

PMDA科学委員会

平成25年7月16日

# 遺伝子治療の現状と課題

島田 隆

日本医科大学  
分子遺伝学教室  
ゲノム先端医療部  
遺伝診療科

# 遺伝子治療の現状と課題

## 1. 遺伝子治療の歴史

- 世界最初の遺伝子治療
- 遺伝子治療の最近の進歩

## 2. 遺伝子治療の課題

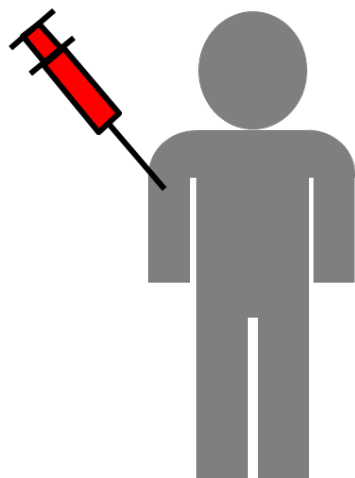
- ウイルスベクターの安全性
- ガイドライン/審査体制の見直し

# 遺伝子治療

- 疾病の治療を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること「遺伝子治療臨床研究に関する指針(文科省、厚労省)」
- 正常の遺伝子を導入して、遺伝子異常を修復する(狭義の遺伝子治療)
- 遺伝子を導入して行う治療(広義の遺伝子治療)

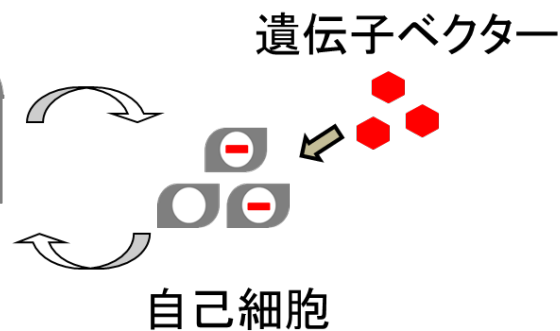
## 体内(in vivo)遺伝子治療

遺伝子ベクターの直接投与



## 体外(ex vivo)遺伝子治療

遺伝子導入細胞の移植

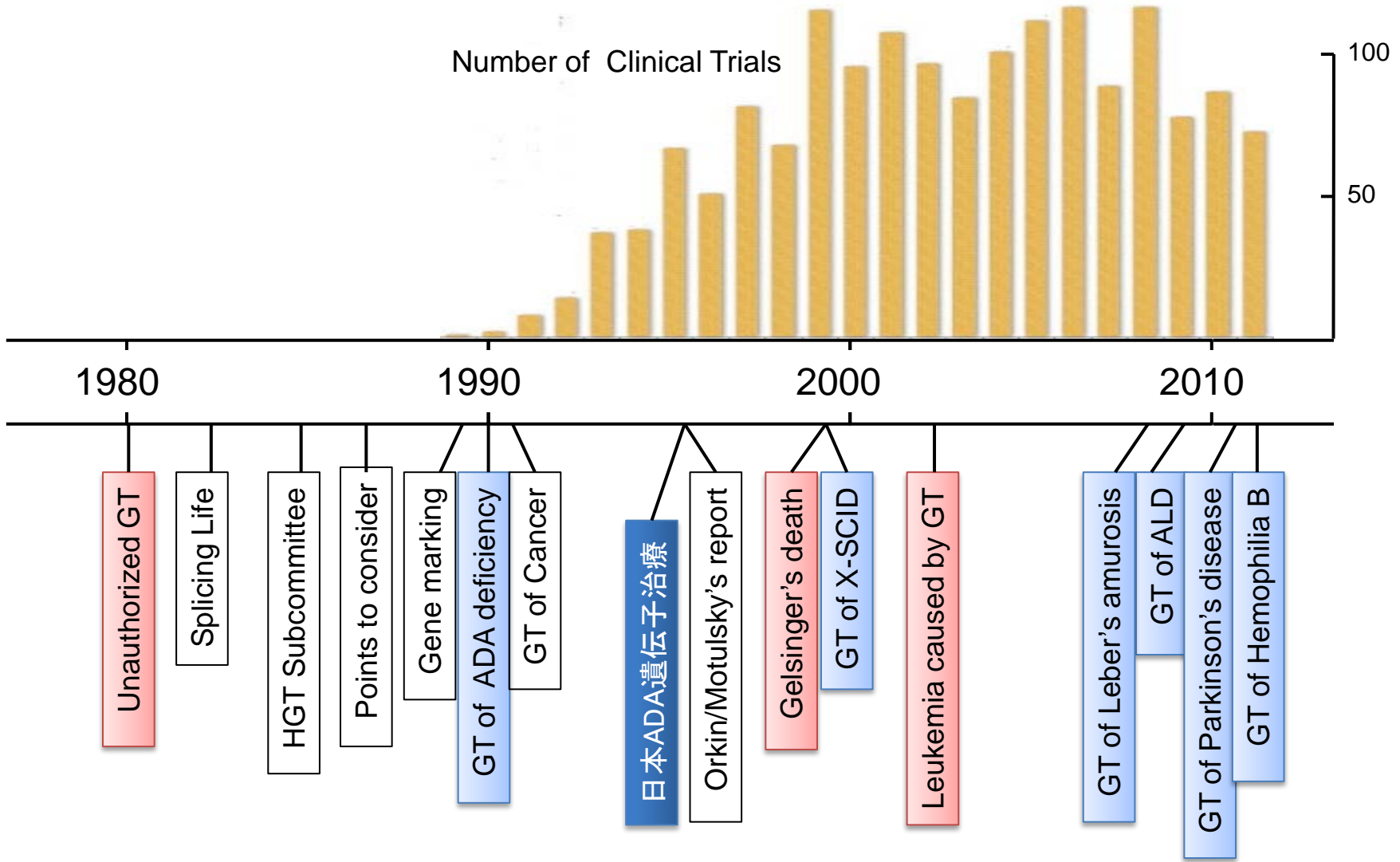


# 遺伝子治療の歴史

---

- 1975 組換えDNA実験の規制 (Asilomar会議) (米)
- 1980 未承認でのヒトへの遺伝子導入 (Cline事件)(米)
- 1982 遺伝子治療の倫理についての議論 (Slicing life) (米)  
生殖細胞の遺伝的改変の禁止、体細胞遺伝子治療の容認
- 1986 NIH遺伝子治療ガイドライン(米)
- 1989 がん患者の遺伝子標識 (米)
- 1990 先天性免疫不全症 (ADA欠損症) の遺伝子治療(米)  
世界最初の遺伝子治療 *First kids with new genes*
- 1991 がんの遺伝子治療 (米)
- 1995 先天性免疫不全症 (ADA欠損症) の遺伝子治療(日)  
日本最初の遺伝子治療
- 1995 遺伝子治療臨床研究の見直し (Orkin, Motulskyレポート) (米)
- 1999 遺伝子治療による死亡事故 (Gelsinger事件)(米)
- 1999 先天性免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療の有効性(仏)  
*The first cure of a genetic disease*
- 2002 ウイルスベクターによる白血病(仏)
- 2009 遺伝性神経変性疾患 (ALD) の遺伝子治療の有効性(仏)  
*A comeback for gene therapy*
- 2011 血友病Bの遺伝子治療の有効性(英、米)

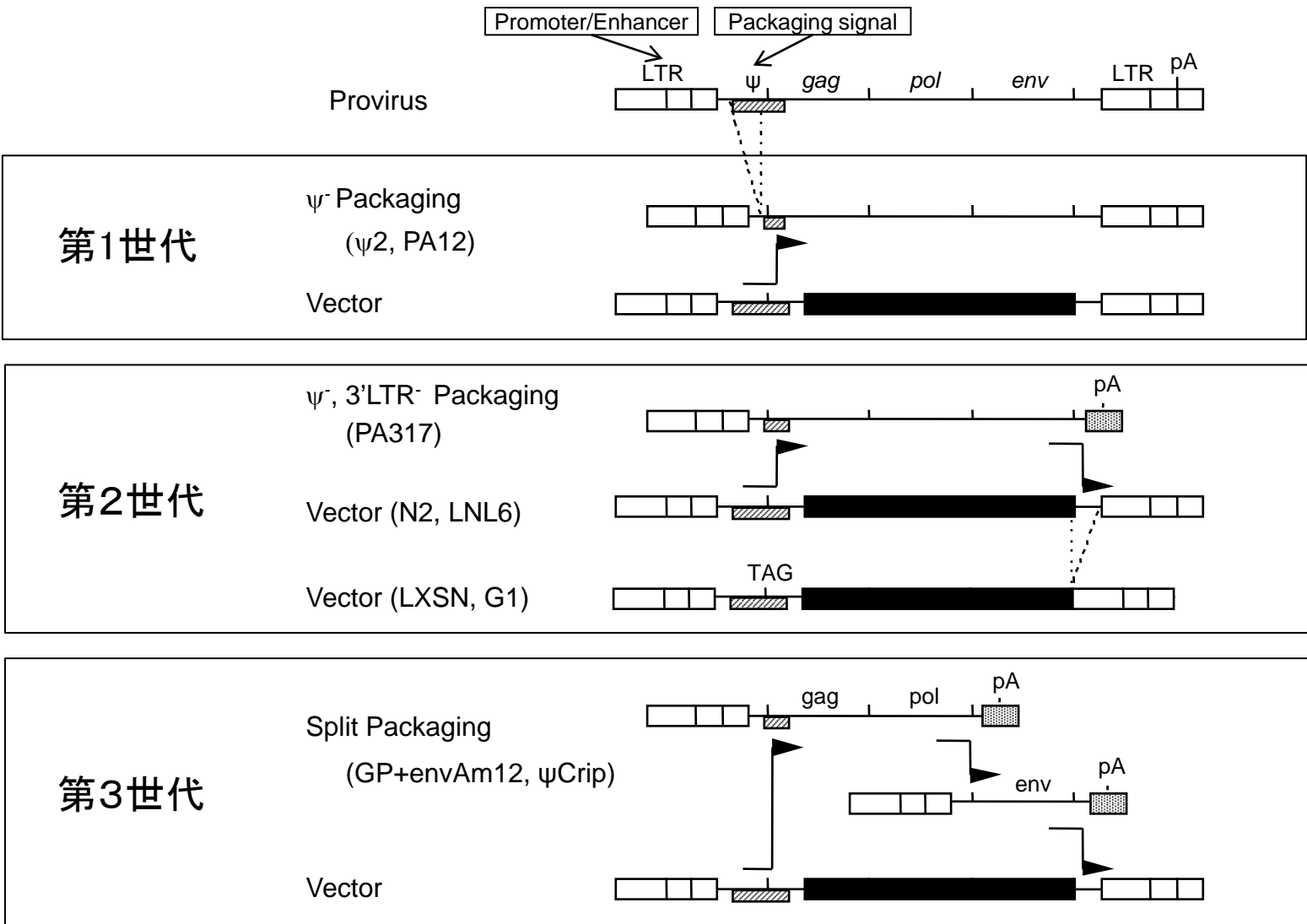
# History of Human Gene Therapy



# 世界最初の遺伝子治療臨床研究に対し NIH(RAC/HGTS)で行われた議論(1984-1990)

1. レトロウイルスベクターの安全性
  - 増殖性ウイルス(RCR)の出現
    - 改良型ベクターの採用
    - 高感度RCR検出系の開発
    - サルでの安全性確認(1990)  
(→サルでリンパ腫の発生(1992))
  - 挿入変異の可能性  
(→→→ヒトで白血病の発症(2002))
2. 有効性
  - 骨髄幹細胞への遺伝子導入を断念して末梢Tリンパ球への遺伝子導入に変更
  - Selective growth advantageが確認された(Bordignon)
3. 倫理性
  - Last hope, Risk/Benefitの評価
  - 最初の遺伝子導入の対象を遺伝病の小児から末期癌の大人の患者に変更
  - 遺伝子治療ではなく遺伝子標識(1989)
  - ADAの遺伝子治療は酵素補充療法の併用(1990)

# レトロウイルスベクターのPackaging System

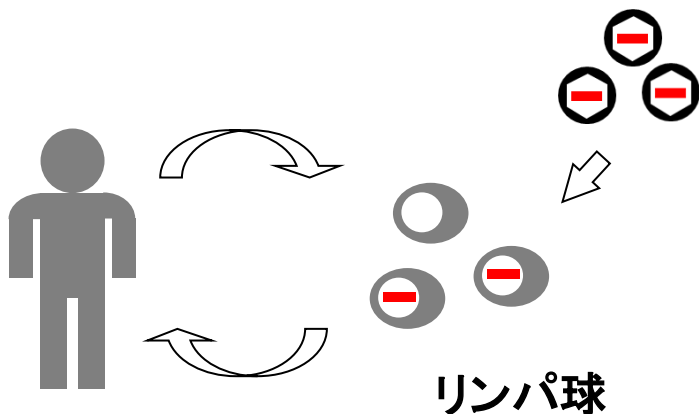


# ADA欠損症(先天性免疫不全症) の遺伝子治療

世界最初の遺伝子治療

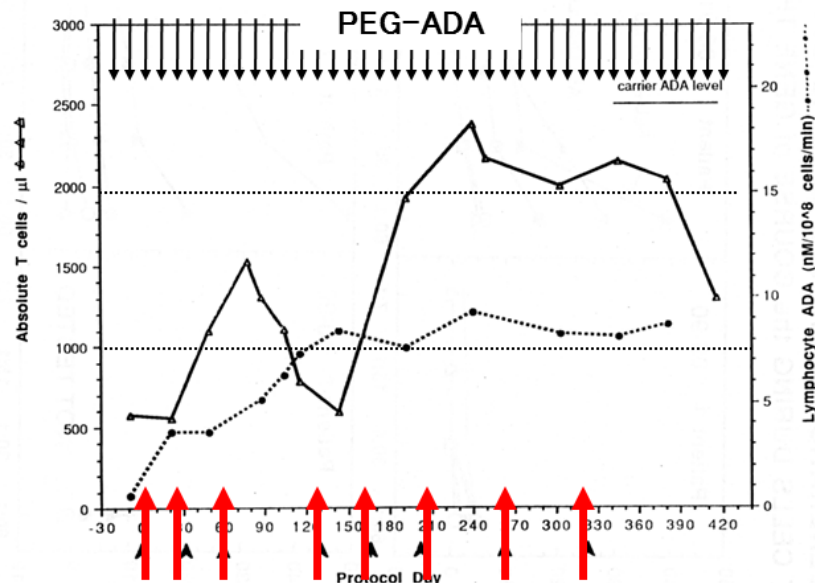
1990, Anderson et al.

レトロウイルスベクター



遺伝子導入リンパ球の繰り返し投与

Blood T Cell Numbers and ADA (patient 1)



(Blaese et al. Science 1995)



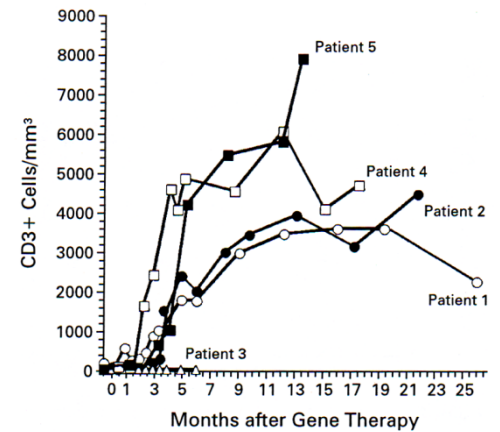
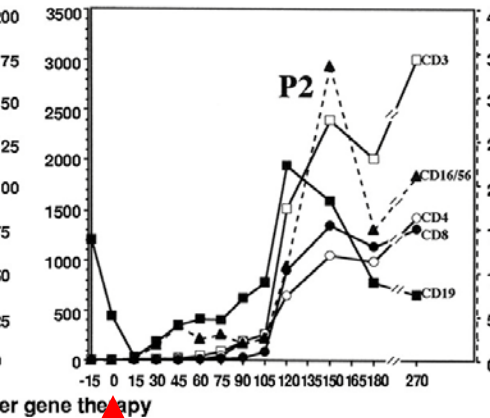
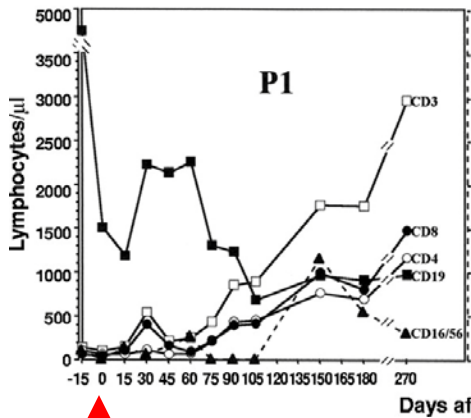
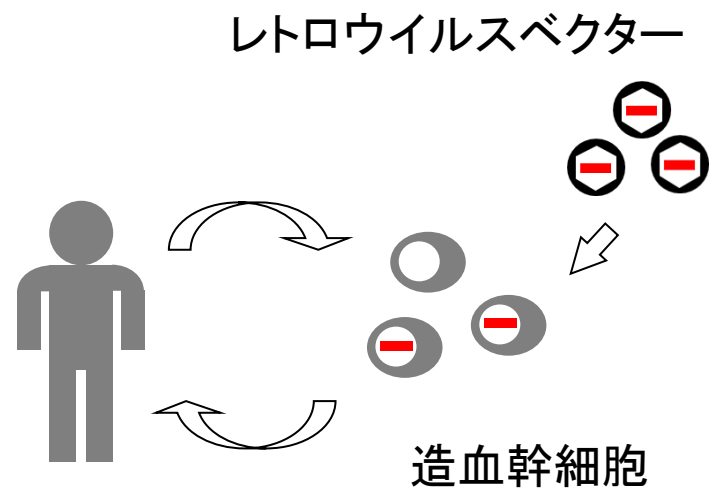
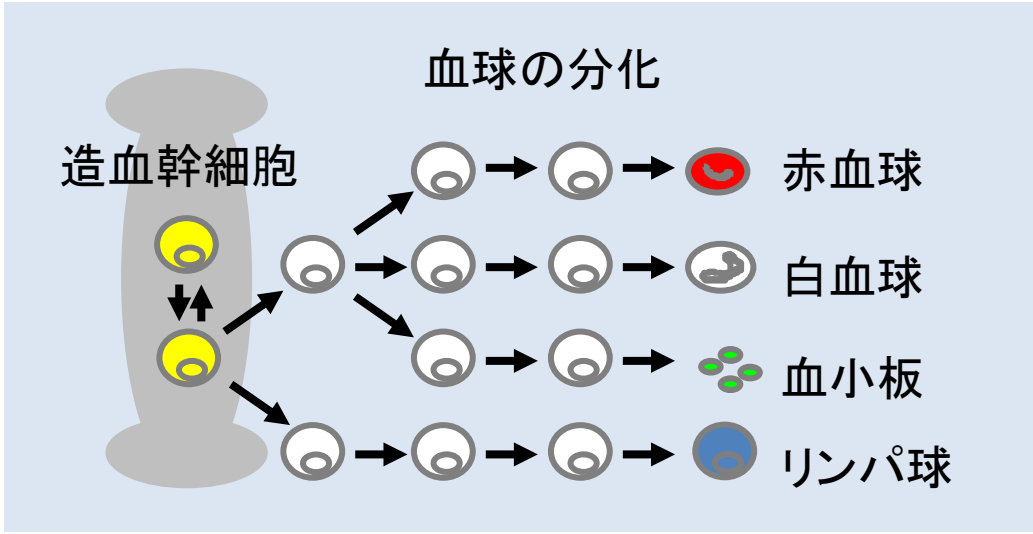
Time, 1993 July



# X連鎖免疫不全症 (X-SCID) の造血幹細胞遺伝子治療

The first cure of a genetic disease

1999, Fischer et al.



遺伝子導入骨髓幹細胞の一回投与

Science 288, 669, 2000  
N Engl J Med 346, 1185, 2002

# X-SCID遺伝子治療後に発症した白血病

SCIENCE VOL298 4 OCTOBER 2002

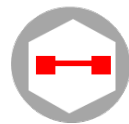
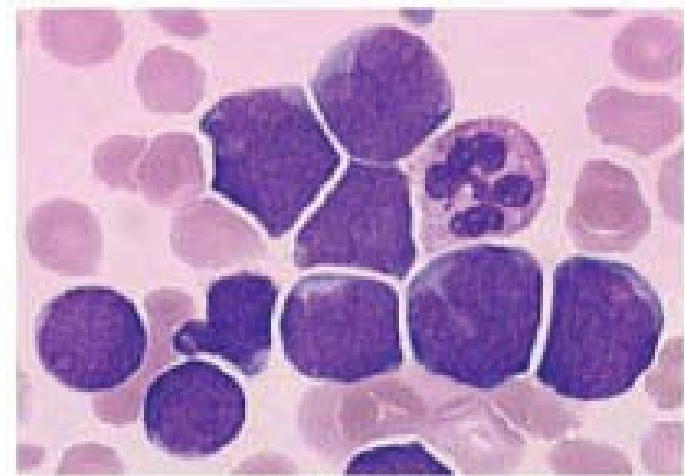
CLINICAL RESEARCH

## Gene Therapy a Suspect In Leukemia-like Disease

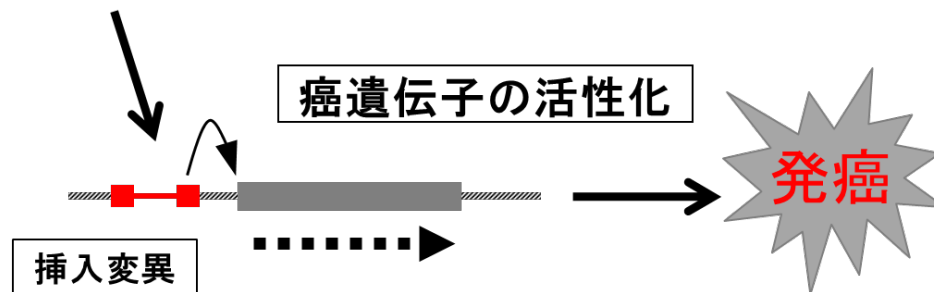
SCIENCE VOL299 17 JANUARY 2003

GENE THERAPY

## Second Child in French Trial Is Found to Have Leukemia



レトロウイルスベクター



RESEARCH ARTICLE

# Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy

Nathalie Cartier,<sup>1,2\*</sup> Salima Hacin-Bey-Abina,<sup>3,4,5\*</sup> Cynthia C. Bartholomae,<sup>6</sup> Gabor Veres,<sup>7</sup> Manfred Schmidt,<sup>6</sup> Ina Kutschera,<sup>6</sup> Michel Vidaud,<sup>1</sup> Ulrich Abel,<sup>6</sup> Liliane Dal-Cortivo,<sup>3,5</sup> Laure Caccavelli,<sup>3,5</sup> Nizar Mahlaoui,<sup>8</sup> Véronique Kiermer,<sup>9</sup> Denice Mittelstaedt,<sup>10</sup> Céline Bellesme,<sup>2</sup> Najiba Lahlou,<sup>11</sup> François Lefrère,<sup>3</sup> Stéphane Blanche,<sup>8</sup> Muriel Audit,<sup>12</sup> Emmanuel Payen,<sup>13,14</sup> Philippe Leboulch,<sup>13,14,15</sup> Bruno l'Homme,<sup>1</sup> Pierre Bougnères,<sup>2</sup> Christof Von Kalle,<sup>6</sup> Alain Fischer,<sup>4,8</sup> Marina Cavazzana-Calvo,<sup>3,4,5\*</sup> Patrick Aubourg<sup>1,2,\*†</sup>

## 副腎白質ジストロフィー (ALD) の遺伝子治療

### 神経系疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療



[http://www.aaas.org/news/releases/2009/1105sp\\_ald.shtml](http://www.aaas.org/news/releases/2009/1105sp_ald.shtml)

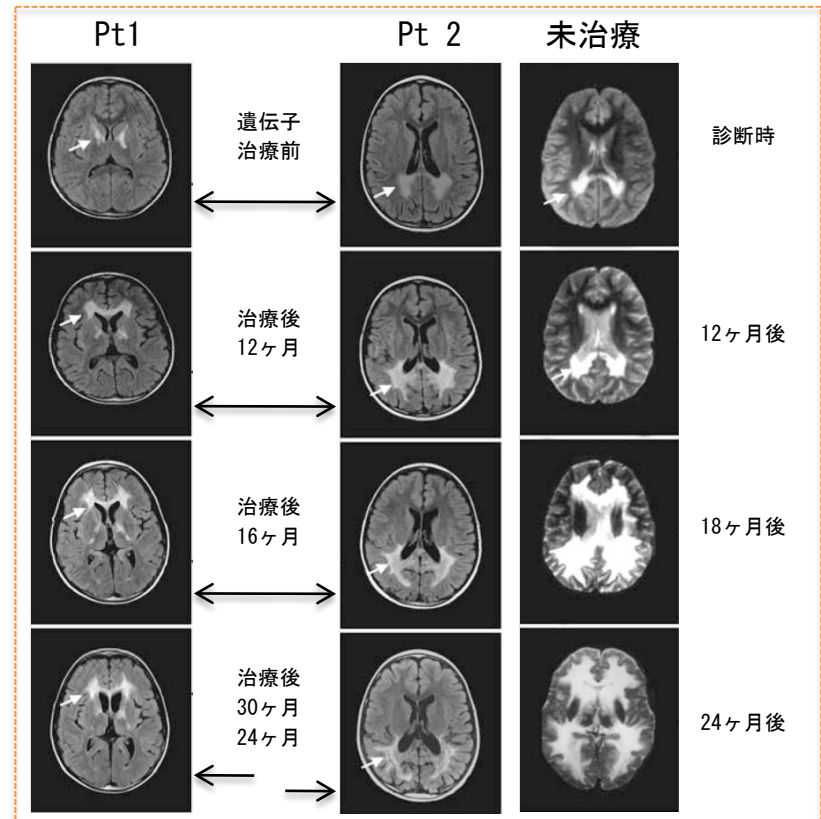
#### Science: Gene Therapy Technique Slows “Lorenzo’s Oil” Brain Disease

A strategy that combines gene therapy with blood stem cell therapy may be a useful tool for treating a fatal brain disease, researchers report in a new study in *Science*.

(Nature 461: 1173, 2009)



(Science 326: 805, 2009)



ORIGINAL ARTICLE

Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B

Nathwani et al., N Engl J Med (2011)

血友病Bの遺伝子治療

AAVベクター  
の静脈内注射

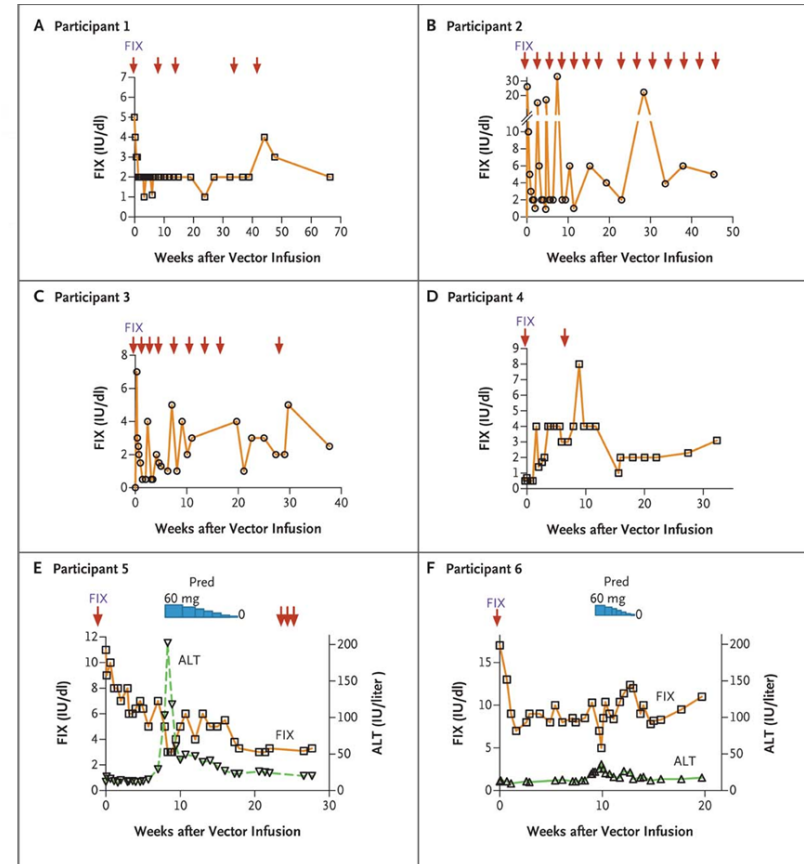


$2 \times 10^{11}$ vg/kg

$6 \times 10^{11}$ vg/kg

$2 \times 10^{12}$ vg/kg

- 6人中4人で凝固因子の投与中止、2人で回数を減少
- 年間医療費が1/10以下
- Baxterが権利取得



# 遺伝子治療の有効性

RV: Retroviral vector  
LV: Lentiviral vector  
AAV: Adeno-associated viral vector

- ADA欠損症(RVを使った造血幹細胞遺伝子治療)
  - 30人以上で治療効果、白血病の報告無し
- X連鎖免疫不全症(RVを使った造血幹細胞遺伝子治療)
  - 20人中17人で治療効果、5人に白血病(4人完全寛解1人死亡)  
(アロ移植の生存率=72%)
- 副腎白質ジストロフィー(LVを使った造血幹細胞遺伝子治療)
  - 2人で進行阻止
- レーバー先天性黒内障(AAVの網膜下投与)
  - 12人全員で光感受性の改善
- 血友病B(AAVの静脈内投与)
  - 6人中4人で凝固因子の予防投与が不要、2人で回数が減少
- βサラセミア(LVを使った造血幹細胞遺伝子治療)
  - 1人で輸血不要、骨髓細胞のクローン増殖(HMGA2)
- パーキンソン病(AAVの脳内投与)
  - シヤム手術対象群に比較した効果
- 癌(RVを使った養子免疫遺伝子治療)
  - TCR(T cell receptor)悪性黒色腫や滑膜肉腫の治療で著効例
  - CAR(Chimeric antigen receptor)CLLの治療で著効例

## 欧米での遺伝子治療の最近の動向

- 米国遺伝子治療学会 (ASGCT) が Target 10 を NIH に提案 (2012)

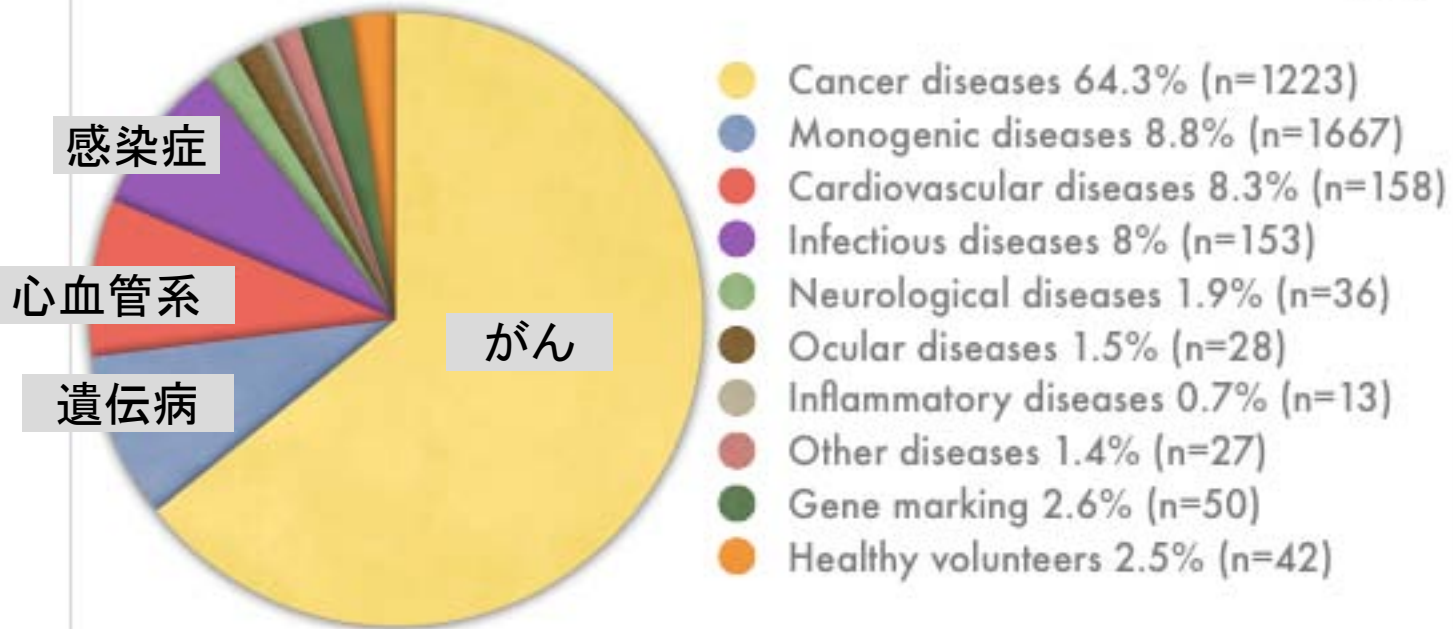
Target 10: 数年以内に実用化可能な遺伝子治療対象疾患

- ①レーバー黒内障、②ADA欠損症、③血友病、④X連鎖免疫不全症、  
⑤パーキンソン病、⑥加齢黄斑変性症、⑦副腎白質ジストロフィー、  
⑧サラセミア貧血、⑨EBVリンパ腫、⑩悪性黒色腫

- ASGCTは遺伝子治療プロトコールのRACでの審査の中止を提案 (2012)
- 大手製薬企業が遺伝子治療に参入
  - 1) GSK (ADA欠損症、Wiscott Aldrich症候群、慢性肉芽腫症、異染性白質ジストロフィー等) (2010)
  - 2) Baxter (血友病) (2012)
- 欧米で最初の遺伝子治療薬の承認
  - Glybera (脂質代謝異常症に対するAAVベクター) (2012)
- 欧米では多くの国際共同治験が計画されている

# 遺伝子治療の対象疾患

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2013 John Wiley and Sons Ltd

[www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

(Jan 2013)

# 遺伝子治療の現状と課題

## 1. 遺伝子治療の歴史

- 世界最初の遺伝子治療
- 遺伝子治療の最近の進歩

## 2. 遺伝子治療の課題

- ウイルスベクターの安全性
- ガイドライン/審査体制の見直し



# 造血幹細胞遺伝子治療 (HSC Gene Therapy)

1. ADA 欠損症: 40人 (日本人2人)  
RV → BMHSC
2. X-SCID: 23人  
RV (20) → BMHSC 5人に白血病 (1人死亡)  
SIN-RV (3) → BMHSC
3. 慢性肉芽腫症 (CGD): 6人  
RV → PBHSC 2人に骨髄異形成症候群 (MDS)
4. Wiskott-Aldrich症候群 (WAS): 13人  
RV (10) → PBHSC 4人に白血病  
LV (3) → PBHSC
5.  $\beta$ -サラセミア: 2人  
LV → BMHSC 1人にクローン増殖
6. 副腎白質ジストロフィー (ALD): 4人  
LV → PBHSC
7. 異染性白質ジストロフィー (MLD): 4人  
LV → BMHSC

RV: Retroviral vector, SIN-RV: SIN Retroviral vector, LV: Lentiviral vector,  
BMHSC: Bone marrow hematopoietic stem cells, PBHSC: Peripheral blood hematopoietic stem cells

➤ 造血幹細胞遺伝子治療を受けた92人中、11人に白血病が発症、1人が死亡

# Clonal Expansion, Myelodysplasias, and Transformation

| Pt(age)/disease/gene                   | Vectors                                      | Effect (mo after treatment)  | Insertion sites               | Other genetic alternations  |
|--|--|--|-------------------------------|---|
| P4(1)/SCID-X1/ $\gamma$ c(Fr)          | MFG/<br>MoMLV LTR                            | T-ALL, mature T cell (30)  | LMO2                          | Translocation (6.13);<br>CDKN2A deletion  |
| P5(3)/SCID-X1/ $\gamma$ c(Fr)          |  | T-ALL, late cortical T cell (34)   | LMO2                          | SIL-TAL microdeletion<br>Trisomy 10<br>Notch mutation (1593F/S)   |
| P7(11)/SCID-X1/ $\gamma$ c(Fr)         |  | T-ALL, late cortical T cell (68)   | CCND2                         | CDKN2A deletion   |
| P10(8)/SCID-X1/ $\gamma$ c(Fr)         |  | T-ALL, late cortical T cell (33)   | LMO2, BMI1                    | Notch mutation (1707A/P)  |
| P8(10)/SCID-X1/ $\gamma$ c(Br)         |  | T-ALL (24)   | LMO2                          | Notch1 mutation (gain-of-function,<br>1559R/P), CDKN2A deletion,<br>TCRb/STIL-TAL1 translocation  |
| P1(25)/XCGD/<br>Gp91 <sup>phox</sup>   | SFFV LTR                                     | Multiple predominant progenitor cell clones (5), subsequent oligoclonal hematopoiesis, monosomy 7 (21), MDS (27) | MDS1-EVI1<br>PRDM16<br>SETBP1 | CpG methylation in promoter of the viral LTR (9); CDKN2B and p15 <sup>INK4B</sup> hypermethylation; phosphorylation of H2AX and DNA double-strand breaks (27)                       |
| P2(26)/XCGD/<br>Gp91 <sup>phox</sup>   |  | Multiple predominant progenitor cell clones (5), subsequent oligoclonal hematopoiesis, monosomy 7 (33), MDS (43) | MDS1-EVI1<br>PRDM16           | CpG methylation in promoter of the viral LTR (15); CDKN2B and p15 <sup>INK4B</sup> hypermethylation; phosphorylation of H2AX and DNA double-strand breaks (43)                      |
| P2(18)/Thalassemia/<br>$\beta$ -globin | $\Delta$ U3HIV LTR<br>+ 2xcHS4<br>insulators | Dominant, myeloid-biased cell clone  | HMGA2                         | Vector rearrangement ;<br>transcriptional activation of HMGA2 in erythroid cells with increased expression of a truncated HMGA2 mRNA insensitive to degradation by let-7 micro-RNAs |

# レトロウイルスベクターの挿入変異による癌化

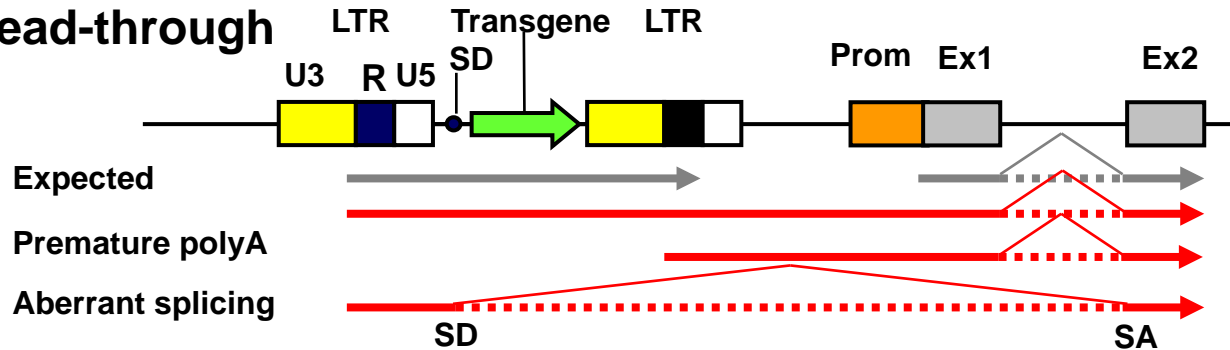
- 挿入変異 (Insertional mutagenesis/oncogenesis)
  - Insertional activation: Read-through、Trans-activation
  - Insertional deregulation: Interruption、Aberrant splicing
- 挿入部位 (IS) の特異性
  - レトロウイルスベクターのISはランダムではない
  - MLVベクター (RV) は染色体遺伝子の転写開始点近傍に偏っている
  - HIVベクター (LV) は遺伝子転写領域に挿入される
- 細胞の特異性
  - 造血幹細胞 (HSC)
  - 末梢リンパ球 (PBL): 免疫、T細胞関連遺伝子への挿入
- 対象疾患の特異性
  - 免疫不全症 (X-SCID、CGD、WAS) の治療でのみ白血病
  - 遺伝性神経疾患 (ALD、MLD) では異常が起きていない
- ベクターの特異性
  - LTR-RVでのみ白血病の発症
  - SIN-RV、SIN-LVでは白血病が起きていない

# Mechanisms of Insertional Oncogenesis

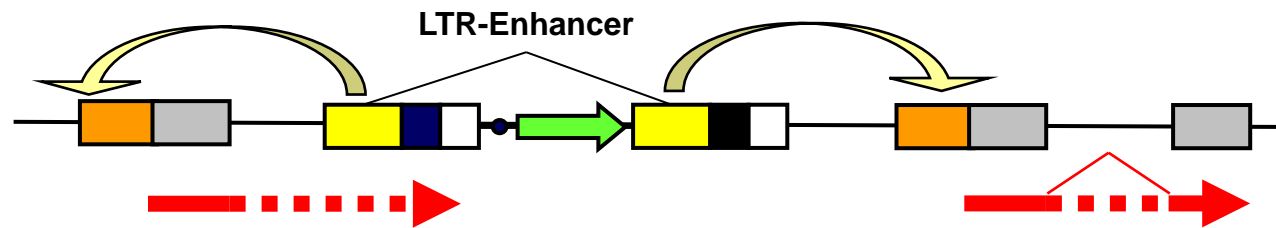
Retrovirus vector

Oncogene

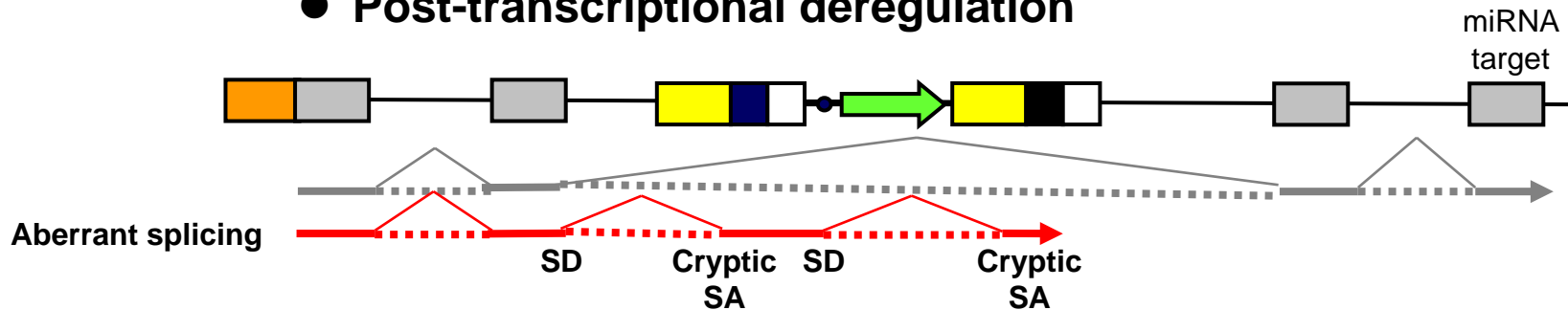
## ● Read-through



## ● Trans-activation

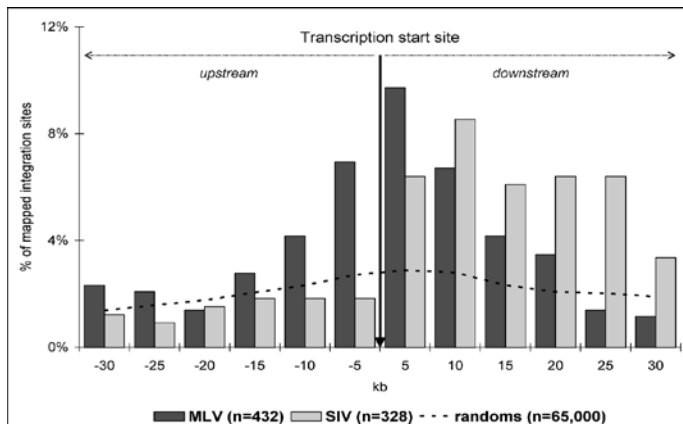
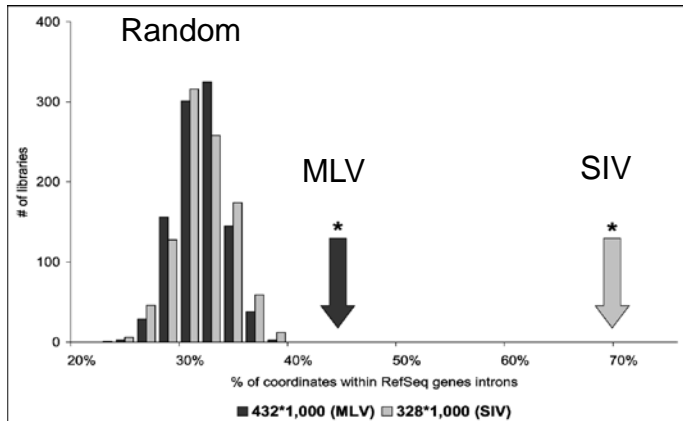


## ● Post-transcriptional deregulation

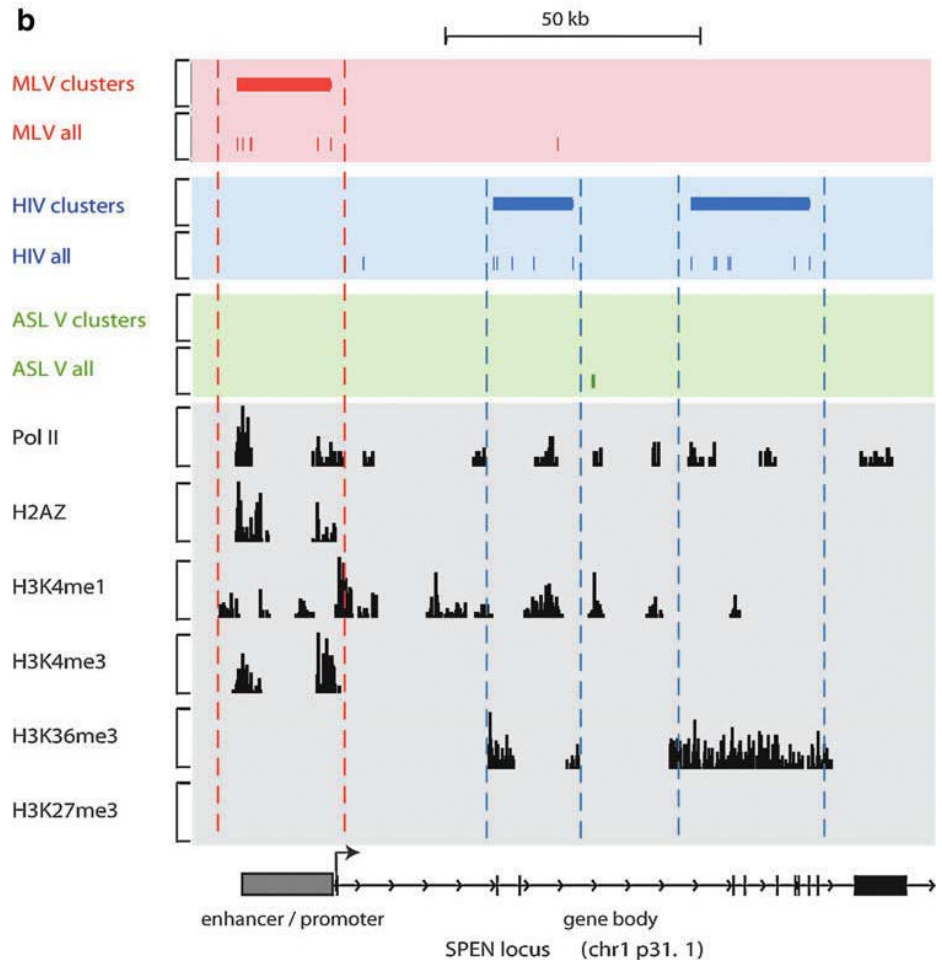


# Retroviral Integration

## Comparison of MLV/SIV integrations



## Association between histone modification and RV integrations



## ChiP-on-chip analysis

Hematti et al, PLoS Biology (2004) Vol. 2, e423

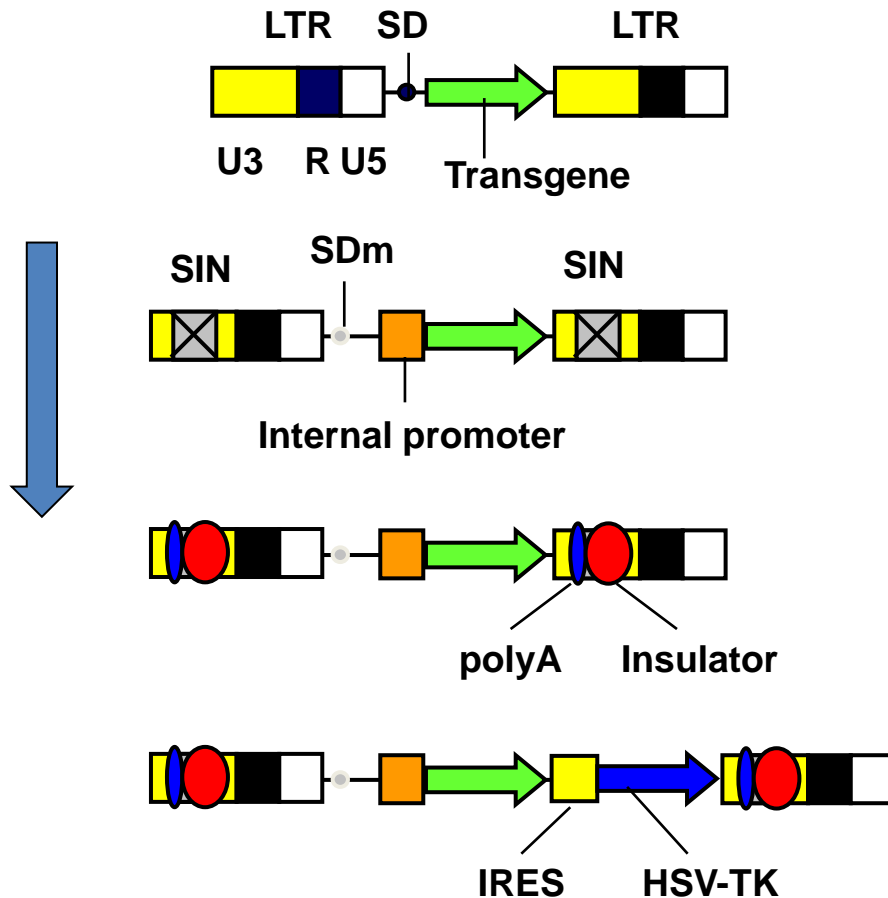
Cavazza et al., Hum Gene Ther (2013) 24:119

## ベクターによる挿入変異を回避できるか？

1. ベクターの改良
2. 部位特異的挿入 (Targeted gene integration)
  - 1) 相同組み換え (Homologous recombination)
  - 2) ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変 (Genome editing)
  - 3) アデノ随伴ウイルス (AAV) の AAVS1 領域への挿入
  - 4) 安全領域 (Safe harbor) への遺伝子挿入
3. iPS細胞を標的とする遺伝子治療

# Improvement of the safety of retroviral vector

1. MLV based retroviral vector → HIV based lentivirus vector
2. Safety modification of vector backbone



1. Deletion of the 3'LTR enhancer → **SIN** vector
2. Use of the non-viral internal promoter (**PGK, EF1 $\alpha$** )
3. Elimination of SD
4. Addition of the stronger polyA
5. Insertion of the **insulator**
6. Addition of the suicide gene (**HSV-TK**)

# Targeted gene integration

1. Homologous recombination
  - 1) Plasmid (knockout mouse)
  - 2) Adeno-associated virus (AAV) vector
  - 3) Adenovirus vector
2. Nuclease mediated integration (Genome editing)
  - 1) ZFN (Zinc-finger nuclease)
  - 2) TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)
    - Non-homologous end joining (NHEJ)
    - Homology directed repair (HDR)
3. AAV-Rep mediated integration into the AAVS1 site in Chr. 19
4. Genomic safe harbors (GSH)

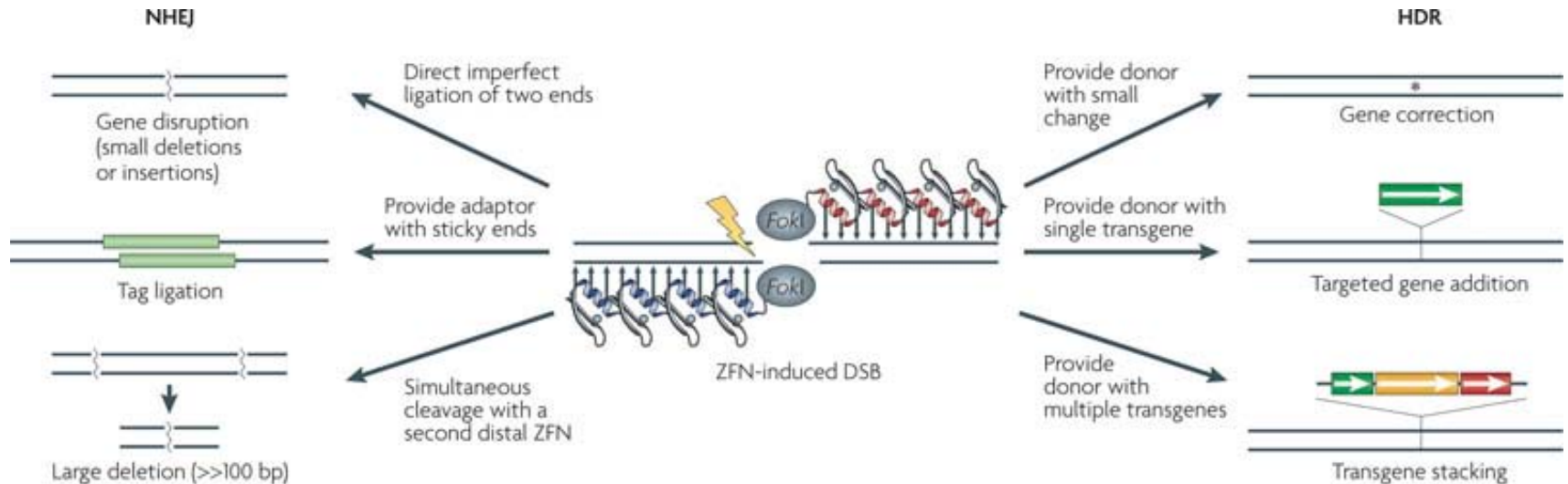
Criteria: (1) Outside a gene transcription unit (2) > 50kb from 5' end of any gene (3) > 300kb from oncogene (4) > 300kb from any miRNA (5) Outside of ultra-conserved regions



# Genome editing with artificial nucleases

## Non-homologous end joining (NHEJ)

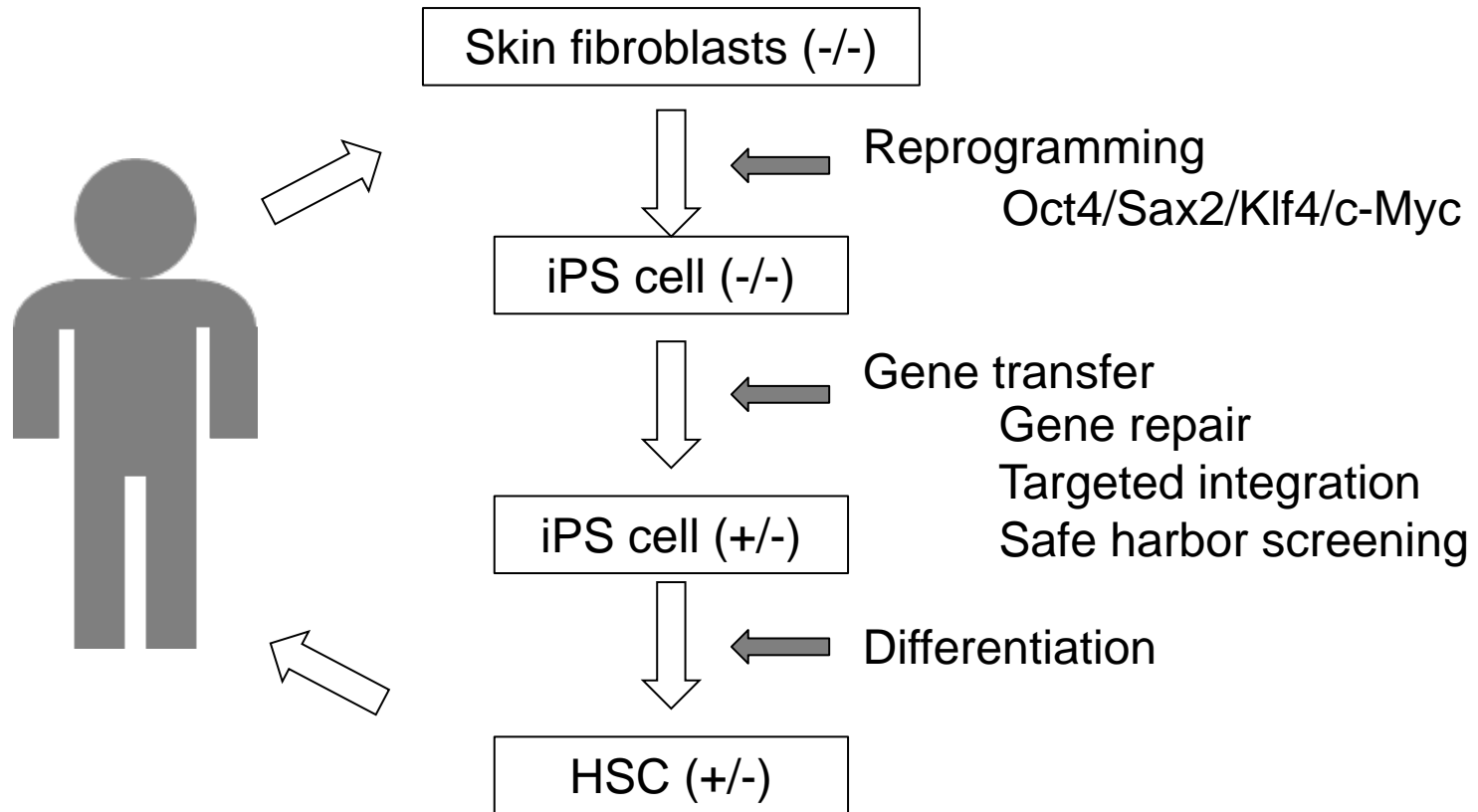
## Homology directed repair (HDR)



Zinc-finger nuclease (ZFN) induced double strand break (DSB)

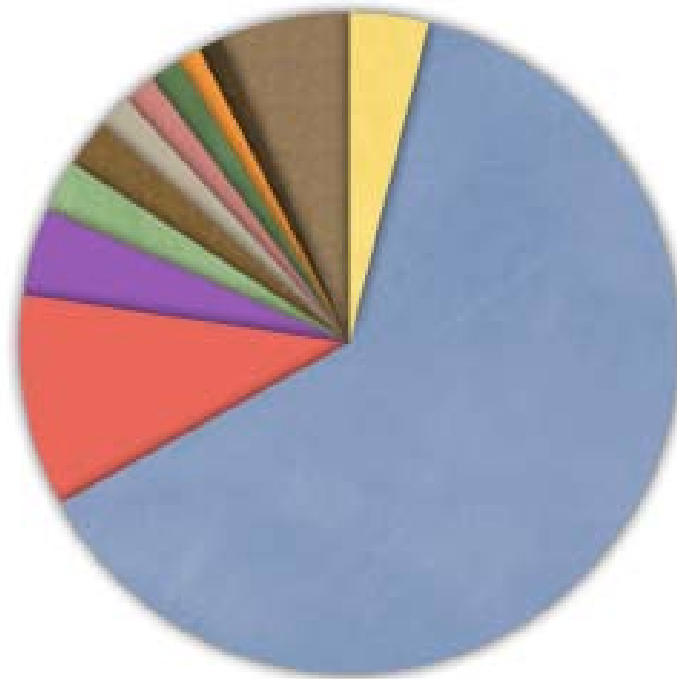
Nature Reviews | Genetics

# Gene Therapy using iPS derived HSC



## 遺伝子治療の国別プロトコール数

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials  
(by Country)



- Multi-country 3.9% (n=74)
- USA 63% (n=1199)
- UK 10.4% (n=198)
- Germany 4.3% (n=81)
- Switzerland 2.6% (n=49)
- France 2.4% (n=45)
- Netherlands 1.7% (n=32)
- Australia 1.6% (n=30)
- China 1.5% (n=29)
- Belgium 1.2% (n=22)
- Canada 1.2% (n=22)
- Other countries 6.4% (n=121)

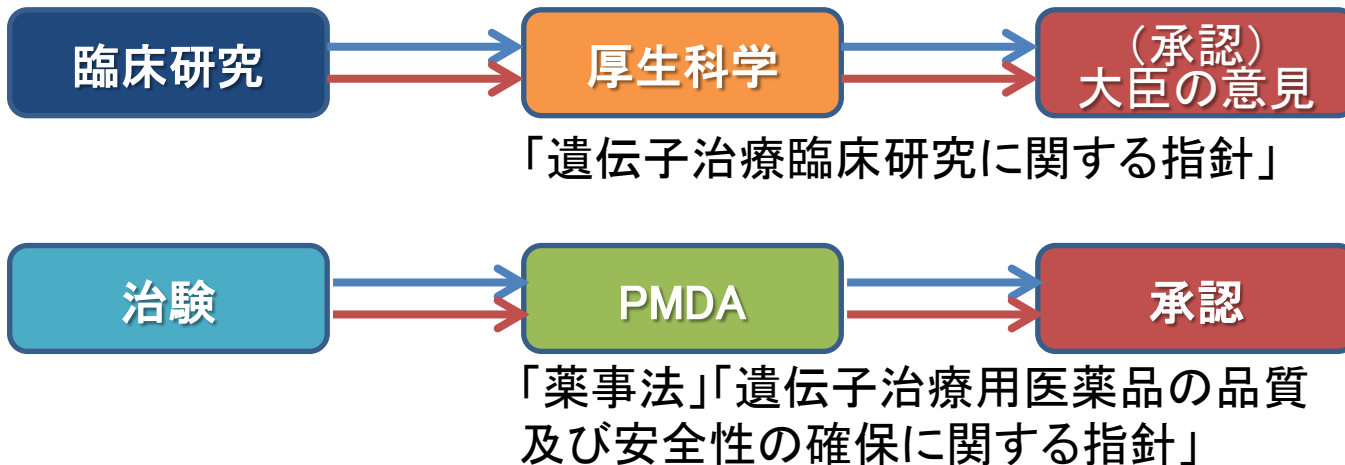
# 日本の遺伝子治療が遅れている理由

1. 遺伝子治療研究に対する公的研究費が少ない
  - 日本オリジナルの研究が進まない
  - 臨床研究が始められない
2. 研究者の数が少ない
  - 若手研究者が幹細胞研究に流れてしまう
3. 臨床用ウイルスベクターの供給体制が整備されていない
  - 研究者が利用できる施設は限られている(東大医科研)
  - 企業からの参入も少ない
    - タカラバイオ(レトロウイルスベクター)
    - ディナベック(センダイウイルスベクター)
4. 臨床プロトコルの申請、審査が煩雑で時間がかかる.
  - 欧米では長くとも半年以内、日本では1年以上かかることがある
  - 施設内審査と中央審査(科学技術部会+作業委員会)の2段階審査
  - PMDAとの連携が取れていない(臨床研究で終わっている)
  - 審査側に専門家が少ない

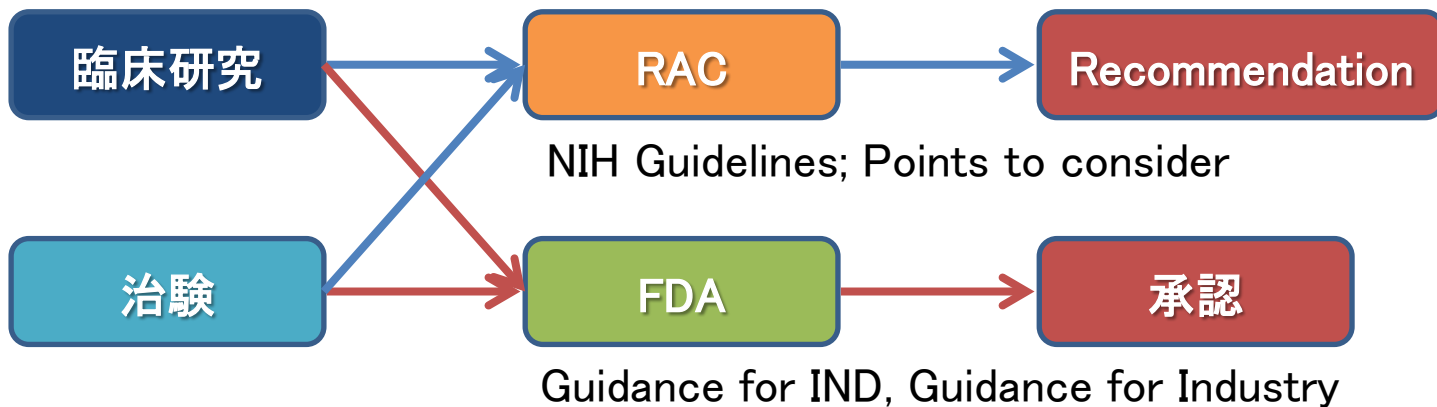
# 遺伝子治療の中央での審査体制

→ プロトコルの科学的妥当性  
→ ベクターの品質、安全性

## 日本



## 米国



平成22年度厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)

## 遺伝子治療臨床研究推進のための 指針見直しに向けた調査研究

研究代表者 島田 隆 日本医科大学教授

＜目的＞遺伝子治療は組換えDNA技術を応用して、患者に遺伝子を導入し疾患を治療しようとする先端医療技術であり、様々な難治性疾患の新しい治療法として期待されている。日本での遺伝子治療の臨床研究は欧米に比較して大きく遅れている。その原因の一つとして申請手続きが煩雑で、審査に時間がかかることが上げられる。最新の科学の進歩や、臨床研究に対する国民の考え方を反映した新たな「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を作り、我が国の遺伝子治療研究を活性化し、迅速な臨床応用を可能にすることを目的とする。

平成24年度医薬品等審査迅速化事業費補助金  
(革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業)

遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発にむけた  
安全性、有効性評価法の確立・ガイドライン作成・人材育成

国立成育医療研究センター(NCCHD)

日本医科大学

医薬品医療機器総合機構(PMDA)

国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)

事業実施機関は、レギュラトリーサイエンスの考え方を踏まえて、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)及び国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)と連携・人材交流を行い、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品の安全性と有効性の評価方法の確立に資する研究を実施し、国が作成する新薬・新医療機器審査・安全対策のガイドラインの世界初または世界同時発信につなげる。本事業により、レギュラトリーサイエンスの推進による医療イノベーションの社会的調和を図るとともに、アカデミア、審査側双方において、革新的技術及びレギュラトリーサイエンスに精通した人材育成及びそのための体制の確立にも資するものである。

# 遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発にむけた 安全性、有効性評価法の確立・ガイドライン作成・人材育成

