



既承認 AAV ベクター製品の 非臨床安全性評価

太田 哲也^{*1, *2}, 三井田 宏明^{*1, *3}, 木下 潔^{*1, *4}, 奈良岡 準^{*1, *5}, 綾 高宏^{*1, *6},
殿村 優^{*1, *7}, 本山 径子^{*1, *8}, 藤原 由佳理^{*1, *9}, 和泉 智子^{*1, *10}

Non-clinical Safety Evaluation of Approved AAV Vector Products

Tetsuya OHTA^{*1, *2}, Hiroaki MIIDA^{*1, *3}, Kiyoshi KINOSHITA^{*1, *4},
Hitoshi NARAOKA^{*1, *5}, Takahiro AYA^{*1, *6}, Yutaka TONOMURA^{*1, *7},
Keiko MOTOYAMA^{*1, *8}, Yukari FUJIWARA^{*1, *9} and Tomoko IZUMI^{*1, *10}

1. はじめに

In vivo 遺伝子治療は、目的遺伝子を搭載した治療製品を体内に直接投与し、体内でタンパク質発現を誘導して治療効果を期待する疾患治療法である。特に開発が進んでいるのがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター製品であり、2025年3月の時点において、日米欧で Table 1 に示す 8 製品が製造販売

承認されている¹⁾。

In vivo 遺伝子治療用製品に関する ICH ガイドラインは ICH S12 「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方」²⁾のみ存在し、この他、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」³⁾が存在するものの、非臨床安全性評価に関して各当局で統一された見解は示されていない。本邦では安全

- * 1 日本製薬工業協会 東京都中央区日本橋本町 2-3-11 日本橋ライフサイエンスビルディング (〒103-0023)
Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Nihonbashi Life Science Bldg., 2-3-11 Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan
- * 2 田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 安全性研究所 神奈川県藤沢市村岡東 2-26-1 湘南ヘルスイノベーションパーク (〒251-8555)
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Shonan Health Innovation Park, 2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan
- * 3 第一三共株式会社 安全性研究所 東京都江戸川区北葛西 1-16-13 (〒134-8630)
Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan
- * 4 MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)
MSD K. K., Kitanomaru Square, 1-13-12, Kudankita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan
- * 5 アステラス製薬株式会社 つくば研究センター 茨城県つくば市御幸が丘 21 (〒305-8585)
Astellas Pharma Inc., Tsukuba Research Center, 21 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan
- * 6 MSD 株式会社 大阪府大阪市中央区平野町 2-3-7 アーバンエース北浜ビル (〒541-0046)
MSD K. K., Urban Ace Kitahama Bldg., 2-3-7, Hiranomachi, Chuo-ku, Osaka-city, Osaka 541-0046, Japan
- * 7 日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部 京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14 (〒601-8550)
Nippon Shinyaku Co., Ltd., 14, Nishinosho-Monguchi-cho, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto 601-8550, Japan
- * 8 ヤンセンファーマ株式会社 東京都千代田区西神田 3-5-2 (〒101-0065)
Janssen Pharmaceutical K. K., 3-5-2 Nishikanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0065, Japan
- * 9 ノバルティスファーマ株式会社 東京都港区虎ノ門 1-23-1 虎ノ門ヒルズ森タワー (〒105-6333)
Novartis Pharma K. K., Toranomon Hills Mori Tower, 1-23-1 Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-6333, Japan
- * 10 アッヴィ合同会社 東京都港区芝浦 3-1-21 msb Tamachi 田町ステーションタワー S (〒108-0023)
AbbVie GK, msb Tamachi Station Tower S, 3-1-21 Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-0023, Japan

Table 1 日米欧のいずれかで承認済の AAV ベクター 8 製品

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez TM
適応疾患	LPL 欠損症	両アレル性 RPE65 変異 遺伝性網膜ジストロフィー	脊髄性筋萎縮症	AADC 欠損症	血友病 B	血友病 A	DMD	血友病 B
セロタイプ	AAV1	AAV2	AAV9	AAV2	AAV5	AAV5	AAVrh74	AAVRh74var
プロモーター	CMV IEP	CMV CBA	CMV CBA	CMV IEP	Liver specific promoter (LP1)	Hybrid human liver specific promoter	Muscle-specific MHCK7 promoter	Liver specific promoter (詳細不明)
導入遺伝子	LPL	RPE65	SMN1	AADC	F9 (Padua 変異)	F8	Micro-dystrophin	F9 (Padua 変異)
投与経路	筋肉内	網膜下	静脈内	被殻内	静脈内	静脈内	静脈内	静脈内
承認年	欧州/2012 ^{*4}	米国/2017 欧州/2018 日本/2023	米国/2019 欧州/2020 日本/2020	欧州/2022 米国/2024 ^{*1}	米国/2022 欧州/2023 ^{*3}	欧州/2022 ^{*3} 米国/2023	米国/2024 ^{*2}	(カナダ/2024 ^{*4}) 米国/2024 ^{*4} 欧州/2024 ^{*3, *4}

*1: 迅速承認, *2: 一部迅速承認, *3: 条件付承認, *4: 販売終了

AAV: Adeno-associated virus, DMD: Duchenne muscular dystrophy, CMV IEP: Cytomegalovirus immediate-early promoter, CMV CBA: Cytomegalovirus enhancer/chicken- β -actin-hybrid promoter, LPL: Lipoprotein lipase, RPE65: Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein, SMN1: Survival motor neuron, AADC: Aromatic L-amino acid decarboxylase, F9: coagulation Factor IX, F8: coagulation factor VIII

性評価に関する留意点は「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について」⁴⁾ 別添「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(指針)に記されているものの、2025年3月の時点で日本の承認品目は Zolgensma[®]と Luxturna[®]の2製品に留まる。このような中、現時点における既承認品目について、開発時に実施された非臨床評価の情報を、現行の指針と照らし合わせて整理しておくことは、今後の *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発を効率的に進めるにあたり有用と考えられる。

本稿では、日本の指針や海外のガイドラインなども参考に、日米欧三極のいずれかで既承認の AAV ベクター製品に絞り、非臨床試験の実施状況について整理し、紹介する。なお、Fig. 1に示すように、日本で承認された2製品は、日本の指針発出前に一連の非臨床安全性試験が実施されていること、各製品は各極のガイドライン類の文書作成と併行して開発されている点も考慮して考察する。

2. 既承認 AAV ベクター 8 製品

既承認8製品の一覧を Table 1に示す。日米欧の

三極で最初に承認された AAV ベクター製品は、2012年に欧州で承認された Glybera[®]である⁵⁾。Glybera[®]は、lipoprotein lipase (LPL) 欠損症患者を適応とし、AAV1ベクターにユビキタスに発現を誘導する cytomegalovirus immediate-early promoter (CMV IEP) と、目的タンパク質 LPL をコードしたゲノムを搭載した製品である⁵⁾。

これ以降、「両アレル性 RPE65 変異遺伝性網膜ジストロフィー」を適応として AAV2 ベクターに cytomegalovirus enhancer/chicken- β -actin-hybrid promoter (CMV CBA) と retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein (RPE65) をコードしたゲノムを搭載した Luxturna^{®6-9)}及び「脊髄性筋萎縮症」を適応として AAV9 ベクターに CMV CBA と survival motor neuron (SMN) をコードしたゲノムを搭載した Zolgensma^{®10-13)}が、それぞれ2017年及び2019年に米国で承認された。2022年には「AAV2に CMV IEP と aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) をコードしたゲノムを搭載した Upstaza^{®14)}」, 「AAV5に liver specific promoter (LP1) と coagulation Factor IX (F9) (Padua 変異) をコードしたゲノムを搭載した Hemgenix^{®15, 16)}」及

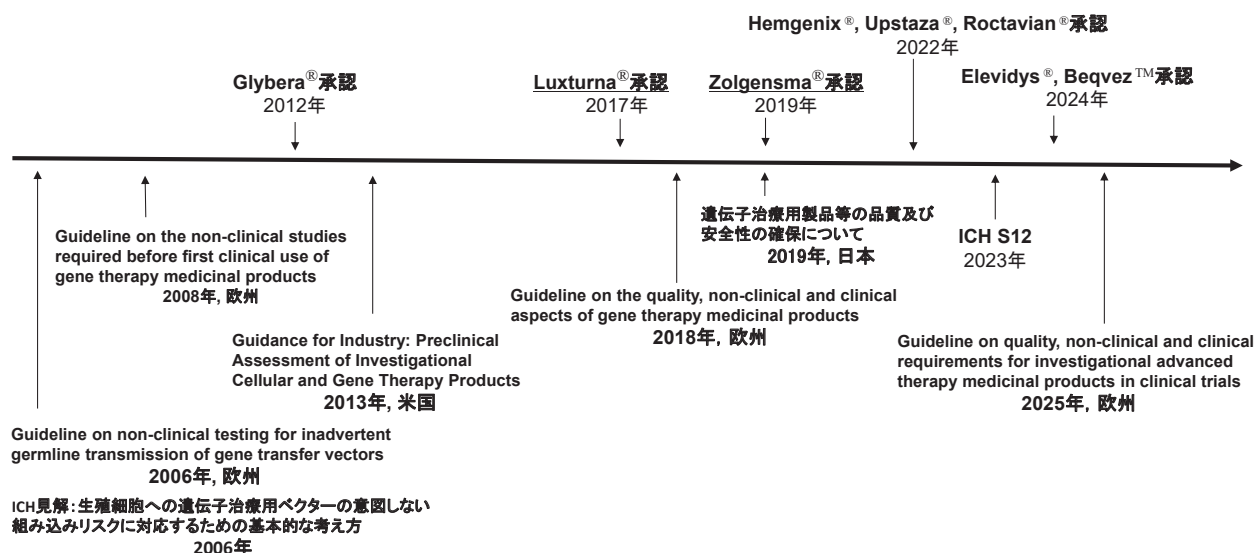


Fig. 1 各極の主要なガイドライン発出時期と各製品承認時期
 アンダーライン：日本で承認を受けている品目（2025年3月時点）
 注）各製品の承認年は日米欧三極の最初の承認年を示す

び「AAV5にhybrid human liver specific promoterとcoagulation factor VIII (F8) をコードしたゲノムを搭載したRoctavian®^{17, 18)}」が、それぞれAADC欠損症、血友病B及び血友病Aを適応として欧米で承認された。更に、2024年には「ヒト由来のAAVベクターよりも免疫原性が低いアカゲザル由来のAAVrh74ベクターにmuscle-specific MHCK7 promoterとmicrodystrophinをコードしたゲノムを搭載したElevidys®¹⁹⁾」及び「変異型のAAVRh74varベクターにliver specific promoterとF9 (Padua変異) をコードしたゲノムを搭載したBeqvez™ (US)/Durveqtix® (EU)^{20, 21)}」が、それぞれデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 及び血友病Bを適応として欧米で承認された。

2022年のUpstaza®まではユビキタスなプロモーターが用いられていたが、2022年のHemgenix®以降は組織特異的なプロモーターが主流となってきた。これらはいずれも難治性の先天性希少疾患が適応となっており、両眼に片眼ずつ投与するLuxturna®を除き、単回投与される製剤である。なお、当該8製品のうちGlybera®とBeqvez™に関しては、市場性の問題から既に発売中止となっている¹⁾。

3. AAVベクター製品の非臨床安全性評価パッケージの比較

日本の申請資料では、従来の「一般毒性」、「遺伝毒性」、「生殖発生毒性」、「がん原性」、「局所刺激性」、「その他毒性」のカテゴリで評価結果が分類・記載されているが、指針⁴⁾では必要な評価として「一般毒性」、「遺伝子組込み」、「腫瘍形成及びがん化の可能性」、「生殖発生毒性」、「免疫毒性」、「増殖性ウイルス出現の可能性」が提示されており、申請資料と指針の記載には分類に差異が見られる。これらの指針の評価項目のうち、「免疫毒性」は申請資料では一般毒性の項に、「遺伝子組込み」のうち「腫瘍形成及びがん化の可能性」は遺伝毒性の項に、「遺伝子組込み」のうち、次世代への影響評価については生殖発生毒性の項目に分類されて記載されていた。なお、「増殖性ウイルス出現の可能性」についてはAAVベクター製品では複製に必要なrep/capをコードしたゲノムが含まれておらず、品質試験として製造段階及び遺伝子導入細胞での増殖性ウイルス試験等からそのリスクがないことを確認していることから、非臨床安全性の評価項目としては記載がなかった。

既承認8製品の非臨床安全性評価パッケージをTable 2に示す。ここでは日本で承認された2製品の申請資料の構成をもとに各製品の非臨床安全性試

Table 2 AAVベクター製品の申請資料に含まれている非臨床安全性評価パッケージ

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez [™]
安全性薬理	×	×	×	△ (中枢のみ)	△ (循環のみ)	×	×	×
一般毒性 (単回)	○	○	○	○	○	○	○	○
(反復)	×	△ (非GLPのみ)	×	×	×	×	×	×
遺伝毒性 (挿入解析)	○	×	×	×	○	○	×	○
生殖発生毒性 (次世代 移行リスク 評価)	○	×	×	×	○	○	×	×
がん原性	×	×	×	×	×	×	×	×

* 局所刺激性試験に関しては原則として単独では評価していないため、表への記載は省略した。

○：評価実施，△：一部評価実施，×：評価実施の記載なし

験の内容を比較した。なお、局所刺激性試験については欧米文書には項目がなく、また日本で承認された2製品でも単独では評価していないため、Table 2への記載は省略した。

In vivo 遺伝子治療用製品では、遺伝毒性の項目にゲノムへの挿入解析、生殖発生毒性の項目に繁殖試験による次世代移行リスク評価に関する記載が含まれていたため、Table 2ではそれらの評価項目を含めて記した。

既承認AAVベクター8製品の試験実施状況を比較すると、一般毒性については全ての製品で評価されていた。一方、その他の評価項目には製品ごとに差異が認められた。そのため、次の章以降では、個々の製品の各評価項目で実施された試験やそのデザイン並びに免疫毒性の特殊検査項目などを取り上げ、各製品における非臨床安全性評価の類似点と相違点について概説する。

4. 一般毒性評価

In vivo 遺伝子治療用製品の一般毒性評価の動物種選択に関して、指針⁴⁾には、a) 発現ベクターに搭載した目的遺伝子が標的細胞で発現すること、b) 目的遺伝子由来の核酸、タンパク質等がヒトで期待される薬理学的作用を発揮すること、c) ウイルスベクターを用いる場合には、ウイルスベクターの由来

となった野生型ウイルスがヒトと同様の感染性及び組織・細胞への指向性を示すこと、d) 臨床での投与方法を適用できることの4点が一般原則として示されている。

臨床投与経路においてヒトで期待される薬理学的作用を示すと考えられる動物種を選択することが原則とされ、1種類の適切な動物種のみでの評価で十分な場合（ベクターや目的遺伝子の生物学的特性が十分に評価されている場合等）があるとされている。また、一般毒性評価の試験期間は、目的遺伝子由来の核酸、タンパク質等が薬理学的作用を発揮することから、ICH S6ガイドライン²²⁾を参照し、最長6か月で十分とされている。

これらを背景に既承認AAVベクター8製品の一般毒性試験の実施状況について動物種選択と試験期間の観点でTable 3に示し、以下その評価実態についてそれぞれの観点でまとめる。

4.1 動物種選択について

Glybera[®]、Zolgensma[®]、Roctavian[®]、Elevidys[®]ではマウスが、Upstaza[®]ではラットが一般毒性試験動物種として選定され、これら5製品ではげっ歯類のみで単回毒性試験がGLP基準で実施されていた。これらを指針に示された一般原則と照らし合わせると、Glybera[®]はLPL欠損マウスで薬理試験が実施されており、マウスでのAAV1の感

Table 3 一般毒性試験における動物種選択と試験期間

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez TM
臨床投与経路	筋肉内	網膜下	静脈内	被殻内	静脈内	静脈内	静脈内	静脈内
単回毒性 (動物種、 投与経路、 最長試験 期間)	・マウス、 im/iv*1、 180D	・イス、網膜下/硝 子体内、3M (サル、網膜下、 3M、イス(REP65- /-ブリアード)、 網膜下、5W~3M、 幼若マウス、網膜 下、3~4W、幼若イ ス、網膜下/硝子 体内、5W/3M、非 GLP)	・幼若マウス、iv、 12W (GMP2ロッ ト) ・幼若マウス、iv、 24W (感染力弱い 製剤で参考) (幼若サル、iv、6M (感染力弱い製剤 で参考)、幼若サ ル、it、18M、非 GLP)	・ラット、 被殻/黒 質内、6M	・マウス、 iv、6M ・サル、iv、 6M	・マウス、 iv、26W (サル、iv、 26W、非 GLP)	・マウス (C57BL/6J/ mdx)、iv、6M ・幼若マウス (C57BL/6J)、 iv、3M	・マウス、 iv、365D ・サル、30 min iv infusion、 92D、(+542 D*2)
反復毒性	×	(イス(REP65-/- ブリアード)、両眼 網膜下逐次投与、 最長2年、非GLP、 サル(カニクイ/ アカゲ)、両眼網膜 下逐次投与、6-7 か月、非GLP)	×	×	×	×	×	×

*1：ワーストケースシナリオとして実施、*2：被験物質投与群のみ設定し、一部の検査のみ実施
アンダーライン：GLP試験、D：day、W：week、M：month、×：評価実施の記載なし

染とタンパク質発現が確認されていた⁵⁾。Zolgensma[®]はマウスで標的組織への形質導入が可能であることが薬理モデルで示されており、その背景系統のマウスが毒性試験動物種に選定されていた¹³⁾。Roctavian[®]は薬理モデルにRag2-/-×FVIII-/-マウスが使用されており、マウスでのAAV5感染とタンパク質発現が確認されていた¹⁸⁾。Elevidys[®]は薬理モデルにmdxマウスが使用されており、マウスでのAAVrh74感染とタンパク質発現が確認されていた¹⁹⁾。Upstaza[®]では標的タンパク質であるAADCの種間相同性が高く、AAV2カプシド、トランスジーン、プロモーター、及びITRを含むrAAV2-AADCを送達すると、マウス、ラット、及び非ヒト霊長類(NHPs)でAADCタンパク質発現、酵素活性、及びドーパミン生成がもたらされるエビデンスがあることが示されていた¹⁴⁾。

残り3剤のうち、Luxturna[®]では網膜色素上皮細胞及び視細胞に対して同程度の効率で遺伝子導入が可能であり、*in vivo*薬理試験で有効性を確認した動物種としてイスを用いて単回毒性試験がGLPで実施されていたが、これに加えて臨床では各眼へ投

与間隔を6日以上空けて適用することから、非GLP下で反復投与毒性試験も実施されていた⁹⁾。また、霊長類のみが黄斑を有し、眼の解剖学的構造がイスと比べヒトにより近いこと、サルではRPE65タンパク質のヒトとの相同性が98%のイスと比較して高く、1アミノ酸の違いしかないため、遺伝子産物に対する免疫反応のリスクが低いと考えられることから、カニクイザルでも非GLPで毒性試験が実施されていた⁹⁾。残りの2製品、Hemgenix[®]及びBeqvezTMについてはマウス及びサルいずれにおいても薬理作用が確認され、それぞれ反応種として選定され、2種で単回毒性試験が実施されていた^{16, 20, 21)}。

毒性試験動物種は指針の示すように、薬理モデルでAAVの感染と標的タンパク質の発現が確認されており、臨床投与経路での投与が可能な動物種が選定されていた。

4.2 単回投与試験の試験期間について

単回投与試験の試験期間に関して、Luxturna[®]及びZolgensma[®]を除く6製品では、いずれも指針に

示された6か月(26週間)、あるいはそれ以上の試験期間でGLP試験が実施されていた。Luxturna[®]及びZolgensma[®]は、いずれも3か月(12週間)のGLP試験が実施されていた^{9, 13)}。このうち、Luxturna[®]については、両眼へ片眼ずつ適用する製剤であることから、非GLPで参考試験の位置づけであったが、イヌ及びサル両眼へ片眼ずつ、あるいは両眼投与後に片眼へ再投与する反復投与毒性試験が、6か月以上の試験期間で評価されていた⁹⁾。

Zolgensma[®]でもマウスの6か月及びサル6か月の試験が実施されていたが、いずれも感染力の弱い製剤を用いた試験であり、参考扱いの位置づけとなっていた¹³⁾。そのため、PMDAから最長の観察期間が12週間であることの適切性について問われた。そこで、心臓・肝臓の所見が12週時点で回復性があること、AAVベクターは増殖能を有さず、AAVの遺伝子のほとんどはSMNタンパク質の発現に関する遺伝子に置換されていること、SMN1遺伝子の過剰発現による毒性報告がないことなどが当局への回答として説明されていた¹²⁾。しかし、PMDAからは、SMN1遺伝子が長期間発現する可能性があるため、本来は長期間の観察期間を設定すべきとされたが、重篤な疾患を対象としていること、観察期間の延長で新たな毒性所見が認められないこと、そして現在得られている臨床試験成績も踏まえて、最終的には許容可能と判断されている¹²⁾。

単回毒性試験の試験期間については、概ね6か月あるいはそれ以上の期間で評価されており、6か月未満で評価を完了する場合は、その妥当性について十分な説明が必要になるものと考えられた。

5. 免疫毒性評価

免疫毒性評価に関して、指針ではベクター及びベクターからの発現産物が免疫系に有害な影響を与える可能性を明らかにすることが求められており、動物を用いた試験では種特異的な免疫反応が惹起される可能性があることから、試験成績の解釈においてその影響について留意する必要があるとされている⁴⁾。

既承認AAVベクター8製品において、主に実施された免疫毒性評価項目の比較をTable 4にまとめた。当該評価項目として、補体の活性化、サイトカ

インリリース、カプシド及び発現タンパク質に対する抗体及びそれらの中和抗体(NAb)、及びカプシド及び発現タンパク質に対するT細胞抗原依存性免疫応答について比較したところ、その評価には製品によって差異が認められた。また、補体の活性化についてはいずれの製品でも評価が明記されていなかった。

抗AAV抗体は最も古いGlybera[®]を除く7製品で確認され、そのうち1製品、Beqvez[™]ではNAbについても検討された^{20, 21)}。また、発現タンパク質に対する抗体もGlybera[®]とElevidys[®]を除く6製品で検討された。サイトカインについては1製品、Hemgenix[®]でのみ評価が行われた^{15, 16)}。更に、カプシド及び発現タンパク質によるT細胞の抗原依存的なIFN- γ 産生を単一細胞レベルで検出できる高感度なEnzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot)法によって、この6製品中局所投与製剤であるUpstaza[®]、及び非臨床ではT細胞の抗原依存的な免疫応答と関連しそうな肝毒性の所見がないRoctavian[®]を除く、Luxturna[®]、Zolgensma[®]、Hemgenix[®]及びBeqvez[™]の4製品で非臨床の検討がなされた^{9, 13, 16, 20, 21)}。しかしながら、これら4剤の中にも局所投与製剤であるLuxturna[®]が含まれ、他の3剤でもT細胞の抗原依存的な免疫応答と関連しそうな肝毒性などが必ずしも検出されているわけではなかった。なお、非臨床でT細胞の抗原依存的なIFN- γ 産生がELISpotで未検討の4製品についても、局所投与製剤であるUpstaza[®]を除くGlybera[®]、Roctavian[®]、Elevidys[®]の3製品では臨床試験において当該評価が実施されていた^{5, 18, 19)}。

免疫抑制剤を用いた評価についても3製品で実施されており、Hemgenix[®]とRoctavian[®]では発現タンパク質への影響を確認する目的で評価されたが、Elevidys[®]では臨床試験と同様に、NHPsでアナフィラキシーを抑制する目的で使用されていた^{16, 18, 19)}。

以上、免疫毒性評価についてはカプシド及び発現タンパク質の免疫原性の評価は概ね実施されていた。一方、カプシド及び発現タンパク質におけるT細胞の抗原依存的なIFN- γ 産生については非臨床における評価には差異が認められ、実施の要否に明確な基準はなく、開発者の自主的な判断に依存しているものと考えられた。

Table 4 免疫毒性評価

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez [™]
毒性試験 (動物種)	・マウス単回	・イヌ単回 (サル単回, イヌ・サル反 復, 非GLP)	・幼若マウス (サル単回, 非 GLP)	・ラット単回	・マウス単回 ・サル単回	・マウス単回 (サル単回, 非GLP)	・マウス単回 ・幼若マウス 単回	・サル単回 ・マウス単回
抗AAV抗体	×	○	○	○	○	○	○	○
AAV中和抗体	×	×	×	×	×	×	×	○
抗発現タンパク抗体	×	○	○	○	○	○	×	○
発現タンパク中和抗体	×	×	×	×	×	×	×	×
サイトカイン	×	×	×	×	○	×	×	×
補体活性化	×	×	×	×	×	×	×	×
カプシド・発 現タンパクに 対するT細胞 の抗原依存的 免疫応答	×	○	○	×	○	×	×	○
	(臨床では 評価)					(臨床では 評価)	(臨床では 評価)	

アンダーライン：GLP 試験，○：評価実施，×：評価実施の記載なし

6. 遺伝子組込み並びに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価

遺伝子組込み並びに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価に関する一般原則として、指針では生命予後の著しく不良な疾患を除き、ベクターのゲノムへの組込みの可能性について評価することが求められている。その際、細胞1個当たりに組み込まれるコピー数及び特定の部位に組み込まれる可能性について評価すること、更に、挿入変異による特定の遺伝子の活性化による腫瘍形成及びがん化の可能性を評価することも重要である。アデノウイルスベクター及びプラスミドDNAのようにゲノムへの組込み能を持たないベクターの場合には、低頻度の挿入を検出する感度の高い試験の実施を考慮することとされている⁴⁾。現状のAAVベクター遺伝子治療用製品では、*rep*をコードする遺伝子を取り除いてあるため、AAVの大きな特徴である第19番染色体への部位特異的組込みという性質が失われており、ゲノムへの組込み自体がほとんど起こらないとされている²³⁾。しかしながら、ほとんどのベクターDNAは宿主細胞の核内でエピソームとして長期間存在し、低頻度ながらもランダムな宿主ゲノムへの組込みが

起こることが報告されている²⁴⁾。

既承認AAVベクター8製品のゲノム挿入解析の実施の有無と実施しなかった場合の理由についてはTable 5-1及び2にまとめた。ゲノム挿入解析はGlybera[®]、Hemgenix[®]、Roctavian[®]、Beqvez[™]の4製品で実施された^{5, 16, 18, 20, 21)}。Glybera[®]では、ベクター配列に特異的なプライマーを用いて非制限linear amplification-mediated PCR (LAM PCR) 法で増幅し、次世代シーケンサーで隣接する配列を特定する解析が行われた。また、Hemgenix[®]では、非制限LAM PCR法に加えてLAM PCR法とdeep sequencingで挿入部位の解析が実施された。Glybera[®]については試験動物種が確認できなかったが、筋肉と肝臓で挿入部位のクラスター化は特定されなかった。

一方、Hemgenix[®]ではマウスとサルの2種で解析が実施され、マウスでは染色体の特定の部位への挿入を示す挿入部位のクラスター化が複数同定されたが、サルでは挿入部位のクラスター化が認められなかった。げっ歯類では幼若マウスにのみに、RNA imprinted and accumulated in nucleus (Rian) 遺伝子座への部位特異的な組込みに関連したAAV誘発性のhepatocellular carcinoma (HCC) が報告されている²⁵⁾。これに対してHemgenix[®]で検出され

Table 5-1 遺伝子組み並びに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価～挿入解析を実施した4製品～

製品名	Glybera®	Hemgenix®	Roctavian®	Beqvez™
プロモーター	CMV IEP	Liver specific promoter (LP1)	Hybrid human liver specific promoter	Liver specific promoter (詳細不明)
挿入解析の実施内容	・肝臓及び筋肉(動物種未記載) ・非制限LAM-PCR+次世代シーケンサー ・挿入により突然変異のリスクが生じる可能性のある統合ホットスポットやクローンの偏りなし(生殖腺への組み込みは未評価)	・サル、マウス肝臓 ・LAM-PCR, 非制限 LAM-PCR, deep-sequencing ・マウス8646, サル1541の固有の挿入部位を検出, サルは宿主ゲノム全体にランダムに分布, マウスは強いクラスター化.	・サル肝臓 ・TES ・サルでは9227の固有の挿入部位を検出. 共通の挿入プロファイルから, クローン増殖はないと考察.	・サル肝臓 ・TES, S-EPTS/LM-PCR ・挿入部位比率から, ベクターの大半がエピソーム内に残り, 共通の挿入部位プロファイルから, ベクター組み込みによる遺伝毒性リスクは低いと判定. (イヌサロゲートも評価)

CMV IPE: Cytomegalovirus immediate-early promoter, LAM-PCR: linear amplification-mediated PCR, TES: Target enrichment sequencing, S-EPTS/LM-PCR: Shearing extension primer tag selection ligation-mediated PCR

Table 5-2 遺伝子組み並びに腫瘍形成及びがん化の可能性の評価～挿入解析を実施しなかった4製品の理由～

製品名	Luxturna®	Zolgensma®	Upstaza®	Elevidys®
プロモーター	CMV CBA	CMV CBA	CMV IEP	Muscle-specific MHCK7 promoter
挿入解析非実施の理由	・組み込み頻度が低い ・組み込みに関与する <i>rep</i> 遺伝子が削除 ・投与部位は細胞分裂能が低い	・組み込み頻度は低く, 挿入発がんの報告はない, かつ乳児でリスク増大の情報がない ・生殖腺に存在するベクターDNAのレベルは低い.	・毒性試験で造腫瘍性を示唆する所見なし ・サルでは有糸分裂後の神経細胞におけるゲノム組み込み又は造腫瘍性のリスクは低いデータを取得 ・DNA挿入及び欠失のリスクは, 正常細胞の自然発生率と同程度	・主に男性に発現するX連鎖性DMDが適応症であり, 完了した毒性試験で懸念すべき所見が認められていないことに基づき, がん原性/造腫瘍性, 及び遺伝毒性のさらなる評価は, 現時点で必要とされないと当局は判断.

CMV IPE: Cytomegalovirus immediate-early promoter, CMV CBA: CMV enhancer/chicken- β -actin-hybrid promoter, DMD: Duchenne muscular dystrophy

た挿入部位のクラスターは, 悪性形質転換に関与する遺伝子とは関連していなかったが, 慢性肝疾患を有する成体マウスにおいて挿入性HCC誘発の可能性も報告されているため²⁶⁾, ヒトでの長期観察の重要性がEMAのassessment reportに記載されている¹⁶⁾.

Roctavian®ではサルのみで, ベクター配列に特異的に相補結合する複数のプローブを用いて挿入領域を濃縮するTarget enrichment sequencing(TES)法(本特集の川崎秀吉ら²⁷⁾の稿を参照), Beqvez™ではサルのみで, TES法とShearing extension primer tag selection ligation-mediated PCR(S-EPTS/LM)により詳細な挿入解析が実施されたが, 挿入部位のクラスター化が認められなかった^{18, 20, 21)}.

挿入解析を実施しなかった残りの4剤は, AAVベクターの先行研究により一般的に挿入リスクが低いこと, 細胞分裂能が低い部位が標的であること, これまでの長期観察試験で腫瘍性変化が認められていないことなどを理由に, その妥当性が説明されていた. また, 挿入解析を実施した4剤のうち, Glybera®を除く3剤は新規の肝臓特異的なプロモーターを利用し, げっ歯類でAAV誘発の腫瘍形成報告がある肝臓を標的としたAAVベクター製品であった.

7. 生殖発生毒性評価

生殖発生毒性試験は, 指針⁴⁾において受胎能及び

着床までの初期胚発生に関しては、一般毒性試験における病理組織学的検査で生殖器官への影響が懸念される場合に必要であるとされている。また、胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は、適用患者集団や遺伝子治療用製品等の生物学的特性（一般毒性、薬理作用、曝露量、生体内分布、胎盤通過性、組織・細胞への指向性など）を踏まえて、試験実施の必要性を検討する必要があるとされている。

更に、ICH S12では生殖腺組織における生体内分布評価を必須としており、遺伝子治療用製品の生殖腺における持続的存在の有無により、生殖細胞（卵母細胞、精子）又は非生殖系列細胞における遺伝子治療用製品濃度を測定する追加試験が必要とされている²⁾。この内容は、ICH見解³⁾にも具体的に示されている。欧州のGuideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectorsでは、適用患者を考慮の上、分布試験の成績をもとに、*in vivo* 遺伝子治療用製品の繁殖試験 (breeding studies) を含む次世代への影響に関する評価について具体的なフローを規定し、評価することが示されている²⁸⁾。

これらの背景をもとに、生殖組織への分布と生殖発生毒性及び次世代移行リスク評価について、既承認8製品の情報をTable 6にまとめた。

局所投与製剤であるLuxturna[®]及びUpstaza[®]では生殖腺への分布は認められなかったため、これら2剤では生殖関連の更なる検討は実施されていなかった^{9, 18)}。一方、全身曝露する投与経路の6製剤では、生殖腺への分布が確認された。このうち、Hemgenix[®]、Roctavian[®]、Elevidys[®]及びBeqvez[™]の4剤はいずれも男性のみの適用で、Beqvez[™]では投与5か月目でウサギの精液からベクターDNAの消失が認められたこと^{20, 21)}、Elevidys[®]では導入遺伝子のプロモーターであるMHCK遺伝子及びマイクロシストロフィンタンパク質の精巣での発現が低レベルかつ用量相関性がないことから¹⁹⁾、いずれも繁殖試験による次世代移行リスク評価は実施されなかった。しかし、Elevidys[®]ではFDAから形質導入の可能性を排除できないと指摘されている¹⁹⁾。なお、Hemgenix[®]とRoctavian[®]については、生殖細胞への分布は評価せずに雄からF1への移行リスクが繁殖試験によって評価され、未検出と結論付け

られていた^{16, 18)}。

男女両性への適用である残り2剤のうち、Glybera[®]は生殖腺への残存及び生殖細胞への分布が認められたことから、雌の生殖能及び胎児発達への影響と雌からF1への移行リスクが繁殖試験によって評価され、未検出と結論付けられていた⁵⁾。一方、Zolgensma[®]は生殖腺への分布が認められたが、重篤な疾患かつ新生児適用であることから、生殖発生毒性、繁殖試験のいずれも実施されていなかった。Zolgensma[®]についてはPMDAから、マウスでベクターDNAが残存し、臨床でも血中にベクターDNAが12か月後でも残存することから、長期残存して生殖細胞へ及ぼす影響がある可能性について添付文書への記載が要求された¹²⁾。

生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組込みリスクに関しては、ICH見解やEMAから次世代への影響を評価するための指針が既承認品目の開発段階で既に発出されていたため、各開発段階で既に取得済の情報も活用した上で、概ねこれに沿った形で評価が実施されていた。また、Glybera[®]では一部の生殖発生毒性試験のみ実施されたが、それ以外の7剤では一般的な生殖発生毒性試験は実施されていなかった。

8. 製剤ロット間における安全性評価

In vivo 遺伝子治療用製品は、製法のスケールアップや臨床製剤の品質管理の観点から、開発段階で製法が変更されることが多い。指針には、製法が変更された場合、旧製法で製造された製品を用いて得られた非臨床・臨床試験成績を新製法で製造された製品での試験成績と同等として用いるために、製法変更前後の製品の同等性/同質性評価が必要と記されている⁴⁾。実例として、Table 3に示したように、Zolgensma[®]では旧製剤が感染力の弱い製剤であったため、幼若マウスとサルでの長期観察の毒性試験が参考扱いとなっていた¹³⁾。

既承認AAVベクター8製品における最終的な臨床製剤・最終製剤の毒性試験の実施状況については、Table 7にまとめた。既承認AAVベクター8製品の臨床製剤・最終製剤での安全性評価は、Glybera[®]、Luxturna[®]、Zolgensma[®]、Hemgenix[®]、Elevidys[®]及びBeqvez[™]の6製品について実施され

Table 6 生殖発生毒性及び繁殖試験による次世代移行リスク評価

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez TM
臨床投与経路	筋肉内	網膜下	静脈内	被殻内	静脈内	静脈内	静脈内	静脈内
適用	M/F	M/F	M/F	M/F	M	M	M	M
生殖腺分布	有	無	有	無	有	有	有	有
生殖腺残存*1	有	×	有	×	有	有	有	無
生殖細胞分布	有	×	×	×	×	×	低	×
次世代移行リスク評価の有無*2	無	×	×	×	無	無	×	×
生殖発生毒性	妊娠マウスを用いた試験で雌の生殖能及び胎児発達への影響なし	×	×	×	×	×	×	×
備考	雌からF1への移行を評価, 雄からは未評価.	網膜への局所投与で全身分布が少ない.	対象は新生児であり, 成長によりベクターDNAが希釈されるため次世代への移行リスク評価は非実施と説明.	被殻内への局所投与で全身分布が少ない.	雄からF1への移行を評価	雄からF1への移行を評価	精巣内でAAVプロモーターゲノム陽性細胞, マイクロジストロフィン陽性細胞が低レベルであるから次世代への移行リスクは低いと説明.	ウサギの精液中に投与4か月後までベクターDNAを検出したが, 5か月目で消失.

*1：生殖腺への分布が確認され、消失が確認されていないものは残存有と表記、*2：繁殖試験にて確認された次世代（F1）への移行リスクの有無について記載。

M: Male, F: Female, ×: 評価実施の記載なし

ていた。Glybera[®]は一般毒性の評価を最終製剤で行っており⁵⁾、Luxturna[®]では非GLPであるが、単回及び反復投与の長期試験で最終製剤の評価を実施していた⁹⁾。Zolgensma[®]では旧製剤の感染力が弱かったことから、臨床製剤2ロットで実施した12週間の試験が、結果的に最終的な一般毒性の評価となっていた¹³⁾。Hemgenix[®]では旧製剤と臨床製剤のいずれにおいても、一般毒性の評価を実施していた¹⁶⁾。Elevidys[®]では3か月の一般毒性評価を臨床製剤の評価として追加実施していた¹⁹⁾。BeqvezTMではサルでの長期試験前までに臨床製剤を準備して、評価を実施していた^{20, 21)}。

一方、Upstaza[®]とRoctavian[®]に関しては最終製剤での評価が確認できなかった。Upstaza[®]については、商用製剤に添加剤としてpoloxamer 188が添

加されており、このpoloxamer 188単独の毒性試験と、未添加の試験結果の組み合わせで最終製剤のリスク評価を実施していた¹⁴⁾。一方、Roctavian[®]に関しては、第3相臨床製剤と最終製剤の品質の観点からの比較試験から両者の同等性が許容範囲内にあることを確認し、担保していた¹⁸⁾。

以上から、臨床製剤・最終製剤の安全性評価には以下の選択肢があると考えられた。①長期観察の毒性試験開始前までに最終製剤を準備し、評価する。②最終製剤が間に合わなかった場合は適切な期間（例：3か月観察など）の毒性試験を追加実施する。③添加剤の違いなどがある場合、それぞれの毒性試験成績の組み合わせでリスク評価が可能であればそれらのデータを活用する。④品質の観点で同等性を説明する。

Table 7 臨床・最終製剤の安全性評価

製品名	Glybera [®]	Luxturna [®]	Zolgensma [®]	Upstaza [®]	Hemgenix [®]	Roctavian [®]	Elevidys [®]	Beqvez [™]
臨床・最終製剤での単回毒性評価について	非臨床バルクの前備試験後にバキュロウイルスを用いて製造された最終的な単回毒性を評価。	最終製剤はイヌ (RPE 65-/-ブリアード) 及びサル (非 GLP の単回 3M 試験及び反復試験) で評価。	最終的には GMP バルク 2 ロットを 12W で評価。	商業製剤に用いている poloxamer 188 単独の毒性試験を別途実施し、ヒトへのリスク評価を追加実施。非臨床試験は最終製剤では実施されていないと考えられる。	Padua FIX 変異体である AMT-060 と最終製剤である AMT-061 の両方で毒性試験を実施。	マウスの毒性試験は最終製剤で実施されたかは不明。ただし、第 3 相臨床製剤と最終製剤の品質の観点から同等性が許容範囲内にあることを確認。	臨床製剤を用いたマウス単回 3M 試験を追加評価。	マウスは非臨床製剤だが、サル長期試験は臨床製剤で評価。

W: week, M: month, RPE65: Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein

文 献

9. 終わりに

既承認 AAVベクター製品に関する非臨床安全性評価については、国際的に合意されたガイダンス・ガイドライン文書は ICH S12 のみであり、各極で個別にガイダンスやガイドラインが発出されている段階である。しかし、2006～2013 年の間に欧米のガイドライン・ガイダンス文書及び ICH 見解などで大まかに評価の方向性が定められたこと、Glybera[®] と Elevidys[®] を除き、欧米もしくは日米欧と複数の極で承認されていることから、評価の考え方に関しては国内の指針とも大きな相違はないものと考えられた。

評価パッケージや各試験項目の差異は、製品毎の投与経路、対象疾患の重篤性、発現タンパク質の性質、それまでに得られている AAVベクター製品の情報なども踏まえて、ケースバイケースに実施されていたためと考えられる。しかし、現時点では既承認品目の評価事例は限られており、個々の品目の具体的な評価に関して網羅できているわけではないこと、既承認品でも承認はされているものの、現状の評価に対して規制当局から評価内容について不足や解釈に関して指摘もあることから、これまで発出されている文書や既承認品目の評価を参考に評価戦略の精度を高め、規制当局と相談しながら取り進めていくことが必要と考えられる。

- 1) 日米欧で承認された遺伝子治療製品/in vivo 遺伝子治療製品 (アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター製品). 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部ホームページ. <http://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section1-1.pdf> (accessed 2025-03-19).
- 2) 厚生労働省医薬局医療機器審査管理課長. 「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方」について. 医薬機審発 1023 第 1 号, 令和 5 年 10 月 23 日.
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課・医療機器・再生医療等製品担当参事官室. 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. 事務連絡, 平成 27 年 6 月 23 日.
- 4) 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長. 遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について. 薬生機審発 0709 第 2 号, 令和元年 7 月 9 日 (一部改正, 医薬機審発 1023 第 2 号, 令和 5 年 10 月 23 日).
- 5) Glybera[®]: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/glybera-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 6) Luxturna[®]: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/110105/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 7) Luxturna[®]: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/luxturna-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 8) Luxturna[®]: 審査報告書. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2023/R20230721001/30024200_0_30500FZX00003000_A100_1.pdf (accessed 2025-03-

- 19).
- 9) Luxturna®: 申請概要. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2023/R20230721001/index.html (accessed 2025-03-19).
- 10) Zolgensma®: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/128116/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 11) Zolgensma®: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 12) Zolgensma®: 審査報告書. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2020/R20200407001/30024200_0_30200FZX00001_A100_2.pdf (accessed 2025-03-19).
- 13) Zolgensma®: 申請概要. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2020/R20200407001/index.html (accessed 2025-03-19).
- 14) Upstaza®: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/upstaza-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 15) Hemgenix®: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/164163/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 16) Hemgenix®: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/hemgenix-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 17) Roctavian®: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/170576/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 18) Roctavian®: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/roctavian-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 19) Elevidys®: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/170231/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 20) Beqvez™: FDA approval package. <https://www.fda.gov/media/178738/download?attachment> (accessed 2025-03-19).
- 21) Beqvez™: EMA assessment report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/durveqtix-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 2025-03-19).
- 22) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「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」について. 薬食審査発0323第1号, 平成24年3月23日.
- 23) Schnepf, B. C.; Clark, K. R.; Klemanski, D. L.; Pacak, C. A. and Johnson, P. R. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol.* 2003, **77**(6), p.3495-3504.
- 24) Sabatino, D. E.; Bushman, F. D.; Chandler, R. J.; Crystal, R. G.; Davidson, B. L.; Dolmetsch, R.; Eggan, K. C.; Gao, G.; Gil-Farina, I.; Kay, M. A.; McCarty, D. M.; Montini, E.; Ndu, A. and Yuan, J. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther.* 2022, **30**(8), p.2646-2663.
- 25) Chandler, R. J.; Sands, M. S. and Venditti, C. P. Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models. *Hum Gene Ther.* 2017, **28**, p.314-322.
- 26) Dalwadi, D. A.; Torrens, L.; Abril-Fornaguera, J.; Pinyol, R.; Willoughby, C.; Posey, J.; Llovet, J. M.; Christian Lanciault, C.; Russell, D. W.; Markus Grompe, M. and Naugler, W. E. Liver injury increases the incidence of HCC following AAV gene therapy in mice. *Mol Ther.* 2021, **29**(2), p.680-690.
- 27) 川崎秀吉, 三井田宏明, 奈良岡準, 太田哲也, 木下潔, 後藤浩一, 高木観, 佐々木正徳, 直田みさき, 櫻井陽, 小野寺雅史, 内田安則, 山下拓真, 吉田徳幸, 山本武範, 井上貴雄. 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. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2025, **56**(5), p.370-376.
- 28) European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Non-clinical Testing for Inadvertent Germline Transmission of Gene Transfer Vectors. <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/2024-06/guideline-non-clinical-testing-inadvertent-germline-transmission-gene-transfer-vectors-ema.pdf> (accessed 2025-03-19).