

【別添様式】

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業

最終報告書（平成24年度～28年度）

研究機関名：国立成育医療研究センター

研究事業名	遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発に向けた安全性、有効性評価法の確立・ガイドライン作成・人材育成
分類	医薬品主体 ・ 医療機器主体 ・ 再生医療主体
1. 研究の概要 現在、欧米では数多くの遺伝性疾患に対する遺伝子治療が実施され、その有効性、安全性が実際の臨床の場で証明されている。そして、それを受け平成28年5月にはアデノシン・デアミナーゼ（ADA）欠損症に対する <i>ex vivo</i> 遺伝子治療が Strimvelis として欧州医薬品庁（EMA）より医薬品として承認された。また、ウイスコット・アルドリッチ症候群（WAS）や副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、遺伝性網膜疾患、ライソゾーム病、血友病などの遺伝性疾患に対する遺伝子治療が企業治験として実施されている。一方、我が国の遺伝子治療は、その多くが「医薬品としての製造販売承認取得を目的としないアカデミアによる臨床研究」に留まり、製造販売承認を目的とした治験実施に至ったものは極めて少ない。同時に、遺伝子治療に対する審査体制も国内外では異なり、日本では遺伝子治療臨床研究の品質・安全性に関する事項は厚生科学審議会（再生医療等評価部会）のみで審査され、医薬品/再生医療等製品の開発につながる医薬品医療機器総合機構（PMDA）の審査を受けていない。このため、治験が求める品質・安全性基準を満たす臨床研究が少なく、海外企業の治験への参入や日本発の国際共同治験の実施を困難にしている。本研究事業では遺伝性難病に対する我が国独自の遺伝子治療用品開発のため、レンチウイルス（LV）ベクターとアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの遺伝子治療用製品等に焦点を当て、先導的開発研究を実施することで、そこで必要となる安全性・有効性の評価項目を洗い出し、研究機関や企業、国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）が連携して一定の検査項目等を提案し、最終的に PMDA が Advisory Body とともにガイドラインとしての遺伝子治療の安全性・有効性評価法を策定することを目標とする。	
2. 研究の概要及び成果について (1) ガイドライン等の策定に必要な試験・研究 (平成24年度) <ul style="list-style-type: none">・培養上清中のウイルス粒子ゲノム配列を次世代シーケンサーにて解析し、その変異率を算定した。・次世代シーケンサーを用いた遺伝子導入部位の網羅的解析を行った。・遺伝子導入細胞の <i>in vitro</i> で培養し、その不死化率を予測する <i>in vitro</i> 不死化アッセイ（IVIM）系を確立した。・高感度・高精度のデジタル PCR を用いてウイルスベクターの定量解析を可能にする系の確立を目指した。・低フォスファターゼ症（HPP）の胎児/新生児遺伝子治療法の有効性を世界で最初に報告	

した。

- ・ 異染性白質ジストロフィーの非侵襲的治療法として発症前の新生児遺伝子治療と発症後の髄腔内遺伝子治療の有用性を明らかにした。

- ・ AAV ベクターの大量生産法の標準化を目指した。

(平成 25 年度)

- ・ 遺伝子導入細胞より 3 種類のライブラリー (Paired-End ライブラリー: 平均 300bp と 1kp のフラグメント、Mate-Pair ライブラリー: 平均 3kbp のフラグメント) を調製し、その遺伝子配列を次世代シーケンサーにて解析し、1kp のフラグメントが最も効率が良いことを示した。

- ・ LV や AAV などの一過性ウイルス産生法では時に産生されたウイルスゲノム内に遺伝子変異が入ることを示した。

- ・ ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の測定法として、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。

- ・ AAV ベクターを HPP モデルマウスの新生児の静脈或いは胎児の腹腔内に投与することで生存期間の著明な延長、痙攣の抑制、骨化や運動機能の改善が認められた。

- ・ 無血清培地中に分泌されたベクター粒子を限外ろ過、硫酸分画、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムにて精製し、その最終標品を SDS-PAGE、western blot、電子顕微鏡、定量 PCR (qPCR) にて評価したところ empty 粒子の少ない、極めて高い純度を持つことが確認された。

(平成 26 年度)

- ・ 微量検体による解析系の確立、プラスミドや細胞の状態が品質に与える影響を評価した

- ・ 次世代シーケンサーを用いて実際の遺伝子治療を受けた患者検体を用いて、その導入部位を同定した。

- ・ ウイルスベクターの insertional mutagenesis の頻度を IVIM の系で検討した。

- ・ Droplet digital PCR を用いて 1 細胞あたりに導入されたベクターコピー数を算定し、遺伝子治療後の各細胞集団における遺伝子導入効率を評価した。

- ・ タカラバイオと連携で、臨床用 AAV ベクターの新規大量作製法の開発と品質評価系の確立を行った。超遠心分離法を使用せずにクロマトグラフィー技術のみで、1 型 AAV ベクター (AAV1) を精製する方法を確立した。

(平成 27 年度)

- ・ 次世代シーケンサーを用いて実際に遺伝子治療を受けた患者検体の導入部位を同定した。

- ・ ウイルスベクターの insertional mutagenesis の頻度を IVIM の系で検討した。

- ・ Droplet digital PCR を用い、1 細胞あたりに導入されたベクターコピー数を算定し、遺伝子治療後の各細胞集団における遺伝子導入効率を評価した。

- ・ タカラバイオと連携で、臨床用 AAV ベクターの新規大量作製法の開発と品質評価系の確立を行った。AAV1 のスケラビリティを確認した。また、超遠心分離法を使用せずにクロマトグラフィー技術のみで 9 型 AAV ベクター (AAV9) を精製することに成功し、こちらもスケラビリティも確認した。

- ・ 医師主導治験に向け HPP と異染性白質ジストロフィー (MLD) の遺伝子治療の有効性と安全性についての非臨床研究を行った。

(平成 28 年度)

- ・次世代シーケンサーを用いて実際に遺伝子治療を受けた患者検体の導入部位を同定し、その安全性に関して評価した。
- ・ウイルスベクターの insertional mutagenesis の頻度を IVIM の系で検討した。
- ・Droplet digital PCR を用い、1 細胞あたりに導入されたベクターコピー数を算定し、遺伝子治療後の各細胞集団における遺伝子導入効率を評価した。
- ・タカラバイオと連携で、臨床用 AAV ベクターの新規大量作製法の開発と品質評価系の確立を行った。AAV9 精製法の再現性と、その精製法が同じ血清型でゲノム構造の異なる様々なベクターにも応用できることを確認した。
- ・医師主導治験に向け HPP と異染性白質ジストロフィー (MLD) の遺伝子治療の有効性と安全性についての非臨床研究を行った。

(2) ガイドライン等の策定

(平成 24 年度)

治験に関する指針として平成 7 年に通知された「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」があるが、その内容が科学技術の進歩や臨床試験の経験を必ずしも反映されておらず、品質や安全性担保に関する項目の整備が必要である。また、国際共同治験等の実施には海外の規制動向の反映も必要である。当該年度は、欧米の指針と比較・検討し、本邦の指針における各項目の問題点とその修正案の提示を行った。

(平成 25 年度)

欧米の指針等との比較の下、治験開始までに明らかにすべき事項を示す改正素案（一次案）を作成し、また、現在、厚生科学審議会の専門委員会で改正が行われている「遺伝子治療臨床研究の指針」との整合性を考慮して製法や品質特性解析・規格設定、非臨床試験に関しても見直しを行い、その二次案を作成した。

(平成 26 年度)

遺伝子治療の治験を行う際の基本指針となる現行の「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」の修正案を作成した。これは、近年の遺伝子治療関連技術の進歩や臨床経験、海外の規制動向を反映した修正案であり、特に品質、安全性に関して治験開始までに明らかにすべき事項を明記し、同時に、厚生科学審議会で改正作業が行われている「遺伝子治療臨床研究に関する指針」と整合性を図ることで臨床研究から治験へのスムーズな移行を目指しており、12 月末に厚生労働省医薬食品局審査管理課と PMDA に修正案を提案し、一部、コメントを得た。

(平成 27 年度)

・現行の「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」を基に厚労省・審査管理課や PMDA に対して作成に関する方向性を訊ね、その上で作成した案を平成 27 年 3 月に関連学会（日本遺伝子細胞治療学会、日本再生医療学会）及び関連団体（日本製薬工業協会、再生医療イノベーションフォーラム）に提示して、多数の意見を聴取した。そして、これらコメントを基に修正案となる「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」（最終案）と Q&A を作成して、同年 10 月末に当該班の成果物として審査管理課に提出した。

(平成 28 年度)

・ 遺伝子治療用製品等の品質及び安全性確保に関する指針改定案の作成について
現行の「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」を基に厚労省・審査管理課や PMDA に対して作成に関する方向性を訊ね、その上で作成した案を平成 27 年 3 月に関連学会（日本遺伝子細胞治療学会、日本再生医療学会）及び関連団体（日本製薬工業協会、再生医療イノベーションフォーラム）に提示して、多数の意見を聴取した。そして、これらコメントを基に改正案となる「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」（最終案）と Q&A を作成して、昨年 10 月末に当該班の成果物として審査管理課に提出した。現在、PMDA で確認・修正いただいた案の最終確認を行った。

・ AAV のリフレクションペーパーの作成
AAV ベクターの製造品質管理に関して、既知の知見と本事業で得られた作製・精製法・品質評価法を総合的に勘案し、また、AAV ベクター品質評価における課題とその解決法の提言も盛り込んだリフレクションペーパーを作成した。

・ LV 及び AAV の遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）の第一種使用承認申請に必要な生物多様性影響評価書の記載例の作成
遺伝子治療を行う際に使用するウイルスベクターの virus shedding に関する生物多様性影響評価（カルタヘナ法）は必須であり、関係各省に生物多様性影響評価書と共に第一種使用規程承認申請書を提出する必要があるが、その記載方法・内容が明確に示されていないため、資料作成に困難を伴うことが多い、このため、本班では記載方法・内容を検討し、リフレクションペーパーとして記載内容を提示した記載例を提示した。

3. 研究の組織体制及び人材交流実績等について

（1）組織体制

（平成 24 年度）

総括研究代表者：小野寺雅史（成育）、副総括研究代表者：島田隆（日本医大）

- ・ ガイドラインの作成：小野寺、島田、土田尚（成育）、内田恵理子（NIHS）、PMDA 担当者
- ・ ウイルス安全性検査：小野寺、五十嵐友香（成育）、山元茉莉（成育）、内田
- ・ AAV に関する基礎研究：島田
- ・ 遺伝子治療の治験への取り組み：小野寺、土田

（平成 25 年度）

- ・ ガイドラインの作成：小野寺、島田、土田尚（成育）、内田恵理子（NIHS）、PMDA 担当者
- ・ ウイルス安全性検査：小野寺、五十嵐（成育）、山元（成育）、伴野太郎（日医）、内田
- ・ AAV に関する基礎研究：島田、伴野
- ・ 遺伝子治療の治験への取り組み：小野寺、土田

（平成 26 年度）

- ・ ガイドラインの作成：小野寺、川本恵（成育）、島田、内田、PMDA 担当者
- ・ ウイルス安全性検査：小野寺、五十嵐、岡田、伴野、内田
- ・ AAV に関する基礎研究：島田、岡田、伴野
- ・ 遺伝子治療の治験への取り組み：小野寺、川本、五十嵐

（平成 27 年度）

- ・ ガイドラインの作成：小野寺、川本、島田、内田、PMDA 担当者
- ・ ウイルス安全性検査：小野寺、五十嵐、岡田、伴野、内田
- ・ AAV に関する基礎研究：島田、岡田、伴野

- ・ 遺伝子治療の治験への取り組み：小野寺、川本、五十嵐
(平成 28 年度)
- ・ ガイドラインの作成：小野寺、川本、島田、内田、PMDA 担当者
- ・ ウイルス安全性検査：小野寺、岡田、伴野、内田
- ・ AAV に関する基礎研究：岡田、島田、伴野
- ・ 遺伝子治療の治験への取り組み：小野寺、川本
(2) 人材交流の状況・効果
(平成 24 年度)
(1) NIHS
- ・ 時限付常勤職員の五十嵐が常駐派遣員として勤務した。
- ・ 内田が月に一回程度成育または日本医大を訪問し、進捗状況・研究方針などについての意見交換を行った。
- (2) PMDA
- ・ 当センター医師土田が月二回程度 PMDA に出向き、意見交換を行った。
- ・ PMDA 側より担当者が月 1 回成育を訪問し、遺伝子治療に関する意見交換を行った。
- ・ PMDA で合計 4 回の遺伝子治療に関するセミナーを開催した。
(平成 25 年度)
(1) NIHS
- ・ 時限付常勤職員の五十嵐が常駐派遣員として勤務し、時限付非常勤職員の伴野が AAV に関する技術習得のため日本医大にて研究を行った。
- ・ 内田が月に一回程度成育または日本医大を訪問し、進捗状況・研究方針などについての意見交換を行った。
- (2) PMDA
- ・ 当センター医師土田が月二回程度 PMDA に出向き、意見交換を行った。
- ・ PMDA 側より担当者が月 1 回成育を訪問し、遺伝子治療に関する意見交換を行った。
- ・ PMDA で合計 3 回の遺伝子治療に関するセミナーを開催した。
(平成 26 年度)
(1) NIHS
- ・ 時限付常勤職員の五十嵐が常駐派遣員として勤務し、時限付非常勤職員の伴野が AAV に関する技術習得のため日本医大にて研究を行った。
- ・ 内田が月に一回程度成育または日本医大を訪問し、進捗状況・研究方針などについての意見交換を行った。
- (2) PMDA
- ・ 時限付常勤職員の川本が常駐派遣員として勤務し、ガイドライン作成に関して研究者側と PMDA 側との連携役を努めた。
- ・ PMDA 側より担当者が月 1 回成育を訪問し、遺伝子治療に関する意見交換を行った。
(平成 27 年度)
(1) NIHS
- ・ 時限付常勤職員の五十嵐が常駐派遣員として勤務し、時限付非常勤職員の伴野が AAV に関する技術習得のため日本医大にて研究を行っている
- ・ 内田が月に一回程度成育または日本医大を訪問し、進捗状況・研究方針などについての

意見交換を行った。

(2) PMDA

- ・時限付常勤職員の川本が常駐派遣員として勤務し、ガイドライン作成に関して研究者側とPMDA側との連携役を努めた。
- ・PMDA側より担当者が月1回成育を訪問し、遺伝子治療に関する意見交換を行った。

(平成28年度)

(1) NIHS

- ・時限付非常勤職員の伴野がAAVに関する技術習得のため日本医大にて研究を行っている。
- ・内田が月に一回程度成育または日本医大を訪問し、進捗状況・研究方針などについての意見交換を行った。

(2) PMDA

- ・時限付常勤職員の川本が常駐派遣員として勤務し、ガイドライン作成に関して研究者側とPMDA側との連携役を努めた。
- ・PMDA側より担当者がH28年5月まで月1回成育を訪問し、遺伝子治療に関する意見交換を行った。

4. その他（論文等を含む）

(1) 慢性肉芽腫症（CGD）に対する遺伝子治療臨床研究について

成育医療研究センターは慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を実施しており、その一例目は平成26年7月に行った。その後、約2年半を経過したが、現時点まで遺伝子治療に関する有害事象の発症はなく、末梢血中の遺伝子導入細胞数は減少しているものの感染症の罹患率は遺伝子治療開始前と比べて減少している。

(2) 医師主導治験導入に関して

WAS遺伝子治療に対する医師主導治験におけるPMDAとの対面助言は、臨床プロトコルに関しては1回（H28年2月25日）、品質に関しては2回（H28年3月11日、8月26日）実施し、非臨床安全性試験に関してはH28年12月1日に実施した。なお、カルタヘナ第一種使用規程承認申請書に関してはH28年8月10日に承認を得ており、H29年第3四半期にはWASに対する遺伝子治療の治験を開始したいと考えている。

(3) 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム開催について

毎年1月第三木曜日に「国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム」を開催し、その中で、遺伝子治療に関する規制等に関して話し合ってきた。特に、平成29年1月に開催された第7回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム（当番世話人 国立成育医療研究センター 小野寺 雅史）では、AMED平成28年度「医薬品等規制調和・評価研究事業・遺伝子治療におけるカルタヘナ法の第一種使用規程の考え方に関する研究」の班会議を開催した。