

1. 概要

hAADC 発現組換えアデノ随伴ウイルス 2 型ベクター (AAV-hAADC-2) を作製した後、精製を行い医薬品グレードに近い製品として製造を行う。製造したベクターは無菌的に分注を行う。

2. 使用プラスミド DNA、細胞株および試薬

・トランスフェクションプラスミド DNA:

pAAV-hAADC-2

pRC-BI-khB342-2

pHelper

・組換えアデノ随伴ウイルスベクター調製細胞株:

HEK293T/17

・使用基本培地(HEK293T/17):

DMEM+10% FBS

DMEM (SIGMA, Code: D5796)

Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Cat.No 10099-141)

・ウイルス生産時使用培地(HEK293T/17):

DMEM+炭酸水素ナトリウム

DMEM (SIGMA, Code: D5796)

炭酸水素ナトリウム (和光純薬, Code 192-13805)

・細胞回収用バッファー(HEK293T/17):

エデト酸ナトリウム (和光純薬, Code: 044-29525)

・AAV-hAADC-2 抽出バッファー

クエン酸 (和光純薬, Code: 037-19185)

クエン酸ナトリウム (和光純薬, Code: 194-13245)

塩化ナトリウム (和光純薬, Code 193-13715)

・粗精製時使用試薬:

クエン酸 (和光純薬, Code: 037-19185)

トロメタモール (和光純薬, Code: 207-16045)

塩化マグネシウム・六水和物 (Merck, Code: 1.37008.5000)

マクロゴール 6000 (Merck, Code: 8.17007.5000)

HEPES (Merck, Code: 1101101000)

塩化ナトリウム (和光純薬, Code 193-13715)

エデト酸ナトリウム (和光純薬, Code: 044-29525)

・超遠心精製時使用試薬:

塩化セシウム (ナカライテスク, Code: 09661-35)

HEPES (Merck, Code: 1101101000)

塩化ナトリウム (和光純薬, Code 193-13715)

エデト酸ナトリウム (和光純薬, Code: 044-29525)

・TFF 時使用バッファー（最終置換バッファー）

PBS + 塩化ナトリウム + Poloxamer-188

PBS(-): (GIBCO, Code.10010-049)

塩化ナトリウム (和光純薬, Code 193-13715)

Poloxamer-188 (Merck, Code:1.37065.1000)

・PBS(-): (GIBCO, Code.10010-049)

・TrypLE 溶液 (GIBCO, Code.12563-011)

・Benzonase Nuclease HC, Purity >90% (Merck, Code: 71205-3)

3. 方法と結果

3-1. AAV-hAADC-2 の調製

calcium phosphate transfection 法を用いて、HEK293T/17 細胞に pAAV-hAADC, pRC-BI-khB342-2, pHelper を共導入し、AAV-hAADC-2 を調製した。方法は以下の通りである。

T225 フラスコ (CellBIND) 75 枚に 2×10^6 cells/T225 で HEK293T/17 細胞を播種し、約 72 時間培養した後、calcium phosphate transfection 法により、pAAV-hAADC, pRC-BI-khB342-2, pHelper を共導入した。DNA トランスフェクション開始から約 24 時間後にウイルス生産時使用培地に交換し、さらに培養を行った。DNA トランスフェクション開始から約 72 時間後に細胞回収用バッファーを添加して細胞をフラスコから剥離させ、細胞懸濁液を遠心しペレットの状態にした。ペレットは AAV-hAADC-2 抽出バッファーに再懸濁し -80℃ で一時保管した。後日溶解・ボルテックス処理し、遠心後の上清を「Cell Harvest」とした。

3-2. AAV-hAADC-2 の精製

精製工程では 1, 粗精製、2, 超遠心精製、3, TFF 膜によるバッファー交換、4, 濾過滅菌の 4 段階で精製を行った。方法は以下の通りである。

1, Cell Harvest にクエン酸溶液を加え、4℃ で静置した。その後遠心を行い、上清をトモメタモール溶液で中和、塩化マグネシウムおよび Benzonase 添加後 37℃、90 分処理を行った。処理後 4℃ で 1 晩保存し翌日マクロゴールにて PEG 沈殿を行った。沈殿は一晩再懸濁し翌日 Benzonase 添加後 37℃ 60 分処理を行った。処理後の溶液を遠心し、上清を 0.8/0.2μm フィルターでろ過し超遠心精製に用いた。2, ろ過後のサンプルは塩化セシウム溶液に重層した後、超遠心機で 32,000rpm, 20℃, 4 時間超遠心を行った。超遠心後超遠心チューブ下部より 0.2~0.5mL ずつ溶液を回収しそれぞれの屈折率値を測定し、1.3765~1.3710 までの画分を回収した。回収後のサンプルは TFF 時使用バッファーにて希釈し -80℃ で一時保存した。3, 超遠心精製後のサンプルを溶解し、TFF バッファーで希釈しながら分画分子量 100kDa の TFF 膜を循環させバッファー交換および濃縮を行った。濃縮後のサンプルは「Bulk Drug」として -80℃ で保存した。4, 「Bulk Drug」を溶解し、0.22mm 径の医療用フィルターを用いて濾過滅菌を行った。濾過後、200μL ずつ無菌的に 2mL クライオバイアルへと分注を行った。分注後のものを「Final Product」として納品物とした。

3-3. 精製 AAV-hAADC-2 のベクターゲノム濃度およびタンパク質純度測定

qPCR 法を用いて AAV-hAADC-2 Final Product のベクターゲノム濃度を測定したところ、 4.01×10^{12} vg/mL であった。SDS-PAGE／銀染色法を用いて AAV-hAADC-2 Final Product のタンパク質純度を測定した結果、ほぼウイルス由来と推定されるバンドのみが検出された。(添付データ 5-1)

4. 納品物／返却物

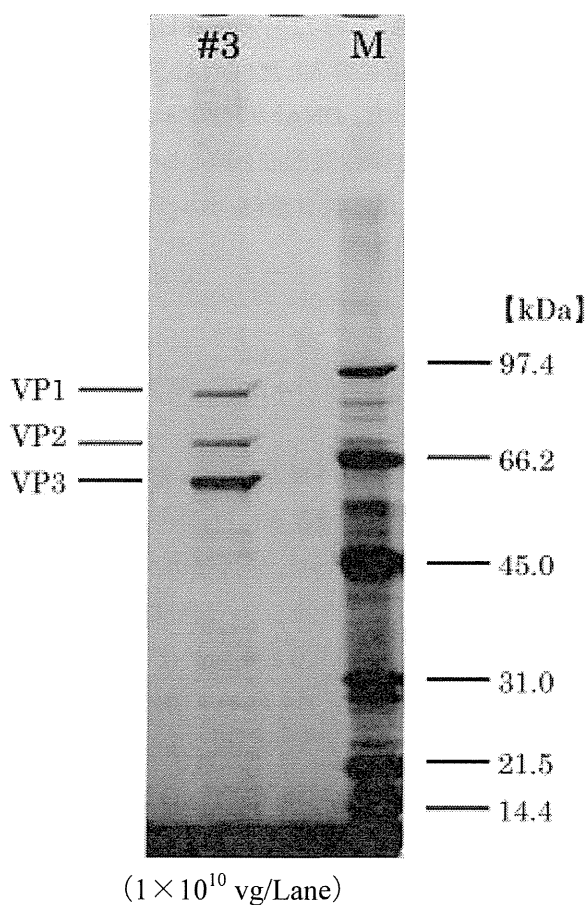
- ・本作業報告書 1 部
- ・AAV-hAADC-2 Final Product
Lot.試作製造#3

5. 添付データ

5-1. SDS-PAGE/銀染色結果

M:分子量マーカー

#3:AAV-hAADC-2 Final Product Lot.試作製造#3



以上

II. 分担研究報告

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究 GMP レベルベクターの作製と生物多様性評価

村松慎一

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

□

研究要旨

パーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床研究で使用したベクターと同様の発現カセットを搭載した GMP レベルのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製した。力価は 1.8×10^{12} vector genome/mL で、HEK293 細胞を使用したドパミン産生試験で基準を満たすドパミンの産生が確認された。また、遺伝子組換え生物の第一種使用における評価を行い、生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断した。

A. 研究目的

1. 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究で使用するアデノ随伴ウイルス 2 型（AAV2）由来のベクターを作製しその評価を行う。
2. 遺伝子組換え生物の第一種使用における生物多様性に対する影響を評価する。

36 時間後に $5 \mu\text{g/ml}$ の L-dopa を培地中に添加した。その 6 時間後に培地を回収しドパミンを HPLC により定量した。 1 nmol/ml 以上のドパミン産生を基準とした。

2. 第 1 種使用における生物学的多様性への影響を評価した。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療の実施計画は、厚生労働省の定める「遺伝子治療臨床研究に関する指針」にもとづき設置された、施設内の遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会で審査された。生物多様性評価は、施設内遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

B. 研究方法

1. 自治医科大学では 2007 年以降にパーキンソン病に対する遺伝子治療の臨床研究で実施した。その際に使用したベ AAV2 ベクターと同様の発現カセットを持つベクタープラスミドをタカラバイオ社に供給し GMP レベルの AAV ベクター (AAV-hAADC-2) を委託生産した。

受け入れ試験として、1) 変性の有無を確認する外観試験、2) ウイルスのゲノムコピー数の測定、3) AAV-hAADC-2 の生物学的活性を確かめるためのドパミン定量試験を実施した。外観試験は、融解後ベクター液の混濁の有無を肉眼で確認し、無色澄明であるとき適合とした。ゲノムコピー数の定量は、AAV-hAADC-2 作製時に使用するプラスミド pAAV-hAADC-2 を基準とし、AADC の特異的塩基配列プライマーを使用した定量的 PCR を実施し、 1.5×10^{12} vector genome (vg)/ml 以上を条件とした。ドパミン定量試験は、 10^5 個の HEK293 細胞に 10^8 vg の AAV-hAADC-2 を感染させ、

C. 研究結果

1. pAAV-hAADC-2 の発現カセットは、CMV プロモーター、 β -グロビンイントロン、ヒト AADC cDNA、ヒト成長ホルモン poly (A) で構成される。受け入れ試験の結果、外観は無色透明、力価は 1.8×10^{12} vg/mL、HEK293 細胞におけるドパミン産生は 22.8 nmole/ml であり、いずれも適合していた。タカラバイオ社において実施中の品質試験を別紙に示した。

2. AAV2 ベクターが感染する動植物等の種類は野生型 AAV2 と同等で、ほ乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。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。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ないかぎり、環境中で増殖することはない。ヒト体内の同一の細胞にベクターと野生型 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、ベクターはやがて環境中から消滅すると考えられる。極めて微量のベクター由来の replication-competent AAV (以下 RCA) 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、RCA は野生型 AAV2 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 AAV2 に極めて近い構造になると考えられる。RCA 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 AAV2 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、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。今回の臨床研究における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した。

D. 考察

1. 作製した GMP レベルベクターのドパミン産能を培養細胞で確認した。今回の計画では 1×10^{12} vg/ml のベクターを患児一人あたり 200 μ l 投与する予定であり、力価も基準を満たしていた。現在、マウスの脳内投与による安全性試験とタカラバイオ社における品質検定を実施している。

2. アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デペンドウイルス属に分類されている。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき 100 以上の型に分けられており、今回の遺伝子治療では 2 型 (AAV2) を宿主として作製する。AAV2 は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトへの病原性は知られていない。自治医科大学で実施したパーキン病の遺伝子治療では術後 4 日目以降、排泄

物中にベクターゲノムは検出されなかった。ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV2 ベクターを肝動脈に注入した臨床試験では、 4×10^{11} vg/kg 投与群の 1 名で 16 週までベクターゲノムが精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出されたと報告されている。そのため、臨床研究においては環境中への拡散に留意する必要があるが、今回の臨床研究における第一種使用等の方法によるかぎり、自然環境中でベクター由来のゲノムが生物多様性に影響を生ずるおそれはないと考えられる。

E. 結論

AADC 欠損症に対する遺伝子治療の臨床研究に使用する GMP グレード AAV ベクターを作製した。受け入れ試験の結果は基準をみたした。また、今回の臨床研究では生物学的多様性に影響しないと判断した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu S, Ozawa K, Yamada K and Nabeshima T: Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int JNP*, 16:1559-1567, 2013.
2. Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, Muramatsu S, Ichinose H and Hwu W-L: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-aminoacid decarboxylase deficiency. *Neurobiol Dis*, 52:177-190, 2013.
3. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S and Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, 3:1472, 2013.
4. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K and Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med*

Res Int, 2013;974819, 2013.

5. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S and Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-*ADAR2* delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med*, 5:1-10, 2013.
 6. Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S and Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. *Adv Pharmacol*, 68:273-84, 2013.
 7. Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of Shati/Nat8l, an *N*-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, in press.
 8. Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. *Clinical implications of fetal transplantation in Medicine* (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, London, 193-203, 2013.
 9. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 パーキンソン病と運動異常, 辻省次 壮編集, 高橋良輔 専門編集, 中山書店, 東京, 2013, pp384-391.
2. 学会発表
1. Muramatsu S: Gene therapy clinical trial update for AADC. *Cell and Gene Therapies for Inherited Metabolic Disease*, April 17, 2013, London.
 2. 村松慎一: パーキンソン病の AADC 遺伝子治療: 長期効果遺伝子発現の検証. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京.(プログラム p137)
 3. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
 4. Miyamoto Y, Iegaki N, Sumi K, Ishikawa Y, Furuta T, Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of shati/nat8l in the dorsal striatum affects emotional behaviors via dysfunction of serotonergic neuronal system in mice. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
 5. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of neurons in the primate brain using intrathecal injection of AAV vectors. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
 6. Iwashita Y, Tokuoka H, Munezane H, Muramatsu S and Ichinose H: Distinct regulation mechanism of the dopamine content in the striatum from that in the midbrain. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
 7. Nitta A, Ishikawa Y, Iegaki Y, Sumi K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Miyamoto Y: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in mice nucleus accumbens and dorsal striatum. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
 8. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread neuronal transduction in the primate brain via intrathecal administration of adeno-associated virus vectors. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 4, 2013, Okayama. (abstract p125)
 9. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Muramatsu S and Saido TC: Global and effective gene delivery of neprilysin to the brain via intravascular administration of AAV vector in alzheimer's disease mice. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 5, 2013, Okayama. (abstract p179)
 10. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治: 多系統萎縮症(NSA-P)の FMT-PET 解析. *Movement Disorder Society Japan 第 7 回学術集会*, 2013 年 10 月 11 日, 東京.(抄録集 p59)
 11. 村松慎一: Parkinson 病に対する遺伝子治療の現状と課題. 第 53 回日本定位・機能神経外科学会 シンポジウム, 2014 年 2 月 7 日, 大阪.(プログラム p63)
- H. 知的所有権の取得状況
- 該当なし

AAV-hAADC-2 の品質試験

1. 無菌試験

製造数が、100 容器以下であるとき、各培地に対して 10%、また 101 容器以上 500 容器以下であるとき、各培地に対して 10 容器を検体とする。検体を液状チオグリコール酸培地（TGC 培地）またはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）に接種し、TGC 培地は 30～35℃で、SCD 培地は 20～25℃で 14 日間培養し、菌の発育の有無を確認する。培養最終日に検体によって培地が混濁し判定が困難な場合、培養液を新しい培地に接種して、元の培地と共に 4 日間以上培養し、菌の発育の有無を確認する。

2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）

1) 培養法：

- ①マイコプラズマが増殖可能な寒天培地に WCB 破碎液を接種し、微好気的条件下で 35～37℃において 14 日間以上培養する。
 - ②マイコプラズマが増殖可能な液体培地に試料溶液を接種し、密栓して 35～37℃において 21 日間培養する。
 - ③試料溶液を接種した液体培地より、接種後 3±1 日目、7±1 日目、14±1 日目及び 20±1 日目に寒天培地上にその培地を接種し、これらを微好気的条件下 35～37℃で 14 日間（但し 20±1 日目に接種したものは 7 日間）以上培養する。
- ①から③について、マイコプラズマの生育の有無を調べる。

2) DNA 染色法：

WCB 破碎液を Vero 細胞に接種し、3 日間培養する。スライド付の培養容器に継代後、3-5 日間培養する。培養後、スライド上の培養細胞を固定して DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡にてマイコプラズマの存在を検鏡する。

3. In vitro ウイルス試験

検体を各指標細胞（MRC-5、Vero、NIH3T3）に接種後、36±2℃、5%炭酸ガス条件下で 28 日間培養し（期間中、必要に応じて継代を行う）、ウイルス特異的な細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察する。

培養 28 日目の細胞について、ヒト O 型、モルモット及びニワトリの混合赤血球に対する吸着反応の有無を試験する。

また、培養 28 日目の培養上清を用いて、ニワトリ、モルモット及びアカゲザルの各赤血球に対する凝集反応の有無を試験する。

4. ベクターゲノム濃度試験

ウイルスベクターゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からベクターゲノム濃度を換算する。

5. oriDNA 配列定量試験 (Q-PCR 法)

プラスミド DNA 配列に含まれる oriDNA 配列に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線から検体中に含まれる oriDNA 配列の濃度を換算する。

6. rcAAV 否定試験

検体を、E1/E3 欠損型アデノウイルスとともに、293 細胞に共感染させる。共感染後の細胞を継代して、ウイルス増幅を起こした後、PCR により、AAV 配列の増幅の有無を検出する。

7. セシウム残留試験

GC-MS 法により、セシウム濃度を測定する。

8. キャプシド率試験

微量分光光度計を用いて、紫外線吸光度 (260 nm 及び 280 nm) を測定する。280 nm 測定値に対する 260 nm 測定値の比率をキャプシド率の指標とする。

9. ヒトゲノム DNA 残留試験

ヒトゲノム DNA に特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、Ct 値を測定する。測定した Ct を元に標準プラスミド濃度と検量線を作成し、検量線からヒトゲノム DNA 濃度を換算する。

10. エンドトキシン試験

日本薬局方 一般試験法 エンドトキシン試験 カイネティック-比濁法の項により、エンドトキシン濃度を測定する。

11. 純度試験

電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により、タンパクを分子サイズで分離した後、銀染色を行なう。標準品と比較した純度を測定する。

12. 導入効率試験

検体を、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞の細胞膜を融解した後、抗

hAADC-2 抗体を用いた ELISA 法により、導入遺伝子の発現の有無を測定する。

13. 感染力価試験

検体を、野生型アデノウイルスとともに、HeLaRC32 細胞に共感染させる。共感染後の細胞から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、増殖の有無を定性的に測定する。

測定値をグラフ化し、TCID₅₀ とする。

14. 性状試験

性状を目視確認する。

15. pH 試験

pH 計を用いて、日本薬局方 pH 試験を実施する。

16. 浸透圧試験

浸透圧計を用いて、日本薬局方 浸透圧試験を実施する。

17. ウイルスベクター純度試験（電子顕微鏡）

ウイルス粒子とウイルスパーティクルのみの割合を電子顕微鏡法により確認する。

18. 塩基配列試験

塩基配列決定用シーケンスプライマーを用いて、シーケンス反応を行った後、反応産物を精製し、DNA シーケンサーで解析する。

19. ベンゾナーゼ残留試験

製造に使用したベンゾナーゼの残留量を、抗 Benzonase 抗体を用いた ELISA 法により測定する。

「ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素
(aromatic L-amino acid decarboxylase:AADC)
を発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイル
スベクター (AAV-hAADC-2)」

生物多様性影響評価書

自治医科大学附属病院

生物多様性影響評価書
(区分：遺伝子治療臨床研究)

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-hAADC-2（以下、本遺伝子組換え生物という）は、ヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素（aromatic L-amino acid decarboxylase：AADC）を発現する遺伝子組換え2型アデノ随伴ウイルスベクターである。

アデノ随伴ウイルス（AAV）はパルボウイルス科デPENDウイルス属に分類されている（文献1、2）。これまでに霊長類で分離されたウイルスは、血清型およびゲノムの違いに基づき100以上の型に分けられており（文献1、3、4）、本遺伝子組換え生物はAAV 2 型（AAV2）を宿主として作製された。

AAV2 は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトでは小児期に初感染が起こること、成人の約半数が中和抗体を有することが知られている（文献1）が、ヒトへの病原性は知られていない。

文献 1： Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed., Fields VIROLOGY 4th edition, pp.2327-2379, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2： Tijssen, P. ed., Handbook of Parvoviruses, Volume I, pp.11-30, CRC press, Boca Raton, FL (1990)

文献 3： Gao, G., et al., Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78: 6381-6387 (2004)

文献 4： Mori. S., et al., Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology 330: 375-383 (2004)

2 使用等の歴史及び現状

AAV2 を含めいかなる血清型も生ワクチン等に使用した報告はない。また、AAV2に由来する遺伝子組換えウイルスは遺伝子治療で汎用されている（IV 章参照）。

3 生理・生態学的特性（文献1、2）

(1) 基本的特性

AAVは約4.7 kb の線状1 本鎖DNAウイルスであり、エンベロープを持たず直径約26 nmの正二十面体構造のキャプシドを有している。

細胞膜の普遍的成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカンを認識して感染するため宿主域は広く、非分裂細胞にも導入が可能である。野生型 AAV は標的細胞に感染すると Rep が関

与して第 19 染色体長腕の AAVS1 領域に組み込まれることが知られているが、プラスミドベクターから作成した AAV はランダムに組み込まれる傾向にあり、アクティブな遺伝子領域に挿入されやすいとの報告がある(文献 5)。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染はするが、ウイルス粒子を構成するために必要なE1A、E1B、E2A、E4及びVA 遺伝子を有さず、自律的な増殖能を欠損したウイルスである。増殖にはこれらの遺伝子を供給する「ヘルパーウイルス」(アデノウイルス又はヘルペスウイルスなど)の存在が必要である。培養細胞でも同様に、rep及びcapを搭載した「アデノ随伴ウイルスヘルパープラスミド(AAVヘルパープラスミド)」及び、E2A、E4及びVAを発現する「アデノウイルスヘルパープラスミド(Adヘルパープラスミド)」を、E1A及びE1Bを発現するヒト胎児腎培養細胞(293T/17細胞)にコトランスフェクションした場合にのみ増殖が起こる。本ウイルスは物理化学的に比較的堅牢であり、常温においても比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

他の生物を捕食することはない。自然界では、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おける存在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があり得るとされる(文献1)。

(4) 繁殖又は増殖の様式

AAV2 は、ヒトに主に経気道ないし経口感染し、ヘルパーウイルスと同時に感染した場合に感染個体で増幅し、分泌物と一緒に排泄されて、ヘルパーウイルスと共に次の生物に感染する。ヘルパーウイルスが存在しない場合、AAV2 ゲノムは、扁桃・肺・脾臓などの組織において、2 本鎖環状DNA として存在し、まれに染色体に組み込まれる(文献6、7)。

(5) 病原性

AAV2 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。

(6) 有害物質の産生性

AAV2 の感染に際して細胞内に産生される蛋白質性の毒素等は報告されていない。

(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ていることから、不活化には85℃で数分の加熱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。

文献 5 : Nakai H., et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature Genetics* 34 :297-302 (2003)

文献 6 : Chen, C., et al., Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J. Virol.* 79: 14781-14792 (2005)

文献 7 : Schnepf, B., et al., Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79: 14793-14803 (2005)

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

AAV2 の両末端にあるITR (Inverted terminal repeat) の間の領域を供与核酸となる AAV-hAADC-2 (3,457bp) と置換した。AAV-hAADC-2 の全塩基配列を別紙1に示した。

AAV-hAADC-2 は AAV2 にヒト芳香族Lアミノ酸脱炭酸酵素 human aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) の発現カセットを挿入したものであり、その構成成分は以下のとおりである。

1) サイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー (CMV Pr)

塩基番号139から797の659 bp の配列である。hAADC 遺伝子を転写する。

2) ヒト β グロビンイントロン

塩基番号805から1,296の492 bp の配列である。cDNA からの発現レベルを増加させる。

3) ヒトAADC遺伝子 (hAADC)

塩基番号1,331から3,307の1,443 bp の配列であり、hAADC (EC 4.1.1.28) をコードする。発現産物のhAADCはL-dopaをドパミンに、5-HTP (5-hydroxytryptophan) をセロトニンに脱炭酸化する酵素である。アミノ酸配列を別紙2に示した。

4) ヒト成長ホルモンのpoly A 付加シグナル (hGH poly(A))

塩基番号2,829から3,307の479 bp の配列である。CMVプロモーターにより開始された転写が終了する。

5) 人工配列

塩基番号 131 から 138、798 から 1,004、1,298 から 1,330、2,774 から 2,828 及び 3,308 から 3,338 の配列である。これらは制限酵素認識サイトを含むクローニングサイト及びその周辺配列であり、131 から 138 及び 3308 から 3338 の配列には制限酵素 Not I 切断サイトを有する。

AAV-hAADC-2の構造模式図を別紙3に示した。

2 ベクターに関する情報

(空欄)

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の調製に使用するpAAV-hAADC-2、pRC-BI-khB342-2 及びpHelper の3種類のプラスミドの構成を別紙4 に記載した。

pAAV-hAADC-2 はCMV の転写制御下にあるhAADC 遺伝子を含む。pRC-BI-khB342-2は、AAV2 ゲノムのうち、ウイルス固有の蛋白質であるRep（複製と増殖に関与する）及びVP（キャプシドを形成する）をコードする領域（4,229 bp）を含むAAVヘルパープラスミドである。pHelperは、2 型アデノウイルスのE2A、E4及びVARNA遺伝子を含むAdヘルパープラスミドである。いずれもAmpicilin 耐性遺伝子を有している。（2）宿主内に移入された核酸の移入方法

pAAV-hAADC-2 は、AAV2 の末端反復配列ITR 配列の間に、CMV Pr、 β グロビンイントロン、hAADC、hGH poly(A)からなる発現カセットを制限酵素Not I を使用して挿入し作製した。pRC-BI-khB342-2 は、AAV2 のゲノムDNA からITR を削除してAAV2 のrep 遺伝子及びcap 遺伝子をクローニングし、更に、SnaBI サイトにヒトBcl-XL 遺伝子及びhsa-miR342 を発現するカセットを挿入した。なお、rep遺伝子のp5プロモーターはTATA boxを破壊し、rep、cap遺伝子のポリA配列の下流に移動させている。pHelperは、アデノウイルス2 型のE2A、E4、VARNA 遺伝子をクローニングして構築した（別紙4）。構築したpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2のそれぞれを大腸菌DH5 α に導入して形質転換し、アンピシリン耐性株のグリセロールストックを作製して、MWCBとした。各プラスミドベクター溶液は、MWCB を培養して菌体を集め、溶菌後、ゲル濾過クロマトグラフィー及び2種類のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にて濃縮後、0.22 μ m フィルターで濾過して作製した。得られたpAAV-hAADC-2、pHelper 及びpRC-BI-khB342-2 を共に、リン酸カルシウム法によってヒト胎児腎細胞（293T/17 細胞）に導入し、本遺伝子組換え生物を得た（別紙5）。

（3）遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換え生物は、293T/17生産細胞から抽出及び粗精製処理後、セシウム密度勾配超遠心により精製し、更に、タンジェンシャルフロー膜濃縮にてバッファー置換後、0.22 μ m フィルターで濾過して、クライオバイアルにて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

プラスミドの製造及び品質試験並びに本遺伝子組換え生物の製造及び品質試験は、タカラバイオ株式会社草津事業所（滋賀県草津市野路東七丁目2番62号）の細胞・遺伝子治療センターにおいて、GMP 基準に従って実施した（各バンク及び本遺伝子組換え生物の品質管理試験の詳細は別紙6及び別紙7）。本遺伝子組換え生物は、自治医科大学附属病院本館1 階臨床用細胞調製室（P2レベル）にて受け入れ、同室内のディープフリーザーに施錠の上、保管する（当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙8）。

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

移入した核酸は本遺伝子組換え生物の1 本鎖DNA ゲノムの一部としてAAV のITR に挟まれて存在し、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8）。

細胞に感染するとAAV-hAADC-2 のゲノムは核内に移行して2 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9、10、11）。この2本鎖DNAとなったものからhAADC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。hAADC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。一般に神経細胞は非分裂細胞であるので長期的な発現が期待される。

本遺伝子組換え生物を293T/17細胞で作製する過程でpRC-BI-khB342-2とpAAV-hAADC-2が非相同組換えを起こして増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下RCAとする）を生ずる可能性は否定できない。しかしそのRCAはパッケージできるサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っていると考えられる。さらにこのRCAも野生型のAAVと同様にAAVのヘルパーウイルスであるアデノウイルスや単純ヘルペスウイルス等がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

文献 8: Xu R. et al., Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. Med. Sci. Monit. 11: 305–308 (2005)

文献 9: Yan, Z., et al., Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J. Virol. 79: 364–379 (2005)

文献 10: Schnepf, B., et al, Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J. Virol. 77: 3495–3504 (2005)

文献 11: Grimm, D., et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. J Virol 80: 426–439 (2006)

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は宿主のAAV2に存在しないhAADC遺伝子を含むので、hAADC遺伝子DNAの一部をPCRで増幅、定量する方法により検出される。このときに用いるPCR反応では試料1 μ l中に12コピーのAAV-hAADC-2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。

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AAV2と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違がある。

- ・本遺伝子組換え生物は発現プロモーターの下流にhAADC遺伝子を持つため、本遺伝子組換え生物が感染した細胞はhAADCを発現する。
- ・本遺伝子組換え生物はウイルスDNAの複製やAAV粒子の形成に必要なrep及びcap遺伝子を欠失しているため、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でなければ増殖は起こらない。

・本遺伝子組換え生物はヘルパーウイルスを介さずにプラスミドベクターを用いて製造するが、ヒトに感染してもほとんどがエピソードとして核内に留まり、稀に、細胞のゲノムにランダムに組み込まれる。

・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（文献11）。

本遺伝子組換え生物由来のRCA は、本遺伝子組換え生物作製時、rep及びcap 遺伝子をもつpRC-BI-khB342-2とhAADC 遺伝子をもつpAAV-hAADC-2 の間での遺伝子組換えにより生じる可能性がある。ウイルスゲノムの複製に必須なITR とRep、及び細胞向性（cell tropism）を規定するキャプシドは野生型と同一であるので、遺伝子組換え生物に該当するものも含め、RCA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RCA が生じる可能性は否定できないが、供与核酸がベクター内の野生型AAV 由来の生物多様性に影響を与える因子に関与する可能性は低い（文献9、10、11）。

AAV-hAADC-2 は細胞に感染すると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存在する。

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

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、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

治療施設の所在地：栃木県下野市薬師寺 3311 番地1

治療施設の名称：自治医科大学附属病院

(1) 本遺伝子組換え生物の溶液は、スクリュウキャップ付き密閉容器に封入されており、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の実験室内の冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態の 本遺伝子組換え生物の溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の安全キャビネット内で行う。本遺伝子組換え生物希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、本遺伝子組換え生物希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の区域に運搬する場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(3) 本遺伝子組換え生物（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、本施設で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。

(4) P2 実験室内の安全キャビネット内で本遺伝子組換え生物希釈溶液を専用のシリンジ、チューブ及びカニューレからなるデバイスに充填し、それを専用のシリンジポンプに装着したもの（以下「注入セット」という。）を二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない手術室（以下「手術室」という。）に運搬する。なお、手術室は手術室区域の端に位置し、本遺伝子組換え生物投与当日は手術室で他の手術を行わない。

(5) 被験者に対する本遺伝子組換え生物の投与は、手術室内において、両側の被殻の中に本遺伝子組換え生物希釈溶液を定位脳手術により注入することで行う。

注入セットを定位脳手術装置に慎重に装着した後、被験者の頭蓋骨に開けた直径約12mmの骨孔からカニューレを刺入して、シリンジポンプにより本遺伝子組換え生物希釈溶液を被殻内の2方向へ3 μ l/minの速度で注入する。注入終了後は、カニューレをそのままの位置で約3分間保持した後、遅い速度で抜去する。特に、脳表からの抜去は、毎分約3mmの速度で慎重に行う。先端を先細り構造にしたカニューレを用いることにより、カニューレ先端からの本遺伝子組換え生物希釈溶液の漏出及び抜去中の本遺伝子組換え生物希釈溶液のエアゾール化を防止する。カニューレ抜去後、被験者の創部を速やかに一時的に閉創する。もう一方の被殻への注入も、これと同様に行う。なお、頭部の周辺には布を二重に敷き詰める。

(6) 被験者へ本遺伝子組換え生物投与終了後、被験者の創部を消毒し、真皮に至る創傷用の皮膚欠損用創傷被覆材を貼付して密閉してから、さらに三角巾で覆う。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を手術室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。

(7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具及び布、ガーゼ類は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却）を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、当該手術室は、術後12時間は閉鎖する。その後、床を紫外線照射し、さらに4級アンモニウム塩配合洗剤で液拭きして滅菌する。

(8) 投与後72時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に手術室及び個室から外の開放系区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。

(9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物等（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。これらのウイルス不活化を他の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、本遺伝子組換え生物の溶液の取扱いに準じる。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理又は焼却による。）を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。これらのウイルス不活化を他の

区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の血液及び尿中の本遺伝子組換え生物が陰性であることを確認する。本遺伝子組換え生物が確認されたときは、個室における管理を継続する。

(12) 個室における管理解除後に被験者の血液又は尿中から本遺伝子組換え生物が検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。

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RCA の出現の有無については、被験者への投与後、適切な時期に血液及び尿を用いてPCR 法にて検査し、連続した2回の検査結果が陰性であることを確認する。

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

遺伝子組換えウイルス投与後の被験者についてはPCR 法にて血液、尿中の遺伝子組換えウイルスが連続した2回の検査において検出されなくなるまで追跡する。

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

ラット及びサルのパーキンソン病モデルに対して脳内へAAV-hAADC-2 の注入を行った前臨床試験では、明らかな毒性は認められていない（文献12、13、14、15、16、17、18、19）。また、血液中でAAV-hAADC-2 は検出されていない。

文献 12： Fan, D. S., et al., Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and atomatic L-amino acid decarboxylase genes using two separete adeno-associated virus vectors. Hum. Gene Ther. 9: 2527-2535 (1998)

文献 13： Shen, Y., et al., Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson' s disease. Hum. Gene Ther. 11: 1509-1519 (2000)

文献 14： Muramatsu, S., et al., Behavioral recovery in a primate model of Parkinson' s disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Hum. Gene Ther. 13: 345-354 (2002)

文献 15： Sanftner, M. L., et al., AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: Evaluation of an infusion device and delivery parameters. Experimental Neurology 194 476 - 483 (2005)

- 文献 16: Cunningham, J., et al., Biodistribution of Adeno-associated Virus Type-2 in Nonhuman Primates after Convection-enhanced Delivery to Brain. *Molecular Therapy* vol. 16 no. 7, 1267-1275 (2008)
- 文献 17: Daadi, M. M. et al., Distribution of AAV2-hAADC-transduced cells after 3 years in Parkinsonian monkeys. *NEUROREPORT* Vol 17 No 2 201-204 (2006)
- 文献 18: Fiandaca, S. M., et al. Real-time MR imaging of adeno-associated viral vector delivery to the primate brain. *Neuroimage* 47(Suppl 2): T27-T35 (2009)
- 文献 19: Sebastian W. S., et al. Safety and Tolerability of Magnetic Resonance Imaging-Guided Convection-Enhanced Delivery of AAV2-hAADC with a Novel Delivery Platform in Nonhuman Primate Striatum. *HUMAN GENE THERAPY* 23:210-217 (2012)

6 国外における使用等により得られた情報

1999 年に承認され、米国ペンシルバニア大学で実施された第 I 相臨床試験（血友病 B に対するヒト凝固第 IX 因子を搭載する組換え遺伝子 AAV の骨格筋内投与による治療）において 8 名の患者に AAV に由来する遺伝子組換えウイルスを骨格筋に投与した結果、尿中への遺伝子組換えウイルスの排出は注入後 2 日目以降では検出されなかった（文献 20）。

一方、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV を肝動脈に注入した臨床試験では、 8×10^{10} vg/kg 2 名、 4×10^{11} vg/kg 3 名、 2×10^{12} vg/kg 2 名の合計 7 名において、術後 2 日目以降にも血清中にベクターゲノムが検出され、そのうち 2×10^{12} vg/kg を投与した 1 名では 14 週まで陽性であった。また、 4×10^{11} vg/kg 投与群の 1 名では、16 週まで精液中に検出され、別の 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出された（文献 21）。

本研究で用いるウイルス量は血友病の場合に比べておよそ 100 分の 1 以下であり、しかも脳内への投与であるため遺伝子組換えウイルスの環境への排出はより少ないものと考えられる。

また、本研究と同じ目的遺伝子を搭載した AAV ベクターを同じ経路で投与した第 I 相臨床試験が米国で実施されている。2008 年、カルフォルニア大学ローレンス・バークレイ国立研究所より、AAV-hAADC ベクターをパーキンソン患者の両側後方被殻に注入した第 I 相臨床試験結果が報告された。60 から 67 歳の男女 5 人に総量 9×10^{10} のベクターゲノムを投与したところ、1 か月及び 6 か月後に、6-[18F]フルオロ-L-mチロシン (FMT) の取込みが 30% 向上し、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。引き続き、総量 3×10^{11} のベクターゲノムが男女 5 人に注入され、FMT 取込みは 75% 増加したが、ベクターに関連する有害事象は認められなかった。その後、最長、4 年以上にわたり脳内での遺伝子の発現が観察され、若干の運動機能悪化などの 4 件の有害事象が報告されたが、ベクターの異常増殖による有害事象は認められていない（文献 22、23、24）。

文献 20: Manno, C. S., et al., AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle