

表 題 AAV ベクターを用いた遺伝子治療法における免疫反応の影響の解析
とその制御

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 綿野 亮太

担当指導教員氏名 水上 浩明 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系
生体分子医学
分子医学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

1. はじめに	2
2. 研究方法	6
2.1 細胞株、プラスミド、および AAV ベクターの調製	6
2.2 動物実験	7
2.3 中和抗体検出法	7
2.4 ブタ組織における AAV8 ベクター DNA の定量	8
2.5 血清中の抗 AAV8 抗体の検出	9
2.6 AAV ベクターリポソーム化の検討	9
2.7 統計学的分析	10
3. 研究結果・遺伝子治療におけるマイクロミニピッグの有用性の検討	11
3.1 実験タイムライン	11
3.2 AAV ベクター静脈内投与後の肝臓での遺伝子発現（#1）	12
3.3 AAV ベクター静脈内投与後の組織内のベクターゲノムの定量（#1）	13
3.4 AAV ベクター静脈内投与後の各組織での遺伝子発現（#2-5）	14
3.5 AAV ベクター静脈内投与後の組織内のベクターゲノムの定量（#2-5）	17
3.6 AAV8 に対する NAb 力価と抗 AAV8 IgG 量の比較	19
4. 研究結果・AAV ベクター中和抗体回避法や中和抗体検出法の検討	21
4.1 AAV ベクターリポソーム化の検討	21
4.2 新たな原理に基づく中和抗体検出法の検討	25
5. 考察	27
6. 結論	35
7. 参考文献	36
8. 謝辞	48

1. はじめに

現在、世界的に Adeno-associated virus (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療の研究が行われている。AAV ベクターは、非病原性ウイルス由来で安全性が高く、広範な細胞に遺伝子導入が可能で導入遺伝子が長期にわたり発現するといった利点があり、遺伝子治療に適している。さまざまな疾患状態の臨床応用が進行中であり、いくつかの成功例が報告されている¹⁾。

肝臓は、複数の代謝経路における主要な調節臓器であり、血漿タンパク質を産生するための重要な器官である。いくつかの遺伝性代謝疾患は特定の遺伝子異常が原因であると考えられている。このような疾患に対する遺伝子治療は、効果的な治療となる可能性が期待されている。近年、肝臓を標的とした AAV ベクターを使用した遺伝子治療は、いくつかの単一遺伝子変異疾患の臨床的改善を達成し、治療選択肢の一つとなりつつある²⁾。例えば、血友病は、単一遺伝子変異によって引き起こされる疾患であるため、AAV ベクターを使用した遺伝子治療の最適な候補疾患の 1 つであり、多数の臨床試験が実施されている³⁾。血友病は凝固因子活性の安全域が広く発現レベルを制御する必要がないこと、凝固因子活性が 1%未満の重症例の場合、数%の活性増加によって劇的な治療効果が得られること、予防的な効果が期待できること、などの点から遺伝子治療が有望であると考えられている。血友病 B マウスおよび犬のモデルでは、AAV ベクターを

用いて、生涯にわたる持続的な導入遺伝子発現が実証された。ヒトにおいても肝臓を標的とする AAV8 ベクターを使用した血友病 B 遺伝子治療の成功が報告されており^{4,5}、その臨床応用は近年さらに進歩している⁶。血友病 A 遺伝子治療の成功例も 2017 年に報告された⁷。

AAV は非病原性ウイルスであるが、野生型ウイルスは自然界に広く分布している。AAV への曝露は人生の早い時期に始まり⁸⁻¹⁰、ヒトの約半分が中和抗体 (NAb) 陽性とされている¹¹⁻¹⁴。日本人における検討結果も他の国々のものと大きな差はなく、陽性率は約 3-4 割であった¹⁵。AAV ベクターを末梢静脈より全身投与すると、AAV キャプシドに対する NAb の存在が遺伝子導入の効率を阻害または著しく抑制することはよく知られている¹⁶⁻¹⁸。肝細胞を標的として肝動脈への注入により投与する臨床試験では、2 人の被験者に AAV2-hFIX ベクターを投与した結果、NAb の影響が観察された。1 人の被験者は AAV2 に対する治療前の NAb 力価が低く (1 : 2)、第 IX 因子活性の有意な上昇が見られたが、別の被験者は治療前の NAb 力価が高く (1 : 17)、第 IX 因子活性の上昇は見られなかった¹⁹。これは、その後の研究で、マウスおよび非ヒト霊長類で得られた結果と類似している²⁰⁻²³。非ヒト霊長類における AAV8-hFIX ベクター末梢静脈投与による研究では、NAb 力価 (1 : 5) において、ベクターによる導入遺伝子発現を妨げた²⁰。同様に、ヒト免疫グロブリンを静注した複合免疫不全マウスに

において、AAV8-hFIX ベクター末梢静脈投与による研究では、NAb 力価（1：4）において、ベクターによる導入遺伝子発現を妨げた²¹。本研究グループによる過去の報告においても同様に NAb 陽性サルにおける導入遺伝子発現の抑制も観察された²⁴。これらの研究結果から、AAV ベクター末梢静脈投与による遺伝子治療の際、わずかな NAb の存在によって、導入遺伝子発現が大きく抑制されることが分かり、NAb への対策が重要であるとの認識が深まった。

AAV ベクター末梢静脈投与による遺伝子治療の際、導入遺伝子発現に影響を与える NAb 力価の閾値は明確に定義されていない。そのため現在行われている多くの臨床試験では、NAb 陽性患者は全て除外されている²⁵。NAb の閾値力価を明らかにするために、NAb 陽性動物を使用した前臨床試験が不可欠である。これまで遺伝子治療の前臨床試験として、イヌやサルは大型動物モデルとして使用されてきた。しかし、世界中の動物福祉と倫理に対する関心が高まる中、これらの動物を使用した実験を行うことは難しくなっている。したがって、イヌやサルに代わる非げっ歯類動物モデルの開発は、社会的な懸念事項である。もともと家畜として使用されていたブタは、解剖学的および生理学的にヒトとの類似性が高く、近年前臨床試験の動物モデルとして注目されつつある²⁶。通常のサイズのブタは大きすぎて取り扱いが困難なため（成熟時に 200 kg 以上）、1940 年代からミニブタと総称される小さなサイズの豚が開発され、その結果、Clawn、

Göttingen、Yukatan などの複数の品種が確立された²⁷。さらに、近年、世界最小の実験用モデルのブタとしてマイクロミニピッグが作出された²⁸。成熟時の体重は約 10 kg であるため、大規模な飼育施設は不要であり、投与する試薬の量が少なく済み、取り扱いも容易である。これらの理由により、薬理学²⁹、遺伝子ドーピング³⁰、ウイルス感染³¹などの様々な分野でこの動物モデルを使用した報告が増加している。したがって、遺伝子治療開発に向けた新しい動物モデルとしてマイクロミニピッグの有用性を評価することは極めて重要である。

これまでブタを用いた AAV ベクター遺伝子治療の例として心疾患、網膜などを標的とした報告があったが³²⁻³⁴、肝臓を標的とした遺伝子治療動物モデルとしては、マウス、イヌ、サルが用いられてきた。今回、われわれは初めてマイクロミニピッグにおける末梢静脈からの AAV8-LUC ベクターの導入により肝臓での遺伝子発現を確認した。また、AAV 中和抗体の分布と遺伝子発現に関わる NAb の閾値力価を、マイクロミニピッグを用いて確認した。さらに、新たな NAb 回避法や抗 AAV 抗体検出法を検討し、AAV ベクターを用いた遺伝子治療における影響とその制御を観察・評価した。

2. 研究方法

2.1 細胞株、プラスミド、および AAV ベクターの調製

Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) から購入したヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞および ATCC (Manassas, VA, USA) から取得したヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞を過去の報告に基づき維持・継代した²⁴。また、理研 Cell Bank (Ibaraki, Japan) より取得したヒト肝癌細胞由来 Huh7 細胞および、ATCC (Manassas, VA, USA) から取得したヒト肝癌細胞由来 HepG2 細胞を過去の報告に基づき維持継代した。

AAV8 ベクターは、肝臓特異的キメラプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードしている。また、ApoE / C-I 遺伝子の肝制御領域 (HCR) およびヒト enhance 1 アンチトリプシン (HAAT) 遺伝子の 5' フランキング領域からのエンハンサー要素も含まれる³⁵。AAV ベクターは HEK293 細胞にベクタープラスミド, AAV パッケージングプラスミド (AAV2 rep / AAV8 cap) とアデノウイルスヘルパープラスミド pHelper (Agilent Technologies) をトランスフェクションすることで作製された³⁶。組換え AAV ベクターの定量は、リアルタイム PCR システム StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を使用した定量的 PCR により実施した³⁷。

2.2 動物実験

マイクロミニピッグは、富士マイクラ株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入した。本研究では、事前の NAb 力価測定に基づいて NAb 力価が低い (56 倍以下) または陰性の 5 匹のマイクロミニピッグを使用した。実験は、自治医科大学内動物施設管理委員会が示すガイドラインに従って実施した。外科的処置は、セボフルラン (Pfizer, Inc., Tokyo, Japan) 吸入による全身麻酔下で実施し、規定のガイドラインに従ってバイタルサインモニタリングを実施した。ベクター溶液は頸静脈より注入した。ブタのルシフェラーゼ発現を評価するために、ベクター投与の 7 日後、15 mg/ml の D-ルシフェリン溶液 (OZ Biosciences, San Diego, CA, USA) を頸部静脈より注入した。ルシフェラーゼ発現は IVIS Spectrum CT 画像システム (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) を使用して評価した。本来、マウスなどの小動物に利用する画像システムであるが、今回はマイクロミニピッグに使用した。

2.3 中和抗体検出法

AAV に対する NAb 検出法は、過去に報告された手法を用いて行った¹⁵。まず 2V6.11 細胞を 96 穴培養プレートの 1 well あたり 5×10^4 個に継代した。血清サンプルは 56°C で 30 分間熱不活性化処理を行った。24 時間後、10 μ l の血

清（未希釈またはウシ胎児血清で 2 倍ごとに段階希釈）をベクター（AAV8-CMV-LacZ、 5×10^7 vg / 10 μ l）と混和後 37°C で 1 時間インキュベートし、この混和物を 96 穴培養プレートに加え感染させた。48 時間インキュベーション後に培地を除去し、 β -ガラクトシダーゼ活性を、 β -Gal Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で定量化した。試験サンプルの β -ガラクトシダーゼ活性が、コントロールのウシ胎児血清の 50%以上阻害した検体を NAb 陽性とした。血清サンプルの NAb 力価は、阻害活性を示した最高希釈倍率として表した。

2.4 ブタ組織における AAV8 ベクターDNA の定量

ブタ組織における AAV8 ベクターDNA の定量は、StepOnePlus™機器 (Applied Biosystems) を使用して定量 PCR を実施した。DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) によりブタ組織から単離され、以下のプライマーを使用して PCR にかけた。

F : 5'- AGCAATAGCATCACAAATTTACAA -3 '

R : 5'- CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT -3 '

プローブ : 5'- AGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC -3、

(THUNDERBIRD®Probe qPCR Mix; Toyobo, Osaka, Japan)

2.5 血清中の抗 AAV8 抗体の検出

血清中の抗 AAV8 抗体は、酵素免疫測定法 (ELISA) によって定量化した。

まず AAV8 キャプシドを 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) で 1×10^8 vg / μ l に希釈した。希釈した AAV8 キャプシド溶液を、96 穴培養プレート
の各 well に 100 μ l 加え 4°C で静置した。24 時間後、各 well を PBS で洗浄し、
150 μ l のブロッキング溶液 (5% BSA) を加え、37°C で 2 時間インキュベート
した。PBS で洗浄後、2,000 倍希釈した血清 100 μ l を加え、37°C で 90 分間イ
ンキュベートした。PBS で洗浄後、horseradish peroxidase (HRP、1 : 5000)
でタグ付けされたウサギ抗ブタ IgG 抗体 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
100 μ l を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、KPL ABTS
Peroxidase Substrate System (Seracare Life Sciences Inc., Milford, MA,
USA) を添加し、37°C で 10 分間インキュベートした。Benchmark™ Plus マ
イクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で吸光
度を測定した。

2.6 AAV ベクターリポソーム化の検討

まず細胞を 96 穴培養プレートの 1 well あたりに 1×10^4 個に継代した。細胞
はヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞、ヒト肝細胞由来 Huh7 細胞、HepG2 細胞

を用いて検討を行った。24 時間後、リポソーム試薬(Lipofectamine®)(Thermo Fisher Scientific, MD, USA)を 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ l /well となるようにそれぞれ調整し、AAV2 ベクター (AAV2-CMV-LacZ) と混和後、室温で 15 分置き、この混和物を 96 穴培養プレートに加え感染させた。細胞間での AAV2 ベクターへの感染性の違いから、2V6.11 細胞では 12.5 vg/cell 、Huh7 細胞、HepG2 細胞では 2×10^5 vg/cell となるよう AAV2 ベクターを感染させた。48 時間インキュベーション後に培地を除去し、 β -ガラクトシダーゼ活性を、 β -Gal Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で定量化した。

2.7 統計学的分析

データ解析は StatMate V (ATMS, Tokyo, Japan) と SPSS (IBM Japan, Tokyo, Japan) を用いて行い、平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で記した。独立 2 群間の比較には Welch の t 検定を用い、多群間比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、事後比較には Tukey または Games-Howell 法を用いた。 P 値が 0.05 未満を有意差ありと判断した。

3. 研究結果・遺伝子治療におけるマイクロミニピッグの有用性の検討

3.1 実験タイムライン

肝特異性を高めるため、human α 1-antitrypsin (hAAT) プロモーターおよび hepatic control region (HCR) エンハンサー (HCRhAAT) を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に搭載した AAV8 ベクターを使用して、マイクロミニピッグの肝臓での導入遺伝子発現を観察した。実験のタイムラインを図 1 に示した。

ベクター投与 56 日前に、複数のマイクロミニピッグの NAb 力価を測定し、AAV ベクターを投与する動物を選択した。0 日目に、ベクター投与直前に各動物からの血清を収集し、AAV8 キャプシドに対する NAb 力価を決定した。

次いで、AAV8 ベクターを末梢静脈投与した。投与後 7 日目に、IVIS システムを使用して遺伝子発現を評価した。定量的 PCR アッセイにより、各組織のベクターゲノム量を分析した。

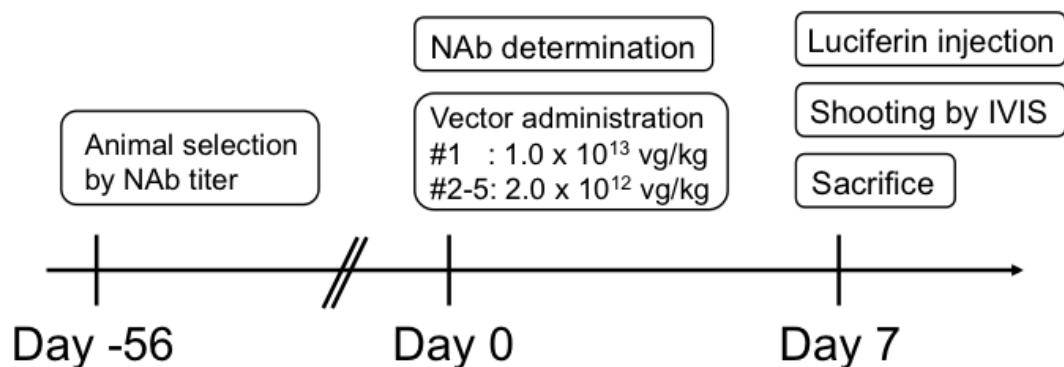


図1 実験タイムライン

使用動物を NAb 力価に基づいて事前に選択する。0 日目、血清を採取し、AAV8 キャプシドに対する NAb 力価を決定した後、AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターを静脈内注射する。7 日後、ルシフェリンを末梢静脈から投与し、遺伝子発現を IVIS システムにより評価する。各臓器から組織片を取り出し、定量的 PCR により各組織からのベクターゲノムコピーの数を解析した。

3.2 AAV ベクター静脈内投与後の肝臓での遺伝子発現 (#1)

最初のブタでは、高用量 (1.0×10^{13} vg / kg) の AAV8-HCRHAAT-ルシフェラーゼベクターを末梢静脈投与した。7 日後、IVIS による遺伝子発現を観察した (図 2a)。全身麻酔下での皮膚切開後、IVIS による遺伝子発現の確認を行ったところ、肝特異的な遺伝子発現を明確に観察できた (図 2b)。

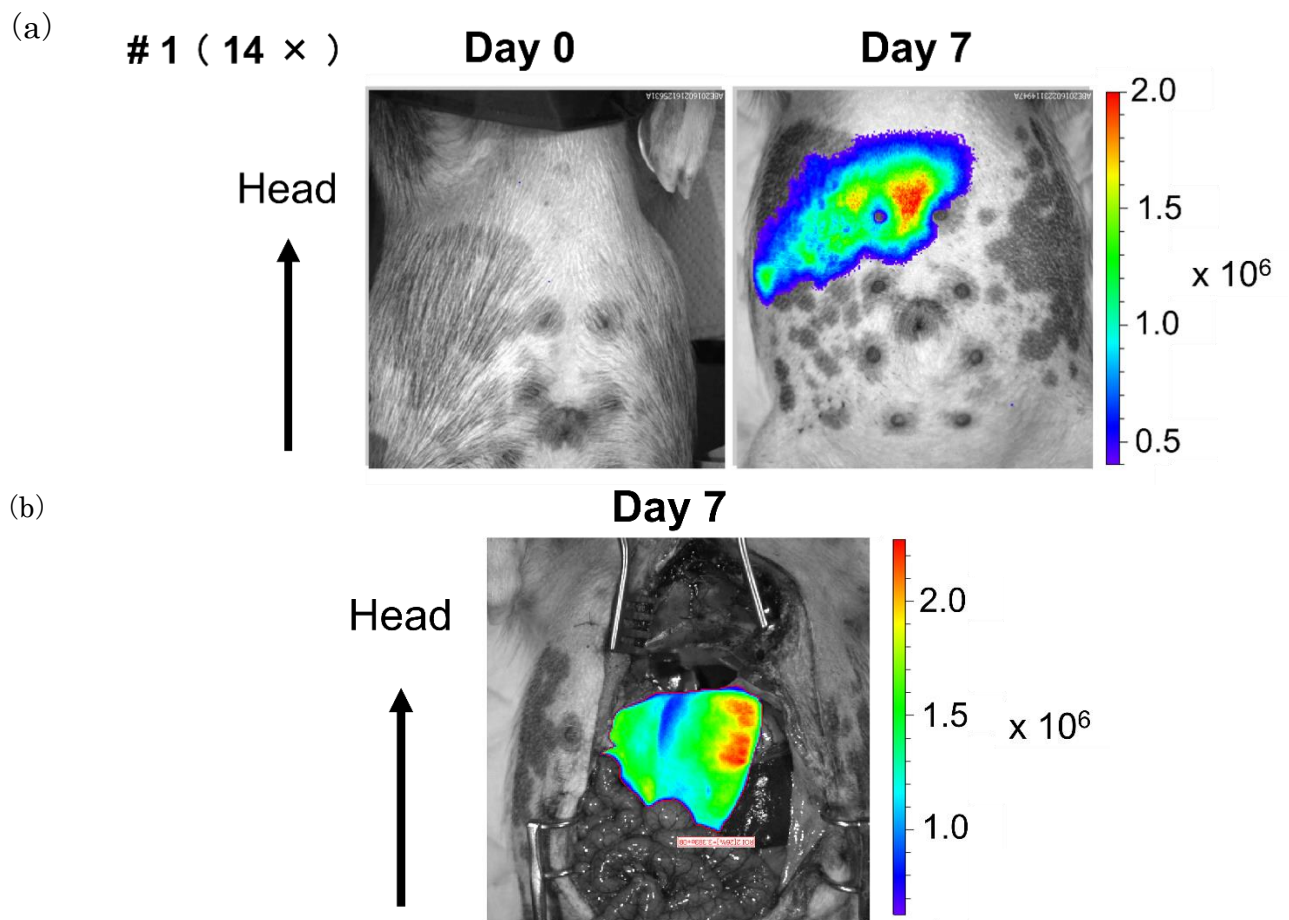


図 2 AAV ベクター静脈内投与後の肝臓での遺伝子発現
 高用量 (1.0×10^{13} vg / kg) の AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターをマイクロミニピッグ #1 に静脈内注射した。 7 日目に、IVIS システムを用いて遺伝子発現を評価した。 (a) 導入遺伝子発現を、腹部の右上の領域で確認した。(b) 内臓を皮膚切開により露出し、肝臓特異的な遺伝子発現を確認した。

3.3 AAV ベクター静脈内投与後の組織内のベクターゲノムの定量 (#1)

定量的 PCR を使用して各組織のベクター量を分析したところ、肝組織において高いベクターゲノムコピー数を示した (図 3)。

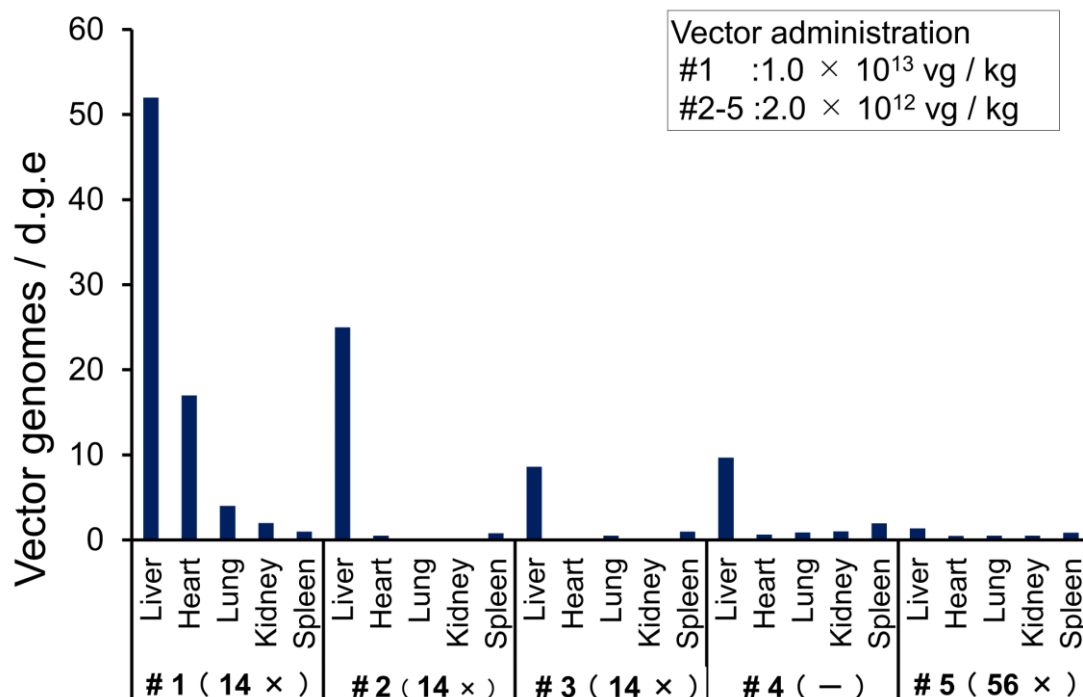


図 3. AAV ベクターの静脈内投与後の組織内のベクターゲノムの定量と分布
 0 日目に、AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターを 5 頭のマイクロミニピッグに静脈内注射した。#1 には 1.0×10^{13} vg / kg 、#2-5 には 2.0×10^{12} vg / kg) のベクターを投与した。7 日目に、各組織のベクターゲノム (vg) コピーの数を定量的 PCR によって測定し、細胞あたりのコピー数として表した。

3.4 AAV ベクター静脈内投与後の各組織での遺伝子発現 (#2-5)

次に、AAV に対する NAb の作用を評価した。4 頭のブタを使用して、NAb 力価と導入遺伝子発現の関係を試験した。この試験において、NAb 陰性からから 56 x までの NAb 力価を持つブタを選択した。標準用量 (2.0×10^{12} vg / kg) の AAV8-HCRHAAT-ルシフェラーゼベクターを末梢静脈投与し、投与後 1 週間に導入遺伝子発現を評価した。この研究が実施された時点では全身

IVIS が利用できなかったため、*ex vivo* 実験により遺伝子発現を評価した。その結果、NAb 陰性（＃4）および最小陽性（14x）（＃2）のブタ肝臓でルシフェラーゼ遺伝子発現が観察されたが、高力価（56x）ブタでは遺伝子発現は観察されなかった（＃5）（図 4a）。また、この実験における肝臓のルシフェラーゼ発現レベルを定量化したところ、NAb 陰性（＃4）および最小陽性（14x）（＃2）のブタ肝臓でルシフェラーゼ遺伝子発現が観察されたが、高力価（56x）ブタ肝臓では遺伝子発現は観察されなかった（＃5）（図 4b）。

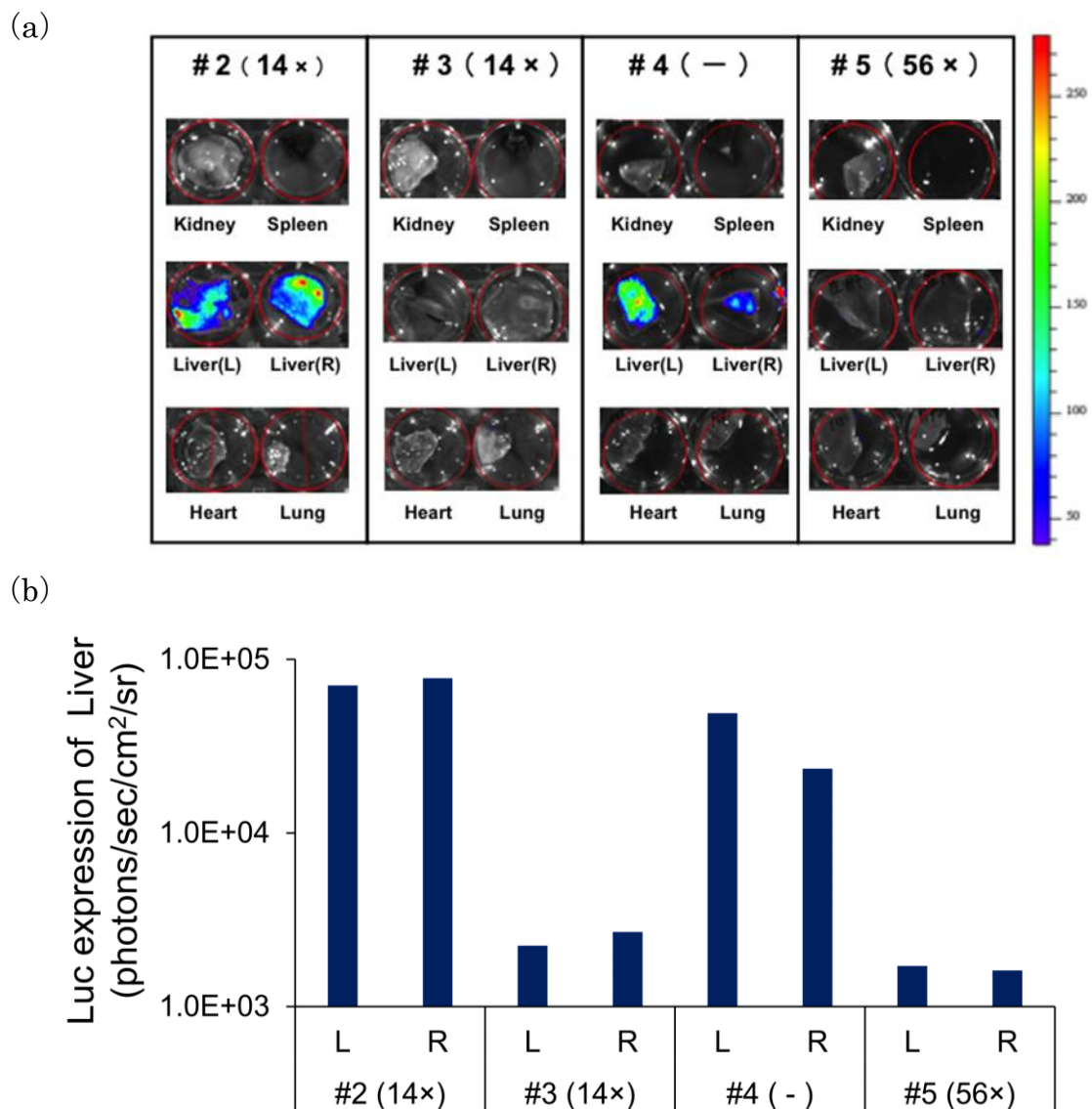


図4 AAVベクターの静脈内投与後の各組織での遺伝子発現
 標準用量 (2.0×10^{12} vg / kg) の AAV8-HCRhAAT-ルシフェラーゼベクターをマイクロミニピッグ #2-5 に静脈内注射した。7 日目に、IVIS システムを使用して遺伝子発現を確認し、NAb 力価と導入遺伝子発現の関係を評価した。(a) 主要臓器におけるルシフェラーゼ発現を *ex vivo* で確認した。(b) 肝組織のルシフェラーゼ発現レベルを定量化した。L:左肝臓、R:右肝臓

3.5 AAV ベクター静脈内投与後の組織内のベクターゲノムの定量 (#2-5)

各組織のベクターゲノムのコピー数を、定量的 PCR により評価した。NAb 陰性 (#4) および最小陽性 (#2、#3) ブタで肝臓の定量可能な数のベクターゲノムが観察されたが、ベクター配列は高力価 (56x) 陽性個体 (#5) では検出できなかった (図 3)。AAV8-HCRHAAT-ルシフェラーゼベクターの注射後のブタの発現結果は、表 1 に要約した。1 頭には高用量のベクター (1.0×10^{13} vg/kg) (#1) を投与し、導入遺伝子発現を示した。他の 4 頭には標準用量のベクター (2.0×10^{12} vg/kg) (#2-5) を投与し、陰性 (#4) および最小陽性 (#2、#3) 個体では肝臓での遺伝子導入を認められたが、高力価 (56x) 陽性個体 (#5) では導入遺伝子発現が認められなかった。肝臓でのベクターゲノムコピー数とルシフェラーゼ発現量には相関が見られた。(表 1)

表 1. この研究で使用されたマイクロミニピッグのリスト

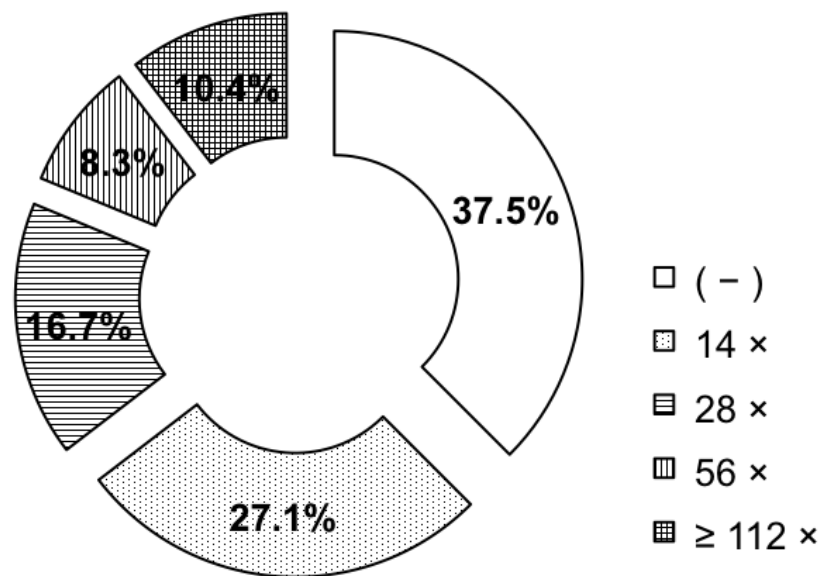
Pig number	Weight (kg)	Vector dose (vg/kg)	Anti-AAV8 NAb titer	Luciferase expression ^a	Vector genome copies in liver tissue ^b
#1	2.3	1.0E+13	14×	(++)	52
#2	5.5	2.0E+12	14×	(+)	25
#3	5.0	2.0E+12	14×	(-)	8.5
#4	6.7	2.0E+12	(-)	(+)	9.6
#5	5.7	2.0E+12	56×	(-)	1.3

AAV8-HCRHAAT-ルシフェラーゼベクターを、5 頭のマイクロミニピッグに静脈内投与した。すべての個体はオスで、ベクター投与の時点で月齢 3 ヶ月であった。1 頭には高用量のベクター (1.0×10^{13} vg / kg) (#1) を投与し、他の 4 頭には標準用量のベクター (2.0×10^{12} vg / kg) (#2-5) を投与した。AAV8 キャプシドに対する NAb 力価は、試験血清の最終希釈倍率として表した。肝細胞内のベクターゲノム (vg) コピーの数は、定量的 PCR によって決定され、細胞あたりのコピー数として表した。ルシフェラーゼ発現は、IVIS システムを使用して評価した。^a 定量した結果は Figure 4B に示した。^b コピー数は vg/diploid genome で示した。

3.6 AAV8 に対する NAb 力価と抗 AAV8 IgG 量の比較

マイクロミニピッグの有用性を評価するために、AAV8 キャプシドに対する NAb 陽性率を調べた。同じ施設で飼育された 48 頭のブタから血液を採取し、その NAb 力価を分析した。その結果、NAb 陽性率は全体で 62.5%であった。 14 x、28 x、56 x、および 112 x（またはそれ以上）の NAb 力価を持つ動物の割合は、それぞれ 27.1%、16.7%、8.3%、および 10.4%であった（図 5a）。さらに、ブタ血清中の抗 AAV8 抗体（IgG）量を ELISA で試験し、NAb 力価との関係进行分析したところ、これら 2 つのパラメーター間に相関性を示さなかった（図 5b）。

(a)



(b)

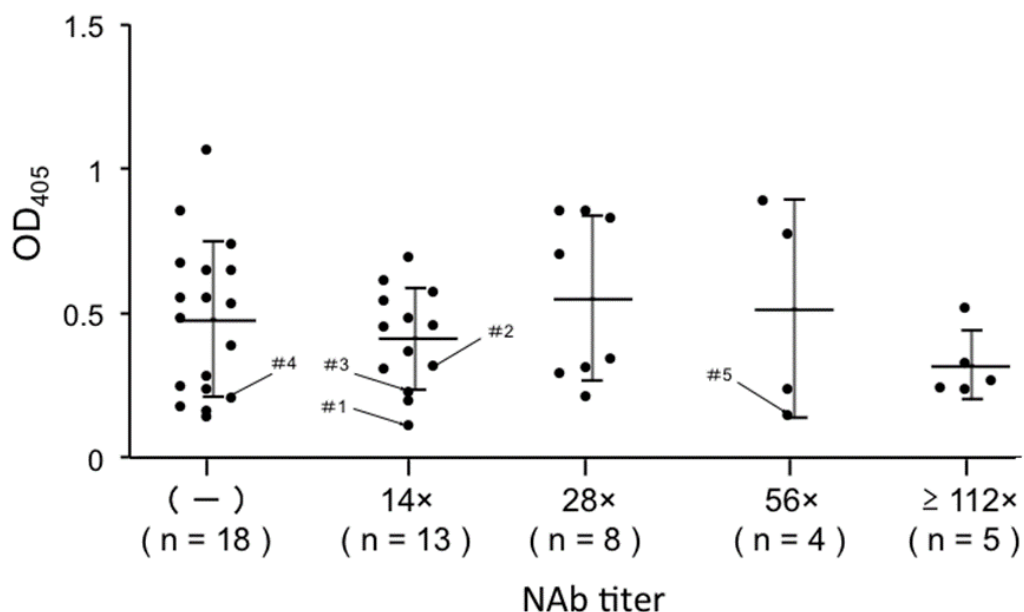


図 5. AAV8 に対する NAb 力価と抗 AAV8 IgG 量の比較

血液サンプルは、単一の飼育場のマイクロミニピッグ (n = 48) から収集した。血清を血液サンプルから調製し、-20℃で保存した。(a) 抗 AAV8 NAb 力価は、AAV8 キャプシドに対する NAb 力価は、試験血清の最終希釈倍率として表した。

(b) 血清中に存在する特定の抗 AAV8 免疫グロブリンのレベルを ELISA で評価した。抗 AAV8 抗体の量と NAb 力価の関係を分析した。血清の希釈力価は 1:2000 であった。データは平均値±標準偏差として示した。縦軸に ELISA で測定した吸光度、横軸に中和抗体価を示す。一元配置分散分析検定を使用して、各群間の統計的有意差を判定した。

4. 研究結果・AAV ベクター中和抗体回避法や中和抗体検出法の検討

4.1 AAV ベクターリポソーム化の検討

AAV ベクターに NAb を回避させるための方法としてリポソームに着目した。

リポソームは細胞膜を模した脂質二分子膜を持つ閉鎖小胞で内部に核酸、タンパク質などを含ませることができ、細胞内導入用試薬に利用され、薬物を封入し医薬品にも応用されている。このリポソームに AAV ベクターを封入出来れば、NAb の影響からの回避、遺伝子導入効率の向上、免疫応答の抑制などが期待できるのではないかと考えた(図 6)。AAV ベクターのリポソーム化に関してはこれまで導入遺伝子発現への影響に関していくつかの報告がされている^{38, 39}が、NAb の影響からの回避に関する報告はされていない。

- 中和抗体の影響からの回避
- 遺伝子導入効率の向上
- 免疫応答の抑制
- リポソーム膜表面の修飾による標的部位への送達



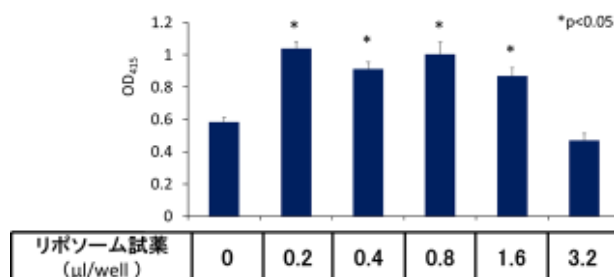
※中和抗体との物理的な接触を減らす

図 6 リポソームへの AAV ベクターの封入

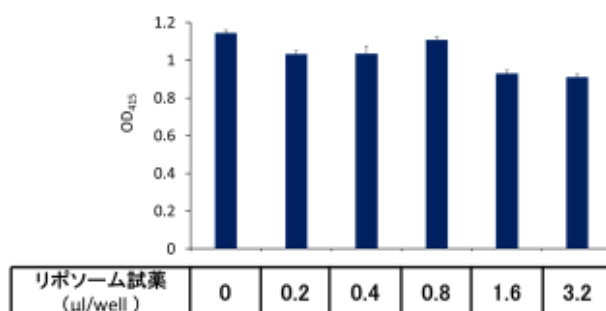
リポソームに AAV ベクターを封入出来れば、NAb の影響からの回避、遺伝子導入効率の向上、免疫応答の抑制などが期待できる可能性がある。

本研究では AAV2 ベクターに市販のリポソーム調製試薬(Lipofectamine®)を加え、調製条件の違いにより導入遺伝子発現が変化するかを *in vitro* で検討した。細胞はヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞、ヒト肝細胞由来 Huh7 細胞、HepG2 細胞を用いてそれぞれ検討を行った。細胞間での AAV2 ベクターへの感染性の違いから、2V6.11 細胞では 12.5 vg/cell、Huh7 細胞、HepG2 細胞では 2×10^5 vg/cell となるよう AAV2 ベクターを感染させた。その結果、2V6.11 細胞においては AAV2 ベクターにリポソーム調製試薬を加えることで有意に導入遺伝子発現が上昇した。AAV2 ベクター量を統一し、リポソーム調製試薬の割合を増やしても有意な導入遺伝子発現の上昇が見られた (図 7a)。一方、ヒト肝細胞由来 Huh7 細胞、HepG2 細胞においては AAV2 ベクターにリポソーム調製試薬を加えても導入遺伝子発現の上昇は見られず、リポソーム調製試薬の割合を増やしても導入遺伝子発現が上昇する傾向は見られなかった (図 7b,c)。

(a) 2V6.11細胞



(b) Huh7細胞



(c) HepG2細胞

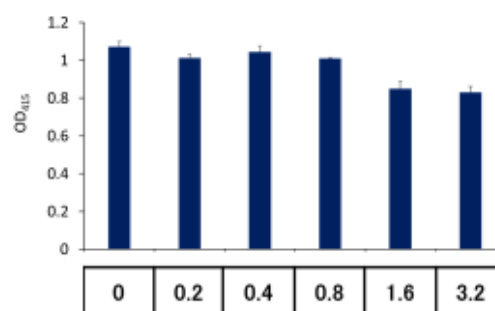


図 7 リボソーム調製条件の違いによる導入遺伝子発現の検討(*in vitro*)

(a) ヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞、(b)ヒト肝細胞由来 Huh7 細胞、(c) ヒト肝細胞由来 HepG2 細胞。2V6.11 細胞では 12.5 vg/cell、Huh7 細胞、HepG2 細胞では 2×10^5 vg/cell となるよう AAV2 ベクターを感染させた。縦軸に β -Gal Assay で測定した吸光度、横軸にリボソーム試薬濃度を示す。結果は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。 $P < 0.05$ であるものを*で示した。

リボソーム試薬を加えた AAV2 ベクターの NAb 存在下での影響を調べた。

2V6.11 細胞では 12.5 vg/cell 、Huh7 細胞、HepG2 細胞では 2×10^5 vg/cell となるよう AAV2 ベクターを感染させた。また、リボソーム試薬は 0.2 μ l/well とな

るように調製した。その結果、どの細胞を用いた場合でも、コントロールの半分の値を示す NAb 力価に変化がなく、リポソーム試薬を加えることによる NAb による影響の回避は見られなかった。(図 8a–8c)

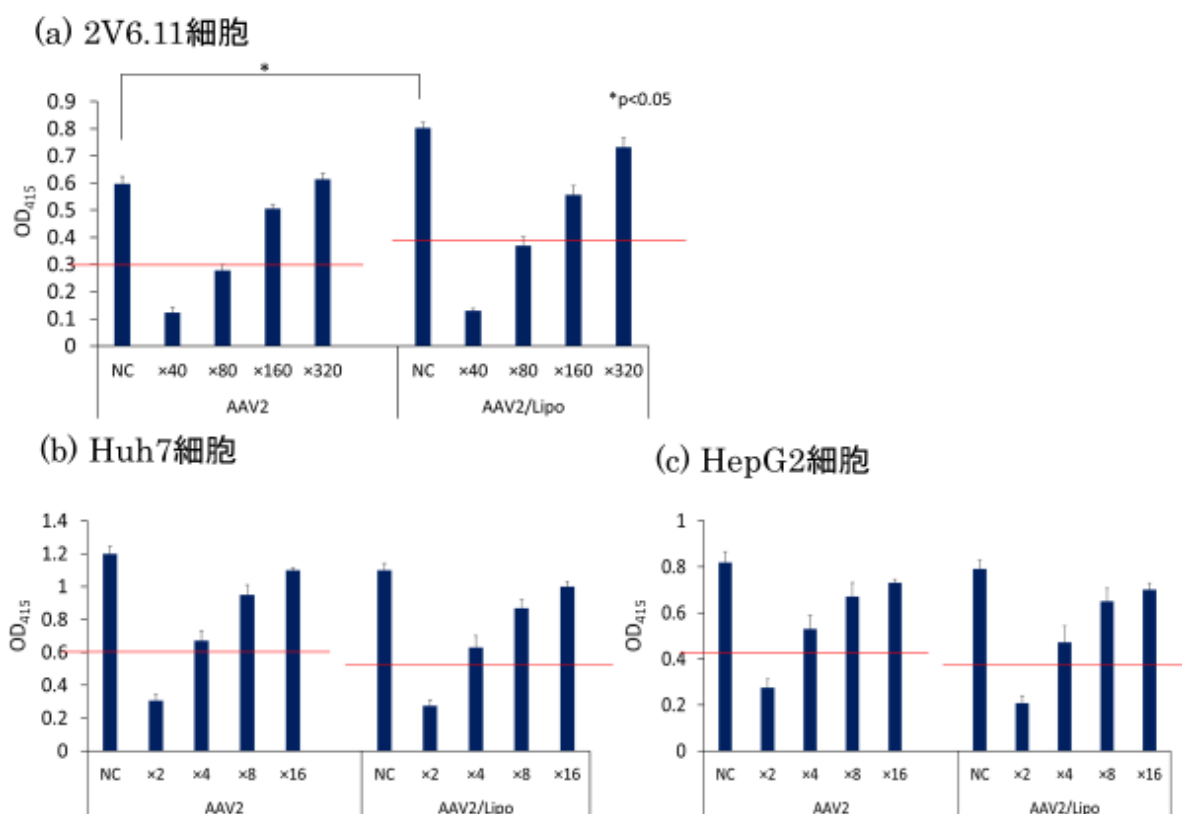


図 8 NAb 存在下での導入遺伝子発現の比較(*in vitro*)

(a) ヒト胎児腎細胞由来 2V6.11 細胞、(b)ヒト肝細胞由来 Huh7 細胞、(c) ヒト肝細胞由来 HepG2 細胞。2V6.11 細胞では 12.5 vg/cell 、Huh7 細胞、HepG2 細胞では 2×10^5 vg/cell となるよう AAV2 ベクターを感染させた。リポソーム試薬は 0.2 μ l/well となるように調製した。縦軸に β -Gal Assay で測定した吸光度、横軸に中和抗体価を示す。結果は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。 $P < 0.05$ であるものを*で示した。

4.2 新たな原理に基づく NAb 検出法の検討

現在、一般的に使われている NAb 検出法は、細胞に AAV ベクターを感染させる方法が用いられているが、使用する細胞の違いや、同じ細胞を用いた場合でも AAV ベクターの血清型による感染性の違いがある。また、NAb 力価は段階希釈した血清検体のうちコントロールの 50%以上の阻害活性を示した血清検体の最高希釈倍率として表されるが、同じ希釈倍率でも最大一段階分の誤差が生まれる可能性があり、厳密ではない。研究グループによって使用するレポーター遺伝子も GFP、ルシフェラーゼ、 β -gal など異なっており、世界的に統一された検出方法が確立していないことも課題である。現在、より適した方法を確立するためにいくつかの研究グループから NAb 検出法が報告されている^{40, 41 42}が、最適な方法は確立していない。本研究では、NAb 検出の際に細胞の代わりに AAV 結合性基質を用いることで、使用する細胞の違いや、AAV ベクターの血清型による感染性の違いを克服し、統一した NAb 検出法につながるのではないかと考える。現在は具体的な方法を検討中である。

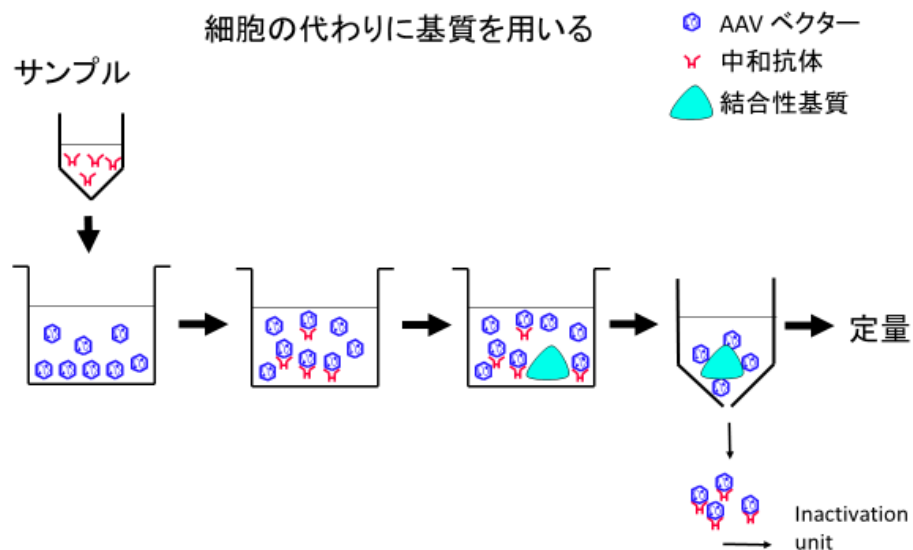


図9 中和抗体検出法の検討

NAb 検出の際に細胞の代わりに AAV 結合性基質を用いることで、使用する細胞の違いや、AAV ベクターの血清型による感染性の違いを克服し、統一した NAb 検出法につながる可能性がある。

AAV 結合性基質としては、市販されている AAV アフィニティー担体などを検討している。検出系はこれまで β -ガラクトシダーゼ活性を、 β -Gal Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で定量化する方法を用いていたが、発光量の OD 値が 0.0 から 2.0 の間で示され、検出領域が狭いこともあり、検出感度が良くない。検出感度をさらに上げるために AAV 結合性基質に結合した AAV ベクター量を PCR 法で検出する方法を検討している。これにより特定の AAV 結合性基質に何 vg の AAV ベクターが結合しているかをより正確に定量することができると考える。

5. 考察

組換え AAV ベクターは、肝臓を含む標的臓器に治療遺伝子を導入するために広く使用されている。これまで、肝臓を対象とした遺伝子発現は、マウスをはじめ、イヌ、霊長類（ヒトを含む）で広く報告されてきたが、ブタではほとんど報告されていない。本研究では、IVIS システムを使用してマイクロミニピッグの肝臓での導入遺伝子発現を確認した。本研究はマイクロミニピッグにおいて生体内イメージングシステムを使用して肝臓を標的とした導入遺伝子発現を実証する初めての報告であると考ええる。IVIS システムは本来小動物を対象に用いる生体内イメージングシステムであるが、本研究ではマイクロミニピッグに用いた。マイクロミニピッグの臓器は厚いため、励起光が臓器の深くまで届かず、肝臓表面のルシフェラーゼ発現しか見ることが出来ていない可能性があるが(図 2)、肝組織を採取して調べたベクターゲノムコピー数はルシフェラーゼ発現量と関連していたため、AAV ベクターによる肝臓特異的な遺伝子発現が起きていたことを示すことができたと考ええる。

また、NAb 力価の異なる複数のマイクロミニピッグの導入遺伝子発現を確認した。これらの結果は、マイクロミニピッグが遺伝子治療実験におけるモデル動物となる可能性を示している。

末梢静脈から AAV ベクターを投与する場合、NAb が遺伝子発現へ与える影響はすでに認識されている問題であり、ヒト、サル、マウス^{19, 20 21, 24}で報告されて

いる。本研究では、マイクロミニピッグにおいても低力価 NAb の存在が *in vivo* での導入遺伝子発現に影響していることを示した。しかし、他の動物種においては、NAb の最小力価で肝臓での導入遺伝子発現がほぼ完全に阻害されていたのに対し、マイクロミニピッグにおいては最小陽性であっても導入遺伝子発現が見られた点において大きな違いがあり、この点においてマイクロミニピッグは中和抗体の検討において有利となる可能性を示している。

肝臓での導入遺伝子発現は、NAb 陰性および最小陽性 (14 x) 個体で観察されたが、力価の高い個体 (56 x) では観察されなかった。これらの結果から、本実験における導入遺伝子発現の NAb の閾値は、標準的なベクター用量 ($2.0 \times 10^{12} \text{vg} / \text{kg}$) では、最小陽性 (14 x) 付近にあることが考えられ、NAb 陽性個体の中にも AAV ベクターを用いた遺伝子治療が可能となる対象が存在する可能性がある。サルを使用した以前の研究では、NAb 力価が最小の陽性 (14 x) の 3 匹の動物のいずれでも導入遺伝子の発現は観察されなかった²⁴。したがって、マイクロミニピッグでは、NAb の閾値レベルがサルの閾値レベルよりもわずかに高い可能性がある。また、ベクター用量 $2.0 \times 10^{12} \text{vg} / \text{kg}$ では、最小陽性 (14 x) 個体で遺伝子発現が見られない個体があったが (#3)、ベクター用量を $1.0 \times 10^{13} \text{vg} / \text{kg}$ で行うと、最小陽性 (14 x) 個体で強い導入遺伝子発現が見られたため (#1)、高用量のベクターは NAb の阻害作用を克服できる可能性がある。

る。ベクター用量と NAb の閾値の関係はまだ十分に検証されていないため、今後さらに検討する必要がある。これまでの報告では、わずかの NAb の存在が遺伝子発現に大きく影響を及ぼすことが知られており、全ての NAb 陽性患者は、AAV ベクター静脈内投与を行う臨床試験において候補から除外されている。したがって、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値を選定することができれば、その閾値よりも低い力価の NAb 陽性例に対して遺伝子治療の適応が広がることが考えられ、遺伝子治療の発展に貢献することができると考えている。

また、NAb の抑制作用を回避する方法を開発することも重要である⁴³。NAb を克服するためのさまざまな戦略が提案されている。バルーンカテーテルで生理食塩水フラッシュ後に直接肝臓にベクターを投与する方法²⁴、空のキャプシドをおとりとして NAb を吸着する方法⁴⁴、エキソソームで包まれた AAV ベクターを使用する方法⁴⁵、などが提案されている。しかし、臨床的に最適な方法は確立されておらず、さらなる研究が必要である。

本研究では、NAb 力価が 14 x (#2、#3) の個体と NAb 陰性の個体 (#4) の間で、導入遺伝子発現の相違が観察された。NAb 力価が同じであるにもかかわらず、#2 と #3 の間に発現の違いがあった。この違いには多くの要因が関係している可能性がある。その一つとして、現在の NAb 検定法による誤差が挙げられる。通常、NAb 力価は血清検体を段階希釈し、コントロールの 50%以下にな

る希釈倍率の最大値で表される。本研究で 14 x と表記された個体は、実際には同じ力価内にあっても、正確には、14 x から 28 x 未満のほぼ 2 倍の範囲の力価を持つ可能性がある。したがって、NAb の効果をより詳細に評価するには、NAb をより正確に表記する方法を検討する必要がある。また、他の要因も発現の違いに影響する可能性がある。例えば、ベクターおよびルシフェリン投与時の全身麻酔下での個々の個体の血行動態の違い（発現解析時に #4 が一時的な心機能低下を認めた）は、遺伝子発現に影響を与える可能性がある。過去の報告においても、ヒト、サル、マウスにおいて同じ NAb 力価の個体に同じ量のベクターを注入した場合、導入遺伝子発現に個体差があることが観察されている^{4, 5 20 21, 24}。

NAb 陰性（#4）および最小陽性の個体（#1、#2、#3）の肝臓におけるベクターゲノムコピー数にもばらつきが見られている。NAb 陰性の個体（#4）で肝臓での測定可能なベクターゲノムコピー数と遺伝子発現が観察された。一方、最小陽性（14 x）個体（#3）では肝臓で測定可能なベクターゲノムコピー数が確認されたが、遺伝子発現は観察されなかった。この結果から、遺伝子発現に関わる下限のベクターゲノムコピー数は約 10 ベクターゲノム/細胞と考えられる。本研究では、肝臓のベクターゲノムコピー数と遺伝子発現との間に相関関係があることが示唆された（表 1）。しかし、本実験では導入遺伝子の発現レベルが相対的に低く、これは実験施設の制約によりベクター投与後の観察期間が 1 週間と

短いためである可能性がある。1 週間でルシフェラーゼの発現が観察できたが、発現レベルはまだ定常状態に達しておらず、導入遺伝子発現にばらつきが起きている可能性が考えられる。これについては今後、ベクター投与後の観察期間を延長して確認する必要がある。

導入遺伝子に対する抗体産生により、遺伝子発現に影響し、個体差を生み出す可能性も考えられる。しかし、1 週間での抗体産生は時間的に不十分であるため、本実験においてこの可能性は否定できる。さらに、ルシフェラーゼは細胞膜内で発現するため、産生された抗体が 1 週間で発現に影響を与える可能性は低いと考えられる。

本研究においてマイクロミニピッグの NAb 力価の分布を調べたところ、AAV8 に対する NAb の陽性率は 62.5%であり、低力価陽性個体の割合が高かった。この点においても、マイクロミニピッグは遺伝子治療研究における利点があることを示している。 NAb 陰性および低力価 (14 x) 陽性個体の割合は、それぞれ 37.5%および 27.1%であり、本研究で導入遺伝子発現を確認した NAb 力価をもつ個体の割合が高かった (図 5a)。したがって、マイクロミニピッグは、肝臓を標的とする遺伝子治療における低力価 NAb の影響を試験するのに適しており、最終的には前臨床研究における NAb の影響を評価するのに適している可能性がある。

本研究において ELISA と NAb 力価の関係を調べたところ、ELISA による抗キャプシド抗体の定量により NAb 力価を予測することができないことを示した (図 5b)。ELISA は AAV8 キャプシドが結合した IgG 全体の量を反映するが、NAb 力価は IgG のうち阻害作用を示す抗体力価を示す。ELISA と NAb 力価がどの程度相関するかは明らかではない。ある研究では、AAV2 と AAV8 における総 IgG 量と NAb 力価の検討の結果、相関は見られなかったが⁴⁶、別の研究では、AAV5 で総 IgG 量と NAb 力価との相関が示された⁴⁷。抗 AAV 抗体には NAb と非 NAb が存在しており、NAb 力価は抗 AAV 抗体量と相関するものの、それは NAb 高力価の検体を含んだ際の検討であり、NAb 陰性または弱陽性個体だけでは、NAb 力価と抗 AAV 抗体量が相関しないとも言われている⁴⁶。今回、ブタのほとんどは NAb 陰性または弱陽性個体であったことから NAb 力価と抗 AAV 抗体量は相関しなかった可能性が考えられる。NAb は抗 AAV 抗体の一部であり、NAb がある一定量以上にならないと抗 AAV 抗体との相関が見られないことが考えられる。

NAb の影響を回避するための方法として AAV リポソーム化の検討を行った。AAV ベクターにリポソーム化試薬を加えて導入遺伝子発現の確認を行ったが、NAb の影響を回避するには至らなかった。本研究の方法では完全に AAV ベクターをリポソーム化できていない可能性が高く、独自の方法でリポソーム化を

行うことは現時点で難しい状況にあると考える。リポソーム化の評価方法に関しては、電子顕微鏡による形態学的観察に加えて、機能面での解析についても検討が必要である。これには NAb を用いた免疫電顕や、定量的 PCR 法を用いた NAb によるベクターの捕捉などの解析が必要である。また、リポソーム化による組織特異性や導入効率の変化についても合わせて検討を行い、大きな違いが見られるような場合には、リポソーム膜表面の修飾などの対処が必要となる。これらの課題を克服し、リポソーム化 AAV ベクターの有用性を示すために、より最適なりポソーム化の方法を検討する必要があると考える。

現在、新たな原理に基づく NAb 検出法において具体的な方法を検討中である。現在の NAb 力価表記法はコントロールの 50%以上の阻害活性を示した血清検体の最高希釈倍率として表しているが、この方法では定量性に乏しく、研究グループ間での標準化も困難である。NAb 測定法の測定感度を上げ、より厳密な方法で遺伝子発現に関わる NAb の検討ができれば、統一した NAb 検出法につながるのではないかと考える。加えて、治療可能な NAb 力価の水準を *in vitro* の実験結果から明確に線引きすることができ、これまで遺伝子治療対象から除外されていた患者の中から適応可能な患者の幅が広がり、遺伝子治療の発展に貢献することができると考える。

本研究では AAV8 ベクターの静脈内投与によりブタの肝臓を標的とした遺伝

子発現を確認し、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値レベルを決定した。本研究結果は、将来、肝臓を標的とした AAV 遺伝子治療の前臨床試験でマイクロミニピッグを使用する場合の有益な情報となり得る可能性がある。また、NAb 陽性個体の中にも遺伝子治療が可能となる対象が存在する可能性があることを示した。ヒトにおいて NAb 陽性患者にベクターを投与する場合、遺伝子発現に関わる NAb 力価の閾値より低い NAb 力価であれば、治療可能となり、これまで遺伝子治療対象から除外されていた NAb 陽性患者の中から投与可能な対象が広がる可能性があることを示した。

6. 結論

本論文では、肝臓を標的とした遺伝子治療のためのマイクロミニピッグの有
用性を評価した。高用量 (1.0×10^{13} vg / kg) の AAV8-HCRhAAT-ルシフェラー
ゼベクターを 1 頭のマイクロミニピッグ (#1) に静脈内注射した結果、肝特異
的な遺伝子発現と肝組織における高いベクターゲノムコピー数を示した。標準
用量 (2.0×10^{12} vg / kg) の AAV8-HCRHAAT-ルシフェラーゼベクターを NAb
力価の異なる 4 頭のマイクロミニピッグ (#2-4) に末梢静脈投与した結果、NAb
陰性 (#4) および最小陽性 (14x) (#2) のマイクロミニピッグ肝臓でルシフ
ェラーゼ遺伝子発現が観察されたが、高力価 (56x) 個体 (#5) では遺伝子発現
は観察されなかった。標準的なベクター用量 (2.0×10^{12} vg / kg) では、遺伝子
発現に関わる NAb 力価の閾値は、最小陽性 (14x) 付近にあることが考えられ
る。これらの個体の肝臓のベクターゲノムコピー数と遺伝子発現との間には相
関関係が見られた。本研究で調べた 48 頭のマイクロミニピッグの AAV8 に対す
る NAb の陽性率は 62.5%であった。NAb 陰性および低力価 (14 x) 陽性個体
の割合は、それぞれ 37.5%および 27.1%であり、本研究で導入遺伝子発現を確
認した NAb 力価をもつ個体の割合が高かった。ブタ血清中の抗 AAV8 抗体 (IgG)
量と NAb 力価との間に統計的有意差は示されなかった。

7. 参考文献

- [1] Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., and Sadelain, M. Gene therapy comes of age, *Science* 359. (2018)
- [2] Baruteau, J., Waddington, S. N., Alexander, I. E., and Gissen, P. Gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects, *Journal of Inherited Metabolic Disease* 40, 497-517. (2017)
- [3] Ohmori, T. Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives, *International Journal of Hematology* 2018
<https://doi.org/10.1007/s12185-018-2513-4>
- [4] Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., Morton, C. L., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., Cunningham, J. M., Srivastava, D., Basner-Tschakarjan, E., Mingozi, F., High, K. A., Gray, J. T., Reiss, U. M., Nienhuis, A. W., and Davidoff, A. M. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B, *The New England Journal of Medicine* 365, 2357-2365. (2011)
- [5] Nathwani, A. C., Reiss, U. M., Tuddenham, E. G., 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, Y. M., Halka, K. G., Basner-Tschakarjan, E., Mingozzi, F., High, K. A., Allay, J., Kay, M. A., Ng, C. Y., Zhou, J., Cancio, M., Morton, C. L., Gray, J. T., Srivastava, D., Nienhuis, A. W., and Davidoff, A. M. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B, *The New England Journal of Medicine* 371, 1994-2004. (2014)

[6] George, L. A., Sullivan, S. K., Giermasz, A., Rasko, J. E. J., Samelson-Jones, B. J., Ducore, J., Cuker, A., Sullivan, L. M., Majumdar, S., Teitel, J., McGuinn, C. E., Ragni, M. V., Luk, A. Y., Hui, D., Wright, J. F., Chen, Y., Liu, Y., Wachtel, K., Winters, A., Tiefenbacher, S., Arruda, V. R., van der Loo, J. C. M., Zeleniaia, O., Takefman, D., Carr, M. E., Couto, L. B., Anguela, X. M., and High, K. A. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant, *The New England Journal of Medicine* 377, 2215-2227. (2017)

[7] Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G. F., Wong, W. Y., and Pasi, K. J. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A, *The New England Journal of Medicine* 377, 2519-2530. (2017)

- [8] Erles, K., Sebokova, P., and Schlehofer, J. R. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV), *Journal of Medical Virology* 59, 406-411. (1999)
- [9] Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Batshaw, M. L., and Wilson, J. M. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents, *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 1586-1588. (2011)
- [10] Li, C., Narkbunnam, N., Samulski, R. J., Asokan, A., Hu, G., Jacobson, L. J., Manco-Johnson, M. J., and Monahan, P. E. Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia, *Gene Therapy* 19, 288-294. (2012)
- [11] Halbert, C. L., Miller, A. D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R. L., Ramsey, B., and Aitken, M. L. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors, *Humun Gene Therapy* 17, 440-447. (2006)
- [12] Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated

viruses, *The Journal of Infectious Diseases* 199, 381-390. (2009)

[13] Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., and Masurier, C. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors, *Humun Gene Therapy* 21, 704-712. (2010)

[14] Mingozzi, F., and High, K. A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy, *Blood* 122, 23-36. (2013)

[15] Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., and Sakata, Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals, *Journal of Medical Virology* 86, 1990-1997. (2014)

[16] Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G., and Patel, S. D. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure, *Journal of Virology* 74, 1761-1766. (2000)

[17] Sun, J. Y., Chatterjee, S., and Wong, K. K., Jr. Immunogenic issues

concerning recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy,

Current Gene Therapy 2, 485-500. (2002)

[18] Grimm, D., and Kay, M. A. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy, *Current Gene Therapy* 3, 281-304. (2003)

[19] Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., Lessard, R. R., Sommer, J. M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H. C., High, K. A., and Kay, M. A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response, *Nature Medicine* 12, 342-347. (2006)

[20] Jiang, H., Couto, L. B., Patarroyo-White, S., Liu, T., Nagy, D., Vargas, J. A., Zhou, S., Scallan, C. D., Sommer, J., Vijay, S., Mingozzi, F., High, K. A., and Pierce, G. F. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy, *Blood* 108, 3321-3328. (2006)

- [21] Scallan, C. D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J. M., Zhou, S., Couto, L. B., and Pierce, G. F. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice, *Blood* 107, 1810-1817. (2006)
- [22] Wang, L., Calcedo, R., Bell, P., Lin, J., Grant, R. L., Siegel, D. L., and Wilson, J. M. Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors, *Humun Gene Therapy* 22, 1389-1401. (2011)
- [23] Murphy, S. L., Li, H., Zhou, S., Schlachterman, A., and High, K. A. Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adeno-associated vectors targeted to the liver, *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 138-145. (2008)
- [24] 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, *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 318-323. (2013)

- [25] Mingozi, F., and High, K. A. Overcoming the Host Immune Response to Adeno-Associated Virus Gene Delivery Vectors: The Race Between Clearance, Tolerance, Neutralization, and Escape, *Annual Review of Virology* 4, 511-534. (2017)
- [26] Svendsen, O. The minipig in toxicology, *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 335-339. (2006)
- [27] Köhn, F. History and Development of Miniature, Micro- and Minipigs, In *The minipig in biomedical research*. (McAnulty, P. A., Dayan, A.D., Ganderup, N. -C., & Hastings, K.L., Ed.), pp 3-15, CRC Press. (2012)
- [28] Kaneko, N., Itoh, K., Sugiyama, A., and Izumi, Y. Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: preface, *Journal of Pharmacological Sciences* 115, 112-114. (2011)
- [29] Tanikawa, Y., Hagiwara-Nagasawa, M., Kambayashi, R., Goto, A., Chiba, K., Kitta, K., Hoshiai, K., Izumi-Nakaseko, H., Naito, A. T., and Sugiyama, A. Characterization of microminipig as a laboratory animal for safety pharmacology study by analyzing fluvoxamine-induced cardiovascular and dermatological adverse reactions, *Cardiovascular Toxicology* 19, 412-421. (2019)

- [30] Tozaki, T., Gamo, S., Takasu, M., Kikuchi, M., Kakoi, H., Hirota, K. I., Kusano, K., and Nagata, S. I. Digital PCR detection of plasmid DNA administered to the skeletal muscle of a microminipig: a model case study for gene doping detection, *BMC Research Notes* 11, 708. (2018)
- [31] Iwatsuki-Horimoto, K., Nakajima, N., Shibata, M., Takahashi, K., Sato, Y., Kiso, M., Yamayoshi, S., Ito, M., Enya, S., Otake, M., Kangawa, A., da Silva Lopes, T. J., Ito, H., Hasegawa, H., and Kawaoka, Y. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection, *Journal of Virology* 91. (2017)
- [32] Maddalena, A., Tornabene, P., Tiberi, P., Minopoli, R., Manfredi, A., Mutarelli, M., Rossi, S., Simonelli, F., Naggert, J. K., Cacchiarelli, D., and Auricchio, A. Triple Vectors Expand AAV Transfer Capacity in the Retina, *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 524-541. (2018)
- [33] Trapani, I. Dual AAV Vectors for Stargardt Disease, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1715, 153-175. (2018)
- [34] Schlegel, P., Huditz, R., Meinhardt, E., Rapti, K., Geis, N., Most, P., Katus, H. A., Muller, O. J., Bekeredjian, R., and Raake, P. W. Locally Targeted Cardiac Gene Delivery by AAV Microbubble Destruction in a Large Animal

Model, *Human Gene Therapy Methods* 27, 71-78. (2016)

[35] Ishiwata, A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., and Sakata, Y. Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice, *The Journal of Gene Medicine* 11, 1020-1029. (2009)

[36] Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., and Ozawa, K. Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors, *Humun Gene Therapy* 17, 921-928. (2006)

[37] Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., and Kume, A. Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector, *The Journal of Gene Medicine* 13, 114-122. (2011)

[38] Fein, D. E., Limberis, M. P., Maloney, S. F., Heath, J. M., Wilson, J. M., and Diamond, S. L. Cationic lipid formulations alter the in vivo tropism of AAV2/9 vector in lung, *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 2078-2087. (2009)

- [39] Guo, P., Yu, C., Wang, Q., Zhang, R., Meng, X., and Feng, Y. Liposome Lipid-Based Formulation Has the Least Influence on rAAV Transduction Compared to Other Transfection Agents, *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 9, 367-375. (2018)
- [40] Falese, L., Sandza, K., Yates, B., Triffault, S., Gangar, S., Long, B., Tsuruda, L., Carter, B., Vettermann, C., Zoog, S. J., and Fong, S. Strategy to detect pre-existing immunity to AAV gene therapy, *Gene Therapy* 24, 768-778. (2017)
- [41] Guo, P., Zhang, J., Chrzanowski, M., Huang, J., Chew, H., Firrman, J. A., Sang, N., Diao, Y., and Xiao, W. Rapid AAV-Neutralizing Antibody Determination with a Cell-Binding Assay, *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 13, 40-46. (2019)
- [42] Kruzik, A., Koppensteiner, H., Fetahagic, D., Hartlieb, B., Dorn, S., Romeder-Finger, S., Coulibaly, S., Weber, A., Hoellriegl, W., Horling, F. M., Scheifflinger, F., Reipert, B. M., and de la Rosa, M. Detection of Biologically Relevant Low-Titer Neutralizing Antibodies Against Adeno-Associated Virus Require Sensitive In Vitro Assays, *Human Gene Therapy Methods* 30, 35-43. (2019)

- [43] Louis Jeune, V., Joergensen, J. A., Hajjar, R. J., and Weber, T. Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy, *Human Gene Therapy Methods* 24, 59-67. (2013)
- [44] Mingozi, F., Chen, Y., Edmonson, S. C., Zhou, S., Thurlings, R. M., Tak, P. P., High, K. A., and Vervoordeldonk, M. J. Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue, *Gene therapy* 20, 417-424. (2013)
- [45] Meliani, A., Boisgerault, F., Fitzpatrick, Z., Marmier, S., Leborgne, C., Collaud, F., Simon Sola, M., Charles, S., Ronzitti, G., Vignaud, A., van Wittenberghe, L., Marolleau, B., Jouen, F., Tan, S., Boyer, O., Christophe, O., Brisson, A. R., Maguire, C. A., and Mingozi, F. Enhanced liver gene transfer and evasion of preexisting humoral immunity with exosome-enveloped AAV vectors, *Blood Advances* 1, 2019-2031. (2017)
- [46] Fitzpatrick, Z., Leborgne, C., Barbon, E., Masat, E., Ronzitti, G., van Wittenberghe, L., Vignaud, A., Collaud, F., Charles, S., Simon Sola, M., Jouen, F., Boyer, O., and Mingozi, F. Influence of Pre-existing Anti-capsid Neutralizing and Binding Antibodies on AAV Vector Transduction, *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 9, 119-129. (2018)

[47] Majowicz, A., Nijmeijer, B., Lampen, M. H., Spronck, L., de Haan, M., Petry, H., van Deventer, S. J., Meyer, C., Tangelder, M., and Ferreira, V. Therapeutic hFIX Activity Achieved after Single AAV5-hFIX Treatment in Hemophilia B Patients and NHPs with Pre-existing Anti-AAV5 NABs, *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 14, 27-36. (2019)

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、自治医科大学分子病態研究センター遺伝子治療研究部の水上浩明教授、医学部生化学講座病態生化学部門の大森司教授、先端医療技術開発センター医療技術トレーニング部門の菱川修司准教授、奈良県立医科大学血栓止血医薬生物学の坂田飛鳥先生には多大なるご指導ご鞭撻を頂き、心より感謝申し上げます。

また、本研究は自治医科大学分子病態研究センター遺伝子治療研究部および医学部生化学講座病態生化学部門で実施させていただき、両部門の皆様から多くのご支援、ご協力を頂きました。ここに深く御礼申し上げます。

2020 年 3 月