

Barbara Konkle: 私は Barbara Konkle です。私はワシントン大学の教授であり、Bloodworks Northwest (ブラッドワークス・ノースウエスト) の主任科学者と Washington Center for Bleeding Disorders (出血性疾患ワシントンセンター) の共同ディレクターも勤めています。本日は、遺伝子治療と血友病、特にアデノ関連ウイルス (AAV)、AAV ベクターを用いた遺伝子治療と血友病への応用についてお話します。

今回の学習目的は、血友病 A と血友病 B に対する遺伝子治療の最近の臨床試験の主な特徴を理解することです。遺伝子治療は非常に単純です。標的とする遺伝子を AAV ベクターに搭載して、それを末梢から注射するだけです。ベクター、エンハンサー、プロモーター、これらは後ほど詳しく述べますが...

...これらによって目的となる肝臓を標的とします。AAV は基本的には染色体外に存在してタンパク質を産生します。標的細胞でなにがおこっているかは、未だ解明すべき不明な点が多いですが、...

...AAV を基本とした遺伝子治療は様々な疾患に対して過去 30 年に 200 以上ものヒト臨床試験が行われています。AAV ウイルスに焦点をあてると、上段が野生型の AAV です。野生型 AAV に存在する rep, cap 遺伝子はベクターでは除去される遺伝子です。AAV はパルボウイルス科の一種です。約 4.7-kb の単鎖 DNA ゲノムを持っています。

AAV は単独で複製できないため、ヘルパーウイルスを必要とします。これが、(随伴という) その名前がついた理由です。アデノウイルス培養に含まれる不純物として見つかりましたが、この様にして発見されたという以外はアデノウイルスと何の関係もありません。それは非病原性で、自然にヒトに感染します。AAV ベクターも、単独では複製しません。

以降のスライドでご覧いただけるように、AAV ベクターには自然界に存在する AAV を利用したもの、または遺伝子工学で人工的に設計されたものがあります。ウイルスのカプシドが、ベクターの組織指向性を決定します。非分裂細胞において長期発現が可能なこと、また基本的には染色体に挿入されないこと、また、現段階において重要な点は、今のところ



ろヒト臨床試験や動物モデルで安全性が認められていることです。先ほどお話した様に、私たちは AAV に曝露されています。

人口の約 30% から 50% が AAV に対する抗体を持っています。最も見られるのは AAV2 の血清型です。血友病関節症の転帰を調査するために 62 名の少年からサンプルを採取した臨床試験の一貫として、経時的に若年における AAV 抗体の陽転を調べた優れた試験がありました。

右側にあるグラフで示している様に、これらの少年は AAV に曝露されていました。最も頻度の高かったのは AAV2 で、この試験では特に AAV2、AAV5、AAV8 を調べました。血友病にこれらのベクターを使うには、発現を改善するために数年間に及ぶ工夫がありました。初期には、カプシドに対する免疫反応を空カプシドの除去によって軽減する可能性が考えられました...

...これは良い方法のように思われますが、全般的な免疫反応が改善できたかどうかは不明です。異なる AAV 血清型が使用されます。初期には AAV2 が使われ、その後、抗体陽性率が低く、異なる組織向性を持つ別の血清型が使用されました。肝臓を確実に標的にするために肝臓に特定したプロモーターと調節因子が最適化されました。

この図は CMV プロモーターが示されていますが、実際には別のプロモーターが使われます。科学者はさらに、コドンを最適化して、第 VIII 因子と第 IX 因子の発現を増加させます。現在では共通した 2 つの遺伝子改変が行われます。1 つは第 VIII 因子の B ドメインを削除して AAV に挿入できるサイズにします。

次は第 IX 因子の Padua 変異体です。イタリア Padua の家族に発見されたこのアミノ酸変化は、非常に高レベルの第 IX 因子活性を持ちます。それはこの 1 つのアミノ酸変異によるものでした。ご覧いただけるように、それを第 IX 因子カセットに挿入することにより、第 IX 因子の活性を顕著に増加させることができます。

血友病における最初の AAV ベクターによる臨床試験は、筋肉内注射で行われました。これはフィラデルフィア小児病院で実施されました。全身性の凝固因子発現はありませんでした。しかし興味深いことに、後で筋肉の生検をした時に、持続性の第 IX 因子遺伝子の



発現を認めました。最初の肝臓注入は第 IX 因子をもつ AAV2 ベクターが使用されました。右側に示しているグラフは、論文からのものです。

高用量では、実際に第 IX 因子は増加し、赤線で示されるように、最初は約 12% で、それは信じられないほどの値でした。しかし、その後、肝酵素 ALT の上昇が顕著で、これが第 IX 因子の発現低下と関連していました。これは非常に驚きでした。その理由のひとつは、この試験の施行が犬モデルの結果に基づいていたからです。

この肝障害は犬では起こりませんでした。もちろんヒトは犬ではありませんが、それでも驚く結果でした。その後に投与された患者には AAV2 に対する抗体を認めました。そのためでしょうが、この患者には効果を示さず、次に、免疫反応をより良く理解するために、別な被験者に投与されました。

再度、肝機能の上昇がありました。第 IX 因子の発現は認めませんでした。最初の長期発現は、St. Jude/UCL の試験で見られ、右側に示されているのは、公表された論文からのものです。最初の経過観察から、最長 8 年のデータがあり、それらは継続的に発現しています。金色の線は因子レベルで、上の青い矢印は凝固因子投与であることを示しています。

ご覧いただけるように、因子レベルは上下に変動しますが、約 2% から 6% に上昇するにつれて、本当に安定した発現が見られます。この治療で学んだ重要な点は、緑色の矢印で示しているように、ALT の上昇があった時、患者 5 で急な上昇が見られますが、これらの患者にはプレドニゾンの投与が行われました。

プレドニゾン治療によって因子活性を維持できることを示しています。これが、すべての遺伝子治療治療で用いられているアプローチです。この表は現在進行中の第 I/II と III 相の治療の代表例です。ここではいくつかの試験が掲載されていないかもしれませんが、この表はすべての臨床試験を示すものではなく、この分野の状況を理解するためだからです。

この分野は進歩が著しく、そのためデータが多少古くなっているかもしれませんが、最初にご覧いただいたのは血友病 A で、次に 3 つの血友病 B の治療が、同じ治療依頼者で、別名で行われました。お気づきのように、ベクターは異なる血清型で行われました。またカプシド改変ベクターとして、Spark 100 や Ultragenyx 社の AAVhu37 があります。



AAV ベクターの製造に使われる細胞は昆虫、または哺乳類由来のものです。昆虫細胞のメリットは多く生産できることですが、翻訳語修飾が異なります。現時点では、これが違いをもたらすかどうかは不明です。次の欄は試験の相です。BioMarin が最も進んでいます。第 III 相では 2 種類の用量が使用されており、これらは体重キログラムあたりのベクターのゲノム量です。

登録時には高用量が含まれていましたが、第 III 相で使用される用量を決定するために、第 I 相と II 相では用量漸増が行われました。Spark の第 I/II 相試験では第 VIII 因子が現在観察相にあり、少なくとも 6 か月間行われます。患者に治療レジメンと出血状態を電子日誌に記録させます...

...そのため、患者がいったん遺伝子治療を受け取った後では、結果を遺伝子治療前の自身のデータと比較できます。血友病 B では、第 III 相の 2 つの試験があります。第 I/II 相で Spark 試験であったものがファイザー社によって第 III 相で、次いで UniQure 試験もまた第 III 相です。

より早期の段階のものは、Freeline 社の試験です。これまでの試験結果は何を伝えているでしょうか？いくつかの報告済みの結果や臨床試験から、どんな状況がわかります。これは AAV-第 IX 因子 Padua をもちいた AMT-061 試験で、この試験の最初は...

...図の左側に示されるように、AMT-060 は、第 I/II 相に関しては最初のもので、これは約 7.5% の第 IX 因子活性を得ました。これは私が血友病の治療を開始した頃には聞いたことのないものでした。遺伝子治療で、患者を軽度レベルに回復させることができれば、それだけで成功だと思っていました。そして、それは本当に達成されました。

その試験を見ますと、6%の持続的レベルがあり、それらの患者は凝固因子製剤の注入を行っておらず、出血していないのです。直近の試験からは、もっと高いレベルを達成できることがわかっています。ここで行われたのは、ベクターを使い Padua 変異体を追加し、それを 3 名の被験者に注入しました。36 か月までの結果がここに示されており、実際には、その後のデータが ASH で発表されました。

これらの 3 名の参加者において、第 IX 因子活性の平均は 36 週目で 45% でした。この試験での興味深いのは、免疫抑制が必要なかったことです。患者は低力価の



AAV5 に対する抗体をもっており、そのため一部の患者には抗体が存在しても、ベクターを注入可能かどうかについて議論が生じました。

この試験は、この用量での第 III 相試験です。これは、AAV-第 IX 因子 Padua Spark-9001 試験での 2 年間のアップデートで、29 か月までの発現レベルを示しています。いくらかの変動はありますが、すべての状態において臨床的に有意な状態となり、凝固因子投与の必要性や出血がなくなっています。

この BMN 270 は第 I/II 相で、現在はこの用量、すなわち  $6 \times 10^{13}$ 、で第 III 相試験に入っています。これらは合成基質法による第 VIII 因子測定の結果です。初期にはこのベクターを使うことで正常範囲の第 VIII 因子にまで上昇しましたが、時間を追って少し低下しました。

それでも未だに中央値の範囲は 40 週間程度で、明らかに素晴らしい数字です。この試験が最も進んだものなので、今後も観察していく必要があります。その他の第 VIII 因子の試験についても推移をみていく必要がありますが、現時点ではまだまだ不明です。別な第 VIII 因子の遺伝子治療の試験に、Alta 試験があります。これが最新結果で、ASH 学会で発表されました。

これは第 I/II 相です。一番上でご覧になれるように、これらは  $2 \times 10^{12}$  までの用量を投与された被験者です。最高用量のコホートは、 $3 \times 10^{13}$ 、で第 III 相です。用量効果があります。次に、左側のパネルでご覧になれるのは、直線グラフの第 VIII 因子活性で、結果はよく分かれています。

対数目盛で高用量コホートの患者における正常範囲のレベル達成を立証しています。まだ早期のものであるため、時間を追ってこれらの被験者の経過観察を続ける必要があります。この第 VIII 因子が、ファイザーが実施している試験の第 III 相で使われています。全般に、AAV 遺伝子治療には一部非常に優れた点がありますが、課題と疑問もあります。

問題の 1 つは、すべての患者が適応にならないことです。現在の対象となる被験者はインヒビターを持たない患者になります。しかし、インヒビターを対象とした多くの研究がなされていますので、将来は、この基準が変わる可能性があります。試験は成人男性を対象としています。第 VIII 因子については、一般的に 1% 未満ですが...



...その基準は少し甘くなってきており、第 IX 因子については、2% 以下です。AAV ベクターに対する既存の抗体を持つ患者は除外されます。血友病 B を対象とした UniQure 社の治験では、低力価の AAV 中和抗体陽性の患者が含まれています。これが、ベクター力価に関連しているのか、または血清型に関連しているのか、未だに議論が続いており、まだ完全な解答が得られていません。

将来的には、現在または過去のインヒビター保有患者が標的となります。Spark 社が治験を予定し、他にも治験用の治験実施計画書を作成中の会社があると聞いています。抗 AAV 抗体の存在も問題ですが、重症度の低い血友病や小児期の患者も除外されます。AAV は染色体へ非挿入性ですので、成長中の肝臓では徐々に失われます。

それは確かに現時点では若年小児における制限ですが、どの程度の年齢からその影響が失われるかはわかっていません。重度の血友病患者には女性もいますが、一部の治験実施計画書では女性の参加許可に関する基準を緩めています。そして、発現が消失したり、早期の治験に参加した患者やうまく行かなかった患者にどうするか、などについても結論がありません。

血友病に対して、AAV 以外の遺伝子治療で同様の研究相にあるものはありません。それでは遺伝子治療のリスクは何でしょうか？ 現在血友病に対しては本当に良い治療があります。ですので、患者の治療を考慮する時には、患者に対する利点がリスクよりも優れていることを確認する必要があります。既知のリスクがいくつか存在します。

ひとつは短期の肝毒性で、ほとんど全治験で一部の患者に見られます。一般的にそれは短期のステロイド投与が奏効します。いくつかの治験では、少数の患者が免疫抑制の長い治療を必要とすることが知られています。そのため毒性についての懸念が挙がっています。また、患者は、ウイルスに暴露されると、抗 AAV 抗体が発生し、この時点で追加の投与が不可能になります。

一般に個人間の発現には広範囲の違いがあることもわかっています。それは、T-細胞のカプシドに対する免疫反応によるといわれています。ただし、効果が失われる、または低下する患者の中には、この現象が認められない方もいます。これに関して異なる議論もありますが、現時点では、本当に解明はされていないと思います。



また、いくつかの不明な点も存在します。長期の肝毒性があるかどうかわかりません。現在その証拠がありませんが、それは経過観察が非常に重要なものになります。前述のように、AAV の挿入率は非常に低いものです。しかし、体重キログラムあたり 実数として  $10^{13}$  のウイルスゲノムを投与しています。

様々な疾患に対して複数の治験で AAV を投与された患者の数が増えているので安心はできると思いますが、これは今後も綿密に観察が必要です。生殖細胞系への移行のエビデンスはありません。動物モデルはそれを裏付けていません。ヒトの試験では、ベクターが精液に検出されますが、これは、消失しますが、これが精子中に存在するという証拠はありません。ですからこれは安心です。

まとめますと、AAV を用いた遺伝子治療は、血友病患者で第 VIII 因子と第 IX 因子のレベルを上昇させることに成功してきました。達成しえた様々な凝固因子の上昇によって、凝固因子の使用と出血を顕著に減少させました。今日までに、血友病と他の AAV 治験から、非常に優れた安全性プロファイルが得られているように見えます。しかし、安全性に関する徴候を調査するためには、長期経過観察による注意を怠ってはいけません。

この発現が数年にわたる一過性のものであるかどうかを理解する長期の有効性データもまた必要です。現時点では、数年に及ぶ発現を得られることはわかっています。それは継続するでしょうか？それは消失するでしょうか？長期データが本当に必要です。さらに AAV を使ったアプローチを工夫したり、他のベクターを利用することで、小児を含む、幅広い血友病患者集団を治療するようになると思います。

ご静聴ありがとうございました。

