

AAVベクター製品の 非臨床安全性評価に関する留意点

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構
再生医療製品等審査部 審査専門員
直田 みさき

COI開示

発表者名： 直田 みさき

演題発表内容に関連し、発表者らに開示すべき
COI関係にある企業などはありません。

本発表は個人的見解に基づくものであり
PMDAの公式見解を示すものではありません。

本日の内容

1. 遺伝子治療用製品とは？

- 遺伝子治療用製品の規制
- AAV（アデノ随伴ウイルス）の特徴

2. 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価

- 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価に関する指針
- 指針に基づく非臨床安全性評価の各論
- 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験の考え方

3. まとめ

本日の内容

1. 遺伝子治療用製品とは？

- 遺伝子治療用製品の規制
- AAV（アデノ随伴ウイルス）の特徴

2. 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価

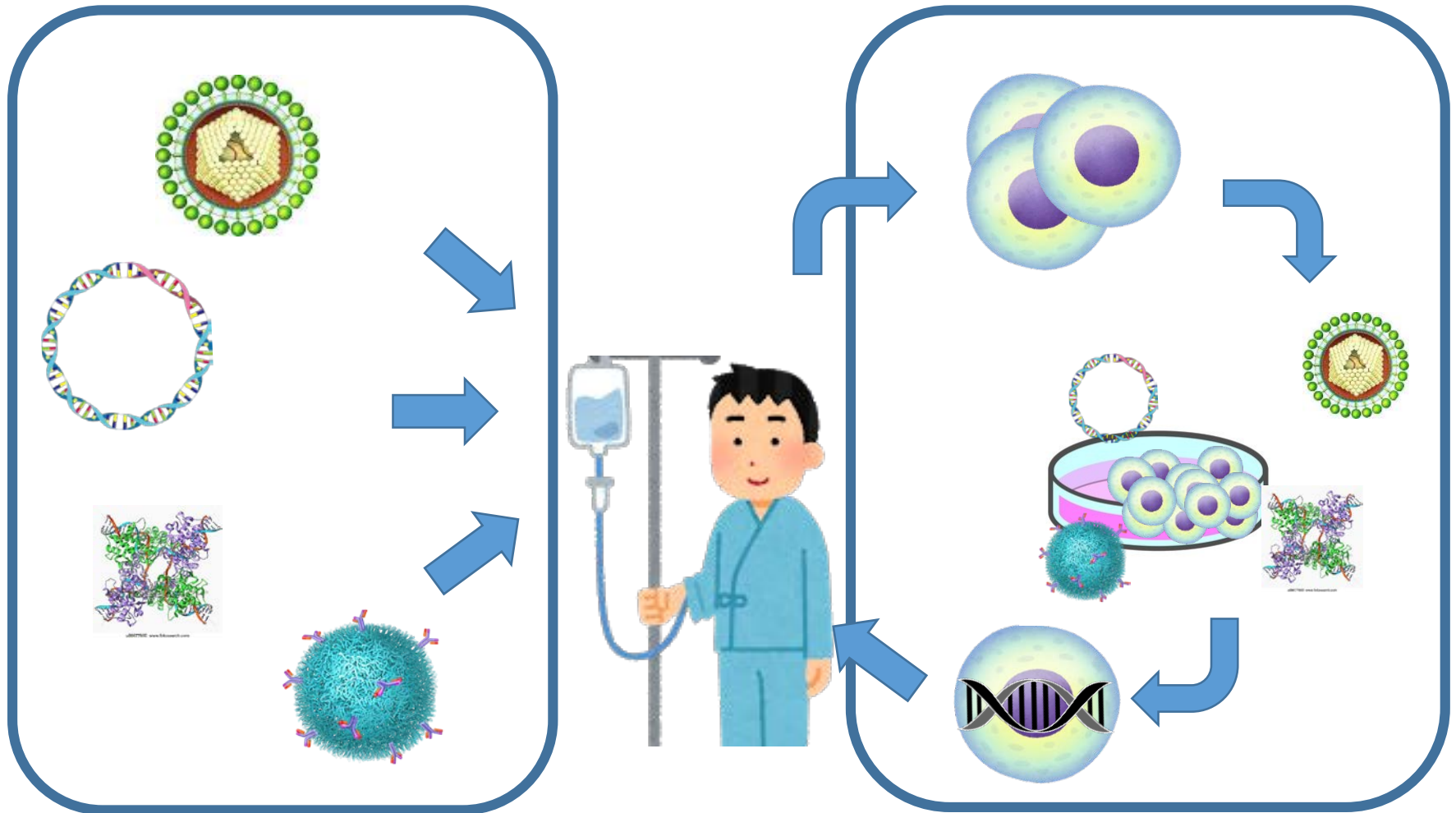
- 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価に関する指針
- 指針に基づく非臨床安全性評価の各論
- 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験の考え方

3. まとめ

遺伝子治療とは

疾病の治療を目的として
遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を
人の体内に投与すること

In vivo and *Ex vivo* 遺伝子治療



In vivo :
ベクターを直接投与

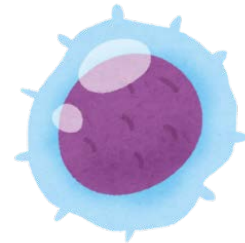
Ex vivo: 細胞を取り
出して遺伝子導入

遺伝子治療用製品等とは？

細胞加工製品

人の細胞に導入され
体内で発現する遺伝
子を含むもの

- 自己由来
- 同種由来
- 体性幹細胞由来
- iPS（様）細胞由来
- ES細胞由来



In vivo

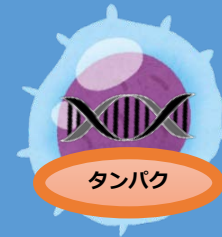
- プラスミドベクター
- ウイルスベクター

増殖型
非増殖型

- mRNAベクター



Ex vivo



遺伝子導入細胞からなる
ヒト細胞加工製品

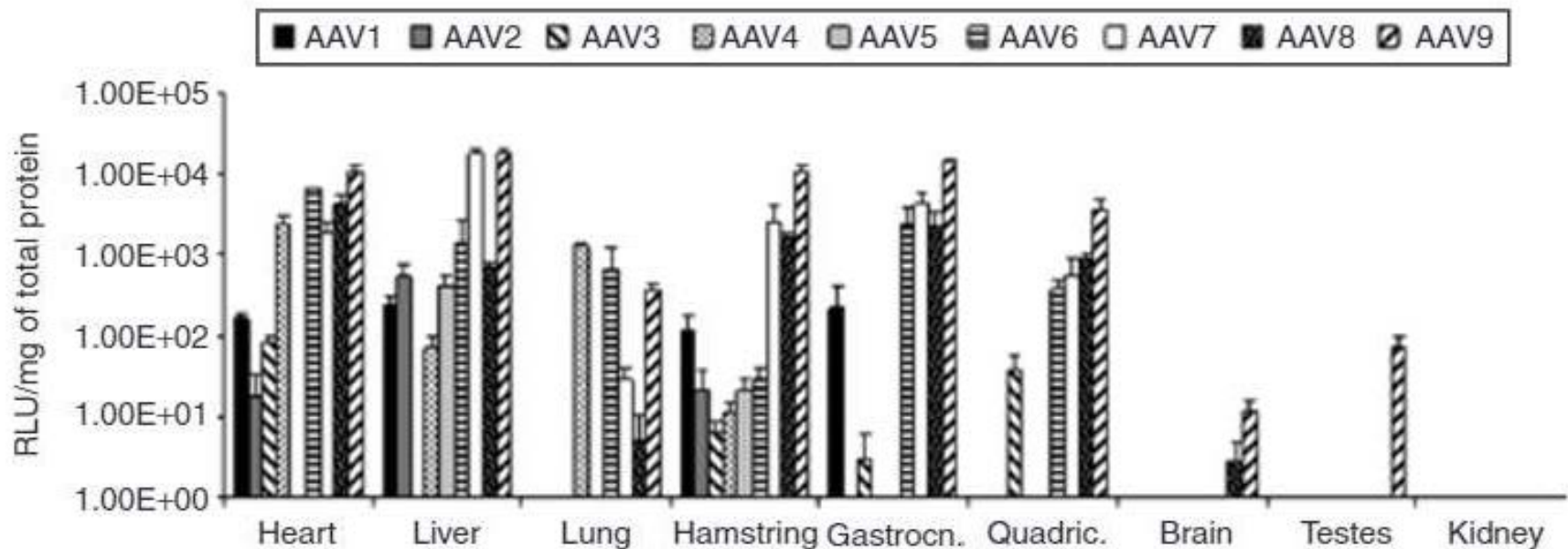
遺伝子治療用製品の ウイルスベクターの特徴

	染色体 への 組込み	遺伝子導入 分裂細胞 非分裂細胞		遺伝子 発現期間	野生型 ウイルス の病原性	主な 投与法	その他
AAV アデノ 随伴	低い	○	○	長期	なし	In vivo	ゲノムサイズの制限 <4.7kb
アデノ	低い	○	○	短期	あり	In vivo	免疫原性
レトロ	○	○	×	長期	あり	Ex vivo	挿入変異
レンチ	○	○	○	長期	あり	Ex vivo	挿入変異
センダイ	×	○	○	短期	なし	In vivo	免疫原性

アデノ随伴ウイルス（AAV）の特徴

- AAVの主な血清型では、小児期の感染により成人の約半数が中和抗体を保有
- ヘルパーウイルスの非存在下では複製できない
- 野生型AAVの病原性はない
- 免疫原性が低い
- カプシド表面タンパク質により指向性が決定

血清型と組織指向性



Analysis of AAV serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection (Molecular Therapy, 2008)

本日の内容

1. 遺伝子治療用製品とは？

- 遺伝子治療用製品の規制
- AAV（アデノ随伴ウイルス）の特徴

2. 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価

- 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価に関する指針
- 指針に基づく非臨床安全性評価の各論
- 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験の考え方

3. まとめ

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価に関する指針

薬生機審発0709第2号
令和元年7月9日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について

遺伝子治療の目的に使用される医薬品（治験薬を含む。以下「遺伝子治療用医薬品」という。）については、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保について」（平成25年7月1日付け薬食審査発0701第4号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知。以下「旧課長通知」という。）において、品質及び安全性確保のために必要な基本的要件として「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」（以下「旧指針」という。）を定めているところです。

適用範囲

遺伝子治療用
製品
(*in vivo*)

遺伝子導入細胞
からなる
細胞加工製品
(*ex vivo*)

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

ベクターの特性

- ✓ プロモーターや目的遺伝子の機能的特性
- ✓ ウイルスベクターの由来・性質
 - 物理化学的安定性、病原性、細胞傷害性
 - 種特異性や組織特異性を変更するような改変の有無
 - 遺伝子導入の効率
 - 目的遺伝子の発現効率
 - ウイルスベクターの細胞での存在状態
 - 染色体への挿入部位の特異性
 - ウイルスベクターの増殖性

◆ 遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について
(令和元年7月9日)

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

動物種選択の留意点

例えば、

- ベクター

- ✓ ヒトと同じ感染性、増殖性、細胞・組織指向性を示すか

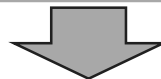


- 発現産物

- ✓ ヒトでのリスクが明らかか
- ✓ ヒトと同じ薬理作用を示すか
- ✓ 標的細胞で発現するか

- 解剖学的特徴

- ✓ 臨床での投与方法が適用できるか



以上が考慮されれば、動物種1種で良い場合もある

一般毒性試験デザイン1

動物種 : 薬理反応を示す動物種

最高用量 :

原則として、最大耐量、投与可能な最大量
又は意図する薬理作用が最大となる量

臨床投与量との比較から説明する場合

- ・ 遺伝子導入/発現効率の種差
- ・ 薬理活性の種差

一般毒性試験デザイン2

試験期間： 最大で6カ月

- ベクターの発現期間
目的遺伝子由来の核酸・
タンパク質の発現の経時的な変化
- 臨床での適応症



◆ ICH S6 GL「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（平成24年3月23日）

一般毒性試験デザイン3

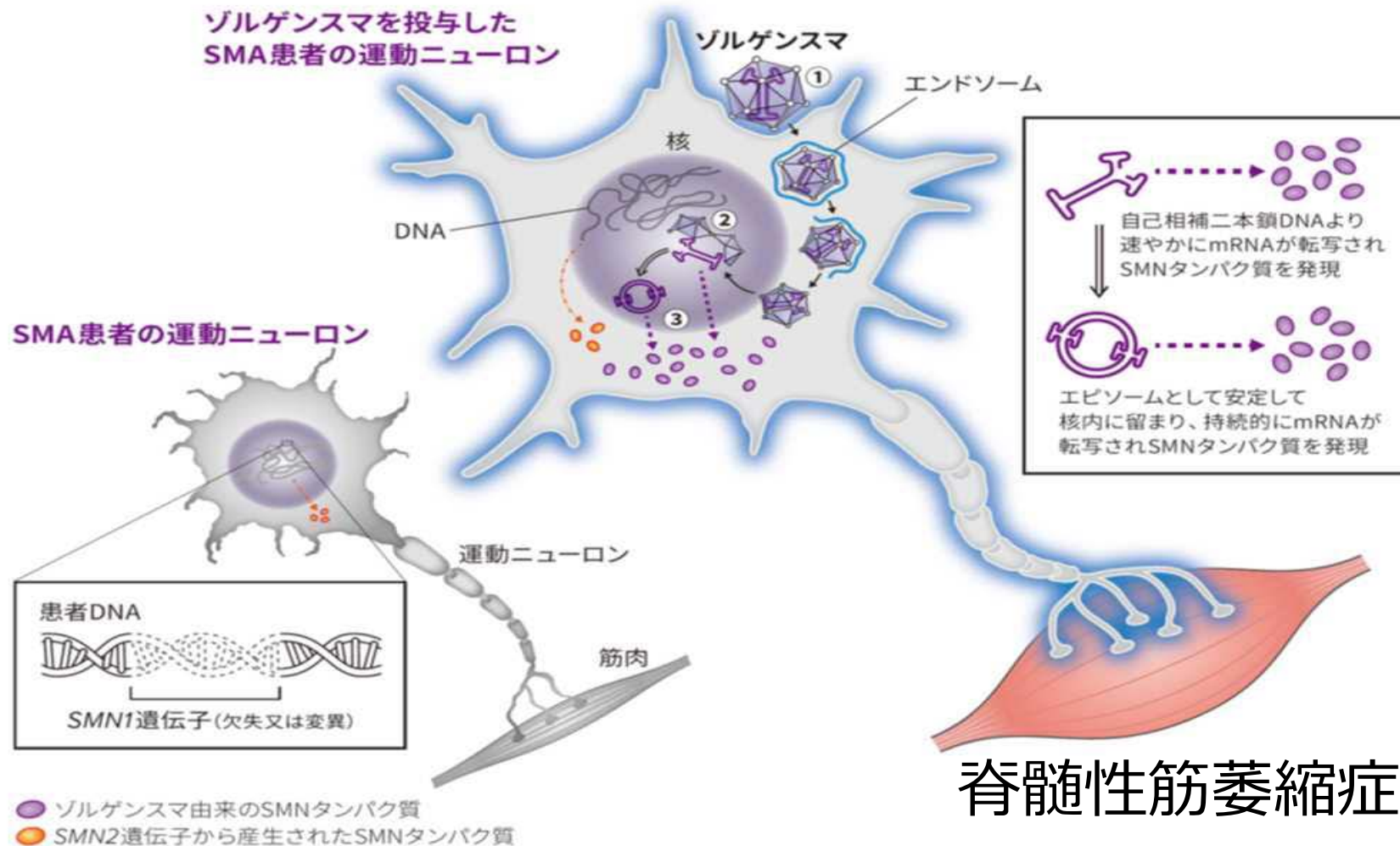
- 一般状態
- 体重、摂餌量
- 血液・血液生化学検査、尿検査、眼科学的検査など
- 剖検、器官重量、病理組織学的検査

ただし

試験デザインは製品の特性、既存の情報を踏まえ
ケースバイケースに検討

◆ 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について
(平成11年4月5日)

ゾルゲンスマ点滴静注 (AAV9)



◆ ノバルティス社作成ゾルゲンスマ点滴静注適正使用ガイド
(2020年3月作成)

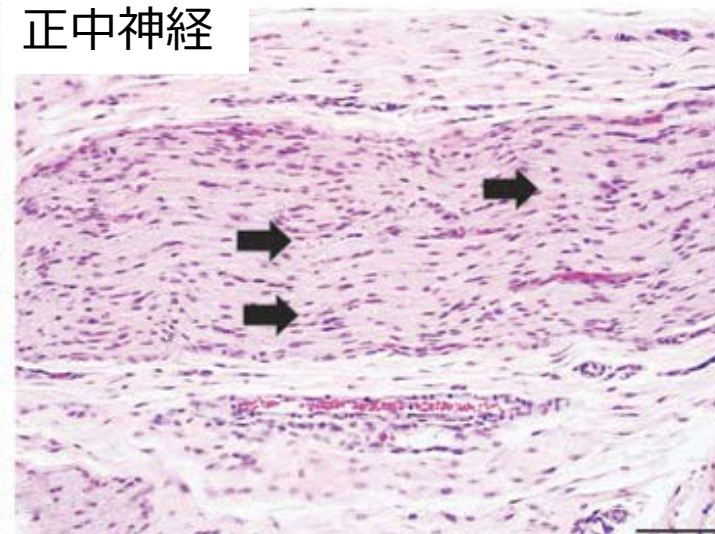
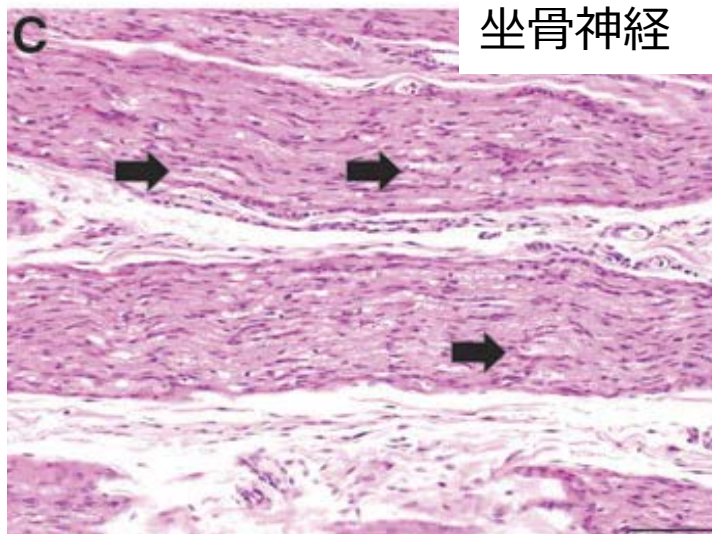
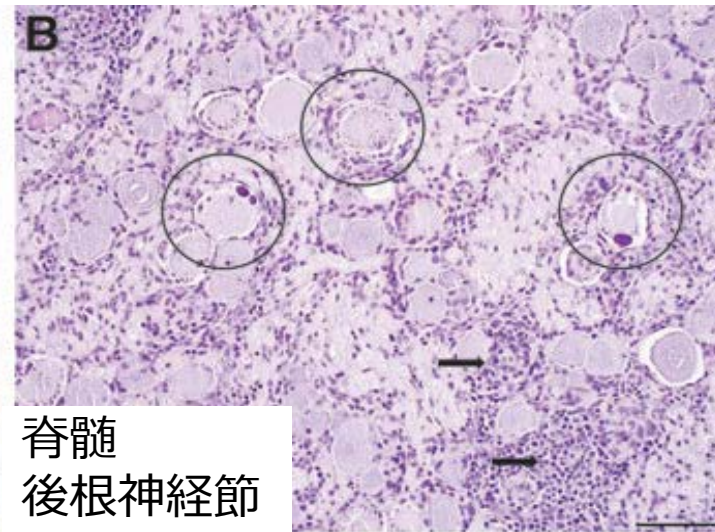
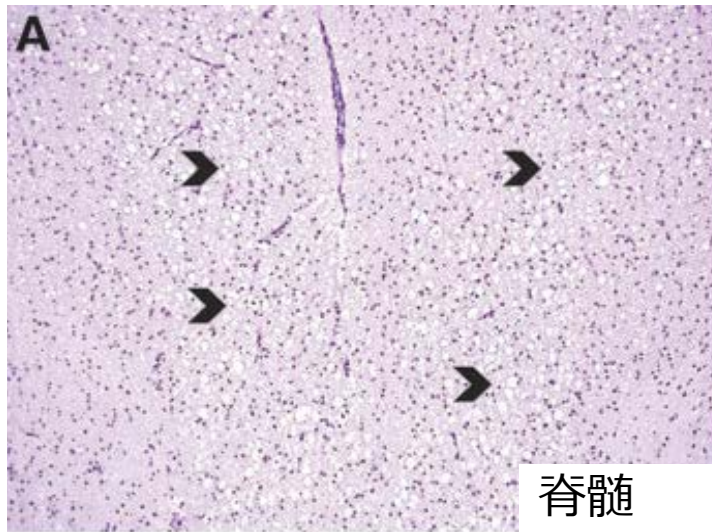
ゾルゲンスマ点滴静注 審査報告書

表 12 単回投与毒性試験

試験系	投与経路	観察期間	用量	主な所見
雌雄 新生仔 マウス*1 (FVB/NJ)	静脈内	3、6、 12 週間	0 (0.9%生理食塩液) 7.9×10^{13} vg/kg 2.37×10^{14} vg/kg 3.91×10^{14} vg/kg	3.91×10^{14} vg/kg 投与群：心臓における血栓を伴う死亡。自発運動低下、腹部膨満、脱水、努力呼吸、眼球の暗色化、白血球数増加、赤血球及びヘモグロビン減少、網状赤血球増加、総タンパク質、アルブミン及びグロブリンの減少、心臓及び肝臓における変性、並びに心臓における血栓。 本試験の無毒性量： 2.37×10^{14} vg/kg
雌雄 新生仔 マウス*2 (FVB/NCrl)	静脈内	3、6、 12 週間	0 (媒体*3) 1.5×10^{14} vg/kg 2.4×10^{14} vg/kg 3.0×10^{14} vg/kg	1.5×10^{14} vg/kg 以上の投与群：心筋の炎症、心筋線維化、浮腫、肝細胞肥大。 2.4×10^{14} vg/kg 以上の投与群：心房における血栓を伴う死亡。心房における血栓、線維増殖、心筋変性/壊死及び心房拡張、肺における血管周囲炎及び慢性炎症、肝臓における類洞マクロファージの増加、肝細胞壊死及び肝細胞核周囲の空胞化。 3.0×10^{14} vg/kg 投与群：不規則又は努力性呼吸、自発運動低下、円背位姿勢、眼球の突出及び暗色化、心臓の拡大及び形態異常。 本試験の最大耐量： 1.5×10^{14} vg/kg
カニクイザル	髄腔内	2 週間	3.0×10^{13} vg/animal	脊髄（頸髄、胸髄、腰髄又は仙髄）の後根神経節における炎症性単核細胞浸潤、神経細胞壊死、鉍質化を伴う神経細胞の消失。

Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN

(HUMAN GENE THERAPY, 2018)



AAVの神経毒性

- CNS delivery of AAV in non-human primates is associated with neurodegeneration in the dorsal root ganglia (DRG), which may be a result of cellular stress due to high DRG transduction.

MicroRNA-mediated inhibition of transgene expression reduces dorsal root ganglion toxicity by AAV vectors in primates.
(Sci Transl Med, 2020)

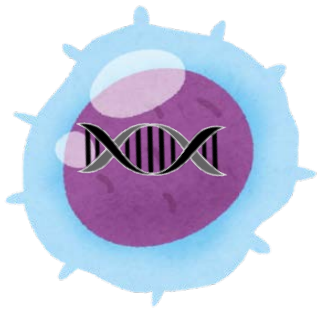
- 投与経路によって発現状況が異なる
- 臨床的意義は不明

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ **遺伝子組込み評価**
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

染色体への遺伝子組込み評価

- 挿入変異による細胞のがん化
- ベクターDNA の生殖細胞への組込みによる次世代への移行



- 細胞あたりのウイルスコピー数
- 挿入部位に関する情報
- ベクターの生殖器への分布(in vivo)
- ベクターの特性、投与経路 など

染色体に遺伝子が組み込まれる可能性

ベクターの特性

- ✓核に移行して組み込み能を持つ（レトロ、レンチ）
- ✓核へ移行するが組み込み機構を持たない（**AAV**、アデノ、プラスミド）
- ✓細胞質へ留まる（センダイ、mRNA）

標的細胞の分化の程度

未分化な細胞
（造血幹細胞）

分化した細胞
（T細胞、筋肉細胞）

投与経路/投与量

静脈内
/高用量

局所投与
/低用量

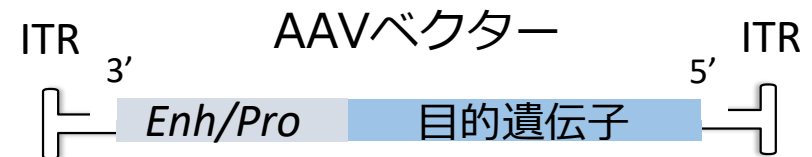
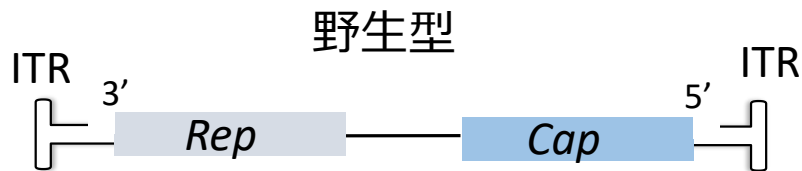
高
リスク

低
リスク

- ◆ 遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について（令和元年7月9日）
- ◆ ICH 見解「生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」について（平成27年6月23日）

AAVベクターの 細胞内での存在状態と特徴

- AAVゲノムは核に移行後、染色体外に長期的に安定して存在
- 宿主の19番染色体への組込みに関与する*rep*遺伝子を欠く



生殖細胞の染色体への 遺伝子組込みリスク

- AAVベクターをヒト以外の霊長類に筋肉内又は静脈内に投与したときの組込み頻度は $10^{-4} \sim 10^{-5}$

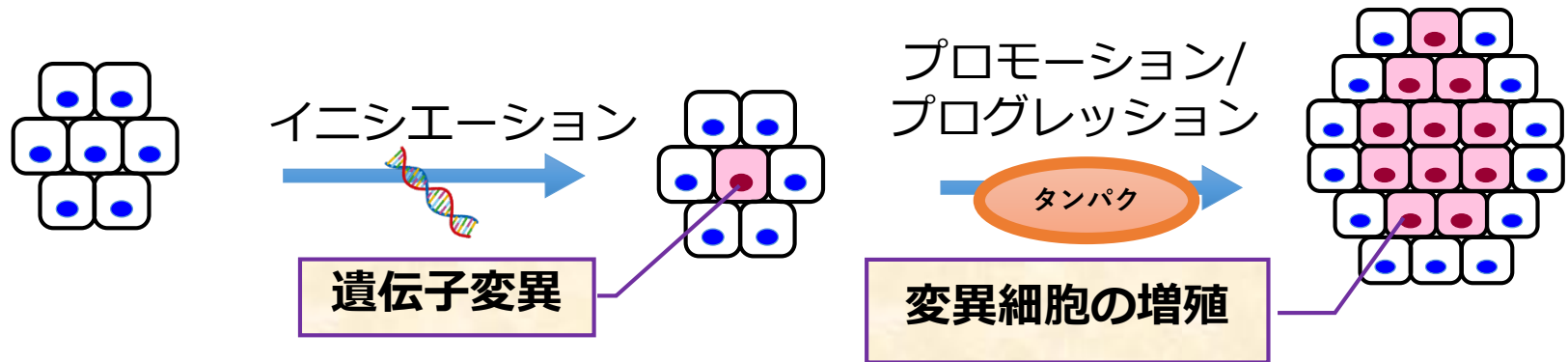
Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver
(Mol Ther, 2012)

- 生殖器へのベクターの分布が認められた場合は、組込み頻度と分布したベクター量から、生殖細胞への染色体への組込みリスクの評価が必要

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

腫瘍形成及びがん化の可能性 (がん原性) の評価



遺伝子組込み

- ✓がん遺伝子の活性化
- ✓がん抑制遺伝子の破壊

発現産物

- ✓プロモーター活性
- ✓細胞増殖作用
- ✓免疫抑制作用

腫瘍形成及びがん化の可能性 (がん原性) まとめ

遺伝子組込みによるリスク

発現産物によるリスク



標準的ながん原性試験は適切ではない



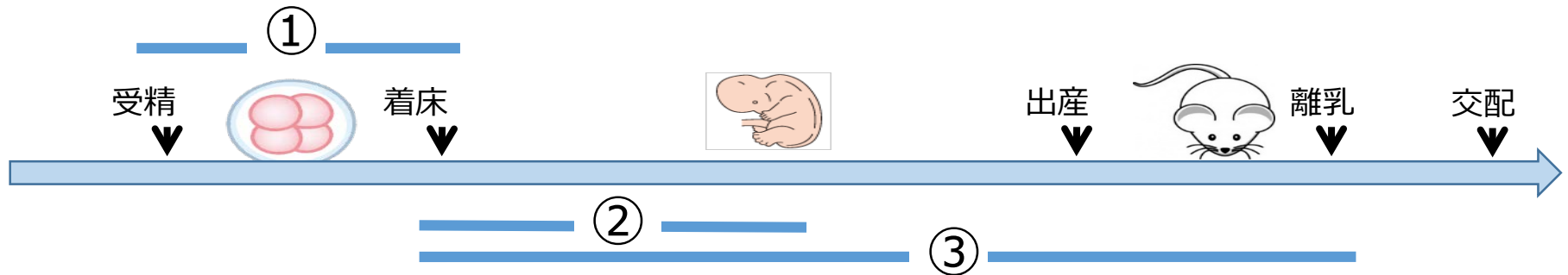
- 既存情報に基づく考察
(ベクターの特性、発現産物の生物学的特性)
- 組込みリスク評価結果、毒性試験成績

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ **生殖発生毒性評価**
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

生殖発生毒性試験

①受胎能および着床までの初期胚発生 一般毒性試験での生殖器官の評価



②胚・胎児発生

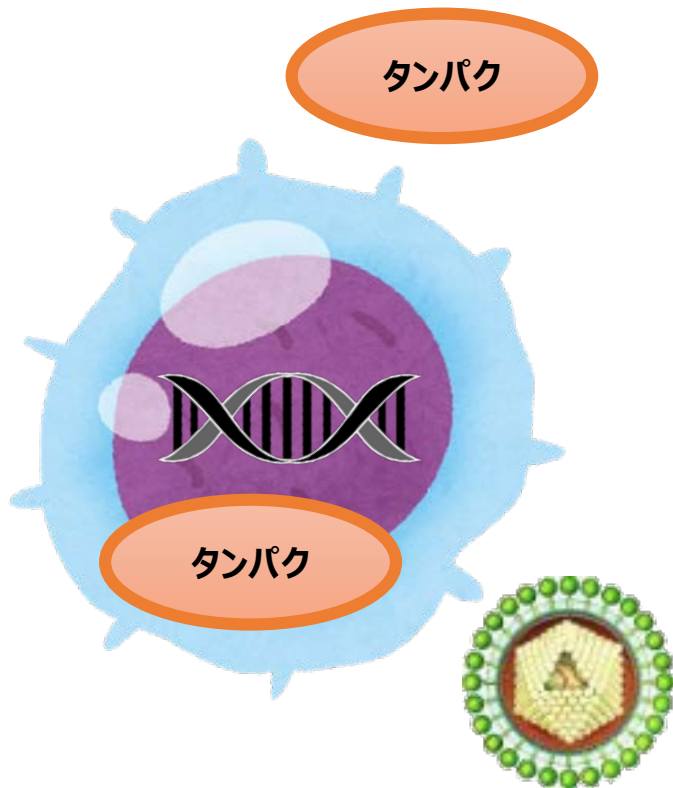
③出生前および出生後の発生並びに母体の機能

➡ 胎盤通過性、組織・細胞指向性、発現タンパクの作用などから試験の要否を検討

遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

免疫毒性の評価

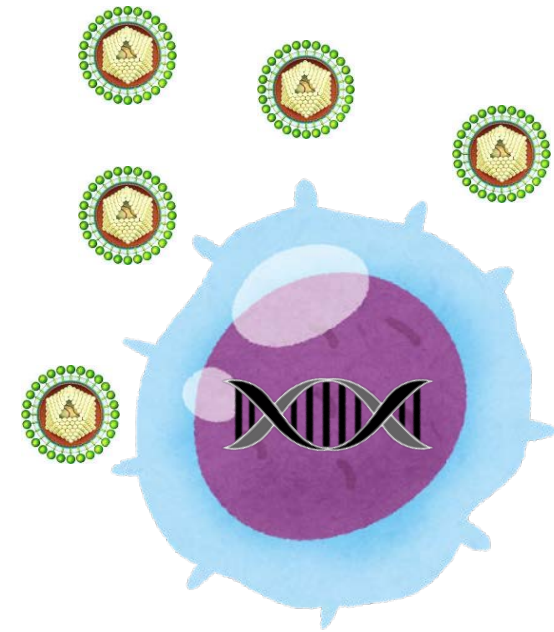


ベクターや発現産物による免疫系への悪影響を評価

動物では**特異的な免疫反応**が発現する可能性があることから、試験成績の解釈に留意する

増殖性ウイルスが出現する可能性

- AAVベクターは複製に必須である*rep*及び*cap*遺伝子を欠損している
- ウイルスベクターの製造段階や遺伝子導入細胞における増殖性ウイルス否定試験



抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験の考え方

あなたが

余命幾ばくも無い



重篤かつ致死性の悪性腫瘍（進行がん）
を有する患者

として、以下の有望な薬をあきらめますか？

- 長期間の安全性が不明
- 他のがんになるリスク不明
- 子供への影響が不明

ICH S9 GL

抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインに
ついて（平成22年6月24日付け）

進行がんを対象に遺伝子治療用製品を開発する場合

通常の疾患

- 一般毒性評価
- 遺伝子組込み評価（生殖細胞への遺伝子組込みリスクの評価）
- 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価（がん原性/造腫瘍性評価）
- 生殖発生毒性試験
- 免疫毒性評価
- 増殖性ウイルス出現の可能性



進行がん

最大90日間
でよい

がん原性評価は
省略可能

胚・胎児試験
のみ

ICH S9 GL

本日の内容

1. 遺伝子治療用製品等とは？

- 遺伝子治療用製品の規制
- AAV（アデノ随伴ウイルス）の特徴

2. 遺伝子治療用製品の非臨床安全性評価

- 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価に関する指針
- 指針に基づく非臨床安全性評価の各論
- 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験の考え方

3. まとめ

遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 指針に従った試験は必要であるが、指針の例示を「必ず守る！」ではない
- 科学的に適正な評価であればOK

- ✓ 一般毒性評価（生命維持に関わる重要な器官・組織への影響の評価を含む）
- ✓ 遺伝子組込み評価
- ✓ 腫瘍形成及びがん化の可能性の評価
- ✓ 生殖発生毒性評価
- ✓ 免疫毒性評価
- ✓ 非増殖性ベクターにおける増殖性ウイルスの出現の可能性の評価

AAVベクター製品の 非臨床安全性評価

- AAVベクター製品の非臨床試験で認められる毒性所見のヒトへの外挿性や臨床的意義については不明であることも多く、データの蓄積や毒性の発現機序の解明が求められる。
- 臨床試験成績、開発と並行して新たに得られた非臨床試験成績、文献情報など、広く情報を収集した上で、長期の安全性を慎重に評価する必要がある。

おわりに

遺伝子治療用製品等は、
ケースバイケースでの評価が必須



RS総合相談・RS戦略相談

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品の実用化を日本から

RS戦略相談など
を有効にご活用ください