

## 遺 伝 子 治 療 等 臨 床 研 究 終 了 報 告 書

平成30年11月20日

厚生労働大臣 殿

研 究 機 関	所 在 地	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
	名 称	国立研究開発法人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	国立研究開発法人国立成育医療研究センター 理事長 五十嵐 隆



下記の遺伝子治療等臨床研究について、別添の総括報告書を提出します。

## 記

遺 伝 子 治 療 等 臨 床 研 究 の 課 題 名	研 究 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	国立研究開発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

## 遺 伝 子 治 療 等 臨 床 研 究 総 括 報 告 書

申 請 年 月 日	平成23年 9月29日
-----------	-------------

## 1. 基本情報

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	平成24年 6月14日から平成30年10月31日まで(6年間)	
多施設共同臨床研究	該当	<input type="checkbox"/> 非該当

## 2. 研究責任者及び研究機関に関する情報

研究責任者	所属部局の所在地	東京都世田谷区大蔵2-10-1 (郵便番号 157-8535)	
	所属機関・部局・職	国立研究開発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	
	氏 名	小野寺 雅史	
研究機関	所 在 地	東京都世田谷区大蔵2-10-1 (郵便番号 157-8535)	
	名 称	国立研究開発法人国立成育医療研究センター	
	連 絡 先	TEL: 03-3416-0181、FAX: 03-3416-2222	
研究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・診療部長	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
	内山 徹	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
	河合 利尚	国立成育医療研究センター・病院・診療部長	患者管理
	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、個人情報の保護
	加藤 俊一	東海大学医学部・名誉教授	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・名誉教授	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・名誉教授	患者選定
	久米 晃啓	自治医科大学・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・准教授	造血幹細胞への遺伝子導入と培養
	大森 栄	信州大学附属病院薬剤部・部長	ブスルファンのモニタリング管理
勝山 善彦	信州大学附属病院薬剤部・主任	ブスルファンの血中濃度測定	
巾 正美	千葉大学薬学部薬学科・教授	ブスルファンの血中濃度測定	

3. 総括責任者及び総括責任者が所属する研究機関に関する情報（多施設共同臨床研究に該当する場合は、以下の項目を記載すること。）

総括責任者	所属部局の所在地	(郵便番号 )
	所属機関・部局・職	
	氏 名	
研究機関	所 在 地	(郵便番号 )
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号 )

4. 総括責任者以外の研究責任者及び当該研究責任者が所属する研究機関に関する情報（多施設共同臨床研究に該当する場合は、以下の項目を記載すること。）

研究責任者①	所属部局の所在地	(郵便番号 )
	所属機関・部局・職	
	氏 名	
研究機関①	所 在 地	(郵便番号 )
	名 称	
	連 絡 先	(電話番号 )

5. 倫理審査委員会の見解

倫理審査委員会の意見	申請者に申し出た以下の点	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>慢性肉芽腫症に対するレンチウイルスベクターを用いた血幹細胞遺伝子の治療の安全性・有効性が近年評価され、今後、レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子が安全性の観点から実施されなくなること</li> <li>当センターが保管している臨床用ウイルスの保管期間が5年を経過し、その使用に際して品質等を再評価する必要があること</li> </ul> <p>より、当該遺伝子治療の中止は適切な判断と考える。</p> <p>なお、当該遺伝子治療を受けた患者の状態は良好であるとのことであるが、今後も長期にわたり経過をフォローしていくことが肝要である。</p>	
	倫理審査委員会の長の職名	氏 名
	小児がんセンター長	松本 公一 (印)

研究の区分	治療に係る臨床研究	予防に係る臨床研究
研究の目的及び意義	<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。原因としては食細胞が病原体を殺菌する際に利用する活性酸素（O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HClO<sup>+</sup>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、抗菌剤や抗真菌剤などの内科的治療が主体となるが、根治療法は造血幹細胞移植のみである。治療成績は、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、基本、血縁、非血縁を問わずHLAが完全一致した骨髓幹細胞を用いた場合、成功率が高い。一方、HLAが異なるに従いその治療成績は極端に低下する。</p> <p>よって、本研究では遺伝子検査にてX-CGDを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>	
実施方法	<p>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</p> <p>2. 被験者の選定基準と除外基準</p> <p>選定基準：1) 遺伝子検査にてgp91<sup>phox</sup>に異常のあるX-CGDと診断された3歳以上の男性で体重10kg以上の症例、2) 体重1kgあたり5x10<sup>6</sup>個のCD34陽性細胞が採取可能な症例、3) 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、4) 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2x10<sup>7</sup>個（CD34陽性細胞として1.5x10<sup>5</sup>個）以上の移植ドナーが見つからない症例、5) 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、6) 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、7) 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 ≥ 50%、安静時の動脈酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>) ≥ 95%、AST、ALT ≤ 100IU/L、体表面積 (1.73m<sup>2</sup>) 補正クレアチニン・クリアランス (Ccr) ≥ 70ml/min、随時または食後2時間後の血糖値 ≤ 200mg/dl、HbA1c ≤ 9%)</p> <p>除外基準：1) HIV陽性例、2) 悪性腫瘍併発例、3) 同意に影響を及ぼす精神障害を有する症例、4) 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）、5) 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、6) 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、7) 長期（3ヶ月程度）の生命予後が見込まれない症例</p> <p>3. 遺伝子治療臨床研究の実施方法</p> <p>1) 遺伝子導入方法および投与方法</p> <p>・末梢血CD34陽性細胞の採取：患者体重1kgあたり10ug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</p>	

	<p>ら細胞からヒト抗 CD34 抗体を用いた ClinMACS にて患者 CD34 陽性細胞を分離する。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 無菌性・無毒性を確認した後、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する。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 <math>5 \times 10^6</math> 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。</li> <li>・ 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 のブスルファンを全量とし、1 日 4 回、2 時間以上かけて 3 日間に投与される。</li> </ul> <p>2) 患者観察</p> <p>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。</p>
<p>研究結果の概要 及 び 考 察</p>	<p>症例 27 歳 男性</p> <p>生後 9 ヶ月頃より感染を反復し、1 歳頃に慢性肉芽腫症の診断され、年に 2~3 回は肺炎や頸部リンパ節炎で近医入院加療してきた。</p> <p>15 歳 (H14 年 1 月)：肺アスペルギルス症。AMPH-B 投与で腎機能障害出現したため左下肺切除術施行</p> <p>18 歳 (H17 年 7 月)：頸部リンパ節膿瘍、咽後膿瘍、縦隔膿瘍、肝脾膿瘍。IFN-<math>\gamma</math> 導入</p> <p>22 歳 (H21 年 2 月)：右耳下腺部膿瘍切除術施行 (当院耳鼻科)</p> <p>23 歳 (H22 年 4 月)：真菌性肺炎、CGD 腸炎と診断され、<math>\beta</math>-D-グルコサミン 2250mg、probiotics 開始。リンパ節炎、肺肉芽腫など重症感染症に 1 年に 1 回以上罹患。</p> <p>2014/7/22 当センターにて末梢血造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を実施。前処置はブスルファン (9.6mg/kg) を用いてを行った。遺伝子導入細胞投与後、多発性のリンパ節炎、縦隔膿瘍などの感染症は軽快したが、治療後 6 ヶ月以降は患者末梢血中の遺伝子導入細胞は 0.1% 未満まで減少した。</p> <p>2017/3/3 定期フォローのため地元大学へ受診した際、末梢血中に芽球を 3% 認め、血小板も減少傾向を示した (10 万台 <math>\rightarrow</math> 7 万)。3/13 の再検査で末梢血中に芽球を 5% 認め、血小板も 5 万へ減少した。3/16 に同大学で実施した骨髄検査では、5% 程度の芽球を認め骨髄異形成症候群 (MDS) と診断された (遺伝子治療 32 ヶ月後)。</p> <p>末梢血で gp91<sup>phox</sup> 陽性あるいは活性酸素を産生する好中球は認めず、遺伝子治療 30 ヶ月後のデータと同様の結果だった。CYBB 領域に primer を設計した PCR では遺伝子導入細胞のベクターコピー数 (VCN) は感度以下であったが、ウイルス LTR 領域に primer を設計した PCR では遺伝子治療後 12 ヶ月目に VCN の増加を認め、それ以降一定の値で維持していた。なお、その挿入部位は遺伝子治療後 9、12、18、24、30、32 ヶ月目で一つのプロウイルスが MECOM IVS II に挿入されていることがわかった。なお、CYBB 領域に primer を設計した PCR で VCN が感度以下であった理由は CYBB cDNA 領域に多数の G to A 変異が挿入されているためであった。</p> <p>2017 年 7 月 患者は父親をドナーとした造血幹細胞移植 (post-CY) を受け、移植後 1 年を越えて MDS の再発を認めず、また、原疾患 (慢性肉芽腫症) は治癒されている。</p> <p>まとめと考察</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 活性酸素産生遺伝子導入細胞 (DHR 陽性細胞) は投与後 6 ヶ月までは確認できるが 9 ヶ月以降は確認できない。</li> <li>・ MECOM IVSII に挿入され、CYBB 領域に多数の G to A 変異を持つプロウイルス導入細胞 (活性酸素は産生しない) は 9 ヶ月以降に明らかとなった。</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>MECOM へのプロウイルス挿入は MECOM の発現を増強させるが、直ちに MDS 様の病態を呈するのではなく、その後、約 1 年半にわたり正常は造血能を維持したことが示唆された。</li> <li>Blast 以外の細胞にもベクター挿入を認めることから、MDS の発症には何らかの影響 (second hit) があつた可能性は示唆される。</li> <li>クロナリティーに関しては、当初から NGS 解析より単一の挿入部位であり、また、G to A 変異においても治療後 1 年と blast が同一であることから monoclonal な増殖と考えられた。</li> <li>造血幹細胞移植に関しては、近年、HLA 不適合移植において重度の GVHD を抑制する post-CY (細胞投与後に cyclophosphamide を投与) 移植が開発され、これにより患者は移植が 1 年を越えて寛解状態にあり、通常の日常生活を送れる程回復している。</li> </ul>
今後の研究計画	<ul style="list-style-type: none"> <li>今回、MDS の発症という有害事象を見たが、遺伝子治療を受けた患者においては抗菌剤等の治療に抵抗性を示す重篤感染症は改善し、造血幹細胞移植を受けうるまでその病状は改善した。この点から、遺伝子治療がより安全な造血幹細胞移植への bridging の役割を果たしたことは否定し難い。</li> <li>ただ、現在、レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療が行われ、その安全性、有効性が確認されつつあることから、今後はレンチウイルスベクターによる遺伝子治療が主流になっていくものと思われる。</li> <li>なお、当センターが保管している臨床用ウイルスの保管期間が 5 年を経過し、その使用に際して品質等を再評価する必要があるため、当該遺伝子治療を中止したいと考えている。</li> <li>一方、患者は造血幹細胞移植により良好な状態にあるが、今後も安全性の観点から長期にわたり経過をフォローしていく。</li> </ul>
研究成果の公表状況	現在、MDS の発症原因を含め、症例報告としての論文を投稿準備中である。
備考 (共同研究機関の実施状況等)	

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 A 列 4 番とすること。
2. この報告書は、正本 1 通及び副本 2 通を提出すること。
3. 字は墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 各項目数行程度で簡潔に記載すること。記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙 ( ) のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 多施設共同臨床研究に該当する場合は、備考欄に共同研究機関の進捗状況を記載すること。