

様式第 1 (第 7 条関係)

<p>第一種使用規程承認申請書</p> <p style="text-align: right;">令和元年 10 月 9 日</p> <p>厚生労働大臣 加藤 勝信 殿 環境大臣 小泉 進次郎 殿</p> <p style="text-align: center;">氏名 国立大学法人 九州大学 九州大学病院</p> <p style="text-align: center;">申請者 病院長 赤司 浩一 印</p> <p style="text-align: center;">住所 福岡市東区馬出 3 丁目 1 番 1 号</p>	
<p>第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項 (同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。) の規定により、次のとおり申請します。</p>	
<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>3'-LTR の U3 領域を欠失し、ヒト色素上皮由来因子をヒトサイトメガロウイルスプロモーター及び変異型 Woodchuck 肝炎ウイルス転写後制御エレメントの制御下に発現し、水疱性口内炎ウイルス由来 G タンパク質をエンベロープに持つ非増殖型の遺伝子組換えアフリカミドリザル由来免疫不全ウイルス (SIVagm-hPEDF)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の施錠管理された冷凍庫において行う。</p> <p>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p> <p>運搬</p> <p>(3) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。</p>

患者への投与

- (4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で、患者の網膜内に直接注入することにより行う。投与時は、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (5) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の排出が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。
- (6) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、血液、涙液、尿の検体に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。必要と判断された場合には、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在を確認する。

患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間までに、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (11) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等及び検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。
- (12) 施設等から検査機関への検体の運搬は、第一種使用規程の承認を受けて

いる遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。

感染性廃棄物等の処理

(13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。

(14) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が附着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

(15) 患者の投与眼に接触した眼帯及びガーゼ等の廃棄は、排出等の管理が不要となる期間までは不活化処理した上で行う。

以上

生物多様性影響評価書

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

「3'-LTRのU3領域を欠失し、ヒト色素上皮由来因子をヒトサイトメガロウイルスプロモーター及び変異型Woodchuck肝炎ウイルス転写後制御エレメントの制御下に発現し、水疱性口内炎ウイルス由来Gタンパク質をエンベロープに持つ非増殖型の遺伝子組換えアフリカミドリザル由来免疫不全ウイルス (SIVagm-hPEDF) (以下、本遺伝子組換え生物)」の基本骨格に用いられているアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (*Simian immunodeficiency virus from African green monkeys: SIVagm*) は、分類学的にはレトロウイルス科、レンチウイルス属に分類される[1]。レトロウイルス科のウイルスは、逆転写酵素をもつ一本鎖RNAウイルスであり、7属に分類され、サル免疫不全ウイルス (SIV) の属するレンチウイルス属にはSIVのほか、ヒト免疫不全ウイルス (*Human immunodeficiency virus: HIV*)、ネコ免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルスなどが属している。SIVは1985年に、ヒト後天性免疫不全症候群 (*Acquired immune deficiency syndrome: AIDS*) と似た症状を呈するマカク属のアカゲザルから初めて分離され (現在はSIVmacと呼ばれる)、以後分離されたサル種により、SIVagm, SIVcpz, SIVmnd, SIVsyk等と分類されている[2, 3]。SIVagmはアフリカミドリザルを主な自然宿主とし自然宿主に対して病原性を示さない[4]。本遺伝子組換え生物 (SIVagm-hPEDF) は1988年にアフリカミドリザルから分離されたSIVagm-TYO株[5]を基本骨格として作成されている[6]。ヒトへのSIVの感染については、これまでに報告がない。本遺伝子組換え生物は、エンベロープにVSV由来のGタンパク質を含む。

1. Knipe DM, H.P., Nonhuman Lentiviruses Fields virology fifth edition., 2007 2215-2243.
2. Hirsch, V.M., et al., Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV. Current opinion in genetics & development, 1995. 5(6) 798-806.
3. 井戸栄治、速水正憲, サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性. 蛋白質核酸酵素, 1994. 39(8) 1425-1437.
4. Miura, T., et al., Genetic analysis and infection of SIVAGM and SIVMND. Journal of medical primatology, 1989. 18(3-4) 255-9.
5. Fukasawa, M., et al., Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. Nature, 1988. 333(6172) 457-61.
6. Nakajima, T., et al., Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. Human gene therapy, 2000. 11(13) 1863-74.

2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスベクターは導入遺伝子を宿主ゲノムに挿入でき、目的遺伝子の発現を長く維持できることから、遺伝子治療の有力な候補として研究が進められてきた。レトロウイルスベクターは、1990年代の遺伝子治療開発初期に用いられたガンマレトロウイルスベクター (マウス白血病ウイルス (*Murine leukemia virus: MLV*) 由来) と、近年利用が進んでいるレンチウイルスベクターに分けられる。レンチウイルスベクターは非分裂細胞にも遺伝子を挿入できることから神経細胞を対象とした治療薬開発にも利用でき、またガンマレトロウイルスベクターに比べ遺伝子の挿入部位がランダムに分布し、ガンマレトロウイルスベクターで報告されたような白血病の発生の報告はこれまでになく、より安全性の高い手法として期待されている[7-10]。

現在最も広く使用されているレンチウイルスベクターは第3世代レンチウイルスベクターで

あり、そのパッケージングシステムにより導入遺伝子の高い発現効率を得られるとともに、野生型ウイルスや再構成中の相同組換えにより偶発的に自己複製能を獲得したレンチウイルス (Replication competent lentivirus: RCL) が発生する可能性はほとんどないと考えられている[11-14]。

現在、医療を目的として最も使用されているレンチウイルスベクターはHIV-1由来で、AIDS、副腎白質ジストロフィー、 β サラセミア、パーキンソン病など複数の疾患に対して治療薬開発が進められている[15-18]。

九州大学病院では、本遺伝子組換え生物の網膜色素変性に対する遺伝子治療臨床研究を2013年3月に開始し、2016年2月末日までに5症例の投与及び観察期間が完了した。その結果、1例1件において、本遺伝子組換え生物投与との因果関係が否定できない重篤な副作用として、投与した臨床研究薬の吸収が遅く、網膜剥離が遷延したため投与後14日に、網膜剥離手術が実施された。当該事象は被験者や投与部位の選定で対応可能と考えられた。また、本遺伝子組換え生物由来の核酸配列等の体液からの排出も確認されていないことから、安全性上の重要な問題がないと判断した。(添付1：遺伝子治療臨床研究 総括報告書)。

7. Naldini, L., et al., In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (New York, N.Y.), 1996. 272(5259) 263-7.
8. Naldini, L., et al., Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. 93(21) 11382-8.
9. 塙秀樹, レンチウイルスベクターの最近の進歩. *バイオテクノロジージャーナル*, 2007. 7(2) 158-162.
10. 土肥可奈世, 竹内康裕, レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療: 臨床治験での進展と安全性. *ウイルス*, 2015. 65(1) 27-36.
11. Zufferey, R., et al., Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology*, 1997. 15(9) 871-5.
12. Dull, T., et al., A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology*, 1998. 72(11) 8463-71.
13. Zufferey, R., et al., Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology*, 1998. 72(12) 9873-80.
14. 三好浩之, レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入. *ウイルス*, 2002. 52(2) 225-231.
15. Levine, B.L., et al., Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(46) 17372-7.
16. Cartier, N., et al., Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* (New York, N.Y.), 2009. 326(5954) 818-23.
17. Cavazzana-Calvo, M., et al., Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*, 2010. 467(7313) 318-22.
18. Palfi, S., et al., Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* (London, England), 2014. 383(9923) 1138-46.

3 生理・生態学的特性

(1) 基本的特性

SIVagmは直径約100 nmの球型のエンベロープウイルスで、一本鎖のプラス鎖RNAをゲノムとして持つ。SIVagmのゲノムには、すべてのレトロウイルスに共通する構造遺伝子 *gag*・*pol*・*env*、調節遺伝子である *tat*・*rev*、アクセサリ遺伝子である *vif*・*vpx*・*nef*が存在する。*gag*はウイルスの構造タンパク質を、*pol*はウイルス酵素群を、*env*はエンベロープタンパク質をコードする。*tat*・*rev*は発現制御遺伝子で、Tatは遺伝子発現の制御シグナル配列を含むTAR (trans-acting responsive region) に結合して下流の転写を促進し、RevはmRNAの核外輸送に関わるRRE (Rev response element) に結合する。*vif*・*vpx*・*nef*はSIVagmの複製に必ずしも必須ではない。

SIVagmは細胞に吸着・侵入したのち、自らの逆転写酵素を用いてRNAゲノムを二本鎖DNAに変換する。逆転写で形成された二本鎖DNAは、インテグラーゼによって宿主細胞の染色体に組み込まれる。この組み込みは一般にランダムに起こると考えられているが、他のレンチウイ

ルスではウイルスによって特定の部位に取り込まれやすい傾向が指摘されている[19]。染色体に組み込まれたウイルス由来DNA配列（プロウイルス）からは、宿主細胞のRNAポリメラーゼを利用して、新しいウイルスRNAが合成される[1, 3-5]。

（２）生育又は生育可能な環境の条件

SIVagmはサルに血液感染、性感染または母子感染し、潜伏期を経て増殖する。SIVagmはHIVと同様にCD4分子を主要なレセプターとしており、CD4陽性Tリンパ球、マクロファージや一部の樹状細胞などに感染する。血液感染や性感染をすることから推定されるように、血液や精液などの体液中では比較的安定であるが、空気感染をしないことから環境中ではやがて消滅すると考えられる。

（３）捕食性又は寄生性

報告によっても異なるが、アフリカミドリザルの10-60%にSIVagmの感染を認めることが報告されている[20-22]。また実験的にはアフリカミドリザル以外に、マカク属のカニクイザル、アカゲザル、ブタオザルにも感染することが報告されている[23-25]。

SIVagmのヒトへの感染性はこれまでに報告がない。

（４）繁殖又は増殖の様式

SIVagmはアフリカミドリザルを自然宿主とし、血液感染、性感染または母子感染によって伝播し、潜伏期間を経て感染個体で増殖する。細胞に感染後、ウイルスのRNAゲノムは2本鎖DNAに変換され、宿主細胞の染色体へ組み込まれる。染色体に組み込まれたプロウイルスから、ウイルスRNAゲノムやウイルスタンパク質が翻訳・転写され、新たなウイルス粒子が形成・放出される。空気伝播はしない。増殖したウイルスは、HIVと同様に血液、精液、母乳などの体液に排出される[3, 5]。

（５）病原性

SIVの病原性はウイルスと宿主の組み合わせにより規定され、SIVagmは自然宿主であるアフリカミドリザルに対して病原性を有さないことが知られている[4]。一方、実験的にSIVagm90株をブタオザルに感染させた場合、CD4陽性リンパ球の減少、易感染性など、ヒトのAIDSと類似した症状を呈することが報告されている[25]。本遺伝子組換え生物の基本骨格であるSIVagm-TYO株については、カニクイザルへの実験的感染で病原性を認めていない[24]。またヒトへの感染や病原性の報告はない。

（６）有害物質の産生性

SIVagmそのもの、およびその構造蛋白質が有害物質を産生するという報告はなく、また感染を契機に有害物質が産生されるとする報告もない。

（７）その他の情報

物理化学的安定性に関して、SIVagmはエンベロープを有しており、有機溶媒（グルタルアルデヒド、エタノールなど）や塩素化合物などの処理で容易に失活し、HIVと同様に感染性を失う。例えば、有機溶媒としては2%グルタルアルデヒドあるいは50%エタノールで10分、70%アルコールで1分処理、塩素化合物としては有効塩素濃度0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウムで処理することで容易に失活する[26-29]。また実験室では、通常はオートクレーブによる滅菌処理により失活させる。

保存安定性に関しては、-80℃以下では数年間にわたり感染性がほとんど低下しない。ただし凍結融解を繰り返すと、エンベロープが障害を受けて感染性が急激に低下する。

本遺伝子組換え生物は、LTRのU3領域を削除したSIN (self-inactivating)ウイルスであり、宿主細胞の染色体に組込まれた後に5'R領域からの全ゲノムは転写されない。ウイルスの感染と増幅に関与する構造及び調節タンパク質はウイルス製造時のみプラスミドとして細胞に導入して供給されるため、当該遺伝子組換え生物からは構造及び調節タンパク質は生産され

ず、感染細胞内でのみCMVプロモーター直下に搭載したhPEDF遺伝子からのmRNAが効率よく産生される。したがって、天然ウイルスは自然環境中で増殖し得るのに対して、本遺伝子組換え生物はたとえ外界に漏出しても、伝播して増殖することは無い。

本遺伝子組換え生物の生存能力を評価するために、外界と類似した環境中として水道水中に本遺伝子組換え生物を一定時間曝した後、培養細胞への感染能力の有無を確認した結果、水道水条件下において25℃および4℃の両条件において12時間以降はゼロ付近の値となる。従って、12時間以降はベクターの感染能を失っていると考えられる。参照条件として実施した緩衝溶液 (DPBS) 中では、48時間(2日)後において25℃では約7%及び4℃では約18%が感染能を有していることが示されたが、それぞれの条件で継時的に感染能を消失して行くことが確認された (別紙1)。

19. Mitchell, R.S., et al., Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS biology*, 2004. 2(8) E234.
20. Ohta, Y., et al., Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *International journal of cancer*, 1988. 41(1) 115-22.
21. Hendry, R.M., et al., Antibodies to simian immunodeficiency virus in African green monkeys in Africa in 1957-62. *Lancet (London, England)*, 1986. 2(8504) 455.
22. Allan, J.S., et al., Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *Journal of virology*, 1991. 65(6) 2816-28.
23. Herchenroder, O., et al., Experimental infection of rhesus monkeys with SIV isolated from African green monkeys. *Intervirology*, 1989. 30 Suppl 1 66-72.
24. Honjo, S., et al., Experimental infection of African green monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVAGM strain isolated from a healthy African green monkey. *Journal of medical primatology*, 1990. 19(1) 9-20.
25. Hirsch, V.M., et al., Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *Journal of virology*, 1995. 69(2) 955-67.
26. 日本ウイルス学会, ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. *ウイルス*, 1993. 43 199-232.
27. Spire, B., et al., Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet (London, England)*, 1984. 2(8408) 899-901.
28. Resnick, L., et al., Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *Jama*, 1986. 255(14) 1887-91.
29. Watanabe, Y., et al., Inactivation of laboratory animal RNA-viruses by physicochemical treatment. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 1989. 38(4) 305-11.

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

*hPEDF*遺伝子：約5 kDaの*hPEDF* (human pigment epithelium-derived factor: ヒト色素上皮由来因子) タンパク質をコードする全長1257 bpのcDNAであり、ヒト由来培養網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) のcDNAライブラリーをテンプレートとしてサブクローニングを行い、得られた塩基配列がGenbankに登録されている*hPEDF*遺伝子の塩基配列 (No. AF400442) と完全に同一であることを確認した。全塩基配列および対応するアミノ酸配列を、別紙2に示す。

SIVagm-*hPEDF*のゲノムRNAを合成するジエントランスファープラスミドには、*hPEDF*遺伝子の他に、SIVagm-TYO株由来のパッケージングシグナル (ψ)・RRE (Rev-response element)・cPPT (central polypurine tract)、Cytomegalovirus由来のCMVプロモーター、Woodchuck hepatitis B virus由来のWPRE (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) が配列されている。また*hPEDF* mRNAの転写にはプロモーター活性の高いCMVプロモーターを使用し、ウイルスゲノムRNAの5'端と3'端のLTR (Long terminal repeat) 配列のプロモーター部分は削除 (Δ 5'LTR, Δ 3'LTR) し、SIN (self inactivating) 化してある[6, 13]。SIVagm-*hPEDF*の全塩基配列、塩基数については別紙3に示す。

(2) 構成要素の機能

・*hPEDF* 遺伝子：418 個のアミノ酸からなる分子量 46,342Da の分泌型糖タンパク質である*hPEDF* をコードする。*hPEDF* は胎児網膜色素上皮細胞の培養上清から初めて分離・精製され[30]、構造上セリンプロテアーゼ感受性ループを有するが、プロテアーゼ阻害活性をもたず Non-inhibitory SEPRIN (Serine protease inhibitor) に分類される[31, 32]。

中枢神経系をはじめ広くヒトの体内に発現しており、神経親和性が強く、小脳顆粒細胞、海馬・線条体の神経細胞、網膜神経細胞、脊髄の運動神経などに対し、強い神経保護作用を示すことが知られている[33]。その機序としては、培養未熟小脳顆粒細胞を用いた実験では、転写因子 NF κ B の活性化を誘導し、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2 や Bcl-x、神経栄養因子である NGF (nerve growth factor)、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)、GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) の発現を上昇させることが報告されている[34]。

また近年では、強力な血管新生抑制効果を示し[35]、虚血性心疾患[36] や悪性腫瘍[37]に対する効果も報告されている。

hPEDF の過剰発現に関しては、発生期のマウス網膜にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて *hPEDF* を高発現させた実験や[38]、米国での *hPEDF* 遺伝子搭載アデノウイルスベクターの硝子体投与による加齢黄斑変性に対する臨床研究[39]の報告があるが、*hPEDF* 過剰発現による毒性は報告されていない。また *hPEDF* により野生型ならびに遺伝子組換え SIV ベクターの感染性 (感染する動植物の種類や感染様式) が変化したとする報告はない。

- ・ RRE : Rev タンパク質が結合し、ウイルス RNA を効率よく核から細胞質へ輸送する。
- ・ cPPT : ウイルスゲノムの核内移行を媒介し、導入遺伝子の発現効率を高める。
- ・ CMV プロモーター : 多くの細胞において構成的に機能するプロモーターであり、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞において、*hPEDF* 遺伝子の転写を行う。
- ・ WPRE : RNA 安定性を高めることにより導入遺伝子の発現効率を高める。

SIVagm 由来のゲノム配列は大部分が削除されており、感染後に新たなウイルス粒子は作成されない (非伝播性)。またこれら供与核酸の導入によって SIVagm ベクターの感染性が変わることはないと考えられる。これは SIVagm-nls*-LacZ (*nuclear localizing signal) と SIVagm-*hPEDF* で、ラット網膜に同等の効率で導入遺伝子を発現させることができることから支持される。

30. Tombran-Tink, J., et al., Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1995. 15(7 Pt 1) 4992-5003.
31. Steele, F.R., et al., Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(4) 1526-30.
32. Becerra, S.P., Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Advances in experimental medicine and biology*, 1997. 425 223-37.
33. Yabe, T., et al., The neuroprotective role of PEDF: implication for the therapy of neurological disorders. *Current molecular medicine*, 2010. 10(3) 259-66.
34. Yabe, T., et al., NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *The Journal of biological chemistry*, 2001. 276(46) 43313-9.
35. Dawson, D.W., et al., Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 1999. 285(5425) 245-8.
36. Kuo, H.F., et al., Pigment Epithelium-Derived Factor Mediates Autophagy and Apoptosis in Myocardial Hypoxia/Reoxygenation Injury. *PloS one*, 2016. 11(5) e0156059.
37. Broadhead, M.L., et al., Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: prospects for therapy. *Trends in molecular medicine*, 2009. 15(10) 461-7.
38. Wong, W.T., et al., Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Molecular vision*, 2004. 10 837-44.
39. Campochiaro, P.A., et al., Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Human gene therapy*, 2006. 17(2) 167-76.
40. Miyazaki, M., et al., Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene therapy*, 2003. 10(17) 1503-11.

2 ベクターに関する情報

- (1) 名称及び由来
- (2) 特性

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

SIVagmベクター内に移入されたゲノムRNAは、5'端と3'端にそれぞれLTRを持つ単鎖RNAである。前述のように5'LTRと3'LTRに存在するプロモーター領域は削除され、かわりに*hPEDF*発現のためにCMVのプロモーター配列が挿入されており、Tat非依存的なゲノムRNAの転写を可能としている。5'LTRの下流にはSIVのパッケージングシグナル (ψ)、Revとの作用により転写産物の核外移行を亢進するRRE、遺伝子の導入効率を上昇させるcPPT配列が挿入されており、その下流にCMVプロモーターと搭載遺伝子*hPEDF*が配置されている。さらにその下流にはmRNAの安定性を高めることにより導入遺伝子の発現効率を高めるウッドチャック肝炎ウイルス由来のWPRE配列が挿入されている。本遺伝子組換え生物は、エンベロープにVSV由来のGタンパク質を含む。

野生型SIVagmと構築された SIVagm-*hPEDF* のゲノム構造の概略図を図1に示す。また、SIVagm-*hPEDF*の作製方法を別紙3に示す。

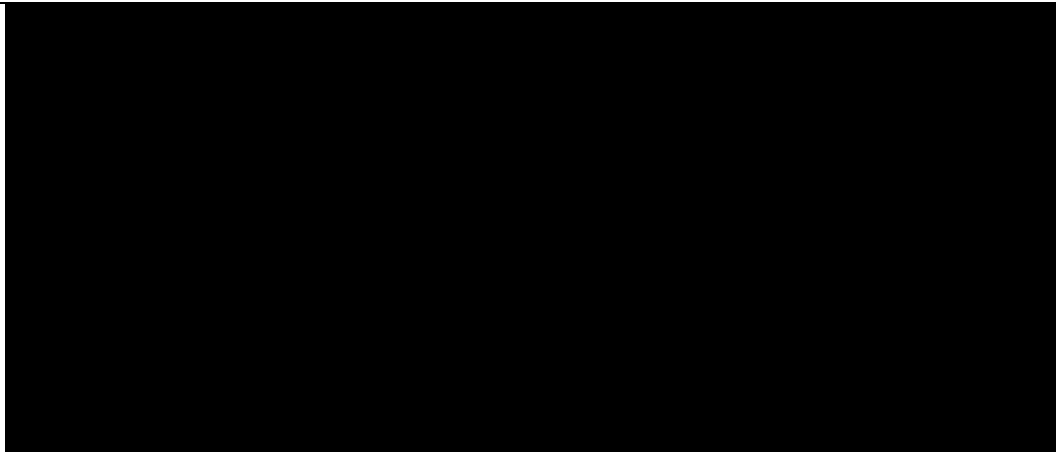


図1 野生型SIVagmと構築された SIVagm-hPEDF のゲノム構造の概略図

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

1) 名称及び由来

本遺伝子組換え生物は第3世代レンチウイルスベクターであり、以下の4種類のプラスミドベクターより作製される。各プラスミドベクターの構造図を図2に示す。各プラスミドベクターの塩基配列は別紙4に示す。

①名称：ジーントランスファープラスミド (pGTV-PEDF)

由来：hPEDF、SIVagm-TYO 株由来の RRE・cPPT・パッケージングシグナル (ψ)、Cytomegalovirus 由来の CMV プラモーター、Woodchuck hepatitis B virus 由来の WPRE を含む。

②名称：パッケージングプラスミド (pPV 3rd)

由来：SIVagm-TYO 株由来の gag・pol を含む。

③名称：Rev 発現プラスミド (pCI-rev)

由来：SIVagm-TYO 株由来の rev を含む。

④名称：VSV-G 発現プラスミド (pVSV-G)

由来：ヒト水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV) 由来の VSV-G を含む。

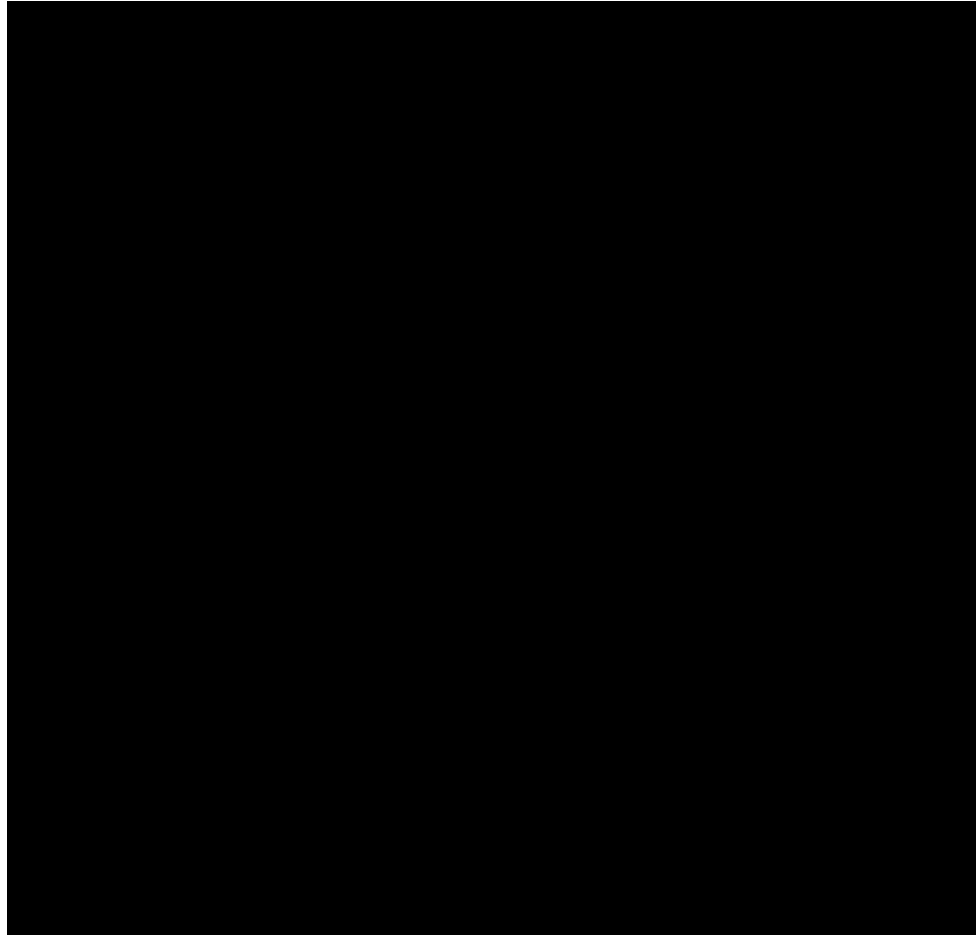


図2 SIVagm-hPEDFを構築するための各プラスミド構造図

2) 特性

①ジーントランスファープラスミド (pGTV-PEDF)

SIVagm-hPEDF のゲノム RNA を合成するプラスミドで、搭載遺伝子である *hPEDF* 遺伝子のほかに、遺伝子の発現効率を高めるための RRE・cPPT・WPRE が挿入されている。ウイルスゲノム上のプロモーター活性は除去され、かわりに CMV プロモーターが挿入されている。アンピシリン耐性遺伝子を有している。

②パッケージングプラスミド (pPV 3rd)

ウイルス構造タンパク質を発現させるプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

③Rev 発現プラスミド (pCI-rev)

制御タンパク質である Rev を発現するプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

④VSV-G 発現プラスミド (pVSV-G)

ウイルスベクターのエンベロープタンパク質に含まれる VSV-G (VSV G glycoprotein) を発現するプラスミドで、アンピシリン耐性遺伝子を有している。

レトロウイルスベクターの一般的な作製方法と同様、複数のプラスミドを培養細胞に同時に導入し、細胞上清に放出されるウイルス粒子を回収し、精製・濃縮する方法を用いた。具体的には、上記の 4 種のプラスミドを、最適化された一定の比率でヒト腎臓線維芽細胞由来株 293T にトランスフェクションすることにより作成される。

HEK293T 細胞はセルバンク化し、SIVagm-hPEDF の製造毎にプラスミドを導入する。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

プラスミド導入後、ウイルスベクターを含む培養上清を回収・濾過し、混入DNAを除去した後に濃縮を行う。濃縮後のウイルスベクター力価は、ジーントランスファープラスミド中の遺伝子配列を標的としたリアルタイムRT-PCR (Reverse transcription – polymerase chain reaction) 法により粒子数 (viral particle: Vp) を測定する。抗hPEDF抗体を用いた免疫組織化学的検出によるfunctional titerの算出 (transduction unit: T.U.) も併せて行う。SIVagm-hPEDF製剤の製造工程を別紙5に示す。品質検査試験の詳細は別紙6に示す。凍結した状態で治療施設へ輸送し、凍結状態のまま治療施設内の施設管理された冷凍庫に保管する。

製造者：株式会社 IDファーマ

製造所名：株式会社IDファーマ 研究開発センター1階 つくばGMPベクター製造施設

製造場所：茨城県

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

SIVagm ベクター内に移入した核酸は SIVagm-hPEDF の一本鎖 RNA として存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。細胞に感染すると、SIVagm-hPEDF の RNA ゲノムは核内へ移行し、逆転写酵素によって二本鎖 DNA に変換され、宿主細胞の染色体に組み込まれる。組み込まれた DNA (プロウイルス) からは、宿主細胞の RNA ポリメラーゼによって hPEDF mRNA が転写され、hPEDF タンパク質が翻訳される。導入遺伝子の長期的な発現を SIVagm-EGFP (enhanced green fluorescent protein) を用いて観察したところ、小動物 (ラット) の網膜において少なくとも1年間、大動物 (サル) の網膜において少なくとも4年間、安定した遺伝子発現が得られることを確認している[40, 41]。

ウイルスゲノムの宿主細胞染色体への組み込み部位については、SIVagm-hPEDF を用いてヒト網膜色素上皮細胞株に遺伝子導入し、プロウイルスの染色体挿入部位について検討を行ったところ、747クローンの検討にて特定のホットスポットは検出されず、過去の HIV の報告[42]と同様に遺伝子挿入はランダムにおこると考えられた。

SIVagm-hPEDF を作製する過程で、ベクターゲノムから欠失した Gag・Pol タンパク質や Rev タンパク質は分離したプラスミドよりトランスに供給するが、ベクターゲノムと gag・pol・rev 遺伝子には相同部分はなく、相同組換えにより RCL が出現する可能性は極めて低い[13]。

41. Ikeda, Y., et al., Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene therapy*, 2003. 10(14) 1161-9.
42. Ikeda, Y., et al., Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors. *Human gene therapy*, 2009. 20(6) 573-9.

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

SIVagm-hPEDF の検出にはリアルタイムRT-PCR法を用いる。SIVagm-hPEDFは自然界に存在するSIVagm が有しないhPEDF遺伝子を含むが、正常ヒト組織はPEDFを高く発現しているため、この部分を標的とした場合、リアルタイムRT-PCR法ではバックグラウンドが高くなり不適格である。そのため、SIVagm-hPEDF、野生型SIVagm及び相同組換えにより増殖能を獲得した組換えウイルス (RCL) の全てを検出する、SIVagm固有のゲノム領域を標的とした検出方法を確立した。このSIVagm固有のゲノム領域の RNA をDNA に逆転写後、PCR法を用いて増幅、定量して SIVagm-hPEDF を検出する。細胞から抽出した[]のSIVagm-hPEDFがあれば検出することができる (別紙7)。尿検体の検出限界 [] copies/μL、定量限界 [] copies/μL、涙液検体の検出限界 [] copies/スワブ検体、定量限界 [] copies/スワブ検体、血液検体 (全血) の検出限界及び定量限界 [] copies/μLである。

RCL (replication competent lentivirus) 検出について：米国Recombinant DNA Advisory Committeeにおいて議論されているように（2006年3月および6月開催）[43, 44]、レンチウイルスベクターにおけるRCLの検出法として再現性が高く安定した方法は確立していない。第3世代の製造方法によって生産されたHIV由来レンチウイルスベクターについて、最も経験のある2施設（Inder Verma博士の研究室ならびにNational Gene Vector Laboratories）で繰り返し実施された①遺伝子導入標的細胞におけるcapsid蛋白（p24）検出法、②vector mobilization assay、③gag・pol遺伝子を対象としたPCR法、のいずれにおいてもRCLの出現は検出できなかったことから、広汎なRCL検出試験を実施する必要性はないのではないかとされている。従って本遺伝子組換え生物において実施するRCL検出は、最終製品ならびに最終生産に使用したHEK293T細胞を継代培養増幅法（10継代）により増幅したサンプルについて、継代培養後の培養上清中のReversetranscriptase活性の有無を測定することにより、治験製品の品質試験として検定する。本法での定量下限及び検出限界は■■■■である。

43. Minutes of March 2006 RAC Meeting. Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors
(http://oba.od.nih.gov/rdna/rdna_resources.html)
44. Minutes of June 2006 RAC Meeting. Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors
(http://oba.od.nih.gov/rdna/rdna_resources.html)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

野生型レンチウイルスの場合、自身のゲノムに複製に必要な遺伝子群がコードされており感染した細胞の染色体にウイルスゲノムが組み込まれた後、ウイルスタンパク質が合成され新たなウイルス粒子が形成される。ウイルスゲノムの両端には転写活性を有するLTRが存在し、この部位より転写が開始される。またウイルス粒子はCD4分子を主要なレセプターとするため、感染性はCD4陽性Tリンパ球、マクロファージや一部の樹状細胞などに限定される。

本遺伝子組換え生物（SIVagm-hPEDF）のゲノム領域における野生型SIVagmとの違いは①アクセサリー遺伝子である*vif*・*vpx*・*nef*、LTRのTARに結合し転写を活性するTatをコードする*tat*、エンベロープタンパク質をコードする*env*を全て取り除いていること、②ウイルスベクター構成時のパッケージングに必要な構造遺伝子*gag*・*pol*・*rev*は、ジーントランスファープラスミドとは分離した2つのプラスミドから独立して供給されること、③5'LTRならびに3'LTRのU3、U5領域の一部が削除されており、その転写活性が取り除かれていること（SIN化）、の3点である。その結果、塩基配列としてSIVagm由来ウイルスゲノムの80%以上が取り除かれている。SIVagm-hPEDFが感染した細胞に導入される遺伝子はhPEDFのみであり、遺伝子導入後に新たなウイルス粒子は形成されない（非伝播性）。またhPEDF mRNAへの転写にはCMVプロモーターを用い、ウイルスゲノム上のLTRの転写活性は削除されている。そのため、SIVagm-hPEDFによって遺伝子導入された細胞でhPEDF遺伝子以外の遺伝子が非特異的に活性化される可能性は理論的に低い。

SIVagm-hPEDFは、エンベロープタンパク質としてリン脂質を認識するVSV-Gを有しているため、ヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物の幅広い細胞への感染が可能であるが、網膜下投与によって網膜色素上皮細胞へ選択性の高い遺伝子導入ができることを確認している[41]。

Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

2 使用等の方法

本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の施錠管理された冷凍庫において行う。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された手術室内で行い、手術室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

運搬

- (3) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

患者への投与

- (4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された手術室内で、患者の網膜内に直接注入することにより行う。投与時は、手術室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (5) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の排出が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間対策を講じる。
- (6) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、血液、涙液、尿の検体に対し、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。必要と判断された場合には、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在を確認する。

患者検体の取扱い

- (9) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となる期間までに、検体の検査が外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託される場合は、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (11) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に

基づいて施設等及び検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

- (12) 施設等から検査機関への検体の運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者の検体である旨を情報提供して行う。

感染性廃棄物等の処理

- (13) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
- (14) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (15) 患者の投与眼に接触した眼帯及びガーゼ等の廃棄は、排出等の管理が不要となる期間までは不活化処理した上で行う。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

涙液、尿、血液中の本遺伝子組換え生物等の核酸配列検出検査を実施する。必要と判断された場合には、培養細胞を用いて感染性ウイルスの存在を確認する（別紙8）。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(1) 非臨床試験：

カニクイザルを用いた安全性試験では、投与直後から投与3か月後まで、血液及び尿中にSIVagm-hPEDF由来の核酸配列は検出されなかった[45]。また水平感染に関する検討では、SIVagm-hPEDFを網膜下投与したカニクイザルと非投与カニクイザルを同一飼育室内で飼育した場合、非投与カニクイザルにおいてVSV-Gタンパク質（SIVagm-hPEDFのエンベロープタンパク質の一部）に対する抗体価の上昇を認めず、水平感染の可能性は否定的であった（別紙9）。

(2) 臨床試験

九州大学病院にて行った「神経栄養因子（ヒト色素上皮由来因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究（2013年3月～2016年2月）」では、投与6時間後から24か月後まで全患者（5例）の血中及び尿中にSIVagm-hPEDF由来の核酸配列は検出されなかった。5例中1例、投与6時間後の涙液中に微量のSIVagm-hPEDF由来の核酸配列を検出したが、翌日には陰性化し、24か月後まで陰性のままであった。当該症例は術直後の涙液からの検出であり、SIVagm-hPEDF希釈溶液が術野へ漏出した結果と考えられた（添付1：遺伝子治療臨床研究 総括報告書）。

45. Ikeda, Y., et al., Acute toxicity study of a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector for retinal gene transfer in nonhuman primates. *Human gene therapy*, 2009. 20(9) 943-54.

6 国外における使用等により得られた情報

増殖型、非伝播型を問わず、遺伝子組換えSIVagmをヒトに投与した報告は国外に無い。
HIV由来レンチウイルスベクターについては、AIDSをはじめ複数の疾患の治療手段として開発が進んでいるが[15-18]、これまでに重篤な副作用や環境中への拡散に関する報告はない。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられるので、微生物には感染せず、また競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断される。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられる。そのため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

レンチウイルス及びレトロウイルス由来のウイルスベクターでは、ウイルスゲノムが宿主細胞の染色体へ組み込まれるため、長期間の安定した遺伝子発現が得られる。一方で、マウス白血病ウイルス (MLV) を基本骨格としたレトロウイルスベクターが造血幹細胞において特定のがん遺伝子領域 (LMO2) を活性化したように、悪性腫瘍の発生に関する危険性を完全には否定できない[46]。遺伝子挿入による悪性腫瘍発生の機序としては、①がん遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域への挿入による転写活性化、②がん抑制遺伝子のエクソン領域あるいはプロモーター、エンハンサー領域への挿入による発現阻害、の2つが考えられるが、本ベクターは前述のようにSIN化されており、①の機序によって非特異的にがん遺伝子を活性化させる可能性は低い[12]。SIVagm-hPEDFを網膜色素上皮細胞株に感染させ、遺伝子挿入部位について検討したところ、747ヶ所の組み込み部位で特定のホットスポットを認めなかった。またがん抑制遺伝子の発現に影響を与える可能性のある部位への挿入は1ヶ所 (0.13%) のみであった。がん抑制遺伝子の発現阻害によるがん化には、遺伝子対の両方の発現阻害が必要であることから、SIVagm-hPEDFによるがん化の可能性は計算上約60万分の1以下 (0.0013²) である上、さらに一つの細胞に複数のSIVagm-hPEDFが感染する必要があるため、②の機序による悪性腫瘍発生の可能性も極めて低いと考えられる。近年、白血病発症マウスモデルにおいて、MLVを基本骨格としたレトロウイルスベクターが有意にがん化を促進したのに対し、SIN化されたレンチウイルスベクターはがん化に関与しなかったとの報告があり[47]、SIN化されたレンチウイルスベクターは従来のレトロウイルスベクターに比し安全性が高いと考察されている。実際に、小動物 (マウス、ラット) およびサルを用いて行ったSIVagm-hPEDFの安全性確認試験では、免疫不全や悪性腫瘍の発生を含め、重篤な有害事象を認めなかった[40, 41, 45, 48]。

なおSIVagmベクターは、2000年に最初の構築の成功が報告されて以来[6]、まだ限られた施設でしか使用されていないために、環境への影響に関する既存の知見が不足している。但し、野生型のSIVagmTYO株は発見以来20年を経過し、多くの研究機関において使用されてきたが、環境に対する影響はこれまで報告されていない。従ってその危険性は理論的に低いものと判断される。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、SIVagm-hPEDFの環境中への拡散は極めて微量である。さらにSIVagm-hPEDFは増殖能を失っており、環境中では増殖することはない。また野生型HIVと共存した場合でも、SIVagm-hPEDFは第3世代に改良されていること、HIVと相同性の高い配列が削除されていることから相同組換えにより増殖型ウイルスが出現する可能性は極めて低いと考えられる。さらに万一増殖型ウイルスが出現した場合にも、元来SIVagm-TYO株は自然宿主に対して病原性を示さないことが知られている[3]。以上より、本遺伝子組換え生物が患者以外のヒトや動物に対して病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

46. Haccin-Bey-Abina, S., et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)*, 2003. 302(5644) 415-9.
47. Montini, E., et al., Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature biotechnology*, 2006. 24(6) 687-96.
48. Miyazaki, M., et al., Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther*, 2003. 10(17): p. 1503-11.

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられる。そのため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

SIVagm-hPEDFが感染したヒトではhPEDFタンパク質を発現する可能性があるが、これによるヒトへの病原性は知られていない。米国において、hPEDF遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターを硝子体内へ投与する臨床研究が行われているが、PEDFタンパク質の過剰発現による病原性は報告されていない[39]。

ヒトPEDFタンパク質は418個のアミノ酸からなる、糖鎖修飾を受けた分子量46,342Daの一本鎖ポリペプチドで、分泌シグナルを有し細胞外に分泌される。構造上セリンプロテアーゼ感受性ループを有するが、プロテアーゼ阻害活性はないことが報告されている[31, 32]。PEDFは種々の神経細胞に対して、分化誘導、および傷害による神経アポトーシスを抑制する作用を持つことが、培養細胞および動物個体において報告されている。その機序には転写因子NFκBの活性化が関与し、また抗アポトーシス遺伝子であるBcl-2, Bcl-xや、神経栄養因子であるNGF、BDNFの発現を誘導することが報告されている[34]。さらにPEDFは強力な血管新生抑制効果を有し、種々の血管新生モデル、腫瘍血管新生を抑制することが報告されている[35]。またPEDFはヒト胎児網膜色素上皮細胞の培養上清から分離・精製された因子であり、眼内局所において比較的豊富に存在し、眼内での過剰発現による副作用は理論的に低いと考えられる[30]。実際に、発生期のマウス網膜にPEDFを高発現させた場合においても、神経系・血管系の発達に異常を認めなかったことが報告されている[38]。さらに、米国において施行されているhPEDF遺

伝子を搭載したアデノウイルスベクターの硝子体投与による加齢黄斑変性に対する臨床研究においても、過剰発現による毒性は報告されていない[39]。またPEDFにより野生型ならびに遺伝子組換えSIVベクターの感染性（感染する動植物の種類や感染様式）が変化したとする報告はない。

hPEDFの全塩基配列において、既知の有害配列（含意電子、有害物質、トキシン）との相同性は認められなかった。

(3) 影響の生じやすさの評価
(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされており、感染性はVSVと同一と考えられる。そのため、自然界で病原性を受ける対象はヒトの他にサル、ウシなど多くの哺乳動物が想定される。

(2) 影響の具体的内容の評価

SIVagm-hPEDFの感染する対象は、ヒトの他にサル、ウシ等の広範な哺乳動物が想定され、SIVagm-hPEDFの核酸が野生生物等の染色体に組み込まれる可能性がある。水平感染が起きる可能性については、以下の場合が考えられる。

①SIVagm-hPEDF製造時にレプリケーションコンピテントレンチウイルス（RCL）を含む場合。

②SIVagm-hPEDF感染細胞が既にHIVなどの近縁ウイルスの感染しているまたは、後から同ウイルスが感染し、感染可能な組換えウイルスを生産するようになる場合。

②には以下の2つのケースが考えられる。

2.1. HIVの共感染により、SIVのゲノムRNAを取り込んだHIV粒子が生産される。

2.2. HIVゲノムSIVゲノム間で組換えが起こり、供与核酸を含むHIVが生産される。

①が起きるためには、LTRを持つジーントランスファープラスミドの2つのLTR間に少なくともgag、pol、VSV-G、REVの4つの遺伝子の発現ユニット全てが組み込まれなければならない、その確率は極めて低い。さらに、最終製品の品質試験としてRCLの混入否定試験も行っている。

2.1.の場合、LTRに挟まれるSIVゲノムの転写が必要となるが、SIVゲノムは、SIN化しておりプロウイルスからの転写は起こらないと考えられる。また、HIVとの相同組換えによりSIN化されたSIVプロウイルスの5'側のLTR部分の再活性化の心配もHIV LTR とSIV LTRとのホモロジーの低さ（48%）から、相同組換えは起こらないと考えられる。従って、SIVゲノムをパッケージしたHIV粒子は産出されないと考えられる。

2.2.の場合はプロウイルス間の相同組換えが起こる場合である。SIVプロウイルス部分は、SIVゲノムのほんの一部であり、HIVとのホモロジーは40%程度である。また連続した核酸配列の一致部分も最大15ヌクレオチドしかなく、相同組換えが起こるには40ヌクレオチド程度必要である[49]ことを考えると、相同組換えは通常は起こらないと考えられる。

HIV-1、HIV-2間のプロウイルスの組換えもHIV-1サブクラス間の組換えより1/35と低く、0.2%ほどである[50]。HIV-1、HIV-2の共感染者が100万人以上いる中から組換えウイルスは検出されていないことを考えると、SIVプロウイルスとHIVプロウイルス間では相同組換えは

起こらないと考えられる。

以上より、SIVagm-hPEDFの供与核酸が水平感染により第三者、動物等に伝達する可能性およびゲノムに組み込まれる可能性は極めて低いと考える。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、SIVagm-hPEDFの環境中への拡散は極めて微量である。さらにSIVagm-hPEDFは増殖能を失っており、環境中で増殖することはない。また上述のように相同組換えによって増殖性ウイルスが出現する可能性は極めて低いと考えられる。従って、仮に微量なSIVagm-hPEDFが環境中へ拡散しても、やがて消滅すると考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

49. Zhang, Y., et al., A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nature genetics, 1998. 20(2) 123-8
50. 本村和嗣., HIV-1 と HIV-2 のゲノム組換え効率の解析. 感染症誌, 2009. 83 81-93

5 その他の性質

不活化処理とは、70%エタノールによる30分間の噴霧、有効塩素濃度0.1～1.0%の次亜塩素酸ナトリウムへの30分の浸漬等の消毒薬処理、又はオートクレーブ処理をいう。

V 総合的評価

SIVagm-hPEDFはVSV-Gによってシュードタイプパッケージされているため、ヒトを含め幅広い哺乳動物への感染性を有する。しかし第一種使用規程承認申請書の遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法による限り、環境中への拡散の可能性は低く、拡散したとしてもその量は検出レベル以下であると推定される。SIVagm-hPEDFの感染した細胞に導入される遺伝子はhPEDF遺伝子のみで、hPEDFの過剰発現による有害事象の報告はない。また遺伝子挿入により感染した細胞の遺伝子が非特異的に活性化される可能性を最小化しており（SIN化）、また遺伝子挿入部位に特定の偏りを認めないことから、SIVagm-hPEDFが生物に対し病原性を示す可能性は、悪性腫瘍の発生を含め極めて低い。実際にマウス、ラット、サルを用いた安全性試験、および九州大学病院眼科で行った臨床研究「神経栄養因子（ヒト色素上皮由来因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究（2013年3月～2016年2月）」において、SIVagm-hPEDFによる病原性を認めていない。さらにSIVagm-hPEDFは2次感染粒子の放出がなく、また仮に野生型HIVと共感染しても、相同部分が殆どないため増殖性ウイルスを生じる可能性は極めて低い。従って仮に微量なSIVagm-hPEDFが環境中に拡散しても、やがて消滅すると考えられる。以上より、ヒト及び他の哺乳動物、植物、並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

よって、第一種使用規程申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、SIVagm-hPEDFによる生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

生物多様性影響評価書
別紙資料および添付資料一覧

別紙資料

1. 外界での生存性
2. 供与核酸の塩基配列
3. 遺伝子組換え生物
4. 遺伝子組換え生物の作製に用いるプラスミド
5. 遺伝子組換え生物の製造方法
6. 品質管理試験
7. ウイルス排出試験方法
8. ウイルス排出試験計画
9. 一般毒性試験結果概要

添付資料

1. 遺伝子治療臨床研究総括報告書

1. Knipe DM, H.P., Nonhuman Lentiviruses Fields virology fifth edition,. 2007. p. 2215-2243.
2. Hirsch, V.M., et al., Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. 5(6): p. 798-806.
3. 井戸栄治, 速水正憲, サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性. *蛋白質核酸酵素*, 1994. 39(8): p. 1425-1437.
4. Miura, T., et al., Genetic analysis and infection of SIVAGM and SIVMND. *J Med Primatol*, 1989. 18(3-4): p. 255-9.
5. Fukasawa, M., et al., Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature*, 1988. 333(6172): p. 457-61.
6. Nakajima, T., et al., Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther*, 2000. 11(13): p. 1863-74.
7. Naldini, L., et al., In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996. 272(5259): p. 263-7.
8. Naldini, L., et al., Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(21): p. 11382-8.
9. 塙秀樹, レンチウイルスベクターの最近の進歩. *バイオテクノロジージャーナル*, 2007. 7(2): p. 158-162.
10. 土肥可奈世, 竹内康裕, レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療: 臨床治験での進展と安全性. *ウイルス*, 2015. 65(1): p. 27-36.
11. Zufferey, R., et al., Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*, 1997. 15(9): p. 871-5.
12. Dull, T., et al., A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998. 72(11): p. 8463-71.
13. Zufferey, R., et al., Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 1998. 72(12): p. 9873-80.
14. 三好浩之, レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入. *ウイルス*, 2002. 52(2): p. 225-231.
15. Levine, B.L., et al., Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(46): p. 17372-7.
16. Cartier, N., et al., Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, 2009. 326(5954): p. 818-23.
17. Cavazzana-Calvo, M., et al., Transfusion independence and HMGA2 activation after gene

- therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*, 2010. 467(7313): p. 318-22.
18. Palfi, S., et al., Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, 2014. 383(9923): p. 1138-46.
 19. Mitchell, R.S., et al., Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2004. 2(8): p. E234.
 20. Ohta, Y., et al., Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int J Cancer*, 1988. 41(1): p. 115-22.
 21. Hendry, R.M., et al., Antibodies to simian immunodeficiency virus in African green monkeys in Africa in 1957-62. *Lancet*, 1986. 2(8504): p. 455.
 22. Allan, J.S., et al., Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J Virol*, 1991. 65(6): p. 2816-28.
 23. Herchenroder, O., et al., Experimental infection of rhesus monkeys with SIV isolated from African green monkeys. *Intervirology*, 1989. 30 Suppl 1: p. 66-72.
 24. Honjo, S., et al., Experimental infection of African green monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVAGM strain isolated from a healthy African green monkey. *J Med Primatol*, 1990. 19(1): p. 9-20.
 25. Hirsch, V.M., et al., Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J Virol*, 1995. 69(2): p. 955-67.
 26. 日本ウイルス学会, ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. *ウイルス*, 1993. 43: p. 199-232.
 27. Spire, B., et al., Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*, 1984. 2(8408): p. 899-901.
 28. Resnick, L., et al., Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *Jama*, 1986. 255(14): p. 1887-91.
 29. Watanabe, Y., H. Miyata, and H. Sato, Inactivation of laboratory animal RNA-viruses by physicochemical treatment. *Jikken Dobutsu*, 1989. 38(4): p. 305-11.
 30. Tombran-Tink, J., et al., Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci*, 1995. 15(7 Pt 1): p. 4992-5003.
 31. Steele, F.R., et al., Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and

- identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(4): p. 1526-30.
32. Becerra, S.P., Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol*, 1997. 425: p. 223-37.
 33. Yabe, T., T. Sanagi, and H. Yamada, The neuroprotective role of PEDF: implication for the therapy of neurological disorders. *Curr Mol Med*, 2010. 10(3): p. 259-66.
 34. Yabe, T., D. Wilson, and J.P. Schwartz, NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*, 2001. 276(46): p. 43313-9.
 35. Dawson, D.W., et al., Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999. 285(5425): p. 245-8.
 36. Kuo, H.F., et al., Pigment Epithelium-Derived Factor Mediates Autophagy and Apoptosis in Myocardial Hypoxia/Reoxygenation Injury. *PLoS One*, 2016. 11(5): p. e0156059.
 37. Broadhead, M.L., C.R. Dass, and P.F. Choong, Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: prospects for therapy. *Trends Mol Med*, 2009. 15(10): p. 461-7.
 38. Wong, W.T., et al., Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis*, 2004. 10: p. 837-44.
 39. Campochiaro, P.A., et al., Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther*, 2006. 17(2): p. 167-76.
 40. Ikeda, Y., et al., Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther*, 2003. 10(14): p. 1161-9.
 41. Ikeda, Y., et al., Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2009. 20(6): p. 573-9.
 42. Schroder, A.R., et al., HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 2002. 110(4): p. 521-9.
 43. Meeting, M.o.M.R., Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors. 2006.
 44. Meeting, M.o.J.R., Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors. 2006.
 45. Ikeda, Y., et al., Acute toxicity study of a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector for retinal gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 2009. 20(9): p. 943-54.
 46. Hacein-Bey-Abina, S., et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003. 302(5644): p. 415-9.

47. Montini, E., et al., Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(6): p. 687-96.
48. Miyazaki, M., et al., Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther*, 2003. 10(17): p. 1503-11.
49. Zhang, Y., et al., A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998. 20(2): p. 123-8.
50. 和嗣, 本., HIV-1 と HIV-2 のゲノム組換え効率の解析. *感染症誌*, 2009. 83: p. 81-93.