

ICH Considerations General Principles to Address the Risk of Inadvertent Germline Integration of Gene Therapy Vectors

生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込み*¹リスクに対応するための基本的な考え方

1. Introduction

1. 緒言

Gene therapy vectors are designed to introduce genetic material into patients' cells for therapeutic, preventive or diagnostic purposes. Integration of delivered gene(s) into the genome of target cells represents the therapeutic goal in some clinical applications, for example when long-term efficacy/therapy is sought in genetic diseases. Also, vectors not generally considered capable of integration can do so at low frequencies. Integration of DNA might be desired or tolerated in target cells but should be minimised in non-target cells and is of particular concern for gonadal tissue where, although unlikely, there exists the potential for modifying the germline.

遺伝子治療用ベクターは、疾患の治療、予防又は診断を目的として遺伝子を患者の細胞へ導入するために設計される。遺伝性疾患の治療において、長期間にわたる効果的な遺伝子発現が求められるケースでは、導入遺伝子を目的細胞の染色体へ組み込むことが治療の最終目的となる。さらに、導入遺伝子の染色体への組み込みは、一般に組み込み能があるとは考えられていないベクターでも低頻度とはいえ起こりうることである。標的細胞へのDNAの組み込みは望ましいことであり、また容認しうることであるが、非標的細胞への組み込みは最小限に抑えるべきであり、生殖組織においては、可能性は低いものの生殖細胞が改変されるおそれがあり、特に懸念されるものである。

Integration events can result in insertional mutagenesis or genetic rearrangements that interrupt, induce or otherwise modify gene structure and/or expression. In addition, newer gene therapy technologies have resulted in vectors with higher titres, increased transduction efficiencies, and broader tropism, adding to the existing concerns regarding the risk of inadvertent germline integration. Regulatory authorities represented at the ICH agree that based on current scientific, ethical, and legal arguments gene therapy trials that are intended to allow direct germline integration should not be conducted. The regions also agree that the risk of inadvertent germline integration should be minimised because of the potential for subsequent transmission of vector DNA to progeny.

染色体への組み込みが起こると、(正常な)遺伝子構造を修飾したり遺伝子発現を妨害、誘発する遺伝子の再配列や挿入変異が起こる可能性がある。さらに、新しい遺伝子治療技術により作製される、より高い力価、より高い導入効率、あるいはより広い指向性を有するベクターでは、生殖細胞への意図しない組み込みリスクに対する懸念が高まる可能性がある。ICHに参加している規制当局は、現在の科学的、倫理的及び法的な議論に基づき、生殖細胞への直接の遺伝子組み込みを目的とする遺伝子治療の臨床試験は実施すべきではないということに合意している。さらに各極は、ベクターDNAの次世代への移行につながる可能性のあるものとして、生殖細胞への意図しない遺伝子組み込みリスクを最小にするべきであるということにも同意している。

This document identifies general principles for investigating and addressing risks for inadvertent germline integration and provides considerations to minimise this potential risk in humans enrolled in clinical trials. This document applies to gene therapy vectors and could also apply to oncolytic viruses.

本文書では、生殖細胞への意図しない組み込みリスクに関する試験法やリスクに対応するための基本的な考え方を明確にするとともに、臨床試験の被験者に対するリスクを最小にするために考

慮すべき事項を示す。本文書は遺伝子治療用ベクターに適用されるが、腫瘍溶解性ウイルスに適用されることもあり得る。

2. Risk factors for inadvertent germline integration of gene therapy vectors

2. 生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みにおけるリスク要因

The risk of inadvertent germline integration is based on a number of factors including vector type, dose, route, and site of administration; thus a science-based and case-by-case approach should be used in assessing this risk.

生殖細胞への意図しない組み込みリスクは、ベクターの種類、投与量、投与経路、投与部位などを含む多様な要因に基づいていることから、リスク評価には科学的知見に基づくケースバイケースのアプローチが用いられるべきである。

2.1. Vectors

The relative risk of germline integration associated with each vector category is generally based on the biodistribution profile, the replication capacity, and the integration potential for each vector type.

2.1. ベクター: 各ベクターごとの生殖細胞への相対的な組み込みリスクの大きさは、一般に各ベクターの生体内分布の特性、複製能及び染色体組み込み能に基づく。

Vectors used in gene therapy research and clinical trials include, but are not limited to:

- adeno-associated viral (AAV) vectors
- adenoviral vectors
- gamma-retroviral vectors
- herpes simplex-1 viral (HSV-1) vectors
- lentiviral vectors
- paramyxoviral vectors
- plasmid vectors
- pox viral vectors

遺伝子治療の研究や臨床試験に用いられるベクターには以下のようなものがあるが、これらに限定されるものではない。

- アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター
- アデノウイルスベクター
- ガンマレトロウイルスベクター
- 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) ベクター
- レンチウイルスベクター
- パラミクソウイルスベクター
- プラスミドベクター
- ポックスウイルスベクター

The ability of a vector to integrate into host cell chromosomes is a key factor in assessing the risk of germline integration. The following three categories list in descending order the relative ability of gene therapy vectors to integrate:

ベクターの宿主細胞染色体への組み込み能は、生殖細胞への組み込みリスクを評価するうえでの重要な要因である。遺伝子治療用ベクターは、組み込み能が高い順に以下の3つに分類される。

- (i) Vectors that enter into the cell nucleus and that carry integration machinery
 - (ii) Vectors that enter into the cell nucleus, without integration machinery
 - (iii) Vectors that are unable to enter the target cell nucleus and remain cytoplasmic
- (i) 細胞の核に移行し、組み込み能 (組み込み機構) を持つベクター
 - (ii) 組み込み能 (組み込み機構) を持たないが、細胞の核に移行するベクター
 - (iii) 細胞の核内に移行することができず、細胞質に留まるベクター

For example, gamma-retroviral and lentiviral vectors have viral enzymes (e.g. integrase) that allow the vector to integrate. Therefore, these vectors are considered to have an increased risk of inadvertent germline integration.

例えば、ガンマレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターは、ベクターの宿主染色体への組み込みが可能となるようなウイルス特有の酵素（例えば、インテグラーゼ）を持っている。従って、これらのベクターは生殖細胞への意図しない組み込みリスクが高いと考えられる。

Additional properties to consider in risk assessment include replication competence and cell host range (tropism). Modification or pseudotyping of a viral vector can change the virus's natural tropism allowing dissemination to gonadal tissue, while replication competence might affect overall exposure.

リスクを評価する際にさらに考慮すべき性質として、複製能や細胞宿主選択性（トロピズム）がある。ウイルスベクターの改変やシュードタイプ化^{*2}はウイルスの本来のトロピズムを変えることができ、これにより生殖組織への分布が可能になる。一方、ベクターの持つ複製能は生殖組織への暴露量に影響を及ぼす可能性がある。

2.2. Dose and route of administration

2.2.投与量および投与経路

High doses might contribute to a higher statistical risk of gonadal exposure by the vector or vector components. Intravenous administration of gene therapy vectors could carry greater risk due to the increased potential for haematogenous spread to the gonads. Conversely, replication incompetent gene therapy vectors delivered by *ex vivo* transduction would represent a minimal risk of germline integration.

高用量の投与は、ベクターやベクター構成成分の生殖腺に対する暴露のリスクが統計的に高まる可能性がある。静脈内投与は、血流を介する拡散により遺伝子治療用ベクターの生殖腺への暴露リスクを高める可能性がある。反対に、複製能を欠損した遺伝子治療用ベクターを用いた*ex vivo*での遺伝子導入は、生殖細胞への組み込みリスクはきわめて小さいと考えられる。

3. Non-clinical studies

3.非臨床試験

3.1 General considerations

3.1 一般に考慮すべき事項

The clinical development of a gene therapy vector involves evaluation of both non-clinical and clinical safety information. Non-clinical studies are important in establishing safety and proof-of-concept for any product intended for clinical use. These studies also help define the risk:benefit ratio of the product for the intended clinical population. The design of non-clinical studies for biotechnology-derived pharmaceutical products is addressed in ICH S6. Although gene therapy vectors are specifically excluded from the scope of ICH S6, general principles described in this guideline could be relevant to this product class.

遺伝子治療用ベクターの臨床開発は非臨床試験及び臨床試験から得られる安全性情報を検討しながら進められるべきである。非臨床試験は、臨床使用を目的とした全ての製品において、安全性やプルーフ・オブ・コンセプト^{*3}を確立するために重要である。また、これらの試験は当該製品の対象患者に対するリスク・ベネフィット比の評価にも役立つ。バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床試験のデザインは ICH S6 において述べられている。遺伝子治療用ベクターは ICH S6 の適用範囲に含まれていないものの、このガイドラインに記載されている考え方は遺伝子治療用ベクターに適用できる場合もある。

3.2 Biodistribution studies

3.2 生体内分布試験^{*4}

Biodistribution studies in animals address vector dissemination to target and non-target organs and should be conducted with the product that is intended for use in clinical trials. Such

studies should include analyses of gonads (testes and ovaries) because dissemination to gonadal tissue is an indication of the potential for germline integration. Vector dissemination can be detected using an assay for nucleic acid sequences. It is also recommended that testing for the presence of vector sequences in animal organs and tissues be done by at least one sensitive assay such as quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR).

動物での生体内分布試験は標的及び非標的臓器におけるベクターの分布や推移を調べるための試験であり、臨床試験において使用される製品を用いて実施される必要がある。生殖組織への分布は生殖細胞への組み込みの可能性の指標であることから、生体内分布試験では生殖組織（精巣及び卵巣）の分析を含む必要がある。ベクターの分布や推移は核酸配列を測定することにより検出できる。動物の臓器や組織でのベクター配列の存在を調べるには、少なくとも一つは、定量的PCRのような高感度分析法を用いることが望ましい。

Prior biodistribution studies of the vector containing other transgenes could be used to support early phase clinical development.

他の導入遺伝子を含む同一ベクターを用いて行った生体内分布試験データは初期の臨床開発で利用できる可能性がある。

If the vector is not detected in gonadal tissue, then further germline integration studies might not be warranted. If the vector is present in the gonads, animals should be studied to assess whether the level of vector sequence falls below the assay's limit of detection at later time points (i.e., transient detection). A persistent detection of vector sequences in the gonads might warrant elucidation of whether germline cells are transduced. When possible, testing of gonadal tissue should be performed to determine whether vector is present within germ cells or non-germline cells (e.g., Sertoli cells, Leydig cells, leukocytes). In male animals, this can be accomplished by analyzing sperm at different time points based on the duration of spermatogenesis. Persistent detection of vector limited to only non-germline cells and/or a transient detection in sperm, likely indicates that germline integration has not occurred. In female animals, the present interpretation is that if vector is detected in one oocyte, all oocytes are affected. In cases where a persistent detection of vector sequences is observed in oocytes or sperm, the situation should be discussed with your regulatory authority.

ベクターが生殖組織で検出されない場合、生殖細胞への遺伝子の組み込みを確認するためのそれ以上の試験は必要ないであろう。ベクターが生殖組織で検出された場合は、検出されたベクター量が経時的に減少し、検出限界以下になるかどうかを調べる動物試験の実施が必要となる（分布の一過性を確認）。生殖組織にベクター配列が持続的に検出された場合、生殖細胞へ遺伝子が導入されているか否かを明らかにする必要があるかもしれない。可能な限り、生殖組織の検査を実施して、ベクターが生殖細胞内に存在するのか、あるいは非生殖細胞（例えば、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、白血球など）内に存在するのかを検討するべきである。雄動物の場合、精子形成サイクルの期間に考慮し、異なる時点で精子を分析することによって評価可能である。ベクターの持続的な検出が非生殖細胞のみに限局している場合や、精子でのベクター配列の検出が一過性の場合、おそらく生殖細胞への組み込みが起こっていないと考えられる。雌動物の場合は、ベクターが一つの卵細胞で検出された場合、すべての卵細胞に分布していると現在のところ解釈すべきである。ベクター配列が持続的に卵細胞又は精子から検出された場合は、各規制当局と議論する必要がある。

4. Patient Monitoring

4. 患者のモニタリング

If, based on the animal biodistribution studies, the gene therapy vector is found to be transiently detected in the gonads, assaying patient semen for presence of vector might be considered. It is recognised that if the patient population is sterile, or the patient has a severe disease condition with a short life expectancy, monitoring of semen samples might not be warranted.

動物での生体内分布試験において、遺伝子治療用ベクターが一過性に生殖腺で検出された場合には、患者の精液にベクターが存在するか否かを検査することを考慮したほうがよい。患者が生殖

不能な場合、または余命が短いことが見込まれる重篤な疾患では、精液のモニタリングは必要ないであろう。

Testing should preferably be done at various time points and extend over at least one cycle of spermatogenesis, which is approximately 64-74 days in man. If semen samples are positive past one cycle of spermatogenesis, testing should continue and the respective regulatory authorities should be notified.

精液の検査は、成人男子における精子形成の1サイクルである約 64-74 日間を越えて複数回実施することが望ましい^{*5}。精子形成の1サイクルを過ぎて実施した精液の検査が陽性であった場合には、検査を継続するとともに規制当局へ報告すべきである。

Currently there are no non-invasive means to monitor women for germline integration; therefore, the risk assessment for female subjects might be exclusively based on non-clinical data.

現在、女性の生殖細胞への組み込みを非侵襲的にモニターする方法はない。したがって、女性の被験者におけるリスクは主として非臨床試験成績に基づいて評価する必要がある。

In clinical trials, regardless of the outcome of non-clinical biodistribution data, contraceptive measures are usually recommended for the duration of the clinical trial.

臨床試験の期間中は、非臨床生体内分布試験の結果にかかわらず避妊手段をとるべきであろう。

注：

*1：ここでいう組み込みとは、ベクターに含まれる DNA やその一部、又は RNA ウイルスベクターにあってはその RNA に由来する DNA の全体や一部が生殖細胞の染色体へ組み込まれることを指す。染色体外に存在している場合には、発生毒性等からの懸念は当然存在するが本文書の範囲外としている。

*2：ウイルスやウイルスベクターの感染に關与するエンベロープタンパク質を別のウイルスのエンベロープタンパク質に置換し、細胞への指向性を変えること。

*3：製品開発過程において、その開発コンセプトの妥当性を証明することの総称。ここでは開発段階にある遺伝子治療薬について、非臨床試験で検討された有効性や安全性から、ヒトへの応用研究の妥当性を確認することを意味する。

*4：いわゆる医薬品の体内動態試験に相当するが、ここでは投与したベクターの動態を解析することが目的ではなく、投与したベクターが生殖腺を含めて体内組織にどのように分布するかを明らかにする試験を意味する。

*5：精子幹細胞への組み込みを否定するために、一般的には精子形成の1サイクルを超える期間を考慮して、複数回（例えば3回）の試験で連続して陰性であることを確認する必要がある。またその最終の試験は、ベクター投与後精子形成1サイクルの期間を超えている必要がある。