

Thierry VandenDriessche: 私は Thierry VandenDriessche で、ベルギーにある Vrije University

Brussels の教授です。遺伝子治療と再生医学の長も務めています。過去 30 年間で、遺伝子治療の分野、特に血友病の遺伝子治療について研究してきました。この分野の現状、血友病の将来の遺伝子治療に関連した重要な懸念と不明点は何かについて、本日お話できることを大変嬉しく思います。

遺伝子治療における共通の懸念は以下の通りです。血友病の遺伝子治療は有効ですか？それはうまく作用しますか？異なる遺伝子治療臨床試験の転帰をどのように比較すべきですか？遺伝子治療の予想持続期間は？生涯ですか、それとも一時的ですか？考慮すべき安全性の懸念がありますか？

患者が遺伝子治療を実施した後に、第 VIII 因子または第 IX 因子レベルが減少した場合、再治療は可能か？第 VIII 因子または第 IX 因子に対するインヒビター症例でも治療可能ですか？遺伝子治療の後にインヒビターが発生するリスクは？そのリスクは従来の凝固因子補充療法よりも高い、それとも同等あるいは低いですか？最終的に、遺伝子治療で、関節障害が発生する前に小児期に治療可能ですか？

未だ回答がない疑問点がいくつもあります。しかし、遺伝子治療が素晴らしい治療効果があることは確かです。血友病に対する遺伝子治療の臨床試験を見てみると、大半の試験は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと呼ばれるベクターを用いています。

AAV ベクターは、遺伝子を包み込むために使われるカプシドや、治療に使われる遺伝子自体も、それぞれの試験により若干異なります。様々な臨床試験をみてみると、1 つの共通点があります。それは、コドン最適化した B-ドメイン欠損第 VIII 因子が使われていることです。最適化はベクターによって異なります。

導入遺伝子の性質も、若干違いがあります。例えば、Freeline 社では、発現を増強すると考えられている V3 ドメインが存在します。これらのベクターは、遺伝子を発現させるために、肝細胞特異的プロモーター (HSP) を使用しています。これらの治療用遺伝子を包み込むにカプシドに関しても違いがあり、それらが分子の鍵となる部分で...

...実際にこの鍵で細胞のドアを開けて治療用遺伝子を細胞の中に送りこみます。血友病 A について少し説明すると、1 つの試験が頭に浮かびます。この試験は Rangarajan らが



New England Journal of Medicine に発表したもので、第 VIII 因子を発現させるために、AAV5 ベクターが使われました。このベクターの一回の静注で速やかに...

...安定した高い第 VIII 因子活性の増加をもたらし、それは正常域をこえることさえあります。これによって、出血や第 VIII 因子製剤の使用が明らかに減少しました。これは非常に重要な進歩であり、血友病 A に対する遺伝子治療の有望性を示すものです。

経過をみてみると発現は少し減少していくようです。これについては後でまたお話しします。血友病 B に関してもまた、実施中の多くの治験があります。すべてが AAV ベクターで、異なる治療用遺伝子を含んでいます。第 VIII 因子と同様に...

...第 IX 因子導入遺伝子もコドンが最適化されています。このコドン最適化の目的は、ベクターによって産生されるタンパク質の量を最大にすることです。大半の治験で、活性の高い第 IX 因子遺伝子が使われました。第 IX 因子 Padua 遺伝子は、第 IX 因子活性を 5 から 10 倍増加させる機能的変異です。これは、同じ量のベクターで、第 IX 因子活性が 5 から 10 倍高くなります。

Sangamo 社 によって開発された別なベクターもあり、これは遺伝子編集で、内因性のアルブミンプロモーターから第 IX 因子を発現させます。通常、第 IX 因子 Padua、または野生型第 IX 因子を発現させるには肝細胞に特異的なプロモーター（HSP）を用います。Sangamo 社のジンクフィンガーヌクレアーゼの場合は...

...これにも、肝細胞に特異的なプロモーターが使われます。ここでご覧になれるのは、様々な治験間の共通点です。ベクターのカプシドにはいくつかの違いがあります。異なる血清型が使われ、これらのカプシドの分子的な違いについての結論は、現時点では完全に理解されていません。

第 IX 因子活性の明らかな上昇を示した AAV-第 IX 因子の臨床治験は George らによって 2017 年に New England Journal of Medicine で報告されました。比較的低いベクター量、体重 kg 当たり  $5 \times 10^{11}$  のベクターゲノムの注射ですぐに明らかな効果を認めました。その第 IX 因子の活性は、30% から 50% の範囲で持続しました。



この FIX 上昇は、平均年次出血率と平均第 IX 因子注射回数の有意な低下と関連していました。ですから、これは先ほど話した血友病 A 治験と同様です。この試験では、患者間で治療効果に非常に大きな差異もあったことにご注意ください。他の治験でもそれが見られており、これに関する理解を深め改善が必要です。

遺伝子治療で、なぜ一部の患者では他の患者よりも、第 IX 因子または第 VIII 因子のレベルが高くなるのでしょうか？ 未だその質問に対する回答はありません。すべてについて詳細な説明をする時間はありませんが、異なる治験を見てみますと、これらの治験で治療域の第 VIII 因子と第 IX 因子が得られています。それらは少なくとも 1 年間持続しました。

ただし、2 年 または 3 年後に低下していく可能性に関してはいくつかの議論がありますので、これについては後でお話します。この第 VIII 因子と第 IX 因子の増加は、年次出血数と凝固因子使用量の有意な減少と関連しています。遺伝子治療は比較的安全であると考えられ、主要な有害事象はありません。肝毒性については若干の懸念があり、それについては後でお話します。

機能獲得型の Padua 変異も、野生型よりもかなり高い活性が得られ、これにより低用量の安全なベクター量を使うことができるため、強い関心が持たれています。第 VIII 因子または第 IX 因子に対するインヒビターの発生は報告されませんでした。これは特に驚くことではありません。これらの治験に登録された患者は、もちろん、インヒビター歴のない方を選択したからです。

前臨床モデルにおける長期経過観察期間は、現在用いることができるヒト臨床試験で得られる期間を遥かに超えています。血友病イヌのモデルでは、5%から 10%の発現が 12 年間を超えて立証されました。非ヒト霊長類の試験では、まだ経過観察試験はそれほど長くありませんが、ここでもまた発現が 6 年間を超えていることが立証されました。

異なる血友病遺伝子治療の臨床試験の効果と安全性を比較したときに、いくつかの懸念が生じます。AAV の投与量が同じなとき、同じように製造されたときに、比較ができるものと思います。よって、異なる製造過程、異なる AAV ベクターを用いた治験における有効性と安全性を比較することは実に困難です。



BioMarin 社と UniQure 社 によって実施された治験においては、Freeline 社 と Spark 社 が実施した治験とは異なり、明らかに高いベクター量が、体重キログラム当たり  $10^{13}$  ベクターゲノムの範囲で使われました。

Freeline 社 と Spark 社 が使用したベクター用量は、体重キログラム当たり  $2 \times 10^{12}$  ベクターゲノム、またはそれ未満でさえありました。しかし、ベクター測定が標準化されていないため、これらの用量の真の比較はできません。また、異なる製造方法、異なるベクターの機能、空粒子と完全な粒子の比、は治験ごとに異なります。

また、これらのベクターの検定に使われた方法も、治験ごとに異なる可能性があります。被験者自身も、例えば、既存の抗-AAV 抗体に関しても違いがあるかもしれません。またこの段階で、これらの抗-AAV 抗体の解析法が開発されました...

...しかし、これらの分析は標準化されず、感受性とカットオフ値が異なります。要するに、一定の基準が欠如している状況下で、比較不能なものを比較しているのです。ですから、これらの疑問を解決するために使用できる標準物質を開発する必要があります。さらに、遺伝子治療の重要な疑問の 1 つは...

...遺伝子治療が治療遺伝子の発現が生涯つづくのか、または数年間発現してその後は減少するのかという点です。これは、この分野において、数字的には数百万ドルが関与する問題です。イヌでは、発現が少なくとも 12 年間であり、非ヒト霊長類では少なくとも 6 年間で、マウスでは生涯に及ぶことがわかっているので期待は持てます。

肝臓の臨床治験における第 IX 因子についての経験は現在では少なくとも 8 年間第 IX 因子の持続的発現が立証されており、非常に期待できる状況です。事実、早期の筋肉内投与の治験では、10 年間発現のエビデンスさえあります。BioMarin AAV-第 VIII 因子治験における第 VIII 因子発現レベルは安定していません...

...-第 VIII 因子発現レベルを追跡してみると、長期にわたり第 VIII 因子の中央値レベルは初期の 150% 超から 50% 未満にまで低下しました。この動態の理由はまだわかりません。この原因を十分に解明していくことが必要です。現在の疑問は、発現レベルがこの 2 年を超えて持続するのかということで、これを綿密にモニターする必要があります。



肝細胞は成人ではゆっくりと分裂します。これは発現の安定性に影響を及ぼす可能性があります。いったん細胞が分裂すると、第 VIII 因子または第 IX 因子を発現する AAV ベクターゲノムが希釈されます。これは、細胞分裂に伴う第 VIII 因子または第 IX 因子の発現低下に結びつきます。

細胞が分裂しない場合は、第 VIII 因子または第 IX 因子の発現が比較的安定します。しかし、小児被験者では、増殖中の肝細胞が増加し、肝細胞ゲノムへの安定的な第 VIII 因子または第 IX 因子治療遺伝子の組み込みがなければ...

...遺伝子は希釈されて、発現は一過性であることが予想されます。この仮説を裏付ける前臨床動物モデルがあり、これまで子供の血友病は遺伝子治療が行われていません。しかし、ベクターが標的細胞のゲノムに安定して組み込まれれば、安定的な発現が得られることが予想されます。この状態では治療遺伝子が希釈されないからです。

現在、遺伝子治療に関連した長期リスクは完全にはわかっていません。リスクとしては、全く予期できないもの、または予測される未知要素があります。我々は、何を知っていて、何を知らないのか？ 肝臓がんのリスクはどうでしょう？ 標的細胞ゲノムへの遺伝子の組入は諸刃の剣です。

ゲノムへの遺伝子挿入は、発現遺伝子を一生涯でなくても、長期発現の可能性にします。ですから恒久的な治療効果が期待できます。一方、ゲノムのどこに遺伝子を組み込ませるかについては制御が不可能です。これが、がん遺伝子近傍で起こると...

...少なくとも理論的にはリスクとなります。これは腫瘍の形成誘発する可能性で、いわゆる挿入形質転換です。ほとんど無作為な現象で、ベクターをどこに組み込めるか制御できないため、リスクをもたらす可能性があります。この生物学的根拠は、関心のある遺伝子が...

...発がん遺伝子の近くに挿入される場合、遺伝子修飾細胞に増殖優位性をもたらし、発がん遺伝子の活性化と肝細胞の増殖誘発につながる可能性があります。生存または増殖優位性がない場合は何も起こりませんが、これは考慮すべき事柄です。しかし、このデータを見てください。この長期安全性に対処する前臨床モデルでのデータは何でしょうか？





健常なマウス、血友病マウス（第 IX 因子欠乏、または第 VIII 因子欠乏）、または血友病イヌ、または非ヒト霊長類を含む、血友病 A または B に対する遺伝子治療の前臨床試験のいずれにおいても、悪性腫瘍が増加しないことには安心させられます。ただ、その可能性を完全に除外することはできませんが...

...可能性の有無について、前臨床試験の結果は非常に強固なものです。そして、現在臨床試験で評価されている遺伝子治療ベクターが、これらのモデルにおいて悪性腫瘍を増加させるということを裏付ける証拠は何もありません。安全性の懸念に戻りますと、AAV 第 VIII 因子または第 IX 因子ベクターの投与は急性肝毒性につながるということがわかっています。

これは既知の現象です。George らによって報告されたデータを例に取りますと、これらの患者では、緑色で示しているように、第 IX 因子レベルが上昇することが分かります。しかし、これらの患者の血中では、同時に肝臓酵素の上昇があります。ここで、これらの患者の血中で、肝臓酵素の上昇が明らかであった 2 名の患者を示します。

この 2 番目の患者では、第 IX 因子活性低下と一致しているようです。血中のトランスアミナーゼの上昇は、おそらく肝毒性と肝臓の炎症を反映しており、遺伝子修飾細胞と第 IX 因子発現の同時の消失につながる場合があります。これらの有害事象は、プレドニゾンの投与である程度制御...

...経口コルチコステロイドによる治療です。大半の試験でこのような反応が見られました、その機序は完全に理解されていません。AAV 特異的 T-細胞反応が、少なくとも一部の患者で役割を果たすと信じられていますが、これがすべてではありません。発現の低下、トランスアミナーゼ上昇を引き起こす、他の免疫機序が存在する可能性があります。

しかし、前臨床試験モデルで確認された仮説の 1 つで、少なくとも一部の患者で起こる可能性のあるものとしては、AAV 特異的 CD8 陽性の細胞障害性 T-細胞が患者の免疫系に MHC クラス I によって提示される AAV-由来のカプシドのペプチドを認識する可能性があるという事実です...

...そのため、これらの細胞のクリアランスと発現損失につながります。しかしながら、例えばコルチコステロイドを投与して一過性の免疫抑制を行いますと、この免疫反応が抑制され



て、安定した発現が達成される可能性があります。ただ、これだけでは説明できず、他の免疫機序がトランスアミナーゼ上昇を起こす可能性があることがわかっています...

...一部の患者では AAV 特異的 T-細胞反応がなく、それでもトランスアミナーゼ上昇が起こるからです。ですから、これは血友病 A 治験で頻度の高い副作用です。これは一律に見られました。特に大量のベクターが投与された時に、血友病以外の他の治験でも見られました。血友病 B の治験でもトランスアミナーゼが上昇します。

この発生を避けるのが、患者にステロイドを投与する理由です。しかし、経口コルチコステロイド投与は、高トランスアミナーゼ血症を削減するのに常に十分ではありません。治験の 1 つでは、経口コルチコステロイドの使用にも関わらず第 VIII 因子発現の低下がありました。ある血友病 に対する AAV の治験では、重度の肝毒性があり、これらの治験は中止されました。

トランスアミナーゼ上昇を防ぐための予防的コルチコステロイド投与の実施についての多くの議論があります。最後になりますが、第 VIII 因子または第 IX 因子に対するインヒビターの問題があります。多くの試験では、興味深いことに、第 VIII 因子または第 IX 因子の遺伝子治療が免疫寛容の誘発につながることを示しています。

一部の症例では、第 VIII 因子または第 IX 因子に対するインヒビターが遺伝子治療の後に消失しています。Arruda らのグループによって発表された試験に注意を促したいと思いますが、他にもこの仮説を裏付ける多くの試験があります。例えば、早期の試験では、マウスに第 VIII 因子または第 IX 因子を投与すると、一部は第 VIII 因子または第 IX 因子に対する抗体産生につながります。これらの動物を遺伝子治療で治療する場合...

...おそらくは制御性 T 細胞の誘導が関与するのですが、第 VIII 因子または第 IX 因子に対する抗体は生じません。Arruda らが、明らかにしたことは、第 VIII 因子と大規模な動物モデルでさえ、第 VIII 因子に対する抗体を一掃できる可能性があるということでした。これは、遺伝子治療によって、第 VIII 因子に対する中和抗体が除去できる可能性があるという明瞭な例です...

...これは非常に興味深い観点です。遺伝子治療には、明らかになった疑問点あり、未だに答えが出ない問題点もあります。遺伝子治療は効果があるのでしょうか？ はい、血友



病をはじめ、他の遺伝的疾患やがんにも効果があります。遺伝子治療は、血友病以外に他の疾患に対するいくつかの製品が EMA および FDA で承認されています。

血友病に遺伝子治療が承認されるのは時間の問題です。遺伝子治療の持続期間はどのくらいでしょうか？効果が数年に及ぶか、生涯に及ぶかを明確にはわかりませんが、現在のデータは、少なくとも 8 年間の発現を裏付けています。主な安全性の懸念は何でしょうか？主要な安全性の懸念は、肝炎と炎症です。

これは短期の副腎皮質ステロイドの投与でコントロールできます。長期の安全性リスクに属する他のリスクは、ベクターの無作為な染色体への挿入です。挿入による腫瘍形成のリスクは血友病モデル、および遺伝子治療ベクターの使用に依存している別な前臨床試験モデルでは、非常に低いことが明らかにされ、その後、ベクター投与が臨床試験で使われました。

患者を再治療することはできますか？現時点では、それは不可能です。理由は、遺伝子治療で治療されたこれらの患者には、ベクターに対する抗体が産生され、それがベクターの再投与を阻害するからです。ですから、同じベクターで再投与することはできません。これを解決するいくつかの方法が前臨床試験モデルで開発中です。そのため、...

...遺伝子治療後で発現が減少する状況に陥った場合では、再治療する方法が開発されているかもしれません。インヒビターのある患者は治療できますか？現時点では、インヒビターの患者は治験に含まれていません。現在インヒビターがない患者でも、過去にインヒビターの既往があった場合は、遺伝子治療で治療されていません。インヒビターの既往のある患者も...

...将来的には治験に含まれる可能性があります。しかし、動物試験によってインヒビターの免疫寛容が誘導されたこと、および第 IX 因子または第 VIII 因子に対するインヒビターが消失することを示したことは期待が持てます。遺伝子治療後のインヒビターの発生リスクは、タンパク質補充療法よりも、低い可能性があります。

しかし、これはさらなる調査が必要です。それでは、遺伝子治療の後でインヒビターが発生するリスクはどうでしょうか？現在の治験では、インヒビターのない患者が対象となっているため、この答えを出すことはできません。しかし、先ほどお話したように、前臨床試験は、遺伝





子治療後のインヒビター発生リスクは低い可能性があることを示唆しています。では最後になりますが、遺伝子治療で、理想的には関節疾患が発生する前に小児患者を治療できますか？

それには、染色体への何らかの遺伝子組み込みが必要です。しかし、これは無作為な遺伝子挿入のリスク、もしくは、特異的なゲノム部位を修飾するゲノム編集への懸念が生じます。他の方法としては、AAV ベクターの再投与を可能にすることです。しかし、それには、抗体を除去するアプローチが必要で...

...抗体発生は、AAV ベクターの投与で引き起こされます。しかし、これもまた、前臨床試験の所見を、実際に臨床に応用できるまで時間の問題でしょう。結論を言えば、良い点としては、遺伝子治療の後に、第 IX 因子および第 VIII 因子の持続的なレベルが獲得できることです。これまでの第 IX 因子活性の最高レベルは、30% から 40% です。

1 つ早期試験で、2%から 5% の発現範囲で少なくとも 8 年間の長期にわたることが示唆しています。もちろん、この 30%から 40% のレベルが、これらの患者の後期コホートで経時的に最後まで継続するか、注目すべきです。第 VIII 因子の場合、遺伝子治療 2 年後で、レベルは現在 50% 近辺で停止しています。これらの第 IX 因子および第 VIII 因子の上昇は、出血症状の改善と,,,

,,,,と凝固因子予防投与の中止と関係しています。凝固因子使用は減じ、第 IX 因子および第 VIII 因子に対するインヒビターは生じません。前臨床試験の結果は、第 VIII 因子および第 IX 因子に対する免疫寛容さえ示唆しており、非常に期待が持てるものです。現在遺伝子治療は特効薬ではありません。考慮すべき、または、他のパラメーターが必要な未知な要素があります。

短期の安全性問題、ベクターおよび遺伝子導入細胞に対する免疫反応、コルチコステロイドの投与が必要となる肝毒性、長期安全性の問題、患者間の治療効果の差異があります。そのために、現時点では、いまだに宝くじに当たるようなものです。一部の患者は正常レベルを持ち、他の患者のレベルは 10% 未満です。この患者間の治療効果について差異が生じる理由が何であるか、完全には理解されていません。



現在、この話の教訓は、慎重に楽観的であるべきだということです。これに関してウィンストン・チャーチルの言葉を使いたいと思います。「今は終わりではない。終わりの始まりでさえない。しかし多分、始まりの終わりである。」ご参加いただき、誠にありがとうございました。

