

# 遺伝子治療用製品等の 非臨床安全性評価

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（PMDA）

真木 一茂

# Outline

1. 遺伝子治療用製品等について
2. 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価
  - *In vivo*遺伝子治療
  - *Ex vivo*遺伝子治療
3. おわりに

# 遺伝子治療に関する用語

## • 遺伝子治療

疾病の治療や予防を目的として、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

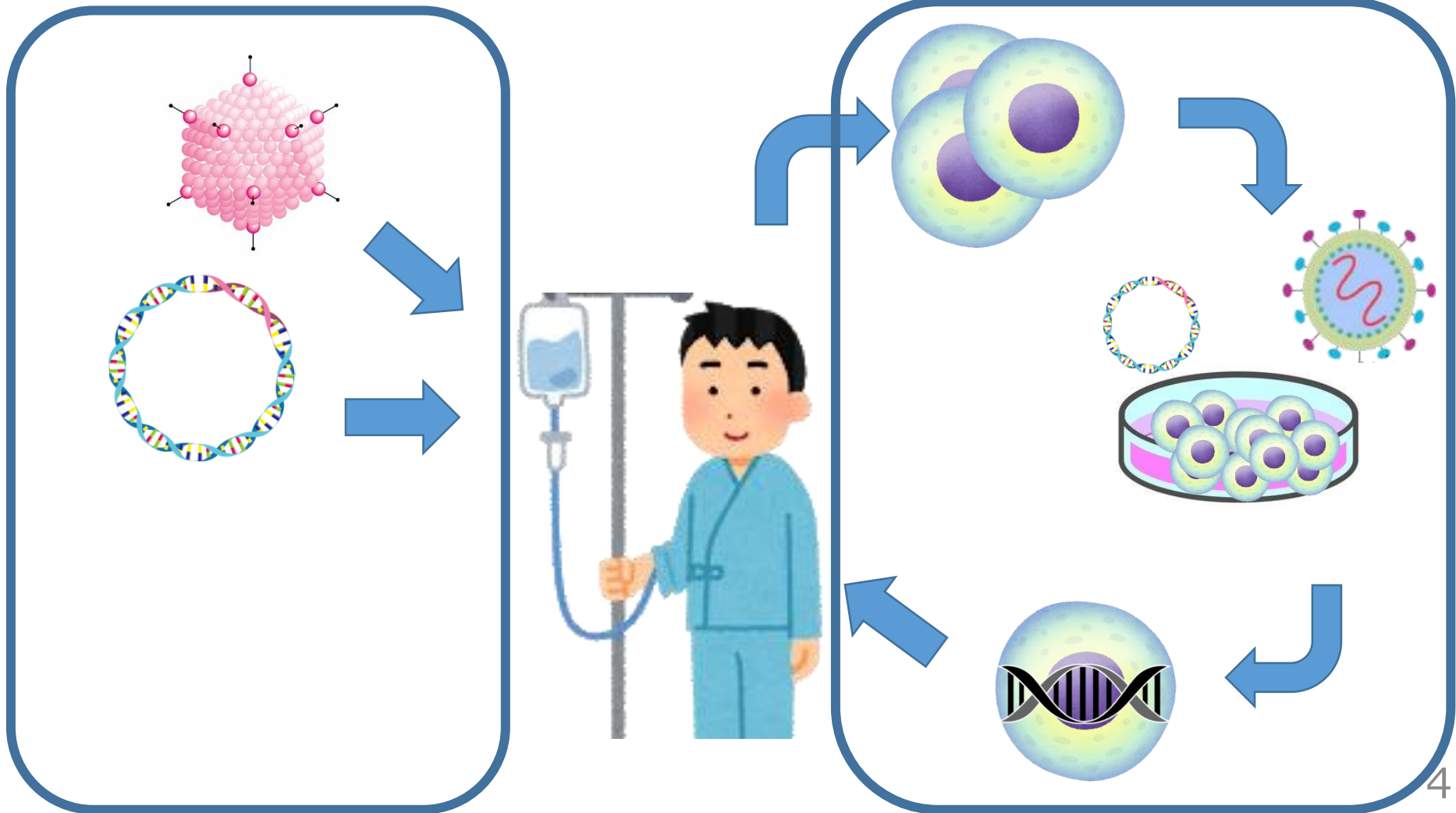
## • 遺伝子治療用製品

ヒト又は動物の体内で発現し、効果又は性能の本質となる遺伝子を含む遺伝子構成体からなるもので、細胞加工製品以外の再生医療等製品

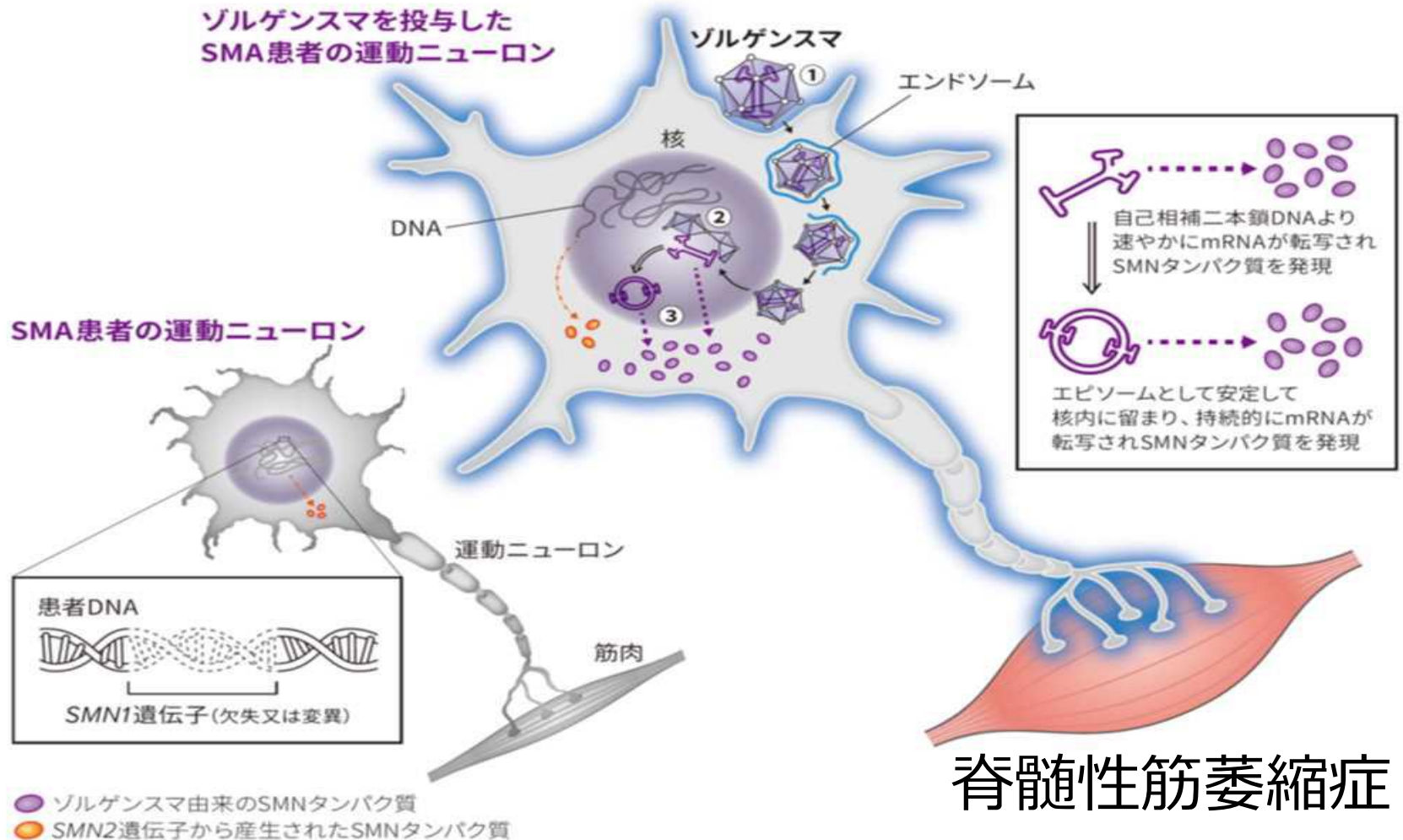
# 遺伝子治療

*In vivo*

*Ex vivo*



# 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) より

# 遺伝子治療用製品等の位置づけ

## 細胞加工製品

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



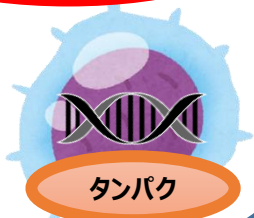
## 遺伝子治療用製品等

## 遺伝子治療用製品

- プラスミドベクター



*Ex vivo*



*In vivo*

# Outline

1. 遺伝子治療用製品等について
2. 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価
  - *In vivo*遺伝子治療
  - *Ex vivo*遺伝子治療
3. おわりに

# 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

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

## Point

- 科学技術/治験は日進月歩
- 一律に適用しない
- 製品特性及び開発段階に応じてケースバイケース対応



# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 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

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 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

# 非臨床安全性評価における切り口

オンターゲット毒性



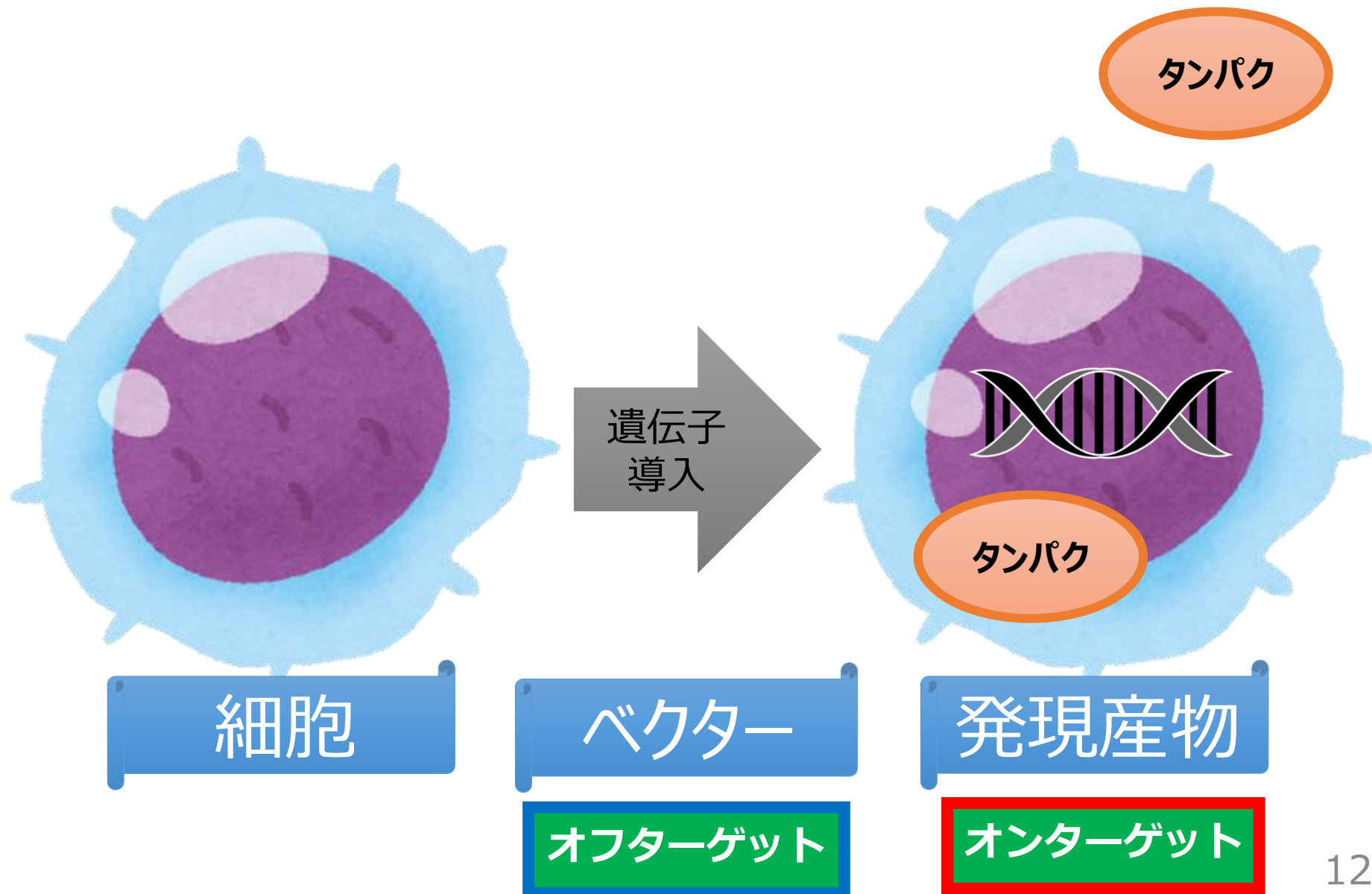
意図する効力に関連する作用

オフターゲット毒性



効力に関連しない作用  
(意図しない作用)

# 遺伝子治療用製品等の安全性評価



# バイオ医薬品の非臨床安全性評価

S6

薬食審査発 0323 第 1 号  
平成 2 4 年 3 月 2 3 日

「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

選択性が高いため、  
過剰な薬理作用に起因する  
有害作用に留意する

# バイオ医薬品（反復投与毒性）

S6

- 動物種： 2種以上の薬理反応を示す動物種
- 最高用量 MTD、MFD  
臨床曝露量の~10倍（結合親和性の種差考慮）  
最高薬理用量
- 投与期間： 臨床使用予想期間に準ずる

臨床試験



毒性試験

臨床試験と同じ(最大6カ月)



# 遺伝子治療用製品（一般毒性試験）

- 動物種： 薬理反応を示す動物種
- 最高用量 MTD、MFD  
臨床投与量から説明する場合
  - ・ 遺伝子導入/発現効率の種差
  - ・ 薬理活性の種差
- 試験期間：（単回であっても）臨床で発現する期間

臨床試験



臨床での発現期間(～6カ月)



ただし、特性を踏まえ ケース・バイ・ケース

# 遺伝子治療用製品における動物種選択の留意点

例えば、

- 発現遺伝子産物
  - ✓ 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
- 発現ベクター
  - ✓ ウイルスベクター/非ウイルスベクター
  - ✓ ヒトと同じ感染性、増殖性、細胞・組織指向性を示すか
- 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



# 一般毒性の評価（試験期間）



臨床において長期間、目的遺伝子の発現を期待する製品の場合、常に観察期間は6カ月が必要でしょうか？

例えば、以下の場合、より短期間で受け入れ可能です。

- ① 免疫原性で、長期発現が期待できない場合
- ② 発現タンパク質の特性が十分に理解されている場合
- ③ ベクターの安全性について十分な情報がある場合

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性試験

- 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

# 生殖細胞への意図しない組み込みリスク

事務連絡  
平成 27 年 6 月 23 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

## ① 遺伝子治療用ベクターの特性

意図しない組み込みリスク

ベクターの種類	核移行	組み込み機序
γ-レトロウイルス レンチウイルス	あり	あり
アデノ随伴ウイルス アデノウイルス プラスミドDNA	あり	なし
ポックスウイルス センダイウイルス	なし	なし

# 生殖細胞への意図しない組み込みリスク

事務連絡  
平成27年6月23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

## ② 生体内分布試験における生殖器での分布評価

- 検出された場合
  - 検出限界以下になるかを確認
    - 一過性の発現
      - ヒトで精液検査を推奨
    - 持続的な発現
      - 生殖細胞/非生殖細胞か確認
      - 生殖細胞の場合、規制当局と議論

# 生殖細胞への意図しない組み込みリスク QA

生体内分布試験における生殖器での分布評価で、ベクターDNAが検出された場合、どのようにリスクを考えたらよいですか

ベクターの種類により、ケースケースで考える必要があります。例えば、関連するガイドラインに基づく説明、ベクターの生殖細胞への感染性、染色体への組み込み効率との比較により、評価することが考えられます。

# 生殖細胞への意図しない組み込みリスク



AAVベクターを用いた非臨床安全性試験において、ゲノム組み込みのリスク評価必要との話を聞くが、どのように対応すれば良いのか？

# 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  
( $\gamma$ -レトロ, レンチ)
- 核へ移行するが組み込み機構持たない  
(**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

未分化細胞  
(造血幹細胞)

分化細胞  
(T細胞,  
筋肉細胞)

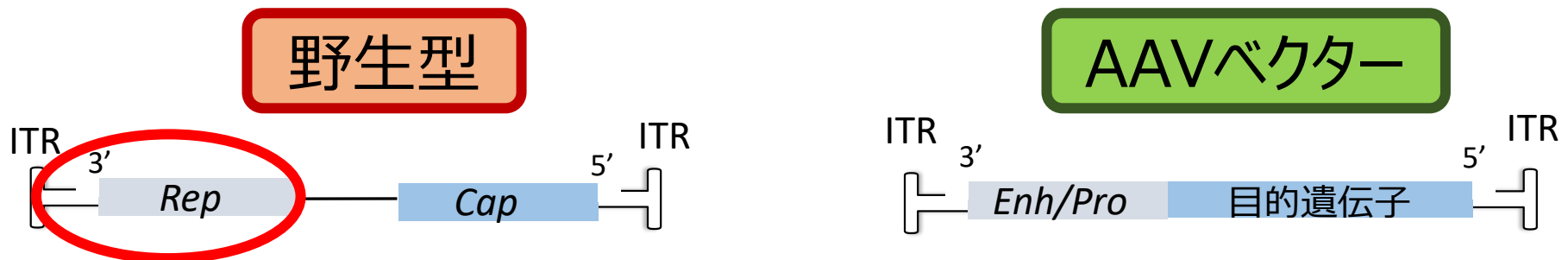
## 投与経路/投与量

静脈内  
/高用量

局所投与  
/低用量

# AAVベクターの特徴

- 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)

組み込み機序がなくても、組み込み能力がないわけではない

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

# Toxicity Risk of AAV Vectors for GT

## Discussion Questions for the Committee: Oncogenicity



1. Please discuss the merits and limitations of animal studies to characterize the risk of AAV vector-mediated oncogenicity, and provide recommendations preclinical study design elements, to include:
  - a. Animal species, healthy vs. disease models, and animal age
  - b. In-life and post-mortem assessments, including methods for integration analysis
  - c. Duration of follow-up, post-dose
4. Please discuss whether some vector designs may enhance the frequency of vector-mediated integration and the risk of oncogenesis. For example, how is the risk affected by promoter-enhancer elements, genome-targeted nucleases, or novel AAV vector designs for which there is limited clinical experience. Because AAV vectors can carry significant levels of co-packaged DNA impurities from the manufacturing process, is the risk of oncogenesis increased due to potential integration of non-vector DNA, and what types of studies should be performed to assess this risk?


組み込み評価

# 組み込み機構を持たない ウイルスベクターの組み込みリスク



- 「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」に沿って評価する必要があります。
- 類似製品の成績や公表文献等で評価できない場合には、製品を用いた試験が必要になります。
- **「低い頻度の挿入を検出する感度の高い試験法」**  
(PCRを利用した方法等) で実施する必要がありますが、**特定の試験法を推奨することはなく、科学的に適切であれば受け入れ可能**です。
- がん等の生命を脅かす疾患については、必ずしも組み込みリスクを評価する必要はありません。

# 意図しない組み込みリスク評価の例

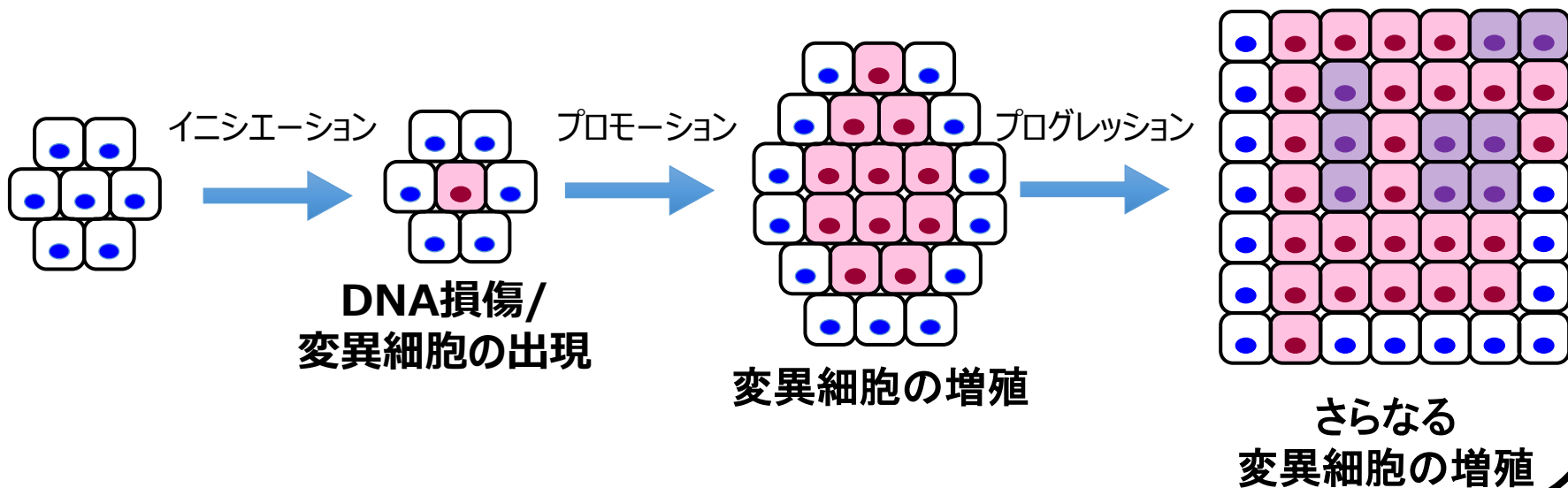
ベクターの種類	組み込みリスクの考え方
プラスミドDNA	<b>WHO</b>
	Technical Report Series No 941 <ul style="list-style-type: none"><li>• ≤ 30 copies of plasmid DNA per 100 000 host cells persist after 60 days</li></ul>
アデノウイルス	
	バキスゼブリア筋注 審査報告書 <ul style="list-style-type: none"><li>• 生殖細胞の感染性</li><li>• <i>In vitro</i>試験で報告されている組み込み頻度 (●●×10<sup>-6</sup> vp /細胞) との比較</li></ul>

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

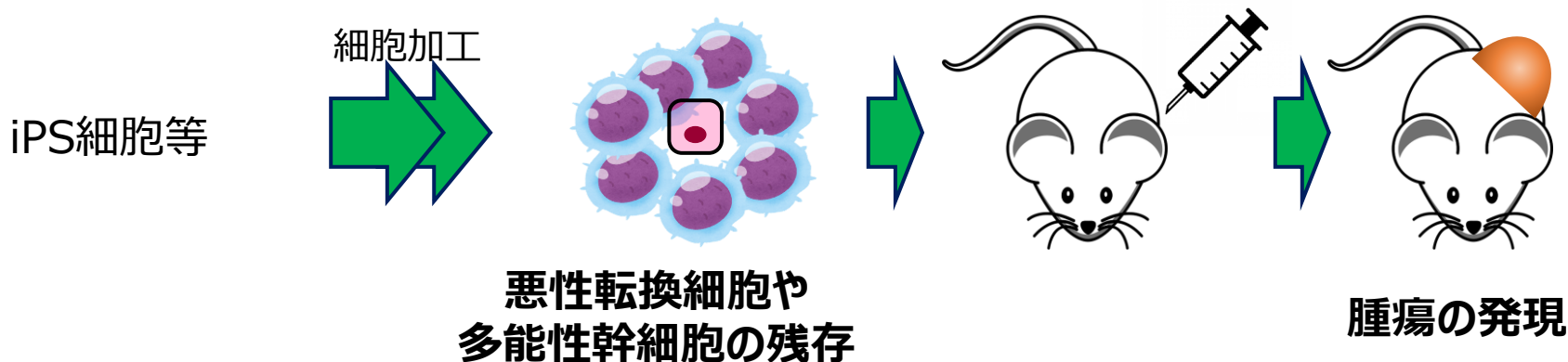
- 一般毒性評価
- 遺伝子組込み評価（生殖細胞への遺伝子組込みリスクの評価）
- **腫瘍形成及びがん化の可能性の評価（がん原性/造腫瘍性評価）**
- 生殖発生毒性試験
- 免疫毒性評価
- 増殖性ウイルス出現の可能性

# がん原性と造腫瘍性の違い

**がん原性**：生体内の正常な細胞をがんに変化させる性質



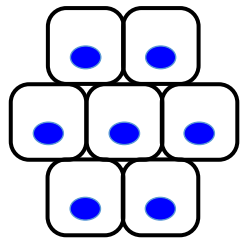
**造腫瘍性**：加工した細胞集団が、生体内で腫瘍を形成する性質



# 腫瘍形成の過程（がん原性）

正常細胞

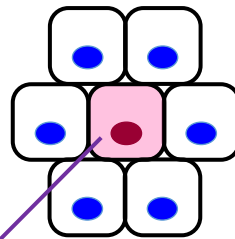
腫瘍化



イニシエーション



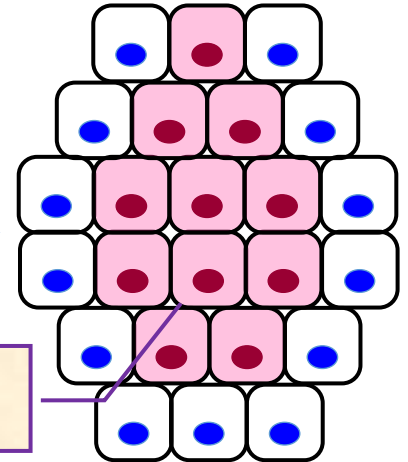
遺伝子変異



プロモーション/  
プログレッション



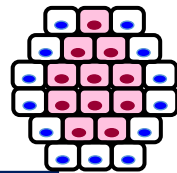
変異細胞の増殖



遺伝子組込み

発現産物

# S6 がん原性試験（バイオ医薬品）



臨床での曝露が、少なくとも6ヶ月以上継続されるもの

- 既存情報：遺伝子改変マウス、ヒト遺伝性疾患、クラスエフェクト等
- 薬理作用：標的分子の生物学的特性、作用機序等
- 非臨床試験成績：*in vitro* 試験、長期毒性試験等  
長期がん原性試験は必須ではない



総合的に発がんリスクを評価



# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 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

# 生殖発生毒性試験

## 一般毒性 次第

- 受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験

- 胚・胎児発生に関する試験

## 患者集団 生物学的特性 次第

- 出生前および出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

# 生殖発生毒性の評価



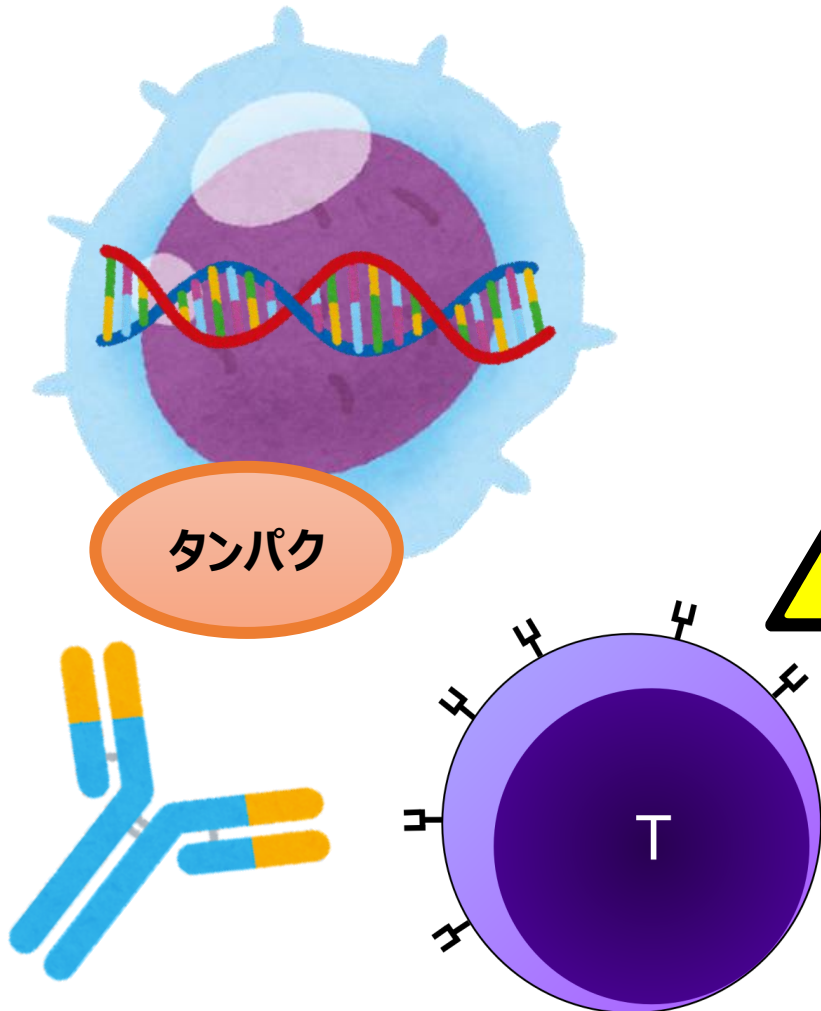
生殖発生毒性試験は、どのような時に必要ですか？

適用患者集団、製品（ベクター、発現産物）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、ベクターの細胞・組織指向性等）を踏まえて、ケースバイケースで検討する必要があります。

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 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

# 免疫毒性の評価

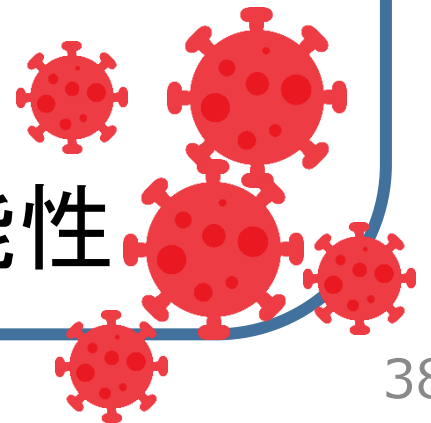


ベクター/発現産物による  
免疫系への悪影響を評価

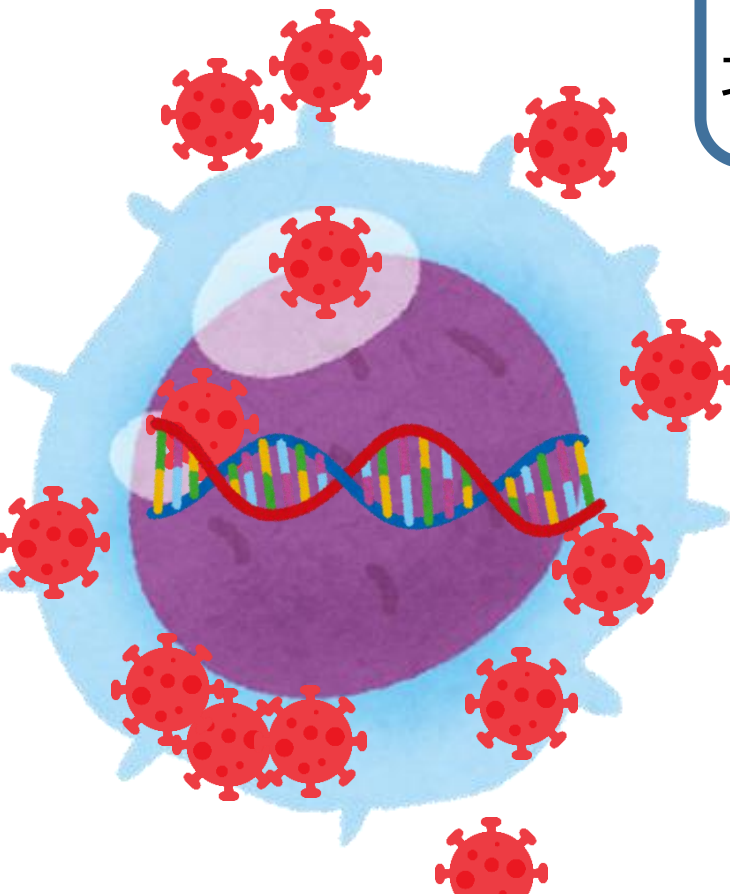
動物では特異的な免疫反  
応が発現する可能性がある  
ことから、解釈に留意する

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価

- 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**



# 増殖性ウイルスが出現する可能性



非増殖性ウイルスベクターは  
増殖性ウイルスが出現しないことを確認



品質試験として  
製造段階及び遺伝子導入細胞で  
の増殖性ウイルス否定試験等

# Outline

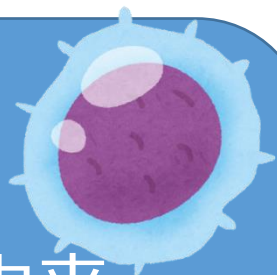
1. 遺伝子治療用製品等について
2. 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価
  - *In vivo*遺伝子治療
  - *Ex vivo*遺伝子治療
3. おわりに



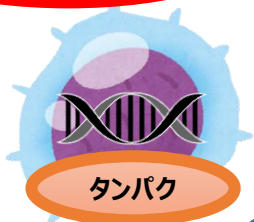
# 遺伝子治療用製品等製品的位置づけ

## 細胞加工製品

- 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



*Ex vivo*



## 遺伝子治療用製品

- プラスミドベクター
- ウイルスベクター  
(増殖型/非増殖型)



*In vivo*

# 細胞加工製品の非臨床安全性

- 目的外の形質転換を起こしていないこと
- 細胞・組織が産生する生理活性物質による影響
- 正常な細胞又は組織への影響
- 異所性組織を形成する可能性
- 望ましくない免疫反応が生じる可能性
- 腫瘍形成及びがん化の可能性
- 遺伝子導入が行われている場合には、遺伝子治療用製品指針に定める安全性評価
- 一般毒性試験



ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について（薬食発第0208003号）等

ヒトに投与する際、安全性上の「**明らかな懸念**」がないかを、「**科学的合理性のある範囲**」で確認

# 細胞加工製品の 非臨床安全性評価のポイント

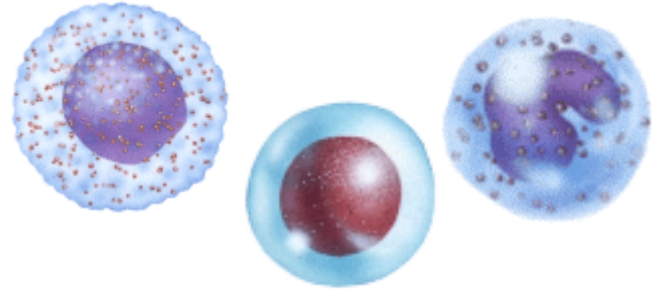
製品の特性を考慮して、

- **一般毒性** (生命維持に関わる機能への影響を含む)
- **造腫瘍性**
- **製造工程由来不純物**

の評価が必要

# 細胞加工製品の構成

- 細胞成分



- 非細胞成分

- 製造工程由来不純物

# 一般毒性の評価 (細胞加工製品)

有害性評価

x

曝露評価

=

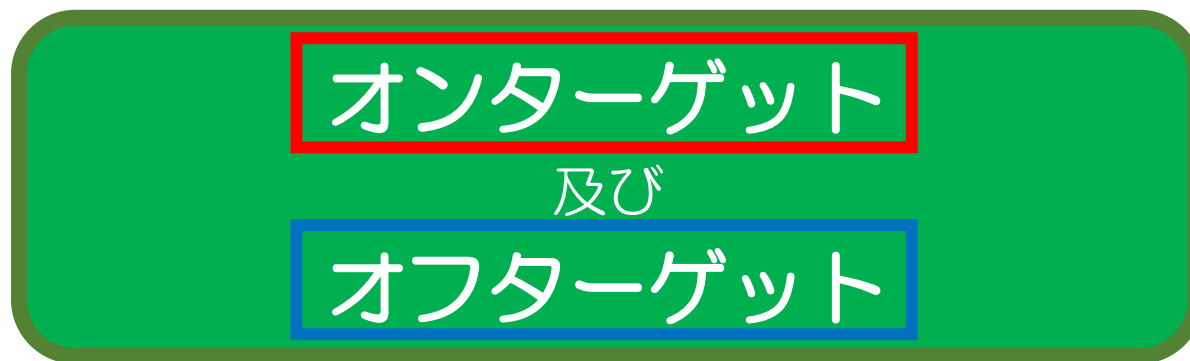
リスク評価

- ヒト製品に対する異種免疫反応
- ヒトと動物での反応性の違い
- 曝露量での評価が困難

動物で  
リスク評価  
は困難

# 必要な非臨床安全性評価を考える切り口

製品の特性を考慮して、



WOEアプローチを優先して 評価

# 一般毒性の評価（細胞成分）

## オンターゲット毒性

例 細胞加工製品の過剰な効力によるリスク

理論的あるいは効力を裏付ける試験  
等で、オンターゲット作用による  
重大な安全性上の懸念がある？

ない  
→

オンターゲット  
毒性の試験  
は不要

ある  
↓

- オンターゲット作用が評価できる動物類似品等を用いた試験で、安全性を評価する

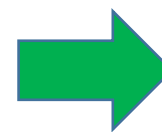
# 一般毒性の評価（細胞成分）

## オフターゲット毒性

例 細胞の意図しない生体内分布  
細胞が産生する意図しない生理活性物質の影響

オフターゲット作用による重大な  
安全性上の懸念がある？

ない



ヒト投与前に、  
最低限の  
安全性評価

ある ↓

懸念の内容に応じた最大限  
（例：試験期間）の毒性試験で評価



# 細胞加工製品の 非臨床安全性評価のポイント

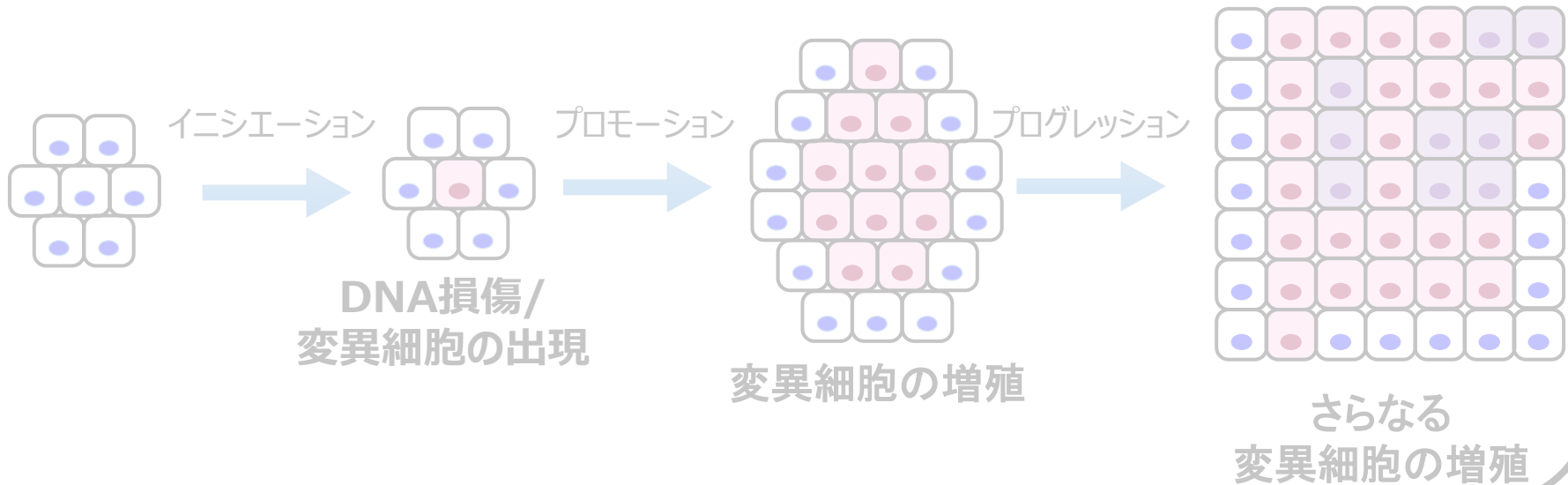
製品の特性を考慮して、

- **一般毒性** (生命維持に関わる機能への影響を含む)
- **造腫瘍性**
- **製造工程由来不純物**

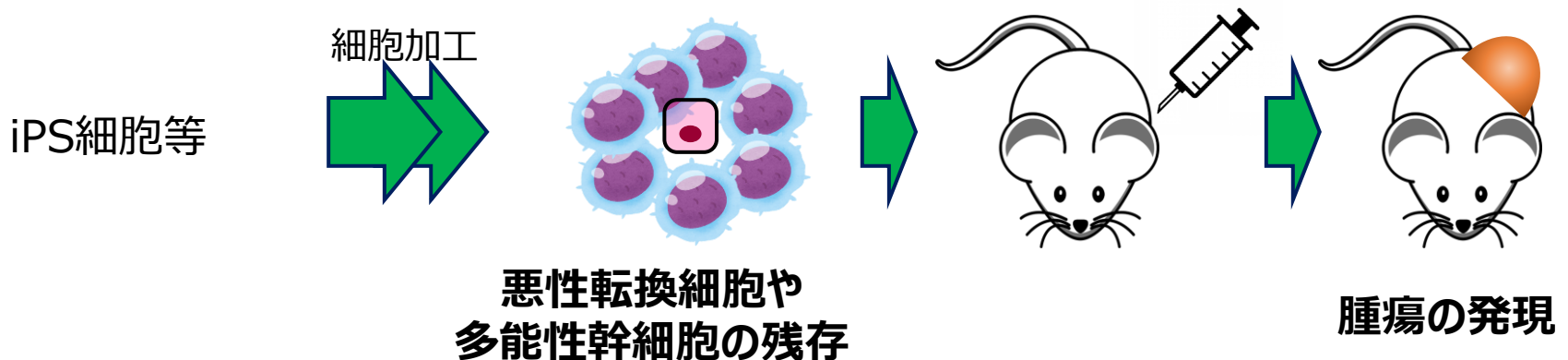
の評価が必要

# がん原性と造腫瘍性の違い

**がん原性**：生体内の正常な細胞をがんに変化させる性質



**造腫瘍性**：加工した細胞集団が、生体内で腫瘍を形成する性質



# 造腫瘍性関連試験

## 代表的な試験

*in vitro* 試験 ・核型分析試験

→ 遺伝的安定性

・軟寒天コロニー形成試験

→ 足場非依存的な増殖能

*in vivo* 試験 ・免疫不全動物を用いた試験

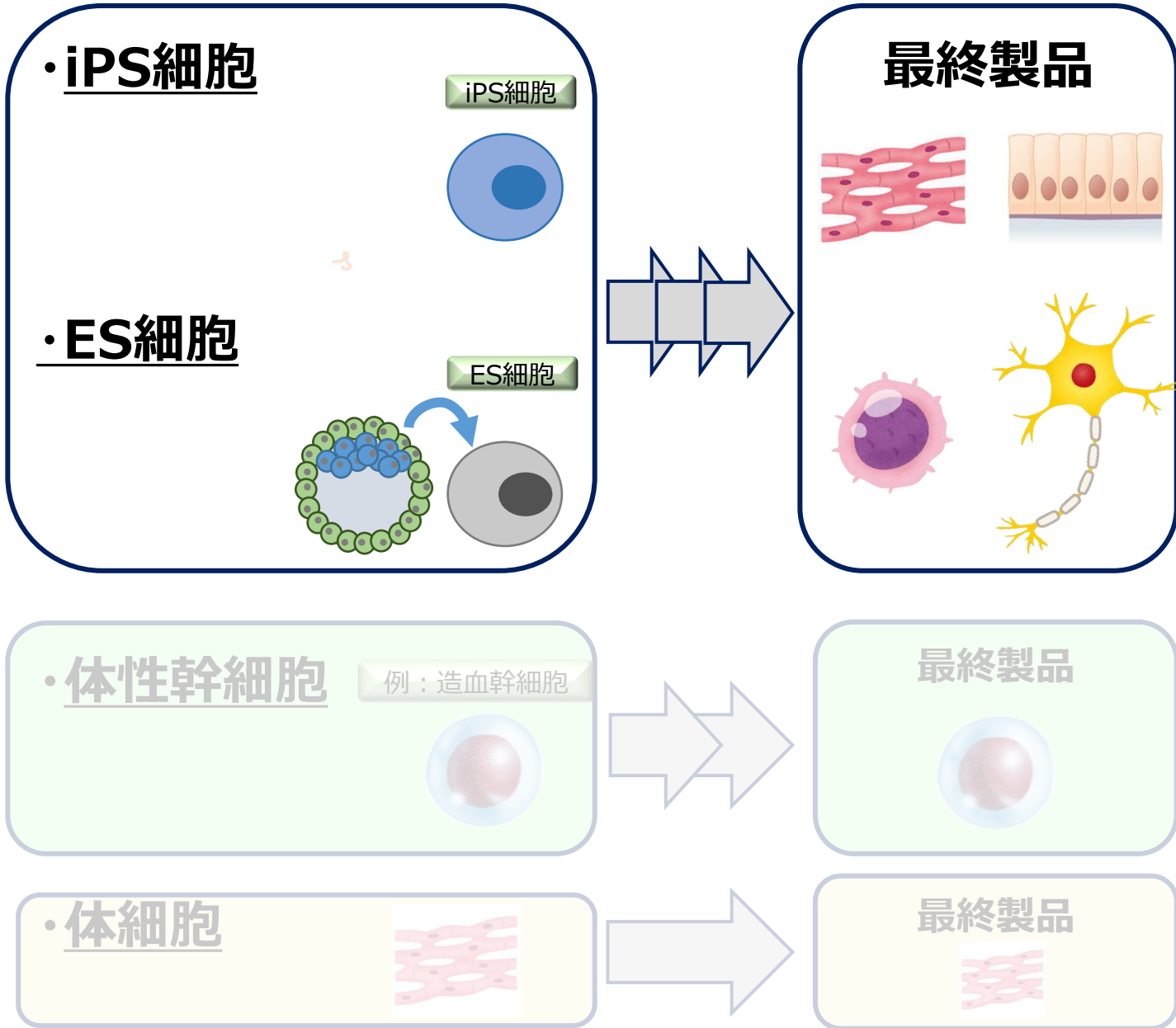
→ 生体内での腫瘍形成能



製品ごとに必要な試験は異なる

# 細胞の由来により異なるリスク

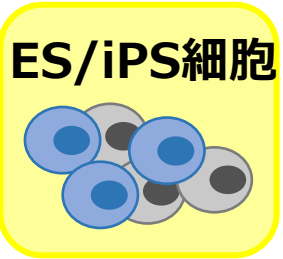
安全性上の懸念



ES/iPS細胞の混在

悪性形質転換

# 造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験



## 未分化ES/iPS細胞による造腫瘍性の評価

Step 1 ES/iPS細胞の混在量を評価

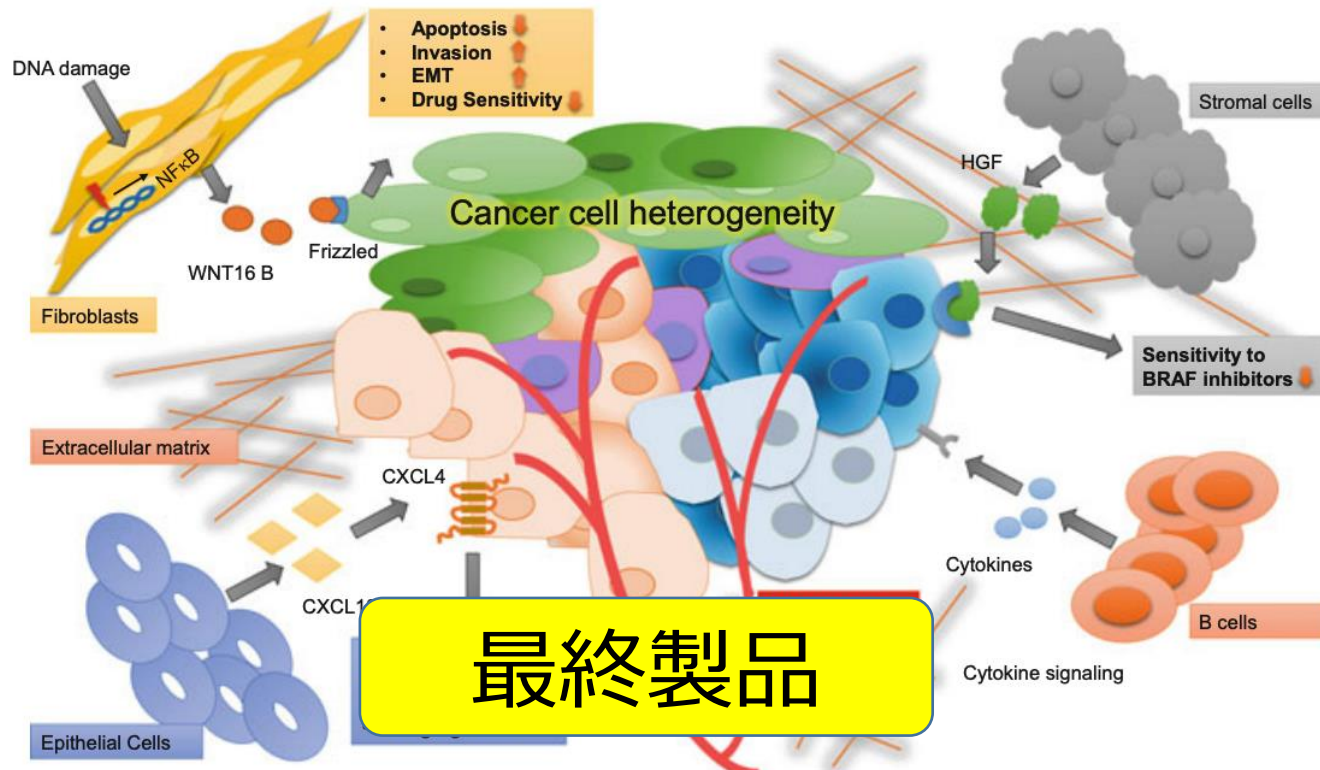
- ・フローサイトメトリー、qRT-PCR (Lin28等)
- ・H3+ポドカリキシン検出 など

Step 2 可能な限りES/iPS細胞を低減

Step 3 生体内微小環境（投与部位、最終製品）  
を踏まえた造腫瘍性の評価

➡ 動物において、最終製品を臨床投与部位で評価

# がんの発症における微小環境の役割



Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer pp 483-510

造腫瘍性は、臨床投与部位で評価することが望ましい

# 造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験

形質転換細胞



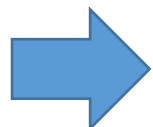
悪性形質転換細胞による造腫瘍性の評価  
様々な表現型が考えられ、残存量の把握が困難

Step 1 製品の特性に応じた*in vitro*試験で評価

例えば

- ・細胞の増殖特性解析
- ・軟寒天コロニー形成試験
- ・遺伝的安定性試験  
(Gバンド核型解析、FISHなど)

Step 2 生体微小環境を踏まえた造腫瘍性評価



最終製品を用いて、臨床投与部位で評価

# 細胞加工製品の 非臨床安全性評価のポイント

製品の特性を考慮して、

- 一般毒性 (生命維持に関わる機能への影響を含む)
- 造腫瘍性
- 製造工程由来不純物

の評価が必要



# 製造工程由来不純物の安全性評価

Step 1 可能な限り不純物を除去

Step 2 推定される残留量と臨床での用法・用量を踏まえ、様々な情報で評価

例

新規物質	無毒性量 (NOAEL) や最小薬理作用量 (MABEL) など
内因性物質	ヒト血中濃度 など
使用実績	医薬品や添加剤として使用前例、許容摂取量 など
ガイドライン	ICH-Q3CやD, ICH-M7
毒性学的概念	毒性学的懸念の閾値 (TTC) など

Step 3 以上で評価できない場合、非細胞成分同様に試験

# 毒性学的懸念の閾値 (TTC、LTL)

TTC :

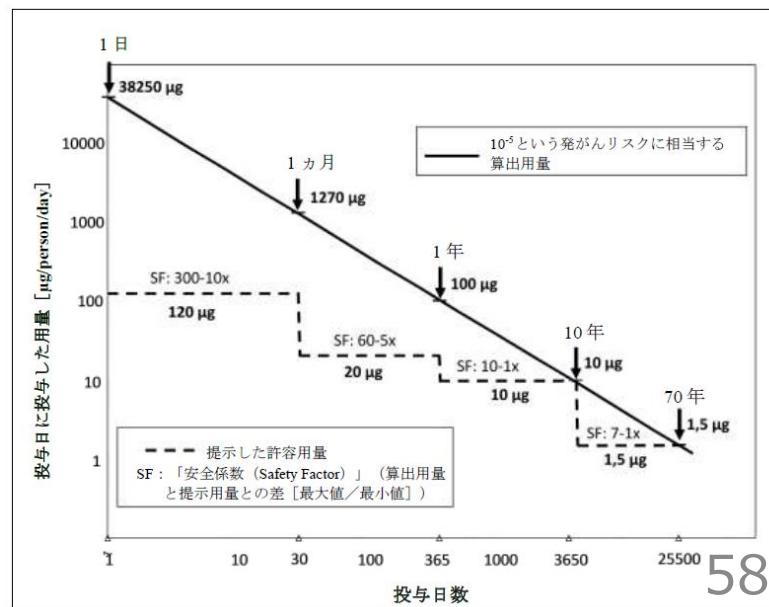
特殊な化学物質を除き、明らかな有害影響が現れないとするヒト曝露の閾値

一生涯なら、 $1.5\mu\text{g}/\text{ヒト}/\text{日}$

ICH M7(R1): 「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理ガイドラインについて」

不純物の許容摂取量 (1日摂取量) LTL

投与期間	$\leq 1$ 月	1~12月	1月~10年	>10年
$\mu\text{g}/\text{日}$	120	20	10	1.5



# 製造工程由来不純物の評価



様々な情報に基づき評価ということですが、  
どのように調べたらよいですか？

まず、国際機関や各国の評価機関のリスク評価書、データベース、医薬品や添加剤の使用前例（例：医薬品添加物事典、PMDA website）、などが考えられます。

# 情報の収集（例）

## 評価機関

## 評価書

WHO

IARC Monographs

EHC, CICAD

JECFA, JMPR

OECD

SIDS

EPA (US)

IRIS

ACGIH (US)

Doc. of the TLV for  
Chemical Substances

NTP, NIEHS (US)

Toxicological Profile

ECHA (EU)

食品安全委員会（日本）

食品安全委員会評価書

国際

各国

# 情報の収集 (例)

## データベース/文献情報

OECD eChemPortal	<a href="https://www.echemportal.org/echemportal/">https://www.echemportal.org/echemportal/</a>
OECD QSAR Toolbox	<a href="http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm">http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm</a>
JECDB	<a href="https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPageENG.jsp">https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPageENG.jsp</a>
HESS	<a href="https://www.nite.go.jp/en/chem/qsar/hess-e.html">https://www.nite.go.jp/en/chem/qsar/hess-e.html</a>
JCIA BigDr	<a href="https://www.jcia-bigdr.jp/jcia-bigdr/top">https://www.jcia-bigdr.jp/jcia-bigdr/top</a>
ChemiDplus	<a href="https://www.nite.go.jp/en/chem/qsar/hess-e.html">https://www.nite.go.jp/en/chem/qsar/hess-e.html</a>
PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
RTECS	<a href="https://www.cdc.gov/niosh/rtecs/default.html">https://www.cdc.gov/niosh/rtecs/default.html</a>
CAS	<a href="https://www.cas.org/">https://www.cas.org/</a>

# Outline

1. 遺伝子治療用製品等について
2. 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価
  - *In vivo*遺伝子治療
  - *Ex vivo*遺伝子治療
3. おわりに

# 遺伝子治療用製品等の非臨床安全性評価



- 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

- 規定に従った試験は必要であるが、GLに示された例示を「必ず守る！」ではない
- 科学的に適正な評価であればOK

# 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