がん	
遺伝子組換えセンダイウイルス	ディナベック	大腸がん, 線維肉腫
レオウイルス3型	大分大学医学部	膵がん, 同腹膜転移

(www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/secl/oncltc_v/oncltc-j.html)

Table 14 ICH腫瘍溶解性ウイルスワークショップ2005年シカゴ

● 目的

腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する以下のような問題点を整理し、フロアーも含めて積極的に意見交換を行う。

- ・腫瘍溶解性ウイルスの設計（野生型, 弱毒型, 遺伝子組換え型）
- ・非臨床試験での有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討
- ・腫瘍選択性
- ・臨床での安全性
- ・適切な動物モデル
- ・体外からの排出（測定法, 実測データ）

六つ目は、先ほど述べたように長期にわたる体外からの排出をどのように測定し、評価するかについての検討です。

ワークショップでは、世界各国から約10人の演者が講演し、それぞれの発表についての議論を取りまとめ、そのアウトプットとして見解案を作成しようと考えています。

6.3 Viral Shedding (Table 15)

2002年に開催された第1回遺伝子治療ワークショップにおいて、viral sheddingについての議論を行いました。

アデノウイルスベクターの体外への放出について

Table 15 Viral Shedding

- 第1回遺伝子治療ワークショップで viral shedding についても議論 (2002年)
 - アデノウイルスベクターの体外への排出 (Shedding)
 - ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は現在までのところ確認されていない
 - アデノウイルス5型国際標準品
 - アデノウイルス5型国際標準品を使用することによって、異なる施設/研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となる。これにより、用量依存的な毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかにすること、及び遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中に含まれる増殖性アデノウイルス (RCA) の真の定量値を求めることが可能となるであろう。
- 2008年 (?) ICH7で virus/vector shedding について総合的に議論 (予定)

Table 16 ICH遺伝子治療専門家会議の将来的課題

- Viral Shedding
 - 測定法の確立・安全性評価。
- ウイルスベクター標準品
 - レンチウイルス (?)
- Insertional Mutagenesis
 - 挿入部位の高感度測定法開発。挿入部位が特定出来るより安全なベクターの開発。
- 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価

は、安全性上の問題は今までのところ確認されていません。しかし、正確な評価をするためには参照品が必要ですので、アデノウイルス5型の国際標準品を使用することによって、異なる施設、若しくは研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータを科学的に比較することが可能になること等について議論しました。

更に今のところ決定されているわけではないのですが、2008年にICH7が開催される場合に Viral/Vector Shedding に関する議論を再度行い、それに

Table 17 ICH GTDG国内メンバー (於横浜会議)

MHLW	JPMA
国立医薬品食品衛生研究所	日本製薬工業協会
● 山口照英	● 鳥海互
● 内田恵理子	● 小澤健夫
医薬品医療機器総合機構	● 井上誠
● 荒戸照世	● 竹迫一任
● 前田大輔	● 玄番岳踐
	● 田中舞紀

基づいて見解案を策定することをステアリングコミッティに申請しました。

7. GTGD の将来的課題 (Table 16)

遺伝子治療専門家会議の将来的課題の一つ目は、先ほど述べた Viral Shedding について、測定法が十分確立されていませんので、今後検討していく必要があります。

二つ目は、ウイルスベクター標準品について、レンチウイルス、AAV (アデノ随伴ウイルス)、又はそれ以外のウイルスについて標準品が必要かどうかを検討し、必要であればどのように作成して、どのように利用するかを検討する必要があります。

三つ目は、Insertional Mutagenesis を評価するために挿入部位についての高感度測定法の開発があげられます。現在のところ専門家会議の議論でも確定的な方法はなく、複数の方法を取り合わせることによって推論するしかないとされており、より適切な方法を開発したり、あるいは挿入部が特定できるような安全なベクターの開発が望まれています。

四つ目は、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価に関しては、見解を取りまとめる中で明らかにしたいと考えています。

最後に ICH 横浜会議に参加した MHLW, JPMA のメンバーを Table 17 に示し、謝意を表したいと思います。

文 献

- 1) Estuardo Aguilar-Cordova: *Nature Biotech.*, 21, 756-757 (2003).

臨床とウイルス別刷
第35巻第4号
2007年10月10日 発行
日本臨床ウイルス学会

遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

石井(渡部)明子, 山口 照 英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

1. はじめに

ゲノムプロジェクトの成果やバイオテクノロジー、発生学、幹細胞学などの科学・技術の飛躍的な発展を受けて、遺伝子治療薬や細胞治療薬（再生医療）の開発が大きく進んでいる。遺伝子治療では、ベクターや遺伝子導入方法、周辺技術の改良や知識の集積などによって、一部の先天性遺伝子疾患に関してはめざましい治療効果が見られるようになってきている。また、ガン細胞で特異的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する腫瘍溶解性ウイルスなど、これまでの遺伝子治療用ベクターとは全く発想の異なる技術開発も行われるようになってきている。さらには、siRNA や miRNA による遺伝子発現制御の発見を受け、タンパク質発現を目的としない RNA 転写のみを目的とするベクターの開発も進んでいる。

一方、細胞治療（再生医療）の開発研究では、国内では200を超える臨床研究や治療薬の開発が進んでおり、国際的にも多様な治療薬の開発が先進国のみならず、ASEAN 諸国を始め様々な国で開発研究が進められている。EU では加盟国独自の規制から欧州医薬品庁での中央審査に移行する動きが始まっており、規制状況も大きく変わろうとしている。

本総説では、遺伝子治療薬や細胞治療薬などの先端技術医薬品の開発動向を含め、このような先端医薬品のウイルス安全性確保の問題点や

その解決のための技術開発について概説する。

2. 遺伝子治療薬の開発とウイルス安全性

1990年に世界で最初のアデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）の遺伝子治療が開始され、患者の細胞を遺伝子改変して治療を行うというまったく新しい治療法が世に出された¹⁾。それ以降、世界中で非常に多種多様な遺伝子治療臨床研究が実施されてきている（図1）。このような遺伝子治療薬の開発動向を受け、欧米や日本でも遺伝子治療薬の品質・安全性・有効性を確保するための指針が制定された²⁻⁵⁾。これらの指針の中で、遺伝子治療薬のウイルス安全性確保に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* ウイルス迷入試験やヒト由来細胞を用いる場合の各種ヒトウイルス否定試験、製造（培養）に用いる血清や動物由来因子の安全性試験などについて言及している。さらに、ベクター製造に用いられるセルバンクシステムに関しては日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）で策定された ICH-Q5A ガイドライン「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」⁶⁾ に基づいた評価が求められる。本稿では、遺伝子治療薬のウイルス安全性に関する基本的事項に関しては各ガイドラインを参考にされるものとして、現在 ICH 等で議論されている遺伝子治療薬のウイルス安全性に絞って概説することとする。

遺伝子治療臨床研究は、当初は、遺伝子挿入

Viral Safety of Gene therapy and Cell Therapy Products

Eriko UCHIDA, Division of Cellular and Gene Therapy Products

Akiko ISHII-WATABE, Teruhide YAMAGUCHI, Division of Biological Chemistry and Biologicals

National Institute of Health Sciences

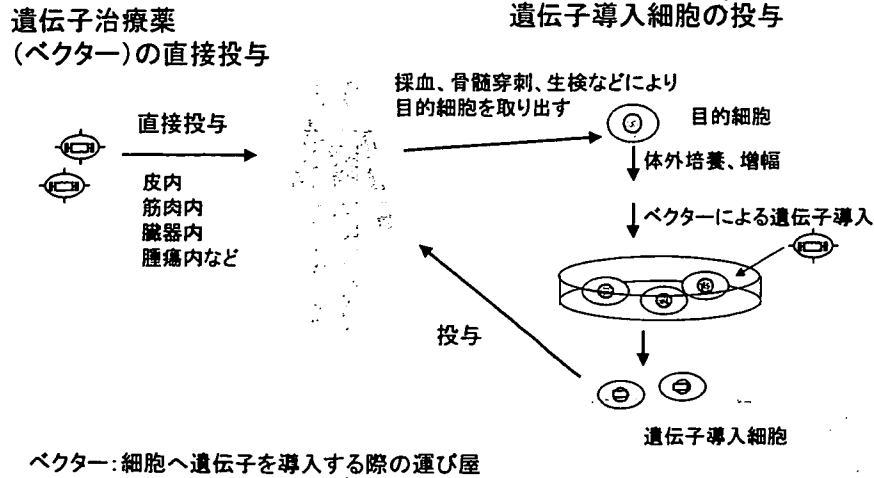


図1 遺伝子治療とは

表1 ICH 遺伝子治療専門家会議 (GTDG)

2001年5月 ICH SC

「遺伝子治療用医薬品など急速に進展している領域においては、特にその種の製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性のある新しい科学的知見に関連する情報について、ICH 各極間での情報の交換/共有を積極的に継続して行う必要がある」



ICH 内に、遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group ; GTDG) を新設

Klaus Cichutek (EMEA), Stephanie Simek (FDA), Teruhide Yamaguchi (MHLW), Christine-Lise Julou (EFPIA), Wataru Toriumi (JPMA), Alex Kuta (PhRMA), EFTA, Canada

変異等の安全性に関するさまざまな懸念から、有効性よりも安全性に重点を置いて実施されてきた。しかし、実際に多くの遺伝子治療臨床研究が開始されると、当初危惧された挿入変異やさまざまな安全性に関連する有害事象はほとんど認められず、力点が有効性に移るようになった。特に、多くのケースで目的とする臨床効果が得られないのは、用いた遺伝子治療用ベクターがコードする目的遺伝子からの発現が十分でなく、発現産物が少ないためと考えられるようになり、いかにして目的遺伝子を高発現するベクターを開発するかが重要なポイントと考えられるようになった。しかし、1999年に米国ペンシルベニア大学でのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、遺伝子治療薬の投与が原因で患者が急死するという初めての事故が発生し⁷⁾、遺伝子治療薬の品質や遺伝子治療の安全性確保が再度クローズアップされることとなった。

以上のような背景から、2002年に ICH の中に遺伝子治療薬の品質・安全性・有効性に関する様々な問題を科学的に討議するために遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group : GT-DG) が発足した (表1)。ICH における GT-DG の活動としては、周辺技術を含め急速に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページ等を通じて得られた議論の成果を広く公開すると共に、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで GT-DG で取り上げた話題について表2にあげたが、非常に多岐に渡る科学的課題について議論を行ってきた。

本稿では、特に ICH の GT-DG での議論を中心に、遺伝子治療薬を巡る最近の動向とウイルス安全性について概説するとともに、我々のデータについても紹介する。

表2 ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

- ・ Viral Shedding from patients
- ・ Detection of RCV (RCA or RCR)
- ・ Reference Materials (Adenovirus type 5)
- ・ Minimize of the Risk of Germline transmission
- ・ Insertional mutagenesis
- ・ Oncolytic virus (Workshop)
- ・ Long term follow up (FDA Guideline 案)
- ・ Lentiviral vector (EMA Guideline 案)

1) 遺伝子治療の光と影

ペンシルベニア大学でのアデノウイルスベクターを用いた先天性代謝疾患 (OTC 欠損症) の遺伝子治療で発生した死亡事故は、その事故原因について徹底的な解析が行われた結果、アデノウイルスベクターの動脈内への過剰投与による異常免疫反応が原因と結論された⁸⁾。この教訓から、アデノウイルス参照品を用いて治療に用いるアデノウイルスベクターの特性・品質管理を行うことが提案され、FDA および欧米の産官学で構成されるアデノウイルス参照品作業委員会 (Adenovirus reference material working group) により2002年にアデノウイルス5型参照品 (国際標準品) が策定された⁹⁾。この参照品を用いてアデノウイルスベクター製品の粒子数や感染力価を測定することにより、異なる施設/研究で測定されたウイルス粒子数および力価のデータ同士を科学的に比較することが可能である。

一方、1999年からフランスのネッカー病院で実施されたレトロウイルスベクターによる X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する遺伝子治療では、10例中9例で非常に有効な成績が得られ、遺伝子治療で初の成功例と報告された^{10,11)}。しかし治療から約3年後、遺伝子の染色体挿入が原因となり、2名の患児に T 細胞白血病様症状が発症するという重篤な副作用の発現が判明した¹²⁾。その後1名は白血病で死亡し、また3例目の発症も報告された。このような重篤な副作用の原因として、癌遺伝子である LMO2 領域への挿入変異が起きたことが一つの要因とされているが、イギリスで実施されている同様の遺伝子治療では、現在までこのような副作用は認められていない。しかし、現時点でもフォローアップが続いており、これらの原因の究明はかなり先にならざるを得ない¹³⁾。

注) その後4例目の白血病患者が出たとの報告があった。

このようなフランスでの X-SCID 遺伝子治療による重篤な副作用発現は、遺伝子導入効率の非常に高い遺伝子治療用ベクターや導入条件が開発されたためともいえる。表3に示すように、X-SCID や ADA-SCID¹⁾、さらには慢性肉芽腫症 (CGD) 遺伝子治療¹³⁾ で非常にめざましい治療効果が認められるようになり、無菌室でしか生活出来なかった患児が室外で生活出来るようになり、普通の学校生活を送れるようになってきている。すなわち遺伝子治療で患者が治癒出来る時代に到達したといえる。しかし、上記の

表3 遺伝子治療の光と影

成功例

- ・ X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療 (レトロウイルスベクターで IL-2R コモンγ鎖を導入) により10人中9人に著効
- ・ アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA-SCID) に有効
- ・ 慢性肉芽腫症 (CGD) の遺伝子治療で極めて有望な結果

重篤な副作用の発現

- ・ アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡 (米・ペンシルベニア大)
- ・ レトロウイルスベクターによる X-SCID 遺伝子治療で遺伝子の染色体挿入が原因となり3名に T 細胞白血病様症状発症 (仏・ネッカー病院)

遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある

ように安全性面からも遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず、有効性、安全性を慎重に検討する必要がある。

2) 遺伝子治療用ベクターに含まれる増殖性ウイルス検出

図2は世界で実施された遺伝子治療臨床研究の件数をベクターごとに分類したものである(ワイリー出版のデータ (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/>) を改変)。用いられるベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスが約半数を占めている。これらのウイルスベクターの作製においては、生産細胞内において相同組換えにより増殖能を持ったウイルスが出現する可能性がある。従って、遺伝子治療用ベクターの製造では増殖性ウイルスの試験

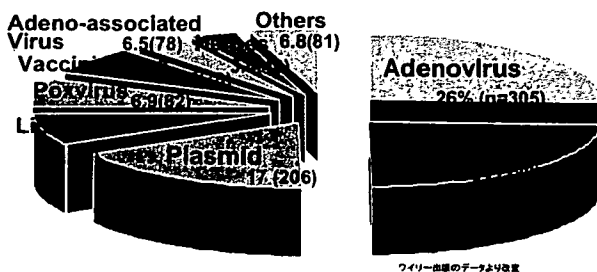


図2 世界の遺伝子治療臨床研究で用いられているベクターの種類

が必要とされている。

一方、このような治療用ベクターに存在する増殖性ウイルスの検出では、共存するベクターによって検出しようとする増殖性ウイルスの感染性試験が妨害されることが知られており、この点に充分配慮した試験を行う必要がある。

そこで、大量に存在するレトロウイルスベクターに混入する微量の増殖性レトロウイルスを検出するために、FDAのガイドライン¹⁴⁾では Mus dunni 細胞へ感染を繰り返す(通常5回継代を繰り返す)、ついで指標細胞である PG-4 (S+L-) 細胞へ感染させ、フォーカス形成を指標として検出する方法が示されている。しかし、この方法は結果が出るまで一ヶ月近くを要するため、我々は Mus dunni 細胞に感染後、培養上清に産生されてくるレトロウイルスを濃縮して定量的 RT-PCR 法にて検出する方法(感染性 PCR 法)を開発した(図3)。ウイルスの濃縮には、ポリエチレンイミン磁気ビーズ(PEI ビーズ)を用いることにより多くのモデルウイルスを吸着・濃縮出来ることを見いだしており^{15,16)}、本法でも PEI ビーズを用いた系を確立した。すなわち、レトロウイルスが含まれる Mus dunni 細胞の上清に PEI ビーズを添加し、PEI ビーズ吸着画分からレトロウイルスゲノムを抽

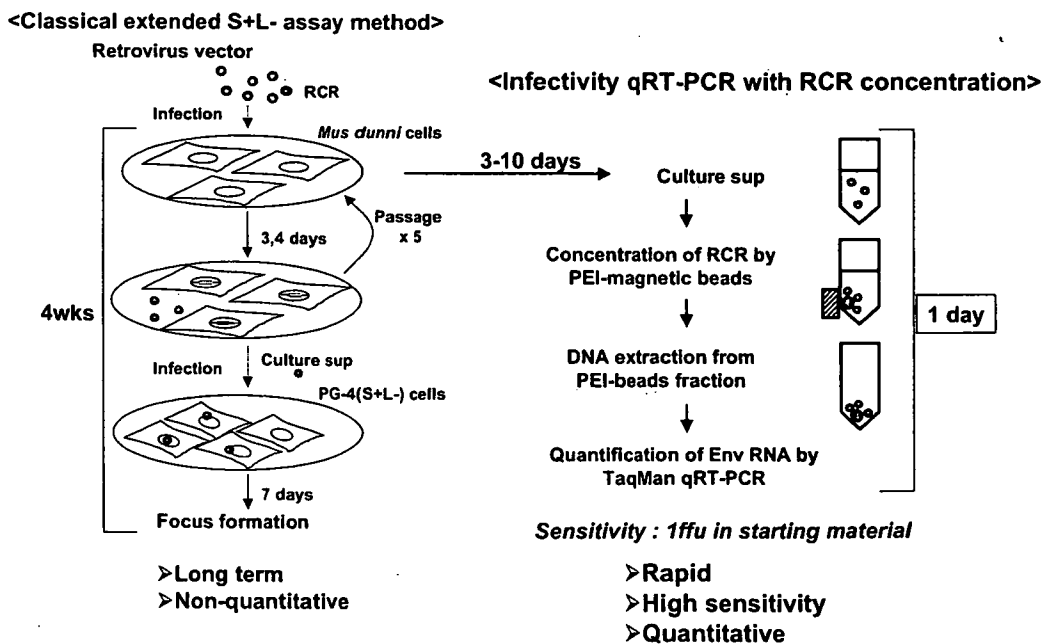


図3 感染性 PCR 法と S+L- アッセイ法の比較