

レトロウイルスベクターの安全性についての遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の見解

平成29年7月26日

厚生科学審議会再生医療等評価部会
遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会
委員長 山口 照英

国立研究開発法人国立成育医療研究センターより、「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」において、本研究との因果関係が疑われる骨髄異形成症候群(MDS)が発生した旨の遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書が提出されたことを踏まえ、平成29年7月26日、遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会を開催し、レトロウイルスベクターの安全性、今後の対応等について見解をまとめた。

1 「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」の研究実施計画承認の経緯

本研究については、平成23年9月29日付で遺伝子治療臨床研究実施計画の申請があり、遺伝子治療臨床研究作業委員会において次の見解をまとめ、厚生科学審議会科学技術部会における了承を経て、平成24年6月14日付で承認された。

(見解の要点)

- 世界において先天性免疫不全症で遺伝子治療を受けた患者82人中9人が白血病などの造血系異常を発症しており、その症例の検証結果から、次の点が明らかになっている。
 - ・ 白血病などの造血系異常は、レトロウイルスベクターが染色体に組み込まれたことによる近傍のがん原遺伝子の活性化が主な原因である。
 - ・ ベクター挿入による白血病化は造血幹細胞でのみで起きており、他の分化した細胞では起きていない。
 - ・ 白血病の発症は、対象疾患がTリンパ球の機能異常による免疫不全症(X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)やウィスコット・アルドリッヂ症候群(WAS))か、遺伝子発現率の高い脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)由来レトロウイルスベクターを使った時に限られている。

- しかし、がん化の機構については、未だ不明な点も多く、がん化のリスクをあらかじめ予想することは困難とされている。レトロウイルスベクターを使った臨床研究では、遺伝子導入細胞のクローン性増殖の検出が重要であり、クローン性増殖の確認にはゲノム解析が必須となっている。X-SCID 等の遺伝子治療では、治療後 3~5 年という長い期間後に白血病が発症したことから、長期に渡るフォローアップが重要である。
- 骨髄移植が実施できない重篤な慢性肉芽腫症(CGD)に対しては、造血幹細胞遺伝子治療は重要な選択肢である。本臨床研究は、既に米国で行われ一定の治療効果と安全性が確認されたプロトコール(米国の臨床研究で造血系異常が起きていないベクターを使用)であり、Risk/Benefit の観点から CGD 患者にとって有益である。
- 理論的に安全性が高いと考えられている新型ベクターの開発について、現時点での安全性や優位性が確立したものではなく、これらの評価には数年を要すると考えられ、現時点での使用可能な最も安全なベクターを使った臨床研究を開始することは科学的及び倫理的に妥当である。

2 本研究中に発生した MDS についての評価

(1) 本研究と MDS との因果関係について

- ウイルスベクター-LTR(プロモーター部分)を標的とした qPCR 法によれば、遺伝子導入細胞が導入 12 ヶ月目で急に増加し、32 ヶ月目まで持続している。
- ウイルスベクターが、がん原遺伝子の近傍(MECOM IVS II の 1 箇所のみ)に挿入されていることが確認されており、MECOM^{*}の活性化により、異常な細胞増殖が誘導されたものと推定される。
※MECOM は MDS1-EVI1 複合タンパク質をコードするがん原遺伝子である。
- 以上から MDS は、本研究により発生した可能性が高いと考えられるが、単独原因ではなく、何らかの追加的な要因も重なり発症した可能性も考えられる。
- また、ウイルスベクター投与前に前処置として使用したブスルファンには、二次発がんが認められたとの文献報告があることから、ブスルファンの影響も完全には否定できず、引き続き原因の科学的解明が必要である。

(2) 遺伝子導入細胞の検出法について

- 遺伝子導入細胞の検出にあたって、当初、治療に用いた X 連鎖性慢性肉芽腫症(X-CGD)の原因遺伝子である活性酸素産生酵素遺伝子(CYBB 遺伝子)プローブを用いて qPCR を行ったが、検出できていなかつことが明らかとなった。これは、その後の遺伝子解析により、挿入された CYBB 遺伝子に

変異が起きていたためであることが判明した。その後、LTR を標的とした qPCR 法による検出にて遺伝子導入細胞の増殖が確認された。

- 一方で、CYBB 遺伝子に多くの変異がみられており、必ずしも、造血幹細胞にベクターが挿入された後に変異が起きたとはいえず、ベクター製造の段階で様々な要因で変異が導入された可能性もあり、その要因については今後の解析を待たざるを得ない。もし、導入前のベクターの一部に変異が起きていた場合には、ベクターの品質管理についてより注意を喚起する必要がある。
- いずれにしても、今回の解析で当初 CYBB 遺伝子を標的とした解析で十分な検出ができなかつたことから、遺伝子導入細胞を検査する際には、ウイルスベクター上の適切な部位を複数選択するような qPCR を行う等の考慮が必要である。

(3) 本研究の今後について

- 抗生物質研究の進歩により CGD 患者の細菌感染制御は比較的改善しているが、真菌感染症等の制御は未だ困難であり重篤な感染症が繰り返される状況にある。本遺伝子治療を実施したことで、CGD の急性期重症感染症を制御し、造血幹細胞移植の実施に至ったことは、本遺伝子治療の有効性を示していると考えられること、また、現時点より安全性や有効性の高い他の新型ベクターは開発されていないことから、本遺伝子治療の中止を求めるべきではないと考えられる。ただし、本研究を継続する場合は、研究を一旦留保し、次のことを実施する必要がある。
 - CYBB 遺伝子において検出された変異がウイルスベクターの細胞への導入前、又は導入後のどちらで起きていたのか明らかにし、必要な対応を研究計画に記載すること
 - 本研究で MDS が発症したこと、及び遺伝子治療は CGD 患者の造血幹細胞移植の実施まで、重篤な急性期感染症を制御する Bridging としての治療法であることを研究計画書と患者説明同意書に反映させること
 - 本研究はあくまでも造血幹細胞移植が適用不能の場合に実施を考慮する位置づけにあると考えられる。ハプロ移植 (HLA 半合致ドナーからの移植) の技術の進歩は目覚しいものがあり、その点も考慮して、HLA の適合率等についての被験者の選定基準の見直しを検討し、研究計画書と患者説明同意文書に反映させること。
 - 患者にとって遺伝子治療の Risk/Benefit を慎重に評価すること。

- 本研究によるMDSの発生の機序に関する科学的解明を継続して行うこと。

3 レトロウイルスベクターの安全性について

- レトロウイルスベクターは1990年に米国で世界初の遺伝子治療として行われたADA欠損症の治療以来、多数の治療プロトコールで使われている。これまでレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療の有害事象としては、フランスおよびイギリスのX-SCID遺伝子治療において、20例中5例で白血病発症が報告¹⁾され、WAS遺伝子治療では10例中7例で白血病発症¹⁾、CGD遺伝子治療において12例中3例で骨髄異形成症候群(MDS)の発症²⁾が認められている。一方、造血幹細胞にレトロウイルスベクターで遺伝子導入したADA欠損症遺伝子治療ではこれまでイタリアで18症例、イギリスで8症例、米国で14症例、日本で2症例の投与が行われているが白血病発症の報告はない³⁾。また、有効性に関して、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した治療プロトコールでは遺伝子治療の有効性が確認されており、X-SCIDの遺伝子治療において、感染防止のための隔離が不要になるなど顕著な有効性が認められている。さらにADA欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療製品は欧州で承認されている。
- これらの検証結果から以下の点が明らかとなっている。
 - ① 白血病などの造血系異常は、レトロウイルスベクターが染色体のがん原遺伝子近傍に組み込まれたことによるがん原遺伝子の活性化が主な原因である。
 - ② レトロウイルスベクターによるがん化の頻度は対象疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なっており、これらの組み合わせにより安全性が変わってくるものと考えられる。
 - 対象疾患特異性
先天性免疫不全症、しかもその一部の疾患(X-SCID、WAS、X連鎖CGD)の治療のみで起きている。
 - 細胞特異性
造血幹細胞でのみで起きており、他の分化した細胞では報告されていない。

➤ ベクター特異性

野生型 LTR を持つレトロウイルスベクターでのみ起きている。LTR 内のプロモーター部分を削除して安全性を高めた自己不活化型ベクターでは起きていない。

- 今回の報告を受け、レトロウイルスベクターの中でも、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）由来レトロウイルスベクターのように遺伝子発現率の高いベクターだけでなく、遺伝子発現率の低いベクターにおいてもMDSが発生することが明らかとなった。対象疾患特異性、細胞特異性、ベクター特異性、さらにその組み合わせによって安全性に差があることが想定されるが、いずれの疾患、細胞、ベクターを用いるにしても長期にわたる慎重な経過観察が必要と考える。経過観察においてはベクター特性や対象疾患等でのリスクに応じたデザインとすることが望ましい。

- 1) Sandeep RP Kumar et al, Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. Mol Ther Methods Clin Dev. 25; 3, 2016.
- 2) 河合利尚, 「原発性免疫不全」. 小児内科, Vol49;7, 2017.
- 3) 金田安史, 遺伝子医学 MOOK「今着実に実り始めた遺伝子治療-最新研究と今後の展開-」. メディカルドウ, 2016.

4 その他のウイルスベクターの安全性について

- 遺伝子治療に使用されるベクターには、レトロウイルスベクター以外に、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、プラスミド DNA 等があるが、レトロウイルスベクター以外のウイルスベクターやプラスミド DNA で、白血病等のがんが発生したという報告はない。
- 遺伝子治療ベクターの特徴から
 - ベクターの細胞内での動態
 - ・染色体への挿入機構を持つウイルスベクター
(レトロウイルス、レンチウイルス等)
 - ・核内での遺伝子発現機構を持つベクター
(アデノウイルス、AAV、プラスミド DNA)
 - ・細胞質での遺伝子発現機構を持つベクター
(センダイウイルス)
 - 遺伝子導入が可能な細胞
 - ・増殖性細胞のみに遺伝子導入可能(レトロウイルス、プラスミド DNA)

- ・非増殖性細胞にも遺伝子導入可能(レンチウイルス、アデノウイルス、AAV、センダイウイルス)

に分けられる。これらのベクターのうち、アデノウイルスベクター、AAV ベクター、プラスミドDNA、センダイウイルスベクターについては、宿主細胞の染色体には積極的に組み込まれないが、レンチウイルスベクターについては、レトロウイルスベクターと同様に、宿主細胞の染色体に組み込まれることから、注意が必要である。しかしながら、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター以外のベクターに関しても、慎重な取扱いが必要と考える。

5 今後の必要な対応

- 従来から、白血病等の造血系異常は、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID、WAS、CGD の造血幹細胞遺伝子治療のみで発生している。今回の CGD での MDS 発症の報告によって、これまで造血系異常が発生したことのない ADA 欠損症などの他の疾病的遺伝子治療や、造血幹細胞以外の細胞を用いた遺伝子治療に対する、レトロウイルスベクターのリスクが高まるることは考えにくい。
- 今回の重大事態等報告があった CGD を対象とした研究を除き、現在、日本において、造血幹細胞を用いたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療で、X-SCID、WAS、CGD に対して行われているものはないが、遺伝子治療等臨床研究の一層の安全性を確保する観点から、下記の対応を行うことが適切である。
 - ① 現在実施されている研究への対応
レトロウイルスベクターあるいはレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療等臨床研究を実施している機関を対象に、本重大事態等報告の内容について情報提供し、それぞれの研究計画書および患者説明同意書に、導入細胞や疾患でのリスクも踏まえた上で今回の事例を追記する等、本重大事態等報告の内容を踏まえた必要な対応の検討を求める。
 - ② 既に終了した研究への対応
レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療等臨床研究を終了した研究機関に対し、患者のフォローアップに資するよう本重大事態等報告の内容について情報提供を行う。

③海外への情報提供

今回の重大事態等報告の内容は、遺伝子治療の安全性評価として極めて重要なデータであり、米国 FDA、欧州 EMA、IPRF(国際薬事規制当局者フォーラム)[※]への情報提供を行う。

※ IPRF(International Pharmaceutical Regulators Forum:国際薬事規制当局者フォーラム)

ヒト用の医薬品について、メンバーが相互に関心を持つ問題や規制協力に関する情報を交換するための環境を作り出すことを目的としてつくられた。IPRF は、ICH や他の国際的に調和した人用の医薬品の技術ガイドラインの実施を促進するものである。メンバーは、EU、米国、オーストラリア、韓国、シンガポールなどの規制当局やWHOなど。

事務連絡
平成 27 年 6 月 23 日

各都道府県衛生主管部（局）薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

厚生労働省医薬食品局
医療機器・再生医療等製品担当参事官室

ICH 見解「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」について

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（以下「ICH」という。）が組織され、品質、安全性及び有効性の各分野で、ハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われているところです。

近年の遺伝子治療に関する研究開発の発展等を踏まえ、ICH の遺伝子治療専門家会議（GTDG）において ICH 見解としてとりまとめられた「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」について、別添のとおり事務連絡しますので、今後の業務の参考とするよう、貴管下関係業者に対し御周知願います。

2006年10月25日

ICH 見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込み^{*1}リスクに対応するための基本的な考え方

1. 緒言

遺伝子治療用ベクターは、疾患の治療、予防又は診断を目的として遺伝子を患者の細胞へ導入するために設計される。遺伝性疾患の治療において、長期間にわたる効果的な遺伝子発現が求められるケースでは、導入遺伝子を目的細胞の染色体へ組み込むことが治療の最終目的となる。さらに、導入遺伝子の染色体への組み込みは、一般に組み込み能があるとは考えられていないベクターでも低頻度とはいえることである。標的細胞へのDNAの組み込みは望ましいことであり、また容認しうることであるが、非標的細胞への組み込みは最小限に抑えるべきであり、生殖組織においては、可能性は低いものの生殖細胞が改変されるおそれがあり、特に懸念されるものである。染色体への組み込みが起こると、(正常な)遺伝子構造を修飾したり遺伝子発現を妨害、誘発する遺伝子の再配列や挿入変異が起こる可能性がある。さらに、新しい遺伝子治療技術により作製される、より高い力価、より高い導入効率、あるいはより広い指向性を有するベクターでは、生殖細胞への意図しない組み込みリスクに対する懸念が高まる可能性がある。ICHに参加している規制当局は、現在の科学的、倫理的及び法的な議論に基づき、生殖細胞への直接の遺伝子組み込みを目的とする遺伝子治療の臨床試験は実施すべきではないということで合意している。さらに各極は、ベクターDNAの次世代への移行につながる可能性のあるものとして、生殖細胞への意図しない遺伝子組み込みリスクを最小にするべきであるということにも同意している。

本文書では、生殖細胞への意図しない組み込みリスクに関する試験法やリスクに対応するための基本的な考え方を明確にするとともに、臨床試験の被験者に対するリスクを最小にするために考慮すべき事項を示す。本文書は遺伝子治療用ベクターに適用されるが、腫瘍溶解性ウイルスに適用されることもあり得る。

2. 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みにおけるリスク要因

生殖細胞への意図しない組み込みリスクは、ベクターの種類、投与量、投与経路、投与部位などを含む多様な要因に基づいていることから、リスク評価には科学的知見に基づくケースバイケースのアプローチが用いられるべきある。

2.1. ベクター：

ベクターごとの生殖細胞への相対的な組み込みリスクの大きさは、一般に各ベクターの生体内分布の特性、複製能及び染色体組み込み能に基づく。

遺伝子治療の研究や臨床試験に用いられるベクターには以下のようなものがあるが、これらに限定されるものではない。

- ・アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター
- ・アデノウイルスベクター
- ・ガンマレトロウイルスベクター
- ・単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) ベクター
- ・レンチウイルスベクター
- ・パラミクソウイルスベクター
- ・プラスミドベクター
- ・ポックスクスウイルスベクター

ベクターの宿主細胞染色体への組み込み能は、生殖細胞への組み込みリスクを評価するうえでの重要な要因である。遺伝子治療用ベクターは、組み込み能が高い順に以下の 3 つに分類される。

- (i) 細胞の核に移行し、組み込み能（組み込み機構）を持つベクター
- (ii) 組み込み能（組み込み機構）を持たないが、細胞の核に移行するベクター
- (iii) 細胞の核内に移行することができず、細胞質に留まるベクター

例えば、ガンマレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターは、ベクターの宿主染色体への組み込みが可能となるようなウイルス特有の酵素（例えば、インテグラーゼ）を持っている。従って、これらのベクターは生殖細胞への意図しない組み込みリスクが高いと考えられる。リスクを評価する際にさらに考慮すべき性質として、複製能や細胞宿主選択性（トロピズム）がある。ウイルスベクターの改変やシードタイプ化^{*2}はウイルスの本来のトロピズムを変えることができ、これにより生殖組織への分布が可能になる。一方、ベクターの持つ複製能は生殖組織への暴露量に影響を及ぼす可能性がある。

2.2. 投与量および投与経路

高用量の投与は、ベクターやベクター構成成分の生殖腺に対する暴露のリスクが統計的に高まる可能性がある。静脈内投与は、血流を介する拡散により遺伝子治療用ベクターの生殖腺への暴露リスクを高める可能性がある。反対に、複製能を欠損した遺伝子治療用ベクターを用いた *ex vivo* での遺伝子導入は、生殖細胞への組み込みリスクはきわめて小さいと考えられる。

3. 非臨床試験

3.1 一般に考慮すべき事項

遺伝子治療用ベクターの臨床開発は非臨床試験及び臨床試験から得られる安全性情報を検討しながら進められるべきである。非臨床試験は、臨床使用を目的とした全ての製品において、安全性やブルーフ・オブ・コンセプト^{*3}を確立するために重要である。また、これらの試験は当該製品の対象患者に対するリスク・ベネフィット比の評価にも役立つ。バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床試験のデザインは ICH S6 において述べられている。遺伝子治療用ベクターは ICH S6 の適用範囲に含まれていないものの、このガイドラインに記載されている考え方は遺伝子治療用ベクターに適用できる場合もある。

3.2. 生体内分布試験^{*4}

動物での生体内分布試験は標的及び非標的臓器におけるベクターの分布や推移を調べるための試験であり、臨床試験において使用される製品を用いて実施される必要がある。生殖組織への分布は生殖細胞への組み込みの可能性の指標であることから、生体内分布試験では生殖組織（精巣及び卵巣）の分析を含む必要がある。ベクターの分布や推移は核酸配列を測定することにより検出できる。動物の臓器や組織でのベクター配列の存在を調べるには、少なくとも一つは、定量的PCRのような高感度分析法を用いることが望ましい。

他の導入遺伝子を含む同一ベクターを用いて行った生体内分布試験データは初期の臨床開発で利用できる可能性がある。

ベクターが生殖組織で検出されない場合、生殖細胞への遺伝子の組み込みを確認するためのそれ以上の試験は必要ないであろう。ベクターが生殖組織で検出された場合は、検出されたベクター量が経時的に減少し、検出限界以下になるかどうかを調べる動物試験の実施が必要となる（分布の一過性を確認）。生殖組織にベクター配列が持続的に検出された場合、生殖細胞へ遺伝子が導入されているか否かを明らかにする必要があるかもしれない。可能なかぎり、生殖組織の検査を実施して、ベクターが生殖細胞内に存在するのか、あるいは非生殖細胞（例えば、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、白血球など）内に存在するのかを検討するべきである。雄動物の場合、精子形成サイクルの期間に考慮し、異なる時点での精子を分析することによって評価可能である。ベクターの持続的な検出が非生殖細胞のみに限局している場合や、精子でのベクター配列の検出が一過性の場合は、おそらく生殖細胞への組み込みが起こっていないと考えられる。雌動物の場合は、ベクターが一つの卵細胞で検出された場合、すべての卵細胞に分布していると現在のところ解釈すべきである。ベクター配列が持続的に卵細胞又は精子から検出された場合は、各規制当局と議論する必要がある。

4. 患者のモニタリング

動物での生体内分布試験において、遺伝子治療用ベクターが一過性に生殖腺で検出された場合には、患者の精液にベクターが存在するか否かを検査することを考慮したほうがよい。患者が生殖不能な場合、または余命が短いことが見込まれる重篤な疾患では、精液のモニタリングは必要

ないであろう。

精液の検査は、成人男子における精子形成の1サイクルである約64-74日間を越えて複数回実施することが望ましい^{*5}。精子形成の1サイクルを過ぎて実施した精液の検査が陽性であった場合には、検査を継続するとともに規制当局へ報告すべきである。

現在、女性の生殖細胞への組み込みを非侵襲的にモニターする方法はない。したがって、女性の被験者におけるリスクは主として非臨床試験成績に基づいて評価する必要がある。

臨床試験の期間中は、非臨床生体内分布試験の結果にかかわらず避妊手段をとるべきであろう。

注：以下の説明は和訳に当たって、理解を助ける目的で付したものである。

*1：ここでいう組み込みとは、ベクターに含まれるDNAやその一部、又はRNAウイルスベクターにあってはそのRNAに由来するDNAの全体や一部が生殖細胞の染色体へ組み込まれることを指。染色体外に存在している場合には、発生毒性等からの懸念は当然存在するが本文書の範囲外としている。

*2：ウイルスやウイルスベクターの感染に関するエンベロープタンパク質を別のウイルスのエンベロープタンパク質に置換し、細胞への指向性を変えること。

*3：製品開発過程において、その開発コンセプトの妥当性を証明することの総称。ここでは開発段階にある遺伝子治療薬について、非臨床試験で検討された有効性や安全性から、ヒトへの応用研究の妥当性を確認することを意味する。

*4：いわゆる医薬品の体内動態試験に相当するが、ここでは投与したベクターの動態を解析することが目的ではなく、投与したベクターが生殖腺を含めて体内組織にどのように分布するかを明らかにする試験を意味する。

*5：精子幹細胞への組み込みを否定するために、一般的には精子形成の1サイクルを超える期間を考慮して、複数回（例えば3回）の試験で連続して陰性であることを確認する必要がある。またその最終の試験は、ベクター投与後精子形成1サイクルの期間を超えている必要がある。