

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) in vivo 遺伝子治療における患者検体を用いた AAV ベクター由来遺伝子治療用
製品の品質・有効性・安全性評価系の開発
(英語) Development of methods to assess the quality, efficacy, and safety of
AAV vector-derived gene therapy products using patient samples

研究開発実施期間: 令和4年8月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小野寺 雅史
(英語) Masafumi ONODERA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立成育医療研究センター・遺伝子細胞治療推進センター・センター長
(英語) National Center for Child Health and Development, Gene & Cell Therapy Promotion Center,
Director

II 研究開発の概要

本研究の目的は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いて *in vivo* 遺伝子治療を受けた患者の血液等の検体を用い、安全性および有効性に関する評価系を確立して、その結果を基に市販後のリスクマネジメントプラン（RMP）を試作する。具体的には、AAV ベクターに対する免疫応答や生体内分布及び感染細胞における挿入部位の評価法を確立し、その標準作業手順書（SOP）を公開する。また、関連企業・規制当局との協働によるウイルスベクターの排出に関するガイドラインの策定も同時に行う。

免疫応答に関しては、9 型カプシドを有する AAV ベクターによる *in vivo* 遺伝子治療のゾルゲンスマ（一般名：オナセムノゲン アベパルボベク）を受けた脊髄性筋萎縮症患者の血漿を用い、網羅的サイトカインアッセイを行った。その結果、重度の肝機能障害を呈した患者では自然免疫系に関連する MCP-1、IL-8、IL-10 の上昇を認めた。一方、血管内皮系のマーカーである IL-1、TNF- α 、IFN- γ に変動はなく、フローサイトメトリーにおいても獲得免疫系の CD4/CD8 T 細胞の活性化は認められなかった。なお、これら反応は投与後 1～2 ヶ月を経た段階でも発症しており、AAV ベクターによる肝機能障害など重篤な不具合の原因として自然免疫系の関与が示唆された。

AAV ベクターの生体内分布および体液中への排出量は、カルタヘナ法における第一種使用規程申請において極めて重要な情報であり、これらの評価にはベクター配列に基づく droplet digital PCR（ddPCR）など定量 PCR が用いられる。ただ、同方法では感染性ウイルスの有無を評価することはできず、また、体液中に含まれる残存ウイルス量はごく微量であるため、その感染性を評価するには高感度な感染感受性細胞株が必要となってくる。そこで、標的細胞において AAV ベクター感染を抑制する糖鎖を欠失させるため、糖転移酵素遺伝子を破壊した 293 細胞株を樹立した。同細胞は 2 型および 6 型カプシドを有する AAV ベクターに対し、従来の 293 細胞では検出が難しかった微量ウイルスでも高い感染性を示した。今後は、9 型カプシドを含む他の血清型 AAV ベクターに対する感染感受性細胞株の確立を目指し、生体内分布および体液からの排出試験における標的細胞として利用することを検討する。

挿入部位解析に関しては、マウス肝がん細胞由来の Hapa1-6 細胞にハイグロマイシン耐性遺伝子を搭載した AAV ベクターを感染させ、薬剤選択によりベクターが宿主ゲノムに挿入された細胞株を複数樹立し、次世代シーケンサーにてその挿入部位を解析した。なお、挿入部位の検出精度を高めるため、ベクター全長をカバーするキャプチャーベイトの設計、分子バーコードを付加したアダプターの使用、さらに HTLV-1 感染細胞の挿入部位解析で使用される RAISING 法（poly A 末端修飾を用いた手法）を改変して行った。一方、複数クローンにおいて挿入部位を同定したが、その挿入部位は二重鎖切断等の宿主ゲノムの状態に多大な影響を受けるようであり、宿主ゲノムやベクターゲノムに欠失・逆位などの複雑なゲノム構造を認めた。このため、より詳細な解析にはロングリードシーケンスの活用が必要とされ、ナノポア社のプロトコルを改変し、従来の約 50%のコストで調製可能なサンプル作製法を確立した。現在、キャプチャーシーケンスとロングリードシーケンスを併用して、AAV ベクターの挿入部位解析を行っている。なお、これら免疫応答評価や挿入部位同定に関する実験プロトコルは公開を予定している。

RMP の策定に関しては、ゾルゲンスマを含む *in vivo* 遺伝子治療を実施している全国 10 か所の医療機関とワーキンググループを組織し、治療時に患者検体が速やかに本センターに搬送される体制を臨床研究として構築した。また、2019 年度に作成した「AAV ベクターを用いた *in vivo* 遺伝子治療のカルタヘナ法第一種使用規程対応マニュアル」を改訂し、2024 年 3 月 1 日付で第 2 版として日本小児神経学会より発出した。

AAV ベクターを含むウイルスベクターを用いた *in vivo* 遺伝子治療においては、院内でのベクター排出 (viral shedding) への対応が重要であり、FDA では viral shedding に関するガイドラインを策定しており、第三者への伝播防止や環境への影響の観点から RMP および評価法の整備が進められている。この点からも日本において医療機関や企業と連携し、viral shedding への対応および安全性確保のための長期フォローアップ体制についてガイドラインの策定が求められており、産業界からも排出ガイドライン作成の要望が寄せられている。これに対応し、本研究ではガイドラインに盛り込むべき内容を検討し、その概念を含めて PMDA と議論し、ガイドラインの骨子をまとめたリフレクションペーパーを作成した。そして、同ペーパーに対して産業界から多数の意見を収集し、PMDA との複数回の協議を経て、最終的に改訂案として厚生労働省に提出した。今後は、同ガイドライン (案) の要求事項に関して産業界から意見募集を行い、次期 AMED 規制班にてさらなる検討を行う予定である。

最後に、本研究では、AAV ベクターによる *in vivo* 遺伝子治療を受けた患者の血液検体等を用い、投与後に見られる肝機能障害が自然免疫反応に起因する可能性を示した。また、生体内分布およびベクター排出に関わる微量ウイルスに対応する高感度感染感受性細胞の樹立やキャプチャーシーケンス、ロングリードシーケンスを用いた AAV ベクターの挿入部位解析法の確立、カルタヘナ法第一種使用規程対応マニュアルの改訂およびウイルスベクター排出に関するガイドラインの策定を関係機関と連携して行った。研究期間は 3 年間で短期間であったが、当初の研究計画は概ね達成されたと考えている。

The purpose of this study is to establish methods for evaluating the safety and efficacy of in vivo gene therapy using adeno-associated virus (AAV) vectors using patient samples, and at the same time contribute to the setting of post-marketing risk management plans (RMPs). Specifically, we focused on the analysis of immune responses to AAV vectors, viral biodistribution after administration, and integration sites in infected cells, and developed standard operating procedures (SOPs) for these methods. In addition, we worked with industry and regulatory authorities and developed virus shedding guidelines.

Immune responses were evaluated using plasma from patients with spinal muscular atrophy who received AAV9-based treatment (onasemnogene abeparvovec). In patients with severe liver dysfunction, elevated levels of innate immune-related cytokines (MCP-1, IL-8, IL-10) were observed. However, vascular endothelial cell response markers (IL-1, TNF- α , IFN- γ) and T cell activation markers were unchanged. These adverse events persisted for 1–2 months after treatment, suggesting the involvement of innate immune responses.

To solve the problem of low residual viral load in body fluids, we established 293 cells deficient in glycosyltransferase genes capable of inhibiting AAV infection and developed a highly sensitive infection assay. These cells are highly susceptible to infection even with trace amounts of AAV2 and AAV6, and we are currently developing a cell line that is also susceptible to infection with AAV9.

To analyze vector insertion sites, we used AAV-infected Hpa16-1 mouse hepatoma cells and identified insertion sites by next-generation sequencing using techniques such as capture bait design, molecular barcoding, and application of the RAISING method. However, the observed insertion sites showed complex genomic structures, so we introduced long-read sequencing, which allows low-cost sample preparation.

Regarding RMP development, we established a nationwide clinical network with ten institutions administering in vivo gene therapy, enabling prompt patient sample collection. We also revised and published the second edition of the “Manual for Cartagena Law Compliance for in vivo Gene Therapy Using AAV Vectors” through the Japanese Society of Child Neurology.

As regulatory authorities around the world began to place greater emphasis on viral shedding, we began developing national guidelines in consultation with the PMDA and industry. We prepared a reflection paper summarizing key concepts, revised it through consultations with industry and regulatory authorities, and finally submitted it to the Ministry of Health, Labor and Welfare.

In summary, this study revealed the potential role of innate immunity in AAV-associated hepatotoxicity, established tools to evaluate viral shedding and biodistribution, and established advanced integration site analysis methods. These collaborative studies will be useful in establishing a regulatory regime to support the safe implementation of in vivo gene therapy in Japan.