

第一種使用規程承認申請書

令和2年11月12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 代表取締役社長 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RNA編集酵素（ADAR2）を発現する遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV.GTX-ADAR2）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒトの治療を目的とした投与、保管、運搬、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>製剤の保管及び運搬</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、遺伝子組換え生物等である旨を表示した容器に密封された状態で治療施設に運搬される。治療施設において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、適切に管理された冷凍庫で保管する。</p> <p>(2) 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> <p>投与液の調製及び保管</p> <p>(3) 製剤は希釈せずに投与する。治療施設の他の区画から明確に区別された作業室で、指定された温度を保ち密封状態で保管する。</p> <p>患者への投与</p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画から明確に区別された治療室内で患者の髄腔内に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> <p>投与後の患者からの排出等の管理</p> <p>(5) 投与後は、患者の投与部位を消毒し、創が治癒するまでドレープ材を貼付する等、投与部位からの本遺伝子組換え生物等</p>

の排出が最少となるよう対策を講じる。

- (6) 患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となる対策を講じるとともに、排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝搬を防止するため、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) 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、尿、唾液等に含まれる本遺伝子組換え生物等の検査を経時的に実施する。
- (8) 本遺伝子組換え生物等の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、患者に適切な指導を行う。

検体の取り扱い

- (9) 試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (10) 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れしない構造の容器に入れ、施設等から検査機関に運搬する。検体は検査機関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は、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た上で行う。
- (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) 未投与の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、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廃棄する。
- (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機材の廃棄は、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。

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

AAV.GTX-ADAR2（以下「本遺伝子組換え生物等」）の宿主は、アデノ随伴ウイルス（以下「AAV」）である。国際ウイルス分類委員会による分類体系上、ウイルスとしての AAV は以下のように位置付けられている（文献 1、2）。

Baltimore 分類：第 2 群（一本鎖 DNA ゲノム）

科：パルボウイルス（Parvoviridae）

属：デペンドウイルス（Dependovirus）

種：アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus）

AAV は自然界に広く分布しており、哺乳動物に感染する。2008 年までにヒト及び霊長類で分離されたウイルスは抗原性に基づいて 12 の血清型に分けられていたが、さらにその後の検索も合わせると、これまでに 100 以上の型が見つかっている（文献 3、4）。ヒトでは主に小児期に初感染が起こり、成人の約半数が中和抗体を有するが、ヒトへの病原性は知られていない。AAV 自体は複製機能を欠損しており、動物細胞における複製はヘルパーウイルスの機能に依存している（文献 2）。

本遺伝子組換え生物等は、AAV3 型（AAV3）の *rep/cap* 遺伝子領域がヒト RNA 編集酵素（ADAR2）発現カセットに置換されたゲノム構造を持ち、AAV9 型（AAV9）に由来するキャプシドタンパク質により形成されるウイルス粒子外殻（キャプシド）及び AAV3 型に由来する Rep タンパク質を有する。

AAV3 型の生活環について報告はないが、AAV3 型は AAV2 型と相同性が高いことから AAV3 型と AAV2 型の生活環に大きな差はないと考えられる。

野生型 AAV2 型の場合、生活環については、AAV2 型の外殻タンパク質には突出したループ構造があり、この構造が細胞へ結合し、共受容体を介してエンドサイトーシスにより AAV が感染する。単独で感染した場合、AAV ウイルスゲノムは第 19 番染色体に特異的に組込まれ、サイレントな状態（潜伏感染）となる。潜伏感染状態の細胞にヘルパーウイルスが感染、又は AAV の感染時にヘルパーウイルスが同時に感染した場合、AAV の増幅が起こり、細胞外へ排出される。（文献 5、6）。AAV9 型の外殻タンパク質のコード領域 (*cap*) は、AAV2 との相同性が 78% であり、細胞への結合（感染）は AAV2 と同様であると推察される。また AAV3 型の複製コード領域 (*rep*) は、AAV2 との相同性が Gaps を含めて 85% であり、本遺伝子組換え生物等の生活環は AAV2 と同様であると推察される（別紙 1）。

2 使用等の歴史及び現状

AAV は、1965 年にアデノウイルス調製物の混入物として発見されたが、病原性が認められないため、医学的関心を引かなかった。しかしその非病原性、潜伏性及び広汎な感染性などの特性が

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4、7；IV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8）。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に使用された報告はない。

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 (ITR) 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み込み及びその後の切り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 (AAVR) があることが知られているが (文献 9)、感染には血清型ごとに異なる副受容体 (co-receptor) 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 10)。

AAV2型の場合、野生型AAVが単独で標的細胞に感染すると核内でエピソームとして存在するか Repが関与して第19染色体長腕のAAVS1領域への組み込みが起こるが、プラスミドベクターから作製した組換えAAVではこのような部位特異的組み込みは起こらない。組換えAAVの細胞染色体への組み込みは低頻度で起こりうるが、その場合には活発に転写されている遺伝子領域にランダムに挿入されやすいとの報告がある (文献11-13)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

細胞に感染した野生型AAVが核内に侵入すると、キャプシドからウイルスゲノムが放出されるが、AAVが単独感染した場合は自律的増殖ができず、潜伏感染する。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が共存する場合はAAVゲノムの複製とウイルス粒子の構築が起こる。なお、アデノウイルスがヘルパーウイルスの場合は、*E1A*、*E1B*、*E2A*、*E4*及び*VA*遺伝子が供給される。

本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温において安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。野生型 AAV が哺乳動物に感染することは知られているが、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。ヒトの正常フローラに存在するか否かについては明らかにされていないが、急性感染時には便中に排泄されることもある (文献 2)。AAV が単独で感染し、ヘルパーウイルスが存在しない場合は、二本鎖 DNA の形

でエピソームとして、又は宿主染色体（多くの場合ヒト第 19 染色体又はそのホモログ）に組み込まれて潜伏感染する（文献 14、15）。

(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。ヒト以外にも多くの哺乳動物に感染しうる。感染の際には、AAV は、細胞表面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、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。この時、アデノウイルス又はヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染していれば、AAV の増殖が起きて溶解感染の経路に進む。ヘルパーウイルスが共存しない場合は、感染細胞において複製することなく潜伏する（文献 16）。

(5) 病原性

AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで感染に伴ういかなる病原性も知られていない。ヒトの肝細胞癌組織を解析したところ AAV ゲノム配列が見出されたという報告がある（文献 17）。しかし、病的な意義は見出されていない（文献 18）。

(6) 有害物質の産生性

AAV の感染に際して細胞内で産生されるタンパク質に病原性又は毒性を示す報告はされていない。

(7) その他の情報

パルボウイルスに共通する性質として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ことから、乾燥に対しても抵抗性を示す。不活化には加熱（85℃で数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1000 ppm）などのウイルス消毒剤、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）。通常のオートクレーブ処理により完全に不活化される。

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

遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の全塩基配列を別紙 2 に、構造模式図を別紙 3 に示す。

本遺伝子組換え生物等のゲノムにおいて、宿主である AAV3 に由来するのは両末端の ITR 配列のみであり、これらに挟まれた形で供与核酸である [] プロモーター領域、ヒト ADAR2 コード領域、[] ([]) 配列、[] ([]) 由来ポリ A 付加シグナル領域、及び非コーディング人工配列が存在する。また、ウイルス粒子は AAV9 のキャプシドタンパク質を外殻に有する。

本遺伝子組換え生物等の構成要素は以下のとおりである。括弧内に本遺伝子組換え生物等ゲノム DNA の供与核酸の塩基番号（別紙 2）と塩基長を示した。

- ① Left ITR (■■■■、■■■■ 塩基)
AAV3 由来の配列である。
- ② ■■■■ プロモーター (■■■■) (■■■■、■■■■ 塩基)
■■■■ ■■■■ 遺伝子プロモーター領域に由来する。
- ③ ヒト ADAR2 コード領域 (■■■■、■■■■ 塩基)
ヒト RNA 編集酵素 (adenosine deaminase acting on RNA type 2: ADAR2 ; アミノ酸配列を別紙 4 に示す) をコードする。
- ④ ■■■■ 配列 (■■■■、■■■■ 塩基)
mRNA を安定させ、発現レベルを増加させる ■■■■ ■■■■ (■■■■) に由来する。野生型 ■■■■ 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。
- ⑤ ■■■■ ポリ A 付加シグナル (■■■■ pA) (■■■■、■■■■ 塩基)
■■■■ (■■■■) の後期発現遺伝子領域に由来する転写終結シグナル。
- ⑥ Right ITR (■■■■、■■■■ 塩基)
AAV3 由来の配列である。
- ⑦ 人工配列 (■■■■、■■■■、■■■■、■■■■、■■■■、計 ■■■■ 塩基)
プラスミド構築の過程で挿入された人工配列であり、本遺伝子組換え生物に新たな生物学的機能を付与するものではない。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸構成要素の機能は以下のとおりである。

- ① Left ITR
AAV ゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。
- ② ■■■■ プロモーター
転写因子が結合し、神経細胞特異的に ADAR2 遺伝子の転写を開始させる。
- ③ ヒト ADAR2 コード領域
ヒト RNA 編集酵素 ADAR をコードする。発現産物の ADAR2 はグルタミン酸受容体 GluA2 の mRNA を編集する。
- ④ ■■■■ 配列
ポリ A 部位のリードスルーを防ぐ、RNA のプロセッシングと成熟を促進する、RNA の核外への輸送を増大させる、等の働きにより導入遺伝子の発現を増大させる。
- ⑤ ■■■■ のポリ A 付加シグナル (■■■■ pA)
RNA ポリメラーゼIIによる転写終結に寄与し、転写産物末端にポリアデノシンを付加することにより RNA の安定性と転写効率を増加する。
- ⑥ Right ITR
AAV ゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。

⑦ 人工配列

プラスミド構築の過程で挿入された制限酵素認識部位等であり、本遺伝子組換え生物に新たな生物学的機能を付与するものではないと考えられる。

供与核酸配列において、既知の有害配列との相同性は認められなかった。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

(2) 構成要素の機能

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造

宿主である AAV に移入された供与核酸は、1 項の (1) に記載された ADAR2 タンパク質発現カセットである。それらの塩基配列を別紙 2 に示す。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法 (別紙 5 を参照)

本遺伝子組換え生物等は、ADAR2 遺伝子及びアデノ随伴ウイルス 3 型の ITR を組み込んだプラスミド (pADAR2())、アデノ随伴ウイルス 9 型の改変型 *cap* 遺伝子及びアデノ随伴ウイルス 3 型の *rep* 遺伝子を組み込んだプラスミド (pGTX())、並びにアデノ随伴ウイルス E2A 及び E4 遺伝子を組み込んだプラスミド (pHelper()) を AAV-293 細胞に導入して作製される。

(3) 遺伝子組換え生物等の 生育の経過

凍結した AAV-293 細胞のワーキングセルバンク (WCB) を拡大培養し、プラスミド pADAR2(), pGTX() 及び pHelper() を同時に導入する。細胞培養後に培養上清及び培養細胞を回収し、界面活性剤等により処理し、フィルターろ過、カラムクロマトグラフィー等の精製工程を経て、AAV.GTX-ADAR2 のバルクを調製する。目的の濃度に調整し、バイアル等の密封容器に小分け分注し、-60°C 以下にて冷凍保管する。AAV.GTX-ADAR2 は、製造ロット毎に品質試験を行う (別紙 5)。

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様式が保管中に変化することはない（文献 19）。

動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムが細胞染色体に組み込まれることはごく稀で、通常核内で染色体外 2 本鎖 DNA（エピソーム）として安定に存在し、搭載された SynI プロモーター支配下に転写され、ADAR2 タンパク質を発現する（文献 20-22）。ADAR2 タンパクの発現は細胞の遺伝子パターンに大きな変化が起こらない限り、また細胞が分裂しない限り継続するものと考えられる。一般に神経細胞は終末分化した静止期の細胞であり、遺伝子発現パターンの大きな変化やエピソームの希釈が起こらないので長期的な発現が期待される。

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

本遺伝子組換え生物等は宿主の AAV3 に存在しないヒト ADAR2 遺伝子及びその発現カセットをコードしているので、その配列の一部を PCR で特異的に増幅、定量することが可能である。このときに用いる PCR 反応では試料 μL 中に コピーの発現カセットがあれば検出することができる。本検出法の信頼性については、同様の定量的 PCR 法を用いたウイルス検出法が既に臨床応用されていることから、十分に確立しているものと考えられる。詳細を別紙 7 に示す。

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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 ADAR2 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 ADAR2 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。本組み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、又は通常の細胞に本遺伝子組換え生物等・野生型 AAV・ヘルパーウイルスの 3 者が共感染した場合のみである。
- ・本遺伝子組換え生物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 pGTX()と ADAR2 遺伝子をもつ pADAR2()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 replication-competent AAV (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 (cell tropism) を規定する外被蛋白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、感染様式、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、パッケージングする供与核酸の長さは非常に短い（文献 21、22）。

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

ヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬、廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 使用等の方法

製剤の保管及び運搬

- (1) 本遺伝子組換え生物等の製剤は、遺伝子組換え生物である旨を表示した容器に密封された状態で治療施設に運搬される。治療施設においては、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、適切に管理された冷凍庫で保管する。
- (2) 本遺伝子組換え生物等の製剤の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

投与液の調製及び保管

- (3) 本遺伝子組換え生物等の製剤は希釈せずに投与する。治療施設の他の区画から明確に区別された作業室内で、指定された温度を保ち密封状態で保管する。

患者への投与

- (4) 本遺伝子組換え生物等の製剤の投与は、治療施設の他の区画から明確に区別された治療室内で患者の髄腔内に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

- (5) 投与後は、患者の投与部位を消毒し、創が治癒するまでドレープ材を貼付する等、投与部位からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となるよう対策を講じる。
- (6) 患者からの本遺伝子組換え生物等の排出が最少となる対策を講じるとともに、排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝搬を防止するため、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) 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、尿、唾液等に含まれる本遺伝子組換え生物等の検査を経時的に実施する。

(8) 本遺伝子組換え生物等の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、患者に適切な指導を行う。

検体の取り扱い

(9) 試験のために患者から採取した検体は、治療施設その他外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。

(10)（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構造の容器に入れ、施設等から検査機関に運搬する。検体は検査機関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は、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た上で行う。

(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)未使用の本遺伝子組換え生物等を含む廃棄物は、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廃棄する。

(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機材の廃棄は、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っては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。

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

被験者体内における rcAAV 出現の有無及び排出の有無については、排出等の挙動が明らかになるまで本遺伝子組換え生物等の排出等の検出を経時的に実施する。

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

本遺伝子組換え生物等は孤発性 ALS の病態を示すモデルマウスにおいて運動ニューロン死による症状進行を抑制することが示されている（文献 23）。

ラットにおける非臨床試験では、雌雄の標準及び高用量群にて、胸部髄腔内投与の投与部位と考えられる頸髄で投与 91 日まで AAV.GTX-ADAR2（XXXXXXXXXX）濃度の高値が持続した。脳、腰髄、心臓、脾臓、腎臓、肺、肝臓、精巣及び卵巣の投与後 7 日の AAV.GTX-ADAR2 濃度は頸髄中濃度に比べ低値で、腰髄を除き投与後 28 日以降は大きく減少した。血液、尿及び糞中 AAV.GTX-ADAR2 濃度は投与後 1 日に高値を示したが、その後は投与後 91 日まで低値を示した。また、雌雄の標準および高用量群においても一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液・血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査において本品投与に起因する変化は認められなかった。詳細を別紙 8 に示す。

ラットを用いた AAV9-ADAR2 の一般毒性及び生体内分布試験（試験番号：18K2352G）において AAV.GTX-ADAR2（XXXXXXXXXX）を単回髄腔内投与した後、精巣及び卵巣に AAV.GTX-ADAR2 が検出されたが、91 日までの観察で対象群のレベルまで経時的に低下していたことから、生殖系列への一過性的な移行はあるものの生殖系列への組み込みは起こっていないと考えられる。

臨床試験

本使用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。

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、以下に示すように、類似のウイルスベクターを用いた情報は多数得られている。

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 8）。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 24) 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 25)、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 26)、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 AT132 の臨床試験で 3×10^{14} /kg の AAV8 ベクターを投与した 3 例の死亡例が報告された。詳細は未公表であるが、直接の死因は消化管出血で、当該患者は肝胆道系疾患の既往歴を有していたことから、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

本遺伝子組換え生物等の感染性は野生型 AAV9 と同一と考えられ、微生物に感染するとの報告はない。また、競合や有害物質を産生する報告もなく、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

当該第一種使用規程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はなく、生物多様性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

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等の ITR は AAV3 に、キャプシドタンパク質は AAV9 に由来する。野生型 AAV には病原性がないことが示されているが、本遺伝子組換え生物等は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠落させているため、万が一ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染したとしても、複製・増殖は起こらず、病原性はさらに低いと考えられる。

なお、AAV を宿主とする遺伝子組換えウイルスはこれまで欧米の臨床試験で使用され（文献 21、22、24-26）、さらに欧州で医薬品として承認されたものもあるが（Glybera）、環境への悪影響に関する報告はない。また、これまで当該ウイルスを投与されたヒトにおいて当該ウイルスに由来する重篤な副作用は報告されていない。

(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限り、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が環境中へ拡散する可能性は低く、また、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自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。また、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られるため、本遺伝子組換え生物が及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が被験者以外のヒトに対して病原性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

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規程等の方法による限り、病原性によって生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

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

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及び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の有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性がある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は非病原性である。本組換え生物が発現する ADAR2 は神経細胞膜表面チャンネルタンパク質 GluA2 の mRNA を編集する酵素であって、ADAR2 タンパク質が毒性を持つことは知られていない。

(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限り、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来 rcAAV が環境中へ拡散する可能性は低く、また、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自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖することはない。また、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるア

デノウイルス等と共感染しない限り、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 ADAR2 タンパク質が被験者以外の第三者又は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

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、有害物質の産生によって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又は微生物の特定

本遺伝子組換え生物等が自然界で感染する対象は、野生型 AAV9 と同じく哺乳動物であり、ヒト及びサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。自然界では、野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、ヒト以外で増殖を伴う感染が成立するかどうかは明らかではない。遺伝子組換え AAV を使用した実験結果から、ヒト以外にカニクイザル、アカゲサル、イヌ、ラット、マウス等の哺乳動物に感染することが報告されている。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等のゲノム DNA が、水平感染を受けた第三者や動物等に保持される可能性は完全には否定できないが、本遺伝子組換え生物等が増殖するためにはヘルパーウイルス及び野生型 AAV との三重感染が必要になるため、さらなる水平伝達が起こる確率は極めて低い。三重感染時に相同組み換えが起こって生じた rcAAV が水平伝達される確率はさらに小さくなる。本遺伝子組換え生物が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性に ADAR2 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。本遺伝子組換え生物由来の rcAAV が出現したとしても、核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等である。

(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、本遺伝子組換え生物及び本遺伝子組換え生物由来の rcAAV の環境中への拡散は極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物自体はヘルパーウイルスが存在しても増殖する能力は無く、本遺伝子組換え生物由来 rcAAV も、ヘルパーウイルスであるアデノウイルス等と共感染しない限り、環境中で増殖することはない。さらに、本遺伝子組換え生物が効率よく感染する対象はヒトに限られることから、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。

極めて微量の本遺伝子組換え生物由来の rcAAV の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、rcAAV は野生型 AAV と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでいても野生型 AAV に極めて近い構造になると考えられる。rcAAV の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV と同等であ

り、ヒト及び他の哺乳類動物、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。

(4) 生物多様性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限り、核酸の水平伝達によって生物多様性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が感染する動植物等の種類は野生型 AAV 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限り、本遺伝子組換え生物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、その量は検出レベル以下であると推定される。本遺伝子組換え生物による ADAR2 遺伝子の発現はヒトに病原性をもたないので、ヒトに対する影響はないと考えられる。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等との三重感染が無い限り、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物と野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスであるアデノウイルス等が感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物はやがて環境中から消滅すると考えられる。従って、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限り、本遺伝子組換え生物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 : AAV2, AAV3, AAV9 塩基配列情報

別紙 2 : AAV.GTX-ADAR2 の供与核酸の全塩基配列

別紙 3 : AAV.GTX-ADAR2 供与核酸の構造

別紙 4 : ADAR2 のアミノ酸配列

別紙 5 : AAV.GTX-ADAR2 の作製方法

別紙 6 : AAV.GTX-ADAR2 の品質試験

別紙 7 : qPCR 法 (試験方法、分析バリデーション試験結果)

別紙 8 : ラットにおける非臨床試験結果 (分布・排出)

参考文献

1. Condit RC. Principles of virology. In “Kaipe DM, Howley PM eds, Fields VIROLOGY 6th ed”, pp21-51, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2013)
2. Berns KI, Parrish CR. Parvoviridae. *ditto*, pp1768-1791.
3. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, *et al.* Adeno-associated virus type 12 (AAV12) : a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 82:1399-1406, 2008.
4. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583-593, 2008.
5. S.Muramatsu, *et al*, Nucleotide Sequencing and Generation of an Infectious Clone of Adeno-Associated Virus 3, *VIROLOGY* 221, 208–217 (1996)
6. 中井浩之, 急速に進化をつづけるアデノ随伴ウイルスベクター, *Drug Delivery System* 24-6, 2009
7. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol* 2014, 1:427-451, 2014.
8. Mendell JR, Al-Zaidy S, Arnold WD, *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *New Engl J Med* 377:1713-1722, 2017.
9. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, *et al.* An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530:108-112, 2016.
10. Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* 21:75-80, 2016.
11. Nakai H, Montini E, Fuess S, *et al.* AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34: 297-302, 2003.
12. 小澤敬也, アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療, *ウイルス* 53(2),163-170, 2003
13. 卜部匡司, 小澤敬也 他, アデノ随伴ウイルスベクターと遺伝子治療, *ウイルス* 47(2), 221-230, 1997
14. Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, *et al.* Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* 79:14781-14792, 2005.
15. Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, *et al.* Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 79:14793-14803, 2005.
16. D Stone, A David, *et al*, Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system, *Journal of Endocrinology* (2000)164, 103-118
17. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, *et al.* Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 47:1187-1193, 2015.
18. Gil-Farina I, Fronza R, Kaepfel C, *et al.* Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol Ther* 24:1100-1105, 2016.
19. Xu R, Rahim M, Ma H, *et al.* Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Med Sci Monit* 11:305-308, 2005.

20. Yan Z, Zak R, Zhang Y, *et al.* Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol* 79:364-379, 2005.
21. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, *et al.* Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77:3495-3504, 2003.
22. Grimm D, Pandey K, Nakai H, *et al.* Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol* 80:426-439, 2006.
23. Yamashita T, Chai H-L, Teramoto S, *et al.* Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med* 5:1710-9, 2013.
24. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12:342-347, 2006.
25. Nathwani AC, Reiss UM, Thddenham EGD, *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *New Engl J Med* 371:1994-2004, 2014.
26. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, *et al.* Hemophilia B gene therapy with a high-specific activity factor IX variant. *New Engl J Med* 377:2215-2227, 2017.