

## 遺伝子治療用医薬品の評価に関するレギュラトリ サイエンス研究

研究分担者 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第一室長

遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリ サイエンス研究の一環として、今年度は染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの要因とリスク低減化のために考慮すべき事項、非臨床で実施すべき染色体への組込試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた ex vivo 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。これらの結果は、現在実施中の遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等において活用していく予定である。

研究協力者

五十嵐 友香 国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部協力研究員

### A. 研究目的

本研究は、革新的医薬品としての遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリ サイエンス研究として、(1) 遺伝子治療用医薬品のヒト初回臨床試験の実施に当たっての条件(品質および安全性の確認)の明確化とその手法の開発、(2) 遺伝子治療用医薬品の有用性、安全性を確認・確保するための評価法の開発およびその標準化、(3) 遺伝子治療用医薬品を承認申請するに当たって考慮すべき要件の明確化および基準の作成を目的としている。

昨年度は、国内外の遺伝子治療用医薬品の開発動向の包括的調査及び規制ガイドラインの整備状況を調査するとともに、遺伝子治療用ベクターとして、最近、特に開発が進んでいるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター製品の開発と品質、安全性確保に関する要件を検討した。また、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法開発の一環として、デジタル PCR の活用に関する検討を開始した。今年度は、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題として挿入変異のリスクについて検討した。また、遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価の一環として、デジタル PCR を活用した比活性の評価及び遺伝子導入細胞でのベクターの残存性について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 染色体組込型ベクターの開発動向及び安全性確保

染色体組込型ベクター製品の開発動向は関連する論文や書籍、学会等の情報を基に検討した。リスク評価については、EMA のガイダンス及び関連する論文を中心に検討した。

### 2) 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法

#### (1)レトロウイルスベクターの産生

Gp91phox 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター産生細胞(パッケージング細胞)の培養は、80%コンフルエントな状態で培地交換を行い、経時的にレトロウイルスベクターを含む培養上清を回収して試料とした。

比活性比較のための試験では、次の条件でレトロウイルスベクター上清を回収した。

#### Group A (培地交換なし)

培養開始から 6 時間後に上清回収

培養開始から 24 時間後に上清回収

培養開始から 48 時間後に上清回収

培養開始から 72 時間後に上清回収

#### Group B (培地交換あり)

培養開始 6 時間後に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 24 時間後 (培地交換 18 時間後) に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 48 時間後(培地交換 24 時間後)に上清回収、fresh medium を添加

培養開始 72 時間後(培地交換 24 時間後)に上清回収、fresh medium を添加

#### (2)ウイルスゲノムコピー数の定量

各レトロウイルスベクター上清 160  $\mu$ l から NucleoSpin RNA virus キット(タカラバイオ)を用いてウイルス RNA を抽出し、50 $\mu$ l の TE 液に懸濁した。得られた RNA 試料について、デジタル PCR ( QX100 Droplet Digital PCR

システム ; BioRad 社 ) を用いてウイルスゲノムコピー数を測定した。PCR 反応試薬は OneStep RT-ddPCR kit for probes(BIO-RAD 社)を用い、以下のプライマー、プロ - プを使用した。

Forward ; GGCATCGCAGCTTGGATACA

Reverse ; CCCTCATTCACAGCCCAGTTC

Probe ; [6-FAM]ACGTGAAGGCTGCCGACC  
CCG[BHQ1a-6FAM]

Tm temp. : 60 degree

なお、いずれのサンプルも triplicate で測定した。

#### (3)レトロウイルスベクターの感染力価の測定

レトロネクチン(タカラバイオ)をコートした 6 well dish を用意し、翌日 1 well あたり  $1.8 \sim 2.0 \times 10^6$  個の K562 細胞 (p67phox、p47phox 遺伝子導入済み)を播種後、各ウイルス上清を 4 ml とプロタミン 4 $\mu$ l を添加し、32 で 2 時間、2000G で遠心することにより感染させた。感染操作後、fresh medium に交換して培養した。感染翌日、同じ手法を用いて再度感染操作を行った。その後、37 , 5% CO<sub>2</sub> で 3 日間培養後、細胞内染色(gp91, 7D5)を行い、フローサイトメーターを用いて細胞への感染率を感染力価として算出した。

#### (4)遺伝子導入細胞でのウイルス残存性

細胞への遺伝子導入は、レトロウイルスベクターと K562 細胞を混合後、レトロネクチン使用して 32 で 2 時間の遠心により行った。感染後、遠心分離により上清としてウイルス液を回収し、遺伝子導入細胞のペレットは  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度になるように PBS(-)を 18ml 添加して調製し、遠心洗浄する行程を 4 回繰り返した。感染用ウイルス液、感染後の残存上清及び 4 回の洗浄液を回収した上清の 計 6 サンプルについて、ウイルスコピー数を ddPCR を用いて評価した。なお、洗浄操作による残存ウイ

ルス粒子数の減少の理論値は、遠心後の細胞上清を吸引廃棄した後の残存液量をおよそ 50 $\mu$ l と仮定し、そこに PBS を 18 ml 添加して洗浄することから、理論的には 1/400 ずつ希釈されていくとして算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面への配慮が必要な試料・資料は取り扱わなかった。

## C. 研究結果

### C.1. 染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題

#### C.1.1 染色体組込型ベクターの開発動向

染色体組込型ベクターとは、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター、トランスポゾンなど、染色体にゲノムを組み込むための機構を有するベクターを指す。染色体に組み込まれることにより、細胞分裂でも遺伝子は失われず、長期間の持続的遺伝子発現が必要な単一遺伝子疾患や分裂細胞での長期発現を目的とする遺伝子治療で広く活用されている。

染色体組込型ベクターは、主に *ex vivo* 遺伝子治療で遺伝性疾患またはがんを対象に用いられている。単一遺伝子疾患に対する治療法としては、*ex vivo* で造血幹細胞に欠損遺伝子を導入する造血幹細胞遺伝子治療が主に行われている。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-SCID)、Wiscott-Aldrich 症候群 (WAS)、慢性肉芽腫症 (CGD) などの先天性免疫不全症やサラセミア、中枢神経疾患の副腎白質ジストロフィー (ALD) などに対して実施された *ex vivo* 造血幹細胞遺伝子治療では、1 回の投与で長期にわたる有効性を示す論文が報告されている。ADA-SCID の遺伝子治療用レトロウイルスベクターは、現在 GSK 社により第 3 相臨床試験が海外で実施中である。

一方、がんに対する遺伝子治療では、染色体

組込型ベクターを用いて、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) や、がん抗原を認識する単鎖抗体の抗原認識部位と T 細胞のシグナル伝達ドメインを結合したキメラ抗原受容体 (CAR) を導入した自己の遺伝子改変 T 細胞を用いる養子免疫遺伝子治療製品の開発が急速に進展している。特に、レンチウイルスベクターを用いて B 細胞抗原 CD19 を認識する CAR 遺伝子を導入した遺伝子改変 T 細胞は、慢性リンパ性白血病患者に対し 3 名中 2 名で完全寛解が得られたという (*Sci. Transl. Med.* 3, 95, 2011)。また悪性度の高い小児白血病患児 2 例でも完全寛解を達成したと報告されている (*NEJM* 368, 1509, 2013)。この製品は、Novartis 社が開発中であり、日本でも臨床試験が開始の予定である。

その他にも遺伝子治療の変法として、白血病治療のための同種造血幹細胞移植後の T 細胞輸注療法において、自殺遺伝子のヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を導入した同種 T 細胞を投与することにより、重篤な移植片対宿主病 (GVHD) が発症した場合にガンシクロピルの投与により HSV-TK 導入細胞を死滅させる自殺遺伝子治療が利用されている。

染色体組込型ベクターを用いた日本の遺伝子治療の現状としては、遺伝性疾患では ADA 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究が北大で実施され、10 年以上の長期有効性が報告されているほか、CGD の遺伝子治療が成育医療研究センターで承認されている。がんに対する遺伝子治療では、TCR 遺伝子治療の臨床研究が三重大で 2 件実施されている。そのうち昨年より開始された臨床研究では、内因性 TCR と遺伝子導入した TCR とのミスペアリングを防ぐために、内在性 TCR に対する siRNA をがん抗原の WT1 特異的 TCR 遺伝子とともに T 細胞に導入する方法が採用されており、siRNA をベクターで投与する初めての臨床研究となる。また、GVHD 発症予防の遺伝子治療も筑波大とがんセンター

で実施されている。今後、CAR 遺伝子治療も自治医大で開始される予定である。

一方、九州大では、網膜色素変性症に対してサルレンチウイルス (SIV) ベクターを用いた *in vivo* 遺伝子治療臨床研究が、昨年、厚生科学審議会で承認された。本ベクターは我が国で独自に開発されたレンチウイルスベクターであり、本ベクターを用いた First-in-Human の遺伝子治療臨床試験が昨年より実施され、すでに複数の患者に投与されている。このように、さまざまな製品の開発がわが国でも進められており、遺伝性疾患を中心に、レトロウイルスベクターからレンチウイルスベクターへと開発のトレンドが移りつつある。

### C.1.2 染色体組込型ベクターの安全性確保の課題

染色体組込型ベクターは、染色体にベクターが組込まれることにより長期間の遺伝子発現が可能となる長所を持つ一方で、染色体にランダム・セミランダムに組み込まれるため、挿入変異によるがん化の可能性がある。遺伝子治療が開始された当初から、挿入変異によるがん化のリスクは指摘されていたが、ランダムな組込では確率的に見てがん化のリスクは極めて低いものと考えられていた。しかし、X-SCID の遺伝子治療においてがん原遺伝子の LM02 遺伝子座にベクターが挿入されることにより白血病が発症し (science 302, 415, 2003)、その後、フランス、イギリスで実施された計 20 名の患者のうち 5 名という極めて高い頻度で挿入変異による T 細胞性白血病の発症が認められたことから、レトロウイルスベクターでは挿入変異が安全性上の最大のリスクと考えられるようになった。しかし、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は全て高リスクというわけではないことも判明している。EMA は 2013 年に、Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional

mutagenesis (挿入変異の臨床リスク管理に関するリフレクションペーパー) を発出している。このリフレクションペーパーや関連論文、資料等を基に、染色体組込型ベクターの挿入変異リスクの管理と挿入変異リスクの評価法について検討した。

#### (1) レトロウイルスベクターの挿入変異リスク

レトロウイルスベクターは、これまで 300 以上の臨床プロトコルで使用されている。先天性免疫不全症に対して行われた造血幹細胞を標的とする遺伝子治療では、有効性が確認されている一方、前述の X-SCID に加え CGD、WAS に対する遺伝子治療を受けた患者でも造血系の異常 (白血病及び骨髄異形成症候群) が認められ、合計 12 名に達している (Table 1)。異常が確認された全てのケースで、ベクターの癌遺伝子近傍への挿入が確認されており、癌遺伝子が活性化したことががん化の原因と考えられる。しかし、このような挿入変異による造血系の異常は、今のところ造血幹細胞を標的とした先天性免疫不全症に限定されている。レトロウイルスベクターは T 細胞への遺伝子導入も数多くの被験者に対して実施されているが、これまで白血病発症は認められていない。また、X-SCID 等と同じ先天性免疫不全症で、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が行われた ADA-SCID では、LM02 や MDS-EV11 といったがん遺伝子領域への挿入が確認されているにもかかわらず、治療後 10 年以上経過しているが、がんの発症は認められていない (Table 1)。また、まだ経験が短く例数も少ないこともあるが、同じく染色体組込型ベクターであるレンチウイルスベクターでは、これまでサラセミアでクローン優位性が確認されたもののがん化の発症は確認されていないなど、一概に染色体組込型ベクターあるいはレトロウイルスベクターといってもリスクは同じではない。

これまでの経験から、がん化が認められているのは特定の対象疾患 (X-SCID, WAS) 、または特定の強力なエンハンサー・プロモーター活性を持つ Spleen Focus-Forming Virus (SFFV) 由来レトロウイルスベクターを使用した場合に限られている。一方で、白血病を発症した患者は、1名を除き白血病も免疫不全症も治癒している。これらの結果から、骨髄移植が実施できない重篤な先天性免疫不全症に対しては、以下の項に示すような十分なリスクへの対応策をとった上でということが前提になるが、リスク・ベネフィットを考慮すると造血幹細胞遺伝子治療のベネフィットがリスクに勝るものと考えられる。

## (2) 挿入変異によるがん化のリスク要因と対応策

染色体組込型ベクターが染色体に挿入されても、大部分はサイレントであるか、あるいは細胞が死滅するのみと考えられる。ベクターの組込による異常クローン増殖に必要な前提として、

- 形質転換能を持つがん関連遺伝子内にベクター挿入を持つ細胞クローン
  - ベクターが組み込まれたクローンが長時間生存すること
  - クローンの寄与が十分に高く、他のクローンよりも過剰に増殖すること
- の3点が挙げられる。

このようながん化のリスクに寄与する要因として、以下の点が重要と考えられる。

- ・ベクターデザイン(ベクター骨格と調節エレメントを含む)
- ・挿入プロファイル
- ・ベクターの投与量
- ・導入遺伝子産物
- ・標的細胞集団/臓器

### a) ベクターデザイン

染色体組込型ベクターの挿入変異リスクに寄与する主な要因として、ベクターがゲノムに挿入された際、近傍の遺伝子をトランスに活性化することが可能な強力なエンハンサー・プロモーター配列がウイルスベクターの LTR に存在することが挙げられる。LTR にあるウイルスそのもののプロモーターを除去した自己不活化 (Self inactivating ; SIN) LTR はそのようなリスクを排除できる。しかし、ベクターに組み込まれた導入遺伝子を発現させるためのエンハンサー・プロモーターからのトランス活性化能についても考慮する必要がある。現在の知見では、あまり強力でないプロモーターを選択する方が挿入変異リスクを低下させることが示唆されている。染色体組込型ベクターに存在するスプライドナー・アクセプターサイトと polyA シグナルは、異常スプライシングを介して安全性に影響する別の転写産物を生じる可能性がある。ベクター固有の遺伝的不安定性も安全性モニタリングで考慮すべきである。

### b) 挿入プロファイル

ベクターがゲノムの特定の部位に組み込まれやすい傾向、例えばレトロウイルスベクターは転写開始部位に挿入されやすい傾向があるため、特定の遺伝子発現を増強する可能性がある。レンチウイルスベクターの挿入プロファイルはレトロウイルスベクターとは異なり、より安全性が高いと考えられる。また、特定のゲノムの位置を標的とした人工 zinc finger nucleas( ZFN )や TALE nucleas( TALEn )、CRISPR-CAS システムなどの遺伝子修正・遺伝子置換技術(ゲノム編集技術)を用いることで、ランダム、セミランダムな挿入によるリスクを低減することが期待される。しかし、これらのベクターの特異性とオフターゲット効果については、注意深い評価が必要となる。

### c) ベクターの投与量

遺伝毒性のリスクは患者に投与される遺伝子導入細胞数が増えるに従い増加する。また、これまでの経験から、細胞あたりのベクター組込数が増加するとリスクはさらに増加すると考えられる。細胞あたりの導入遺伝子量を減らすこと、治療効果が得られる範囲で導入細胞量を減らすとリスクを低減できると考えられる。

### d) 導入遺伝子産物

その他の重要な考慮点として、導入遺伝子産物とその作用機構、及びその産物の遺伝子発現制御の必要性が挙げられる。導入遺伝子産物が細胞の増殖制御に関与している場合、これが不適切に発現される場合（例えば、正常よりも高発現する場合や細胞系列の制限なく発現する場合）、挿入変異のリスクは高まり、さらなる変異を加速する可能性がある。

### d) 標的細胞集団/臓器

標的細胞集団/臓器もリスクに寄与する要因となる。一般に、発がんリスクは細胞・組織の成熟度と逆相関する。例えば、レトロウイルスベクターは造血幹細胞ではがん化を引き起こすが、成熟リンパ球ではがん化が認められないなど、細胞の遺伝的プログラムの相違によると考えられる。胎児組織への *in vivo* 遺伝子導入は、成人組織への導入と比べて相当高リスクと考えられる。Ex vivo 遺伝子導入では、細胞が暴露された *in vitro* での培養期間や増殖因子との接触などの状態や、遺伝子改変細胞として投与後の *in vivo* の状態も考慮すべきである。また、ベクターの転写活性を制御するメチル化状態などのエピジェネティックな状態や導入遺伝子配列も、ベクターによる発がん過程に影響する可能性がある。

### (3) 組込試験

一般に、特定のベクターが宿主細胞に永続的

に組込まれて長期間持続する場合、挿入変異のリスクについて非臨床及び臨床での組込試験で評価すべきである。非臨床サンプル、臨床サンプルを用いたベクター組込のゲノム分布の特性解析や分子レベルでのクローナリティー試験には数種類の方法が利用できる。患者での組込試験の必要性と試験の程度は、用いたベクターの使用経験、非臨床及び臨床試験結果に依存する。

新規ベクターでは、初期のフィージビリティ試験において、組込のプロファイルを調べることにより、ベクターの生物学的性質を理解し、安全性プロファイルの改善に役立つ重要な情報が得られる。例えば、特定部位を標的とするゲノム編集技術に基づいたベクターでは、組込試験は組込の特異性を決定する手段となる。組込型ベクターを用いる場合、*ex vivo* でも *in vivo* でも、関連する標的組織・臓器で組込試験を実施すべきである。臨床の組込試験は、非臨床試験で同定された安全性上の課題をモニタリングするために必要であり、特定の組込プロファイルが有害事象を引き起こしやすいかどうかを評価するのに役立つ。ベクターを *in vivo* 投与した後での組織・臓器からの組込部位の回収には、ベクターの持続性及び遺伝子導入量の検証を目的とした試験と組み合わせが可能な侵襲的方法が必要となる。有害事象が生じた場合、ベクター組込試験は原因となるベクター組込の役割の解明や、治療後の残存病変の検出に有用と考えられる。

### (4) 組込試験から得られる情報

ベクター組込部位の回収は、まずは移植した遺伝子導入細胞の代表サンプルを抽出し、特定のリスクのある遺伝子領域に組込を持つクローンの優性、拡大または増幅クローンの異常などの同定を目的とするべきである。組込部位についてより詳細に分析する場合は、各クローンの寄与を定量化可能な試験を計画する。

LAM-PCR などの手法とハイスループットシーケンスを組み合わせると、細胞あたりの組込ベクターコピー数とクローナリティー(ベクター組込により区別される異なる細胞クローン)に応じて、一つの試料から数百、数千の挿入部位を検出することができる。しかし、現在の手法ではまだ、定量の感度や精度とデータの解釈に限界がある。ベクター組込部位の大規模分析では、制限酵素を用いて目的 DNA を断片化するが、この手法は特定の PCR 産物の増幅にバイアスをかける可能性がある。制限酵素によるバイアスを減らし、定量精度を改善するために、組込部位の回収に制限酵素を用いない物理的切断などの方法が開発され、その有効性が現在評価されている段階である。非臨床及び臨床での安全性評価から得られる情報としては、

組込のクラスターの *in vivo* での有無

遺伝子導入細胞での各組込体の相対的寄与が挙げられる。

a) 共通挿入部位 (Common insertion sites ; CIS)

マウスを用いた挿入変異試験は、*in vivo* でのがん遺伝子の調節解除と発がんの誘導を調べる方法であるが、このスクリーニングで生じたがん細胞は、がん関連遺伝子近傍の Common insertion sites (CIS) と呼ばれる特定領域にベクターが組み込まれている。レトロウイルスベクターを用いて遺伝子治療を行った患者で生じた白血病・骨髄異形成細胞では、LMO2、MECOM、CCND2 等のがん遺伝子近傍に CIS が認められており、ある条件下では CIS は人でも挿入変異を予測するものと考えられる。しかし、CIS は必ずしもがん化による選択でエンリッチされたわけではなく、特定の染色体部位へのベクター組込プロファイルにバイアスがかかったためかもしれないことから、CIS のデータの解釈は注意深く扱うべきである。バイアスによる可能性を区別するには、

遺伝子導入時の *in vitro* でのベクター分布と *in vivo* でのベクター陽性細胞を比較する試験が必要である。CIS の分析は、現時点では試験集団でのベクターの挿入変異リスクに関する情報を提供するが、試験での個人のがん化を予測するものではないことを考慮する必要がある。

b) 遺伝子改変細胞クローンの定量

LAM-PCR 等の分子生物学的手法では、組込まれたベクターとゲノムとのジャンクションのシーケンスリード数に応じて、各遺伝子改変細胞クローンの寄与を定量的に評価することができる。しかし、挿入部位配列の計測による各クローンの測定頻度は、技術的な制約に影響される。当初、患者試料中の遺伝子改変細胞クローンの多様性は、LAM-PCR 産物の電気泳動での検出を基に推定され、バンドがわずかしか検出されない場合、遺伝子導入細胞はオリゴクローナルと見なし、多数のバンドのスミアとなる場合は多数の異なる挿入部位があることを示唆するためポリクローナルとみなした。しかし、LAM-PCR 産物の解析にハイスループットシーケンスを導入し、各成分からのリードの相対数が得られることで、新たな情報が得られている。例えば、X-SCID 遺伝子治療を行った患者 1 名の細胞の化学療法前後でのハイスループット分析により、ベクター-ゲノムジャンクションのシーケンス数は LMO2 へのベクター組込を持つ白血球クローンの動態とよく関連していた。また、遺伝子治療を行ったサラセミア患者で、HMGA2 領域にベクター組込があるクローンの相対的な存在比の決定に有用であった。しかし、LAM-PCR 法は制限酵素を用いることによる技術的バイアスを持つため、挿入部位の頻度はシーケンスで得られる結果と、LAM-PCR で相違が見られる場合がある。遺伝子導入効率が低い場合や、わずかな細胞集団からなるクローンの過大評価を避けるには、

ベクター-ゲノムジャンクションのシーケンス数は、分析試料中の遺伝子導入細胞の頻度を考慮すべきである。

現時点では、分子生物学的データのみでは十分ではなく、他の生物学的あるいは免疫学的アッセイから得られたデータと臨床での知見を組み合わせることが推奨される。遺伝子治療後の患者のフォローアップには、同一の組込部位を持つ細胞の持続性とその寄与を調べることが望ましい。制限酵素を用いない挿入部位の回収法が最近開発されており、制限酵素に依存しない方法が確立されれば、ベクター挿入試験に用いることができるようになる。

これらの試験では、方法の再現性、感度、特異性等、試験法を検証するための内部標準が重要である。バリデーションでは、同一時点での細胞のサンプリングと配列解析を繰り返し実施し、得られたシーケンスリードによりサンプル調製とシーケンスのバイアスの影響を評価する必要がある。この試験は、各試料に含まれる組込部位のカバー率の推定に有用である。

#### (5)患者での望ましい染色体組込プロファイル

目的とするベクターの組込プロファイルは、由来する野生型ウイルスの生物学的特性を反映している。ガンマレトロウイルスベクターの染色体組込はプロモーター領域に強い指向性を持ち、レンチウイルスベクターは転写ユニット内部への組込が優先され、アルファレトロウイルスではもっとランダムな分布を示す。In vitro でのデータと、遺伝子改変細胞で治療した患者の in vivo データの適切な比較が、増殖細胞でのベクター組込プロファイルを明らかにする基本となる。しかしどのような場合でも、染色体組込型ベクターはヒトゲノムのあらゆる危険な領域をヒットする可能性がある。低い遺伝子導入効率・少ない細胞数の移植ではオリゴクローナルとなることもあるが、遺伝子導入細胞を投与した患者では原則として、高度なポ

リクローナル状態が望ましい組込プロファイルといえる。造血系分化の数学的モデルによると、特に前駆細胞分画からの分化では、有害な選択が生じなくても長期のフォローアップではオリゴクローナルな状態が生理学的に生じることが予測される。持続的なクローン拡大がないことが望ましいが、一時的にクローンが増加しても幹細胞の活性化や病原体への免疫応答を反映しているだけかもしれない。

#### (6) 組込のリスクを低減させるための方策

ベクターバックボーンを選択は挿入プロファイルに大きな影響を与える。SIN レトロウイルスと SIN レンチウイルスは、ウイルスLTR に存在するエンハンサー・プロモーター配列を除去したもので、ベクターによる近傍遺伝子のトランス活性化の可能性を減らすことができる。

SIN ベクターでは、非臨床モデルでがん化リスクの上昇が認められるウイルスのプロモーター・エンハンサーよりも、細胞調節エレメントなどの比較的弱いプロモーター・エンハンサーの利用が好まれるが、十分な治療効果を達成するのに必要なタンパク質の発現量が得られるかという観点も考慮する必要がある。また、クロマチン・インスレーター配列は、エンハンサー・プロモーターの間に置くとその相互作用を阻害し、また導入遺伝子カセットからの発現が組込部位の影響を受けてサイレンシングされることを防ぐ。インスレーターは組込まれたベクターと宿主ゲノムとの相互作用を阻害することにより安全性を高める可能性がある。しかし、ベクターと宿主ゲノムの異常な融合転写産物により転写が生じる場合には、その効果は限定的である。組込による近傍ゲノム部位との異常スプライシングを防ぐには、ベクター中のスプライシングアクセプター・スプライシングドナーの除去を考慮すべきである。このように各エレメントについて知見が蓄積されてきて



はいるが、エレメントと特定の配列の相互作用など様々な要因がベクター全体の挿入変異リスクに影響するため、各ウイルスベクターでのエレメントの選択は注意深い研究が必要となる。ゲノム編集技術（ZFN や TALEN 等）を利用すると、安全な遺伝子導入領域であることが判明している AAVS1 や CCR5 等の領域に特異的に遺伝子導入できる可能性がある。このような安全な部位や特定領域への遺伝子導入が治療に応用できれば、遺伝子治療の安全性は著しく改善される。しかし、ゲノム編集技術は染色体 DNA への二本鎖切断の導入と修復を行うことから、標的細胞ゲノム全体でみたときのゲノム編集技術による遺伝子導入の特異性について十分な評価が必要である。

#### (7) 挿入変異によるがん化を評価するための非臨床モデル

染色体組込型ベクター製品の安全性を調べるための非臨床試験法として複数の方法が開発されている。In vitro 不死化試験（IVIM）は、マウス骨髄幹細胞の in vitro での培養に基づく方法で、異なるベクターコンストラクトの遺伝毒性能の測定を目的としている。遺伝子導入細胞の形質転換のパラメーターとして再播種の頻度により定量化している。この方法の感度は、強力なウイルスプロモーターを持つ陽性コントロールベクターを用いた場合、1~2 mutants/10<sup>5</sup> cells とされる。一般に、ベクターのエンハンサー活性が弱いほど、挿入変異は低下する傾向が見られる。この方法には、特定の領域でのわずかな遺伝毒性イベントのみを読みとることと、マウス骨髄細胞を使用するため培養条件が再現性に影響するという試験法の限界がある。

In vivo での発がん性試験は、組込型ベクターによる癌化を検出できるはずである。遺伝子改変造血前駆細胞の移植や直接投与法は有用なモデルとなる可能性があり、目的のベクター

で遺伝子導入した造血幹細胞の野生型マウスへの移植は、異なるベクターや導入遺伝子を比較する共通のプラットフォームとして検討されている。しかし、臨床試験で白血病発症との関連が知られているベクターを用いた場合でも白血病/リンパ腫の出現は低く、多くのマウス系統で長期フォローアップにより観察される白血病/リンパ腫の自然発生頻度との区別が難しい。このためリスクの予測に必要なマウスの数は非常に多くなり、また試験には長期間必要となる。野生型マウスでのクローン選択を増加させるため、継代移植が提案されているが、実際の遺伝子治療プロトコルとは異なることになる。白血病発症のサロゲートマーカーとして、細胞の増殖や生存に關与する遺伝子近傍への組込みによるクローンの変化の評価が提唱されているが、臨床試験でのがん化リスクの予測における重要性はまだ明らかではない。

疾患モデル動物を用いた遺伝毒性試験は、ベクターの組込による導入遺伝子の効果と、疾患の背景を組み合わせる分析する利点があり、より関連性が高い可能性がある。しかし、疾患マウスを用いても、X-SCID 遺伝子治療のように、ベクターによるがん化を予測できないかもしれない。疾患マウスモデルでの試験も正常マウスでの遺伝毒性試験と共通する限界がある。

ベクターの挿入により発がん活性が感作される可能性のある、がん化しやすいマウスモデルを用いる方法もある。このようなマウスは in vivo 及び ex vivo での発がん性試験に適しており、正常マウスや疾患モデルと比較して遺伝毒性の評価をより早くより安定的に評価できる。実際、がん化しやすい Cdkn2a<sup>-/-</sup> マウスを用いた試験では、SIN LTR や弱いプロモーターを持つベクターは、他のベクターよりも安全性に優れることが示されている。しかしこのようなモデルの使用にもいくつかの注意が必要である。第一に、腫瘍形成がおりやすいため、がん化能が低い新規ベクターではベクターの

遺伝毒性が隠されてしまう可能性がある。また、このモデルの表現型はベクターの目的とする疾患とは異なる。がん化しやすいマウスと疾患マウスを交配すると、ベクターによるがん化の加速と目的とする疾患での遺伝子導入細胞の投与が可能ながん化試験の新たな方法となる。しかし、二つの遺伝的背景の相互作用は長い時間がかかり、非臨床試験での使用の妨げになる特異な性質を持つマウス系統が生じる可能性もある。

動物モデルをベクター組込試験に用いる場合、モデルのゲノムや背景、がん化の機構の相違を考慮することが必要である。

#### (8) 臨床試験での考慮事項

現時点では、挿入変異とがん化リスクの予測に利用可能な臨床データ及び実験的データは限られている。遺伝子治療薬の臨床開発では、上述の様々な手法を用いてリスク評価を行うことは、適切なリスク管理、リスクの低減化の方法として役立つ。臨床の報告例から、がん化の発生まで数年かかることが示唆されており、この長い潜伏期間はがんの多段階発生を示唆し、挿入変異を生じるベクターの組込の大部分は、腫瘍発生に直接作用するというよりも、腫瘍発生を起こしやすくするだけとも考えられる。

患者の長期フォローアップは、染色体組込型ベクターによる遺伝子治療を受けた全ての患者に対して実施すべきである。臨床試験や市販後に実施すべきフォローアップの期間、頻度及び試験の程度は、明らかにされたリスクの程度に依存する。治療によるがん化のリスクの可能性や現実のリスクと、既知のベネフィットについて意識すべきである。販売承認(および国の規制当局の決定となる臨床試験の承認)は製品のリスク・ベネフィットの全体を考慮して判断されると考えられる。

## C.2 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法の開発

遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法開発の一環として、従来の PCR 法を改良した新しい PCR 技術であるデジタル PCR の活用に関して検討している。

定量 PCR 法は、遺伝子治療薬の品質・安全性評価において、ベクターや導入遺伝子を高感度で迅速に定量検出可能な方法として汎用されている。一方、デジタル PCR 法は、通常の定量 PCR と同様にプライマー、プローブを用いて検出するが、定量 PCR の 1 つのサンプルを、多数の微小区画、例えば、本研究で使用した droplet digital PCR(ddPCR)装置では約 20,000 個の droplet に分割し、それぞれの区画で個別に PCR 反応を行い、ターゲット遺伝子を含む微小区画のみを陽性として検出する方法である。多数の微小区画で反応させた陽性の微小区画の割合を測定し、ポアソン分布に当てはめることで、試料中のターゲット DNA のコピー数を高感度に絶対定量することが可能とされ、標準品との比較により定量するため標準品がないと定量できない定量 PCR に対して有利な点となる。また、微小区画で反応することにより、阻害物質の共存による阻害がおこりにくく、定量 PCR よりも高感度で、微量でも高精度に検出可能とうたわれている。

24 年度は遺伝子治療用ベクターの検出について、ddPCR 法と定量 PCR 法の検出感度の比較を行い、定量 PCR 法と比較して血漿中のベクターをより高感度に検出できることを明らかにした。今年度は、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価と、レトロウイルスベクターで遺伝子導入を行った細胞でのウイルスの残存性の測定について検討した。

### C.2.1 レトロウイルスベクターの比活性に関する検討

ウイルスベクターの品質管理規格として、ウ

ウイルス粒子数やゲノムコピー数を指標にする場合と、感染力価や遺伝子発現量を指標とする場合がある。しかし、ウイルスベクターに含まれるウイルスは全て感染性を持つわけではなく、感染性のないウイルスは不純物と考えられることから、ウイルスベクターを粒子数・ゲノムコピー数や感染力価のみで規定するのではなく、感染性のあるウイルス粒子の比率、あるいは感染力価とゲノムコピー数との比率として表される比活性を管理することが重要であり、比活性はウイルスベクターの重要品質特性と考えられる。ウイルスベクターの比活性を評価する場合、ウイルス粒子数の測定にはウイルスタンパク質の定量や電顕も用いられるが、定量 PCR/RT-PCR は簡便にゲノムコピー数を測定できる方法として汎用されている。しかし、定量 PCR を用いてウイルスベクターのゲノムコピー数の正確な定量を行うには濃度既知のウイルス標準品が必要であり、アデノウイルスベクターのように国際標準品が作成されているもの以外、正確な定量は困難である。一方、ddPCR は標準品なしでコピー数を絶対定量することが可能とされ、ウイルスベクターの品質管理に有用と考えられる。そこで、ddPCR を利用してレトロウイルスベクターの比活性を検討した。

レトロウイルスベクターはベクター産生細胞の培養上清中に回収されるので、Group A としてベクター産生細胞を培養し、培地交換せずにウイルスベクター上清を継時的に回収した場合、Group B として、継時的にウイルスベクター上清を回収し、そのたびに培地交換した場合についてゲノムコピー数を ddPCR で、感染力価をフローサイトメーターで測定した (Fig.1)。その結果、Group A では培養時間の増加に伴いゲノムコピー数は経時的に増加し、ウイルスベクターが培養上清に蓄積されていることが示された。Group B のコピー数は、同じ時点で回収した Group A の試料のゲノム

コピー数よりも低く、培地交換後の培養時間に依存していた。一方、各試料について感染力価を調べたところ、各時点での試料で Group A、Group B にほとんど差が認められなかった

レトロウイルスベクターは 1 粒子にウイルスゲノム 2 コピーを持つため、ゲノムコピー数と感染力価から、以下のように仮定して比活性を算出した。

$$\text{ウイルス粒子数} = \text{ゲノムコピー数} / 2$$

$$\text{比活性} = \text{感染細胞数} / \text{ウイルス粒子数}$$

その結果、比活性は培養 6 時間後の上清が最も高く、培養時間の経過に伴い比活性は低下した (Fig.2)。また、Group B のように培地を新鮮なものに交換して培養を続けることにより、一定の比活性を有するウイルスベクターをハーベストすることが可能であることが示唆された。Group A のように培養上清中にウイルスベクターを長時間維持すると、新しくウイルスベクターが産生される一方で、初期に産生されたウイルスが失活していく可能性が示唆された。

このような検討をベクター毎に実施することで、ウイルスの品質を規定しうる一定以上の比活性を持つウイルスベクターの回収条件の最適化を行うことが可能と考えられる。

### C.2.2 Ex vivo 遺伝子導入細胞でのウイルスベクターの残存性に関する検討

ウイルスベクターの臨床使用はカルタヘナ法の第一種使用等に該当するため、遺伝子治療の臨床研究や治験の実施には、国によるカルタヘナ法の第一種使用規程の承認が必要とされる。現在は、ウイルスベクターを in vivo で投与する場合だけでなく、ex vivo で遺伝子導入を行った細胞を臨床に用いる場合についても、ウイルスベクターが遺伝子導入細胞に残存する可能性と導入されたウイルスベクターに増

殖性ウイルスが混入している可能性があることからカルタヘナ法の第一種使用が適用されている。しかし、増殖性ウイルスはこれまで検出されたことはなく、製造法の改良から増殖性ウイルスの出現の可能性は極めて低いものとなっている。また、ex vivo 遺伝子治療では、細胞への遺伝子導入後、適切な細胞洗浄等の処理により、ウイルスベクターは除去され、また残存する微量なウイルス粒子も投与までの培養期間(3~14日程度)において失活するとされており、カルタヘナ第一種使用を適用しなくてよい可能性がある。もし、遺伝子導入細胞画分にウイルスベクターが残存しているのであれば、遺伝子導入細胞の安全性上の懸念ともなる。そこで、実際にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入細胞を調製後、細胞の洗浄によりウイルス粒子が適切に除去されるかどうかについて検討を行った。

K562細胞への遺伝子導入に用いた感染用レトロウイルスベクター液、遺伝子導入後に回収した残存上清及び4回の洗浄で回収された各洗浄液上清の計6サンプルについて、低濃度の遺伝子を高精度に検出可能なddPCRを用いてウイルスゲノムコピー数を測定した(Fig.3)。その結果、遺伝子導入後の残存上清に多くのウイルスが回収され、その後の希釈・洗浄操作の理論値では3回の洗浄によりウイルスベクターは細胞残渣に1コピー以下になると計算された。しかし、実測値を見ると、1回目の洗浄では理論値とほぼ一致してウイルス濃度が低下したが、2回目以降の洗浄でも洗浄液中のウイルス濃度はあまり減少せず、細胞にウイルスベクターが付着して残存している可能性が示唆された。4回の洗浄操作を行っても、およそ1~2コピー/ $\mu\text{l}$ の濃度で洗浄液に回収された。これは、実際の患者への遺伝子導入細胞の投与量に換算すると、細胞数 $1 \times 10^7$  cells/mlで5~10 ml程度を投与することから、5000~20000コピー程度が投与時に混入する計算に

なる。しかし実際には、遺伝子導入操作と洗浄を行ってすぐに患者に投与するわけではなく、数日間の培養を行った後に投与するプロトコールが遺伝子治療臨床研究実施施設では採用されている。レトロウイルスベクターは比較的短時間で感染性を失うとされることから、37℃で培養した場合のゲノムコピー数及び感染力価の変化を検討した(Fig.4)。その結果、レトロウイルスベクターは凍結保存や4℃保存では安定だが、37℃では12時間で力価が半減し、24時間では10%程にまで低下し、さらに長時間のインキュベーションで活性はほぼ消失することが確認された。

これらの結果から、遺伝子導入細胞にはウイルスベクターが残存する可能性はあるが、感染性のあるベクターが投与される可能性は極めて低いと考えられる。

## D. 考察

### D.1 染色体組込型ベクターの開発動向と安全性確保の課題

染色体組込型ベクターは先天性、後天性疾患の治療において、ex vivo や in vivo での遺伝子の導入、遺伝子修正の有望な道具である。染色体組込による挿入変異のリスクは遺伝子治療製品の開発中、常に注意深く考慮する必要がある。遺伝子治療製品の全体的な評価には、変異原性から発がん性イベントへの転換を引き起こしやすい要因として、ベクターの組込のプロファイル、組込による活性化や不活化を引き起こしやすい遺伝子エレメントの存在、導入遺伝子の性質、標的細胞・組織の性質、その他の変異を誘発する要因に関する考慮を含めるべきである。ベクターの組込試験と遺伝子導入細胞のクローナリティ試験は、非臨床試験、臨床試験の実施において、製品の包括的な安全性評価のための重要なツールとなるが、挿入変異・がん化のリスク評価に利用できる技術はまだ開発段階である。データの解釈では、試験法が

さらに改良され、妥当性が示されるまではこれから試験の限界について考慮する必要がある。

遺伝子治療の初期の臨床試験でがん化が発生したことにより、遺伝子治療の開発は一次ストップしたが、その後、レトロウイルスベクターの改良からレンチウイルスベクターへと遺伝子治療技術は様々な改良が試みられており、より安全性の高いプロファイルを示す新規のベクターが臨床応用されてきている。また、挿入変異リスクを減らすための新たな遺伝子導入の方法も開発されてきている。しかし、ベクターの挿入変異・がん化のリスク評価に利用できる実験技術はまだ開発段階であり、臨床のリスク評価を十分に行うことはできないので、患者の綿密な長期フォローアップが重要となる。ベクターの挿入変異リスクを正確に評価可能な *in vitro*, *in vivo* のリスク評価法の開発が求められる。

## D.2 遺伝子治療用ベクターの品質・安全性評価法の開発

ウイルスベクターの品質管理において、ベクターの力価や遺伝子発現量だけでなく、感染性のあるウイルス粒子と感染性のない粒子との比率や力価とウイルスのゲノムコピー数との比率(比活性)の管理を行うための方法として、標準品がなくてもコピー数を絶対定量することが可能なデジタル PCR の活用を検討した。レトロウイルスベクターは主として *ex vivo* 遺伝子導入に用いられており、患者に直接投与されるわけではないが、遺伝子治療製品の規格としては比活性を規定して一定の品質のベクターを使用することが重要と考えられ、この方法として、ddPCR の有用性が確認された。なお、今回の比活性の算出においては、感染力価の測定において、一細胞あたり一ウイルスベクターが感染したと仮定して計算した。しかし実際には数コピー挿入されることがあるので、ddPCR の特性を生かして、一細胞あたりのコピー数を

算出する方法を確立する必要があり、現在検討を進めている。この技術が確立されればより正確な比活性値を算出することが可能であり、今後のウイルス粒子の品質評価の一助となると思われる。このような検討を通じて、遺伝子治療薬の品質評価に関して最新の技術をどのように取り入れていくかについてのコンセプトを明確にする予定である。

一方、遺伝子導入細胞でのウイルス残存性については、理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性が示された。感染に至らないウイルス粒子が細胞外に強固に結合している可能性がある。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入では感染効率を上げるためにレトロネクチンを使用しているが、レトロネクチンは細胞接着ドメインで標的細胞に結合し、ヘパリン結合ドメインでウイルス粒子と結合するため、レトロネクチンに結合したウイルスが洗浄操作でも容易にははがれない可能性がある。実際の臨床においては、たとえば成育医療センターの臨床研究プロトコールの場合、ウイルスベクターで遺伝子導入後2日間の培養期間中に3回および投与前3回の計6回の洗浄操作が行われることや、レトロウイルスベクターは1日以上培養で感染性を失うことから、感染性のあるウイルスベクターが遺伝子導入細胞とともに患者に投与される可能性は極めて低いが、各臨床プロトコールにおいて、どの程度ウイルスの残存があるのかについて事前評価しておく必要があると考えられる。

## E. 結論

遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリサイエンス研究の一環として、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの要因とリスク

低減化のために考慮すべき事項、非臨床で実施すべき染色体への組込み試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。これらの結果は、現在実施している遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等に活用していく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 内田恵理子：“**バイオ医薬品**”，第 25 章 遺伝子治療薬，西島正弘・川崎ナナ編，化学同人，京都(2013)，pp.235-244

### 2. 学会発表

1) 吉田徳幸，井上貴雄，内田恵理子，小比賀聡，佐藤陽治：オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究、第 5 回日本 RNAi 研究会、2013.8、広島

2) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato : In silico analysis of off-target effects of oligonucleotide therapeutics, 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, October 6-8, 2013, Naples, Italy

3) 吉田徳幸，小比賀聡，内田恵理子，佐藤陽治，井上貴雄：オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究、日本薬学会第 134 年会、2014.3、熊本

G. **知的財産権の出願・登録状況** (予定を含む)  
該当なし

Table 1 遺伝子組込型ベクターを用いた臨床試験におけるベクターの挿入部位とがん化

対象疾患	ベクターの種類	標的細胞	分析数/患者数	挿入部位数	癌遺伝子関連挿入部位	クローン優位性	がん化
X-SCID (仏)	レトロ	造血幹細胞	8/10	9767	CCND(3/7), LMO2(3/7), BMI1(1/7), HMGA2 (2/7)	4/7	4 (T-ALL)
X-SCID (英)	レトロ	造血幹細胞	6/10	438	-	1/6	1 (T-ALL)
ADA-SCID (伊)	レトロ	造血幹細胞	4/10	708	LMO2(4/4), CCND2	0/4	0
	レトロ	造血幹細胞	4/10	1959	LMO2, MDS-EVI1	0/4	0
ADA-SCID (伊)	レトロ	T細胞	4/6	2198	-	0/4	0
CGD	レトロ	造血幹細胞	2/2	765	MDS-EVI1(2/2), PRDM16(2/2), SETBP1(2/2)	2/2	3 (骨髄異形成)
WAS	レトロ	造血幹細胞	2/10	15247	CCND2(2/2), LMO2(2/2), BMI1(2/2), MDS1-EVI1(2/2), PEDM16(2/2), SETBP1(2/2)	0/2	4/10 (ALL)
AIDS	レンチ	造血幹細胞	3/5	8019	-	0/3	0
X-CGD	レンチ	造血幹細胞	2/2	3597	-	0/2	0
βサラセミア	レンチ	造血幹細胞	1/2	-	HMGA2(1/1)	1/1	0

Knight S et al: Curr.Gene Ther. 13, 11 (2013) 改変

### レトロウイルスベクター(培養上清)のゲノムコピー数と感染力価

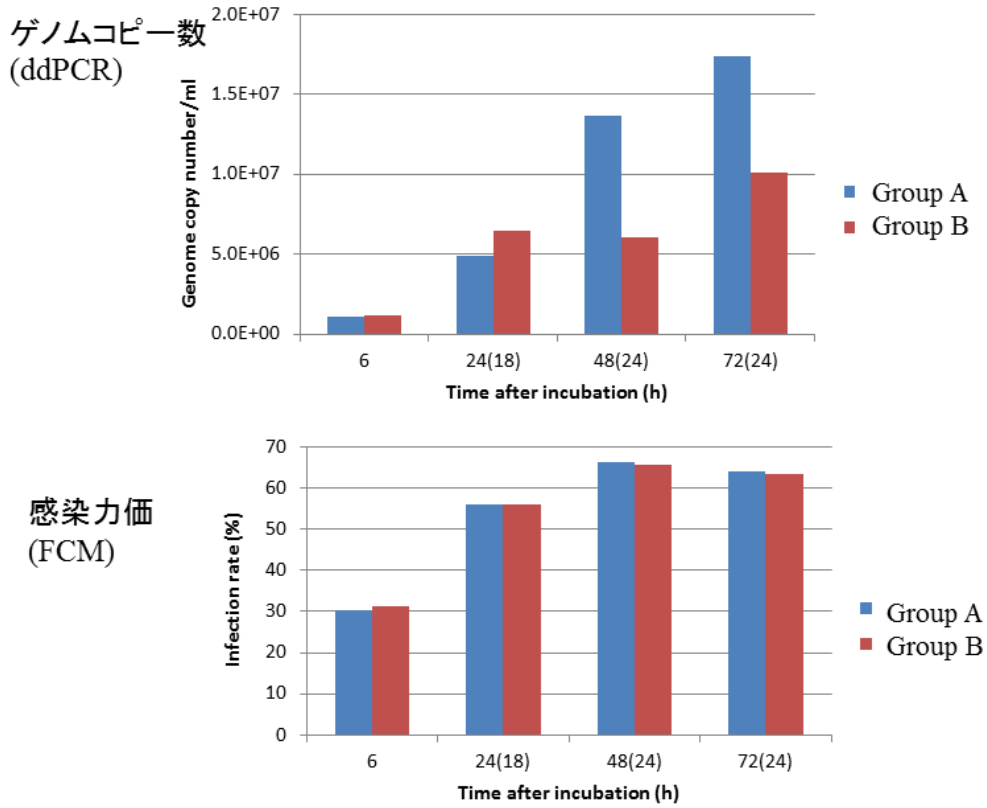


Fig.1 レトロウイルスベクター(培養上清)のゲノムコピー数と感染力価

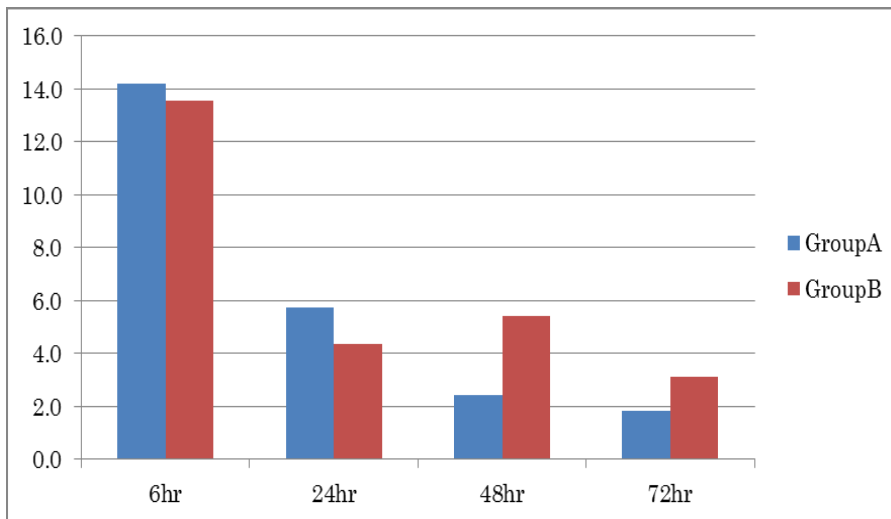


Fig.2 レトロウイルスベクター(培養上清)の培養条件と比活性



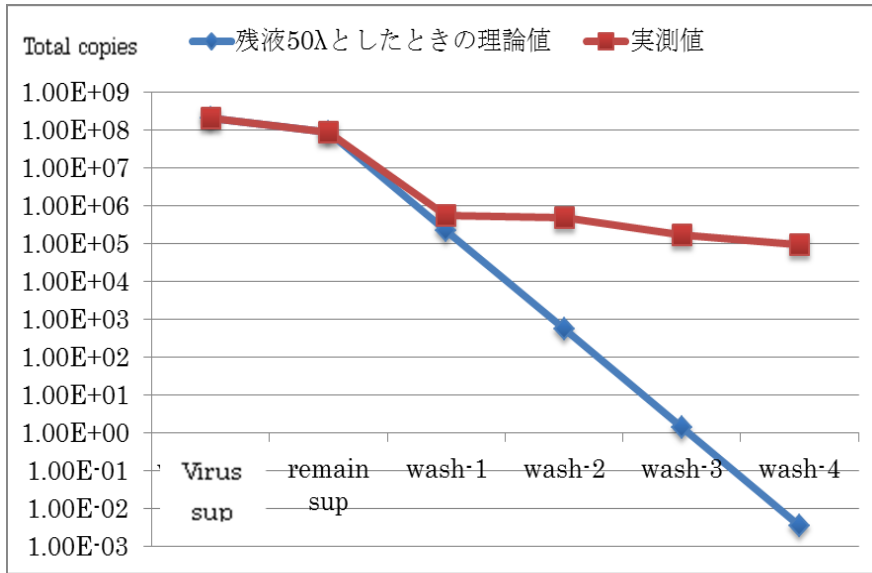


Fig.3 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入後の細胞へのウイルスの残存性

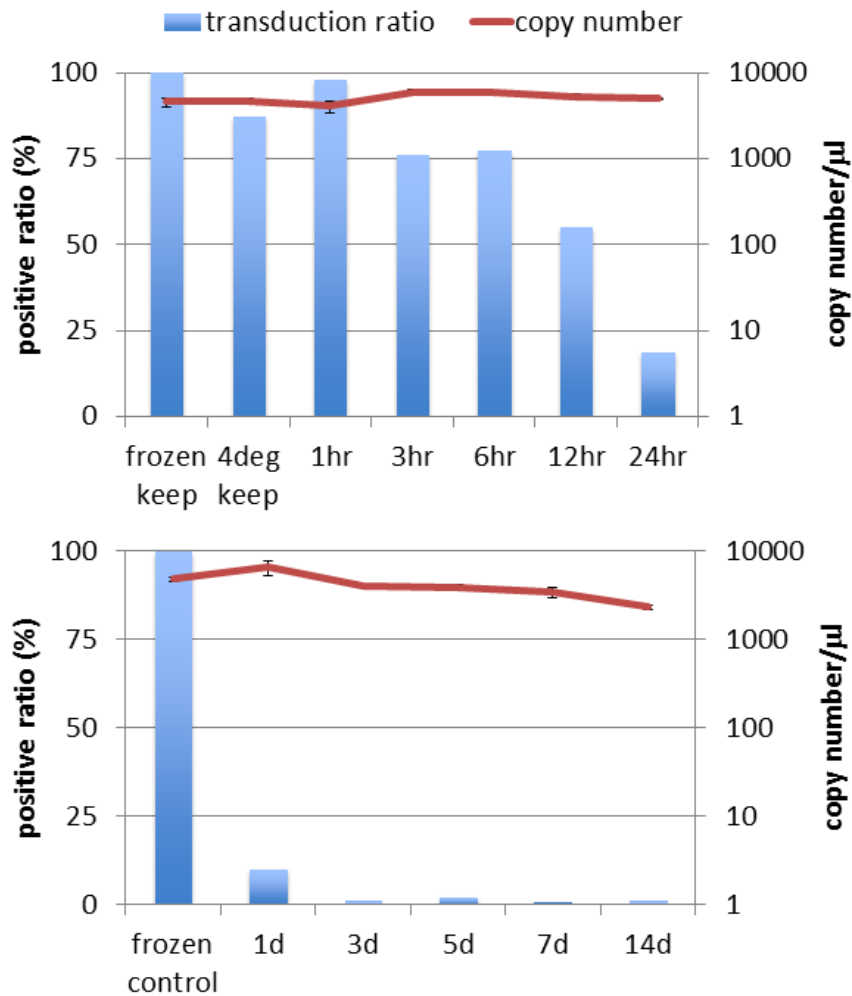


Fig.4 レトロウイルスベクターの37℃保存時間とコピー数及び感染力値の変化

