

20000552

厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

(H-12-エイズ-006)

## 平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13(2001)年3月

主任研究者 松田道生  
(自治医科大学)

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- 血友病の治療とその合併症の克服に関する研究 \_\_\_\_\_ 1  
(自治医科大学 松田道生)

## II. 分担研究報告

1. 血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、SIV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験 \_\_\_\_\_ 9  
(自治医科大学 坂田洋一)
2. AAV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験 \_\_\_\_\_ 15  
(自治医科大学 小澤敬也)
3. イヌモデルを用いた血友病 A 遺伝子治療の基礎実験 \_\_\_\_\_ 18  
(奈良県立医科大学 吉岡 章)
4. 治療に適した SIV ベクターのデザインならびに治療用遺伝子搭載ベクターの作成と応用に関する研究 \_\_\_\_\_ 22  
(株式会社ディナベック研究所 長谷川護)
5. 第 VIII 因子インヒビターの高感度検出と免疫寛容導入に関する研究 \_\_\_\_\_ 25  
(東京医科大学 新井盛夫)

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 30

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 \_\_\_\_\_ 31

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

主任研究者 松田道生 自治医科大学

研究要旨

- 1) 血友病 A 遺伝子治療法の基礎的研究：ウイルスベクターに組み込む FVIII 遺伝子の構築に関して検討した。結果、トロンビンにより限定分解される配列と、フーリンによりプロセッシングを受ける配列の一部を残した B domain deleted FVIII (BDDSQ) が、細胞からの分泌、安定性、活性の 3 点で、現時点で最良であった。プロモータに関しては、特異性と活性の 2 点より解析した。細胞特異性については、十分な検討までには至らなかったが、臓器を特定するまでの *in vivo* の研究に用いる搭載プロモータとして種々の標的細胞で強い活性の見られた EF1- $\alpha$ 、及び PGK1 を選定した。ウイルスベクターとしては、simian immunodeficiency virus(SIV)ベクターを中心に、adeno-associated virus (AAV)、第三世代レンチウイルスベクターなどを検討した。特に病原性が見られない SIV ベクターについては、*in vitro* で培養細胞を用いて、また、腸管膜静脈より投与して、*in vivo* における臓器への分布を検討した。肝実質細胞、血管内皮細胞に発現が確認された。AAV ベクターに関しては packaging 細胞株の改良により産生効率の大幅な改善が達成された。遺伝子治療の基礎実験に不可欠な第 VIII 因子欠損マウスは、米国カザチアン博士より供与され、計画メーティングの結果、今後の実験に必要な数が準備できた。血友病 A イヌを用いた生体部分肝移植による遺伝子治療研究については、本年度は、手術時の止血に必要なクリオ分画を蓄積するとともに、出血症状に関する詳細な検討を行った。
- 2) 血友病 B: 米国からの技術導入による臨床応用の準備：プロトコール作成準備委員会を作り、計 4 回自治医科大学研修センターにて委員会を開催し、プロトコールの素案を作成した。また、High 博士のもとへ共同研究者 2 名が留学し、AAV-2 ベクターによる骨格筋を target とした臨床治験に参加した。
- 3) 血友病インヒビタの解析と対策：第 VIII 因子の抗体産生 B 細胞を検出

するための測定系確立のために、抗原を精製した。また、免疫寛容導入の可能性を KO マウスに生下時に第 VIII 因子製剤を投与して、検討中である。

分担研究者：

自治医科大学分子病態研究部

助教授 坂田洋一

自治医科大学遺伝子治療研究部

教授 小澤敬也

奈良県立医科大学小児科

教授 吉岡章

株式会社ダイナバック研究所

所長 長谷川護

東京医科大学臨床病理学

助教授 新井盛夫

#### A.研究目的

血友病の治療は凝固因子製剤の補充療法が行われている。しかしながら、これはあくまで出血したときの care 療法であり患者は何時でも致命的な出血の危険にさらされている。また、血漿由来製剤の場合は未知のウイルスにより、そして、リコンビナント製剤の場合も微量の夾雑物により、思いもかけない副作用にみまわれる危険がある。更に補充療法により例えば重症血友病 A の場合は 30% 近くの例に因子に対する同種抗体（インヒビタ）が発生する。本研究班では、以下の 3 項目を目標として研究を展開する。：1) 血友病 A を中心に、我が国における血友病に対する遺伝子治療法の基礎的研究の充実と技術開発、並びに臨床研究への展開

を目指す。2) 米国で遺伝子治療が試みられている血友病 B に関しては米国からの技術導入を計り、速やかに臨床応用を指向する。3) 血友病インヒビタに対し、産生レベルの解析とともに、その産生抑制の方法を検討する。

#### B.研究方法

# 血友病 A 1) transgene：第 VIII 因子の full cDNA (9kb) を Dutch の Dr.Mourik より供与された。Alternative splicing によると思われるが何カ所かに mutation が挿入されていたため、これを除去し、complete full cDNA を得た。その内、翻訳領域（約 7.1kb）から、これまでの第 VIII 因子に関する基礎的解析の報告を元に、種々の FVIII 改変体を作製した。具体的には、von Willebrand 因子との結合部位を残し、B domain を全て除いてしまったもの、トロンビンに限定分解される配列のみを除いたもの、その他、プロセッシングを受ける部位を含み種々の程度に B domain を残した改変 cDNA を作製した。これらを組み込んだ真核細胞発現プラスミドベクターを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、発現タンパク質の細胞からの分泌、及び生物活性を検討した。

2) プロモータ活性：プロモータ領域を、レポータープラスミドである pGL3-Basic

Vector (Promega) に組み込み、Lipofectoamin を用いて培養細胞（血管内皮細胞、肝細胞など）に transfection した。24 時間後に最大発現するルシフェラーゼの酵素活性を SV40promoter を基準にして比較した。

3) ベクターの検討：*SIV* ベクター green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をマーカー遺伝子として組み込んだウイルスベクター *SIVG* を用いて、*in vitro* で肝癌細胞、正常ヒト肝細胞、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、牛大動脈血管内皮細胞の培養細胞とインキュベーションし、発現を GFP 蛍光発色により検討した。次いで *in vivo* においてマウス肝臓への遺伝子導入の可能性を腸管膜静脈より *SIVG* を投与して検討した。*AAV* ベクター：これまで開発を進めてきた Cre/loxP 法をベースとし、さらに変異 loxP 配列を利用することにより、AAV の Rep, Cap 両蛋白質の発現を制御可能にした AAV ベクター作製用パッケージング細胞株の開発を進めた。FVIII の重鎖と軽鎖をコードする cDNA を別々に2つのベクタに分けて搭載し、その発現を観察した。**第三世代レンチウイルスベクター**：B-domain deleted イヌ FVIII を挿入した組み換えレンチウイルスベクターを用いて肝癌細胞、及びマウスの腹腔内投与による肝臓への導入を検討した。

4) 第 VIII 因子ノックアウトマウス：FVIII 欠損ホモザイゴートのメス 2 匹、オスの血友病 A マウス 2 匹を米国 Dr.Kazazian の

ご厚意により、供与された。これを計画メーティングした。

5) イヌクリオの蓄積：正常イヌの血漿から定法に習いクリオ分画を精製した。

# 血友病 B：Avigen 社の技術導入を前提に、自治医科大学血液グループと班員を中心としたプロトコール作成準備委員会を作り、計 4 回自治医科大学研修センターにて委員会を開催した。また、共同研究者 2 名が High 博士のもとへ 1 ヶ月留学し、AAV-2 ベクターによる骨格筋を target とした臨床治験に参加した。基礎的検討としては、骨格筋に関してはこれまで世界的に標準とされてきた AAV-2 に由来するベクターでは発現が不十分とする報告がみられることから、この点を改善するため他の血清型のベクターを用いた解析を行っている。特に、我々が塩基配列及びベクターとしての有用性を従来より検討してきている AAV-3 について、LacZ をマーカー遺伝子とするベクターを作製し、筋肉内注射による遺伝子導入効率を検討した。

# インヒビタの検討：FVIII の抗体産生 B 細胞を検出するための測定系確立のために、本年度は、リコンビナント FVIII 製剤より、FVIII モノクローナル抗体カラムクロマトグラフィーにより、アルブミンを除去し精製・濃縮した。さらに、FVIII にトロンピンを反応させ、活性 FVIII を作製した。そこに EDTA を添加して金属イオンをキレートし、3 種のフラグメント(A1,

A2, A3-C1-C2)を Mono Q および Mono S カラムを用いて精製・濃縮した。また、FVIIIKO マウスに出産直後から時間を変えて FVIII を投与し、出血コントロールの手段を検討するとともに、10wks 経過後 FVIII を繰り返し投与し、インヒビタを確実に産生させる条件を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究全体を通して、患者に対する治療の効率の探求は勿論であるが、安全性という点に重点をおいて進める。遺伝子治療については、ヒトに対し非病原性の改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発とその応用を目指したもので、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。生体部分肝移植を利用した治療は、当面血友病 A イヌに限定した試みであり、以下の遺伝子治療と共通の倫理的配慮で十分と考える。各種動物を用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて各大学の動物実験指針規定に沿って行う。筑波霊長類センターとの共同研究として厚生省霊長類共同利用施設で実施する予定のサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」及び筑波霊長類センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。臨床研究を実施する場合は、被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除するとともに、インフォームドコンセントをと

る。特に遺伝子解析に関しては、新規取扱規程に準拠して、人権を保障しながら適正に実施する。また、学内審査委員会及び必要な場合は国レベルでの審査を経た上で実施する。

C.研究結果

# 血友病 A 1)ベクターに組み込む FVIII

遺伝子の検討：ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、搭載できるコンストラクトのサイズに制約がある。これまで米国で血友病 B の遺伝子治療臨床応用に用いられてきた adeno-associated virus (AAV)ベクターは 5kb 以下であり、我々が利用を考えている simian immunodeficiency virus(SIV)ベクターの場合は 7kb である。そこで、FVIII として生理的活性を十分に発現しうる必要最小限の遺伝子の構築に関して検討した。結果、トロンビンにより限定分解される配列と、フーリンによりプロセッシングを受ける配列の一部を残した B domain deleted FVIII (BDDSQ) が、細胞からの分泌、安定性、活性の 3 点で、現時点で最良であった。それでも 5kb あるため、更なる短縮を検討中である。2) プロモータの検討：肝臓、骨格筋、血管内皮、脂肪細胞、皮膚細胞、CD34 陽性細胞などの標的細胞への投与法に適したプロモータの検討を行った。本年度は特異性については十分な検討が出来なかったが、全ての標的細胞で発現効率に関しては EF1- $\alpha$ 、

及び PGK-1 に十分な活性が確認できた。

3) ベクターの検討、SIV ベクター：まず、*in vitro* における SIV ベクターを利用したヒト細胞への遺伝子導入を検討した結果、肝癌細胞、正常ヒト肝細胞、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞にコンフルエントの状態では SIVG の濃度依存性に GFP の発現が観察された。次いで *in vivo* における検討では、マウス肝部分切除の有無に関わらず、肝実質細胞とともに類洞細胞に GFP の発現が観察された。AAV ベクター：変異 loxP 配列を利用することにより Rep, Cap 両蛋白質の発現を制御可能にした AAV ベクター作製用パッケージング細胞株の開発を進めた結果、10cm ディッシュあたり  $2 \times 10^{11}$  ゲノムコピーのベクターを産生する細胞株を得た。この作製効率は以前の Rep 単独制御を行った細胞株の約 40 倍に相当する。第三世代レンチウイルスベクター：B-domain deleted イヌ FVIII を挿入した組み換えレンチウイルスベクターを用いて肝癌細胞、及びマウスの腹腔内投与による肝臓への導入を検討した結果、いずれも発現が確認された。4) ノックアウト(KO)マウスのコロニー作製：出産後、メスが出血死するなど、トラブルも見られたが、順調に計画メーティングが進行した。*in vivo* の実験に向けて遺伝子治療、インヒビタの研究に必要な数の KO マウスが準備できつつある。5) 生体部分肝移植：血友病 A イヌモデルを用いた部分肝移植による遺伝子治療

を検討するために、本年度は手術の際の止血剤としてのイヌクリオ分画を必要量の約 80% 蓄積した。

# 血友病 B：Avigen 社の技術導入を前提に、プロトコール作成準備委員会を作り、プロトコールの素案を作成した。また、共同研究者 2 名が渡米し、骨格筋を target とした臨床治験に参加し、多くの研究者と親交を得るとともに、新しい知識の獲得をはたした。AAV の血清型に関する基礎的検討の結果、AAV-3 に由来するベクターを用いた場合にも筋肉で良好な遺伝子発現が認められた。

# インヒビタの検討：第 VIII 因子の抗体産生 B 細胞を検出するための測定系確立のために、本年度は、製剤より、A1,A2,A3-C1-C2 のフラグメントを精製した。また、免疫寛容導入の可能性を KO マウスに生下時に第 VIII 因子製剤を投与して、検討中である。

#### D. 考察

初年度ということもあり、研究成果の多くは基礎的準備段階にとどまっている。しかし、血友病 A に関しては、transgene、プロモータの検討がすすみ、さらに我が国オリジナルの SIV ベクターをはじめ、ベクターの構築作製が着実に、Knockout マウス、血友病イヌなど実験に必要な動物も準備が進んでおり、今後の発展が期待できる。

血友病 B の遺伝子治療は米国が先行した

待できる。

血友病Bの遺伝子治療は米国が先行したものの、発現効率が実用レベルに達していない。発現臓器の選択や、AAVベクターの血清型の再検討に至るまでの基礎的検討も必要となり、本研究グループの貢献できる点も多い。血友病Aの遺伝子治療に至っては、世界的にも緒についたばかりで、基礎的、技術的問題が数多く残されている。臨床研究に移行するまでには十分な基礎的検討が必要で、研究グループの貢献できる部分は大きいものと思われる。インヒビタ対策も、新生児、成人のいずれをも対象にした免疫寛容を誘導する画期的な試みである。

#### E. 結論

初年度であり、研究成果の殆どは基礎的準備段階にとどまっている。しかし、遺伝子治療は血友病に唯一のcureをもたらす治療法であり、研究グループにおいても研究は着実に進行しており今後の発展が期待できる。インヒビタ対策を含め、達成されれば、患者の生活の改善はもとより、経済的にも社会に対し、資するところ大である。

#### F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Matsuda M : Structure and function of fibrinogen inferred from hereditary dysfibrinogens. *Fibrinolysis & Proteolysis* 14:187-197, 2000.
2. Matsuda M : Structure and function of fibrinogen inferred from hereditary dysfibrinogens. *Intern J Haematol*, 72:436-447,2000.
3. Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N, Niwa K, Sameshima M, Mimuro J, Weisel J W, Nagita A, Matsuda M : End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with a B $\beta$ -chain extension lead to fragile clot structure. *Blood* 96:3779-3785, 2000.
4. Matsuda, K.M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K., and Matsuda, M.: A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: Generation of angiostatin endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 7: 589-596, 2000.
5. Matsuda M, Sugo T : Hereditary disorders of fibrinogen . *Ann N Y Acad Sci*, in press
6. Kimura, H., Sakata, Y., Hamada, H., Yoshida, Y., Sato, O., Deguchi, J., Sugawara, Y., Makuuchi, M., Miyata, T. In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *J. Vasc.*



- Surg. 32:353-63, 2000
7. Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 559-563, 2000.
  8. Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transduction efficiency. *Anal. Biochem.* 278: 91-92, 2000.
  9. 吉岡 章; 血友病の新しい治療戦略  
臨床血液 41 (5); 365-369, 2000
  10. 田中一郎、中 宏之、嶋 緑倫; 血友病 インヒビター 血栓止血誌 11 (6); 559-571, 2000
  11. K.Nogami, M.Shima, K.Hosokawa, M.Nagata, T.Koide, E.L.Saenko, I.Tanaka, M.Shibata and A.Yoshioka : Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed. cleavage at arg1689. *J.Biol. Chem.* 275(33):25774-25780, 2000
  12. M.Shibata, M.Shima, S.Morichika, J.McVey, E.G.D.Tuddenham, I. Tanaka, H.Suzuki, K.Nogami, Y.Minamoto, T.Hato, E.L.Saenko, D.Scandella, and A.Yoshioka : An alloantibody recognizing the FVIII A1 domain in a patient with CRM Reduced Haemophilia A due to deletion of a large portion of the A1 domain DNA sequence. *Thromb Haemost* 84:442-448, 2000
  13. Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M, Hasegawa M. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther.* 2000 Sep 1;11(13):1863-74.
  14. 渡辺 潤、天野景裕、新井盛夫、守谷研二、藤田 進、西田恭治、福武勝幸：遺伝子組換え活性型第VII因子製剤の持続輸注が奏功した血友病A インヒビターの下顎咽頭軟部組織出血、血栓止血誌 12:39-46, 2001
- H. 知的財産権の出願、登録の状況
1. 特許取得  
出願日 1999.6.22  
特許の名称 2 遺伝子を発現するベクター (SIV)  
出願番号 特願平 11-175646  
審査請求中出願日 2000.6.1  
特許の名称 ヘマグルチニン活性を有するシュードタイプレトロウイルスベクター

出願番号 特願 2000-169090

出願済み

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
分担 研究報告書  
血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、  
SIV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験  
研究者 坂田洋一 自治医科大学 助教授

研究要旨

血友病遺伝子治療法の開発のため、遺伝子導入に用いるウイルスベクターへ組み込む凝固因子遺伝子の改変とそれを転写調節する適切なプロモーターの基礎的検討した結果、ウイルスベクターへ組み込み可能な塩基長へ Factor VIII cDNA を改変しえた。この改変 Factor VIII cDNA から発現される改変 Factor VIII は、B domain の大部分が除去され、なおかつ細胞内プロセッシングと thrombin による切断に必要と思われるアミノ酸配列を残し、*in vitro* で培養細胞発現させると、細胞外へ分泌され、凝固活性を有し良好な比活性を示した。遺伝子発現に必要なプロモーターの検討を行い、血管内皮細胞に特異的な強力なプロモーターを開発しえた。また、組織特異性はないがいずれの細胞でも強力に導入遺伝子を発現しえるプロモーターとしては PGK1 が適切であり、ウイルスベクターにより肝実質細胞で改変 FVIIIcDNA を発現させるために PGK1 プロモーターをもちいることとした。遺伝子導入にもちいるウイルスベクターとして、SIVvector の遺伝子導入効率を *in vitro*、*in vivo* で検討した。肝実質細胞、類洞細胞、血管内皮細胞は pseudotype SIV vector を用いることで効率よく遺伝子導入が可能であった。SIV vector は病原性がない African green monkey 由来の lenti virus vector で、3' LTR を改変し self inactivation type vector で、安全であり VSVGpseudotype としてあるため広範囲な宿主細胞へ遺伝子導入可能である。SIVvector を用いて肝実質細胞、類洞血管内皮細胞へ血液凝固因子遺伝子が導入されれば、導入遺伝子から産生された血液凝固第 VIII 因子は効率良く血流へ移行し、凝固反応に寄与できるものと考えられる。

A. 研究目的

難治性血液疾患の一つである血友病 (血友病 A: 凝固第 VIII 因子欠乏症、血友病 B: 凝固第 IX 因子欠乏症) では深部出血のリスクを常に持ち、脳出血など致命的な出血も発症する。欠乏する凝固因子レベルを数%に保つことができれば、日常生活においては出血のリスクが激減し、十分な治療効果をあげることができる。予防的な凝固因子製剤の投与は現実的でなく、その意味でも遺伝子治療により凝固

因子遺伝子導入をはかり恒常的に凝固因子レベルを上昇させることがより優れた治療法と考えられ、治療にもつながるものである。凝固第 VIII 因子 mRNA の発現は肝臓以外にも認められているが、主たる産生臓器は肝臓 (肝実質細胞、肝類洞血管内皮細胞) であると考えられている。凝固第 VIII 因子は 2351 アミノ酸からなる巨大ポリペプチドとして産生され、細胞内でペプチド結合の解裂、糖鎖付加、特定アミノ酸の硫酸化などのプロセッシング

と特殊な分泌機構が必要であるため、その血液への移行が効率よく行われるためには導入した第 VIII 因子遺伝子の発現を肝臓や血管内皮細胞で行うことが適切な方法の一つであると考えられる。本研究では、血友病 A の遺伝子治療を開発するため、第 VII 因子遺伝子の改変、適切なプロモーターの選別、ウイルスベクターをもちい肝臓、血管内皮細胞への遺伝子導入を試み、血友病遺伝子治療の基礎的研究を行った。

## B. 方法

### 1. B domain deleted factor VIII (BDD) cDNA の作成と B DD FVIII の細胞での発現

凝固第 VIII 因子 cDNA は全長 9 kb で、その翻訳領域も 7 kb に及ぶため、ウイルスベクターへの組み込みは困難である。凝固第 VIII 因子はその中央部分に凝固活性発現には直接関与しない B domain を持つ。この B domain は細胞内プロセッシングにおいて部分的に除去され、凝固反応の場で thrombin により A2domain より切り離される。生理活性を有し、なおかつウイルスベクターへの組み込み可能な塩基長へ凝固第 VIII 因子 cDNA を改変するため、B domain の大部分を除き、なおかつ細胞内プロセッシングと thrombin による切断に必要と思われるアミノ酸配列を残した BDD FVIII を発現し得る改変凝固第 VIII 因子 cDNA (B domain deleted FVIII cDNA, BDDFVIII cDNA) の作製を試みた。また、この改変 FVIII cDNA を組み込んだ真核細胞発現プラスミドベクターを培養細胞に遺伝子導入し B ドメインを欠如した第 VIII 因子 (BDD F VIII) を発現させ、その生物活性、細胞からの分泌を第 VIII 因子凝固活性と以下に述べる高感度酵素免疫測定法をもちい検討した。

### 2. 遺伝子治療に適したプロモーターの検討

ウイルスベクターを用いて導入遺伝子を発現させるために強力なウイルスプロモーターが用いられることが多いが、ウイルスプロモーターは強力ではあるものの組織特異性はなく、また生体内ではプロモーター活性が減弱・消失 (シャットダウン) することもある。このため遺伝子導入を行う細胞に特異的かつ強力なヒト由来のプロモーターを用いて導入遺伝子の発現をおこなうことが求められる。我々は遺伝子治療に適したプロモーターの開発をめざし、ヒト由来プロモーターとして EF1 プロモーター、CAG プロモーター、PGK1 プロモーター、Fbg B プロモーター、ウイルスプロモーターとして SV40 プロモーター、我々が開発した血管内皮細胞特異的プロモーターである CEP プロモーター、CEPFX1 プロモーター、CEF プロモーターの活性と FVIII 発現能を検討した。これらのプロモーターの 3' 側にレポーター遺伝子または BDD FVIII cDNA、さらにポリアデニレーションシグナル配列を組み込んだプラスミドベクターを構築し培養肝細胞あるいは培養血管内皮細胞へ遺伝子導入しレポーター遺伝子発現と BDD FVIII の発現を検討した。

### 3. SIVG を用いた培養ヒト細胞への遺伝子導入

ヒト細胞への遺伝子導入が SIVG により可能か検討するため、肝癌細胞 (Hep G2)、正常ヒト肝細胞 (Chang Liver Cell)、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を *in vitro* で培養し、 $10^4$ - $7$  IU/ml の SIVG を含む培地によりさらに 72 時間培養した後、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察した。

### 4. SIVG を用いた実験動物への遺伝子導入

SIVG をもちいることで、*in vivo* において

肝臓に遺伝子導入が可能かを検討するため、マウスをもちいた動物実験を行った。30%肝臓部分切除 (+/-) の後、精製したSIVG ( $10^8$ ) を腸管膜静脈から注入し、マウスの肝臓において GFP の発現が認められるかを検討した。SIVG 注入 7 日後に 4%PFA にて灌流固定後、各臓器を 4%PFA 固定し、凍結切片を作成し蛍光顕微鏡により GFP の発現を検討した。

#### 5. 凝固第 VIII 因子高感度酵素免疫測定法の開発

凝固第 VIII 因子のヒト正常血液濃度は約 100 ng/ml (約 0.4 nM) である。重症血友病 A 患者では凝固第 VIII 因子レベルは凝固活性 1% 以下であるが、凝固第 VIII 因子を正常の数%レベルに上昇させることで有効な治療効果がえられると考えられる。血友病 A の遺伝子治療法を開発するためには、遺伝子導入により発現される凝固第 VIII 因子、BDD F VIII を高感度で検出定量する高感度酵素免疫測定法の開発を試みた。

#### 6. 凝固第 VIII 因子欠損マウスの導入

モデル動物は遺伝子治療法の開発に不可欠である。血友病モデル動物として凝固第 VIII 因子欠損マウス (血友病 A のモデル動物) を米国カザチアン博士より導入した。

### C. 結果

#### 1. B domain deleted factor VIII (BDDF VIII) cDNA の作成と B DD FVIII の細胞での発現

PCR をもちいた deletion と site directed mutagenesis をもちいて 4.5 kb 塩基長の BDD FVIII cDNA を構築した。BDD FVIII を発現ベクターにくみこみ細胞に導入したところ、BDD FVIII は細胞外へ分泌され凝固活性を有し、良好な比活性を示した。しかし、BDD FVIII

は細胞内にも蓄積する傾向を示したことから、FVIII の細胞内プロセッシングと細胞内輸送を改善するさらなる検討が必要と考えられた。

#### 2. 遺伝子治療に適したプロモーターの検討

培養肝細胞において最も強力なプロモーターであったのは PGK1 プロモーターで CAG プロモーターの約 10 倍、EF1 プロモーターの 100 倍強力であった。肝臓特異的な Fbg B プロモーターは十分なプロモーター活性も示さなかった。血管内皮細胞では我々が開発した CEPFX1 プロモーターが最も強力で、EF1 プロモーターの 1000 倍、CAG プロモーターの 100 倍、PGK1 プロモーターの 5 倍強力であった。PGK1 プロモーターは強力であるものの組織特異性はなく、肝臓での導入遺伝子の発現には肝臓特異的で強力なプロモーターの開発が必要であると考えられた。血管内皮細胞での導入遺伝子の発現には、我々が開発した CEPFX1 プロモーターが最適であると考えられた。

#### 3. SIVvector を用いた培養ヒト細胞への遺伝子導入の検討

HepG2、Chang Liver Cell、HUVEC のいずれの培養細胞も SIVG の濃度依存性に GFP の発現が認められ、コンフルエントの細胞においても MOI 5-10 においてほぼ 100% の細胞に GFP の発現が認められた。

#### 4. SIVG を用いた実験動物への遺伝子導入

マウス肝組織では、肝実質細胞とともに、類洞細胞に GFP の発現が認められた。GFP の発現は 30%肝臓部分切除したマウスにおいては 30%肝臓部分切除を行わないマウスに比較して多かったが、肝切除を行わなくとも GFP の発現が認められた。肝部分切除の有無により遺伝子導入効率が変わることは、肝再生と遺伝子発現が関わるのか、MOI が変わるため

か、あるいは sequestration のためか今後検討する必要があると考えられた。

#### 5. 凝固第 VIII 因子高感度酵素免疫測定法の開発

従来法では 10pM レベルまでの FVIII しか検出できなかったが、我々は凝固第 VIII 因子に対するモノクロナル抗体とポリクロナル抗体による酵素免疫測定法へ biotin tyramide による増幅反応を組み合わせることで 0.4 pM (正常血液濃度 0.1% 相当) レベルの凝固第 VIII 因子を検出可能な高感度測定法の開発に成功した。

#### 6. 凝固第 VIII 因子欠損マウスの導入

カザチアン博士より分与された凝固第 VIII 因子欠損マウスを交配し、経過中自然出血により死亡するマウスもみられたが、凝固第 VIII 因子欠損マウスを繁殖させることに成功した。今後の遺伝子発現実験へ使用する予定である。

#### D. 考察

血友病の遺伝子治療は、遺伝子治療のよいモデルとして欧米においても多くの研究者が精力的に研究し、すでに血友病 B の遺伝子治療が AAV ベクターをもちいて臨床治験も行われているが、凝固第 VIII 因子 cDNA は全長 9 kb で、その翻訳領域も 7 kb に及ぶため、ウイルスベクターへの組み込みは困難であり血友病 A の遺伝子治療は立ち後れている。データの発表すらないが欧米ではレトロウイルスベクターを静脈内投与する血友病 A の遺伝子治療がヒトで行われつつある。ただしこの方法は多くのリスクが伴うと考えられ、安全に血友病 A の遺伝子治療を行うためにはベクターを含め基礎的な検討が必要と考えられる。我々が用いる SIVvector は病原性がない African

green monkey 由来の lenti virus vector で、3' LTR を改変し self inactivation type vector で、VSVGpseudotype としてあるため広範囲な宿主細胞へ遺伝子導入可能である。

SIV vector は HIV 由来 lenti virus vector と比較し安全であり、BDD F VIII cDNA も組み込み可能でかつ種々のプロモーターを利用でき、また、われわれの成果からも分かるように非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であるなど多くの利点を有している。また、他の lenti virus vector が遺伝子導入に肝切除が必要であるのに対し、SIVvector では肝切除により遺伝子導入効率が変わるものの肝切除は必須では無く、SIV vector の優位性と思われる。SIV vector により肝臓の肝実質細胞や類洞細胞へ遺伝子導入が可能であることは、導入効率をさらにあげることも必要であるが、第 VIII 因子の生理的産生細胞での導入第 VIII 因子遺伝子の発現が可能であることを示し、その意義は大きい。

#### E. 結論

本年度の研究結果からは、われわれが作成した BDD F VIII cDNA はウイルスベクターへ組み込むことも可能な塩基長で第 VIII 因子凝固活性を有する機能分子を発現することが確認された。BDD FVIII cDNA は完全長 FVIII cDNA に比較してウイルスベクターへの組み込みが容易であるばかりでなく、CHOK1 細胞などにおいても導入された BDD FVIII cDNA から凝固活性を有する BDDFVIII 分子が発現され分泌できうることから、完全長 FVIII cDNA よりも細胞選択性が少ないと思われる。導入する BDD FVIII cDNA を発現させるプロモーターとして、肝実質細胞には最適なプロモーターは開発できていないが、今後は HAAT プロモーターなども検討したい。血管内皮細

胞での BDD FVIII cDNA 発現には、我々が開発した CEPFX1 プロモーターが最適であると考えられた。発現誘導性を高めるなど今後さらにプロモーターの改善を検討する。肝実質細胞、血管内皮細胞は pseudotype SIV vector を用いることで効率よく遺伝子導入が可能であると考えられた。これらの細胞に血液凝固因子遺伝子が導入されれば、導入遺伝子から産生された血液凝固第 VIII 因子は効率良く血流へ移行し、凝固反応に寄与できるものと考えられる。これらの成果をふまえ、PGK1 あるいは CEPFX1 プロモーター、BDD FVIII cDNA を組み込んだ SIV vector を作成し実験動物への遺伝子導入実験を施行する予定である。また、*ex vivo* において SIV vector により細胞あるいは臓器への遺伝子導入を行い、細胞や臓器を移植する方法を検討する。この方法は vector の直接投与にともなうウイルス血症や免疫系への作用を軽減でき、分裂細胞への組み込みと安定した発現細胞の選択、遺伝子組み込み部位の同定も可能であるなど様々なリスクを回避できると思われる。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Kohno, I, Inuzuka, K., Itoh, Y., Nakahara, K., Eguchi, Y., Sugo, T., Soe, G., Sakata, Y., Murayama, H., Matsuda, M. A monoclonal antibody specific to the granulocyte-derived elastase-fragment D species of human fibrinogen and fibrin: Its application to the measurement of granulocyte-derived elastase-digests in plasma. *Blood* 95, 1721--1728, 2000
2. Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y. An autoantibody against prothrombin aberrantly alters the proenzyme to facilitate formation of a complex with its physiological inhibitor antithrombin III without thrombin conversion. *Blood* in press
3. Mimuro, J., Muramatsu, S., Hakamada, Y., Mori, K., Urabe, M., Madoiwa, S., Hirose, S., Matsuda, M., Ozawa, K., Sakata, Y. Recombinant Adeno-Associated Virus Vector-Transduced Vascular Endothelial Cells Express The Thrombomodulin Transgene Under The Regulation of Enhanced Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter. *Gene Therapy* in press
4. Kimura, H., Sakata, Y., Hamada, H., Yoshida, Y., Sato, O., Deguchi, J., Sugawara, Y., Makuuchi, M., Miyata, T. In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *J. Vasc. Surg.* 32:353-63, 2000
5. Hojo, Y., Ikeda, U., Takahashi, M., Sakata, Y., Takizawa, T., Okada, K., Saito, T., Shimada, K. Matrix metalloproteinase-1 expression by interaction between monocytes and vascular endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32:1459-1468, 2000
6. Miyata, M., Sakata, Y., Shibukawa, G., Shishido, H., Munakata, O., Kazuta, Y., Shio, K., Ssajima, T., Sato, Y., Kasuwa, R. Primary antiphospholipid syndrome presenting with cerebral ischemia, thrombocytopenia anemia and proteinuria successfully treated with warfarin potassium. *Internal Medicine* 39:748-753, 2000
7. Watanabe, T., Minakami, H., Sakata, Y., Obara, H., Wada, T., Onagawa, T., Sato, I. Effect of Heparin on activated partial thromboplastin time in patients undergoing gynecologic or obstetric

Surgery. Gynecol. Obstet. Invest. in  
press



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

AAV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験  
分担研究者 小澤敬也 自治医科大学

研究要旨

AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けた基礎的検討を行った。AAV ベクターは筋細胞や肝細胞などの非分裂細胞への遺伝子導入が可能であるが、より効率よい導入及び発現のためにキャプシド及びプロモーターの点から検討を開始した。また、効率よいベクター産生系の開発としてパッケージング細胞株の改良を行い、産生効率の大幅な改善を認めた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。治療用遺伝子としては、血友病 A と B に対してそれぞれ第 VIII 因子と第 IX 因子の遺伝子を用い、肝臓あるいは骨格筋への最適なベクター投与法を検討する。

B. 研究方法

(i) これまで開発を進めてきた Cre/loxP 法をベースとし、さらに変異 loxP 配列を利用することにより、AAV の Rep, Cap 両蛋白質の発現を制御可能にした AAV ベクター作製用パッケージング細胞株の開発を進めた。

(ii) AAV ベクターの in vivo 投与法の基礎実験として、まず第一に、肝臓及び骨格筋の各々への投与法に適したプロモーターの検索を行っている。具体的には、肝臓に対しては、従来より汎用している CMV プロモーターによる発現が不十分と考えられることから、CAG、PGK、EF-1 $\alpha$  等のプロモーターをエリスロポエチン

(Epo) cDNA に連結したベクタープラスミドを構築し、それをもとに作製した AAV ベクターを経門脈的に投与した場合の遺伝子発現効率を血清エリスロポエチン濃

度及びヘマトクリット値で比較し、肝臓での発現に適したプロモーターを見出すことを目指す。

(iii) 次に、ベクターの感染のステップに関わる要素として、AAV の血清型について検討を開始した。骨格筋に関してはこれまで世界的に標準とされてきた AAV-2 に由来するベクターでは発現が不十分とする報告がみられることから、この点を改善するため他の血清型のベクターを用いた検討を行っている。特に、我々が塩基配列及びベクターとしての有用性を従来より検討してきた AAV-3 について、LacZ をマーカー遺伝子とするベクターを作製し、筋肉内注射による遺伝子導入効率を検討した。

(iv) 凝固第 VIII、IX 因子遺伝子を搭載した AAV ベクターの開発：ヒト第 IX 因子遺伝子の場合 cDNA (2.8kb) をそのまま単一ベクターに、ヒト第 VIII 因子遺伝子の場合 cDNA のサイズ (7.2kb) の関係から重鎖と軽鎖にスプリットし、二つのベクターに分けて搭載した後、共感染させることで発現を目指す。

C. 研究結果

(i) 変異 loxP 配列を利用することにより Rep, Cap 両蛋白質の発現を制御可能にした AAV ベクター作製用パッケージング細胞株の開発を進めた結果、10cm ディッ

シュあたり  $2 \times 10^{11}$  ゲノムコピーのベクターを産生する細胞株を得た。この作製効率は以前の Rep 単独制御を行った細胞株の約 40 倍に相当する。

(ii) 骨格筋及び肝臓に対するプロモーターの検討に関する今年度の成果としては、マウス Epo cDNA のクローニングと各プラスミド構築が終了し、培養細胞株に導入した際の遺伝子発現を確認した。現在、AAV ベクターを準備中であり、動物（マウス）に投与する有効量（およそ一匹あたり  $10^{12}$  スケール）が作製でき次第、動物個体レベルでの検討に移る予定である。また、骨格筋へ投与する場合は、CMV プロモーターが標準となるが、CK プロモーターなどの骨格筋特異的とされるものは活性が不十分であり、当面は CAG プロモーターについて検討を行っている。

(iii) AAV の血清型に関する検討の結果、AAV-3 に由来するベクターを用いた場合にも筋肉で良好な遺伝子発現が認められた。従来の AAV-2 を用いたベクターとの定量的な比較を現在行っている。

・凝固第 VIII、IX 因子遺伝子を搭載した AAV ベクターの開発：ヒト第 IX 因子遺伝子の場合には cDNA (2.8kb) をそのまま単一ベクターに、ヒト第 VIII 因子遺伝子の場合には cDNA のサイズ (7.2kb) の関係から重鎖と軽鎖にスプリットし、二つのベクターに分けて搭載した。プロモーターとしては現在基礎実験が進行中であり（上記）、最終的にはその結果を参考にすることになるが、これまでの知見から標準系として筋肉用には CMV 由来、肝臓用には EF-1 $\alpha$  由来のものを用いて作製を行っている。

#### D. 考察

初年度ということもあり研究成果の多くは基礎的な準備段階にとどまっているが、ベクターの構築及び作製が着実に進展しており、今後それらの検討結果が得られることが期待される。

血友病 B に対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、まだ発現効率が不十分であり、実用レベルに到達していない。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかりそうである。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後 AAV ベクターに関する基礎研究としては AAV ベクター作製用パッケージング細胞株に関する諸条件の最適化を図り、一層の産生効率の向上を目指した改良を行う。肝臓及び骨格筋に対する至適プロモーターの検討は、動物個体レベルでのエリスロポエチン濃度並びにヘマトクリット値で得られた結果に基づき結論を得ることで、以後のベクター構築に反映させる。また、凝固第 VIII、IX 因子遺伝子を搭載した AAV ベクターの開発としては、より発現効率の良いプロモーターの利用を試みる。また、AAV ベクターのキャプシドの改変として、他の血清型の AAV ベクターを用いた筋肉内への投与方法につき引き続き検討する。特に AAV-3 はヒト由来と考えられることから様々な血清型の中でも安全性の高いものと考えられ、骨格筋に投与した場合の遺伝子発現効率が AAV-2 よりも高いとする報告もみられることから、今後の進展が期待される。

#### E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子の解析を開始した。また、基盤技術として、パッケージング細胞株の改良を行った。これらの技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発につながることを期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Gamma rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene Ther.* (in press)
2. Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Ishibashi, S., Takizawa, T., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene reduces vasoconstrictive response. *Exp. Clin. Cardiol.* (in press)
3. Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and Ozawa, K.: Targeted integration of foreign dna into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* (in press)
4. Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 559-563, 2000.
5. Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Shibuya, M., Monahan, J., Urabe, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharm.* 36: 438-443, 2000.
6. Shen, Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, I., Fujimoto, K., Fan, D., Ogawa, O., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Nagatsu, L., Urano, F., Suzuki, T., Ichinose, H., Nagatsu, T., Monahan, J., Nakano, I., and Ozawa, K.: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic l amino acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene

therapy of Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11: 1509-1519, 2000.

7. Shimazaki, K., Urabe, M., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.: Adeno associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther.* 7: 1244-1249, 2000.
8. Matsuda, K.M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K., and Matsuda, M.: A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: Generation of angiostatin endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 7: 589-596, 2000.
9. Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transduction efficiency. *Anal. Biochem.* 278: 91-92, 2000.
10. Ozawa, K., Fan, D.-S., Shen, Y., Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Ogawa, M., Urabe, M., Kume, A., and Nakano, I.: Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J. Neural Transm.[suppl]* 58: 181-191, 2000.

2. 学会発表

国内 計 39 回  
外国 計 16 回

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし

## 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業） 分担研究報告書

### イヌモデルを用いた血友病 A 遺伝子治療の基礎実験

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

**研究要旨**；血友病A患者の Cure を目指して、イヌモデルを用いた生体部分肝臓移植と第1世代アデノウイルス・第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療研究を開始した。現時点で肝臓移植は血友病Aの Cure という観点から最も確実な方法と考えられ、イヌモデルの基礎研究と移植術時必要と予想されるイヌクリオ製剤の蓄積が終了した。第1世代アデノウイルスは *in vitro* 系において十分量の発現をみたが、ウイルスの特性を考えた場合先天性遺伝性疾患への応用は困難と考える。クラゲ GFP 遺伝子を担った第3世代レンチウイルスをマウスに腹腔内投与した *in vivo* 実験系においては、GFP の肝臓への導入が示唆されたが、イヌ第 VIII 因子遺伝子を担った同様の実験では、イヌ第 VIII 因子抗原を検出することができなかった。検出感度の問題および第 VIII 因子ノックアウトマウス使用など今後検討したい。

#### A. 研究目的

血友病Aは、X染色体に存在する血液凝固第 VIII 因子遺伝子の異常に起因する先天性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第 VIII 因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計ることである。これらの因子補充療法により、血友病患者の QOL が以前に比して飛躍的に向上した。しかし、血漿由来製剤では HIV/HCV 等の感染は解決したものの、ヒト血漿由来ウイルス伝搬の危険性を完全には否定できない。また、医療経済という観点からは製剤が極めて高価であるという問題が残されている。これらを解決するために、従来の止血管理を主体とする血友病 care という治療方針から、さらに一歩進めて血友病の cure をめざすという観点から、イヌモデルにおける生体部分肝臓移植と、マウス・イヌモデルを用いた遺伝子治療についての可能性を検討する。いずれの方法も従来の第 VIII 因子製剤による補充療法に依存することなく、自らの生体内で一定の第 VIII 因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減～脱却が期待される。

#### B. 研究方法

##### 1) イヌ生体部分肝臓移植

生体部分肝臓移植により、レシピエントである血友病Aイヌモデルに治療域の第 VIII 因子活性が、術後どれくらいの時期から、どの程度のレベルで発現するのか、血友病Aが治癒に至るのか、肝臓移植後にインヒビターが発生するのかなどの知見が得られるものと考えられる。今年度は、血友病Aイヌモデルの出血症状・出血頻度等を臨床的側面からモニタリングしながら、止血剤としてのイヌクリオ製剤を作成し、出血時の治療にあたりとともに、生体部分肝臓移植に備えて蓄積する。

##### 2) 遺伝子治療

第1世代アデノウイルスベクター・第3世代レンチウイルスベクターに GFP (クラゲ由来の蛍光蛋白)、B ドメインを欠失させたイヌ第 VIII 因子遺伝子をそれぞれ組み込んだ組換えウイルスを作成し、種々の培養細胞系においてその発現を確認する。次に通常のマウスに種々のルートを用い、種々のウイルス量で導入することにより、その発現と発現組織分布を検索する。

#### C. 研究結果・考察・結論

##### 1) 血友病Aイヌモデル