

再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業(遺伝子治療製造技術開発)

研究開発課題 中間報告書

研究開発課題名	AAV ベクター遺伝子治療／ゲノム編集治療／CAR-T 療法に関する研究開発
代表機関名	学校法人自治医科大学 医学部免疫遺伝子細胞治療学（タカラバイオ）講座
研究開発代表者名	小澤 敬也
全研究開発期間	平成30年度 ～ 令和5年度（予定）

研究開発の概要

遺伝子治療臨床開発が世界的に活発化し、実用化が急速に進み始めている。そこで、長年に亘って遺伝子治療の開発研究に取り組んできた自治医科大学では、臨床開発を加速するため、学内の遺伝子治療研究者を結集した遺伝子治療研究センター（CGTR: Center for Gene Therapy Research）を設立し、研究体制を強化した。研究テーマとしては、本学の中心課題である AAV ベクター遺伝子治療、ゲノム編集治療、及び CAR-T 療法を取り上げた。これらはいずれも今後の遺伝子治療の発展に繋がる重要テーマであり、我が国としても研究を推進する意義が大きい。AAV ベクター遺伝子治療は、中枢神経疾患、網膜疾患、肝疾患などの革新的治療法になると考えられる。ゲノム編集治療は、より理想的な遺伝子治療法として期待される。CAR-T 療法は、実用化が進んでいるが、現状では有効性がまだ不十分であり、さらなる改良が必要である。

AAV ベクター遺伝子治療に関しては、対象疾患の拡大を見据え、ベクターの門脈内投与（肝疾患）と髄注法（中枢神経疾患）の検討を行っている。ヒト肝細胞用新規 AAV ベクターを使用し、ヒト肝細胞を移植したマウスで高い遺伝子導入効率を確認した。血液脳関門・髄膜脳関門を透過し、広範囲の中枢神経領域に遺伝子導入可能な改良型 AAV ベクターを使用し、カニクイサルの脳室・大槽に投与して検討した。さらに、乳幼児体格相当のミニブタを用い、大槽までカテーテルを到達させ、ベクター送達技術を確立した。また、非臨床試験用 AAV ベクターの試験製造を行い、非臨床安全性試験で一般毒性及び生体内分布を評価した。AAV ベクターの血管内投与では中和抗体陽性例の対策について検討を進め、中和抗体検出法の開発で大幅な改良ができた。動物個体レベルでの遺伝子発現と中和抗体力価の関係に関しては、マイクロミニブタが役立つことが示唆された。AAV ベクターのカプシド修飾（特に糖鎖）の問題についてはまず製造法の観点から検討を行った。抗体カラム、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムを用いることにより高純度 AAV ベクターの精製法が確立でき、それを用いて糖鎖解析を行った。

ゲノム編集治療の基盤技術開発では、体外法として、造血幹細胞へのゲノム編集ツールの送達法を確立した。マウス造血幹細胞へのゲノム編集ツール送達は、エレクトロポレーション法で行い、約 80%の細胞で遺伝子ノックアウト、約 20%の細胞で遺伝子ノックインに成功した。造血幹細胞移植実験では、ゲノム編集造血細胞の生着をマウスで確認した。三次移植まで実施

し、末梢血では遺伝子ノックアウト細胞が約 15-50%検出された。ゲノム編集の安全性については、オフターゲット作用の問題に加え、ゲノム編集後の大きな染色体欠失も報告されている。そこで、体内法に関して、ゲノム編集用 AAV ベクターをマウスに投与し、肝臓がんなどの腫瘍発生がないことを確認した。ゲノム編集のオフターゲット/AAV ベクターのゲノムインテグレーションの検出では、AAV ベクターの染色体挿入部位・ゲノム編集部位を同定するための nrLAM-PCR 法、僅かな AAV ベクターゲノムを定量できるデジタル PCR 法を確立した。

CAR-T 療法における細胞調製の最適化では、CAR-T 療法の臨床成績向上のため、体内における存続能と機能に優れた CAR-T を製造するための条件検討を行った。即ち、健常人 T 細胞を用い、抗 CD3 抗体/RetroNectin® または抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体ビーズに、幾つかのサイトカインを組み合わせ、作製された CAR-T のサブセット解析を行った。

規制科学に関しては、CAR-T シーズの共同開発支援では、CAR-T 製品の工程内試験と出荷試験の規格項目案を策定した。治験用 AAV ベクター製造支援では、RS 戦略相談と治験製品製造のための大臣確認取得を済ませ、カルタヘナ第一種使用規程原案を PMDA に送付した。