

# 血友病に対する遺伝子治療の進歩

柏倉裕志\*, 大森 司

## Advances in gene therapy for hemophilia

Yuji KASHIWAKURA, Tsukasa OHMORI

**要約：**血友病は、F8（血友病A）あるいはF9（血友病B）遺伝子変異が原因となる先天性出血性疾患である。出血に対して凝固因子製剤が用いられるが、凝固因子の半減期が短く頻回の投与が必要なことが患者QOLを阻害する。血友病は古くから遺伝子治療に適した疾患と考えられ、様々な研究がなされてきた。この10年間で飛躍的に遺伝子治療に対する基礎研究が進み、実際にアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus: AAV）ベクターを用いたヒト臨床試験において、一回の投与で長期にわたって血中凝固因子が維持され、製剤投与の必要性がなくなる結果が得られている。現在の遺伝子治療の弱点として、中和抗体陽性患者に適応がないこと、小児に適応がないことなどが指摘されている。これらを克服するために、染色体DNAにアプローチするゲノム編集治療や、レンチウイルスベクターで治療遺伝子を導入した自己造血幹細胞移植治療も進行している。血友病に対する遺伝子治療が日常診療において利用できる日も近いが、長期的な有効性・安全性の観察に加え、高額な医療費に対する議論が必須である。

**Key words:** hemophilia, gene therapy

### 1. はじめに

血友病は、血液凝固因子である第VIII因子（FVIII：血友病A）または第IX因子（FIX：血友病B）の産生・機能が低下する先天性出血性疾患である。原因となる遺伝子F8（FVIII遺伝子）およびF9（FIX遺伝子）はそれぞれX染色体上に存在するため、X連鎖潜性遺伝となる。重症の患者では、関節内や筋肉内での出血が特徴で、特に、膝・足首・肘などの関節内で反復する再発性出血は、血友病性関節症と呼ばれる慢性関節症の原因となる。血友病の標準的治療は、不足する凝固因子濃縮製剤の定期的および出血時の補充療法である。欠乏した凝固因子活性を1%以上に維持することにより、血友病性関節症の発生率を低減、あるいは発症を遅延できる。

補充療法に使用する通常の凝固因子製剤の半減期は短いため、通常の凝固因子製剤の場合は週に2~3回の輸注が必要となる。現在は様々な半減期延長型凝固因子製剤やバイスペシフィック抗体医薬の開発により、輸注の間隔は遥かに伸び、患者の生活の質（QOL）は劇的に改善した。しかし、血友病患者が定期的な薬剤投与・輸注を生涯続けることには変わりはない。また、凝固因子製剤による補充療法では、投与した凝固因子に対する中和抗体（インヒビター）の発生が問題となる。インヒビターは、投与した凝固因子の活性を直ちに阻害するため、補充療法が無効となる。インヒビターの発生率は、重症血友病Aで30%、重症血友病Bで9%である。血友病Bでは、インヒビターの発生がアナフィラキシー反応や他のアレルギー反応とネフローゼ症候群と関連するため問題となる。

血友病は単一遺伝子に起因する遺伝性疾患であること、数%の凝固因子活性の上昇により治療効果が得られること、凝固因子レベルの厳密な調節が不要なこと、出血率や凝固因子レベル測定などの治療効

\*責任者連絡先：  
自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門  
〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1  
Tel: 0282-58-7324, Fax: 0282-44-2158  
E-mail: ykashi@jichi.ac.jp

果の評価が容易であることから、遺伝子治療に適した標的疾患と考えられてきた。これまで数十年間の基礎研究・治療開発研究の積み重ねから、実際のヒト臨床試験では有望な成績が得られてきた。血友病に対する遺伝子治療では、一回の治療ベクター薬の投与により、数十年あるいは生涯にわたって凝固因子製剤による補充療法が不要となる可能性がある。動物モデルの基礎検討では、肝臓を標的として治療タンパク質を発現させることでインヒビターの消失を誘導することも示唆されている。本稿では、血友病遺伝子治療臨床試験を中心に、これまでの血友病に対する遺伝子治療の進歩について概説する。

## 2. 血友病遺伝子治療の概要

これまでの遺伝子治療は、正常な遺伝子あるいは標的遺伝子を代替する治療遺伝子を導入する、いわば遺伝子補充治療であった。近年ゲノム編集技術の登場により、変異遺伝子を正常型に是正する遺伝子正常化治療も技術的には可能となった。標的治療タンパク質を内在的にかつ長期的に発現を可能にする遺伝子治療の実臨床応用は、数十年來の目標である。現在は様々な疾患を標的とした遺伝子治療が研究開発・臨床開発されている。血友病に対する遺伝子治療においても、2011年に報告された血友病B遺伝子治療の成功例<sup>1)</sup>を受けて飛躍的に進展し、現在は主に3つのアプローチによる遺伝子治療法が実臨床に向け臨床試験が実施されている。1つ目は、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターを用いた FVIII あるいは FIX 遺伝子の治療遺伝子導入法で、臨床開発が最も進んでいる。2つ目は、ゲノム編集技術を用いた標的ゲノム配列への治療遺伝子挿入法であり、生涯にわたる遺伝子発現と小児の治療を可能にする。これら2つの遺伝子治療法は、遺伝子導入の際に運び手となるベクターを直接患者に投与する *in vivo* 遺伝子治療法である。3つ目は、レンチウイルスベクターを用いた自己造血幹細胞への治療遺伝子導入と細胞輸注による *ex vivo* 遺伝子治療法で、治療遺伝子を患者細胞のゲノムに挿入させ、治療遺伝子の長期的な発現安定性を提供する。現在進行中の血友病 A (表1) および血友病 B (表2) に

対する遺伝子治療臨床試験の主なものを表に示す。

## 3. AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療

### 1) AAV ベクターの構造と特徴

AAV は、非病原性のパルボウイルス科の DNA ウィルスであり、末端逆位反復配列 (inverted terminal repeat: ITR)、複製に必要な非構造蛋白 (Rep) 遺伝子、キャプシド (Cap) 遺伝子で構成される約 5 kb のゲノムを持つ。AAV ベクターは、ITR 間のウィルス由来の遺伝子配列を、導入遺伝子・プロモーター・エンハンサーなどの要素で置き換えた遺伝子配列構造をとる (図1)。外殻を構成するキャプシドは、血清型により細胞への感染指向性が異なり、標的細胞に指向性の高い血清型を選択することが可能である。また、搭載するプロモーターを標的細胞特異的プロモーターとすることで、搭載遺伝子の特異的発現が可能となる。血友病遺伝子治療では、肝臓に指向性を持つ AAV 血清型を選択 (あるいは改変型 AAV 血清型を構築) し、肝臓細胞特異的プロモーターとの組み合わせにより、肝臓特異的な FIX および FVIII 遺伝子の発現を可能にしている。

### 2) 血友病遺伝子治療の歴史

初期の血友病に対する遺伝子治療臨床試験では、遺伝子挿入型のレトロウイルスベクターやプラスミドベクターを用いて治療遺伝子を細胞に導入し、治療遺伝子発現細胞を移植する *ex vivo* 治療法と、レトロウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターの直接投与による *in vivo* 治療法が、1990年代後半から2000年代前半にかけて実施された。いずれの臨床試験においても、治療遺伝子の発現は一過性の低レベル発現にとどまる成果であった<sup>2)</sup>。また当時、他の疾患に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床試験の結果は、遺伝子導入による挿入変異と免疫応答性合併症のリスクに対する強い懸念をもたらした。そのため、それらリスクを回避可能な非遺伝子挿入型で、病原性が低い AAV ベクターを利用した治療研究が精力的に進められた。AAV ベクターには搭載遺伝子サイズに制限があるため、cDNA 長が 8 kb を超える FVIII よりも、cDNA 長の短い FIX を用いた血友病 B に対する遺伝子治療研究の開発が

表1 公開されている血友病Aに対する遺伝子治療臨床試験

治療ベクターなど	Phase	スポンサー		状態	ID		
BMN 270	Phase 1	BioMarin Pharmaceutical		Active, not recruiting	NCT02576795		
	Phase 2						
Valoctocogene Roxaparvovec	Phase 3			Active, not recruiting	NCT03392974		
	Phase 1						
	Phase 2					Enrolling by invitation	NCT03520712
	Phase 3					Not yet recruiting	NCT04323098
	Phase 3					Active, not recruiting	NCT03370913
BAY2599023 (DTX201)	Phase 1			Ultragenix pharmaceutical	Bayer	Recruiting	NCT03588299
	Phase 2						
SPK-8011	Phase 1	Spark Therapeutics		Recruiting	NCT03003533		
	Phase 2						
SPK-8016	Phase 1			Active, not recruiting	NCT03734588		
	Phase 2						
SB-525	Phase 3			Pfizer		Recruiting	NCT04370054
	Phase 2					Recruiting	NCT03061201
AAV2/8-HLP-FVIII-V3	Phase 1	Medical Research Council	University College, London	Recruiting	NCT03001830		
YUVA-GT-F801	Phase 1	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute		Not yet recruiting	NCT03217032		
BAX 888	Phase 1	Takeda		Active, not recruiting	NCT03370172		
	Phase 2						
Auto CD34+PBSC, lentiviral vector encoding BDDFVIII	Phase 1	Medical College of Wisconsin	Parameswaran Hari	Recruiting	NCT03818763		
Auto CD34+, lentiviral vector encoding CD68-ET3	Phase 1	Expression Therapeutics, LLC		Not yet recruiting	NCT04418414		
SIG-001	Phase 1	Sigilon Therapeutics, Inc.		Recruiting	NCT04541628		
	Phase 2						

先に進展した。AAVベクターを用いた血友病B患者に対する最初の臨床試験は、2型血清のAAVベクター（AAV2ベクター）の筋肉内投与である。ベクターの忍容性は良好であったが、治療タンパク質であるFIX発現は一過性であり、2%以下の低レベル

の発現であった<sup>3)</sup>。同様のAAV2ベクターを用い、FIXの産生臓器である肝臓を遺伝子導入の標的とした最初の臨床試験では、肝動脈を介してベクターを注入することでFIX発現は10%を超えた。しかし、FIXを遺伝子導入された肝臓細胞のMHCクラスIが

表2 公開されている血友病Bに対する遺伝子治療臨床試験

治療ベクターなど	Phase	スポンサー		状態	ID
scAAV2/8-LP1-hFIXco	Phase 1	National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)	St. Jude Children's Research Hospital	Active, not recruiting	NCT00979238
		Hemophilia of Georgia, Inc.			
		Children's Hospital of Philadelphia			
		University College, London			
TAK-748/SHP648/BAX 355	Phase 1 Phase 2	Takeda		Active, not recruiting	NCT01687608
AMT-060	Phase 1	UniQure Biopharma B.V.		Active, not recruiting	NCT02396342
AMT-061	Phase 2			Active, not recruiting	NCT03489291
	Phase 3			Active, not recruiting	NCT03569891
FLT180a	Phase 1	University College, London		Recruiting	NCT03369444
	Phase 2	Freeline Therapeutics		Recruiting	NCT03641703
	Phase 3				
SPK-9001	Phase 2	Pfizer		Recruiting	NCT03307980
PF-06838435/ fidanacogene elaparvovec	Phase 3			Recruiting	NCT03861273
SB-FIX	Phase 1	Sangamo Therapeutics		Active, not recruiting	NCT02695160
YUVA-GT-F901	Phase 1	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute		Not yet recruiting	NCT03961243

AAVのキャプシドタンパクを抗原提示し、FIX発現肝臓細胞が細胞性免疫により排除され、この免疫応答時の肝逸脱酵素の上昇とともにFIX発現の消失が観察された。さらに、野生型AAVの既感染を起因とする既存の中和抗体（neutralizing antibodies: NAbs）を保有した患者では、AAVベクターによる遺伝子導入が著しく阻害されることが明らかとなった<sup>4)</sup>。AAVベクターを用いた後続の血友病遺伝子治療臨床試験はこの試験結果に基づき、NAbs陰性患者を対象にし、肝臓指向性の高い血清型のAAVを選択して静脈投与により肝臓からFIXおよびFVIIIを発現させ、肝逸脱酵素の上昇時にはステロイドで細胞性免疫応答を抑制することで良好な成績を収めている。

### 3) 血友病B遺伝子治療

AAVベクターを用いた血友病B遺伝子治療の最初

の成功例は、St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) と University College London (UCL) のグループによって報告された<sup>1)</sup>。肝臓への指向性が高い8型AAV (AAV8) ベクターを選択し、遺伝子配列コドン最適化したFIXを搭載したAAV8-coFIXの投与により、1~6%の持続的なFIX発現を実現し、現在もベクター投与後のFIX発現が持続している (NCT00979238)。最近の血友病B臨床試験では、正常型と比較して8倍のFIX活性を示す高活性型バリエーションであるFIX Padua (FIX-R338L) が用いられ、低容量のベクター投与によって正常レベルのFIX発現を可能にしている。FIX Paduaを搭載するAAV8ベクターによる臨床試験として、武田薬品工業が主導するTAK-748 (BAX 335) のベクター用量漸増試験がある (NCT01687608)。8名の血友病B患

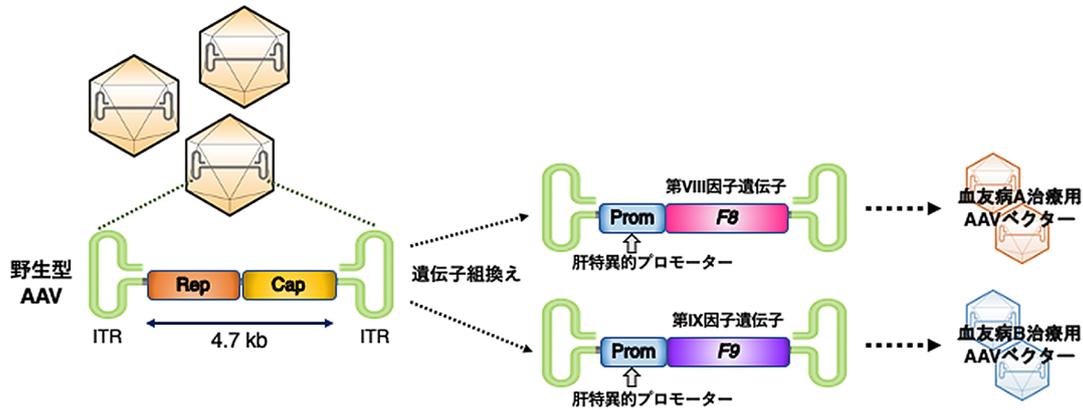


図1 AAVベクターの構造

野生型 AAV は、Rep 遺伝子と Cap 遺伝子の 2 つの遺伝子をコードしている一本鎖 DNA ウイルスである。血友病遺伝子治療では、Rep/Cap 遺伝子の代わりに肝臓特異的プロモーターの下流に FVIII 遺伝子や FIX 遺伝子を配した AAV ベクターが用いられる。

者が 3 つのコホートで治療を受け、1 名で 4 年間の治療レベルの FIX 活性維持が観察された。他の被験者では、治療後 11 週を超えて治療レベルの FIX 活性が維持せず、ステロイド治療による FIX 活性発現も改善しなかった。その要因として、FIX 遺伝子コドン最適化の際に生じた CpG 配列が誘導する自然免疫応答による排除の可能性が考えられている<sup>5)</sup>。

UniQure が主導する AMT-060 の臨床試験では、バキュロウイルスにより作製した AAV5 ベクターを利用している。第 I/II 相試験において、10 名の患者が 2 コホートでコドン最適化した FIX 遺伝子を搭載した AAV5 ベクターの投与を受け、低容量ベクター投与の患者で 4 年間の有意な FIX 発現の維持（各コホートで平均 5.1% と 7.5%）と出血イベントの顕著な減少が観察された。これを受けて UniQure は、AMT-060 試験での 5 年間の追跡調査を発表している。また、FIX Padua を搭載した AAV5 ベクターである AMT-061 (etranacogene dezaparvovec) の第 II 相臨床試験の報告では、3 名の患者が治療後の 36 週において正常レベルの FIX 活性 (30.1~54.1%) を維持した。AMT-061 は忍容性が良好で免疫抑制処置が不要であった。これに続き、AMT-061 の第 III 相 HOPE-B 試験が実施され、54 名の患者が投与を受けた (NCT03569891)。

UCL が主導する新しい遺伝子改変血清型 AAVS3 を使用した FLT180a の第 I 相臨床試験

(NCT03369444) では、免疫抑制を前処置する 4 コホートで実施された。ベクター低用量投与の患者においても、FIX 活性が二年間約 40% を維持するとともに、肝逸脱酵素の上昇を認めない有望な治療成績が報告された。ベクター最大用量投与の患者の 1 名では、FIX 活性が正常値を超え、抗凝固薬による管理が必要とされた。FLT180a の第 II/III 相臨床試験は Freeline が主導し、最大 50 名の被験者を募集している。

Spark Therapeutic から Pfizer に引き継がれた SPK-9001 は、生物工学的に改変した新規血清型 AAV ベクター (AAV-Spark100-FIX-padua) を使用している。第 I/II 相試験では合計 15 名が投与され、最初に治療を受けた 10 名では投与後 12 週で FIX 活性が 14.3%、52 週で 76.8% と正常レベルまでの FIX 増加が報告された。現在、第 III 相試験が行われている。

#### 4) 血友病 A 遺伝子治療

血友病 A では、AAV ベクターの遺伝子長搭載制限から、B ドメインを除いた FVIII (BDDFVIII) が使用される。最初の成功例は、BioMarin が主導する BMN270 (Valoctocogene roxaparvovec, Valrox) である。遺伝子配列コドンを最適化した BDDFVIII を搭載した AAV5 ベクターによる第 I/II 相試験 4 コホートが実施され、投与後の 3 年間の追跡調査が報告された<sup>6)</sup>。低用量を投与された 2 名 ( $6 \times 10^{12}$  vg/kg と  $2 \times 10^{13}$  vg/kg) では FVIII 発現は 1% 未満であった。高

用量の7名と中用量の6名では、投与後約3年後のFVIII発現の中央値はそれぞれ20%と13%であった。この結果を受け、第III相GENEr-1試験では134名の患者に高用量ベクター ( $6 \times 10^{13}$  vg/kg) を投与する用量評価試験が実施された。ごく最近、米国食品医薬品局 (FDA) は、第I/II相試験中に観察された遺伝子発現の大幅な低下、第I/II相試験と第III相試験との乖離により、BioMarinの生物製剤承認申請を一旦棄却し、第III相試験での2年間の追跡データを要求した。

Bayerが主導するAAVhu37ベクター (BAY-2599023) の臨床試験では、これまで3コホートの第I/II相試験で合計6名が治療を受けた。低用量と中用量 ( $0.5$  と  $1 \times 10^{13}$  vg/kg) 投与では、5~20%のFVIII発現が16ヶ月以上維持された。高用量 ( $2 \times 10^{13}$  vg/kg) 投与された2名では、FVIIIレベルが投与28週間後に8~40%に増加し、33週にわたり15%以上のFVIII発現が維持されている<sup>7)</sup>。

Spark Therapeuticsが主導するSPK-8011は、BDDFVIIIを搭載したAAV-LK03 (Spark200) を使用し、2コホートの第I/II相試験で5名が治療を受けた。2年以上の追跡調査から、 $0.5 \times 10^{13}$  vg/kg で6.9~8.4%、 $1 \times 10^{13}$  vg/kg で5.2~19.8%のFVIII発現が維持された。続いて9名が $1 \times 10^{13}$  vg/kg コホートに追加されたが、2名に経口ステロイドで改善できないFVIII発現の低下が報告されている。

PfizerとSangamoが主導するSB-525の第I/II相ALTA試験では、AAV6-BDDFVIIIの高用量投与 ( $3 \times 10^{13}$  vg/kg) により、正常レベル (平均71%) のFVIII発現が1年以上維持する成果を報告した。

FIXの遺伝子治療とは異なり、BioMarinおよびPfizer・Sangamoの血友病A臨床試験では、長期間で徐々にFVIII発現レベルが減衰している。その機序は解明されていないものの、肝実質細胞でのFVIII発現が小胞体ストレスを促進して細胞死を誘導することが起因とも考えられている。遺伝子導入したFVIIIの安定発現の持続期間を推定するためにも注意深い観察が必要である。

## 5) AAVベクターを用いた血友病遺伝子治療の課題

### (1) AAV中和抗体

AAVに対するNAbの保有は、AAVベクターによ

る遺伝子導入を阻害するため、NAb保有患者は遺伝子治療の対象から除外される。また、SJCRH/UCLによる臨床試験でのNAb発現解析から、AAVベクターによる遺伝子治療を受けた患者は、高力価のNAbを保有することが明らかとなった。遺伝子治療を受けた患者において導入治療遺伝子発現が著減した場合には、AAVベクターの再投与が必要となる可能性がある。NAb保有患者およびAAVベクター再投与の戦略として、前臨床試験で様々な手法が検討されている。投与前の体液性免疫の調節、NAbに交差しない血清型への変更、標的細胞の変更、デコイベクターの投与、一時的な免疫抑制、AAV特異的吸着カラムによるNAbの除去などが報告されている<sup>8)</sup>。我々は、門脈アプローチによるAAVベクター投与法を開発し、NAb陽性サルにおいてAAVベクターによる遺伝子導入を可能にした<sup>9)</sup>。

NAb陽性患者へのAAV5ベクターの使用は興味深い。AAV5は欧米においてNAb陽性率が低く、他の血清型に対するNAbほど生体内への遺伝子導入を阻害しないことが報告されている。AAV5ベクターによる臨床試験後に投与前の患者NAbを再解析した結果、NAb陽性患者においても、ある程度の遺伝子発現が得られることが明らかとなった。BioMarinはNAb陽性患者を対象とした臨床試験を予定している (NCT03520712)。ただし、NAb測定は標準化されておらず、個々の臨床試験の解釈が、他の臨床試験に外挿できるかどうかについては注意が必要である。

### (2) インヒビター保有患者への遺伝子治療

インヒビターの発生は、血友病における最も重要な合併症である。これまでの血友病遺伝子治療では、インヒビター既往歴またはインヒビター保有患者を治療の対象から除外している。動物モデルの前臨床試験では、FVIII/FIXに対するインヒビターを保有した場合でも、AAVベクターやレンチウイルスベクターによる肝臓でのFVIII/FIXの発現が免疫寛容を誘導し、インヒビターを消失させることが報告されている。この免疫寛容誘導の主なメカニズムは、免疫応答を負に制御する制御性T細胞の増加が原因とされている。実際にSpark Therapeuticsは、FVIIIインヒビター保有患者を対象としたベクター用量設定

第 I/II 相臨床試験 (SPK-8016) を開始した (NCT03734588)。

### (3) 遺伝子治療の安全性

血友病遺伝子治療における AAV ベクターの安全性評価はこれまでのところ許容範囲内であり、肝逸脱酵素の上昇はステロイドでうまく管理されている。肝障害の原因はキャプシドに対する MHC クラス I の反応性と考えられているが、明らかな用量依存性があり、他の機序も想定される。ごく最近、高用量の AAV8 ベクター (血友病治療の数 100 倍~10 倍) を投与された 17 名の X 連鎖型先天性ミオパチー患児において 3 名の死亡が報告され、少なくとも小児患者群では用量制限毒性が適用されることが示唆されている。これを受け武田薬品工業は、AAV8 ベクターの血友病 A 遺伝子治療 (TAK-754) の第 I/II 相試験への採用を一時停止するという予防措置を講じた。遺伝子治療による長期的なリスクは明らかでないため、通常の試験とは異なる枠組みで長期的フォローが必須と考えられる。世界血友病連盟 (WFH) では、標準化された個々の患者のデータ取得によるレジストリの必要性が唱えられている。

## 4. 血友病に対するゲノム編集遺伝子治療

現在実施されている血友病遺伝子治療の 2 番目の方法は、自然界の DNA 修復システムを利用して開発された遺伝子修正または挿入ツールを使用したゲノム編集治療である。ゲノム編集の結果、是正された標的遺伝子および特異的標的部位に挿入された治療遺伝子は、細胞分裂では希釈されず、生涯にわたる遺伝子発現と小児患者に対する治療を達成可能にするため、魅力的な治療である。一方、遺伝情報が世代を跨ぐ生殖細胞へのゲノム編集は、現在のところ倫理的にも安全性の面でも回避しなければならない。ゲノム編集治療において最も懸念されるのは、オフターゲット効果による DNA 変異のリスクである。オフターゲット効果を減じる技術的工夫とともに、その安全性を評価する必要がある。

### 1) ゲノム編集技術の基礎

ゲノム編集は、特定の DNA 配列を切断するヌクレアーゼにより DNA 二本鎖切断 (double-strand break:

DSB) が引き起こされ、生体が保持する DSB 修復機構によりゲノムが編集される。 *In vitro* や *ex vivo* では容易にゲノム編集のツールを導入・発現させることが可能であるが、これを生体内で治療に用いる場合には、ゲノム編集ツールを効率的に標的細胞へ送達させることが必要となる。DSB を引き起こすヌクレアーゼとして、第一世代のジンクフィンガーヌクレアーゼ (zinc finger nuclease: ZFN)、第二世代の TAL エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease: TALEN)、第三世代の CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR-Associated Proteins 9) がある。ZFN と TALEN は、DNA 結合ドメインが特定の DNA 配列を認識し、制限酵素 FokI の二量体形成により DSB を引き起こす。CRISPR-Cas9 は、ガイド RNA (gRNA) が結合した DNA 部位と PAM (protospacer adjacent motif) 配列を Cas9 が認識し、DSB を引き起こす。CRISPR-Cas9 は gRNA の配列を変更するだけで様々な遺伝子座に DSB を引き起こすことが可能である。ヌクレアーゼにより生じた DSB は、非相同組換え (non-homologous end joining: NHEJ) または相同組換え (homology directed repair: HDR) により修復される。NHEJ では、適切な DNA テンプレートが無い場合、DSB に欠失や挿入を生じる。DNA テンプレートが存在した場合には、NHEJ 部位にノックインが起こる。一方、HDR では修復のためのテンプレート DNA が存在すると、これを鋳型とした精度の高い修復が行われる。この修復過程を経ることから HDR は NHEJ よりも効率が悪い。

### 2) 血友病ゲノム編集治療

血友病に対するゲノム編集治療臨床試験はすでに実施されており、2018 年に Sangamo が ZFN を利用した血友病 B に対するゲノム編集治療第 I/II 相試験を開始した (NCT02695160)。2 種の ZFN と F9 ドナーテンプレートをそれぞれ搭載した AAV6 ベクター (SB-FIX) を 3 コホートで 12 名が治療を受けた。内在性アルブミンプロモーター制御下での FIX 発現を実現するため、アルブミン遺伝子のイントロン 1 の下流に F9 が挿入されるように ZFN と DNA テンプレートが設計されている。この臨床試験の成績は未だ公表されていないが、非ヒト霊長類での前臨

床試験において20～50%程度のFIX発現を実現させた<sup>10)</sup>。Sangamoは現在、*in vivo*送達を上昇させる第2世代ZFNを開発し、SB-FIXの臨床研究を検討している。

ZFNによるゲノム編集治療に追随するのは、ゲノム編集効率が良好なCRISPR-Cas9と考えられるが、まだ臨床試験には達しておらず、前臨床試験が実施されている。我々は、SaCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9)をAAVベクターに搭載し、ほぼ全ての肝実質細胞にCas9が発現可能なこと、FIXcDNAのノックインにより血友病Bマウスの出血が改善することを明らかにした<sup>11)</sup>。この方法はCas9とF9テンプレートの両方をAAV8ベクターに搭載する、デュアルAAVベクターシステムである。Intellia TherapeuticsとApplied Stem Cellはそれぞれ、F9テンプレートを搭載したAAVベクターと脂質ナノ粒子でカプセル化したCas9を投与する、シングルAAVベクターシステムを利用し、非ヒト霊長類を用いた前臨床試験を実施している。

## 5. レンチウイルスベクターを用いた *ex vivo* 血友病遺伝子治療

3番目の血友病遺伝子治療法は、遺伝子挿入型レンチウイルスベクターを用いて自己造血幹細胞へ治療遺伝子を導入し、遺伝子発現細胞を移植する *ex vivo* 遺伝子治療である。AAVベクターは非遺伝子挿入型ベクターであるため、細胞分裂中に導入遺伝子が希釈されることから、終末分化した長命の細胞でのみ安定発現が実現する。これは患者が成長するにつれ治療遺伝子の発現レベルが減衰する可能性を示す。標的細胞ゲノムへ治療遺伝子を挿入し分裂後の細胞に治療遺伝子が伝達可能となれば、この問題が解決される。多くの *ex vivo* 遺伝子治療研究では、宿主ゲノムに効率よく組み込まれるレンチウイルスベクターを使用している。AAVベクターと比較した場合、レンチウイルスベクターには、1) 宿主ゲノム複製時の導入遺伝子希釈の回避、2) NAbs保有率の低さ、3) 搭載遺伝子サイズ制限の拡大などの利点がある。

レンチウイルスベクターを利用した臨床試験では、造血幹細胞にF8またはF9を *ex vivo* で遺伝子導入す

る第I相試験が登録されている (NCT03818763, NCT03961243, NCT03217032)。動物モデルにおいてはインヒビター保有に対する治療効果も明らかとなっている *ex vivo* 治療法<sup>12)</sup>、前者は血小板を標的とし、後者2つは間葉系幹細胞を標的細胞としている。最近、Expression Therapeuticsが申請していた改変型キメラFVIII遺伝子(ET3)を搭載したレンチウイルスベクターによる *ex vivo* 遺伝子治療臨床試験がFDAに承認された。造血幹細胞へET3を導入し、単球を発現標的細胞としてインヒビター保有血友病A患者への展開も視野に入れた臨床試験である(NCT04418414)。これら造血幹細胞移植による *ex vivo* 遺伝子治療では、被験者には一時的な免疫抑制が必要となる。

## 6. おわりに

血友病遺伝子治療は大きな進歩を遂げ、非常に有望な治療法となった。近い将来、血友病に対するAAVベクター治療薬が間もなく市場に投入されると考えられる。現在のところ、NAbs保有の面から全ての患者が対象となるわけではない。また、これまで報告されたNAbs保有率などについても、地域差や測定系の違いで著しく異なる可能性がある。現在臨床開発されている全ての血清型NAbsを比較できるような標準化されたNAbs測定系の構築が必要と考えられる。最近、脊髄性筋萎縮症に対するAAVベクター治療薬ゾルゲンスマが日本国内において薬価1億6千万円で承認された。血友病に対するAAVベクター治療薬についても同程度の価格設定が予測される。一時的にも高額な医薬品費を国民皆保険制度で補償するには、社会全体の理解が必要である。研究者や製薬企業においては、薬価の減額を可能とし、全ての患者を治療の対象にできるような革新的技術開発を推進すべきである。また、一般社会への難治性疾患に対する遺伝子治療薬を認知させるためにも、研究者や医療者側からのアウトリーチ活動も重要となる。

著者全員の利益相反(COI)の開示：  
大森司：研究費(受託研究，共同研究，寄付金等)

(田辺三菱製薬株式会社, ノボノルディスクファーマ)  
 柏倉裕志: 本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

## 文献

- 1) Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM: Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357–2365, 2011.
- 2) Swystun LL, Lillicrap D: Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res* **118**: 1443–1452, 2016.
- 3) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B: AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963–2972, 2003.
- 4) Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Rasko J, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342–347, 2006.
- 5) Konkle BA, Walsh C, Escobar MA, Josephson NC, Young G, von Drygalski A, McPhee SWJ, Samulski RJ, Bilic I, De La Rosa M, Reipert B, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Chapin J, Ewenstein BM, Monahan PE: BAX 335 hemophilia B gene therapy clinical trial results—potential impact of CpG sequences on gene expression. *Blood* 2020.
- 6) Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, Lester W, Symington E, Madan B, Laffan M, Russell CB, Li M, Pierce GF, Wong WY: Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *N Engl J Med* **382**: 29–40, 2020.
- 7) Pipe SW, Ferrante F, Reis M, Wiegmann S, Lange C, Braun M, Michaels LA: First-in-human gene therapy study of AAVhu37 capsid vector technology in severe hemophilia A—BAY 2599023 has broad patient eligibility and stable and sustained long-term expression of FVIII. *Blood* **136**: 44–45, 2020.
- 8) Arruda VR, Samelson-Jones BJ: Gene therapy for immune tolerance induction in hemophilia with inhibitors. *J Thromb Haemost* **14**: 1121–1134, 2016.
- 9) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther* **21**: 318–323, 2013.
- 10) Wechsler T, Meyer KE, Spratt SK, Greengard J, Santiago Y, Sproul S, Surosky R, Paschon DE, Dubois-Stringfellow N, Ando DG, Nichol G, Rebar EJ, Holmes MC: ZFN-mediated gene targeting at the albumin locus in liver results in therapeutic levels of human FIX in mice and non-human primates. *Blood* **126**: 200, 2015.
- 11) Ohmori T, Nagao Y, Mizukami H, Sakata A, Muramatsu SI, Ozawa K, Tominaga SI, Hanazono Y, Nishimura S, Nureki O, Sakata Y: CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Sci Rep* **7**: 4159, 2017.
- 12) Shi Q: Platelet-Targeted Gene Therapy for hemophilia. *Mol Ther Methods Clin Dev* **9**: 100–108, 2018.