



〈特集：特別講演（第31・32回合同年次学術集会より）〉

血友病に対する遺伝子治療の開発動向

富樫朋貴¹⁾、大森 司¹⁾ *

Current Trends in the Development of Gene Therapy for Hemophilia

Tomoki Togashi, Tsukasa Ohmori*

Summary Hemophilia is a congenital bleeding disorder caused by the genetic abnormality of coagulation factor VIII (FVIII) or IX (FIX). Bleeding is treated by administration of the coagulation factor concentrates missing in the blood. Further, regular replacement therapy of coagulation factor is commonly applied to prevent arthropathy in severe patients. It is not hard to imagine that the lifelong need for intravenous injections would be a burden on patients and their families. Therefore, gene therapy is greatly expected to provide long-term hemostatic effects with a single treatment. Current gene therapy for hemophilia involves the intravenous administration of adeno-associated virus (AAV) vectors carrying functional FVIII or FIX genes to express coagulation factors from the liver. Clinical trials have shown promising results with sustained coagulation factor activity at least for several years. Although gene therapy is an extremely effective treatment alternative, there remain several issues to be resolved, including the presence of the patients with anti-AAV neutralizing antibodies that inhibit AAV transduction, duration of therapeutic effects, and immune responses against AAV vector. The development of genome-editing therapies using CRISPR-Cas9, which directly targets the genome, is also rapidly accelerating. Recently, gene therapy for hemophilia A using AAV5 vector was approved in the European Medicines Agency (EMA). It is important to carefully discuss the efficacy and safety of gene therapy drugs in actual clinical practice.

Key words: Hemophilia, Gene therapy, Adeno-associated virus vector, Genome editing

I. 緒言

血友病は第VIII因子 (FVIII)、または第IX因子 (FIX) の遺伝子変異により血漿中の凝固因子が先天的に欠乏する出血性疾患である。

FVIII異常が血友病A、FIX異常が血友病Bとして知られる。両遺伝子はともにX染色体上に位置し、遺伝形式は伴性潜性遺伝である。2021年度の血液凝固異常症全国調査では、日本国内における血友病Aの患者数は5,657人、血友病Bは

¹⁾ 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

¹⁾ Department of Biochemistry, Jichi Medical University
School of Medicine
3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

*連絡先 (責任著者)：大森 司
自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門
Tel: +81- 285-58-7324
E-mail: tohmori@jichi.ac.jp

1,252人と報告され、男性の先天性出血性疾患で最も患者数が多い。重症度は血中の凝固因子活性により、軽症（5-40%）と中等症（1-5%）、重症（1%未満）に分類される。重症患者では繰り返す関節内出血による血友病性関節症がquality of life (QOL) を著しく阻害する。そのため、現在の血友病治療の一つのゴールは関節内出血を予防して患者QOLを保つことである。

現在の血友病に対する主な治療法は、FVIIIまたはFIXの凝固因子製剤を静脈投与するタンパク質補充療法である。FVIIIとFIXの生体内における半減期はそれぞれ8-12時間、16-20時間ときわめて短く、定期的な出血予防には週1-3回の製剤投与が必要となる。ポリエチレングリコールによる化学修飾、アルブミンやIgGのFcドメインとの融合による半減期延長製剤が開発され、注射回数の減少に大きく貢献した。さらに血友病Aに対しては、新しいコンセプトの治療薬であるバイスペシフィック抗体emicizumabが上市され、4週に1回の皮下注射も可能となった。このように血友病治療は急速に進歩し、いわゆるzero bleedingが多く患者で達成することが可能である。そのため、現在の血友病治療の目標は健常者と同等のQOLを実現することである。

一方、血友病は遺伝性疾患のため生涯にわたって治療を継続する必要がある。この患者負担を軽減する治療として、近年、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた*in vivo*遺伝子治療の開発が進められている。最近では複数の臨床試験が第III相まで進み、長期的に凝固因子活性が維持され、年間出血イベントと製剤投与頻度が劇的に減少する有望な成績が得られている。すでに2022年6月には、AAV5ベクターを用いた血友病A治療が欧州医薬品庁 (EMA) にて承認された。本稿では、血友病に対する遺伝子治療に加えて、ゲノム編集治療にも焦点を当て、基礎研究および最近の臨床試験の知見を概説する。

II. 遺伝子治療の概要

現在、主に行われている遺伝子治療は染色体ゲノムを操作するのではなく、外来性に遺伝子

を細胞内に導入する、いわば遺伝子補充療法を指す。遺伝子治療は、治療遺伝子を搭載したベクター（遺伝子の運び屋）を生体内に投与する*in vivo*法と、患者から取り出した細胞に遺伝子を導入し、再び体内に戻す*ex vivo*法に分類される。血友病の遺伝子治療では主にAAVベクターを用いた*in vivo*法が用いられる。AAVベクターを遺伝子の運び屋として、凝固因子の生理的な産生部位である肝臓に機能的な凝固因子遺伝子を発現させる。一方、患者の血液細胞にレンチウイルス (LV) ベクターによって、血液細胞に凝固因子を産生させ、再び体内に戻す*ex vivo*法による遺伝子治療の研究も行われている。

III. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた血友病遺伝子治療

1. AAV ベクターの特徴

AAVはパルボウイルス科に属する、直径約25 nmほどの小さな直鎖一本鎖DNAウイルスである。野生型のAAVゲノムはinverted terminal repeat (ITR) というヘアピン構造を両端に有し、ゲノム複製やパッケージングに関与する非構造タンパク質をコードするRep遺伝子と、カプシドタンパク質やウイルス粒子形成に関わるCap遺伝子を有する。遺伝子治療では、野生型AAVのRep遺伝子とCap遺伝子の領域を、遺伝子発現カセット（プロモーターと治療遺伝子、ポリAシグナル）に置き換えてリコンビナントAAVが使用される。AAVベクターが*in vivo*遺伝子治療に汎用される理由は、(1) ヒトに対して非病原性で免疫原性が低く安全である、(2) 成人の肝臓細胞や中枢神経など終末分化した細胞へ遺伝子導入が可能である、(3) 遺伝子導入後はエピソームに存在し宿主ゲノムへの予期せぬ挿入が起こりにくい、などが挙げられる。また、AAVベクターには多様な血清型が存在し、血友病遺伝子治療では肝細胞に指向性のある血清型を選択する。

2. 搭載遺伝子の工夫

血友病の遺伝子治療では、肝臓で治療遺伝子を発現させるために、トランスサイレチン遺伝子や $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子などのプロ

モーターを用いる。また、タンパク質の翻訳効率を上昇させるために、搭載する治療遺伝子をコドン最適化するのが一般的である。特に、FVIIIのコドン最適化は発現レベルの上昇に有効で、マウスへのAAVベクター投与で血中FVIIIレベルが10倍ほど上昇したと報告されている¹⁾。野生型FVIII cDNAは7 kb以上であり、AAVベクターの搭載可能な遺伝子サイズ (4.7 kb以下) を超過している。そのため、FVIII cDNAのBドメイン (4.5 kb) を除いたFVIII (FVIII-BDD) が用いられる。FVIIIのBドメインは活性化に伴い切断される部位で、凝固活性には影響しない。一方、血友病B遺伝子治療に用いられるFIX cDNAは約1.4 kbと短い。加えて、イントロン1の発現制御領域を挿入することで発現レベルを高めることができる。さらに、血友病B遺伝子治療では機能獲得型変異であるFIX R338L (FIX Padua) を用いることが多い。FIX Paduaは若年性血栓症の家系で同定された変異で、正常FIXの5-10倍の凝固因子活性を有する²⁾。機能獲得型変異を搭載遺伝子に導入することで、より低用量のAAVベクター投与で治療効果を期待できる。

3. 血友病 A 遺伝子治療の臨床試験

血友病に対するAAVベクターを用いた遺伝子治療の主な臨床試験をまとめた (Table 1)。血友病Aに対する遺伝子治療の最初の成功例は

AAV5ベクターを用いたBioMarin社の第I相試験である³⁾。AAV5ベクターは肝臓への遺伝子導入に高用量のベクター投与が必要であるが、AAV5の中和抗体の保有率は低く、中和抗体存在下においても遺伝子導入できる可能性がある。投与から3年後において7名 (6×10^{13} vg/kg) と6名 (4×10^{13} vg/kg) でFVIII活性 (中央値) がそれぞれ20%、13%とやや低下したが、製剤使用の頻度と出血イベントは劇的に改善された⁴⁾。投与から2.6-4.1年後の肝生検ではFVIIIの発現レベルとAAVベクターゲノム定量により、長期的な遺伝子治療の効果が確認されたが⁵⁾、4-5年時点でさらにFVIII活性が低下した。Spark Therapeutics社の第I/II相試験ではヒト肝臓に親和性の高いLK03 (Spark200) を利用した。12名で2年以上にわたりFVIII活性が平均12%ほど維持されている⁶⁾。Bayer社は高い肝臓指向性と中和抗体産生リスクの低さを併せ持つAAVhu37を用い、第I/II相試験のデータが報告され、2名でFVIII活性の5-20%上昇が得られた。Pfizer社とSangamo Therapeutics社はAAV6ベクターによる第I/II相試験を行い、4名で平均46.4%のFVIII活性を2年間維持した。50名を対象とした第III相試験では、一部の参加者で150%以上のFVIII活性が認められ、血栓症の有害事象が認められた (Pfizer社プレスリリース, <https://www.pfizer.com>)。ASC Therapeutics社はAAV8ベクターに改変型FVIIIであるET3を搭載した第I/II相試験

Table 1 血友病遺伝子治療の主な臨床試験

	名称	血清型	搭載遺伝子	スポンサー	段階	状態	試験番号
血友病A	BMN 270	AAV5	FVIIIco-BDD	BioMarin社	I/II	Active, not recruiting	NCT02576795
					I/II	Recruiting	NCT03520712
					III	Active, not recruiting	NCT04323098
					III	Active, not recruiting	NCT03392974
					III	Active, not recruiting	NCT03370913
					I/II	Recruiting	NCT04684940
	SPK-8011	Spark200 (LK03)	FVIIIco-BDD	Spark Therapeutics社	I/II	Recruiting	NCT03003533
	SPK-8016				I/II	Recruiting	NCT03734588
	DTX201	AAVhu37	FVIIIco-BDD	Bayer社, Ultragenix pharmaceutical社	I/II	Recruiting	NCT03588299
	SB-525	AAV6	FVIIIco-BDD	Pfizer社	II	Active, not recruiting	NCT03061201
				III	Active, not recruiting	NCT04370054	
TAK-754 (BAX 888)	AAV8	FVIIIco-BDD	武田薬品工業株式会社	I/II	Active, not recruiting	NCT03370172	
ASC618	AAV8	ET3	ASC Therapeutics社	I/II	Not yet recruiting	NCT04676048	
AAV8-HLP-hFVIII-V3	AAV8	FVIIIco-BDD-V3	University College London	I	Recruiting	NCT03001830	
AAV2/8-LP1-hFIXco	AAV8	FIXco	University College London / St. Jude Children's Research Hospital	I	Active, not recruiting	NCT00979238	
AskBio009 (BAX 335)	AAV8	FIXco (R338L)	武田薬品工業株式会社	I/II	Active, not recruiting	NCT01687608	
AMT-061	AAV5	FIXco (R338L)	CSL Behring社	II	Active, not recruiting	NCT03489291	
				III	Active, not recruiting	NCT03569891	
血友病B	SPK-9001	Spark100	FIXco (R338L)	Pfizer社	II	Recruiting	NCT03307980
					III	Active, not recruiting	NCT03861273
	FLT180a	AAV53	FIXco (R338L)	Freeline Therapeutics社	II	Recruiting	NCT03641703
					I/II	Recruiting	NCT05164471
	BBM-H901	AAV1およびAAV6	FIXco (R338L)	Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital Shanghai Belief-Delivery BioMed Co., Ltd	I	Active, not recruiting	NCT04135300
				I/II	Recruiting	NCT05203679	

o: コドン最適化, FVIII-BDD: Bドメイン欠損型FVIII

を計画中である。ET3はブタとヒトのキメラ凝固因子であり、FVIIIの産生効率が通常のFVIII-BDDと比較して10倍以上改善しており、低用量のベクター投与で治療効果が期待できる。University College LondonはBドメイン内に存在する6ヶ所の糖鎖修飾部位を加えたFVIII (FVIII-N6) を搭載したAAV8ベクターを利用している。第III相試験で 2×10^{12} vg/kgの投与を受けた3名中1名でFVIII活性が69%にまで上昇した。血友病A遺伝子治療では、血友病Bと比較して、経時変化において徐々にFVIII活性が低下するように見受けられる。AAVベクター投与後にFVIII活性が減衰する機序は未だ明らかでないが、FVIIIを肝実質細胞で異所性に発現させることで、小胞体ストレス応答を惹起し、細胞死が誘導される可能性が指摘されている⁷⁾。

4. 血友病 B 遺伝子治療の臨床試験

血友病Bに対する遺伝子治療の最初の成功例はNathwaniらによって報告された⁸⁾。コドン最適化した野生型FIXを搭載したAAV8ベクターを投与し、3.2年後に1-6%のFIX活性を維持した⁹⁾。現在も経過観察が継続中で、少なくとも8.5年は同様の凝固因子活性が得られている。UniQure社はバキュロウイルスにより作製したAAV5ベクターを利用した第I相試験を実施し、 5×10^{12} vg/kgで投与を受けたグループではFIX活性が約4%上昇し、 2×10^{13} vg/kgの投与で約7%のFIX活性を維持した¹⁰⁾。また、FIX製剤の使用回数と出血イベントが著減し、その後5年間のフォローアップでもFIX発現が安定している。また、FIX Padua搭載AAV5ベクターを利用した第II相試験では、26週時点で33.2-57.0%にまで上昇した¹¹⁾。第III相試験では54名で投与から6カ月後に平均37.2%のFIX活性が維持された。Pfizer社は新規血清型のAAVベクター (AAV-Spark100) に、FIX Paduaを搭載したSPK-9001を利用した¹²⁾。SPK-9001の投与を受けた10名でFIX活性が14.3-76.8%維持され、4年後には2名の患者でFIX活性がそれぞれ26.3%、11.8%維持された。Freeline Therapeutics社はヒト肝臓細胞への遺伝子導入効率を高めたAAVS3ベクターに、FIX Paduaを搭載したFLT180aの開発を進めている。第I/II相試験において、投与か

ら2年以上経過した時点で、9名中5名が51-78%、3名が23-43%とFIX活性が維持される有望な成績を取めた¹³⁾。このうち1名でFIX活性が約250%に達し、抗凝固薬による血栓症治療が必要となった。最近、中国において肝臓指向性が高い改変型AAVベクターにFIX Paduaを搭載して遺伝子治療を行った第I相試験の成績が報告された¹⁴⁾。投与を受けた10名で1年経過後もFIX活性が平均36.9%維持される結果であった。本試験は、アジア人の血友病B患者で遺伝子治療の有効性を示す世界初の臨床試験である。

5. AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療の課題

(1) AAV中和抗体保有患者への対応

AAVベクターは治療遺伝子の優れたデリバリーシステムであるが、克服すべき課題も残されている。最も重要な課題は、AAVの既感染に伴う中和抗体の存在である。AAVは自然界に存在するウイルスであり、既感染によって中和抗体を保有している患者が存在する。我々は国内の血友病患者216名の9種類のAAV血清型に対する中和抗体価を測定し、20~30%の患者が中和抗体陽性であることを報告した¹⁵⁾。中和抗体陽性患者では静脈投与された多くのAAVベクターが治療効果を発揮できない。また、AAVベクター投与後もAAVに対する中和抗体が産生されるため、治療効果が減弱しても再投与ができない。中和抗体の回避方法として、異なる血清型のAAVベクター再投与や¹⁶⁾、経門脈投与方法が報告されている¹⁷⁾。また、LeborgneらはAAVベクター投与前にIgG分解酵素によって血中の中和抗体レベルを低下させ、再投与を可能とする方法を報告している¹⁸⁾。

(2) インヒビター保有患者を対象とした遺伝子治療

血友病患者は投与された凝固因子製剤を異物と認識して、凝固因子に対する抗体 (インヒビター) が生じる場合がある。インヒビターが生じると凝固因子製剤の治療効果は期待できない。インヒビター発生率は血友病Aで20-30%、血友病Bでは10%程度で、重症患者で発生率が高い。血友病遺伝子治療の臨床試験では、イン

ヒビター保有患者および既往がある患者は対象から除外されている。一方で、インヒビター保有の動物モデルを対象とした遺伝子治療では、FVIIIおよびFIXの持続発現が免疫寛容を誘導し、インヒビターを消失させるとの報告がある。Spark Therapeutics社はFVIIIインヒビター保有患者における遺伝子治療の有効性を評価する第II相試験を進めている。

(3) ヒト肝臓へ高い指向性を有する改変型AAVベクターの開発

遺伝子導入の標的細胞に指向性の特異性、導入効率を高める改変型AAVベクターも活発に開発されている。例えば、マウス肝臓への遺伝子導入ではAAV8ベクターが優れるが、ヒト肝臓への導入効率は低い。ヒト肝臓への遺伝子導入効率を高めるために、ランダム変異導入およびDNAシャッフリングによる分子進化法や、カプシドの構造理解に基づく合理設計によりAAVベクターの改変が盛んに行われている。例えば、Spark Therapeutics社が臨床試験で使用しているAAV-LK03は、AAV8ベクターでは遺伝子導入効率が低いヒト初代肝細胞やヒト肝細胞移植マウスで高効率な遺伝子導入を可能とした¹⁹⁾。

(4) AAVのゲノム毒性

AAVベクターの一部は染色体DNAに挿入される。マウス実験ではAAVゲノム挿入が肝臓がん発症に関連すると報告されている^{20,21)}。このマウスの肝臓がん発症にはAAVに搭載したプロモーター活性が影響することが示唆されており、特にCAGプロモーターなどのユビキタなプロモーターを使用した際に生じる。SabatinoらはAAVベクターを投与した血友病Aイヌモデルの10年間の経過観察を報告した。2頭でFVIII活性が上昇し続け、細胞増殖やがん関連遺伝子へのAAVゲノムの挿入が観察され、クローン性の細胞増殖を引き起こした可能性がある²²⁾。現段階でヒト臨床試験でAAVベクター投与が明らかな肝臓がんの発症に関与した報告はないが、慎重な経過観察が必要である。

(5) 大量AAVベクター投与時の重篤な有害事象 (SAE)

遺伝性の神経疾患の治療に用いるAAVベクター量は血友病と比較して、かなり多い。この大量のAAVベクターを投与した際のSAEがいくつか報告されている。X連鎖性ミオチューブラーミオパチーの遺伝子治療試験では、大量のAAV8ベクター (3.0×10^{14} vg / kg) 投与を受けた17例のうち3例が重度の肝障害により死亡した²³⁾。Pfizer社が主導するDuchenne型筋ジストロフィ遺伝子治療薬 (PF-06939926) の臨床試験では、大量のAAV9ベクター (1.0×10^{14} または 3.0×10^{14} vg / kg) 投与により、補体活性化に関連した急性腎障害とそれに伴う血小板減少が確認されている。血友病で使用するベクター量は、これらと比較すると低用量であるが、ベクターの免疫反応に対する安全性を考慮すると低用量での治療が望ましい。

IV. レンチウイルス (LV) ベクターを用いた血友病遺伝子治療

1. LV ベクターの特徴

血友病遺伝子治療にレンチウイルス (LV) ベクターを用いる戦略がある。AAVベクターと最も異なる性質は染色体DNAに挿入し、永続的に遺伝子発現が可能な点である。LVベクターはレトロウイルスベクターの一種であり、ヒト免疫不全ウイルスI型 (HIV-1) やサル免疫不全ウイルス (SIV) を基に、HIV-1に由来するウイルスの複製に必要な修飾遺伝子と制御遺伝子が除かれている。また、レトロウイルスベクターによる白血病化の際に問題となったlong terminal repeat配列 (LTR) のエンハンサーとプロモーター領域を除き、更に安全性を高めている (自己不活性化: self-inactivation)。また、LVベクターは中和抗体保有患者が少ない。そのため、AAV中和抗体を保有する血友病患者の選択肢となり得る。また、血友病Aでは遺伝子サイズが大きい全長のFVIII cDNAを搭載できる利点もある。

2. LV ベクターを用いた血友病遺伝子治療

LVベクターを用いた血友病の遺伝子治療には、造血幹細胞を生体から採取し、遺伝子導入後に再び体内に戻す*ex vivo*遺伝子治療がある。

基礎研究レベルでは、*GPIBA*プロモーターを用いて血小板特異的にFVIIIを発現させ、止血部位にFVIIIをデリバリーすることで、血友病Aマウスの止血に有効であると報告がある²⁴⁾。血小板で発現したFVIIIはインヒビター存在下においても治療効果を発揮できる^{25, 26)}。実際に、血小板や間葉系細胞を標的とした血友病治療の臨床試験が予定されている (NCT03818763, NCT03217032)。

さらに、LVベクターを直接体内に投与する*in vivo*遺伝子治療も開発されている。Cantoreらは血友病BイヌへのFIX搭載LVベクターを投与し、FIX活性の上昇は1%程度であるが凝固時間が大幅に改善した²⁷⁾。LVベクターによる*in vivo*遺伝子治療では、治療遺伝子の発現効率が低い、これはLVベクターが標的細胞に感染する前にマクロファージにより貪食されることに起因する。MilaniらはLVベクターのマクロファージによる貪食を回避するために、マクロファージの貪食作用を阻害するCD47を発現するパッケージング細胞を用いてLVベクターを作製した。この方法で作製したLVベクターをサルに投与すると、免疫応答を誘導せずに肝臓でFVIIIまたはFIXを長期的に発現させることが可

能となった²⁸⁾。さらに近年、FVIIIのコドン最適化とXTENポリペプチドの融合による半減期延長で、血友病Aマウスおよび非ヒト霊長類において正常域のFVIII活性維持に成功したと報告された²⁹⁾。

V. 血友病に対する *in vivo* ゲノム編集治療

1. ゲノム編集の概要

ゲノムに直接アプローチをおこなうゲノム編集による治療法の開発も進んでいる。ゲノム編集はzinc finger nuclease (ZFN)、transcription activator-like effector nuclease (TALEN) やCRISPR-Cas9などのヌクレアーゼにより標的の遺伝子座にDNA二本鎖切断 (DSB) が可能になり実現された。特にCRISPR-Casシステムは標的遺伝子座に相同性をもつgRNA配列を変えるだけでターゲット領域を変更できる。タンパク質レベルで設計が必要となるZFNやTALENよりも扱いやすく、急速に基礎研究の分野に広がった。ヌクレアーゼによって生じたDSB部位はDNA修復機構である非相同末端結合によって遺伝子の欠失によるノックアウトを引き起こす (Fig. 1)。修復配列となるテンプレート配列

	名称	血清型	搭載遺伝子	スポンサー	段階	状態
血友病A	BMN 270	AAV5	FVIIIco-BDD	BioMarin社	I/II	Active, not recruiting I/II Recruiting III Active, not recruiting III Active, not recruiting III Active, not recruiting I/II Recruiting
	SPK-8011	Spark200 (LK03)	FVIIIco-BDD	Spark Therapeutics社	I/II	Recruiting
	SPK-8016				I/II	Recruiting
	DTX201	AAVhu37	FVIIIco-BDD	Bayer社, Ultragenix pharmaceutical社	I/II	Recruiting
	SB-525	AAV6	FVIIIco-BDD	Pfizer社	II	Active, not recruiting
	TAK-754 (BAX 888)	AAV8	FVIIIco-BDD	武田薬品工業株式会社	I/II	Active, not recruiting
	ASC618	AAV8	ET3	ASC Therapeutics社	I/II	Not yet recruiting
	AAV8-HLP-hFVIII-V3	AAV8	FVIIIco-BDD-V3	University College London	I	Recruiting
	AAV2/8-LP1-hFIXco	AAV8	FIXco	University College London / St. Jude Children's Research Hospital	I	Active, not recruiting
	AskBio009 (BAX 335)	AAV8	FIXco (R338L)	武田薬品工業株式会社	I/II	Active, not recruiting
AMT-061	AAV5	FIXco (R338L)	CSL Behring社	II	Active, not recruiting	
血友病B	SPK-9001	Spark100	FIXco (R338L)	Pfizer社	II	Recruiting
	FLT180a	AAV53	FIXco (R338L)	Freeline Therapeutics社	III	Active, not recruiting
					II	Recruiting
	BBM-H901	AAV1およびAAV6	FIXco (R338L)	Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital Shanghai Belief-Delivery BioMed Co., Ltd	I	Active, not recruiting
				I/II	Recruiting	

: コドン最適化, FVIII-BDD; Bドメイン欠損型FVIII

Fig. 1 *In vivo*ゲノム編集治療

Cas9-gRNAがターゲット領域にDNA二本鎖切断を引き起こす。DNAが切断されると宿主のDNA修復機構が誘導される。非相同末端結合 (NHEJ) により修復されるとindel変異が導入され、遺伝子機能が破壊される。AAVベクターで正常配列のドナーを送達すると、NHEJと相同組換え (HDR) によるDNA修復時に治療遺伝子がゲノムにノックインされる。一部の図はBioRenderを用いて作成された。

が存在する場合には、効率は悪いが相同組換えや挿入による遺伝子のノックインが可能である(図1)。胚や卵子・精子など、生殖細胞のゲノム編集治療は倫理的・安全性の問題から禁止されている。現在は、体細胞や組織幹細胞を標的としたゲノム編集治療の開発が行われている。ゲノム編集ツールを用いた遺伝子ノックアウトによる臨床試験が徐々に進んでおり、トランスサイレチンアミロイドーシス、鎌状赤血球症・βサラセミアに対して有効な臨床試験の結果が報告されている^{30,31)}。

2. 血友病 *in vivo* ゲノム編集治療の基礎研究と臨床開発

血友病の*in vivo*ゲノム編集治療に対する研究をいくつか紹介する。肝臓を標的とした場合、*in vivo*でどのようにゲノム編集ツールを送達するかが課題であったが、AAVベクターを利用してゲノム編集ツールを肝臓に届ける*in vivo*ゲノム編集治療が開発された。LiらはZFNを搭載したAAVベクターによりFIXイントロン1にDSBを誘導し、正常FIX cDNAを挿入することで血友病Bマウスの出血傾向を改善した³²⁾。また、同様にアルブミン遺伝子座にDSBを引き起こし、FIX cDNAを挿入する治療戦略も報告されている³³⁾。肝臓特異的かつ強力なプロモーターを有するアルブミン遺伝子座をターゲットとすることで高いFIX活性を実現できる。Sangamo Therapeutics社は同手法で血友病Bゲノム編集治療の第III相試験を施行したが、結果は非公開で2021年2月に開発中止となった(NCT02695160)。我々は黄色ブドウ球菌由来のCas9 (SaCas9) を搭載したAAVベクターでDSBを誘導しFIX cDNAを挿入することで、血友病Bマウスの治療に成功した³⁴⁾。また、血友病Aにおいても、肝実質細胞のアルブミン遺伝子座へのFVIIIのノックインによる表現型改善が報告されている³⁵⁾。

近年、AAVベクターに代わるゲノム編集ツールのデリバリーシステムとして脂質ナノ粒子(LNP)が注目されている。Cas9 mRNAとgRNAを包含するLNPを静脈投与することで肝臓にCas9を一過性に発現させられる。治療効果が減衰した場合にも再投与可能でLNPを使用するメリットは多い。Intellia Therapeutics社はLNPを使用してトランスサイレチンアミロイドーシス

の*in vivo*ゲノム編集治療を行い、血中トランスサイレチンの80%以上の低下を実現している(NCT04601051)³⁰⁾。さらに、同社はCas9-gRNAをLNPで、正常FIX cDNAのドナー配列をAAVベクターにより導入する*in vivo*ゲノム編集で、マウスと非ヒト霊長類においてFIX活性の維持に成功している。この他に、凝固系のプレキとして機能するアンチトロンビンの遺伝子(*Selpin1*)を化膿レンサ球菌由来のCas9 (SpCas9)でノックダウンし、血友病AおよびBマウスの治療に成功した報告もある³⁶⁾。

3. *In vivo* ゲノム編集が抱える課題と今後の展開

ゲノム編集治療の解決すべき課題として、ターゲット遺伝子以外の非特異的なゲノム編集であるオフターゲット効果による予期せぬゲノム編集に対する懸念がある。また、DSBにより大欠失や染色体転座が誘導されることが報告されている³⁷⁾。これらのDSBに伴うゲノム毒性を低減するゲノム編集として、変異を塩基レベルで修正する塩基編集が注目されている。塩基編集ではDSBを引き起こさないCas (Nickase) と脱アミノ化酵素を組み合わせることで特定の塩基(C to TまたはA to G)を書き換える³⁸⁾。塩基編集では、疾患に関連する既報の一塩基置換のうち、約60%を正常配列に修正できる³⁹⁾。さらに、gRNA配列に修復用のRNA配列を連結させ、逆転写酵素によってDNAを修復させるPrime Editingの技術も報告された⁴⁰⁾。塩基編集やPrime Editingは個々の患者変異に対応できる究極の個別化医療を実現できる次世代の治療法として今後の臨床応用が期待されている。

VI. おわりに

血友病に対する遺伝子治療は急速な進歩を遂げ、血友病の治療を目指す画期的な治療法となった。ごく最近、EMAで血友病Aに対する遺伝子治療薬が承認され、今後、更に複数の製剤が承認される見込みである。現段階では治療開発が先行しているが、長期的な安全性評価と倫理面での議論を慎重に進めることも重要である。日本国内でも2020年に脊髄性筋萎縮症(SMA)に対するAAVベクター遺伝子治療薬

onasemnogene abeparavovecが承認され、約1億7,000万円の薬価となり注目を集めた。血友病に対する遺伝子治療薬もかなり高額となることが予測される。生涯のトータルコストを考慮すると安価かもしれないが、国民皆保険制度を採用している日本において高額な遺伝子治療薬をどのように患者に平等に届けるか、そのための課題を抽出し、解決していく必要がある。

利益相反は以下のとおり：富樫朋貴について、申告すべき利益相反はない。大森 司について、田辺三菱製薬株式会社から研究費、中外製薬株式会社、ノボノルディスクファーマより講演料を得ている。

文献

- 1) McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, Lee D, Rabbianian S, Raj D, Patel N, Tuddenham EG, Christophe OD, McVey JH, Waddington S, Nienhuis AW, Gray JT, Fagone P, Mingozzi F, Zhou SZ, High KA, Cancio M, Ng CY, Zhou J, Morton CL, Davidoff AM, and Nathwani AC: Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*, 121: 3335-3344, 2013.
- 2) Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, and Arruda VR: X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua) . *N Engl J Med* 361: 1671-1675, 2009.
- 3) Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, Laffan M, Yu H, Vettermann C, Pierce GF, Wong WY, and Pasi KJ: AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med*, 377: 2519-2530, 2017.
- 4) Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, Lester W, Symington E, Madan B, Laffan M, Russell CB, Li M, Pierce GF, and Wong WY: Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *N Engl J Med*, 382: 29-40, 2020.
- 5) Fong S, Yates B, Sihn CR, Mattis AN, Mitchell N, Liu S, Russell CB, Kim B, Lawal A, Rangarajan S, Lester W, Bunting S, Pierce GF, Pasi KJ, and Wong WY: Interindividual variability in transgene mRNA and protein production following adeno-associated virus gene therapy for hemophilia A. *Nat Med*, 28: 789-797, 2022.
- 6) George LA, Monahan PE, Eyster ME, Sullivan SK, Ragni MV, Croteau SE, Rasko JEJ, Recht M, Samelson-Jones BJ, MacDougall A, Jaworski K, Noble R, Curran M, Kuranda K, Mingozzi F, Chang T, Reape KZ, Anguela XM, and High KA: Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *N Engl J Med*, 385:1961-1973, 2021.
- 7) Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, and Kaufman RJ: Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 18525-18530, 2008.
- 8) 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, and Davidoff AM: Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 365 : 2357-2365, 2011.
- 9) Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen YM, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CY, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, and Davidoff AM: Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*, 371: 1994-2004, 2014.
- 10) Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R, Tangelder M, Castaman G, Schwäble J, Bonig H, Seifried E, Cattaneo F, Meyer C, and Leebeek FWG: Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood*, 131:1022-1031, 2018.
- 11) Von Drygalski A, Giermasz A, Castaman G, Key NS, Lattimore S, Leebeek FWG, Miesbach W, Recht M, Long A, Gut R, Sawyer EK, and Pipe SW: Etranacogene dezaparvovec (AMT-061 phase 2b) : normal/near normal FIX activity and bleed cessation in hemophilia B. *Blood Adv*, 3: 3241-3247, 2019.
- 12) George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, Cuker A, Sullivan LM, Majumdar S, Teitel J, McGuinn CE, Ragni MV, Luk AY, Hui D, Wright JF, Chen Y, Liu Y, Wachtel K, Winters A, Tiefenbacher S, Arruda VR, van der Loo JCM, Zelenia O, Takefman D, Carr ME, Couto LB, Anguela XM, and High KA: Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N Engl J Med*, 377: 2215-2227, 2017.
- 13) Chowdary P, Shapiro S, Makris M, Evans G, Boyce S,

- Talks K, Dolan G, Reiss U, Phillips M, Riddell A, Peralta MR, Quaye M, Patch DW, Tuddenham E, Dane A, Watissée M, Long A, and Nathwani A: Phase 1-2 trial of AAVS3 gene therapy in patients with hemophilia B. *N Engl J Med*, 387: 237-247, 2022.
- 14) Xue F, Li H, Wu X, Liu W, Zhang F, Tang D, Chen Y, Wang W, Chi Y, Zheng J, Du Z, Jiang W, Zhong C, Wei J, Zhu P, Fu R, Liu X, Chen L, Pei X, Sun J, Cheng T, Yang R, Xiao X, and Zhang L: Safety and activity of an engineered, liver-tropic adeno-associated virus vector expressing a hyperactive Padua factor IX administered with prophylactic glucocorticoids in patients with haemophilia B. a single-centre, single-arm, phase 1, pilot trial. *Lancet Haematol*, 9: e504-e513, 2022.
 - 15) Kashiwakura Y, Baatarsogt N, Yamazaki S, Nagao A, Amano K, Suzuki N, Matsushita T, Sawada A, Higasa S, Yamazaki N, Fujii T, Ogura T, Takedani H, Taki M, Matsumoto T, Yamanouchi J, Sakai M, Nishikawa M, Yatomi Y, Yada K, Nogami K, Hiramoto T, Hayakawa H, Kamoshita N, Kume A, Mizukami H, Ishikawa S, Sakata Y, and Ohmori T: The seroprevalence of neutralizing antibodies against the adeno-associated virus capsids in Japanese hemophiliacs. *medRxiv*, 2022.
 - 16) Majowicz A, Salas D, Zabaleta N, Rodríguez-García E, González-Aseguinolaza G, Petry H, and Ferreira V : Successful repeated hepatic gene delivery in Mice and non-human primates achieved by sequential administration of AAV5ch and AAV1. *Mol Ther*, 25: 1831-1842, 2017.
 - 17) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, and 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.
 - 18) Leborgne C, Barbon E, Alexander JM, Hanby H, Delignat S, Cohen DM, Collaud F, Muraleetharan S, Lupo D, Silverberg J, Huang K, van Wittengerghe L, Marolleau B, Miranda A, Fabiano A, Daventure V, Beck H, Anguela XM, Ronzitti G, Armour SM, Lacroix-Desmazes S, and Mingozzi F : IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nat Med*, 26: 1096-1101, 2020.
 - 19) Lisowski L, Dane AP, Chu K, Zhang Y, Cunningham SC, Wilson EM, Nygaard S, Grompe M, Alexander IE, and Kay MA: Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature*, 506: 382-386, 2014.
 - 20) Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T and Sands MS: Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther*, 8:1343-1346, 2001.
 - 21) Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, and Sands MS: AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*, 317:477, 2007.
 - 22) Nguyen GN, Everett JK, Kafle S, Roche AM, Raymond HE, Leiby J, Wood C, Assenmacher CA, Merricks EP, Long CT, Kazazian HH, Nichols TC, Bushman FD, and Sabatino DE: A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat Biotechnol*, 39: 47-55, 2020.
 - 23) High-dose AAV gene therapy deaths. *Nat Biotechnol*, 38: 910, 2020.
 - 24) Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J*, 20: 1522-1524, 2006.
 - 25) Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Weiler H, Wells CW, Cooley BC, Desai D, Morateck PA, Gorski J, and Montgomery RR: Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J Clin Invest*, 116:1974-1982, 2006.
 - 26) Shi Q, Fahs SA, Wilcox DA, Kuether EL, Morateck PA, Mareno N, Weiler H, and Montgomery RR: Syngeneic transplantation of hematopoietic stem cells that are genetically modified to express factor VIII in platelets restores hemostasis to hemophilia A mice with preexisting FVIII immunity. *Blood*, 112: 2713-2721, 2008.
 - 27) Cantore A, Ranzani M, Bartholomae CC, Volpin M, Valle PD, Sanvito F, Sergi LS, Gallina P, Benedicenti F, Bellinger D, Raymer R, Merricks E, Bellintani F, Martin S, Doglioni C, D'Angelo A, VandenDriessche T, Chuah MK, Schmidt M, Nichols T, Montini E, and Naldini L: Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B. *Sci Transl Med*, 7: 277ra28, 2015.
 - 28) Milani M, Annoni A, Moalli F, Liu T, Cesana D, Calabria A, Bartolaccini S, Biffi M, Russo F, Visigalli

- I, Raimondi A, Patarroyo-White S, Drager D, Cristofori P, Ayuso E, Montini E, Peters R, Iannaccone M, Cantore A, and Naldini L: Phagocytosis-shielded lentiviral vectors improve liver gene therapy in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 11: eaav7325, 2019.
- 29) Milani M, Canepari C, Liu T, Biffi M, Russo F, Plati T, Curto R, Patarroyo-White S, Drager D, Visigalli I, Brombin C, Albertini P, Follenzi A, Ayuso E, Mueller C, Annoni A, Naldini L, and Cantore A: Liver-directed lentiviral gene therapy corrects hemophilia A mice and achieves normal-range factor VIII activity in non-human primates. *Nat Commun*, 13: 2454, 2022.
- 30) Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, Seitzer J, O'Connell D, Walsh KR, Wood K, Phillips J, Xu Y, Amaral A, Boyd AP, Cehelsky JE, McKee MD, Schiermeier A, Harari O, Murphy A, Kyratsous CA, Zambrowicz B, Soltys R, Gutstein DE, Leonard J, Sepp-Lorenzino L, and Lebowitz D: CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 385: 493-502, 2021.
- 31) Frangoul H, Altschuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, Foell J, de la Fuente J, Grupp S, Handgretinger R, Ho TW, Kattamis A, Kernytsky A, Lekstrom-Himes J, Li AM, Locatelli F, Mapara MY, de Montalembert M, Rondelli D, Sharma A, Sheth S, Soni S, Steinberg MH, Wall D, Yen A, and Corbacioglu S: CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia: *N Engl J Med*, 384: 252-260, 2021.
- 32) Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, and High KA: In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 475: 217-221, 2011.
- 33) Sharma R, Anguela XM, Doyon Y, Wechsler T, DeKolver RC, Sproul S, Paschon DE, Miller JC, Davidson RJ, Shivak D, Zhou S, Rieders J, Gregory PD, Holmes MC, Rebar EJ, and High KA: In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood*, 126 :1777-1784, 2015.
- 34) Ohmori T, Nagao Y, Mizukami H, Sakata A, Muramatsu SI, Ozawa K, Tominaga SI, Hanazono Y, Nishimura S, Nureki O, and Sakata Y : CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Sci Rep*, 7: 4159, 2017.
- 35) Chen H, Shi M, Gilam A, Zheng Q, Zhang Y, Afrikanova I, Li J, Gluzman Z, Jiang R, Kong LJ, and Chen-Tsai RY: Hemophilia A ameliorated in mice by CRISPR-based in vivo genome editing of human Factor VIII. *Sci Rep*, 9: 16838, 2019.
- 36) Han JP, Kim M, Choi BS, Lee JH, Lee GS, Jeong M, Lee Y, Kim EA, Oh HK, Go N, Lee H, Lee KJ, Kim UG, Lee JY, Kim S, Chang J, Lee H, Song DW, and Yeom SC: In vivo delivery of CRISPR-Cas9 using lipid nanoparticles enables antithrombin gene editing for sustainable hemophilia A and B therapy. *Sci Adv*, 8: eabj6901, 2022.
- 37) Kosicki M, Tomberg K, and Bradley A: Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 36: 765-771, 2018.
- 38) Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, and Liu DR: Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551: 464-471, 2017.
- 39) Rees HA, Liu DR: Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 19: 770-788, 2018.
- 40) Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, and Liu DR: Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576:149-157, 2019.