

201312019A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する
遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備

平成25年度総括・分担研究報告書

平成26年（2014年）3月

研究代表者

小野寺雅史

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備

目 次

I. 総括研究報告	研究代表者 小野寺雅史 …	1
II. 分担研究報告		
1. 小児難治性疾患に対する遺伝子治療の現状と我が国の問題点	小野寺雅史…	11
2. 原発性免疫不全症への遺伝子治療に関する研究	内山 徹…	16
3. ライソゾーム病の遺伝子変異に関する研究	大橋 十也…	20
4. ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究	衛藤 義勝…	22
5. 遺伝子・細胞治療のための分子生物学的解析	中林 一彦…	26
6. 造血未熟細胞移植時に使用する薬物血中濃度モニタリングに関する研究	大森 栄…	31
7. 先天性免疫不全症の新生児スクリーニングの開発	野々山恵章…	33
8. PIDJを介した遺伝子治療対象疾患患者に対する遺伝子診断法と スクリーニング方法に関する研究	今井 耕輔…	39
9. 遺伝子治療対象疾患のハイリスクスクリーニング法の確立とその臨床応用	奥山 虎之…	44
10. 北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) の構築とその集計結果について	有賀 正…	47
11. 慢性肉芽腫症登録事業に関する研究	布井 博幸…	50
12. 遺伝子・細胞治療実施に係る基盤整備	藤本純一郎…	53
13. 遺伝子治療における ICH-GCP に準拠したデータ管理	瀧本 哲也…	56
III. レンチウイルスベクター製造および遺伝子導入法検討報告書		61
IV. 班会議プログラム・議事録		117
V. 研究成果の刊行に関する一覧表		121
VI. 研究成果の印刷物・別刷		129

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

総括研究報告書

国際共同治験に基づく小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備
（H25-次世代-一般-007）

主任研究者 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部部長

研究要旨

我が国において小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療を継続して実施していくため、全国の原発性免疫不全症ならびに先天性代謝異常症の専門家と共に臨床研究中核病院である成育医療研究センターが中心となり、国内企業との連携の下、欧米で行われている遺伝子治療に国際共同治験として参加し、そこで得られる知見を基に我が国に小児稀少難病に対する治験実施体制を整備する。本年度は、以下の研究を行い、治験実施体制の整備を行った。

遺伝子治療の実態調査として欧米のこれまでの遺伝子治療臨床研究の結果をまとめた。前臨床研究としては免疫不全症とライソゾーム病に焦点を当て、それら疾患に対する遺伝子治療の基礎的研究を行った。また、次世代シーケンサーを用いた治療用ベクターの染色体挿入部位網羅的解析法ならびに前処置として使用するブスルファンの中モニタリング法を確立した。治験実施のために必要となる診断や患者登録に関しては、免疫不全症、代謝異常症に関するマス・スクリーニングや免疫不全症の患者データベースを整備した。また、当センターにおける実施体制に関しては臨床研究中核病院における遺伝子・細胞治療の基盤整備や ICH-GCP に基づくデータ管理体制を準備した。

なお、小児稀少難病に対する遺伝子治療臨床研究（治験）の国際共同研究に関しては現在海外の企業と協議中であり、正式な契約締結後、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談を受け、治験を始める予定である。

分担研究者・所属機関・職名

内山 徹
国立成育医療研究 C 成育遺伝研究部・室長
大橋 十也
東京慈恵会医科大学総合医科学研究 C・センター長、DNA 医学研究所遺伝子治療研究部・教授
衛藤 義勝
財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究 C・センター長、遺伝病治療研究所・所長
中林 一彦
国立成育医療研究 C 周産期病態研究部・室長
大森 栄
信州大学医学部附属病院薬剤部・教授
野々山 恵章
防衛医科大学校小児科学講座・教授
今井 耕輔
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座・寄附講座准教授
奥山 虎之
国立成育医療研究 C 臨床検査部・部長
有賀 正
北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授
布井 博幸
宮崎大学医学部生殖発達学講座小児科分野・教授
瀧本 哲也
国立成育医療研究 C 社会・臨床研究センター開発薬事・プロジェクト管理部・室長
藤本 純一郎
国立成育医療研究 C 理事長特任補佐室長

A. 研究目的

現在、欧米を中心に小児稀少遺伝性難病に対する遺伝子治療が数多く行われ、その有効性が臨床レベルで証明されている。殊に、原発性免疫不全症（PID）では造血幹細胞移植の適応とされない症例において遺伝子治療が根治療法とよべるほどの成績を上げ、アデノシン・デアミナーゼ（ADA）欠損症に至っては遺伝子治療が有効な一治療法として認識されている。一方、我が国の遺伝子治療は欧米のように進んでいない。この最大の理由は我が国には遺伝子治療を支える十分にインフラがないことである。特に、欧米では遺伝子治療が医薬品の承認を目指した治験ベースで行われるに対し、我が国では遺伝子治療に興味を示す国内企業が少なく、遺伝子治療が医師や研究者による臨床研究レベルで留まり、その実施方法の違いが国内での遺伝子治療の発展を困難なものにしている。ただ、これらのことは遺伝子治療に限ったことではなく、全ての臨床研究にも当てはまり、基礎研究から臨床研究の間にある「死の谷（death valley）」を如何にして乗り越えるが最大の課題となっている。これに対し、我が国にてにおいても、近年、国内に5つの「早期・

探索的臨床試験拠点」と10の「臨床研究中核病院」が定められ、そこで医師主導治験を主体とする臨床研究を積極的に推進しようとする動きがあり、幸運なことに国立成育医療研究センターも平成25年度に「小児・難病治療開発のオールジャパン体制」の構築を目指した臨床研究中核病院に採択された。

そこで、本研究ではPIDあるいは先天性代謝異常症に焦点を当て、全国のこれら疾患に対する専門家と共に臨床研究中核病院である当センターが中心となり、遺伝子治療においては十分な実績を有する国内企業のタカラバイオ社と連携し、現在、フランス GENETHON あるいはイタリア San Raffaele 研究所で行われている原発性免疫不全症の Wiskott-Aldrich 症候群あるいは ADA 欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療を医師主導治験として我が国で実施することを目的としている。そして、これら過程を通じて習得する様々な知見を基に産官学が協働する我が国に適した遺伝子治療（治験）の実施体制を整備する。また、これら稀少疾患に対する遺伝子治療を継続して実施していくためには、全国規模の患者登録体制や発症早期あるいは発症前に診断を可能にする簡便なスクリーニング法も重要となり、本研究において合わせて研究を進める。

B. 研究方法

<欧米における遺伝子治療の実態調査>

1. 海外で行われている遺伝子治療の現状と日本の問題点

公開されている学術論文や資料ならびに日米欧の規制当局のホーム・ページにて情報を入手し、また、いまだ未発表当のデータに関しては、直接、海外の遺伝子治療関連の施設を訪問し、その担当者に会い、情報を入手した（小野寺）。

<前臨床試験>

1. PID に対する前臨床試験

遺伝子臨床研究で使用されるウイルスベクターの安全性、有効性を評価する系を確立するため *in vitro* 不死化アッセイと疾患由来 iPS 細胞の樹立を行った。前者に関しては複数の内部 promoter を有する self inactivated (SIN) レトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターを構築し、K562 細胞に感染させ、そのウイルス力価を評価した。疾患由来 iPS 細胞の樹立に関しては ADA 欠損症、X 連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1)、慢性肉芽腫症 (CGD)、WAS

などの患者から細胞を調製し、センダイウイルス等を用いて iPS 細胞を樹立した（内山）。

2. ライソゾーム病に対する前臨床試験

1) 先天性代謝異常症に対するマス・スクリーニングにおいて陽性者に対する遺伝子解析や酵素活性測定を円滑に進めるためファブリー症 (FD) 患者家系を対象とし、その家系の遺伝子解析をダイレクトシーケンス法にて行い、その原因タンパク質のガラクトシダーゼ (GLA) の酵素活性を測定した（大橋）。

2) 先天性代謝異常症に対する遺伝子治療を確立するため FD 患者由来皮膚線維芽細胞よりセンダイウイルス等を用いて iPS 細胞を樹立した（衛藤）。

3. その他の非臨床試験

1) 治療用ベクターの染色体挿入部位を次世代シーケンサーにて網羅的に解析するため、実際の遺伝子治療で使用された二種類のレトロウイルスベクターの LTR 配列とコントロール遺伝子として Sonic hedgehog (*SHH*) 遺伝子をコードするエクソン配列を対象とした。使用するゲノム DNA 濃度を 1~3 μ g とし、アジレント社の SureSelect キットにてエクソームライブラリーを作製した。解析にはイルミナ社 HiSeq1500 を用い、ペアエンド法 (100bp x2) にて遺伝子配列データを取得した。また、SCID に対する既知遺伝子解析のため合計 28 個の遺伝子を対象としたカスタムアンプリコンをデザインした（中林）。

2) 造血幹細胞遺伝子治療に際に用いられる前処置としてのブスルファンの血中濃度を測定し、その薬物体内動態を予測する系を確立する。また、小児臨床例を用いて体内動態パラメータの算出を行い、そのパラメータをもとに薬物投与量を測定し、その妥当性を検証した（大森）。

<マス・スクリーニング法、患者登録>

1. PID に対するマス・スクリーニング

1) PID に対するマス・スクリーニング法を確立するため、T 細胞受容体再構成断片 (TREC) と免疫グロブリン κ 遺伝子再構成断片 (KREC) の測定とその基準値を検討した。検体としては臍帯血 87 例、臍帯血ろ紙血 78 例、新生児ろ紙血 60 例を対象とし、また、健常時末梢血 53 例も同様に解析した。さらに、無 γ グロブリン患者 12 例、SCID 患者 21 例、IL2RG 欠損患者 15 例、JAK3 欠損患者 2 例、LIG4 欠損患者 2 例、ADA 欠損症患者 2 例も解析した。解析法は直径 6mm 大のろ紙血 2 個より DNA を抽出し、DNA 濃度測定後に TREC、cjKREC、sjKREC、

RNaseP (internal control) を定量 PCR にて測定した (野々山)。

2) 現在、我が国では PID 疑い患者に対する前方視的登録と遺伝子診断ネットワーク構築のため PIDJ において患者検体を集積しているが、今回、これら検体を用いて TREC と KREC の測定及びこれらスクリーニングにて陽性となった患者の微量サンプルを用いた FACS (BD LSR Fortessa) によるリンパ球解析を行った (今井)。

2. ライツゾーム病に対するマス・スクリーニング

ライツゾーム病に対する早期あるいは発症全診断を可能にするハイリスク・スクリーニング法を確立し、その臨床応用を目指すため、ポンペ病を対象としてろ紙血検体を用いた酸性グルコシダーゼ活性の測定法を開発する。方法としては蛍光人工基質である 4 メチルウンベリフェリルグルコシドを用いた酸性グルコシダーゼ酵素活性定量法であり、また、酸性グルコシダーゼ酵素活性の低値を示した症例では pseudo-deficiency (偽欠損) の可能性を考慮して G576S 多型の検出も行った (奥山)。

3. PID のデータベース

1) 現在、我が国には日本免疫不全症研究会が中心となって日本免疫不全症データベース (PIDJ) が運営されているが、今回、北海道地区における PID 患者を PIDH としてまとめた。方法としては、北海道大学小児科、札幌医科大学小児科、旭川大学小児科から担当者を示し、その関連病院において診断された PID 患者を PIDH として登録するものである (有賀)。

2) 我が国における CGD の全国統計を行うため、2009 年までに宮崎大学に相談があり、主に DHR-123 法にて CGD と診断された 286 名を対象とした。このうち PIDJ に CGD として登録された患者数は 166 例で、疑い例が 12 例、登録重複患者が 13 名であった。各県別発生頻度、各年齢別発生頻度については、2011 と 2012 年総務省統計局統計調査部国勢統計課「国勢調査報告」「人口推計年報」基に計算した (布井)。

<遺伝子治療の基盤整備関係>

1. 基盤整備・データ管理

1) 国立成育医療研究センターが厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業の指定を受けたため、本整備事業における遺伝子治療臨床研究 (治験) の位置付けを検討した。また、研究代表者、関連企業の担当者、臨床研究センター (現: 社会・臨床研究センター) 担当者等との

協議会を持ち、遺伝子治療の方向性や計画性等を定めた。さらに、外国企業からの契約書等の内容確認については当センターの顧問弁理士に相談し、契約の締結に向けて準備を進めた (藤本)。

2) 遺伝子治療臨床研究 (治験) においては ICH-GCP に準拠したデータ管理を要求されるため、データ管理に関する各種標準業務作業手順書 (SOP) を作成するとともに Source Document Verification (SDV) モニタリングの実施が可能な体制を検討した (瀧本)。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた実施計画書の作成は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 16 年 2 月 19 日) に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正) に基づいて作成した。実施に関しては、国立成育医療センター内の「遺伝子治療臨床研究審査委員会」や関連政府機関で審査を受けた後、厚生労働大臣からの承認が得られた時点で開始される。

実施計画書作成に必要な前臨床試験の一部では、臍帯血から採取した造血幹細胞を用いるが、この一連の実験については、すでに施設内の倫理審査委員会および臍帯血バンクの倫理審査委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。今回の研究における挿入部位同定は、一部、患者の遺伝子情報を解析する可能性もあることから、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行い、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行う。

C. 研究結果

<欧米における遺伝子治療の実態調査>

1. 海外で行われている遺伝子治療の現状と日本の問題点

1990 年、ADA 欠損症に始まった遺伝子治療臨床研究であるが、当初は使用する細胞が自己の細胞であったため、遺伝子導入細胞投与時に患者に対しては造血幹細胞移植で行われるような前処置は不要と考えられていた。ただ、それまでに行われてきた遺伝子治療の結果を検討したところ、たとえ自己細胞を用いる遺伝子

治療でも前処置は必要と考えられ、ADA 欠損症に対する遺伝子治療よりブスルファン等を用いた前処置が行われ、治療成績は飛躍的に向上した。このため、現在では造血幹細胞遺伝子治療において前処置は遺伝子導入細胞生着のために必須と考えられている。次に、使用するウイルスベクターであるが、当初は安定して遺伝子組換えウイルスを産生できるマウス白血病由来レトロウイルスベクターが使用されてきたが、2000年のSCID-X1遺伝子治療において白血病が発症し、より安全性なレンチウイルスベクターが使用されるようになってきた。ただ、現時点で重篤な有害事象の発症はないものの promoter 活性の弱さからその臨床症状の改善に時間がかかり、また、その治療効果も十分ではない。ただ、WASのようにレトロウイルスベクターにて頻回な白血病を認める症例もあり、今後は前処置同様、疾患毎のベクター選択が必要になってくると思われる。最後に欧州における遺伝子治療の発展をみるとそれは単に遺伝子治療に関わる技術開発の結果に帰結するのではなく、遺伝子治療を包括的に支援する体制整備が必要であり、日本においても本研究のような体制整備に関わる研究が重要となってくると思われる（小野寺）。

<前臨床試験>

1. PIDに対する前臨床試験

作製したベクターは現行のレトロウイルスベクターとしてMND（ADA欠損症）、SFFV（CGD）、MFG（SCID-X1）であり、SINレトロ、レンチウイルスベクターとしては promoter/enhancer の3' LTR のU3領域が欠損し、代わりにEF1 α s、WS1.6配列（WAS遺伝子上流1.6 kb）、UCOE（ubiquitous chromatin opening element）が内部 promoter として組み込まれている。また、発現効率向上のためWPRE（woodchuck hepatitis virus posttranscriptional element）も挿入されている。これらベクターを水疱性口内炎ウイルスであるVSVGにパッケージし、K562細胞への感染実験を行い、いずれのベクターも導入遺伝子としてのEGFPの発現を確認した。疾患由来iPS細胞樹立に関しては、患者由来単球あるいは骨髄線維芽細胞を用いて、従来法であるレトロウイルスベクターあるいはセンダイウイルスを用いた遺伝子導入にてiPS細胞を樹立した。これまでSCID-X1、ADA欠損症、CGDに対してはiPS細胞を樹立し、現在、WAS iPSを樹立中である（内山）。

2. ライソゾーム病に対する前臨床試験

1) 先天性代謝異常症に対するマス・スクリーニング GLA 遺伝子解析の結果、2名のFD男性患者(5.1, 10.4)はGLA遺伝子 intron3 に点突然変異(G>C)が存在していた。ファブリー症状を認める女性(101, 120, 421)では同個所にG/Cヘテロのシグナルが検出された。ファブリー症状のない女性(396, 497)は対象群(169, 281)と同様のシグナルであった。(カッコ:GLA活性単位 nmol/mg/hr、正常値 170-281) (大橋)。

2) FD患者由来皮膚線維芽細胞よりセンダイウイルスあるいはレトロウイルスベクターを用いて山中4因子を導入してiPS細胞の樹立した(衛藤)。

3. その他の非臨床試験

1) 使用したLTRはMoloney murine leukemia virus (MoMLV、444bp)とMyeloproliferative sarcoma virus (MPSV、589bp)由来LTRであり、ヒトゲノムにはこれらLTRと高い相同性を有する配列は含まれていない。RNAベイト長は120bpであり、隣接するベイト同士は60bpの冗長部分を持つように設計した。これによりMoMLV LTRでは17個、MPSV LTRでは12個のRNAベイトにより全配列をカバーできる。解析する細胞として上記ウイルスベクターが挿入されているHEK293細胞とK562細胞を用い、ゲノムDNAを抽出し、濃縮ライブラリーを作製し、各ライブラリーについて100Mb程度のシーケンスを取得した。また、カスタムリシーケンシングによる迅速変異同定法としてはSCIDに関わる遺伝子28個を選定し、イルミナ社シーケンサー用のアダプター及びインデックス配列を付加し、インサートサイズのライブラリーが作製できたことを確認した(中林)。

2) 臨床検体試料を用いて高速液体クロマトグラフィー法によりブスルファンの血中濃度定量法を確立した。同方法を用いて造血幹細胞移植患者におけるブスルファンの薬物血中濃度モニタリングを実施し、その確からしさを検証した(大森)。

<マス・スクリーニング法、患者登録>

1. PIDに対するマス・スクリーニング

1) 免疫不全症のない臍帯血、末梢血における内因性コントロールとしてのRNasePには年齢により差はなく、TREC/cjKREC/sjKRECとRNasePとに正の相関を認めた。また、TREC/cjKREC/sjKRECは全例で確認できた。cjKREC/sjKRECは新生児で他の年齢と比べて低く、乳幼児で最高値を示し、それ以降は低下する傾向

を示した。疾患別では無 γ グロブリン血症で TREC は正常範囲であったが、cjKREC/sjKREC は全例検出感度以下であった。一方、SCID では TREC は maternal T 陽性例を含め全例で低値あるいは検出感度以下であった。ただ、IL2RG 欠損症や JAK3 欠損症では cjKREC/sjKREC は全例検出可能で健常人と有意な差を認めなかった。毛細血管拡張性運動失調症や Nijmegen 染色体不安定症候群では全例 KREC が陰性であった（野々山）。

2) 2013 年に集積した 160 症例のうち 15 症例で SCID (IL2RG 遺伝子 4 例、RAG2 遺伝子 1 例、LIG4 遺伝子 1 例、STAT5 遺伝子 1 例) と診断でき、6 症例の WAS 遺伝子変異を同定した。また、微量検体 (250 μ l) を用いた 10 color FACS にて T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球の評価系を確立した（今井）。

2. ライソゾーム病に対するマス・スクリーニング

解析した 288 検体のうち 3 例 (1.04%) でポンペ病と診断し、また、G576S 多型を有する pseudo-deficiency (偽欠損) は 19 例 (6.6%) であった。このことから乾燥ろ紙血を用いた酵素活性測定法はポンペ病患者と非ポンペ病患者を識別するのに有効な方法であった（奥山）。

3. PID のデータベース

1) 2006 年以降、PIDH に登録された症例は 72 例 (生存 65 例、死亡 7 例) であり、うち 24 例で造血幹細胞移植が行われた (生存 22 例、死亡 2 例)。これらを全国統計 (PIDJ) のデータと比較すると概ね同様の傾向を示したが、PIJH では III 群と V 群が多く、VII が少ないことが分かった。ただ、これは事務局である北海道大学が WAS (III) や CGD (V) を主な研究テーマとして取り上げていることと関連がある可能性はある (有賀)。

2) 宮崎大での登録で 195 例、PIDJ の登録で 50 例、重複例が 91 名例であり、病型としては解析可能であった症例で gp91 欠損が 167 例

(80%)、p22 欠損が 16 例 (8%)、p47 欠損が 11 例 (5.3%)、p67 欠損が 14 例 (6.7%) であった。発症率としては診断法が確立した 1970 年以降で人口 100 万人に対して 5.13 ± 1.63 人であり、19.4 万人に一人の割合であった。また、336 名中 73 名で死亡が確認され、平均死亡率は 22%、死因としては 1980~1990 年では真菌症 (Aspergilloma、Candidiasis) が、2000 年に入ってから真菌 (特に Candidiasis) と移植関連死亡例が多かった (布井)。

<遺伝子治療の基盤整備関係>

1. 基盤整備・データ管理

1) 臨床研究中核病院整備事業は世界的に通用する ICH-GCP 準拠の質の高い臨床研究を実施するための整備事業であり、その点から今回の遺伝子治療臨床研究 (治験) はその方向性と合致することが確認された。このため、治験・医師主導治験の開発薬事に精通しているもの、データマネージメントに精通しているもの、ならびに知財・産学連携の担当者がチームと作り、関連企業との協議会を開いた。また、今回の遺伝子治療臨床研究が海外との連携によるため、外国語による契約締結に関して当センターの顧問弁理士と相談して、これら契約締結の準備を進めている (藤本)。

2) 遺伝子治療は実験的要素や特殊医療技術を多く含む先進医療であり、その症例登録には遺伝子治療臨床研究適応判定委員会の承認が必要である。また、白血病発症等重篤な有害事象発症に際しては特殊な手順が必要となる。同時にこれら疾患は稀少疾患であり、目標となる症例数が極めて少ないことから統計学的処理には馴染まず、1 例ごとの有効性と安全性の評価が重要となる。さらに実施施設が当センターのみであることから施設訪問で行う SDV モニタリングと中央データマネージメントとの区別が判然としない。よって、本研究に特有の SOP が必要となり、GCP 本文を参考にしつつ

GCDMP (Good Clinical Data Management Practices: 日本製薬工業協会訳) から必要事項を抽出した。内容としては、a. 総論的事項、b. データマネージメント、c. データベース作成、d. Electric Data Capture (EDC)、e. 有害事象の収集と報告、f. 監査等である。また、施設訪問モニタリングによる Source Document Verification (SDV) に関しては、遺伝子治療が当センター単施設での実施となるため施設訪問モニタリングについては当面不要と考えられるが、将来の治療施設が増加する可能性を考慮し、また来年度以降のモニター要員の雇用も視野に入れつつ、上記の具体的な内容について検討することとした (瀧本)。

<遺伝子治療臨床研究の進捗状況>

現在、臨床用ベクターの輸入元をフランス NPO 団体 GENETHON あるいはイタリア San Raffaele 研究所として、直接担当者に会って日本での実施に関する交渉を進めている。そして、契約締結後に実施に必要な非臨床・臨床試験のデータや品質試験に関するデータを入手し、

PMDAとの薬事戦略相談を開始する。なお、これら非臨床試験データ等に国内での治験における必要事項が含まれていなければ、国内で追加実験を行えるよう企業委託を含めてその準備を進めている。

D. 考 察

現在、遺伝子治療は「疾患の治療を目的に遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する治療法」と定義され、具体的には機能遺伝子（治療遺伝子）を患者体内で発現させることがその基本となる。このため、患者体内（細胞）に機能遺伝子を入れることが重要となるが、それを行うのが「遺伝子の運び屋」とよばれるベクターであり、現行では効率性の観点から染色体に直接機能遺伝子を導入し、その発現を維持するレトロウイルスベクター（レンチウイルスベクターも含む）か、肝臓、筋肉、神経等静止期の細胞にも機能遺伝子を導入できるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが主に用いられる。ただ、問題はこれらウイルスベクターを安全性の観点から如何にして臨床の場で使用できるものとして製造するかであり、実際、その製造には安定してウイルスベクターを産生する細胞（vector producer cell line: VPC）が必要となる。このVPCの樹立には単一細胞より増殖させ、その安全性が確認した Master Cell Bank（MCB）とこのMCB 1バイアルより培養を開始し、およそ100バイアルの細胞保存になるように培養した Working Cell Bank（WCB）が必要となる。そして、このWCB 1バイアルからVPCを培養し、ウイルスベクターを回収することになるが（transient transfectionの場合、WCBの細胞にDNA plasmidを導入し、一過性に発現するウイルスを回収する）、その全て段階は極めて厳しい安全性試験が要求され、その安全性を担保する必要がある。ただ、これにかかる費用は莫大であり、一研究者あるいは一研究機関が通常の研究補助金にて行うのは不可能に近い。よって、これらを克服する手段・体制が必須であり、その体制の有無こそが欧米と我が国との違いとなっている。

たとえば、フランスにはGENETHONとよばれる臨床用ウイルス製造機関がある。このGENETHONはフランス筋障害協会（AFM）がTELETHON（テレビにて募金を募るシステム）にて得た資金を基に1990年に設立したNPO団体で、その設立の目的は「遺伝性疾患の病態解明に役立つツールの開発」であり、設立当初はヒトゲノムのmappingを行い、ゲノム解読が終

了した1997年より遺伝子治療用のベクター開発に着手した。この後、複数の遺伝子治療用ベクターの製造を行い、2010年からは本格的に遺伝性疾患に対する遺伝子治療を開始した。ただ、重要な点はGENETHONが医療機関ではなく、あくまでも臨床で使用するGMP準拠ウイルスを製造する研究機関であり、実際の遺伝子治療臨床研究はGENETHONが製造するベクターを用い、欧米の複数の医療機関がコンソーシアムを形成することで行っている点である。この点から、今回、本研究で実施を計画しているWASに対する造血幹細胞遺伝子治療はこの治験に参加するものであり、現在、フランス、英国、米国の3施設（各施設5症例、合計15症例）で行われているWAS遺伝子治療臨床研究に第4の医療機関として参加することになっている。また、GENETHONの特異な点は、年30億円程度かかる運営費の85%をフランスTELETHONより補填されている点で、これだけの多額の経費が寄付金にて賄われていることは驚きに値する。ただ、これだけの多額の民間からの募金はその設立の趣旨（遺伝性疾患の病態解明に役立つツールの開発）のために使用されることは逆に理想的とも思える。

さて、次にPID、特にSCIDに対するマス・スクリーニングについて考える。およそSCIDはその診断に急を要し、1歳までに根治的治療法である造血幹細胞移植を行わないとその生存率は極端に低下する。また、新生児早期に行われる生ワクチンのBCGやロタウイルスワクチンにより未診断患児が医原性感染症に罹患する危険性もあり、安全な予防接種の在り方を考えたときこの問題は重大である。このように、たとえ造血幹細胞移植や遺伝子治療の有効性が確かなものであっても、PID患者を発症前（新生児早期）に診断することは極めて重要で、同時に、このような診断法が全国規模で導入できれば根治療法である造血幹細胞移植や遺伝子治療が重度の感染症の無い状態で行うことができ、患者の生命予後は大きく改善する。さらに、このことは医療の均てん化にもつながる。

実際、このTREC測定による新生児マス・スクリーニングが米国ウィスコンシン州で行われ、20万人の新生児のうち5名のSCID患者を診断したと報告されている（J Allergy Clin Immunol. 124: 522-527, 2009）。このようなことを考えるとSCIDに対する新生児マス・スクリーニングは早々に導入する必要があり、現在、成育医療研究センターで小規模のモデルの実施を行っており、一定の期間後、その確からし

さを検証できれば全国の地方自治体へのその範囲を広げていきたいと考えている。

E. 結 論

1. WAS遺伝子治療における臨床用ベクターの輸入先としてフランス GENETHONあるいはイタリア San Raffaele研究所と交渉を進めており、契約締結後にすでに欧州等で承認されている非臨床・臨床試験データ、品質試験データを入手し、PMDAとの薬事戦略相談を開始する。
2. 欧米で行われている遺伝子治療臨床研究の成績をまとめた。
3. 前臨床試験としてPIDあるいは先天性代謝異常症に関する基礎研究を行い、また、実際の遺伝子治療臨床研究で使用予定の治療用ベクターの挿入部位解析ならびにブスルファンの血中モニタリング法を確立した。
4. PIDあるいは先天性代謝異常症におけるマス・スクリーニング法ならびに患者登録に関する疫学研究を行った。
5. 臨床研究中核病院として本研究の支援の仕方を検討し、また、ICH-GCPに準拠したデータマネジメント体制の導入を準備している。同時に床研究中核病院としてARO機能の導入も検討している。

F. 健康危険情報

WAS 遺伝子治療において治療を受けた 10 名中 7 名で造血系異常を発症し、うち 6 名が T 細胞系白血病、3 名が骨髄系白血病を発症した。この骨髄系白血病を発症した 3 名のうち 2 名は T 細胞系白血病を発症した後に骨髄系白血病を発症したが、1 名は初発から骨髄系白血病を発症した。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

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

II. 分担研究報告

小児難治性疾患に対する遺伝子治療の現状と我が国の問題点

研究分担者 小野寺雅史 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部部长

研究要旨

現在、欧米では小児稀少難病に対する遺伝子治療が広く行われ、画期的な治療成績を上げている。特に、家族性リポ蛋白リパーゼ（LPL）欠損症に対する Gybera（Alipogen Tiparvovec）が欧州初の遺伝子治療薬として承認され、さらには米国遺伝子細胞治療学会が米国国立衛生研究所に対し5年以内に遺伝子治療が治療薬となる疾患 10（Target 10）を上げたことから、遺伝子治療の機運が再び高まり、現在、大手の製薬企業を含む複数の企業が遺伝子治療を治験として行っている。本研究では、現在までに公開された文献や資料ならびに実際に遺伝子治療関係者や企業と面会することで入手した貴重な情報を基に小児難治性疾患に対する遺伝子治療の現状を把握し、そこから我が国の遺伝子治療の問題点を整理した。

A. 研究目的

現在、遺伝子治療は「疾患の治療を目的に遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する治療法」と定義され、近年の急速に解明される遺伝子情報の影響を最も強く受ける医療分野の一つである。殊に、単一の遺伝子異常により病気が発症する小児難治性疾患では遺伝子治療が劇的な治療効果をあげ、2012年には欧州で初となる遺伝子治療薬 Gybera がリポタンパク質リパーゼ（LPL）に対する治療薬として承認された。同様に米国では米国遺伝子細胞治療学会（ASGCT）が米国国立衛生研究所（NIH）に対し5年以内に遺伝子治療が治療薬になりうる疾患 10（Target 10）を上げ、遺伝子治療のさらなる研究推進を国に求めている。そして、この流れを受け、今では大手の製薬企業を含む複数の国外企業が遺伝子治療を治験として行っている。一方、我が国では遺伝子治療が「医薬品としての承認取得を目的としない研究者による臨床研究」に留まっているため、これら海外の企業治験を主体とする遺伝子治療との共同研究実施を困難なものとしている。また、実際に遺伝子治療を行って行く上でのインフラの整備不足や審査体制の違いもこの困難さを大きなものにしてしている。

本研究では、これまで公開されている文献（論文）や資料を精査し、また、実際に遺伝子治療を行っている医師や研究者または企業側と面会を重ねることでこれら遺伝子治療に関わる貴重な情報を入手

して欧米諸国の遺伝治療の現状とその実施体制を把握した。また、日本のそれと比較することで我が国の遺伝子治療の問題点を整理した。

なお、下記の ASGCT が NIH に提唱した Target 10 を示す。

Target 10

1. レイバー病
2. アデノシン・デアミナーゼ欠損症
3. 血友病（治験）
4. X 連鎖重症複合免疫不全症
5. パーキンソン病
6. 網膜色素変性症
7. 副腎白質ジストロフィー
8. サラセミア
9. EB ウイルス関連リンパ腫
10. メラノーマ

B. 研究方法

1. 文献（論文）、資料の調査

学術論文等に関しては PubMed、遺伝子治療臨床研究に関しては The Journal of Gene Medicine が公開している Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (GTCTW)、国内の遺伝子治療臨床研究に関しては国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞治療部（衛研）、遺伝子・細胞治療のガイドライン等に関しては米国食品医薬品局（FDA）、欧州医薬品局（EMA）、医薬品医療機器総合機構（PMDA）のホームページを参考にした。

PubMed:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

GTCTW: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

衛研: <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/index1-j3.html>

FDA:

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/default.htm>

EMA:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000266.jsp&mid=WC0b01ac05800292a4

PMDA:

<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/idenshi-chiryu.html>

2. 研究者、医師、企業との面会

研究者・医師に関しては、San Raffaele 研究所（イタリア）：Aiuti 博士、Bonini 博士、Naldini 博士、Bordignon 博士、Necker 小児病院（フランス）：Cavazzana-Calvo 博士、Fischer 博士、Genethon（フランス）：Galy 博士、Gesmi 博士、Fulvio 博士、Great Ormond Street 病院（イギリス）：Thrasher 博士、Gasper 博士、NIH（米国）：Candotti 博士、Malech 博士（NIH）と個別に面会し情報を得た。また、企業等に関しては、MolMed 社（イタリア）、Genethon（フランス）、GSK（イギリス）、Sigma Tau 社（米国）などを訪問し、そこで各担当者と話し合いを持った。

（倫理面への配慮）

本研究では、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1) 遺伝子治療臨床研究の概要

1990 年、米国 NIH においてアデノシン・デアミンナーゼ（ADA）欠損症に対して始まった遺伝子治療であるが、当初は遺伝子導入技術の未熟さも相俟って効率良く患者造血幹細胞に治療遺伝子を導入することはできなかった。このため、90 年代は主に標的細胞を患者末梢血リンパ球とした遺伝子治療が行われた。2000 年に入り、使用するウイルスベクターの改良や造血幹細胞の未熟性を維持するサイトカインが導入され、さらには造血幹細胞への遺伝子導入効率を飛躍的に向上させるレトロネクチンが開発されたことから 2000 年には X 連鎖重症複合免疫不全症（SCID-X1）に対する造血幹細胞遺伝子治療の有効性が報告された。その後も比較的軽度の前処置を併用した造血幹細胞遺伝子治療が ADA 欠損症、慢性肉芽腫症、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）に対して行われ、SCID-X1 同様、感染症の治癒や全身状態の改善等遺伝子治療

の臨床効果を確認することができた。ただ、SCID-X1 に対する遺伝子治療において治療を受けた患者に重篤な有害事象である造血系腫瘍が発症し、遺伝子治療の安全性が疑問視され、全世界的に造血幹細胞遺伝子治療は一時、停止した。その後、レトロウイルスベクターに代わるウイルスベクターとしてレンチウイルスベクター（HIV ベクター）が開発され、それらベクターを用いた遺伝子治療が再開された。また、それまでの遺伝子治療が単独の施設で行われてきたのに対し、これらの遺伝子治療は欧米諸国が遺伝子治療に関するコンソーシアムを形成し、同一臨床プロトコルで行われるようになってきた。さらに、臨床用ウイルスベクターの製造に関してはフランスの NPO 団体 GENETHON が一括してこれら臨床研究を支える量の臨床用ウイルスベクターを製造するようになっている（後述）。

レンチウイルスベクターに関しては、いまだ十分な観察期間を経していないため、得られた臨床結果を適性に評価することは難しいが、安全性に関してはこれまでのレトロウイルスベクターに比べてその安全性は高いといえる。一方、遺伝子治療の臨床効果に関してはこれまでのものと比べて緩徐と言わざるを得ず、臨床効果と有害事象の発症率はある程度相関するものと思われる。

2) 各疾患に対する遺伝子治療の臨床結果

・ ADA 欠損症

核酸代謝酵素の ADA が先天的に欠損すると、細胞内に細胞毒性の強い dAXP が蓄積し、特に胸腺中の未熟 T 細胞が著しく障害を受けることから患者は生まれながらにして重度の免疫不全症を呈する（severe combined immunodeficiency: SCID）。この ADA 欠損症は世界で最初に遺伝子治療が行われた疾患であり、また、遺伝子治療において遺伝子導入細胞生着のための前処置が必要であることを示した疾患でもある。これまでイタリア、米国、イギリスなどでレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が 42 症例行われ、うち 31 名で PEG-ADA による酵素補充療法が中止されている。また、死亡例はなく disease free survival に関しては 78.3%と HLA 一致ドナーがいない患者に対する造血幹細胞移植の治療成績と比較して驚異的に治療成績を上げている。さらに SCID-X1 で見られたような重篤な有害事象も起こっていないことから GlaxoSmithKline（GSK）社はイタリア San Raffaele 研究所と共同で欧州において治験の準備を進めている。一方、レン

チウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療も米国、イギリスにおいて5名の患者に対して行われているが、治療後のT細胞回復に時間が係ることからSCIDに対する治療の側面を考えたときレトロ、レンチウイルスベクターの選択が議論的になる疾患でもある。

・ SCID-X1

SCID-X1はサイトカイン受容体であるIL-2R、IL-4R、IL-7R、IL-9R、IL-15R、IL-21Rを構成する共通鎖の γ 鎖 (common γ chain: γ c) 遺伝子に変異があることで発症する疾患で、ADA欠損症同様、生下時より重度の免疫不全症を呈する。かつて患児が無菌室にて長期間管理されたことから「bubble boy」と呼ばれた疾患でもある。さて、SCID-X1に対してはレトロウイルスベクターを用いてフランスで11名、イギリスで10名の患者に遺伝子治療が行われ、そのほとんどで感染症の治癒等の治療効果を確認している。ただ、治療を受けた患者のうちフランスで4名、イギリスで1名の患者にT細胞性白血病が発症したことは前述の通りである。ただ、これら5名のうち4名は通常の化学療法にて寛解に至り、実際に遺伝子治療により死亡した症例は $\gamma\delta$ T細胞性白血病を発症した1名のみである。

このようにSCID-X1に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有効性は確認されたが、白血病発症という有害事象の発生からベクターをより安全なSIN-Retroに変更した遺伝子治療がフランス、イギリス、米国において9名の患者に対して行われた。結果、有害事象は認められなかったものの治療効果に関してはレトロウイルスベクターのそれと比較して有効とは言えず、SIN-Retroを用いた遺伝子治療への移行は難しいと思われた。

・ 慢性肉芽腫症

慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) は細菌等を貪食する食細胞 (好中球、単球) の異常で、貪食した好中球等が細菌等を細胞質内で殺菌できず、炎症が持続する疾患である。CGDに対する遺伝子治療はADA欠損症同様かなり以前から行われてきたが、CGDの場合、異常好中球が生体内に多数存在し、遺伝子導入細胞のための骨髓間隙がなく、また、遺伝子導入細胞が非遺伝子導入細胞より効率良く増殖する能力 (増殖優位性) が無いことから他の免疫不全症と比べて遺伝子治療の有効性は発揮しにくかった。ただ、2000年に入りドイツらのグループが比較的強力な前処置 (体重あたりブスルファン 10mg) と強いpromoter活性を有するレト

ロウイルスベクター (SFFV) を使用して遺伝子治療を行った。その結果、抗生剤に抵抗性を示す肝膿瘍や肺膿瘍等の重度の感染症が治癒した。ただ、治療効果が劇的である反面、promoter活性の強さは造血系にも影響を与え、治療を受けた4名全てにおいて造血系異常を発症した。一方、通常のレトロウイルスベクター (MLV) を用い、3名の患者に対して遺伝子治療を行った米国では2名の患者において肝膿瘍や肺膿瘍の治癒を見た。ただ、長期にわたっては遺伝導入細胞の低比率 (0.1%程度) が報告されている。なお、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療もイギリスにおいて1症例行われたが、その治療効果は確認されていない。

・ ウィスコット・アルドリッチ症候群

ウィスコット・アルドリッチ症候群 (Wiskott Aldrich syndrome: WAS) は細胞骨格に關与するWASP遺伝子に異常がある疾患で、その症状として免疫不全症、血小板減少、湿疹を呈する。WASに対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療はドイツのグループが中心となってこれまで10名の患者に対し行われた。その結果、ほぼ全ての症例で感染症の治癒、血小板の増加、湿疹の改善を見た。一方、治療を受けた10名のうち7名の患者で造血系異常を発症し、6名でT細胞系白血病、3名で骨髓系白血病を発症した。この骨髓系白血病を発症した3名のうち2名はT細胞系白血病を発症した後に骨髓系白血病を発症したが、1名は初発から骨髓系白血病を発症した。このことはWASPがリンパ系、骨髓系細胞にとって重要な遺伝子であることを意味し、また、この遺伝子治療で用いられたベクターが通常のレトロウイルスベクターであったことからWASにおけるレトロウイルスベクターの遺伝子治療は極めて危険であることが示唆された。このため、現在、フランス、イタリアにおいてレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療が行われ、特に、イタリアの6症例では比較的有効な治療成績を示しており、感染症の治癒、血小板の増加、湿疹の改善を見ている。ただ、治療効果、例えば血小板の増加率はレトロウイルスベクターと比べて弱く、治療効果と有害事象の発症率との相関はここでも観察される。

以下に、原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の概要をSCID-X1における白血病発症前 (その1) とその後 (その2) で示す。

原発性免疫不全症に対する遺伝子治療 その1

疾患	国	ベクター	標的細胞	前処置	患者数 (n)
ADA欠損症	イタリア	G1ADA1	EM CD34	+	15
	米国	GCsepMADA1 MNDADA	EM CD34	+	6
	英国	SFeda/W	EM CD34	+	9
	日本	GCsepMADA	EM CD34	-	2
X-SCID	フランス	MFG	EM CD34	-	11
	米国	MFG	EM CD34	-	3
	英国	MFG	EM CD34	-	10
JAK3欠損	米国	MSCV	EM CD34	-	1
慢性肉芽腫症	英国	MFGSep91 SFGsep91	PB CD34	+	1 3
	欧州	SFGsep91	PB CD34	+	4
	米国	MFGsep91	PB CD34	+	3
	韓国	MT-sep91	PB CD34	+	2
WAS	ドイツ	SFG-WASp	PB CD34	+	10

造血幹細胞遺伝子治療 その2

疾患	国	ベクター	標的細胞	現状
ADA欠損症	イタリア	G1ADA1	EM CD34	GSKが治験を開始
	米国	MNDADA	EM CD34	継続して治験
X-SCID	フランス	SIN レトロ	EM CD34	白血病発症後の開始 3名の患者
	米国			
WAS	イタリア	レンチ	EM CD34	3名の患者
	フランス	レンチ	EM CD34	2名の患者
	米国	レンチ	EM CD34	
慢性肉芽腫症	イタリア	レンチ	EM CD34	計画中
	フランス	レンチ	EM CD34	1名の患者
ALD	フランス	レンチ	EM CD34	4名の患者
MLD	イタリア	レンチ	EM CD34	1名の患者
サラセミア	フランス	レンチ	EM CD34	1名の患者

ベクターで 800L、レンチウイルスベクターで 100L の臨床用ベクターの製造が可能で、これにより年間 20 の遺伝子治療臨床研究をサポートすることができる。なお、これら維持費には年 10 億程度かかるが、これらも Telethon により賄われている。

D. 考察

現在、遺伝子治療は原発性免疫不全症のみならず先天性代謝異常症や血友病やサラセミアなどの血液系疾患に対しても有効性を示し、小児難治性遺伝性疾患に対する有効な治療法として認識されている。これを受け今では GSK、Novartis Pharma、Baxter などの大手製薬企業が遺伝子治療を治験として行っているが、その源になったのは 2000 年を境にして始まった前処置の導入であろう。それはそれまで自家の細胞を用いる遺伝子治療では前処置は不要と考えられていたが、たとえ SCID といえども一部の前駆細胞が骨髄等に存在し、それら細胞を排除しない限り遺伝子導入細胞が生着することはないと理解したためである。遺伝子治療においてこの前処置を最初に行ったのは ADA 欠損症に対する遺伝子治療である、前処置として体重当たり 4mg のブスルファンを使用した。その結果、遺伝子導入細胞の高い骨髄腔への生着が可能となり、治療効果が長期にわたった。その後、CGD においてはブスルファンを体重あたり 10mg で使用している。これは SCID と異なり、CGD では異常な食細胞が多数骨髄腔を占めており、さらには遺伝子導入細胞の拒絶に関与するリンパ球機能 (T 細胞機能) が CGD 患者では十分にあるため、ADA 欠損症と比べて強力な前処置の必要であると考えられたためである。さらに、先天性代謝異常症である副腎白質ジストロフィー (ALD) ではブスルファン、エンドキサンと通常の造血幹細胞移植と同様の前処置が行われている。また、WAS において自己免疫疾患を伴う症例では B 細胞除去のためのリツキサンの使用も行われている。このように現在では遺伝子治療の前処置は遺伝子治療の有効性を発揮するためには必須と考えられており、今後は疾患毎に適した前処置の選択が検討される必要がある。

次に使用する臨床用ウイルスベクターに関してであるが、当初はマウス白血病ウイルス由来のレトロウイルスベクター (マウスモロニー白血病ウイルス MoMLV) を使用していた。これは、これまでの基礎研究から種々のプロモーターと比較して MLV の LTR が最も強力なプロモーター活性を有す

3) GENETHON の臨床用ウイルス製造に関して

前述した GENETHON はフランス筋障害協会が Telethon にて得た資金を基に 1990 年に設立した NPO 団体で、臨床で使用可能な GMP 準拠のウイルスベクターを製造する研究機関であり、ここで製造されるベクターは複数の医療機関で構成されるコンソーシアムでの遺伝子治療臨床研究で使用されている。現在計画している遺伝子治療臨床研究は、AAV ベクターを用いたガンマサルコグリカン異常症やレンチウイルスベクターを用いた WAS や CGD などである。

GENETHON の特異な点は、NPO 団体として年 30 億円程度かかる運営費の 85% をフランス Telethon より補填されている点で、2011 年には GENETHON での雇用は 220 名を数え、その 8 割以上がバイオ関係、臨床研究の研究者であり、広大な敷地に巨大な研究所が複数建ち、特に、世界最大の GMP 準拠ウイルス製造プラント Genethon Bioprod は目を見張る。この Bioprod にはウイルス製造工場と品質管理部門があり、前者には 2,500m² のレベル 3 封じ込め実験室、500m² の 4 つのウイルス製造室、class A isolator を持つ無菌のウイルス上清充填室があり、後者には 500m² の GMP 準拠品質管理実験室がある。そして、この Bioprod は AAV

ることが知られており、これにより造血幹細胞への至適サイトカインやレトロネクチンとの併用下で極めて高い治療遺伝子の発現をヒト造血幹細胞で可能にした。ただ、MLVを始めとするレトロウイルスは細胞増殖に関わる遺伝子（proto-oncogene）のプロモーター領域に挿入されやすいことも知られており、その強力なプロモーター活性による造血系腫瘍の発症は想像に難くない。そこで、遺伝子挿入部位がプロモーター領域に偏らないレンチウイルスベクターが使用されるようになった。レンチウイルスベクターはヒト免疫不全症ウイルス（HIV）由来のベクターであり、挿入部位の偏倚の少なさをさることながら治療遺伝子の発現をウイルス由来のLTRではなく、別の弱いあるいは生理的に近いプロモーターを使用できる点でレトロウイルスベクターに対する利点として上げられる。ただ、臨床結果に関してはこれまでに有害事象の報告は無いもののその効果に関してはレトロウイルスベクターのそれと比較して弱いと言わざるを得ない。特に、SCIDのように早急に治療効果を求められる疾患に関してはその治療効果の発揮の遅延は患者の生命予後に関与してくるために極めて重要である。ただ、WASで見られたようなレトロウイルスベクターによる高頻度の白血病の発症はたとえ治療効果が高くともその継続は不可能に思われ、イタリアの症例のようにレンチウイルスベクターへの移行は理にかなっている。このように前処置同様、疾患に対するウイルスベクターの選択の重要な遺伝子治療の要件になってくる。

最後に遺伝子治療の実施体制であるが、まず重要な点は各国が遺伝子治療に関するコンソーシアムを形成して遺伝子治療を行っている点である。小児遺伝子性難病のその多くは症例数が極めて少なく、たとえ一症例において有効性を示せても、統計学的その有効性を証明することは極めて困難である。また、各施設が異なったベクターや遺伝子導入法を用いた場合、そこで得られる結果は単純に比較することはできない。このような点から、統一のプロトコルにて遺伝子治療を行うこのようなコンソーシアムの導入はいまだ発展が求められる遺伝子治療の分野においては重要である。さらに、これらコンソーシアムを支える臨床用ベクターの製造機関も重要で、これがNPO団体にて行われていることは極めて理想的である。このような、欧米の遺伝子治療は単に遺伝子治療に関する技術が進んでいるだけでなく、遺伝子治療を包括的に支援する体制が整

っていることに起因していると思われる。

E. 結論

- 欧米におけるこれまでの遺伝子治療臨床研究の結果をまとめた。
- 造血幹細胞遺伝子治療には前処置の導入が必要である。
- 最近ではレンチウイルスベクターが主流であるが、その有効性はレトロウイルスベクターより弱い。
- 遺伝子治療の発展のためには単に技術開発のみではなく、包括的に遺伝子治療を支援する体制整備が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Takeda K et al: Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon g in a patient with dominant partial interferon γ . *Clinical Immunology*. 151: 25-28, 2014.
2. Yamamoto R, et al: Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 154: 1112-1126, 2013.
3. Hamanaka S, et al: Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. *BBRC* 435: 586-591, 2013
4. Kawai T, et al: Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven Inflammatory Cytokine Production in Chronic Granulomatous Disease. *Clinical Immunology* 147: 122-128, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

原発性免疫不全症への遺伝子治療に関する研究

研究分担者：内山 徹 国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 室長

共同研究者：八木田万里、青木徹、高橋シリラット

国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 研究員

研究要旨

原発性免疫不全症への遺伝子治療は、従来のレトロウイルスベクターのほか、自己不活型（self-inactivating: SIN）レトロウイルスやレンチウイルスベクターによる遺伝子治療が開始されている。本研究では、今後の我が国での遺伝子治療の実施に向けて、各ウイルスベクターの効果と安全性の評価法確立を目指す。

A. 研究目的

1990年代より始まった原発性免疫不全症に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子治療は、免疫系の再構築という極めて優れた成果が得られたが、同時に発がん挿入変異という有害事象が報告された。ウイルスベクターの強力なエンハンサーによるがん原遺伝子の活性化が原因と考えられ、近年欧米では自己不活型（self-inactivating: SIN）ベクターによる臨床試験が開始されている。本研究は我が国における遺伝子治療の実施に向けて、各ウイルスベクターの効果や安全性の評価法の確立を目標とする。具体的には、①マウス骨髄を用いた *in vitro* 不死化 (*in vitro* immortalization: VIM) アッセイによる安全性の評価、②各免疫不全症患者から作製した疾患特異的 iPS を用いたウイルスベクターの有効性と安全性の評価を行う。

B. 研究方法

①ウイルスベクターの作製

実際の臨床試験において使用されているものと同様の構造を持つウイルスベクターを作製した。SIN レトロ、レンチウイルスベクターに組み込む

内部プロモーターも実際の臨床試験と同一の配列を使用した。作製したベクタープラスミドによりウイルスを作製し、K562細胞への感染によりその効果を確認した。

②疾患特異的 iPS 細胞の樹立

アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency: X-SCID)、慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD)、Wiskott-Aldrich 症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome: WAS) の患者検体より iPS 細胞を作製した。

(何れも倫理委員会に提出承認済)

C. 研究成果

①第一世代レトロウイルスベクターとして、EGFP を発現する MND (ADA 欠損症に対する遺伝子治療で使用されている)、SFFV (CGD) および MFG (X-SCID) ベクターを作製した。SIN レトロウイルスベクターは、X-SCID への遺伝子治療に使用されているものと同様、エンハンサーを含む U3 領域が欠損し、また発現効率の上昇のため woodchuck hepatitis virus

posttranscriptional element (WPRE) が挿入されている。この SIN レトロおよびレンチウイルスベクターに種々の内部プロモーターと EGFP を組み込んだ。EF1 α は X-SCID と ADA 欠損症、WS1.6 配列 (WAS 遺伝子の 1.6kb) は WAS の遺伝子治療にそれぞれ使用されている。また、近年プロモーターとして報告されている ubiquitous chromatin opening element (UCOE) と、発がん変異の陽性コントロールとして MND (ウイルスプロモーター) も組み込んだベクターも作製した (図 1)。K562 への感染により、いずれのベクターも遺伝子の発現が可能であることを確認した (図 2)。

図 1

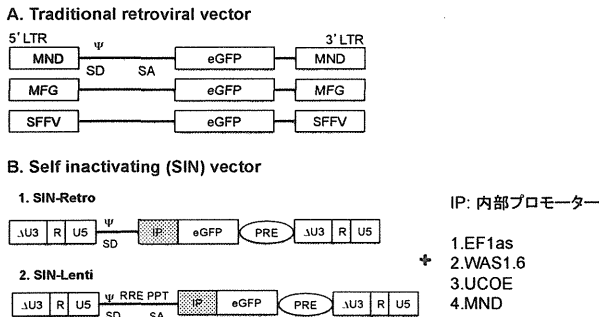
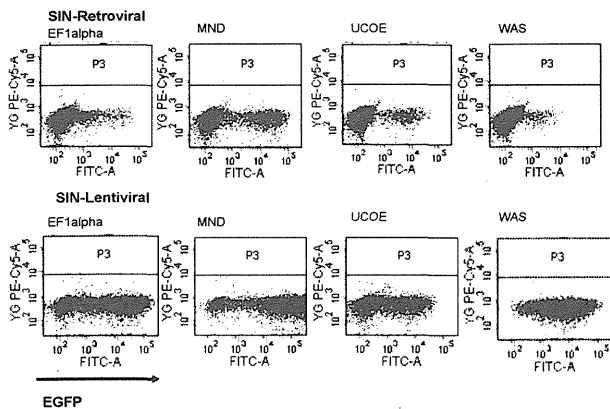


図 2

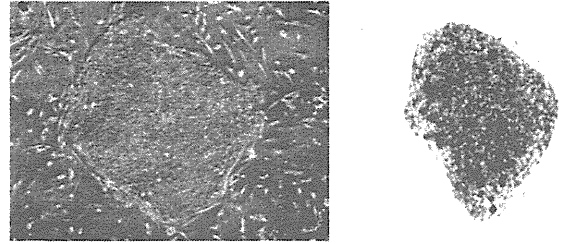


現在これらのベクターを用いた IVIM アッセイを行っている。

②原発性免疫不全症患者の血液または骨髄から iPS 細胞を樹立した。遺伝子再構成の影響を排除するために、単球もしくは骨髄の線維芽細胞を材料とした。また、従来のレトロウイルスベクターの他に、染色体への挿入が無いセンダイウイルス

によっても iPS 樹立を行った (図 3)。これまでに X-SCID、ADA 欠損症、CGD の樹立に成功しており、WAS に関しては現在樹立中である。

図 3



樹立した疾患特異的 iPS 細胞を利用して、治療用遺伝子 (cDNA) を持った各ウイルスベクターによる遺伝子導入とその影響を評価する予定である。

D. 考察

第一世代レトロウイルスベクターによる発がん挿入変異の報告から、現在はエンハンサー配列を削除した SIN ベクター (レトロ、レンチ) が主流となっている。SIN ベクターでは、ベクター自体の発がんへの影響は排除されているものの、遺伝子発現に内部プロモーターを利用するため、これらの配列の発がんへの影響を十分検討する必要がある。今回作製した各ウイルスベクターによりマウスの骨髄細胞への遺伝子導入を行い、その後の不死化する細胞の割合を算出することで、各ウイルスベクターの構造や内部プロモーターの発がんへの影響を推測することが可能である。

ベクターの構造の以外に注目すべきこととして、各疾患によるがん発症の違いが挙げられる。第一世代ベクターによる発がんは、X-SCID では 20 例中 4 例で急性リンパ性白血病 (ALL)、CGD では 6 例中 4 例で骨髄異形成症候群 (MDS)、WAS では 10 例中 6 例で ALL、うち 2 例で二次性の急性骨髄性白血病 (AML)、更に AML での初発が 1 例と、白血病の頻度や形態が違っている。一方 ADA 欠損症では、40 例近い症例数であるものの、発がんの報告が全く無い。このことから、遺伝子治療における発がんには、ウイルスベクタ

一以外にも各疾患病態が深く関わっていると考えられる。今後は、樹立した各疾患 iPS 細胞を造血細胞へ分化させ、作製したベクターと内部プロモーターの各種組み合わせで遺伝子導入し、がん関連遺伝子の発現を解析することで、疾患ごとに安全なベクターとプロモーターの組み合わせを検討する予定である。

E. 結論

①現在臨床応用されているものと同様の構造を持つウイルスベクターを作製した。各ベクターの安全性を IVIM アッセイにて検討中である。

②各免疫不全症患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。今後、疾患別に効果と安全性を両立した遺伝子治療ベクターの選択が可能かどうか検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

【論文発表】

1. 原著論文

内山徹

1) Kitazawa H, Moriya K, Niizuma H, Kawano K, Saito-Nanjo Y, Uchiyama T, Rikiishi T, Sasahara Y, Sakamoto O, Setoguchi Y, Kure S. : Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations. *Eur J Pediatr.* 172: 953-7, 2013.

2) Watanabe Y, Sasahara Y, Satoh M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, Onuma M, Kitazawa H, Irie M, Niizuma H, Uchiyama T, Rikiishi T, Kumaki S, Minegishi M, Wada T, Yachie A, Tsuchiya S, Kure S. : A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study. *Eur J*

Haemarol. 91: 242-8, 2013.

3) Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. : Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One.* 8: e71594, 2013.

4) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Uchiyama M, Wong WF, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int Immunol.* 2014 in press

2. 総説

内山徹： 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と今後の展望 日本臨床免疫学会会誌 2013; 36 148-155

【学会発表】

1) 河合利尚、中澤裕美子、新井勝大、内山徹、後藤文洋、布井博幸、小野寺雅史：第4回関東甲越免疫不全症研究会、慢性肉芽腫症の慢性炎症に対する新たな抗炎症治療、東京、2013/9/22

2) 中澤裕美子、河合利尚、山元茉莉、横山みどり、渡辺信之、後藤文洋、内山徹、小野寺雅史：第4回関東甲越免疫不全症研究会、インターフェロノンγ受容体1部分欠損症患者に発症した多発性 BCG 骨髄炎に対するインターフェロノンγ治療法の1有効例、東京、2013/9/22

3) 河合利尚、中澤裕美子、渡辺信之、横山みどり、内山徹、田村英一郎、伊藤秀一、放生雅章、小野寺雅史：第23回日本小児リウマチ学会、慢性肉芽腫症における肺間質性炎症、埼玉、2013/10/12

4) 河合利尚、中澤裕美子、田村英一郎、清水泰岳、伊藤玲子、内山徹：第45回日本小児感染症学会、単球の活性酸素産生能低下による肉芽腫性腸炎、札幌、2013/10/27

- 5) Toru Uchiyama, Satoshi Horino, Takanori So, G Jayashree Jagadeesh, Naoto Ishii, Fabio Candotti : 20th Annual Meeting, European society of gene and cell therapy, Gene therapy models of X-linked severe combined immunodeficiency and Wiskott-Aldrich syndrome using foamy virus vectors. Madrid, 27/10/2013
- 6) Kawai T, Nakazawa Y, Uchiyama T, Arai K. Onodera M: Effects of chronic granulomatous disease-associated bowel inflammation on microbial gut flora. 第13回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会(第40回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2
- 7) Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, Arai K. Onodera M.: Effect of Thalidomide Therapy on Bowel Inflammation in Chronic Granulomatous Disease. 第13回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会(第40回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2
- 8) 後藤文洋、河合利尚、中澤裕美子、内山徹、原山静子、田村英一郎、小野寺雅史:慢性肉芽腫症42例における肉芽腫性疾患の臨床的検討 第21回食細胞機能異常研究会, 東京, 2013/12/14
- 9) 河合利尚、後藤文洋、渡辺信之、横山みどり、中澤裕美子、内山徹、前川貴伸、樋口昌孝、小野寺雅史:慢性肉芽腫症における過剰炎症と肉芽腫形成. 第7回免疫不全症研究会、福岡、2014/1/25
- 10) 中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、内山徹、渡辺信之、前川貴伸、石黒精、奥山虎之、山田雅文、大津真、有賀正、小野寺雅史: 酵素補充療法が奏効した造血幹細胞遺伝子治療後アデノシンデアミナーゼ欠損症の一例. 第7回免疫不全症研究会、福岡、2014/1/25

H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし。