

2.1.5 遺伝子治療 (*in vivo* 遺伝子治療/*ex vivo* 遺伝子治療)

(1) 研究開発領域の定義

遺伝子導入ベクターなどを用いて治療用遺伝子を導入し、遺伝性疾患などの根治を目指す医療技術 (*in vivo* 遺伝子治療)、および、遺伝子改変などにより治療機能を搭載した細胞を用いて疾患の制御・根治を目指す医療技術 (*ex vivo* 遺伝子治療) を本項では指す。

(2) キーワード

遺伝子治療、CAR-T、TCR-T、ベクター、幹細胞、免疫細胞、ゲノム編集、ゲノム修復、免疫レパトア解析

(3) 研究開発領域の概要

【本領域の意義】

遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) は、低分子医薬や抗体医薬とは根本的に異なるコンセプトの治療法である。従って、低分子医薬や抗体医薬ではアプローチが困難であった疾患に対して、画期的な治療法となり得るポテンシャルを有する。さらに、対症療法にとどまらず、根治療法も実現する可能性があり、これからの医療技術として大きな注目を集めている。特に、2010年代後半、圧倒的な治療効果を実証し製品化した事例が続々と登場したことから、産官による研究開発投資が世界中で急拡大し、研究開発競争が激化している。

しかし、治療コストが極めて高額 (数千万円~数億円) であり、世界各国で医療費の高騰が問題となっている。医学的側面からの安全性や有効性に加えて、社会的観点からの経済性をクリアすることも大きな課題である。

【研究開発の動向】

遺伝子治療は、体外に取り出した患者細胞に目的遺伝子を導入・発現させ再度体内に戻す手法 (*ex vivo* 遺伝子治療) と、遺伝子導入ベクターの全身投与によって標的臓器において目的遺伝子を直接発現させる手法 (*in vivo* 遺伝子治療) に分けられる。

遺伝子治療の最初の成功例は、2000年に報告されたX-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) における、造血幹細胞を対象とした遺伝子治療である。自己造血幹細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いて欠損遺伝子を導入し、自己造血幹細胞移植をしたところ、劇的な効果を示したが、治療を受けた児が2~3年後に急性Tリンパ球性白血病を次々と発症し、大きな問題となった (5例中、1例死亡)。いずれの場合も、レトロウイルスベクターのゲノムがLIM domain only-2 (LMO2) 遺伝子に挿入され、ウイルスベクターのlong terminal repeat (LTR) のプロモーター活性が当該遺伝子を人為的に活性化したことが白血病のトリガーとなった。この深刻な副作用を契機に、遺伝子治療の開発は停滞期に入った。その後、この問題を解決するために、LTRの自己不活性化や、転写開始点に挿入され難いレンチウイルスベクターが用いられるようになった。結果として、ウイルスベクターの安全性は改善し、現在では様々な遺伝性疾患に対する臨床試験が行われている。造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の対象疾患としては、X-SCID以外に、ADA欠損症¹⁾、Wiscott-Aldrich症候群²⁾、βサラセミアなどで治療効果が認められている。その他、X連鎖副腎白質ジストロフィー (ALD)³⁾ や異染性白質ジストロフィー (MLD)⁴⁾ などの中枢神経症状を呈する疾患でも、造血幹細胞遺伝子治療によって症状の進行が抑えられることが報告されている。造血幹細胞遺伝子治療製剤で上市されたものとして、2016年にStrimvelis® (ADA欠損症、2016年EMA承認)、Zynteglo® (βサラセミア、2019年FDA承認)、Libmeldy® (異染性白質ジストロフィー、2020年EMA承認)、Skysona® (早期大脳型副腎白質ジストロフィー、2022年FDA承認) などが挙げられる。

ここ数年、遺伝子治療が世界的に注目を集めている背景には、遺伝子改変造血幹細胞の*ex vivo* 遺伝子治

療に加えて、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた *in vivo* 遺伝子治療、および遺伝子改変免疫細胞 (CAR-T など) を用いた *ex vivo* 遺伝子治療の臨床試験の成功事例が相次いでいることが挙げられる。AAV ベクターは、神経細胞、肝細胞、筋細胞などの終末分化細胞への遺伝子導入に適しており、それら細胞では遺伝子発現が年単位にわたり長期間持続する。AAV は非病原性ウイルス由来であり、アデノウイルスベクターよりも免疫原性が少ないため、安全性も比較的高い。AAV ベクターには臓器指向性が異なる複数の血清型があり、標的細胞に応じて最適な型を使い分けることが可能である。臨床効果が得られている対象疾患として、レーバー先天性黒内障⁵⁾、コロイデレミア (網脈絡膜変性疾患)⁶⁾、パーキンソン病、AADC 欠損症⁷⁾、血友病 B^{8, 9)}、血友病 A¹⁰⁾、Spinal Muscular Atrophy (SMA)¹¹⁾、LPL 欠損症¹²⁾ などが挙げられる。2017 年に RPE65 変異を認めるレーバー先天性黒内障に対する AAV ベクターが LUXTURN[®] として FDA で承認された。2019 年には脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対する Zolgensma[®] が FDA で承認され、高い有効性のみならず、2 億円を超える治療コストも大きな話題となった。そして、2022 年に FDA で承認された血友病 B に対する Hemgenix[®] は、4 億円を超える治療コストとなっている。

遺伝子改変免疫細胞を用いた *ex vivo* 遺伝子治療も大きく注目されている。特に、がんに対し、細胞傷害性 T リンパ球の活性を人工的に強化し投与することで治療効果を発揮しようとする方向性である。T 細胞をがん治療に使うという考え方は古くからある。1980 年代から米国 NIH の Rosenberg らによって、腫瘍に浸潤している T 細胞 (TIL) を体外で活性化・増幅して投与する方法 (養子免疫療法) などが進められてきた。TIL を用いた養子免疫療法は様々な改良が加えられ、最近では転移性メラノーマの患者の 4 割が長期生存できた、などの成果報告も見られるが標準治療には至っていない¹³⁾。一方、患者の T 細胞の遺伝子を改変することで、飛躍的に高い治療効果が得られるようになった。現時点では大きく 2 つの方向性がある。①特定の細胞表面抗原 (CD19 抗原など) を認識するキメラ抗原受容体 (CAR) を T リンパ球に発現させる CAR-T、②MHC クラス I 分子の提示するペプチドを認識する T 細胞受容体 (TCR) を T リンパ球に発現させる TCR-T である。CD19 CAR-T 細胞医療は、再発・難治性急性リンパ性白血病の 70~90% で完全寛解が得られるという驚異的な治療成績が報告された^{14, 15)}。2017 年以降、急性リンパ性白血病・悪性リンパ腫に対する CD19 CAR-T の 4 製品が FDA に承認され (Kymriah[®]、Yescarta[®]、Breyanzi[®]、Tecartus[®])、日本においても 2019 年以降、3 製品が承認されている。さらに 2021 年以降、多発性骨髄腫に対する BCMA CAR-T 細胞療法の 2 製品 (Abecma[®]、Carvykti) が相次いで承認されている。TCR-T は、製品化事例はまだ見られないが、臨床研究が次々と進められており、特定のがん種に対し一定の効果が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。

遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) の高い有効性が実証された結果、世界の産業界 (製薬企業・ベンチャー) および官とアカデミアが、これらの分野に大きな関心を示している。造血幹細胞の遺伝子治療については、欧州を中心にコンソーシアムが設立され臨床開発が進められている。AAV ベクターを用いた遺伝子治療や CAR-T 治療については、ベンチャー企業が次々と設立され、開発競争が激化している。日本においても 2014 年の薬機法改正により再生医療等製品の規定が新設され、近年では AMED において遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) に対する重点的な支援が開始されつつあり、研究開発が徐々に活性化している。

(4) 注目動向

【新展開・技術ピックアップ】

最も注目すべき技術的展開として、ゲノム編集技術の医療応用が挙げられる。2012 年の CRISPR/Cas9 登場以降、技術改良・高度化に向けた様々な取り組みがなされてきた結果、医療応用も可能な技術へと洗練され、臨床試験が開始された事例も見受けられる。例えば、CRISPR/Cas9 を搭載した AAV ベクターの直接投与によるゲノム編集治療の報告が増加している。マウス疾患モデルでは、Duchenne 型筋ジストロフィー¹⁹⁾、血友病 B²⁰⁾ などにおいて報告がみられ、米 Sangamo 社はムコ多糖症 2 型に対し、ZFN (Zinc Finger Nucleases) を搭載した AAV ベクター投与によるゲノム編集治療の臨床開発を推進中である。

ex vivo 遺伝子治療の事例として、例えば HIV 患者のリンパ球を取り出して CCR5 遺伝子をゲノム編集で破

2.1

壊し患者体内に戻すことで、HIVウイルス量の減少とリンパ球の増加が認められた事例が見られる²¹⁾。CAR-Tの開発に於いて、日本は欧米に遅れをとっているが、独創性の高い先進的なアプローチも見られる。例えば山口大の玉田らによってCAR-T細胞にIL-7とCCL19を発現させて強化するアプローチの臨床開発が進められている²²⁾。CAR-T細胞療法は現時点では主に「キラーT細胞にCARを導入してがん細胞を殺傷する」というコンセプトで進められている。一方、制御性T細胞 (Treg) にCARを導入し、免疫を抑制しようとする研究も始まっている。例えば、マウスにヒトの皮膚を移植するモデルで、HLA抗体を用いたCARを発現させたTregが拒絶を抑制することが示されている²³⁾。慶応大の吉村らは、ヒトの末梢血単核球からのCD19 CAR Tregの樹立に成功している²⁴⁾。今後、臓器移植、GVHD、自己免疫疾患などへの応用が期待されており、大きな領域に発展すると考えられる。また、信州大の中沢・柳生らによる、腫瘍細胞に高発現しているサイトカイン受容体・増殖因子受容体を標的とする新型CAR-T (piggyBac利用) として、GM-CSF受容体 (CD116/CD131複合体) を標的とするリガンド型CAR (GMR CAR、EPHB4 CAR) などの開発が進められている^{25, 26)}。抗原結合領域として、一本鎖抗体 (scFV) ではなく、標的受容体に相互的なリガンドを用いるリガンド型CARとすることで、設計が容易、抗原親和性が適度、完全ヒト化が可能などの利点がある。リガンド変異体を作製することにより、安全域を広げるための最適化も可能となる²⁷⁾。GMR CAR-T細胞療法については、2021年から医師主導治験を実施しており、EPHB4 CAR-T細胞療法については、2023年に医師主導治験の開始が予定されている。

現在、研究開発が進められている*ex vivo* 遺伝子治療は、患者由来のT細胞を用いるものが多く、コストと質の面から問題が大きい。そこで、他家移植が可能な、ユニバーサルなT細胞製剤の開発が進められている。例えば、CAR-Tへの応用で、Tリンパ球のTCRをゲノム編集で破壊し移植片宿主反応を防ぎ、同種Tリンパ球を用いることを可能にした方法 (ユニバーサルCAR-T) の臨床試験が始まっている²⁸⁾。この臨床試験では、投与細胞の拒絶を防ぐためにCD52抗体の投与で患者の免疫系細胞を殺傷し、投与細胞は殺傷されないようにCD52遺伝子を破壊しておくという方法がとられている。日本においては、2021年から京都大の金子らが、卵巣明細胞がんを対象にglypican3を標的とするiPS細胞由来ILC/NK細胞 (iCAR-ILC-N101) の医師主導治験を行っている。他家移植のソースとなるiPS細胞には日本人に多いHLA型のホモiPS細胞が用いられている²⁹⁾。また、ペンシルバニア大学のJuneらのグループは、腫瘍抗原特異的TCR遺伝子をT細胞に導入する際に、内在性TCR及びPD-1に対するCRISPR/Cas9ゲノム編集を付加した他人のT細胞を多発性骨髄腫や脂肪肉腫の患者へ輸注するPhase Iの結果を最近報告している³⁰⁾。ゲノム編集における懸念事項であるオフターゲット編集や染色体転座は一部の細胞に認められているが、そのことによる腫瘍化などの明らかな毒性は報告されていない。日本では、長崎大の池田が、T細胞のTCRをタカラバイオ社が開発したsiRNA技術で抑制し、導入したTCRだけを発現させる技術³¹⁾ を用い、さらにHLAをゲノム編集で欠失させるという方法を組み合わせる事により、他家T細胞を用いたT細胞療法の臨床試験に向けた準備を進めている。NY-ESO1抗原特異的TCRを用い、成人T細胞性白血病を対象疾患としている。

なお、腫瘍溶解性ウイルス療法の臨床開発も注目すべき動向である。がん細胞特異的に増殖し、正常細胞では増殖しない性質を持つ制限増殖型ウイルスを用いるのが基本コンセプトであるが、それだけでは当該遺伝子改変ウイルスを注入した局所病変に効果が限定されてしまう。最近の考え方では、局所のがん病変を破壊することによってがんに対する全身性の免疫反応を誘導し、転移巣に対しても効果を発揮することが強調されている。

【注目すべき国内外のプロジェクト】

欧米のメガファーマ、およびベンチャーが次々に巨額の資金を投入・獲得し、遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) の開発に参入している。日本では、遺伝子治療の基盤整備を目的とし、2018年度よりAMED「遺伝子・細胞治療研究開発基盤事業」が開始され、2019年度よりバイオ創薬全般 (遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) 含む) の技術開発に主眼を置いた「先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業」が開始され、現在に至る。他

にも、難病、がん関連プロジェクトにおいて、遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) のテーマが一定数採択されている。AMEDが2020年度より第2期に入り、第1期で「再生医療」として予算の枠組みが整理されていたが、第2期では「再生・細胞医療・遺伝子治療」と整理され、研究開発が進められている。

関連する科学技術政策提言として、JST-CRDSライフサイエンス臨床医学ユニットより、戦略プロポーザル「デザイナー細胞 ～再生・細胞医療・遺伝子治療の挑戦～」が2020年9月末に刊行され、これから日本が取り組むべき、再生・細胞医療・遺伝子治療のあるべき研究開発戦略が示されている³²⁾。

(5) 科学技術的課題

造血幹細胞への遺伝子導入効率が十分でないため、遺伝子導入細胞の体内における増殖優位性や生存優位性が見られる疾患でないと効果が出にくく、対象疾患はまだ限定されている。例えば、正常遺伝子を入れた造血幹細胞～好中球系細胞の優位性が認められない慢性肉芽腫症では、十分な治療効果が得られていない。静止期にある真の造血幹細胞への高効率な遺伝子導入技術の確立が期待される (例えば、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なレンチウイルスベクターを用いたチャレンジなど)。遺伝性疾患を対象とした造血幹細胞のゲノム編集は、基礎研究が行われているが、臨床応用を行うには、ヒト造血幹細胞の体外培養法、或いは体内増幅技術の開発が期待される。

AAVベクターの遺伝子治療では、標的細胞に最適な血清型のAAVベクターの利用が望ましいが、最適な血清型がマウスなどの実験動物とヒトで必ずしも一致しないことが問題となっている³³⁾。血清型の人工改変研究も進められている。AAVベクターの血中投与では、中和抗体の存在が問題となるため、それを克服する方法の開発が必要である³⁴⁾。AAVベクターの全身投与では、AAVベクター感染細胞が、CD8陽性T細胞により排除されることが知られている³⁵⁾。そのため、AAVベクター投与後の免疫反応が生じた場合に、一時的な副腎皮質ステロイド薬の投与によりコントロールする必要がある。AAVベクターはエピゾームに主に存在し、染色体DNAに組み込まれないため安全性が高いと考えられている。細胞増殖に伴いAAVベクターが希釈されるため、活発に増殖する細胞においては治療効果が減弱し、肝臓に遺伝子導入を行う場合は小児が適用にならない。ゲノム編集とAAVベクターの融合は、この問題を克服する上で重要な鍵になると考えられる。

非ウイルスベクターの研究開発も進められており、国産ツールの事例として、例えば信州大の中沢らによるpiggyBacトランスポゾンを活用した遺伝子導入技術が挙げられる。piggyBacは、1996年にFraserらによって報告されたイラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来のトランスポゾンで、他のトランスポゾンと比較して、遺伝子転位能が高く、遺伝子搭載容量が大きく、トランスポザーゼの過剰産生による遺伝子転位能の抑制が少ないことが特徴とである^{36, 37)}。中沢らは、piggyBacトランスポゾンを用いた遺伝子導入ツールとして実用可能なレベルに洗練させ、純国産技術として確立させた。piggyBacトランスポゾンを活用したCAR-Tの臨床開発も進められている。他にも、国産の遺伝子導入ツールの観点からは、センダイウイルスを大幅に改良した、ステルスRNA技術の開発・応用も進められている。

CAR-T治療では、オンターゲット毒性も大きな問題となるため、回避する技術開発が必要である。固形がんなど、腫瘍塊を形成している場合は、腫瘍への浸潤性が必要であると共に腫瘍微小環境による免疫抑制効果を受け易いのでこのような免疫遺伝子治療の効果が出にくく、さらなる工夫が必要である。また、治療に必要な量のT細胞確保も大きな課題となっている。T細胞が疲弊形質を獲得すると輸注後に抗腫瘍効果が減じることが知られ、疲弊形質を避ける大量培養技術、細胞改変技術、併用療法の開発も必要である。標的としては現在のところCD19とBCMA以外では目覚ましい効果が確認されておらず新規標的抗原の探索も課題である。CAR-Tは原則として細胞表面抗原のみを標的とする制限があるが、三重大の宮原らはMHCと細胞内抗原ペプチド複合体を認識するTCR擬似抗体を用いたCAR-Tの開発を進めている。

日本は自家T細胞を用いたCAR-T療法に関しては遅れをとったが、他家T細胞を用いたCAR-Tや、CAR-Tとは異なるタイプの開発競争はこれからであり、日本にも勝機がある。産業的な観点も含めると、ユニバーサル化による他家移植可能な細胞リソース基盤を確立することができれば、*ex vivo* 遺伝子治療市場で大きな

存在感を発揮することができる。ES細胞やiPS細胞などの幹細胞をベースとしてT細胞などの免疫細胞を作製する方向性が加速している。例えばCAR-TをiPS細胞から作製するという戦略はMemorial Sloan Kettering HospitalのSadelainらとFate Therapeutics社が進めている³⁸⁾。キラーT細胞、CAR遺伝子導入NK・T細胞、或いはTCR遺伝子導入キラーT細胞の再生については、例えばわが国の河本（京都大学）、金子（京都大学）、安藤（順天堂大学）らによる研究成果が見られる^{39, 40, 41, 42, 43)}。

ES細胞やiPS細胞を*ex vivo* 遺伝子治療のリソースとして用いる際、ユニバーサル化についてはES細胞、iPS細胞の段階でHLA遺伝子を欠失させるアプローチが複数のグループによって進められている。その1つであるUniversal Cells社は、2018年2月にアステラス社に100億円で買収された。移植細胞のHLAを欠失させると、レシピエントのNK細胞に攻撃されてしまうが、同社はHLA-Eを強制発現させることでNK細胞による攻撃を回避するという戦略をとっている⁴⁴⁾。ただし、NK細胞による攻撃を回避するにはHLA-Cが必要との報告もあり⁴⁵⁾、またHLAを欠失させると細胞が感染した時に免疫系による排除が起こらなくなるなどの懸念もある。ユニバーサル細胞は将来的には重要な位置づけになると考えられるが、解決すべき課題は多い。免疫学的拒絶を防ぐ方法と、投与した細胞に感染が起こった時の対処法の開発が重要となる。

ゲノム編集については、技術的課題（オフターゲット、改変配列の制限ほか）や産業展開上の課題（基本特許および多くの関連特許を米国が取得）などが大きいため、それらに対応した研究開発などが進められている。

(6) その他の課題

近年、圧倒的な有効性を背景に次々と上市される遺伝子治療 (*in vivo/ex vivo*) は、数千万円～数億円という極めて高額な治療コストを要する。中長期的に、それらの治療技術が幅広い疾患の治療・根治法として普及するためには、技術改良によるコストの低減、および成功報酬型の支払制度をはじめとした医療制度面での仕組みの検討が必要と考えられる。

2010年前後より、日本の研究費がiPS細胞などを利用した再生医療に大きくシフトし、遺伝子治療に対する研究費が激減したため、次世代の研究者が十分に育っていないことが問題となっている。近年、遺伝子治療に関する研究費が増加傾向であるが、その多くは臨床応用に近い研究の加速を目指すものであり、次世代のブレイクスルーとなるような基盤的な技術開発を志向したものではない。例えば、野生型AAVベクターの特許切れが間近であることから、日本独自のベクター技術開発も重要なテーマである。

遺伝子治療の対象となる疾患は、患者数が非常に少ないケースが多いこともあり、日本ではビジネスモデルが確立しておらず、企業の取り組みが進んでいない。今後、技術革新が進むことでコストが大きく下がることが期待されるが、当面は採算が取れない時期が続くと考えられる。単一の製品ではなく、診断薬なども含めた複数の製品群としての採算を考えるような工夫が必要であるが、例えばフランスのGENETHON社や、イタリアのTIGET社などのように、慈善基金によるファンディングで、採算がとりづらい段階の遺伝子治療を積極的に加速していくような仕組みは日本においても参考となりうる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> 次世代を担う基礎研究者が、欧米と比較が少ないが近年増加傾向。 遺伝子治療 (<i>in vivo/ex vivo</i>) について、国を挙げて取り組もうとする機運が着実に高まっている。 医療応用を前提としたゲノム編集技術について、日本に優れた技術シーズが複数存在。
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子治療 (<i>in vivo/ex vivo</i>) の臨床試験が進められているが、米中の後塵を拝している。

米国	基礎研究	◎	↗	・近年、遺伝子治療 (<i>in vivo/ex vivo</i>) に対して再び注目が集まり、米国遺伝子細胞治療学会学術集会への参加者は増加。 ・遺伝子治療 (<i>in vivo/ex vivo</i>) に関する様々な切り口からの基礎研究が活性化。
	応用研究・開発	◎	↗	・画期的ながん治療薬として、CAR-T臨床開発が激化。 ・AAVベクターを用いた遺伝子治療の臨床開発が飛躍的に加速。
欧州	基礎研究	◎	↗	・英・仏・伊などを中心に基礎研究が着実に推進。
	応用研究・開発	◎	↗	・造血幹細胞の遺伝子治療で優れた成果を挙げている。 ・希少疾患が対象となるため、コンソーシアム体制を組むことで協力体制を強化。
中国	基礎研究	○	↗	・驚くべきスピードで研究開発が加速しており、優れた成果を着実に上げている。
	応用研究・開発	◎	↗	・CAR-Tについて、米国との開発競争が激化。 ・難易度の高い固形がんに対するCAR-T治療開発も活発に推進。
韓国	基礎研究	×	→	・基礎研究はあまり活発でないが、ToolGen社がゲノム編集に関する優れた成果を発表している。
	応用研究・開発	△	↗	・五松(オソン)地域に、バイオ産業の拠点として先端医療複合団地を形成し、規制当局をはじめとした国の機関が集まり、遺伝子治療などの開発研究の中核となっている。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発(プロトタイプの開発含む)の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1~2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

関連する他の研究開発領域

・幹細胞治療(再生医療)(ライフ・臨床医学分野 2.1.4)

参考・引用文献

- 1) M. P. Cicalese et al., "Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency", *Blood* 128, no. 1 (2016) : 45-54. doi: 10.1182/blood-2016-01-688226
- 2) A. Aiuti et al., "Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome", *Science* 341, no. 6148 (2013) : 1233151. doi: 10.1126/science.1233151
- 3) N. Cartier et al., "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy", *Science* 326, no. 5954 (200) : 818-823. doi : 10.1126/science.1171242
- 4) A. Biffi et al., "Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy", *Science* 341, no. 6148 (2013) : 1233158. doi : 10.1126/science.1233158
- 5) J. W. B. Bainbridge et al., "Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis", *N. Eng. J. Med.* 372 (2015) : 1887-1897. doi : 10.1056/NEJMoa1414221

- 6) R. E. MacLaren et al., “Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial”, *Lancet* 383, no. 9923 (2014) : 1129-1137. doi: 10.1016/S0140-6736 (13) 62117-0
- 7) W. L. Hwu et al., “Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency”, *Sci. Transl. Med.* 4, no. 134 (2012) : 134ra61. doi: 10.1126/scitranslmed.3003640
- 8) A. C. Nathwani et al., “Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B”, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) : 1994-2004. doi: 10.1056/NEJMoa1407309
- 9) A. G. Lindsey et al., “Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant”, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) : 2215-2227. doi: 10.1056/NEJMoa1708538
- 10) S. Rangarajan et al., “AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A”, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) : 2519-2530. doi: 10.1056/NEJMoa1708483
- 11) J.R. Mendell et al., “Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy”, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) : 1713-1722. doi : 10.1056/NEJMoa1706198
- 12) D. Gaudet et al., “Long-Term Retrospective Analysis of Gene Therapy with Alipogene Tiparvovec and Its Effect on Lipoprotein Lipase Deficiency-Induced Pancreatitis”, *Hum. Gene Ther.* 27, no. 19 (2016) : 916-925. doi: 10.1089/hum.2015.158
- 13) S. A. Rosenberg, “Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know”, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, no. 10 (2011) : 577-585. doi : 10.1038/nrclinonc.2011.116
- 14) M. L. Davila et al., “Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia”, *Sci. Transl. Med.* 6, no. 224 (2014) : 224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226
- 15) S. L. Maude et al., “Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia”, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) : 1507-1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222
- 16) R. A. Morgan et al., “Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes”, *Science* 314, no. 5796 (2006) : 126-129. doi : 10.1126/science.1129003
- 17) P. F. Robbins et al., “Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1”, *J. Clin. Oncol.* 29, no. 7 (2011) : 917-924. doi : 10.1200/JCO.2010.32.2537
- 18) A. P. Rapoport et al., “NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma”, *Nat. Med.* 21, no. 8 (2015) : 914-921. doi: 10.1038/nm.3910
- 19) P. Tebas et al., “Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV”, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) : 901-910. doi: 10.1056/NEJMoa1300662
- 20) C. E. Nelson et al., “In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy”, *Science* 351, no. 6271 (2016) : 403-407. doi: 10.1126/science.aad5143
- 21) T. Ohmori et al., “CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice”, *Sci. Rep.* 7, no. 1 (2017) : 4159. doi: 10.1038/s41598-017-04625-5
- 22) K. Adachi et al., “IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 4 (2018) : 346-351. doi: 10.1038/nbt.4086

- 23) D. A. Boardman et al., “Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection”, *Am. J. Transplant.* 17, no. 4 (2017) : 931-943. doi: 10.1111/ajt.14185
- 24) Imura Y, et al., “CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD.”, *JCI Insight*, 2020, 23 ; 5 (14) : e136185.
- 25) Y. Nakazawa et al., “Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34 (+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia”, *J. Hematol. Oncol.* 9, no. 27 (2016) : 1-11. doi: 10.1186/s13045-016-0256-3
- 26) Kubo H, et al., “Development of non-viral, ligand-dependent, EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma.”, *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 5; 20 : 646-658.
- 27) Hasegawa A, et al., “Mutated GM - CSF - based CAR - T cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti - tumor effects against acute myeloid leukaemia.”, *Clin Transl Immunology*, 2021, 6 ; 10 (5) : e1282.
- 28) Couzin-Frankel J., “CANCER IMMUNOTHERAPY. Baby's leukemia recedes after novel cell therapy”, *Science* 350, no. 6262 (2015) : 731. doi : 10.1126/science.350.6262.731
- 29) Ueda T, et al., “Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells.”, *Cancer Sci*, 2020, 111 (5) : 1478-1490.
- 30) E. A. Stadtmauer et al., “CRISPR-engineered T Cells in Patients With Refractory Cancer”, *Science* 367, no. 6481 (2020) : eaba7365. doi: 10.1126/science.aba7365
- 31) S. Okamoto et al., “Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR”, *Cancer Res* 69, no. 23 (2009): 9003-9011. doi : 10.1158/0008-5472
- 32) 国立研究開発法人科学技術振興機構研究開発戦略センター「戦略プロポーザル『デザイナー細胞』～再生・細胞医療・遺伝子治療の挑戦～」(CRDS-FY2020-SP-01) (2020年9月) <https://www.jst.go.jp/crds/report/report01/CRDS-FY2020-SP-01.html> (2020年12月16日アクセス)
- 33) L. Lisowski et al., “Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model”, *Nature*, 506, no. 7488 (2014) : 382-386. doi: 10.1038/nature12875
- 34) J. Mimuro et al., “Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors”, *Mol. Ther.* 21, no. 2 (2013) : 318-323. doi : 10.1038/mt.2012.258
- 35) C. S. Manno et al., “Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response”, *Nat. Med.* 12, no.3 (2016) : 342-347. doi: 10.1038/nm1358
- 36) M. J. Fraser et al., “Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera”, *Insect Mol. Biol.* 5, no. 2 (1996) : 141-151. doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00048.x
- 37) M. H. Wilson, C. J. Coates and A. L. George Jr., “PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells”, *Mol. Ther.* 15, no. 1 (2007) : 139-145. doi: 10.1038/sj.mt.6300028
- 38) M. Themeli et al., “Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy”, *Nat. Biotechnol.* 31, no. 10 (2013) : 928-933. doi:

2.1

10.1038/nbt.2678

- 39) R. Vizcardo et al., “Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8 (+) T cells”, *Cell Stem Cell* 12, no. 1 (2013) : 31-36. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.006
- 40) T. Maeda et al., “Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity”, *Cancer Res.* 76 (2016) : 6839-6850. doi : 10.1158/0008-5472
- 41) Ueda T, et al., “Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells.”, *Cancer Sci*, 2020, 111 (5) : 1478-1490.
- 42) Ueda T, et al., “Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells.”, *Nat Biomed Eng*, 2022, doi: 10.1038/s41551-022-00969-0
- 43) Harda S, et al., “Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma.”, *Mol Ther*, 2022, 2 ; 30 (2) : 534-549.
- 44) G. G. Gornalusse et al., “HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells”, *Nat. Biotech.* 35, no. 8 (2017) : 765-772. doi: 10.1038/nbt.3860
- 45) H. Ichise et al., “NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-Homozygous iPSCs”, *Stem Cell Rep.* 9, no. 3 (2017) : 853-867. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.07.020