

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 年 月 日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1
	名 称	(独) 国立成育医療研究センター TEL: 03-3416-0181、FAX: 03-3416-2222
	代 表 者 役職名・氏名	(独) 国立成育医療研究センター 総長 加藤 達夫 職印

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。


記

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 の 課 題 名	総括責任者の所属・職・氏名
慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした 遺伝子治療臨床研究	(独)国立成育医療研究センター研 究所成育遺伝研究部 部長 小野寺 雅史

平成 23 年 2 月 24 日

遺伝子治療研究倫理審査結果通知書

独立行政法人
国立成育医療研究センター総長 殿

遺伝子治療研究臨床研究審査委員会
委員長 大橋 十也 

審査課題 慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究

申請者 小野寺 雅史 (国立成育医療センター成育遺伝研究部長)

平成 22 年 12 月 20 日付にて審査を行った標記実施計画申請書について、当委員会の審査結果を下記のとおり報告します。

承認 条件付き承認 不承認 継続審査

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 概 要 書

平成 年 月 日	(申請年月日)
----------	---------

研 究 の 名 称	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究		
研 究 実 施 期 間	厚生労働大臣による承認の日より5年間		
総括責任者	所属部署の所在地	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 〒157-8535	
	所属機関・部局・職	国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝研究部・部長	
	氏 名	小野寺 雅史 印	
実施の場所	所 在 地	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 〒305-8576	
	名 称	国立成育医療研究センター病院 8 西病棟及び無菌室 国立成育医療研究センター研究所 5 階 5-2 遺伝子細胞調製室	
	連 絡 先	TEL: 03-3416-0181、FAX: 03-3416-2222	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所 属 機 関 ・ 部 局 ・ 職	役 割
	奥山 虎之	国立成育医療研究センター病院・部長	総括責任者の補佐、遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報等の収集、遺伝子カウンセリング
	藤本 純一郎	国立成育医療研究センター臨床研究センター・センター長	遺伝子治療臨床研究環境整備
	河合 利尚	国立成育医療研究センター研究所・室長	患者管理
	熊谷 昌明	国立成育医療研究センター病院・医長	造血幹細胞採取・導入細胞の患者投与
	森 鉄也	国立成育医療研究センター病院・医長	造血幹細胞採取・導入細胞の患者投与
	清河 信敬	国立成育医療研究センター研究所・部長	治療遺伝子導入法の検討
	梨井 康	国立成育医療研究センター研究所・室長	遺伝子導入効率、挿入部位等の解析
	緒方 勤	国立成育医療研究センター研究所・部長	遺伝子導入効率、挿入部位等の解析
	瀧本 哲也	国立成育医療研究センター研究所・室長	臨床データの管理
	掛江 直子	国立成育医療研究センター研究所・室長	倫理性、個人情報保護
	土田 尚	国立成育医療研究センター病院・医師	遺伝子治療の文書作成と情報の収集
	加藤 俊一	東海大学医学部・教授	患者選定、幹細胞移植の指導
	有賀 正	北海道大学医学研究科・教授	患者選定、免疫学的検査の管理と指導
	布井 博幸	宮崎大学医学部・教授	患者選定、免疫学的検査の管理と指導
水上 智之	宮崎大学医学部・助教	患者管理	
久米 晃啓	自治医科大学・准教授	遺伝子治療の検査体制の構築	
大津 真	東京大学医科学研究所・助教	造血幹細胞への遺伝子導入と培養	
岡田 真由美	都立東大和療育センター・医師	臨床データの管理	

審査委員会が研究計画の 実施を適当と認める理由	別紙（遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の審査結果について） のとおり	審査委員会の長の職名	氏 名
		東京慈恵会医科大学教授	大橋 伸 (印)

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>本遺伝子治療臨床研究は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症のうち、特に慢性肉芽腫症としては最も頻度の高い NADPH オキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質 gp91^{phox} に変異のある X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) に対して有効な治療法を確立することにある。具体的には、レトロウイルスベクターを用いて gp91^{phox} をコードするヒトチトクローム b245 ベータポリペプチド (CYBB) 遺伝子 (NM_000397) を患者造血幹細胞に導入し、これら細胞を再び患者に投与する「造血幹細胞遺伝子治療」を行い、その安全性 (遺伝子導入操作及び遺伝子導入細胞の安全性) と有効性 (臨床検査的有効性と症状改善等の臨床的有効性) を別表に基づいて評価する臨床研究であり、第 I/II 相試験として行う。</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>慢性肉芽腫症は、乳幼児期より重篤な細菌性・真菌性感染症を反復罹患し、諸臓器に肉芽腫を形成する原発性免疫不全症である。原因として、食細胞が病原体を殺菌する際に利用する活性酸素 (O_2^-、H_2O_2、$HClO$ など) の産生に関わる NADPH オキシダーゼ酵素複合体に異常があり、その構成分子である gp91^{phox} をコードする CYBB 遺伝子に変異がある X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD) が全体の 8 割を占める。国内での発症頻度は 22.5 万出生に 1 名で、現在まで 200 家系以上、300 名程度の患者が登録されている。症状として、乳児期より繰り返す難治性感染症があげられ、複数の抗生剤・抗菌剤を用いても改善しない時には致死的な経過をとる。また、他の症状として、肺や消化管、肝臓に肉芽腫を形成し、臓器障害に陥ることがある。</p> <p>慢性肉芽腫症治療の基本的方針は、合併する感染症のコントロールであり、抗生物質や抗真菌剤などの抗菌療法がその主体をなす。特に、最近は効力のある抗真菌剤 (ミカファンギンやボリコナゾール) が開発され、従来では治療が困難であった感染症が軽快する症例も増えてきた。ただ、慢性肉芽腫症の場合、一旦、感染症に罹患すると完全な治癒が望めないことから、頻回に感染症が再発し、入院期間が長期化することが多い。一方、抗菌剤投与以外の治療法としては、感染症予防としてのインターフェロンガンマ (IFN-γ) や肉芽腫形成による臓器障害に対してのステロイド投与が上げられるが、これら治療をもってしても完治することはなく、現時点での慢性肉芽腫症の根治療法は造血幹細胞移植のみと考えられている。</p> <p>慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植は、2008 年までで 34 名の患者に 38 回行われてきており、その内訳は、骨髄由来の造血幹細胞移植が 27 例、臍帯血由来の移植が 7 例、末梢血由来の移植が 4 例で、HLA 完全一致例が 24 例、5/6 例で 8 例、4/6 以下で 6 例である。治療成績 (無イベント生存率) は、移植時の感染症の有無や前処置の違いにより大きく左右されるが、血縁、非血縁を問わず HLA が完全一致した骨髄幹細胞を用いた場合、20 例中 19 例で移植が成功している。一方、HLA が一遺伝子異なる場合 (5/6)、治療成績は 50~60% と低下し、この値は小児非腫瘍性疾患に対する臍帯血移植の成績 (51±8%) と大方一致する (日本さい帯血バンクネットワーク・移植データ管理小委員会 2007 年度解析結果)。このように、慢性肉芽腫症に対して造血幹細胞移植を考慮する場合、DNA typing (DNA 型、遺伝子型) で HLA が 5/6 以上のドナーがいることが望ましい。さらに、慢性肉芽腫症の場合、他の免疫不全症とは異なり、患者 T 細胞機能が正常であることから移植に際して強力な前処置が必要で、同時に、移植時に重症感染症を罹患していることも多いため、移植関連合併症を併発しやすく、移植成績は他の重症複合免疫不全症と比較して不良である。</p> <p>これらのことを鑑み、本研究では、遺伝子検査にて X-CGD を診断された男性患者で、重症の感染症などで造血幹細胞移植が望まれるものの DNA typing で 5/6 以上の HLA 一致ドナーが見つからず、同時に、本研究の実施目的を十分に理解し、自由意思に基づく文書同意を示した患者に対し、患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療臨床研究を行うものである。</p> <p>上記症例を対象とした理由は以下の 4 点である。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 造血幹細胞移植が慢性肉芽腫症に対し根治療法とよべる程の治療成績を 	

	<p>上げてはいるが、ドナー不在の患者あるいは移植に伴う副作用（移植関連合併症）に耐えられない患者がいること。</p> <p>2. 造血幹細胞遺伝子治療が慢性肉芽腫症を始めとする原発性免疫不全症に対し広く行われ、難治性感染症の治癒等一定の治療成績を上げていること。同時にその手技に関する安全性は、過去の症例からも確認されていること。</p> <p>3. 造血幹細胞遺伝子治療において造血系異常という重篤な有害事象の報告もされてはいるが、その有害事象の発症頻度を考えたとき、本遺伝子治療臨床研究がもたらす利益は患者不利益（造血系異常の発症）を十分に上回ると予想されること。</p> <p>4. 本遺伝子治療臨床研究では、上記、造血系異常の有害事象に関する安全性を鑑み、過去の事例においてを一度も造血系異常発症していないウイルスベクターを使用すること。</p>																																
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>本遺伝子治療臨床研究において導入を計画している遺伝子は、X-CGD の原因遺伝子であるヒトチトクローム b245 ベクターポリペプチド (CYBB) 遺伝子のアミノ酸をコードする部分 (open reading frame) であり、制限酵素 <i>NcoI</i>/<i>BamHI</i> にて消化した 1732bp の CYBB 遺伝子フラグメントを Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来レトロウイルスベクター-MFGS に組み込み、gp91^{phox} を発現するレトロウイルスベクター-MFGSgp91 を作製した。CYBB 遺伝子はウイルス LTR よりその発現が誘導される。</p> <p>レトロウイルスベクター-MFGSgp91 はウイルス粒子形成に必須の遺伝子 gag、pol、env を有していないため、それ自体では完全なウイルス粒子を形成することはない。そのため、MFGSgp91 に相当する遺伝子組換え生物（遺伝子組換えレトロウイルス）を作製するためには、パッケージング細胞株が必要となる。本遺伝子治療臨床研究では、ヒト由来胎児腎細胞 293 細胞に MoMLV 由来の gag-pol 遺伝子とマウス両種性 (amphotropic) ウイルス 4070A 由来の env 遺伝子を導入したパッケージング細胞株 293-SPA を用いる。この 293-SPA に上記 MFGSgp91 をリポフェクション法にて導入して、高力価のウイルスタイター（感染効率が低い）を示した細胞株 293-SPA-gp91-155 をウイルス産生細胞株とし、この細胞株から得られた培養上清を用いて、標的細胞（患者造血幹細胞）に CYBB 遺伝子を導入する。</p> <p>レトロウイルスベクター-MFGSgp91 を用いて CYBB 遺伝子を導入するのは、患者由来末梢血 CD34 陽性細胞である。5 日間、体重あたり 10μg の顆粒球刺激因子 (G-CSF) を 1 日 1 回皮下注射し、投与終了日の翌日、血液分離装置 (CS3000) を用いて末梢血単核球分画を採取する。そして、これら末梢血単核球分画から ClinMACS を用いて CD34 陽性細胞を分取し、stem cell factor (SCF, 100ng/ml)、thrombopoietin (TPO, 100ng/ml)、FLT3-L (100ng/ml)、IL-3 (10ng/ml) 添加 1% ヒトアルブミン/X-VIVO 10 にて 1.0~5.0x10⁵/ml の濃度に調整した後、炭酸ガス透過性バッグを用いて 48 時間培養する (Day 0, 1)。CD34 陽性細胞への CYBB 遺伝子の導入は、これら細胞を 37$^{\circ}$C で迅速に融解した MFGSgp91 のウイルス上清中に浮遊させ、遺伝子組換えヒトフィブロネクチン CH-296 (レトロネクチン) にて固層化した培養バッグに移した後、2 時間の遠心操作にて行う。なお、同様の遺伝子導入操作を、感染効率を確認しながら 24 時間ごと 3 回程度行う (Day 2, 3, 4)。</p> <p>CYBB 遺伝子導入後、遺伝子導入細胞を生理食塩水にて十分に洗浄し、回収する (Day 5)。その際に検体の一部を用いて無菌性検査ならびに遺伝子導入効率を確認し、安全性が確認された段階で末梢静脈より患者に投与される。</p> <p>なお、患者は遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すために、遺伝子導入細胞投与 4 日前から体重あたり 10mg のブスルファンを 1 日 4 回、2 時間以上かけ、3 日間にわたり投与される (Day 1, 2, 3)。</p> <table border="0" data-bbox="454 1835 1262 1990"> <tr> <td>Day</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>培養</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>●</td> <td>●</td> <td>●</td> <td>○</td> <td>(●遺伝子導入)</td> </tr> <tr> <td>ブスルファン</td> <td></td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>細胞投与</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○</td> <td></td> </tr> </table>	Day	0	1	2	3	4	5		培養	○	○	●	●	●	○	(●遺伝子導入)	ブスルファン		○	○	○				細胞投与						○	
Day	0	1	2	3	4	5																											
培養	○	○	●	●	●	○	(●遺伝子導入)																										
ブスルファン		○	○	○																													
細胞投与						○																											

安全性についての評価

1. 遺伝子導入方法の安全性

1) ウイルスベクターの純度

本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスベクターMFGSgp91を産生するウイルス産生細胞株 293-SPA-gp91-155は、共同研究者である米国国立衛生研究所の Malech 博士らによって樹立され、米国 Magenta 社が臨床研究用として GMP 準拠にて製造したもので、その安全性は担保されている。今回、使用を予定しているレトロウイルスベクターMFGSgp91は、Magenta 社が作製した Working Cell Bank (WCB) により製造されたもので、すでに Malech 博士らによって使用されているものである。この一部を適切な拡散防止措置を講じた上で、ドライアイス詰めで日本まで空輸し、国立成育医療研究センター研究所にて受け入れ試験を行い、適切 (RCR が存在しないなど) と判断されたもののみを使用する。

2) 患者に投与される物質の純度

患者に投与される物質は、CYBB 遺伝子が導入された患者末梢血由来 CD34 陽性細胞であり、ウイルス上清においては無血清培地にて調製されたものを使用し、CD34 陽性細胞の培養に関しては 1% ヒト血清アルブミンを使用する。なお、細胞投与前に細胞を十分に洗浄し、無菌性・無毒性 (エンドトキシン) の検査を行い、安全性が確かめられた細胞を投与する。

3) 増殖性ウイルスの出現

MFGSgp91 はウイルス構造タンパク質の Gag, Pol, Env をコードする遺伝子を全てあるいは一部削除されているため、MFGSgp91 から新たな増殖性ウイルスが出現することはない、野生型ウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて低い。また、過去 300 を越えるレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療においても RCR が出現したとの報告はない。なお、本遺伝子治療臨床研究では Magenta 社で RCR が存在しないことが確認され、また、当センターの受け入れ試験でも RCR が存在しないことを確認したウイルスベクターを使用し、治療開始後も患者細胞や血清を用いて RCR の存在を定期的に確認する。

4) 染色体挿入による危険性

レトロウイルスはその性質上、感染した細胞の染色体に挿入され、導入遺伝子の発現を誘導する。ただ、その挿入部位近傍に癌原遺伝子が存在した場合、時に白血病等の造血系腫瘍を発症することがある。事実、ドイツを中心に行われた慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療において、治療を受けた患者に骨髄異形成症候群が発症したとの報告がある。この臨床研究で使用されたベクター (SFV 由来) が今回使用を予定している MFGSgp91 (MoMVL 由来ベクター) とは異なり内在性の癌遺伝子を有し、転写活性も数十倍高いことから、宿主染色体に挿入された際に造血系異常を誘発したと考えられている。ただ、MFGSgp91 もにおいても CYBB 遺伝子発現の際に宿主染色体への挿入を必要とすることから、近傍の遺伝子の異常な発現を誘導することは否定できず、本遺伝子治療臨床においても造血系異常を発症する危険性は完全には否定できない。このため、早期にこれら造血系細胞の異常を検出するために、定期的に血液検査 (血算、生化学検査) と適宜の骨髄検査を行う。また、抗 gp91^{phox} 抗体 (7D5) を用いた FACS や定量 PCR 法にて、患者体内の遺伝子導入細胞の動態を追跡し、必要に応じて (増加傾向が確認された場合など)、遺伝子導入細胞のクローン数を確認できる LAM-PCR を行い、その挿入部位を pyrosequence 法にて同定する。

2. 遺伝子産物の安全性

レトロウイルスベクターMFGSgp91の遺伝子導入にて、感染細胞はCYBB遺伝子産物であるgp91^{phox}を獲得する。gp91^{phox}は前述のように細胞膜表面でp22^{phox}と会合し、菌体成分などの刺激にて細胞内構成タンパク質と結合することで活性酸素産生などの機能を発揮する。よって、gp91^{phox}を過剰発現させても過剰なp22^{phox}の発現がない限り活性酸素産生は起こらず、それ自体で細胞障害を起こすとは考えられない。事実、gp91^{phox}による細胞傷害性の報告はない。

3. 培養細胞の安全性

1) 培養細胞の純度

使用するレトロウイルスベクター上清はMagenta社において微細孔フィルター (0.22µm) を通しているため、ウイルス産生細胞株や細胞破砕物の混入はない。また、同一期間中は単一の患者細胞のみを扱い、遺伝子導入を含む全ての細胞操作はGMPに準拠した細胞調製室内 (P2レベル) に設置したクラスIIaの安全キャビネットか完全閉鎖系バッグ間 (bag to bag) で行われ、無菌性なら

	<p>びにウイルスの封じ込めは担保される。なお、細胞の安全性に関する検査は遺伝子導入前と患者投与前に SRL 社に依頼して行う。</p> <p>2) 細胞の安全性</p> <p>患者に投与する細胞はレトロウイルスベクター-MFGSgp91にてCYBB 遺伝子を導入した自己末梢血 CD34 陽性細胞である。現在、リンパ腫や固形腫瘍に対し自家幹細胞移植が一般的に行われていることから自家 CD34 陽性細胞の投与が患者に対して重大な影響を及ぼすとは考えにくい。また、細胞培養に使用するサイトカインなどの細胞増殖因子の残存濃度も、患者投与前に細胞を十分に洗浄することから、生体への影響はほとんどないと考えられる。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断される理由</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 近年、適当なドナーのいる慢性肉芽腫症の症例では造血幹細胞移植が行われ、根治療法とよべる程の治療成績を上げている。ただ、ドナーの問題や合併症の点から全ての症例が移植医療の対象とはならないこと。 2. 造血幹細胞遺伝子治療が原発性免疫不全症を中心に広く行われ、その手技等に関しては安全性が確認され、さらに難治性感染症の治癒等一定の治療効果も確認されていること。 3. 本研究で使用を予定しているレトロウイルスベクター-MFGSgp91 は、すでに共同研究者の米国国立衛生研究所 Malech 博士が複数の患者に対して使用しており、その安全性と有効性が確認されていること。 4. 先行研究（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）にて、現在、「安全性を鑑みたとき X-CGD に対する治療の第一選択は移植医療であるが、ドナー不在など何らかの理由により移植医療が行えない重症患者に対しては、治療の候補として遺伝子治療を考慮することをも十分に妥当である」と結論を得たこと。 5. 実施施設である国立成育医療研究センターが、成育医療に特化した高度専門医療センターであり、その使命が小児難治性疾患の機序解明とその論理を応用した診断・治療法の開発ならびに臨床研究の実践であること。
<p>実施計画</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 患者数と実施期間 実施承認が得られた時点から 5 年間、目標症例数 5 症例 2. 本遺伝子治療臨床研究に関連する委員会 <ol style="list-style-type: none"> 1) 遺伝子治療臨床研究審査委員会 本委員会は、「(独) 国立成育医療研究センター遺伝子治療臨床研究審査委員会規定」(平成 22 年 4 月)に基づき国立成育医療研究センター内に設置され、センター内で行われる遺伝子治療臨床研究が、生命倫理及び医の倫理に基づき、また、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づき適正に行われるかを審査する。 2) 遺伝子治療臨床研究適応判定委員会 本委員会は、遺伝子治療臨床研究の実施が承認された時点で、国立成育医療研究センター内に設置され、遺伝子治療臨床研究実施に際し申請される症例が、実施可能かの適当判定を行う。 3) 遺伝子治療臨床研究評価判定委員会 本委員会は、遺伝子治療臨床研究が開始された時点で、国立成育医療研究センター内に設置され、遺伝子治療臨床研究において実際された症例の評価判定を行う。 3. 被験者の選定基準と除外基準 本遺伝子治療臨床研究の対象者は下記の示す選定基準を全て満たし、いずれの除外基準にも合致しない症例とする。 <ol style="list-style-type: none"> 1) 選定基準 <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子検査にて gp91^{phox} に異常のある X 連鎖慢性肉芽腫症と診断された男性 ・ 3 歳以上、体重 10kg 以上の症例 ・ 体重 1kg あたり 5×10^6 個の CD34 陽性細胞が採取可能な症例 ・ 2 ヶ月以上、一般的な治療を継続しても、臨床症状かつ検査結果が改善しない、あるいは悪化する症例で、今後も、その治療効果が確認できないと思われる症例 ・ 造血幹細胞移植に際し、DNA typing で 5/6 以上の HLA 一致で、有核細胞数として体重あたり 2×10^7 個 (CD34 陽性細胞として 1.5×10^5 個) 以上の移植ドナーが見つからない症例 ・ 治療期間中及び治療終了後 5 年間の避妊に同意した症例

- ・患者もしくはその代諾者から文書による同意が得られている症例
- ・治療に耐えうる心肺肝腎機能を有する症例
performance status (PS) 0-2、左室駆出率 $\geq 50\%$ 、
安静時の動脈酸素飽和度 (SpO_2) $\geq 95\%$ 、AST、ALT $\leq 100IU/L$
体表面積 ($1.73m^2$) 補正クレアチニン・クリアランス (Ccr) $\geq 70ml/min$
随時または食後2時間後の血糖値 $\leq 200mg/dl$ 、HbA1c $\leq 9\%$

2) 除外基準

- ・ HIV 陽性例
- ・ 悪性腫瘍併発例
- ・ 同意に影響を及ぼす精神障害を有する症例
- ・ 原病と関連しない重篤な合併症を有する症例 (心疾患、肺疾患など)
- ・ 既往例にて重篤なアレルギー反応を起こす可能性のある症例
- ・ これまでにマウス血清を含む薬剤を受けた既往のある症例
- ・ 長期 (3ヶ月程度) の生命予後が見込まれない症例

4. 遺伝子治療臨床研究の実施手順

遺伝子治療が適切と考えられる被験者は、国立成育医療研究センター病院免疫科を受診し、そこで問診や必要な検査を受け、選定基準ならびに除外基準に照らし合わせ実施可能であるかが検討される。実施が適切と判断された被験者は、研究代表者より実施施設長 (総長) に必要書類を添えて審査を申請し、実施施設長 (総長) は遺伝子治療臨床研究適応判定委員会に当該患者が遺伝子治療臨床研究に適しているかの判断を諮問する。当適応判定委員会は実施可能であることを判定し、実施可能と判定された被験者は、再度、本遺伝子治療臨床研究について詳細な説明を受け、自由意思に基づき文書による同意書に署名する。

5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

1) 遺伝子導入方法および投与方法

- ・ 末梢血 CD34 陽性細胞の採取

患者体重 $1kg$ あたり $10\mu g$ の G-CSF を 5 日間皮下投与し、投与終了翌日に血液分離装置にて末梢血単核球を分離・採取する。回収後、これら細胞からヒト抗 CD34 抗体を用いた ClinIMACS にて患者 CD34 陽性細胞を分離する。

- ・ CYBB 遺伝子導入

得られた末梢血 CD34 陽性細胞を SCF、TPO、FLT3-L、IL-3 を添加した 1% ヒトアルブミン/ X-VIVO10 にて 48 時間培養し、次に、リコンビナントフィブロネクチン (レトロネクチン) 固層化培養バッグ内で MFGSgp91 のウイルス上清に浮遊されることで CYBB 遺伝子を導入する。これら操作を 24 時間ごと 3 回行う。

- ・ 無菌性・無毒性を確認した後、遺伝子導入細胞を 1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に浮遊し、末梢静脈より患者に投与される。なお、投与する細胞数の上限は定めないが、最低投与数は体重あたり 5×10^6 個とし、不足分はあらかじめ保存しておいた自己 CD34 陽性細胞を用いて補填する。

・ 遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、患者は遺伝子導入細胞の投与前 5 日目より、体重 $1kg$ あたり $10mg$ のブスルファンを 1 日 4 回、2 時間以上かけて、3 日間に投与される。

2) 患者観察

治療中は患者体内での CYBB 遺伝子導入細胞の動態ならびに臨床症状 (感染症の改善) 等を経時的に注意深く観察する。また、遺伝子導入細胞に対する反応や副作用等を日本癌治療学会薬物有害反応判定基準に基づいて評価する。

なお、主な診察項目、検査項目は以下の通りである。

- ・ 診察項目 身体測定 (身長、体重)、バイタルサイン (体温、血圧、脈拍、呼吸数)、内科的診察 (頭頸部、口腔内、胸腹部、皮膚所見、四肢、リンパ節、外陰部)
- ・ 一般検査項目 血液一般検査、尿一般検査、生化学検査、免疫学的検査、血液凝固能検査、骨髄穿刺検査、感染症関連検査 (CRP、 β -D-グルカン、アスペルギルス抗原、カンジダ抗原)、画像検査 (CT、MRI、Echo、内視鏡、PET)
- ・ 遺伝子治療関連検査項目 gp91^{phox} の発現 (7D5 抗体における FACS)、好中球活性酸素産生能 (DHR、NBT、ケミルミネッセンス)、gp91^{phox} の定量 PCR、RCR 出現検査 (Env PCR)

有害事象

に関する有害事象

細胞：投与する細胞が体外で培養されているため、特に、試薬に一反応（かゆみ、発疹、発熱）がある。

採取時：採血部位の出血や感染症。また、細胞採取時の全身倦怠しびれ、めまい、吐き気、嘔吐

筋痛や筋肉痛などの全身の痛み、発疹、吐き気、嘔吐、頭痛、食時に、重度の副作用としてアレルギー性ショック、間質性肺炎、心筋梗塞、脳血管障害、脾臓の破裂など

ン：けいれんと吐き気が起こるため、ブスルファンを複数回にわりと点滴し、また、抗痙れん剤（クロナゼパム）や吐き気止め（グン）を使用する。その他、重篤なものとして造血機能抑制があり、しては輸血、血小板輸注を含めて対処する。また、肝機能障害やの影響も報告されている。

造血幹細胞が生着しない場合

ンの影響により骨髄抑制状態が継続し、さらに投与した遺伝子導が骨髄に生着しない場合には、予め保存しておいた自己造血幹細胞。しかし、この治療によっても造血能が回復しない場合には、臍帯血移植（HLA 一致 4/6 以下のドナー）からの造血幹細胞移植

ウイルスベクターの危険性

たレトロウイルスベクターより野生型レトロウイルス（RCR）が性は極めて低い、定期的に PCR 等にて RCR の存在を確認し、もたら詳細な検査の下、抗レトロウイルス剤を使用する。

たレトロウイルスベクターにより造血系異常が発症する危険性は低い。ただ、下記に示すように、造血系異常を起こしやすい状況は、うに T 細胞が完全に欠損しており、さらに治療遺伝子が共通ガンのような増殖に関わる遺伝子を使用した場合とドイツ・スイスので使われた SFFV のような強力な LTR を有するレトロウイルスベした場合に限られる。

病名	実施国	患者数	造血系異常	頻度
SCID-X1	フランス	12	4 (白血病)	5/26 人
	イギリス	11	1 (白血病)	
	アメリカ	3	0	
CGD	ドイツ・スイス	4	3 (MDS)	3/13 人
	アメリカ	3	0	
	韓国	2	0	
ADA	イタリア	15	0	0/32 人
	アメリカ	6	0	
	イギリス	9	0	
	日本	2	0	
WAS	ドイツ	10	0	0/10

用するレトロウイルスベクターは MoMLV 由来のベクターであり、一を使用したアメリカ CGD の臨床研究で、4 年を越えた現時点で系異常を発症していない。このようなことから、本遺伝子治療臨髄異形成症候群（MDS）のような造血系異常が発症する危険性はるが、なんらかの造血系異常発症の際には、臍帯血を含めた造血考慮する。

の効果がなく、免疫系が回復しない場合

真菌剤、インターフェロン・ガンマ等の現行の治療を継続する。が悪化するなどの場合は、臍帯血を含めた造血幹細胞移植も考慮このような場合でも、再度、遺伝子治療を繰り返すことはし

響

るレトロウイルスベクターが生殖細胞に感染（垂直感染）するこわれるが、一定期間（5 年間）の避妊をお願いする。

7. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

1) 評価方法と評価基準

本遺伝子治療臨床研究は第 I/II 相試験として実施し、その安全性（遺伝子導入操作及び遺伝子導入細胞の安全性）と有効性（臨床検査的有効性と症状改善等の臨床的有効性）を別紙に示す基準を基に評価する。

2) 中止判定基準

(1) 症例の中止判定基準

- ・ 被験者又は代諾者から離脱の申し出があった場合
- ・ 観察期間中に被験者との接触が困難となり、経過観察が不可能となった場合
- ・ 観察期間中に造血幹細胞移植を施行した場合
- ・ その他、総括責任者が継続を困難と判断した場合

なお、上記の場合であっても、有害事象の発症により被験者の安全が損なわれると考えられる場合は、積極的に経過観察のみなどの追跡調査を患者に依頼する。

(2) 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準

- ・ 予測できない有害事象が発症した場合
- ・ 予想可能な有害事象であっても、その有害事象が重大と考えられる場合
- ・ 外部評価委員会からの中止要請があった場合

なお、上記理由にて本遺伝子治療臨床研究の継続が困難となったと考えられる場合は、総括責任者は速やかに実施施設長にその旨を報告し、本遺伝子治療臨床研究の新規登録中止を申し出る。

8. 有害事象への対応

有害事象とは、本遺伝子治療臨床研究との因果関係の有無に関わらず、治療中止及びその後の観察期間中に被験者に生ずるあらゆる好ましくない医療上の症状、徴候、疾患を指す。

被験者に有害事象が発生した場合、総括責任者は速やかに実施施設長に報告し、実施施設長は「評価委員会」に報告する。「評価委員会」は、報告を受けた有害事象の詳細な内容（症状、発症日、程度、処置の有無、経過）を十分に審議し、有害事象と本遺伝子治療臨床研究との関連性、総括責任者より提案された有害事象に対する医療処置ならびに研究継続の可否を含めた意見書を実施施設長に速やかに提出する。なお、被験者の状態により、「評価委員会」の開催が待てない場合は、総括責任者の判断のもと有害事象に対する処置を開始することとする。ただし、全ての医療処置は、総括責任者あるいはその代理人となる医師が、被験者に対してその旨を十分に説明し、同意を得た後に開始するものとする。同時に原因の究明に努める。

実施施設長は、「評価委員会」の意見書を基に「審査委員会」の開催を審査委員長に要求する。「審査委員会」では「評価委員会」の意見書を基に本遺伝子治療臨床研究の安全性・有効性を評価し、継続の可否を含めて最終的な意見を実施施設長に報告する。実施施設長は、これら意見書を速やかに厚生労働省などの関係各省に文書をもって報告する。なお、重篤な有害事象の場合には、たとえ本遺伝子治療臨床研究が終了後であっても、発生時から 48 時間以内に厚生労働大臣に報告する。また、本遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の事象に関しても、速やかに厚生労働大臣に報告する。

9. 個人情報に関して

本遺伝子治療臨床研究における個人情報は、国立成育医療研究センターが定める保有個人情報管理規定に基づき保護される。

備 考	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の国外での状況 現在まで、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる造血幹細胞遺伝子治療は、米国、ドイツ、スイス、英国、韓国において行われ、その臨床経過を学会等にて報告されている。使用されたベクターや前処置、治療効果、有害事象は各々の症例で異なるが、下記の表で示すように現在までに 23 症例が行われている。						
	実施国	病型	ベクター	症例数	前処置	治療効果	造血異常
1995	米国	p47(-)	MFGS-p47	5	なし	なし	なし
1998	米国	X-CGD	MFGS-p91	5	なし	なし	なし
2001	英国	X-CGD	MFGS-p91	1	メルファラン	あり	なし
2004	ドイツ	X-CGD	SF71gp91	2	ブスルファン	あり	あり
	スイス	X-CGD	SF71gp91	1	ブスルファン	あり	なし
	英国	X-CGD	SF71gp91	3	ブスルファン	一部あり	なし
2006	米国	X-CGD	MFGS-p47	3	ブスルファン	あり	なし
2007	韓国	X-CGD	MT-gp91	2	ブスルファン フルダラビン	-	なし
2008	スイス	X-CGD	SF71gp91	1	ブスルファン	あり	あり
	<p>欧州で使用されている SF71gp91 は、プロモーターに工夫がなされており、骨髄系細胞において効率良く導入遺伝子を発現させる特性がある。ただ、この特性により白血病などの造血系腫瘍を発症しやすいことも報告されている。ドイツでの患者で見られた造血異常は、SF71gp91 ベクターが癌原遺伝子の MDS1 近傍に挿入されたことにより誘発されたと考えられている。</p> <p>本遺伝子治療臨床研究で使用される MFGS-gp91 は、MoMLV 由来のレトロウイルスベクターで、SFFV に比べて導入遺伝子の発現効率は悪いが、白血病等の造血異常は発症しにくい。ただ、レトロウイルスベクターである以上、宿主染色体挿入による白血病発症の危険性は避けることは困難である。したがって、被験者の利益と危険性について十分な検討がなされた上で遺伝子治療臨床研究がなされるべきものと考えられる。</p>						

(別紙)

遺伝子治療臨床研究の安全性、有効性判定基準

1. 安全性評価

1) 遺伝子導入細胞: 無菌性検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査、RCR
上記、全ての検査項目の陰性を持って安全性を評価

2) 被験者

細胞投与後～12ヶ月: 4週ごと、12ヶ月～60ヶ月: 3ヶ月ごと
60ヶ月～ 最低でも1年ごとの臨床症状、検査による観察
薬物有害反応判定基準で grade II を越えないことで安全性を評価

2. 有効性評価

1) 遺伝子導入細胞

PCR、抗 gp91^{phox} 抗体 (7D5) 染色による遺伝子導入効率の解析
投与前、5%以上の遺伝子導入細胞の存在、
投与後、末梢中遺伝子導入細胞の確認あるいは好中球活性酸素産生能の上昇、にて評価

2) 被験者

2-1) 感染症に関する短期的評価

治療前に存在していた感染症の遺伝子治療1ヶ月後の変化

1	治療前の感染症が治癒
2	治療前より感染症が改善し、治療強度を減弱できている
3	治療前よりも感染症が明らかに改善している (同じ治療を継続)
4	治療前の感染症が不変
5	治療前よりも感染症が悪化

2-2) 感染症に関する長期的評価

短期的評価後、1年ごとに、治療前12ヶ月間のCGD特有の感染症 (皮膚化膿症、膿瘍、細菌・真菌性肺炎、化膿性リンパ節炎、肝膿瘍、肛門周囲膿瘍など) の罹患程度と比較する。具体的には、治療前後の発熱日数、外来受診回数、入院回数、入院日数、感染症に対する使用薬剤の種類 (抗菌剤、抗真菌剤)、用量、治療日数、学校・職場などへの欠勤数の比較を基に、下記のような治療後の感染頻度を決定する。

1	全くない (予防なし)
2	全くない (予防あり)
3	治療前より少ない
4	治療前と同じ
5	治療前より多い

2-3) 被験者に対する本遺伝子治療の有効性に関する総合判断基準

短期的有効性及び長期的有効性を基に、治療前後の患者の病状を下記の項目から選び、レベルの減少をもって有効であると判断する。

1	何ら症状/検査異常がなく治療/予防ともに不要である (検査のみ実施)
2	感染予防が必要で定期的に外来通院しているが臨床症状はない
3	軽度の臨床症状/検査異常が時折あり、時に外来で治療を要す
4	外来通院が主体であるが、時に臨床症状/検査異常のため入院治療を要す
5	主に入院治療が主体であるが、治療によって症状/検査が改善する
6	入院して濃厚な治療をするも反応が悪く、退院のめどがたたない
7	あらゆる治療にも拘らず死期がせまっている (死)

《スケジュール》

	登録前		造血幹細胞採取						入院	前処置		投与	投与直後観察							定期的観察		長期的観察					
	登録前	8週間前	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目		6日目	4日前		3日前	2日前	1日	0日	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目		6日目	7日目	2週間	3-8週間	3-12ヵ月
外来	○	○	△*1																					△*1	△*1	○	
入院									○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
臨床研究の説明																											
同意の確認																											
患者適性調査(病歴等)																											
診察																											
登録時検査*2																											
骨髄検査*3																											
血液一般検査																											
生化学検査(免疫学的検査含む)																											
感染症の検査*4																											
特殊検査*5																											
尿検査																											
CT画像検査																											
G-CSF投与																											
造血幹細胞採取																											
グアルテランの点滴																											
造血幹細胞の投与																											

△:外来と入院の場合があるとき ○:必須です ●:スケジュールに沿って実施します

*1:必要な場合は入院

*2:登録時の検査(血液検査、尿検査、感染症の検査(HIV、HBs、HCV、梅毒)、CT検査、心電図検査、心エコー検査、肝機能検査、骨髄検査)

*3:骨髄検査(入院することがあります。)

*4:感染症の検査(β-D2リカイン、チラリアアスルギル抗原、カビ抗原)

*5:特殊検査(末梢好中球のbcr検査、好中球活性酸素産生能検査)…移植した血液のばたつきをみる検査

*:遺伝子治療の6ヵ月後からは、骨髄検査と特殊検査があるときは、国立成育医療研究センターに受診して頂きます。その以外は、かかりつけの病院で検査をすることができます。

治療のために、中心静脈のカテーテルを挿入します。

遺伝子治療臨床研究実施計画書

[課題名]

「慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした

遺伝子治療臨床研究」

(平成 22 年 12 月 17 日 第二版 (2-2))

(平成 22 年 11 月 15 日 第二版)

(平成 22 年 5 月 15 日 第一版)

目次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称	- 7
2. 研究者の氏名、所属部局、役職、役割	
2-1. 総括責任者の氏名及びその担当する役割	- 8
2-2. 副総括責任者の氏名及びその担当する役割	- 8
2-3. 総括責任者、副総括責任者以外の研究者の氏名及び その担当する役割	- 8
2-4. 海外共同研究者	- 10
3. 遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在	- 11
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	- 12
5. 対象疾患及び対象疾患として選定した理由	
5-1. 対象疾患	- 13
5-2. 対象疾患に関する現時点での知見	- 13
5-2-1. 慢性肉芽腫の病因と頻度	- 13
5-2-2. 慢性肉芽腫の症状と経過	- 14
5-2-3. 従来の治療法	- 15
5-3. 本遺伝子治療臨床研究の背景と概要	- 16
5-4. 他の治療法との比較及び遺伝子治療臨床研究を実施する 適応があると判断した理由	- 17
6. 遺伝子の種類及び遺伝子導入方法	
6-1. ヒトに導入する遺伝子の構造と性質	- 19
6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造	- 19
6-1-1-1. ヒト CYBB 遺伝子	- 19
6-1-2. 導入する遺伝子の性質ならびに導入遺伝子からの生成物の 構造及び生物活性	- 22
6-2. 標的細胞の由来ならびに生物学的特徴及び標的細胞とした理由	- 22
6-3. 遺伝子導入方法の概略及び当導入法を選択した理由	- 22

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	- 23
6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響	- 23
6-4-2. ウイルスベクターの作製方法	- 23
6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造	- 26
6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴	- 26
7. 安全性についての評価	
7-1. 遺伝子導入方法の安全性	- 27
7-1-1. 遺伝子導入に用いられるウイルスベクターの純度	- 27
7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性	- 31
7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性	- 31
7-1-4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	- 32
7-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	- 32
7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性	- 32
7-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	- 33
7-1-8. 癌原性の問題	- 33
7-2. 遺伝子産物の安全性	- 34
7-3. 細胞の安全性	- 34
7-3-1. 培養細胞の純度	- 34
7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	- 34
7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性	- 35
8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠	- 36
9. 遺伝子治療臨床研究の計画	
9-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	- 38
9-2. 被験者の選定基準及び除外基準	- 38
9-2-1. 被験者の選定基準	- 39
9-2-2. 被験者の除外基準	- 39
9-3. 本遺伝子治療臨床研究に関連する各委員会	- 39
9-3-1. 遺伝子治療臨床研究適応判定委員会	- 40
9-3-2. 遺伝子治療臨床研究評価判定委員会	- 40
9-3-3. 遺伝子治療臨床研究審査委員会	- 40
9-4. 被験者の同意の取得法	- 40

9-4-1. 被験者と家族への心理的支援	- 42
9-5. 実施期間及び目標症例数	- 42
9-6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	- 42
9-6-1. 対照群の設定	- 42
9-6-2. 遺伝子導入方法（安全性及び有効性に関する事項は除く）	- 42
9-6-2-1. 無菌性の確保	- 42
9-6-2-2. ベクターの入手先及び保存法	- 42
9-6-2-3. 被験者からの末梢血 CD34 陽性細胞の採取	- 43
9-6-2-4. 標的細胞への遺伝子導入	- 43
9-6-2-5. 遺伝子導入細胞の患者への投与	- 44
9-6-3. 前処置及び併用療法の有無	- 44
9-6-4. 治療中の観察項目及び臨床研究項目	- 45
9-6-5. 有害事象ならびにその対処方法	- 46
9-6-5-1. 有害事象の定義	- 46
9-6-5-2. 有害事象発症時の対応	- 47
9-6-5-3. 予想される有害事象とその対処法	- 48
9-6-6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	- 50
9-6-6-1. 遺伝子治療臨床研究の評価方法と評価基準	- 50
9-6-6-2. 中止判定基準	- 50
9-6-6-2-1. 症例の中止判定基準	- 50
9-6-6-2-2. 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準	- 51
9-6-7. 症例記録に関する記録用紙の様式	- 51
9-6-8. 記録の保存及び成績の公表方法	- 51
10. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報について	- 52
10-1-1. 個人情報の定義	- 52
10-1-2. 個人情報の利用目的の特定及び利用目的の通知	- 52
10-2. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報保護に関する取り組み	- 52
10-2-1. 個人情報の正確性の確保	- 52
10-2-2. 安全管理処置	- 52
10-2-3. 第三者への提供の制限	- 53
10-2-4. 開示	- 53
10-2-5. 訂正について	- 53
10-2-6. 利用停止について	- 53

10-2-7. 開示、訂正、利用停止等ができない場合の理由説明	- 54
10-2-8. 参照、質問	- 54
11. 参考文献	- 55

別添 1	同意取得の際に用いられる説明及び同意書
別添 2	個人情報関係
別添 3	本遺伝子治療臨床研究に対する Malech 博士の同意書
別添 4	略号一覧
別添 5	pMFGSgp91 ベクターの全塩基配列
別添 6	Performance Status
別添 7	本遺伝子治療臨床研究の安全性、有効性の判定基準
別添 8	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植の現状
別添 9	薬物有害判定基準
別添 10	Malech HL. et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 12133-12138, 1997.
別添 11	Ott MG. et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. Nat Med 12: 401-409, 2006.
別添 12	Seger RA. et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. Blood 100: 4344-4350, 2002.
別添 13	Kobayashi S. et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. Eur J Pediatr 167: 1389-1394, 2008.
別添 14	Kang EM. et al. Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. Blood 115: 783-791, 2010.
別添 15	Stein S, et al: Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EV11 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. Nat Med 16: 198-204, 2010.

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究