

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460407

研究課題名(和文) 適正製造規範に適合する簡易精製が可能な次世代AAVベクターの開発

研究課題名(英文) Purification of rAAV-1 and -9 with ultracentrifugation-free technique towards GMP production.

研究代表者

平井 幸彦 (Hirai, Yukihiro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10089617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：第1世代の2型や5型AAVのキャプシドのheparinやムチンに対する親和性に基づいて、第2世代のキャプシドを種々に混合した新たなAAVベクターを作成し、そのアフィニティークロマトを用いて簡易精製する方法の開発を申請した。しかし、実験を進める過程で、type 1 およびtype 9 AAVベクターの各々を、適正製造規範(GMP)への準拠が可能な簡易精製法を確立できる可能性を見出した。そこで、高価なアフィニティークロマト用カラムの必要が無く、標準作業手順上の煩雑さを含む超遠心分離を含まないtype 9 AAVベクターの作成・精製のdown-stream processingを確立した。

研究成果の概要(英文)：The current production of rAAV from the transfected cell lysate and purification based on CsCl or iodixanol density ultracentrifugation are not suitable for large-scale processing. Although rAAV1 and rAAV9 are promising therapeutic vectors for genetic neuromuscular disorders, the large-scale purification method for those vectors has not yet been established. In this study, we elaborate the novel chromatography-mediated methods for purification of rAAV1 and rAAV9 from the serum-free culture supernatant with ultracentrifugation-free technique towards large-scale and GMP production.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：AAV ベクター精製法 適正製造規範準拠 down-stream processing AAV type 1 vector AAV type 9 vector

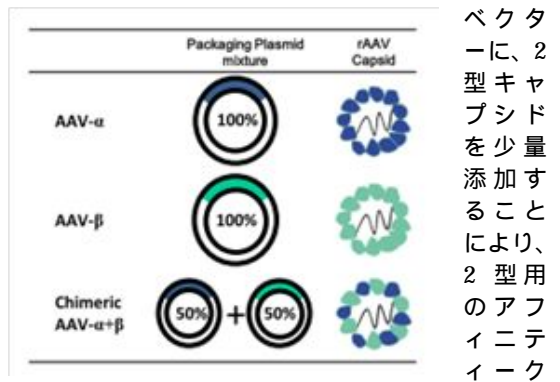
1. 研究開始当初の背景

AAV のウイルス粒子は エンベロープ構造を持たず、それぞれ、分子量が 87, 73, 62 kDa の VP1, VP2, VP3 という三つのウイルス外殻蛋白質であるキャプシド蛋白質, 60 個より構成される正二十面体構造のキャプシドを持っている。組換え AAV ベクターのプロトタイプである AAV2 型以外の血清型 (血清型 1-12 型) AAV の組換えベクターが最近作成されている。これらの血液型ベクターはそれぞれ遺伝子発現効率に相違があるばかりか (Mol. Ther., 16, 1073- 80, 2008)、プロトタイプの 2 型ベクターに比べ、1 型は筋肉で、4 型は脳室の上皮細胞で、5 型は気道粘膜、神経細胞で、6 型は肺胞で、7 型は網膜、肝臓に、8 型のマウスの尾静脈投与では、全身の組織、特に心、筋肉、肺、腎等に効率良く遺伝子導入し、脳・血液関門を超えて脳内の神経細胞や星状細胞にまで遺伝子導入し、9 型はほとんどの臓器で特異性が高いと報告されている。我々の作成したこれらの血清型ベクターもほぼ同様な組織特異性を確認している (Cancer Investigation, 29:353, 2011)。このことは、血清型の異なった AAV ベクターはそれぞれ異なった細胞受容体と結合し、異なった細胞内輸送経路を介して移動し、異なった遺伝子発現過程を取る事を示唆する。この新しい血清型ベクターをヒトの遺伝子治療に応用できれば、導入遺伝子の臓器への選択的導入、遺伝子発現効率、発現期間も 2 型ベクターに比べて優れるため、ウイルスの投与量を下げることが可能であり、投与ウイルスに起因する抗体産生の抑制や、投与回数を下げる事が可能となる。

しかし、新世代の 7-12 型 AAV ベクターはこれまでの第 1 世代ベクター (1-6 型) の様に、存在する野生型 AAV ウイルスゲノムを基に組み換えて作成されたベクターではない。ヒト・サル臓器より抽出された宿主ゲノム DNA より、不顕性感染時に宿主ゲノムへ挿入された AAV 遺伝子のキャプシド部分を PCR 法により増幅・抽出し、プロトタイプである AAV 2 型遺伝子の AAV キャプシド遺伝子と置換して、パッケージングプラスミド化したものである。このようなキャプシドを持つ実際のウイルスは現時点では存在していないので、新世代の AAV ベクターの感染に必要な細胞受容体も同定されて居らず、第 1 世代の 2 型、5 型ウイルスに用いられたようなウイルスの細胞受容体アナログを用いたアフィニティークロマトによる簡便・迅速な精製法は適応出来ない。

従来よりの AAV ベクター精製法は牛胎児血清を 10% 含む細胞培養液存在下で燐酸カルシウム法によって 3 種のプラスミドをヒト胎児腎組織由来 HEK293 細胞へトランスフェクションし、2-3 日後に、核内に産生された AAV ベクターを、凍結融解して細胞破碎し、回収する方法である。このため、従来の AAV ベクター分画はヒト培養細胞および牛胎児血清由来のタンパク質が共存し、精製するには塩化セシウムや Iodixanol 等を用いた密度勾配超遠心法を行うのが一般的で、適正製造規範 (GMP) に適合した生物学的な薬品として、AAV ベクターを調製するには問題があった。しかし、Polyethylenimine (PEI) を用いて 3 つのプラス

ミドを無血清培地中の HEK293 細胞へトランスフェクションし、5 日間連続培養すると、1, 6, 7, 8, 9 型-AAV ベクターの 60-86% が細胞培養液へ分泌されることが報告された (Hum. Gene Ther. 21 1259-71, 2010)。申請者らも、これらの細胞培養液を排除限界分子量の大きな (750 kDa) Tangential flow filtration (TFF) により低分子量のタンパク質を除去しながら濃縮精製すると、牛胎児血清や 293 細胞由来のタンパク質のコンタミの少ない粗 AAV ベクター分画を得ることが出来た。本申請の新しいハイブリッド AAV をこの無血清培地を用いた AAV ベクター調製法にて作成できれば、最終的なアフィニティークロマト処理により down-stream processing が確立できると考える。殆どの AAV ベクターのキャプシド蛋白質はどれも構造的に類似しており、4, 5 型を除けば、プロトタイプの 2 型キャプシドのアミノ酸配列に対して 80 -88 % の相同性、DNA 配列で 78 -82 % の相同性を有する。これら構造的に類似した異なる血清型キャプシド蛋白質の混合状態、ウイルスを作成すれば、単一の血清型では持ち得ない特性を併せ持つ新しい性質の AAV ベクターを作成することが可能であることを Hauck ら (Mol. Ther., 7, 419- 425, 2003)、Rabinowitz ら (J. Virol., 78, 4421-4432, 2004) が報告している。下図の様に、このハイブリッドキャプシド作成方法の優れた点は組換えウイルスのキャプシドを供給するパッケージングプラスミド同士の単純な混合によって、作成出来ることであり、その混合比率 (図では 1 : 1) を変えれば、ハイブリッドキャプシドの性質も連続的に変更出来る点にある。そこで、遺伝子導入効率の high が、その細胞受容体が未だに不明な第二世代 (7 型-10 型) の AAV



ベクターに、2 型キャプシドを少量添加することにより、2 型用のアフィニティークロマトを用いて簡便に最終の精製が可能なハイブリッド AAV ベクターの作成を試みる計画であった。既に、第一世代の 1 型と第二世代の 8 型とを混合し、その混合比率に依存した特性を有する新しい AAV ベクターを作成していた。

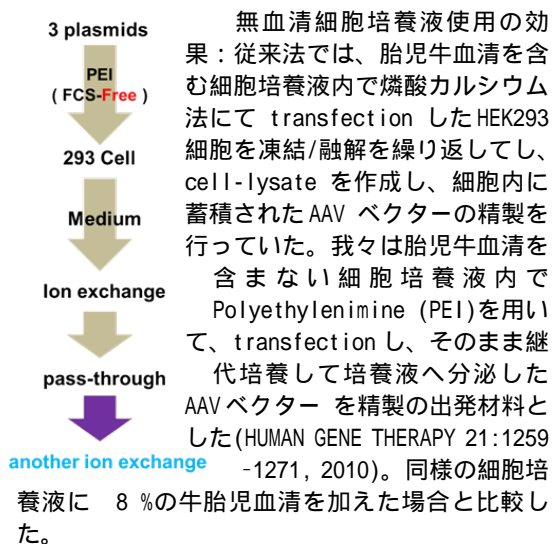
2. 研究の目的

第 1 世代の 2 型や 5 型 AAV のキャプシドの heparin やムチンに対する親和性に基づいて、第 2 世代のキャプシドを種々に混合した新たな AAV ベクターを作成し、そのアフィニティークロマトを用いて簡易精製する方法の開発を申請した。しかし、実験を進める過程で、type1 および type 9 AAV ベクターの各々を適正製造規範 (GMP) への準拠が可能な簡易精製法を確立できる可能性を見出し

た。そこで、高価なアフィニティークロマト用カラム等を使用せず、標準作業手順書の記載が煩雑な手順のために記載が困難な超遠心分離手法を含まない type 1 および type 9 AAV ベクターの作成・精製法の確立と、それらの down-stream processing の確立をまず試みた。

3. 研究の方法

キャプシドのアミノ酸組成の相違に基づく表面化荷電の相違により、全ての Serotype に適応する精製方法の確立が困難であると考えられる。そこで、無血清細胞培養液に分泌した AAV vector を出発材料とし、ゲル濾過、イオン交換樹脂等の HPLC を用いて、密度勾配遠心(超遠心)の分離を行わないが、抗原となる AAV 中空キャプシドを多く含まない type1 および type 9 AAV ベクター共通の部分精製方法の確立を検討した。



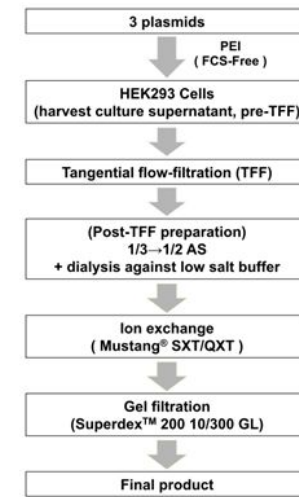
AAV を含む培養濃縮液の濃縮と低分子量タンパク質を減少させる試み：750-kDa molecular mass cut-off の tangential flow filtration (TFF : (UFP-750-E-3MA; 750,000 nominal molecular weight cut off [NMWC], GE Healthcare, Westborough, MA)) を用いて AAV を含む無血清培養液(分泌 AAV 分画)を約 1 / 2 0 程度に濃縮した。

飽和硫酸処理を用いた沈殿法の検討：

TFF にて濃縮した AAV ベクター分画と同量の飽和硫酸溶液を加えて半飽和硫酸沈殿法により、AAV ベクターを沈澱とした(1/2 AS)。また、TFF にて濃縮した分画の半量の飽和硫酸溶液を加えて 1/3 飽和硫酸沈殿法を行い、低速の遠心分離により沈澱を除去し後に、さらに開始試料容積の半量の飽和硫酸溶液を加えて、最終的に半飽和硫酸沈殿させた AAV ベクター(1/3 1/2 AS)を回収した。5-20% gradient polyacrylamide gels を用いた 5-20%グラディエントゲル SDS-PAGE のタンパク質染色像 (Oriole Fluorescent Gel Stain もしくは Quick Coomassie Brilliant Blue 染色)、EGFP-targeted primer を用いた qPCR にて測定した benzonase(250 U/μl, Merck Millipore, Billerica, MA) 耐性の AAV ベクターゲノム数の測定により、飽和硫酸処理の方法を評価した。

type1AAV ベクターの密度勾配遠心(超遠心)を用いない精製法の確立

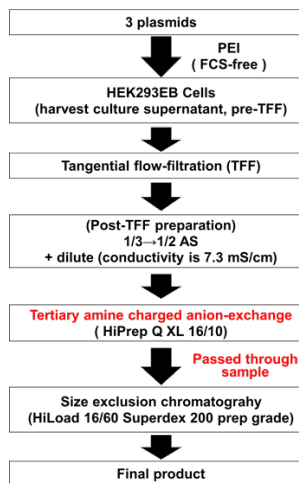
飽和硫酸処理沈澱を 3.3mM MES-HEPES-NaOAc (以下 MHN) 50mM NaCl pH 6.5 +0.01% Fluoric F-68 (界面活性剤) 溶液に溶解させた。そのこの細胞培養



分画を、Mustang S/Q (陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを直結させたもの：Pall Corporation, Ann Arbor, MI) に吸着させ、Mustang Sを外し、Mustang Qを 50-250mM NaCl の Stepwise gradient の塩濃度 (MHN pH8.+0.01% F-68 NaCl) で溶出させた。溶出させたウイルス分画を 1.0 ml ずつ集め、qPCR、C2C12

cell(マウス筋原培養細胞)への transduction による EGFP 発現等により、r A A V 1 の流出部位を確認後、Ultracel 30K により濃縮し、ゲル濾過 (Superdex 200 HR) (MHN pH6.5 300mM NaCl) を行なった。

Type 9 AAV ベクターの密度勾配遠心(超遠心)を用いない精製法の確立



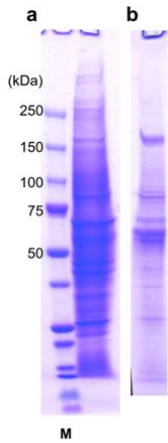
無血清培養液下の HEK293 EB 細胞(アデノウイルスの E1 遺伝子領域 (E1A, E1B19K, and E2A) と Bcl-xL 遺伝子を発現強化した HEK293 細胞)へ 3 つのプラスミドを遺伝子導入後、9 型 AAV ベクターを細胞培養液中に分泌させた。細胞培養液を Type 1 AAV ベクターと同様に 750-kDa

molecular mass cut-off の tangential flow filtration にて、低分子量のタンパク質を除去しながら濃縮・精製し、牛胎児血清や細胞由来のタンパク質の混入の少ない粗 Type 9 AAV ベクター AAV 分画を得た。Type 1 AAV ベクターと同様に 1/3 飽和硫酸処理により不要な共存蛋白質を低速度の遠心除去後、1/2 飽和硫酸処理により、Type 9 AAV vector を沈殿させた。沈澱を 3 .3mM MES-HEPES-NaOAc 緩衝液 pH8.0 にて、電気伝導度が 7.3 mS/cm まで希釈後、HiPrep Q XL16/10 (GE Healthcare) に負荷して、流出液としてベクターを回収した。5-20%グラディエントゲル SDS-PAGE の蛋白質染色で精製度を、電子顕微鏡像によって、中空キャプシドの含有率を検討した。

4. 研究成果

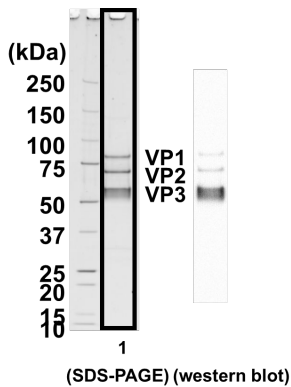
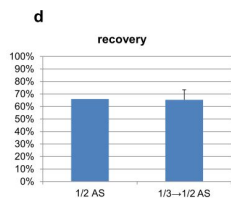
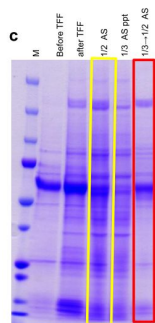
無血清細胞培養培地使用の効果および AAV を含む培養濃縮液の濃縮と低分子量タンパク質を減少させる試み：

従来法に従い、ダルベッコの細胞培養培地に 8% の牛胎児血清を加え、培養後に 4 回の凍結・融解法により細胞抽出液を作成した場合 (a)、および無血清細胞培養液使用し、そのまま、5 日間培養を継続した細胞培養液を 750-kDa molecular mass cut-off の tangential flow filtration (TFF ; (UFP-750-E-3MA; 750,000 nominal molecular weight cut off [NMWC], GE Healthcare, Westborough, MA)) を用いて AAV を含む無血清培養液 (分泌 AAV 分画) を約 1/25 程度に濃縮したもの (b) について、各々を 5-20% グラディエントゲル SDS-PAGE を行い、蛋白染色にて比較した。左図 (b) の無血清細胞培養液系は力価は変わらずに、明らかに、共存蛋白質が少なかった。この改良で、serotype 1, 6, 7, 8, 9 の AAV ベクターは破壊した細胞からのコンタミおよび牛胎児血清由来の蛋白質の汚染を最小限できた。これまでは報告 (James A. Allayr ら) では molecular mass cut-off が 100-kDa のものを使用していたが、より大きな 750-kDa に変更することにより、低分子量の共存蛋白質を効率良く除去すること出来き、濃縮に費やす時間も短縮することが出来た。



飽和硫酸処理を用いた沈殿法の検討：

5-20% グラディエントゲル SDS-PAGE を行い、蛋白染色にて比較したところ、rAAV type 1 および type 9 ともに、1/3 1/2 AS 精製法は、1/2 AS に比し、低分子量の共存タンパク質を除去することが出来 (下図 (c))、EGFP-targeted primer を用いた qPCR にて測定した benzonase (250 U/ μ l, Merck Millipore, Billerica, MA) 耐性の AAV ベクターゲノム数の測定により、1/3 1/2 AS 精製法は回収率もほぼ同様であることを確認した前頁下図 (d)。以後の実験には 1/3 1/2 AS を用いた。

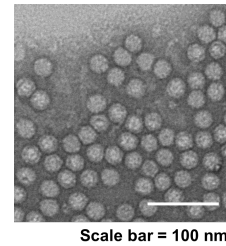


超遠心を用いない新しい Type 1 AAV ベクターの作製法の開発。

1) 5-20% グラディエントゲル SDS-PAGE と western blot 解析：

遺伝子導入した HEK293 細胞の培養上清を限外濾過、硫酸分画、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを組み合わせて、高純度の 1 型 AAV vector (AAV1) を調製し、5-20% グラディエントゲル SDS-PAGE の蛋白質染色 (Oriole staining) で、ほぼ VP1, VP2, VP3 の 3 本のバンドとなった (上図左)。同様の試料を用い、抗 AAV キャプシド・モノクロナル抗体である B1 を用いた western blot 解析においても VP1, VP2, VP3 の 3 本のバンドのみを認めた (上図右)。

2) 電子顕微鏡像による中空粒子 (empty particles) の含有率の測定



Type 1 AAV 粒子のネガタイプ染色像を 1086 個観察し、中空の empty particles は 36 個であり、約 3% (36/1086 particles) であった。

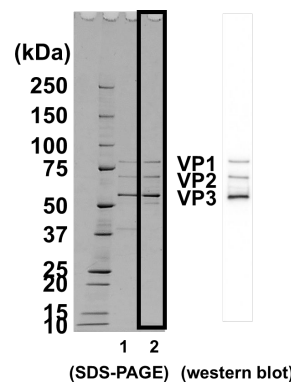
Table 1 Infectious titer measured by FACS

C2C12	2×10^5 cells		
Sample	5×10^4	7×10^4	2×10^5
Final product	11.61% (6.71)	15.13% (7.85)	39.82% (18.28)
Post-TFF preparation	8.99% (5.68)	12.78% (6.80)	38.55% (16.99)

また、上表が示すように、精製が進むにしたがってウイルス力価の上昇もみとられた。これらの工程は、GMP 準拠で行うことが容易であり、新しい臨床用ベクターの大量生産法として期待できる。

超遠心を用いない新しい Type 1 AAV ベクターの作製法の開発。

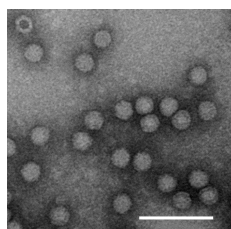
1) 遺伝子導入した HEK293EB 細胞の培養上清を限外濾過後、Type 1 AAV ベクターと同様に 1/3 飽和硫酸処理により不要な共存蛋白質を低速度の遠心



除去後、1/2 飽和硫酸処理により、Type 9 AAV vector を沈殿させた。沈渣を 3.3mM MES-HEPES-NaOAc 緩衝液 pH8.0 にて、電気伝導度が 7.3 mS/cm まで希釈後、HiPrep Q XL16/10 (GE Healthcare) に負荷するだけで、流出液として Type 9 AAV ベクターを回収した。

5-20%グラディエントゲル SDS-PAGE の蛋白質染色(Oriole staining)で、ほぼ VP1 ,VP2 ,VP3 の3本のバンドとなった(前頁右下図左)。同様の試料を用い、抗 AAV キャプシド・モノクロナル抗体である B1 を用いた western blot 解析においても VP1 ,VP2 ,VP3 の3本のバンドのみを認めた(前頁右下図右)。

2) 電子顕微鏡像による中空粒子(empty particles)の含有率の測定



Scale bar = 100 nm

Type 9 AAV 粒子のネガティブ染色像を 1640 個観察し、中空の empty particles は 37 個であり、約 2.3 % (37/1640 particles)であった。約 97%の粒子がウイルス・ゲノムを有しており、実際の遺伝子細胞治療に使用可能な高力価・高純度であることが示された。

これらの工程も、GMP 準拠で行うことが容易であり、新しい臨床用ベクターの大量生産法として期待できる。

Type 1 AAV ベクターと同様に精製段階が進むに従ってウイルス力価の上昇もみとられた。最終的に $5 \times 10^{E+9}$ の HEK293 E B 細胞より、 $1.5 \times 10^{E+15}$ viral genome の精製 AAV ベクターを down-stream processing によって得ることが出来た。

これらの工程も、GMP 準拠で行うことが容易であり、新しい臨床用ベクターの大量生産法として期待できる。現在、Molecular Therapy に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Machida A, Kuwahara H, Mayra A, Kubodera T, Hirai T, Sunaga F, Tajiri M, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal administration of AAV9-shRNA inhibits target gene expression in the dorsal root ganglia of neonatal mice. *Mol Pain*. 査読有, **9, 2013**, , **36-45**. doi:10.1186/1744-8069-9-36

Hirai T, Enomoto M, Kaburagi H, Sotome S, Yoshida-Tanaka K, Ukegawa M, Kuwahara H, Yamamoto M, Tajiri M, Miyata H, Hirai Y, Tominaga M, Shinomiya K, Mizusawa H, Okawa A1 Yokota T. Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury. 査読有, *Mol Ther*. **22, 2, 2013, 409-419**. doi:10.1038/mt.2013.247

Yamazaki Y, Hirai Y, Miyake K, Shimada T. Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF. 査読有, *Scientific Reports* **4**, 2014, **5506**.

doi: 10.1038/srep0550

Hironaka K, Yamazaki Y, Hirai Y, Yamamoto M, Miyake N, Miyake K, Okada T, Morita A, Shimada T. Enzyme replacement in the CSF to treat metachromatic leukodystrophy in mouse model using single intracerebroventricular injection of self-complementary AAV1 vector. 査読有, *Scientific Reports* **5**, 2015, **13104**. doi: 10.1038/srep13104

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada H. Ultra-centrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). 査読有, *Mol Ther. Methods & Clinical Development* **3**, 2016, **15058**. doi: 10.1038/mtm.2015.58

Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, Adachi K, Nitahara-Kasahara Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Narisawa S, Millán J L, Shimada T, Okada T. Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. 査読有, *Mol Ther. Methods & Clinical Development* **3**, 2016, **15059**. doi: 10.1038/mtm.2015.59

[学会発表](計 12 件)

Yamazaki Y, Hironaka K, Hirai Y, Miyake K, Shimada T. Targeted Gene Transfer into the Ependymal Cells and Long - Term Enzyme Replacement in the CSF by Intraventricular Injection of AAV Vector Serotype 1. The 16th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会), 2013 年 05 月 15 日 ~ 2013 年 05 月 18 日. Salt Lake City, Utah, USA .

Igarashi T, Miyake K, Kobayashi, Takahashi K, Miyake N, Iijima O, Nakamoto K, Hirai Y, Shimada T, Takahashi H. Efficient Protection of Retina By Tyrosine-Mutated Self-Complementary AAV2 Vector Encoding BDNF in a Rat Retinal Ischemic Injury Model. The 17th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会), 2014 年 05 月 21 日 ~ 2014 年 05 月 24 日, Washington, DC, USA.

Igarashi T, Miyake K., Kobayashi M, Takahashi K, Miyake N, Iijima O, Nakamoto K, Hirai Y, Shimada T, Okada T, Takahashi H. Tyrosine-mutated AAV2 mediated BDNF rescued inner retina in rat retinal ischemic injury model. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014). 2014 年 08 月 06 日 ~ 2014 年 08 月 08 日. Tokyo, Japan.

Tomono T, Hirai Y, Shimada T, Onodera M, Okada T. Production and purification of AAV1

and AAV9 vectors without using ultracentrifugation. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014). 2014年08月06日～2014年08月08日. Tokyo, Japan.

Nakamura A, Iijima O, Miyake K., Watanabe A, Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T. Improvement of hypophosphatasia model mice by muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase using self-complementary AAV8 vector. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014). 2014年08月06日～2014年08月08日. Tokyo, Japan.

Yamazaki Y, Hironaka K, Miyake N, Hirai Y, Miyake K, Okada T, Shimada T. Long-term enzyme supplementation into the CSF to treat metachromatic leukodystrophy by intraventricular injection of AAV1 vector. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT2014). 2014年08月06日～2014年08月08日. Tokyo, Japan.

Nakamura A, Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Okada T, Shimada T. Rescue of lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus mediated muscle specific expression of bone targeted alkaline phosphatase. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (国際学会), 2014年10月18日～2014年10月22日. San Diego, California, USA.

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Chiyo T, Shimada T, Onodera M., Okada T. Efficient Scalable Purification of rAAV1 Using Ion-Exchange and Gel-Filtration Chromatography To Avoid Ultra-centrifugation Procedure. The 18th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会), 2015年05月13日～2015年05月16日. New Orleans, Louisiana, USA.

Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T. Prolonged Survival and Improved Phenotypes of Lethal Hypophosphatasia Model Mice by Adeno-Associated Virus-Mediated Muscle Transduction of Bone-Targeted Alkaline Phosphatase. The 18th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会), 2015年05月13日～2015年05月16日. New Orleans, Louisiana, USA.

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Chiyo T, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. The large-scale purification of rAAV1 from the serum-free cultured medium by ion-exchange and gel-filtration chromatography-steps with ultra-centrifugation-free technique. The 21st Annual

Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2015年07月24日～2015年07月26日. Osaka, Japan.

Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Kinoshita H, Noguchi T, Abe S, Shimada T, Okada T. Gene therapy to rescue lethal hypophosphatasia model mice by adeno-associated virus-mediated muscle transduction of bone-targeted alkaline phosphatase. The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2015年07月24日～2015年07月26日. Osaka, Japan.

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Ultracentrifugation-free Chromatography-mediated Large-scale Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 1 (rAAV1) and rAAV9 from the Serum-free Culture Supernatant. The 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (国際学会), 2016年05月04日～2016年05月07日, Washington, DC, USA.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 幸彦 (HIRAI YUKIHIKO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：10089617