

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 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 中枢神経症状を伴うガングリオシドーシスの遺伝子治療法開発  
(英語) Development of gene therapy for gangliosidosis  
involving neurological symptoms

研究開発実施期間：令和元年10月30日～令和4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) 国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 (薬学域) 教授  
(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, Professor

## II 研究開発の概要

### 【研究開発の目的】

GM2 ガングリオシドーシスであるテイ-サックス病 (TSD) とサンドホッフ病 (SD) は、リソソーム酵素  $\beta$ -ヘキサミンナーゼ (Hex) A ( $\alpha\beta$  鎖ヘテロ二量体) の各サブユニットをコードする *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子の潜性変異が原因で、HexA が欠損し、その基質である GM2 ガングリオシド (GM2) が患者脳内で過剰蓄積し、退行や筋緊張低下などの進行性の中枢神経症状を伴って発症する遺伝性神経難病である。TSD と SD の発生頻度は、各々22万及び44万出生児当たり1人程度の希少疾患 (ライソゾーム病) である。現在の患者数は、欧米 (ユダヤ人に多い) では合せて約250名、国内では22名 (日本先天代謝異常症患者登録制度 JaSMIn 登録数 2022年9月) である。しかしこれらの疾患に対する根本治療法はない。伊藤 (徳島大) らは、HexA の X 線結晶構造を基に、ヒト Hex  $\beta$  鎖のアミノ酸配列の一部 (9種のアミノ酸) を  $\alpha$  鎖型に置換した改変 Hex  $\beta$  鎖遺伝子 (*modHEXB*) の発現産物 modHexB が、HexA のもつ GM2 分解能と優れた生体内安定性を示すことを明らかにしてきた (*JCI*, 2016, 126:1671)。一方、村松 (自治医大) は独自にチロシン変異型アデノ随伴ウイルス AAV9/3 ベクターを発明 (*Biomed Res Int*, 2013, 2013:974819) し、神経変性疾患の遺伝子治療への応用可能性を示してきた。伊藤と村松は、平成28～29年度AMED産学連携医療イノベーション創出プログラム イノベーションセットアップ事業 (ACT-MS) において、*modHEXB* を搭載した AAV9/3 ベクター (AAV.GTX-*modHEXB*) の、TSD 患者 iPS 細胞由来培養神経系細胞への投与による HexA 様活性回復、また SD モデルマウス (*Hexb*<sup>-/-</sup>) の脳室内単回投与による協調運動機能の維

持と寿命の延長（非投与群中央値 123 日→投与群 744 日）等の顕著な有効性を示すことを明らかにし、薬効薬理 POC を取得した。本 ACT-M 事業では、企業代表者 株式会社遺伝子治療研究所 浅井らが参画し、製品名 GT0005X (AAV.GTX-*modHEXB*) を用いる、国内乳児型・若年型 TSD/SD 症例を対象とした、髄腔（大槽）内単回投与の *in vivo* 遺伝子治療の治験準備を目的とした。GLP 試験用ベクターの製造と PMDA の対面助言（非臨床）に基づく GLP 非臨床安全性試験の実施、また治験用ベクターの製造と PMDA の対面助言（品質）、GLP 試験結果を基に治験計画を策定し、PMDA の対面助言（臨床）を実施する。さらに 2020～2021 年度に国内患者の実態調査とレジストリー作成を行い、2022 年度以降の医師主導治験の開始を目指した。

## 【研究開発の成果】

### 1. GLP 試験用及び治験用 AAV.GTX-*modHEXB* ベクターの製造

株式会社遺伝子治療研究所が、GLP 試験用及び治験用 AAV.GTX-*modHEXB* ベクター（以下、製品名 GT0005X と略す）の製造を実施した。2019 年度は HEK293 細胞亜株 AAV-293 の接着培養による小スケール製造で、平均  $8.76E+12$  vector genome (vg)/生産時液量約 4L を回収できた。ベクター品質については、確認試験、純度試験、感染性因子に対する試験、生物活性 (*modHEXB* タンパクの発現)、含量等についても暫定規格値をクリアした。

しかし COVID-19 感染拡大の影響で、接着培養系でのスケールアップが困難となり、2020 年度から AAV ベクターの大量製造を目的とした、HEK293 浮遊培養製法を新たに確立した。なお、同 HEK293 細胞のセルバンク（同社の先行開発品と共通使用）の生原基適合確認・細胞株の適格性は、PMDA 対面助言で確認済みである。また、2020 年度末に、治験製品ベクター製造のためのカルタヘナ法第二種使用に係る厚労大臣確認を取得した。さらに、COVID-19 の影響で、GLP 非臨床安全性試験用 GT0005X の製造も遅れたが、2021 年度には、浮遊培養（生産時液量 10L）系では、平均  $1.26E+13$  vg/L の製造・精製を達成でき、接着系（平均  $2.19E+12$  vg/L）と比べ、製造量を約 5.8 倍増大させることに成功した。

本浮遊系で得られた GT0005X を用いた GLP 非臨床安全性試験を 2022 年 4 月から開始しており、2022 年度末までには GLP 非臨床試験を完了する予定である。

### 2. 非臨床試験（GLP 非臨床安全性試験、薬効薬理確認試験）

GLP 非臨床安全性予備試験用に製造した GT0005X を用い、幼若ラット（7 日齢及び 4 週齢）の（大槽）内単回投与 2 試験を実施した。7 日齢ラットへは、技術的に可能な用量  $8.4E+11$  vg/rat 個体で投与し、また 3 週齢（投与時 4 週齢）のカニューレ留置ラットに対しては、用量  $6.3E+12$  vg/rat 個体（ヒト換算  $3.78E+14$  vg/human）で投与した。4 週間の一般毒性及び生体内分布を評価した結果、重篤な有害事象は観察されず、安全性に懸念事項はないと判断された。また、この予備試験結果に基づき、幼若ラット（4 週齢）を用いる GLP 非臨床安全性試験の計画を策定した。しかし COVID-19 の影響により、GLP 試験薬の製造が 2021 年度末となり、試験の開始は 2022 年 4 月となった。

GT0005X の薬効薬理確認試験については、COVID-19 の影響で、GLP 基準ベクターを用いることはできなかった。しかし米国 TAYSHA Gene Therapies 社が 2021 年から、乳児型 TSD 及び SD 症例に対して開始した、髄腔内単回投与遺伝子治療の先行治験で用いているバイシストロニックベクター AAV9-*HEXB-P2A-HEXA* の同等品となる、非 GLP 基準 AAV9/3-*HEXB-P2A-HEXA* (AAV9/3-P2A と略す。AAV.GTX-*modHEXB* と同じセロタイプ) を村松らが作製し、伊藤らがその薬効薬理（有効性）を GT0005X と比較した。

非 GLP 基準の GT0005X の、SD モデル (*Hexb*-/-) マウスの脳室内（脳脊髄液内）への単回投与（用量  $6E+12$  vg/kg 体重）により、*Hexb*-/- マウスでは 12 週齢以降にロタロッド試験における運動機能低下が観察されたのに対し、GT0005X 投与群では、16 週齢においても野生型と同様の運動機能が維持された。一方、米国先行治験でも用いられているバイシストロニック AAV9/3-P2A の投与群では、12 週齢以降も運動機能の低下が観察された。寿命については、Log-rank 試験において、*Hexb*-/- マウスは 123 日（中央値）、AAV9/3-P2A 投与群

は 138 日（中央値）及び GT0005X は 474 日（中央値）の成績であり、GT0005X は、AAV9/3-P2A に比べ、顕著な寿命の延長効果を示すことを明らかにした。

### 3. PMDA との RS 戦略相談

GT0005X の非臨床安全性試験に関する RS 相談については、GT0005X を用いる遺伝子治療の治験対象が、乳児・若年型 TSD 及び SD 患者になることが想定されたため、幼若ラットを用いる GLP 非臨床安全性試験計画に係る PMDA の対面助言を実施した。GLP 試験に用いるラットはできる限り幼若な個体を用いるようにとの助言があった。しかし COVID-19 の影響で、GLP 試験用 GT0005X の製造が遅れたため、2020 年度に、小スケールで試験製造した GT0005X を幼若ラット（7 日齢及び 4 週齢）の大槽内に単回投与する非臨床安全性予備 2 試験を実施した。いずれの予備試験においても GT0005X の安全性に懸念事項ないことが示されたため、本予備試験結果を基に PMDA の対面助言を実施し、幼若ラット（4 週齢）の大槽内に単回投与する非臨床安全性試験計画を相談し、受け入れ可能である見解を得た。

臨床相談については、治験前の事前面談を終了し、治験計画概要を策定した。GLP 非臨床安全性試験の結果を入手でき次第、対面助言を実施する予定である。

品質に関する相談は、生物由来原材料基準（生原基）への適合性について、遺伝子治療研究所が製造する同一キャプシド・同一原材料・同一製造工程の先行品に対して PMDA の対面助言を実施した。しかし COVID-19 の影響で、本研究開発期間内に治験用 GT0005X に関する PMDA の対面助言（品質相談）には至らなかった。

### 4. 治験実施計画策定

酒井（大阪大）が関与した、厚労省難治性疾患等政策事業（衛藤・奥山班）における全国患者調査結果から、ライソゾーム病の総数は 1,435 例あり、そのうち GM2 ガングリオシドーシス（TSD または SD）は 16 例であったこと、またそのうちで病型が分かっている 8 例中、乳児型が 6 例、若年型が 2 例であった。山形（自治医大）は、2021 年度に自治医科大学病院での受診患者のうち、TSD 患者 1 名を確定診断した。また 2021 年度末までに GM2 患者会患者の中での治験希望者数を把握できた。

また GT0005X を用いる TSD/SD 患者の遺伝子治療における治験患者への投与方法としては、カテーテルを腰椎から挿入し、大槽内まで到達させ、GT0005X ベクターを注入する方法を採用し、乳児型または若年型患者（4 ヶ月齢以上）の髄腔（大槽）内単回投与する医師主導治験計画に組み入れた。

なお、上述のように GLP 非臨床試験が完了していないため、カルタヘナ法第一種使用に係る大臣承認申請には至っていない。

2021 年度内に策定された、国内 GM2 ガングリオシドーシス TSD/SD 患者を対象とする、GT0005X を用いる遺伝子治療の医師主導治験の概要としては、GT0005X の大槽内単回投与による遺伝子治療の安全性と有効性の評価を目的とした、単施設（自治医科大学病院）、非盲検、非対照、共同医師主導型 第 I/II 相試験である。対象患者は、乳児型または若年型（4 ヶ月齢以上）の TSD または SD 患者（4~6 例予定）で、投与方法は、腰椎クモ膜下腔内に穿刺、カテーテルを胸髄~大槽まで挿入し、GT0005X を単回注入する。投与量は、低用量  $1.1E+11$  vector genomes/g brain（脳重量）、高用量  $3.3E+11$  vector genomes/g brain（脳重量）とする。主要評価期間は、24 週間（6 ヶ月）~52 週間（13 ヶ月）、評価終了後観察期間は、主要評価期間終了後 10 年~15 年を予定している。主要評価項目（安全性）は、有害事象・不具合の発生、バイタルサイン、12 誘導心電図、臨床検査値（血液学的検査、生化学的検査、尿検査）等、主要評価項目（有効性）は、髄液中の酵素活性、髄液中のタンパク質、AST、LDH、NSE 活性等で評価する予定である。

#### 【研究開発成果の意義】

HexA（ $\alpha\beta$ ヘテロ二量体）が遺伝的に欠損して GM2 が脳内に過剰蓄積して中枢神経症状を発症する、TSD（1881 年初症例報告）と SD（1968 年初診断）患者に対する遺伝子治療法を開発するためには、Hex $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖を各々コードする *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子を患者脳構成細胞に同時に導入し、同一細胞内で HexA を発現させる必要がある。

米国 UMass とスイス Sio Gene Therapies 社は、両遺伝子を別々の AAVrh8 ベクターに搭載した AAVrh8-*HEXA* と AAVrh8-*HEXB* を 1:1 の割合で混合した製剤を、乳児型 TSD 患者の視床実質または髄腔内に単回投与する臨床研究及び治験を実施した。AAVrh8 ベクター投与の安全性は確認されたものの、HexA の相対発現量は低く、顕著な有効性は示されなかった (*Nat Med* 2022, 28:251)。一方、本研究開発で用いる GT0005X は、その単一搭載 *modHEXB* 遺伝子の発現産物 modHexB (改変  $\beta$  鎖ホモ二量体) が GM2 分解能と優れた生体内安定性を示すため、遺伝子導入された脳構成細胞では必ず蓄積 GM2 の分解・減少が起こる。また過剰発現した細胞から、modHexB が細胞外に分泌され、周囲の細胞に取り込まれて有効性を示す、クロスコレクション効果が期待される。さらに、modHexB は、分子母体が正常 HexB (正常  $\beta$  鎖ホモ二量体) であるため、Hex  $\alpha$  鎖欠損症の TSD 患者がもつ正常 HexB にカモフラージュされ、modHexB の免疫原性は低いと想定される。さらに本研究開発で実施した薬効薬理確認試験において、米国 TASHA Gene Therapies 社が、乳児型 TSD 及び SD 患者の髄腔内への単回投与による遺伝子治療の先行治験で用いているバイシストロニック AAV9-*HEXB-P2A-HEXA* 相当ベクターよりも、GT0005X (非 GLP 基準) の方が顕著な有効性と優位性を示すことを明らかにした。なお、2022 年 4 月に Sio Gene Therapies 社と TAYSHA Gene Therapies 社は、いずれも財務上の理由から、GM2 の遺伝子治療法の臨床開発を中止している。

このような背景で、本研究開発では、株式会社遺伝子治療研究所は、GT0005X の新規製造法として、HEK293 細胞亜株を用いる浮遊培養系を確立し、従来の接着培養系に比べ、製造量を約 5.8 倍増大させることに成功した。また、米国でも一部の先端企業しか実施できていない浮遊培養製造施設を増設 (現在 120 L まで) できた。

GLP 基準試験製造 GT0005X を幼若ラット (7 日齢及び 4 週齢) の (大槽) 内に単回投与する予備 2 試験において、ヒト予定臨床最大量よりも多い  $3.78E+14$  vg/human で投与した場合でも、4 週間の一般毒性及び生体内分布を評価した結果、重篤な有害事象は観察されず、安全性に懸念事項はないと判断されたため、現在、進行中の GLP 非臨床安全性本試験の結果を入手でき次第、PMDA の対面助言 (臨床治験相談) を実施し、策定した治験計画を確定できる。

治験用 GT0005X の製造は、COVID-19 の影響で遅れたが、生物由来原材料基準 (生原基) への適合性については、遺伝子治療研究所が製造する同一キャプシド・同一原材料・同一製造工程の先行品において PMDA の対面助言 (品質相談) を実施済みである。

厚生労働省難治性疾患等政策事業 (衛藤/奥山班) との連携で、国内 TSD 及び SD 患者の実態調査を実施し、患者レジストリーの作成に向けた準備を開始できた。また本期間中に新たに 3 名の国内 TSD 患者が確定診断されたとともに、GM2 患者家族の会からの治験希望者数を把握できた。

さらに GT0005X の大槽内単回投与による遺伝子治療の医師主導治験 (第 I/II 相試験) 計画概要が策定され、PMDA の対面助言 (臨床) での承認、カルタヘナ第 1 種申請承認が得られれば、医師主導治験を実現できる状況である。GT0005X は、国内のみならず、海外における GM2 患者に対する、First-in class の *in vivo* 遺伝子治療用製剤となり得る。

Tay-Sachs disease (TSD) and Sandhoff disease (SD) are GM2 gangliosidoses caused by autosomal recessive mutations in the *HEXA* and *HEXB* genes, which encode the alpha and beta chains of human  $\beta$ -hexosaminidase (Hex), respectively. The incurable hereditary neurological diseases are associated with HexA ( $\alpha\beta$  heterodimer) deficiency and excessive brain accumulation of GM2 ganglioside (GM2). The frequency of each condition is 1 in 222,000 and 1 in 422,000 live births. The number of patients (TSD+SD) in Europe and the United States (especially among Jews) is about 250, and 22 in Japan (JaSMin registry 2021). Although there is no fundamental treatment for both diseases, in November 2018, UMass and Sio Gene Therapies became the first to confirm the safety of gene therapy (clinical study) with equal amounts of AAVrh8 vector carrying *HEXA* or *HEXB* mixture via intrathalamic or intrathecal administration as a single dose (*Nat Med* 2022, 28:251). Since then, clinical trials have been ongoing, but no significant efficacy

has been demonstrated for infantile TSD. In the previous AMED ACT-MS program, PI Itoh (Tokushima Univ.) and co-investigator Muramatsu (Jichi Medical Univ.) produced a tyrosine mutant AAV9/3 vector (AAV.GTX-*modHEXB*, GT0005X) carrying a modified *HEXB* gene encoding a modified human Hex  $\beta$ -chain in which nine amino acid residues are substituted into  $\alpha$ -chain type. The *modHEXB* gene products (modHexB) show GM2-degrading activity and protease resistance (*JCI*, 2016, 126:1671). We obtained the POC for pharmacological efficacy of non-GLP grade GT0005X by single intracerebroventricular administration as a single dose (0.6-3E+13vg/kg body weight) to presymptomatic adult SD model (*Hexb*<sup>-/-</sup>) mice to reduce the accumulated GM2 in each brain region, maintain motor function, and prolong the life span.

In this R&D, a co-investigator Asai, the CEO of Gene Therapy Research Institution, Co. Ltd. (GTRI), established a new floating culture system using the HEK293 cell sub-line for large-scale AAV production and increased the AAV amounts by approximately 5.8 times compared to the conventional adhesion culture system. He also produced GLP-grade GT0005X for a preliminary safety study, in which a single intracisternal dose injection was performed in juvenile rats (7 days and 4 weeks old) to evaluate the 4-week general toxicity and biodistribution. As a result, no serious adverse events were observed, and no safety concerns were identified. So, we started a non-clinical GLP safety study of GT0005X after the PMDA's face-to-face advice and will complete it in FY2022. Based on the results, we will develop a domestic physician-initiated clinical trial plan, which can be finalized after PMDA's face-to-face advice on the clinical trial.

In collaboration with the Ministry of Health, Labour and Welfare, a co-investigator Dr. Sakai (Osaka Univ.), surveyed TSD and SD patients in Japan and started preparing to create a patient registry. During this R & D period, three new patients with TSD in Japan were diagnosed by Dr. Sakai and Dr. Yamagata (Jichi Medical Univ.), and the number of applicants for clinical trials from the GM2 Patient Family Association was also identified. In the present design, we will perform a Phase I/II clinical trial aimed at evaluating the safety and efficacy of a single intracisternal dose of GT0005X (Low dose, 1.1E+14vg/kg brain weight; High dose, 3.3 E+14vg/kg brain weight) administration to infantile and juvenile TSD or SD patients (4 months old or older) with the flexible catheter. *In vivo* gene therapy utilizing GT0005X for infantile and juvenile TSD and SD patients, if started before disease progression, is expected to have a long-term therapeutic effect on CNS symptoms based on the degradation of accumulated GM2 in a wide range of brain regions. For TSD patients with normal  $\beta$ -chains and mild SD patients expressing mutant  $\beta$ -chain proteins, recombinant HexB composed of modified  $\beta$ -chains is expected to have low immunogenicity. GT0005X will be a first-in-class *in vivo* gene therapeutic agent for GM2 patients in Japan and overseas.

### III 事後評価総合所見

GM2 ガングリオシドーシスの遺伝子治療薬開発研究において、AAV.GTX-*modHEXB*の安全性予備試験および薬効薬理予備試験を実施し、安全性の確認や疾患モデルマウスにおける米国の競合開発品との優位性を確認し、PMDAとのRS戦略相談、治験デザインの策定、治験希望者の存在の確認などライソゾーム病に対する根本的な治療法として臨床試験に向けた準備が進んだ。コロナ禍の影響により、GLP非臨床試験用ベクターおよび治験用ベクター製造が遅れたが、ほぼ計画通りに進行したと評価された。

GLPベクター製造が完了したことから、今後はGLP非臨床試験を行い、また、治験薬製造を完成し、さらにGLP非臨床試験の結果に基づいた医師主導治験に向けた準備を進めることを期待する。また、将来的な国内外

の開発戦略の体制構築も重要である。