

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）アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療用製品の安全性評価法に関する研究

（英 語）Research on safety evaluation of gene therapy products based on adeno-associated virus vectors

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）山本 武範

（英 語）Yamamoto Takenori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長

（英 語）Chief of Gene Therapy section, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products
National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

代表的な *in vivo* 遺伝子治療用製品であるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、治療手段のない遺伝性疾患を救う新しい医療モダリティとして、大きな注目を集めている。実際に、AAV ベクターの臨床開発及び実用化は近年大きく進展しており、日欧米で 2026 年 5 月現在 11 品目が承認されている。本邦でも脊髄性筋萎縮症を適応とするゾルゲンスマをはじめとして 4 品目の AAV ベクター製品が承認されており、複数品目の臨床開発が進められている。安全性の観点では、AAV ベクターは病原性が低く、ウイルスゲノムが宿主ゲノムに組み込まれないことから、安全性が高いと考えられてきた。しかしながら、2020 年より AAV ベクターを高用量で静脈内に投与する臨床試験において、死亡例を含む重篤な有害事象が相次いで報告され、この要因については、AAV ベクターが肝臓において何らかの作用を引き起こすことが主要な原因と考えられている。以上のように、この数年で AAV ベクターの毒性発現に関する課題が浮き彫りとなり、AAV ベクターの安全性確保に資する取り組みの必要性が国際的に強く認識されるに至っている。これに対し、各開発者は AAV ベクターの改変 (ウイルスカプシドの改変、導入遺伝子配列の改変) 等により肝毒性の低減を指向した研究開発を行っているが、そもそもヒトにおける肝毒性発現を予測する非臨床評価手法が存在しないという課題があり、早急な対応が求められている。以上の背景から、本研究では AAV ベクター製品の肝毒性の予測・評価法の確立およびこれを踏まえて AAV ベクターの安全性評価に関する留意事項文書を作成することを目的として研究を行った。

具体的には以下の研究項目に関する研究を実施した。

- 1) AAV ベクターによる自然免疫・炎症応答を高感度に検出する *in vitro* 評価系を確立
- 2) *in vitro* 評価系と *in vivo* (肝毒性発現) の相関を検証
- 3) AAV ベクターに起因する肝毒性発現を予測するマーカー候補分子の探索
- 4) AAV ベクターの安全性評価に関する調査研究および留意事項文書の作成以降に各項目の研究成果を述べる。

1) AAV ベクターによる自然免疫・炎症応答を高感度に検出する *in vitro* 評価系を確立

AAV ベクターに対する自然免疫・炎症応答を高感度に検出する *in vitro* 評価系の構築に向け、AAV ベクターに対して高い免疫応答性を示す細胞株のスクリーニングを行った。まず、本スクリーニングに用いるモデル AAV ベクターとして、自然免疫・炎症応答が異なると想定されるモデル AAV ベクター群をデザイン・製造した。これらのモデル AAV ベクター群を種々のヒト細胞株等に添加し、自然免疫・炎症応答の評価を行うことによって、*in vitro* 評価系に適した細胞株のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、AAV ベクターの添加により自然免疫・炎症応答を示す細胞株を特定した。本細胞株を用いることにより、AAV ベクターの自然免疫・炎症応答性を高感度に検出する *in vitro* 評価が可能になると考えられる。

特定した細胞株の AAV ベクターに対する免疫応答に対して、自然免疫・炎症応答の関与遺伝子の欠損がどのような影響を及ぼすかを体系的に解析することにより、AAV ベクターに対する免疫応答経路、およびそれらの応答経路の特性から、免疫機構によって認識されていると考えられる AAV ベクターの成分に関する基盤データを取得した。これらの基盤データは自然免疫・炎症応答性を低減させた AAV ベクターのデザインにも活用できる可能性が考えられる。

2) *in vitro* 評価系と *in vivo* (肝毒性発現) の相関を検証

上述の「自然免疫・炎症応答を高感度に検出する *in vitro* 評価系」と肝毒性発現の相関を調べるため、項目 1) で用いた「自然免疫・炎症応答が異なると想定されるモデル AAV ベクター群」をマウスに投与し、肝毒性との相関を検証した。解析の結果、特定のモデル AAV ベクターを投与した場合に、肝毒性マーカーの上昇

が観察され、「自然免疫・炎症応答を高感度に検出する in vitro 評価系」と肝毒性発現との間に一定の相関が認められることが確認された。

3) AAV ベクターに起因する肝毒性発現を予測するマーカー候補分子の探索

AAV ベクターによって引き起こされる肝毒性の特性を包括的に理解するため、オミクス解析を実施し、肝臓内あるいは培養細胞内で起こるイベントを精査した。これまでに見出した AAV ベクターの投与により肝毒性マーカーの上昇が認められたマウスの肝臓等に対して、オミクス解析を実施し、AAV ベクターの投与により発現変動する遺伝子群の抽出を行った。本解析は、AAV ベクターによる毒性発現の分子機構に関する取り組みであるとともに、AAV ベクターに起因する肝毒性発現を非臨床段階で予測する新規マーカー候補分子の特定につながる可能性がある。

4) AAV ベクターの安全性評価に関する調査研究および留意事項文書の作成

以上のウェット研究の成果ならびに調査研究の成果を統合し、AAV ベクターの非臨床安全性評価の在り方について留意事項文書を取りまとめた。

・調査研究：

本研究において既承認品目においてどのような安全性評価が行われているかは特に重要であるため、日欧米で承認を受けた AAV ベクターを用いた遺伝子治療用製品の審査報告書を中心に調査研究を行い、本研究で提案する評価法も含め、各評価法の特性や適用される場面等に関する考察を行った。

・非臨床安全性評価の在り方に関する留意事項文書：

上記のウェット研究およびドライ研究（調査研究）の結果を踏まえ、医薬品医療機器総合機構（PMDA）を含む産官学の関係者ならびに日本製薬工業協会（革新的医薬品・医療技術課題対策チーム）との連携の下、安全性評価の在り方に関する議論を重ね、2024 年 12 月「AAV ベクター製品の安全性評価の考え方」と題するシンポジウムを開催した（<http://www.nihs.go.jp/mtgt/section2/kakusanRSsymp20.pdf>）。当該シンポジウムにおいて議論した「動物種選択」、「毒性試験の試験期間」、「免疫反応の評価」、「ゲノム挿入評価」、「生殖組織への分布と次世代への移行リスク」、「がん化リスク評価」、「不純物の評価」等の考え方を、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス誌（Vol.56, No.5：2025 年 10 月号）の特集「AAV ベクター製品の安全性評価の考え方」において、以下の 6 報の総説として取りまとめた。

1. 序論：アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター製品の安全性評価の考え方

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.348-350.pdf

2. 既承認 AAV ベクター製品の非臨床安全性評価

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.351-362.pdf

3. AAV ベクター製品の一般毒性評価及び免疫毒性評価

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.363-369.pdf

4. AAV ベクター製品の遺伝子組込み評価並びに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.370-376.pdf

5. AAV ベクター製品の生殖細胞を介した次世代移行リスク及び生殖発生毒性評価

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.377-383.pdf

6. AAV ベクター製品に含まれうる不純物と安全性評価

https://www.nihs.go.jp/mtgt/section-1/PMRJ/RS56-05_p.384-392.pdf

これらの総説について、関係者に広く情報共有する目的で、国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部ホームページよりダウンロード可能にするとともに、関連する学会に周知を行った（第 53 回日本毒性学会学術年会（2026 年 7 月 1～3 日）では、「AAV ベクターの安全性評価の考え方」と題するセッションを企画し、本文書に関して執筆者らによる講演を行うことにより具体的な文書内容の周知を予定している）。

これらの文書を通じて、AAV ベクター製品を実際に開発するにあたり、「具体的に何を、いつまでに、どのように評価すべきか」について、開発者ならびに規制関係者におけるコンセンサスが一定程度形成されたと考えられ、AAV ベクター製品の開発ならびに審査が迅速化に寄与すると期待される。

II. Overview of the Research and Development

Adeno-associated virus (AAV) vectors, which are representative in vivo gene therapy products, have attracted considerable attention as a novel therapeutic modality for inherited diseases lacking effective treatment options. As of May 2026, 11 AAV vector products have been approved in Japan, Europe, and the United States, including four in Japan, such as Zolgensma for spinal muscular atrophy, while multiple additional products remain under clinical development. However, despite their traditionally favorable safety profile, serious adverse events, including fatal cases associated with high-dose intravenous administration, have raised significant concerns regarding AAV vector-associated hepatotoxicity. Although developers are attempting to mitigate such risks through vector engineering, including capsid and transgene modifications, no reliable nonclinical method currently exists to predict hepatotoxicity in humans, creating an urgent need for improved evaluation strategies.

Against this background, this study aimed to establish predictive and evaluative methods for AAV vector-associated hepatotoxicity and to develop guidance for the nonclinical safety evaluation of AAV vectors.

The study focused on four major objectives:

1. establishment of an in vitro evaluation system capable of sensitive detection of innate immune and inflammatory responses to AAV vectors;
2. validation of the correlation between this in vitro system and in vivo hepatotoxicity;
3. identification of biomarkers predictive of hepatotoxicity; and
4. investigative research and preparation of a guidance document for AAV safety evaluation.

For Objective 1, a screening study was conducted to identify human cell lines exhibiting high immunological responsiveness to AAV vectors. This led to the identification of a cell line suitable for highly sensitive detection of innate immune and inflammatory responses. In addition, systematic analyses using deficiencies in immune-related genes provided mechanistic insights into host immune recognition pathways and the AAV vector components involved in these responses. These findings may also contribute to the rational design of safer AAV vectors with reduced immunostimulatory properties.

For Objective 2, model AAV vectors with differing immunostimulatory characteristics were administered to both wild-type mice and humanized liver chimeric mice to evaluate their relationship with hepatotoxicity. The results demonstrated that vectors inducing stronger immune responses in vitro were associated with increased hepatotoxicity markers in vivo, supporting the utility of the in vitro evaluation platform as a predictive nonclinical tool.

For Objective 3, omics analyses were performed on liver tissues and cultured cells to comprehensively characterize molecular events associated with AAV-induced hepatotoxicity. Candidate genes exhibiting altered expression following AAV administration were identified, providing a foundation for both mechanistic understanding of toxicity and the identification of novel predictive biomarkers.

For Objective 4, findings from experimental studies and investigative analyses were integrated to develop guidance on the nonclinical safety evaluation of AAV vectors. Regulatory review reports for approved AAV gene therapy products in Japan, Europe, and the United States were analyzed to assess currently applied safety evaluation approaches. In parallel, discussions involving academia, industry, PMDA, and the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association contributed to consensus building. These efforts culminated in a symposium and a six-article review series addressing key issues including species selection, toxicity study design, immune response assessment, genomic integration, germline transmission risk, carcinogenicity, and impurity evaluation.

Collectively, these activities are expected to facilitate greater consensus among developers and regulators regarding practical safety evaluation strategies for AAV vector products, thereby contributing to more efficient product development and regulatory review.