作成／更新日:令和 8 年 5 月 27 日
課題管理番号:25bm1223013h0003

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： （日本語）SOD1 変異 ALS に対する遺伝子編集治療法の開発
（英　語）Development of Gene Editing Therapy for mutant SOD1 ALS

研究開発実施期間：令和　5 年 6 月 19 日～令和　8 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：（日本語）井上　治久
（英　語）Haruhisa Inoue

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
（日本語）京都大学 iPS 細胞研究所　教授
（英　語）Center for iPS Cell Research and Application Kyoto University　Professor

II 研究開発の概要

（日本語）

１．研究開発の概要

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、上位・下位運動ニューロンが進行性に障害される難治性神経変性疾患であり、依然として根治療法が存在しない。家族性 ALS の代表的原因遺伝子である SOD1 変異に対しては、アンチセンス核酸医薬などの開発が進展しているものの、十分な臨床効果には至っておらず、変異遺伝子そのものを修復する根本治療の開発が求められている。

本研究では、SOD1 変異を有する家族性 ALS を対象として、CRISPR-Cas9 による遺伝子編集技術である Prime editing および base editing を用いて、ALS に対する遺伝子治療の非臨床 POC（Proof of Concept）取得を目的とした。特に、日本国内で患者集積のある SOD1 G93S 変異および L126S 変異に加え、既存の動物モデルが確立されている G93A 変異を対象とし、疾患特異的 iPS 細胞、ALS モデルマウス、ALS モデルブタを用いて、有効性および送達法の評価を行った。

研究期間中には、①遺伝子編集コンストラクトの最適化、②AAV9 等を用いた送達系の構築、③新規 ALS モデルマウスの作製、④ALS モデル動物における有効性評価、⑤薬事開発に向けた PMDA 相談および企業連携の検討を推進した。

２．研究開発成果

（1）変異 SOD1 遺伝子編集コンストラクトの最適化

SOD1 遺伝子の配列特異性に基づき、SOD1 G93A 変異および G93S 変異に対して Prime editing を用いた遺伝子編集を実施し、SOD1 L126S 変異に対して Base editing を用いた遺伝子編集を実施した。

SOD1 G93A 変異に対する Prime editing のコンストラクトについては、既存データベースを基盤として編集効率の向上を図った。G93A 変異を有する iPS 細胞を作製し、この細胞を用いた評価系において、変異修復効率の最適化を進めた。また、日本国内で患者集積のある G93S 変異および L126S 変異については、それぞれ疾患特異的 iPS 細胞を用いてスクリーニングを実施し、編集条件を検討した。その結果、各変異に対して編集可能な候補コンストラクトを選定し、以降の in vivo 評価に展開可能な基盤を構築した（論文投稿中）。

（2）遺伝子治療デリバリー技術の構築

中枢神経系への効率的送達を目的として、AAV9 ベクターおよび NanoMEDIC システムを用いた遺伝子導入法を検討した。

脊髄軟膜下投与法を用いてマウスへのベクター投与を行った。GFP 搭載 AAV ベクター、GFP 搭載 NanoMEDIC を脊髄軟膜下に投与した。GFP を搭載した AAV ベクターの脊髄軟膜下投与により、脊髄全域への広範なベクター拡散が可能であることを確認した。また、髄腔内投与や静脈投与に比較して、少ない投与量で高い導入効率が得られる可能性が示された。本送達法は、中枢神経疾患に対する遺伝子治療において有望な技術基盤となると考えられた。

（3）ALS モデルマウスの作製

これまで、ALS モデルマウスとして SOD1 G93A 変異を有するマウスが、ALS の表現型を呈するモデルとして多くの研究が実施されてきた。しかし、日本には G93A 変異の症例は乏しく、本研究では日本に症例集積がある G93S 変異および L126S 変異の遺伝子治療薬を開発するために、それらのトランスジェニックマウスを作製した。Rosa 領域へ、それぞれ G93S もしくは L126S 変異を有する SOD1 遺伝子のノックインを行ったマウスを作製し、PCR およびシーケンス解析による遺伝子導入を確認した。さらに、ddPCR および FISH による解析を実施し、1 コピーの変異 SOD1 遺伝子導入を確認した。さらに、運動機能評価、病理組織解析、misfolded SOD1 タンパク量解析などを行い、作製したモデルマウスの解析を実施した。

（4）ALS モデルマウスおよびブタを用いた有効性評価

作製した SOD1 G93S 変異を有するモデルマウス、SOD1 L126S 変異を有するモデルマウスに対して、それぞれ G93S 変異に対する Prime editing もしくは L126S 変異に対する Base editing のためのコンストラクトを搭載した AAV ベクターを、脊髄軟膜下投与法を用いて投与した。遺伝子編集効率を NGS および ddPCR によって評価した。さらに、既存の SOD1 G93A トランスジェニックマウスに対して、G93A 変異に対する Prime editing コンストラクトを搭載した AAV ベクターを投与し、遺伝子編集効率を解析した。

さらに、SOD1 G93A ALS モデルブタを用いて、よりヒト病態に近い大型動物での有効性評価系を構築した。

モデルブタに対して脊髄軟膜下投与法により AAV ベクターを投与した。脊髄各セグメントにおける編集効率解析や安全性評価を実施し、大型動物における送達可能性を評価した。大型動物モデルでの検討は、今後の臨床応用を見据えた重要な成果である。

（5）薬事開発および臨床応用への準備

研究期間中に、企業との連携について検討を進めるとともに、PMDA 事前面談を実施し、今後の開発に向けた非臨床データパッケージやベクター開発に関する相談を行った。

また、将来的な医師主導治験を見据えた患者リクルート体制の整備を継続した。非臨床 POC 取得後の CDMO との連携や製造工程検討についても方向性を整理し、臨床開発への移行を視野に入れた研究基盤を構築した。

３．研究開発成果の意義およびインパクト

本研究は、ALS に対する遺伝子編集治療という新規モダリティを用いて、変異遺伝子そのものを修復する根本治療を目指した点に大きな意義がある。従来のアンチセンス核酸医薬では、変異 SOD1 のみならず正常 SOD1 の発

現低下も懸念されていたが、本研究では正常遺伝子機能を維持しながら変異を修復することを目標とした。これは、SOD1 機能欠損が病態に関与する可能性を踏まえた合理的戦略であり、次世代 ALS 治療として高い将来性を有する。さらに、本研究では日本国内で患者集積のある G93S 変異および L126S 変異を対象とした点で、日本発の難病研究として重要性が高い。また、患者由来 iPS 細胞、マウスモデル、大型動物モデルを一貫して活用した研究体制を構築したことで、基礎研究から臨床応用への橋渡し研究として高い完成度を有している。
加えて、脊髄軟膜下送達法など、新規送達技術の検討は、ALS のみならず他の中枢神経疾患への展開可能性も期待される。

４．今後の課題と展望

遺伝子編集治療の臨床応用には、編集効率のさらなる向上、オフターゲット評価、安全性検証、長期有効性評価など、依然として解決すべき課題が残されている。特に、中枢神経系に対する高効率かつ安全な送達法の確立は重要である。今後は、本研究で得られた非臨床 POC を基盤として、さらなる展開を目指す予定である。

本研究成果は、ALS に対する根本的遺伝子治療の実現に向けた重要な一歩であり、将来的には神経難病治療への大きな社会的貢献が期待される。

（英語）

1. Overview of the Research and Development Project

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by degeneration of upper and lower motor neurons, for which no curative treatment has yet been established. Although therapeutic development targeting SOD1 mutations has progressed, including antisense oligonucleotide therapies, sufficient clinical efficacy has not yet been achieved. Therefore, development of a therapy capable of correcting the causative mutation itself is strongly needed.

In this study, we aimed to obtain non-clinical proof of concept (POC) for gene therapy targeting familial ALS caused by SOD1 mutations using CRISPR-Cas9-based gene editing technologies, including prime editing and base editing. We focused on the SOD1 G93S and L126S mutations, which are relatively enriched in Japanese patients, as well as the G93A mutation, for which established animal models are available. Disease-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs), ALS model mice, and ALS model pigs were utilized to evaluate therapeutic efficacy and delivery methods.

The project included optimization of gene editing constructs, establishment of delivery systems using AAV9 and related technologies, generation of novel ALS model mice, efficacy evaluation in ALS model animals, and regulatory consultation with the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA).

2. Research and Development Outcomes

Prime editing was applied to the SOD1 G93A and G93S mutations, while base editing was applied to the SOD1 L126S mutation. Disease-specific iPSCs harboring each mutation were generated and utilized to optimize mutation correction efficiency. Candidate constructs capable of editing each mutation were successfully identified, establishing a platform suitable for subsequent in vivo evaluation (manuscript under submission).

To achieve efficient delivery to the central nervous system, gene delivery methods using AAV9 vectors and the NanoMEDIC system were investigated. Spinal subpial injection enabled widespread vector distribution throughout the spinal cord and demonstrated the potential for efficient gene delivery with lower vector doses compared with conventional administration methods.

In addition, novel transgenic mouse models carrying the SOD1 G93S or L126S mutation were generated. Successful gene insertion was confirmed by PCR, sequencing, ddPCR, and FISH analyses. AAV vectors

carrying gene editing constructs were administered to ALS model mice and pigs using spinal subpial injection, and editing efficiency and safety were evaluated by next-generation sequencing (NGS), ddPCR, and pathological analyses. These studies established a translational platform for future clinical application.

Furthermore, discussions regarding collaboration with industry partners and preliminary consultations with the PMDA were conducted to support future clinical development and investigator-initiated clinical trials.

3. Significance and Future Perspectives

This study is significant because it aimed to establish a fundamental therapy for ALS by directly correcting disease-causing mutations using gene editing technologies. Unlike conventional antisense oligonucleotide therapies, which may reduce both mutant and normal SOD1 expression, this approach aims to preserve normal gene function while correcting pathogenic mutations. In addition, this study specifically targeted the G93S and L126S mutations enriched in Japanese patients and established a translational research platform integrating patient-derived iPSCs, mouse models, and large-animal models. Although several challenges remain, including improvement of editing efficiency, off-target evaluation, and long-term safety assessment, the outcomes of this project represent an important step toward the realization of curative gene therapy for ALS and may contribute broadly to future treatments for neurodegenerative diseases.