

様式第1（第7条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和4年9月22日

厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

氏名 株式会社遺伝子治療研究所

申請者 代表取締役 浅井 克仁

住所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-22

ライフイノベーションセンター 414

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>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p><i>rep/cap</i> 遺伝子領域を欠失し、アデノ随伴ウイルス9型に由来する改変型キャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス3型に由来する ITR を有し、ヒト グルコーストランスポーター 1 (GLUT1) を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (AAV.GTX-GLUT1)</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、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。</p> <p>本遺伝子組換え生物等の調製及び保管</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、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>(3) 投与準備済みの原液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。</p> <p>運搬</p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。</p> <p>患者への投与</p> <p>(5) 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治療室内で、患者の髄腔内に直接注入することにより行う。投与時は、治療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>

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散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。
- (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までの期間、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、当該患者に適切な指導を行う。
- (9) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。

患者検体の取扱い

- (10) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (11) 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までの期間、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。
- (12) 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）に基づいて施設等又は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。

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) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令

	<p>第 300 号) の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物 (以下「感染性廃棄物」という。) として廃棄する。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を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。</p> <p>(17) 本遺伝子組換え生物等の患者から採取した検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、血液・尿・糞便・唾液検体は漏出しない容器に入れ、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は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。</p> <p>(18) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等の原液を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌処理等により不活化処理を行い、廃棄する。</p>
--	--

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

*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス9型に由来する改変型キャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス3型に由来するITRを有し、ヒトグルコーストランスポーター1 (GLUT1) を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (株名、以下「本遺伝子組換え生物等」という。) の宿主は、パルボウイルス科 (*Parvoviridae*) パルボウイルス亜科 (*Parvovirineae*) デペンドウイルス属 (*Dependovirus*) に属するヒトアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus) (以下、AAV) と呼ばれるウイルスの一つである (文献1、2)。

AAV の主な血清型 (AAV2、AAV5 等) では、小児期の感染により、成人の約半数が中和抗体を有するとされるが、ヒトへの病原性を有する AAV の報告はない。

AAV 自体は、自己複製機能を欠損しており、動物細胞における複製は、アデノウイルス等のヘルパーウイルスの機能に依存するため、ヘルパーウイルスと同時に見いだされることが多い。

本遺伝子組換え生物等のゲノムの一部は、adeno-associated virus 3 (以下「AAV3」という。) に、キャプシドタンパク質は、adeno-associated virus 9 (以下「AAV9」という。) に由来する。

自然環境及び実験室内において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。

2 使用等の歴史及び現状 (人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。)

AAV は、その非病原性、潜伏性及び広汎な感染性などの特性から遺伝子治療用ウイルスとしての有用性が注目され、遺伝子治療で汎用されている (文献3、4 及びⅢ章参照)。

また、AAV9 は、血液脳関門を通過し中枢神経系に到達できるという特性から、神経疾患に対する遺伝子治療ベクターとして使用されるようになった (文献5)。なお、AAV3 及び AAV9 を含め、いかなる血清型の AAV もヒト用の生ワクチン等として本邦で承認されたものはない。

株式会社遺伝子治療研究所では、遺伝子治療用ウイルスベクター作製の目的で AAV を使用している。

3 生理学的及び生態学的特性

(1) 基本的特性

野生型AAVのウイルス粒子は、直径約25nmの正二十面体構造のキャプシドを有しており、エンベロープを持たない。AAVのゲノムは約4.7kbの線状一本鎖DNAであり、プラス

鎖DNAを持つウイルス、マイナス鎖DNAを持つウイルス共に感染性を有する。AAVゲノムDNAの両端には逆位末端反復配列（以下「ITR」という。）があり、その間に*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子が挟まれている。*rep*遺伝子は、DNAの複製に必要な4つのRepタンパク質をコードする。*cap*遺伝子は、AAVの正二十面体キャプシドを形成する3つのタンパク質（VP1、VP2及びVP3）をコードする。ITRは、DNA複製、パッケージング、宿主細胞ゲノムへの組込み及びその後の切出しに必要な配列を含む。AAVには、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いによって100以上の型があり、それぞれ感染指向性が異なる。多くのAAVには共通する受容体（以下「AAVR」という。）があることが知られているが（文献6）、感染には血清型ごとに異なる副受容体（以下「副受容体」という。）も関与しており、これらの組み合わせによって指向性の違いが生ずると考えられている（文献7）。

野生型 AAV が哺乳動物に感染することは知られているが、血清型や系統によって感染宿主域は異なる。自然界においてヒト以外で増殖を伴う感染が起こるかどうかは明らかでない。

ヒトより AAV2、AAV3、AAV5、AAV6 が、非ヒト霊長類より AAV1、AAV4、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11 が同定されている。ほとんどの AAV のキャプシドタンパク質はどれも構造的に類似しており、2 型キャプシドのアミノ酸配列に対して 80～88% の相同性、DNA 配列で 78～82% の相同性を有する。

AAV は血清型や系統に応じて、特異性の高い臓器が異なることが知られており、本遺伝子組換え生物等の宿主である AAV9 は中枢神経系に特異性が高いことが報告されている（文献 8、9）。

（2）生育又は生育可能な環境の条件

AAVが細胞に単独感染した場合は、自律的な増殖ができず、二本鎖環状DNA（以下「エピソーム」という。）として又は染色体へ組み込まれた状態で潜伏感染する。一方で、アデノウイルスやヘルペスウイルス等のヘルパーウイルス（以下「ヘルパーウイルス」という。）が共存する場合は、これらの*E1A*、*E1B*、*E2A*、*E4*及び*VA*遺伝子機能を利用して、AAVゲノムの複製とウイルス粒子の構成が起こる。培養細胞でも同様にヘルパーウイルスの感染が成立する場合にのみ増殖が起こる。

細胞外に放出されたAAVは常温において安定である。

（3）捕食性又は寄生性

AAV が他の生物を捕食することはない。

（4）繁殖又は増殖の様式

野生型AAVのヒトへの感染経路として、経気道感染、糞口感染、接触感染が挙げられている。感染の際には、AAVは、AAVR及び副受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれる。細胞内侵入後は、キャプシドからウイルスゲノムが細胞質へ放出され、エンドソーム内の弱酸性環境下で細胞質に放出されて核周囲に蓄積し、さらに核膜孔複合

体を通して核内に移行すると考えられている。ヘルパーウイルスが同時に感染している場合、AAVは感染細胞及び感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物と一緒に排泄され、次の生物に感染する。

ヘルパーウイルスが共存しない場合は、AAVのゲノムは感染細胞において複製することなく、エピソームとして核内に潜伏するが、まれに、Repタンパクの関与により、第19染色体長腕のAAVS1領域への組み込まれることがある（文献10、11）。

一般的な遺伝子組換えAAV（以下「組換えAAV」という。）では、*rep*遺伝子を欠失しているため、染色体への部位特異的組み込みは起こらない。組換えAAVの細胞染色体へのランダムな組み込みは低頻度で起こりうるが、その場合でも活発に転写されている遺伝子領域に挿入されやすいとの報告がある（文献12）。

（5）病原性

野生型 AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで野生型 AAV の感染に伴う病原性は知られていない。

なお、野生型 AAV2 の染色体への組み込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでに AAV を用いて実施された臨床試験において AAV 感染が原因の肝がんの発症は確認されていない（文献 13）。

（6）有害物質の産生性

野生型AAVの感染に際して細胞内で産生されるタンパク質が病原性又は毒性を示すという報告はない。

（7）その他の情報（不活化条件等を含む。）

AAVは、一般的なパルボウイルスと同様に、物理化学的に安定なキャプシドを有しエンベロープを持たないため、物理化学的に比較的堅牢であり、乾燥に抵抗性があり、常温において安定している。

不活化には加熱（85℃、数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1000ppm）、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）照射などの処理が必要とされている（文献 1）。また、通常の高圧蒸気滅菌処理により完全に不活化される。

その他の不活化方法

- 170℃、2 時間の乾熱滅菌
- 20～30 分間の煮沸消毒
- 3.5～4%ホルマリン
- 2%グルタール
- 10%又は 1%ポピドンヨード液、0.3%過酸化水素水

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

本遺伝子組換え生物等のゲノムでは、野生型AAVにおけるウイルス遺伝子である*rep*及び*cap*遺伝子配列をヒト*SLC2A1*遺伝子配列(ヒトGLUT1タンパク質の遺伝子配列)に置換している。

本遺伝子組換え生物等は、供与核酸となる*SLC2A1*コード領域()を含む発現カセット及びその両側の野生型AAV3のウイルス遺伝子由来のITRからなり、組換えAAV9のキャプシドに内包される。

本遺伝子組換え生物等は、 プロモーター領域、ヒト*SLC2A1*コード配列、配列、 ポリアデニル化シグナル領域及びプラスミド構築時に移入された複数の人工配列(Cloning/joining sites)からなる。

本遺伝子組換え生物等のゲノムのDNA配列及びゲノムの各要素の配置を別紙1に示す。

各要素の由来について以下に示す。

・ プロモーター領域

遺伝子プロモーターを含む領域。

・ ヒト *SLC2A1* 遺伝子をコードする領域 (*hSLC2A1*)

ヒト *SLC2A1* 遺伝子は1番染色体(1p34.2)上に位置しており、 492アミノ酸よりなるGLUT1をコードしている。

*hSLC2A1*は、開始コドンATGから終始コドンTGAまでの bpとそれに続く3'末端非翻訳領域を含むDNAを制限酵素*Eco* O65I/*Xho* Iで切り出した配列である。

・ 領域

を含む領域。

中に、コード領域が存在するXタンパク質が発癌性を有するとされているので、このタンパク質が発現しないように変異を導入してある。

・ ポリアデニル化シグナル領域 (poly(A))

転写終結ポリアデニル化シグナル配列を含む領域。

・ 制限酵素認識部位の人工配列

プラスミドの構築過程で便宜的に挿入されたもので、本遺伝子組換え生物等に新たな生物学的機能を付与するものではない。

・ ITR

一般的に AAV ゲノムの 5' 及び 3' 末端領域は ITR として知られている。野生型 AAV3 のウイルスゲノムからクローニングして得られた。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能は以下のとおりである。

・ プロモーター領域

発現プロモーター。

・ ヒト SLC2A1 遺伝子をコードする領域 (hSLC2A1)

ヒト SLC2A1 遺伝子により発現される GLUT1 は、492 アミノ酸より構成される分子量約 45~55kDa の細胞内局在タンパク質である。GLUT1 は細胞のエネルギー源であるグルコースを運搬するトランスポーターである。GLUT1 欠損症患者は GLUT1 の活性が低下又は不活性化されることで、脳組織への糖取込み機能の低下により、神経細胞の機能が障害され、神経症状を呈する。

・ 領域

ポリアデニル化部位のリードスルーを防ぎ、RNA のプロセッシングと成熟を促進し、RNA の核外への輸送を増大させる。それにより導入遺伝子の発現が増大する。

・ ポリアデニル化シグナル領域 (poly(A))

ポリアデニル化配列は mRNA の安定化に寄与する。

・ ITR

ITR は、本遺伝子組換え生物等の製造において、粒子中にウイルスゲノムをパッケージするために必要である。また、標的細胞への導入の後、ウイルスゲノムの安定化に ITR が必要となる。ITR は、宿主のポリメラーゼによる不安定な一本鎖 DNA から安定した二本鎖 DNA の形成の起点となる。また、ITR は繰り返し構造であるため、複数のウイルスゲノムの ITR と ITR が複合化し、線状多量体 (以下「コンカテマー」という。) として知られるより大きな二本鎖 DNA を形成する。このコンカテマーは転写活性を保持しており、持続的に安定なエピソーム構造を有する (文献 10)。なお、ITR はタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) を有していない。

これらの供与核酸について、NCBI(National Center for Biotechnology Information)の Web サイト Nucleotide BLAST(Program Selection:Highly similar sequences(megalblast),

program:BLASTN 2.9.0+)を使用して相同性検索を行った結果、毒素、がん原性等の有害性を有する可能性のある塩基配列は認められなかった。また、遺伝子操作により目的外のORFが生じることで産生されるタンパク質は特定されなかった（別紙1）。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

該当なし

(2) 特性

該当なし

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

本遺伝子組換え生物等のゲノム及び発現されるGLUT1タンパク質の構成を別紙1に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムは*SLC2A1*発現カセット及びその両側の野生型AAV3のウイルスゲノム由来のITRからなる。*SLC2A1*発現カセットは、[REDACTED]プロモーター、ヒト*SLC2A1*遺伝子コード配列、[REDACTED]領域、[REDACTED]ポリアデニル化シグナル領域及び制限酵素切断部位に由来する人工配列からなる。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

本遺伝子組換え生物等は、以下の供与核酸、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を搭載した2種類のプラスミド p[REDACTED]、p[REDACTED]（パッケージングプラスミド）及び pHelper [REDACTED]（ヘルパープラスミド）をヒト胎児腎由来細胞（HEK293 細胞）の垂型細胞（[REDACTED]）に同時に導入することで作製される。

- p[REDACTED]
[REDACTED]プロモーター、ヒト *SLC2A1* 遺伝子をコードする領域、AAV3 に由来する ITR 等を搭載するプラスミド
- p[REDACTED]
AAV3 に由来する *rep* 遺伝子及び AAV9 に由来する改変型 *cap* 遺伝子を搭載するプラスミド
- pHelper [REDACTED]
アデノウイルス 5 型の *E2A*、*E4* 及び *VA* 領域を搭載するプラスミド

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本遺伝子組換え生物等は国内の製造施設において製造される。

本遺伝子組換え生物等の製造工程の概略は以下のとおりである。

解凍したワーキングセルバンク（WCB）を培養して得られた HEK293 に由来する [REDACTED] に、p [REDACTED]、p [REDACTED] 及び pHelper [REDACTED] をトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、清澄化した液からウイルス粒子を精製し、濃縮後透析ろ過して原薬を得る。原薬は希釈後、無菌ろ過し容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。

なお、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）は [REDACTED]。

本遺伝子組換え生物等の育成の経過の詳細を別紙2に示す。

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

移入された核酸は本遺伝子組換え生物等の一本鎖DNAゲノムの一部として存在し、凍結保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染方法が保管中に変化することはない（文献14）。

動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムは核内に移行して二本鎖DNAとなり、多くは染色体とは独立したエピソームとして存在すると考えられる（文献10、11、15）。このエピソームから *SLC2A1* 遺伝子が転写される。細胞のゲノムへの組込みは稀で低頻度である。*SLC2A1* mRNAの発現は発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり、また細胞が分裂しないかぎり継続するものと考えられる。

本遺伝子組換え生物等を HEK293 に由来する [REDACTED] で作製する過程で rcAAV を生ずる可能性は否定できない。しかしその rcAAV は AAV のウイルス粒子にパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っている可能性が高いと考えられる。さらにこの rcAAV も野生型 AAV と同様にヘルパーウイルスの共存がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

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

<非臨床試験>

定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（以下「qPCR法」という。）により本遺伝子組換え生物等のDNAの検出及び定量を行った。qPCR法で用いる検体は動物からの採取検体から AAVゲノムを抽出した。

本遺伝子組換え生物等の検出は、供与核酸の一部である [REDACTED] 配列又は *SLC2A1* 配列の DNA断片をqPCR法で増幅・定量することにより検出される。本qPCR法では試料 [REDACTED] μL 中に [REDACTED] コピーのゲノムがあれば検出することができる。

詳細を別紙3に示す。

臨床試験で用いるqPCR法ではヒトからの採取検体からAAVゲノムを抽出し、SLC2A1配列用プライマープローブセットを使用する。使用するプライマープローブセットは[REDACTED]のように設計してある。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

宿主であるAAVと本遺伝子組換え生物等の間には以下の相違がある。

本遺伝子組換え生物等は発現プロモーターの下流にヒト *SLC2A1* 遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞は *SLC2A1* を発現する。

本遺伝子組換え生物等はゲノムの複製やウイルス粒子の形成に必要な *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、ヘルパーウイルスが共存しても増殖は起こらず、その生存力は野生型 AAV 以下である。本遺伝子組換え生物等の増殖が起こるのは、*rep* 及び *cap* 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞にヘルパーウイルスと共感染した場合、若しくは通常の細胞に本遺伝子組換え生物等、野生型 AAV、及びヘルパーウイルスが三重に共感染した場合のみである。

本遺伝子組換え生物等の感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等は野生型AAVと同等と考えられるが、感染してもそのゲノムの大半は染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外にエピソームとして存在する。

AAV ベクター作製時、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子をもつ p[REDACTED] とヒト *SLC2A1* 遺伝子をもつ p[REDACTED] の間での遺伝子組換えにより本遺伝子組換え生物等由来の増殖能を持つ rcAAV が生じる可能性がある。この場合でも、ウイルスゲノムの複製に必須な ITR と *rep* 遺伝子、及び細胞指向性を規定するキャプシドの主要部分は野生型と同一であるので、遺伝子組換え生物等に該当するものも含め、rcAAV がヒトや動植物等への感染性、感染方法、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 AAV と同等であると考えられる。また供与核酸の一部を保持した rcAAV が生じる可能性は否定できないが、AAV 粒子中にパッケージング可能なゲノムの長さは非常に短いため、供与核酸を保持したとしてもその長さは極めて短いと考えられる（文献 10、11）。

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、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。

本遺伝子組換え生物等の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等は原液を希釈せずに投与する。原液の投与準備は、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。
- (3) 投与準備済みの原液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。

患者への投与

- (5) 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治療室内で、患者の髄腔内に直接注入することにより行う。投与時は、治療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

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散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。
- (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、排泄等の管理が不要となるまでの期間、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、当該患者に適切な指導を行う。
- (9) 患者の排泄モニタリングは、必要に応じて実施する。

患者検体の取扱い

- (10) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (11) 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までの期間、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。
- (12) 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）に基づいて施設等又は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。

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) 患者が自宅で用いたドレッシング材及び洗浄に用いた器材等は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で廃棄する。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和46年政令第300号）の別表第1の4の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。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を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。
- (17) 本遺伝子組換え生物等の患者から採取した検体等の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、血液・尿・糞便・唾液検体は漏出しない容器に入れ、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は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。
- (18) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等の原液を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌処理等により不活化処理を行い、廃棄する。

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

被験者からの本遺伝子組換え生物等の排出の確認は治験実施計画書に従って行う。被験者への投与後、被験者の血液、尿、唾液等を用いて qPCR 法により、本遺伝子組換え生物等の排出を経時的に確認する。

AAV.GTX-GLUT1 ゲノムの検出方法について別紙 3 に示す。

また、AAV.GTX-GLUT1 の臨床試験における排出試験計画を別紙 4 に示す。

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
該当なし

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

<非臨床試験> (文献16、17)

非臨床試験 (毒性及び生体内分布試験 / 予備試験: ██████████ 試験)

██████████ ラットに対して、0 (媒体) 及び ██████████
██████████ vg/rat の本遺伝子組換え生物等を単回髄腔内投与した非臨床試験 (試験番号 ██████████) ██████████
██████████

また、投与後28日目の剖検で脳 (大脳)、脊髄 (頸髄)、脊髄 (腰髄)、脾臓、精巣 (左側) を採取し、DNA を抽出した。抽出DNA についてリアルタイムPCR を行い、AAV.GTX-GLUT1 のゲノム濃度の定量を行った。測定値は1点のみで経時変化のデータは取得していない。

この生体内分布試験の結果概要は次の通り。

- ・脳 (大脳) 中の本遺伝子組換え生物等のゲノム濃度は、投与群では投与後28日に高値であった。
- ・脊髄 (頸髄) 中の本遺伝子組換え生物等のゲノム濃度は、投与群では投与後28日に高値であった。
- ・脊髄 (腰髄) 中の本遺伝子組換え生物等のゲノム濃度は、投与群では投与後28日に高値であった。
- ・脾臓中の本遺伝子組換え生物等のゲノム濃度は、投与群では投与後28日に高値であった。
- ・精巣 (左側) 中の本遺伝子組換え生物等のゲノム濃度は、投与群では投与後28日に高値であった。

非臨床試験 (毒性及び生体内分布試験 / 試験: ██████████ 試験)

██████████ ラットに対して、0 (媒体) 及び ██████████
vg/kg、██████████ vg/kg の本遺伝子組換え生物等を単回髄腔内投与した非臨床試験 (試験番号 ██████████) ██████████
██████████

また、同様に本遺伝子組換え生物等を ██████████ ラットに単回髄腔内投与 (0 (媒体)、██████████ vg/kg 及び ██████████ vg/kg) し、投与後13

週及び26週の剖検で脳（大脳）、脊髄（頸髄）、脊髄（胸髄）、脊髄（腰髄）、心臓、脾臓、肝臓、肺、腎臓、精巣/卵巣におけるAAV.GTX-GLUT1ゲノム濃度、及び投与後1日、4週、13週、26週の尿、唾液、便、血液内におけるAAV.GTX-GLUT1のゲノム濃度の定量を行った。

投与後13週に低用量群の大脳を除く全組織においてAAV.GTX-GLUT1ゲノム濃度は顕著に検出され、投与26週まで維持していた。排出試験では、いずれの検体においてもAAV.GTX-GLUT1濃度は投与後1日をピークに投与後4週より急激に減少していた。高用量群では26週目に便及び血中にAAV.GTX-GLUT1が検出されたが、低用量群では26週時点では雌の血中を除いて検出されなかった。さらに、低用量群の雌雄各1個体の尿検体を除き、4週後より尿及び唾液中からは検出されなかった。

予備試験（試験番号 [REDACTED]）及び非臨床試験（試験番号 [REDACTED]）生体内分布試験において、精巣及び卵巣に AAV.GTX-GLUT1 ゲノムが検出されたが、本遺伝子組換え生物等は *rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠如させていることから、複製能を有しておらず生殖細胞に組み込まれる可能性は低いと考える。

非臨床試験（ミニブタに対する生体内分布試験）

ヒトの学童相当のミニブタに、髄注針を経皮的に腰椎くも膜下腔へ穿刺の上、カテーテルを胸髄～頸髄レベルまで挿入し、[REDACTED] vg/kgを脳大槽へ投与（今回の治験計画と同様の経路）したところ、[REDACTED]

[REDACTED] また、AAVベクターゲノムがAAV組織特異性に従って臓器分布することが確認された。

生体内分布試験の詳細を別紙5に示す。

<臨床試験（治験）>

本遺伝子組換え生物等と同一の遺伝子を搭載した組換え AAV を用いた臨床試験等は実施されていない。

6 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え生物等と同じ目的遺伝子を搭載した組換え AAV を用いた臨床試験等はない。

一方、これまでに、類似のAAVウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する情報が多数得られている。

現在までに、遺伝子治療用の組換えAAVは、様々な疾患を対象とする臨床試験でヒトに投与されており、安全性プロファイルは全般的に良好であった。一部の被験者において肝酵素値の上昇が見られたが、これはAAVのキャプシドに対するTリンパ球応答の結果であり、投与AAVの用量に依存すると考えられている。肝酵素値の上昇は無症候性かつ一過性であり、重大な転帰に至った患者は報告されていない。また、これらの臨床試験において、増殖能を持つAAVの出現は報告されていない。

本遺伝子組換え生物等と同じAAV9キャプシドを有する遺伝子組換えAAV (AVXS-101) を用いた最初の臨床試験では、脊髄性筋萎縮症1型 (SMA 1) 患者15名にAVXS-101を単回点滴静注した際の安全性と有効性が評価された (文献5)。コホート1では3例に低用量 (6.7×10^{13} vector genomes (vg)/kg) が、コホート2では12名に高用量 (2.0×10^{14} vg/kg) が静注された。この試験における重篤な有害事象 (SAE) は56件 (13例) で、グレード5 (死亡) はなかった。治療に関連したグレード4のSAEは2件の肝酵素上昇で、ステロイド投与により消退した。高用量を投与されたコホート2の12例のうち、11例でSMAの症状が急速かつ著明に改善した。

他の血清型キャプシドを有する組換えAAVが全身投与された臨床試験としては、血友病Bに対する遺伝子治療臨床試験が複数行われている。3用量 (8×10^{10} vg/kg、 4×10^{11} vg/kg、又は 2×10^{12} vg/kg) の組換えAAV2を肝動脈に注入した臨床試験 (文献18) では、最長20週まで末梢血単核細胞中に1例、16週まで精液中に1例AAVが検出された。AAV8キャプシドを有する組換えAAVを用いた臨床試験では 2×10^{11} vg/kg、 6×10^{11} vg/kg、又は 2×10^{12} vg/kgの組換えAAVが計10名の患者に静注され (文献19)、AAV8を人工改変したSPK100キャプシドを有する組換えAAVでは 5×10^{11} vg/kgの組換えAAVが10名の患者に静注されたが (文献20)、いずれの試験も安全に施行された。

なお、X連鎖性Myotubular myopathy (XLMTM) 患者を対象としたAAV8ベクター (AT132) の臨床試験で 3×10^{14} /kgを投与した3人と 1×10^{14} /kgを投与した1人で死亡が報告された。詳細は未公表であるが、当該疾患では肝胆道系にも障害があることが知られており、元々、肝病変のある患児に高用量のベクターを投与したことが要因と推察されている。本臨床試験は一旦差し止めとなったが、FDAは差し止め解除通知を発出した (2020年12月)。

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微生物の特定

野生型 AAV は、競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させることは知られていない。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。よって、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV により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

該当なし

(3) 影響の生じやすさの評価

該当なし

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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され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、他の微生物を減少させる性質に基づいて、生物多様性の影響が生ず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

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、供与核酸の病原性は知られていないことから、AAV と同様に病原性を持つ可能性は低いと考えられる。

また、AAV 粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が病原性を持つことはないと考えられる。

なお、野生型 AAV2 の染色体への組込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでに AAV を用いて実施された臨床試験において AAV 感染が原因の肝がんの発症は確認されていない（文献 13）。

(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かぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、XXXXXXXXXXため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等及びrcAAVが第三者、野生動植物等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

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、病原性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはない。

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

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質に対する免疫応答は、野生型AAVの免疫応答と同様に、自然界における感染と同等の量の暴露であれば無症候性であると考えられる。複数の臨床試験において、組換えAAVの大量投与によって重篤な免疫炎症反応等が報告されているが、ステロイド剤の投与等によって、これらの免疫炎症反応の発生の軽減が可能であると考えられている（文献21、22）。

AAV粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAVは野生型AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAVが有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。

本組換え生物が発現するGLUT1は脳の活動のエネルギー源であるグルコースを運搬す

るトランスポーターであって、GLUT1タンパク質が毒性を持つことは知られていない。

本遺伝子組換え生物等由来のGLUT1タンパク質は、ヒトにおいて発現しているGLUT1タンパク質と同一であるため、このGLUT1タンパク質に対する免疫応答は起こらないと考えられる。

また [redacted] ラットに本遺伝子組換え生物等 [redacted] vg/rat ([redacted]) を胸部髄腔内投与する非臨床試験（予備試験： [redacted] 試験）において、*hSLC2A1*mRNA は脳（大脳）約 43.4 倍、髄液（頸髄）約 44.8 倍、脊髄（腰椎）約 20.7 倍、脾臓 1.7 倍過剰発現していたが、この過剰発現に関連する有害事象は認められなかった。この非臨床試験結果は、GLUT1 タンパク質の定量結果ではないが、GLUT1 タンパク質の過剰発現が必ずしも有害事象と関連しないことを示唆している。

なお、異種動物においては、アレルゲンとなる可能性を除いては、GLUT1 タンパク質の有害性は知られていない。

（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かぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、 [redacted] ため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

よって、本遺伝子組換え生物等が発現するGLUT1タンパク質が第三者、野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

（4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

当該第一種使用規程に従って使用等を行うかぎり、有害物質の産生性に起因した生物多様性影響が生ずるおそれはない。

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又は他の微生物の特定

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供

与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、これらの改変による感染宿主域の変化はない。

(2) 影響の具体的内容の評価

野生型AAVは低い確率で感染細胞のゲノムに挿入されることが知られている。

一方、本遺伝子組換え生物等が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性にヒト *SLC2A1* 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他の哺乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。

また、AAV粒子へパッケージング可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAVは野生型 AAVと同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAVが核酸を水平伝達する性質はないと考えられる。

(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かぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。本遺伝子組換え生物等は *rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失により増殖能力がないため、環境中に拡散したとしても他の生物に感染を起こす可能性は低く、また、感染したとしても *rep* 遺伝子が欠失しているため、本遺伝子組換え生物等由来の核酸が感染細胞のゲノムに組み込まれる可能性は極めて低い。

また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ水平感染が発生する可能性があるが、その可能性は極めて低い。

さらに、rcAAVが発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうるrcAAVは、原薬の規格試験で陰性であることを確認するため、rcAAVが環境中へ拡散する可能性は極めて低く、ヘルパーウイルスと共感染しないかぎり、環境中で増殖することはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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、核酸を水平伝播する性質に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

野生型AAVについては、トランスポゾンやプラスミド等の可動性遺伝因子 (mobile genetic elements) は知られておらず、当該第一種使用等によってそれらを介した遺伝子の伝搬が起こることはないと考えられる。

V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動植物等の種類は野生型 AAV9 と同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

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、本遺伝子組換え生物等の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、極めて微量である。

本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失並びに供与核酸の導入の他は野生型 AAV と本質的に同一であり、本遺伝子組換え生物等による *SLC2A1* 遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質をもたないことから、生物多様性への影響はないと考えられる。

また、本遺伝子組換え生物等は増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスと三重感染しないかぎり、環境中で増殖することはなく、その可能性は極めて低い。

rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、本遺伝子組換え生物等由来の rcAAV が環境中に放出される可能性は極めて低く、rcAAV は野生型 AAV9 と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質によりヒト及び他の哺乳動物等に影響を与えることはないと考えられる。

ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物等と野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスが感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物等はやがて環境中から消滅すると考えられる。

したがって、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、本遺伝子組換え生物等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一覧

別紙1：AAV.GTX-GLUT1の情報

別紙2：AAV.GTX-GLUT1の製造方法及びrcAAVの管理状況

別紙3：AAV.GTX-GLUT1の検出試験

別紙4：AAV.GTX-GLUT1の臨床試験における排出試験計画

別紙5：非臨床生体内分布試験結果概要

参考文献

1. Condit RC, Principles of Virology, In “Knipe DM, Howley PM eds, FIELDS VIROLOGY 6th ed.”, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, (2013), pp.21-51.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2015)
3. Daya S, Berns KI, Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors., *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(4): 583–593.
4. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol* 2014; (1):427-451.
5. Mendell JR, et al., Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy., *N Engl J Med.* 2017;377(18):1713-1722.
6. Pillay S, et al., An essential receptor for adeno-associated virus infection., *Nature.* 2016; 530(7588): 108–112.
7. Srivastava A, *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors., *Curr Opin Virol.* 2016; 21: 75–80.
8. 伴野太郎, 岡田浩典, 岡田尚巳, 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作製法., *Pharma Medica.* 2015; 33(4): 15-22.
9. 三宅弘一, 島田隆, ウイルスベクターによる遺伝子導入と発現., *日医大医学会誌*, 2012; 8(3): 216-221.
10. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR, Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle., *J Virol.* 2003 Mar;77(6):3495-3504.
11. Grimm D, Pandey K, Nakai H, Storm TA, Kay MA, Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype., *J Virol.* 2006;80(1):426-39.
12. Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA, AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice., *Nat Genet.* 2003;34(3):297-302.
13. Srivastava A, Carter BJ, AAV Infection: Protection from Cancer., *Hum Gene Ther.* 2017; 28(4): 323–327.
14. Xu R, Rahimi M, Ma H, Fung P, Chang C, Xu S, During M, Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery., *Med Sci Monit.* 2005;11(9):BR305-308.
15. Yan Z, Zak R, Zhang Y, Engelhardt JF, Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes., *J Virol.* 2005;79(1):364-79.
16. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Ito M, Jimbo FE, Watanabe C, Hishikawa S, Nakajima T, Yamagata T, Intra-cisterna magna delivery of an AAV vector with the GLUT1 promoter in a pig recapitulates the physiological expression of SLC2A1., *Gene Ther.* 2021;28(6):329-338.
17. Nakamura S, Muramatsu S, Takino N, Ito M, Jimbo FE, Shimazaki Kuniko, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T, Osaka H, Gene therapy for Glut1-deficient mouse using an adeno-

- associated virus vector with the human intrinsic GLUT1 promoter., *J Gene Med.* 2018;20(4):e3013.
18. Manno CS, et al., Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response., *Nat Med.* 2006;12(3):342-347.
 19. Nathwani AC, et al., Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B., *N Engl J Med.* 2014;371(21):1994-2004.
 20. George LA, et al., Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant., *N Engl J Med.* 2017;377(23):2215-2227.
 21. Mingozzi F, High KA, Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy., *Blood.* 2013;122(1):23-36.
 22. Muhuri M, Maeda Y, Ma H, Ram S, Fitzgerald KA, Tai PWL, Gao G, Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors., *J Clin Invest.* 2021;131(1):e143780.