

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究  
ーレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターの安全性確保ー

分担研究者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた研究の一環として、本年度はレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターの安全性確保について検討した。遺伝子治療薬としての臨床開発が期待されているレンチウイルスベクターについては、EU-CPMPからレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案が提示されている。本案は基となるレンチウイルスの性質やレンチウイルスベクターの特徴と欠点を明らかにするとともに、ベクターの設計および製造において安全性を確保するために留意すべき事項、レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験として実施すべき事項についてまとめられている。本案は今後、日本におけるレンチウイルスベクターの品質、安全性確保のあり方を考える上で非常に参考になると考えられる。また、レトロウイルスベクターについてはX連鎖重症免疫不全症(X-SCID)遺伝子治療による白血病発症事例に基づいて、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の副作用発現のリスクと安全性確保のための方策について検討した。X-SCID遺伝子治療による副作用の発現にはレトロウイルスベクターに共通する問題と、疾患、プロトコール特有の問題が共に関与したと考えられるが、ウイルスベクターの染色体への挿入による副作用発現のリスクは従来考えられていたよりも高頻度で起こる可能性があることが明らかになってきている。今後の遺伝子治療の安全性確保にあたってはリスク・ベネフィットを十分に考慮すると共に、より安全性を高めたベクターの開発や非臨床安全性試験法の開発が重要と考えられる。

A. 研究目的

遺伝子治療は、現在、効果的な治療法のないガンや各種遺伝性疾患等に対する画期的な先端医療として、また、高齢化社会の到来に伴い増加の一途をたどると予測される糖尿病や動脈硬化等のいわゆる成人病に対しても、既存の方法より優れた治療法となる可能性がある新しい医療技術として期待されている。一方でアデノウイルスベクターを用いた臨床研究における死亡事故やレトロウイルスベクターを用

いたX連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID)の遺伝子治療におけるT細胞白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用も生じている。このように遺伝子治療のような革新的医療技術には、未知、未経験の要素が多く、治療法として確立するためには解決すべき課題が数多く存在する。今後、遺伝子治療が一般的に実用化されるための極めて重要な課題のひとつとなるのが安全性の確保である。遺

伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。

本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を調査し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。本年度は EU CPMP のレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案を基にレンチウイルスベクターの品質・安全性確保において考慮すべき点を検討した。また、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について検討した。

## B. 研究方法

EU CPMP が 2003 年に作成したレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案(資料 1 ; **Position statement on development and manufacture of lentiviral vectors**)及び関連する論文等を基にレンチウイルスベクターの品質、安全性確保に重要な要件を検討した。また、フランスでの X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療による白血病発症事例に関連する論文、報告書等を基に、遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について検討した。

## C. 研究結果及び考察

### C.1. レンチウイルスベクターの品質、安全性確保

マウス白血病ウイルスなどを元にしたレトロウイルスベクターは、現在の遺伝子治療臨床

研究で最も広く用いられているベクターであるが、増殖性の細胞にしか遺伝子導入できず、導入効率も低いことが知られている。一方、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を代表とするレンチウイルスは同じくレトロウイルス科に属するが、非分裂細胞にも感染し、遺伝子を染色体中に効率よく導入することから、レトロウイルスの長所を持ち、*in vivo* で体細胞にも遺伝子導入可能なベクターとしての開発が注目されているが、安全性上考慮すべき点も多いと考えられる。2003 年 9 月、EU CPMP よりレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント(案) が公表された。以下にその概要を示す。

### 1.1) 序論

レンチウイルスはレトロウイルスファミリーに属し、人に対する病原体である HIV-1, HIV-2 も含まれる。レンチウイルスから作成された非増殖性レンチウイルスベクター(以下 LV と略す) は種々の細胞に外来遺伝子を導入する。他のレトロウイルスベクター、特にガンマレトロウイルス(従来はオンコレトロウイルスとして知られていたもの)に由来するベクターと異なり、非分裂細胞(幹細胞、リンパ球、樹状細胞、神経細胞など)に遺伝子導入可能である。従って *ex vivo* の他に *in vivo* での遺伝子導入手段として有用である可能性がある。さらに、他のレトロウイルスベクターと比べて遺伝子発現がサイレンシングされる頻度が低いため、LV では長期間に渡る遺伝子発現の持続が期待できる。しかしながら、他のレトロウイルスベクターと同様、LV にも以下のような欠点がある。

- (1) 挿入可能な導入遺伝子や調節配列のサイズに限度がある (約 8kb)。
- (2) 高力価の安定なベクターの産生が困難。
- (3) 標的細胞のプロウイルス DNA 挿入部位近傍の内在配列を活性化あるいは不活性化

する可能性があり、発ガンの危険性がある。  
(4) レンチウイルスのゲノムはガンマレトロウイルスよりも複雑なため、ベクターのデザインが難しい。

現在、LV 開発の主な中心のひとつが人に対して悪性の病原体である HIV をもとにしたものであることから、他のレトロウイルスベクターと比べて品質、有効性、安全性の問題が一層重要視される。LV の製造と臨床使用に関する主な懸念は以下のとおりである。

- (1) LV 製造過程における増殖性ウイルス (RCL) の出現の可能性。
- (2) レンチウイルスの遺伝子との *in vivo* での組換えの可能性。
- (3) プロウイルス DNA が活性遺伝子内や遺伝子の近傍に挿入されることにより、発癌をイニシエーションあるいはプロモーションする可能性。

製造過程における RCL の混入に伴う生物学的有害性はどの LV でも同様であるが、混入を最小限にする方法は、他のレトロウイルスベクターの場合と同様である。

レトロウイルスベクターの品質、安全性に関する要件は現在の遺伝子治療薬に関するガイダンスにに記載されている。このポジションステートメントは *ex vivo*, *in vivo* 使用を意図した LV の品質面にして述べたものであり、各 LV 製品の有効性や安全性について示したものではない。

## 1.2) レンチウイルスの性質と LV 開発への影響

ヒトレンチウイルスの HIV-1, HIV-2 は CD4+ T 細胞及びマクロファージを標的とする、ヒトに対して高い病原性を持つ病原体である。他の霊長類や非霊長類のレンチウイルスはその種にとっては悪性の病原体であるが、現在

の知見ではヒトには感染性あるいは病原性がないと考えられている。HIV は細胞の特異性が限定されていること、ヒト以外のレンチウイルスがヒトに感染しないことは、ウイルスエンベロープタンパクを他のウイルスの遺伝子に変換することにより克服可能で、広い細胞特異性を持つようになる。LV は非増殖性に設計されているが、そのようなベクターの臨床投与によりヒトに対する新たな病原体が生じる可能性が懸念される。しかしながら、現在は HIV の病原性に関する膨大な知識に基づいて、(1) 安全な HIV-based LV の設計、(2) HIV-based LV の定量と組換えにより生じる可能性のあるウイルスの検出に関する技術的なアプローチが可能となっている。それでもなお、上述のような HIV-based LV の臨床使用による安全性上の懸念から、適切なヒト以外の霊長類あるいは非霊長類のレンチウイルス、そのいくつかは現在の知識では人に対して病原性がないと考えられるものを用いた LV の研究開発が進められている。種々のサルに由来するサル免疫不全ウイルス (SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウシ Jembrana 病ウイルスなどが候補とされ、いくつかは開発中であるが、SIV、EIAV ベクターは利用可能である。非霊長類レンチウイルスの遺伝的構造は HIV-1 より単純であり、EIAV はレンチウイルスの中では最も単純なものである。ヒト以外の霊長類あるいは非霊長類のレンチウイルスは通常はヒトに感染性がないと考えられているが、これらに由来するベクターを人に感染させた結果は未知であり、安全性上の懸念、特に、変わりやすいリコンビネーションの起こったキメラレンチウイルスの水平感染や種を超えた感染の危険性は残る。従って、ヒト以外の霊長類あるいは非霊長類の LV が HIV-based LV と比べてはるかに安全性上有利であるかどうかについては議論の余地がある。

### 1.3) LV の設計

LV の産生の元となる野生型レンチウイルスの病原性を減らし、LV の危険性を最小限にするため、考えられるあらゆる手段が講じられるべきである。これは以下によって達成される。

- (1) 不必要な毒性/修飾遺伝子を除去した最小限のレンチウイルスゲノムを作成する。
- (2) LV 産生に不可欠なレンチウイルス遺伝子/配列を適切なコンストラクト/カセットに切り離し、RCL 産生の可能性を最小限に抑える。

現在、ほとんどの LV 産生において次のような 3 つ以上のプラスミドを用いている。

- エンベロープコンストラクト  
ヘテロのウイルスエンベロープ蛋白、たとえばレンチウイルスのエンベロープを vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) に置換してシュードタイプ LV 粒子を作成。
- ヘルパーコンストラクト  
ウイルス蛋白の Gag, Pol をコード。
- 導入遺伝子コンストラクト(トランスファーベクター)  
導入遺伝子と LV 発現ベクターの産生、パッケージングに必要な配列を含む。

特に、トランスファーベクターとパッケージング(エンベロープ、ヘルパー) コンストラクトとの配列の相同性は組換えを起こさないために最小限にされている。トランスファーベクターに関しては、ベクターDNA の可動性と標的細胞へのプロモーター挿入による前癌遺伝子の活性化を軽減するために 3' LTR に SIN (self inactivating; 自己不活化) 修飾を施したほうがよい。特に、HIV-based LV はベクターDNA の可動性と野生型 HIV との組換えを抑制するために SIN 修飾が推奨される。その他、

パッケージングコンストラクトを 2 つのコンポーネントに分けたり、Rev 非依存性システムの開発、レトロウイルスのポリアデニレーションシグナルを外来性のものに置換するなどの安全性を向上させるための修飾も、これらの変更がベクターの性能や理論的に危険性を増すものでなければ推奨される。RCL 出現の可能性を含めてコンストラクトの特性を *in vitro*、*in vivo* で十分に検討することが必要である。

### 1.4) LV の製造方法

LV はベクター産生細胞株にパッケージングコンストラクトとトランスファーベクターコンストラクトを一過性に共導入するか、あるいは LV 粒子産生に必要なひとつ以上の (インデューシブル) パッケージングコンストラクトを含むパッケージング細胞株にトランスファーベクターをトランスフェクションすることにより生産される。今日では、前者の方法が SIN ベクターを含む最新のコンストラクトの組合せを使える唯一の方法である。しかしながら、一過性発現による生産は製造ロットに限界があり、そのために *ex vivo* 遺伝子導入のような初期の限られた臨床試験用の量しか供給できない。他のレトロウイルスベクターと同様に LV 増幅に必要な全ての要素を含む安定なパッケージング細胞株を用いて製造すれば LV の収量も増加するはずである。そのような細胞については現在の遺伝子治療薬に関するガイダンスに従って、書類に導入した塩基配列全ての詳細とその品質、安全性に関して記載する必要がある。

VSV-G のようなヘテロなウイルスエンベロープのコンストラクトをシュードタイプ LV 粒子の製造に用いる場合、そのエンベロープ遺伝子が LV ロットに混入していないこと、内在性のあるいは飛び込みウイルスをシュードタイプしないことを調べる必要がある。また、LV ロットへの Gag/pol 配列の混入も最小限にす

べきである。

DNA の共導入により一過性にベクターを産生する場合、コンストラクトの DNA は高品質でなければならない。導入したプラスミドと LV 粒子にパッケージされるトランスファーベクターについて全塩基配列を示す必要がある。ベクターの製造に用いる細胞は細胞基材に関するガイドライン(Q5D)<sup>2)</sup>に従うこと。可能であれば、LV ロットのバッチ間での均一性を示すこと(例えば、臨床試験に用いた前回のパイロットバッチから得られた十分な分析データが利用可能な場合)。

### 1.5) LV の特性解析と品質管理試験

どの LV 調製品でも遺伝子導入活性、ベクター粒子数、RCL が混入していないことについて十分に解析する必要がある。ロットリリースの規格は特性解析を行うための適切な試験に基づくこと(遺伝子治療薬ガイダンス<sup>3)</sup>参照)。一過性の遺伝子導入により産生した LV の場合、最終ロットに含まれる細胞由来及びプラスミド由来 DNA の混入量の最大値を定めること。DNA を除去するために DNase 処理を考慮すること。VSV-G その他のエンベロップ蛋白をコードするコンストラクト、あるいは Gag/Pol コンストラクトに由来する DNA が LV 製品に混入する場合には DNase 処理は不可欠である。

十分に特性解析された製造ロットから in house の参照品を樹立すべきである。

#### 1.5.1) 遺伝子導入活性

遺伝子導入活性の重要な点は遺伝子組み込み能、導入遺伝子の発現とその機能性である。遺伝子導入活性は粒子数、逆転写酵素活性、Gag とエンベロップ蛋白(あるいは他の蛋白質)との比率など、すべての関連する LV の性質と相関する必要がある。

##### (1) 遺伝子組み込み(integration)能

遺伝子組み込み能はベクタープロウイルス DNA の標的細胞への組み込みにより測定可能である。標的細胞への組み込みは、遺伝子導入細胞を限界希釈し、導入遺伝子あるいはトランスファーベクター DNA に含まれるパッケージングシグナル $\Psi$ を標的としたプローブを用いた NAT アッセイを用いて評価することができる。

そのようなアッセイでは、以下の規格を含め、標準化された手法を用いる必要がある。

- (1) 感染に用いる LV のタイター
- (2) 遺伝子導入に用いる細胞株
- (3) 遺伝子導入時の細胞の培養条件
- (4) 遺伝子導入後、PCR を行うタイミング
- (5) 遺伝子導入された細胞数の定量
- (6) シュードタイプ特異的レンチウイルスの参照品

VSV-G によりシュードタイプされた LV の多くは広範な細胞に感染する。例えばレンチウイルスを含むシュードタイプレトロウイルスの検出に広く用いられる HEK293 細胞のような細胞株は、異なる研究室で異なる培養条件によりその品質に多様性があることが知られている。このことはアッセイの標準化と結果の一定性に影響する可能性がある。

##### (2) 導入遺伝子の機能性

LV により導入された遺伝子の機能性の定量は導入遺伝子の発現産物の濃度と機能活性により測定する。このようなアッセイは、以下の項目及び遺伝子組み込み能の項に示した考慮事項の規格を含めた標準的手法が必要である。

- (1) 感染に用いる LV のタイター
- (2) 遺伝子導入に用いる細胞株
- (3) 遺伝子導入時の細胞の培養条件
- (4) 導入遺伝子産物の発現のタイミング

#### 1.5.2) LV の粒子数測定

レトロウイルス粒子のルーチンの検出法はネガティブ染色電子顕微鏡法であるが、この手法によるウイルス粒子の定量は困難(粒子の可塑性、不安定性のため)であり感度も低い。しかしながら full (RNA+)の粒子と empty (RNA-)の粒子、エンベロープ蛋白陽性粒子と陰性粒子、感染性粒子と非感染性粒子を見分ける方法は他にはない。ウイルスの全粒子数(full及びempty)はGag蛋白の含量と相関し、これは特異的なイムノアッセイにより測定できる。しかし、レンチウイルスの産生法によってはGagが過剰発現し、遺伝子導入能を欠損したLV粒子が産生される。それでもなお可能であれば、Gag蛋白の量を測定し、LVの他の特性との相関を調べるべきである。例えば、各LV調製品でGagタンパク質と遺伝子導入能との関連が一定性であるというデータを提示する必要がある。レンチウイルスの場合、1pgのGag蛋白はほぼ粒子数 $1 \times 10^4$ 個に相当する。代替法として、ウイルスエンベロープあるいはカプシド蛋白を免疫染色して共焦点顕微鏡で可視化し、既知の濃度の蛍光粒子との相関を調べることで全粒子数を測定することが可能であるが、これはまだ一般的な方法ではない。

エンベロープ蛋白を欠いた不完全なLV粒子が観察された場合、その比率を求めること。

ベクターRNA分子がパッケージされているLV粒子数の測定にはバリデートされた核酸増幅試験(NAT assay)を用いること。

逆転写酵素活性はベクターのLVのその他の特性、特に粒子数や遺伝子導入効率と相関するかもしれない。しかし、それだけではLVロットの特性解析としては不十分である。

### 1.5.3) RCL否定試験

現在のLV産生系ではRCLが生じる可能性を除くための安全装置が用いられているが、それでもなおRCLがLVロットに混入する危険性が低いながらも残るため、適切な否定試験を

実施すべきである。

RCLの存在レンチウイルスのgag/pol配列の染色体DNAへの組込みにより示され、これはいくつかの方法で測定可能である。例えば、RCLを感受性細胞に感染させた後、細胞上清を継代してRCLを増幅し、組み込まれたgag/pol特異的核酸をリアルタイム定量PCRで測定できる。HIV-1を基にしたLVの製造では、生じるRCLはいずれもHIV-1とはgagとpolの遺伝子しか共通の配列を持たない。このようなRCLの検出はHIV-1のGag蛋白あるいはgag遺伝子配列を元に検出可能であるが、それには良くバリデートされた高感度なアッセイが既に利用可能であり、例えばp24GagイムノキャプチャーアッセイやgagRNAのPCRアッセイをそれぞれ用いることができる。代替法として、PERT(product enhanced reverse transcriptase)アッセイを感受性細胞での継代培養でRCLを増幅後に行うことも考慮すべきである、というのはこの方法は幅広いソースの逆転写活性を測定できるためである。他の代替法として、マーカーレスキューアッセイもRCLの検出と定量に考慮すべきである。

一般的に、RCL試験に求められる定量限界はLVの予定投与量と製造ロットのサイズから決める必要がある。理想的には1投与量のベクターに含まれる一個のRCLを検出できることを立証すべきである。しかしながら、RCLアッセイの感度を示すためには適切で代表的な陽性対照あるいは標準品の選択が必要である。

どのRCLアッセイも良く特性解析がなされ、適切な陽性対照を入れて行うべきである。しかし、細胞への感染が必要な試験は一般的な参照品がないことからアッセイのキャリブレーションを行うことは難しい。現在のところ、VSV-GとGag/polをコードするレンチウイルスをRCLの感染性アッセイをモニターするだけのために作成することは、そのようなウイルスが病原性を持つことから望ましくないと考

えられている。

### 1.6) 癌原性

プロウイルス DNA の組み込み部位は広範囲に及ぶことから、挿入変異による癌原性の危険性は、改変細胞の数及び細胞ゲノムあたりの組み込み数が増えるに従い増加する。LV ロットのインテグレーション能は適切な細胞株を用いて NAT 試験で評価するが、ベクター DNA の挿入が起こっているヒトゲノム上の部位を同定し、*in vivo* で入りやすい活性遺伝子や局所のホットスポットを明らかにすることは安全性の確保に寄与すると思われる。例えば、臨床試験において LV で遺伝子導入した細胞での挿入部位のモニタリングは貴重な情報が得られるであろう。そのような調査では、LV で遺伝子導入した細胞の一部をとっておき、Alu-PCR により挿入部位のライブラリーを作成することを考慮すべきである。しかし、現在の技術的能力及び知見からこれはかなり難しい。

### 1.7) ポジションステートメント案に関する考察

本ポジションステートメント案は今後遺伝子治療薬として臨床開発が期待されるレンチウイルスベクターについて基となるウイルスの性質、ベクターの特徴と欠点、安全性を確保するためのベクターの設計および製造方法、レンチウイルスベクターの特性解析と品質管理試験について最新の知見をもとに有用な情報がまとめられているものである。

レンチウイルスに属する HIV はヒトにとって極めて有害な病原体であることから、それを遺伝子治療用ベクターとして活用するためにはベクターの設計や製造方法の段階から安全性確保のための特別の配慮が必要である。特に、レンチウイルスは染色体に組込まれることから、1.3) に示されているようにウイルスの LTR

に含まれるエンハンサー/プロモーター配列を除去した SIN ベクター<sup>3)</sup>を用いることが、挿入変異のリスクを抑えるのに重要と考えられる。また、組換えによる野生型ウイルスの出現が安全性上最も懸念される問題であることから、コンストラクトを複数のコンポーネントに分けたり、ウイルスの配列を可能な限り削除することが行われている。このような改変も、例えば 1.3) に述べられている REV(HIV 構造蛋白質の翻訳に関与する制御蛋白質)非依存性システムの場合、修飾蛋白をひとつ除けることにはなるが、同時に REV のリコンビネーションなしに GAG/POL 蛋白を作ることにもつながり、必ずしも安全性を高めるものではない可能性がある。

1.4) の製造方法に関して、SIN ベクターを含む最新のコンストラクトの場合、共導入しか方法がないとされている。これは pol 遺伝子にコードされているプロテアーゼや VSV-G 蛋白が細胞に対して毒性が高く、安定なパッケージング細胞の樹立が困難なためである。しかし、最近ではこれらの遺伝子がベクターを産生する時だけ発現されるように発現制御を施したパッケージング細胞株も樹立されており、最新のベクターでもスケールアップが可能となっている<sup>4)</sup>。

ベクターの特性解析、品質管理試験としては遺伝子導入活性、粒子数測定、増殖性ウイルス (RCL) 否定試験についてまとめられている。安全性確保の観点からは特に増殖性ウイルス否定試験が問題となる。1.5.3) にも述べられているように RCL 試験を行うための陽性対照、標準品がないこと、病原性を持つウイルスを標準品として作成することはリスクが大きいことが問題である。

1.6) の癌原性については C.2 に述べるようにレトロウイルスベクターで挿入変異による発癌が現実のものとなり、同様に染色体に挿入するレンチウイルスベクターでもベクターの

入りやすい部位、ホットスポットの解明や挿入の機構について十分な検討が必要と考えられる。なお、本案ではベクターの挿入部位のモニタリングを Alu-PCR で行うとされているが、C.2 に詳細を示す LAM-PCR (Linear amplification-mediated PCR)法<sup>6)</sup>がより適切であると思われる。

本案にまとめられている内容は、今後、日本におけるレンチウイルスベクターの開発と製造に関する安全性確保のあり方を考える上で非常に参考になると考えられる。

## C.2 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における重篤有害事象と安全性確保対策

C.1にも述べたように、レトロウイルスベクターは現在の遺伝子治療プロトコルの約1/3と最も広く使用されているベクターであるが、遺伝子導入効率が十分でないことなどによりこれまであまり大きな治療効果は得られていなかった。しかし、フランスのネッカー小児病院において1999年より実施されたX連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency; X-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた幹細胞遺伝子治療では、10例中9例で非常に有効な成績が得られ、遺伝子治療で初の成功例とされた<sup>6,7)</sup>。しかしながら、治療から約3年後、治療に成功した患者2名において遺伝子治療が原因となりT細胞が異常増殖し、白血病を発症するという重篤な副作用の発現が判明し、遺伝子治療関係者に衝撃を与えた。ここではこの重篤な副作用の発現に関連して現在までに明らかになった事項、各国の対応、及び今後取るべき安全性確保対策について検討した。

### 1) X-SCID 遺伝子治療による副作用の発現機構

X-SCIDはIL-2受容体サブユニットのコモンガンマ鎖( $\gamma_c$ )の遺伝的な欠損が原因でT細胞、NK細胞への分化の初期段階がブロックされ免疫不全を生じる疾患で、通常生後2年以内に感染症で死亡する。今回フランスで実施された遺伝子治療は小児患者より得たCD34<sup>+</sup>自己

骨髄造血前駆細胞に対してレトロウイルスベクターを用いてex vivoで $\gamma_c$ 遺伝子を導入後患者に戻すという治療法で、10例中9例において欠損していた成熟T細胞の出現、免疫機能の長期にわたる改善が認められ、特別な補充療法を受けなくても日常生活を送ることができるまでに回復した。しかし治療から約3年後、2例においてT細胞の異常増殖、白血病様の症状が出現した<sup>8)</sup>。1例目は2002年10月に公表されたもので、生後1ヶ月の時に $9.2 \times 10^7$ 個の遺伝子導入細胞を移植、30ヶ月目までは順調に経過したが、2002年4月の水痘罹患を機にT細胞( $\gamma\delta$ T細胞)がモノクローナルに増加、34ヶ月目には脾腫も出現した。また2例目は2003年1月に公表されたもので、生後3ヶ月の時に $13.3 \times 10^7$ 個の遺伝子導入細胞を移植、T細胞の回復が認められたが治療後34ヶ月でT細胞( $\alpha\beta$ T細胞)のモノクローナルな異常増加と貧血、脾腫が生じた。現在は2人とも化学療法により状態は安定しているという。

この2例について詳細に検討を行ったが、増殖性レトロウイルスは見いだされなかった。また、レトロウイルスの挿入部位を検討した結果、いずれも遺伝子導入直後は50ヶ所以上の挿入部位がLAM-PCR法により検出されたが、T細胞の異常増殖時には1クローンが増幅し、2例ともLMO2(LIM-domain only-2 protein)という遺伝子のプロモーター近傍にレトロウイルスベクターの挿入が認められ、LMO2が異常発現していることが判明した<sup>8)</sup>。LMO2は造血の初期に働く転写因子で、LMO2のトランスジェニックマウスはT細胞白血病を発症すること、またLMO2の染色体転座による異常発現により急性リンパ性白血病(T-ALL)



が発症することが知られる T 細胞の癌原遺伝子である。今回の X-SCID 遺伝子治療ではレトロウイルスベクターの挿入によりウイルス LTR のエンハンサー活性が作用して LMO2 のプロモーターが活性化され、LMO2 が異常発現したことにより T 細胞の異常増殖が引き起こされたこと、すなわち挿入変異(insertional mutagenesis)が白血病発症の主な原因と推測された。このような重篤な副作用の発生には以下のようなレトロウイルスベクターに共通の問題と、疾患、プロトコール特有の問題とが関与したと考えられる。

### (1)遺伝子の挿入変異のリスク

レトロウイルスベクターは遺伝子を染色体にランダムに組み込むことで遺伝子発現を行うため挿入変異のリスクは当初より想定はされていたが、これまでのレトロウイルスベクターを用いた前臨床、臨床試験の成績からはこの可能性はかなり低いものと考えられていた。しかし、X-SCID遺伝子治療では10例中2例で LMO2 への挿入変異が認められ、さらにもう一例でも LMO2 部位への組み込みが認められたという(この患者では今のところ白血病の発症は認められていない)<sup>9)</sup>。この結果からレトロウイルスベクターによる染色体への組込みは従来考えられていたようにランダムに起こるものではなく、組込み部位には選択性があり、挿入変異は予想以上の頻度で起こることが明らかとなった。

挿入変異については、マウスの実験でもレトロウイルスベクターで  $\Delta$ NGF 受容体遺伝子を導入した骨髄細胞の移植により白血病様の異常が認められ、ベクター挿入による転写因子 Evil (ecotropic viral integration site-1)の活性化が原因であったことが報告されている<sup>10)</sup>。これに関連して、最近、マウス白血病ウイルス MLV のヒト染色体への組込みはランダムではなく、活発に転写されている遺伝子の転写開始

部位付近に組み込まれやすいという性質があることが判明している<sup>11)</sup>。レトロウイルスは 10kb 離れていても遺伝子発現を増強することが可能であることから、ヒトゲノム中に 100 個以上の癌原遺伝子があるとすると、レトロウイルスによる遺伝子導入の 0.1 から 1%は癌原遺伝子の異常につながることを推定され<sup>12)</sup>、レトロウイルスベクターを用いた場合の挿入変異は相当高い頻度で出現する可能性がある。

組み込み部位に関しては、今回の X-SCID の例では LMO2 がホットスポット、あるいはベクターの挿入により LMO2 が活性化された細胞は増殖性が優位であるために選択されてきたと考えられるが、それには疾患、プロトコール特有の問題と LMO2 の性質が関係していると思われる。X-SCID 患者では T 細胞の分化が阻害されているため、患者の骨髄 CD34+細胞には T 細胞前駆細胞の割合が高いと考えられる。さらに CD34+細胞を導入すると T 細胞系の増幅が優位に働き、遺伝子導入細胞の多くは T 細胞となることから T 細胞白血病を発症しやすいことが推測される。LMO2 は造血系前駆細胞すべてで発現しているが、分化に伴い低下する。LMO2 は治療対象の CD34+細胞で発現しており、T 細胞を形質転換させる能力をもつことから X-SCID では LMO2 による発癌が起りやすくなると考えられる<sup>13)</sup>。ヒトゲノム上の遺伝子は 30,000 個程度であり、レトロウイルスは活性化遺伝子へ挿入されやすいこと、LMO2 は CD34+で発現されていること、投与細胞数から計算すると今回の例ではどの患者でも 1-10 個<sup>8)</sup>、あるいは 10-100 個<sup>13)</sup>の細胞で LMO2 にレトロウイルスが組み込まれていたと想定され、どの細胞でも T 細胞白血病発症に至る可能性がある。

しかし、LMO2 トランスジェニックマウス及び LMO2 転座の場合でも、白血病発症までには LMO2 の活性化の他に更なる変異が必要と考えられている<sup>13)</sup>。LMO2 部位への挿入は

三人目の患者でも認められているが、この患者では LMO2 の活性化、白血病様の症状は今のところ認められていない。従って、LMO2 部位への挿入のみで白血病の発症に至るわけではなく、さらにリンパ球の異常増殖を開始、促進させるような付加的要因が関与していることが示唆される。

### (2)導入遺伝子の発現によるリスク

導入遺伝子が白血病発症の要因の一つである可能性も指摘されている。X-SCID の場合、導入遺伝子の  $\gamma c$  は T 細胞増殖因子として作用する IL-2, -4, -7, -9, -15, -21 (すべて単独あるいは他の因子と共同で T 細胞の増殖因子として作用するサイトカイン) の受容体の共通サブユニットであるが、これらのサイトカイン受容体は白血病発症とも関与しており、例えば、IL7 受容体はほとんどの T-ALL で発現されており、白血病 T 細胞の DNA 合成、セルサイクル促進、アポトシス抑制に働くという<sup>13)</sup>。また、マウス血液癌のレトロウイルス挿入部位のデータベース (mouse retroviral tagged cancer gene database) をサーチした結果、T 細胞白血病細胞で LMO2、 $\gamma c$  の両方に挿入されている例が見いだされている<sup>14)</sup>。この例では LMO2 の発現が上昇し、X-SCID 患者の白血病細胞と同様の所見であったことから LMO2 と  $\gamma c$  との共同作用による発癌が遺伝的に示唆される。X-SCID 患者の白血病細胞では  $\gamma c$  の過剰発現は認められていないが、 $\gamma c$  が遺伝子導入細胞の増殖や分化に作用することでオンコジェニックに働いた可能性は考えられる。

### (3)その他のリスク要因

さらに 2 例の患者における T 細胞の選択的増殖、白血病発症には以下の要因が関与した可能性が考えられる。

①2 例とも患者に戻した CD34+細胞の数が他

の患者と比較して最も多かった ( $1.8 \times 10^7$  細胞及び  $2.0 \times 10^7$  細胞/kg、治療の平均値は  $4.3 \times 10^6$  細胞/kg)。このため挿入変異の起こった細胞が投与されるリスクが高まった。

②発症した 2 例は治療時の年齢が最も低かった (生後 1 ヶ月と 3 ヶ月、その他の患者は 6 ヶ月以上)。患者の年齢が低い場合には幹細胞のサブセットが異なり、挿入変異のリスクが高い T 細胞前駆細胞の比率が高く、また細胞の増幅能も高いため異常増幅が起こりやすい可能性がある<sup>15)</sup>。

③発症した 1 人の患者は腫瘍多発家系で染色体の転座も認められており、また水痘罹患がきっかけとなって T 細胞の選択的増幅が起こった。もう 1 人の患者は他の T 細胞オンコジンの TAL1, SCL に変異が認められている。これらの要因が LMO2 部位への挿入に加えて白血病の促進に関与した可能性がある<sup>16)</sup>。

## 2) 各国の対応

1 例目の報告 (2002 年 10 月 3 日公表) を受けてすぐに英国を除く各国で X-SCID 遺伝子治療、あるいは国によってはレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療全てが一時中止・凍結とされた。米国では FDA/CBER/BRMAC が 2002 年 10 月 10 日、レトロウイルスによる X-SCID 遺伝子治療の安全性に関わる公聴会を開催して発症の原因や代替法との比較などの検討により対応を協議した<sup>17)</sup>。SCID-X1 の治療法は HLA 適合ドナーがあれば骨髄移植が第 1 選択であるが、完全に適合した場合で生存率が 84%、半一致では 60%であり、また SCID 患者では骨髄移植でも 1-5%にリンパ性増殖性疾患が発生する。これまで得られた知見と治療のリスク・ベネフィットを考慮して、レトロウイルスベクターを用いた SCID に対する幹細胞遺伝子治療は全面的な凍結、中止とはせず、治療プロトコールの見直し、患者のモニタリング体制の強化及び

白血病が発症した事実も含めて発癌のリスクを患者に説明し、治療中の患者を含めてインフォームドコンセントを取り直すことを条件として治療を再開するという方針が示された。

しかし、2003年1月に公表された2例目の白血病発症の報告を受けて、FDAはレトロウイルスベクターを造血幹細胞に導入する全ての遺伝子治療臨床試験の一時中止を発表するとともにレトロウイルスベクターを用いた過去の遺伝子治療の副作用についても再調査を行った<sup>18)</sup>。2003年2月にはFDA/CBER/BRMACの会議で遺伝子治療の再開に向けて議論し<sup>19)</sup>、諮問委員会はX-SCIDにγc遺伝子をレトロウイルスベクターで導入する治療法については他に有効な治療法がない場合に限って認めるべきであること、またレトロウイルスベクターを用いたその他の幹細胞遺伝子治療については治療のリスク・ベネフィット、適切なインフォームドコンセント、代替法のリスク・ベネフィットについてケースバイケースでレビューした後、一時停止を解除すべきであるという勧告を出したが、FDAとしての決定はまだ出されていない。

その他の国の現在の対応状況は参考文献<sup>20)</sup>によると以下のとおりである。

英国：SCID遺伝子治療はケースバイケースで評価し、継続実施されている。

フランス：一時的な中断の後、2004年1月からX-SCID遺伝子治療の再開が認められた。

イタリア：2003年12月まではレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が全て中止された。新しいルールが現在待たれている。

ドイツ：レトロウイルスを用いた遺伝子治療が全て一時中断されたが、2003年2月に再開された。

ヨーロッパ：統一された規制はない。幹細胞遺伝子治療については生命を脅かす疾患の場合リスク・ベネフィットを注意深く評価した後で認められるべきとされている。

### 3) 日本における対応

我が国では東北大でネッカー小児病院との共同研究として計画されたX-SCID遺伝子治療が遺伝子治療臨床研究作業委員会で承認され患者の選定作業中であったが、1例目の報告を受けて実施は保留とされた。さらに2例目の報告を受けた2003年1月の遺伝子治療臨床研究作業委員会では、(1)東北大におけるX-SCIDに対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は保留のまま据え置くこと、(2)北大で計画されたADA欠損症(ADA-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は研究計画を再検討すること、(3)癌研での乳がんに対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療の今後の実施を当面差し控えることと既に実施したものについては経過観察を続けること、(4)その他のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究について、既に実施したものについては慎重に経過観察を続けることと今後実施するものについては有用性と有害事象との関係において慎重に取り扱う必要があることが示された。その後、2004年10月の厚生科学審議会科学技術部会においてレトロウイルスベクターを用いた2種類の遺伝子治療(北大のADA欠損症における血液幹細胞を標的とする遺伝子治療および筑波大学付属病院で計画された同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法)が審議され、遺伝子治療のリスク・ベネフィットを考慮し、フランスでの有害事象を受けて予想される副作用と危険性についてのインフォームドコンセントへの追記及び患者のモニタリングを強化した実施計画の変更が承認され再開が認められている。

### 4) 今後の安全性確保対策と課題

遺伝子治療の実施にあたってはリスク・ベネフィットの考慮が非常に重要となる。X-SCID 遺伝子治療はベネフィットは非常に大きい、フランスで実施されたレトロウイルスベクターで $\gamma c$ 遺伝子を導入した骨髓幹細胞を患者に戻す治療法は現在の段階では白血病発症のリスクが相当高いことから、その実施、再開にあたっては米国の BRMAC の勧告にもあるように他に有効な治療法がない場合に限って認められるべきであり、さらにプロトコルの見直しや患者の血液細胞のクローナリティのモニタリング、あるいは後で解析を行うための患者試料保存の実施が必要と思われる。

2002 年 12 月 4-6 日に行われた米国組換え DNA 審議会 (RAC) では X-SCID 遺伝子治療患者のモニタリングとその評価に関するプロトコルの試案が出されている<sup>21)</sup>。その内容は以下のとおりである。

- (1) 末梢血サンプルについて 6 ヶ月ごとに LAM-PCR を行いクローナリティを調べる。
- (2) LAM-PCR で異なる 2 つの時点 (90 日以内) のサンプル間で遺伝子導入細胞の 20%以上のクローンが 2 倍以上の増加を認めた場合はオリゴクローナル、モノクローナル増加とみなし、次の検査を行う。
  - (i) リンパ球増加による臨床的評価
  - (ii) 血清学的検査
  - (iii) 末梢血検査—リンパ球増加, 白血球増加, 骨髓浸潤(血液減少)
- (3) 末梢血の免疫学的検査により異常クローンを含む細胞群の免疫学的表現系を同定する。モノクローナルな細胞群が検出されたら挿入部位の同定を行い、ベクター挿入と遺伝子発現異常との因果関係を検討する。
- (4) オリゴクローナル、モノクローナルな細胞集団が認められた場合、より頻繁にフォローを行う。少なくとも 2 年間の間

LAM-PCR を 90 日ごとに実施し、白血病発症の有無を追跡調査する。

- (5) 一生涯にわたり定期的にモニタリングを実施。

このような挿入部位のモニタリングはクローナリティの変化を調べることはできるが、患者の発症のリスクを予測、診断するものではないので他の臨床検査、血液学的検査も同時に行う必要がある。また治療施設にとっては負担が大きく、むしろ幹細胞遺伝子治療を実施した患者から定期的に採取した骨髓、血液サンプルを保存し、いつでもレトロスペクティブな分析が可能な状態にすることの方が大事ではないかという意見もある<sup>20)</sup>。

レトロウイルスベクターは染色体に遺伝子が組み込まれてはじめて遺伝子を発現して作用するものであることから、挿入変異はベクターの本質的な問題であるが、遺伝子治療の安全性を確保するためには挿入変異のリスクを可能な限り減らすことが重要である。挿入変異のリスクはベクターの用量、治療に用いる細胞数、細胞の種類、ベクターの種類、発現遺伝子、対象疾患に依存する<sup>16)</sup>。挿入変異による副作用発現のリスクを減らすには次のような方法が挙げられる<sup>16,22)</sup>。

- ①細胞あたりの遺伝子導入数の低減と患者に戻す遺伝子導入細胞の数の低減。

MOI が高いと望ましくない部位への挿入リスクが高まり、細胞数が多いと望ましくない部位に挿入された細胞が患者に投与される確率が高まる。しかし、これらの低減により治療効果が低下する可能性がある。

- ②安全性を高めた改良型ベクターの開発。

レトロウイルスベクターの 3'LTR のエンハンサー活性が問題となることからエンハンサーを除去した SIN ベクターの開発や、挿入変異が生じた場合にベクターを除去できるような機構を取り入れたベクターの開発。

これらはすぐにでも実現が可能と思われる。  
③安全な細胞だけを戻す方法の開発。

少量の幹細胞に遺伝子導入を行い、患者に戻す前に遺伝的解析を行い、あらかじめ問題のない部位に挿入された細胞だけを患者に戻すことができれば望ましい。しかし、現在の挿入部位を検出する方法では細胞が破壊されてしまうため、移植前に挿入部位を特定することは技術的に不可能である。

④ベクターの挿入機構の解明と望ましくない部位への挿入を回避できるベクターの開発。

⑤安全な挿入部位を明らかにし、これらの部位を標的としたベクターの開発。

これらを実現するには十分な基礎研究が必要である。また、あわせて前臨床段階でリスクを評価できる非臨床安全性試験法の開発、癌原遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化を高感度に測定する方法の開発が望まれる<sup>10)</sup>。ベクターの挿入部位の解析法は患者の細胞の挿入部位、クローナリティのモニタリングやベクターがどこに入りやすいかを検討するためにも重要な手段である。現在は C.1 でも触れた LAM-PCR 法<sup>9)</sup>がよく用いられている。この方法はレトロウイルスとゲノムの融合部位の配列を調べることが可能な方法で、PCR のバンドの数を解析することによりおおよそのクローナリティを知ることができるため、レトロウイルスベクターの挿入部位を検出するにはすぐれた方法であるが、かなり複雑なステップを含むため汎用性に向け、ベクターの導入効率の低い場合などには定量性にも欠けるという問題も指摘されている。最近、日本においてクローンの存在状態を反映するような遺伝子増幅が可能で LAM-PCR 法の改良法が開発されたと報告されている<sup>23)</sup>。このような評価技術の開発がより安全なベクターの開発、遺伝子治療の安全性確保には重要であると思われる。

とが報告されており<sup>11, 24, 25)</sup>、遺伝子を染色体に挿入することで機能するレンチウイルスベクター、AAV ベクターもレトロウイルスベクターと同様に挿入変異のリスクがあると考えられる。しかし、遺伝子治療により染色体に組み込まれた遺伝子からの長期的な遺伝子発現が得られることによるのみ根本的な治療が可能となる疾患もある。遺伝子治療のリスク・ベネフィットを見極め、疾患と治療遺伝子に対する理解を深め、各ベクターおよび導入遺伝子に固有のリスク要因を明らかにした上でベクターの改良や新たなベクターの開発を行うことが今後の遺伝子治療の安全性確保には重要であると思われる。

#### D. 結論

遺伝子治療に用いるウイルスベクターの品質・安全性確保に関する欧米の最新の動向について検討し、レンチウイルスベクターの品質・安全性確保において考慮すべき点を明らかにした。また、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について明らかにした。

#### 参考文献

- 1) Note for Guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products, CPMP/BWP/3088/99; <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/308899en.pdf>
- 2) ICH harmonized tripartite guideline, Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/quality/q5d/q5dstep4-e.pdf>
- 3) Miyoshi, H. et al.: Development of a self-inactivating lentivirus vector, *J. Virol.*, 72, 8150 (1998)
- 4) 三好裕之: レンチウイルスベクター-遺伝子治療の臨床応用に向けて-、医学のあゆみ、

- 203, 363 (2002)
- 5) M. Schmidt et al.: Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model, *Blood*, 100, 2737 (2002)
  - 6) M. Cavazzana-Calvo et al.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science*, 288, 669 (2000)
  - 7) S. Hacein-Bey-Abina et al.: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy, *N. Engl. J. Med.* 346, 1185 (2002)
  - 8) S. Hacein-Bey-Abina et al.: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science* 302, 415 (2003)
  - 9) Check E.: Cancer fears cast doubts on future of gene therapy, *Nature* 421, 678 (2003)
  - 10) Z. Li et al.: Murine Leukemia induced by retroviral gene marking, *Science* 296, 497 (2002)
  - 11) X. Wu et al.: Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration, *Science* 300, 1749 (2003)
  - 12) Baum C. et al.: Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells, *Blood*, 101, 2099 (2003)
  - 13) M. P. McCormack and T. H. Rabbitts: Activation of the T cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency, *N. Engl. J. Med.*, 350, 913 (2004)
  - 14) Utpal P. Dave et al.: Gene Therapy Insertional Mutagenesis Insights, *Science* 303, 333 (2004)
  - 15) J. Lyford: Gene Therapy 'caused T cell leukemia' Insertional mutagenesis pinpointed as cause of T cell leukemia in X-SCID gene therapy trial, *The Scientist*, Oct. 20 (2003)
  - 16) Report from the Ad hoc meeting of CPMP gene therapy expert group 26th-27th June (2003)  
<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/genetherapy/2288003en.pdf>
  - 17) FDA Biological Response Modifiers Advisory Committee Summary Minutes, Meeting #33, Oct. 10 (2002)  
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/minutes/3897m1.htm>
  - 18) FDA places temporarily halt on gene therapy trials using retroviral vectors in blood stem cells, FDA talk paper January 14, (2003)  
<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWER/S/2003/ANS01190.html>
  - 19) FDA Biological Response Modifiers Advisory Committee Summary Minutes, Meeting #34, Feb. 28 (2003)  
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/minutes/3924M2.htm>
  - 20) M. Cavazzana-Calvo et al.: The future of gene therapy-Balancing the risks and benefits of clinical trials. *Nature*, 427, 779 (2004)
  - 21) 88<sup>th</sup> Meeting of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), Dec.4-6 (2002)  
[http://www4.od.nih.gov/oba/rac/minutes/RAC\\_minutes\\_12-02.pdf](http://www4.od.nih.gov/oba/rac/minutes/RAC_minutes_12-02.pdf)
  - 22) D.A. Williams and C. Baum: Gene Therapy — new challenges ahead, *Science* 302, 400 (2003)
  - 23) 友野潤ら:レトロウイルスベクターによる幹細胞ゲノムへの遺伝子導入部位をクローム依存的にモニターができる改良型LAM-PCR法、2003年第62回日本癌学会要旨(2539PA)
  - 24) A. R.W. Schroder et al.: HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots, *Cell*, 110, 521 (2002)
  - 25) Nakai H et al.: AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice, *Nature genetics*, 34, 297 (2003)
- E. 健康危機情報  
なし
- F. 研究発表
1. 論文発表
    - 1) Ishii-Watabe1, A., Uchida, E., Iwata, A., Nagata, R., Satoh, K., Fan, K., Murata, M., Mizuguchi, H., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.: Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)
    - 2) 山口照英, 内田恵理子: 生物薬品のウイルス安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディ; 医薬品研究、34(12), 763-769 (2003)

- 3) Eriko Uchida, Koei Sato, Akiko Iwata, Akiko Ishii-Watabe, Hiroyuki Mizuguchi, Mikio Hikata, Mitsuhiro Murata, Teruhide Yamaguchi, and Takao Hayakawa: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, Biologicals, submitted

2. 学会発表

- 1) Akiko Ishii-Watabe, Eriko Uchida, Akiko Iwata, Kouei Sato, Kejun Fan, Mitsuhiro Murata, Hiroyuki Mizuguchi, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa ; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked in Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. 第9回遺伝子治療学会;2003年7月
- 2) 内田恵理子: 遺伝子治療薬に混入する可能性のある増殖性ウイルスの迅速・高感度検出法の開発. 第3回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム;2003年12月
- 3) 石井明子、内田恵理子、岩田明子、永田龍二、佐藤功栄、Kejun Fan、村田充弘、水口裕之、川崎ナナ、川西徹、山口照英、早川堯夫: アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発. 日本薬学会第124年会;2004年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products  
*Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use*

London, <XX month 200X>  
 CPMP/BWP/2458/03

**COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS  
 (CPMP)**

<DRAFT>

**POSITION STATEMENT ON DEVELOPMENT AND MANUFACTURE  
 OF LENTIVIRAL VECTORS**

<b>DISCUSSION IN BIOTECHNOLOGY WORKING PARTY</b>	March 2003 May 2003 June 2003
<b>DISCUSSION IN SAFETY WORKING PARTY</b>	June 2003
<b>DISCUSSION IN GTEG</b>	June 2003
<b>DISCUSSION IN BIOTECHNOLOGY WORKING PARTY</b>	July 2003
<b>TRANSMISSION TO CPMP</b>	September 2003
<b>RELEASE FOR CONSULTATION TO ICH EXPERTS</b>	September 2003
<b>DISCUSSION AT ICH 6 WORKSHOP ON GENE THERAPY IN OSAKA, JAPAN</b>	November 2003
<b>DISCUSSION IN THE &lt;WORKING PARTY&gt;</b>	
<b>TRANSMISSION TO CPMP</b>	
<b>ADOPTION BY CPMP</b>	

**Note:**



## INTRODUCTION

This position statement has been developed as a discussion document in advance of the ICH Workshop on Gene Therapy in November 2003.

Lentiviruses comprise a genus of the Retroviridae family. They include the human pathogens Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) and HIV-2. Replication incompetent vector particles derived from lentiviruses have been shown to mediate transfer and expression of heterologous genes (transgenes) into a variety of cells. Dissimilar to other retroviral vectors, in particular those derived from gammaretroviruses (formerly known as oncoretroviruses), lentiviral vectors (LV) can mediate gene transfer into non-dividing cells, e.g. stem cells, lymphocytes, dendritic and nerve cells. Thus, in addition to use in *ex-vivo* cell transduction LV could be useful for gene delivery *in vivo*. In addition, LV may allow for long-term transgene expression, as the transcript silencing observed with retroviral vectors (derived mainly from gammaretroviruses – here described as oncoretroviral vectors, OV) is less frequent with LV and as such may provide the means for long-term *in vivo* clinical management of chronic diseases. However, in common with OV, LV suffer a number of drawbacks as gene transfer vectors, including (i) limited insert size (8 kb) of the transgene and regulatory sequences, (ii) difficulty in producing high titres of stable vector particles, and (iii) probability of activating or inactivating an endogenous sequence in target cells that may be localised near the proviral DNA integration site, in some cases possibly associated with a risk of cancer development. Additionally, lentiviral genomes are more complex than those of the gammaretroviruses making design of LV a greater challenge.

Currently, in comparison with OV, gene transfer vectors derived from lentiviruses appear to raise greater specific quality, efficacy and safety concerns, particularly since one of the main foci for development of LV has been their derivation from HIV, a severe human pathogen. Major concerns regarding LV manufacture and clinical use are: (i) the potential generation of replication competent lentiviruses (RCL) during LV production, (ii) *in vivo* recombination with lentiviral polynucleotide sequences and (iii) insertional addition of proviral DNA in or close to active genes, which may trigger tumour initiation or promotion. Overall, the biohazards associated with the contamination of the LV with an RCL during production might be considered similar for all types of LV whilst the strategies for minimising such contaminations would be similar to those already in place for OV.

Many of the appropriate quality and safety requirements for retroviral vectors have been described in the current NfG on gene transfer vectors (NfG on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products, CPMP/BWP/3088/99). This position statement describes specific quality aspects that are relevant for LV, which are intended for *ex vivo* or *in vivo* application. It does not address specific efficacy and safety aspects of individual LV products.

## NATURE OF PARENTAL LENTIVIRUSES AND IMPACT ON LV DEVELOPMENT

The human primate lentiviruses HIV-1 and HIV-2 are severe human pathogens, which target CD4+ T lymphocytes and macrophages. Other primate and non-primate lentiviruses are severe pathogens in their respective permissive hosts, but are, based on existing knowledge, not thought to be infectious/pathogenic in humans. Both the restricted cell specificity of HIV and the inability of non-human lentiviruses to infect human cells may be overcome by replacement of the homologous viral envelope proteins by a gene encoding a heterologous viral envelope protein, conferring broad cell specificity. Although LV are designed to be replication-defective, there is concern about the potential generation of novel human pathogens from such vectors following clinical administration. However, for example, broad knowledge of HIV-induced pathogenicity has been generated and technical approaches to (i) design safe HIV-based LV and (ii) quantify HIV-based LV and detect potential recombination products are available. Nevertheless, perceived safety concerns (as above) on the clinical use of HIV-based LV have led to research and development of LV from suitable non-human primate- or non-primate-lentiviruses, some of which are considered non-pathogenic for humans according to current knowledge. Several candidates, including simian immunodeficiency viruses (SIV) from various monkey species, feline immunodeficiency virus (FIV), equine infectious anaemia virus (EIAV), caprine arthritis/encephalitis virus (CAEV) and bovine Jembrana disease virus have been identified; some are still under development, whereas SIV and EIAV vectors are available. The

genetic organisation of the non-primate lentiviruses is simpler than that of HIV-1; EIAV is the simplest known lentivirus. Although it is believed that non-human primate and non-primate-lentiviruses normally do not infect humans, the consequences of human infection with LV derived from them are unknown and thus safety concerns remain, particularly for the risks of horizontal and cross-species transmission of any mobilised, recombined chimaeric lentiviruses. Therefore, it remains controversial as to whether non-human primate- or non-primate-LV provide any greater safety benefits compared with HIV-based LV.

## **DESIGN OF LENTIVIRAL VECTORS**

It is evident that all possible means should be employed to reduce any pathogenicity associated with the wild-type lentivirus used as the basis for LV production and to minimise risks associated with LV. This is achieved by: 1. generation of “minimal lentiviral genomes” through elimination of dispensable lentiviral virulence/accessory genes; 2. separation of lentiviral genes/sequences essential for LV generation into appropriate constructs/cassettes that reduce to a minimum the possibility of RCL generation. Currently most LV manufacturing processes employ at least three plasmids: an envelope construct expressing a heterologous viral envelope protein, e.g. the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G), to replace the homologous lentiviral envelope protein and “pseudotype” LV particles; a helper construct encoding Gag and Pol viral proteins; a third construct harbouring the transgene, including the sequences needed for the production and packaging of active LV expression vector, commonly referred to as the transfer vector. In particular, sequence homologies between transfer and packaging (envelope and helper) constructs are minimised to prevent recombination. Concerning the transfer vector, the use of SIN (Self Inactivating) modifications in the 3’LTR to alleviate the concerns for vector DNA mobilisation and proto-oncogene activation by promoter insertion in target cells is to be encouraged. In particular, SIN modification of HIV-based LV is recommended to prevent vector DNA mobilisation and recombination with wild-type HIV. Additional modifications to improve safety such as splitting the packaging constructs into two separate components, strategies aiming at generating Rev-independent systems and replacement of retroviral polyadenylation signal by exogenous ones are recommended providing these changes do not affect vector performance or increase theoretical safety risks. Comprehensive *in vitro* and/or *in vivo* experiments to assess construct characteristics including risk of RCL generation will be needed.

## **LENTIVIRAL VECTOR MANUFACTURING STRATEGIES**

LV are produced either by transient co-transfection of a producer cell line with a combination of packaging and transfer vector constructs or by transfection and culture of suitable packaging cell lines containing one or more incorporated (inducible) packaging constructs required for LV particle generation with the transfer vector. To date, the first approach is the only one allowing the use of the most advanced combinations of constructs, including SIN transfer vectors. However, manufacturing by transient transfection limits the size of the production lot and thus may only provide sufficient quantities of LV for initial, limited clinical studies, most likely involving *ex vivo* transduction of cells. Production from stable packaging cell lines containing all necessary elements for LV propagation, i.e. similar to those in existence for OV production might increase LV yields. The requirements for the documentation of such cell lines, including full details of all incorporated sequences, and for their quality and safety as set out in the current NfG should be followed.

Where manufacturing strategies utilise constructs that encode heterologous viral envelope proteins, e.g. VSV-G, for pseudotyping LV particles, it should be investigated that such envelope gene sequences do not contaminate LV lots or provide pseudotyping for endogenous or adventitious viruses. Also, contamination of LV lots with Gag-Pol sequences should be minimised.

For the transient production by means of DNA co-transfection, construct DNAs to be used must be of high quality. The full sequence of the transfected plasmids and of the transfer vector packaged by the LV particles should be provided. The cell line used in the manufacturing should be in compliance with the guideline on cell substrate (Q5D). Where applicable, batch-to-batch consistency of LV lots should

be demonstrated (e.g., where sufficient accumulated analytical data from previous pilot batches used in clinical studies is available).

## **CHARACTERISATION AND CONTROL TESTING OF LV**

Any preparation of LV should be fully characterised with regard to transducing activity, vector particle numbers and the absence of RCL. Lot-release specifications should be based on appropriate tests undertaken for characterisation (see NfG). For LV produced by transient transfection, the maximal level of contamination by cellular and plasmid DNA in the final lot should be set. DNase treatment to remove DNA may have to be considered. This treatment would be essential where DNA derived from constructs encoding VSV-G, other envelope proteins, or Gag/Pol, contaminate the LV product.

An in-house reference lot should be established from a fully characterised production lot.

### ***Transducing activity***

Important aspects of transducing activity are integration capacity, transgene expression and functionality. Transducing activity should be correlated with all relevant LV characteristics, such as particle numbers, reverse transcriptase activity, Gag to envelope protein (or other protein) ratio.

#### **Integration capacity**

Integration capacity can be determined by demonstrating the incorporation of vector proviral DNA into target cells; it can be evaluated using limiting dilution techniques of transduced cells and NAT assay with probes targeted to the transgene, or to the packaging signal  $\psi$ , contained within the transfer vector DNA.

Such an assay requires standardised procedures, including specification of (1) LV titres for infection, (2) the cell line used for transduction, (3) cell culture conditions for transduction, (4) timing of PCR testing after transduction (5) quantitative estimation of the number of transduced cells and (6) a pseudotype-specific lentivirus reference reagent. Most LV pseudotyped with VSV-G infect a wide range of cell lines. It is recognised that cell lines e.g. HEK 293 which are widely used and characterised for the detection of pseudotyped retroviruses, including lentiviruses, might be of variable quality due to differing culturing conditions in different laboratories. This may affect standardisation of assays and thus consistency of results.

#### **Transgene functionality**

Quantification of LV-related transgene functionality is typically performed by measuring the concentration and functional activity of the expressed transgene product. Such assays require standardised procedures, including specification of (1) LV titres for infection, (2) the cell line used for transduction, (3) cell culture conditions for transduction, (4) timing of transgene product expression and other considerations as included under "Integration capacity".

### ***LV particle number determination***

Although a routine method for detection of retrovirions is negative staining electron microscopy, quantification of virion particles by this technique is difficult (due to particle plasticity and instability) and insensitive. However, no single alternative method can distinguish between full (RNA+) and empty (RNA-) particles, or envelope protein-positive and -negative particles, or infectious and non-infectious particles. The total number (full plus empty) of viral particles can be correlated with the content of Gag protein, which can be estimated using specific immunoassays. However, when using some lentiviral expression methods, Gag can be over-expressed and generate LV particles devoid of transducing activity. Nevertheless, where possible, the content of Gag protein should be assessed and correlated with other LV characteristics. For example, consistent data correlating Gag protein and transducing activity should be provided for each LV preparation. Typically, for lentiviruses, 1  $\mu\text{g}$  Gag is approximately equivalent to  $10^4$  particles. Alternatively, total particle number can be estimated by immunostaining of viral envelope or capsid proteins and visualising these by con-focal microscopy in

relation to a known concentration of fluorescent microspheres, although it is recognised that the technology involved is not yet routine.

As formation of incomplete LV particles lacking the envelope protein is observed, the proportion of incomplete particles should be determined.

To estimate the numbers of LV particles with vector RNA molecules, validated quantitative nucleic acid amplification technology (NAT) based assays should be used.

Determination of the level of reverse transcriptase (RTase) activity may be usefully correlated with other LV characteristics of the vector, in particular the number of particles and transduction efficiency. However, it is recognised that such determinations are not in themselves sufficient for LV lot characterisation.

### ***Testing for absence of RCL***

Despite current safeguards in LV production systems to eliminate the possibility of RCL generation, there remains a low risk of them contaminating LV lots and therefore appropriate tests should be applied to test for their presence.

The presence of RCL is indicated by lentiviral *gag/pol* sequences integrated into chromosomal DNA, which can be determined by several means. For example, following infection of a susceptible cell line with RCL and serial passaging of successive cell supernatants to achieve RCL amplification, quantitative real-time PCR can be used to detect integrated *gag/pol* specific nucleic acids. For HIV-1-based LV manufacture, any RCLs generated would only share the *gag* and *pol* genes with HIV-1. Detection of such RCLs could be based on HIV-1 Gag protein or *gag* gene sequences, for which there are well-validated and sensitive assays already available, e.g. p24 Gag immunocapture assay or *gag* RNA PCR assay, respectively. Alternatively PERT (product enhanced reverse transcriptase) assays, following RCL amplification involving several serial passages of a susceptible cell line, should be considered for RCL detection since they can detect reverse transcriptase activity from a range of sources.

As a further alternative, “marker rescue” assays could also be considered for detection and quantification of RCL.

In general, the limit of quantification required for RCL tests should be established according to the proposed LV dose and to the size of the production lot. Ideally, the capacity of tests to detect one RCL in a vector dose should be proven. However, the choice of a suitable, representative positive control or reference standard is critical for demonstrating the sensitivity of RCL assays.

Any RCL assay should be well characterised and include an appropriate positive control. However, for tests requiring cell infection the current lack of generic reference materials poses a challenge for assay calibration. Presently, it is considered undesirable to generate a lentivirus encoding VSV-G and Gag/Pol simply to monitor RCL infectivity assays, since such a virus could be pathogenic.

## **ONCOGENESIS**

Due to the wide distribution of proviral DNA insertion sites, the risk of oncogenesis due to insertional mutagenesis increases with the number of cells modified and with the number of insertions per cellular genome. While the integration capacity of LV lots may be assessed in suitable cell lines by NAT methods, identification of the sites in the human genome at which vector DNA integration occurs favouring active genes and local hotspots *in vivo* and their consequence would contribute to safety assurance. For example, monitoring the insertion sites in LV transduced cells during clinical studies could provide valuable information. For such investigations, retention of a small fraction of the LV transduced cells and the setting up of a library of integration sites by Alu-PCR should be considered. However, it is recognised that at present this is an area challenging current technical capabilities and knowledge.