

2.6.1 緒言

1. 緒言

AVXS-101 はヒト survival motor neuron (SMN) 遺伝子を発現する、遺伝子組換え非増殖性のアデノ随伴ウイルス (AAV) 遺伝子治療用ベクターである。AVXS-101 は、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー／ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーター (CB) の制御下にあるヒト SMN 遺伝子を含む、AAV ベクターセロタイプ 9 (AAV9) から構成される。AVXS-101 は、疾患発症の有無を問わず I 型脊髄性筋萎縮症 (SMA) を有する乳幼児患者の治療を適応とすることを想定している。

SMA は常染色体劣性の遺伝性疾患である。SMA の原因は、SMN1 遺伝子の両アレル性欠失又は欠損により、運動ニューロンの生存に重要な SMN タンパクの量が減少することである。SMN1 は SMN タンパクを産生する主要な遺伝子である。SMA 患者は臨床像に応じて主に IV グループに分類することができ、その重症度は SMN2 のコピー数によってほぼ決定される。I 型 SMA は、乳児死亡の第一の遺伝的要因である。全タイプの SMA が、SMN タンパクの喪失又はレベル低下と関連している。

AVXS-101 は実験動物において、静脈内投与後に血液脳関門を通過することが示されている。本申請において予定している治療法は、体重 2.6～8.5 kg の乳幼児に AVXS-101 製剤を単回点滴静注 (IV) するというものである。AVXS-101 点滴静注用製剤は 20 mM Tris 緩衝液、イオン安定化剤 (200 mM NaCl、1 mM MgCl₂) 及び 0.001% プルロニック F-68 (ポロキサマー) を含み、1.1E14 vg/kg の用量で投与される予定である。

このベクターコンストラクトの遺伝子構造を図 1 に示す。また、2 つのうち 1 つの AAV 由来の逆位末端反復配列 (ITR) を改変することで導入遺伝子の分子内アニーリングを促進し、導入遺伝子の二本鎖を形成することにより、転写可能な状態にしている。この改変 ITR は自己相補的 (sc) ITR と呼ばれ、導入遺伝子が転写され、その結果タンパクが産生される速度が大幅に速くなることが示されている。

図 1. AVXS-101 ベクターコンストラクトの遺伝子構造



2.6.2 薬理試験の概要文

目次

目次	1
表一覧	1
図一覧	2
1. まとめ	3
2. 効力を裏付ける試験	8
2.1. AVXS-101 を用いた <i>in vivo</i> 薬理試験	11
2.1.1. PND1 新生仔マウスを用いた AAV9 の導入効率試験	11
2.1.2. SMN Δ 7 疾患モデルマウスを用いた <i>in vivo</i> 有効性試験	13
2.1.3. SMA 疾患マウスモデルにおける脳室内投与による形質導入及び有効性試験	13
2.1.4. 新生仔及び幼若サルを用いた CNS 形質導入効率試験	16
2.1.5. 新生仔ブタを用いた scAAV9.CB.GFP ベクターの直接脳室内投与による CNS 形質導入及び遺伝子発現解析	21
2.1.6. 幼若ブタ疾患誘発モデルにおける髄腔内投与の有効性試験	23
2.1.7. 幼若サルを用いた GFP 発現 AAV9 ベクターによる髄腔内投与形質導入試験	27
3. 副次的薬理試験	30
3.1. SMN Δ 7 マウスの心不全モデルを用いた AVXS-101 の有効性試験	30
4. 安全性薬理試験	32
5. 薬力学的薬物相互作用	32
6. 考察及び結論	32
7. 図表	32
8. 参考文献	33

表一覧

表 1 :	AVXS-101 又は関連 scAAV9 ベクターを用いて完了している非臨床薬理試験	7
表 2 :	SMA のクラス及び重症度	8
表 3 :	SMN Δ 7 マウスを用いた AVXS-101 及び scAAV9.CB.GFP の CSF 投与試験のデザイン	14
表 4 :	幼若ブタの SMN ノックダウンモデルにおける AVXS-101 の有効性試験	23

図一覧

図 1 :	<i>SMN1</i> 及び <i>SMN2</i> の遺伝子構造と, <i>SMA</i> 患者における欠損.....	9
図 2 :	1, 2, 及び 3 型 <i>SMA</i> 患者の Kaplan-Meier 生存曲線	10
図 3 :	scAAV9.CB.GFP 投与マウスの腰部脊髄への形質導入	12
図 8 :	<i>SMNΔ7</i> マウスにおける生存率に対する AVXS-101 単回脳室内投与の影響.....	15
図 9 :	カニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP ベクター投与後の腰部脊髄の GFP 免疫 蛍光検査.....	17
図 10 :	scAAV9.CB.GFP を全身投与されたカニクイザルの腰部脊髄前角における GFP mRNA.....	18
図 11 :	scAAV9.CB.GFP を投与したカニクイザルの器官及び筋肉中の GFP 発現.....	19
図 12 :	カニクイザルの脊髄における緑色蛍光タンパク質の発現.....	20
図 13 :	scAAV9.CB.GFP を静脈内投与した 3 歳のサル脳の緑色蛍光タンパク質に関 する免疫組織化学的染色.....	21
図 14 :	scAAV9.CB.GFP ベクター投与後の新生仔ブタ脊髄の組織学的検査及び免疫組 織化学検査.....	22
図 15 :	scAAV9-shSMN (上図) 及び AVXS-101 (下図) のベクターマップ	23
図 16 :	<i>SMA</i> ブタにおける電気生理学的所見及び AVXS-101 投与による改善.....	24
図 17 :	<i>SMN</i> shRNA ベクター投与仔ブタにおける運動ニューロン欠損に対する AVXS- 101 の影響.....	26
図 18 :	1 歳のカニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP による脊髄運動ニューロンへの 形質導入.....	28
図 19 :	カニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP ベクターの直接髄腔内投与後の組織分 布	29
図 20 :	野生型マウス, 対照 <i>SMA7</i> マウス, 及び AVXS-101 を投与した疾患マウスにお ける心電図検査.....	31

1. まとめ

AVXS-101 は、I 型脊髄性筋萎縮症 (SMA) と診断された小児患者の治療を適応とする、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー／ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーター (CB) による制御下でヒト Survival motor neuron (SMN) 遺伝子を含む、非増殖性の遺伝子組換えアデノ随伴ウイルスベクターセロタイプ 9 (AAV9) である。AVXS-101 は機能性 SMN1 遺伝子をもたず SMN2 遺伝子コピー数が 2 のみである I 型 SMA の患者に対して、単回点滴静脈内投与することが予定されている、遺伝子治療の生物製剤である。

SMA は染色体 5q13 上の SMN1 遺伝子の欠失または微小変異により引き起こされる常染色体劣性遺伝疾患である。SMA の原因となる SMN1 遺伝子の欠失パターンとしては、SMN1 遺伝子のホモ接合型の欠失が約 95% を占め、その遺伝子欠損部位は SMN1 遺伝子上のエクソン 7 単独又はエクソン 7 及びエクソン 8 両部位であることが報告されている (Lefebvre et al. 1995)。残り約 5% の欠失パターンとして、SMN1 遺伝子の片側対立遺伝子がエクソン 7 単独又はエクソン 7 及びエクソン 8 両部位の欠失をきたし、反側対立遺伝子に微小変異を有するヘテロ接合型変異がある。微小変異部位としては、Alias らは高頻度変異部位として SMN1 遺伝子エクソン 3 の c.399_402delAGAG の変異を報告しており、その他様々な変異部位が報告されている (Alías et al. 2009, Yamamoto et al. 2014)。SMN1 遺伝子のヘテロ接合型欠失の場合には、SMN1 遺伝子のコピー数が 1 であり、SMA 疾患の重症度は SMN2 遺伝子のコピー数のみだけでなく、SMN1 遺伝子内変異の種類や位置に影響されることが示唆されている (竹内 他 2018)。また、両親が同じ変異を有している必要があり頻度は極めて低いものの、両側にホモ接合型の微小変異を有するパターンが考えられる。この場合は、SMN1 遺伝子のコピー数が 2 となり、疾患の重要性との相関はほとんど報告されていない。

また、4~5% の SMA 患者では、染色体 5q 領域以外の遺伝子が関連して SMA が発症しており (Wirth et al. 1999)、SMN1 遺伝子以外の遺伝子異常として IGHMBP2, GARS, HSP22, HSPB1, UBE1, DCTN1, VABP, BSCL2, SCO2, AR 及び TRPV4 遺伝子等の異常に起因して発症した SMA 及び各原因遺伝子の神経筋接合部における機能異常が報告されている (Wee et al. 2010)。各原因遺伝子により発現する異常タンパク質は多様であるが、SMA 病態の発症には総じて神経筋結合部のシナプス構造異常あるいはシナプス前細胞の細胞骨格異常及びシナプス小胞放出の減少を含む機能異常が関与していると考えられる。

SMA 患者は臨床像に応じて主に IV グループに分類される。I 型 SMA は新生児期の死亡の主な遺伝的要因になっており (Smith et al. 2007)、現在、より軽度で乳児型以外の SMA 用に市販されている治療薬はスピンラザ®のみである。しかしこの薬物は、比較的早期に発症した新生児期の患者を適応としておらず、さらに効果を維持するためには 4 ヶ月ごとの髄腔内投与を繰り返す必要がある。I 型 SMA の診断は、臨床症状及び遺伝子検査の組合せにより行われ、遺伝子検査では SMN1 遺伝子の欠失とバックアップ遺伝子である SMN2 遺伝子のコピー数を確認する。一般的に、SMN2 遺伝子のコピー数は疾患の重症度と関わっており、SMN2 遺伝子のコピー数と脊髄の運動神経細胞内で機能を有する SMN タンパク質の量は相関関係にあることが推察されている (Lefebvre et al. 1997)。したがって、SMN2 遺伝子のコピー数が多い方が重症度は低い。

SMN2 遺伝子のコピー数以外に SMA の重症度に関わる因子としては、疾患修飾因子 (NAIP, SERF1A, PLS3, CORO1C, NCALD 等) 及び SMN2 c.859G>C における点変異があげられる。NAIP 及び SERF1A は SMN1 の近接遺伝子で SMN2 遺伝子と同様にコピー数が SMA の重症度と逆相関する。PLS3 は女性に特異的な疾患修飾因子であり、コピー数が SMA の重症度と逆相関する。SMA 病態における異常なエンドサイトーシスを CORO1C が抑制する一方、NCALD が進行させることが報告さ

れている (Anderton and Mastaglia 2015, Groen et al. 2018)。また, SMN2 c.859G>C における点変異は重症度が軽くなることが知られている (Prior et al. 2009)。

上記より, AVXS-101 開発の臨床的意義は, 中枢神経系 (CNS) における SMN タンパクの発現量及び活性を増加させることである。

SMA の原因はヒト SMN タンパクの欠損であるとされており, AVXS-101 はその SMN タンパクをコードしている。SMN はあらゆる細胞に遍在的に発現されている 38 kD のタンパク質であり, RNA 代謝及びスプライシングに関与し, さらに運動神経細胞においては, 生存及び機能維持, 神経変性に対する保護等を含む複数の経路に関与している。それぞれの機能が複合的に働くことで, 正常な運動神経細胞機能の維持に寄与していると考えられる。以下に SMN タンパク質の機能についての詳細を示す。SMN タンパク質は SMN 複合体の構成要素であり, SMN 複合体は核内低分子リボ核タンパク (snRNP) の形成及び RNA 代謝及びスプライシングに関与する (Eggert et al. 2006, Li et al. 2014)。SMN 複合体によってプロセッシングを受ける RNA 分子種の全容は明らかにされておらず, 正確な機能は不明な点も多い。RNA スプライシングを受ける分子の一つとして, 神経細胞維持に重要な E1 酵素 UBA1 があり, SMA モデルマウスの脊髄において Uba1 の mRNA スプライシング異常によりユビキチンシステムを介したタンパク分解が破綻し, 運動神経細胞の神経回路形成障害を引き起こした (Wishart et al. 2014)。SMN タンパク質は, 神経細胞のアポトーシスの制御因子としても作用することで運動神経細胞の生存及び維持に関与する (Kerr et al. 2000)。特に, 強力なアポトーシス誘導物質であるカスパーゼ 3 切断及び活性化を遮断することにより, アポトーシスを抑制することが報告されている (Anderton et al. 2011)。さらに, SMN タンパク質は運動神経細胞の軸索伸長に重要な役割を果たしている。McWhorter らは, ゼブラフィッシュにおける SMA モデルを用いた実験により, SMN タンパク質が運動神経細胞軸索の運動性を規定していることを示した

(McWhorter et al. 2003)。Rossoll らは, SMA マウスモデルから単離した運動神経細胞が, 正常な生存能を保ちながらも軸索伸長の減少を認められたこと, SMN タンパク質を欠損した運動神経細胞における軸索伸長の減少は, 神経軸索先端の成長円錐上で発現量が低下していた β アクチンとの hnRNP を介した相互作用に起因していることを示唆した (Rossoll et al. 2003)。Nolle らは, SMN タンパク質がプロフィリン 2a と結合することで, Rho シグナルを介したアクチン制御系の破綻を防ぎ, 正常な軸索伸長に寄与していることを報告した (Nolle et al. 2011)。また, SMN タンパク質の神経変性に対する作用として, SMA マウスモデルにおいて JNK3 を阻害することで運動神経細胞の脱落が抑制し運動機能が改善したことから, SMN タンパク質が JNK3 の上流シグナルとして神経変性保護に寄与していることが示唆されている (Genabai et al. 2015)。初期の研究は, SMA に対する SMN 遺伝子治療の開発のため, AAV9 ベクターコンストラクトの使用に重点がおかれていた。AAV9 に関して公表されている文献に基づく, AAV9 はマウス, ラット, ネコ, ブタ, 及びサルといった多数の動物種の組織に形質導入することができ, 治療効果を担うタンパク質を高濃度で産生できる (Duque et al. 2009, Foust et al. 2009, Bevan et al. 2011, Duque et al. 2015, Jackson et al. 2015)。

AAV9 は, AAV6 及び AAV8 を含む数種のセロタイプのうちの 1 つであり, 単回の静脈内投与又は腹腔内投与の後, 骨格筋及び心筋等の複数の組織にわたり広範に形質導入することができる

(Blankinship et al. 2004, Wang et al. 2005, Inagaki et al. 2006, Nakai et al. 2005, Pacak et al. 2006)。これらのセロタイプはすべて血管内皮細胞のバリアを効率的に通過することが明らかになっているものの, AAV9 は他の AAV セロタイプに比べて比較的容易に脳内に移行する (Cearley and Wolfe 2006)。AAV9 は AAV2 及び AAV8 と同様にラミニン受容体を利用するが, AAV9 はその他にも, 細胞接着, 内在化, 及び形質導入のための未知の受容体を利用している可能性がある (Akache et al. 2006)。したがって AAV9 は, 多様なカプシドの立体構造及び標的細胞相互作用をもっていると考えられる。このような独自の特性を踏まえ, 我々は, 血液脳関門 (BBB) が十分に発達していない新生仔マウス, 及び BBB が完全に確立した成熟マウスに対して AAV9 セロタイプを静脈内投与したとき, 遺伝子を CNS 内に効率的に導入できるか否かを検討した。また, 正常マウス及び SMA 疾患モデルのマ

ウスを用いた非臨床試験，並びに幼若サル及びブタを用いた非臨床試験が完了している。さらに，*SMN17* 疾患モデルマウスの心機能に対する AVXS-101 の副次的影響を検討する追加試験も行った。

初期の静脈内投与試験では，緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する同じ CMV-ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーター（scAAV9.CB.GFP）を利用した GFP 発現 AAV9 コンストラクトを使用した。生後 1～2 日（PND1～2）の C57BL/6 マウスに scAAV9.CB.GFP を静脈内投与した後，主にニューロンに形質導入されたことを観察した。生後 1～2 日（PND1～2）での静脈内投与では主にニューロンに導入されたが，成熟マウス（約 70 日齢）に同じベクター用量を静脈内投与したときには主にグリア細胞への導入が認められ，約 5%～10%がニューロンに導入された。形質導入される細胞種の割合は，明らかに投与時の日齢に依存すると考えられ，投与時のマウスの日齢が進むほど，導入される細胞種は主にニューロンから主にグリアへと移行し（新生仔マウスでは 70%超，成熟マウスでは約 5%～10%），発達の極めて初期に投与することの重要性が明確にされた。

SMN17 マウスを用いて脳室内（ICV）に直接投与した試験において，AVXS-101 は *SMN17* マウスの生存期間を有意に延長させた。AVXS-101 の脳室内投与により CNS から脊髄に及ぶ広範な中枢神経系領域への形質導入が生じ，脊髄の頸・胸・腰部における用量依存的な発現が認められ，その発現は腰部で最も高かった。

同様に PND1，PND30，及び PND90 の新生仔カニクイザルに 1～3 E14 vg/kg の用量範囲の scAAV9.CB.GFP を静脈内投与したときは，主にニューロンに形質導入された。導入遺伝子の発現は，脳，骨格筋，心筋，及びほとんどの内臓器官にも検出された。この GFP ベクターを用いた発現データから，少なくとも生後 90 日間は運動ニューロンを標的として形質導入できることが確認された。3 歳のカニクイザルに scAAV9.CB.GFP ベクターを下行大動脈を介して静脈内投与した結果からも，比較的高年齢の幼若サルでは成熟サルに比べて著明に低用量で運動ニューロンを標的として形質導入できることが確認された。この際にも，脳内の導入遺伝子の発現は皮質領域，外側膝状体，中脳，橋，及び髄質で顕著に高いことが認められたが，マウスではニューロンに形質導入されたこととは対照的に，サルでは主にグリア細胞に形質導入された。

新生仔ブタ（5 日齢）にこの scAAV9.CB.GFP ベクターを用いた追加試験から，髄腔内（IT）経路による CNS への直接投与の有用性が確認された。髄腔内又は大槽内に直接投与したとき，GFP の発現は背根神経節のみならず脊髄の白質及び灰白質でも確認された。この経路を用いたとき広範な運動ニューロンへの形質導入が認められ，全レベルの脊髄の前角ニューロンに AAV9 ベクターが導入された。脳内では，小脳プルキンエ細胞，髄質神経線維，及び個々の核（オリブ核等）で遺伝子の高発現が認められた。脳のその他の部位における発現は，髄膜表面近くの散在した細胞に限局しており，CNS 以外の組織では意義のある発現又は形質導入は認められなかった。このことは，髄腔内又は大槽内投与後にはベクターの大半が CNS に局在することを示唆していた。

また AVXS-101 は，ブタ SMA 誘導モデルにおいても疾患重症度を軽減させた。幼若ブタに SMN をノックダウンする低分子ヘアピン型 SMN（shSMN）ベクターを投与し，標的細胞におけるブタ SMN タンパクを特異的に低減させることで，ヒト疾患の病因を模倣した SMA 様症候群を誘発した。このベクターの投与は，形質導入したブタにおける SMA の徴候の発現及び病因に関連する運動ニューロン中の SMN タンパクを，著しく減少させた。発症前に AVXS-101 を投与したブタでは，SMA の臨床症状又は重度の後肢脱力は発現しなかった。全体として AVXS-101 は，shSMN ベクター投与の骨格筋系への有害な電気生理学作用を軽減するようであった。以上のことから，この新生仔ブタモデルにおける電気生理学的マーカー及び筋力の低下は SMN 依存性であることを示唆していた。また，新生仔ブタにおいて，出生後の運動ニューロン中の SMN mRNA を約 70%減少させることは，SMA 様表現型を誘発するのに十分であった。さらに，発症前後に AVXS-101 を投与することで，ブタ SMA 誘導モデルにおける臨床症状及び電気生理学的作用を著しく改善した。

2.6.2 薬理試験の概要文

さらに幼若サルを用いた試験から、scAAV9.CB.GFP ベクターによる CNS 内のニューロンへの形質導入の可能性が確認された。AAV9.GFP ベクターコンストラクトの髄腔内投与により、CNS 全体（脳及び脊髄）にわたる導入及び GFP 遺伝子発現が認められた。投与中サルを倒立させてトレンデレンブルグ体位に 5～10 分間保持したとき、形質導入効率はさらに改善された。加えて、髄腔内投与後の scAAV9.CB.GFP DNA の体内分布はかなり広範であったものの、RNA 発現は CNS、副腎、骨格筋、及び肝臓で最も高く、他の内臓器官における RNA 発現量は著しく低かった。

SMN17 マウスに AVXS-101 を投与することで、これらのマウスに認められていた心臓障害に対する改善作用を検討した。無処置 SMA マウスでは、生後 14 日までに徐脈及び拡張型心筋症が発現し、早期の生後 7 日目には比較的軽度の異常が検出されていた。AVXS-101 の投与により無処置の SMN17 マウスに比べ、PND14 における左心室心筋重量が増加した。投与された SMN17 マウスでは、拡張と壁菲薄化の両方が改善し、野生型の数値に向けて回復した。これらのマウスでは PND1 での AVXS-101 投与により、これらの症状が部分的に改善した。この副次的な試験から、マウスにおける SMN の欠乏は早期かつ持続的な心機能不全をもたらすこと、また、AVXS-101 の静脈内投与により SMN タンパク質を供給することで、このような不全を部分的～完全に改善できることが明らかとなった。AVXS-101 の非臨床薬理試験の要約を [表 1](#) に示す。

表 1 : AVXS-101 又は関連 scAAV9 ベクターを用いて完了している非臨床薬理試験

Study Title	Study Number	Laboratory Name and Location	CTD Reference
Pharmacology Studies			
Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes	Foust et al. 2009	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.1 Tabular Summary: 2.6.3
Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: A Dose-response study in mice and nonhuman primates	Meyer et al. 2014	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.3 Tabular Summary: 2.6.3
Systemic Gene Delivery in Large Species for Targeting Spinal Cord, Brain, and Peripheral Tissues for Pediatric Disorders (<i>NHPs</i>)	Bevan et al. 2011	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.4 Tabular Summary: 2.6.3
Systemic Gene Delivery in Large Species for Targeting Spinal Cord, Brain, and Peripheral Tissues for Pediatric Disorders (<i>Piglets</i>)	Bevan et al. 2011	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.5 Tabular Summary: 2.6.3
A Large Animal Model of Spinal Muscular Atrophy and Correction of Phenotype	Duque et al. 2015	Ohio State University Medical Center, Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.6 Tabular Summary: 2.6.3
Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: A Dose-response study in mice and nonhuman primates	Meyer et al. 2014	National Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.2.1.7 Tabular Summary: 2.6.3
Early heart failure in the SMNΔ7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery	Bevan et al. 2010	National Children's Hospital Columbus, OH	Summary: 2.6.2.3.1 Tabular Summary: 2.6.3

各非臨床試験で使用された被検製品は2種類であり、1つは本品と同じゲノムの被検製品を使用している scAAV9.CBA.SMN、もう1つは発現遺伝子として *SMN* 遺伝子の代わりに *GFP* 遺伝子を組み込んだ scAAV9.CBA.GFP を用いている。なお、scAAV9.CBA.SMN については、申請製品との品質特性の同等性/同質性については検討しておらず、不明である。

2. 効力を裏付ける試験

脊髄性筋萎縮症（SMA）は染色体 5q13 上の *SMN1* 遺伝子の欠失により引き起こされる常染色体劣性疾患である（[Lefebvre et al. 1995](#)）。SMA 患者は臨床像に応じて主に IV グループに分類することができ、その重症度は *SMN2* のコピー数によって決定される（表 2）。I 型 SMA は新生児期の死亡の主な遺伝的要因になっているが、それに対する治療薬は今のところ得られていない（[Smith et al. 2007](#)）。

表 2: SMA のクラス及び重症度

SMA Type	Age at Onset	Highest Function	Natural Age at Death	SMN2 Copy Number
0	Prenatal	Respiratory Support	< 1 month	1
I	0-6 months	Never sit	< 2 years	2
II	<18 months	Never stand	>2 years	3-4
III	>18 months	Stand alone	Adult	3-4
IIIa	18 mon-3 yrs	Stand alone	Adult	3-4
IIIb	>3 years	Stand alone	Adult	4
IV	>21 years	Stand alone	Adult	4-8

SMA 治療の取り組みはこれまで、SMN 発現の促進を目的とした低分子化合物の薬剤が中心であった。これにはバルプロ酸、酪酸ナトリウム、フェニル酪酸、及びトリコスタチン A 等の薬剤からなるヒストンデアセチラーゼ阻害剤が含まれる。これらの薬剤は SMA モデルにおいて *SMN2* プロモーターを活性化し、その結果として完全長 *SMN* タンパクを増加させる（[Riessland et al. 2010](#), [Dayangac-Erden et al. 2011](#)）。しかし公表されているデータにあるように、これらの数種の薬剤（特にフェニル酪酸、バルプロ酸、及びヒドロキシ尿素）を使用した臨床試験からは、臨床的ベネフィットは示されていない（[www.ClinicalTrials.gov](#) 及び [Darbar et al. 2011](#)）。エクソン 7 を包含するよう *SMN2* のスプライシングを変化させる原理を中心として、その他の治療法も検討されている。このような *SMN2* スプライシングアプローチを検討するため、小動物を用いてアンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）を脳室内（ICV）投与する研究が実施されている（[Williams et al. 2009](#), [Hua et al. 2010](#)）。上記の考えの延長として、SMA マウスに二機能性の治療用 RNA 及び RNA トランススプライシング法を用いた研究も行われている（[Baughan et al. 2006](#), [Coady et al. 2008](#), [Coady and Lorson 2010](#)）。

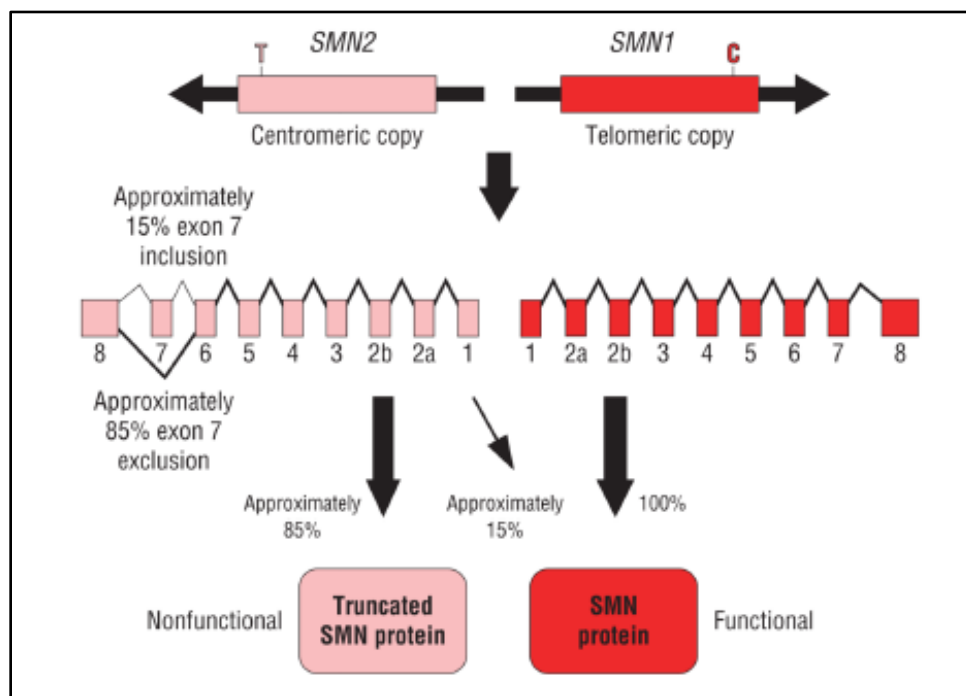
Survival Motor Neuron（SMN）はあらゆる細胞に遍在的に発現している 38 kD のタンパク質であり、核内低分子リボ核タンパク質（snRNP）及びその他のリボ核タンパク質（RNP）複合体の構成することによって RNA 代謝に重要な役割を果たしている。ヒトでは各対立遺伝子上に、テロメア型（*SMN1*）とセントロメア型（*SMN2*）という 2 つの *SMN* 遺伝子が存在している（図 1, 上図）。*SMN1* 遺伝子の転写により、SMN タンパクをコードする完全長メッセンジャー RNA（mRNA）が生成される。*SMN2* 遺伝子は、840 位で C から T にヌクレオチド置換が生じていることを除いて *SMN1* と同一である。このような置換により、転写中の大部分でエクソン 7 が排除される。その結果生じる切断型タンパク質は機能をもたず、速やかに分解される。しかし、*SMN2* mRNA の約 10%~15% は確かにエクソン 7 を包含し、完全長の *SMN* タンパクをコードする（図 1, 下図）。

SMN1 遺伝子は、エクソン 7 領域にて CAGACAA の短い配列が高親和性の SF2/ASF 結合モチーフとなり、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）複合体の安定化に必要な分子（U2 snRNP/U2

AF35/U2 AF65 複合体, U1 snRNP/70K 複合体等) が適切に局在することで, エクソン 7 隣接領域での正確なスプライシングが起こりエクソン 7 を含む完全長の SMN タンパク質をコードする mRNA ができる。一方で, SMN2 遺伝子では 840 位のヌクレオチドが C から T に置換されていることにより, エクソン 7 領域の配列モチーフが TAGACAA となることで, SF2/ASF ではなく hnRNP-A1 が結合する。これにより Sam68, PTB/FUSE 等のタンパク質とともに U2 snRNP/U2 AF35/U2 AF65 複合体や U1 snRNP/70K 複合体の結合を阻害することで, SMN1 遺伝子同様の適切な位置における選択的スプライシングが起こりにくくなる結果, 約 90% がエクソン 7 領域のエクソンスキッピングがおきた不完全長の SMN タンパク質をコードする mRNA, 約 10-15% が完全長の SMN タンパク質をコードする mRNA となる (Coady and Lorson 2011)。

エクソン 7 を含む完全長 SMN タンパクと比較してエクソン 7 を含まない mRNA から産生された SMN タンパク質 (以下, SMN Δ 7) では C 末端の 16 個のアミノ酸が欠損し, 代わりにエクソン 8 にエンコードされた EMLA が付与されている (Le et al. 2005)。Cho らは, エクソン 7 を欠損した mRNA 及び完全長の mRNA による cDNA を用いて, SMN Δ 7 は完全長 SMN タンパク質と比較して速やかに分解されることを示した。さらに, EMLA 及びエクソン 6 領域の YG box の局在によって SMN Δ 7 の安定性が低下してタンパク分解が促進されることを同定した (Cho and Dreyfuss 2010)。

図 1: SMN1 及び SMN2 の遺伝子構造と, SMA 患者における欠損



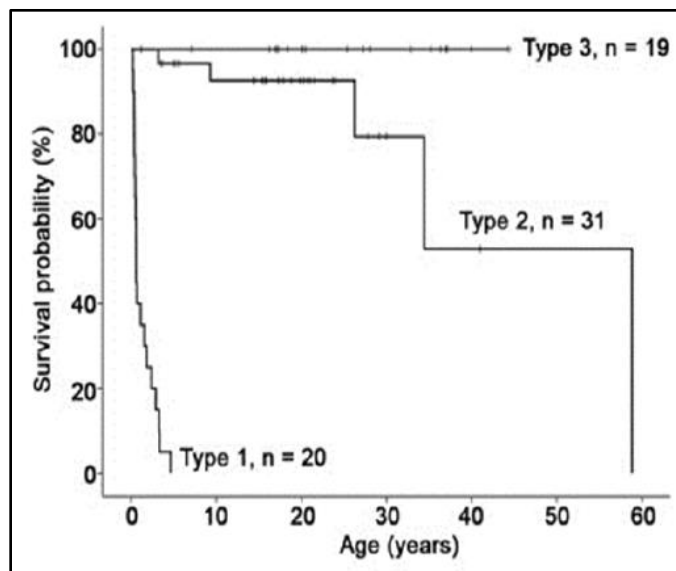
SMA 患者では, 両対立遺伝子上の SMN1 コピーに欠失が生じている。SMN2 遺伝子にはエクソン 7 のスキッピングに至る変異があり, 不安定な切断型タンパク質が産生される。SMN2 mRNA の一部からは完全長の SMN 表現型が生じる。SMN2 のコピー数が多いほど, 表現型は軽度となる (Kolb and Kissel 2011 から図を引用)。

SMA の根底にある疾患機序については, 2 つの仮説が提案されている。第一には, snRNP の障害が, 運動ニューロンの回路に重要な特定の遺伝子のスプライシングに影響している可能性がある (Eggert et al. 2006, Costford et al. 2007)。第二に, SMN 自体が軸索において機能をもっており, し

たがって SMN の濃度低下が軸索に異常を引き起こすというものである (Rossoll et al. 2003, McWhorter et al. 2003, Fan and Simard 2002)。

最終的に SMA の予後には個人差があり、疾患表現型及び遺伝子コピー数に基づいて IV タイプ (I, II, III, 及び IV 型) に区分される。どの SMA 型に属するかの判断は、自然歴研究から収集された情報に基づいて行われている (Farrar et al. 2012)。一般的に SMN2 遺伝子のコピー数が病型を決定することが確認されているが (表 2), SMN2 遺伝子のコピー数以外に SMA の重症度に関わる因子として疾患修飾因子 (NAIP, SERF1A, PLS3, CORO1C, NCALD 等) 及び SMN2 c.859G>C における点変異が報告されており、これら要因により SMN2 遺伝子のコピー数が同じであっても患者により異なる病型を有する可能性がある。また、SMN2 遺伝子から産生される完全長の SMN タンパク質は約 10~15%とされており、スプライシング調節機構において、SMN 遺伝子と協働する hnRNP-A1, Sam68 及び PTB/FUSE 等のタンパク発現量の違い等によっても SMN2 遺伝子から産生される完全長の SMN タンパク質発現量に違いが生じ、SMN2 遺伝子のコピー数が同じ場合における病型の違いに寄与することが推察される。一方で、SMN1 遺伝子の片側対立遺伝子に微小変異を有するヘテロ接合型変異の場合は、SMA 疾患の重症度は SMN1 遺伝子内変異の種類や位置に影響されることが示唆されている。これまでに完了している臨床試験において対象集団としている SMN2 が 2 コピーの I 型 SMA 患者に関しては、疾患の重症度及び自然歴に対する知見が十分に確立されている。ある研究において、I 型 SMA 患者の平均発症年齢はわずかに 2.1 ± 2.2 ヶ月齢であり、生存期間中央値は 7.4 ヶ月であった。全例が呼吸不全により死亡した (Farrar et al. 2012)。生存期間を決定する最も強い予測因子が発症年齢である。このことは、発症が早いほど早期に死亡することを意味している。生後 3 ヶ月以内の発症例は、普遍的に予後不良である (Farrar et al. 2012)。このことは、SMN 遺伝子補充療法の最適な時期は、乳幼児期であることを示唆している。以下の図 2 に示す Kaplan-Meier 生存曲線は、I 型 SMA 患者が顕著に予後不良であることを示している。

図 2: I, II, 及び III 型 SMA 患者の Kaplan-Meier 生存曲線



I ~ III 型 SMA 患者の Kaplan-Meier 生存曲線。I 型 SMA 患者における顕著な予後不良は、SMN2 が 2 コピーのみの患者と関連している。生後 21 ヶ月を超えて生存する患者はほとんどいない。

2.1. AVXS-101 を用いた *in vivo* 薬理試験

本項に示す以下の試験は、AVXS-101 の治療効果を裏付ける非常に期待できる結果を示している。初期の試験では、CNS への形質導入に適切な期間の検討を中心に、AAV9-GFP ベクターを正常な新生仔及び成熟マウスに静脈内投与してその比較を行った。これらの試験を 2.1.1 項に要約した。

SMA の SMN1/7 モデルマウスを用いて、治療ベクター又は関連する GFP 発現ベクターを直接 CNS へ投与し、用量反応関係を評価した。試験では生存期間、機能的効果、体重変化、及び CNS ニューロンを標的とする形質導入効率を中心に検討した。これらの試験を 2.1.3 項に記載した。

サルに scAAV9.CB.GFP ベクターを静脈内投与し、CNS 導入効率及び導入細胞種の評価も行った。生後 1, 30, 90 日又は 3 歳の新生仔又は幼若サルに投与し、蛍光染色によって導入効率及び細胞を標的とする形質導入を明らかにした。本試験を以降の 2.1.4 項に要約した。

AAV9 ベクターが、他の大型動物モデルの細胞に形質導入され発現するかを検討するため、新生仔ブタに AAV9-GFP ベクターコンストラクトを CNS へ直接投与し、AAV9 ベクターの導入効率及び発現特性も検討した。この一連の試験は 2.1.5 項に記載した。

幼若ブタを用いたこれら形質導入試験の結果を踏まえ、疾患を誘発した大型動物モデルを用いて AVXS-101 投与により疾患を改善できるかを検討した。幼若ブタに shRNA-AAV9-SMN ベクターを投与して SMA を誘発し、この疾患誘発モデルの疾患軽減に関する試験を行った。このブタモデルは 2.1.6 項に詳述した。

幼若サル（1 歳齢）に AAV9-GFP ベクターコンストラクトを用いた追加試験を実施し、このベクターコンストラクトの形質導入効率を最適化した。これらの試験を 2.1.7 項に要約した。

SMA マウスはその神経障害に加えて最終的に二次的な心臓障害を示すようである。3.1 項に述べた試験において、本モデルでの心臓への作用を評価し、AVXS-101 がこのような心臓における有害な影響を改善できるかを評価した。

まとめると、これらの試験は、SMN タンパクが SMA において機能的役割をもつこと、また、疾患モデルマウスにおいて本疾患の病因を改善し生存期間を有意に延長できる可能性を示した。また、静脈内及び CNS への直接投与によって新生仔又は幼若サルの CNS に形質導入できること、並びに SMA 誘発幼若仔ブタモデルにおいても疾患を改善できることを確認した。

2.1.1. PND1 新生仔マウスを用いた AAV9 の導入効率試験

試験の標題： 血管内 AAV9 投与は新生仔マウスのニューロンと成熟マウスのアストロサイトを選択的に標的として形質導入する。

試験番号： Foust et al. 2009

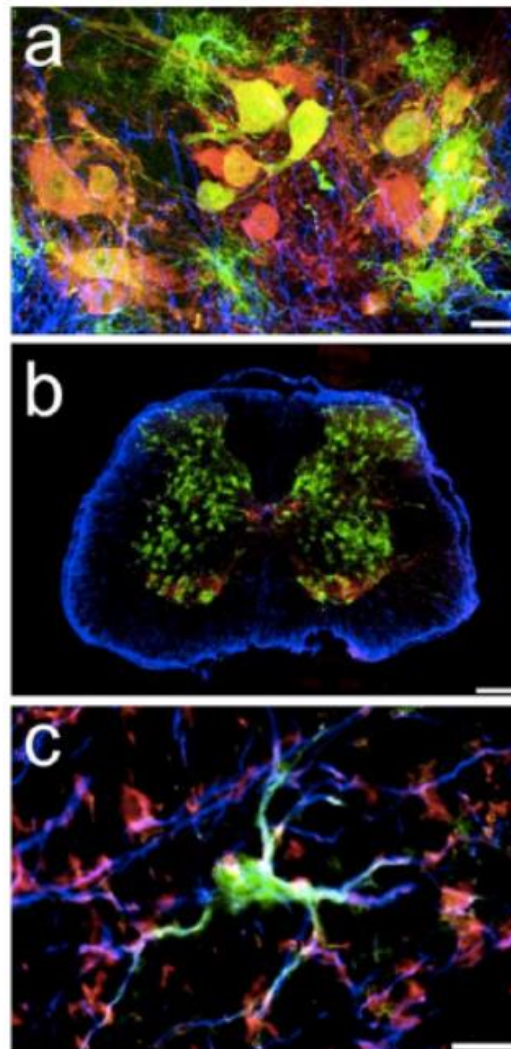
本試験は、新生仔及び成熟マウス（C57BL/6）において全身（静脈内）投与された AAV9 が血液脳関門（BBB）を通過できるか否かを評価することを目的とした。脳室内又は髄腔内経路で AAV を直接 CNS 投与することに比べ、静脈内投与は容易であると考えられた（Foust et al. 2009）。公表されている本試験では scAAV9.CV.SMN ベクターを使用していないが、代わりに類似したコンストラクトとして、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現させる同じ CMV-ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーターを利用したコンストラクト、すなわち scAAV9.CB.GFP を使用した。

生後 1~2 日（PND1~2）の C57BL/6 マウスに 4 E11 vg の scAAV9.CB.GFP を静脈内投与した後、主に（56%超）ニューロンに形質導入されたことを観察した。一方、成熟マウス（約 70 日齢）に同じベクターを 4 E11~4 E12 vg/マウスの用量で静脈内投与したとき、主にグリア細胞への形質導入が認められた。成熟マウスではニューロンの約 5%~10%に形質導入された。

形質導入された細胞種の割合は、投与時の動物の日齢に依存していた。PND1～2 のマウスに scAAV9.CB.GFP を静脈内投与したとき主にニューロンに形質導入され、1 例あたり 4 E11 vg (2.7 E14 vg/kg) を投与したとき、脊髄全体の運動ニューロンの 70%超が標的となった (図 3)。

しかし、ベクター投与時のマウスの日齢が進むと、形質導入細胞種が主にニューロンから主にグリアへと移行した (新生仔マウスで 70%超, 成熟マウスで約 5%~10%)。最終的に本試験から、CNS に対して効率的かつ比較的非侵襲的に遺伝子を投与する方法が明らかにされ、ニューロンへの形質導入が可能な標的期間が確立された。

図 3 : scAAV9.CB.GFP 投与マウスの腰部脊髄への形質導入



(a) PND1 の時点で投与されたマウス腰部脊髄の GFP (緑) 免疫組織化学検査。運動ニューロン (ChAT, 赤) には広範に形質導入されているが、アストロサイト (GFAP, 青) には形質導入されていない。(b) PND70 の時点で投与されたマウス脊髄の染色。灰白質全体で主にグリア細胞に形質導入されていることが分かる。(c) GFP (緑) が EAAT2 (赤) 及び GFAP (青) と共局在していることから、PND70 の時点で投与されたマウスでは導入遺伝子はアストロサイトで発現していることが分かる。

2.1.2. SMN Δ 7 疾患モデルマウスを用いた *in vivo* 有効性試験

該当なし

2.1.3. SMA 疾患マウスモデルにおける脳室内投与による形質導入及び有効性試験

試験の標題： AAV9 を介した SMA 遺伝子治療における単回 CSF 投与による導入効率の改善：
マウス及びサルを用いた用量反応性試験

試験の参考文献： Meyer et al. 2014

上記のとおり、ヒトでは完全長 SMN タンパクの欠損によって SMA が発現する。ヒトにはほぼ同一の SMN 遺伝子のコピー、すなわちテロメア型の SMN1 とセントロメア型の SMN2 の 2 つが存在する。SMN2 では、エクソン 7 のスキッピングを生じさせる C→T 置換がエクソン 7 において生じ、切断型で不安定な SMN が産生されることから、SMN2 自体では完全長のタンパクを十分量産生することができない。疾患重症度は SMN2 のコピー数と逆相関を示し、SMN2 のコピー数が多いほど完全長のタンパクが産生され、重症度の低い疾患表現型となる。

本試験ではデルタ 7 SMN (SMN Δ 7) と呼ばれる新規の SMA マウスモデル (*Smn*^{-/-}, SMN2^{+/+}, SMN Δ 7^{+/+} の FVB/N マウス) を利用した (Le et al. 2005)。本モデルでは、マウス SMN 遺伝子を欠失させ、ヒト SMN2 遺伝子のコピーがマウスゲノムに組み込まれている。さらに、ヒト SMN2 Δ 7 cDNA の複数のコピーがマウスゲノム内にタンデムに組み込まれている。ヒト SMN2 遺伝子により、SMN Δ 7 タンパク及び安定かつ持続的に発現する全長 SMN タンパク質を産生することができる。一方で、ヒト SMN2 Δ 7 導入遺伝子からは SMN Δ 7 タンパクのみが発現する。SMN Δ 7 タンパクは、エクソン 7 を含む完全長 SMN タンパク質と比較して C 末端の 16 個のアミノ酸が欠損し、代わりにエクソン 8 にエンコードされた 4 アミノ酸 (EMLA) が付与されている。SMN Δ 7 タンパクは、完全長 SMN タンパク質と比較して不安定であり、速やかに分解されるが、本タンパクにおいても SMN としての機能は保持されているため、本マウスモデルは 5 日前後の生存能を有する *Smn*^{-/-} SMN2^{+/+} の SMA マウスモデルよりも生存能が高く、生存日数は約 16 日間であることが報告されている。このモデルは脊髄運動ニューロンの進行性の喪失、神経筋接合部の異常及び筋萎縮といった、SMA の主要な表現型特性を示し、出生前又は重症 I 型 SMA の病態の一部を再現している。このモデルでは生後 9 日までに急速に発症し、PND13~16 の日齢範囲の末期まで体重が徐々に減少する。このモデルとヒト疾患の類似性に基づき、SMN Δ 7 マウスは主力モデルとなり、動物を用いた SMA 研究の標準となっている。したがって、遺伝子治療の候補薬である AVXS-101 の非臨床試験には、このモデルを利用した (Osbourne and Lutz 2010)。

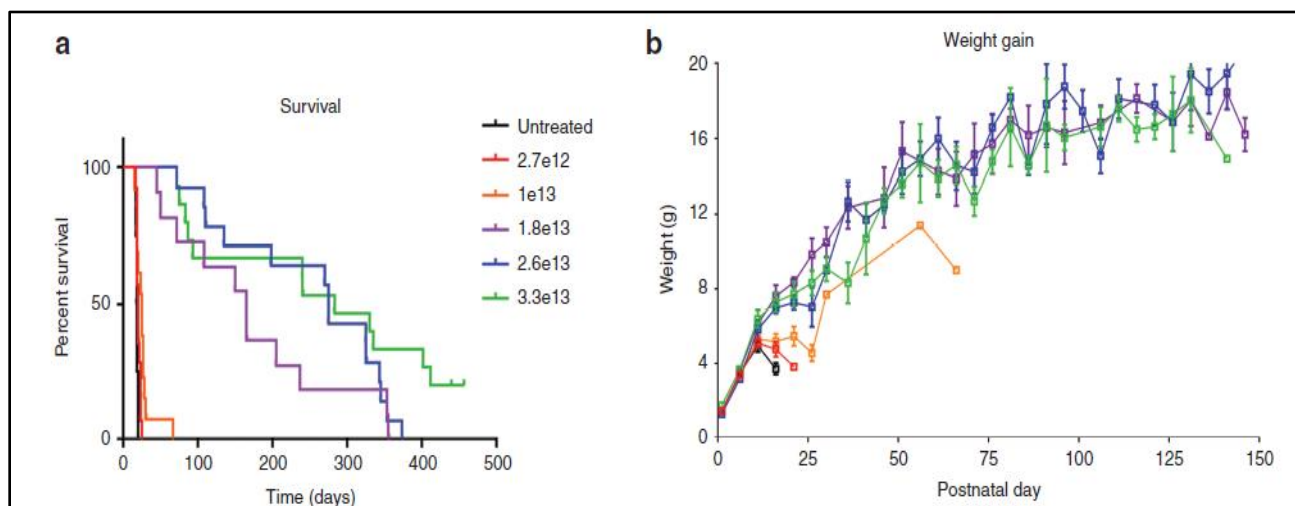
本試験は、さまざまな用量の AVXS-101 が、生後 1 日 (PND1) に単回脳室内投与された SMA Δ 7 マウス (*Smn*^{-/-}, SMN2^{+/+}, SMN Δ 7^{+/+} の FVB/N マウス) の生存率に及ぼす影響を検討し、また関連する scAAV9.CB.GFP コンストラクトによる CNS 中の脊髄運動ニューロンへの指向性を評価することを目的とした。行動及び生存率の解析のため、病態動物又はヘテロ接合同腹仔 (SMN^{-/-}, SMN2^{+/+}, SMN Δ 7^{+/+}又は SMN^{-/+}, SMN2^{+/+}, SMN Δ 7^{+/+}) に、PBS で希釈したさまざまな用量の AVXS-101 を投与した。1 群あたり 11~15 例の PND1 のマウスに、2.7 E12~3.3 E13 の用量範囲の AVXS-101 を単回脳室内投与した (表 3)。その他、脊髄へのベクター導入の評価のため、1 群あたりマウス 3 例からなる小規模の群に対して、以下に示すように同用量の対照 scAAV9.CB.GFP ベクター又は AVXS-101 を投与した。

生存状況及び体重増加量についてマウスを毎日モニターした。PND15 に、身体を横にさせて 30 秒以内に立ち直ることができるかを調べて、正向反射を試験した。PND30 にはオープンフィールドでの活動性解析を行った。

表 3 : SMA47マウスを用いた AVXS-101 及び scAAV9.CB.GFP の CSF 投与試験のデザイン

Group	ICV Treatment	Dose Level (vg/kg)	Number of Mice
Long-Term Survival Treatment Arm			
1	AVXS-101	2.7 E12	14
2	AVXS-101	1.0 E13	13
3	AVXS-101	1.8 E13	11
4	AVXS-101	2.6 E13	14
5	AVXS-101	3.3 E13	15
Spinal Cord Distribution Treatment Arm (d10)			
6	scAAV9.CB.GFP	2.7 E12	3
7	scAAV9.CB.GFP	1.0 E13	3
8	scAAV9.CB.GFP	1.8 E13	3
9	scAAV9.CB.GFP	2.6 E13	3
10	scAAV9.CB.GFP	3.3 E13	3
11	AVXS-101	2.7 E12	3
12	AVXS-101	1.0 E13	3
13	AVXS-101	1.8 E13	3
14	AVXS-101	2.6 E13	3
15	AVXS-101	3.3 E13	3

無処置マウス（生存期間中央値 17.5 日）と比較し、最高用量の AVXS-101 を投与したマウスの生存期間中央値は 282 日であった。次に低い 2 用量（ $2.6 \times E13$ 及び $1.8 E13$ vg/kg）の投与群の生存期間中央値は、それぞれ 274 日及び 165 日であった。最も低い 2 用量の生存期間中央値はそれぞれ 24 日と 19 日であり、無処置マウスの結果と有意差はなかった。全用量群で体重増加が認められたものの、高い方の 3 用量で記録された体重増加は同程度で、野生型マウスに比べ正向反射はほぼ完全に回復していた（図 8）。

図 8 : *SMNΔ7* マウスにおける生存率に対する AVXS-101 単回脳室内投与の影響

PND1 に AVXS-101 を単回脳室内投与した *SMNΔ7* マウスにおける生存率 (a) 及び体重増加量 (b) 。マウスの生存状態を 400 日間以上、体重への影響を投与後最長 150 日間観察した。

行動への影響に関しては、Day 30 の rear breaks 又は移動について、3 つの高用量と野生型マウスの間に差はみられなかった。

GFP ベクター投与マウスを用いた免疫蛍光検査から、全用量の投与により腰部脊髄に広範に形質導入されること、また高用量では頸・胸・腰部の運動ニューロンそれぞれの 46%、47%、及び 72% が標的となることが明らかとなった。さらに、*SMN* 又は GFP 遺伝子産物に関する mRNA 転写物発現量の比較を行い、mRNA 量の用量反応性は AVXS-101 と scAAV9.CB.GFP で非常に類似していることが確認された。このことから、この AAV9 ベクターコンストラクト中の同じプロモーターを使用するとき、GFP を使用することにより *SMN* 遺伝子発現パターンに近似できることが示唆された。

これらのデータから、髄腔内投与時の最小有効用量は 1.8 E13 vg/kg であること、また、最大の患者利益が期待される臨床目標の髄腔内投与用量は 3.3 E13 vg/kg であることが確認された。

scAAV9.CV.SMN の脳室内投与により CNS から脊髄に及ぶ広範な形質導入が生じ、脊髄の頸・胸・腰部において用量依存的な発現が認められ、その発現量は腰部が最も高かった。これらのデータは、以下に記載したカニクイザルを用いた同様の形質導入及び発現試験とよく関連していた。

2.1.4. 新生仔及び幼若サルを用いた CNS 形質導入効率試験

試験の標題： 小児疾患に対して脊髄、脳、及び末梢組織を標的とするための大型動物種（サル）における AAV9 の静脈内投与

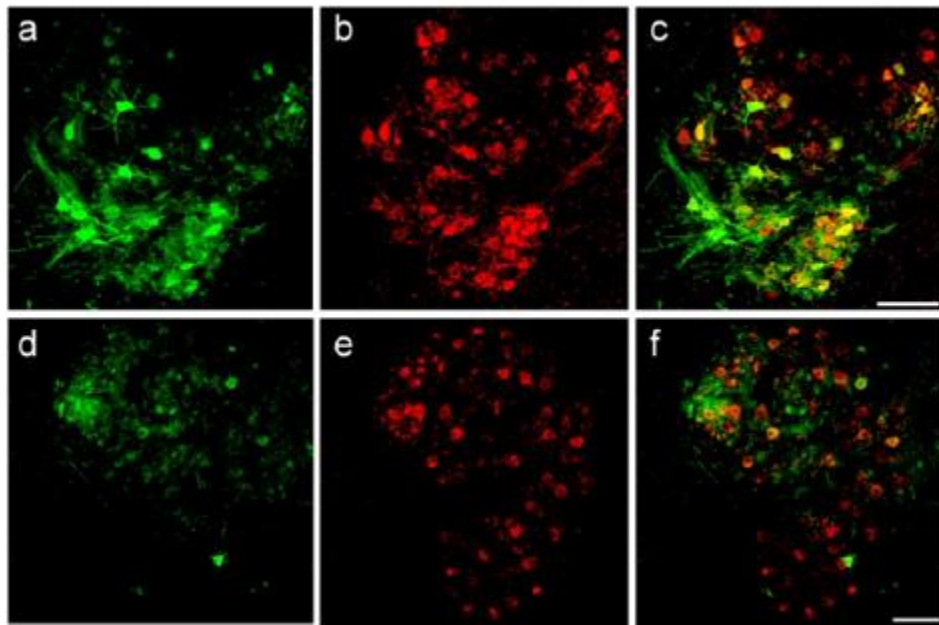
試験の参考文献： [Bevan et al. 2011](#)

SMA の遺伝子治療を確立する上で、マウスにおいて運動ニューロンへの指向性が得られる期間を特定していることは重要である。その目的のため、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) におけるこの治療目標期間の存在とそのパラメータを実験的に確定するさらなる試験を実施した。3 例のカニクイザルに、マウスに投与したものと同一用量で対照の GFP 発現ベクター scAAV9.CB.GFP (1~3 E14 vg/kg) を静脈内投与した。投与後 21~25 日に動物を安楽死し、各種組織中の GFP の形質導入を分析した。

PND1, PND30, 及び PND90 のカニクイザルに 1~3 E14 vg/kg の用量で scAAV9.CB.GFP を静脈内投与したとき、少なくとも生後 90 日間で主にニューロンへの形質導入（約 70%）が認められた。免疫蛍光検査により、導入遺伝子の発現は脳、骨格筋、心筋、及びほとんどの内臓器官にも検出された。この GFP 発現データから、少なくとも生後 90 日間は運動ニューロンへの形質導入が持続することが示された（図 9）。

別途行った試験において、3 歳のカニクイザル 1 例を用い、腹腔動脈にバルーンカテーテルを留置することで肝臓への血流を部分閉塞させながら、下行大動脈を介して 2.7 E13 vg/kg の scAAV9.CB.GFP を投与した。この手技は、ニューロンへの導入率を向上させるため、脊髄動脈を通過するウイルスの「初回通過」を可能にするよう設計された。脊髄の頸・胸・腰部で GFP 陽性運動ニューロンが認められ、また、成熟サルにおいて GFP の標的となった運動ニューロン数は、幼若サルにおいて標的となった運動ニューロン数に比べてはるかに少なかった。したがって、幼若カニクイザルでは大幅に低い用量での全身投与により、運動ニューロンへの形質導入が可能である。脳における GFP の発現は皮質領域、外側膝状体、中脳、橋、及び髄質で最も高かった。サルでは主にグリア細胞への形質導入が認められ、これはマウスで認められたニューロンへの形質導入と対照的であった。

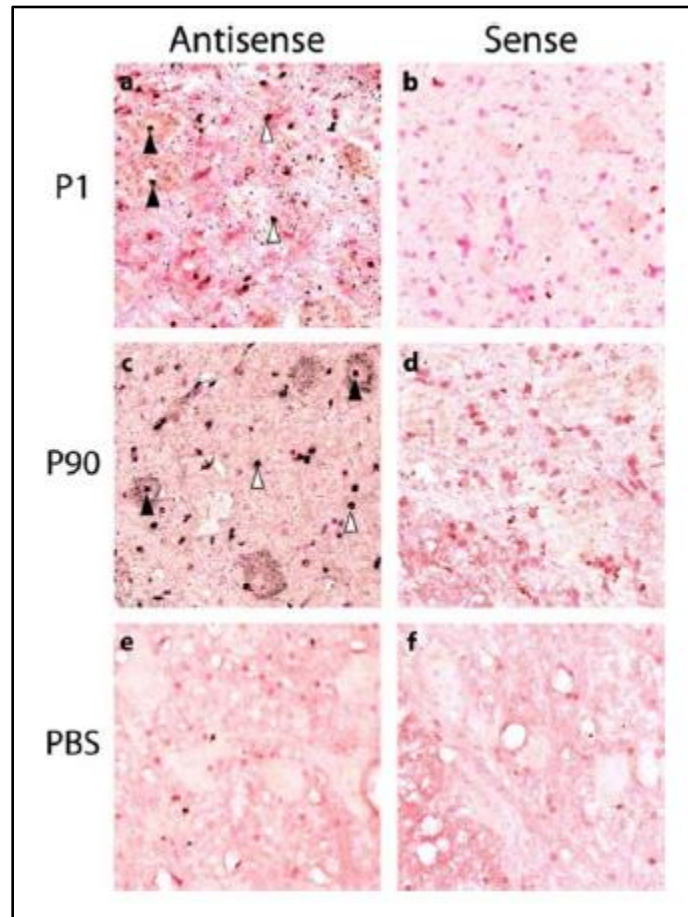
図 9 : カニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP ベクター投与後の腰部脊髄の GFP 免疫蛍光検査



(左) scAAV9.CB.GFP を PND1 (a~c) 及び PND90 (d~f) に投与されたカニクイザルの、腰部脊髄における GFP 免疫蛍光。結合したパネル (c 及び f) に示すように、GFP (緑) は運動ニューロンマーカー (ChAT, 赤) と共局在している。

PND1 で投与されたカニクイザルの腰部脊髄では、前角の運動ニューロンの 70% 超に形質導入がみられた。さらに、PND30 及び PND90 の投与後における *in situ* ハイブリダイゼーションデータからも、運動ニューロンへの広範な形質導入が示され、たとえ遅い時点で投与された場合でも高い臨床効果を期待できるものと考えられた (図 10)。

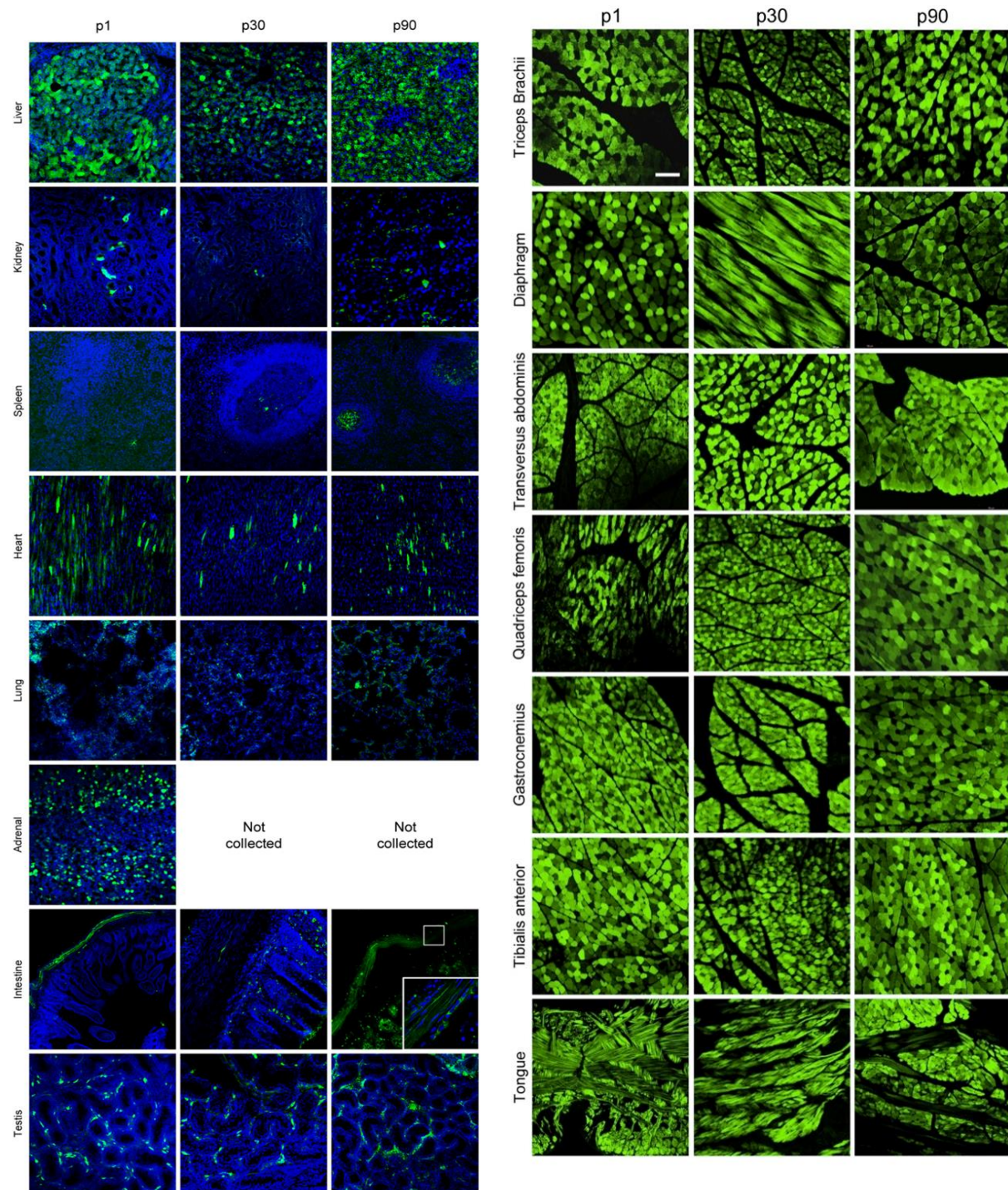
図 10 : scAAV9.CB.GFP を全身投与されたカニクイザルの腰部脊髓前角における GFP mRNA



PND1 及び PND90 に scAAV9.CB.GFP を全身投与されたカニクイザルの腰部脊髓前角における導入遺伝子 (GFP) mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションによる検出。投与後 20～25 日に動物を安楽死した。無処置対照群又は非結合のセンス (プローブを用いたときは、シグナルは検出されなかった。黒矢印は陽性の運動ニューロンの核を、白矢印は陽性のグリア細胞の核を示している。

3 時点 (PND1, PND30, 及び PND90) で投与された動物の脳, 骨格筋, 心筋, 及び主要な内臓器官における GFP 導入遺伝子の発現も, 免疫蛍光検査により検出した (図 11)。

図 11 : scAAV9.CB.GFP を投与したカニクイザルの器官及び筋肉中の GFP 発現

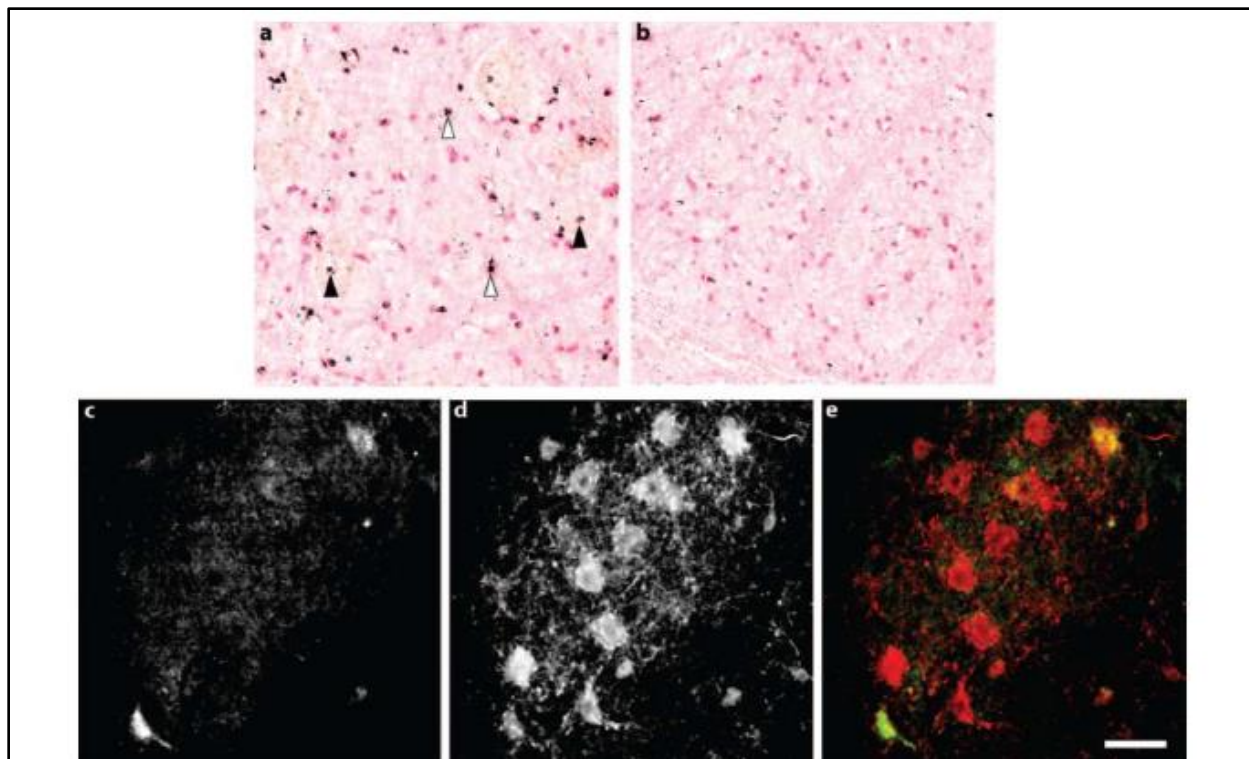


サルに scAAV9.CB.GFP を全身投与した後の器官（左）及び筋肉（右）中の GFP 発現。PND1, PND30, 又は PND90 の時点で被験動物に投与した。GFP は緑, DAPI は青で示されている。

2.6.2 薬理試験の概要文

上述の PND1, PND30, 及び PND90 のサルに加え, 3 歳のカニクイザルにも, 肝臓への血流を部分閉塞させた状態で 2.7 E13 vg/kg の scAAV9.CB.GFP を下行大動脈から投与した。この手技は, ニューロンへの導入効率を向上させるため, 脊髄動脈を通過するウイルスの「初回通過」を可能にするよう設計された。各種組織における GFP 発現を, 投与後 2 週で分析した。GFP 及び ChAT 免疫蛍光染色から, 脊髄の頸・胸・腰部における GFP 陽性運動ニューロンが示された (図 12)。

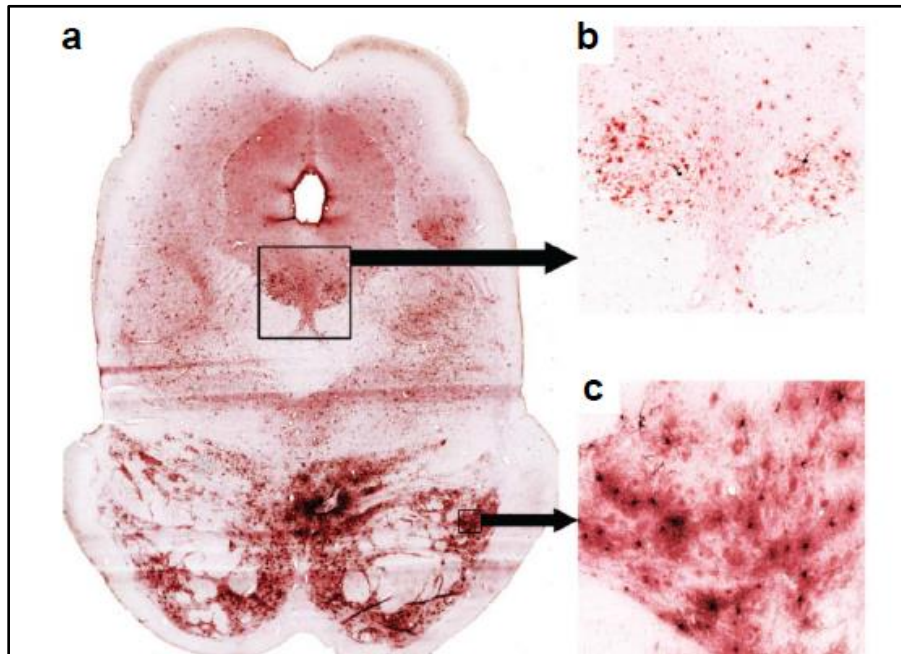
図 12: カニクイザルの脊髄における緑色蛍光タンパク質の発現



3 歳のサルの脊髄における GFP 発現。In situ ハイブリダイゼーションによる AAV9 投与動物の脊髄切片のニューロン (黒矢印) とグリア (白矢印) における GFP 発現。アンチセンスプローブで検出されるが (a), センスプローブでは検出されない (b)。GFP (c, 黒と白) 発現と運動ニューロン (d, ChAT, 黒と白) の共局在を確認した (e, 結合画像。GFP は緑で, ChAT は赤で示されている)。

しかし, 3 歳のサルの染色では, より若齢の投与サルに比べて陽性細胞数が少なかった。この 3 歳のサルにおいてみられた GFP 形質導入の減少は, 低用量のベクターを投与したことによる可能性がある (PND1 で投与したマウスの 1/10 量)。GFP の標的となった運動ニューロン数ははるかに少なかったものの, このことは, 幼若カニクイザルでは大幅に低い用量で AAV9 を全身性に投与した場合でも, 運動ニューロンを標的にできることを裏付けている。scAAV9.CB.GFP を投与したすべてのサルで, 脳全体に広範に導入遺伝子が認められた。この GFP 発現はマウスのそれと類似していた。マウスでは, 皮質領域, 外側膝状体, 中脳, 橋, 及び髄質において最も多数の GFP 発現細胞が認められていた。しかし, 主にニューロンへの形質導入がみられたマウス試験とは対照的に, すべてのサルでは, 脳全体で主にグリア細胞への形質導入がみられた。3 歳のサルの脳組織における GFP 陽性細胞は主にアストロサイトとミクログリアであり, また脳神経のニューロンの核も GFP を発現していた (図 13)。

図 13 : scAAV9.CB.GFP を静脈内投与した 3 歳のサルの脳の緑色蛍光タンパク質に関する免疫組織化学的染色



scAAV9.CB.GFP を静脈内投与した 3 歳のサルの GFP 免疫組織化学染色。(a) 動眼神経核レベルでのスキャン切片。主にグリアからなる切片全体に広範に GFP が発現している。第 3 脳神経のニューロン (b) 及び橋灰白質のグリア (c) に高度な形質導入が認められる。

マウス及びカニクイザルのこれらのデータは、2つの独立した研究グループがラットとネコの CNS に AAV9 を静脈内投与したデータと一致している。これらの所見は、新生児期の SMA 患者への早期投与の有用性を支持する結果である (Foust et al. 2010, Foust et al. 2009, Bevan et al. 2011, Duque et al. 2009, Wang et al. 2010)。

2.1.5. 新生仔ブタを用いた scAAV9.CB.GFP ベクターの直接脳室内投与による CNS 形質導入及び遺伝子発現解析

試験の標題： 小児疾患に関して脊髄、脳、及び末梢組織を標的とするための大型動物種（仔ブタ）における AAV9 の脳室内投与

試験の参考文献： [Bevan et al. 2011](#)

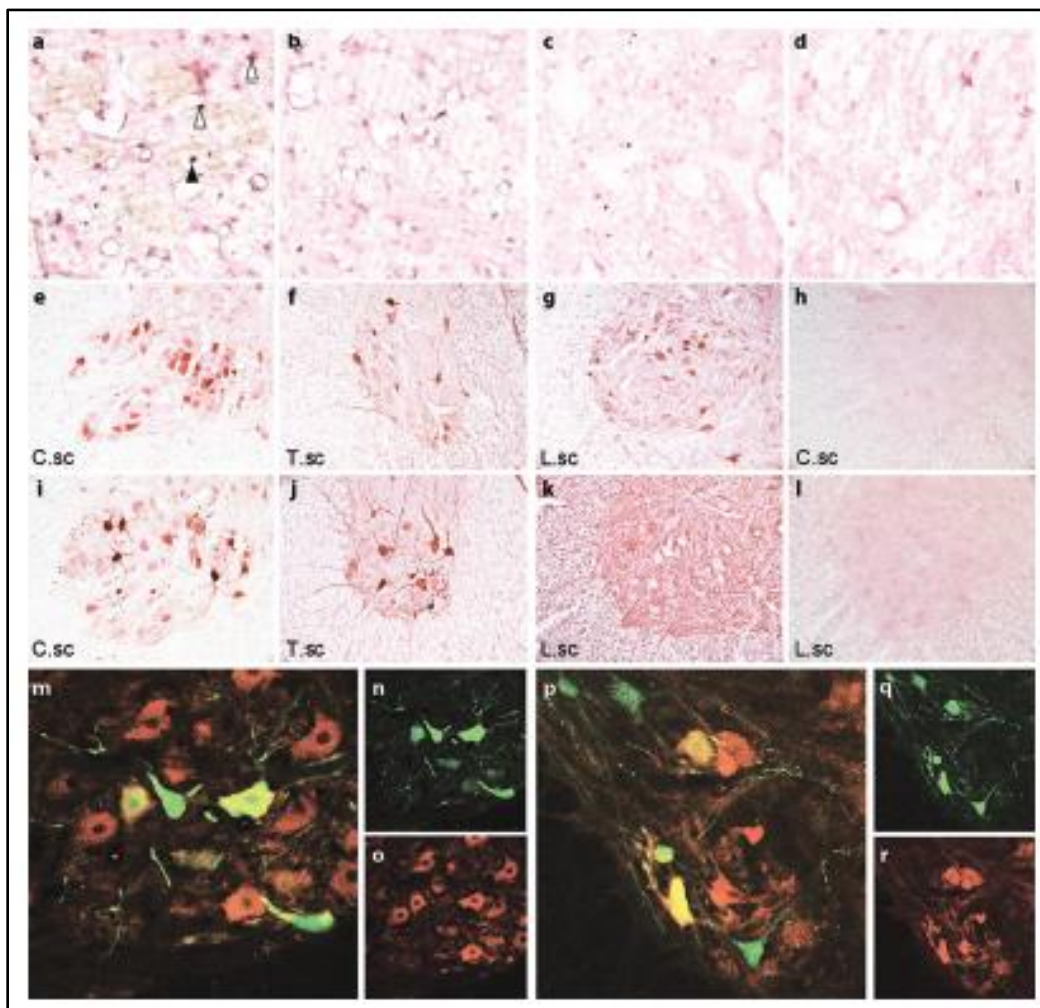
本試験は、ニワトリ β -アクチンプロモーターで GFP 発現を誘導する自己相補的 AAV9 ベクター (scAAV9.CB.GFP) を用いて、新生仔ブタ (*Sus scrofa domestica*) の CNS における AAV9 ベクターの分布と導入遺伝子の発現を検討することを目的とした。そのため我々の SMN ベクター産物の代替として scAAV9.CB.GFP を利用した。2 群 (3 例/群) の小規模の仔ブタ (5 日齢) を用い、5.2 E12 vg/kg の scAAV9.CB.GFP を髄腔内又は大槽内投与した。投与後 21~24 日にすべての仔ブタを安楽死し、組織学的検査及び免疫組織化学検査のため組織を回収した。

すべての動物において、GFP の発現は背根神経節、並びに脊髄の灰白質及び白質に認められた。重要な点は、頭蓋底の大槽腔又は L5 の髄腔内に scAAV9.CB.GFP を投与し、*in situ* ハイブリダイゼーションによって検討したとき、脊髄の全レベルで広範な運動ニューロンへの形質導入が確認された

点である (図 14 a~d)。また、大型の前角ニューロンも、脊髄の全レベルで免疫組織化学検査によって GFP 発現陽性が確認された (図 14 e~l)。

最後に、GFP 免疫蛍光法を用いて脳における導入遺伝子発現を検討した。小脳プルキンエ細胞、髄質神経線維、及び個々の核 (オリーブ核等) で最も高い発現が認められた。脳のその他の部位における発現は、髄膜表面近くの散在した細胞に局限していた。末梢 (CNS 以外の) 組織では顕著な GFP 発現は認められなかった。このことは、両経路による脳室内への投与では、ベクターの大半が CNS に局限することを示唆していた。最後に、GFP 陽性細胞は運動ニューロンマーカーである ChAT も発現していることが免疫蛍光検査から確認された (図 14 m~r)。

図 14 : scAAV9.CB.GFP ベクター投与後の新生仔ブタ脊髄の組織学的検査及び免疫組織化学検査



AAV9 投与脊髄 (a~b) 又は PBS 投与脊髄 (c~d) の *in situ* ハイブリダイゼーションにより、運動ニューロン (黒矢印) 及びグリア細胞 (白矢印) 中の緑色蛍光タンパク質 (GFP) が示されている。AAV を投与した新生仔ブタの切片では、アンチセンスプローブによるシグナルが検出されたが (a), PBS を投与した場合は検出されなかった (c)。センスプローブで処理した切片では、投与動物及び対照動物の両方でシグナルを検出できなかった (b 及び d)。大槽内投与時 (e~h) 又は髄腔内投与時 (i~l) の脊髄における GFP の免疫組織化学的検査から、AAV9 投与動物の大型の前角ニューロンでは広範なシグナルが確認されたが (e~g 及び i~k), PBS 投与動物では確認されなかった (h 及び l)。AAV9 を大槽内又は髄腔内投与した新生仔ブタの脊髄切片を、免疫蛍光法によ

り GFP (n 及び q) 並びに ChAT (o 及び r) について同時標識した。形質導入細胞は運動ニューロンであることが分かる (結合画像, m 及び p)。C.sc : 頸部脊髄, T.sc : 胸部脊髄, L.sc : 腰部脊髄。

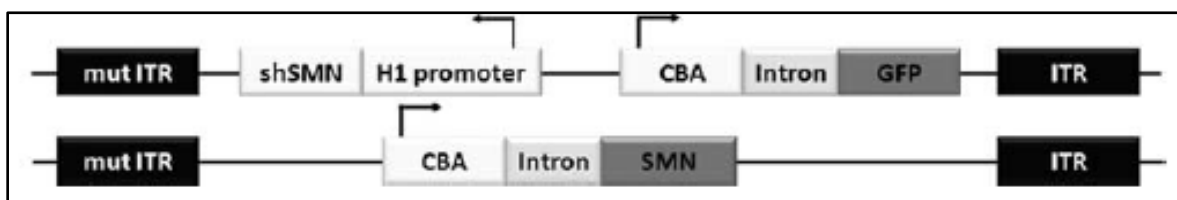
2.1.6. 幼若ブタ疾患誘発モデルにおける髄腔内投与の有効性試験

試験の標題： 脊髄性筋萎縮症の大型動物モデルと AVXS-101 投与による表現型の改善

試験の参考文献： [Duque et al. 2015](#)

本試験は、低分子ヘアピン型 (shRNA) SMN コンストラクトを用いて内因性 SMN タンパクの発現を低減することで、幼若ブタ (*Sus scrofa domestica*) を用いた大型動物の SMA モデルを開発し、このモデルにおける病態の進行に対する AVXS-101 の直接 CNS 投与の影響を評価することを目的とした。SMN 発現をノックダウンするようデザインされたこの shSMN shRNA コンストラクトは、治療用 AVXS-101 製剤と同じニワトリ β -アクチンプロモーターを用いて同じ scAAV9 ベクターにクローニングした (図 15)。

図 15 : scAAV9-shSMN (上図) 及び AVXS-101 (下図) のベクターマップ



本試験に使用した scAAV9-shSMN 及び scAAV9-SMN のマップ。shSMN はヒトプロモーターH1 から転写し、ニワトリ β -アクチン (CBA) プロモーターの下で GFP レポーター遺伝子と合わせて scAAV ベクターにクローニングした。ITR5 = 逆位末端反復配列, mut ITR5 = 変異 ITR

本試験は、ヒト化 AVXS-101 ベクターの投与及びそのタイミングが治療効果を示すかを明らかにすることを副次的目的とした。20 例の PND5 の幼若ブタに、scAAV9.CB.GFP-shRNA 又は対照であるスクランブル化 shRNA を CSF 内投与した。その他 6 例の幼若ブタを無処置対照として用いた (表 4)。

表 4 : 幼若ブタの SMN ノックダウンモデルにおける AVXS-101 の有効性試験

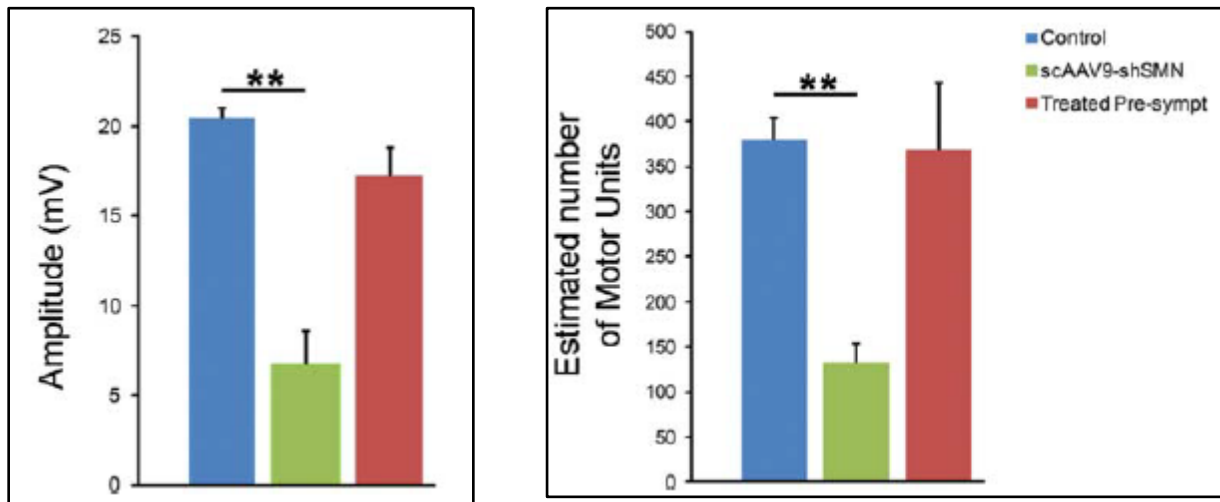
Group	Treatment	scAAV9-shSMN Vector		scAAV9-SMN Therapeutic Vector		Number of Piglets
		Vector Dose (Vg/kg)	Treatment Day	Vector Dose (Vg/kg)	Treatment Day	
1	Control	-	-	-	-	6
2	scAAV9-scrambled control	6.5 E12	PND5	-	-	6
3	scAAV9-shSMN vector	6.5 E12	PND5	-	-	5
4	scAAV9-shSMN + AVXS-101 (Presymptomatic)	6.5 E12	PND5	8 E12	PND6	4
5	scAAV9-shSMN + AVXS-101 (Symptomatic)	6.5 E12	PND5	2-3.8 E13	PND-33-36	5

免疫抑制の処置として、scAAV9-ベクターを投与したすべての幼若ブタに、0.1 mg/kg タクロリムス（プログラフ®）及び 25 mg/kg ミコフェノール酸モフェチル（セルセプト）を、scAAV9-ベクターの初回投与後 1 週間又は投与後に症状を示す群の場合は PND33 の 2 回目の投与後まで投与した。

電気生理学的パラメータをモニターするため、ポータブル型の臨床用電気診断システムを用いて、坐骨運動神経伝導検査及び針筋電図（EMG）検査を行った。坐骨の複合筋活動電位（CMAP）及び運動単位数推定値（MUNE）を、坐骨神経を刺激して左後肢から記録した。針 EMG を行って異常な自発活動について評価した。投与後 6～10 週間にブタを安楽死し、腰部脊髓切片の免疫蛍光検査を行った。また、脊髓ライセートのウェスタンブロット解析を行い、shSMN-ベクター誘導性の SMN の標的化ノックダウンを評価した。さらに、逆転写 ddPCR 法も用いて、運動ニューロンにおけるブタ SMN mRNA の発現をより正確に評価した。

GFP の免疫染色から、運動ニューロンへの確実な形質導入が示された。shRNA-ベクターを大槽内に直接投与した幼若ブタでは、運動ニューロン中のブタ SMN タンパク質が減少し、SMA の典型的な症状が発現した。scAAV9-shSMN の髄腔内投与後 3～4 週間に、幼若ブタには進行性の筋力低下（特に後肢）が発現した。これは、scAAV9 を用いて投与した導入遺伝子について確認されている発現パターンとよく関連していた。幼若ブタにみられた初期の一般状態の変化として、ガニ股歩き及び長期間の立位が困難な歩行異常がみられた。脱力が急速に進行して、完全な後肢麻痺及びマッドをひいた傾斜上の上行困難となった。幼若ブタは自立して立つことができなくなり、前肢の脱力が発現した。これらの徴候は、免疫蛍光染色により確認された運動ニューロン中のブタ SMN タンパク質の喪失と関連し、また、電気生理学的な坐骨の CMAP 及び MUNE 反応の低下とも関連していた。

図 16： SMA ブタにおける電気生理学的所見及び AVXS-101 投与による改善



生後 54 日（PND54）の坐骨の運動神経伝導検査（CMAP 及び MUNE）の結果は、scAAV9-shSMN 投与動物（n=4）が無処置の対照群（n=6）に比べて有意に低かった。scAAV9-shSMN 及び scAAV9-SMN-ベクターを 24 時間あけて投与した発症前の群では、CMAP 及び MUNE の値は維持され、これらの数値は無処置対照群とは有意差はなかった。

PND54 の対照又は scAAV9 スクランブル化対照動物の筋電図に、線維自発電位は認められなかった。ただし、scAAV9-shSMN 投与幼若ブタの各試験筋（中殿筋、傍脊柱筋群、大腿二頭筋、及び僧帽筋）では線維自発電位が認められた。shSMN 投与動物では対照動物に比べ、CMAP 及び MUNE が有意に低値であった。

2.6.2 薬理試験の概要文

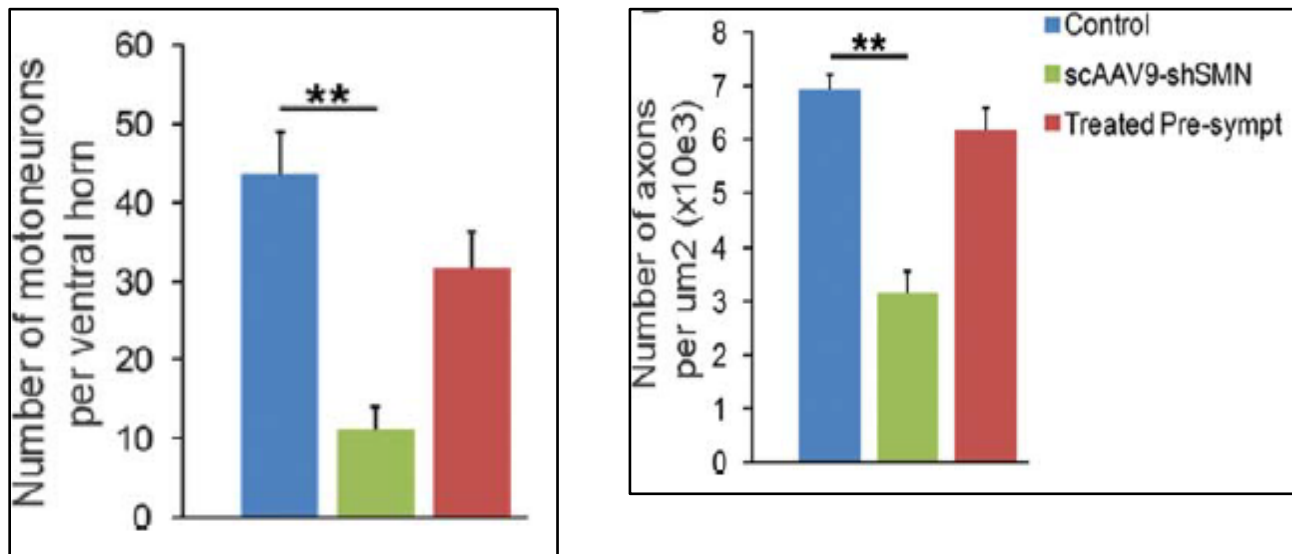
発症前に AVXS-101 を投与された幼若ブタでは、SMA の徴候又は重度の後肢脱力は発現しなかった。AVXS-101 を投与された発症前の幼若ブタにおける CMAP の振幅及び MUNE 値は、所見が観察された動物と比較して有意に維持されていた。全体として AVXS-101 は、shSMN ベクター投与の骨格筋への有害な電気生理学作用を軽減するようであった。これらの結果は、この新生仔ブタモデルにおいて、これら SMA の電気生理学的マーカー及び筋力低下は SMN 依存性であることを示唆していた。

腰部脊髄組織のニッスル染色から、SMA 病態幼若ブタの脊髄の前角には、劇的な病的変化が確認され、多数の運動ニューロンで核周囲部の腫脹及びニッスル小体消失がみられた。運動ニューロンの計数から運動ニューロンの細胞体の顕著な喪失が確認され、対照動物に比べて 74%減少していた。腹根組織の病理組織学的検査から、運動軸索の大幅な喪失が示唆された。脊髄のその他の領域及び背根神経節では、形態学的変化は認められなかった。重要な点は、AVXS-101 により SMN を再導入することで、幼若ブタで認められていた SMA 様の形態学的変化が改善したということである。これらの結果は、新生仔ブタの CSF に scAAV9-shSMN を投与することで、SMA 患者で認められるものと類似した電気生理学的及び病理的变化が生じ、これらの変化は SMN に依存性であることが示唆された。

対照的に、scAAV9 によりスクランブル化 shRNA を投与した場合、病理的又は電気生理学的变化は生じなかった。重要な点は、AVXS-101 の直接投与することで、少なくとも部分的には SMN shRNA ベクター投与により誘導された多くの運動ニューロンの欠損による CMAP, MUNE, 及び EMG の異常を改善したということである。

また本試験では、これらの動物で達成されるブタ SMN ノックダウンの程度、及びヒト SMN 発現量を評価した。GFP 染色により運動ニューロンへの強力な形質導入が明らかにされ、運動ニューロンではブタ SMN の効率的なノックダウンが達成されたことを示唆していた。ヒト SMN に特異的な抗体を用いた SMN 染色から、運動ニューロンにおいて scAAV9-SMN ベクターが強力に発現していることが示された。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって採取した運動ニューロン及び後角の部位について、ブタ SMN 又はヒト SMN に特異的なプライマーセットを用いた定量的 mRNA 分析を行った。予想されたとおり、scAAV9-shSMN 投与によりブタ SMN タンパクは、発症前後に AVXS-101 を投与された群それぞれにおいて顕著に減少した（発症前 87%減少、発症後 69%）。

図 17： SMN shRNA ベクター投与仔ブタにおける運動ニューロン欠損に対する AVXS-101 の影響



scAAV9-shSMN 投与動物では無処置対照動物に比べ、運動ニューロン数が有意に減少していた。腰部腹根 $1,000 \mu\text{m}^2$ あたりの有髄軸索数も、scAAV9-shSMN 投与動物では対照動物に比べて有意に減少していた。AVXS-101 の投与により、運動ニューロン数及び有髄軸索数の回復が認められた。

このレベルの SMA ノックダウンは、これらの幼若ブタに SMA 様の変化を誘発するのに十分な程度であった。一方、発症前又は発症後に AVXS-101 を投与されたいずれの動物でも、運動ニューロン中に高レベルのヒト SMN mRNA が検出された。興味深いことに、発症時に AVXS-101 を投与された動物では、腰部脊髄及び相当する腹根組織の神経病理の顕著な改善が示され、ニッスル小体消失性の運動ニューロン及び変性した運動軸索数の減少が認められた。発症時に AVXS-101 を投与された群では無処置の幼若ブタに比べ、運動ニューロン数が 39%増加していた (図 17)。

最終的に本試験から、生後 5 日 (PND5) に scAAV9-shSMN (6.5 E12 vg/kg) を投与し作製した SMA 幼若ブタに対して、疾患発症前の PND6 に AVXS-101 を 8 E12 vg/kg の用量で投与したとき、SMA の疾患表現型が完全に阻止された。一方で、後肢虚弱及び歩行障害等の症状が発症した PND33-36 において、AVXS-101 を 2 E13-3.8 E13 vg/kg の用量で投与したとき、溶媒ベクター投与群と比較して PND54 における複合筋活動電位 (CMAP) 振幅の増加 (AVXS-101 投与群 17.2 ± 2.3 , 溶媒ベクター投与群 6.8 ± 1.9) が認められ、正常対照群又は疾患発症前 PND6 での投与群と同等レベルであった。また、PND54 における運動単位数推定法 (MUNE) 測定値は、正常対照群と同等レベルには回復しなかったものの、溶媒ベクター投与群と比較して改善が認められた (AVXS-101 投与群 225 ± 41 , 溶媒ベクター投与群 133 ± 21 , 正常対照群 380 ± 25)。本試験から、出生後の運動ニューロンにおける SMN mRNA 量の 70%減少は、新生仔ブタにおいて SMA 様表現型を誘発するのに十分であることが示された。本モデルは、SMA に伴う特徴的な電気生理学的及び組織学的変化を正確に模倣していると考えられた。発症後に AVXS-101 を投与された幼若ブタは、部分的な疾患に対する改善効果が認められた。このことから、これらの動物はまだ回復不能となる時点に達していないことを示し、SMN 遺伝子補充の効果が確認された。本試験において、ブタ脊髄の免疫染色から、運動ニューロンに対して AAV9 の強力な指向性があること、また、ごく稀にグリア細胞に形質導入されることが明らかにされた。したがって、臨床における SMA の病理と同様、この大型動物モデルでも運動ニューロンにおける高い SMN タンパク発現量が重要であることが明らかとなった。本動

2.6.2 薬理試験の概要文

物モデルが有用であると考えられる点として、CMAP 及び MUNE の測定値が、SMA 様幼若ブタにおける表現型の進行と関連しているということが挙げられる。また本試験から、至適な効果を得るためには治療ベクターの早期投与が重要であることも示された。

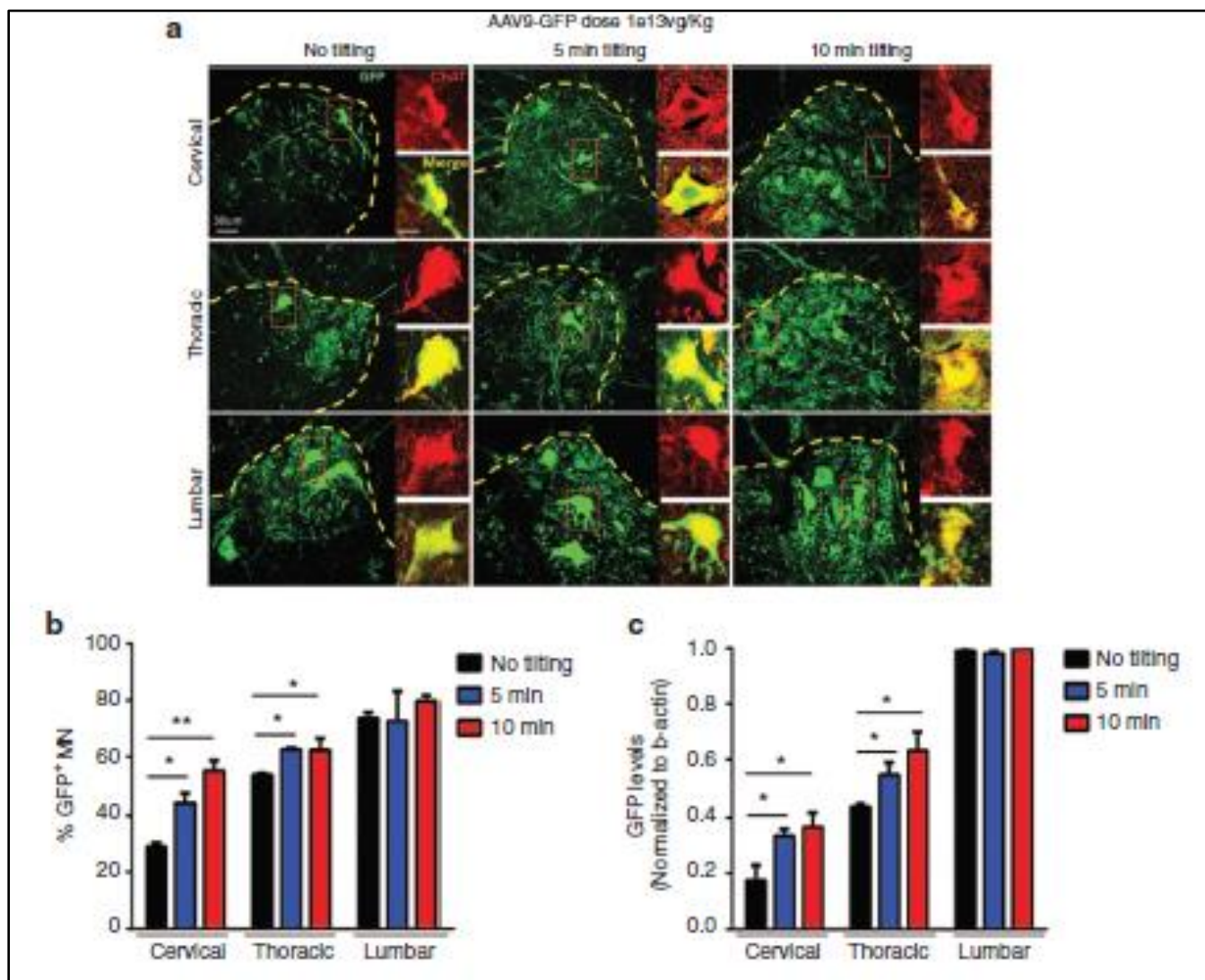
2.1.7. 幼若サルを用いた GFP 発現 AAV9 ベクターによる髄腔内投与形質導入試験

試験の標題： AAV9 を介した SMA 遺伝子治療の単回 CSF 投与における導入効率の改善：マウス及びサルを用いた用量反応性試験

試験の参考文献： Meyer et al., 2014

本試験は、1 歳のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を用い髄腔内 (IT) 投与による scAAV9.CB.GFP の形質導入状態を明らかにし、投与時にトレンデレンブルグ体位 (倒立位) を保持したときの形質導入に対する影響を評価することを目的とした。1 歳のカニクイザル 7 例を用いて、腰部髄腔内投与により scAAV9.CB.GFP (1 E13 vg/kg, 約 2 E13 vg/サル) を投与した。2 例のカニクイザルにはトレンデレンブルグ体位を保持せずに投与し、2 例は投与後 5 分間 45 度のトレンデレンブルグ体位を保持し、3 例は投与後 10 分間この体位を保持した。CNS 全体 (脳及び脊髄) を通してニューロンへの形質導入が生じ、サルを 5~10 分間トレンデレンブルグ体位に保持したとき形質導入が改善した。投与後 10 分間トレンデレンブルグ体位を保持したとき、頸・胸・腰部のそれぞれ 55%, 62%, 及び 80% に GFP の発現がみられた (図 18)。

図 18 : 1 歳のカニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP による脊髄運動ニューロンへの形質導入

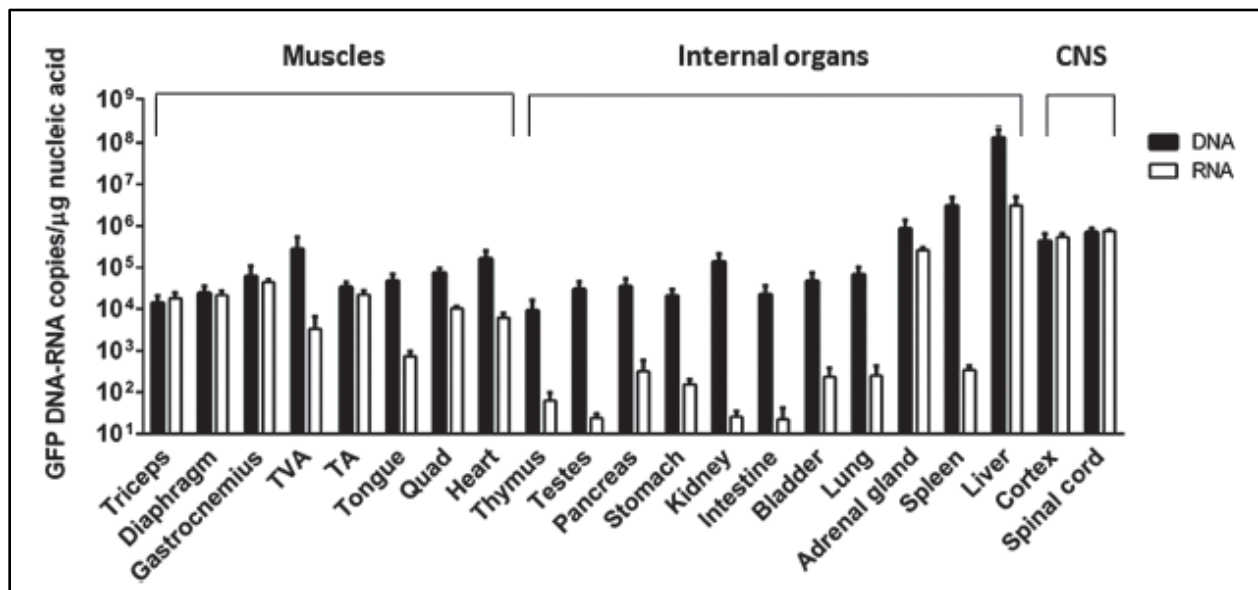


1 歳のカニクイザルの仙骨髄腔内に 1×10^{13} vg/kg の scAAV9.CB.GFP を単回投与したとき、全脊髄セグメントの 50% を超える運動ニューロンを標的とする形質導入が示された。(a, b) 7 例のカニクイザルの仙骨髄腔内に 1 E13 vg/kg の scAAV9.CB.GFP を点滴投与し、2 例では投与後 5 分間、3 例では投与後 10 分間トレンドレンプルグ体位を保持した。(c) GFP mRNA 量は細胞への形質導入の増加と相関し、また、トレンドレンプルグ体位をとらせることがより高い形質導入効率を示すことが確認された。

エラーバー = SD, $n = 2 \sim 3/\text{群}$, $*p < 0.05$ 。

さらに、髄腔内投与後の scAAV9.CB.GFP の体内分布も検討した。骨格筋、平滑筋、心臓、精巣、胸腺、膵臓、胃、腎臓、腸管、膀胱、肺、副腎、肝臓、脾臓、脳皮質、及び脊髄といった組織の小検体を採取し、ベクター DNA 及び RNA 発現の有無を評価した。ウイルスベクター DNA の組織中濃度は比較的高かったものの、mRNA コピー量は必ずしも相関していなかった(図 19)。CNS 及び骨格筋組織では DNA 量と RNA 量との強い相関がみられたが、内臓器官(ただし副腎と肝臓は除く)ではこの相関はみられなかった。たとえば、腎臓、肺、脾臓、及び精巣で認められた GFP mRNA の低値は、これら組織における CB プロモーター活性の変動に起因する可能性が高かった。

図 19 : カニクイザルにおける scAAV9.CB.GFP ベクターの直接髄腔内投与後の組織分布



1 mg の組織生検から DNA 及び RNA を単離し、ウイルスゲノム及び GFP mRNA 分子の存在を検討した。ウイルス DNA 又は RNA の体内分布を Taqman 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) により評価した。

3. 副次的薬理試験

SMA モデルを用いた試験に加え、SMN タンパク質が心機能に果たす役割についても検討した。*SMNΔ7* マウスは徐脈を呈し、Day 14 までに心筋症が発現する。本副次的薬理試験は、AVXS-101 がこれらの心臓への有害作用を回復できるかを検討することを目的とした。

3.1. SMNΔ7 マウスの心不全モデルを用いた AVXS-101 の有効性試験

試験の標題： 脊髄性筋萎縮症の *SMNΔ7* モデルにおける早期心不全と、出生後の scAAV9-SMN 投与による改善作用

試験の参考文献： [Bevan et al. 2010](#)

SMA 患者で認められる多数の所見から、SMN タンパク質が心機能に関与していること、また AVXS-101 投与によりこの病因を改善できる可能性が示されている。重度 SMA マウスに AAV ベクターを介して SMN タンパク質の遺伝子導入を行う試験において、この疾患モデルマウスは心臓障害をきたす可能性が確認されている ([Araujo et al. 2009](#))。血流異常に対して考えられる 1 つの説明は、心血管系に対する自律神経の緊張度が変化するというものである。

SMA では血流変化が生じるという仮説に基づき、本試験は、SMA の *SMNΔ7* マウスモデル (*Smn*^{-/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+} の FVB/N マウス) において心臓障害が認められるかどうか、またそうである場合、AVXS-101 の投与によってこれが改善できるかどうかを明らかにすることを目的とした。心エコー検査及び心電図 (ECG) 検査から、無処置の SMA マウスでは生後 14 日までに徐脈及び拡張型心筋症 (DCM) が発現し、生後 7 日目には早くも比較的軽度の異常が検出されることが明らかにされた。

本試験中、PND14 の SMA マウスの生体内心構造を心エコー検査により評価した。本試験には以下 (1) 健康な野生型 (WT) FVB マウス、(2) SMA 病態をきたす無処置 *SMNΔ7* マウス、及び (3) AVXS-101 を投与した *SMNΔ7* マウスの 3 群を評価した。1 群のマウスで、心エコー検査により心臓の構造を解析するため、PND1 に 5 E11 vg/マウスを静脈内投与した (1.5 g のマウスあたり 3.3 E14 vg/kg)。無処置の *SMNΔ7* マウスは健康な WT マウスに比べ、概ね心臓が縮小し、左室 (LV) 重量が減少し、心室壁が顕著に菲薄化していた。PND14 に AVXS-101 を投与された動物では無処置の *SMNΔ7* マウスに比べ、LV 重量が増加していた。AVXS-101 を投与された *SMNΔ7* マウスでは、拡張と壁菲薄化の両方が改善した。

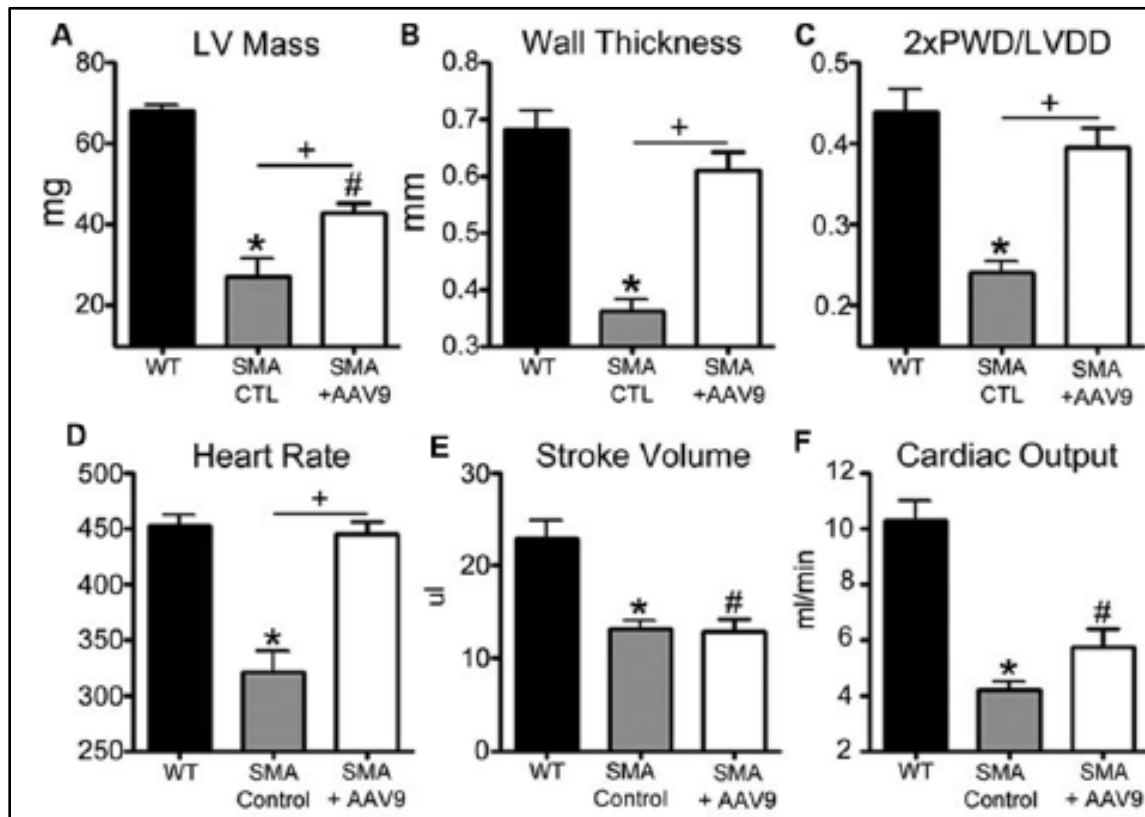
LV 重量の減少により示されたように、SMA マウスでは WT マウスに比べ心臓が矮小化していた (図 20)。また、これらの動物では心室壁が顕著に菲薄化していることを確認した。これらの所見の一部は、SMA マウスの体格が小さいことによると考えられた。そこで次に、LV 壁厚を拡張期の LV 径と比較して補正し、各群の LV 構造を比較した。この比率は SMA マウスで低く、遠心性肥大が示唆された。PND14 で AVXS-101 を投与した動物では SMA マウスに比べ LV 重量が増加し、拡張及び壁菲薄化の程度の両方が減弱し機能改善を示した。

無処置の *SMNΔ7* マウスでは野生型に比べた左室重量の減少、壁厚の菲薄化、及び心機能の低下を含め、早期心不全の症状が認められた ([Bevan et al. 2010](#), [Passini et al. 2010](#), [Shenouda et al. 2008](#))。これらのマウスでは PND1 での AVXS-101 投与により、これらの症状が部分的に改善した。

また、組織学的解析により評価された構造的変形は、*in vivo* の機能的所見と関連していることが明らかとなった。PND1 に 5 E11 vg の AVXS-101 を静脈内投与したとき、左室 (LV) のリモデリングが改善し、心拍数が完全に是正された。これら心臓障害の根本的な原因となる機構は不明であるが、

自律神経及び発達という要素が関係している可能性が示唆されている。この試験で、マウスにおける SMN タンパクの欠乏は早期かつ持続的な心機能不全をもたらすこと、また、AAV9 SMN 全身投与によりこのような不全を部分的～完全に改善できることが明らかになった。

図 20： 野生型マウス，無処置 *SMNΔ7* マウス，及び AVXS-101 を投与した *SMNΔ7* マウスにおける心電図検査



(A) LV 重量，(B) 壁厚，及び (C) 2xPWD/LVDD の心エコー検査結果は，SMA マウスにおける遠心性肥大の発現を示唆している。PND14 の SMA マウスにおける心機能を，心拍数 (D)，1 回拍出量 (E)，及び心拍出量 (F) によって検討した。

4. 安全性薬理試験

AVXS-101 を用いた安全性薬理試験は実施していない。

5. 薬力学的薬物相互作用

AVXS-101 を用いた薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

AVXS-101 は、I 型脊髄性筋萎縮症（SMA）と診断された小児患者の治療を適応とする、サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサー／ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーター（CB）の制御下においてヒト Survival motor neuron（SMN）遺伝子を含む、非増殖性の遺伝子組換えアデノ随伴ウイルスベクターセロタイプ 9（AAV9）である。AVXS-101 は機能性 SMN1 遺伝子をもたず SMN2 遺伝子が 2 コピーである I 型 SMA の患者に対して、単回点滴静脈内（IV）投与することが予定されている、遺伝子治療薬である。

公表されている試験から、SMN タンパクの重要性と、実質的にすべての細胞におけるその役割が確認されている。SMN タンパクの欠乏により SMA 疾患に至り、最も重度の病態である I 型の新生児患者は、数ヵ月を超えて生存することができない。多数の試験から、SMN タンパクが働いていること、またマウス及びブタでは CNS に SMN を投与することで疾患を改善できることが確立されている。さらにこれらの試験から、SMA 治療のために AAV ベースのベクター製剤を開発することの妥当性が示されている。

非臨床薬理試験では、CNS への直接投与、又は静脈内経路からの CNS 投与に適することが確認されているため、AAV9 セロタイプを利用している。AVXS-101 又は scAAV9.CB.GFP ベクターを用いた早期試験から、このベクターコンストラクトが CNS を標的にできること、また、形質導入パターンが GFP 及び SMN 発現ベクターの間で非常に類似していることが明確に示されている。いずれのベクターコンストラクトも、全身投与後（又は直接 CNS 投与後であっても）には体内に広く分布し、また脳及び脊髄にはたとえ静脈内投与後でも高度に形質導入され、高度な SMN 遺伝子発現が性腺以外の大半の組織に認められていた。特に静脈内投与後には、脊髄のあらゆる部位に顕著な形質導入が生じ、マウス及びブタの両方の SMA モデルにおいて疾患を改善できることも示された。

AVXS-101 に予定されている臨床投与経路は静脈内であるものの、薬理試験では、CNS 直接投与後の CNS への形質導入、並びに疾患及び生存期間に対する作用を検討した。脳室内又は髄腔内に直接投与したとき、運動ニューロンへの形質導入及び SMN $\Delta 7$ マウスの生存期間延長が確認された。

CNS に関連した明確な作用に加え、これら SMN $\Delta 7$ マウスへの AVXS-101 投与によりマウスにおける心臓障害が構造的及び機能的に改善された。このことは、心機能に対する SMN の作用をさらに臨床的に検討する根拠を示している。

以上のことから、げっ歯類、ブタ、及び幼若サルを用いた非臨床試験から、AVXS-101 の投与により CNS へ SMN タンパクを形質導入できることが示された。また、AVXS-101 の投与により SMA 動物モデルにおける疾患症状の改善及び生存期間の延長を確認した。

図表

図表は本文中に記載している。

7. 参考文献

- Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, & Kay MA. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of virology*, 80(19), 9831-9836.
- Alías L, Bernal S, Fuentes-Prior P, et al. (2009) Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene. *Hum Genet*; 125(1):29-39.
- Anderton RS and Mastaglia FL (2015) Advances and challenges in developing a therapy for spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother*; 15(8):895-908.
- Anderton RS, Meloni BP, Mastaglia FL, et al. (2011) Survival of motor neuron protein over-expression prevents calpain-mediated cleavage and activation of procaspase-3 in differentiated human SH-SY5Y cells. *Neuroscience*; 181:226-33.
- Araujo A, Araujo M, Swoboda KJ. Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. *J. Pediatrics*, 2009; 155(2):292-4.
- Bach JR. Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 2007; 86(5):349-55.
- Baughan T, Shababi M, Coady TH, et al. Stimulating full-length SMN2 expression by delivering bifunctional RNAs via a viral vector. *Mol Ther*, 2006; 14(1):54-62.
- Bevan AK, Duque S, Foust KD, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther.*, 2011, 19(11):1971-80.
- Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH, Kaspar BK. Early heart failure in the SMN Δ 7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20):3895-905.
- Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, & Chamberlain JS. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular therapy*, 10(4), 671-678.
- Cárcel-Trullols J, Kovács AD, Pearce DA. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do, *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852 (10 Pt B):2242-55.
- Cearley CN & Wolfe JH. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Molecular Therapy*, 13(3), 528-537.
- Cho S and Dreyfuss G (2010) A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev*; 24(5):438-42.
- Coady TH, Baughan TD, Shababi M, Passini MA, Lorson CL. Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS one*, 2008; 3(10):e3468.
- Coady TH, Lorson CL. Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.*, 2010; 30(1):126-30.

Coady TH and Lorson CL (2011) SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*; 2(4):546-64.

Costford SR, Seifert EL, Bezaire V, M FG, Bevilacqua L, Gowing A *et al.* The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2007; 32(5):884-94.

Darbar IA, Plaggert PG, Resende MB, Zanoteli E, Reed UC. Evaluation of muscle strength and motor abilities in children with type II and III spinal muscle atrophy treated with valproic acid. *BMC Neurol* 2011; 11:36.

Dayangac-Erden D, Bora-Tatar G, Dalkara S, Demir AS, Erdem-Yurter H. Carboxylic acid derivatives of histone deacetylase inhibitors induce full length SMN2 transcripts: a promising target for spinal muscular atrophy therapeutics. *Arch Med Sci*, 2011; 7(2):230-234.

Duque SI, Arnold WD, Odermatt P, Li X, Porensky PN, Schmelzer L, Meyer K, Kolb SJ, Schümperli D, Kaspar BK, Burghes AH. A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Ann Neurol.*, 2015, 77(3):399-414.

Duque SI, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, Fyfe J, Moullier P, Colle MA, and Barkats M. Intravenous Administration of Self-complementary AAV9 Enables Transgene Delivery to Adult Motor Neurons. *Mol Ther.*, 2009, 17:1187–1196.

Eggert C, Chari A, Lagerbauer B, Fischer U. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol. Med.*, 2006; 12(3):13-21.

Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Gen.*, 2002; 11(14):605-14.

Farrar MA, Vucic S, Johnston HM, du Sart D, Kiernan MC. Pathophysiological Insights Derived by Natural History and Motor Function of Spinal Muscular Atrophy. *J. Pediatrics.*, 2012.

Finsterer J, Stollberger C. Cardiac involvement in Werdnig-Hoffmann's spinal muscular atrophy. *Cardiology* 1999; 92(3):78-82.

Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK., Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.* 2009, 27(1):59-65., Epub 2008 Dec 21.

Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, Crawford TO, Gogliotti RG, DiDonato CJ *et al.* Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Human Mol Gen.*, 2008; 17(8):063-75.

Genabai NK, Ahmad S, Zhang Z, et al. (2015) Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*; 24(24):6986-7004

Groen EJN, Talbot K, Gillingwater TH (2018) Advances in therapy for spinal muscular atrophy: promises and challenges. *Nat Rev Neurol*; 14(4):214-24.

Hachiya Y, Arai H, Hayashi M, Kumada S, Furushima W, Ohtsuka E et al. Autonomic dysfunction in cases of spinal muscular atrophy type 1 with long survival. *Brain & development* 2005; 27(8):74-8.

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu HM, Wang NM, Tsai CH et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Gen.*, 2000, 24(1):66-70.

2.6.2 薬理試験の概要文

Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF *et al.* Antisense correction of *SMN2* splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & Dev*, 2010; 24(15):634-44.

Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctierman CF, Kay MA, & Nakai H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy*, 14(1), 45-53.

Jackson KL, Dayton RD, & Klein RL. (2015). AAV9 supports wide-scale transduction of the CNS and TDP-43 disease modeling in adult rats. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2.

Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, et al. (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *PNAS*; 21;97(24):13312-17

Kolb S, Kissel J. Spinal Muscular Atrophy: A Timely Review, *Arch Neurol-Chicago*, 2011, 68:79–84.

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH., *SMN*Delta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (*SMN2*) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length *SMN*. *Hum. Mol Gen.*, 2005, 14(6):45-57.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, and Zeviani M. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80:155–165.

Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. (1997) Correlation between severity and *SMN* protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*; 16(3):265-9.

Li DK, Tisdale S, Lotti F, et al. (2014) *SMN* control of RNP assembly: from post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin Cell Dev Biol*; 32:22-9.

McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. Knockdown of the survival motor neuron (*Smn*) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol.*, 2003; 162(5):19-31.

Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu SI, Nara Y, & Kay MA. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *Journal of virology*, 79(1), 214-224.

Narver HL, Kong L, Burnett BG, Choe DW, Bosch-Marce M, Taye AA *et al.* Sustained improvement of spinal muscular atrophy mice treated with trichostatin A plus nutrition. *Annals of neurology* 2008; 64(4):65-70.

Nölle A, Zeug A, van Bergeijk J, et al. (2011) The spinal muscular atrophy disease protein *SMN* is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet*; 20(24):4865-78.

Osborne M and Lutz C. Reference guide to mouse models of spinal muscular atrophy. In: *The Jackson Laboratory*. Bar Harbor, ME, 2010.

Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, & Byrne BJ. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circulation research*, 99(4), e3-e9.

Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR *et al.* CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin Invest*, 2010; 120(4):253-64.

Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ, Burghes AH and Kissel JT. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the *SMN2* gene. *Am. J. Hum Gen.*, 2009; 85(3):08-13.

- Riessland M, Ackermann B, Förster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, and Wirth B. (2010). SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*, 19(8), 1492-1506.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.*, 2003; 163(4):01-12.
- Rudnik-Schoneborn S, Heller R, Berg C, Betzler C, Grimm T, Eggermann T et al. Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *J. Med Gen.*, 2008; 45(10):35-8.
- Rudnik-Schoneborn S, Vogelgesang S, Armbrust S, Graul-Neumann L, Fusch C, Zerres K. Digital necroses and vascular thrombosis in severe spinal muscular atrophy. *Muscle & nerve* 2010; 42(1):44-7.
- Shenouda SK, Lord KC, McIlwain E, Lucchesi PA, Varner KJ. Ecstasy produces left ventricular dysfunction and oxidative stress in rats. *Cardiovascular res* 2008; 79(4):62-70.
- Smith M, Calabro V, Chong B, Gardiner N, Cowie S, du Sart D. Population screening and cascade testing for carriers of SMA. *Eur J Hum Genet* 2007; 15(7):59-66.
- Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL, Li H. Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiology of disease* 2006; 24(2):86-95.
- Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, & Xiao X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature biotechnology*, 23(3), 321.
- Wang DB, Dayton RD, Henning PP, Cain CD, Zhao LR, Schrott LM *et al.* Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed. *Mol Ther.*, 2010; 18(12):664-74.
- Wee CD, Kong L, Sumner CJ (2010) The genetics of spinal muscular atrophies. *Curr Opin Neurol*; 23(5):450–8.
- Williams JH, Schray RC, Patterson CA, Ayitey SO, Tallent MK, Lutz GJ. Oligonucleotide-mediated survival of motor neuron protein expression in CNS improves phenotype in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.*, 2009; 29(24):633-8.
- Wirth B, Herz M, Wetter A, et al. (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*; 64(5):1340-56.
- Wishart TM, Mutsaers CA, Riessland M, et al. (2014) Dysregulation of ubiquitin homeostasis and β -catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 124(4):1821-34.
- Yamamoto T, Sato H, Lai PS, et al. (2014) Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain Dev*; 36(10):914-20.
- Zhou H, Janghra N, Mitrapant C, Dickinson RL, Anthony K, Price L *et al.* A novel morpholino oligomer targeting ISS-N1 improves rescue of severe spinal muscular atrophy transgenic mice. *Hum gene ther* 2013; 24(3):31-42.
- 竹内敦子, 西尾久英, 齋藤利雄, 他 (2018) 脊髄性筋萎縮症: SMN1 遺伝子非欠失患者の分子病態. *BIO Clinica*; 33(12): 47-51.

2.6.3 藥理試驗概要表

2.6.3 薬理試験概要表

1. 薬理試験

概要			被験物質：AVXS-101		
試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号又は参考文献	CTD 中の記載箇所
効力を裏付ける試験					
scAAV9.CB.GFP ベクター形質導入正常マウスを用いた導入効率及びベクター送達に関する試験 (<i>GFP</i> ベクターのみを使用)	PND1 の新生仔 C57BL/6 マウス	単回静脈内投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Foust et al, 2009	4.3
SMNΔ7 マウス疾患モデルを用いた in vivo ICV 投与有効性試験	SMNΔ7 新生仔マウス	単回 ICV 投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Meyer et al, 2015	4.3
AAV-9 GFP ベクターを導入した新生仔又は幼若カニクイザルを用いた CNS 導入効率及び標的試験 (<i>GFP</i> ベクターのみを使用)	新生仔及び幼若カニクイザル	単回静脈内投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Bevan et al, 2011	4.3
新生仔ブタを用いた直接 ICV 注射による CNS 形質導入及び遺伝子発現解析	PND5 の仔ブタ	ICV 及び髄腔内単回投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Bevan et al, 2011	4.3
shSMN-RNA ベクター投与ブタモデルを用いた、誘導疾患モデルにおける AVXS-101 の有効性試験	PND5 の仔ブタ	単回 ICV 投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Duque et al, 2015	4.3
幼若サルを用いた AAV9.CB.GFP ベクターによる髄腔内投与形質導入試験	1 歳齢のカニクイザル	単回髄腔内投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Meyer et al, 2015	4.3
副次的薬理試験					
SMNΔ7 マウスの心不全モデルを用いた scAAV9.CB.SMN の有効性試験	SMNΔ7 新生仔マウス 野生型 C57BL/6 マウス	単回静脈内投与	Nationwide Children's Hospital Columbus, OH	Bevan et al, 2010	4.3

2.6.3 薬理試験概要表

2. 効力を裏付ける試験

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vg/kg) ¹	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は 参考文献
scAAV9.CB.GFP ベクター導入正常 マウスを用いた導 入効率及びベクタ ー送達に関する試 験 (<i>GFP</i> ベクター のみを使用)	C57BL/6 マウ ス	単回静脈内 投与	scAAV9.CB. GFP 4 E11 vg/マ ウス 又は 2.7 E14 vg/kg	8～10 例/群	PND1 又は PND2 の新生仔マ ウスに対する投与により、当 該 AAV9-GFP ベクターは主に ニューロンに形質導入され た。一方、成獣 (PND70) マ ウスに同じベクターを静脈内 投与したとき、主にグリア細 胞への形質導入が認められ た。形質導入された細胞種の 割合は、投与時の動物の年齢 に大きく依存していた。運動 ニューロンへの形質導入の喪 失は主に、これらマウスの出 生後 10 日以内に生じた。	Foust et al, 2009

2.6.3 薬理試験概要表

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vg/kg) ¹	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は 参考文献
SMA の SMNΔ7 マウスモデルを用いた ICV 投与の有効性及び CNS を標的とする形質導入試験	SMNΔ7 マウス	単回 ICV 投与	AVXS-101 : 2.7 E12 1.0 E13 1.8 E13 2.6 E13 3.3 E13 scAAV9.CB. GFP : 2.7 E12 1.0 E13 1.8 E13 2.6 E13 3.3 E13	雌雄 生存率 : 11～15 例/ 群 CNS 標的 : 1 用量あたり 3 例/ベクター	SMNΔ7 マウスに AVXS-101 を ICV 投与したとき、生存率及び行動成績が用量依存性に改善した。1.8 E13 vg/kg 以上の投与により生存率、正向反射、及び体重増加が有意に改善した。 高い方の 3 用量では腰部脊髄への幅広い形質導入が認められ、頸部で 46%、胸部で 47%、腰部で 72%が運動ニューロンに形質導入された。RNA 発現量は GFP ベクターと SMN ベクターで同程度であり、同じモデルを用いて静脈内投与した場合に比べて 10 分の 1 の用量で、形質導入がみられた。	Meyer et al, 2015

2.6.3 薬理試験概要表

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vg/kg) ¹	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は 参考文献
新生仔及び幼若の カニクイザルを用 いて AAV9-GFP ベクターを投与し た IV 形質導入試 験	PND1、 PND30、及び PND90 の新生 仔及び幼若の 雄性カニクイ ザル 3 歳時に投与す るカニクイザ ル 1 例	単回静脈内 投与	PND1～ PND3 のカ ニクイザル に投与： 1～3 E14 vg/kg 3 歳のカニ クイザル： 2.7 E13 vg/kg	雄：3 雄：1	PND1、PND30、及び PND90 のカニクイザルに 1～3 E14 vg/kg の用量で AAV9-GFP ベ クターを静脈内投与したと き、少なくとも出生後 90 日間 で主にニューロンへの形質導 入 [約 70%] が得られた。 3 歳のカニクイザルでは主に グリア細胞への形質導入が認 められ、運動ニューロンを標 的とする形質導入のための投 与の時間枠は早期であること が示唆された。	Bevan et al, 2011
5 日齢の新生仔ブ タを用いた ICV 投 与及び形質導入試 験	5 日齢の新生仔 ブタ	ICV 又は髄 腔内	5.2 E12 vg/kg	ICV：3 IT：3	すべての新生仔ブタにおい て、GFP の発現は背根神経節 のほか脊髄及び白質にも認め られた。これにより、全レベ ルの脊髄で広範な運動ニュー ロンへの形質導入が得られ た。 小脳プルキンエ細胞、髄質神 経線維及び個々の核（オリ ブ核など）で高発現が認めら れた。脳のその他の部位にお ける発現は、髄膜表面近くに 散在する細胞に局限してい た。末梢（CNS 以外）組織で は著明な GFP 発現は認められ なかった。	Bevan et al, 2011

2.6.3 薬理試験概要表

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vg/kg) ¹	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は 参考文献
shSMN-RNA ベクター投与ブタモデルを用いた、誘導病態モデルにおける AVXS-101 の有効性試験	5 日齢の新生仔ブタ	出生後 6～30 日に AVXS-101 を単回 ICV 投与	第 1 群： PBS 対照 第 2 群： scAAV9-スクランブルベクター： 6.5 E12 vg 第 3 群： scAAV9-shSMN：6.5 E12 vg 第 4 群： (発症前) scAAV9-shSMN ベクター：6.5 E12 vg AVXS-101： 8 E12 vg 第 5 群： 発症後 scAAV9-shSMN ベクター：6.5 E12 vg AVXS-101： 2-3.8 E13vg	第 1 群 対照：6 第 2 群：6 第 3 群：5 第 4 群：4 第 5 群：5	新生仔ブタを用いて大型動物の SMN「ノックダウン」モデルを作成した。低分子ヘアピン型 (sh) SMN RNA AAV9 ベクターを単回 ICV 投与された新生仔ブタは、顕著な運動ニューロンの消失を示し、SMA の徴候が発現して発症した。 罹病した新生仔ブタに対して AVXS-101 を用量 6.5E12 vg/kg で投与したとき、PND6 の新生仔ブタでは SMA の疾患表現型が完全に阻止されたが、PND30 にベクターを投与したときは部分的な疾患の改善が得られた。 このモデルは、SMA に伴う特徴的な電気生理学的及び組織学的変化を正確に模倣していることから、SMA 治療のための AVXS-101 の早期使用の理論的根拠が示された。	Duque et al, 2015

2.6.3 薬理試験概要表

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vg/kg) ¹	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は 参考文献
幼若サルを用いた AAV9.CB.GFP ベ クターによる髄腔 内投与形質導入試 験	幼若 (1 歳齢のカニ クイザル)	IT 投与	1 E13 vg/kg の scAAV9.CB. GFP	1 歳齢のカ ニクイザル 7 例 雌雄	CNS、脳及び脊髄全体を通し てニューロンへの形質導入が 生じ、サルを 5～10 分間トレ ンデレンブルグ体位に保持し たとき形質導入が改善した。 投与後 10 分間トレンデレンブ ルグ体位を保持したとき、頸 部、胸部、及び腰部の GFP 発 現は 55、62、及び 80%改善し た。 体内分布解析から、ベクター DNA は多数組織に広範に分布 することが明らかになった が、顕著な RNA 発現は CNS、筋肉、肝臓、及び副腎 組織でのみ認められた。	Meyer et al, 2015

¹ 又は、他に記載の通り

2.6.3 薬理試験概要表

3. 副次的薬理試験

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (vp)	被験物質：AVXS-101		
				雌雄、各群 の例数	特記すべき所見	試験番号又は参考文献
SMN17 マウスを用いた心機能試験	SMN17 SMA マウス 正常 C57BL/6 マウス	出生後 1 日に静脈内投与	5 E11 vg / マウス	雌雄	無処置の SMN17 マウスは健康な WT マウスに比べ、概ね心臓が縮小し、左室重量が減少し、心室壁が顕著に菲薄化していた。 PND1 に AVXS-101 を静脈内投与した後、AVXS-101 投与マウスでは無処置 SMN17 マウスに比べ PND14 の左室心筋重量が増加した。投与 SMN17 マウスでは、拡張と壁菲薄化の両方が改善し、野生型の数値向かって回復した。	Bevan et al, 2010