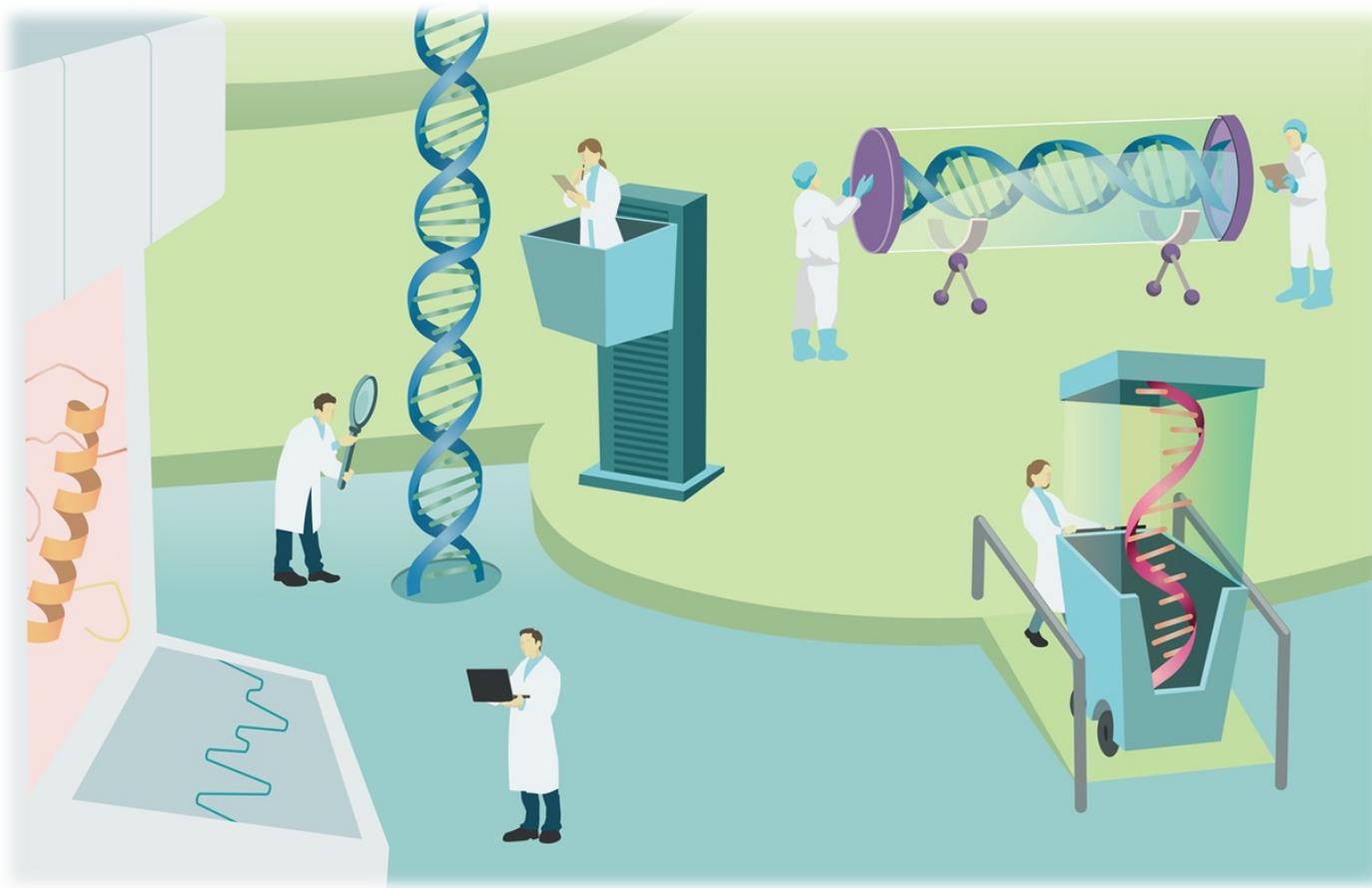


令和5年9月10日 (2023. 9.10) 11:00~12:00
JSGCT教育プログラム

ゲノム組み込み型ウイルスベクター



遺伝子細胞治療推進センター (GCPセンター)
小野寺 雅史

今回の発表はあくまでも私、個人の意見です。

また、一切、企業との利益相反もありません

なお、ご意見は

小野寺 雅史 まで お願いいたします。

onodera-m@ncchd.go.jp

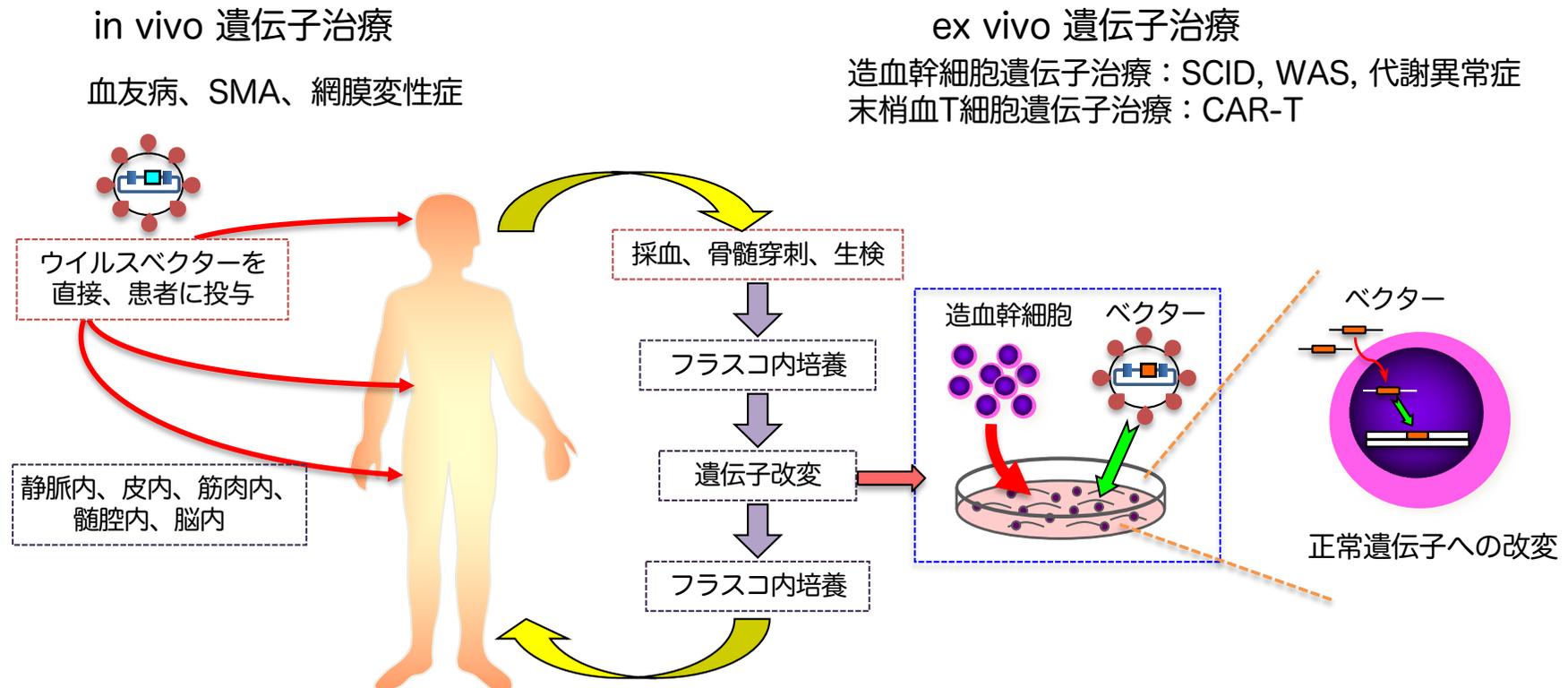
宜しくお願い致します

遺伝子細胞治療・再生医療等製品

「遺伝子治療等」とは、疾病の治療や予防を目的とした以下の行為

1. 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 (gene addition)
2. 特定の塩基配列を標的として人の遺伝子を改変すること (gene correction)
3. 遺伝子を改変した細胞を人の体内に投与すること (gene modifications, ex vivo)

1. 13文科振第114号、科発第0327001号 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 平成14年 3月27日
- 2, 3. 厚生労働省告示第48号 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 平成31年 2月28日



遺伝子治療用ベクター

ウイルス・非ウイルス		ウイルスベクター				非ウイルスベクター
ベクター由来		ガンマレトロウイルス	レンチウイルス	アデノウイルス	アデノ随伴ウイルス	プラスミド
分類		Retroviridae	Retroviridae	Adenoviridae	Parvoviridae	核酸
主な宿主		MLV	HIV	5型	2型、8型、9型	
ウイルス ゲノム	構造	ssRNA	ssRNA	dsDNA	ssDNA	dsDNA
	サイズ	8-9kb	8-9kb	36kb	4.7kb	
エンベロープ		あり	あり	なし	なし	
粒子の直径		100nm	100nm	80nm	20~26nm	
宿主ゲノムへの挿入		あり	あり	低頻度	低頻度	低頻度(?)
非分裂細胞への感染		不可	可	可	可	可
導入遺伝子の大きさ		~6kb	~8kb	~30kb	~4.7kb	制限なし
導入遺伝子の発現		長期	長期	一過性	長期	一過性
標的細胞		血液細胞	血液細胞(神経)	がん	神経・筋・肝臓	表皮など
問題点		造腫瘍性	造腫瘍性・安全性	免疫原性	免疫原性	低発現
拡散防止措置レベル		P2	P2	P2	P1	不要

ウイルスベクター

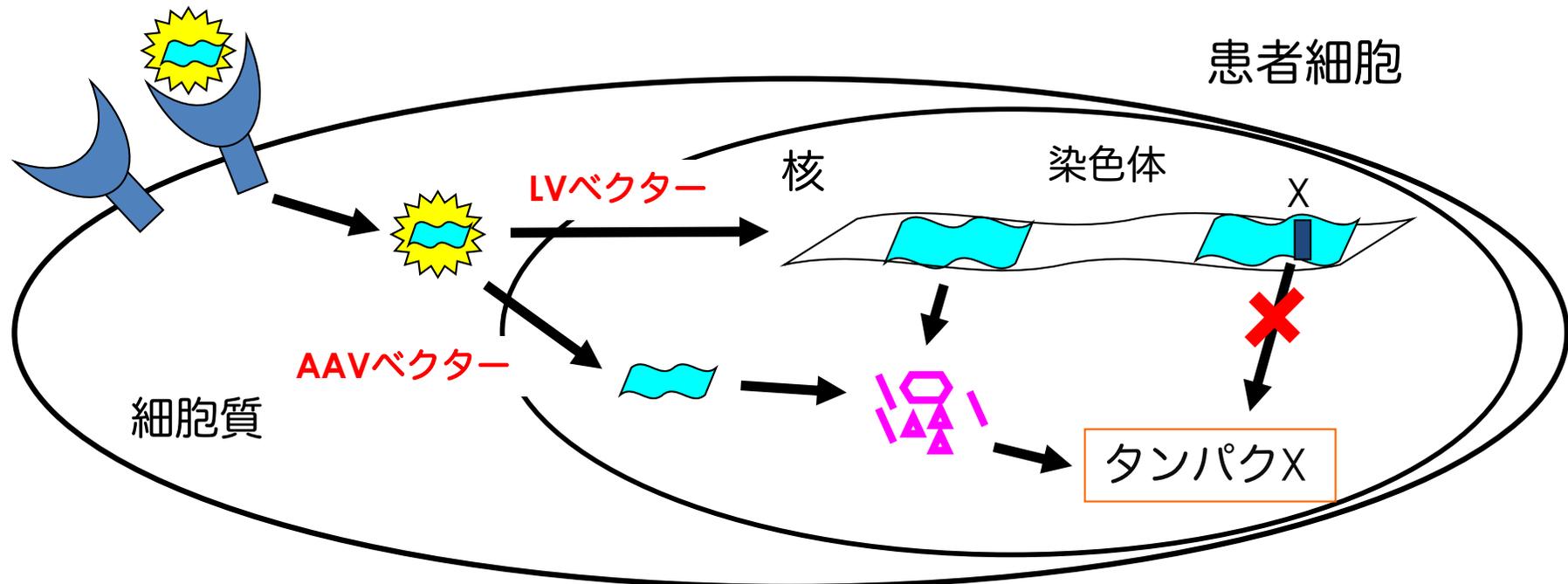
1. 遺伝子治療の定義

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 → 患者細胞に正常遺伝子を導入

2. 遺伝子導入方法

レンチウイルス (LV) ベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

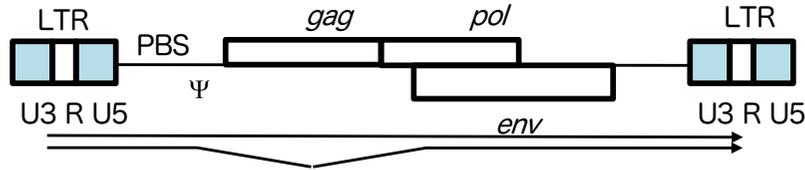
ウイルスベクター



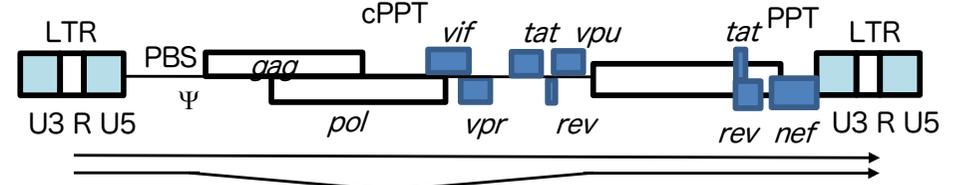
ガンマレトロウイルス/ レンチウイルス ベクター

A

γ RV : MLV (Murine leukemia virus)

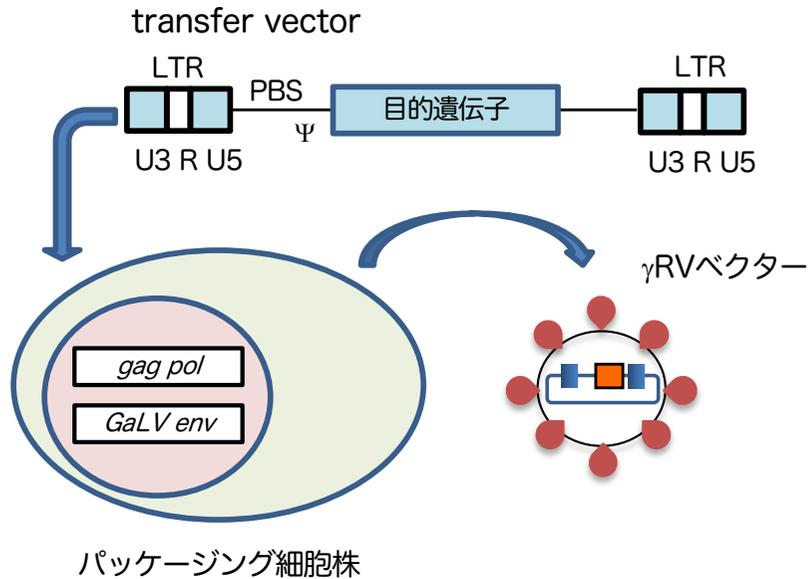


LV : HIV (Human immunodeficiency virus)

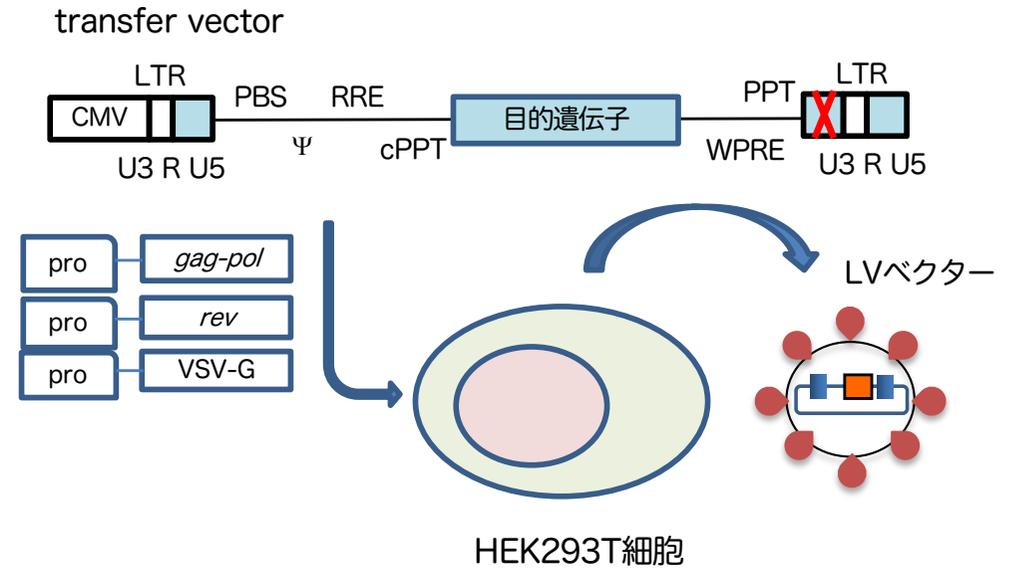


B

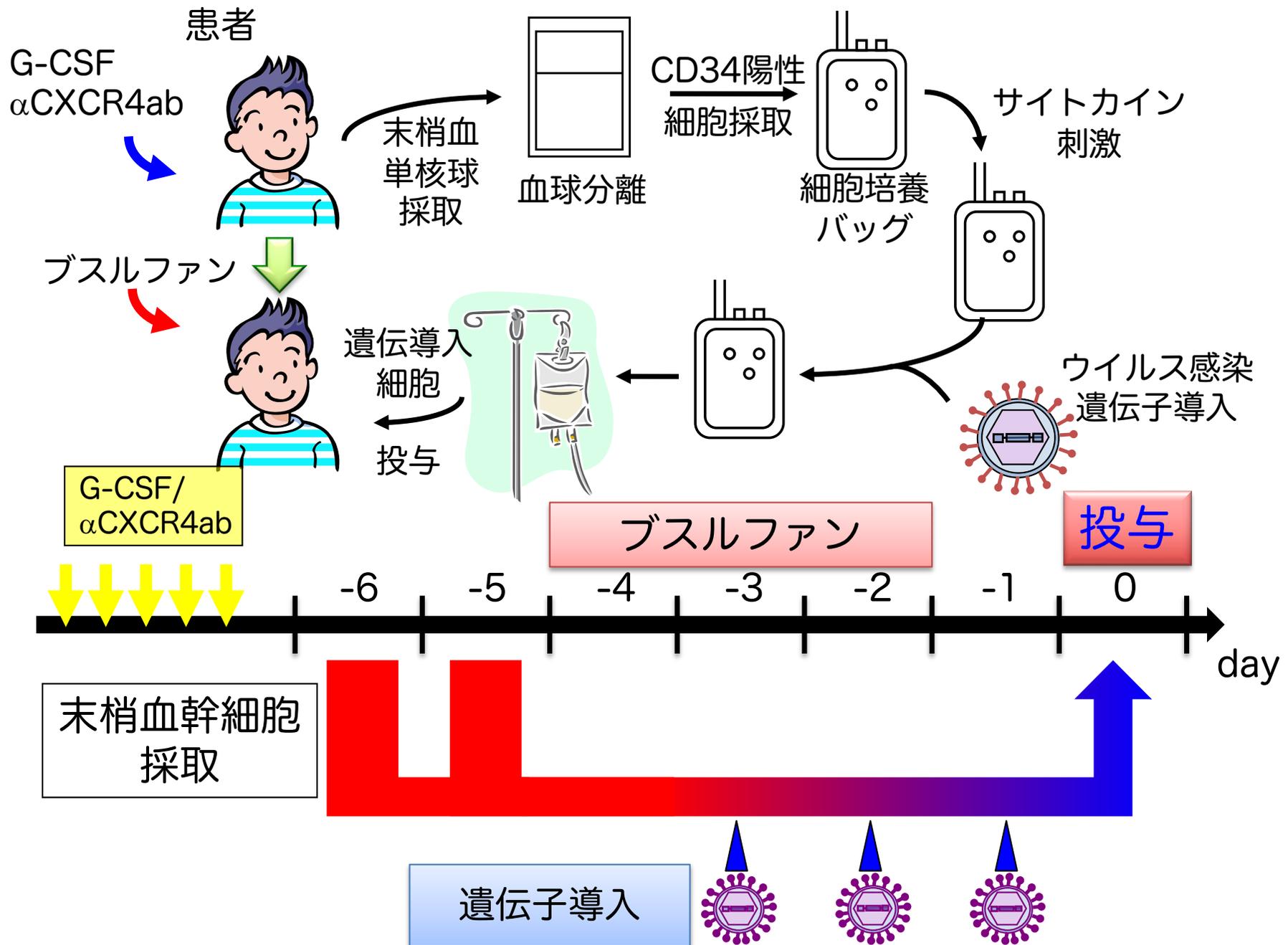
stable法



transient法

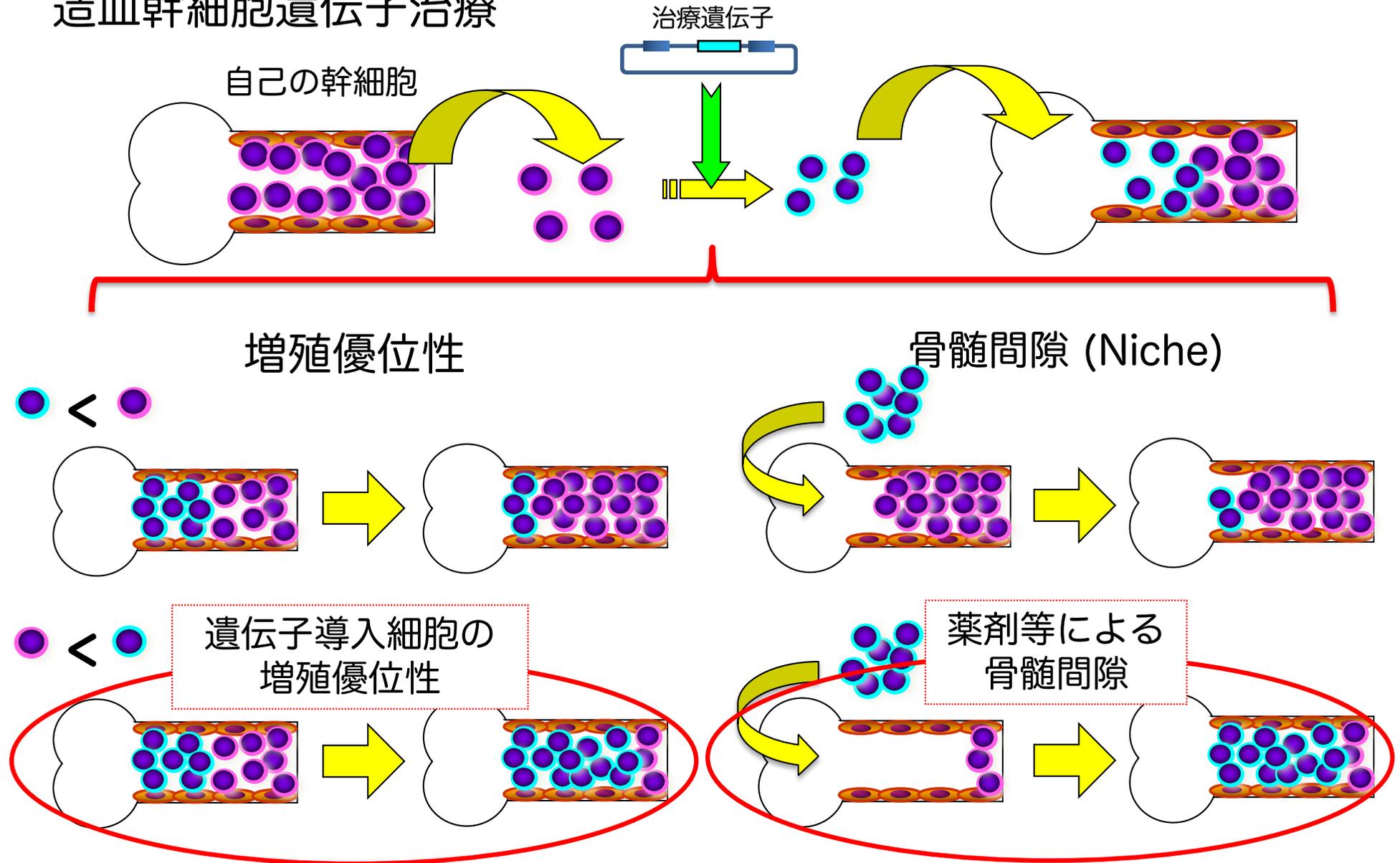


造血幹細胞遺伝子治療



造血幹細胞遺伝子治療の重要要因

造血幹細胞遺伝子治療



Ex vivo遺伝子治療

疾患名	変異遺伝子・タンパク	ベクター	前処置	治験・商品名
ADA欠損症	ADA (adenosine deaminase)	レトロ	BU RIC	Strimvelis
		レトロ	Mel. BU RIC	
		レトロ	BU RIC	
		レンチ	BU RIC	Phase 1/II
X連鎖重症複合免疫不全症	IL2RG (gc)	レンチ	BU RIC	
ウィスコット・ アルドリッチ症候群	WASP (WASp)	レトロ	BU/Flu RIC	
		レンチ	BU/Flu FMC	
		レンチ	BU/Flu/ α CD20ab FMC	Phase 1/II
慢性肉芽腫症	CYBB (gp91phox)	レトロ	BU RIC	
		レトロ	BU RIC	
		レトロ	BU RIC	
		レンチ	BU RIC	
副腎白質ジストロフィー	ABCD (ALDP)	レンチ	BU/Flu FMC	Skysona
異染性白質ジストロフィー	ARSA (Arylsulfatase A)	レンチ	BU RIC	Libmeldy
地中海貧血/ 鎌状赤血球症	HBB (β globin)	レンチ	BU RIC	Zynteglo

BU: Busulfan, Mel: Melphalan, RIC: reduced intensity conditioning, FIC: full myeloablative conditioning

CAR-T細胞療法： B細胞腫瘍 (kymliah, Yescarta, Tecartus, Breyanzi)
 多発性骨髄腫 (Abecma, Carvykti)
 固形腫瘍 (神経芽腫, GD2, NEJM 388, 2023. など)

ウイルスベクターを用いた遺伝子治療

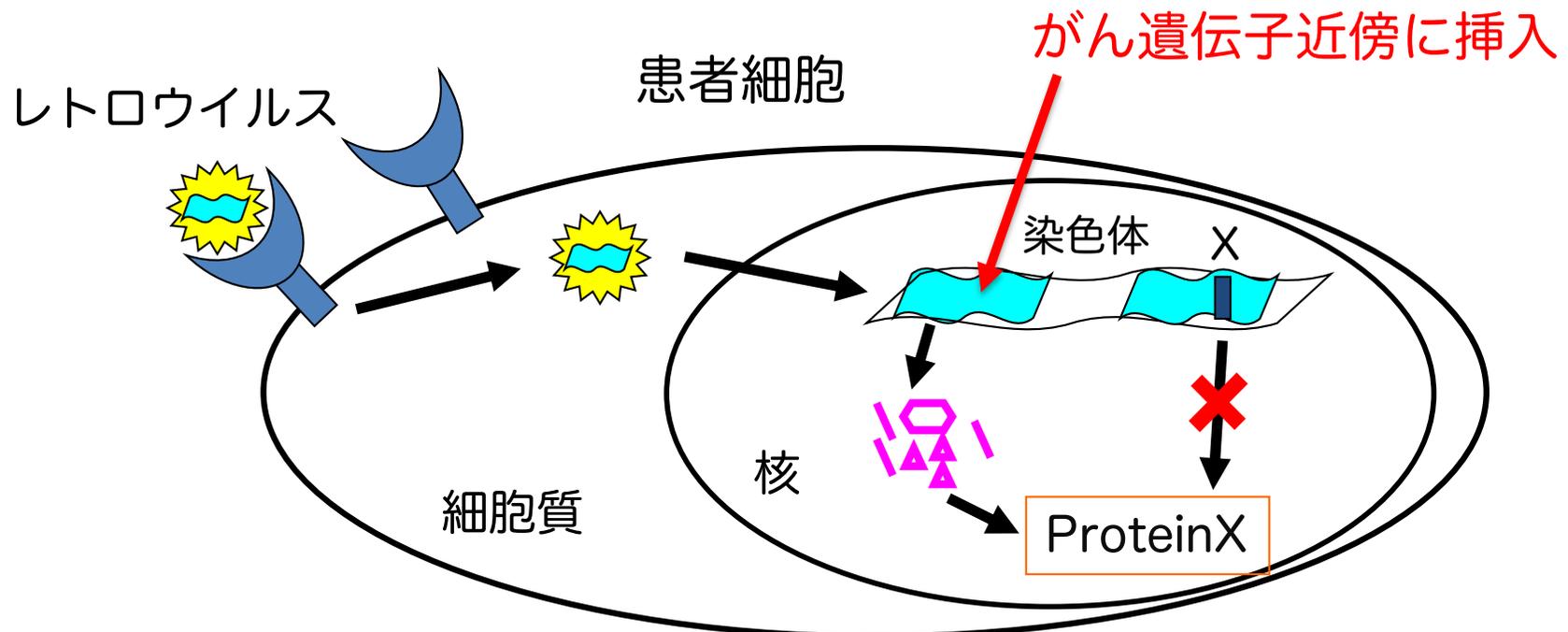
1. 遺伝子治療の定義

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

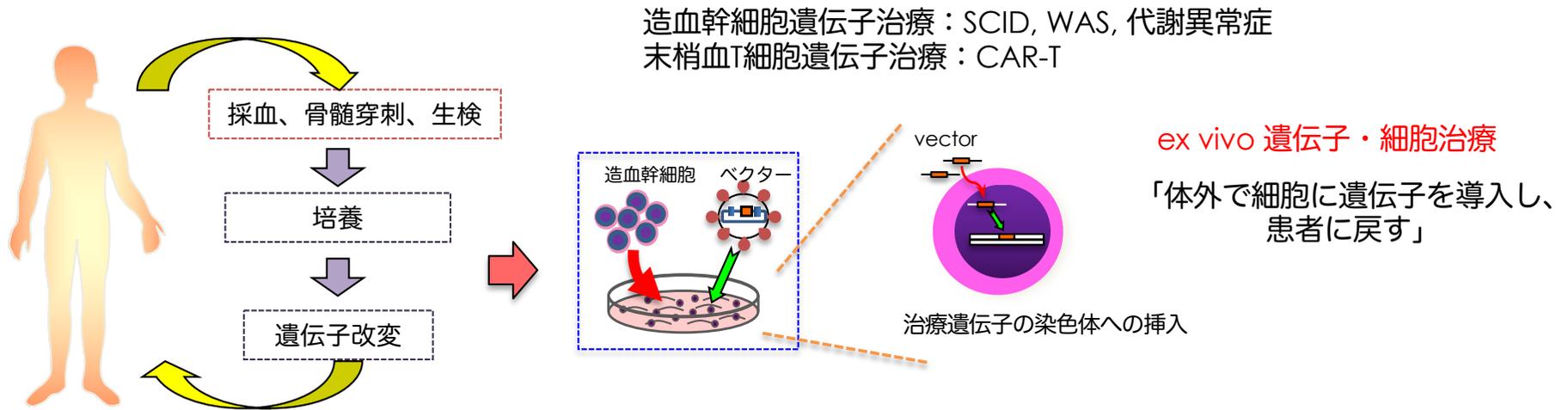
患者細胞に正常遺伝子cDNAを導入

2. 遺伝子導入方法

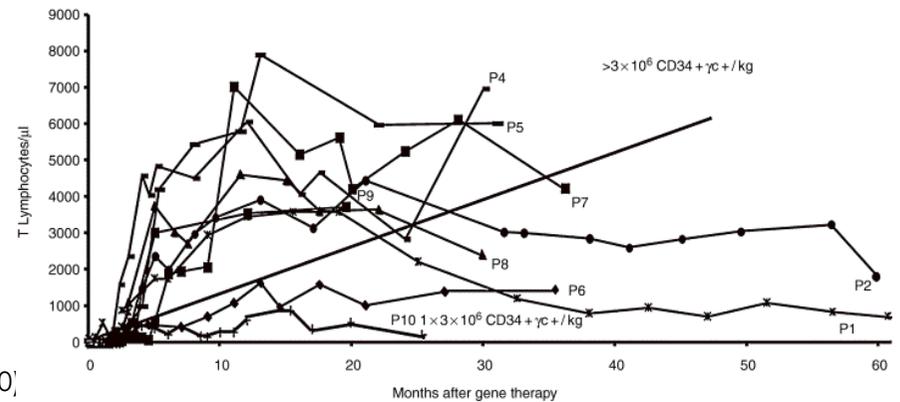
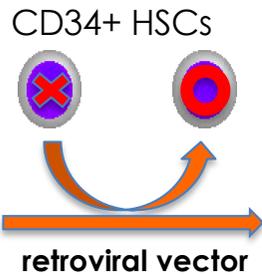
レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなど



Ex vivo 遺伝子・細胞治療における安全性



レトロウイルスベクターによるSCID-X1への遺伝子治療



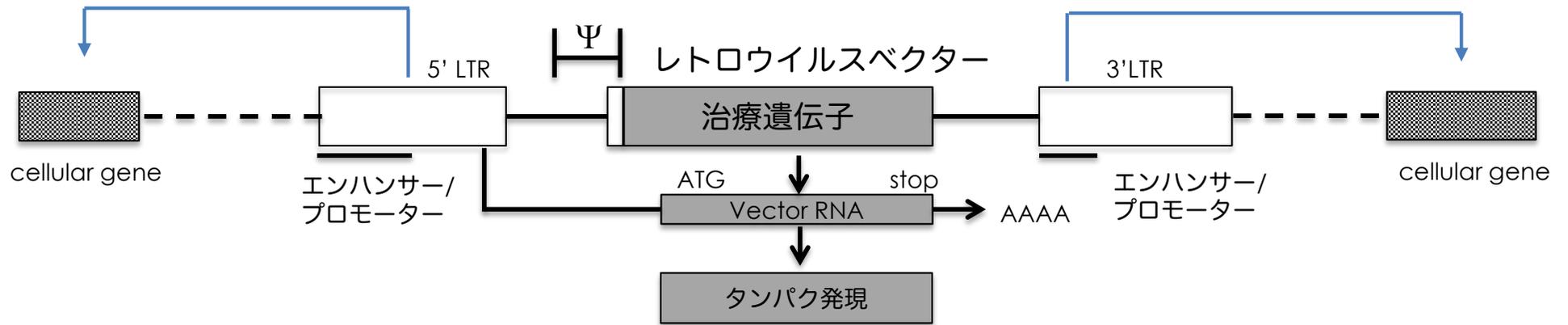
After his gene therapy, he was running around at home
 - He is a normal little boy now -

(science 288:669, 2000)

(Immunol Rev. 203: 98, 2005)

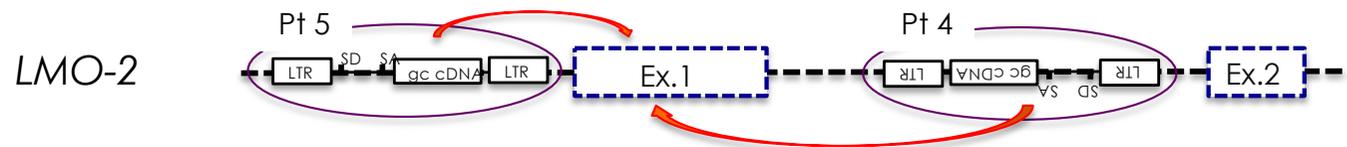


γRVによる挿入変異

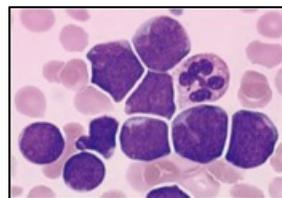


挿入変異の機序

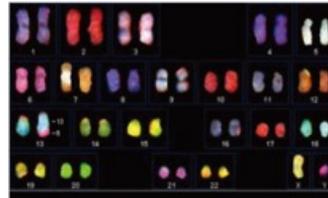
SCID-X1患者でのLMO2遺伝子の活性化によるT-ALLの発症



Pt4

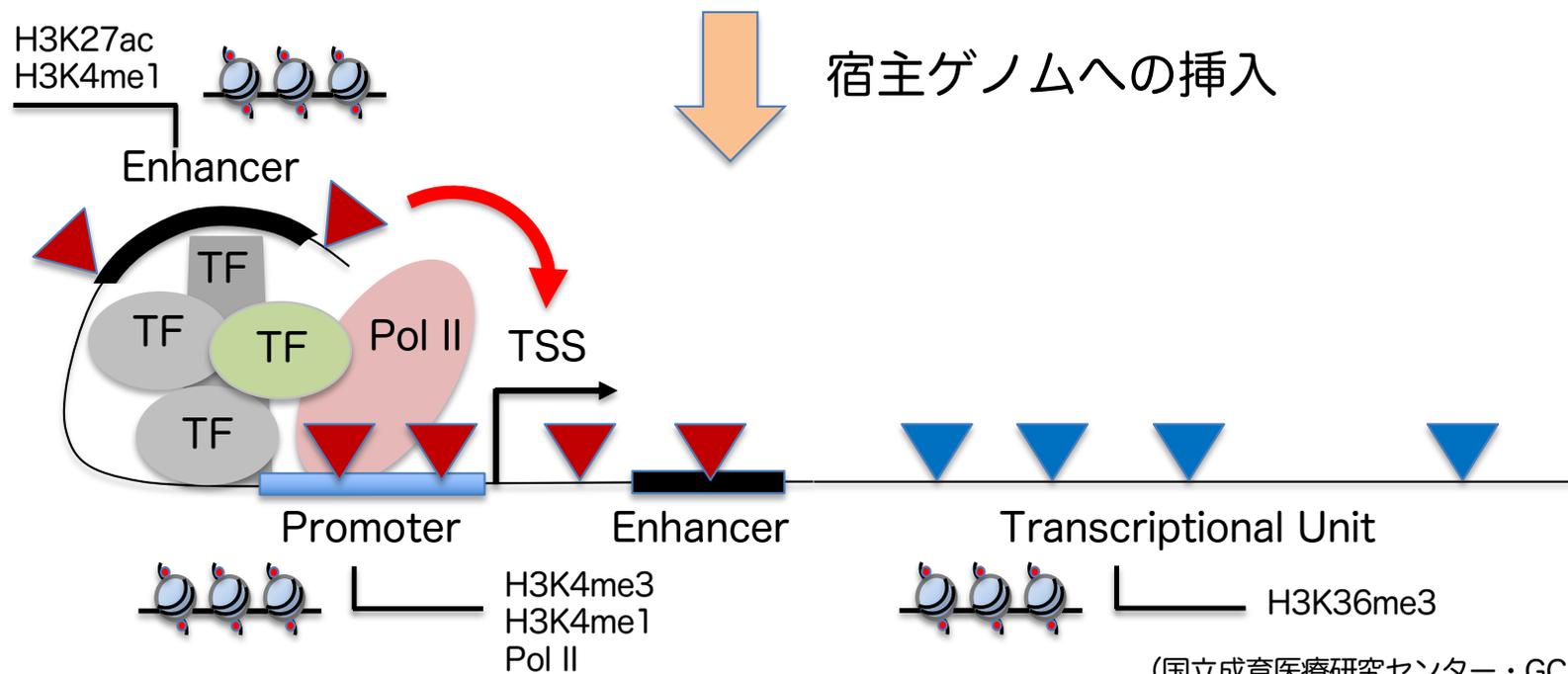
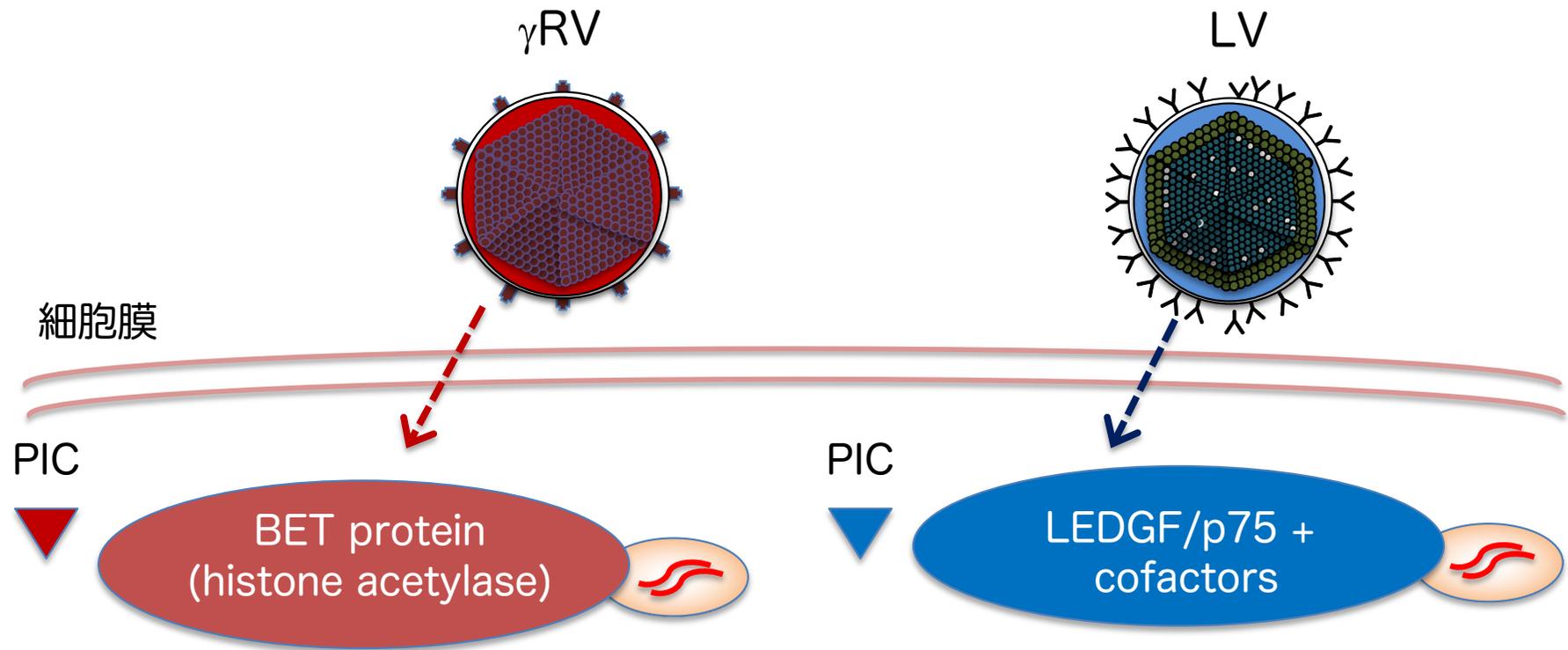


M-G stain

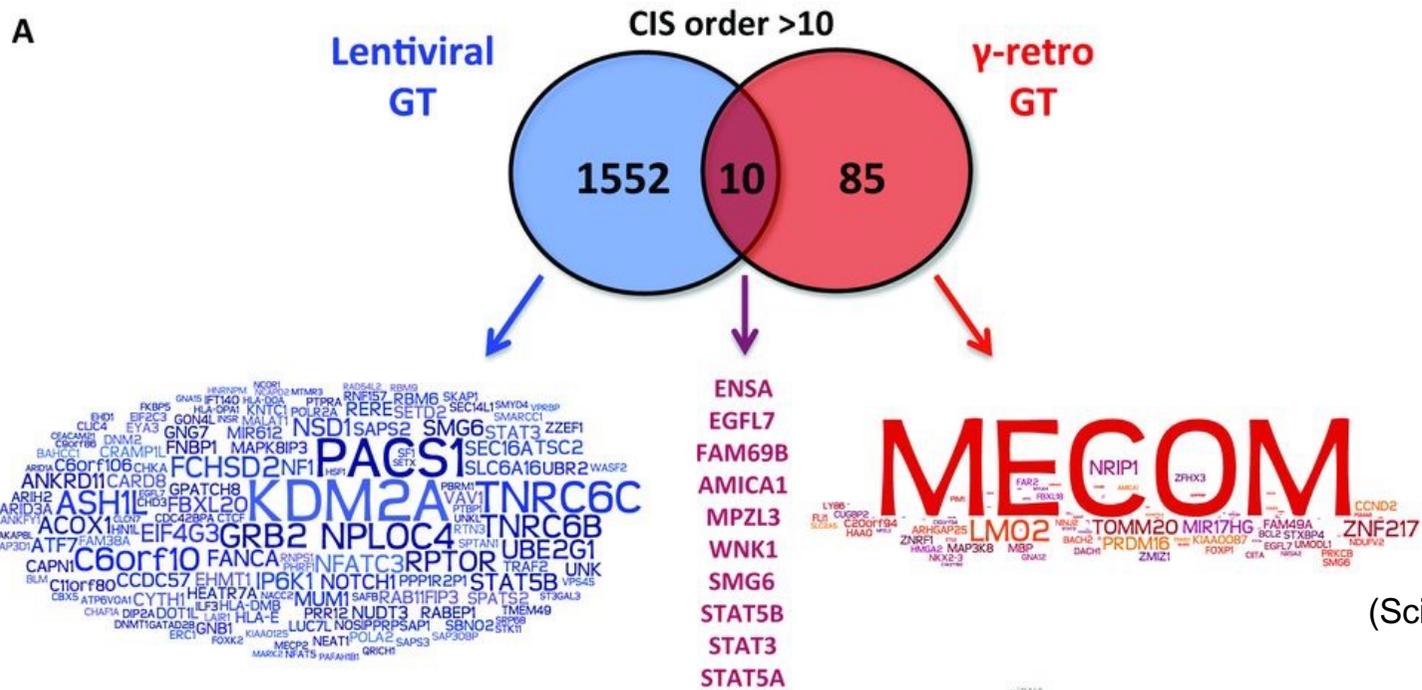
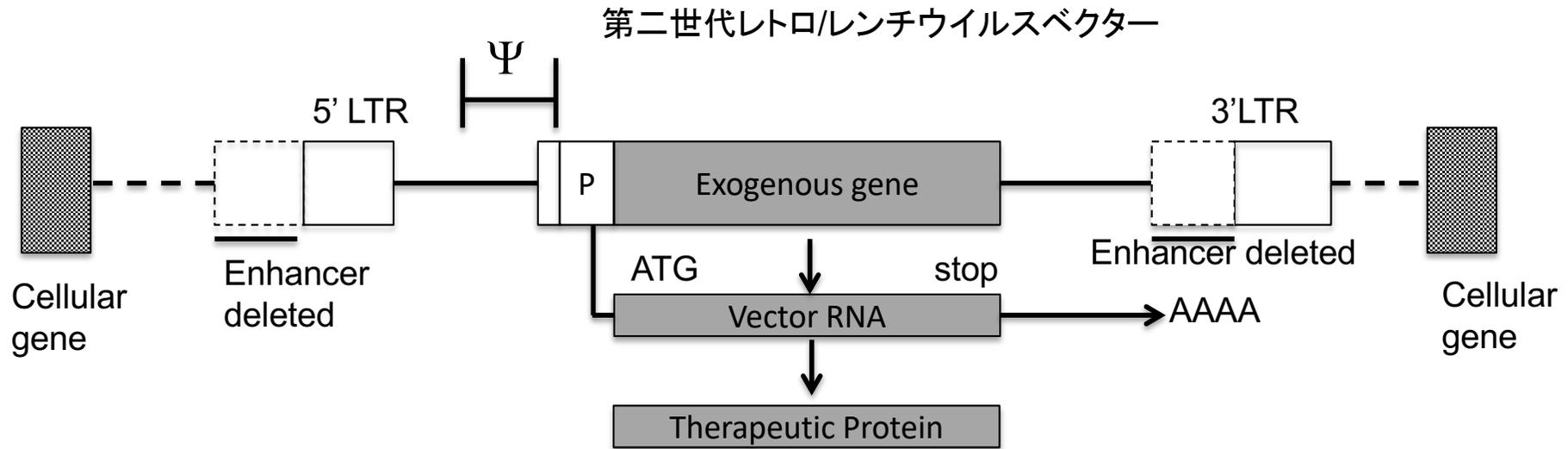


Spectral Karyotype

(science 302, 415, 2003)

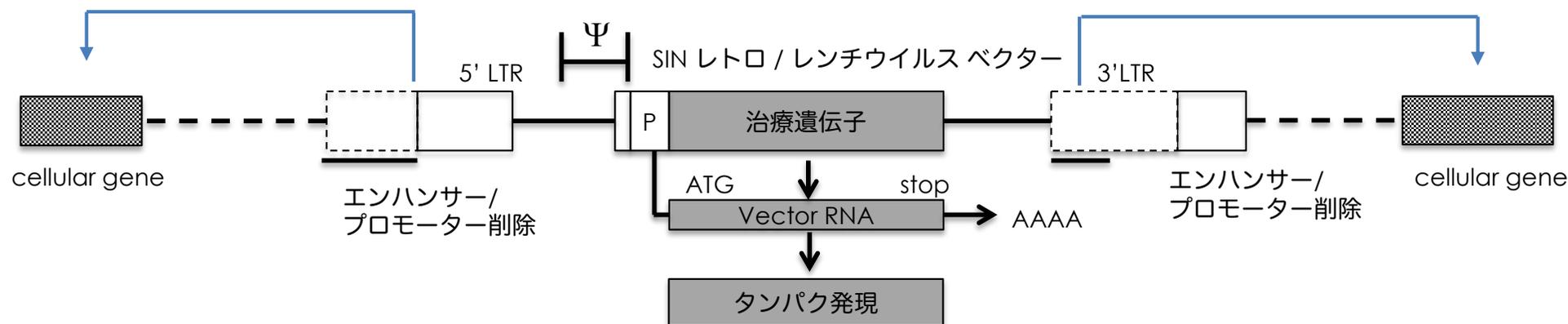


レトロウイルスベクター vs レンチウイルスベクター



(Science. 2013)

Self inactivated vectorsによるHSC-GT



挿入発がん変異を抑制

疾患	国	数	開始	前処置	ベクター	状況
ADA	USA/UK	61	2011	BU	レンチ	Phase I/II
SCID-X1	UK/France	13	2010/2011	None	SIN-g レトロ	Phase I/II
	USA	21	2010	BU	レンチ	
WAS	Italy	17	2010	BU+FLU	レンチ	Phase III
	UK/France	13	2011	BU+Flu	レンチ	Phase I/II
X-CGD	UK/France	9	2015	BU	レンチ	Phase I/II

10年を経過してレンチウイルスの挿入変異による白血病の発症は報告されていない。

HSC-GTにおける造腫瘍性

疾患	ベクター	白血病	病型	IS
SCID-X1	レトロ (MFG)	6/23	T-ALL	LMO2, CCND2, BMI1
CGD	レトロ (SFFV)	3/4	MDS	MECOM
	レトロ (MFGS)	1/4	MDS	MECOM
WAS	レトロ (MFG)	9/10	T-ALL, AML	LMO2, MECOM, MN1など
ADA-SCID	レトロ (MLV)	1/40	T-ALL	LMO2
Sickle cell disease	レンチ	2/47	AML	ベクター挿入は関係ないとの見解
ALD	レンチ	3/28	MDS	MDS関連遺伝子への挿入

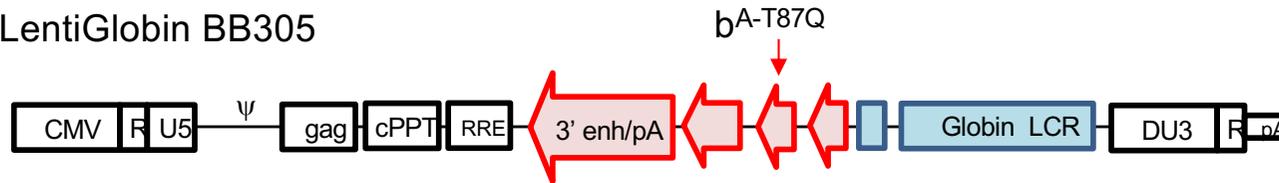
ADA-SCID (Strimvelis)

- ADA cDNAをコードするgRVにより遺伝子導入した自己CD34陽性細胞
- 欧州にて2016年に承認
- 33人の患者が治療を受けている
- 2020年に一人の患者がT-ALLを発症
- 遺伝子治療後4.7年の経過で発症
- LMO2遺伝子の40kb上流にベクターの挿入を認める

鎌状赤血球症（SCD）におけるAML

- SCD
- 血流障害、臓器内血液貯留、中枢神経発作、溶血性貧血
 - 最終的に多臓器障害となる。
 - 平均生存期間が60歳前後

LentiGlobin BB305



(Blood 138: 942, 2021)

	Case 1 MDS/AML (2018)	Case 2 AML (2021)
遺伝子治療前の異常	遺伝学的／細胞学的異常なし	遺伝学的／細胞学的異常なし
遺伝子治療後の異常	なし	なし
AML発症時の染色体／遺伝子変化	Monosomy 7 Abnormal 19p RUNX1 (p.Asp198Gly) PTPN11 (p.Phe71Leu) KRAS (p.Gly12Ala)	Monosomy 7 Partial loss of 11p RUNX1 Exon 5 stop gained PTPN11 p.A72V
白血病細胞におけるベクター挿入	なし	VAMP4遺伝子のイントロン4への挿入

- Case 2
- VAMP4 遺伝子は、細胞増殖や発がんには関与しない。
 - ベクター挿入による近傍遺伝子の活性化などは無い。

➡ ベクターによる挿入変異による可能性は低いと判断

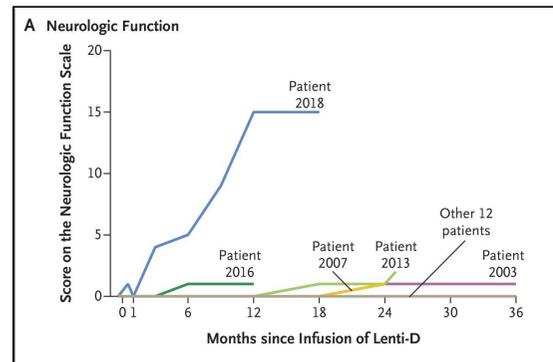
副腎白質ジストロフィー（ALD）におけるMDS

Bluebird bio Phase 2-3 study using Lenti D vector (N Engl J Med. 377: 1630, 2017)

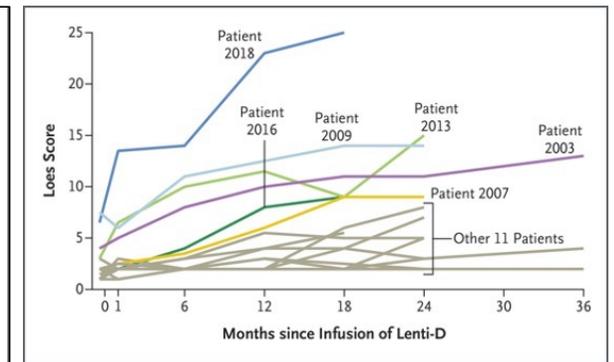


- 90%の患者が24ヶ月の評価
- 28人中26人：NFS score ≤ 1
- 96.3%の患者で生存及びMFD(major functional disability)-free

→ 2021.7
EUで承認「SKYSONA」



神経機能悪化の抑制



MRI病変の進行の抑制

2021.8

- 1名の患者でMDSの発症（治療後1年）
- 2名の患者で骨髄のdysplasia

MDS患者

ベクターのMECOM遺伝子への挿入を認める

現在のところ考えられる原因

MNDプロモーター（MLVの改良型）

- 幅広い細胞における強い発現
- RVベクターによる白血病の発症あり

CAR-T細胞療法における造腫瘍性

CAR-Tのクローナルな増殖

	疾患	ベクター挿入	Clonal expansion	CARの検出	影響に関して	文献
CD19-CAR	CLL	TET2 gene	Day+120頃から	5年以上	治療効果の向上?	nature, 558: 308, 2018
CD22-CAR	ALL	CBL gene	Day+50頃から	6ヶ月	治療効果の向上?	blood adv. 3: 2317, 2019

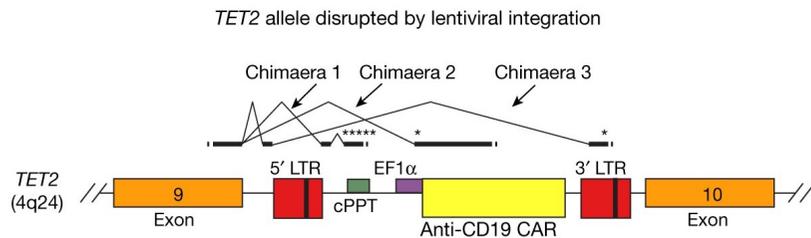
- レンチウイルスベクターのinsertional mutagenesisによるクローン性の増殖
- 増殖および長期間の生存に関与 → 治療効果の向上をもたらした可能性
- 一方で、second hitが入ることで、腫瘍化の可能性も考えられる

➡ 挿入部位解析の重要性

LETTER

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0178-z>

Disruption of *TET2* promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells nature, 558: 308, 2018



Clonal expansion of CAR T cells harboring lentivector integration in the CBL gene following anti-CD22 CAR T-cell therapy

blood adv. 3: 2317, 2019

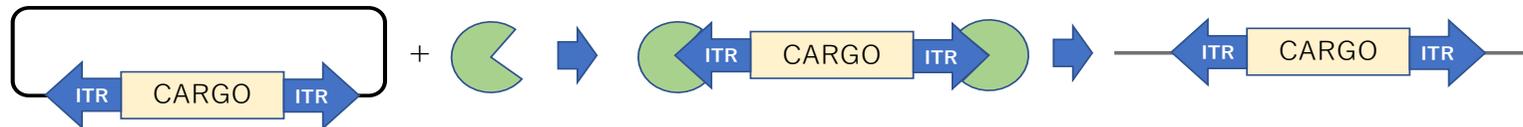


CAR-T細胞療法における造腫瘍性

	製造法	発症	症状	時期	文献
CD19-CAR	PiggyBac transposon	2/10	CAR-Tリンパ腫	Day+100頃?	Blood. 138: 1391, 2021 Blood. 138: 1504, 2021
Allo-CD19-CAR	CAR: lenti TCR and CD52: TALEN	1/100人以上	血球減少 染色体異常		Allogen Therapeutics

① トランスポゾン法におけるリンパ腫

高濃度のトランスポゾンとトランスポナーゼによる染色体の切断による可能性？

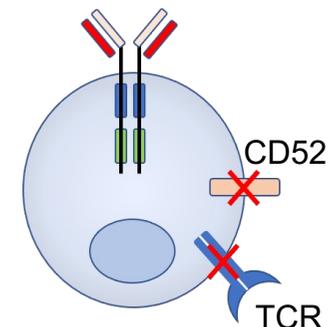


② Allo-CD19-CAR-T における汎血球減少と染色体異常

当初はTALENによる染色体切断による可能性が考えられたが、他のAlloCAR-Tプロダクトおよび投与後の患者では認められない。

➡ 製造工程に積極的に起因するものではないとの結論。

- (挿入部位解析による) クローン性の増殖の同定の重要性
- 製造工程におけるゲノム編集の安全性の評価が必要



ゲノム編集における安全性の評価

	疾患	細胞	標的遺伝子	ヌクレアーゼ	状況	
T細胞	HIV	CD4+T細胞	CCR5 (ノックダウン)	ZFN	Phase 1- 1/2	
	AML	T細胞	PD-1, CD52 (ノックダウン)	TALEN	Phase 1- 1/2	CD123-CAR-T細胞 (レンチ) でノックダウン
	B cell malignancy	T細胞	CD19の導入	Cas9	Phase 1- 1/2	
	B cell malignancy	T細胞	TCR a/b, b2MG	Cas9	Phase 1- 1/2	ユニバーサルCD19-CAR-T 細胞の作製
HSC-GT	サラセミア	CD34陽性細胞	Erythroid enhancer to BCL11A gene	Cas9	Phase 1/2	難治性遺伝病に対する ゲノム編集による 造血幹細胞遺伝子治療
	SCD	CD34陽性細胞	Erythroid enhancer to BCL11A gene	Cas9	Phase 1/2	

「ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療用製品等の品質・安全性等の考慮事項に関する報告」

(Human Gene Therapy 31, 2020)

- オフターゲット効果 : GUIDE-seq, CIRCLE-seq, SITE-seqなど
- オンターゲット変異 (広範囲の欠失など) : long-read sequence
- 染色体変異 (転座、欠失、inversion) : G-band, Q-band, FISH

慢性肉芽腫症 CGD

慢性肉芽腫症

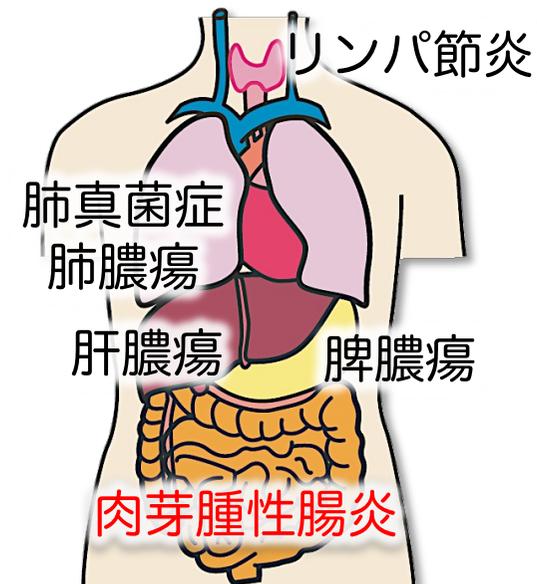
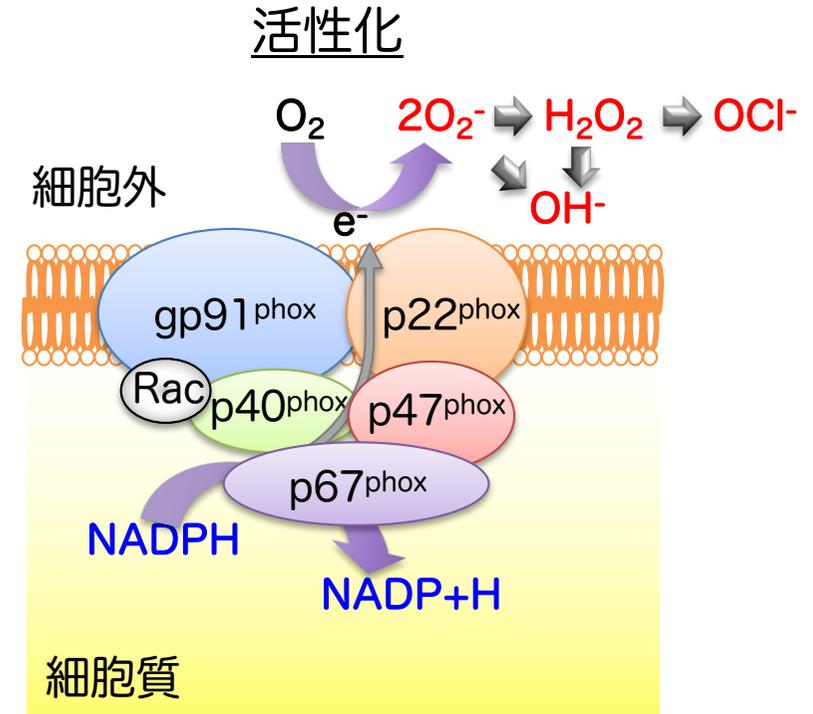
- ・ **好中球等食細胞**の異常
- ・ 活性酸素産生異常により殺菌能低下
- ・ 重篤な感染症を頻回に罹患
- ・ 腸管等に肉芽腫を形成
- ・ 根治療法は、造血幹細胞移植
⇒HLA適合ドナーが不在の場合、
拒絶やGVHDのリスクが高い



細菌性骨髄炎

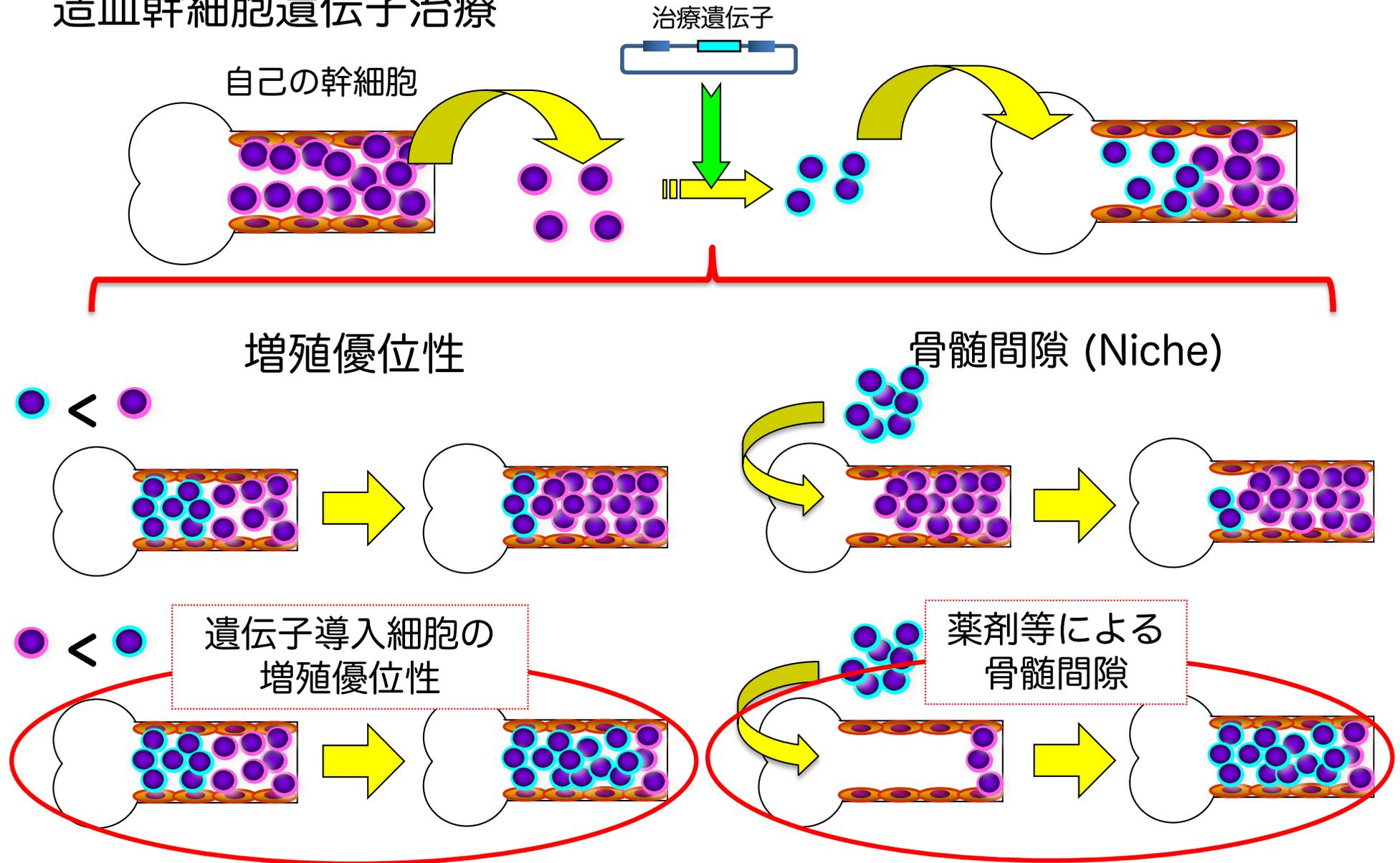


肺アスペルギルス症



造血幹細胞遺伝子治療の重要要因

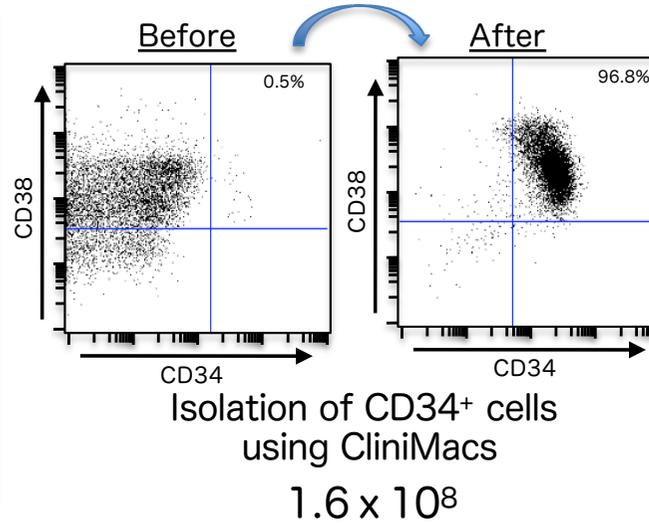
造血幹細胞遺伝子治療



患者造血幹細胞への遺伝子導入



Starting cell number
 4.89×10^{10}



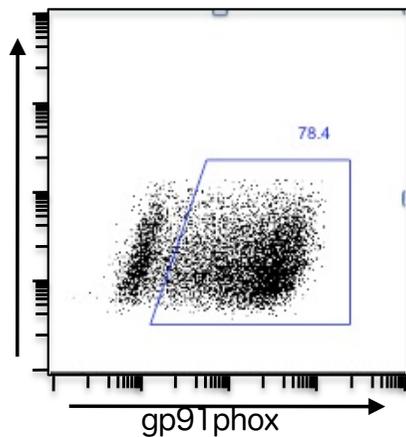
③ Cell manipulation



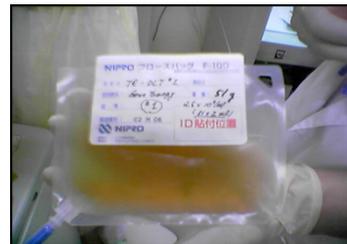
④ Transduction

バッグを用いた閉鎖系培養法

Cell number 3.6×10^8
Viability 95%



Tx efficiency 78.4%
BU 10mg/kg

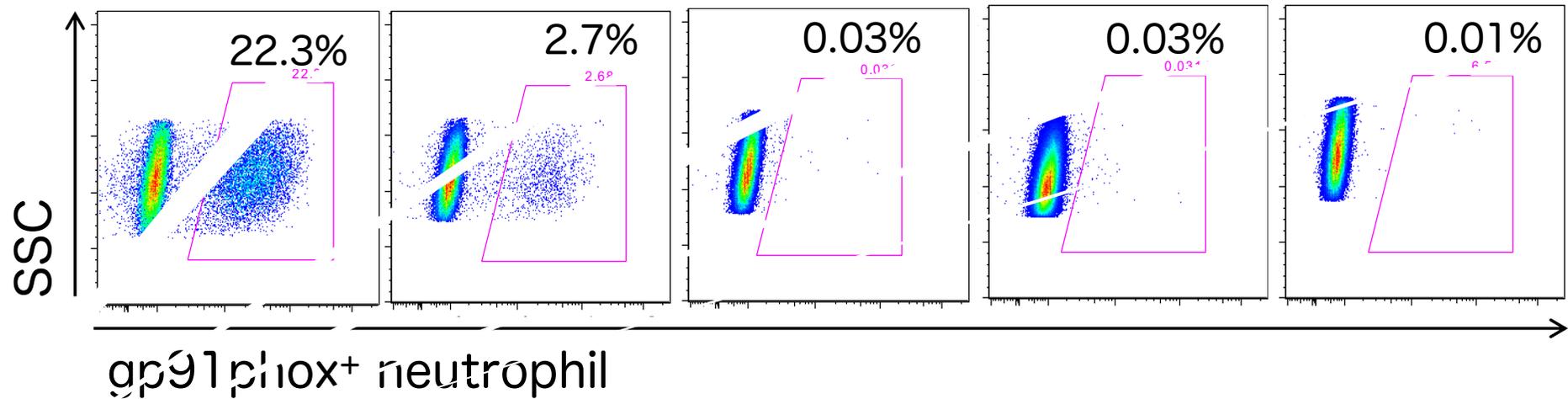
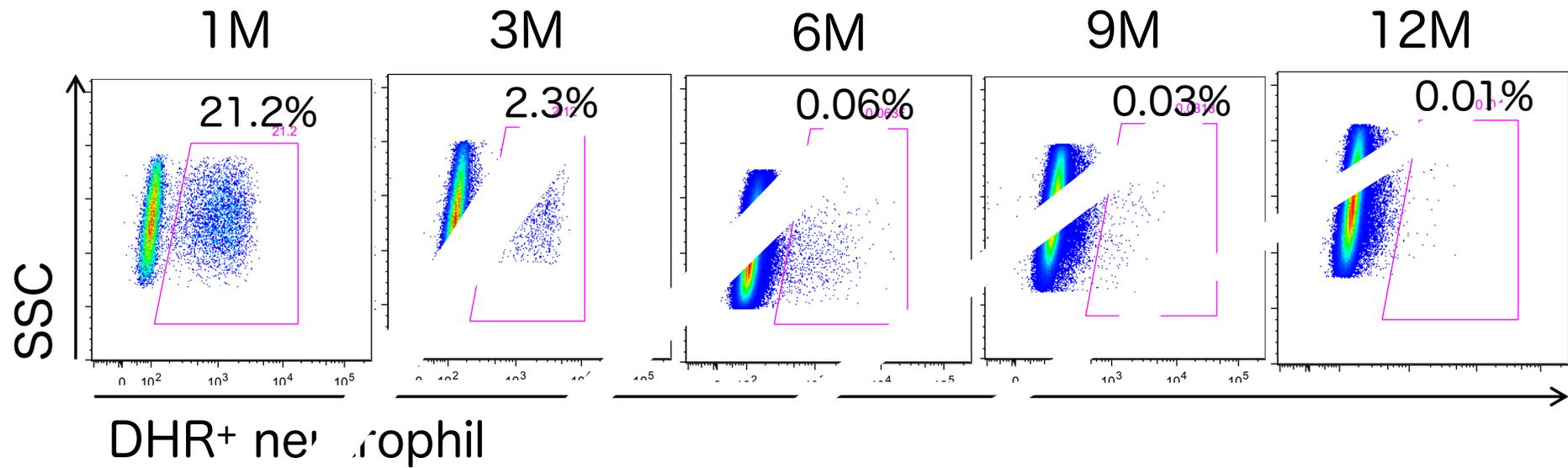


Collection



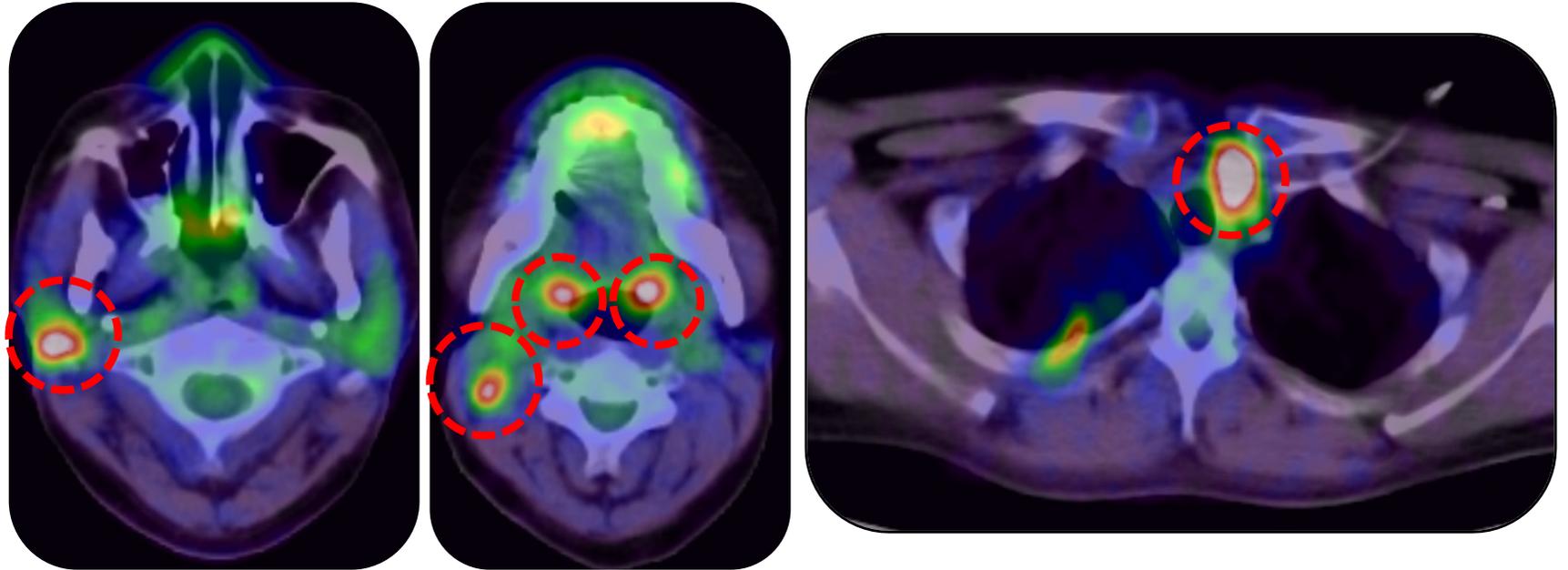
Cell washing (国立成育医療研究センター・GCPセンター)

治療後1年間の末梢血好中球の活性酸素等の解析

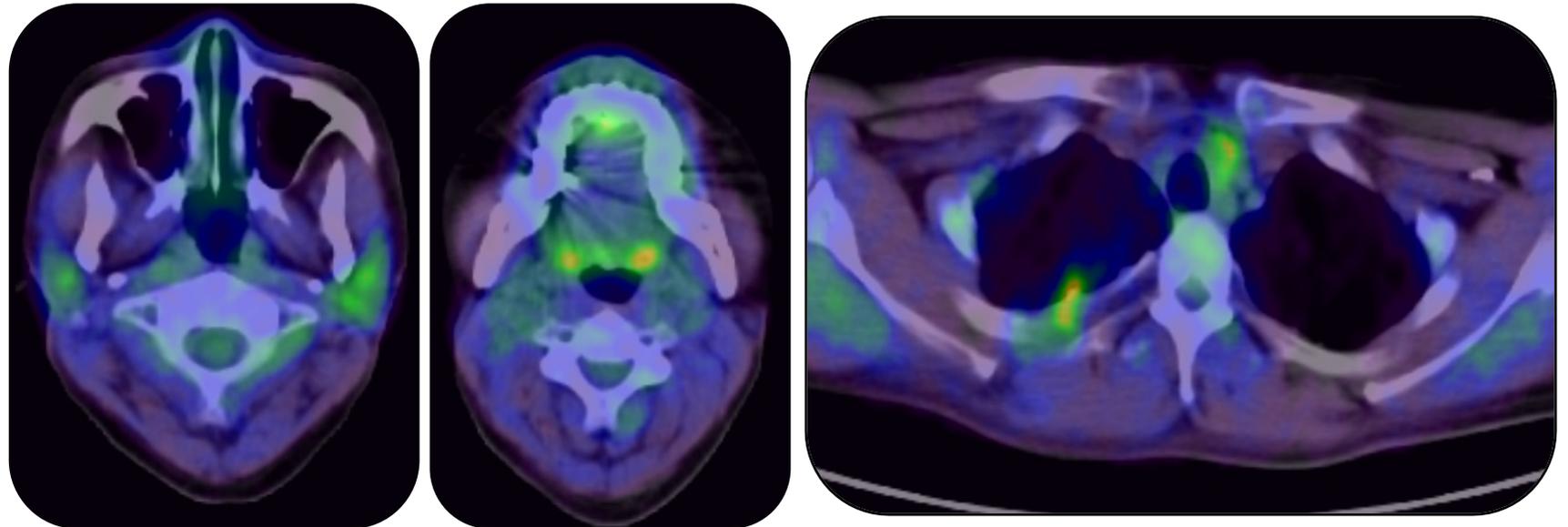


難治性感染症の治癒

治療前

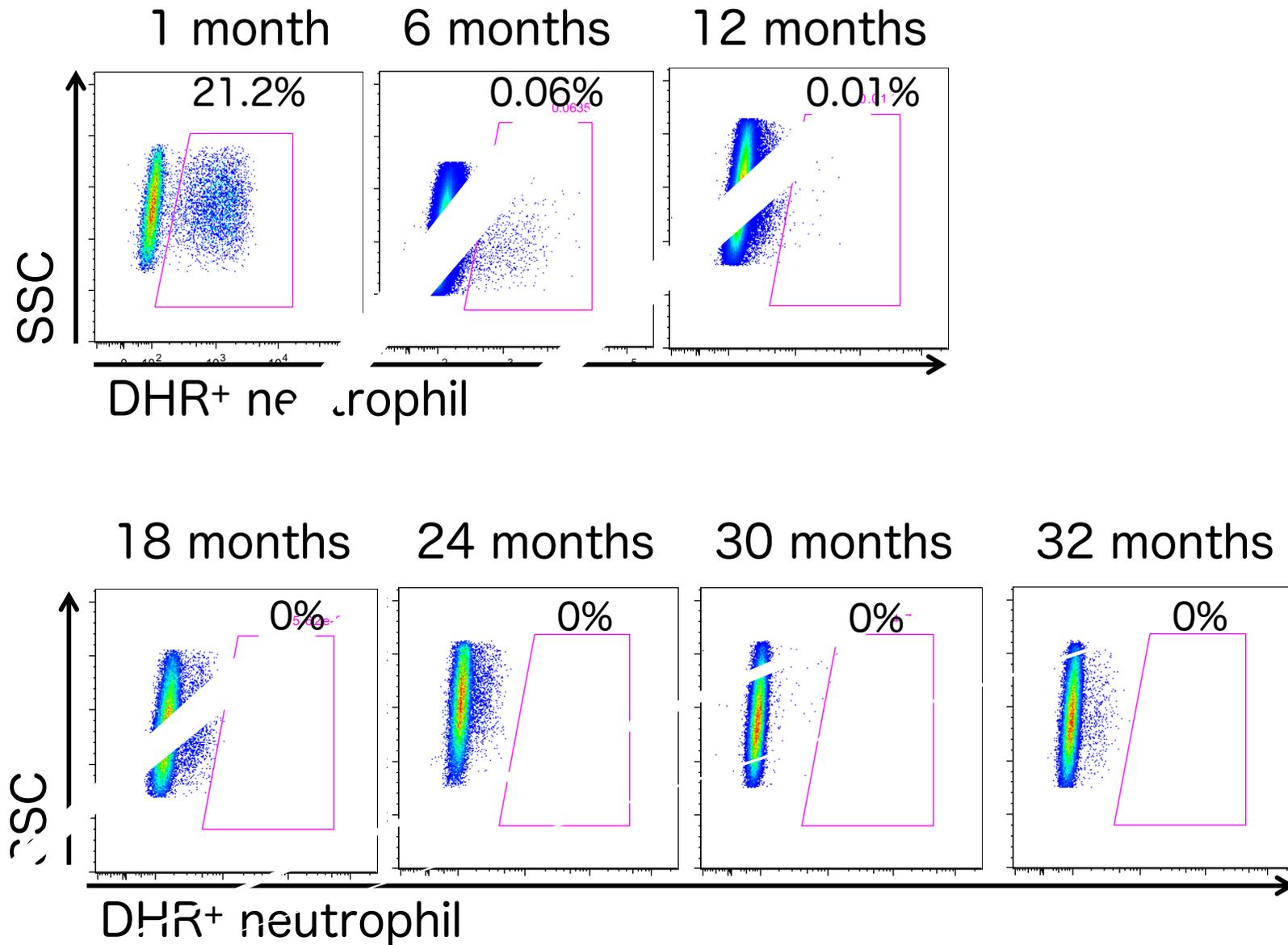


治療後
4M

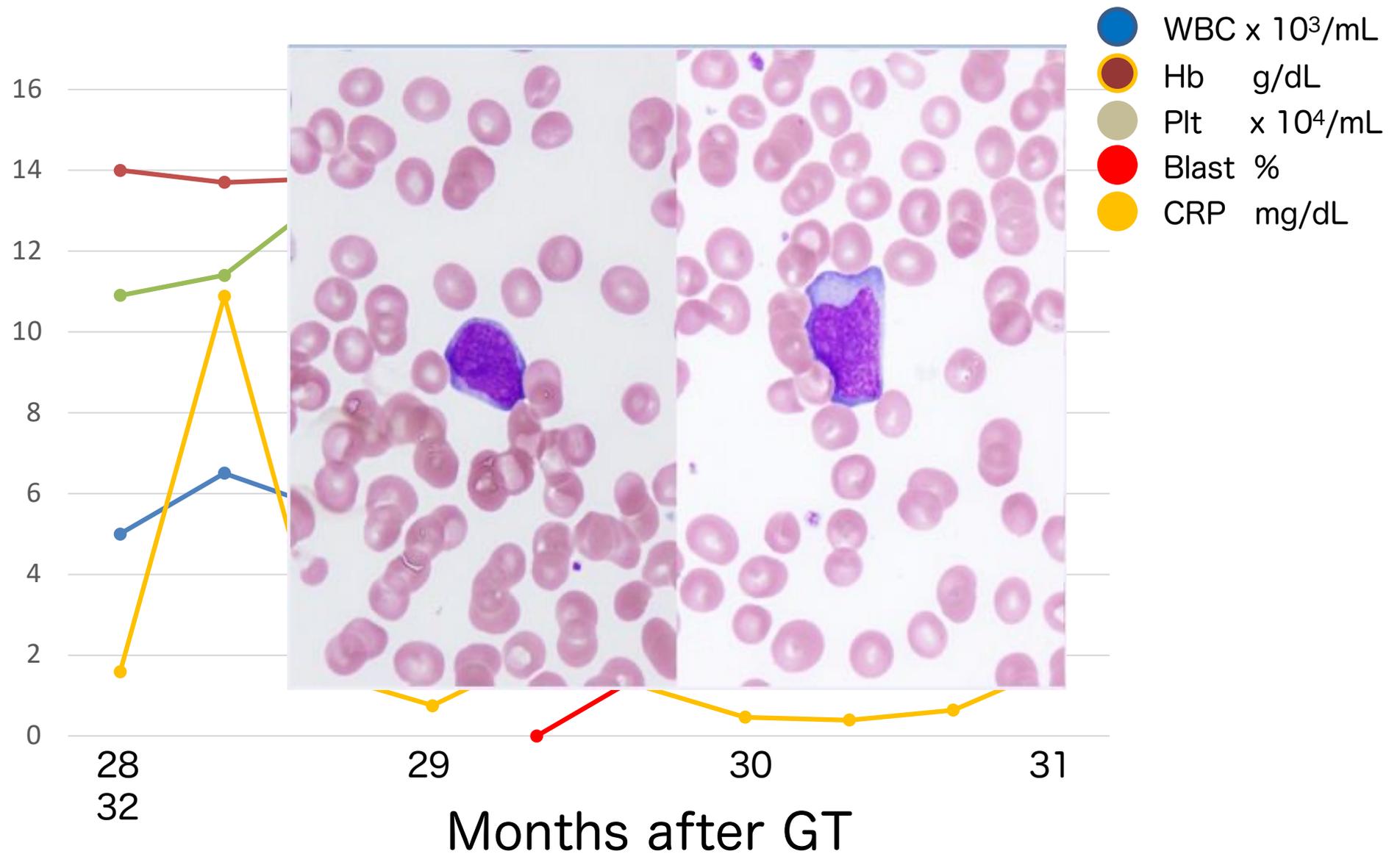


Images of PET-CT

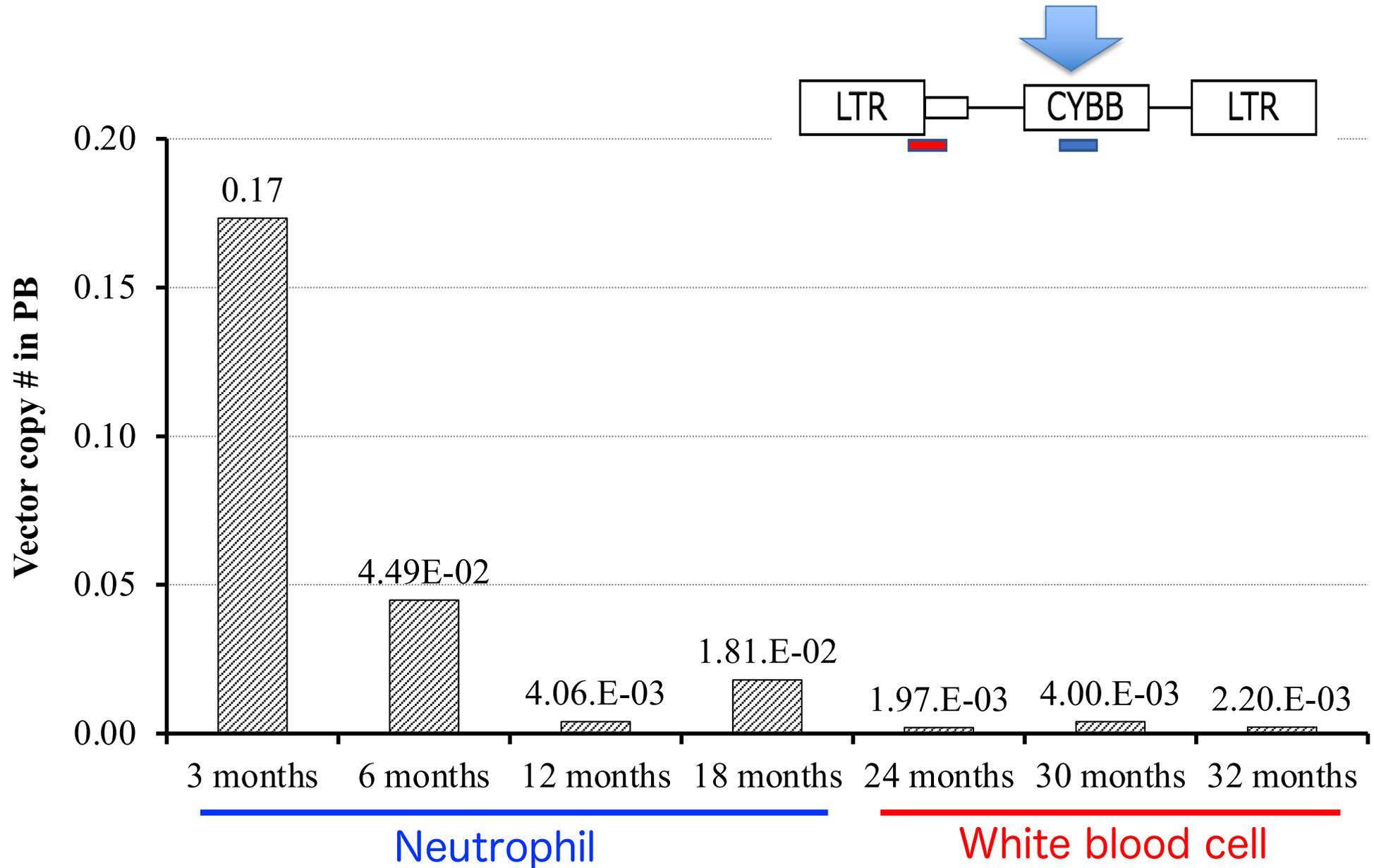
治療後32ヶ月までの活性酸素解析



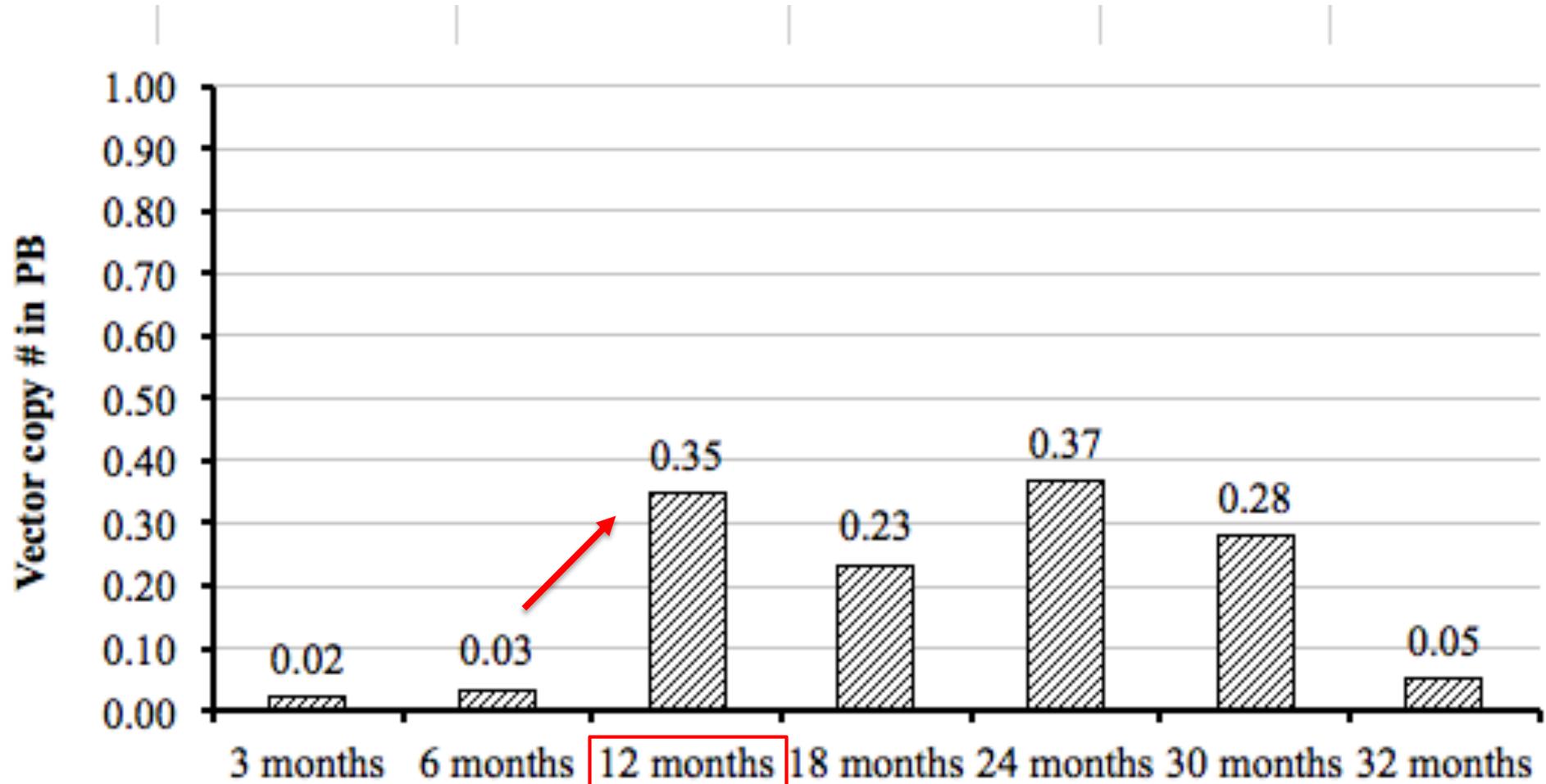
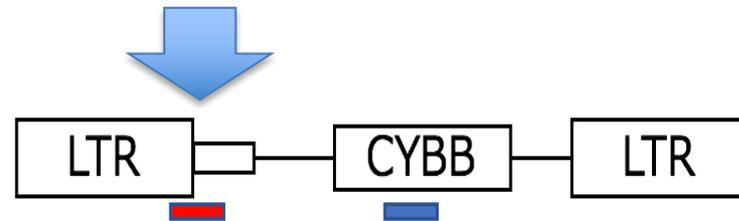
治療後32Mでの芽球の出現



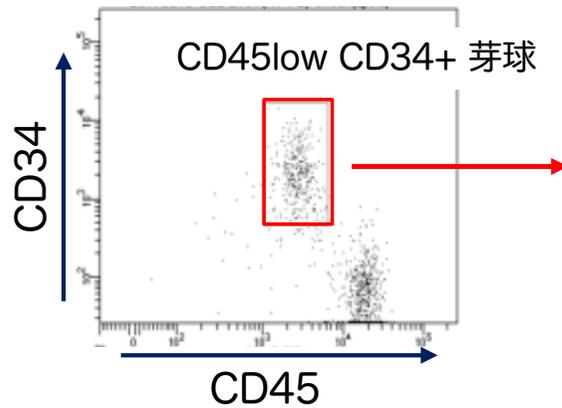
末梢血細胞でのベクターコピー数：LTR



末梢血でのベクターコピー数：CYBB

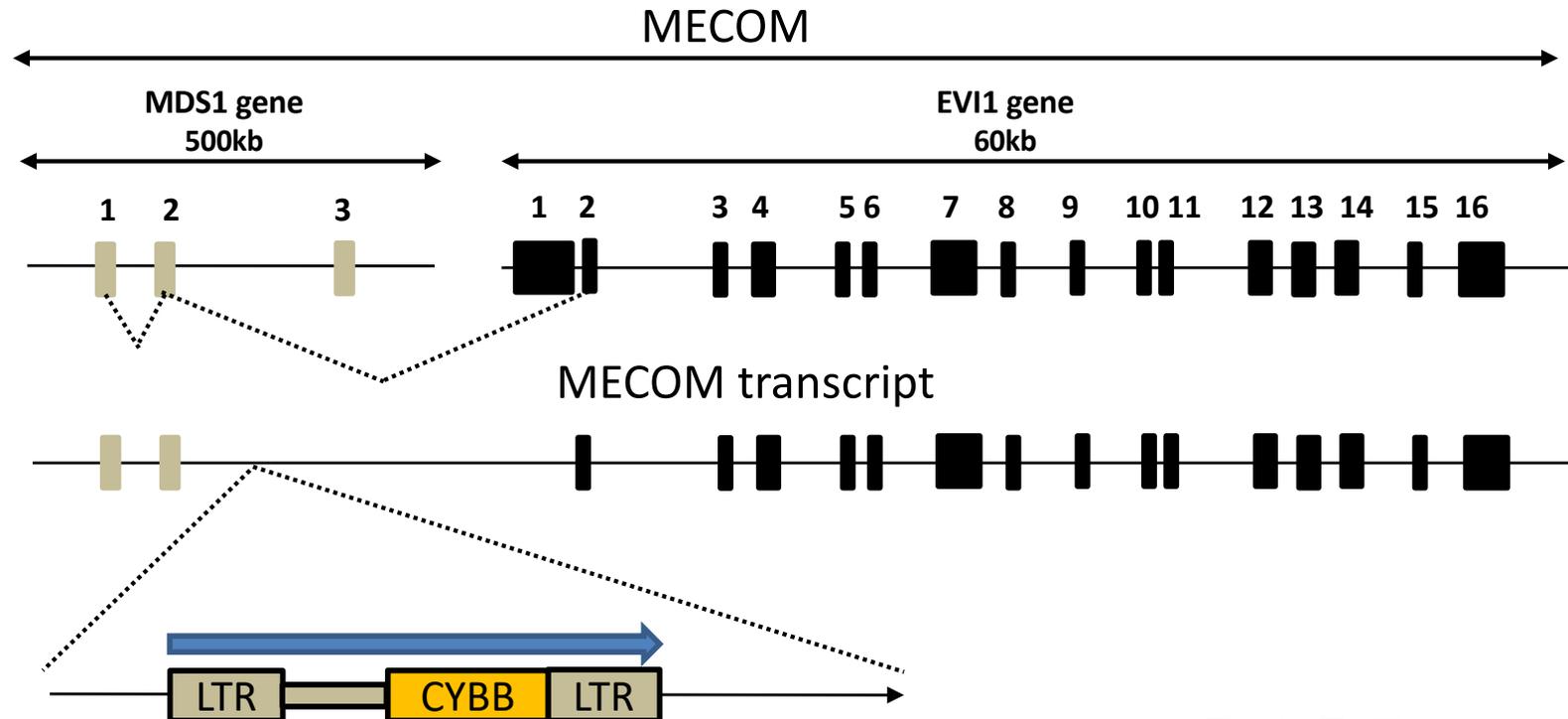


芽球におけるベクター挿入部位解析

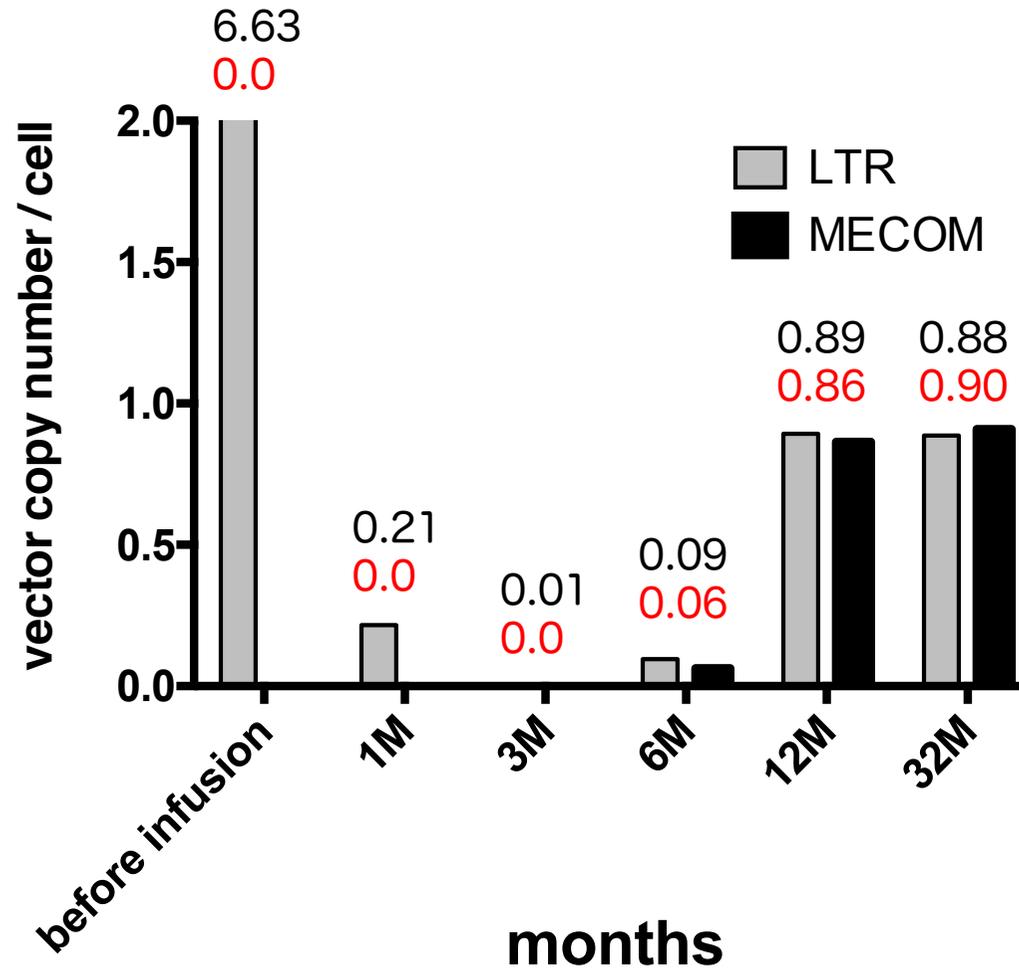


```

TCTTCCGTGTCACCTTATTCTGTCTCATTACTGAGCATAACAGAACTTA
GAACCAACTTTCTCTACAAGTGCAGGAAGAGACTGAGGACAGTGGGCT
GGGGCTAATGCCGTTAACGCAGTTTGCCAGGAAGAAGTGTCTGACAGC
TAGAAGATTCAACTCTGGGTACTTTTTACTGAGGGTATTTCCACAGCCTC
TTCCTACCACCCCCCTCCCTTCTCTGCCAACTCCCTCATCTCAGCAAAA
TCAAATCACACCTGGTACAGATTGAAGTTACCTTGCAAAGTGTGGGCCT
ACAGTAACAGCTCTTCACTACTCACAGCTCATATTTCCAGGCAGCAG
AGTACTAAATCTAGGATGATCAAAACCAGATCTTGAAGTCTAACCTACCA
TGGGTTTGAGAACCCCTTATGAATAGTGAAAAGTTTTCACTGAGCTTTG
GGCCAGAGGTGCACAGAAGCAC
    
```



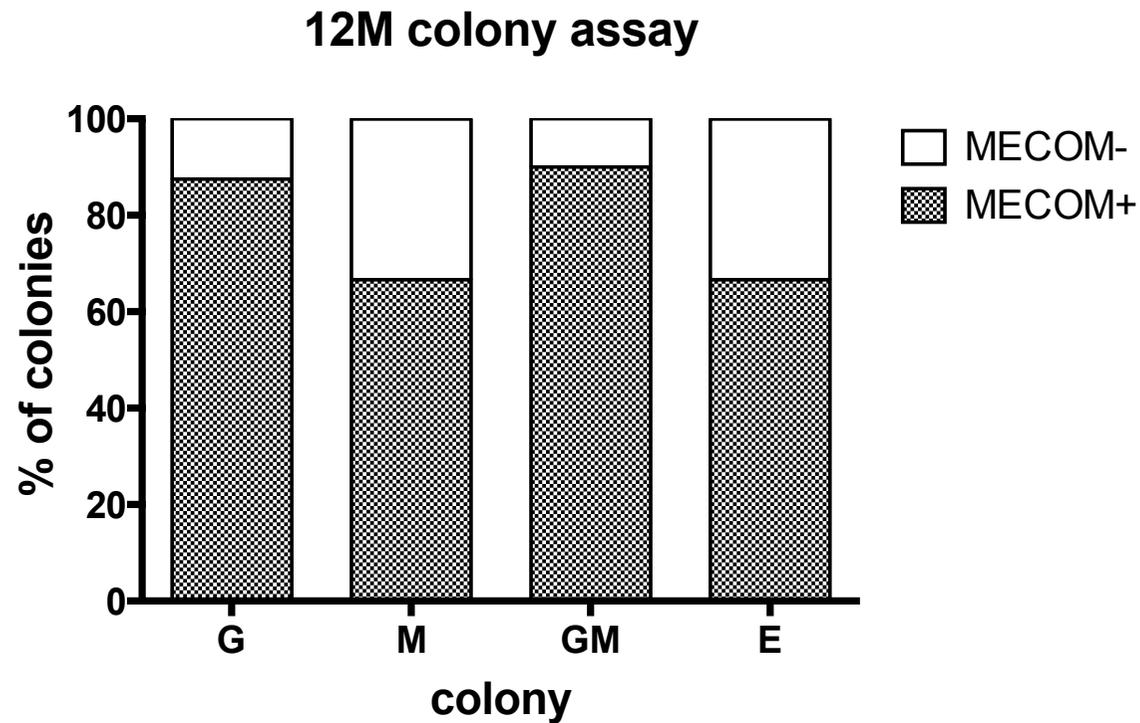
MECOM挿入細胞の割合の推移



MECOM発現細胞のCFU-C

12か月時の骨髄細胞を用いたCFU-Cアッセイ

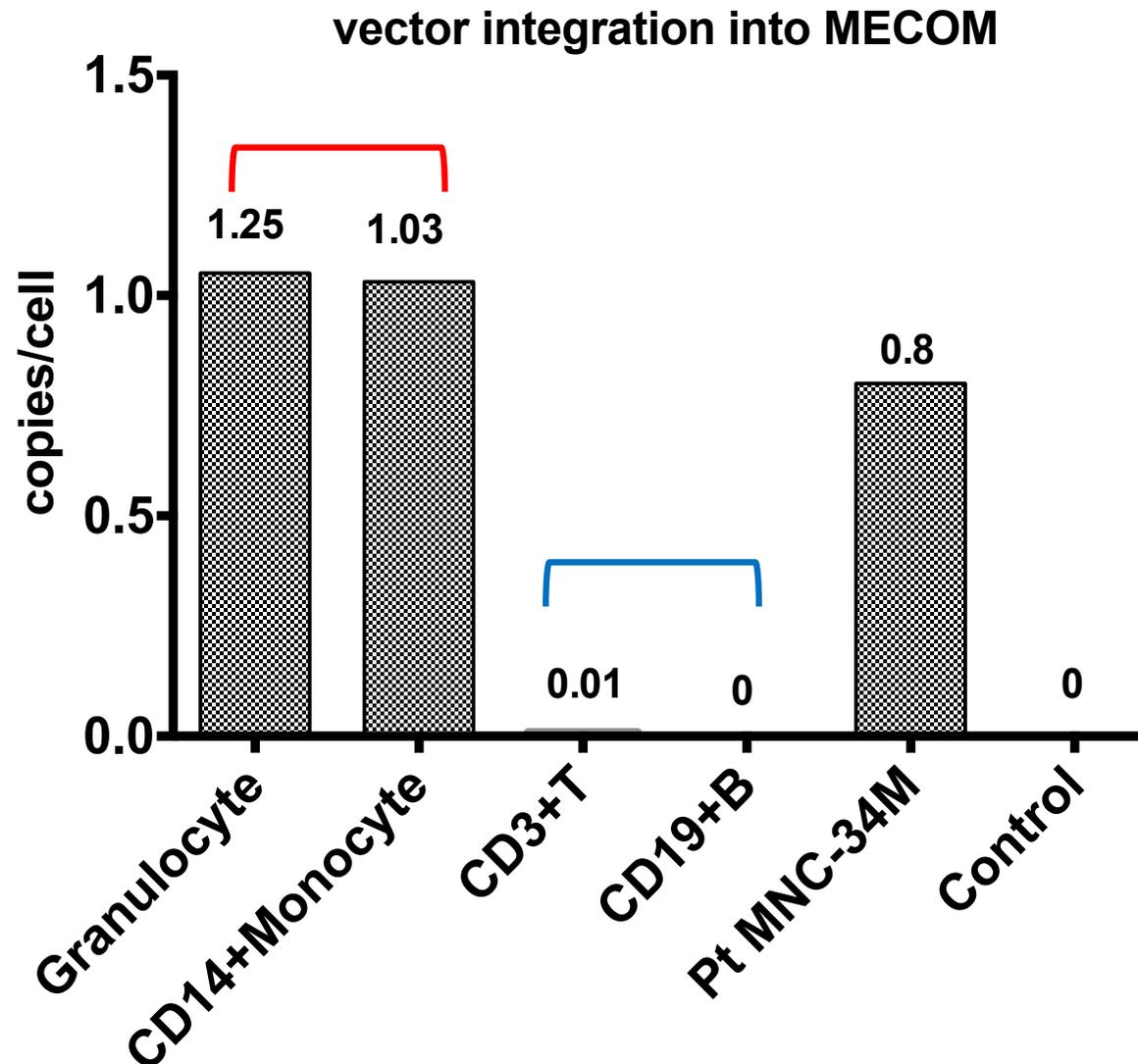
➡ 各コロニーにおけるMECOM遺伝子へのベクター挿入を解析



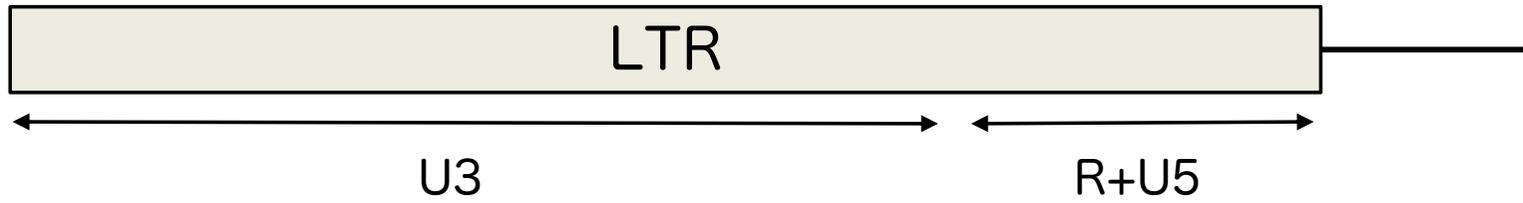
半数以上のコロニーでベクターのMECOM領域への挿入を確認

MECOM発現細胞の各系譜への分化

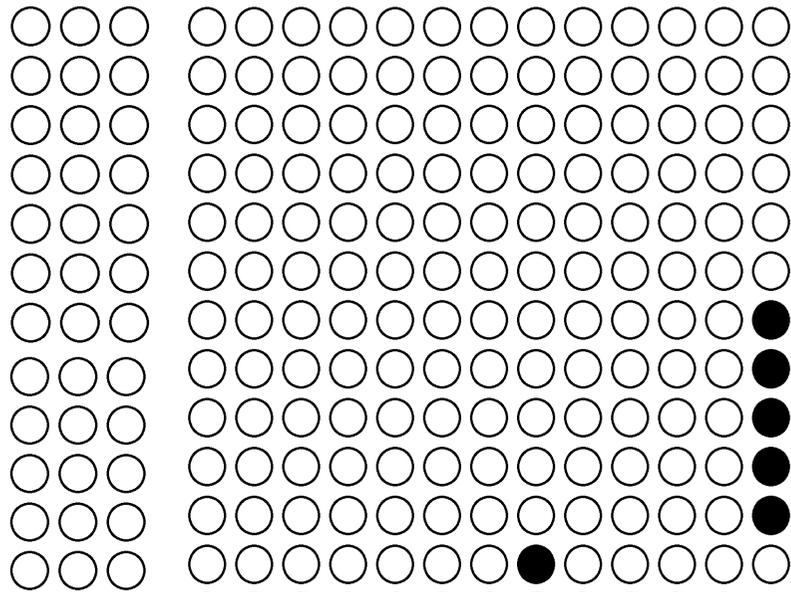
治療16か月の各系譜におけるMECOM領域へのベクター挿入



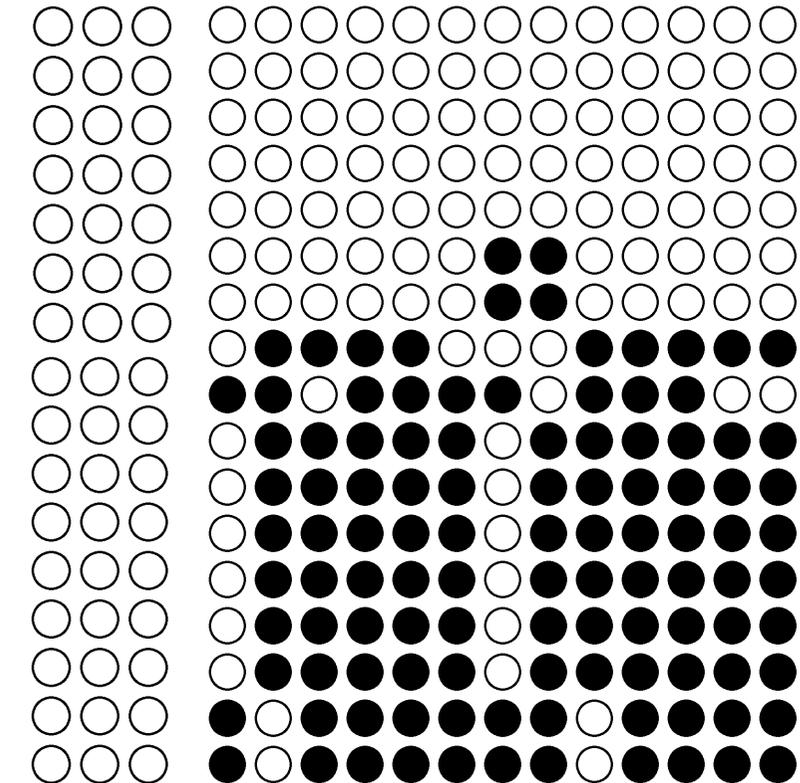
CYBBの発現低下の原因



Cells at 12m
U3



Blasts
U3



クロナリティー解析

Blast 8M

Ex	17.6.15	15.4.16
Ex1		
	1944	○
Ex2	1981	○
	2009	○
Ex3	2079	○
	2121	○
Ex4	2147	○
	2153	○
	2169	○
	2199	○
	2202	○
Ex5	2220	○
	2251	○
	2262	○
	2284	○
	2314	○
	2315	○
	2317	○
	2329	○
Ex6	2355	○
	2371	○
	2375	○
	2394	○
	2488	○
	2498	○
	2520	○
	2554	○
Ex7	2558	○
	2574	○
	2583	○
	2614	○
	2635	○
	2636	○
	2646	○
	2647	○
	2651	○
	2672	○
Ex8	2690	○
	2691	○
	2697	○
	2728	○
	2730	○
	2736	○
2750	○	

	17.6.15	15.4.16	
Ex9	2781	○	
	2817	○	
	2820	○	
	2823	○	
	2838	○	
	2839	○	
	2844	○	
	2845	○	
	2846	○	
	2874	○	
Ex10	2907	○	
	2922	○	
	2923	○	
	2926	○	
	2971	○	
	2972	○	
	2995	○	
	3021	○	
	3033	○	
	3043	○	
Ex11	3046	○	
	3061	○	
	3067	○	
	3070	○	
	3085	○	
	3087	○	
	3090	○	
	3093	○	
	3103	○	
	3104	○	
Ex12	3110	○	
	3115	○	
	3116	○	
	3117	○	
	3183	○	
	3195	○	
	Ex13		
		3229	○
		3235	○
		3239	○
3247		○	
3265		○	
3267		○	
3280		○	
3284		○	
3285		○	
Ex14	3330	○	
	3331	○	
	3334	○	
	3367	○	
	3370	○	
	3372	○	
	3373	○	
	3375	○	
	3379	○	
	3384	○	
Ex15	3396	○	
	3405	○	
	3415	○	
	3416	○	
	3436	○	
	3478	○	
	3494	○	
	3499	○	
	3502	○	
	3507	○	
Ex16	3583	○	
	102	○	
	504	○	
	117	○	
	362	○	
	709	○	
	810	○	
	823	○	
	844	○	
	878	○	
Ex17	887	○	
	916	○	
	1108	○	
	1123	○	
	1127	○	
	1133	○	
	1160	○	
	1270	○	
	1349	○	
	1430	○	
Ex18	1444	○	
	1513	○	
	1523	○	
	1553	○	
	1564	○	
	1619	○	
	1628	○	
	1638	○	
	1738	○	
	1745	○	
Ex19	1761	○	
	1821	○	
	1840	○	
	1862	○	
	3598	○	
	3600	○	
	3601	○	
	3608	○	
	3628	○	
	3642	○	
Ex20	3660	○	
	3691	○	
	3697	○	
	3717	○	
	3848	○	
	3854	○	
	3863	○	
	4108	○	
	4291	○	
	4305	○	
4313	○		

	17.6.15	15.4.16	
Ex9	2781	○	
	2817	○	
	2820	○	
	2823	○	
	2838	○	
	2839	○	
	2844	○	
	2845	○	
	2846	○	
	2874	○	
Ex10	2907	○	
	2922	○	
	2923	○	
	2926	○	
	2971	○	
	2972	○	
	2995	○	
	3021	○	
	3033	○	
	3043	○	
Ex11	3046	○	
	3061	○	
	3067	○	
	3070	○	
	3085	○	
	3087	○	
	3090	○	
	3093	○	
	3103	○	
	3104	○	
Ex12	3110	○	
	3115	○	
	3116	○	
	3117	○	
	3183	○	
	3195	○	
	Ex13		
		3229	○
		3235	○
		3239	○
3247		○	
3265		○	
3267		○	
3280		○	
3284		○	
3285		○	
Ex14	3330	○	
	3331	○	
	3334	○	
	3367	○	
	3370	○	
	3372	○	
	3373	○	
	3375	○	
	3379	○	
	3384	○	
Ex15	3396	○	
	3405	○	
	3415	○	
	3416	○	
	3436	○	
	3478	○	
	3494	○	
	3499	○	
	3502	○	
	3507	○	
Ex16	3583	○	
	102	○	
	504	○	
	117	○	
	362	○	
	709	○	
	810	○	
	823	○	
	844	○	
	878	○	
Ex17	887	○	
	916	○	
	1108	○	
	1123	○	
	1127	○	
	1133	○	
	1160	○	
	1270	○	
	1349	○	
	1430	○	
Ex18	1444	○	
	1513	○	
	1523	○	
	1553	○	
	1564	○	
	1619	○	
	1628	○	
	1638	○	
	1738	○	
	1745	○	
Ex19	1761	○	
	1821	○	
	1840	○	
	1862	○	
	3598	○	
	3600	○	
	3601	○	
	3608	○	
	3628	○	
	3642	○	
Ex20	3660	○	
	3691	○	
	3697	○	
	3717	○	
	3848	○	
	3854	○	
	3863	○	
	4108	○	
	4291	○	
	4305	○	
4313	○		

	17.6.15	15.4.16
LTR	102	○
	504	○
	117	○
	362	○
M M LV ←	709	○
	810	○
	823	○
	844	○
	878	○
	887	○
	916	○
	1108	○
	1123	○
	1127	○
gag (truncated)	1133	○
	1160	○
	1270	○
	1349	○
	1430	○
	1444	○
	1513	○
	1523	○
	1553	○
	1564	○
pol region	1619	○
	1628	○
	1638	○
	1738	○
	1745	○
	1761	○
	1821	○
	1840	○
	1862	○
	3598	○
3600	○	
3601	○	
3608	○	
3628	○	
3642	○	
3660	○	
3691	○	
3697	○	
3717	○	
3848	○	
3854	○	
3863	○	
4108	○	
4291	○	
4305	○	
4313	○	

G to A mutations in CYBB

Number: position of G>A in blasts

○: G>A detected also at 8M

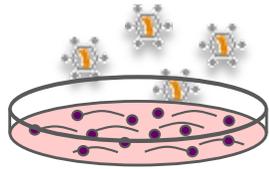
ほぼすべてのG>A 変異が8か月の段階で存在



モノクローナルな増殖が始まる時点ですべての変異を確認

挿入変異に関する考察

1. ウイルス産生時

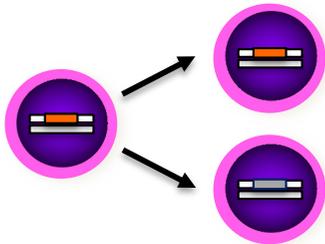


ベクター上清のNGSによる網羅的解析



品質管理

2. 細胞分裂時 (DNA複製時)



DNA polymerase

Proof-reading repair $1/10^8-10^{10}$



細胞分裂の度、変異が蓄積

3. ウイルスゲノム転写時



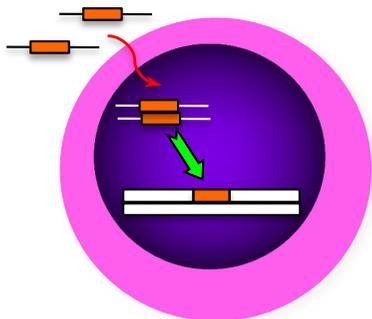
RNA polymerase II

Fidelity $1/10^3-10^4$



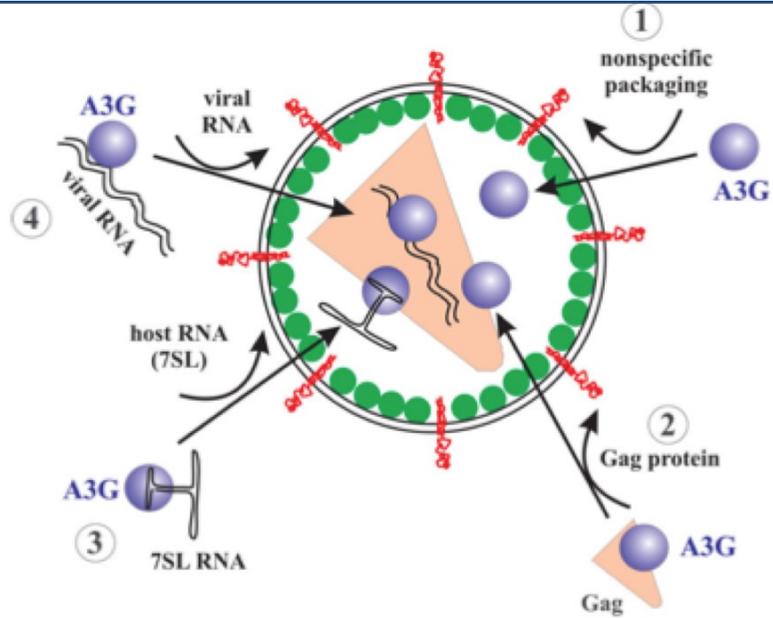
Gag-pol-envがない。再感染しない

4. 逆転写時

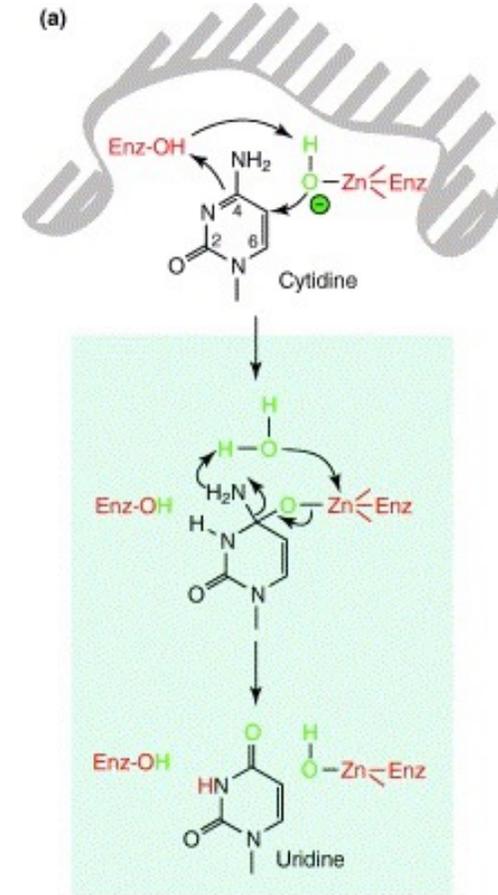


シチジン変換酵素 APOBEC3 が抑制因子として機能

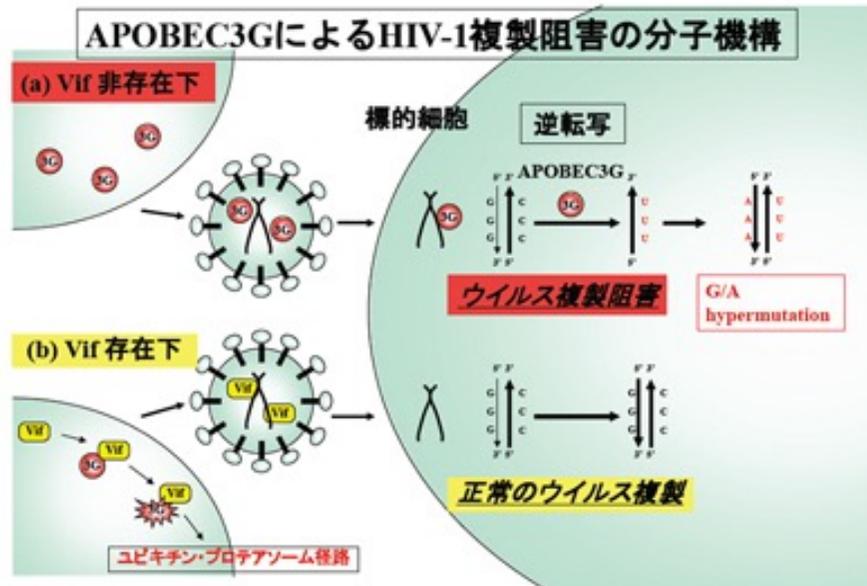
APOBEC3



1. Non-specific packaging of APOBEC3G
2. APOBEC3G interaction with host RNA
3. APOBEC3G interaction with viral RNA
4. Interaction of APOBEC3G with HIV-1Gag proteins



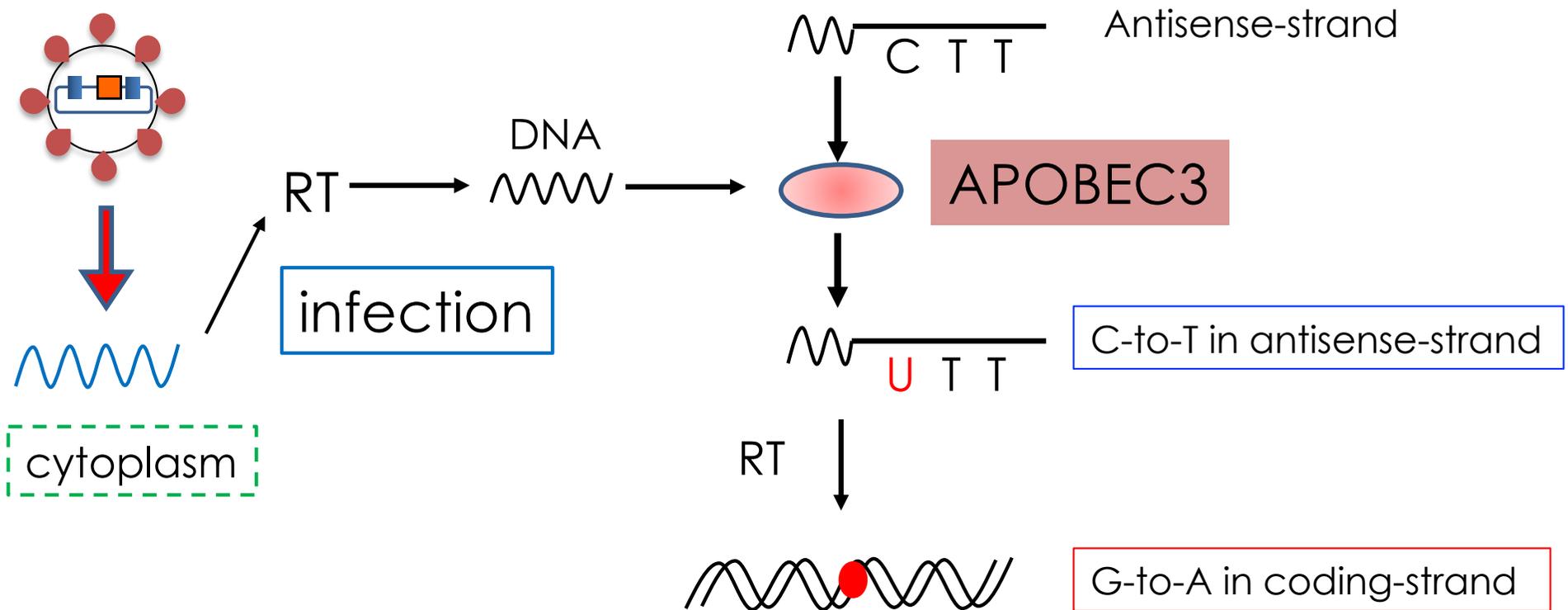
Cytidine → Uridine

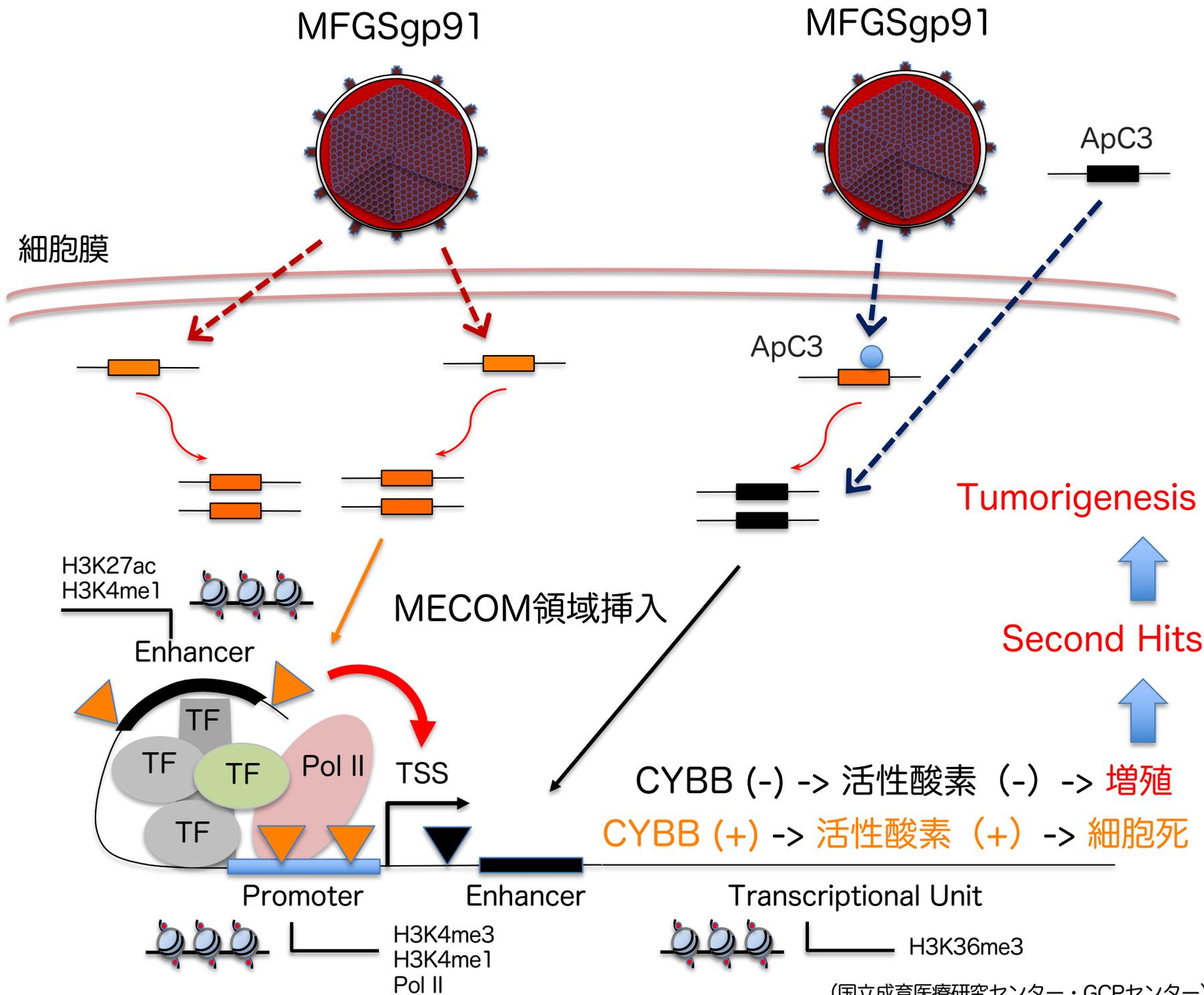


プロウイルス変異の発症機序

- 芽球（32ヶ月）で認められた変異の全てが治療後6ヶ月の時点で認められる。
 - 変異の蓄積ではなく、早期に変異が出現している。
- Coding-strandにはG-to-Aの変異のみ検出される。
 - 一本鎖のDNAもしくはRNAで変異が出現した可能性。

APOBEC3Cによるプロウイルスへの変異

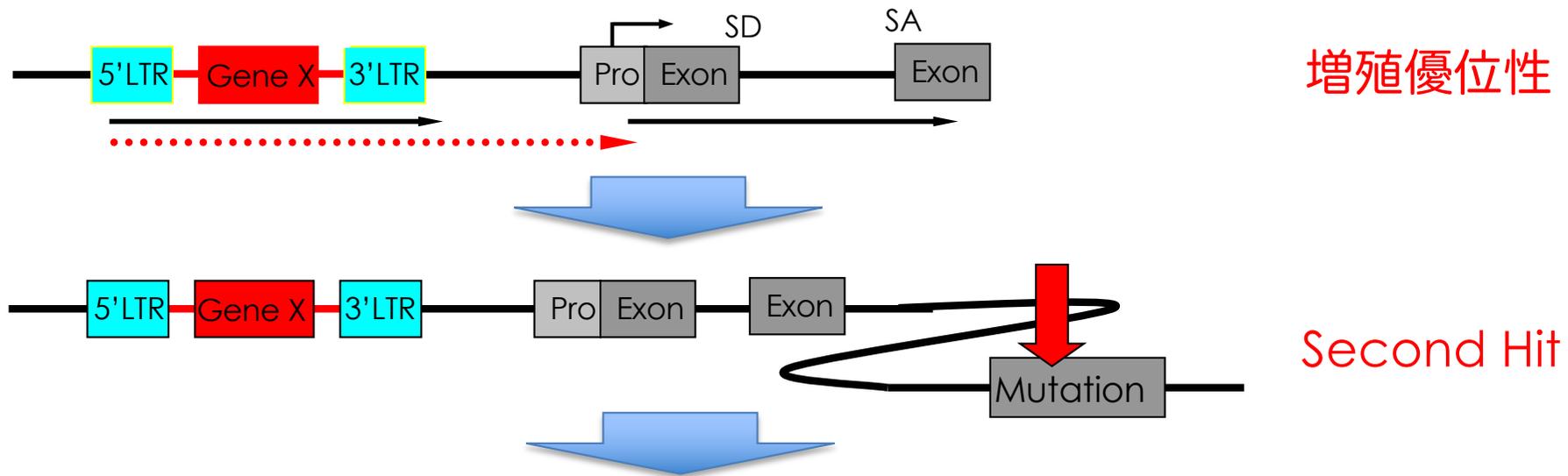




遺伝子治療における多段階機序による白血病発症

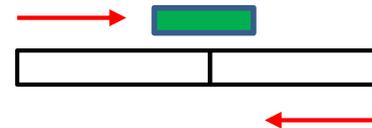
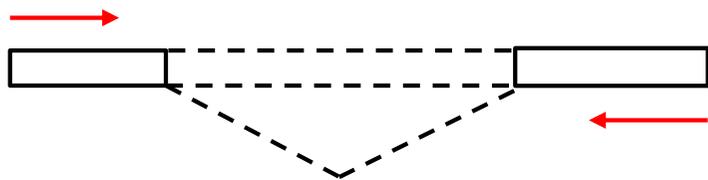
SCID-X1における挿入部位以外の遺伝子変異

実施国	患者	年齢	発症時期	挿入部位	染色体変異	Notch変異	CDKN2A
フランス	P4	1	30	LMO2	t(6,13)		+
	P5	3	34	LMO2	SIL-TAL, trisomy 10	1593F/S	
	P7	11	68	CCND2			+
	P10	8	33	LMO2,BMI1		1707A/P	
イギリス	P8	10	24	LMO2	SIL-TAL	1599R/P	+



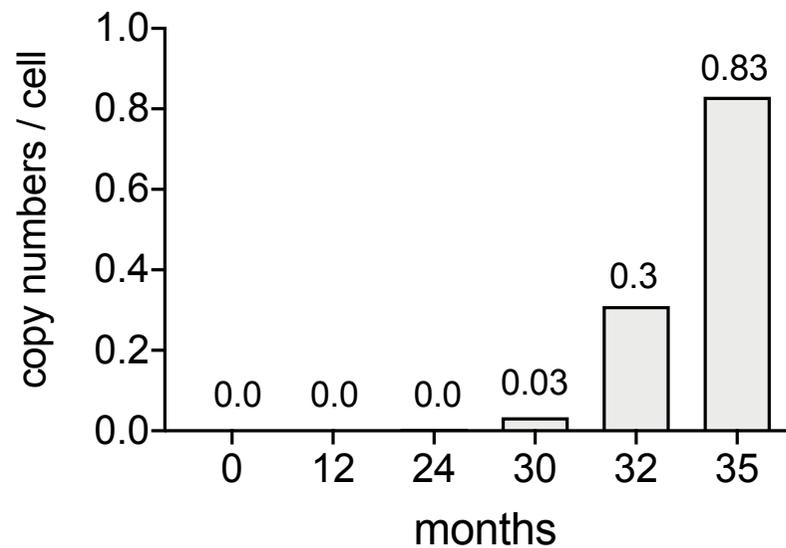
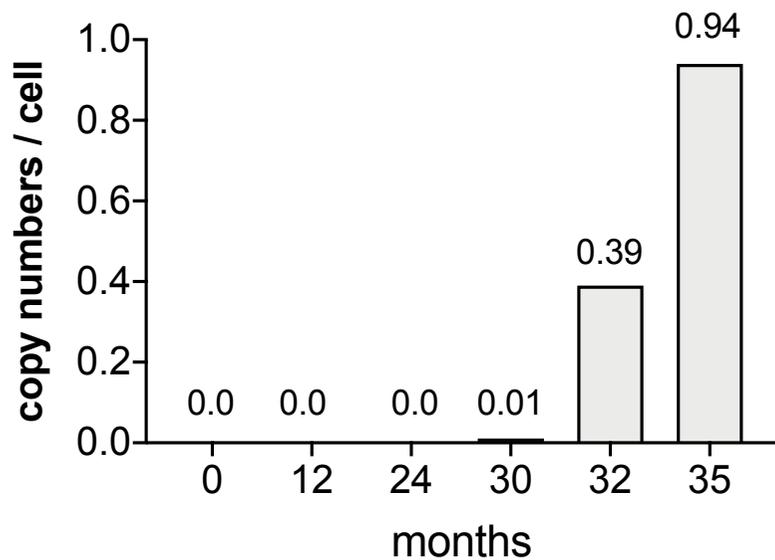
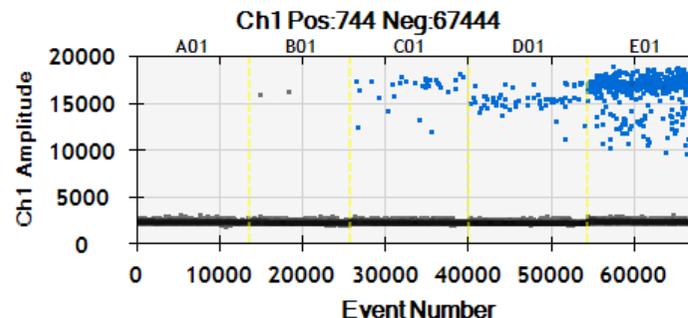
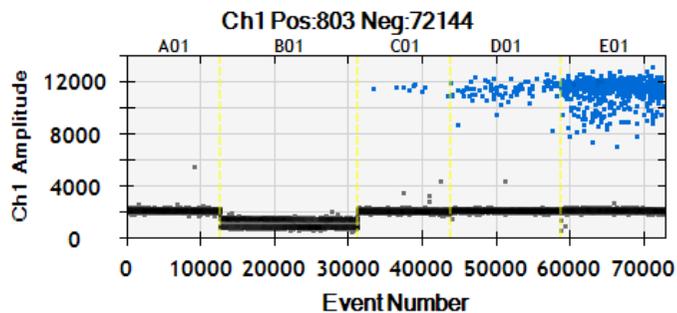
遺伝子導入細胞の腫瘍化

WT1遺伝子の欠損



1. chr11:32,431,725-32,454,841 (23kb deletion)

2. chr11:30,327,021-37,027,358 (6.7MB deletion)



造血幹細胞におけるCYBBの強発現および活性酸素の影響

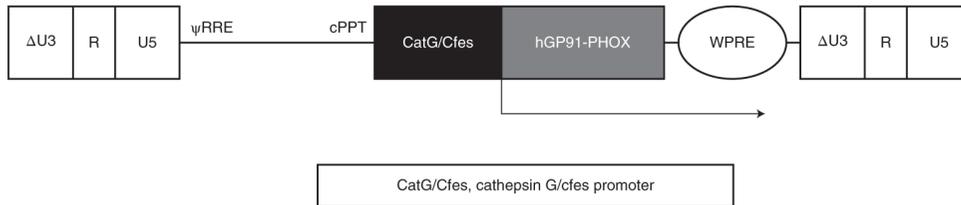
- CYBBの発現
- 活性酸素

造血幹細胞 \longrightarrow 好中球

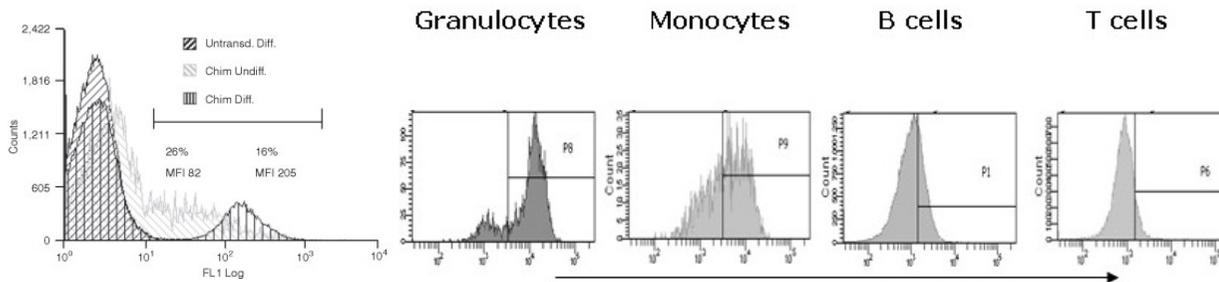


造血幹細胞および好中球分化におけるCYBBの異常発現

- 好中球分化の障害
 - 造血幹細胞への毒性
- \longrightarrow 遺伝子導入細胞の消失

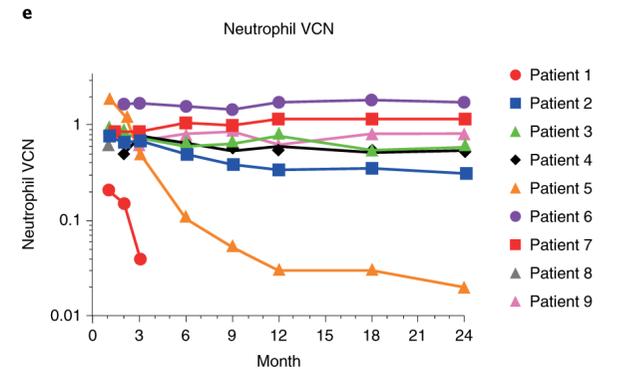
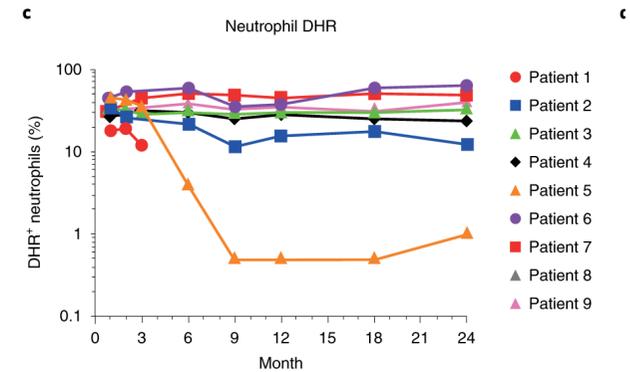


Chimeric myeloid specific promoter (MSP)



(Mol Ther. 19:122-132, 2011)

7D5-FITC

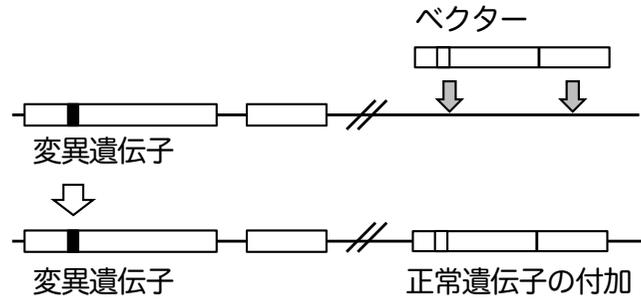


(Nat Med. 2019)

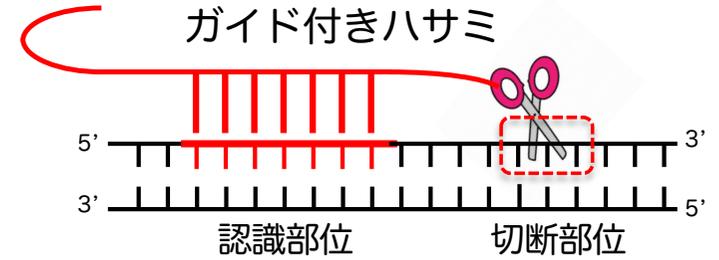
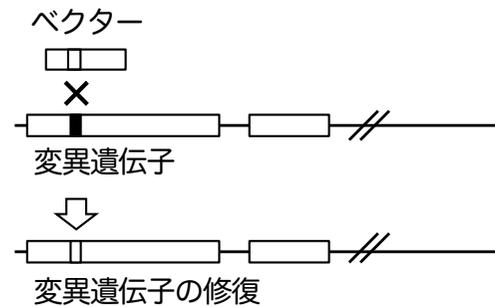
- 骨髄球系特異的プロモーターの使用により遺伝子導入細胞の長期の生着が認められる

ゲノム編集技術

gene addition



gene correction



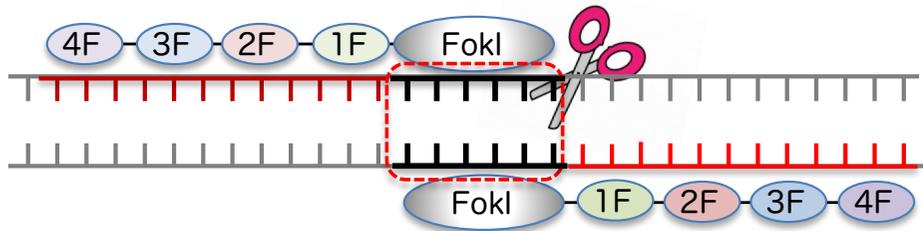
ヒト塩基 31億個から
目的の配列を同定

$$31 \text{億} = 3.1 \times 10^9$$

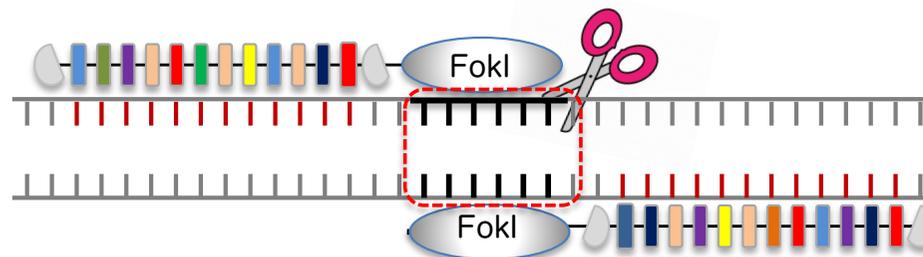
$$\text{塩基} 15 \text{個} = 4^{15} = 1 \times 10^9$$

$$\text{塩基} 16 \text{個} = 4^{16} = 4 \times 10^9$$

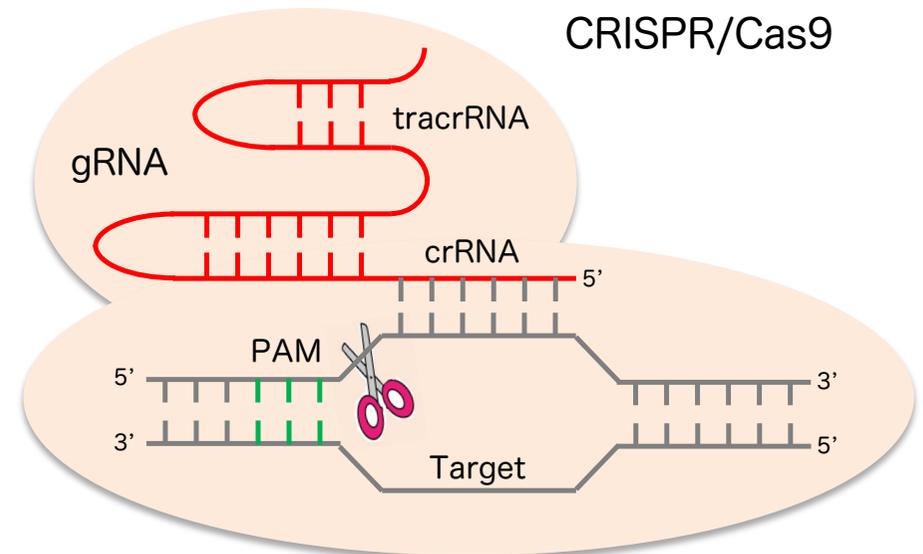
ZFNs



TALENs



CRISPR/Cas9



Safe Harbor

- 定義

1. 遺伝子転写領域外
2. 遺伝子開始点（N端）より50kb外側
3. がん原遺伝子開始点（N端）、終止点（C端）より300kb外側
4. miRNA開始点（N端）、終止点（C端）より300kb外側

- 頻度

1. 62.52%、2. 62.94%、3. 76.78%、4. 91.27%

1~4の全てを満たす領域 38.4%

代表的遺伝子領域 *CCR5*、*AAVS1*

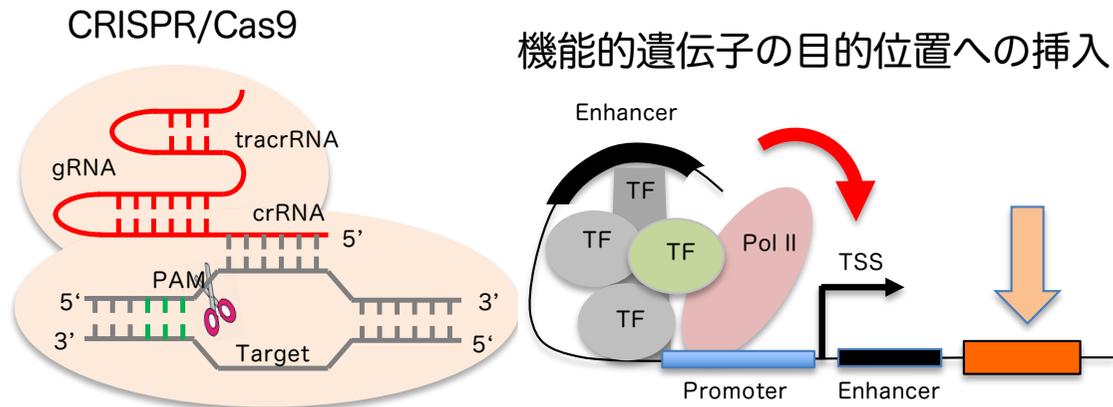
なぜゲノム編集による遺伝子治療が必要なのか

1. 機能破壊型：universal CAR-T療法、 β TH/SCD

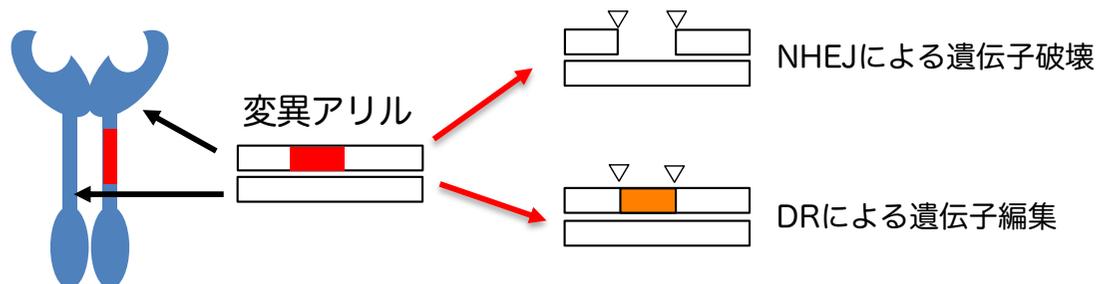


標的細胞	変異部位	導入効率	発現調節
T cell HSC	遺伝子 固定	中～高	不要
HSC T cell	部位 固定	低	必要
HSC	部位 固定	高	必要

2. 発現調節型：CD40L欠損症

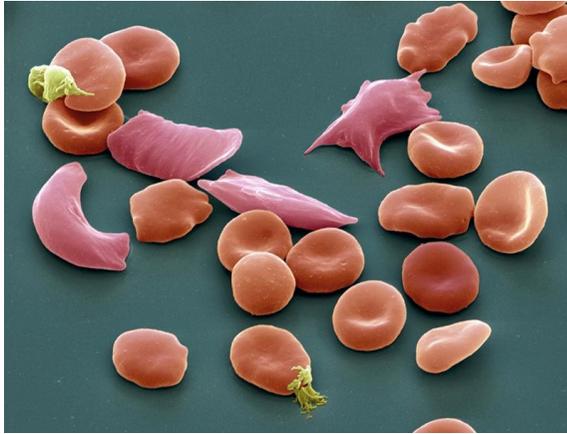


3. Dominant Negative型：STAT3変異

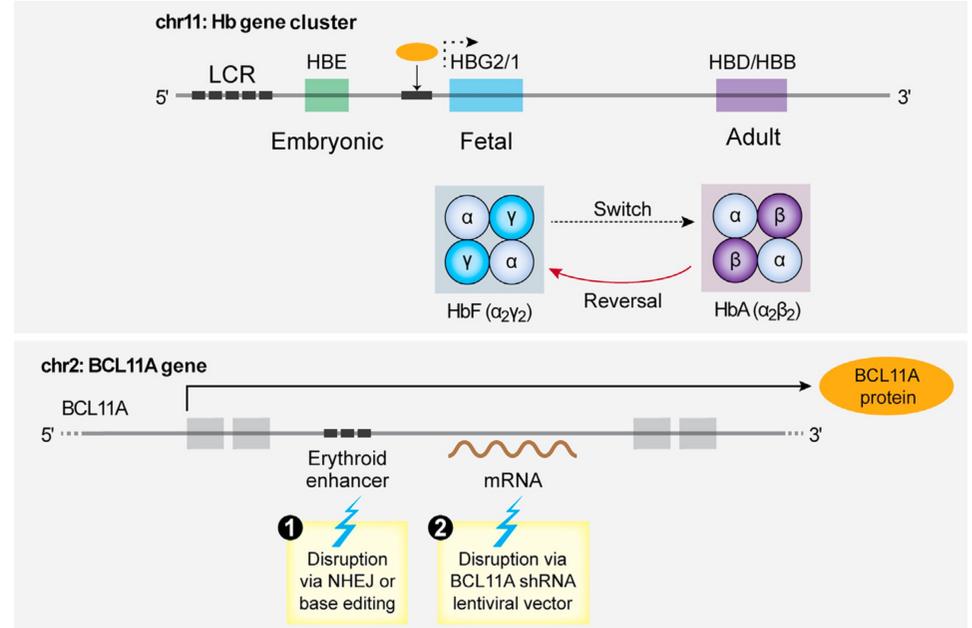


遺伝子改変細胞のみの選択

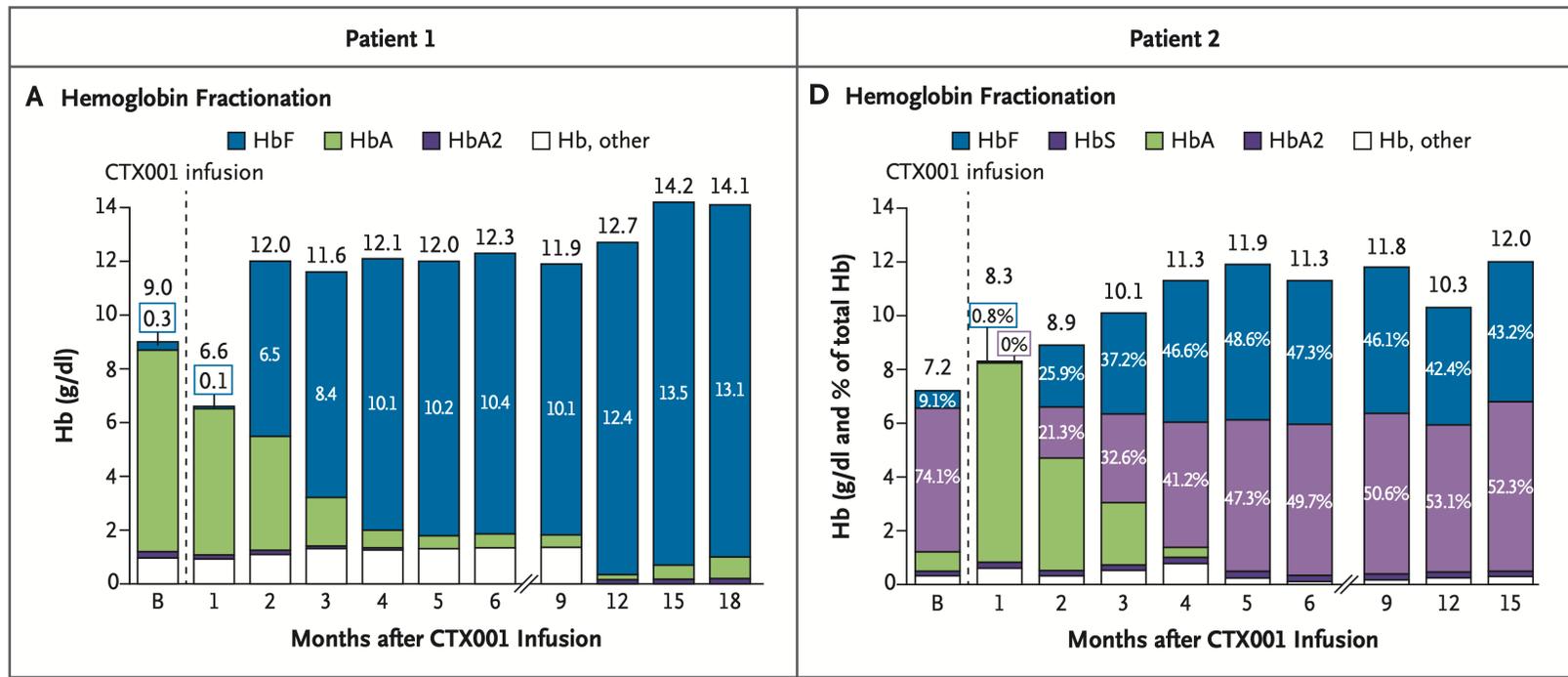
CRISPR/Casを用いたSCDの臨床試験



SCD Pts Hb遺伝子をCRISPR/Casで破壊し、胎児型ヘモグロビン (HbF)を誘導



Trends in Genetics, 38: 1286, 2022.



NEJM, 384: 252, 2021.

臨床試験における安全性評価

LTFU観察の期間

- ・ 遺伝子治療用製品のin vivoが持続する期間
- ・ 導入遺伝子の発現が予想される期間
- ・ in vivoにおける遺伝子治療用製品の特性
- ・ 投与経路
- ・ 治療患者の期待される生存期間と背景
- ・ LTFU観察を行う際に可能的及び科学的妥当性（治療効果の期間）

一般的な推奨期間

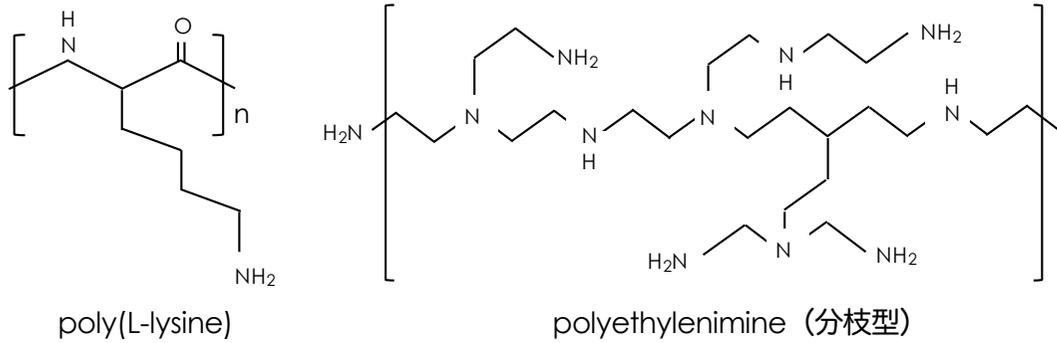
- ・ 15年：ガンマレトロウイルス、レンチウイルス、トランスポゾン等のヒトゲノム挿入型
 - ・ ~15年：ヒトゲノム編集による製品
 - ・ ~5年：AAVベクター
- 加えて、使用するベクターの特性を考慮
- ・ 潜在性（ヘルペスウイルス）、ゲノムに挿入しないが発現が長期化するもの（AAV）

以下の項目を記載

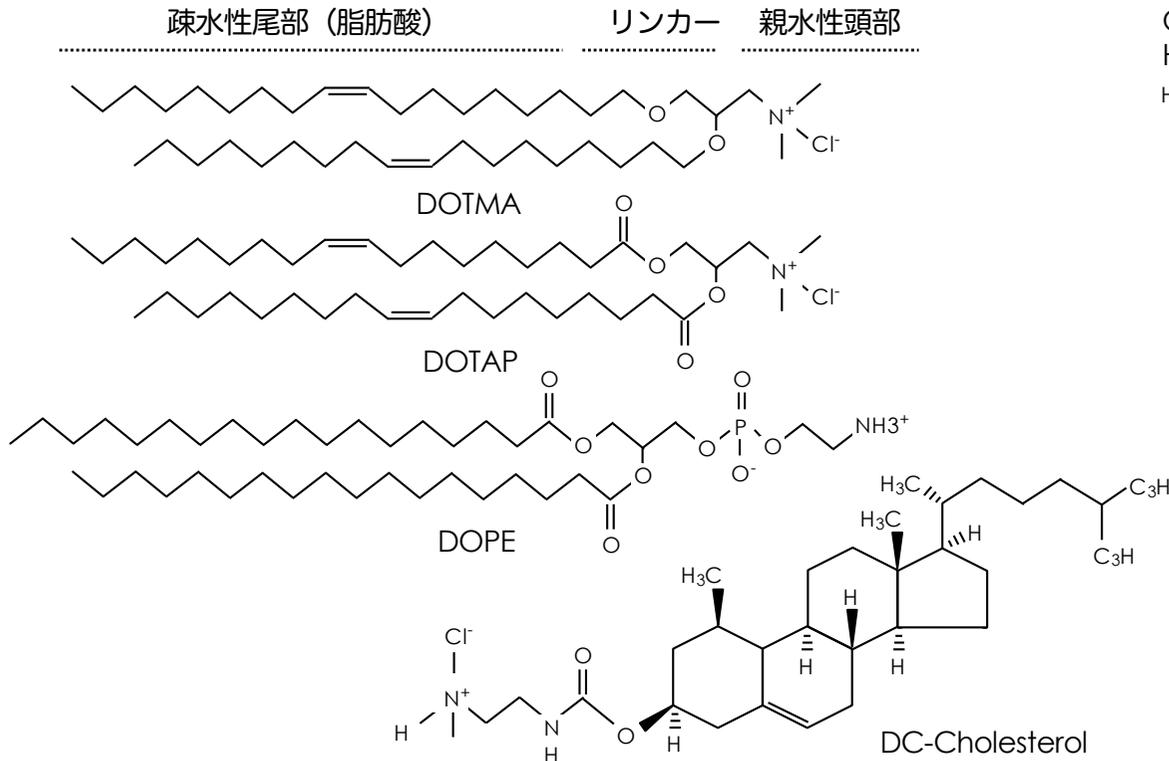
- ・ 患者受診スケジュール、血液等の検体採取計画、モニタリングの方法、注意すべき臨床での事項
- ・ 正確な記録の管理・保管
- ・ 医療技術提供者（Health care providers: HCPs）に対するテンプレート、マニュアル
- ・ 直接検査が侵襲性が高い場合は代用試験（surrogate test）。但し、規制側と相談

非ウイルスベクターへの展開

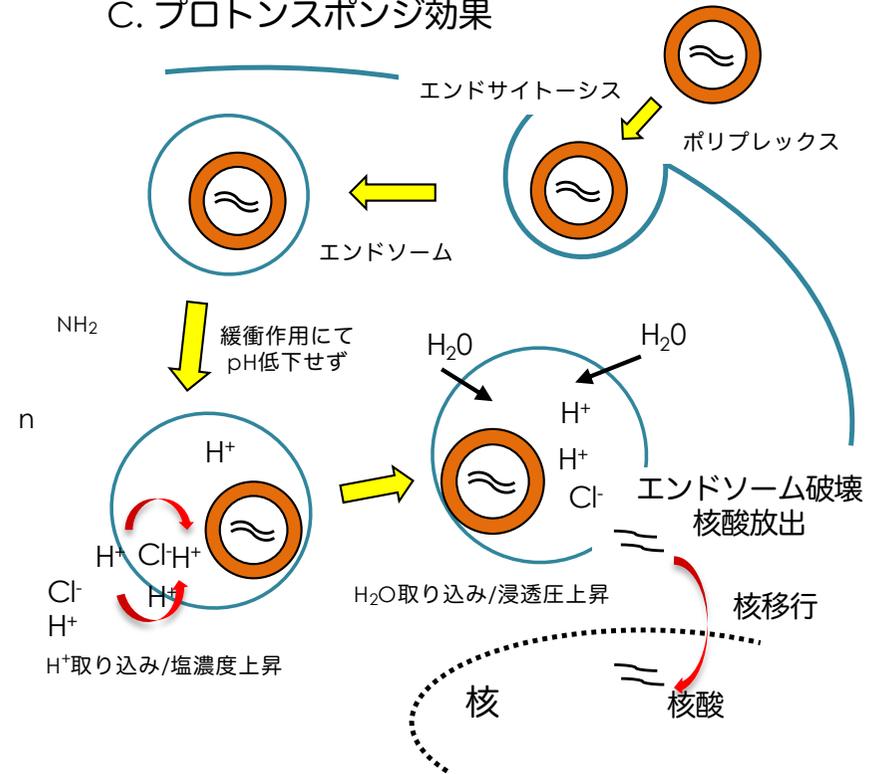
A. カチオン性ポリマー



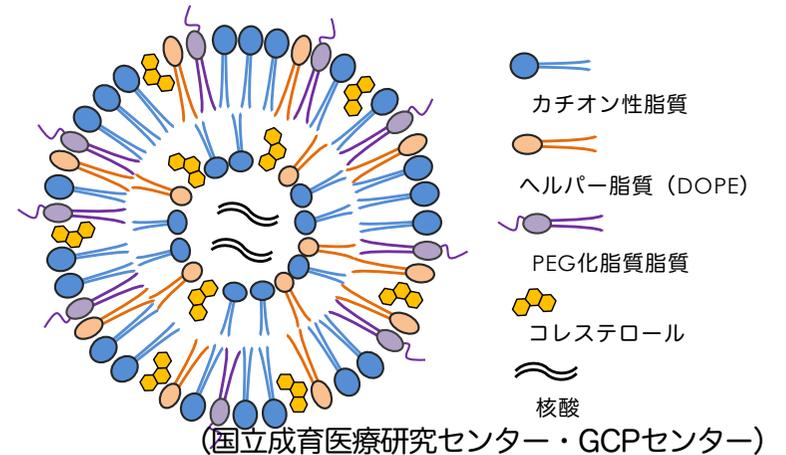
B. カチオン性リポソーム



C. プロトンスポンジ効果



D. pH感受性リポプレックス



非ウイルスベクターの利点・欠点

利点：安全性（組込みリスクが低い）、**一過性発現**

欠点：低遺伝子導入効率、毒性（細胞障害性）、**一過性発現**

	製造法	発症	症状	時期	文献
CD19-CAR	PiggyBac transposon	2/10	CAR-Tリンパ腫	Day+100頃？	Blood. 138: 1391, 2021 Blood. 138: 1504, 2021
Allo-CD19-CAR	CAR: lenti TCR and CD52: TALEN	1/100人以上	血球減少 染色体異常		Allogen Therapeutics

毒性（細胞障害性）：

カチオン性化合物（陽イオン） -> 核酸（アニオン、陰イオン）、細胞膜（アニオンに荷電）

電位の上昇は細胞障害性を増強し、血清タンパク質等の凝固傾向を増大させる

非イオン性化合物（ヘルパー脂質、PEG）は立体構造を変化させ、遺伝子導入効率も下げる

パチシランナトリウム点滴静注 -> トランスサイレチン型アミドイドーシス

-> パセラチン（TTR mRNA siRNA） /LNP+ ApoE -> LDLR in liver

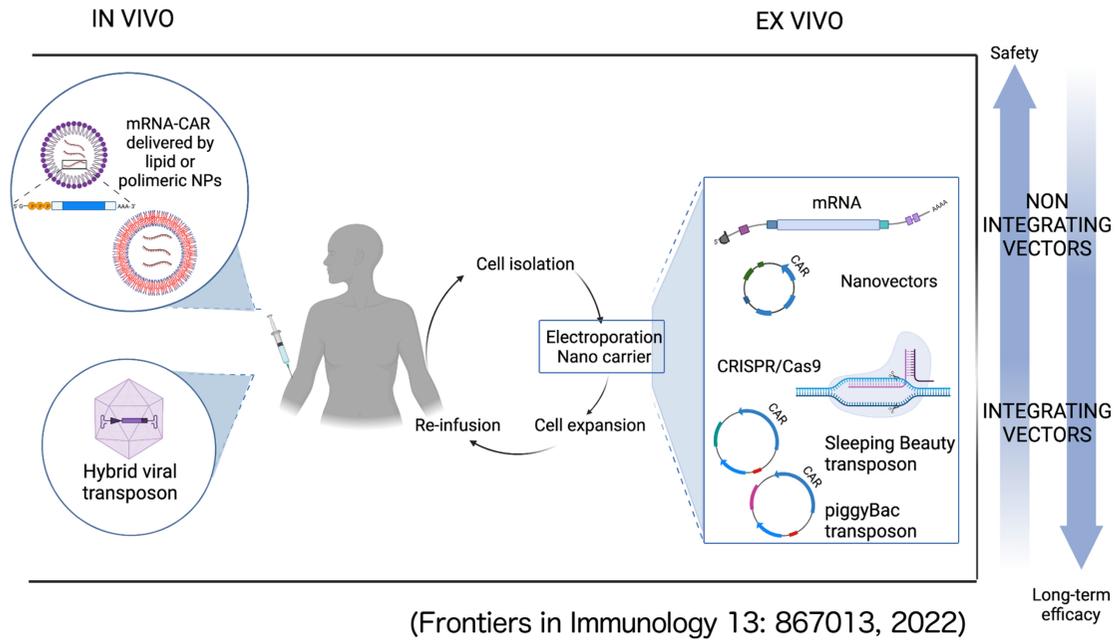
がんの細胞障害性T細胞 (CTL)：

in vivo CAR-T細胞療法：mRNAによるin vivoでのCAR-T細胞の樹立

mRNA vaccine：BNT162b2によるCovid-19（RBD等）への反応性CD4/CD8T細胞の樹立

非ウイルスベクターの展開

・非ウイルスベクターによるCAR-T細胞療法



・Oncolytic virus療法の代替治療

使用するベクター：Ad, HSV, Measles, Vaccinia virus

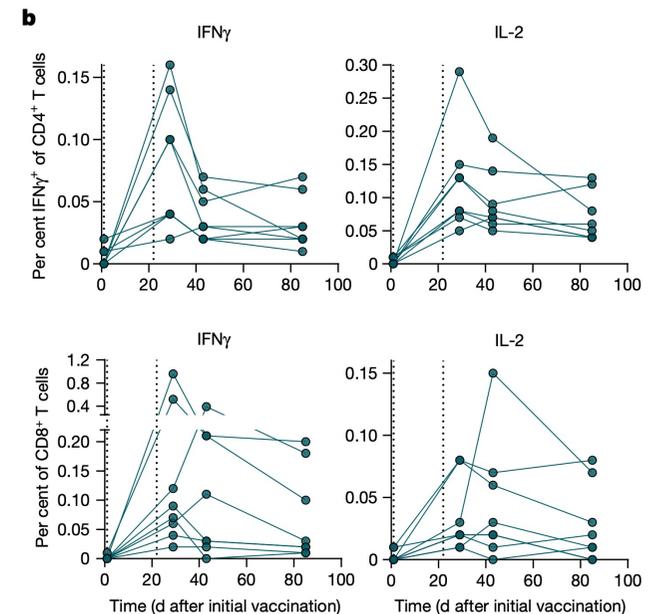
使用目的：ウイルス細胞障害性 ⇒ 制限増殖型（腫瘍内で増殖）

免疫惹起 ⇒ サイトカイン+細胞障害性（CTL）

これまでガンワクチン ⇒ 十分なCTLの誘導が困難

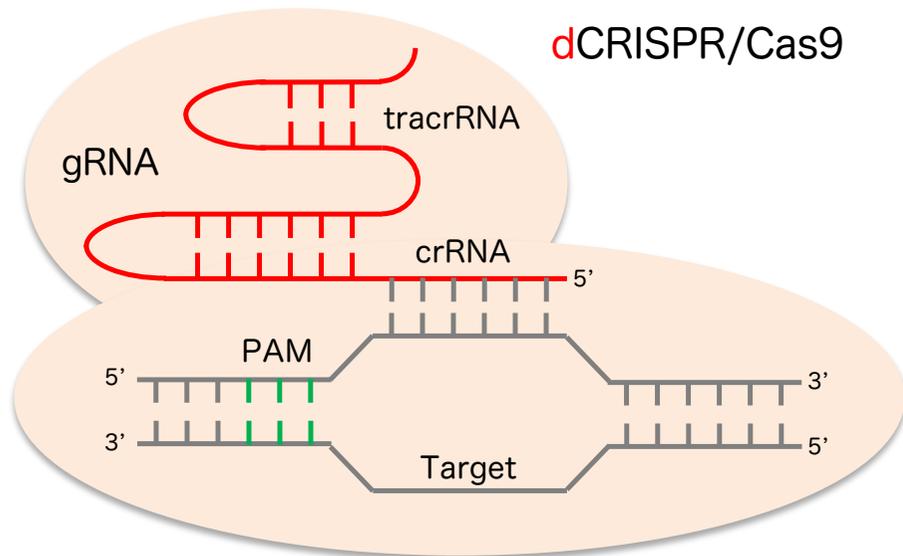
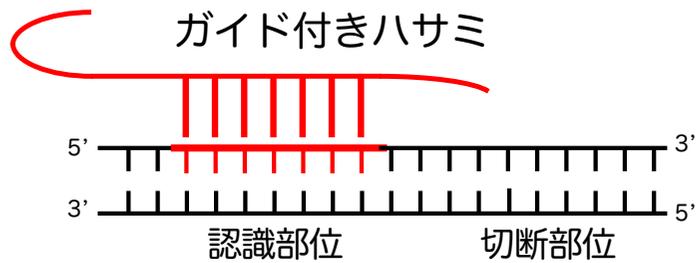
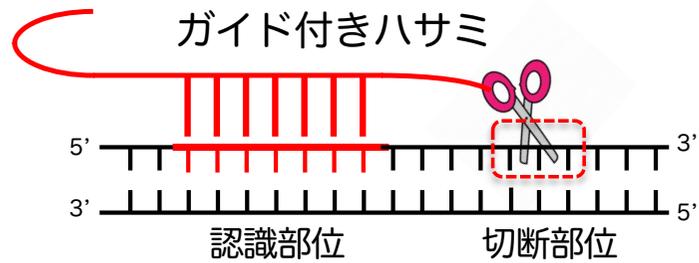
mRNAワクチン

⇒ Covid-19 RBD/ S1/S2 protease反応T細胞樹立

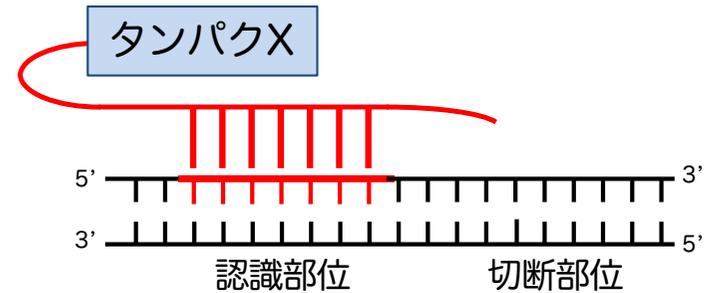


(Nature 595: 572, 2021)

塩基標的の新薬開発



特異的配列を標的とした新規薬剤



X: 転写因子, メチル化酵素, 脱メチル化酵素
ADA/CDA, ヒストン修飾酵素 等



Base editingによる遺伝子改変
A → I (脱アミノ化) → G (誤認) : A/G
C → U (脱アミノ化) → T (誤認) : C/T

特定の遺伝子発現のon/off可能

抗がん剤、生活習慣病、依存症
皮膚科 (アトピー、膿疱性乾癬等)



分子標的薬から塩基標的薬への
パラダイムシフト

遺伝子細胞治療推進センター



国立研究開発法人 国立成育医療研究センター

遺伝子細胞治療推進センター

Gene & Cell Therapy Promotion Center



病気で苦しむ子どもたちに **新しい治療法** を届ける

- 遺伝子細胞治療（臨床研究・治験・市販後調査等）の実施
- 遺伝子細胞治療に関する企業・CROへのコンサルテーション
- 非臨床試験法（新規ベクター構築、モデル動物開発）の支援
- 市販後有効性・安全性評価法の開発



ご清聴、ありがとうございます
ご意見・ご質問は onodera-m@ncchd.go.jp

なお、当センターの維持に関しアンジュス株式会社様より御寄付を頂いております