

令和 6 年 7 月 4 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
理事長 藤原 康 弘 殿

科 学 委 員 会
委員長 富田 泰 輔

科学委員会では、今般、下記について科学的見地からの議論をまとめました。
独立行政法人医薬品医療機器総合機構における通常業務にご活用ください。

記

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発における留意事項
— *in vivo* CAR-T の開発など

以 上

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発における留意事項
-- *in vivo* CAR-T の開発など

目次

1. 総論	2
1.1. 背景	2
1.2. 報告書が扱う範囲	2
1.3. 標的特異性	2
1.4. 用語の定義	3
2. 遺伝子治療用ベクター／モダリティごとの標的特異性付与戦略	3
2.1. レンチウイルス（LV）ベクター	3
2.2. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター	4
2.3. アデノウイルス（AdV）ベクター	4
2.4. mRNA、DNA	4
3. 注目事例の開発動向	5
3.1. CAR-T	5
3.2. 造血幹細胞遺伝子治療	6
3.3. 抗悪性腫瘍（CAR-T 以外）	6
3.4. 再生医療	7
3.5. ゲノム編集（上記以外）	7
4. 臨床試験開始における留意事項	8
4.1. 特性解析と品質管理	8
4.2. 非臨床試験	9
4.2.1. 生体内分布評価	9
4.2.2. 非臨床薬理評価（効力を裏付けるための評価）	10
4.2.3. 非臨床安全性評価	10
4.2.3.1. 発現産物に起因する毒性	10
4.2.3.2. 発現産物に起因しない毒性	11
4.2.3.3. 遺伝子組み込み評価	11
4.3. 臨床試験計画策定にあたり考慮すべき事項	11
4.3.1. ベクター毒性	11
4.3.2. がん化のリスク	12
4.3.3. 生殖系細胞への組み込みリスク	13
4.3.4. 免疫原性	13
4.3.5. 標的外細胞改変の可能性と、改変された場合の安全性評価	13
4.3.6. 過剰な薬理作用	13
5. まとめ	14

1. 総論

1.1. 背景

近年、遺伝子治療製品の開発が急速に進み、承認品目も増えつつある (1)。遺伝子治療には、大きく分けてウイルスベクターや非ウイルスベクターを直接患者に投与する *in vivo* 遺伝子治療と、組織や細胞を体外に取り出して遺伝子導入／改変操作を施してから患者に投与する *ex vivo* 遺伝子治療がある。著明な効果を挙げている *in vivo* 遺伝子治療の例がアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる先天性黒内障 (Leber 病) や脊髄性筋萎縮症 (SMA) の治療である。 *Ex vivo* 遺伝子治療としては、B 細胞系悪性腫瘍に対するキメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T) 療法が著効を示している。しかし CAR-T は、製造に多大のリソース (設備、物品、人手) を要するという問題点があり、*in vivo* 遺伝子治療で CAR-T を作る試みが進んでいる。今後、この流れはさらに広がり、*ex vivo* 遺伝子治療から *in vivo* 遺伝子治療への切り替えが模索されていくであろう (2)。

ベクターの直接投与により *ex vivo* 遺伝子治療と同等以上の有効性及び安全性を得るためには、標的とする細胞／組織に局限して治療用遺伝子や遺伝子改変ツールを送達し発現させるための高い標的特異性が必要であり、その評価、特に安全性について、開発側と規制側が基本的な考え方を共有しておくことは有意義だと考えられる。そこで、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の科学委員会では、この課題について専門部会を設けて検討することとした。対象となる読者は、遺伝子治療用製品の開発者 (企業)、ベクター等の開発研究者 (企業・アカデミア)、及び規制当局の審査員などである。

1.2. 報告書が扱う範囲

本報告書では、*ex vivo* 遺伝子治療から *in vivo* 遺伝子治療へ発展させていくなど、これまで以上の標的特異性を必要とする *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発について考察する。一方で、*in vivo* 遺伝子治療として既に確立された技術やその延長上にあるもの、例えば腫瘍や実質臓器への局所投与による標的化や、腫瘍特異的な感染・増殖が作用機序の基本である腫瘍溶解性ウイルスなど、現行の規制で対応できていると考えられるものについては、必要に応じて指針や文献を挙げるに留める。

その上で、本専門部会が重視する主な安全性上の懸念は二つある。第一はゲノム組み込み型ベクターやゲノム編集操作による宿主ゲノムの永続的変化に伴うリスクである。特に、遺伝子改変された細胞が生殖細胞であった場合は、その影響が世代を越えて及ぶため、格別の配慮が必要と考えられる。第二の懸念は、重篤な全身的副反応である。特にこれまで全身投与に用いられてこなかったウイルスベクター (レトロウイルス・レンチウイルス) の大量全身投与を行う場合の安全性確保をどうするか、十分な検討が求められる。

1.3. 標的特異性

「標的特異性」の付与については、大きく 3 つの段階に分けて考えられる。一つ目は細胞表面分子に対するベクターの親和性に基づくもので、「(細胞／組織) 指向性」と呼び変えてもよい。ウイルスベクターでは、エンベロープやカプシドと細胞表面受容体との相互作用として研究され

てきたが、その組織特異性は必ずしも高くない。非ウイルス性のモダリティである mRNA やプラスミド DNA などについては、組み合わされる脂質ナノ粒子 (LNP) などナノキャリアが担う薬物送達システム (DDS) が指向性を左右する。二つ目は、細胞内トラフィッキングやウイルスの生活環に応じた宿主因子の利用であるが、その実態について十分な知見は得られていない。三つ目は発現レベルの調節、すなわち組織特異的プロモーター／エンハンサーなどの転写調節、転写後翻訳調節や RNA 干渉などを利用した組織特異的発現調節などである。この報告書では、ベクター／モダリティごとに、細胞／組織指向性付与を主体に、必要により発現制御との組み合わせで議論を進める。

1.4. 用語の定義

ベクター：本報告書では、遺伝子導入／改変ツールを総称して遺伝子治療用ベクターと呼ぶ。ウイルスベクターには、レトロウイルス (RV)、レンチウイルス (LV)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、アデノウイルス (AdV) などに由来するものがある。非ウイルスベクターとしては、プラスミド、mRNA のほか、以下に定義する LNP を含むナノキャリアなどを含む。

ナノキャリア：薬物 (DNA、RNA、蛋白質、低分子化合物を含む) と複合体を形成し、目的組織に送達するミクロンサイズ以下の担体を総称する。高分子／脂質／無機ナノ粒子、リポソーム、ナノチューブ、ナノ複合体、ニオソームなどが含まれる。

LNP (脂質ナノ粒子)：ナノキャリアの一種で、脂質を主成分とする直径 10-1000 nm の粒子。現在 mRNA の送達に使われている LNP は、pH 感受性脂質 (イオン化脂質)、ポリエチレングリコール修飾脂質、ヘルパー脂質 (リン脂質、コレステロール) から構成されている。

2. 遺伝子治療用ベクター／モダリティごとの標的特異性付与戦略

この章では、標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用ベクターとして現在主に研究されている LV ベクター、AAV ベクター、AdV ベクター、mRNA、DNA について、その特徴と標的特異性付与戦略を記載する。

2.1. レンチウイルス (LV) ベクター

レトロウイルスの一群に属する LV に由来するベクターは、導入遺伝子を細胞のゲノムに安定的に組み込むため、幹細胞遺伝子治療のように生涯にわたり目的遺伝子の機能が持続することが期待される場合に適している。LV 粒子は数種類の蛋白質を包埋する脂質二重膜エンベロープに包まれており、エンベロープ蛋白質を他のウイルスのものと入れ替えたり (擬似タイピング、シェードタイプ化)、改変したりすることにより感染指向性が変化する (3)。標的特異性の高い LV ベクターを開発するために、シンドビスウイルス (4) や麻疹ウイルス (5) などのウイルス由来膜蛋白質をベースとし、標的となる受容体に結合する抗体の単鎖可変領域フラグメント (scFv) やアンキリンリピート蛋白質 (DARPin) などの配列を組み込むのが一般的である (3, 6, 7)。抗体が認識する細胞表面抗原としては、造血幹細胞 (HSC) マーカーである CD133 (8)、HSC・血管内皮細胞マーカーである CD105 (9, 10)、T 細胞マーカーである CD8 (11) や CD4 (12) が報告されている。

LV ベクターの発現段階での調節としては、標的細胞でのみ活性化する組織特異的プロモーターを使用する方法と、標的細胞以外で発現するマイクロ RNA (miRNA) の標的配列を付加して、標的外の細胞での遺伝子発現を抑制する方法がある (13)。

2.2. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

AAV の粒子は 1 本鎖 DNA ウイルスゲノムとこれを包むカプシドからなり、エンベロープを持たない。感染後、ベクターゲノムは宿主ゲノムに組み込まれずエピソードとして核内に存在する。AAV ベクターの細胞／組織指向性はカプシドと宿主受容体との親和性で決定され、カプシドのアミノ酸配列によって異なる組織指向性を示す。自然界には 100 以上の AAV 血清型が存在しているが、そのバリエーションだけで限局的な細胞／組織指向性を得ることは困難であり、カプシドの表面に任意のペプチド配列を付加したり、scFv、DARPin を挿入したりすることで高い標的特異性を付与した AAV ベクターが開発されている。最近では、バイオインフォマティクスと計算ツールを応用した *in silico* カプシド工学が注目を集めている (14)。

導入遺伝子の発現調節には組織特異的プロモーター／エンハンサーが用いられるが、AAV ベクターにはゲノムサイズ制限があるため、最適化の工夫が必要である。

2.3. アデノウイルス (AdV) ベクター

AdV は 2 本鎖 DNA ゲノムを持つ非エンベロープウイルスで、血清型 5 (Ad5) などカプシドのアミノ酸配列が異なる 100 以上の血清型が知られている。感染指向性を決定するのは粒子から突出したファイバー・ノブと細胞表面受容体の親和性で、自然分離株の探索やファイバー・ノブの改変が続けられてきた。たとえば、HSC で高発現する CD46 を受容体とする血清型 35 (Ad35) やデスモグレイン 2 (DSG2) を受容体とする血清型 3 (Ad3) のファイバー・ノブ配列を利用して HSC への遺伝子導入が可能になった (15 - 19)。最近では、複数の改変によって HSC への指向性をさらに高めた AdV ベクターが開発され、注目されている (20)。その他、ファイバーにインテグリン結合 RGD モチーフを挿入した上で B 細胞特異的プロモーターを用いたり (21)、Ad5 のノブと T 細胞上の分子 (CD3、CD28、interleukin (IL) -2 受容体) を橋渡しするアダプターを用いて選択性を持たせたりする試みもある (22)。

AdV は AAV に比べて免疫原性が高く、投与後のサイトカイン・ストームによる死亡例もあって大量全身投与には向かないと考えられてきたが (23)、標的特異性の向上がさらに進めば、投与量を減らしつつ治療効果を得ることが可能になると期待される。AdV ベクターは搭載できる遺伝子サイズが大きく、組織特異的プロモーター／エンハンサーによる発現制御を組み合わせやすいという利点も有する。

2.4. mRNA、DNA

mRNA は、severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ワクチンの成功によって、最近特に注目を集めている遺伝子導入モダリティである。同様に蛋白質産生を目的とする非ウイルスベクターである DNA が細胞核への送達を必要とするのに対し、細胞質で直接翻訳される mRNA は核への送達が不要なため、特に非分裂細胞で DNA に比べて高発現が期待でき、さら

にゲノム挿入変異のリスクもない。一方、mRNA は体内で分解されやすいため発現持続時間が短く、化学的に不安定なため保存安定性が低い。そのため、mRNA と組み合わせられる DDS は、mRNA の保護と標的細胞／組織への送達という二つの役割を持ち、mRNA ワクチンでは、ほぼ全ての開発例で LNP が用いられた (24)。LNP は細胞膜に含まれる脂質を主材料とすることで mRNA の細胞取り込みを促進して高い導入効率を発揮するのに加え、免疫反応を誘導するアジュバントとしても機能する。一方、脂質を用いない他の DDS (例えば合成高分子をベースとするナノキャリア) も開発が行われており、特に治療用 mRNA 医薬品への応用が期待される。

細胞／組織指向性に関して、標的によっては既に化成品や核酸医薬の DDS として承認されているものも使えるだけでなく (25)、低分子から高分子まで様々な分子を包埋することが可能で自由度が高いため、今後の展開が期待される。ウイルスベクターと同様に scFv や DARPins を利用するほか (26-28)、LNP の脂質組成を調整して肺・脾臓・肝臓への指向性を高める研究や (29, 30)、多種のナノキャリアの生体内分布をハイスループット解析して求める指向性を有するものを選択する方法の開発も行われている (31)。

蛋白質発現レベルで標的特異性を付与する戦略として、DNA はウイルスベクターと同様、組織特異的プロモーター／エンハンサーによる転写レベルの調節と miRNA による翻訳レベルの調節が可能である。一方 mRNA で可能なのは翻訳レベルでの制御のみであるが、その効率・汎用性は DNA 以上に注目されている。mRNA の細胞選択的翻訳制御の手法として、i) 細胞特異的な miRNA 活性の利用 (32 - 34)、ii) 細胞特異的に転写されている RNA と投与した mRNA との相補鎖形成 (35, 36)、iii) 細胞特異的に発現している蛋白質と投与 mRNA との相互作用の利用 (37 - 39)、iv) 細胞特異的な蛋白質分解機構の利用などが報告されている (40)。

3. 注目事例の開発動向

3.1. CAR-T

遺伝子治療用ベクターの直接投与により体内で CAR-T を作る研究が多数報告されており、非臨床段階では活性のある CAR-T の体内製造に成功している (26, 41)。既に CD19-CAR-T の *ex vivo* 遺伝子治療で用いられている LV をベースとした研究が最も多く (42 - 47)、最近では、小動物のみならず霊長類を使った企業の非臨床試験の成果も報告されている (48, 49)。さらに、AAV ベクター (47, 50)、DNA (27)、mRNA を用いた *in vivo* CAR-T の非臨床研究も行われている (51, 52, 53)。注目すべきは、これまでの主な対象疾患であった血液系の悪性腫瘍に加え、心疾患なども治療標的として考慮されるようになってきたことである (53)。(表 1)

表 1. *In vivo* CAR-T 非臨床研究 ((26)より抜粋改変)

プラットフォーム	標的細胞への結合	標的細胞の受容体	参考文献
LV ベクター	抗体, DARPins	CD3, CD4, CD7, CD8	42 - 49
AAV ベクター	DARPins	CD4, CD8	47, 50
DNA/ナノキャリア mRNA/ナノキャリア	抗体	CD3, CD8	27, 51, 52

mRNA/LNP	抗体	CD5	53
----------	----	-----	----

3.2. 造血幹細胞遺伝子治療

HSC は生涯にわたって全ての血球を産生する細胞であり、これを遺伝子修復することができれば、様々な遺伝性疾患に対して 1 回の治療で永続的な治療効果を得ることが可能となる。現在までの臨床試験で、HSC を対象とした遺伝子治療に成功しているのは全て *ex vivo* 遺伝子治療であるが (54)、CAR-T 療法と同様ないしそれ以上のリソースを必要とする。

HSC 遺伝子治療ツールの *in vivo* 送達手段は、主にウイルスベクターと mRNA/LNP の 2 種類である。ウイルスベクターは LNP より免疫原性が高いが、遺伝子導入の効率・安定性は優れており、AdV ベクターによる遺伝子送達法の開発が最も進んでいる。2.3.で紹介した CD46 に吸着する Ad35 のカプシド改良に加え、ベクターからの prime editor の発現と薬剤選択による鎌状赤血球症モデルマウスの *in vivo* での治療が報告された (19)。最近、さらに HSC 特異的遺伝子導入効率の高い AdV ベクターの報告があり、注目されている (20)。AdV ベクターは免疫原性が高いため、基本的に投与できるのは 1 回と考えられている。LV ベクターについては *in vivo* での検討に至っておらず (55)、免疫原性に関するデータも限られている。

非ウイルスベクターである mRNA/LNP は免疫原性が比較的低く、複数回投与が可能であるという利点があり、HSC の *in vivo* ゲノム編集についても報告されている (56, 57)。HSC へ遺伝子治療ツールを送達するためには、特異的に発現する細胞表面マーカーの抗体を用いるのが一般的である。

3.3. 抗悪性腫瘍 (CAR-T 以外)

CAR-T 以外で悪性腫瘍に対する *in vivo* 遺伝子治療用製品として開発が進められている事例として腫瘍溶解性ウイルス (OV) があげられる。ベースとなるウイルスとしては、AdV、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルスが多く用いられている (58)。OV には、自然分離されたウイルスを弱毒化したものと、腫瘍特異的なプロモーターの利用等によりウイルスが腫瘍でのみ複製し正常細胞では増殖しないように遺伝子改変されたものがある。すなわち、OV は当初から、ある程度は非標的細胞にも感染する可能性を念頭に置いた上で安全性と有効性を確保するように設計されており、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) からこれに沿った見解 (「腫瘍溶解性ウイルス」 (59) 及び「生殖細胞への意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」 (60))。以下、「ICH 見解：腫瘍溶解性ウイルス」及び「ICH 見解：生殖細胞への組み込みリスク」が発出されている。OV の投与経路は腫瘍内投与が主であるが、静脈内投与も 1/4 近くを占める。AdV やワクシニアウイルスは腫瘍内投与が主で、静脈内投与のプロトコールも散見される。レオウイルス、ニューカッスル病ウイルスは主に静脈内投与で用いられている (58)。静脈内投与の場合、腫瘍に到達するための様々な物理的バリアに加え、親ウイルスの自然感染や過去の OV 投与により生ずる中和抗体が問題となる (61)。

OV の標的特異性をさらに高めるベクター側の改良としては、2.2.-2.3.で述べたカプシド改変による細胞指向性変更や、指向性進化法による腫瘍特異的増殖力の増大 (62) などが挙げられる。一方、全身投与された OV の腫瘍標的への送達を促進する投与法の工夫として、血管構築の正常

化 (63)、腫瘍灌流圧の調整 (64)、超音波や磁気など物理的機器の使用、キャリア細胞の併用などがある (65)。本委員会では、このような改良も含め、OV 開発については上記 ICH 見解など既存のガイドラインで当面の対応が可能だと考えている。

3.4. 再生医療

再生医療は遺伝子治療の応用分野の 1 つとして、かねてより注目されている。組織再生は本質的に局所での現象であり、投与遺伝子の標的指向性が強く求められる。そのため、遺伝子治療用ベクターの全身投与による再生医療への応用はほとんど報告が無く、標的部位・組織に対する局所投与が中心であった。一方、サイトカインや成長因子などの徐放を目的としたウイルスベクターの局所投与は古くより検討されてきたが (66)、ウイルスベクターの引き起こす免疫反応が投与部位のみならず遠隔部位の組織再生にも悪影響を及ぼす場合があるなど (67)、安全かつ有効な再生医療実現にはまだ課題が多い。

一方、mRNA は DNA と異なりゲノムへの挿入変異リスクが無いなど安全性で優れており、局所投与による再生医療への応用が検討されている。臨床試験事例としては、虚血性心疾患に対する血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA の心筋投与によって投与部位での有意な血管再生効果が得られている (68)。前臨床段階のものとしては、骨形成蛋白質 (BMP-2) mRNA を用いた骨再生 (69)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNA を用いた脳虚血疾患の神経保護療法 (70) などがある。さらに、mRNA は転写因子など細胞内で働く因子を発現させることも可能なため、標的細胞のシグナル制御により組織再生を促す研究も行われている。基礎研究としてはダイレクトリプログラミングへの応用 (71)、臨床応用に向けては、我が国で軟骨誘導性転写因子 mRNA の関節内投与による変形性関節症治療の前臨床試験が進められている (72)。再生医療領域での mRNA 投与に共通する特徴として、ワクチンで一般的に用いられる LNP は使われておらず、naked mRNA の形で、あるいはコラーゲンや高分子ベースの DDS が用いられている。LNP によって惹起される免疫反応が、組織再生には障害となることが示唆されているためである。

3.5. ゲノム編集 (上記以外)

ゲノム編集ツールには、大きく分けて zinc finger nuclease (ZFN) や transcription activator-like effector nuclease (TALEN) などの配列特異的人工エンドヌクレアーゼと、配列認識を RNA が行う clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR-associated (Cas) endonuclease (CRIPR/Cas) システムの 2 系統がある。ZFN や TALEN の場合には、これらをコードする DNA/mRNA を各標的組織に送達する。これまでは標的に合った指向性をもつ血清型の AAV ベクターが用いられることが多かったが、LNP に組織特異性を持たせて mRNA を送達する試みも次第に増えてきている。一方、CRISPR/Cas に由来するツールの場合は、DNA 切断蛋白質である Cas もしくはそれをコードする遺伝子と、Cas を標的 DNA 配列にリクルートするガイド RNA (gRNA) とを別々の分子として送達する。Cas やそれから派生した塩基編集、プライム編集などは、遺伝子サイズが AAV のパッケージング限界を越える場合があるため、遺伝子を分割して別々の AAV ベクターで導入し再構成する必要がある。LNP を用いる場合には、Cas の mRNA と gRNA とを同時に LNP に封入する。さらに、AAV や mRNA ではなく、Cas 蛋白質と gRNA の複

合体を LV ベースのウイルス様粒子などを用いて送達する試みも行われている (73, 74)。

既に臨床に応用されている例として、肝臓指向性の高い LNP を用いた *in vivo* ゲノム編集治療の第一相試験の結果が報告されている (75)。この LNP は既に核酸医薬の DDS として承認されているもので (25)、それ自体に細胞特異的リガンドは含まれていないが、静脈内投与されると血中の apolipoprotein E と効率よく結合し、肝実質細胞表面に高発現している low-density lipoprotein (LDL) 受容体を介したエンドサイトーシスで取り込まれ、LNP に内包された Cas mRNA と gRNA の働きで肝臓の transthyretin 遺伝子を破壊して効果的にアミロイド沈着を軽減した。同様に、肝臓を標的とした *in vivo* 塩基編集として、高コレステロール血症患者に対する PCSK9 遺伝子改変の第一相試験中間報告では、アデニン塩基編集ツールをコードする mRNA と PCSK9 遺伝子を標的とする gRNA が封入された LNP の投与後、用量依存的に LDL コレステロール値低下が観察された (76)。PCSK9 の塩基編集については、標的指向性を向上させるために *N*-アセチルガラクトサミンを表面に持つ LNP に変更し、アシアロ糖蛋白質受容体を介して肝実質細胞に特異的に取り込ませる臨床試験も開始されている。

4. 臨床試験開始における留意事項

4.1. 特性解析と品質管理

治験開始にあたって品質面の一般的な原則として、開発する遺伝子治療用製品の重要な品質特性 (CQA) の理解が重要である。特に、非臨床試験及び臨床試験における有効性／安全性の評価が妥当であることを説明するためには、非臨床試験で用いる被験製品、臨床試験で用いる治験製品及び市販される遺伝子治療用製品の間の品質上の一貫性の説明を可能とするだけの特性解析の情報を得ておく必要がある。さらに、高い標的特異性を付与する *in vivo* 遺伝子治療用製品については、その特異性に関連する CQA (標的特異性関連 CQA) についても、開発初期から意識して情報を収集し特定に努める必要がある。一般的な遺伝子治療用製品の品質管理については「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(以下、「遺伝子治療用製品等の指針」) に記載されているが (77)、本項においては、本報告書で焦点を当てた高い標的特異性付与に伴う品質管理の論点について述べる。

本製品は高い標的特異性によって、目的とする局所 (細胞／組織) へ送達／導入させることにより、有効性を発揮するための必要投与量の減量・最適化、投与量の低減に伴う安全性に係るハザードの軽減等を期待して開発することが想定される。開発者は高い標的特異性を付加することの科学的な作用機序や高い特異性を付加する意義を説明できる必要がある。標的特異性は有効性及び安全性に直結するため、細胞／組織特異性に関連する品質特性は標的特異性関連 CQA となる可能性が高い。前述の通り、CQA の一貫性は非臨床試験や臨床試験の評価に当たって極めて重要と考えられるため、標的特異性関連 CQA の管理についても、通常の遺伝子治療用製品で求められる品質管理に加えて、開発初期から厳密に行う必要がある。

例えば、薬効を示す物質に標的特異性を付加する修飾 (標的細胞特異的な抗体の結合や目的細胞の受容体に結合するリガンドの結合) を行った場合は、付加の割合や修飾による標的分子への結合能などを標的特異性関連 CQA として評価・管理する必要がある。LNP のような粒子に薬効を示す物質を包含する場合は、LNP を構成する脂質の種類や割合、LNP の表面に結合させた抗

体等の量、薬効を示す物質（核酸を含む）の粒子への包含率などが標的特異性関連 CQA となるであろう。また、*in vitro* 試験によって、特異性が期待される細胞種での遺伝子発現や局在すべきではない細胞への遺伝子導入や遺伝子改変がないことを確認する試験なども考えられ、この点も安全性を踏まえた重要な特性となるであろう。

治験開始に当たっては、その時点で既知である全ての CQA を含む品質特性を把握した上で、品質管理における標的特異性関連 CQA の許容幅についても検討する必要がある。つまり、標的特異性の低下で想定されるハザード（有効性の低下、対象外の細胞での遺伝子発現による影響、生殖細胞への組み込み等）を特定した上で、ベクターの種類、投与経路、投与量等を勘案し最終的なリスクを評価し、どこまでの幅が許容されるかを検討する必要がある。評価においては非臨床試験の結果も参考となる可能性が高い。なお、上市される最終製品の規格幅は臨床試験の結果も踏まえて最終判断される。

モデル動物などが利用可能である場合は、非臨床試験によって可能な限り想定される標的特異性が生体内で機能することを確認しておくことが望ましい。しかしながら、異種動物を用いた標的特異性の評価結果は種によって異なる可能性があり、ヒトにおける影響を非臨床試験で評価することには限界がある場合も多い。そのような場合は、ヒトの細胞や組織を用いて *in vitro* で標的特異性を解析する必要がある。例えば、ヒトの特定の臓器への特異性が期待される場合は、多くの種類の細胞を網羅した細胞パネルなどを用いて、期待される臓器への局在性や局在してはならない臓器へ局在しないことを評価するなどが考えられる。

また品質特性評価における標的特異性の解析手法として、i) 定量的 PCR/逆転写-定量的 PCR (qPCR/RT-qPCR) を用いたベクター遺伝子の検出、ii) 抗原抗体反応（免疫染色、ELISA など）によるベクターからの遺伝子発現産物の検出などが行われている。さらに、iii) 蛍光蛋白質等を組込んで発現を評価するために作成されたベクターを用いることも可能かもしれない。qPCR/RT-qPCR による解析の感度は高いと考えられるが、mRNA のように細胞内での半減期が短いモデルティに対しては感度が低下する可能性がある。上記 2.4. で挙げた細胞特異的な miRNA (32 - 34)、細胞特異的な転写産物、細胞特異的に発現している蛋白質 (37 - 39) などを対照とした解析を組み合わせることも有用であろう。

4.2. 非臨床試験

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品を用いた臨床試験を実施する際には、それまでに得られた品質に関する情報に加えて、有効性及び安全性の観点から、以下の非臨床試験における評価が重要になる。

4.2.1. 生体内分布評価

In vivo 遺伝子治療用製品を用いた生体内分布試験では、標的とする器官、組織及び細胞だけでなく、それ以外への分布も評価できるため、標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の有効性と安全性を評価する上で重要な情報が得られる。

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発では、これまで *in vivo* 遺伝子治療に利用されなかった RV ベクターや LV ベクターなどのゲノム組み込み型ウイルスベクターも用いられる

ケースが考えられる。このようにゲノム組み込みリスクが高い遺伝子治療用製品の全身曝露が想定される場合には、ICH 見解：生殖細胞への組み込みリスク（60）に準じて、生殖細胞への意図しない遺伝子組み込み及び改変リスクを慎重に評価する必要がある。同様のリスク評価は、全身投与するゲノム編集製品の開発においても必要である。

また、標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の生体内分布試験の立案にあたっては、従来の *in vivo* 遺伝子治療用製品と同様に、遺伝子治療用製品等の指針（77）及び「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方」（以下、「ICH-S12」）（78）が参考になる。しかしながら、標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品では、ヒトの標的細胞のみに結合する場合も想定される。その場合には、ヒト組織パネルやヒト蛋白質を発現させた細胞等を用いた組織交差反応試験を利用することが考えられる。また、非臨床薬理試験や非臨床安全性試験がモデル動物などを用いて行われる場合には、これらの試験成績を解釈する上で、被験動物種の相同遺伝子を搭載した製品を用いて生体内分布を評価することも有用と考えられる。なお、当該評価は必ずしも独立した試験として実施する必要はなく、有効性については非臨床薬理試験、安全性については毒性試験の中で評価することも可能と考えられる。

4.2.2. 非臨床薬理評価（効力を裏付けるための評価）

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の非臨床薬理試験については、遺伝子治療用製品の指針（77）を参考に、当該製品を用いた臨床試験実施の適切性を有効性の観点から判断する目的で実施する必要がある。*In vivo* 非臨床薬理試験に用いる動物種を選択する際には、後述する非臨床安全性試験と同様に、可能な限りヒトと同様の標的特異性を有すること、及び遺伝子治療用製品の発現産物がヒトと同様の生物活性を惹起することが重要である。これらの条件を満たすことが困難である場合には、標的特異性を優先して動物種を選択し、被験動物種の相同遺伝子を搭載した製品を用いて検討することが推奨される。また、*in vivo* 遺伝子治療用製品の標的特異性を評価する上では、副次的薬理作用（期待した治療標的に関連しない被験物質の薬力学的作用）の情報も有用と考えられる。

4.2.3. 非臨床安全性評価

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品であっても完全な標的特異性を期待することは困難であることから、標的特異的発現だけでなく標的外細胞／組織で発現する「発現産物に起因する毒性」の評価が必要であり、さらに、従来の *in vivo* 遺伝子治療用製品と同様に、「発現産物に起因しない毒性」についても評価する必要がある。

4.2.3.1. 発現産物に起因する毒性

In vivo 遺伝子治療用製品の発現産物に起因する毒性評価は、遺伝子治療用製品の指針（77）を参考に、ヒトで期待される薬理学的作用を示すと考えられる動物種 1 種を用いる必要がある。さらに標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品では、導入遺伝子がヒトで標的とする細胞／組織で発現し、その発現産物が生物活性を発揮する動物を用いて評価することが望ましい。しかしながら、標的特異性に関するヒトと動物との種差を考慮すると、適切な動物種を選択することが

困難な場合も想定される。このような場合には、標的細胞や発現産物の生物学的な特性等の様々な情報を踏まえてヒトでのリスクを見積もる方策（weight of evidence アプローチ）によって、標的特異的な発現産物に起因する毒性を評価することが推奨される。このような方策を実施した上で、ヒトでのリスクを見積もるために追加の非臨床安全性試験成績が必要な場合には、被験動物種の相同遺伝子や遺伝子組換え動物（トランスジェニック動物など）を用いた非臨床安全性試験を行うことも考えられるが、その必要性については、規制当局との協議により合意を得ておくことが推奨される。

4.2.3.2. 発現産物に起因しない毒性

標的特異性を有する *in vivo* 遺伝子治療用製品の発現産物に起因しない毒性評価は、ヒトでの安全性が明らかでない化学物質が含まれるかどうかによって、その方策が異なる。当該製品（例えば、LNP 等）にヒトでの安全性が確認されていない化学物質（新規の脂質等）を利用する場合には、その化学物質の安全性を確認するために、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（以下、「ICH-M3」）（79）に準じた非臨床安全性試験（例えば、2 種の動物種を用いた一般毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験等）を検討する必要がある。一方、そのような成分を含まない製品での発現産物に起因しない毒性は、任意の 1 種類の動物種を用いた一般毒性試験の中で、発現産物に起因する毒性と合わせて評価可能と考えられる。

4.2.3.3. 遺伝子組み込み評価

従来の *in vivo* 遺伝子治療用製品の開発では、ゲノムへの組み込みによる発がんや次世代影響のリスクを懸念して、全身曝露を伴うヒトへの組み込み型ウイルスベクターの静脈内投与等は避けられてきたが、今後は、標的特異性を付与して意図しない細胞／組織（例えば、生殖細胞）への影響を可能な限り低減化した上で、組み込み型ウイルスベクターの全身投与が検討される可能性も考えられる。そこで、そのような製品の開発においては、従来の *in vivo* 遺伝子治療用製品や *in vivo* ゲノム編集製品の考え方と同様に、遺伝子治療用製品の指針（77）や「ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療製品等の品質・安全性等の考慮事項に関する報告書」（80）に加え、特に生殖細胞への影響を評価するために ICH 見解：生殖細胞への組み込みリスク（60）も参考にしてより詳細に評価する必要がある。そこでは、生体内分布評価やヒトでの推定血中曝露量等を踏まえて、生殖細胞への組み込みリスクを見積もることが重要である。その結果、ヒト生殖細胞への組み込みリスクが懸念される場合には、リスク・ベネフィットを慎重に検討する。その上で、臨床試験を実施する場合は、その管理手順、インフォームドコンセント、並びに適切な注意喚起などの方策を講じて患者に対するリスク軽減に努めなければならない。

4.3. 臨床試験計画策定にあたり考慮すべき事項

4.3.1. ベクター毒性

これまで全身投与された遺伝子治療用ベクターとしては、AAV ベクターの臨床経験が最も蓄積されており、肝臓、腎臓、心臓、肺の障害等による死亡例や重篤な有害事象が報告されている（81

- 84)。その中で最も多く認められる有害事象は肝障害で、SMA 患者や X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー患者ではそれぞれ 4 例の死亡が報告されている (81-84)。肝毒性の原因としては、肝臓が全身に投与された AAV ベクターの受け皿になるため、高ベクター負荷により肝ストレスや免疫反応が生じるなど複数の要因が考えられ (84, 85)、用量が大きい場合はコルチコステロイド投与等の肝毒性予防対策が必須となる (86)。次に、重篤な有害事象として血栓性微小血管症 (TMA) があり、SMA 患者 1 例が死亡したほか (87)、多様な疾患 (Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD)、ファブリー病、ダノン病、メチルマロン酸血症) でも観察されている。TMA は内皮細胞の障害により微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、腎障害、微小血栓症などをきたす疾患で、補体系の活性化が病態増悪の一因であるため、抗補体療法 (C5 阻害薬のエクリズマブやラブリズマブなど) や血液透析は治療に有効な戦略である。なお、ミニ/マイクロジストロフィン遺伝子治療を受けた DMD 患者で心臓毒性が観察されたが、治療用遺伝子産物が非自己と認識されて起こった細胞性免疫反応が原因と示唆されている (88)。その他、AdV ベクターの高用量全身投与後に見られたサイトカイン・ストーム (23) は、他のウイルスベクターでも起こる可能性があるため注意が必要である。ヒトでの重篤な神経毒性は知られていないが、AAV9 ベクターの非臨床試験において、カニクイザルへの髄腔内投与後に脊髄後根神経節における炎症性単核細胞浸潤、神経細胞壊死・消失が報告されていることもあり (89)、血液脳関門を通過しやすいベクターについては、投与量増大につれてリスクが生ずる可能性を考慮する必要がある。

これまで主に *ex vivo* 遺伝子治療で用いられてきた RV/LV ベクターについては、ヒトへの全身投与の経験がほとんどないため、*in vivo* 遺伝子治療に用いる場合には、投与量の検討や投与後モニタリングの実施など、慎重に進める必要がある。

一方、mRNA/LNP については、COVID-19 ワクチンとして全世界で累計数十億回以上の筋肉内投与がなされた。主な副反応は接種後の炎症反応 (接種部位の疼痛・腫脹、発熱・悪寒、疲労、筋肉痛・関節痛、悪心・嘔吐、下痢など) であり (90)、LNP の脂質成分に対する反応が主となっていると考えられる (91)。また、頻度は低いものの心筋炎・心膜炎 (92)、重篤になり得るものとしてアナフィラキシー反応も起こり得る。mRNA/LNP の全身投与はゲノム編集用途や遺伝性難治疾患に対して臨床試験が行われており (75, 76, 93)、参考になる。LNP の点滴静注は、核酸医薬の投与方法として用いられており、重大な副作用として *infusion reaction* や房室ブロックなどがある (94)。その他の副作用として mRNA/LNP ワクチン投与後に見られる一般・全身障害や胃腸障害などが起こりうる。非臨床試験では肝毒性や肺障害も報告されているため、これらにも留意して臨床試験を行う必要がある (95, 96)。LNP と一部成分が重なるものとして「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」も発出されており (97)、品質・非臨床の留意事項と併せて参考になる。

4.3.2. がん化のリスク

ベクターのゲノム挿入によるがん化 (挿入発がん) のリスクは、組み込み型である RV/LV 由来のベクターについては広く認識され、警告が促されてきたが、最近、米国食品医薬品局 (FDA) が改めて CAR-T 療法における二次性悪性腫瘍発生の調査を行った (98)。発生頻度はかなり低く、CAR-T 治療については対象疾患の性質や先行治療による影響も考えられるが、T 細胞性悪性腫瘍

の発生リスクについて改めて添付文書での警告が求められた。

AAV ベクターは基本的に非組み込み型であるが、新生仔マウスへの投与による肝細胞がんの発症を契機に、AAV ベクターのゲノム挿入に起因する可能性が指摘された (99 - 103)。AAV のゲノム挿入はヒトでも確認されているが、これまでにがん化は確認されていない (104, 105)。一方、ゲノム編集でゲノム DNA の二本鎖切断により DNA が損傷を受けると AAV ベクターが切断部位に高頻度で組み込まれることが報告されており (106)、AAV ベクターを用いたゲノム編集では挿入変異のリスクが上がるのが懸念される。これまで AAV についてはそれほど長期のフォローアップは求められてこなかったが、ゲノム編集など永続的影響を残すものについては、ゲノム非組み込み型ベクターを *in vivo* 投与する場合も組み込み型ベクター並みの長期追跡が求められる。

4.3.3. 生殖系細胞への組み込みリスク

高い標的指向性を持つベクターを用いる *in vivo* 遺伝子治療であっても、原則は非臨床生体内分布試験で、目的とする細胞や組織だけでなく目的としない部位への分布も評価しておくべきである。その結果、生殖組織への分布が認められた場合には、ICH 見解：生殖細胞への組み込みリスク (60) を参考に、生殖細胞の遺伝子改変のリスクについて評価することが求められる。その上で、リスクに応じて物理的避妊などの遺伝子改変が子孫に伝播しない対策を講じる必要がある。

4.3.4. 免疫原性

ベクター毒性 (4.3.1.) で述べた自然免疫応答に加え、カプシド、ゲノム、導入遺伝子発現産物に対する獲得免疫応答による重篤な有害事象を防止／低減するための対応が求められる (83, 104, 107)。投与前には、患者側背景因子であるカプシドに対する抗体や T 細胞応答、ヒト白血球抗原 (HLA) 型や補体関連遺伝子変異のスクリーニングなどを考慮する。投与後については、現在の AAV 遺伝子治療プロトコールにおいて標準となっている全身的なコルチコステロイド療法をベースに、獲得免疫の B 細胞／抗体や T 細胞を標的とする抗 CD20 モノクローナル抗体、mTOR 阻害薬などが選択肢となる。

4.3.5. 標的外細胞改変の可能性と、改変された場合の安全性評価

標的外細胞の遺伝子導入／改変の可能性と、その細胞／組織における治療用遺伝子の発現によるリスクについては、B 細胞系腫瘍への CD19-CAR 遺伝子導入の例が報告されている (108)。原則としては、非臨床生体内分布評価を参考にしつつ、どのような標的外組織／細胞が改変されるか、その細胞／組織で治療用遺伝子が発現するかを評価し、起こり得る副作用について製品の特성에応じて検討する。

4.3.6. 過剰な薬理作用

目的とする製品の過剰な薬理作用による有害事象として代表的なものが CAR-T 投与によるサイトカイン放出症候群 (CRS) と中枢神経毒性である。CRS は、CAR の標的である B 細胞腫瘍の認識をきっかけに CAR-T がマクロファージなどと共に過剰な炎症性サイトカインを産生することで発症する全身反応であり (109, 110)、発熱や悪寒に留まる軽度なものから、循環障害、毛細

血管漏出症候群や多臓器不全などに至る重篤なものまで起こりうるが、IL-6 や IL-1 など上流の炎症性サイトカインに対する薬物療法を含むマネジメントが推奨されており、概ね有効である。CAR-T 治療に続発する中枢神経毒性は immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS) と呼ばれ、認知機能障害、注意障害、せん妄、痙攣、脳浮腫などが見られる (110-112)。CAR-T 投与後早期に起こるものは CRS に関連すると考えられ、適切な治療により多くが 3 週間以内に改善する。一方、CRS とは独立に起こるものがあり、発症機序はまだよくわかっていないが、重篤なものでは血液脳関門の破綻や血管内皮障害が示唆されており、CAR-T の安全性情報更新には注意を払う必要がある。

5. まとめ

遺伝子治療の普及・実装に向けて、*in vivo* 遺伝子治療のさらなる高精度化、*ex vivo* 遺伝子治療から *in vivo* 遺伝子治療への切り替えの動きが見られる。その高精度化の最大の鍵は細胞／組織特異性の向上であり、それぞれのベクターについて改良が続けられている。そのようなベクターの開発にあたっては、標的特異性向上を裏付け、担保する品質管理戦略が必須である。非臨床生体内分布試験は当面 ICH-S12 の考え方をベースに行うのが妥当で、毒性評価は治療用遺伝子発現産物の過剰発現によるものとそれ以外のものに分けて考える。臨床試験開始にあたっては、これまでの臨床使用経験を参考に、ベクターごとに全身投与時の毒性を予測して用量設定や有害事象予防の対策を講ずる。ベクターの標的外細胞／組織への分布によるリスク、免疫反応のリスク、標的細胞／組織での発現によるリスクなどについては、ベクターと搭載遺伝子の特性に応じた個別の対応が必要である。

参考文献

1. 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部．開発品リスト．
http://www.nihs.go.jp/mtgt/development_items.html
2. Collins FS. Towards scalable in vivo gene editing. American Society of Gene and Cell Therapy the 25th Annual Meeting, 2022.
<https://asgct.org/annual-meeting/annual-meeting-archives/25th-annual-meeting-video-archive/may-18/outstanding-achievement-award-symposium>
3. Buchholz CJ, *et al.* Surface-engineered viral vectors for selective and cell type-specific gene delivery. Trends Biotechnol 33: 777-790, 2015.
4. Morizono K, *et al.* Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. Nat Med 11: 346-352, 2005.
5. Buchholz CJ, *et al.* Lentiviral vectors with measles virus glycoproteins – dream team for gene transfer? Trends Biotechnol 27: 259-265, 2009.
6. Waehler R, *et al.* Engineering targeted viral vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 8: 573-587, 2007.
7. Frank AM, Buchholz CJ. Surface-engineered lentiviral vectors for selective gene transfer into subtypes of lymphocytes. Mol Ther Methods Clin Dev 12: 19-31, 2019.
8. Anliker B, *et al.* Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. Nat Methods 11: 929-935, 2010.
9. Kays S-K, *et al.* CD105 is a surface marker for receptor-targeted gene transfer into human long-term repopulating hematopoietic stem cells. Stem Cells Dev 24: 714-723, 2015.
10. Abel T, *et al.* Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. Blood 122: 2030-2038, 2013.
11. Zhou Q, *et al.* T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8⁺ cells enhances tumor cell killing. Blood 120: 4334-4342, 2012.
12. Zhou Q, *et al.* Exclusive transduction of human CD4⁺ T cells upon systemic delivery of CD4-targeted lentiviral vectors. J Immunol 195: 2493-2501, 2015.
13. Kelly EJ, Russell SJ. MicroRNAs and regulation of vector tropism. Mol Ther 17: 409-416, 2009.
14. Zinn E, *et al.* In silico reconstruction of viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. Cell Rep 12: 1056-1068, 2015.
15. Shayakhmetov DM, *et al.* Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by a retargeted adenovirus vector. J Virol 74: 2567-2583, 2000.
16. Wang H, *et al.* In vitro and in vivo properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46. J Virol 82: 10567-10579, 2008.
17. Li C, *et al.* In vivo HSC gene therapy using a bi-molecular HDAd5/35⁺⁺ vector cures sickle cell disease in a mouse model. Mol Ther 29: 822-837, 2021.
18. Wang H, *et al.* In vivo HSC transduction in rhesus macaques with an HDAd5/3⁺ vector targeting desmoglein 2 and transiently overexpressing cxcr4. Blood Adv. 6: 4360-4372, 2023.
19. Li C, *et al.* In vivo HSC prime editing rescues sickle cell disease in a mouse model. Blood 141: 2085-

- 2099, 2023.
20. Yao J, *et al.* Targeted, safe, and efficient gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells *in vivo* using the engineered AVID adenovirus vector platform. *Mol Ther* 32: 103-123, 2024.
 21. Rice-Boucher PJ, *et al.* Adenoviral vectors infect B lymphocytes *in vivo*. *Mol Ther* 31: 2600-2611, 2023.
 22. Freitag PC, *et al.* Targeted adenovirus-mediated transduction of human T cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther Methods Clin Dev* 29: 120-132, 2023.
 23. Raper SE, *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80: 148-158, 2003.
 24. Verbeke, R, *et al.* Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today* 28: 100766, 2019.
 25. Akinc A, *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol* 14: 1084-1087, 2019.
 26. Michels A, *et al.* Precision medicine: *In vivo* CAR therapy as a showcase for receptor-targeted vector platforms. *Mol Ther* 30: 2401-2415, 2022.
 27. Smith TT, *et al.* *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Biotechnol* 12: 813-822, 2017.
 28. Moulahoum H, *et al.* Surface biomodification of liposomes and polymersomes for efficient targeted drug delivery. *Bioconjug Chem* 32: 1494-1502, 2021.
 29. Paunovska K, *et al.* Nanoparticles containing oxidized cholesterol deliver mRNA to the liver microenvironment at clinically relevant doses. *Adv Mater* 31: 1807748, 2019.
 30. Cheng Q, *et al.* Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotech* 15: 313-320, 2020.
 31. Dahlman JE, *et al.* Barcoded nanoparticles for high throughput *in vivo* discovery of targeted therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 2060-2065, 2017.
 32. Magadum A, *et al.* Pkm2 regulates cardiomyocyte cell cycle and promotes cardiac regeneration. *Circulation* 141: 1249-1265, 2020.
 33. Lockhart JH, *et al.* Self-assembled miRNA-switch nanoparticles target denuded regions and prevent restenosis. *Mol Ther* 29: 1744-1757, 2021.
 34. Sun J, *et al.* CCND2 modified mRNA activates cell cycle of cardiomyocytes in hearts with myocardial infarction in mice and pigs. *Circ Res* 133: 484-504, 2023.
 35. Zhao EM, *et al.* RNA-responsive elements for eukaryotic translational control. *Nat Biotechnol* 40: 539-545, 2022.
 36. Ning H, *et al.* Rational design of microRNA-responsive switch for programmable translational control in mammalian cells. *Nat Commun* 14: 7193, 2023.
 37. Kawasaki S, *et al.* Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 45: e117, 2017.
 38. Cella F, *et al.* Engineering protein-protein devices for multilayered regulation of mRNA translation

- using orthogonal proteases in mammalian cells. *Nat Commun* 9: 4392, 2018.
39. Nakanishi H, *et al.* Versatile design of intracellular protein-responsive translational regulation system for synthetic mRNA. *ACS Synth Biol* 11: 1077-1085, 2022.
 40. Yang J, Ding S. Engineering L7Ae for RNA-only delivery kill switch targeting CMS2 type colorectal cancer cells. *ACS Synth Biol* 10: 1095-1105, 2021.
 41. Xin T, *et al.* *In-vivo* induced CAR-T cell for the potential breakthrough to overcome the barriers of current CAR-T cell therapy. *Front Oncol* 12: 809754, 2022.
 42. Pfeiffer A, *et al.* *In vivo* generation of human CD19-CAR T cells results in B-cell depletion and signs of cytokine release syndrome. *EMBO Mol Med* 10: e9158, 2018.
 43. Agarwal S, *et al.* *In vivo* generated human CAR T cells eradicate tumor cells. *Oncoimmunol* 12: e1671761, 2019.
 44. Agarwal S, *et al.* *In vivo* generation of CAR T cells selectively in human CD4⁺ lymphocytes. *Mol Ther* 28: 1783-1794, 2020.
 45. Frank AM, *et al.* Combining T-cell-specific activation and *in vivo* gene delivery through CD3-targeted lentiviral vectors. *Blood Adv* 4: 5702-5715, 2020.
 46. Huckaby JT, *et al.* Bispecific binder redirected lentiviral vector enables *in vivo* engineering of CAR-T cells. *J Immunother Cancer* 9: e002737, 2021.
 47. Michels A, *et al.* Lentiviral and adeno-associated vectors efficiently transduce mouse T lymphocytes when targeted to murine CD8. *Mol Ther Methods Clin Dev* 23: 334-347, 2021.
 48. Andorko JI, *et al.* Targeted *in vivo* generation of CAR T and NK cells utilizing an engineered lentiviral platform. *Blood* 142 Suppl 1: 763-764, 2023.
 49. Parker M, *et al.* VivovectTM surface-engineered lentiviral particles mediate *in vivo* CAR T generation with potent and highly durable activity in non-human primates and tumor-bearing humanized mice. *Blood* 142 Suppl 1: 765-766, 2023.
 50. Theuerkauf SA, *et al.* AAV vectors displaying bispecific DARPins enable dual-control targeted gene delivery. *Biomaterials* 303: 122399, 2023.
 51. Parayath NN, *et al.* *In vitro*-transcribed antigen receptor mRNA nanocarriers for transient expression in circulating T cells *in vivo*. *Nat Commun* 11: 6080, 2020.
 52. Billingsley MM, *et al.* *In vivo* mRNA CAR T cell engineering via targeted ionizable lipid nanoparticles with extrahepatic tropism. *Small* 20: e2304378, 2024.
 53. Rurik JG *et al.* CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science* 375: 91-96, 2022.
 54. Drysdale CM, *et al.* Hematopoietic stem cell-targeted gene-addition and gene-editing strategies for β -hemoglobinopathies. *Cell Stem Cell* 28: 191-208, 2021.
 55. Berckmueller K, *et al.* CD90-targeted lentiviral vectors for HSC gene therapy. *Mol Ther* 31: 2901-2913, 2023.
 56. Shi D, *et al.* *In vivo* RNA delivery to hematopoietic stem and progenitor cells *via* targeted lipid nanoparticles. *Nano Lett* 12: 2938-2944, 2023.
 57. Breda L, *et al.* *In vivo* hematopoietic stem cell modification by mRNA delivery. *Science* 381: 436-

- 443, 2023.
58. Bhatt DK, *et al.* A systematic analysis on the clinical safety and efficacy of onco-virotherapy. *Mol Ther Oncolytics* 23: 239-253, 2021.
 59. 厚生労働省医薬食品局審査管理課／医療機器・再生医療等製品担当参事官室. ICH 見解「腫瘍溶解性ウイルス」について. (平成 27 年 6 月 23 日付け事務連絡)
 60. 厚生労働省医薬食品局審査管理課／医療機器・再生医療等製品担当参事官室. ICH 見解「生殖細胞への意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」について. (平成 27 年 6 月 23 日付け事務連絡)
 61. Lemos de Matos A, *et al.* Oncolytic viruses and the immune system: The dynamic duo. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17: 349-358, 2020.
 62. Kuhn I, *et al.* Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One* 3: e2409, 2008.
 63. Kurozumi K, *et al.* Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy. *J Natl Cancer Inst* 99: 1768-1781, 2007.
 64. Miller A, *et al.* Perfusion pressure is a critical determinant of the intratumoral extravasation of oncolytic viruses. *Mol Ther* 24: 306-317, 2016.
 65. Hill C, Carlisle R. Achieving systemic delivery of oncolytic viruses. *Expert Opin Drug Deliv* 16: 607-620, 2019.
 66. Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery: Update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev* 44: 185-194, 2000.
 67. Egermann M, *et al.* Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther* 13: 1290-1299, 2006.
 68. Collén A, *et al.* *VEGFA* mRNA for regenerative treatment of heart failure. *Nat Rev Drug Discov* 21: 79-80, 2022.
 69. De La Vega RE, *et al.* Efficient healing of large osseous segmental defects using optimized chemically modified messenger RNA encoding BMP-2. *Sci Adv* 8: eabl6242, 2022.
 70. Fukushima Y, *et al.* Treatment of ischemic neuronal death by introducing brain-derived neurotrophic factor mRNA using polyplex nanomicelle. *Biomaterials* 270: 120681, 2021.
 71. Baek S, *et al.* Generation of integration-free induced neurons using graphene oxide-polyethylenimine. *Small* 13: 201601993, 2017.
 72. Aini H, *et al.* Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep* 6: 18743, 2016.
 73. Streibinger D, *et al.* Cell type-specific delivery by modular envelope design. *Nat Commun* 14: 5141, 2023.
 74. Hamilton JR, *et al.* In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles. *Nat Biotech*, published online Jan 11, 2024.
 75. Gillmore JD, *et al.* CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* 385: 493-502, 2021.

76. Vafai SB, *et al.* Safety and pharmacodynamic effects of VERVE-101, an investigational DNA base editing medicine designed to durably inactivate the PCSK9 gene and lower LDL cholesterol – interim results of the phase Ib heart-1 trial. American Heart Association Scientific Sessions, November 12, 2023.
77. 厚生労働省医薬局医療機器審査管理課長. 「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保について」の一部改正について. (令和 5 年 10 月 23 日付け医薬機審発 1023 第 2 号)
78. 厚生労働省医薬局医療機器審査管理課長. 「遺伝子治療用製品の非臨床生体内分布の考え方について (ICH-S12) . (令和 5 年 10 月 23 日付け医薬機審発 1023 第 1 号)
79. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について (ICH-M3) . (平成 22 年 2 月 19 日付け薬食審査発 0219 第 4 号)
80. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構科学委員会ゲノム編集専門部会. ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療製品等の品質・安全性等の考慮事項に関する報告書. (令和 2 年 2 月 7 日)
81. Philippidis A. Fourth boy dies in clinical trial of Astellas' AT132. *Hum Gene Ther* 32: 1008-1010, 2021.
82. Lek A, *et al.* Meeting report: 2022 Muscular Dystrophy Association Summit on 'Safety and Challenges in Gene Transfer Therapy'. *J Neuromuscul Dis* 10: 327-336, 2023.
83. Duan D. Lethal immunotoxicity in high-dose systemic AAV therapy. *Mol Ther* 31: 3123-3126, 2023.
84. Whiteley LO. An overview of nonclinical and clinical liver toxicity associated with AAV gene therapy. *Toxicol Pathol* 51: 400-404, 2023.
85. Thomsen G, *et al.* Biodistribution of onasemnogene abeparvovec DNA, mRNA and SMN protein in human tissue. *Nat Med* 27: 1701-1711, 2021.
86. ノバルティスファーマ株式会社. 「ゾルゲンスマ点滴静注」添付文書 2024 年 5 月改訂 (第 6 版).
87. Guillou J, *et al.* Fatal thrombotic microangiopathy case following adeno-associated viral SMN gene therapy. *Blood Adv* 6: 4266-4270, 2022.
88. Bönnemann CG, *et al.* Dystrophin immunity after gene therapy for Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 388: 2294-2296, 2023.
89. ノバルティスファーマ株式会社. 再生医療等製品インタビューフォーム「ゾルゲンスマ点滴静注」2024 年 5 月改訂 (第 9 版).
90. 厚生労働省. 新型コロナワクチンについて. 新型コロナワクチン Q&A . https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/vaccine_qa.html
91. Alameh M-G, *et al.* Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* 54: 2877-2892, 2021.
92. 濱谷泰弘, 赤尾昌治. COVID-19 ワクチン接種後の心筋炎. *血栓止血誌* 34: 452-456, 2023.
93. Koeberl D, *et al.* Interim analyses of a first-in-human phase 1/2 mRNA trial for propionic acidemia. *Nature* 628: 872-877, 2024.
94. Alnylam Japan 株式会社. 「オンパットロ点滴静注 2mg/mL」添付文書 2023 年 7 月改訂 (第 3

版).

95. Kedmi R, *et al.* The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the roll of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials* 31: 6867-6875, 2010.
96. Sedic M, *et al.* Safety evaluation of lipid nanoparticle-formulated modified mRNA in the Sprague-Dawley rat and cynomolgus monkey. *Vet Pathol* 55: 341-354, 2017.
97. 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長. 「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」について. (平成 28 年 3 月 28 日付け薬生審査発 0328 第 19 号)
98. Verdun N, Marks P. Secondary cancers after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med* 390: 584-586, 2024.
99. Donsante A, *et al.* Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 8: 1343-1346, 2001.
100. Donsante A, *et al.* AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317: 477, 2007.
101. Chandler RJ, *et al.* Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 125: 870-880, 2015.
102. Walia JS, *et al.* Long-term correction of Sandhoff disease following intravenous delivery of rAAV9 to mouse neonates. *Mol Ther* 23: 414-422, 2015.
103. Li Y, *et al.* Enhanced efficacy and increased long-term toxicity of CNS-directed, AAV-based combination therapy for Krabbe disease. *Mol Ther* 29: 691-701, 2021.
104. Food and Drug Administration. Briefing Document Food and Drug Administration (FDA) Cellular, Tissue, and Gene Therapy Advisory Committee (CTGTAC) Meeting #70 Toxicity risks of adeno-associated virus (AAV) vectors for gene therapy (GT). September 2-3, 2021.
105. Sabatino DE, *et al.* Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther* 30: 2646-2663, 2022.
106. Hanlon KS, *et al.* High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun* 10: 4439, 2019.
107. Chan YK, Flotte TR. Analyzing clinical observations to better understand and manage immune responses to AAV gene therapies. *Mol Ther* 31: 913-914, 2023
108. Ruella M, *et al.* Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med* 24: 1499-1503, 2018.
109. Shimabukuro-Vornhagen A, *et al.* Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 6: 56, 2018.
110. Lee DW, *et al.* ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 25: 625-638, 2019.
111. Rivera AM, *et al.* CAR T-cell-associated neurotoxicity: Current management and emerging treatment strategies. *Crit Care Nurs Q* 43: 191-204, 2020.
112. 高尾昌樹. CAR-T 細胞療法に関連する中枢神経系合併症. *BRAIN and NERVE* 73: 47-58, 2021.

標的特異性を有する in vivo 遺伝子治療用製品のベクターに関する評価の考え方専門部会
委員名簿

- いたか けいじ 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授
位高 啓史 大阪大学感染症総合教育研究拠点 教授
- うちだ えりこ 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 主任研究官
内田 恵理子
- うちだ なおや 米国国立衛生研究所 心肺血液部門 細胞分子治療分野 遺伝子治療グ
内田 直也 ループリーダー
- おざわ けいや 自治医科大学医学部 名誉教授/客員教授
小澤 敬也
- おの でら まさふみ 国立研究開発法人国立成育医療研究センター 遺伝子細胞治療推進セン
小野寺 雅史 ター センター長
- ◎ く め あきひろ 自治医科大学 附属病院臨床研究センター 客員教授
久米 晃啓
- みずぐち ひろゆき 大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授
水口 裕之
- みたに こうのすけ 埼玉医科大学 医学部ゲノム応用医学 教授
三谷 幸之介
- やまぐち てるひで 金沢工業大学 加齢医工学先端技術研究所 所長/特任教授
山口 照英

◎部会長 ○副部会長
(五十音順)