

○ 共同研究

7. 本臨床研究は NIH との国際多施設共同研究として行われることになっているが、本プロトコールと NIH のプロトコールの違いについて、説明してください。技術的な面だけでなく患者の選択基準や評価基準についても比較してください。

(回答)

NIH 及び今回の遺伝子治療臨床研究における選定基準、除外基準の対照表を示します。

	今回の遺伝子治療臨床研究	NIH
選定基準	X連鎖慢性肉芽腫症 (gp91phox 異常) と遺伝子診断された男性例	X連鎖慢性肉芽腫症 (gp91phox 異常) と遺伝子診断された症例
	体重あたり 5.0×10^6 個の CD34 陽性細胞を採取可能な症例	体重あたり 5.0×10^6 個の CD34 陽性細胞を採取可能な症例
	3歳以上、体重 10kg 以上	3~55歳、体重 20kg 以上
	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 (CRP、b-グルカン、画像など) 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	以下のような不反応で、難治性の感染症を有する症例 1) 2ヶ月以上の一般的な抗菌剤の投与によっても、感染症が進行するか、持続する症例 2) 組織検査にて、多剤耐性菌による感染症を罹患している症例
	造血幹細胞に対し、5/6 以上の HLA 一致ドナーがないこと	造血幹細胞に対し、HLA 一致血縁ドナーがないこと
	実施期間中ならびに終了後 5 年間、避妊を行える症例	二つ以上の方法で避妊を行える症例
	文書による同意が得られる症例	
除外基準	下記の心肺機能を有する症例 performance status (PS) 0-2 (別添) 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 $\leq 9\%$	
	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	
	既往歴により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	
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)	血液動態が不安定な症例 高濃度酸素の補助呼吸機が必要な症例	

		体重 20 以下 HLA 一致血縁ドナーがいる 二つ以上の方法で避妊ができない
		ブスルファンに耐えられない
		他の遺伝子治療に参加している

NIH との選定、除外基準の違い

- 1) 対象疾患: NIH では重症感染症のみを対象としていますが、本遺伝子治療では、慢性肉芽腫症が原因となる肉芽腫発症例 (CGD 腸炎など) も対象としています。
 - 2) 移植ドナー: NIH では血縁ドナーのみを対象としていますが、本遺伝子治療では、骨髄バンク、臍帯血バンクのドナーも想定し、非血縁ドナーもいない症例としています。
 - 3) 対象疾患の体重: NIH では 20kg 以上の症例を対象としていますが、本遺伝子治療では、10kg 以上の症例を対象としています。
- 2) と 3) に関しては、遺伝子治療の違いというより造血幹細胞移植の両国の違いによるものと思われまます。なお、遺伝子導入方法に関しては、極力、同様な方法で行います。また、入手不可な機器や消耗品に関しては可能な限り類似した代用品を用います。

○ ベクター

8. 計画書 P. 24 に関連して、本研究で使用予定のオンコレトロウイルスベクター (MFGS) はフランスの X-SCID に使用された MFG ベクターを改良して、複製可能ウイルスの出現の可能性を低めた第二世代レトロウイルスベクターですが、ゲノム中への遺伝子挿入に関しては本質的には MFG ベクターと同様に、転写因子周辺への導入の可能性が高く、造血器腫瘍の発症を誘導しかねません。米国等ではこの可能性が低いレンチウイルスベクターを使用する臨床研究が進められていますが、本臨床研究で、レンチウイルスベクターを用いない理由を説明してください。

(回答)

レンチウイルスが遺伝子治療臨床研究において安全であるというエビデンスはいまだありません。また、レンチウイルスを用いない理由 (用いることができない理由) は、現時点で使用可能なレンチウイルスベクターの臨床応用がされていないからです (次年度くらいから欧州でこれら臨床研究が始まるそうですが)。今後は Malech 先生らと共にレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の導入を検討し、本当にレンチウイルスが安全であるかを検討していきたいと思ひます。

9. 概要書 P. 5 「MFGSgp91 は・・・Malech 博士らによって使用されているものである」、同 P. 6 及び計画書 P. 38 「MFGSgp91 は・・・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」とあります。資料5の P. 21 にあるとおり、8 例（米国 98 年～5 例、06 年～3 例）を評価したと考えてよいのでしょうか。また、それを踏まえて、記載内容を改めて下さい。

(回答)

使用したベクターは全て同一ベクターです（同一の MCB より作られたもの）。有効性に関してはブスルファン使用後の 2 名のみです。誤解を招きかねる表現ですので、計画書の「有効性」をいう表現を削除します。安全性に関しては、米国 98 年の 5 例においても有害事象を認めなかったことから評価しても良いかと思えます。

概要書 p6 「その安全性と有効性が」-> 「その安全性が」

計画書 p39 「その安全性と有効性は」-> 「その安全性が」

10. 説明文書及び同意書 P. 11、「慢性肉芽腫症」についてのパンフレット P. 11、『慢性肉芽腫症』に対する遺伝子治療について P. 2、「今回の遺伝子治療で使用するレトロウイルスは、既にアメリカで用いられていますが・・・造血異常は発生していません」等の記載がありますが、何例に投与した結果であるか追記して下さい。

(回答)

下記のように追記しました。

同意説明書 p12

（前処置を行った症例 3 名、前処置を行わなかった症例 5 名の合計 8 症例）

パンフレット p11。

「ブスルファン使用前で 5 名、使用後で 3 名」

11. 計画書 P. 38 「8. 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」で、「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、既に共同研究者の 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。」とありますが、有効性は本当に確認されているのか、その具体的内容を説明してください。単に感染症が良くなったといったものではなく、期待された遺伝子導入効率が得られた上での臨床症状の改善の有無を科学的に議論する必要があると考えます。

(回答)

遺伝子治療前にあった肝膿瘍や肺アスペルギルス症が遺伝子治療後に治癒したことを「遺伝子治療の有効性」と判断してはいけないのでしょうか（この段階では 1～10%程

度の遺伝子導入細胞率が末梢血で検出されている)。もし、上記質問の意図が「有効性は判断するためには他の大規模治験のように二重盲検法等をもって統計的に処理しなければならない」にあるのであれば、このような稀少疾患を対象とする臨床研究では有効性という表現は用いることはできません。それは、この種の臨床研究では倫理的に対照群を置くことができないからで、あくまでも historical control との比較において判断するしかないからです。もちろん、私たちは今回の遺伝子治療が治療前にある重篤感染症や長期の感染症予防に対して、一定の治療効果があると考えて今回の遺伝子治療を行うわけですが、上記「有効性」の表現が、科学的に問題があるとのことご指摘であれば、以下のように有効性という表現を削除します。

「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、既に共同研究者の Malech 博士が複数の患者に対して使用しており、その安全性が確認されていること。」
(質問9 参照)

○ 選定・除外基準

12. 計画書 P. 41 「被験者の選定基準」について、以下の観点で遺伝子治療を受けられる可能性を排除することは避けた方がよいのではないのでしょうか。

i) 例えば、3歳以上と限定するのはなぜか。3歳未満の患者が遺伝子治療を希望されたときに除外する根拠はあるのか。乳幼児期で感染症に罹患していない、または悪化していない年齢の早い時期に遺伝子治療を行える可能性を残しておいた方がよいのではないのでしょうか。

ii) HLA が 5/6 で成績が 50~60%に低下するとあることから、患者及び親権者の意志により、5/6 一致のドナーがいたとしても、遺伝子治療を行う選択肢を残しておいた方がよいのではないか。すなわち「6/6 のドナーがいない場合」とした方がよいのではないのでしょうか。

さらに、GVHD についての記載がありませんが、6/6 一致のドナーであっても非血縁と血縁で GVHD の発生率、重症度に有意な差があるならば、さらに踏み込み、血縁 6/6 一致ドナーがいない場合とするという考え方もありうると考えるがいかがでしょうか。

iii) 国際的には HLA は 10 座で見るのが常識になっています。将来のことを考えると、6 座ではなく、10 座を照合しておいた方がよいのではないのでしょうか。

(回答)

上記の関しては全てご指摘の通りだと思っています。ただ、欧米では医療行為として通常に行われているブスルファン等を用いた造血幹細胞遺伝子治療ですが、日本では初めてであるため、今回の臨床研究では安全性を重視していることも事実です。また、遺伝子治療がまだ実験的治療の範疇を超えないため、現行の移植医療とのバランスも重要だと考えています。つまり、現状で移植が行えると判断される状況 (HLA 一致 5/6 以上のドナーがいる状況) でのブスルファンを用いた遺伝子治療の選択が万人のコンセンサスを得られるかは不明です。さらには、X-SCID 遺伝子治療の有害事象発症時に見られ

た遺伝子治療を良く理解されていない研究者を含む人々からの風評被害をさけるためにも、やはりここは症例を重ねることが重要であり、遺伝子治療に対する経験あるいはコンセンサスを得た段階で step by step 方式で上記の点を検討するのが得策と考えます。

13. 除外基準として、その時点での感染症の重症度を考慮する必要がないか考え方を説明してください。

(回答)

今回の遺伝子治療での感染症に関する適応・除外基準は下記の通りです。

(適応基準) 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 (CRP、 β -グルカン、画像など) 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

(除外基準) 長期 (3ヶ月程度) の生命予後が見込まれない症例

つまり、本遺伝子治療の症例は感染症が重度であることが条件で、また、その感染症があっても3ヶ月以上の生存可能な症例が対象です。その意味で、感染症の重症度は考慮されおり、罹患している感染症が重度で進行が早く、3ヶ月以上の延命が期待できない症例は対象となりません。

14. 対象患者の選択に当たっては活動性の感染症がないことが望ましいと考えますが、本症例の特徴からかなり難しいと思われます。ただ、造血幹細胞移植ドナーのいない患者のみならず、一度移植を失敗した患者も適用とできるのではないのでしょうか。(X-SCIDに白血病が発症したときの ICH 会議での議論で、白血病のリスクがあっても、骨髄移植の適用にならない患者や移植を試みたが成功しなかった患者は適応に含めてもよいとの意見が大勢を占めておりました。)

(回答)

幹細胞移植不成功例に対する遺伝子治療の可能性については賛否両論あることは承知しています。これについては Malech 先生と話し合いましたが、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植では前処置、それもかなり強力な前処置により骨髄細胞や骨髄ストローマ細胞が強く障害されている可能性があり (遺伝子治療の適応となるのは拒絶の場合であるから)、それら造血幹細胞に効率良く治療遺伝子を導入できるかどうか、また、それら細胞を患者に投与した際、骨髄腔に確実に生着できるのかどうかは不明です。よって、現段階では遺伝子治療が先である方がよい (遺伝子治療と移植の前処置の強弱により) との結論を得ました。ご指摘の X-SCID に対する造血幹細胞移植は慢性肉芽腫症とは異なり弱い前処置を行う場合が多く、また、遺伝子治療においても前処置は行いません。もちろん、移植後の遺伝子治療を完全に否定するものではありませんが、現時点での慢性肉芽腫症の現状 (他の SCID とは異なり、高い遺伝子導入細胞率が得られない状況) では適応は難しいかと思えます。

○ 目標症例数

15. 5年間で5名の患者を組み込む予定（計画書P.44）ですが、その設定根拠を明らかにしてください。少ない症例数のためなのか、薬剤（ベクターの供与、細胞の調整）のファクターによるものでしょうか。

（回答）

薬剤（ベクターの供与及び細胞調製）の関係もありますが、慎重な患者フォローを考えると5年で5名が限度かと思えます（1、2年目 1名程度/年、3年目以降 2名/年）。つまり、有害事象の発生を考慮して、最初の1~2年は年1~2名程度で患者フォローを行うのが安全性の面から妥当と思えます。3年目以降はある程度の状況を把握できるため、少しずつ患者数を増やせますが、人材、経費等から5名程度が限度です。

○ 遺伝子導入

16. 遺伝子導入細胞の一部を用いて無菌性検査や遺伝子導入効率を調べることになっていますが（計画書P.46）、導入効率が規格値以下だった場合、どのように対応するのでしょうか。

（回答）

遺伝子導入効率が規格値以下であっても、患者への投与は行います。これは、すでに前処置を行っているからです。また、必要に応じて（ブスルファンにより骨髄障害が強く骨髄機能が戻らない場合）、保存してある患者造血幹細胞を追加投与します。

17. 本臨床研究で用いるベクターについては海外での多くの臨床試験に用いられているものと同じであり、ベクターの品質については一定の評価がされていると思われます。本臨床研究で、PCRや7D5抗体を用いて遺伝子導入効率を解析する予定とされています。そこで、細胞当たりのレトロウイルスベクターの導入率が挿入変異の発現と相関するといわれておりますので、CD34陽性細胞当たりのウイルスベクターの導入効率（1コピー/細胞以下が望ましいとされています）を明らかにできないか検討してはどうでしょうか？

（回答）

投与前の細胞を用いたウイルスベクターの導入率は測定可能かと思えますが（投与前の細胞は多くはCD34陽性細胞）、この段階で遺伝子導入率を測定しても細胞間でコピー数が異なり、あくまでも平均値でしか示すことができません。single cell sortingを組み合わせてそれが可能であるか検討してみます。

18. 概要書 P. 4 及び 7 (計画書 P. 45)、SCF、TPO、FLT3-L、IL-3 及びヒト血清アルブミンは、それぞれ医薬品なのか、試薬なのか、また、どのように製造されたもの (どのように検査されたかを含む) を使用するのか説明してください。

(回答)

現在、NIH 等で使用されている Cell Genix 社のものを使用する予定です (資料 3 として添付します)。(http://www.cellgenix.com/)

19. gp91^{phox} は好中球分化の後期 (バンド) に発現してくるといわれており、また、B 細胞にわずかに発現するといわれていますが、ほとんど好中球です。したがって、投与後の患者の経過観察で、7D5 抗体を用いた FACS 解析で好中球以外の細胞への発現を確認することにより、造血幹細胞への遺伝子導入の比率を推測することが可能ではないでしょうか。

(回答)

7D5 抗体を用いた FACS にて他の血液系譜での gp91^{phox} の発現を調べることで、ある程度の造血幹細胞への遺伝子導入効率を推測することは可能かと思いますが、gp91^{phox} は p22^{phox} と結合することで膜表面に発現しますので、B 細胞のように p22^{phox} を発現していない細胞では膜表面の発現はほとんど確認できません。ただ、細胞内染色を用いることで発現は確認できると思いますので上記の点について検討したと思います。もちろん、定期的な骨髄穿刺にてよりコロニーアッセイも併行して行っていきます。

20. 遺伝子導入/培養は、無血清培地 (1%ヒトアルブミン添加培地) で本当に問題ないでしょうか。血清含有培地との効率の差はどうでしょうか。

(回答)

無血清培地でも十分な遺伝子導入効率を得られることは過去の報告から示されています (Blood 91: 3487, 1998. Hum Gene Ther 9: 771, 1998)。ただ、当然のことながらウシ血清 (あるいは患者血清) を用いた方が遺伝子導入効率は高いかことも事実ですが、現在遺伝子治療臨床研究では無血清による細胞培養を推奨していますので、この方法を踏襲したいと思います。

21. CGD の場合は、幹細胞/前駆細胞レベルでは不活性で、顆粒球系に分化してからスイッチ・オンになるプロモーターを使用できれば、安全性の観点から理想的であると思われます。このようなプロモーターを使用できる見通しはあるのでしょうか。

(回答)

ご指摘の通りです。現時点では使用するベクターがレトロウイルスベクターであるため、ウイルスLTRを使用しなければなりません、レンチウイルスの使用により可能になるかと思えます。

○ 前処置

2.2. 計画書 P. 46、47 について、ブスルファンの投与量や投与方法を決めた根拠を説明してください。(計画書に、米国のプロトコールに準じたことを記載してください。)

(回答)

下記の前処置の理由およびブスルファン使用の理由を示します。

・造血幹細胞遺伝子治療における前処置の必要性

1990年より始まった遺伝子治療ですが、当初、遺伝子治療は造血幹細胞移植とは異なり、自己の細胞を使用することから前処置の必要性を認めていませんでした。ただ、遺伝子治療のような自家移植であっても、骨髓腔に移植細胞のための場所(niche)が存在しなければ効率よく細胞が生着しないことが、数多くの遺伝子治療を行うことで理解されるようになってきました。これが明確に示されたのがアデノシン・デアミナーゼ(ADA)欠損症や慢性肉芽腫症(CGD)に対する遺伝子治療です。両疾患とも患者骨髓腔には標的となる患者細胞が残存しており(ADA欠損症ではT細胞、CGDでは顆粒球)、たとえ、高効率の遺伝子導入細胞を投与しても長期にわたり遺伝子導入細胞が患者体内で生存することは困難でした。これに対し、両疾患とも前処置としてブスルファンを患者の投与し、骨髓に遺伝子導入細胞が生着するためにnicheを創出することで、長期間にわたる遺伝子導入細胞の患者体内での生着を可能にしました。この結果を受け、それ以降の造血幹細胞遺伝子治療では、遺伝子導入細胞投与前の前処置を行うようになってきました。

・造血幹細胞遺伝子治療における前処置の種類

基本的には造血幹細胞遺伝子治療は自家移植であるため、一般的に造血幹細胞遺伝子治療で行われる前処置は移植で行われる前処置と比較すると弱めての前処置が行われています。ただ、下記に示すように最近では免疫不全症以外の疾患に対しても造血幹細胞遺伝子治療が行われるようになってきたことから、造血幹細胞移植と同様、より強い前処置を行う例も増えてきています。

疾患	薬剤	投与量	国
ADA 欠損症	ブスルファン	4mg/kg	イタリア
		75~90mg/m ²	米国
	メルファラン	140mg/m ²	英国
CGD	ブスルファン	8mg/kg	ドイツ・スイス
		10mg/kg	米国
	ブスルファン + フルダラビン	6.4mg/kg + 120mg/m ²	韓国

WAS	ブスルファン	8mg/kg	ドイツ
	ブスルファン + フルダラビン	8mg/kg + ?	イタリア
	ブスルファン + α		フランス
ALD	ブスルファン + エンドキサン	6.4mg/kg + 200mg/m ²	フランス
MLD	ブスルファン	14mg/kg	イタリア
サラセミア	ブスルファン + α		フランス

CGD: 慢性肉芽腫症、WAS: ウィスコット・アルドリッチ症候群、ALD: 副腎白質ジストロフィー、
MLD: 異染色性白質ジストロフィー

しかし、ほぼ全ての症例でブスルファンが使用されており、これは造血幹細胞移植とは異なり、造血幹細胞遺伝子治療においては免疫系の抑制と言うよりはブスルファンによる造血幹細胞への直接の影響（増殖抑制効果）を求めた結果かと思われます。このため、本研究におきましてもブスルファンの使用が適切と考えています。

・ブスルファンの投与量

ブスルファンの投与量は、造血幹細胞移植におきましては体重あたり 16mg ですが、造血幹細胞遺伝子治療においてその至適投与量は決まっておられません。一般的に T 細胞系の免疫不全症（ADA 欠損症や最近では X-SCID など）ではかなり少なめ、CGD など骨髄系の異常では多めとなっております。ただ、実際、どの程度の投与量が適切かは症例が少ないため、いまだ明確になっておらず、今回の遺伝子治療では米国 NIH のプロトコール（本臨床研究と同一プロトコール）を踏襲して体重あたり 10mg を使用することにしました。

計画書 P19

「なお、投与量は同一ベクターにより遺伝子治療臨床研究を行った NIH 例に従い、体重あたり 10mg とする。」

同意説明書 (p7)

「なお、投与するブスルファンの量は同様の遺伝子治療臨床研究を行った NIH の例に従っています。」

23. ブスルファンの血中濃度測定は行わないのでしょうか。また、試験投与により、至適血中濃度を定めることも行わないのでしょうか。

(回答)

血中濃度の測定を行い、至適血中濃度も決定します。

(外注業者 株式会社 SCG 社)

下記を追記します。

計画書 p47

「なお、事前に行うブスルファンの試験投与にて投与量を調整することもある。」

同意説明書 p6

「また、前処置として使用するブスルファンの適量を決めるため、試験投与を行います。」

同意説明書 p7

「体重による投与量・投与方法は以下の通りですが、薬に対する個人差があるため、予め行ったブスルファンの試験投与にてその量を調整する可能性があります」

○ 患者への細胞投与

24. 概要書 p.6 (計画書 P.37)、「サイトカインなどの細胞増殖因子の残存濃度も、・・・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」とありますが、洗浄によりどの程度まで除かれるのか説明してください(実際の測定値でなくても、洗浄による希釈率をざっと算出することによる説明で構いません)。

(回答)

NIHのMalech博士やCandotti博士(いずれも造血幹細胞遺伝子治療を行っている先生)に確認しました。3回のwashingでELISA上残存するサイトカインは検出以下になります。仮に、100mlの培地が浮遊している細胞が遠心によりペレット化し、吸引にて残る培地量は1ml程度かと思えます。これを3~5回洗浄しますと、 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ですから $10^{-6} \sim 10^{-10}$ となり、残存するサイトカインの影響は無いとおもいます(もともと、 μ オーダーですので、picoオーダーになる)。ただ、細胞表面上に残っているサイトカインに関してはわかりません(現時点でこれに関しての有害事象は報告されていません)。

25. 本臨床研究における投与細胞数は最低投与量が 5×10^6 で、上限は定められていません(計画書 P.46)が、非臨床安全性試験の投与量(20×10^6)で十分安全性が検討できていると言えるのか、必要に応じて臨床成績も踏まえ、説明してください。

(回答)

質問にある「十分安全性が検討できていると言えるのか」の「安全性」の意味はいかなる意味でしょうか。「ヒト細胞を大量に投与すること」による危険性(血栓等?)の意味でしょうか、それとも「遺伝子導入ヒト細胞を大量に投与すること(たとえば、ウイルスの混入など)」の危険性のことでしょうか。質問にある安全性の意味がわからないため、下記の回答が正しいものかわかりませんが、回答致します。

まず、最初の「ヒトCD34陽性細胞を大量に投与すること」に関してですが、原発性免疫不全症に対しては比較的大量CD34+細胞移植が行われています(Biol Blood Marrow Transplant 14: 1125, 2008)。大量(megadose)の意味は、体重あたり 20×10^6 個以上のCD34陽性細胞を移植する方法で、症例においては 60.0×10^6 個以上の細胞が投与されています。また、当然ですが、通常の造血幹細胞移植では臍帯血あるいは骨髓細胞を体重あたり $1 \sim 3 \times 10^8$ 個投与しており、白血病に対する同種幹細胞移植において行われるdonor

lymphocyte transfusion (DLI) では $1 \times 10^8/\text{kg}$ 以上のドナー T 細胞が輸注されています。つまり、ヒト血液細胞を 20×10^6 個投与することは通常の医療行為内において行われていると思います。

また、遺伝子導入細胞を 20×10^6 個投与することの危険性が何と意味しているかわかりませんが、遺伝子導入 CD34 陽性細胞に関しては NIH の症例や非ヒト霊長類アガゲザル (Rhesus Macaque) に $22 \times 10^6/\text{kg}$ の gp91phox 導入遺伝子導入細胞を投与した実験 (Mol Ther 14:202, 2006) があり、同様にヒト末梢血遺伝子導入 T 細胞に関しては HSV-TK DLI において $2 \times 10^8/\text{kg}$ 個の細胞を輸注しており、いずれにおいても何ら問題を認めておりません。

26. 本臨床研究における投与細胞数は最低投与量が 5×10^6 で、上限は定められておらず、gp91 の発現も「5%以上」(計画書 P. 33) とされています。このように投与細胞数及び gp91 の発現率の上限が規定されていないにもかかわらず、安全性及び有効性の評価が可能と考えた理由を説明してください。

(回答)

質問の意図が他の大規模研究と同様「安全性及び有効性を評価するためには本遺伝子治療においても投与する細胞や遺伝子導入効率を揃えるべき」ということであれば、ご指摘に通り「安全性及び有効性を評価すること」は不可能です。これら稀少難治性疾患に対する治療においておよそ対照をおくことは倫理的に許されず、また、遺伝子導入効率を含む細胞条件や患者状態(感染症の程度など)を揃えること現実的に不可能だからです。唯一可能な評価法としては、別紙(遺伝子治療臨床研究の安全性、有効性判定基準)で示した通り、historical control 等を用いて解析するしかありません。これが質問に対する求められた回答に値するかはわかりませんが、この判定基準で安全性、有効性を評価したい(評価するしかない)と思っています。

○ 治療後の対応

27. 計画書 P. 49～「有害事象発生時の対応」に関連して、ドイツ・スイスにおける CGD の遺伝子治療では 4 例中 3 例の骨髄異形成症候群 (MDS) が発症していることから、今回の臨床研究でも MDS の発症に対する備えが必要と思われます。MDS 発症を最も早期に検出する方法、発症年齢、MDS の治療法及び予後等について記載してください。

(回答)

通常の臨床で見られる MDS と遺伝子治療で見られる MDS を同一に考えることは無理があると思いますが、遺伝子治療においてこれら血液系の以上を早期に検出する方法はやはり LAM-PCR 等を用いたクロナリティー解析しかないと思います。その他、発症年齢(遺伝子治療後からの発症までの期間?)、治療法、予後は治療用ベクターが染色体のどこに挿入されるかによって違ってくると思われ、これらを一律に記載することは困難と考えます。

一応、IC 及び申請書には以下のように記載しています。

IC

「白血病などを発症した際には、抗がん剤治療を含め、適切な治療を行います。必要に応じて、臍帯血を含めた造血幹細胞移植を実施することも考慮します。

なお、今回の臨床研究ではこれら白血病の発症を予測し、また、早期に発見するために欧米で採用されている最新の検査技術を導入し、危険性を最小限に抑えるように努めています。」(IC p11)

申請書 (p51)

「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。」

また、ドイツの症例の MDS の詳細は資料 5-2-1 と 5-2-2 に記載しております。

28. RCR が患者体内に検出された場合、具体的にどのような治療を行うのでしょうか。有効性が確認されている抗レトロウイルス剤があるのでしょうか。

(回答)

現在、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において RCR を検出した症例は一例もなく、実際どのような治療法が有効であるかわかりません。一般的に血清によりウイルスは不活性化しますから、RCR が存在しても (持ち込まれても) 問題はないものと思われまます。ただ、検出量が多い場合は、効果の程はわかりませんが HIV 感染症で使用される核酸系逆転写酵素阻害剤は使用可能かと思ひます。

29. 投与後の患者のフォローアップとして十分な末梢血の採取が可能な場合には、より定量性の高い活性酸素生成能の測定を検討してはどうでしょうか。チトクローム c を用いたスーパーオキシドラジカルの生成能は、蛍光測定よりも定量性が高く、経時的な変化を追うのに適しています。

(回答)

ご指摘ありがとうございます。検討させていただきます。方法等を御教示頂ければと存じます。

○ 有効性

30. 治療効果が得られる可能性について、造血幹細胞遺伝子治療を一括して議論することは困難であり、対象疾患のタイプによって分けて考える必要があります。遺伝子導入

細胞の体内における増殖優位性が期待できる X-SCID、生存優位性が期待できる ADA 欠損症では、遺伝子導入効率が低くても機能を回復したリンパ球が次第に体内で優位になってくるメカニズムが働くため、臨床的効果が得られやすく、一方で、CGD の場合は、機能を回復した前駆細胞／顆粒球が増加してくることは期待できず、効果が得られるかどうかは最初の遺伝子導入効率次第です。また、最初は効果があっても、導入遺伝子のメチル化などにより、次第に遺伝子発現が低下し効果が薄れていくことが欧州の臨床研究で観察されています。(欧州の臨床研究で効果が出たのは、挿入変異によりクローン性増殖が出現したことによる。)このような、対象疾患による違いを正確に記載してください。

(回答)

ご指摘のとおり、原発性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子治療を一括して議論することは困難ですが、同時に「対象疾患による違いを正確に記載すること」も困難と考えます。確かに X-SCID や ADA 欠損症において治療遺伝子が導入された造血幹細胞は周囲の細胞に対し増殖優位性を示すでしょうが、これのみで遺伝子治療の成功、不成功が決まるわけではなく、X-SCID や ADA 欠損症においてもうまく行かない症例が多々あります (ADA 欠損症では低い遺伝子導入細胞率のため、いまだ PEG-ADA を継続している症例も少なくありません。イタリアの症例)。また、逆にドイツ・スイスの CGD 症例では、なぜかあのように高い遺伝子導入細胞率 (P1 40%程度、P2 15%程度) を長期間にわたり維持しています。もし、CGD において完全に遺伝子導入細胞の増殖優位性がないのであれば、当然のことながら消失していくわけです (アメリカの症例のように)。さらに、ご指摘の CGD 症例でのメチル化の件ですが、彼らから聞いたところによると、なぜか LTR 領域 (R3 領域) の promoter 領域のみメチル化が起こり (gp91phox の発現が下がり)、enhancer 領域にはメチル化が起こらなかった (MDS1 の活性化) そうです。その機序は全くわからないと言っていました (私信)。また、最近行われている WAS やサラセミア、ALD に対する造血幹細胞遺伝子治療の疾患による違いも私たちはどのように記載してよいかわかりません。

難治性疾患に対するこれら遺伝子治療はやはり症例が少なく、いまだ各疾患の遺伝子治療の有効性の違いがどこに由来するか (疾患、患者状態、ベクター、前処置、培養条件、など、など) 科学的に証明されていないと思います (だからこそ、遺伝子治療を継続すべきと考えますが)。このような段階で IC に「疾患による違いを正確に記載」するのは無理があると思え、やはり、時期尚早かと思えます。逆に、現時点での推論による記載はかなり誤謬があり (正直言って、私たちは疾患による違いを正確に、科学的に記載できる自信はありません)、患者さんの誤解を招く恐れがあり、延いては混乱さえを引き起こすような気がします。

もちろん、私たちは申請書や IC において単に慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療の安全性、有効性 (短期的な治療効果としてでも結構ですが) のみを言及しており、SCID-X1 遺伝子治療の成功例を我田引水的に一緒くたにして CGD の有効性を言及していません。

3 1. 機能回復した顆粒球がどの程度 (%と絶対数) あれば、遺伝子治療の効果が期待できるのか記載してください。

(回答)

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝治療の臨床効果は2つに分けられると思います。それは、1) 治療時ある重篤感染症の治癒と2) 治療後の重篤な感染症予防です。一般的にCGDのキャリア解析から全好中球の10%程度の正常顆粒球があれば健常人と同様の感染予防能力があるとされています。つまり、遺伝子治療において遺伝子導入細胞投与後の1ヶ月間くらいは比較的有意な遺伝子導入細胞率(1~10%)を示しますので、感染症に対し一定の治療効果は期待できると思います(NIHの症例で肝膿瘍と肺アスペルギルス症の改善)。ただ、長期的予後の関しては、よくわかりません。もちろん、NIHの症例やドイツの症例から1%程度の遺伝子導入細胞があれば感染予防に何らかに効果があると思いますが、本当にそれが遺伝子治療の効果であるかは不明です。ただ、実際、私たちは10%以下の活性酸素産生細胞しか持たないキャリア(母親)でも感染症を示さないことを経験しています。ただ、これも個人差もあると思いますので、やはり、現時点ではhistorical controlとの対比にて判断するしかないと思います。

○ 説明文書及び同意書

3 2. 説明文書 P. 10 の「レトロウイルスベクターの危険性」について、WAS での白血病や、レンチウイルスベクターを使ったヘモグロビン症に対する遺伝子治療についても記載すること。

(回答)

了解しました。下記のように追記します。

同意説明書 (p10)

「また、最近ではウイスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) において遺伝子治療を受けた患者さん 1 名に、上記 X 連鎖重症複合免疫不全症での遺伝子治療で見られたのと同じ白血病が発症したと報告があります。また、使用したベクターは異なりますが、レンチウイルスベクターを用いたヘモグロビン症での遺伝子治療で、ある遺伝子 (HMGA2) の近くに治療遺伝子を持った細胞が増殖したとの報告があります。」

3 3. 「治療効果がなく、免疫系が回復しない場合、再度遺伝子治療を繰り返し行わない」(説明文書 P. 11) という規定がありますが、当初効果を認め、その後効果が減弱・消失したような場合はどのように対応するのでしょうか。再治療を考慮することが可能となるような条件(倫理的・人道的な観点を含む)は臨床的にあるのでしょうか。

(回答)

同一遺伝子治療の繰り返しは世界的にも例がありません。これは、「遺伝子治療に治療効果がない」と判断すべきであるということと繰り返しの遺伝子導入はベクターコピー数を上げ、有害事象の発症を容易にすると考えられるからです。よって、遺伝子導入細胞の減

弱・消失をみた場合は、その臨床経過を観察し、重度の感染症等が発症した場合は、造血幹細胞移植を考慮すべきと考えます。

34. 説明文書の内容（米国 NIH の成績）がやや誇大であり、患者を誘導する可能性があるため、もう少し科学的に正確な内容に修正してください。

（回答）

米国 NIH の成績は 3 例中 1 名が死亡し、2 名は遺伝子治療後、治療前あった重篤感染症が治癒したことです（患者 1 は 5 年、患者 3 は 3 年）。これは事実であり、私たちはこれを誇大表現とは考えていません。ただ、長期の感染予防に関しては、私たちも何パーセントの遺伝子導入細胞が末梢血にあれば感染予防として効果があるかは分かりませんし、また、通常キャリア解析から推測される 1～10% の遺伝子導入細胞率を大きく下回っているのに、感染症が起こらないのは別のファクターによるものと考えるのも当然かと思えます。その点（長期感染予防に関して）を鑑み、同意説明文を以下のように訂正致します（IC p8）

「この臨床研究で行われる遺伝子治療が治療効果を示すと、現在、発症している重い感染症がおさまり、その後も慢性肉芽腫症による重い病状が発症しにくくなることが予想されます。これは、2006年に同一プロトコールで行われたアメリカの遺伝子治療で、遺伝子治療を受けた3名のうち2名の方で肝膿瘍や肺膿瘍などの感染症が治ったことから推測されます。ただ、長期的な感染症の予防に関しては、体内に残っている遺伝子導入細胞数が極端に少ないため、その効果は科学的には証明されていません。」

35. 計画書、説明文書中に利益相反に関する記述を追記してください。

（回答）

下記のように記載しました。

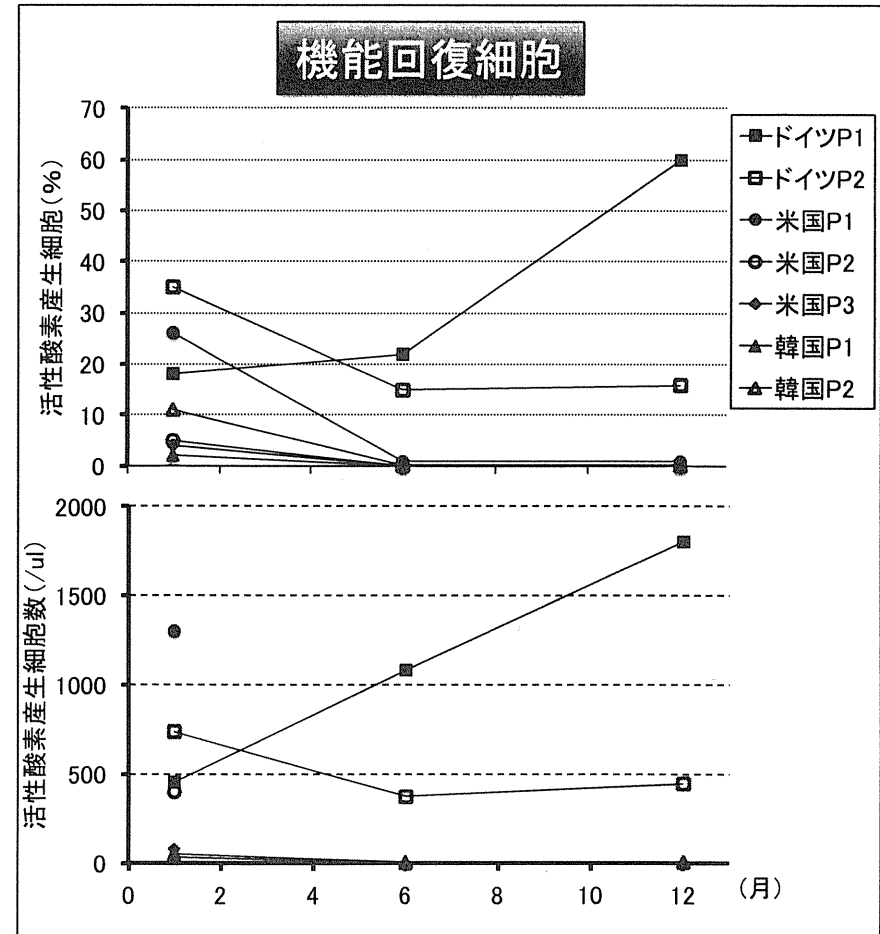
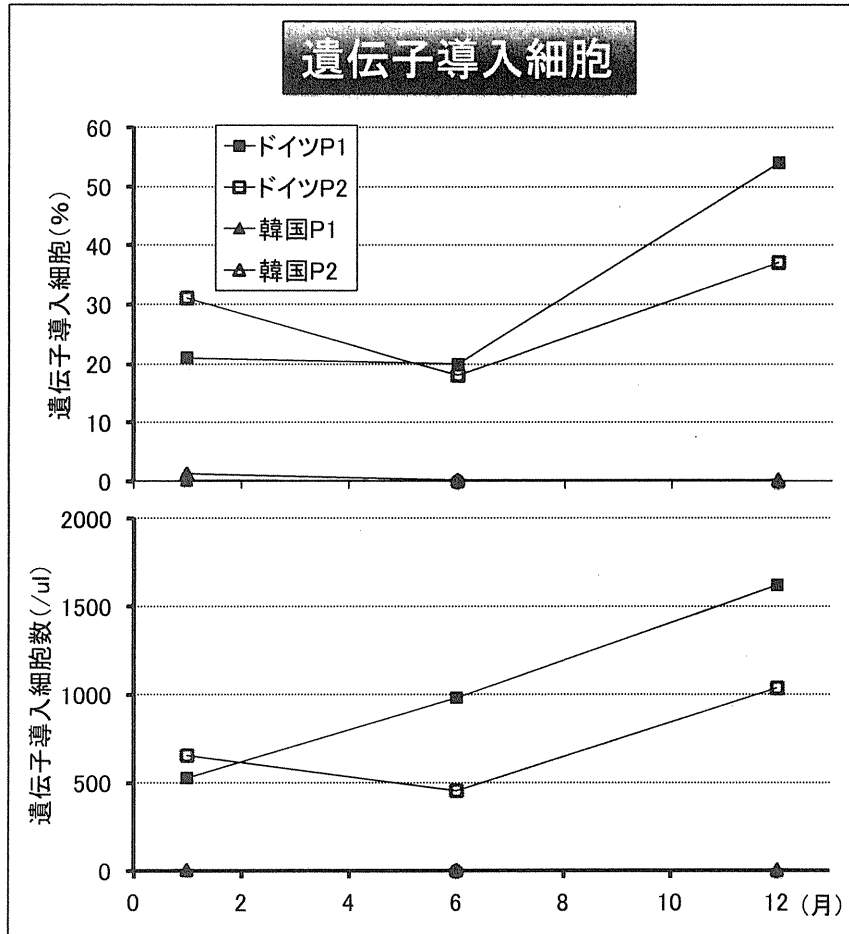
実施計画書（p58）

11. 利益相反に関して

今回の遺伝子治療臨床研究に関わる全ての研究者、医師はいかなる企業とも利益相反関係にないことをここに示す（当センターにおける COI 委員会に申請済）

説明文書（p15）

「なお、この臨床研究に関わる全ての研究者、医師はいかなる企業とも利益相反関係にないことをお伝えします。」

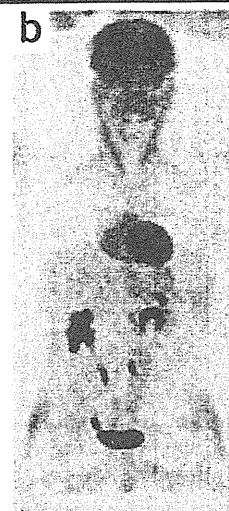
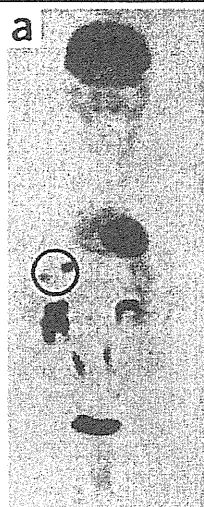


Ott MG, Grez M, et al. *Nat Med.* 2006 Apr;12(4):401-9.
 Kang EM, Malech HL, et al. *Blood.* 2010 Jan 28;115(4):783-91.
 Kang HJ, Ahn HS, et al. *Mol Ther.* 2011 Nov;19(11):2092-101.

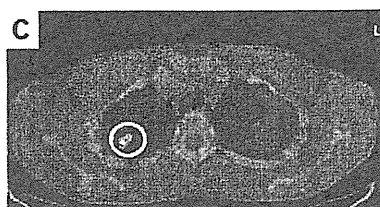
遺伝子治療前

遺伝子治療後

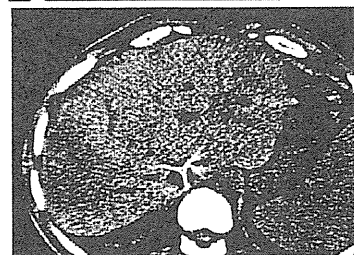
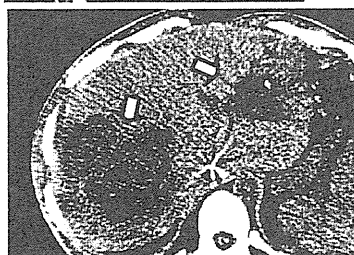
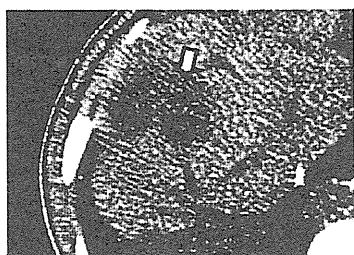
ドイツP1: 肝膿瘍



ドイツP2:
肺アスペルギルス症



米国P1:
肝膿瘍



米国P3: 肺アスペルギルス症が軽快

韓国P1, P2: 遺伝子治療時に、重篤な感染症なし
遺伝子治療後、重症感染症への罹患なし

独立行政法人国立成育医療研究センター倫理予備審査委員会規程

(目的)

第1条 この規程は、独立行政法人国立成育医療研究センター（以下「センター」という。）倫理委員会規程（平成22年委員会規程第5号。以下「倫理委員会規程」という。）第3条第2項の規程に基づき、倫理予備審査委員会（以下「委員会」という。）の運営にあたって必要な事項を定め、委員会における審査を円滑に進めることを目的とする。

(審査対象)

第2条 委員会は、倫理委員会への申請が予定されている医療行為の臨床実施計画及び医学研究計画について科学的妥当性及び倫理的配慮の観点から審査を行う。

(委員会の構成)

第3条 委員会は次の各号に掲げる部会により構成する。

- 一 基礎医学研究部会
 - 二 社会医学研究部会
 - 三 治療研究部会
- 2 各部会に部会長、副部会長を置く。
- 3 部会長は、部会を統括し部会長に事故あるときは、副部会長がこれを代行する。
- 4 委員及び各部会長の任命は総長が行う。
- 5 各部会において、専門的知識を有する者の見識を必要とした場合、総長の了解の下に委員以外の者を加えて審議できるものとする。

(部会の審査対象)

第4条 前条第1項の各部会の審査対象は次の各号に掲げるとおりとする。

- 一 基礎医学研究部会 ヒト由来の資料を対象とした基礎研究。
- 二 社会医学研究部会 観察研究等、人体から直接採取された資料を用いないが、既存資料以外のヒトの健康に関する情報を用いる研究
- 三 治療研究部会 ヒトを対象とした臨床研究のうち侵襲性を有するもの及び医療行為のうち安全性及び有効性が確立していないもの。

(審査の申請)

第5条 審査を申請しようとする者（以下「申請者」という。）は、倫理委員

会規程第7条に定める申請書等を企画経営部研究医療課を通じて審査を担当する部会長あて提出しなければならない。

(部会の開催及び議事)

第6条 各部会は、部会長が必要と認めた場合、部会長が招集する。

- 2 部会は、委員の過半数が出席しなければ開くことができない。
- 3 委員が申請者である場合は、その委員は、審議に加わることはできない。
- 4 部会は、審議をするにあたって、申請者の出席を求め、申請内容等の説明を受け、また必要な場合には参考人の出席を求め、その意見を徴することができる。
- 5 部会長は、同条2項から4項までの手続きを、書面のみにより行うことが適当と認める場合は、委員が部会長に意見を提出することにより代えることができる。

(部会の判定)

第7条 部会の判定は、出席委員全員の合意を原則とする。ただし、前条5号により開催した場合は、全委員の合意を原則とする。

- 2 判定は、次の各号に掲げる表示による。
 - 一 承認
 - 二 条件付承認
 - 三 継続審査
 - 四 非該当
- 3 前項第1号の判定がなされた申請及び第2号の判定がなされた申請のうち、承認に必要と判断された条件を満たしたと部会長が判断した申請でなければ倫理委員会へ申請することができない。

(判定の通知)

第8条 部会長は、部会審査の判定を様式1（様式2を含む。）による通知書をもって、申請者に速やかに通知しなければならない。

- 2 前項の通知をするにあたっては、審査の判定が、第7条第2項第2号、第3号及び第4号である場合には、その理由等を記載しなければならない。

(審査判定不服申立て)

第9条 申請者は、審査判定を不服とする場合は、様式3をもって不服理由を記載の上、前条第1項の通知を受理した日から1年以内に総長に不服申し立てを行うことができる。

(委員の責務)

第10条 委員会の委員は、職務上知りえた情報を正当な理由なく漏らしてはならない。また、委員を辞した後も同様とする。

(庶務)

第11条 この委員会に関する庶務は、企画経営部研究医療課が行う。

附 則

(施行期日)

この規程は、平成22年4月1日から施行する。