

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13年度 総括・分担研究報告書

平成14(2002)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. 血友病の治療をめざした生体部分肝移植 (イヌモデル) および第3世代 レンチウイルスを用いた血友病A遺伝子治療	20
(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	23
(株式会社ダイナベック研究所 長谷川 護)	
5. 第VIII因子インヒビターの特異的B細胞検出に関する研究	26
(東京医科大学 新井盛夫)	
6. 種々の血友病治療モデルにおける技術開発	29
(自治医科大学 小林英司)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	36
-----------------	----

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 自治医科大学名誉教授

研究要旨

1) 血友病 A 遺伝子治療の基礎的検討: simian immunodeficiency virus (SIV) ベクターに搭載する FVIII の遺伝子として一年目に B domain deleted FVIII cDNA (BDDSQ) を選択した。安全性の確認されている adeno-associated virus (AAV) ベクターを利用するには更なる短縮が必要となる。そこで、主として 5' 側を修飾することを検討した。しかしながら、利用可能な比活性を得るためには BDDSQ が現時点で必要不可欠であることが確認された。SIV ベクターの利用を前提として、本年は標的細胞として、臍帯血由来血液幹細胞、肝実質細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、皮膚細胞などを検討した。1年目にプラスミドベクターを用いて選択したプロモーターを SIV ベクターに搭載して再検討したところ、CMV が種々の細胞で強い活性を示したため、これを選択した。Ex vivo で CD34 陽性細胞に FVIII 或いは GFP を搭載した SIV ベクターを transfection し、至適な発現が確認された細胞を NOD/SCID マウスに移植し、骨髄への生着、末梢血中の FVIII 濃度などを検討した。骨髄への十分な生着と、骨髄細胞での FVIII 発現、及び血小板内 FVIII などが確認された。末梢血中には計算通りの FVIII レベルが得られず、ヒト BDDSQ の血中半減期などを検討中である。肝実質細胞に発現は見られたが、網内系細胞の制御が必要であることが示唆された。筋肉、皮膚細胞には発現は見られなかったが、脂肪細胞には確認された。血友病 A イヌを用いた生体部分肝移植による血友病治療の実験も一例施行した。免疫抑制剤による副作用と思われる衰弱により移植後 46 日間で死亡したが、血友病の治療は確認された。

2) 血友病 B: AAV の血清型の違いにより in vivo では transduction 効率が 100-1000 倍も異なること、しかも標的細胞、更には種によっても効率が異なることが基礎実験より示唆されたために、標的動物を霊長類カニクイザルに選んで、基礎的検討を開始した。サル FIX とヒト FIX を選択して測定するために、transgene として 3' 側にタグ遺伝子を導入した FIX cDNA と、wild type FIX cDNA の 2 つを作製した。前者は細胞からの分泌の確認、後者はヒト型のみを測定する ELISA の樹立が実験遂行に不可欠であるが、いずれも達成できた。特に後者では、ヒト FIX のみを選択的に認識するモノクロナル抗体のエピトープも同定でき、標的細胞を問わず、霊長類を用いた前臨床試験を展開していく上で強力な解析手段を得た。平成 14 年 3 月より、実際 FIX cDNA を種々の AAV に搭載したベクターを用いた霊長類での発現実験を開始した。

3) 血友病インヒビタの解析と対策: 第 VIII 因子欠損マウスを用いて、生下時より日を変えて頸静脈にヒト FVIII 濃縮製剤を投与し、10 週後、更に製剤を頻回に投与することでインヒビタの産生と免疫寛容誘導を検討した。解析はインヒビタアッセイと、抗原によるリンパ球刺激試験により解析した。結果、0 日生下

時早期に製剤を投与することが、免疫寛容誘導にクリティカルであることが示唆された。

分担研究者:

自治医科大学分子病態研究部

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学教室

教授 吉岡章

株式会社ディナベック研究所

取締役研究所長 長谷川護

東京医科大学臨床検査医学教室

助教授 新井盛夫

自治医科大学臓器置換研究部

教授 小林英司

アドバイザー

東京大学医科学研究所先端医療研究センター

助教授 北村義浩

A. 研究目的

血友病に対しては、現在、血漿由来、或いはリコンビナント凝固因子製剤を用いた補充療法による care を中心とした治療が行われている。しかしながら、これらの製剤の使用は未知のウイルスや、微量の夾雑物により思いもかけない副作用に見舞われる危険がある。また重症例では因子に対する同種抗体＝インヒビタが高頻度に発生する。突然の出血を予防するために製剤を連日投与することは経済的にも非現実的である。血漿中濃度が低く、しかも正常の数%のレベルに維持すれば出血を予防できることから遺伝子治療はこの目的にかなっている。成功すれば、高価な因子製剤の使用量が減り経済的に社会に貢献

できるのみならず、患者に cure を導き、生活の改善にもつながる。本研究では 1) 血友病の cure を目指した治療として遺伝子治療の基盤技術確立を図ること、及び 2) 濃縮製剤投与により、或いは、遺伝子治療に伴い発生することが予測される同種抗体(インヒビタ)に対する対策を検討することを目的とする。

B. 研究方法

血友病 A 1) transgene: AAV ベクターの利用も考慮して、第 VIII 因子の cDNA の翻訳領域より B domain を除いた BDDSQ の 5' 側を修飾することにより更なる短縮を図った。CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、発現タンパク質の分泌、生物活性を検討した。2) プロモータ活性: 初年度にプラスミドベクターを用いて選択した PGK1, EF1- α 、CMV を実際 FVIII 或いは GFP もしくは LacZ の cDNA を搭載した SIV ベクターに組み込み、種々の標的細胞及び HEK293 細胞での発現を検討した。3) 標的細胞の検討: 臍帯血由来 CD34 細胞に *ex vivo* で CMV-BDDSQ(或いは、GFP か LacZ) を搭載した SIV ベクター用いて、MOI 及び incubation time を変えて transduction 効率を検討した。治療目的を達成するために必要十分な条件を上記 *in vitro* アッセイにて確認し、予め一定量の放射線を照射した NOD/SCID マウスに FVIII 発現 CD34 細胞を移植した。数週間後に CD34 細胞の骨髄への生着と、末梢血中のヒト FVIII 量を測定し、遺伝子導入効果を評価した。骨髄への生着はフローサイトメトリーによる解析と第 VIII 因子特異抗体を利用した免疫染色により

検討した。肝実質細胞へは上記 SIV ベクターを FVIII ノックアウトマウスの腸管膜静脈より 10^8 transduction unit(TU)注入して、発現を GFP 発色、FVIII 免疫染色にて検討した。同量の SIV ベクターをマウス骨格筋細胞、皮膚細胞、脂肪細胞へ投与し、発現を検討した。肝実質細胞への発現はイヌ第 VIII 因子或いは GFP を搭載したヒトレンチウイルスを用いても検討した。

4) SIV ベクターの改良:ベクターのエンベロープタンパク質としての口内炎ウイルスGタンパク質(VSV-G)をセンダイウイルスの F,HN タンパク質或いはインフルエンザウイルス HA タンパク質に変えて感染性の向上と細胞毒性の軽減を図った。

5) 血友病 A イヌを用いた生体部分肝移植:血友病 A イヌの肝左葉を切除し、同胞イヌ(第 VIII 因子活性約 60%)よりの肝左葉を同位置に移植した。出血はイヌクリオグロブリンにより、また免疫抑制は Tacrolimus 0.16mg/kg により管理した。術後、血漿中 FVIII 活性のモニターと種々の生化学的データを解析した。

血友病 B1) 種々の血清型の AAV ベクターの検討: LacZ, 或いは GFP を搭載した種々の血清型の AAV ベクターを作製し、*in vivo* で 10^{10} virus genome(VG)/mouse をマウス骨格筋に、また腸管膜静脈より 10^{11} VG/mouse を投与して肝臓での発現を検討した。ヒト骨格筋の発現は初代培養骨格筋細胞を用いて検討した。発現を増強すると言われている FIX のイントロンの一部と FIX cDNA の 3' 側にタグ遺伝子を付加したものと、付加しない wild type の 2 種類の mini-gene を作製し、種々の血清型の AAV ベクターに搭載した。いずれも HEK293 細胞、CHO-k1 細胞に導入し、

発現 FIX の分泌を検討した。またヒト FIX をサルのと選別して認識しうる FIX モノクロナル抗体をスクリーニングし、エピトープを同定するとともに、微量測定のための ELISA をセットアップした。サルにヒト FIX 製剤を投与し、1%以下のレベルのヒト FIX を測定しうることを確認するとともに、種々の血清型 AAV ベクターの投与実験のための基礎的検討を行った。2) AAV ベクターの改良: Cre/loxP 法を更に発展させて、アンチセンス法を利用することで、AAV の Rep,Cap 両タンパク質の発現を制御可能にする 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。

インヒビタ対策、第 VIII 因子ノックアウトマウスの頸静脈へ、生後 0 日から日を変えて単独、或いは連続的にヒト第 VIII 因子製剤を投与し、10 週後から連続投与してインヒビタの産生を観察し、免疫寛容誘導の可能性を検討した。解析は、第 VIII 因子インヒビタアッセイと 3 H-チミジンを用いた特異抗原(hFVIII、対照として製剤に含まれているアルブミン)による脾臓由来リンパ球刺激試験で施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、全体を通して、患者に対する治療の効率の探求とともに、安全性により重点を置いて進めている。遺伝子治療については、ヒトに対して病原性を持たない改変ウイルスベクターを利用して遺伝子導入法の開発とその応用を目指したものであり、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はないと考えている。今後、我が国でも普及するであろう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労働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

血友病の遺伝子治療研究は、諸般の事情により我が国では欧米に比べ10年間遅れのスタートである。パテントの面での自由度のなさ、更に、基盤技術の基礎がなく、厳しい研究状況ではあったが、各班員の努力及び効率の良い研究協力により、成果が得られつつある。

#血友病 A 1) 第 VIII 因子遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターを利用した血友病 A の遺伝子治療: 臍帯血由来 CD34 陽性細胞に分裂刺激を加えない条件で SIV ベクターを用いて GFP 或いは第 VIII 因子遺伝子を導入し、*in vitro* での発現解析を施行した。MOI1 で、24 時間培養で、約 30% の細胞に発現が確認され、培養上清中に $10\mu\text{g}/10^6\text{cells}$ の FVIII が集積し、十分治療量に達することが確認できた。この条件で 3.6 グレイの放射線照射処置をした NOD/SCID マウスへ培

養細胞を移植して検討したところ、8 週後に 3-9% の CD34 細胞の骨髄生着がフローサイトメリーで確認され、更に同法で血小板内にも蓄積していることが示唆された。骨髄液中及び免疫染色でもヒト第 VIII 因子産生が確認されたが、末梢血液中では 1% に満たない量の FVIII しか同定できなかった。切除可能な種々の臓器をターゲットとして発現解析を施行した結果、脂肪細胞に強発現することが免疫染色法により明らかとなった。骨格筋細胞、皮膚細胞には発現は確認できなかった。肝実質細胞については、 10^6TU では *in vivo* ではクッパー細胞など網内系の細胞に取り込まれ、僅かの取り込みしか見られなかった。ヒト第三世代レンチウイルスベクターを用いて肝実質細胞での発現を GFP の蛋白発現系を用いて検討したところ、 10^6TU の量では *in vivo* では、肝臓部分切除を加えた例に僅かに取り込まれたが、基本的に SIV ベクターと同様の結果であった。

2) AAV ベクターを利用した血友病 B の遺伝子治療: 使用する AAV ベクター量は治療の可否を決める重要な因子の一つであるが、パッケージング細胞株の改良などにより、十分量の AAV ベクターの産生が可能になった。血清型の異なる AAV ベクターに LacZ、第 IX 因子、エリスロポエチン遺伝子などを搭載し、*in vivo* でそれぞれのマウス骨格筋細胞における発現を検討したところ、3 型、4 型を用いた場合はこれまでの 2 型同様のレベルであったが、1 型、5 型を用いた場合は極めて高い発現が確認された。一方、肝臓では 1 型は 2 型と同レベルであったが、5 型で数倍の発現が確認された。また培養ヒト骨格筋細胞では 1 型は 2 型とほぼ同様に 5 型に強い発現が確認された。この結果を基礎に霊長類カニクイザルを発現実

験に用いることを選択し、血清型の違いによる骨格筋での発現を検討する実験に用いる十分量の導入ベクターを作製した。AAV 搭載遺伝子の FIX はタグつきも wild type のいずれも HEK293 細胞、CHO-K1 細胞で transduction、及び分泌が確認された。モノクロナル抗体をスクリーニングした結果、ヒトの FIX のみを認識し、カニクイザル由来の FIX とは交差しない抗体が見つかった。僅か 3 箇所微妙に異なるヒトとサルの第 IX 因子の一方所がエпитープであることが、mutagenesis により作製した FIX 変異体利用することで同定された。この抗体と他の部位を認識するモノクロナル抗体を組み合わせ、選択的ヒト FIX 微量測定のための ELISA を確立した。マウス肝臓においては血清型の比較として LacZ 発現系を用いて検討したところ、5 型による発現が最良であるという結果を得た。3) イヌ生体部分肝移植: 血友病 A 犬に対して同胞犬 (FVIII 活性, 約 60%) から生体部分肝移植を施行し、第 VIII 因子として経過中 3-60% の活性を得た。残念ながら、免疫抑制剤 Tacrolimus の腸管への副作用が一因と思われる衰弱が見られ、46 日で死亡したが生存期間中明らかな出血傾向はなく、又血液検査でもビリルビン値などに拒絶反応を示唆するデータもなく、移植肝にも、組織所見で異常は見られなかった。4) インヒビタ対策: インヒビタアッセイ、刺激試験及び死亡率の結果からは生後 0 日早期の投与がドラマティックな効果を示し、出産直後の抗原暴露がクリティカルであることが示唆された。昨年報告した免疫寛容誘導物質 May1 が大規模レベルで産生発現出来るようになり臨床応用が可能になった。

D. 考察

血友病 A 非分裂細胞に導入可能で、長期発現が期待できる遺伝子導入ベクターとして SIV ベクターを選択したが、これはヒトには勿論、host である african green monkey にも病原性はなく安全なベクターであるという認識が広がりつつある。また、感染効率を上げるために VSVG を利用して pseudotype にしているが、更に VSVG の毒性を低下させるための検討も着々と進行しており、実用的なベクターになる可能性が高い。血液幹細胞を標的とした導入実験では、骨髄への CD34 細胞の生着、発現、更には血小板に蓄積を示唆する結果などが得られている。出血部位へ血小板が濃縮されることも考慮すると極めて将来性のあるプロジェクトであると思われる。また実際ヒトに施行する場合は、自己骨髄移植の利用ということとなり、マウスを用いた実験で苦労している免疫抑制は不要となる。現時点では、見積もり計算上の第 VIII 因子レベルと末梢血中のレベルに乖離が見られている。ヒト BDDSQ とマウス von Willebrand 因子との結合が不十分、或いは免疫学的な理由により、半減期が短縮しているためか、生着 CD34 細胞中の FVIII 産生細胞の population が少ないためかなどを検討中である。切除できる臓器を遺伝子導入の標的に選択することは極めて魅力的である。脂肪細胞は標的細胞の候補として有用であることが示唆され、今後の発展が期待できる。既にヒト血友病患者に、肝硬変治療目的に肝臓移植が施行され、血友病が治癒したという報告から考えれば血友病イヌを用いた実験の結果は当然かも知れない。しかし、血友病治療のためにどのサイズの肝臓を移植すれば十分であるかなどを検討するための基礎実験は不可欠であり、今後、今回のイヌの死因の解

析と免疫抑制剤の検討など解決すべき問題は多い。

血友病 B 米国で AAV2 ベクターを用いて 1999 年 6 月よりヒト下肢骨格筋細胞を標的にした血友病 B の遺伝子治療臨床研究は、発現量が治療目的量に達せず、現在再検討に入っている。原因は、*in vivo* で骨格筋細胞に発現効率の悪い AAV-2 ベクターを利用したことにある。我々は、種々の血清型の AAV ベクターを用いて、*in vivo*、臓器、種の違いによる発現の検討を行ったが、実験結果からは、ヒトに近い霊長類で実験を進めることが肝要であることが示唆された。ただサルを用いる場合血友病 B サルがないこと、サルの FIX とヒトのそれとでは 97-98% 以上のホモロジーがあることなどにより、発現解析に技術的難題がある。ヒト FIX を選択的に測定しうる系はこれまでには世界に存在していなかった。モノクロナル抗体を選択し、微量ヒト FIX を測定しうる系の確立は今後の霊長類を用いた血友病 B の実験解析に多大な貢献が期待できる。既に FIX を搭載した血清型の違う AAV ベクターの実験は開始されているが、発現効率の検討のみならず、ヒトに投与する前の直前の前臨床試験として安全性の十分な確認も計画に入っている。科学的に保証された結果の集積が待ち望まれる。

インヒビタ対策 生下時、短時間内にヒト FVIII 製剤を投与することで、幾ばくかの免疫寛容が誘導されることを示唆される結果が得られたことは、臨床的には極めて意義深い。キャリアである母親から生まれた男子に投与することで将来のインヒビタ産生頻度が低下する可能性が高い。この実験は生下時マウスの頸静脈に過たず製剤を投与できる技術があつて可能であり、班員

の小林の技術に負うところ大である。生下時の投与までの時間や繰り返し投与する場合の 2 回目の開始時期など、まだ解析しなければならない問題も多いが、今後に期待できるプロジェクトであると思われる。

E. 結論

2年目に入り、グループ間の意志の疎通が十分となり、共同研究のシステムが機能し始めており、成果が集積しつつある。遺伝子治療は血友病に cure をもたらす治療法であり、成果を元に今後の臨床応用に向けた発展が期待できる。インヒビタ対策を含め、患者、及び社会に貢献することが大きいプロジェクトであると信ずる。

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

1. Sugo, T., Sekine, O., Nakamikawa, C., Endo, H., Arocha-Piñango, C. and Matsuda, M. Mode of Perturbation of Asahi Fibrin Assembly by the Extra Oligosaccharides. *Ann. New York Acad. Sci.* 936, 223-226, 2001
2. Matsuda, M. and Sugo, T. Hereditary Disorders of Fibrinogen. *Ann. New York Acad. Sci.* 936, 65-88, 2001
3. Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y. Autoantibody against Prothrombin aberrantly alters the Proenzyme

- to facilitate Formation of a Complex with its Physiological Inhibitor Antithrombin III without Thrombin Conversion. *Blood*, 97, 3783-3789, 2001.
4. Mimuro, J., Muramatsu, S., Hakamada, Y., Mori, K., Urabe, M., Madoiwa, S., Hirokawa, S., 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* 8, 1690-1697, 2001
 5. 三室淳: 血友病の遺伝子治療 高久史磨、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉謙、編集 ANNUAL REVIEW 血液 2002 p207-214 中外医学社
 6. Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Mizukami, H., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.: AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Method. Enzymol.*, 346: 378-393, 2002.
 7. Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc. Res.* (in press)
 8. Okada T, Mizukami H, Urabe M, Nomoto T, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K. Development and characterization of an antisense-mediated prepackaging cell line for adeno-associated virus vector production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 19;288(1):62-8.
 9. Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, Okada T, Kume A, Nishino H, Monahan J, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K. Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2001 Feb;8(2):99-106.
 10. 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.* 6: 50-55, 2001.
 11. A. Yoshioka, M. Shima, K. Fukutake, J. Takamatsu, A. Shirahata and the KOGENATE FS study group: Safety and efficacy of a new recombinant FVIII formulated with sucrose (rFVIII-FS) in patients with haemophilia A: a long-term, multicentre clinical study in Japan. *Haemophilia* 7:242-249, 2001.

12. K. Nogami, M. Shima, J. C. Giddings, K. Hosokawa, M. Nagata, S. Kamisue, H. Suzuki, M. Shibata, E. L. Saenko, I. Tanaka and A. Yoshioka: Circulating factor VIII immune complexes in patients with type 2 acquired hemophilia A and protection from activated protein C-mediated proteolysis. *Blood* 97:669-677, 2001.
13. A. Shirahata, T. Kamiya, J. Takamatsu, T. Kojima, K. Fukutake, M. Arai, H. Hanabusa, H. Tagami, A. Yoshioka, M. Shima, H. Naka, S. Fujita, Y. Minamoto, J. Kamizono and H. Saito: Clinical trial to investigate the pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with hemophilia with inhibitor. *Int J hematol* 73:517-525, 2001.
14. 田中一郎、吉岡 章; 血友病の生活管理 小児内科 33(11):1555-1558, 2001.
15. 嶋 緑倫; 血友病 A 血液フロンティア 11(9):21-32, 2001.
16. 永泉圭子、稲葉浩、伊藤武善、山中晃、鈴木隆史、西田恭治、萩原剛、天野景裕、香川和彦、新井盛夫、福武勝幸: 先天性第 VII 因子欠乏症 3 家系のミスセンス変異. 血栓止血誌 12:133-143, 2001
17. 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
18. Hakamata, Y., Tahara, K., Uchida, H., Sakuma, Y., Nakamura, M., Kume, A., Murakami, T., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Kobayashi, E.: Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *BBRC* 286:779-785, 2001.
19. Xiu, D.R., Hishikawa, S., Sato, M., Nagai, H., Uchida, H. and Kobayashi, E.: Rat auxiliary liver transplantation without portal vein reconstruction Comparison with the portal vein-arterialized model. *Microsurgery* 21:189-195, 2001
- H. 知的財産権の出願 登録状況
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ェ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

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 教授

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療法: CMV プロモーターの下流に改変 Factor VIII cDNA (BDD FVIII cDNA) を配置した SIV ベクターを用いて臍帯血由来 CD34 陽性細胞へ凝固第 VIII 因子遺伝子を導入したところ、CD34 陽性細胞は凝固第 VIII 因子を $10\mu\text{g}/10^6$ 細胞/24 時間産生しえた。この遺伝子導入した CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスへ移植したところ NOD/SCID マウス末梢血でヒト凝固第 VIII 因子を検出しえた。また、CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID マウスの末梢血と骨髄を検討するとヒト由来の血液細胞、CD34 陽性細胞が検出され、移植したヒト CD34 陽性細胞が NOD/SCID マウスへ生着したことが確認できた。また、第 VIII 因子を含有する血小板も産生されていることが確認された。これらの結果は、ヒトにおいては、自己血液幹細胞移植を応用し、凝固第 VIII 因子を産生する血液幹細胞を移植する血友病 A 遺伝子治療の可能性を示唆している。また、CD34 陽性細胞以外では、SIV ベクターを用いマウスの脂肪組織においてヒト凝固第 VIII 因子を発現している。脂肪組織へはベクター投与が安全かつ容易に行えること、また免疫反応などの副作用などが発生したときには除去できることなど、遺伝子導入部位として安全面で優れている。血友病 A 患者に高頻度に発症する抗第 VIII 因子自己抗体 (インヒビター) の発生を抑制する免疫寛容誘導が可能かを血友病 A マウス (第 VIII 因子ノックアウトマウス) を用いて検討した結果、血友病 A マウス生下時 (24 時間以内) に凝固第 VIII 因子を投与すると、血友病 A マウス成長後にヒト第 VIII 因子を投与してもインヒビターが発症しなかった。この結果はインヒビターの発生が予見される患者に臨床応用可能と思われる。血友病 B 遺伝子治療: 霊長類モデルとしてカニクイザルをもちいることとし、発現効率を高めるため凝固第 IX 因子 cDNA を改変し intron の一部を組み込んだ凝固第 IX 因子 mini gene を作成した。ヒトの凝固第 IX 因子とカニクイザル凝固第 IX 因子を明確に識別するために凝固第 IX 因子 mini gene を改変し FLAG アミノ酸配列を凝固第 IX 因子 C 端に付加した改変凝固第 IX 因子 (F IX FLAG) を作成した。またヒト凝固第 IX 因子を骨格筋で遺伝子導入効率の良い type 1, 5 AAV ベクターへ凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ。カニクイザルへヒト凝固第 IX 因子遺伝子を導入し発現させた場合には、ヒト凝固第 IX 因子とカニクイザル凝固第 IX 因子を識別する必要があるが、ヒト凝固第 IX 因子に対するモノクロナル抗体を組み合わせるにより、カニクイザル由来の凝固第 IX 因子の存在に影響されずヒトの第 IX 因子のみを検出しえるヒト第 IX 因子測定系を確立した。また、293 細胞で発現させた変異凝固第 IX 因子を用い、このヒト凝固第 IX 因子測定にもちいるモノクロナル抗体のエピトープを決定した。AAV ベクターをもちいてカニクイザル骨格筋細胞でヒト凝固第 IX 因子を発現し、ヒト凝固第 IX 因子を検出できるかを検討するため、ヒト凝固第 IX 因子

100/kg をカニクイザルへ静脈注射し、経時的にカニクイザル血漿を採取し、そのヒト凝固第 IX 因子濃度を測定したところ、カニクイザルでは投与後 1 時間でヒト凝固第 IX 因子は 470 ng/ml (ヒト正常第 IX 因子濃度の 12% に相当) で血中半減期約 8 時間で漸減し 4 日後で 4 ng/ml (ヒト正常第 IX 因子濃度相当 0.1%) となったことから、我々が開発した凝固第 IX 因子測定系はカニクイザル血漿中のヒト凝固第 IX 因子を高感度で検出可能であることが示された。今後は、カニクイザルへ凝固第 IX 因子遺伝子を搭載した AAV ベクターを投与し、ヒト凝固第 IX 因子の発現を検討する。

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、治癒にもつながるものである。本年度は、血友病 A の遺伝子治療開発のため、改変凝固第 VIII 因子 cDNA を組み込んだ SIV ベクターを用いた遺伝子導入実験、インヒビターが発生を押さえる免疫寛容誘導、また霊長類をモデルとした血友病 B のもちいた基礎的検討をおこなうことを目的とする。

B. 方法

1. SIV V FIII による細胞への凝固第 VIII 因子 遺伝子の導入

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改変した凝固第 VIII 因子 cDNA を EF1 α プロモーター、PGK1 プロモーター、CMV プロモーター、と組み合わせた SIV ベクターをもちい HEK293 細胞での

FVIII の発現を検討した。また、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞へ SIV FVIII をもちい凝固第 VIII 因子遺伝子導入を行い、凝固第 VIII 因子の産生を検討した。

2. 凝固第 VIII 因子遺伝子を導入した CD34 陽性細胞の NOD/SCID マウスへの移植

凝固第 VIII 因子遺伝子を導入した CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスへ静脈注射し CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスへ移植した。CD34 陽性細胞が生着したか否かは末梢血、骨髄の細胞を採取しフローサイトメトリーで検討した。またヒト第 VIII 因子を ELISA で測定した。

3. SIV VIII の直接投与によるマウス組織、臓器でのヒト凝固第 VIII 因子の発現

野生型マウス、肥満マウス (db/db) の筋肉、皮膚、脂肪組織へ SIV LacZ と SVI F VIII を注射し遺伝子導入が可能か検討した。

4. 免疫寛容誘導実験

第 VIII 因子ノックアウトマウスの頸静脈へ、生後 0 日 (生後 24 時間以内) から日を変えて単独、或いは連続的にヒト第 VIII 因子製剤を投与し、10 週後から連続投与してインヒビターの産生を観察し、免疫寛容誘導の可能性を検討した。解析は、第 VIII 因子インヒビタアッセイと ³H-チミジンを用いた特異抗原 (ヒト第 VIII 因子、対照として製剤に含まれているアルブミン) による脾臓由来リンパ球刺激

試験で施行した。

5. ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ベクターの開発

発現効率をあげるため、cDNA を改変し intron の一部を組み込んだ凝固第 IX 因子 mini gene を作成した。ヒトの凝固第 IX 因子とカニクイザル凝固第 IX 因子を明確に識別するために凝固第 IX 因子 mini gene を改変し FLAG アミノ酸配列を凝固第 IX 因子 C 端に付加した改変凝固第 IX 因子 (F IX FLAG) を発現しうる改変凝固第 IX 因子 mini gene を作成した。またヒト凝固第 IX 因子を骨格筋で遺伝子導入効率の良い type 1, 5 AAV ベクターへ凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ。

6. ヒト凝固第 IX 因子測定法の開発

血友病 B 遺伝子治療法の開発のため、霊長類モデルとしてカニクイザルをもちいることとした。カニクイザルへヒト凝固第 IX 因子遺伝子を導入し発現させた場合にはヒト凝固第 IX 因子とカニクイザル凝固第 IX 因子を識別する必要がある。ヒト凝固第 IX 因子に対するモノクロナル抗体を組み合わせることにより、カニクイザル由来の凝固第 IX 因子の存在に影響されずヒトの第 IX 因子のみを検出しうるヒト第 IX 因子測定系、融合蛋白 FIX FLAG 測定系を検討した。

C. 結果

1. SIV V FVIII による細胞への凝固第 VIII 因子 遺伝子の導入

SIV ベクターをもちい HEK293 細胞での FVIII の発現を検討したところ、CMV プロモーターが最も強力であり、他のプロモーターは 293 細胞では FVIII を発現できなかった。このため、以後は CMV プロモーターで FVIII を発現させる SIV FVIII をもちいることとした。臍

帯血由来 CD34 陽性細胞へ SIV FVIII をもちいて凝固第 VIII 因子遺伝子を導入し、FVIII の発現を検討したところ、ベクター量依存性の FVIII の発現がみとめられ、最高 $10\mu\text{g}/10^6$ 細胞/24h の FVIII が産生された。

2. 凝固第 VIII 因子遺伝子を導入した CD34 陽性細胞の NOD/SCID マウスへの移植

ex vivo において SIV FVIII をもちいて凝固第 VIII 因子遺伝子を導入されたヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスへ移植したところ、短期間ではあるが末梢血液中にヒト第 VIII 因子が検出された。また、末梢血液中にヒト由来血液細胞が検出され、脾臓、骨髄にもヒト由来血液細胞が高率にまた CD34 陽性細胞も検出された。

3. SIV VIII の直接投与によるマウス臓器、組織でのヒト凝固第 VIII 因子の発現

肥満マウス (*db/db*) の皮下脂肪組織へ SIV lacZ を投与したところ局所の脂肪組織に β -galactosidase 活性が検出された。また同様に SIV FVIII を投与したところ、ヒト FVIII が脂肪組織で発現していることが免疫蛍光法により確認された。しかし、筋肉、皮膚に投与したときには β -galactosidase、第 VIII 因子の発現は認められなかった。

4. 免疫寛容誘導実験

ヒト第 VIII 因子の初回投与を第 VIII 因子ノックアウトマウスの生後 24 時間以内に行ったときには、以後ヒト第 VIII 因子を反復して投与しても中和抗体は発症しなかった。しかし、ヒト第 VIII 因子の初回投与が生後 24 時間以内におこなわれないときにはヒト第 VIII 因子を反復投与すると中和抗体が発症した。 ^3H -チミジンを用いた特異抗原による脾臓由来リンパ球刺激試験で陽性になることが示された。

5. ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ベクターの開発

cDNA を改変し intron の一部を組み込んだ凝固第 IX 因子 mini gene、凝固第 IX 因子 mini gene を改変し FLAG アミノ酸配列を凝固第 IX 因子 C 端に付加した改変凝固第 IX 因子 (F IX FLAG) を発現しうる改変凝固第 IX 因子 mini gene 作成、ヒト凝固第 IX 因子を骨格筋で遺伝子導入効率の良い type 1, 5 AAV ベクターへ凝固第 IX 因子 mini gene を組み込んだ。

6. ヒト凝固第 IX 因子測定法の開発

ヒト凝固第 IX 因子に対するモノクロナル抗体を組み合わせることにより、カニクイザル由来の凝固第 IX 因子の存在に影響されずヒトの第 IX 因子のみを検出しうるヒト第 IX 因子測定系を確立した。班研究者の吉岡が開発したモノクロナル抗体 3A6 はヒト第 IX 因子と結合するがサル第 IX 因子とは全く結合せず、カニクイザル血漿中のヒト第 IX 因子を 0.1% の濃度で検出しえた。モノクロナル抗体 3A6 のヒト第 IX 因子への結合部位 (エピトープ) を第 IX 因子変異体をもちいて明らかにした。カニクイザルへヒト凝固第 IX 因子を静注し経時的に採血し、カニクイザルでのヒト第 IX 因子の動態を検討したところ、半減期約 8 時間で血中から消失した。さらにはモノクロナル抗体 3A6 と FLAG に対するモノクロナル抗体 M2 をもちいて融合蛋白 FIX FLAG 測定系を確立した

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、血友病 A の遺伝子治療は立ち後れている。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 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、VSVG pseudotype 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。この SIV vector へ BDD F VIII cDNA を組み込み遺伝子導入を試みたところ、臍帯血由来 CD34 陽性細胞では効率よく FVIII を発現し、またこの CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID マウスで FVIII が検出されていることから自己骨髄移植を応用した、血友病 A の遺伝子治療が可能であると考えられる。また、脂肪組織を利用した FVIII の発現も安全な遺伝子治療法へつながると考えられる。

第 VIII 因子ノックアウトマウスをもちいた免疫寛容誘導の基礎的検討からは生後直後に第 VIII 因子を投与することで第 VIII 因子にたいする中和抗体が発症することを抑制できることは、インヒビターの発生が予見される患者に臨床応用可能と思われる。

血友病 B の遺伝子治療は、すでに臨床治験が行われつつあるが、AAV2 ベクターをもちい凝固第 IX 因子遺伝子を骨格筋で発現させる試みは十分な治療効果をあげられず、みなおされ、AAV2 ベクターをもちい肝臓をターゲットとした血友病 B の遺伝子治療の臨床治験がスタートしている。しかし、肝臓をターゲットとし遺伝子導入することはリスクもあり、安全にベクター投与が可能な骨格筋などをターゲットとした遺伝子導入はさらに検討されるべきものと考えられる。臨床治験で用いら

れた AAV2 ベクターと比較し効率よく筋肉へ遺伝子導入可能な AAV1、AAV5 ベクターをもちいて、霊長類のカニクイザル骨格筋へ第 IX 因子遺伝子を導入する計画では、我々の開発した第 IX 因子測定系は、特異的にヒト第 IX 因子を定量でき、測定感度も正常第 IX 因子濃度の 0.1%まで検出できることから、遺伝子導入により発現した微量のヒト第 IX 因子の変動も検討可能で、前臨床実験として、犬やマウスをもちいることに比較し優れている。

E. 結論

血友病 A 遺伝子治療では自己骨髄移植を応用した細胞移植による遺伝子治療法の開発が可能であると考えられた。血友病 B 遺伝子治療の前臨床実験に適切な霊長類モデルと AAV ベクターによる骨格筋への第 IX 因子遺伝子の導入法の開発が可能と思われた。

F. 研究発表

論文発表

Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y. Autoantibody against Prothrombin aberrantly alters the Proenzyme to facilitate Formation of a Complex with its Physiological Inhibitor Antithrombin III without Thrombin Conversion. *Blood*, 97, 3783-3789, 2001.

Mimuro, J., Muramatsu, S., Hakamada, Y., Mori, K., Urabe, M., Madoiwa, S., Hirokawa, S., 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* 8, 1690-1697, 2001

坂田洋一、目黒輝雄：慢性透析患者に見られる高ホモシステイン血症の治療、*日本透析会誌* 34：243-248, 2001

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.* 51:178-183, 2001

Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Tamura N, Obara H, Wada T, Onagawa T, Sato I: Effect of labor on maternal dehydration, starvation, coagulation, and fibrinolysis. *J. Perinat. Med.* 29:528 -534, 2001

Hamano A, Tanaka S, Takeda Y, Umeda M, Sakata Y: A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma. *Cin.Chim Acta* (in press)

Imura O, Kusano E, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y: Effect of ureteral obstruction on gelatinase A in rat renal cortex. *Exp. Nephrology* (in press)

Kaminishi Y, Aizawa K, Sato T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y, Fuse K: Modified bentall operation in a patient with

hemophilia A. Ann Thorac Cardiovasc.
Surg (in press)

三室淳: 血友病の遺伝子治療 高久史磨、溝
口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉謙、編集
ANNUAL REVIEW 血液 2002
p207-214 中外医学社

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 自治医科大学遺伝子治療研究部 教授

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行い、骨格筋及び肝臓における最適な条件を見出した。また、ベクター産生系の開発として引き続きパッケージング細胞株の改良を行った。

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、主にプロモーター及び血清型の観点から骨格筋と肝臓に対する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法を用いる方法を発展させ、アンチセンス法を更に応用することで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、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 α 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、こ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)次に遺伝子導入・発現効率に影響する要素としてAAVの血清型に関する検討を開始した。既知の1型から5型までの計5種類の血清型を用いてベクターを作製するシステムを準備し、これらを用いてLacZ及びEpoを搭載するベクターを作製し、経門脈及び筋肉内投与における遺伝子導入効率を比較検討した。

(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後、共感染させることで発現を目指す。

尚、本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境およ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。動物実験は、動物倫理面(実験動物に対する動物愛護上の配慮など)を含めて自治医大動物実験指針の規定に従って行う。

C. 研究結果

(i) Cre/loxP 法をベースとし、更にアンチセンス法を併用することにより 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結果、10cm ディッシュ換算で最大 7.5×10^{10} ゲノムコピーのベクターを産生する細胞株を得た。

(ii) AAV ベクターの *in vivo* 投与法の基礎実験として、肝臓への投与に適したプロモーターの検索を行った。具体的には、肝臓を標的臓器とする場合には我々が以前より標準としている CMV プロモーターによる発現が不十分とする報告が見られることをふまえて、CAG、PGK、EF-1 α 等の肝臓における機能が確認されているプロモーターを用い、マウス由来のエリスロポエチン(Epo) cDNA に連結したベクタープラスミドを構築した。これらをもとに作製した AAV ベクターを経門脈的に投与し、遺伝子発

現効率を血清エリスロポエチン濃度及び血液学的指標を用いて系時的に比較した。その結果、CAG プロモーターを用いた場合に最も高い発現が得られ、CMV プロモーターを用いた場合がこれに次いだ。PGK、EF-1 α を用いた場合には血清 Epo 濃度は以上に比してやや低かったが、血液学的な指標に基づく検討ではいずれも著明な多血症傾向を示した。

(iii) 次に、AAV の血清型による発現の違いについては 1 型から 5 型までの血清型を用いて LacZ 及びマウス Epo をコードするベクターを作製し、肝臓及び骨格筋における遺伝子発現を比較検討した。肝臓に対しては前記の結果から CAG プロモーターを使用してベクターを作製した。その結果、肝臓においては 5 型を用いた場合に最大の発現が見られ、その他の型を用いた場合にはこれまで 2 型において得られた結果とほぼ同じレベルであった。また、骨格筋においては 1 型が極めて高く、5 型がこれに次ぎ、それ以外は 2 型とほぼ同じで合計 3 つの群に分かれる結果を得た。また、いずれの血清型を用いた場合にも発現は長期にわたって持続した。

(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後、共感染させることで発現を目指している。前者については骨格筋における発現の比較目的で 1 型・2 型・5 型の血清型に対応したベクターの構築・作製が終了しており、霊長類における *in*

vivo の実験が開始可能な状況にある。また、ヒト第 VIII 因子に関してもベクターの構築・作製を行っており、*in vitro* における第 VIII 因子活性が認められていることから1型・2型・5型に対応したベクターの大量調整を準備中である。

D. 考察

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、骨格筋を用いたアプローチでは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ものと考えられる。肝臓を標的とする投与方法については臨床研究が最近開始されたと伝えられているが、その効果はいまだ明らかでない。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。今年度の検討ではプロモーター及び血清型の点から解析を行ったが、それぞれの標的臓器に対して最適なベクター構造が予測可能であり、今後のベクター構築全般に応用可能な知見と考えられる。プロモーターに関しては今回代表的なものを取り上げたが、エンハンサーエレメントも含めて活発な開発がなされている領域であり、世界的な進捗状況をにらみつつ *in vivo* における有用性の検証を今後とも要する点と考えられる。また、血清型の比較に関しては自然界に存在する AAV に関しては既知のものは全て比較検討することが出来たが、血清型の違いにより極め

て大きな発現の相違が認められており、その機序の解明に興味を持たれる。今回の検討に用いた実験系は導入遺伝子が動物にとって同種蛋白質であることから、導入遺伝子産物に対する免疫反応の関与を考慮する必要がなく、血清型の違いのみに焦点を当てて比較検討することが可能であるというシステム上の利点がある。また、今回の検討では数ヶ月の観察においては導入遺伝子の発現は安定していたが、更に長期にわたって同じ傾向が保たれるのかどうかは実際の治療に向けて重要な点であると考えられる。今後更に大型の動物、特に霊長類モデルにおいて治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いて検証を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果が得られるものと期待される。

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を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。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。以上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通じることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(論文)

1 Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A, Momoeda M,

- Yoshikawa H, Tsuruo T, Shibuya M, Taketani Y, Ozawa K: Soluble Flt-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res.* (in press)
- 2 Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, and Ozawa K: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neuroreduction and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Therapy*, (in press)
- 3 Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., Shen, Y., Lijun, W., Mizukami, H., Kume, K., Matsumura, M., Nagatsu, N., Urano, F., Ichinose, H., Nagatsu, T., Terao, T., Nakano, I., and Ozawa, K.: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* (in press)
- 4 Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Mizukami, H., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.: AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Method. Enzymol.*, 346: 378-393, 2002.
- 5 Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., Ozawa, K., and Shimada, K.: AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc. Res.* (in press)
- 6 Kawada, T., Nakazawa, M., Nakauchi, S., Yamazaki, K., Shimamoto, R., Urabe, M., Nakata, J., Hemmi, C., Masui, F., Nakajima, T., Suzuki, J.I., Monahan, J., Sato, H., Masaki, T., Ozawa, K., and Toyo-Oka, T.: Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 901-906, 2002.
- 7 Okada T, Mizukami H, Urabe M, Nomoto T, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K. Development and characterization of an antisense-mediated prepackaging cell line for adeno-associated virus vector production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 19;288(1):62-8.
- 8 Maeda Y, Ikeda U, Oya K, Shimpo M, Ueno S, Urabe M, Kume A, Monahan J, Ozawa K, Shimada K. Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene inhibits protein synthesis of rat ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2001 Jan;15(1):19-24.