

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム  
セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法開発  
(英語) Development of gene therapy for lysosomal diseases involving  
neurological symptoms

研究開発実施期間：2016年10月19日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 伊藤 孝司  
(英語) Kohji Itoh

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
(英語) Tokushima University・Graduate School of Biomedical Sciences・Professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：2ページ以上

テイ-サックス病 (Tay-Sachs disease, TSD) (1881年発見) とサンドホッフ病 (Sandhoff disease, SD) (1968年発見) は、リソソーム酵素の、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ (Hex) を構成する  $\alpha$  及び  $\beta$  鎖をコードする *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子の劣性変異が原因で、HexA ( $\alpha\beta$ ) の欠損と GM2-ガングリオシド (GM2) の脳内過剰蓄積と中枢神経症状を伴うライソゾーム病である。各発生頻度は、1人/36万及び1人/31万出生児であるが、厚労省では難病指定されている。TSD は、欧米のユダヤ人種で発生頻度が高い (近年は1人/3万出生児程度) ことが知られているが、最近の国内患者数は、TSD が27名で、SD が3名である。しかしこれまで国内外で、これらの疾患に対する根本治療法はない。

生理的な GM2 の分解代謝は、 $\alpha$  と  $\beta$  鎖から構成される HexA と GM2 活性化タンパク質 (GM2A) との協調作用により行われているため、TSD 及び SD の治療には、脳をはじめ、患者組織内での正常な *HEXA* 及び *HEXB* 両遺伝子の発現が必要となる。一方、代表者の伊藤は、これまでに HexA を構成する正常  $\beta$  鎖のアミノ酸9残基を、GM2 分解能や GM2A との結合能をもつ  $\alpha$  鎖型に置換した改変型 *HEXB* 遺伝子を構築した。また同遺伝子高発現 CHO 細胞株を樹立し、培養上清から改変型 HexB (改変  $\beta$  鎖ホモ二量体) を精製した。SD モデルマウス脳室内への投与で、HexA よりも長い脳内半減期の Hex 活性回復と蓄積 GM2 の減少に伴い、運動機能の改善と寿命の延長に成功した (Kitakaze K. *et al. J Clin Invest* 2016; 特許: 第 6230158 号、EP2910632)。

自治医科大・村松は、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素欠損症 (世界で130人、国内6人) の患者5人に対し、独自に開発したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いる遺伝子治療の臨床試験を実施し、有効性と安全性を示した。また独自に発明した AAV9/3 ベクター (特許: 第 5704361 号、EP2634253B1) を用い、筋萎縮側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の遺伝子治療法の臨床開発を進めている。

本研究では、中枢神経症状を伴う TSD と SD に対し、改変型 *HEXB* を搭載し、GM2 分解能をもつ改変型 HexB

を発現する AAV9/3-*modHEXB* ベクターを用いる髄腔内遺伝子治療法 (IT-GT) の開発を目的とし、AMED ACT-MS 事業 (H28-29 年度 伊藤代表) で、GM2 ガングリオシドである TSD と SD のモデル細胞またはマウスを用い、非 GMP 基準の AAV9/3-*modHEXB* ベクターの薬効薬理試験を進め、有効性に関する Proof of Concept (POC) を取得した。また同ベクターをカニクイサル (非ヒト霊長類) に対し髄腔内単回投与し、3 ヶ月間の安全性を確認した。

1. 徳島大院・薬・創薬生命工学分野で独自に樹立した、TSD 患者線維芽細胞由来 iPS 細胞から、分化誘導した神経 (前駆) 細胞の培養系への AAV9/3-*modHEXB* を投与実験では、 $5 \times 10^5$  vector genome (vg)/cell 以上の投与量で、用量依存的に、TSD で欠損している人工 HexA 基質 (4-MU-6-sulfo- $\beta$ -N-acetylglucosaminide, MUGS) の分解活性が増大 (回復) し、酸性基質分解能をもつ高機能型 HexB (改変型  $\beta$  鎖ホモ二量体, modHexB) が発現することを明らかにした。
2. ゲノム編集技術により *HEXB* 遺伝子をノックアウト (KO) した、ヒト SD モデル細胞 (SH-SY5Y *HEXB-KO*) に対する AAV9/3-*modHEXB* の投与では、 $5 \times 10^5$  vg/cell 以上で、HexA 基質の MUGS 分解活性のみならず、中性基質 (4-MU- $\beta$ -N-acetylglucosaminide, MUG) の分解活性も回復することが判明した。またレチノイン酸により神経分化誘導した SH-SY5Y *HEXB-KO* 細胞内で過剰蓄積している GM2 ガングリオシド (GM2) が減少し、GM2 分解能をもつ modHexB がヒト SD 培養神経細胞内で発現・機能していることを明らかにした。
3. 成体 SD マウス (8 週齢) の脳室内に AAV9/3-*modHEXB* を  $0.6 \sim 3 \times 10^{13}$  vg/kg 体重 で単回投与すると、大脳、小脳をはじめ広範な脳領域で modHexB の発現と蓄積 GM2 の減少、神経炎症 (ミクログリアの活性化、炎症性ケモカイン分泌) の抑制、協調運動機能の維持及び寿命 (平均 16 週齢) の延長 (45 週齢以上) などの知見が得られた。また、末梢臓器 (心臓、肝臓、脾臓など) においても AAV9/3-*modHEXB* による遺伝子導入に基づく modHexB の発現が認められた。
4. 新生仔 SD マウス (P0~1) の脳室または側頭静脈内に AAV9/3-*modHEXB* を  $0.6 \sim 3 \times 10^{13}$  vg/kg 体重 で単回投与すると、同様に各脳領域や末梢臓器における modHexB の発現、蓄積 GM2 の減少、協調運動機能の維持及び寿命 (平均 16 週齢) の延長 (60 週齢以上) などの有効性が示された。
5. 正常カニクイサル (非ヒト霊長類) に対し、非 GMP 基準の AAV9/3-*modHEXB* ベクターを、 $2 \times 10^{12}$  vg/kg 体重の用量で髄腔内投与した。投与後、少なくとも 3 ヶ月間に、食欲不振、体重減少または行動異常などの副作用は認められなかった。また投与部位近傍の腰髄、胸髄、頸髄、小脳、被殻での相対 Hex 活性の増大が観察され、また血漿中の Hex 活性も 2 倍程度増大していることが明らかになった。

近年、末梢症状を示す遺伝性リソソーム酵素欠損症 (ライソゾーム病) (50 種余り存在) の根本治療法として、組換えヒト酵素製剤を患者静脈内に定期継続投与する酵素補充療法が 9 種の疾患に臨床応用されている。しかし静脈内投与された酵素は、血液脳関門により脳実質には送達されず、中枢神経症状にはほとんど無効であるため、中枢症状を伴うライソゾーム病に対して有効な根本治療法の開発が待望されている。本研究で開発した AAV9/3-*modHEXB* を用いる髄腔内遺伝子治療法は、従来治療法が無い、神経難病である TSD 及び SD の両疾患に対する有効性を示し、特に、生来、正常な Hex  $\beta$  鎖をもつ TSD 患者に対する低免疫原性の根本治療法としての臨床応用が期待される。また本研究開発では、(株) 遺伝子治療研究所と連携して GMP (GCTP) 基準の製造のためのマスターセル及びウイルスバンクの作製を進めるとともに、PMDA との RS 戦略相談 (非臨床安全性及び品質に関する事前面談) を行い、将来の治験実施を踏まえた準備を行った。

Tay-Sachs disease (TSD) and Sandhoff disease (SD) are autosomal recessive lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase (Hex) deficiencies caused by the gene mutations of *HEXA* and *HEXB*, encoding  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit, respectively. These incurable diseases associate with the HexA ( $\alpha\beta$  heterodimer) and excessive accumulation of GM2 gangliosides (GM2) in the brains of the patients and neurological manifestations. Their incidences are 1/360,000 and 1/310,000 live births. Although high incidence of TSD in Jewish populations (about 1/30,000 births according to the 2012 report by NTSAD) is well known, there are 27 Japanese TSD and 3 SD patients according to the 2017 report by Prof. N. Sakai (Osaka Univ., Japan). However, there is no effective therapy for these diseases.

Previously Prof. K. Itoh (Tokushima Univ., Japan), the representative in this AMED ACT-MS program, constructed the modified *HEXB* (*modHEXB*) to substitute 9 amino acid residues in normal human Hex  $\beta$ -subunit to those corresponding to the  $\alpha$ -type, and established a CHO cell line overexpressing the *modHEXB* to produce the modified HexB composed of homodimeric modified  $\beta$ -subunits with GM2-degrading activity and longer *in vivo* half-life than the normal human HexA. He demonstrated that the modified HexB intracerebroventricularly administered to the SD model mice can restore the GM2-degrading activity, reduce the GM2 accumulated in the brains, improve the motor dysfunctions and prolong the life span (Kitakaze K. *et al. J Clin Invest* 2016; Patent granted: JP6230158, EP2910632).

Prof. S. Muramatsu (Jichi Medical Univ., Japan) had performed the physician-led clinical trial of *in vivo* gene therapy with an adeno-associated viral (AAV) vector for 5 Japanese patients with aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency as a rare intractable neurological disease (130 patients in the world and 6 Japanese patients) and demonstrated the clinical efficacy. He also has been developing a novel *in vivo* gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) by using his original AAV9/3 vector (Patent granted: JP5704361, EP2634253B1).

In this ACT-MS program, Drs. Itoh and Muramatsu produced the AAV9/3 vector (non-GMP grade) carrying the *modHEXB* (AAV9/3-*modHEXB*) expressing the modified HexB with GM2-degrading activity and superior bioavailability to develop a novel intrathecal gene therapy, especially low-antigenic for TSD. We succeeded in acquiring the proof of concept (POC) for pharmacological efficacy by using the human TSD and SD model neuronal cells and SD model mice. The research results are as follows:

1. The AAV9/3-*modHEXB* ( $>5 \times 10^5$  vg/cell) dose-dependently restored the Hex activity towards anionic substrate (4-MU-6-sulfo- $\beta$ -N-acetylglucosaminide, MUGS) in cultured neuronal cells induced from the iPS cells derived from a TSD patient.
2. The AAV9/3-*modHEXB* ( $>5 \times 10^5$  vg/cell) restored MUGS- and neutral MUG (4-MU- $\beta$ -D-N-acetylglucosaminide)-degrading activities in cultured neuronal cells differentiated from the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y *HEXB-KO*) established by genome editing. The GM2 accumulated in the *HEX-KO* neuronal cells was also reduced by the administration of AAV9/3-*modHEXB*.
3. Single intracerebroventricular (*icv*) administration of AAV9/3-*modHEXB* ( $0.6 - 3 \times 10^{13}$  vg/kg BW) to adult SD model mice (8-wks of age) expressed the human modified HexB throughout the brains to reduce the accumulated GM2, improved the motor dysfunction and prolonged the lifespan (from 16 wks to over 45 wks). Restoration of Hex activities in peripheral organs including heart, liver and spleen was also observed.
4. Single *icv* or intravenous (*iv*) administration of AAV9/3-*modHEXB* ( $0.6 - 3 \times 10^{13}$  vg/kg BW) to neonatal SD mice (P0 – P1) also restored the GM2-degrading activity in the CNS and peripheral organs, maintained the motor function and prolonged the lifespan (from 16 wks to over 60 wks).
5. Single intrathecal (*it*) administration of non-GMP AAV9/3-*modHEXB* ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg BW) to normal cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) did not cause the adverse effects on appetite, body weight and behaviors for at least 3 months. Wide distribution of Hex activities in the CNS was observed 3 months after *it* injection.

This novel *it* gene therapy by utilizing AAV9/3-*modHEXB* is expected to be clinically applied especially for TSD patients as low-antigenic treatment in the future. This ACT-MS program was also performed in collaboration with Mr. K. Asai (CEO of Gene Therapy Research Institution, Co., Ltd.) aiming the preclinical and clinical trials.