

平成 24 年 3 月 28 日

独立行政法人国立成育医療研究センターから申請のあった  
遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について

遺伝子治療臨床研究作業委員会  
委員長 島田 隆

独立行政法人国立成育医療研究センターから申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

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  
申請者：独立行政法人国立成育医療研究センター 総長 加藤 達夫  
申請日：平成 23 年 9 月 29 日

## 1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名： 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

(2) 申請年月日： 平成23年9月29日

(3) 実施施設： 独立行政法人国立成育医療研究センター  
代表者： 総長 加藤 達夫

(4) 総括責任者： 独立行政法人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

(5) 対象疾患： 慢性肉芽腫症  
導入遺伝子： ヒトチトクローム b245 ベータポリペプチド (CYBB) 遺伝子  
ベクターの種類： 非増殖性レトロウイルスベクター  
用法・用量： 患者体重 1kg あたり 10 $\mu$ g の G-CSF を 5 日間皮下投与し、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、これら細胞から患者 CD34 陽性細胞を分離する。得られた CD34 陽性細胞を 48 時間培養し、培養バッグ内で CYBB 遺伝子を導入する (24 時間ごとに 3 回)。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する。最低投与数は体重 1kg あたり 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 個とする (上限はなし)。

研究実施期間： 厚生労働大臣より了承された日から 5 年間

目標症例数： 5 例

### (6) 研究の概略：

本研究は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症 (CGD) のうち、特に CGD としては最も症例数が多い NADPH オキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質 gp91<sup>phox</sup> 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を目的とした臨床研究である。レトロウイルスベクターを用いて gp91<sup>phox</sup> をコードする CYBB 遺伝子を患者由来造血幹細胞に導入し、これらの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、その安全性と有効性を評価する。

### (7) その他 (外国での状況等)：

CGD に対する遺伝子治療臨床研究は、1995 年に米国で初めて報告され、その後イギリスやドイツなどでも実施されている。米国では、2006 年末から本臨床研究と同一のベクターを用いた、ほぼ同一のプロトコルの臨床研究が開始されており、3 名に施行されている。

## 2. 遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議概要

### 1) 事前の意見・照会事項及びその回答

作業委員会会合の開催に先立ち、各委員より申請者に対して、平成 23 年 11 月 28 日に遺伝子治療臨床研究実施計画申請書等に係る意見・照会事項を送付し、同 12 月 22 日に申請者よりそれに対する回答を得た。主な意見・照会事項及び回答の概要は以下の通りである。

(作業委員会委員からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答)

ア. 本研究で使用予定のレトロウイルスベクターは、ゲノム中への遺伝子挿入に関しては、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ない。

米国等でその可能性がより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るが、本研究でレンチウイルスベクターを用いない理由を説明すること。

【回答】レンチウイルスベクターが安全であるという証拠は未だない。今後、米国の研究者ととも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、レンチウイルスベクターの安全性等について検討していきたい。

イ. 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。

【回答】本研究の対象症例は、感染症が重度であることが条件で、また、感染症があっても 3 カ月以上生存可能な症例が対象となる。これにより、重症度は考慮されている。

ウ. 遺伝子導入効率が規格値以下だった場合、どうするのか。

【回答】規格値以下であっても、既に前処置を行っているため、患者への投与は行う。必要に応じて(前処置により骨髓機能が戻らない場合)、保存してある患者造血幹細胞を投与する。

エ. 前処置としてのブスルファンの投与量等を決めた根拠を説明すること。

【回答】造血幹細胞移植の至適投与量は、体重 1kg あたり 16mg だが、造血幹細胞遺伝子治療の至適投与量は定まっていない。本研究では、米国 NIH のプロトコル(本研究と同一プロトコル)を踏襲して、体重 1kg あたり 10mg としている。

オ. 投与細胞数の最低投与量は体重 1kg あたり  $5 \times 10^6$  で、上限は定められていないが、非臨床試験の投与量 ( $20 \times 10^6$ ) で安全性は十分検討されているか。

【回答】原発性免疫不全症に対しては比較的大量の細胞移植が行われており(症例によっては  $60 \times 10^6$  以上)、通常の造血幹細胞移植では、臍帯血あるいは骨髓細胞を  $1 \sim 3 \times 10^8$  投与されているなど、通常の医療行為で行われている範囲である。

カ、実施計画書及び患者への説明文書に、利益相反に関する記述を追記すること。

【回答】両文書へ追記した。

## 2) 作業委員会における審議

① 開催日時：平成24年1月13日(金) 14:30~15:50

### ② 議事概要：

平成23年9月29日付けで独立行政法人国立成育医療研究センターより申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画(対象疾患：慢性肉芽腫症)についての審議を行った。

まず、研究実施計画について総括責任者から説明を受けた後、説明及び提出資料を基に、委員間で実施計画の科学的妥当性等について審議を行った。

その結果、本実施計画を概ね了承することとしたが、同意説明文書における関連する臨床試験の治療効果についての記載や、同センター内に設置される適応判定委員会等に外部委員を入れる必要性について指摘事項を出すこととされ、申請者と事務局との間で整備の上、委員長の確認を得た後に、次回以降の科学技術部会に報告することとした。

なお、指摘事項は平成24年1月30日に発出され、同2月6日に申請者より回答が提出された。これらを踏まえた実施計画書等の整備については、同2月15日に委員長により了承された。指摘事項の内容及び回答の概要は以下の通りである。

(本作業委員会の指摘事項及びそれに対する回答)

ア. 患者に対して、本遺伝子治療で期待される効果をより正確に伝えることを念頭に、他の原発性免疫不全症(X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)やアダノシン・デアミナーゼ(ADA)欠損症など)を対象とした造血幹細胞遺伝子治療の臨床研究の治療効果に関して、同意説明文書への追記を再検討すること。

【回答】本遺伝子治療で期待される効果について、他の原発性免疫不全症と比較しつつ、同意説明文書に記載した。

イ. 施設内に設置される「遺伝子治療臨床研究適応判定委員会」、「遺伝子治療臨床研究評価判定委員会」に外部委員を入れることを検討すること。

【回答】「遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会」を設置することとし、外部委員を入れることとした。

## 3) その他(レトロウイルスベクターの安全性についての見解)

レトロウイルスベクターによる白血病の可能性は、造血幹細胞遺伝子治療で危惧されている重要な安全性の問題である。そこで本研究課題におけるレトロウイルスベクターの使用について、特に作業委員会の現時点での見解をまとめることとした。見解は、以下の通りである。

① レトロウイルスベクターを使った造血幹細胞遺伝子治療の問題点

レトロウイルスベクターは 1990 年に米国で世界最初の遺伝子治療として行われた ADA 欠損症の治療以来、これまでに 300 以上の臨床プロトコルで使われている。特に、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ルでは遺伝子治療の有効性が確認されている。しかし、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たことが報告されている。これらの症例についての検証結果から、以下の点が明らかになっている。

- 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癌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-SCID や Wiscott-Aldrich) か、発現効率の高い 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、レトロウイルスベクターによるがん化の機構については未だ不明な点も多く、染色体に組み込まれるベクターの特性として、がん化の可能性を完全に無くすことは難しいと考えられている。また、ベクターや *ex vivo* で遺伝子導入された細胞を用いた造腫瘍性試験等ががん化のリスクをあらかじめ予測することも困難とされている。レトロウイルスベクターを使った臨床研究では、細胞のクローン性増殖の検出が重要であり、クローン性の増殖の確認にはゲノム解析が必須となっている。さらに 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。

## ② 欧米での造血幹細胞遺伝子治療の状況

遺伝子治療により白血病を発症した 9 人の患者については、1 人を除き白血病の治療が有効で、結果としては免疫不全も白血病も治療されている。これらの結果から、欧米では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、白血病のリスクがあっても造血幹細胞遺伝子治療を積極的に行うべきであると考えられている。イタリアでは大手製薬企業 (GSK 社) により、レトロウイルスベクターを使った ADA 欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療の治験が開始されている。

一方で、より安全なベクターの開発研究も進められている。挿入部位近傍の遺伝子発現に影響を与えないような SIN 型レトロウイルスベクターや、染色体の挿入部位が異なる HIV 由来のレンチウイルスベクターを使った免疫不全症の遺伝子治療が開始されている。しかし、これらの新型ベクターの有効性と安全性の評価には数年かかると考えられる。

## ③ CGD の遺伝子治療

造血幹細胞遺伝子治療の方法が確立した 2000 年以降、13 例の CGD の遺伝子治療が行われている。ドイツ及びスイスで行われた SFFV ベクターを用いた 4 人に対

する治療では、感染症の改善だけでなく長期に渡る遺伝子導入細胞及び機能を回復した白血球の出現が確認されている。しかし、3人で骨髄異形成症候群（MDS）の発症が報告されている（治療効果あり、予防効果あり、副作用あり）。一方、米国で行われた通常のレトロウイルスベクターを使った3人に対する治療では、遺伝子治療実施後短期での感染症は軽快がみられているが、長期での遺伝子の安定的な発現が確認できていない。しかし、MDSや白血病の発症は起きていない（治療効果あり、予防効果不明、副作用なし）。両者の違いはベクターの違いによるもので、強力なプロモーターをもつ SFFV ベクターでは長期に渡る有効性が期待できる反面、細胞の異常増殖の可能性も増加すると考えられている。これらはいずれも少数例での知見であり、有効性と安全性の評価にはさらに多くの症例の蓄積が必要である。韓国では独自に開発したレトロウイルスベクターを使った CGD の遺伝子治療が行われている。現在、欧米では HIV 由来レンチウイルスベクターを使った CGD の治療が計画されている。これらの動向についても注視する必要がある。

### 3. 遺伝子治療臨床研究作業委員会の検討結果

独立行政法人国立成育医療研究センターから申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：慢性肉芽腫症）に関して、遺伝子治療臨床研究作業委員会は、主として科学的観点から以上のとおり論点整理を進めた。その結果は、以下の通りである。

- 骨髄移植が実施できない重篤な 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。今回、計画されている遺伝子治療臨床研究は、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ルであり、我が国において進めることに問題はない。患者及び家族の十分な理解を得たうえで本遺伝子治療臨床研究を実施することは Risk/Benefit の観点からも CGD 患者にとって有益であると考えられる。
- ベクターは、米国の臨床研究で造血系異常が起きていない MFSGsp91 を、米国 NIH との共同研究として使うことになっている。一部は米国 BioReliance 社から供与されるが、さらに国内のタカラバイオ株式会社と共同で高力価のベクター上清の製造を試みている。両社ともに GMP レベルのレトロウイルスベクター生産の実績があり、増殖性ウイルス（RCR）混入否定試験も含め、品質管理の面では問題がないと考えられる。
- 理論的には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は、是非国内でも基礎研究を進めるべきであるが、現時点では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る。基礎研究と平行して、現時点で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と考えられる。
- 日本の遺伝子治療臨床研究は欧米に比較して大きく遅れている。特に、造血幹細胞遺伝子治療は 2002 年の ADA 欠損症の治療以来行われていない。将来的に、新

型ベクターを使った国際共同臨床研究に参加するためにも、我が国でも造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実績を積み重ねておくことは重要である。

- 研究チームは2002年のADA欠損症の造血幹細胞遺伝子治療臨床研究にも参加したレトロウイルスベクターの研究者や免疫不全症の専門家で構成されており、レトロウイルスベクターによる有害事象に対しても適切に対応できる体制が整備されていると考えられる。

以上の結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた上で、本作業委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

次回以降の科学技術部会に報告する。



厚生科学審議会科学技術部会  
 遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員名簿

【 国立成育医療研究センター 】

「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」

氏名	所属
あらと てるよ 荒戸 照世	(独) 医薬品医療機器総合機構 レギュラトリーサイエンス推進部 研修課長
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
だに けんざぶろう 谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
なす やすとち 那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
みずぐち ひろゆき 水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

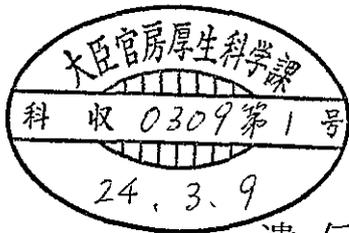
○

疾患専門

ののやま しげあき 野々山 憲章	防衛医科大学校 小児科学講座教授
---------------------	------------------

○ : 委員長 (五十音順 敬称略)





遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 23 年 9 月 29 日

(一部修正) 平成 24 年 2 月 6 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



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



# 遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成23年9月29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	
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 西病棟及び無菌治療室 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
	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				
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="845 414 1157 459">審査委員会の長の職名</td> <td data-bbox="1165 414 1372 459">氏名</td> </tr> <tr> <td data-bbox="845 459 1157 515">東京慈恵会医科大学教授</td> <td data-bbox="1165 459 1372 515">大橋 正</td> </tr> </table>	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 正
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 正				



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<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> 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 (臨床検査の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 (<math>O_2^-</math>, <math>H_2O_2</math>, <math>ClO^-</math> 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<sup>phox</sup> 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-<math>\gamma</math>) 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 60% 程度に低下し、この値は小児非腫瘍性疾患に対する臍帯血移植の成績 (<math>51 \pm 8\%</math>) 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 と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"> <li>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。</li> </ol>	

	<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なされてはいるが、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/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<sup>phox</sup> 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 10<math>\mu</math>g 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 ClinimACS 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 1.0~5.0x10<sup>5</sup>/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<math>^{\circ}</math>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、エンドトキシン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="446 1825 1276 2004"> <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、エンドトキシン試験を行い、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レトロ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 由来レトロウイルスベクター) とは異なりマウスにおいて急性白血病を発症し、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 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<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> を獲得する。gp91<sup>phox</sup> は前述のように細胞膜表面で p22<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> を過剰発現させても過剰な p22<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> 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>びに周囲からのウイルス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"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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、その安全性は確認されていること。</li> <li>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、「安全性を鑑みるとき 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。</li> <li>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。</li> </ol>
<p>実施計画</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> <li>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"> <li>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。</li> <li>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、実施可能かの適応判定を行う。</li> <li>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。</li> </ol> </li> <li>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"> <li>1) 選定基準           <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 遺伝子検査にて gp91<sup>phox</sup> に異常のある X 連鎖慢性肉芽腫症と診断された男性</li> <li>・ 3 歳以上、体重 10kg 以上の症例</li> <li>・ 体重 1kg あたり <math>5 \times 10^6</math> 個の CD34 陽性細胞が採取可能な症例</li> <li>・ 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</li> <li>・ 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 <math>2 \times 10^7</math> 個 (CD34 陽性細胞として <math>1.5 \times 10^5</math> 個) 以上の移植ドナーが見つからない症例</li> <li>・ 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</li> </ul> </li> </ol> </li> </ol>

- ・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

遺伝子治療が適当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。実施が適当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。

- ・ 無菌性及びエンドトキシンがないことを確認した後、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  $5 \times 10^6$  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、 $\beta$ -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)
- ・ 特殊検査 (遺伝子治療関連の検査) gp91<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> の定量 PCR、

RCR 出現検査 (Env PCR)

6. 予想される有害事象

1) 薬剤や手技に関する有害事象

- ・ 遺伝子導入細胞：投与する細胞が体外で培養されているため、特に、試薬によるアレルギー反応（かゆみ、発疹、発熱）がある。
- ・ 造血幹細胞採取時：採血部位の出血や感染症。また、細胞採取時の全身倦怠感、手足のしびれ、めまい、吐き気、嘔吐
- ・ G-CSF：関節痛や筋肉痛などの全身の痛み、発疹、吐き気、嘔吐、頭痛、食思不振など。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、血圧の低下、心筋梗塞、脳血管障害、脾臓の破裂など
- ・ プスルファン：けいれんと吐き気が起こるため、プスルファンを複数回にわけてゆっくりと点滴し、また、抗痙れん剤（クロナゼパム）や吐き気止め（グラニセトロン）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、これらに対しては輸血、血小板輸注を含めて対処する。また、肝機能障害や生殖細胞への影響も報告されている。

2) 投与した造血幹細胞が生着しない場合

プスルファ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入造血幹細胞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を輸注する。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、緊急処置として臍帯血移植（HLA 一致 4/6 以下のドナー）からの造血幹細胞移植も考慮する。

3) レトロウイルスベクターの危険性

今回使用し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）が出現する可能性は極めて低いが、定期的に PCR 等にて RCR の存在を確認し、もし、確認されたら詳細な検査の下、抗ウイルス剤等を使用する。

今回使用し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否定できない。実際、下記に示すように、SCID-X1 やウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）のように T 細胞が欠損しているか、機能異常を示す症例ならびにドイツ・スイスでの肉芽腫症で見られたように SFV のような強力な LTR を有するレトロウイルスベクターを使用した場合に造血系異常が発症している。

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	1	1/10

本研究で使用するレトロウイルスベクターは MoMLV 由来のレトロウイルスベクターであり、同一のベクターを使用したアメリカ CGD の臨床研究で、5 年を越えた現時点でも一例の造血系異常を発症していない。このようなことから、本遺伝子治療臨床研究で造血系異常が発症する危険性は低いと思われるが、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幹細胞移植も考慮する。

4) 遺伝子治療の効果がなく、免疫系が回復しない場合

抗生剤、抗真菌剤、インターフェロン・ガンマ等の現行の治療を継続する。ただ、感染症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する。なお、このような場合でも、再度、遺伝子治療を繰り返し行うことはしない。

5) 子孫への影響

今回使用するレトロウイルスベクターが生殖細胞に感染（垂直感染）することはないと思われるが、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

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。

本遺伝子治療臨床研究で使用される MGFS-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、白血病等の造血系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する。

(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<sup>phox</sup> 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)

	登録前		造血幹細胞採取						退院 (日)	前処置		投与		投与直後検査							短期的観察		長期的観察			
	登録前	退院前	C日	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日目	0日	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	2週間目	3-8週間目	9-12ヵ月目 (1ヵ月毎)	13-60ヵ月 (3ヵ月毎)
外来	○	○	△*	[黒塗り]							治療のために、中心静脈のカテーテルを挿入します。								△*	△*	○					
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		○*2																						●5ヵ月と 12ヵ月後	●1年毎	●1年毎
血液検査	血液一般検査	○*2								○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	生化学検査(免疫学的検査含む)	○*2								○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	感染症の検査*4	○*2																				○	○	○	○	○
	特殊検査*5	○*2																					●8週間目	●3ヵ月毎	●6ヵ月毎	●1年毎
尿検査	○*2									○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
CT画像検査	○*2	○							○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●3ヵ月毎	●1年毎	●1年毎
G-CSF投与			○	○	○	○	○																			
造血幹細胞採取								○	○																	
ブスルファンの点滴									○	○	○															
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、肺機能検査、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-Dグルカン、ブラデリアアスペルギルス抗原、カンジダ抗原)

\*5:特殊検査(末梢好中球CD116検査、β2ミクログロブリン産生能検査)・移植した血液のふるまいをみる検査

※退院後治療の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へ受診していただきます。その以外に、かかりつけの病院で検査をすることもできます。

# 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 24 年 2 月 6 日 第五版)

(平成 23 年 12 月 21 日 第四版)

(平成 23 年 9 月 9 日 第三版)

(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	- 18
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	- 20
6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造	- 20
6-1-1-1. ヒト CYBB 遺伝子	- 20
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	- 23
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	- 23
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	- 23

6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	- 24
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	- 24
6-4-2. ウイルスベクターの作製方法	- 25
6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造	- 27
6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴	- 27
7. 安全性についての評価	
7-1. 遺伝子導入方法の安全性	- 29
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	- 29
7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性	- 33
7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性	- 33
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	- 34
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	- 34
7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性	- 34
7-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	- 35
7-1-8. 癌原性の問題	- 35
7-2. 遺伝子産物の安全性	- 36
7-3. 細胞の安全性	- 36
7-3-1. 培養細胞の純度	- 36
7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	- 36
7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性	- 37
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	- 38
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	- 40
9-2. 被験者の選定基準及び除外基準	- 40
9-2-1. 被験者の選定基準	- 41
9-2-2. 被験者の除外基準	- 41
9-3. 本遺伝子治療臨床研究に関連する各委員会	- 41
9-3-1. 遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会	- 42
9-3-2. 遺伝子治療臨床研究審査委員会	- 42
9-4. 被験者の同意の取得法	- 42
9-4-1. 被験者と家族への心理的支援	- 43

9-5. 実施期間及び目標症例数	- 44
9-6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	- 44
9-6-1. 対照群の設定	- 44
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）	- 44
9-6-2-1. 無菌性の確保	- 44
9-6-2-2. ベクターの入手先及び保存法	- 44
9-6-2-3. 被験者からの末梢血 CD34 陽性細胞の採取	- 45
9-6-2-4. 標的細胞への遺伝子導入	- 45
9-6-2-5. 遺伝子導入細胞の患者への投与	- 46
9-6-3. 前処置及び併用療法の有無	- 46
9-6-4. 治療中の観察項目及び臨床研究項目	- 47
9-6-5. 有害事象ならびにその対処方法	- 48
9-6-5-1. 有害事象の定義	- 48
9-6-5-2. 有害事象発症時の対応	- 49
9-6-5-3. 予想される有害事象とその対処法	- 49
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	- 52
9-6-6-1. 遺伝子治療臨床研究の評価方法と評価基準	- 52
9-6-6-2. 中止判定基準	- 52
9-6-6-2-1. 症例の中止判定基準	- 52
9-6-6-2-2. 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準	- 53
9-6-7. 症例記録に関する記録用紙の様式	- 53
9-6-8. 記録の保存及び成績の公表方法	- 53
10. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報について	
10-1-1. 個人情報の定義	- 54
10-1-2. 個人情報の利用目的の特定及び利用目的の通知	- 54
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	- 54
10-2-1. 個人情報の正確性の確保	- 54
10-2-2. 安全管理処置	- 54
10-2-3. 第三者への提供の制限	- 55
10-2-4. 開示	- 55
10-2-5. 訂正について	- 55
10-2-6. 利用停止について	- 55
10-2-7. 開示、訂正、利用停止等ができない場合の理由説明	- 56

10-2-8. 参照、質問	- 56
11. 利益相反に関して	- 56
12. 参考文献	- 57
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

## 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

小野寺 雅史

国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝研究部・部長

遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、実施計画書の作成及び実施施設長への提出、遺伝子治療臨床研究の適正実施の確認、遺伝子治療臨床研究の進行状況及び研究結果の実施施設長及び審査委員会への報告

### 2-2 副総括責任者の氏名及びその担当する役割

奥山 虎之

国立成育医療研究センター病院・臨床検査部・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・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性及び倫理性の検討、患者の選定基準の作成、遺伝カウンセリング

### 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

氏名	所属	役職	役割
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 俊尚	国立成育医療研究センター・研究所・成育遺伝研究部	室長	遺伝子治療臨床研究に必要な病棟体制の整備・患者診察
熊谷 昌明	国立成育医療研究センター・病院・血液腫瘍科	医長	患者造血幹細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与
森 鉄也	国立成育医療研究センター・病院・血液腫瘍科	医長	患者造血幹細胞の採取と遺伝子導入細胞の投与
清河 信敬	国立成育医療研究センター・研究所・小児血液腫瘍研究部	部長	治療遺伝子導入法の検討
利井 康	国立成育医療研究センター・研究所・RI管理室	室長	遺伝子導入細胞の解析、遺伝子導入効率及び挿入部位の検討
瀧本 哲也	国立成育医療研究センター・臨床研究センター・臨床研究推進室	室長	臨床データの管理

掛井 直子	国立成育医療研究センター・研究所・成育保険政策科学研究室	室長	遺伝子治療臨床研究の倫理性と個人情報保護の管理及び評価の実施
土田 尚	国立成育医療研究センター・病院・総合診療部	医師	遺伝子治療臨床研究に関する文書作成と情報収集
加藤 俊一	東海大医学部・基盤診療学系・再生医療科学	教授	患者選定、造血幹細胞の指導
有賀 正	北海道大学大学院医学研究科・小児科分野	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・生殖発達医学講座・小児科分野	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・生殖発達医学講座・小児科分野	助教	患者管理
久米 晃啓	自治医科大学・分子病態治療研究センター・遺伝子治療研究部	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・幹細胞治療センター	准教授	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

## 2-4 海外共同研究者

本遺伝子治療臨床研究は、米国国立衛生研究所・国立アレルギー・感染症部門・宿主防御研究室 (Laboratory of Host Defenses, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health) の Malech 博士 (Dr. Harry L. Malech)、Kang 博士 (Dr. Elizabeth Kang)、及び過去に同様の遺伝子治療臨床研究を行った実績のあるドイツ Georg-Speyer-Haus 生物研究所の Grez 博士 (Dr. Manuel Grez)、スイス Zurich 大学小児病院の Seger 博士 (Dr. Reinhard Seger)、英国小児保健研究所の Thrasher 博士 (Dr. Adrian J. Thrasher) より多くの有益な情報を得て行うものである。なお、本研究で使用されるレトロウイルスベクターは、NIH の Malech 博士より供与されるため、同博士の本研究に対する同意書を添付する (同意書を別添 3 に示す)。

### 3 遺伝子治療臨床研究実施施設の名称及びその所在地

名称：国立成育医療研究センター病院及び研究所

所在地：東京都世田谷区大蔵 2-10-1 〒157-8535

電話：03-3416-0181 FAX：03-3416-2222

## 4 遺伝子治療臨床研究の目的

本遺伝子治療臨床研究の目的は、造血幹細胞移植の実施が困難な重症の慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) のうち、特に CGD としては最も症例数が多い NADPH オキシダーゼ酵素複合体の構成タンパク質 gp91<sup>phox</sup> に変異にある 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<sup>phox</sup> をコードするヒト cytochrome b245 beta polypeptide (CYBB) 遺伝子 (NM\_000397) を患者由来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) を別添 7 に基づいて評価する。なお、PCR 法やフローサイトメトリ法を用いた患者体内での遺伝子導入細胞の動態やクロナリティーの変動なども同時に解析する。

## 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

CYBB 遺伝子 (gp91<sup>phox</sup>) に変異を持つ X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-CGD)

### 5-2 対象疾患に関する現時点での知見

#### 5-2-1 慢性肉芽腫症の病因と頻度

CGD は、乳幼児期より重篤な細菌性あるいは真菌性感染症を反復罹患し、諸臓器に肉芽腫を形成する先天性免疫不全症候群の一疾患である<sup>1-4</sup>。

好中球をはじめとする食細胞は、活性酸素種 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ClO<sup>-</sup>など) を産生し、体外から侵入してきた細菌や異物を殺菌する機構を有している。この活性酸素産生を担う主要な分子が NADPH オキシダーゼ酵素複合体であり、本酵素は細胞膜上の gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup> のヘテロ 2 量体と、細胞質内の p67<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、Rac p21 より構成されている<sup>5-7</sup>。

CGD はこれらのうち gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup> の 4 分子のいずれかが先天的に機能していないため、活性酸素を産生できず、体内に侵入した微生物を殺菌することができないことにより発症する<sup>8,9</sup>。特に、ブドウ球菌、クレブシエラ菌、大腸菌、カンジダ、アスペルギルスなどの過酸化水素非産生・カタラーゼ陽性菌を殺菌することができないため、乳幼児期から細菌や真菌による全身性難治性感染症を反復し、しばしば致命的経過をとる<sup>6</sup>。

わが国の先天性免疫不全症の患者数は、CGD が最も多く、約 18% を占める (平成 18 年度厚生労働省原発性免疫不全症候群研究班)。CGD の発症頻度は 22.5 万出生に 1 人程度であり<sup>10</sup>、国内では 2006 年 12 月現在、200 家系以上、270 名以上が登録されている。男女比はおよそ 6.9:1 で、国内の分布には地域による偏りはない。日本人の病型別の患者割合を見ると X 連鎖遺伝の gp91<sup>phox</sup> 欠損型 (X-CGD) が 79.7% と最も多く、常染色体劣性遺伝の 3 病型は p22<sup>phox</sup> 欠損型 (8.3%)、p67<sup>phox</sup> 欠損型 (6.3%)、p47<sup>phox</sup> 欠損型 (5.7%) であり、諸外国に比べて p47<sup>phox</sup> 欠損型が少ない。病型の違いによって重症度が異なることが報告されており<sup>11,12</sup>、米国では gp91<sup>phox</sup> 欠損型が常染色体劣性遺伝型の 3 病型に比べて死亡率が高かったとの報告がある<sup>10,13</sup>。また、国内でも、gp91<sup>phox</sup> 欠損型が最も重症のようである。

gp91<sup>phox</sup> 欠損型は X 連鎖遺伝のため患者の大部分は男性である。多くはその

母親がヘテロ接合体の保因者であるが、両親とも変異を持たず子に新規変異が生じる場合もある。保因者の末梢血食細胞は、正常食細胞と異常食細胞が混在するモザイクを呈するが、その程度は X 染色体の不活化の程度により個人差がある。ただ、正常食細胞が全体の 5%以上存在すれば、感染症が重症化しにくいことが明らかにされている<sup>14</sup>。また、これまでに行われた国内の X-CGD の遺伝子変異の解析結果によると、ナンセンス変異 24 例、ミスセンス変異 12 例、スプライス部位変異 17 例、欠失 10 例、挿入 7 例であり、特に変異が集積する hot spot は存在せず、変異は翻訳領域全体に散在している。なお、同一変異であっても生活環境により重症度は異なる<sup>15</sup>。

### 5-2-2 慢性肉芽腫症の症状と経過

CGD の一般的な症状として、乳幼児期より繰り返す全身諸臓器の難治性細菌・真菌感染症が上げられている。細菌性感染症としては、化膿性皮膚炎、リンパ節炎、肺炎、中耳炎、肛門周囲膿瘍などがよくみられ、感染症が重症化・遷延化し、抗生物質の多剤併用療法により入院期間が長期化する<sup>16</sup>。一方、真菌による感染症としては肺アスペルギルス感染症が最も多く、多種の抗真菌剤を用いても改善しない場合は致命的経過をとる<sup>6</sup>。一方、軽症例では、10 歳を越えてから肝膿瘍などを契機に初めて CGD と診断される場合がある。

他の特徴として、諸臓器に形成される肉芽腫性病変がある。肺や消化管、肝臓などに多くみられ、ときに頭蓋内にもみられる<sup>17</sup>。肉芽腫形成の詳細な機序は不明だが、一般には細菌などを貪食した好中球を周囲の単球が処理できず、単球の活性化状態が持続し、多種のサイトカインが放出されることで周囲の炎症細胞が集結し、結果、肉芽腫を形成していくと考えられる。肉芽腫性病変は内科的治療だけでは改善しないことが多く、外科的切除の対象になることもある。消化管に肉芽腫が形成されると通過障害をきたす。また、CGD 腸炎では腸管の粘膜下組織に非乾酪性肉芽腫を形成し、クローン病様症状を呈する<sup>18</sup>。McLeod 症候群は、gp91<sup>phox</sup> 遺伝子と隣接遺伝子の XK や RP3 を共に欠失しており、有棘赤血球症や網膜色素変性症を合併する<sup>19</sup>。

X-CGD 患者に抗生物質の予防投与を行わない場合、患者一人あたりの重症感染症罹患回数は平均年 2 回であり<sup>20</sup>、こうした罹患頻度の高さからこれまでの国内 X-CGD 患者の多くは敗血症やアスペルギルス感染症により 30 歳までに死亡していた<sup>21</sup>。しかし、最近は新たな抗生物質や抗真菌剤が開発され、30 歳を越え延命する患者もみられている<sup>21</sup>。

### 5-2-3 従来の治療法

CGD 治療の基本的方針として、合併する感染症のコントロールが上げられる。その治療方針としては、抗生物質や抗真菌剤といった抗菌療法が主体となり、大きく対処療法と予防投薬に分けられる。対処療法に関しては、近年、効力のある抗生物質や抗真菌剤（ミカファンギンやボリコナゾール）が開発され、従来は治療困難であった感染症も軽快する例が増えてきた。ただ、X-CGD の場合、一旦、感染症に罹患すると重症化し多剤併用療法を必要とすることが多く、入院期間も長期化しやすい。このため CGD では、日常の感染予防が重要であり、現在はトリメトプリム/スルファメトキサゾール（ST 合剤）やイトラコナゾールなどの予防投薬を行う場合が多い<sup>22-24</sup>。抗菌剤投与以外の感染症予防としては、インターフェロン・ガンマ（IFN- $\gamma$ ）投与が上げられる<sup>25-27</sup>。IFN- $\gamma$  は、約 3 分の 1 の症例で重症感染症に対する予防効果があると報告され<sup>23,28</sup>、国内患者の約 4 割に投与されている。ただ、これら抗菌剤や IFN- $\gamma$  の投与を行っても、重症感染症や合併症による年間死亡率は 2~5%<sup>10</sup>であり、国内でも毎年死亡例が報告されている<sup>21</sup>。

CGD は造血幹細胞を起源とする食細胞の機能異常であるため、造血幹細胞移植により根治が可能である。ただ、CGD の場合、患者 T 細胞機能が正常であるため強力な前処置が必要で、たとえ HLA 一致幹細胞移植を行っても、移植関連合併症が発症しやすく、治療成績は他の重症複合免疫不全症（SCID）と比べて不良である<sup>29,30</sup>。また、移植医療を受ける患者の多くは活動性の感染症を罹患しており、前処置を含む移植治療によりその感染症が増悪する危険性もある。欧州、米国、我が国の CGD に対する造血幹細胞移植のまとめを別添 8 に示すが、スイスの Segar らは、欧州において CGD 患者 27 名に対し、主にブスルファン（Bu）とシクロフォスファミド（Cy）を前処置とした造血幹細胞移植を行い、移植関連の死亡が 4 名で、特に、移植時に活動性感染症を罹患している症例では危険度が高いと報告している（別添 12）<sup>31</sup>。また、米国では 10 名の CGD 患者に対し、Cy、フルダラビン（Flu）、抗胸腺細胞グロブリン（ATG）を前処置とした T 細胞除去 HLA 一致ドナーからの末梢血幹細胞移植が行われ、10 名中 3 名の死亡例が確認され、1 名は生着不全をきたしている<sup>32</sup>。

我が国では 2008 年までに、34 名の患者に対し 38 回の幹細胞移植が行われた。その内訳は、下記の表に示すように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、末梢血由来が 4 例で、HLA 完全一致例が 24 例、5/6 一致例が 8 例、4/6 一致以下で 6 例であった。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移植では、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 一致例)、治療成績は 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)。

HLA	血縁									非血縁									計
	6/6			5/6			4/6 以下			6/6			5/6			4/6 以下			
ソース	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	
症例数	12	1	2	2	0	1	4	0	1	8	1	0	1	4	0	0	1	0	38
死亡例	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7
拒絶例	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
生着 (%)	92	0	50	50	0	0	25	0	0	100	0	0	100	75	0	0	100	0	71

HLA	6/6			5/6			4/6 以下			計
ソース	BM	CB	PB	BM	CB	PB	BM	CB	PB	
症例数	20	2	2	3	4	1	4	1	1	38
死亡例	1	1	1	1	1	0	1	0	1	7
拒絶例	0	1	0	0	0	1	2	0	0	4
生着 (%)	95	0	50	67	75	0	25	100	0	71

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、少なくとも HLA が 5/6 以上一致するドナーからの移植が望ましい。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ある。ただ、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。

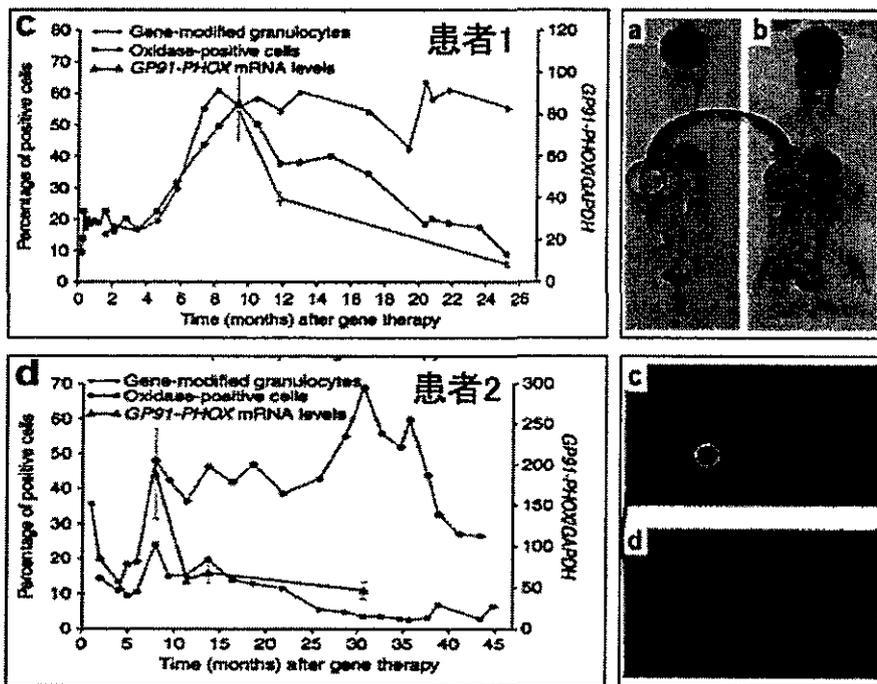
### 5-3 本遺伝子治療臨床研究の背景と概要

前述のように CGD に対する根治療法は、HLA が一致した造血幹細胞移植のみであるが、ドナーの関係からこの移植医療を受けられない症例は全体の 3 割で、また、たとえ適当なドナーが存在したとしても、移植のための前処置に耐えられない程の重篤な感染症に罹患している患者も多く、幹細胞移植が、現時点で CGD に対する最適な治療法とは言い難い。このようなことから、CGD は遺伝子治療開始当初より造血幹細胞遺伝子治療の最適な対象疾患と考えられていた。

1995 年、世界初の CGD に対する遺伝子治療臨床研究が、米国国立衛生研究所の Malech 博士らによって報告された (別添 10)。対象は、NADPH オキシダーゼ酵素の p47<sup>phox</sup> が欠損した症例で、遺伝子導入細胞として患者末梢血造血幹細胞が使用された。その後も、本研究の対象疾患である gp91<sup>phox</sup> 欠損型 CGD (X-CGD) に対しても行われた

が、その治療効果は短期間（6ヶ月以下）であり、長期的な治療効果を示すには至らなかった。これは、これは、患者骨髄腔がもともと存在する患者骨髄細胞で満たされているため、投与された遺伝子導入細胞の生着する空間が確保されていないことが原因と考えられた。

このことを実証したのが、2003年、ドイツの Grez 博士らが行った造血幹細胞遺伝子治療であり、この中で、同博士は難治性感染症があり、適当な移植ドナーのみつからない2名の X-CGD 患者に対して、体重 1kg あたり 8mg のブスルファンを投与前処置として投与し、その後に遺伝子導入細胞を投与した（別添 11）<sup>33</sup>。その結果、下図のように骨髄への生着率が増加し、患者体内で活性酸素産生好中球（正常遺伝子が機能している好中球）が全好中球の 10～57%を占め、臨床的にも肝膿瘍や肺アスペルギルス症が軽快した。



また、スイスで行われた同一の遺伝子治療においても、肉芽腫による脊髄圧迫が軽減し、患者が歩行可能になったと報告されている（Seeger 博士 私信）。同様に 2006 年から 2007 年にかけて、Malech 博士（米国）や Kim 博士（韓国）らもブスルファンを前処置とする遺伝子治療臨床研究を行った。Grez 博士のような高い活性酸素産生好中球数は得られなかったものの、臨床的にはブドウ球菌による肝膿瘍の縮小など一定の治療効果が確認された（両博士からの私信）。

これら結果を受け、本遺伝子治療臨床研究でも、レトロウイルスベクターを用いた患者造血幹細胞への CYBB 遺伝子導入と、前処置としてのブスルファン投与を遺

伝子導入細胞投与前に患者に対して行う。なお、投与量は同一レトロウイルス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。詳細は後述するが、本研究では、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) にて末梢血中に誘導した造血幹細胞を患者から回収し、生体外でレトロウイルスベクターを用いて CYBB 遺伝子を造血幹細胞に導入して、あらかじめブスルファン投与された患者に対し、これら遺伝子導入細胞を静脈内より輸注する。

#### 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

CGD は、重篤な細菌・真菌感染症を反復罹患し、青年期までにその多くの患者が死亡する予後不良な疾患である。患者の一部には軽症例も見受けられるが、特に本遺伝子治療臨床研究が対象とする gp91<sup>phox</sup> 欠損型の X-CGD は、幼児期より重症感染症を反復するため、早期に根治療法を実施することが望ましい<sup>4</sup>。

近年は、治療効果が増強した抗生物質や抗真菌剤が開発され、重症感染症に対しても一定の治療成績を上げつつあるが、完全に感染症を沈静化することは困難である。また、IFN- $\gamma$  や顆粒球輸血も限定的な治療効果しかもたらしていないこともあり、現時点で確立された根治療法は同種造血幹細胞移植のみである<sup>34</sup>。

しかし、同種造血幹細胞移植であっても、適当な移植ドナーの不足により全症例へ移植医療を実施することは困難であり、さらに、移植に関連した原因で死亡する例も少なくなく、いまだ移植医療が安全な治療法とは言い難い。特に、CGD の場合、移植時に難治性感染症に罹患している場合が多く、また、肝、腎、肺機能に障害のある症例も多いことから、同種造血幹細胞移植のリスクは他の疾患と比べて大きい<sup>35</sup>。

一方、遺伝子治療でも遺伝子導入細胞の生着のためにブスルファンなどの前処置を必要とするが、その量は、同種造血幹細胞移植に比べて少量であり、また、移植後に免疫抑制剤を使用しないため、造血能回復までの日数の短縮が期待できる。さらに、患者自身の造血幹細胞を用いるため、移植片対宿主病 (GVHD) 発症の危険性も回避できる。このようなことから、ドナー不在あるいは全身状態不良など、なんからの理由で移植の実施が困難であり、かつ、重篤な感染症のため生命の危機にある CGD 患者にとって、本遺伝子治療臨床研究における造血幹細胞遺伝子治療は意義のある治療法と言える。ただ、過去の遺伝子治療において発症した造血系異常などの有害事象を考えると、その実施は患者の利益と危険を十分に検討した上で慎重に決定されなければならない。たとえ、今回使用するベクターではそのような有害事象が報告されていなくとも、実施に際しては注意深い経過観察が求められる。

以上の点をふまえ、下記の理由により X-CGD に対する遺伝子治療は実施するに値すると判断した。

- X-CGD は単一遺伝性疾患であり、その病態が分子レベルで十分に解明されていること。
- 現時点で確立されている根治療法は同種幹細胞移植であるが、実施困難な症例も多く、また、適応になったとしてもその危険性は小さくないこと。
- 治療遺伝子を導入するヒト造血幹細胞の採取法、ならびにこれら細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法はすでに確立していること。
- 治療遺伝子 (CYBB 遺伝子) 導入により機能が回復した患者食細胞が、全好中球の 10%程度あれば、重症感染症に対する治療効果が見込まれること。
- 本遺伝子治療臨床研究で使用されるベクターの過去の事例 (トレーサビリティ) を勘案したとき、有害事象である白血病の発症の危険性は決して高くないこと。

## 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

本遺伝子治療臨床研究においてヒトに導入する遺伝子は、ヒト CYBB 遺伝子である。この導入遺伝子は gp91<sup>phox</sup> タンパク質をコードしている。

なお、導入されるが発現しないベクターDNAなどの構造と性質は、6-4の「ウイルスベクターを用いた遺伝子導入」の項で述べられる。

#### 6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造

##### 6-1-1-1. ヒト CYBB 遺伝子

ヒト CYBB 遺伝子は、1986年、Orkinらによって初めて単離された遺伝子であり、この遺伝子は、4339塩基対 (bp) の糖タンパク質である gp91<sup>phox</sup> をコードしており<sup>36</sup>、翻訳開始コドン ATG の上流にある 61 bp の非翻訳領域のほか、570 アミノ酸をコードする 1710 bp と TAA を終止コドンとする 1713 bp によりなっている。その位置は X 染色体短腕 (Xp21.1) にあり、大きさは 33.5kb である (GenBank NM\_000397)。

本遺伝子治療臨床研究において、ベクターに組込まれるのは gp91<sup>phox</sup> の open reading frame (ORF) の 1713 bp とベクター挿入の際に加えられた人工的な配列の合計 1723 bp である。次頁に CYBB 遺伝子の塩基配列ならびにベクターに挿入される CYBB 遺伝子の模式図を示す。なお、ベクターの全 DNA 塩基配列上 (別添 5)、2278~3990 bp に相当する塩基対がヒト CYBB 遺伝子の領域である。

CYBB がコードする gp91<sup>phox</sup> のアミノ酸配列

ATGGGGAAGTGGGCTGTGAATGAGGGGCTCTCCATTTTTGTCTTCTGGTTTGGCTGGGGTTGAACGTCCTCCTTTGTCTGGTATTACCGGGTTTATG 100  
MetGlyAsnTrpAlaValAsnGluGlyLeuSerIlePheValIleLeuValTrpLeuGlyLeuAsnValPheLeuPheValTrpTyrTyrArgValTyr

ATATTCCACCTAAGTCTTTTACACAAGAAAAGTCTTGGGTCAGCACTGGCACTGGCCAGGGCCCTGCAGCCTGCCTGAATTTCAACTGCATGCTGAT 200  
AspIleProProLysPhePheTyrThrArgLysLeuLeuGlySerAlaLeuAlaLeuAlaArgAlaProAlaAlaCysLeuAsnPheAsnCysMetLeuIle

TCTCTTGCCAGTCTGTGAAATCTGCTGCTCCTCAGGGGTTCCAGTGCCTGCTCAACAAGAGTTCGAAGACAACCTGGACAGGAATCTCACCTTT 300  
LeuLeuProValCysArgAsnLeuLeuSerPheLeuArgGlySerSerAlaCysCysSerThrArgValArgArgGlnLeuAspArgAsnLeuThrPhe

CATAAAATGGTGGCATGGATGATTGCACTTCACTCTGCGATTACACCATTCACATCTATTTAATGTGAATGGTGTGTAATGCCCGAGTCAATAATT 400  
HisLysMetValAlaTrpMetIleAlaLeuHisSerAlaIleHisThrIleAlaHisLeuPheAsnValGluTrpCysValAsnAlaArgValAsnAsn

CTGATCCTTATTAGTAGCACTCTGAACTTGGAGACAGGCAAAATGAAAGTTATCTCAATTTTGTCTGAAAGAGAATAAAGAACCTGAAAGGAGGCT 500  
SerAspProTyrSerValAlaLeuSerGluLeuGlyAspArgGlnAsnGluSerTyrLeuAsnPheAlaArgLysArgIleLysAsnProGluGlyGlyLeu

GTACCTGGCTGTGACCTGTTGGCAGGCATCACTGGAGTTGTATCAGCTGTGCTCATATTAATTACACTTCTCCACAAAACCATCCGGAGGTCT 600  
TyrLeuAlaValThrLeuLeuAlaGlyIleThrGlyValValIleThrLeuCysLeuIleLeuIleIleThrSerSerThrLysThrIleArgArgSer

TACTTTGAAGTCTTTTGGTACACATCATCTCTTTGTGATCTTCTTATTGGCCTTCCATCCATGGAGCTGAACGAATGTACGTGGGAGACCCGAG 700  
TyrPheGluValPheTrpTyrThrHisHisLeuPheValIlePhePheIleGlyLeuAlaIleHisGlyAlaGluArgIleValArgGlyGlnThrAla

AGAGTTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAACAAAAATCTCAGAATGGGAAAAATAAAGGAATGCCAATCCCTCAGTTTGTGAAACCTCC 800  
GluSerLeuAlaValHisAsnIleThrValCysGluGlnLysIleSerGluTrpGlyLysIleLysGluCysProIleProGlnPheAlaGlyAsnProPro

TATGACTTGAAATGGATAGTGGGTCCCATGTTTCTGTATCTCTGTGAGAGTTGGTGGGTTTTGGCGATCTCAACAGAAGGTGGTATCACCAGGTG 900  
MetThrTrpLysTyrIleValGlyProMetPheLeuTyrLeuCysGluArgLeuValArgPheTrpArgSerGlnGlnLysValValIleThrLysVal

GTCACCTACCCTTTCAAACCATCGAGCTACAGATGAAGAAGAGGGTTCAAATGGAAGTGGGACAATACATTTTGTCAAGTGGCCAAAGGTGTCCA 100  
ValThrHisProPheLysThrIleGluLeuGlnMetLysLysLysGlyPheLysMetGluValGlyGlnTyrIlePheValLysCysProLysValSer

AGCTGGAGTGGACCCCTTTTACACTGACATCCGCCCCCTGAGGAAGACTTCTTTAGTATCCATATCCGCATCGTTGGGGACTGGACAGAGGGGCTGTTCAA 110  
LysLeuGluTrpHisProPheThrLeuThrSerAlaProGluGluAspPhePheSerIleHisIleArgIleValGlyAspTrpThrGluGlyLeuPheAsn

TGCTTGTGGCTGTGATAAGCAGGAGTTTCAAGATGCGTGAAACTACCTAAGATAGCGGTTGATGGGCCCTTGGCACTGCCAGTGAAGATGTGTTGAGC 120  
AlaCysGlyCysAspLysGlnGluPheGlnAspAlaTrpLysLeuProLysIleAlaValAspGlyProPheGlyThrAlaSerGluAspValPheSer

TATGAGGTGGTATGTTAGTGGGAGCAGGATTGGGGTACACCCCTTCGCATCCATTCTCAAGTCAGTCTGGTACAAATATTGCAATAACGCCACCAATC 130  
TyrGluValValMetLeuValGlyAlaGlyIleGlyValThrProPheAlaSerIleLeuLysSerValTrpTyrLysTyrCysAsnAsnAlaThrAsn

TGAAGCTCAAAAAGATCTACTTCTACTGGCTGTGCCGGACACACATGCCTTTGAGTGGTTTGCAGATCTGCTGCAACTGCTGGAGAGCCAGATGCAGGA 140  
LeuLysLeuLysLysIleTyrPheTyrTrpLeuCysArgAspThrHisAlaPheGluTrpPheAlaAspLeuLeuGlnLeuLeuGluSerGlnMetGlnGlu

AAGGAACAATGCCGGCTTCTCAGCTACAACATCTACCTCACTGGCTGGGATGAGTCTCAGGCCAATCCTTTGCTGTGCACCATGATGAGGAGAAAGAT 150  
ArgAsnAsnAlaGlyPheLeuSerTyrAsnIleTyrLeuThrGlyTrpAspGluSerGlnAlaAsnHisPheAlaValHisHisAspGluGluLysAsp

GTGATCACAGGCTGAAACAAAAGACTTTGTATGGACGGCCCAACTGGGATAATGAATTCAGACAATTGCAAGTCAACACCTAATACCAGAATAGGAG 160  
ValIleThrGlyLeuLysGlnLysThrLeuTyrGlyArgProAsnTrpAspAsnGluPheLysThrIleAlaSerGlnHisProAsnThrArgIleGly

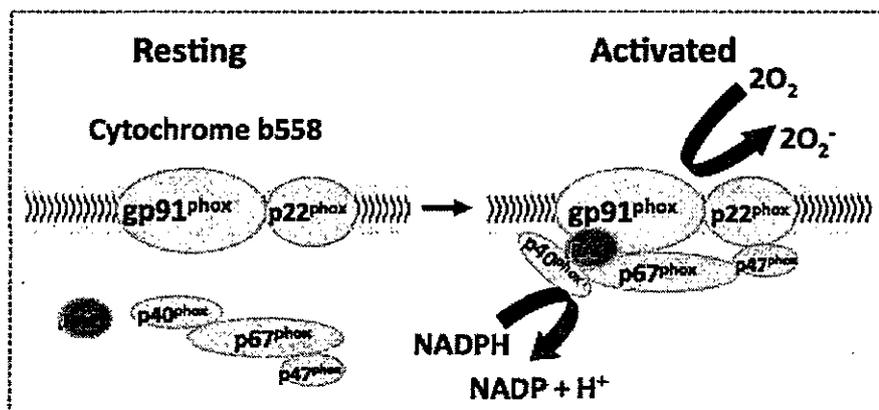
TTTTCTCTGTGGACCTGAAGCCTTGGCTGAAACCTGAGTAAACAAAGCATCTCCAACCTGAGTCTGGCCCTCGGGAGTGCATTTTCATTTCAACAA 170  
ValPheLeuCysGlyProGluAlaLeuAlaGluThrLeuSerLysGlnSerIleSerAsnSerGluSerGlyProArgGlyValHisPheIlePheAsnLys

GGAAAACCTCTAA 1713  
GluAsnPheter



## 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

導入された遺伝子 (CYBB) により発現される gp91<sup>phox</sup> は、p22<sup>phox</sup> と会合することで膜タンパク質のシトクロム b558 を構成し、また、菌体成分などの刺激により細胞質内タンパク質の p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、rac と会合して、superoxide anion の産生に関わる酵素の NADPH oxidase を生成する<sup>37</sup>。一般に休止状態では細胞質因子はシトクロム b558 と乖離しているため NADPH の活性は起こらないが、刺激により細胞内因子が細胞膜へと移行し、シトクロム b558 と会合することで、活性型 NADPH oxidase が産生される。本酵素は酸素分子を直接還元することで superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) を生成し、食胞内へと放出して、さらに強力な活性酸素種 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ClO<sup>-</sup>) が生成され、強力な殺菌作用を発揮する<sup>6</sup>。



## 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

本遺伝子治療臨床研究における標的細胞は、患者由来の末梢血 CD34 陽性細胞である。これは、自己複製能と多分化能（血球系全ての細胞に分化する能力）を有する細胞で、前処置にて骨髓破壊を行った患者の骨髓造血能を再構築することができる<sup>33</sup>。

本遺伝子治療臨床研究で末梢血 CD34 陽性細胞を標的細胞とする理由は、CYBB 遺伝子を導入した患者 CD34 陽性細胞が、移植により患者骨髓造血を再構築し、結果、正常な顆粒球の末梢血出現を期待するためである。

## 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

患者末梢血由来 CD34 陽性細胞への CYBB 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクターを含むウイルス産生細胞の培養上清中で CD34 陽性細胞を培養することで行う。遺伝子導入法の詳細は 9-6-2 の「遺伝子導入方法」の項で示す。

CD34 陽性細胞へ遺伝子を導入するためにレトロウイルスベクターを選択した理由は、レトロウイルスベクターが、感染後に宿主染色体に挿入される性質を有し、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現するためである。また、他のベクターシステムと比較して CD34 陽性細胞に対して高い遺伝子導入効率を示すことによる<sup>38,39</sup>。

下記にレトロウイルスベクターと他のベクターシステムとの比較を示す。

特徴	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV
最大許容量	5kb 以下	7~7.5kb	30kb 以上	4kb 以下
導入法	ex vivo	ex/in vivo	ex/in vivo	ex/in vivo
染色体組込み	あり	あり	なし	あり/なし
安定性	良い	良い	良い	良い
調製の容易さ	容易	困難	容易	困難
免疫学的問題	なし	なし	あり	あり
安全性	挿入変異	挿入変異	炎症・毒性	炎症・毒性
血液細胞導入	良い	良い	不良	不良

#### 6-4. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

##### 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

使用するウイルスベクターはモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV) 由来のレトロウイルスベクターである。この MoMLV は sarcoma 37 細胞より分離され、マウスの週令及び系統に関わらず感染するが、ヒトには感染しない。また、発癌遺伝子を持たないが、感染後、長期を経て、感染マウスにリンパ性白血病を発症する<sup>40,41</sup>。

MoMLV のゲノムは 5' LTR (long terminal repeat) - パッケージング(Ψ) シグナル - gag - pol - env - 3' LTR より構成されている。ウイルス LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、ウイルスゲノムは 5' LTR より転写、翻訳される。gag はウイルスのコア構造タンパク質をコードする遺伝子で、pol は逆転写酵素ならびにインテグラーゼをコードする遺伝子、env はウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子である。Ψシグナルはウイルスゲノム RNA がコア構造タンパク質や pol

遺伝子産物により構成される正二十面体の複合体に取り込まれるのに必須な配列であり、ゲノム RNA がこれら複合体に取り込まれることでウイルス粒子が形成され、細胞膜表面より萌芽する。この際、宿主細胞膜の一部を自らの外被として持ち込む。

レトロウイルスの生活環は、ウイルス粒子の外被表面に存在する外被タンパク質 (Env) が標的細胞の細胞膜表面上に存在する Env に対する受容体に結合することにより始まる。ウイルス粒子が受容体を介して細胞膜表面に結合した後、ウイルスはエンドサイトーシスにて細胞質内へと取り込まれる。その後、自らが持ち込んだ逆転写酵素によりウイルスゲノム RNA を 2 本鎖 DNA へと変換し、核へと移行した後にウイルスが持つインテグラーゼにて宿主染色体へと組込まれる。この状態のウイルスゲノムをプロウイルスとよぶ。染色体に組込まれたプロウイルスはあたかも宿主の遺伝子であるかのように振る舞い、宿主の転写機構を利用してウイルスゲノム (RNA) を転写する。ウイルスゲノムの一部は Gag、Pol、Env を転写するためのメッセンジャー RNA (mRNA) として働き、ウイルスの構成タンパク質を産生する。このようにして新たに生成されたウイルス粒子は細胞外へと萌芽し、周囲の細胞に感染していく<sup>42</sup>。

#### 6-4-2. ウイルスベクターの作製方法

レトロウイルスベクター DNA は野生型ウイルスゲノムの 5' -LTR、primer binding site、 $\Psi$ シグナル、ポリプリン領域および 3' -LTR を保存し、ウイルス粒子の構造タンパク質遺伝子 (gag、pol、env) を削除して作製され、ウイルスベクター DNA のみではウイルスベクター粒子にはなり得ない。

レトロウイルスベクター粒子産生のためには、後で述べられるパッケージング細胞株が必要となるが、さらに安全性を高めるために、種々の工夫がレトロウイルスベクター DNA 自体になされている。本遺伝子治療臨床研究で用いられるウイルスベクターのプラスミド DNA は、レトロウイルスベクター MFGS に CYBB 遺伝子を挿入した MFGSgp91 であり、米国国立衛生研究所 (NIH) の Harry L. Malech 博士らによって作製されたものである。以下にその作製過程を示す。

##### 1) MFG の作製

MFGSgp91 の基となるベクターは MFG である。MFG は MoMLV ゲノム断片を pBR322 プラスミドベクターに挿入して作製された (全配列を別紙 5 で示す)。すなわち、MoMLV ゲノムの 5' LTR から 1038 塩基対 (bp) 番目の *NarI* 部位までの DNA 配列 (ただし、*NarI* 配列は MFG では *NdeI* 配列に変換されている)、splice acceptor を含む 5401bp 番目の *NdeI* 配列から 5674 番目の *XbaI* 配列の DNA 配列、合成 DNA 配列

CTAGACTTGCCATGGCGCGATC (二重鎖) 及び 7672bp 番目の *ClaI* (*BamHI* 配列に変換) から 3' LTR までの DNA 配列まで含んでいる。

MFG が宿主染色体に挿入された後、プロウイルス (宿主染色体に挿入された MFG) は 5' LTR から 396bp 番目の転写開始点より転写が開始され、3' LTR から 696bp 番目まで転写される。MFG では、gag、pol、env のウイルスゲノムはほぼ全て欠失しているが、gag の一部 (5' 側) の約 400bp、env 5' 側のスプライスアクセプター領域の約 400bp、env の一部 (3' 側) の約 90bp は残されている。

MFG のパッケージングシグナル $\Psi$ は gag の一部を含んでおり、この gag 配列の一部を含むパッケージングシグナルを拡張型パッケージングシグナル ( $\Psi^+$ ) とよび、ウイルスゲノムのパッケージング効率を著しく向上させている。また、MFG は MoMLV 由来の splice donor/ acceptor 配列を有し、さらに導入遺伝子の開始コドンをも MoMLV の env 開始コドンに合わせることで、導入遺伝子の転写効率を高めている。なお、MFG は薬剤耐性の選択マーカー遺伝子を有してはいない。

## 2) MFGS の作製

MFG は $\Psi^+$ としてパッケージングシグナル内に gag の一部を有している。この部分はウイルス粒子膜表面や粒子内にある 2 つの重複した Gag-Pol ポリペプチドのアミノ酸末端側をコードするもので、これがパッケージング細胞株にある gag-pol と相同組換えを起こし、複製可能なレトロウイルス (replication competent retrovirus; RCR) を産生する危険性がある。同時に、このポリペプチドがウイルス由来のタンパク質であるため、宿主の免疫反応を惹起する可能性もあり、MFG の gag 配列に以下のような変異を挿入し、遺伝子組換え率の低下と免疫原性の軽減を図ったものが MFGS である。

- ・ 5' LTR より 1256bp 番目の A を T に、1478bp 番目の C を T に変換することで、Gag-Pol の重複翻訳フレームを 84bp と 15bp に短縮させた。
  - ・ 5' LTR より 1273bp 番目の T を A に変換することで、重複翻訳フレームには影響を与えず、パッケージング機能のためのステムループの形成能力を保持させた。
- 以上の変異により、導入遺伝子の発現は低下させず、p15Gag の発現は消失した。

## 3) MFGSgp91 の作製

MFGSgp91 は、MFGS 内の *NcoI*-*BamHI* の配列とその両端に相当する配列を有するヒト由来 CYBB 遺伝子を挿入して作製された。

## 4) パッケージング細胞の作製

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、それ自体で完全なウイルス粒子を形成することはない。このため、MFGSgp91 に相当する遺伝子組換え生物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において、遺伝子組換え生物の作製のために使用されるパッケージング細胞株は 293-SPA であり<sup>44,45</sup>、以下にその作製方法を示す。

- MoMLV ゲノム DNA よりパッケージングシグナル、env 及び 3' LTR のゲノム配列を取り除いた 5' LTR と gag-pol 配列を含む pCRIPenv-ベクター、ならびに SV40 early promoter より大腸菌由来 gpt 遺伝子を発現する pSV2gpt ベクターを、リポフェクション法にてヒト由来胎児腎細胞 293 細胞 (ATCC CRL 1573) に導入し、薬剤 (mycophenolic acid) にて Gag-Pol 発現細胞を選択した。
- これら Gag-Pol 発現細胞に、マウス両種性 (amphotropic) ウイルス由来 4070A env を発現する pCRIPAMgag-と大腸菌由来ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg) を発現する pSV2hyg を導入し、薬剤 (hygromycin) にて Env 発現細胞を選択した。
- 最終的に、Gag-Pol 及び Env を高発現し、レトロウイルスベクターを導入することで高力価のウイルスを産生する細胞株をパッケージング細胞株 293-SPA として樹立した。

この 293-SPA はパッケージングシグナルを有していないため、パッケージングシグナルを有するレトロウイルスベクターを導入しない限り、遺伝子組換え生物 (レトロウイルス) は生じない。

#### 4) パッケージング細胞の作製

作製された MFGSgp91 を、上記 293-SPA にリポフェクション法にて導入し、クローニング後に NIH3T3 を用いたウイルス力価測定にて高力価を示した株が最終的に選択された。このウイルス産生細胞株 293-SPA-gp91-155 は、患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に対して、70%を越える感染効率を示す。

#### 6-4-3. ウイルスベクターDNA の構造

MFGSgp91 の概略図を「CYBB 遺伝子の末端配列と MFGgp91 の構造」(21 頁)に、また全塩基配列を別添 5 に示す。なお、CYBB 遺伝子は 5' LTR より転写が誘導される。

#### 6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

293-SPA はアンフォトロピック系のパッケージング細胞株であり、このパッケージング細胞株より産生されるレトロウイルスは、マウス、ラット、サル、ヒトなどの細胞に感染し、感染宿主域は広範囲である。ただし、本遺伝子治療臨床研究で使用されるレトロウイルスは、前述のように Gag、Pol、Env をコードする遺伝子が削除されているため、感染細胞で新たなウイルス粒子を形成することはなく、感染細胞から周囲の細胞に再感染することはない。

## 7. 安全性についての評価

### 7-1. 遺伝子導入方法の安全性

#### 7-1-1. 遺伝子導入に用いる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 NIH の Malech 博士らによって樹立され、米国 Magenta 社 (Rockville, MD) が、同博士が所属する National Institute of Allergy and Infectious Diseases との契約に基づき、GMP (Good Manufacturing product) ベクターとして管理・保管しているものである。そして、本遺伝子治療臨床研究においては、Magenta 社が製造した 293-SPA-gp91-155 のマスターセルバンク (Master Cell Bank: MCB) よりワーキングセルバンク (Working Cell Bank: WCB) を作製し、そこから産生したベクター上清を使用する。

Working Cell Bank からのレトロウイルスベクター産生法は、上記、MCB より 1 バイアルを融解し、Magenta 社内で管理された製造エリアで GMP 準拠のもとで以下のように行われる。

225cm<sup>2</sup>のプラスチックフラスコに 1cm<sup>2</sup>あたり  $8 \times 10^4$  個の細胞を 10%の胎仔牛血清 (FBS) を含む Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMEM) にて播種して培養する ( $1.8 \times 10^7$  個)。6 日間の培養により細胞数はおよそ 10 倍になると予想されるので、1%のヒト血清アルブミン (HSA) を含む X-vivo 10 に培地を交換し、さらに 10 時間培養する。その後、培養上清を回収し、新しい培地 (X-Vivo 10/ 1% HSA) に交換してから、さらに 14 時間培養を続け、培養上清を回収する。この操作 (14 時間培養後の培養上清の回収) を計 3 回繰り返した後、回収したすべての培養上清をひとつにまとめ、無菌濾過した後、小分けに分注して凍結・保存する。

Magenta 社において製造されたベクター上清に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おいて受け入れ試験を実施する。検査の結果、適切と判断されたベクター上清のみを、同研究所の管理区域内(資料 2 に参照)にある超低温フリーザーにて凍結・保管する。なお、次頁以降に、MCB、大量産生によるベクター上清ならびに受け入れ試験において行われる品質検査項目を示す。

## レトロウイルスベクター産生細胞の品質検査項目

(293-SPA-MFGSgp91-155 Master Cell Bank #2037-0022)

検査	方法	基準値	結果
核型検索	アイソザイム	ヒト	ヒト
細胞状態	トリパンブルー染色	30%以上	90%以上
細菌・真菌 (無菌性)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ	FDA points to consider	陰性	陰性
〈ヒトウイルス〉 EBウイルス サイトメガロウイルス B型肝炎ウイルス HTLV 1/2 アデノ随伴ウイルス パルボB19 HIV	PCR PCR PCR PCR PCR PCR 共培養法	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性	陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性 陰性
偶発的ウイルスの確認	In vivo法 In vitro法	陰性 陰性	陰性 陰性
ウシ由来ウイルス (使用ロット)	ウシウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
ブタウイルス (使用ロット)	ブタウイルス 感受性細胞	陰性	陰性
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
ベクターコピー数	Southern blot法	1コピー	1コピー
gp91 <sup>phox</sup> 配列	DNA sequence法	一致	一致
MFGS配列	DNA sequence法	一致	一致
パッケージング ベクターコピー数	Southern blot法	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag- > 1copy	pCRIPenv- > 1copy pCRIPMgag-> 1copy
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562に よるgp91 <sup>phox</sup> の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現

293-SPA-MFGS91-155 レトロウイルス (#1059-0001)  
ベクター上清と産生細胞の最終産物

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	21CFR610.12	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	FDA法	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Southern blot法 Flow cytometry	0.1 copy以上 10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
野生型ウイルス (細胞)	S+L-アッセイ	陰性	陰性
患者CD34陽性細胞への 導入	ケミルミネッセンスに よる活性酸素	5%以上の発現	5%以上の発現
患者CD34陽性細胞への 導入	DHR flow cytometry	5%以上の発現	5%以上の発現
酸化補酵素K562による gp91 <sup>phox</sup> の発現	Nitroblue tetrazolium blue	5%以上の発現	5%以上の発現
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

国立成育医療研究センター研究所におけるベクター上清の受け入れ試験

検査	方法	基準値	結果
無菌性 (上清・細胞)	SRL	陰性	陰性
マイコプラズマ (細胞)	SRL	陰性	陰性
K562を用いた ウイルスカ価	Flow cytometry	10%以上の発現	10%以上の発現
野生型ウイルス (上清)	Envに対するPCR法	陰性	陰性
エンドトキシン	LALテスト	陰性	陰性

## 7-1-2. 患者に投与される物質の純度及び安全性

患者に投与する物質は、CYBB 遺伝子が導入された患者末梢血由来 CD34 陽性細胞である。通常、本細胞を培養する際にはウシ胎仔血清を用いるが、これは患者にとって異種タンパク質であり、抗原となり得るため本遺伝子治療臨床研究では、CYBB 遺伝子を導入する際に用いるウイルス上清を無血清にて調製する。また、患者 CD34 陽性細胞の培養においても、1% ヒト血清アルブミンを含む無血清培地にて行う。

また、遺伝子導入に際して使用された各種試薬に関しては、1% ヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝液 (PBS) などで十分に細胞を洗浄し、取り除いてから患者に投与する。無菌性・エンドトキシンに有無に関しては、下記の検査の 1 と 2 を行い、安全性が確認された段階で遺伝子導入細胞 (末梢血由来患者 CD34 陽性細胞) を患者に投与する。

なお、安全性の観点からは、野生型レトロウイルス (replication competent retrovirus; RCR) 混入の有無を確認する必要がある。現在行われている RCR 検出法は複数あるが、結果判定に時間が掛かるものが多く、また、今回の全培養期間が 72 時間と短期間 (ウイルスと接している期間は 48 時間以内) であることを考慮して、本研究における主な RCR の検出法は、患者細胞を用いて PCR 法による Env 遺伝子の増幅で行うものとする。なお、投与する細胞の RCR の確認は、回収前日の細胞を用いる。

患者に投与する細胞及び患者の細胞を用いて行われる検査一覧は以下の通りである。

検査項目	基準値
1. 無菌性 (細菌、真菌、マイコプラズマ)	陰性
2. エンドトキシン	陰性
3. 遺伝子導入細胞の RCR 検出試験 (PCR による Env 遺伝子の検出)	陰性
4. 培養上清中の RCR 検出試験 (PCR による Env 遺伝子の検出)	陰性
5. FACS を用いた遺伝子導入細胞における gp91 <sup>phox</sup> の発現	5%以上
6. コロニーアッセイによる遺伝子導入効率の測定	5%以上
7. サイトカイン非存在下での増殖能試験	陰性
8. PCR 法によるプロウイルスコピー数	0.01 以上

## 7-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

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 は野生型ウイルス由来の Gag、Pol、Env をコードする遺伝子の全てあるいは一部を欠失している。さらに、使用されるパッケージング細胞株 293-SPA においても Gag-Pol を

発現する DNA 断片と Env を発現する DNA 断片が異なったベクターによって発現させられているため、本遺伝子治療臨床研究において当ベクターを使用する限り RCR の出現率は極めて低いものと思われる。また、過去の 300 を越える同様なレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究においても、RCR 出現の報告は無い。

本遺伝子治療臨床研究で使用される MFSGsp91 上清は米国 Magenta 社により RCR が存在しないことが確認されたものを使用する。また、使用前の受け入れ試験においても RCR が存在しないことを確認し、さらに、治療開始後にも患者細胞や血清を用いて患者体内で RCR が出現していないことを定期的に確認する。

#### 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

レトロウイルスベクターが感染細胞に外来遺伝子を導入する過程において、細胞に傷害を与えることはないと考えられている。実際、これまでの遺伝子治療臨床研究において細胞傷害性は報告されていない。

#### 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

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞である患者末梢血由来の CD34 陽性細胞に体外で CYBB 遺伝子を導入し (ex vivo 遺伝子治療)、これらの遺伝子導入細胞のみを患者に投与する。したがって、RCR が存在しない限り、標的細胞以外の細胞に CYBB 遺伝子が導入される可能性は極めて少ない。また、たとえベクター粒子が遺伝子導入細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されたとしても、頻回なる細胞洗浄によりその量は極めて微量になる。さらに、その多くは血清などで不活化することから、標的細胞以外へ新たに感染する可能性は極めて低い。

#### 7-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は試験管内で行われるため、患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は否定できない。このため、遺伝子導入に十分な知識と経験を有する研究者のみが P2 レベルの遺伝子導入専用施設で、十分な注意をもってレトロウイルスベクター上清を扱う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧滅菌か次亜塩素酸によるウイルスの不活化操作の後に廃棄される。ただし、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、レトロウイルスベクター上清を直接触れた程度では遺伝子の導入は成立しない。また、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入さ

れる可能性は大量の RCR が患者体内に存在しない限りあり得ない。

#### 7-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

最近の報告で、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入した場合、その挿入部位は細胞増殖に関わるような遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域、特に遺伝子の活性化部位に挿入されやすいことが明らかとなった<sup>33,46</sup>。

挿入が問題となるのは、その近傍遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼした場合である。ただ、レトロウイルスベクターの染色体挿入が細胞増殖に関わる遺伝子に対して負の影響を与えた場合は、その細胞は増殖できず細胞は死滅するため、患者への影響はない。一方、挿入部位近傍に癌原遺伝子が存在し、それがベクター挿入により発現誘導を起こして増強した場合、すなわちベクター挿入が癌原遺伝子の発現に対し正に働いた場合は、遺伝子導入細胞ががん化する可能性はある。実際、フランスで行われた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療において使用されたレトロウイルスベクターが患者染色体の *LMO-2* 遺伝子近傍に挿入され、結果的に遺伝子導入細胞が白血病化 (T 細胞白血病) したとの報告がある<sup>47-51</sup>。また、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) においても同様に、治療ベクターが *LMO-2* 遺伝子近傍に挿入されたことによる白血病の発症が報告されている。現在、この有害事象に対する種々の方策が検討されてはいるが、いまだ完全に白血病などの造血系異常を誘発しないベクターシステムは存在しない。そのため、本遺伝子治療臨床研究においても何からの造血系異常が発症する可能性は否定できない。

#### 7-1-8. 癌原性の問題

ウイルス感染による癌原性は RCR が存在しない限り、その可能性は極めて低い。一方、前項で述べたように挿入部位近傍の遺伝子が活性化することによるがん化の可能性は決して低いものではない。これは本遺伝子治療臨床研究と同一の疾患を扱ったドイツ・スイスでの遺伝子治療臨床研究においても造血系異常を発症したことから推測される。

ただし、ドイツ・スイスの症例で使用されたベクターはマウス急性白血病ウイルスに属する Friend spleen focus-forming virus (SFV) 由来であり、このウイルスが本遺伝子治療臨床研究で使用される MoMLV 由来ベクターとは異なりマウスにおいて急性白血病を発症し、数十倍も転写活性が高いことから、造血系異常を誘発したと考えられている<sup>33,52</sup> (別添 15)。ただ、疾患は異なるものの本遺伝子治療臨床研究と

同じ MoMLV 系のベクターを使用した遺伝子治療臨床研究において、同様に造血系異常（白血病）を発症したことから、本遺伝子治療臨床研究においても造血系異常が発症する可能性は否定できない。

なお、現在まで本遺伝子治療臨床研究で使用されるベクターを用いて行われた CGD に対する遺伝子治療臨床研究において造血系異常を発症した報告はない<sup>53</sup>。

## 7-2. 遺伝子産物の安全性

レトロウイルスベクター MFGSgp91 の遺伝子導入により、感染細胞であるヒト造血細胞は CYBB 遺伝子産物である gp91<sup>phox</sup> を獲得する。gp91<sup>phox</sup> は前述のようにヒト由来のタンパク質で、細胞膜表面で p22<sup>phox</sup> と会合し、菌体成分などの刺激にて細胞質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性質を有している。そのため、gp91<sup>phox</sup> を過剰発現しても、過剰な p22<sup>phox</sup> の発現がない限り、活性酸素産生などの機能は発揮せず、それ自身では細胞に傷害を与えないと考えられる。事実、現在まで gp91<sup>phox</sup> による細胞傷害性の報告はみられない。

## 7-3. 細胞の安全性

### 7-3-1. 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（0.22 $\mu$ m）を通しており、ウイルス産生細胞株や細胞破砕物などの混入はない。また、国立成育医療研究センターにおいては、培養期間中に異なる患者同士の細胞が混入することを防ぐために、同一時期に複数の患者細胞を扱わないこととする。また、微生物などの汚染を防ぐために、全ての操作を P2 レベルの施設内で行い、特に細胞の取り扱いに関してはクラス IIa の安全キャビネット内で操作する。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行われ、その主な検査項目は好気性細菌、嫌気性細菌、真菌、マイコプラズマと RCR の検査であり、これら検査は遺伝子治療の安全性検査に関して実績のある国内企業（SRL 社、タカラバイオ社等）に委託して実施する。

### 7-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

前述のように、レトロウイルスベクターの染色体挿入部位は一定でなく、ま

た、感染細胞よりあらたなウイルスが出現しないため、患者細胞の遺伝型の変化は報告されていない。ただ、過去の報告でその挿入部位は全染色体にわたり、少なからず導入部位近傍遺伝子の発現に何らかの変化を与えることがあるとの報告もあることから、微細な遺伝型の変化、表現型の変化をきたしている可能性は否定できない。ただ、これら変化は臨床症状などの変化を伴わないようなごくわずかなものであり、一般的な臨床検査では異常を示さない。

### 7-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞はレトロウイルスベクターMFGSgp91により正常CYBB遺伝子を導入した患者由来の末梢血CD34陽性細胞である。現在、リンパ腫や固形腫瘍に対して自家幹細胞移植が一般的に行われていることを考えると、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についても、細胞を患者に投与する前に洗浄することで、生体への影響はほとんどないものと考えられる。

## 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

以下の理由により本遺伝子治療臨床研究は実施可能と判断される。

1. 近年、X-CGD に対する骨髄非破壊的前処置による HLA 一致同種造血幹細胞移植が行われ、適当なドナーの存在する症例では改善する例も報告されているが、これら移植医療がすべての症例に対して適応することができないこと。
2. 造血系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臨床研究が数多く行われ、本邦においても既に 3 件実施され（1995 年、ADA 欠損症に対する末梢血リンパ球遺伝子治療；2004 年、同疾患に対する骨髄造血幹細胞遺伝子治療；2004 年、白血病に対するドナーリンパ球輸注療法）、現在までこれら研究において遺伝子治療に関わる有害事象を発症していないこと。
3. 本遺伝子治療臨床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、すでに共同研究者である Malech 博士が NIH において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。
4. 上記、Malech 博士が NIH にて本遺伝子治療臨床研究と同一のプロトコールで行った遺伝子治療臨床研究において、3 名中 2 名で肝膿瘍や肺膿瘍が治癒したこと。
5. 先行研究である「難治性先天性異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究（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）」において、現在、『安全性を鑑みたととき X-CGD に対する治療の第一選択は移植医療であるが、ドナー不在など何から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も十分に妥当である』との結論を得たこと。
6. 実施施設である国立成育医療研究センターが、成育医療（小児医療、母性・父性医療及び関連・境界領域を包括する医療）に特化した高度専門医療センターであり、その使命が先天性疾患を含む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。

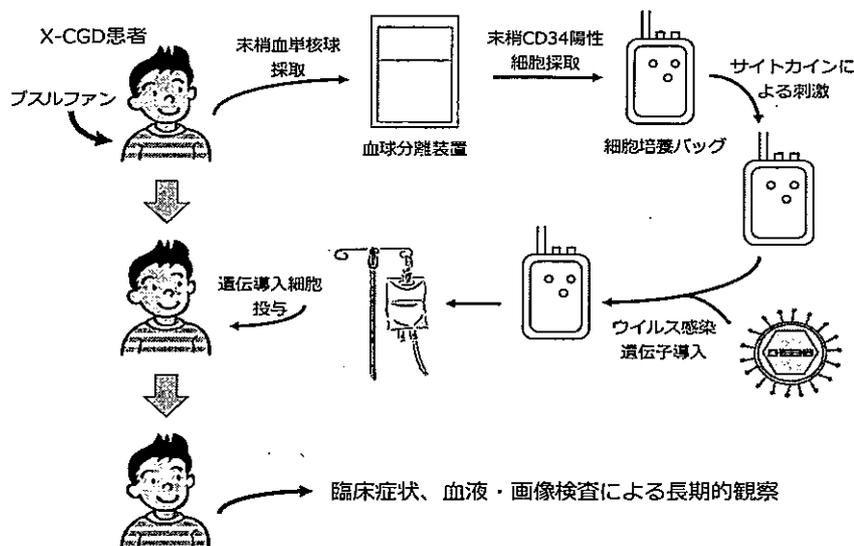
なお、本遺伝子治療臨床研究には、本研究の主旨に賛同し、その実施に尽力を惜し

まない多くの小児科医、免疫学者、細胞治療関係者、遺伝子治療関係者が参加する。

## 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

本遺伝子治療臨床研究では、X-CGD 患者より血球分離装置を用いて末梢血 CD34 陽性細胞を採取する。体外 (ex vivo) にて、細胞培養バッグ中で培養した細胞にレトロウイルスベクターを用いて正常 CYBB 遺伝子を導入し、再び、患者へ投与する。なお、これら遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、患者は投与前にブスルファンが投与され、また、投与後は本遺伝子治療臨床研究の有効性・安全性を評価するため、長期にわたり臨床症状を含めた各種検査が行われる。下記のその概略を示す。



### 9-2. 被験者の選定基準及び除外基準

X-CGD 患者のうち「9-2-1. 被験者の選定基準」の 1-8 の全ての条件を満たし、かつ「9-2-2. 被験者の除外基準」の 1-7 のいずれにも該当しない症例を対象とする。なお、遺伝子治療適応患者の選定にあたっては、人権保護の観点から、病状、年齢、同意能力などを十分に考慮し、慎重に選定する。また、実施症例の決定にあたっては、実施施設長が本遺伝子治療臨床研究の総括責任者からの要請により、諮問機関である「遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会 (9-3-1 参照)」の開催を同委員会委員長に要求する。同委員会は迅速に、かつ十分に症例の適応性を審議し、その適応性の有無を実施施設長に文書として提出し、実施施設長は実施許可に関する判断を委員会の判断を参考に総括責任者に伝える。

### 9-2-1. 被験者の選定基準

1. 遺伝子検査により gp91<sup>phox</sup> に異常のある X-CGD と診断された男性
2. 3歳以上、体重 10kg 以上の症例
3. 体重 (1kg) あたり  $5 \times 10^6$  個の CD34 陽性細胞が回収可能と思われる症例
4. 2ヶ月以上の対処治療によっても、臨床症状や検査所見 (CRP、b-グルカン、画像など) に改善がみられず、今後も十分な治療効果が得られないと推測される症例
5. 造血幹細胞に際し、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  $2 \times 10^7$  個 (CD34 陽性細胞として  $1.5 \times 10^5$  個) 以上の移植ドナーが見つからない症例
6. 患者もしくはその代諾者 (家族、配偶者、親権者など) からの本遺伝子治療臨床研究に対する文書による同意が得られている症例
7. 以下に示す心肺肝腎機能を有する症例  
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<sub>2</sub>)  $\geq 95\%$   
AST、ALT  $\leq 100$  IU/L  
体表面積 ( $1.73\text{m}^2$ ) 補正クレアチニン・クリアランス (Ccr)  $\geq 70$  ml/min  
随時または食後 2 時間後の血糖値  $\leq 200$  mg/dl、HbA1c  $\leq 9\%$
8. 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

### 9-2-2. 被験者の除外基準

1. HIV 陽性例
2. 悪性腫瘍併発例
3. 現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)
4. 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
5. 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
6. 長期 (3ヶ月程度) の生命予後が見込まれない症例
7. 同意に影響を及ぼす精神障害を有する症例

### 9-3. 本遺伝子治療臨床研究に関連する各委員会

本遺伝子治療臨床研究を円滑に、かつ適正に実施するために、国立成育医療

研究センター内に下記の委員会を設置する。

### 9-3-1. 遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会

実施施設長は、本遺伝子治療臨床研究が承認された時点で、国立成育医療研究センター内に遺伝子治療臨床研究適応・評価判定委員会（以下、「適応・評価判定委員会」）を設置し、委員長を任命する。委員の選任法は別途定める。当適応・評価判定委員会は遺伝子治療臨床研究において実施される症例の適応判定を行う。

### 9-3-2. 遺伝子治療臨床研究審査委員会

実施施設長は、本遺伝子治療臨床研究が、生命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」を遵守し、適正に行われるようにするために遺伝子治療臨床研究審査委員会（以下、「審査委員会」）を設置する。本審査委員会は、「(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、当審査委員会は、本遺伝子治療臨床研究の実施計画及び実施の適否について、科学的観点ならびに倫理的観点から審査する。委員長は実施施設長が任命し、委員の選任法は別途定める。

### 9-4. 被験者の同意の取得法

遺伝子治療が適当と考えられる被験者（患者）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。実施が適当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・評価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・評価判定委員会によって実施可能であるこ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。

同意書の取得に関しては、総括責任者あるいはその代理の医師が、本遺伝子治療臨床研究の適応となると考えられる被験者に対し、別添 1 で示す「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究」参加のしおり」および遺伝子治療用パンフレットを基に、下記の 1～8 の事項について説明したうえで、患者自身の自由意思により本遺伝子治

療臨床研究の参加の同意を文書にて得る。被験者が未成年者あるいは文書による同意を得ることが困難な被験者の場合は、その家族、配偶者、保護者、親権者などの代諾者に対して同様の説明を行ったうえで、本遺伝子治療臨床研究に参加する旨の同意を文書にて得る。ただし、別添1で示す年齢別の説明書を用いて、本遺伝子治療の概要を理解してもらう（アセントの取得）。

1. X-CGD の病態説明
2. X-CGD に対する現行の治療法の説明及びその治療効果
3. 本遺伝子治療臨床研究の目的及びその方法
4. 本遺伝子治療臨床研究が実施される場所
5. 予想される効果及び危険性
6. 本臨床研究への参加は自由意思によるもので、参加しない場合であってもなんら不利益を被らないこと
7. 本臨床研究への参加を同意した場合であっても、随時これを撤回できること
8. 被験者の人権が保護されること
9. その他、本遺伝子治療臨床研究の体制など

なお、本遺伝子治療臨床研究において起こりうる危険性を十分に理解した上での同意取得を目指すため、特に、以下の3点を厳守する。

1. 有害事象など本遺伝子治療臨床研究における危険性の説明  
説明医師が、同意説明書ならびに遺伝子治療用のパンフレットを使用して、詳細に説明する。
2. 臨床研究コーディネータなど第三者の介在  
担当医師以外の第三者（臨床コーディネータ）を配置し、被験者が本遺伝子治療臨床研究に関する疑問点などを気兼ねなく質問できるような状況を用意する。
3. 同意を取得するまでの時間  
同意は、説明医師が説明した際に取り取るのではなく、被験者が熟考の上、自由意思で決定できるよう説明後1週間程度の期間をあけてから取得する。

#### 9-4-1. 被験者と家族への心理的支援

本遺伝子治療臨床研究は、被験者本人のみならず保護者等代諾者にとって多大な精神負担と成り得るため、特別な配慮が必要である。これに対して、本臨床研究

の全経過を通じて、臨床心理士による積極的な心理的支援を行う。

## 9-5. 実施期間及び目標症例数

実施期間は、関係各省より承認を得た時点から5年間で、目標症例数を5症例と設定する。

## 9-6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

### 9-6-1. 対照群の設定

特に設けない

### 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）

#### 9-6-2-1. 無菌性の確保

本遺伝子治療臨床研究の実施施設である国立成育医療研究センター研究所内に設置したP2レベルの遺伝子導入専用培養室を使用する。入室時は消毒液による手洗いとガウンテクニックを確実に実行する。使用する器具、試薬品は全て無菌的なものを使用し、可能な限り使い捨てとする。また、同時に複数の被験者の細胞を扱わず、可能な限り閉鎖系操作により細胞を調製する。これら培養室への入室法は別途、標準作業手順書（standard operating procedure; SOP）にて定める。

#### 9-6-2-2. ベクターの入手先及び保存法

使用するレトロウイルスベクターは米国のMagenta社がGMPに準拠して製造したレトロウイルスベクター（293-SPA-MFGS91-155）を用いるが、輸入に関しては、厚生労働省からの本遺伝子治療臨床研究の承認が得られた段階で、必要な手続きを執った上で行う。レトロウイルスベクターの感染力は、凍結状態で保たれるので、輸入後はベクター上清を $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に使用時まで保管する。なお、輸入したベクター上清の一部を解凍し、前述の「国立成育医療研究センターにおけるベクター上清の受け入れ試験」（30頁）に基づき、遺伝子導入効率、RCRの存在の有無、マイコプラズマを含む無菌性ならびにエンドトキシンなどの検査を行う。



遊させ、22 時間培養する。その後、同様の感染操作を、感染効率を確認しながら 3 回行う。

遺伝子導入操作終了後、遺伝子導入細胞を生理食塩水などにて十分に洗浄し、回収する。その際、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する。検査項目は、無菌性検査（グラム染色、BACTEC™ NR16A、NR17A）、エンドトキシン検査、マイコプラズマ検査、遺伝子導入効率（gp91<sup>phox</sup> 遺伝子の PCR、7D5 抗体を用いた FACS 解析）、RCR の検出（envPCR）、細胞表面マーカーの解析などである。

#### 9-6-2-5. 遺伝子導入細胞の患者への投与

上記、検査にて安全性が確認された遺伝子導入細胞のうち、5%は検査用として保存し、残り 95%の細胞を 1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水にて再浮遊して、注射器あるいは輸血バッグを用いて患者へ投与する。なお、投与数の上限は定めがないが、最低投与数は体重あたり  $5 \times 10^6$  個 ( $5 \times 10^6/\text{kg}$ ) とし、不足分はあらかじめ保存していた自己 CD34 陽性細胞にて補充する。また、細胞濃度を  $2 \sim 10 \times 10^7/\text{ml}$  とし、総投与量が 25~50ml 程度になるように調整する。投与方法は静脈内投与であるが、最初に総投与量の 2~5%の量をゆっくりと投与し、その後、5~10 分間被験者の全身状態を観察して、異常所見が観察されなかった場合には、残りの細胞をさらに 20 分かけて投与する。投与中ならびに終了後 2 時間にわたって被験者の状態を、循環系（血圧、脈拍、体温、呼吸）を指標にモニターなどで管理する。

#### 9-6-3. 前処置及び併用療法の有無

遺伝子導入細胞の骨髄生着を促すため、細胞投与前に造血能抑制作用を有するブスルファン（静注用ブスルフェクス®、キリンファーマ株式会社）を被験者に投与する。総投与量は体重 1kg あたり 10mg ( $10\text{mg}/\text{kg}$ ) とし、一回の投与量ならびに投与回数は下記のように体重によって定められる。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。

体重 (kg)	体重あたりの一回の投与量	体重あたりの総投与量(回数)
$10 \leq \text{体重} \leq 23$	1.00mg	10.0mg (10回)
$23 < \text{体重} \leq 34$	0.95mg	9.5mg (10回)
$34 < \text{体重}$	0.80mg	9.6mg (12回)

一回の点滴時間は2時間とし、これを最大で一日4回行う。また、ブスルファンの投与開始時期は、ブスルファンの最終投与から遺伝子導入細胞投与までの時間が24～36時間となるように決定する。ブスルファン投与中は、十分な排尿の確保と電解質平衡化のため輸液による水分補給を十分に行い、抗けいれん薬のクロナゼパムと必要に応じて制吐剤（グラニセトロン、商品名 カイトリル）の投与を行う。治療期間中は、幹細胞移植における無菌室に準じた管理を行う。ブスルファンによる骨髄抑制の程度を血液検査にて評価し、必要な際には輸血なども考慮する。

なお、本遺伝子治療臨床研究においては、X-CGD患者に対して日常的に使用されているIFN- $\gamma$ は、遺伝子治療開始の2ヶ月前までに中止する。なお、遺伝子治療開始時の患者状況により、適宜、必要とする薬剤（抗生物質、抗真菌剤）を投与する。

造血幹細胞の培養、遺伝子導入、ブスルファン投与及び患者への細胞投与の日程は、培養開始時を0日として、以下のようなスケジュールになる。

Day	0	1	2	3	4	5
培養	○	○	●	●	●	○
			(遺 伝 子 導 入)			(回収)
ブスルファン投与		○	○	○		
細胞投与						○

#### 9-6-4. 治療中の観察項目及び臨床検査項目

被験者は、治療前21日目から国立成育医療研究センター病院に入院する。被験者は、別途定める検査一覧に従い、定期的な観察ならびに臨床検査を受ける。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、収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍、呼吸数

内科診察：頭頸部、口腔内、胸腹部（視診、聴診、触診）、皮膚所見、四肢、リンパ節（頸部、腋窩、鼠頸部、その他）、外陰部（肛門周囲、その他）

## 一般検査項目

血液一般検査：血液細胞数、白血球分画、網状赤血球数

尿一般検査：蛋白、潜血、糖、沈渣

生化学検査：尿酸、血清電解質 (Na、K、Cl、Ca、P)、AST、ALT、 $\gamma$ -GTP、LDH、ALP、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、総蛋白質、アルブミン、血糖

免疫学検査：IgG、IgA、IgM、IgE、CH50、リンパ球表面マーカー (CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD56)

血液凝固能検査：PT、APTT、fibronogen、FDP

骨髄穿刺検査 (骨髄細胞染色検査)

感染症関連検査：CRP、 $\beta$ -D-グルカン、アスペルギルス抗原、カンジダ抗原

画像検査：頭部、胸腹部 CT 検査、必要に応じて上下部消化管内視鏡検査、超音波検査、PET-CT 検査

## 特殊検査 (遺伝子治療関連の検査)

末梢血細胞の gp91<sup>phox</sup> の発現：7D5 抗体を用いた FACS 解析

末梢血好中球活性酸素産生能：DHR 検査、NBT 検査、ケミルミネッセンス

導入遺伝子 gp91<sup>phox</sup> の定量 PCR (末梢血ならびに骨髄細胞)

RCR 出現の検査：Env 遺伝子 PCR

## 9-6-5. 有害事象ならびにその対処方法

### 9-6-5-1. 有害事象の定義

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。程度の分類は、「医薬品などの副作用の重篤度分類基準について」(平成4年6月29日付厚生省薬務局安全課長通知薬安第80号)を参考に、かつ被験者の全身状態、原疾患、合併症の状況も勘案して総合的に評価する。

また、以下のような事象は、重篤な有害事象として評価する(「治験中に得られる安全性情報の取り扱いについて」平成7年3月20日付厚生省薬務局安全課長通知薬審第227号)。

1. 死に至るもの
2. 生命を脅かすもの

3. 治療のため入院または入院期間の延長が必要となるもの
4. 永続的または顕著な障害、機能不全に陥るもの
5. 先天異常をきたすもの
6. その他の状況でも、被験者が危機に瀕したり、1～5のような結果に至らぬよう処置を必要とする重大な事象

#### 9-6-5-2. 有害事象発生時の対応

被験者に重篤な有害事象が発生した場合は、総括責任者は速やかに実施施設長に報告し、実施施設長が「適応・評価判定委員会」に報告する。また、総括責任者は発症時より 48 時間以内に、その旨を厚生労働大臣にも報告する。

「適当・評価判定委員会」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、「適当・評価判定委員会」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、「適当・評価判定委員会」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「適当・評価判定委員会」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、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ならびに実施施設長に報告する。

#### 9-6-5-3. 予想される有害事象とその対処法

治療中及びその後の観察期間中に発症する有害事象としては下記のようなものがあげられ、各々の有害事象に対しては現行の医療行為のなかで最良と考えられるものを速やかに行うことで対処する。

1. 末梢血由来 CD34 陽性細胞の採取に伴う有害事象

骨髓から末梢血中に CD34 陽性細胞を誘導するための G-CSF 投与に関する有害事象と血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関する有害事象がある。

#### 1) G-CSF 投与に関連する有害事象

軽微なもの

臨床症状：腰痛、胸痛、骨痛、背部痛、関節痛、筋肉痛、発疹、紅斑、悪心、嘔吐、発熱、倦怠感、頭痛、食思不振、動悸、など

血液検査：白血球増加、血小板減少、肝機能異常、尿酸値の上昇、腎機能異常（血清クレアチニン値の上昇）、など

上記、症状は一過性の反応であり、G-CSF 投与後 2、3 日で正常に回復するが、必要に応じて鎮痛解熱剤等を使用し、また、過度な白血球増加や血小板の減少に関しては G-CSF の減量や中止も検討する。

重大なもの

G-CSF に対するアレルギー性ショック、間質性肺炎、血圧低下などがあり、稀な有害事象として、心筋梗塞、脳血管障害、脾臓破裂などがある。なお、投与後の長期的な観察期間において、G-CSF 投与を受けたドナー 2 例（移植症例）に骨髓増殖性疾患と急性骨髄性白血病が発症したとの報告があるため、本遺伝子治療臨床研究においても、慎重に観察を行う。

#### 2) 血液分離装置による CD34 陽性細胞の採取に関連する有害事象

CD34 陽性細胞の採取に際しては、血管確保の際に出血、感染症の危険性がある。また、採取中に全身倦怠、手足のしびれ、血管迷走神経反射に伴うめまい、嘔気、嘔吐などがみられることがあり、また、終了時に血小板減少による出血傾向を示す場合もある。

#### 2. ブスルファン投与に関連する有害事象

骨髓造血能抑制効果が強いブスルファンを投与することにより、種々の造血系異常が観察され、必要に応じて輸血や血小板輸注を含め迅速に対応する。また、悪心、嘔吐に関しては 5-HT<sub>3</sub> 拮抗剤である塩酸グラニセトロン（商品名 カイトリル）を投与し、ブスルファンの髄液移行による痙攣誘発に関してはクロナゼパムを使用する。

なお、重大な副作用として肝中心静脈閉塞症（VOD）があり、晩期副作用と

して不妊が上げられる。

### 3. 移植した細胞が生着不全を起こす危険性

遺伝子を導入する細胞は被験者の末梢血由来 CD34 陽性細胞であるが、何らかの理由によりこれら細胞が生着せず、被験者自身の骨髄造血能が回復しない場合がある。これに対しては、被験者末梢血由来 CD34 陽性細胞を採取する際に移植用の CD34 陽性細胞も保存しておき、骨髄生着が見られないときには、これら細胞を投与する。また、保存した細胞の投与によっても骨髄造血能の回復が認められない場合は、緊急的な事態と考え、同種幹細胞移植 (HLA 不完全一致) を含めた処置を講ずる。

### 4. 遺伝子導入細胞の投与に伴う有害事象

遺伝子導入細胞投与時に、被験者に発熱、悪寒、筋肉痛などが認められた場合は鎮痛解熱剤などにて適切に対処する。

### 5. RCR 発生の危険性

本臨床研究において RCR が出現する可能性は極めて低い。また、たとえ RCR が PCR などで検出されても、レトロウイルス血症は補体などにより一過性で収束する可能性は高い。ただ、免疫機構が再構築されていない段階での RCR が時に悪性リンパ腫などを引き起こす可能性もあり、細胞投与後は PCR などを用いた検査にて RCR の出現をモニターし、陽性の場合は逆転写酵素阻害剤などにより適切に対応する。

### 6. 染色体へのレトロウイルスベクター挿入による白血病発症の危険性

挿入部位近傍の遺伝子が活性化することによって遺伝子導入細胞ががん化する可能性は否定できないため、抗 gp91<sup>phox</sup>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。

## 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

### 9-6-6-1. 遺伝子治療臨床研究の評価方法と評価基準

別表 7 に基づき、本遺伝子治療臨床研究の評価を行う。

#### 1. 被験者への遺伝子導入細胞投与前の評価方法と評価基準

- 1) PCR 及び抗 gp91<sup>phox</sup> 抗体 (7D5) 染色による投与細胞の遺伝子導入効率の解析  
5%以上の遺伝子導入細胞の存在
- 2) 無菌性検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査  
上記検査項目陰性による無菌性等の確認
- 3) RCR 出現に対する Env 遺伝子の PCR  
上記検査項目の陰性による RCR の存在の否定

## 2. 被験者への遺伝子導入細胞投与後の評価方法と評価基準

### 1) 安全性に関して

遺伝子導入細胞投与後より 12 ヶ月目までは 4 週ごと、それ以降 5 年目までは 3 ヶ月ごと、5 年目以降は最低でも 1 年ごとの臨床症状の観察。ただし、何らかの異常を認めた場合は、速やかに分子生物学的検査を含めた詳細な解析。

薬物有害反応判定基準 (別添 9) で grade II を越えない

### 2) 有効性に関して

難治性感染症の改善程度を指標とし、治療前 12 ヶ月間と投与後の 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) の罹患回数と比較。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。また、患者末梢血の遺伝子導入細胞数や好中球活性酸素産生能 (DHR 検査、NBT 検査、ケミルミネッセンス) の比較。

上記難治性感染症の改善、末梢血中に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

## 9-6-6-2. 中止判定基準

### 9-6-6-2-1. 症例の中止判定基準

治療中およびその後の経過中に下記のような理由で治療の継続が困難になった場合は、総括責任者が治療の中止を決定する。

1. 被験者又は代諾者から離脱の申し出があった場合
2. 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
3. 観察期間中に造血幹細胞移植を施行した場合
4. その他、総括責任者が治療の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。

#### 9-6-6-2-2. 遺伝子治療臨床研究の中止判定基準

1. 予測できない有害事象の発生した場合
2. 予測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
3. 適当・評価判定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。

#### 9-6-7. 症例記録に関する記録用紙の様式

担当医師は、「国立成育医療研究センター診療情報諸記録管理規定」（平成14年3月1日施行。以下、「診療情報管理規定」と略）に基づき、臨床研究被験者以外の患者同様、診療録に被験者の容態、診療内容、検査内容、結果、および家族への説明などを記載する。一被験者一診療録として、その管理は国立成育医療研究センター病院運営部調査課の診療録管理担当者が担当する。また、診療録とは別に本遺伝子治療臨床研究の症例記録用紙を作成し、観察項目と臨床検査項目について記録する。

#### 9-6-8. 記録の保存及び成績の公表方法

診療録に準じて実施施設内で保存される。また、成績の公表は被験者の個人情報に十分に留意しながら、2-3に掲げた、本遺伝子治療臨床研究に参加する研究者全員の合意のもとに行われる。

## 10. 本遺伝子治療臨床研究における個人情報について

### 10-1-1. 個人情報の定義

本遺伝子治療臨床研究における「個人情報」とは、「行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律」（平成15年法律第58号。以下「個人情報保護法」と略）、「行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律施行令」（平成17年4月1日施行。以下「個人情報保護法施行令」と略）および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づく情報を示すものとし、本遺伝子治療臨床研究に含まれる氏名、生年月日、カルテ番号、住所など、その他の記述により特定の個人を識別できることが可能なものを指す。

なお、本遺伝子治療臨床研究は、遺伝情報を明らかにすることを目的としない。

### 10-1-2. 個人情報の利用目的の特定及び利用目的の通知

本遺伝子治療臨床研究における個人情報の利用目的については、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいて作成された本実施計画の「9-1. 遺伝子治療臨床研究の概要」ならびに「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究の参加のしおり」の「IV 今回の遺伝子治療臨床研究について 1. 目的」（16頁）に基づくものとする。また、個人情報保護法 第3条第3項の規定において認められる範囲の利用目的の変更については、改めて本人に通知し、書面によって被験者（未成年者の場合は代諾者）の同意を得る。

## 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

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（別添2）に基づき保護される。

### 10-2-1. 個人情報の正確性の確保

治療結果を含めた個人情報は、「適当・評価判定委員会」で検証されるものとし、その内容の正確性を確保するとともに、常に最新の内容に保つように努める。

### 10-2-2. 安全管理処置

個人情報の組織的、人的、物理的及び技術的安全管理処置については、「個人情報保護法」、「個人情報保護法施行令」および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいた処置を講ずる。

### 10-2-3. 第三者への提供の制限

本遺伝子治療臨床研究は、複数の機関に在籍する研究者による共同研究であり、本遺伝子治療臨床研究に関わる研究者が在籍する機関（以下、「共同研究機関」と略）と得られた結果を共有する可能性がある。このことについては、予め「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究参加のしおり」に記載・説明し、本項についても合わせて書面での同意を得るものとする。また、原則として、共同研究機関以外への被験者個人情報の提供は行わないものとするが、やむを得ず研究・解析などの目的で提供が必要な時は、改めて書面での通知を行い、本被験者の同意を得るものとする。

### 10-2-4. 開示

個人情報の開示手続きについては、「診療情報管理規定」に基づき行うものとする。また、「診療情報管理規定」に基づいて「開示しないことができる場合」に該当する場合は開示をしない。

### 10-2-5. 訂正について

被験者などから、国立成育医療研究センターが保有する、被験者が識別される個人情報の内容が事実ではないとの理由にて、当該情報に対し訂正・追加、または削除を求められた場合には、「診療情報管理規定」に定められた診療情報開示委員会が調査を行い、その調査結果に基づき、実施施設長が必要な内容の訂正を行い、被験者などに通知する。なお、法定代理人などから同様の申し出があった場合は、その事実性などに関し、実施施設長は診療情報開示委員会の答申に基づき、慎重に判断するものとする。

### 10-2-6. 利用停止について

被験者から、国立成育医療研究センターが保有する、被験者が識別される個

人情報を識別できるような個人情報の取り扱いに違反があるとの理由にて利用の停止、あるいは削除を求められた場合は、「診療情報管理規定」に定められた診療情報開示委員会が調査を行い、その調査結果に基づいて、実施施設長が必要な是正処置を講ずるものとする。なお、法定代理人などから同様の申し出があった場合は、その事実性などに関し、実施施設長は診療情報開示委員会の答申に基づき、慎重に判断するものとする。

#### 10-2-7. 開示、訂正、利用停止などができない場合の理由説明

開示、訂正、利用停止などについての申し立てがあった場合、個人情報の開示、訂正、利用の停止などが出来ない場合には、その理由を被験者などに説明する。

#### 10-2-8. 参照、質問

本遺伝子治療臨床研究における個人情報に関する照会方法ならびに質問の受付先などに関しては、「慢性肉芽腫症の遺伝子治療臨床研究参加のしおり」に記載する。

### 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）

## 12. 参考文献

1. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med.* 1957;40:309-312.
2. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA J Dis Child.* 1959;97:387-408.
3. Landing BH, Shirkey HS. A syndrome of recurrent infection and infiltration of viscera by pigmented lipid histiocytes. *Pediatrics.* 1957;20:431-438.
4. Kang EM, Malech HL. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 2009;43:77-84.
5. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-1476.
6. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2000;343:1703-1714.
7. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature.* 1987;327:717-720.
8. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet.* 1966;1:1225-1228.
9. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:578-584.
10. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000;79:155-169.
11. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, et al. Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients. *Clin Immunol.* 2008;129:103-114.
12. Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N, et al. First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J Clin Immunol.* 2009;29:215-230.
13. Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev.* 1994;138:121-157.
14. Bjorgvinsdottir H, Ding C, Pèch N, Gifford MA, Li LL, Dinauer MC.

Retroviral-mediated gene transfer of gp91phox into bone marrow cells rescues defect in host defense against *Aspergillus fumigatus* in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1997;89:41-48.

15. Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, et al. Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study. *Mol Immunol*. 2009;46:1935-1941.

16. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:170-200.

17. al-Tawil YS, Abramson SL, Gilger MA, Paul ME. Steroid-responsive esophageal obstruction in a child with chronic granulomatous disease (CGD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996;23:182-185.

18. Marciano BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, et al. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics*. 2004;114:462-468.

19. Francke U, Ochs HD, de Martinville B, et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet*. 1985;37:250-267.

20. Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. 1989;114:555-560.

21. Kobayashi S, Murayama S, Takanashi 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*. 2008;167:1389-1394.

22. Finn A, Hadzic N, Morgan G, Strobel S, Levinsky RJ. Prognosis of chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child*. 1990;65:942-945.

23. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324:509-516.

24. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2003;348:2416-2422.

25. Weening RS, Leitz GJ, Seger RA. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study. *Eur J*

Pediatr. 1995;154:295-298.

26. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis. 2004;39:692-699.

27. Ohga S, Okamura J, Nakayama H, Nagatoshi Y, Ueda K. Interferon-gamma therapy for infection control in chronic granulomatous disease. Acta Paediatr Jpn. 1995;37:315-320.

28. 崎山幸雄, 倉辻忠俊, 布井博幸, 他. 慢性肉芽腫症におけるインターフェロン- $\gamma$  長期投与の感染抑制効果-国内 32 施設共同研究報告-. 日本小児科学会雑誌. 1994;98:1048-1056.

29. Sato T, Kobayashi R, Toita N, et al. Stem cell transplantation in primary immunodeficiency disease patients. Pediatr Int. 2007;49:795-800.

30. Filipovich A. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. Bone Marrow Transplant. 2008;42 Suppl 1:S49-S52.

31. Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. Blood. 2002;100:4344-4350.

32. Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. N Engl J Med. 2001;344:881-888.

33. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. Nat Med. 2006;12:401-409.

34. Seger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. Br J Haematol. 2008;140:255-266.

35. Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M. Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. Transfus Med. 2009;19:105-108.

36. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. Nature. 1986;322:32-38.

37. Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. Mol Cells. 2003;16:271-277.

38. Porter CD, Parkar MH, Collins MK, Levinsky RJ, Kinnon C. Efficient retroviral transduction of human bone marrow progenitor and long-term culture-initiating cells: partial reconstitution of cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease by gp91-phox expression. *Blood*. 1996;87:3722-3730.
39. Li F, Linton GF, Sekhsaria S, et al. CD34<sup>+</sup> peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1994;84:53-58.
40. Gunzburg WH, Salmons B. Mouse mammary tumor virus mediated transfer and expression of neomycin resistance to infected cultured cells. *Virology*. 1986;155:236-248.
41. Adam MA, Miller AD. Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions. *J Virol*. 1988;62:3802-3806.
42. Goff S. *Retroviridae: the retroviruses and their replication*. Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007:1999-2069.
43. Rosenzweig M, MacVittie TJ, Harper D, et al. Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood*. 1999;94:2271-2286.
44. Davis JL, Witt RM, Gross PR, et al. Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1459-1467.
45. Chen J, Reeves L, Cornetta K. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2001;12:61-70.
46. Fehse B, Roeder I. Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther*. 2008;15:143-153.
47. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:415-419.
48. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118:3132-3142.

49. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:477-488.
50. Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, et al. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest*. 2007;117:2241-2249.
51. Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*. 2007;117:1456-1465.
52. Moreno-Carranza B, Gentsch M, Stein S, et al. Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. *Gene Ther*. 2009;16:111-118.
53. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12133-12138.
54. Sekhsaria S, Fleisher TA, Vowells S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34+ progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase--deficient severe combined immunodeficiency disease patients. *Blood*. 1996;88:1104-1112.

