

—特集 [遺伝子治療 update : 日本医科大学の遺伝子治療研究 (4)]—

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの
感染細胞へのゲノム組み込みについて

平井 幸彦

東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センター分子遺伝学分野

Genome Integration of Adeno-associated Virus (AAV) Vectors into Infected Cells

Yukihiro Hirai

Division of Molecular and Medical Genetics, Center for Gene and Cell Therapy,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Abstract

The development of gene therapy products using adeno-associated virus (AAV) vectors is progressing, and the gene therapy market is rapidly expanding. AAV shows no pathogenicity in the human body, has extremely low cytotoxicity and, unlike lentiviral and retroviral vectors, rarely integrates into chromosomes. Consequently, risk associated with AAV was thought to be low. In recent years, however, adverse events such as hepatotoxicity have become apparent as cases accumulate among laboratory animals and in clinical trials. In this paper, we present an overview of the integration of AAV vectors into the genome of infected cells, which is thought to be the cause of adverse events.

(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 211-217)

Key words: adeno-associated virus vector (rAAV), integration into genomic DNA, insertional mutagenesis, the risk of rAAV-mediated oncogenesis

はじめに

AAV ベクターは様々な分裂終了細胞で持続的な導入遺伝子発現を提供するため, in vivo 遺伝子導入に一般的に使用されます。遺伝子治療に AAV ベクターが広く使用されていますが, ほとんどの AAV ベクターゲノムである DNA は通常エピソームのまま存在しますが, 一部のウイルスゲノムは低頻度で感染細胞のゲノムに組み込まれ, その挿入変異誘発による新生児マウスの腫瘍形成につながることを示されています

(図)。現在のところ, 確認された遺伝毒性事象はこれまでに報告されていないため, ヒトにおける AAV ベクターを介した発癌のリスクは理論上のものです。しかし, 挿入突然変異誘発が少数のマウス研究で報告されており, 動物モデルにおける AAV ベクターの宿主ゲノムへの Integration の証拠と, 患者における挿入変異誘発のリスクの可能性などを検討する研究, 規制の必要性, および患者のケアに必要な情報を提供するために, この遺伝毒性を解明する必要があります。

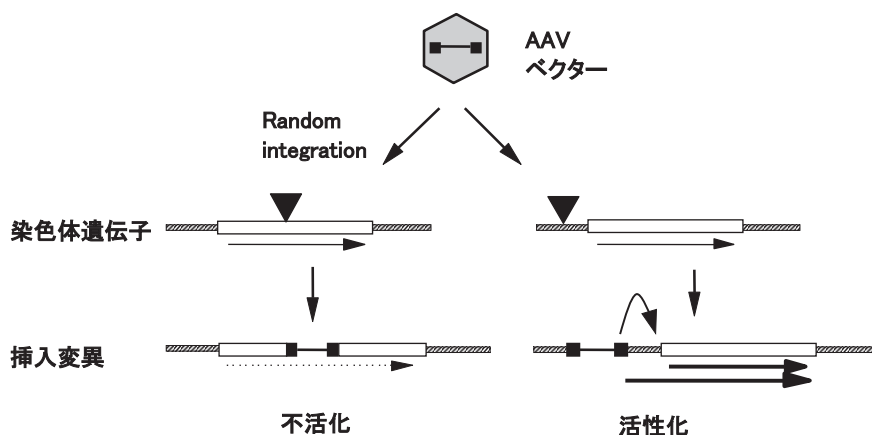


図 AAV ベクターの挿入変異による細胞毒性

臨床試験で認められた重篤な副作用として、Oncogenicity Risk, Hepatotoxicity, TMA (Thrombotic Microangiopathy), Neurotoxicity が取り上げられ議論されています^{1,2}。これら毒性のメカニズムについては色々と仮説は提唱されているものの、まだ明確な結論は出ていません。米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) において Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee (CTGTAC) Meeting が 2021 年に、開催され、AAV ベクターの安全性リスクに関して集中的な議論が行われましたが³、安全性評価における動物モデルの限界や、品質面の担保 (空のカプシド等を含む、種々の不純物による毒性評価) などで課題がまだ残されています。そこで、本稿では AAV ベクターの Integration 等に関する 2021 年 8 月 18 日、米国遺伝子細胞治療学会 (ASGCT) 仮想円卓会議 (AAV Integration Roundtable event) についての Denise E. Sabatino らの白書⁴をとおして、その現状の評価について報告します。

1. 動物モデルにおける AAV ベクター関連の host genome integration

AAV Integration の初期の研究 (1990~2000 年) は、*in vitro* モデル^{5,6} と *in vivo* モデル⁷ の両方で行われ、ゲノムの活発に転写された領域にほぼランダムな Integration が観察されました。肝部分切除マウスモデルを利用した研究では、AAV ゲノムの 10% 未満が組み込まれていると推定されました⁸。AAV ベクターと細胞 DNA とのジャンクション フラグメントのライブラリーの構築によって、AAV ベクターの Integration サイトは通常、アクティブな転写に関連する CpG アイランドおよび GC が豊富な領域の近くに見られること

が明らかになりました⁸⁻¹³。いくつかの AAV ベクター Integration 部位が種間で共通していること、および Integration がゲノムの ds DNA 切断に依存していることも示唆されています^{14,15}。

(I) 新生児マウスからの AAV ベクター遺伝毒性の証拠 (Rian 遺伝子座への挿入)

AAV ベクターと腫瘍形成との最初の関連は、Donsante らのムコ多糖症 VII 型 (MPSVII) マウスの研究でなされました¹⁶。MPSVII マウスの新生児期における 1 回の AAV ベクター治療は、長期的な導入遺伝子の発現、 β -Glucuronidase (GUSB) 活性、および表現型の補正をもたらしました^{17,18}。1 歳以上の投与 MPSVII マウスの多くは hepatocellular carcinoma (HCC) と血管肉腫を発症しました^{16,19}。さらに、同じ AAV2 ベクターを静脈内注射した新生 MPSVII の大規模なフォローアップ研究では、正常マウスと MPSVII マウスの両者の 30%~60% が生後約 13 カ月で HCC を発症し、腫瘍内の AAV ベクター Integration が検出されています。

腫瘍におけるこれらの AAV Integration の大部分は、Rian (核に刷り込まれて蓄積された RNA) 遺伝子座にあり、Rian 遺伝子座内およびその近位の遺伝子のアップレギュレーションを引き起こしました。Rian は、上皮から間葉への移行、Notch シグナル伝達経路の負の調節、および肝星細胞活性化の負の調節において役割を果たす長い非コード RNA です。Rian 遺伝子座の変異は、マウスで HCC を引き起こすことが示されています²⁰⁻²³。このマウス Rian に対してオーソログス (類似または同一の機能をもつ) であるヒトの長い非コード RNA MEG8 の発現増加は、HCC 患者の予後不良と関連しています²⁴。これらの観察結果から、Rian

への AAV ベクターの組み込みが遺伝子発現の調節不全を引き起こし、腫瘍形成に寄与するという最初の仮説が導き出されました。Rian に近接した潜在的な癌遺伝子 *Rhl1* および *Tax1bp1* は、Rian 以外の遺伝子への組み込みでもマウスで遺伝毒性を引き起こす可能性があることを示唆します²⁵。

新生児メチルマロン酸血症 (MMA)¹² マウスでの腫瘍および正常な肝臓組織の AAV Integration の検討では、これらの腫瘍の Rian 遺伝子座でクローン Integration が発見され、マイクロ RNA や *Rhl1* など、これらの Integration に近接する遺伝子の転写が増加し、Donsante の最初の発見が再現されました¹⁹。肝臓特異的遺伝子 *Alb* (アルブミン) および *Afp* (α -フェトプロテイン) への腫瘍形成とは関係のない Integration も特定されました。注目すべきことに、*Alb* 遺伝子座には、Rian を含むほかのどの遺伝子よりも多くの AAV ベクターが組み込まれていました。この高用量グループは、約 1×10^{14} vg/kg で投与されましたが、脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy : SMA) タイプ 1 を治療するためのヒトの全身 AAV ベクター投与に承認された用量に似ています。AAV ベクターの遺伝毒性は用量依存的であり、一部のエンハンサープロモーター (CAG またはサイロキシン結合グロブリン (TBG)) が遺伝毒性を引き起こしますが、ヒト α -1 アンチトリプシン (hAAT) エンハンサープロモーターでは Rian に組み込まれた場合でも遺伝毒性を引き起こしませんでした。これらの発見は、ベクターのデザインが毒性に関与し、毒性が低減されたベクターをデザインできることを示唆していました。

(2) 動物の年齢の役割

マウスでは、年齢が AAV ベクターを介した挿入変異誘発の発生に役割を果たすことを示しています。マウスでの発見は、分化および細胞周期に関与する遺伝子が活発に発現しているときに AAV ベクターで処理された組織または動物は、挿入変異誘発のリスクが高いことを示唆しました。残念ながら、マウスが AAV ベクター遺伝毒性の影響を受けにくくなる正確な年齢は不明です。

ラットにおける AAV 関連の腫瘍形成に関する限られた研究では、自己相補的 (sc) AAV と強力なユビキタス CMV プロモーターを使用して新生児ラットで腫瘍形成能の増加や DNA Integration の優先部位の証拠は見つけられず、AAV 投与後の肝臓腫瘍形成は新生児ラットにおいても存在しないと結論付けられました^{26,27}。さらに、イヌモデルは疾患の大型動物モデルと

して有効性と安全性を評価する機会を提供できますが、長期研究においても、血友病 A、血友病および糖原病 (GSD) タイプ Ia の犬を用いた最長 10 年間の長期追跡研究でも、AAV ベクター関連の腫瘍形成は報告されていません。

(3) 基礎にある肝疾患の影響

既存の肝疾患は AAV ベクター関連の遺伝毒性のリスクを高める可能性があります。慢性肝疾患の状況で AAV ベクター遺伝子治療にさらされた成体マウスは、高頻度で HCC を発症することも示されており¹⁵、したがって、炎症性肝疾患の有病率が高いことを考えると、ヒトでの追加研究の必要性を示しています。

(4) ヒト以外の霊長類における AAV ベクター

Integration と HCC リスクの評価

非ヒト霊長類 (NHP) 研究は、今日まで、遺伝毒性は報告されていませんが、発表されたほとんどすべての研究は短期の観察であるため、長期の遺伝毒性評価はできていません。いくつかの研究では、AAV ベクター投与後の Integration 分析が報告されています^{28,32}、組み込み部位のクラスタリングが示されましたが、遺伝子コード領域に対する優先性は検出されておらず^{29,33,34}。また妊娠後期の胎児または成獣への肝臓特異的発現を伴う持続的な臨床的レベルのヒト血液凝固第 IX 因子 (hFIX) は、臨床的な懸念は示しませんでした^{30,34,35}。

2. 臨床における挿入変異誘発のリスクの評価

AAV2-hFIX 投与の血友病 B の臨床研究および血友病 BscAAV8-LP1-hFIXco を投与した別の臨床研究における 6~15 年間および 8 年間の追跡調査においても、持続的な肝毒性または HCC 発症の証拠は報告されていません³⁶⁻⁴⁰。また、いくつかの異なる AAV 血清型ベクター (AAV1, 2, 5, 8, および 9) が臨床試験 (小児を含む) で現在使用されておりますが、いずれのタイプのがんも増加していません。遺伝子治療後に侵襲的な組織生検を行う必要があるため、AAV Integration の研究は非常に限られています。AAV1 ベクターの導入後のヒト筋生検の分析により、ベクターゲノム Integration が組織全体に不均一に分布していることが明らかになりました⁴¹。Integration 部位は、ミトコンドリア遺伝子および核ミトコンドリア DNA 領域内の主なホットスポットとともに宿主ゲノム全体に分布していました。

uniQure の 血 友 病 B の 治 療 薬 AMT-061

(etranacogene dezaparvovec : 第 IX 因子 Padua バリアントを発現する AAV5 ベクター) を投与した患者の一人に HCC の定期的な腹部超音波検査による予備診断で重篤な有害事象の可能性を見出し、臨床研究が保留にされました。しかし 25 年にわたる C 型肝炎ウイルス (HCV) および B 型肝炎ウイルス (HBV) の罹患病歴、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の証拠、喫煙歴、家族性癌の病歴、進行性癌の病歴および年齢を含む HCC に関連する複数の危険因子を有していたことに留意し^{42,43}、FDA は AMT-061 がこの患者の HCC に寄与した可能性は低いとして、研究の保留を 2021 年 4 月に解除しました^{42,44}。Integration はゲノム全体に分布しており、クローンの拡大や優先的な Integration はありませんでした。しかし、AAV 投与後の慢性肝障害のマウスモデルにおける HCC の発症¹⁵と血友病 B 患者における併存疾患との類似性を無視すべきではありません。

(1) HCC リスクとベクターデザインとの関係の評価

動物モデルにおける HCC のリスクは、① AAV ベクターの投与量および②導入遺伝子のエンハンサーおよびプロモーターエレメントの性質と相関することが示唆されています。データは、プロモーターとエンハンサー配列の Integration だけで腫瘍形成を促進できることを示しています²⁰。HCC を起こしやすい C3H/HeJ マウスを用いた研究では、AAV ベクター感染後の肝部分切除により、CMV-GFP 感染マウスでは HCC 発生率が減少しましたが、ニワトリの β -アクチン (CBA) プロモーターのみのヌルベクターの感染グループでは減少しませんでした。CBA ヌル感染肝切除マウス由来の腫瘍は、対応する CMV-GFP 感染群由来の腫瘍よりも有意に高いレベルのベクター DNA を含む可能性が高く、CMV プロモーターよりも CBA プロモーターによる腫瘍形成能力が強いことを示しました。CBA ヌルベクター挿入は、既知の癌原遺伝子または腫瘍抑制因子と関連しており、強力なリードスルー転写、エンハンサー効果、およびより強力なプロモーターによる腫瘍抑制因子の破壊を示唆しています。同様に CAG や TBG プロモーターなどの強力なプロモーターには、ゲノム Integration 後にリードスルーを駆動し、HCC の発生につながる近くの癌原遺伝子の発現を引き起こす可能性が高いと考えられています。さらに、*cap* 遺伝子と右の ITR の間に位置する領域の野生型 AAV2 ゲノム内に 46 ヌクレオチドの肝臓特異的エンハンサー/プロモーターエレメントが存在⁴⁵し、一部の AAV ベクターでも保存されているため、ベクターゲノムの組

み込み時に発現の調節不全に寄与する可能性があります。主に AAV2 はヒトに遍在しており、成人の約 80% が AAV2 に対する中和抗体を保有しています⁴⁶。HCC 腫瘍および正常な肝組織に Integration された AAV DNA が検出されていますが、多くの場合、AAV Integration イベントが腫瘍内のすべての細胞に存在するわけではありません^{47,48}。したがって、野生型 AAV と遺伝子治療用 AAV ベクターとの組込みの関連性は不明であり^{49,51}、腫瘍形成を含むいかなる疾患とも明確に関連することはないと思われます。

(2) 動物モデルの関連性

動物モデルは生物医学研究や医薬品開発で広く使用されていますが、動物モデルが人間の病気の予測因子として不十分であることは明らかです。完全に外挿可能な動物モデルはなく、人間ほど合理的に研究できる種は他にありません。

(3) Regulatory guidance (規制ガイダンス)

FDA と欧州医薬品局 (The European Medicines Agency : EMA) のガイダンス文書が AAV ベクターは非 Integration 的であると見なしているにもかかわらず、保健当局にとって挿入変異誘発による AAV ベクターの遺伝毒性と発がん性のリスクは、継続的な懸念事項です。例えば、2020 年 1 月に提出された FDA の長期フォローアップ ガイダンスでは、AAV ベクターには Integration する傾向がなく、有害事象のリスクが低いと述べられています。しかし、両機関は、2001 年と 2007 年の Donsante^{16,19} による研究論文について議論し、新生児として AAV で治療されたマウスにおける AAV ベクター DNA Integration に関連する HCC の誘導を説明し、この点を安全性評価で考慮すべきであることを示唆しています^{16,19}。

AAV ベクターの場合、FDA は、最大 5 年間の長期フォローアッププロトコルを実施することを推奨しています。この推奨は、Integration することが知られているベクター (例：レンチウイルスベクター) の場合の 15 年間の長期フォローアップ期間を推奨しているのと対照的です。それにもかかわらず、承認された AAV ベクターの製造業者は、最近の研究でより保守的なアプローチを取り入れています。例えば、Luxturna^{52,53} と Zolgensma^{54,55} はどちらも承認されていますが、15 年間の長期追跡調査期間が計画されています⁵⁶。これらの市販後データ、および進行中の臨床試験および長期前臨床試験から得られた追跡データにより、様々な AAV ベクターについての遺伝子治療の安

全性をさらに高めるための新しい知識が追加されていくと思われます。

おわりに

AAV ベクターによる遺伝子導入の成功は、最近承認された遺伝子治療製品 (Luxturna, Zolgensma, GlyberaSM) によって最もよく示されています。さらに、AAV ベクター ベースのベクターに関する豊富な前臨床および臨床研究により、その耐久性と臨床的安全性を確認する必要性が明確になっています。全体として、AAV Integration の頻度は低く、現在までに AAV ベクターに関連する癌の症例がヒトで報告されていないことを考えると、悪性腫瘍のリスクは理論的なものであると思われます。

血友病 B の臨床試験における被験者の HCC の最近の症例では、HCC と AAV の Integration との関連性は見出されませんでした。AAV の Integration と遺伝毒性のリスクに関する現在進行中の議論の重要性が高まっております。この分野は、リスクを最小限に抑え、患者が長期的に利益を得られるようにすることを目標に、データの透明性と共有の向上、根底にあるメカニズムの調査、および AAV 遺伝子治療の生物学的結果の理解を深めるための新しいツールとモデルの開発に取り組む必要があります。

最後に、私が所属しております東京大学医科学研究所・遺伝子細胞治療センター・分子遺伝医学分野では、AAV ベクター作製のための小・中規模アカデミア GMP 施設を準備中であります。これまで検討をしてまいりました上流過程および下流過程を用いて、より高品質で、より安価な毒性の低い AAV ベクターを作製し、臨床試験に用いたいと考えております。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

- Weinmann, J, Grimm, D: Next-generation AAV vectors for clinical use: an ever-accelerating race. *Virus Genes* 2017; 53: 707-713.
- Berry GE, Asokan A: Cellular transduction mechanisms of adenoassociated viral vectors. *Curr Opin Virol* 2016; 21: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.001>.
- Schmidt M, Govindasamy L, Afione S, Kaludov N, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA: Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV (VR-942). *J Virol* 2008; 82: 8911-8916.
- Sabatino, DE., Bushman, FD, Chandler, RJ., Crystal, RG, Davidson, BL, Dolmetsch, R., Eggan, KC, Gao, G., Gil-Farina, I, Kay, MA., McCarty, DM, Montini, E., Ndu, A, Yuan, J., American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) Working Group on AAV Integration Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther* 2022; 30: 2646-2663. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.06.004>
- Rutledge EA, Russell DW: Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* 1997; 71: 8429-8436.
- Yang CC, Xiao X, Zhu X, et al.: Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* 1997; 71: 9231-9247.
- Nakai H, Iwaki Y, Kay MA, Couto LB: Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* 1999; 73: 5438-5447.
- Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA: Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 2001; 75: 6969-6976.
- Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA: AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 2003; 34: 297-302.
- Nakai H, Wu X, Fuess S, et al.: Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 2005; 79: 3606-3614.
- Miller DG, Trobridge GD, Petek LM, et al.: Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol* 2005; 79: 11434-11442.
- Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al.: Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 2015; 125: 870-880.
- Li H, Malani N, Hamilton SR, et al.: Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011; 117: 3311-3319.
- Gil-Farina I, Fronza R, Kaepfel C, et al.: Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol Ther* 2016; 24: 1100-1105.
- Dalwadi DA, Torrens L, Abril-Fornaguera J, et al.: Liver injury increases the incidence of HCC following AAV gene therapy in mice. *Mol Ther* 2021; 29: 680-690.
- Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al.: Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001; 8: 1343-1346.
- Daly TM, Ohlemiller KK, Roberts MS, Vogler CA, Sands MS: Prevention of systemic clinical disease in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene transfer. *Gene Ther* 2001; 8: 1291-1298.
- Daly TM, Okuyama T, Vogler C, Haskins ME, Muzyczka N, Sands MS. Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus

- results in prolonged beta-glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 85–94.
19. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, Sands MS: AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 2007; 317: 477. <https://doi.org/10.1126/science.1142658>.
 20. Wang PR, Xu M, Toffanin S, Li Y, Llovet JM, Russell DW: Induction of hepatocellular carcinoma by in vivo gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 11264–11269.
 21. Dupuy AJ, Rogers LM, Kim J, et al.: A modified sleeping beauty transposon system that can be used to model a wide variety of human cancers in mice. *Cancer Res* 2009; 69: 8150–8156.
 22. Riordan JD, Keng VW, Tschida BR, et al.: Identification of rtt1, a retrotransposon-derived imprinted gene, as a novel driver of hepatocarcinogenesis. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003441. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003441>.
 23. Ranzani M, Cesana D, Bartholomae CC, et al.: Lentiviral vector-based insertional mutagenesis identifies genes associated with liver cancer. *Nat Methods* 2013; 10: 155–161.
 24. Hu Y, Yan W, Jin Z, et al.: LncRNA MEG8 plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma progression through miR-367-3p/14-3-3z/TGFB1 axis. *Neoplasia* 2021; 68: 273.
 25. Zhong L, Malani N, Li M, et al.: Recombinant adeno-associated virus integration sites in murine liver after ornithine transcarbamylase gene correction. *Hum Gene Ther* 2013; 24: 520–525.
 26. Schmidt EV, Christoph G, Zeller R, Leder P: The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4406–4411.
 27. Kay MA, Li Q, Liu TJ, Leland F, Toman C, Finegold M, Woo SLC: Hepatic gene therapy: persistent expression of human alpha 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 641–647.
 28. Nowrouzi A, Penaud-Budloo M, Kaeppel C, et al.: Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol Ther* 2012; 20: 1177–1186.
 29. Chandler RJ, Sands MS, Venditti CP: Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models. *Hum Gene Ther* 2017; 28: 314–322.
 30. Mattar CNZ, Gil-Farina I, Rosales C, et al.: In utero transfer of adeno-associated viral vectors produces long-term factor IX levels in a cynomolgus macaque model. *Mol Ther* 2017; 25: 1843–1853.
 31. Spronck L, de Haan M, Heijink L, Twisk J, Ferreira V, van Deventer S: Assessment of vector integration of AAV5-hFIX in mice and non-human primates indicates No association with tumorigenic risk [Abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020; 4.
 32. Sullivan L, Zahn M, Gil Farina I, et al.: Rare genomic integrations of AAV5-hFVIII-SQ occur without evidence of clonal activation or gene-specific targeting. *Mol Ther* 2021; 29: 425.
 33. Hüser, D., Gogol-Döring, A., Lutter, T., Weger, S., Winter, K., Hammer, E.M., Cathomen, T., Reinert, K., and Heilbronn, R. (2010). Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000985. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000985>.
 34. Mattar CN, Nathwani AC, Waddington SN, et al.: Stable human FIX intrauterine gene transfer of self-complementary adeno-associated viral vector 5 and 8 in macaques. *Mol Ther* 2011; 19: 1950–1960. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.107>.
 35. Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al.: Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* 2011; 19: 876–885. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.274>.
 36. George LA, Ragni MV, Rasko JEJ, et al.: Long-term follow-up of the first in human intravascular delivery of AAV for gene transfer: AAV2-hFIX16 for severe hemophilia B. *Mol Ther* 2020; 28: 2073–2082.
 37. Nathwani AC, Reiss U, Tuddenham E, et al.: Adeno-associated mediated gene transfer for hemophilia B: 8 year follow up and impact of removing “empty viral particles” on safety and efficacy of gene transfer. *Blood* 2018; 132: 491. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-118334>.
 38. Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, et al.: Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *N Engl J Med* 2020; 382: 29–40. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1908490>.
 39. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al.: AAV5-Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377: 2519–2530. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708483>.
 40. George LA, Monahan PE, Eyster ME, et al.: Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *N Engl J Med* 2021; 385: 1961–1973.
 41. Kaeppel C, Beattie SG, Fronza R, et al.: A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* 2013; 19: 889–891. <https://doi.org/10.1038/nm.3230>.
 42. uniQure: uniQure announces FDA removes clinical hold on Hemophilia B gene therapy program [Press release]. 2021. <https://www.globenewswire.com/newsrelease/2021/04/26/2216691/0/en/uniQure-Announces-FDA-Removes-Clinical-Hold-on-Hemophilia-B-Gene-Therapy-Program.html>.
 43. Schmidt MR, Foster G, Coppens M, et al.: Liver safety case report from the phase 3 HOPE-B gene therapy trial in adults with hemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5.
 44. uniQure: uniQure announces findings from reported case of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in Hemophilia B gene therapy program [Press release]. 2021. <https://tools.eurolandir.com/tools/Pressreleases/GetPressRelease/?ID=3890956&lang=en-GB&companycode=nl-qure&v=>.
 45. Logan GJ, Dane AP, Hallwirth CV, et al.: Identification of liver-specific enhancer-promoter activity in the 3' untranslated region of the wildtype

- AAV2 genome. *Nat Genet* 2017; 49: 1267–1273.
46. Verdera HC, Kuranda K, Mingozzi F: AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer. *Mol Ther* 2020; 28: 723–746.
 47. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, et al.: Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Gen* 2015; 47: 1187–1193. <https://doi.org/10.1038/ng.3389>.
 48. La Bella T, Imbeaud S, Peneau C, et al.: Adeno-associated virus in the liver: natural history and consequences in tumour development. *Gut* 2020; 69: 737–747. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318281>
 49. Berns KI, Byrne BJ, Flotte TR, et al.: Adeno-associated virus type 2 and hepatocellular carcinoma? *Hum Gen Ther* 2015; 26: 779–781. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.29014.kib>
 50. Büning H, Schmidt M: Adeno-associated vector toxicity-to Be or not to Be? *Mol Ther* 2015; 23: 1673–1675. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.182>.
 51. Russell DW, Grompe M: Adeno-associated virus finds its disease. *Nat Genet* 2015; 47: 1104–1105.
 52. EMA: New gene therapy for rare inherited disorder causing vision loss recommended for approval [Press release]. 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/news/newgene-therapy-rare-inherited-disorder-causing-vision-loss-recommended-approval>.
 53. FDA: FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss [Press release]. 2017. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss>.
 54. FDA: FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality [Press release]. 2019. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscularatrophy-rare-disease>.
 55. EMA: New gene therapy to treat spinal muscular atrophy [Press release]. 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/new-gene-therapy-treatspinal-muscular-atrophy_en.pdf.
 56. FDA: Food and drug administration (FDA) cellular, tissue, and gene therapies advisory committee (CTGTAC) meeting #70 toxicity risks of adeno-associated virus (AAV) vectors for gene therapy (GT) [Briefing document]. 2021. <https://www.fda.gov/media/151599/download>.
 57. EMA: 2012. Glybera [Press release]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>.

(受付：2023年6月26日)

(受理：2023年7月3日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示4.0国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。