

20020641

厚生労働科学研究費補助金
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14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）年3月

主任研究者 坂田 洋一
(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 坂田洋一)		
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）、血友病遺伝子治療の基礎 実験	—————	10
	(自治医科大学 坂田洋一、三室 淳、窓岩清治)		
2	AAVベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験	—————	17
	(自治医科大学 小澤敬也)		
3	イヌモデルを用いた生体部分肝臓移植と第3世代レンチウイルスを用いた 遺伝子治療の基礎研究	—————	21
	(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と遺伝子導入効率および 発現効率の向上	—————	25
	(株式会社ディナヘック研究所 長谷川 護)		
5	AAV1ベクターを用いたWPREの血友病遺伝子発現効果に 関する研究	—————	29
	(東京医科大学 新井盛夫)		
6	血友病治療のための新しい遺伝子導入法の開発	—————	32
	(自治医科大学 小林英司)		
7	霊長類における血友病の遺伝子治療全臨床試験の可能性に 関する研究	—————	38
	(東京大学医科学研究所先端医療研究センター 北村義浩)		
III	研究成果の刊行に関する一覧表	—————	41
IV	研究成果の刊行物・別刷	—————	44

研究要旨

1) 血友病 A の遺伝子治療の基礎的検討 搭載可能な遺伝子サイズが第 VIII 因子の必要最小限の cDNA サイズより小さいことから安全性の一応確認されている adeno-associated virus(AAV)ヘクターをそのまま利用することは出来ない。そこで、他の安全で効率のよいヘクターを世界中の研究者が探索中である。我々は日本オリジナルで病原性が見られないサル免疫不全ウイルス (SIV agmTYO-1 株) を基本とした改変サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターを主として選択して基礎的検討を進めた。まず、レトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己血液幹細胞移植法を利用して、画期的な治療効果を上げた先天性免疫不全症の遺伝子治療を参考に、*ex vivo* で、ヒト B 領域除去第 VIII 因子 (hBDDFVIII) 遺伝子を、臍帯血より分離したヒト CD34 陽性細胞に導入し、NOD/SCID マウスに移植した。骨髄への生着をフローサイトメトリーにより、また、血中ヒト第 VIII 因子レベルを mRNA レベル測定および免疫学的に測定した。細胞移植 60 日後に、マウス骨髄におけるヒト由来細胞の割合が約 30%に達し、mRNA および蛋白レベルで骨髄細胞がヒト第 VIII 因子を発現していることが確認できた。第 VIII 因子血中レベルは 60 日後も 2%以上であり、マウスでのヒト第 VIII 因子半減期を考慮すると十分治療量に達していることが示唆された。次に、外科的に除去可能な脂肪細胞を遺伝子導入標的細胞に選び、上記 SIV ベクターをマウスの脂肪組織へ投与し、第 VIII 因子の発現を同様の方法で検討した。遺伝子導入されたマウス脂肪細胞で、ヒト第 VIII 因子を発現していることが確認された。血中レベルも 2-3%に達したがインヒビタ産生のため、速やかに低下した。また、平成 13 年度に血友病イヌに対して同胞大から自己肝保存生体部分肝移植を行い、短期間ではあるが血友病を治癒し得たイヌの移植肝の病理学的検討を施行した。結果、移植肝には組織学的に問題のないことが明らかとなった。

2) 血友病 B ヒト第 IX 因子、或いは LacZ 発現 AAV ベクターを各血清型 (1 型、2 型、5 型) 由来のキャプドを用いて作製し、サル骨格筋に注入した。その後、一定間隔で採血し、血中ヒト第 IX 因子レベルを免疫学的に、また骨格筋細胞の遺伝子発現を、一部筋肉を生検し、免疫組織化学、及び X-gal 染色をより検討した。実験に際しては、サルの排出物検査を始め、血液一般検査も定期的に施行し、安全性の検討も行った。結果、AAV-1 型が高効率にサル骨格筋細胞で第 IX 因子を産生分泌 (血中レベル 5%) していることが確認された。導入ベクター量を 2 倍にすると発現量も 2 倍に上昇した。しかし、インヒビタ産生のために効果は一時的であった。現在、免疫抑制剤、及び、サイクロスポリン A の前投与の効果を検討中である。前臨床試験として、これまでのところ有害事象は見られていない。

3) 血友病インヒビタの解析と対策 第 VIII 因子 KO マウスを用いて、胎児期遺伝子導入法、新生児期第 VIII 因子製剤投与方法により検討した。出産 1 日以内に第 VIII 因子製剤を頸静脈より投与することで、免疫寛容が誘導されることが、種々の方法で確認された。胎児への遺伝子注入による寛容誘導法も現在基礎的検討が進行中である。

分担研究者
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
株式会社ダイナヘノク研究所
取締役研究所長 長谷川 護
東京医科大学臨床検査医学
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
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

血友病は X 染色体上に存在する血液凝固第 VIII, 或いは, IX 因子遺伝子の異常に起因する出血性疾患である。出血に対しては、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、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。血漿中因子活性を正常の数%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おり大きな期待が寄せられている。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。本年度は、血友病 A については動物を対象にレンチウイルスヘクターとアデノ随伴ウイルス (AAV) ヘクターを用いた治療レベルの第 VIII 因子の長期安定発現と安全な遺伝子治療法の開発に向けた基礎的検討をおこなった。また、広

義にはなるが、正常肝細胞移植による第 VIII 因子遺伝子導入の展望についても検討した。血友病 B については、AAV ベクターの最適血清型の選択と、投与部位を含めて投与法の検討をサルを用いて行った。サルを用いた実験は前臨床試験と位置づけ、安全性の検討も進める。遺伝子治療においても重要な血友病インヒビタ対策としては、血友病 A マウスを利用して、第 VIII 因子に対する免疫寛容誘導の可能性を検討した。

B 研究方法

血友病 A a レトロウイルスベクターを用いて自己血液幹細胞移植法を利用して、画期的な治療効果を上げた先天性免疫不全症候群の遺伝子治療法を参考に、*ex vivo* で、病原性のみられないサル免疫不全ウイルス (SIV agmTYO-1 株) を基本とした改変 SIV ベクターを利用して、ヒト B 領域除去第 VIII 因子 (hBDDFVIII) 遺伝子を臍帯血より分離したヒト CD34 陽性細胞に導入した (GFP 或いは LacZ 遺伝子搭載ヘクターも確認のため利用した)。これを、あらかじめ放射線照射し、十分に免疫抑制した NOD/SCID マウスに移植し、骨髄への生着をフローサイトメトリーにより、さらに発現を mRNA レベル測定と免疫学的手法により検討した。また、血中ヒト第 VIII 因子レベルを免疫学的に測定した。b 外科的に除去可能な脂肪細胞を遺伝子導入標的細胞に選び、上記 SIV ヘクターを db/db マウスの脂肪組織へ投与し、第 VIII 因子の発現を a と同様の方法で検討した。c 第三世代ヒトレンチウイルスヘクターを利用して、門脈内ルートより第 VIII 因子ノックアウト (KO) マウスに注入する方法も検討した。d hFVIII の、重鎖および軽鎖を別々に発現する AAV-1 ベクターを作製し、マウス骨格筋に同時に注入した。e 血友病イヌに対して

同胞大から自己肝保存生体部分肝移植を行ったイヌの移植肝の病理学的検討を施行した。また、C57BL/6 マウスより分離した肝細胞を KO マウスの種々の部位に移植し、生着と第 VIII 因子発現を観察した。血友病 B ヒト第 IX 因子発現 AAV ベクターを各血清型（1 型、2 型、5 型）由来のキャプシトを用いて作製し、サル骨格筋に注入した（部位と発現確認のため LacZ 遺伝子搭載ヘクターも同時に投与した）。その後、一定間隔で採血し、血中ヒト第 IX 因子レベルを免疫学的に、また骨格筋細胞への生着発現を、一部筋肉を生検し、第 IX 因子を免疫組織化学的に、及び LacZ タンパク質を X-gal 染色にて検討した。実験に際しては、サルの排出物検査を始め、血液一般検査も定期的に施行し、安全性の検討も行った。遺伝子治療技術的検討 SIV ベクターの安全性を高める検討と、発現効率を上げるための検討を行った。また、高効率で naked DNA の、大動物へ注入を、種々の方法で検討した。インヒビタ対策 第 VIII 因子 KO マウスを用いて、胎児期遺伝子導入法、新生児期第 VIII 因子製剤投与方法により検討した。

（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「動物実験カイトライン」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、インフォームトコンセントをとる。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 a 改変 SIV ヘクターを利用してヒト hBDDFVIII 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞移植 60 日後に、マウス骨髄におけるヒト由来細胞の割合が約 30%に達し、mRNA および蛋白レベルで骨髄細胞がヒト第 VIII 因子を発現していることが確認できた。第 VIII 因子血中レベルは 60 日後も 2%以上であった。b 同様に遺伝子導入されたマウス脂肪細胞で、ヒト第 VIII 因子を発現していることが確認された。血中レベルも 2-3%に達したがインヒビタ産生のため、速やかに低下した。c ヒトレンチウイルスヘクターを KO マウスの門脈内に投与した実験でも、第 VIII 因子レベルは約 60 日後に 1%であった。d 第 VIII 因子の 重鎖 軽鎖遺伝子を別々に搭載したヘクターを用いた実験は現在解析中である。e イヌ移植実験の移植肝には組織学的に問題のないことが明らかとなった。肝細胞移植による第 VIII 因子発現は、現時点ではまだ治療レベルに達する結果は得られていない。マウスを用いた背部皮下に移植する予備実験ではラミニンに富んだ環境にすることで生着率が向上す

が高効率にサル骨格筋細胞で第 IX 因子を産生分泌（血中レヘル 5%）していることが確認された。導入ヘクター量を 2 倍にすると発現量も 2 倍に上昇した。しかし、インヒビタ産生のために効果は一時的であった。現在、免疫抑制剤、及び、サイクロスポリン A の前投与の効果を検討中である。前臨床試験として、排泄物を始め全ての臨床データも集積中である。これまでのところ、安全性に問題になるようなデータは得られていない。技術的には 改変 SIV ヘクターは rev を独立した発現プラスミドに分けた第三世代ヘクターと改善され、cPPT, CTE, WPRE エレメントなどを挿入し発現効率も増強され、ベクターの性能は 10 倍近く上昇した。また、選択的に静脈圧を上昇させる方法で、大動物においても、例えば肝臓の限局した区域の細胞へ遺伝子を導入する技術が確立しつつある。インヒビタ対策 出産 1 日以内に第 VIII 因子製剤を頸静脈より投与することで、免疫寛容が誘導されることが、種々の方法で確認された。胎児への遺伝子注入による寛容誘導法も現在基礎的検討が進行中である。

D 考察

改変 SIV ヘクターを利用した血友病 A の遺伝子治療の結果、見かけは 2%と最低治療域レヘルしか得られていない。しかし、hBDDFVIII のマウス血中内半減期は 1 時間以内であり、ヒトでの半減期 12-18 時間を考慮すると、十分治療レヘルに達しているものと思われる。動物実験を施行するに当たっては、異種細胞を移植するために、マウスに十分な免疫抑制処置が必要であった。しかし、実際のヒトへの応用の際には、採取した自己末梢血幹細胞へ第 VIII 因子遺伝子を導入し、本人に戻すために免疫抑制は不要であり、患者さんの負担は少ないと思

われる。遺伝子は染色体にインテグレーションされるが、第 VIII 因子は他の因子や細胞の産生 増殖刺激活性を持たないため、危険性は少なく、自己末梢血幹細胞移植の手技での治療法は十分臨床応用可能と考える。それ以上の分裂が抑制されている終末細胞の一つである脂肪細胞は分離除去可能な遺伝子治療標的細胞として魅力的である。また非分裂細胞へも遺伝子を効率よく導入する改変 SIV ヘクターはこの目的にかなっている。血友病 B 遺伝子治療に関しては、問題が起きたときに外科的に除去可能な骨格筋細胞に対して AAV-1 ヘクターを利用することで、ほぼ、期待通りの効果が得られ、臨床研究に対する基礎的検討が集積しつつある。分子サイズから胎盤通過性を考えると、第 IX 因子のインヒビタに関してはヒトでは少ないことが期待されるが、本実験にて、サル第 IX 因子と 98.7% 相同性のあるヒト第 IX 因子に対する抗体が高率に産生されたことより、インヒビタ対策は遺伝子治療においても重要な課題であることが示唆される。我々の確立した 新生児免疫寛容誘導法は、遺伝子治療の基礎的検討において重要であるのみならず、血友病の可能性のある男児新生児に対するインヒビタ予防治療として極めて有望であることが期待される。

E 結論

これまでの研究成果により、血友病 A では SIV ヘクターの有効性が確認できた。また、血友病 B においては AAV-1 ヘクターを用いた骨格筋細胞を標的とした遺伝子導入でサルにおいても治療域に達する第 IX 因子の発現が確認できた。安全性を目指した遺伝子投与法の検討、及び長期発現に重要な意味を持つインヒビタ対策に関しても知見が集積しつつある。今後は、臨床研究へ

の準備として、大動物を対象に安全性の確認を第一に、免疫反応に対する対策、長期発現の確認などを検討していく必要がある。

F 健康危険情報

これまでのところ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 Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y Expression of human coagulation factor VIII in adipocyte transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy *Gene Therapy* in press
- 2 Mimuro J, Ogata K, Mizukami H, Kikuchi J, Sugo T, Madoiwa S, Hanazono Y, Kume A, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y A primate model for hemophilia B gene therapy research *British Journal of Haematology* in press
- 3 Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Madoiwa S, Sugo T, Naito M, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y Sustained transgene expression by human cord blood-derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice *British Journal of Haematology* in press
- 4 Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yase T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y Defective sorting to secretory vesicles in the trans Golgi network is partly responsible for protein C deficiency *Molecular mechanism of impaired secretion of abnormal protein C R169W,R352W and G376D* *Circulation Res* in press
- 5 Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y Successful Induction of Immune Tolerance by Neonatal Injection of Human Factor VIII in Murine Hemophilia A *J Thromb Haemostat*, in press
- 6 Sigeta K, Taniguchi N, Omoto K, Madoiwa S, Sakata Y, Mori M, Hatake K, Itoh K In vitro platelet activation by an echo-contrast agent *J Ultrasound Med* in press
- 7 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 Nephron* in press
- 8 Kamimishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y Modified Bentall Operation in a Patient With Hemophilia A *Jpn J Thorac Cardio Sur* 51(2)68-70,2003
- 9 Watanabe T, Ohkuchi A, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Wada T, Onagawa T, Sato I Perioperative changes in plasma antithrombin activity and platelet counts in patients undergoing gynecologic surgery *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 28(6) 519- 524 ,2002
- 10 Sugo T, Sakata Y, Matsuda M Structural alterations in hereditary dysfibrinogens *Current Protein and Peptide Sci* 3 239-247,2002
- 11 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 *Chimica Acta* 318 25-32,2002
- 12 Miyoshi T, Otsuki T, Omine K, Kirito K, Nagai T, Izumi T, Komatsu N, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y, Ozawa K Acute promyelocytic leukemia accompanied by retinoic acid syndrome with complications of acute myocardial infarction and cerebral infarction during treatment with all-trans retinoic acid *Rinsho Ketsueki*

- 43 954-959,2002
- 13 Shimpō M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, 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* 53, 993-1001 (2002)
 - 14 Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis *J Neurosci* 22, 6920-8 (2002)
 - 15 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 *Methods Enzymol* 346, 378-393 (2002)
 - 16 新井盛夫、福武勝幸、吉岡 章、瀧 正志、嶋 緑倫、血友病補充療法の方向性 血栓止血誌 13(1) 97-122、2002
 - 17 嶋 緑倫 血友病のインヒビター 生物試料分析 25(2) 217-226、2002
 - 18 C Hough, S Kamisue, C Cameron, C Notley, S Tünlün, A Giles and D Lillicrap Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A Similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia *Thromb Haemost* 87 659-65, 2002
 - 19 M Shima, T Matsumoto, K Fukuda, Y Kubota, I Tanaka, K Nishiyama, A Giles and A Yoshioka The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII C) *Thromb Haemost* 87 436-41, 2002
 - 20 K Nogami, M Shima, K Nishiyama, Y Sakurai, I Tanaka, J C Giddings, E L Saenko and A Yoshioka Human factor VIII inhibitor alloantibodies with a C2 epitope inhibit factor Xa-catalyzed factor VIII activation A new anti-factor VIII inhibitory mechanism *Thromb Haemost* 87 459-65, 2002
 - 21 J Ori, I Tanaka, Y Kubota, T Matsumoto, S Kamisue, M Shibata, M Shima, D Lillicrap and A Yoshioka The assessment of carrier status of canine hemophilia A in a hemophilic colony 血栓止血誌 13(3) 252-258、2002
 - 22 吉岡 章 血友病治療-21世紀の展望-日本小児科学会雑誌 106(5) 631-638、2002
 - 23 Kobayashi M Hasegawa M 他 Pseudotyped Lentivirus Vectors Derived from Simian Immunodeficiency Virus SIVagm with Envelope Glyco-proteins from Paramyxovirus *J Virol* 2003 77 2607-2614
 - 24 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 2001,12 133-143
 - 25 新井盛夫 凝固因子インヒビター測定 *medicina* 2001,29 961-966
 - 26 新井盛夫 *Annual Review 血液* 2002 中外医学社 2002, 215-228
 - 27 萩原剛、守谷研二、西田恭治、佐藤晋、小柳泰久、海老原善郎、新井盛夫、福武勝幸 血友病A症例に自然発症した非外傷性小腸壁内血種の1例-内外文献のレビューを加えて- 血栓止血誌 2002,13 55-61
 - 28 新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聡、高松純樹、三間屋純一 インヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブンの使用経験 第3報 頭蓋内出血 抜歯在宅療法 血栓止血誌 2002,13 89-96
 - 29 稲葉 浩、永泉圭子、新井盛夫、福武勝幸 Non-Isotopic RNase Cleavage Assayを用いた血友病Aの遺伝子異常の解析 血栓止血誌 2002,13 26-34
 - 30 山中 晃、天野景裕、永泉圭子、稲葉 浩、新井盛夫、福武勝幸 血友病A患者に認められた2種のミスセンス変異(R2159C,

- R2209Q)は変異第 VIII 因子の分泌が阻害されている 血栓止血誌 2002,13 175-182
- 31 Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H Involvement of Glycoprotein VI in Platelet Thrombus Formation on Collagen and von Willebrand factor Surfaces Under Flow Conditions *Circulation* 2002,106 266-272
- 32 高橋芳右、新井盛夫、小林隆夫、新谷憲治、内海英貴 座談会 後天性血友病 - 臨床像と治療の実際 - 前編 *Pharmamedica* 2002,20 175-186
- 33 新井盛夫 DIC 診断の実際 医薬の門 2002,42 50-56
- 34 新井盛夫 APTT の延長 PT の延長から考えられる血液疾患 血液フロンティア 2002 ,12 59-67
- 35 Horita K, Matsunami H, Shimizu Y, Shimizu A, Kurimoto M, Suzuki K, Tsukadaira T, Arai M Treatment of a patient with hemophilia A and hepatitis C virus-related cirrhosis by living-related liver transplantation from an obligate carrier donor *Transplantation* 2002,73 1909-1912
- 36 高橋芳右、新井盛夫、小林隆夫、新谷憲治、内海英貴 座談会 後天性血友病 - 臨床像と治療の実際 - 後編 *Pharmamedica* 2002 20 153-167
- 37 Ajiki, T , Murakami, T , Kariya, Y , Hoshino, Y , and Kobayashi, E et al Introduction of CTLA4-Ig using non-viral gene transfer method, gene gun, for rat composite tissue allograft *Transplantation* 74(4) 651, 2002
- 38 Ajiki, T , Takahashi, M , Inoue, S , Sakuma, Y , Oyama, S , Kaneko, T , Hakamata, Y , Murakami, T , Kume, A , Kariya, Y , Hoshino, Y , and Kobayashi, E Generation of donor hemato-lymphoid cells after rat limb composite grafting *Transplantation* (in press)
- 39 Ajiki, T , Murakami, T , Kobayashi, Y , Hakamata, Y , Wang, J , Inoue, S , Nakagawa, H , Kariya, Y , Hoshino, Y , and Kobayashi, E Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacain Efficient combination therapy with IL-12 and IL-18 cDNA on the rat with carcinoma *Cancer Gene Ther* (in press)
- 40 Endo, M , Enosawa, S , Suzuki, S , Amemiya, H , Kobayashi, E , Miyashita, T , Aoki, T , and Koyanagi, Y Porcine liver transplantation as an estimation system for bridge-use of bioartificial liver *Transplant Proc* 34 2714-2717, 2002
- 41 Enosawa, S Lu, H , Zhang, H,Q , Kobayashi, E Comparison of postoperative antibody responses against allogeneic MHC antigens and levels of donor-type soluble class I antigen in the recipient serum after liver, heart, small bowel, pancreas/spleen, kidney and skin transplantation in the rat *Transplantation* 74(4) 280-281, 2002
- 42 Inoue, S , Hakamata, Y , Iwamoto, S , Tahara, K , Murakami, T , Takahashi, M , and Kobayashi, E et al Rejection of intestinal grafts overexpressed with human histo-blood group A/B antigens *Transplantation* 74(4) 609, 2002
- 43 Iwamoto, S , Kumada, M , Kanesaki, T , Okuda, H , Kajii, E , Inagaki, T , Saikawa, D , Takeuchi, K , Ohgawara, S , Takahashi, R , Ueda, S , Inoue, S , Tahara, K , Hakamata, Y and Kobayashi, E Rat encodes paralogous gene equivalent of human histo-blood group ABO gene association with antigen expression by overexpression of Human ABO transferase *J Biol Chem* Nov 29,277(48) 46463-46469, 2002
- 44 Kita, J , Kobayashi, E , Hishinuma, A , Kaneda, Y and Kubota, K Genetic modification of cold-preserved renal

- grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method Transplant Immunol (in press)
- 45 Nakao, A , Mitsuoka, N , Tahara, K , Tanaka, N , Kobayashi, E Experimental models of rat small intestinal transplantation cuff method and suture method Transplant Proc (in press)
- 46 Nakao, A , Tahara, K , Inoue, S , Tanaka, N and Kobayashi, E Experimental models of small intestinal transplantation in rats orthotopic versus heterotopic model Acta Medica Okayama 56(2) 69-74, 2002
- 47 Nakao, A , Tahara, K , Inoue, S , Mizuta, K , Takeichi, T , Uchida, H , Tanaka, N and Kobayashi, E Combined cuff and suture technique for orthotopic whole intestinal transplantation in rats Microsurgery 22 85-90, 2002
- 48 Ohya, T , Usui, K , Teramoto, K , Arii, S , Iwai, T , Tahara, K , Hashizume, K , and Kobayashi, E "Virtual Histology" A novel Modality for Monitoring Graft Rejection Post-Small Bowel Transplantation Transplant Proc 34 993, 2002
- 49 Ogata, Y , Takahashi, M , Takeuchi, K , Ueno, S , Mano, H , Ogawara, S , Kobayashi, E , Ikeda, U and Shimada, K Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes A possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy J Cardiovasc Pharmacol 40 907-915, 2002
- 50 Ogata, Y , Takahashi, M , Ueno, S , Takeuchi, K , Okada, T , Mano, H , Ookawara, S , Ozawa, K , Berk, B C , Ikeda, U , Shimada, K , Kobayashi, E c-Src/Bcl-1_L Pathway Involvement in Anti-Apoptotic Effect of Endothelin-1 in H9c2 Cardiomyocytes (in press)
- 51 Okazaki, H , Hirata, D , Kamimura, T , Sato, H , Iwamoto, M , Yoshio, T , Masuyama, J , Fujimura, A , Kobayashi, E , Kano, S and Minota, S Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice Therapeutic Potential in Systemic Lupus Erythematosus J Rheumatol 29(4) 707-716, 2002
- 52 Sakuma, Y , Nagai, H , Sugimoto, K , Fujimura, A , Murakami, T , Uchida, H , Hakamata, Y , Takahashi, M and Kobayashi, E Comparison of efficacy and toxicity between sandimmune* and neoral* in the cyclosporine-resistant rat allo-pancreas transplantation Res Commun Pharmacol Toxicol (in press)
- 53 Sakuma, Y , Xiu, D R , Uchida, H , Hakamata, Y , Takahashi, M , Murakami, T , Nagai, H and Kobayashi, E Short-course methotrexate and long-term acceptance of fully allogeneic rat cardiac grafts A possible mechanism of tolerance Transpl Immunol 10(1) 49-54, 2002
- 54 Sato, Y , Hakamata, Y , Inoue, S , Tahara, K , Sakuma, Y , Ajiki, T , Wang, J , Takahashi, M , Murakami, T , and Kobayashi, E Transgenic rats a novel tool for transplantation research Transplantation 74(4) 291, 2002
- 55 Takahashi, M , Nishihira, J , Katsuki, T , Kobayashi, E , Ikeda, U , Shimada, K Elevation of plasma levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction Am J Cardiol 89(2) 248-9, 2002
- 56 Takahashi, M , Ogata, Y , Okazaki, H , Takeuchi, K , Kobayashi, E , Ikeda, U , Shimada, K Fluvastatin enhances apoptosis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells J Cardiovasc Pharmacol 39(2) 310-7, 2002

- 57 Takahashi, M, Takahashi, S, Shimo, M, Naito, A, Ogata, Y, Kobayashi, E, Ikeda, U, Shimada, K β -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells Atherosclerosis 162(2) 307-313, 2002
- 58 Sakuma S, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y Inhibitory and Enhancing Effects of Insertion of Central Polypurine Tract and Central Termination Sequence on Gene Expression with Vectors Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Biochemical and Biophysical Research Communications in press (2003)
- 59 Yamada T, Kaji N, Odawara T, Chiba J, Iwamoto A, Kitamura Y Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human leukocyte antigen J Virol 77(2) 1589-1594 (2003)
- 60 Kobayashi N, Nakamura K, Goto M, Nakamura T, Nakamura K, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients Jpn J Infect Dis 55(4) 131-133 (2002)
- 61 Takahashi T, Endo T, Nakamura T, Sakashitani H, Kimura K, Ohnishi K, Kitamura Y, Iwamoto A Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in Pneumocystis carinii f sp hominis in Japan J Med Microbiol 51 510-515 (2002)
- 62 Sakuo Hoshi Takashi Odawara, Masamichi Oshima, Yoshihiro Kitamura, Hajime Takizawa, and Hiroshi Yoshikura cis-Elements Involved in Expression of Unspliced RNA in Moloney Murine Leukemia Virus Biochem Biophys Res Commun 290(3) 1139-44 (2002)
- 63 Keisuke Ae, Noriko Kobayashi, Ryuta sakuma, Toshihiko Ogata, Hiroshi Kuroda, Noriyoshi Kawaguchi, Kenichi Shinomiya, and Yoshihiro Kitamura Chromatin remodelling factor encoded by in11 induces G1 arrest and apoptosis in in11-deficient cells Oncogene 21 3112-3120 (2002)
- H 知的財産権の出願 登録状況
- 1 特許取得
- 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トタイプレトロウィルスベクター
- 出願番号 特願 2000-169090
- 海外出願各国移行済み

厚生労働科学研究費補助金 (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)、

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
三室 淳 自治医科大学 講師
窓岩清治 自治医科大学 講師

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療法の開発 SIV ヘ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 因子を効率よく産生しえた。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第 VIII 因子の血液正常値の 2% に相当するヒト凝固第 VIII 因子を恒常的に検出しえた。また、CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID マウスの末梢血と骨髄中に CD34 陽性細胞を含むヒト由来の血液細胞が検出され、第 VIII 因子を産生するヒト血液細胞もマウス骨髄に認められた。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 遺伝子治療が可能であることを示唆している。また、SIV ベクターを用い培養ヒト脂肪細胞、マウスの脂肪組織へ凝固第 VIII 因子遺伝子を導入しえた。さらに、マウスにおいては治療レベルに達するヒト凝固第 VIII 因子を発現しえた。脂肪組織へはベクター投与か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おり、安全な遺伝子治療への展開が期待できると思われた。ヒト凝固第 VIII 因子 cDNA は翻訳領域が 7 kb あり AAV ヘクターへの搭載は困難であったが、ヒト凝固第 VIII 因子の活性発現に必須の重鎖(HC)と軽鎖(LC)をコートする cDNA フラグメントをそれぞれ異なる AAV ヘクターへ搭載 (AAV1FVIIIHC、AAV1FVIIIILC) した dual AAV ベクターシステムを用いてヒト凝固第 VIII 因子軽鎖、重鎖を同一細胞で発現させると、両鎖が結合し生理活性をもつヒト凝固第 VIII 因子が産生されることを培養細胞 (*in vitro*) で確認できた。さらに血友病 A マウスの骨格筋に AAV1FVIIIHC、AAV1FVIIIILC を投与したところ、投与後 2 週間で凝固第 VIII 因子活性が正常濃度の 4% まで上昇することか血友病マウス (*in vivo*) で確認できた。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か可能かを血友病 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か予見される患者に臨床応用可能と思われる。

血友病 B 遺伝子治療の開発 またヒト凝固第 IX 因子を骨格筋で発現するために凝固第 IX 因子 *minigene* を type2 AAV ヘクターに加え、骨格筋への遺伝子導入効率の良い type 1、type5 AAV ヘクターへ凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ。血友病サルは見いだされていないが、霊長類モ

デルとしてカニクイザルをもちいることで凝固因子を発現させるモデルとすることが出来ると思われた。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、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。カニクイザルの下肢骨格筋（大腿四頭筋）に対し凝固第 IX 因子 minigene を搭載した AAV ヘクター 1×10^{12} vg/kg を投与した。AAV ヘクターでは AAV1 が最も効率よくヒト凝固第 IX 因子を発現しえ、ベクター投与後 2 週後には正常ヒト凝固第 IX 因子血液レベルの約 5% に達する発現を認めた。しかし、カニクイザルの凝固第 IX 因子アミノ酸配列はヒトと 97% 以上相同であるか、ベクターを投与されたカニクイザルにヒト第 IX 因子に対する抗体が出現したためヒト第 IX 因子はカニクイザルの血液中に検出されなくなった。副作用の発現は見られなかった。しかし、カニクイザルにヒト第 IX 因子に対する抗体が出現したため、カニクイザル血液中でのヒト凝固第 IX 因子は一過性にしか検出されなかった。このため、免疫抑制剤 cyclosporin A 投与下に、ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ベクター 2×10^{12} vg/kg を別のカニクイザル 3 頭に投与したところ、2 頭では低レベルの発現であったが、1 頭でヒト凝固第 IX 因子は 9% に上昇し、低レベルのヒト第 IX 因子に対する抗体が出現したか正常ヒト凝固第 IX 因子血液レベルの約 4% に相当する発現を 10 週以上維持している。ヒトに近いサルにおいて、治療効果がえられるレベルのヒト第 IX 因子の発現が得られたことは、適切なヘクターを選択することで、骨格筋に第 IX 因子遺伝子を導入する血友病 B 遺伝子治療が可能であると思われた。

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 2% 以上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かより優れた治療法と考えられ、治癒にもつなかるものである。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

ヘクター、AAV ベクターを用いたマウスへの凝固第 VIII 因子遺伝子導入実験、インヒビター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 遺伝子治療の基礎的検討をおこなうことを目的とする。

B 方法

- 1 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
生理活性を有し、なおかつウイルスヘ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 (B domain deleted FVIII cDNA, BDDFVIII) を CMV プロモーターの下流に配置した SIV ベクターをもちい、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞へ凝固第 VIII 因子遺伝子導入を行い、第 VIII 因子の発現を検討した。

第 VIII 因子遺伝子を導入した 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。またマウス末梢血液中のヒト第 VIII 因子を ELISA で定量し、骨髄細胞中の第 VIII 因子は蛍光抗体法で検出した。

2 ヒト第 VIII 因子遺伝子搭載 SIV ヘクターの直接投与による脂肪細胞、脂肪組織でのヒト第 VIII 因子の発現

培養ヒト脂肪細胞、肥満マウス (*db/db*) の脂肪組織へ SIV FVIII を投与し遺伝子導入が可能かまた第 VIII 因子の発現と産生を検討した。

3 AAV vector をもちいた FVIII 遺伝子導入 full length FVIII cDNA を改変し、第 VIII 因子重鎖 (HC) をコードする cDNA フラグメントと軽鎖 (LC) をコードする cDNA フラグメントをそれぞれ別の AAV ヘクターへ組み込み SCID マウス、血友病 A マウスへ投与しヒト第 VIII 因子の発現を検討した。

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 因子インヒビターノセイと ³H-チミ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 ヘクターの開発

凝固第 IX 因子 *mini gene* を type 1, 2, 5 AAV ベクターへ組み込み (AAV1FIX, AAV2FIX, AAV5FIX) ヒト凝固第 IX 因子を発現しうるか

検討した。

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 因子のみを検出しえるヒト第 IX 因子測定系を検討し、また用いたモノクロナル抗体ヒト凝固第 IX 因子結合部位を同定した。

7 カニクイザルを用いた血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討

カニクイザルの骨格筋に AAV1FIX、AAV2FIX、AAV5FIX を投与し、ヒト第 IX 因子の発現をヒト第 IX 因子特異的モノクロナル抗体をもちいて検討した。

C 結果

1 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

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、効率よく第 FVIII 因子の発現かみとめられた。*ex vivo* において SIV FVIII をもちいて凝固第 VIII 因子遺伝子を導入したヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウスへ移植したところ、正常ヒト第 VIII 因子濃度の 2% レベルではあるが、恒常的に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。骨髓細胞にはヒト第 VIII 因子を産生する血液細胞が検出された。

2 ヒト第 VIII 因子遺伝子搭載 SIV ヘクターの直接投与による脂肪細胞、脂肪組織でのヒト第 VIII 因子の発現

SIV ヘクターは培養ヒト脂肪細胞へも効率よく遺伝子導入可能であり、ヘクター量依存性の第 FVIII 因子の発現かみとめられた。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か免疫蛍光法により確認された。また、マウス末梢血液中にヒト第 VIII 因子が一過性ではあるかヒト正常濃度の 2% レベルで検出された。またマウス血液中にヒト第 VIII 因子に対する抗体が検出された。

3 AAV vector をもちいた FVIII 遺伝子導入第 FVIII 因子重鎖(HC)を発現する AAV ヘクター(AAVFVIIIHC)と軽鎖(LC)を発現する AAV ヘクター(AAVFVIIIILC)を SCID マウス骨格筋へ投与しヒト第 VIII 因子の発現を検討したところ、第 VIII 因子軽鎖 LC は 100% のレベルまでの発現かえられたが重鎖 HC の発現は 5% 前後であった。血友病 A マウスへ同様に投与したところ 4% の凝固活性の上昇が認められた。

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 因子の初回投与か生後 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か示された。

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 を type 1, type 2, 及び type 5 AAV ヘクターへ組みマウスへ投与したところ、AAV ベクターのタイプにより発現がことなることが示され、AAV1 ベクターか最も効率よく第 IX 因子を発現した。

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 因子のみを検出しえるヒト第 IX 因子測定系を確立した。班研究者の吉岡か開発したモノクロナル抗体 3A6 はヒト第 IX 因子と結合するがカニクイザル第 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)は第 IX 因子変異体の解析から A262 であることを明らかにした。

7 カニクイザルを用いた血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討

ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ベクター 10^{12} vg/kg をカニクイザルの下肢骨格筋へ投与した。AAV ベクターでは AAV1 が最も効率よくヒト凝固第 IX 因子を発現しえ、ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV1 ヘクターを投与した 3 頭のカニクイザルのうち AAV1 ウイルスに対して抗体を持っていなかった 2 頭においてヘクター投与後 2 週後には正常ヒト凝固第 IX 因子血液レベルの約 3-5% に達する発現を認めた。しかし、カニクイザルにヒト第 IX 因子に対する抗体が出現したため、カニクイザル血液中でのヒト凝固第 IX 因子は一過性にしか検出されなかった。この

ため、免疫抑制剤 cyclosporin A 投与下に、ヒト凝固第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ヘクター 2×10^{12} vg/kg を別のカニクイザル 3 頭に投与したところ、2 頭では低レベルの発現であったか、1 頭でヒト凝固第 IX 因子は 9% に上昇し、低レベルのヒト第 IX 因子に対する抗体が出現したが正常ヒト凝固第 IX 因子血液レベルの約 4% に相当する発現を 10 週以上維持している。

D 考察

血友病の遺伝子治療は、すでにいくつもの臨床試験が行われているが、いまだ十分な成果をあげていない。患者から体外に取り出した線維芽細胞にプラスミドヘクターによりヒト第 VIII 因子を組み込み、第 VIII 因子を産生する線維芽細胞をクローン化し増殖したのちに線維芽細胞を採取した患者の大網へ投与する治療が行われている。この臨床試験の結果が最近報告されたか、第 VIII 因子の発現は一過性で消失していた。さらに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。これらのことから、さらに基礎的な検討が必要であると思われる。

SIV ヘクターをもちいてヒト第 VIII 因子遺伝子を導入した臍帯血由来 CD34 陽性細胞は効率よく第 FVIII 因子を産生し、この CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID マウスにおいてヒト第 VIII 因子を産生する細胞がマウス骨髄に検出され、さらには目標レベルのヒト第 FVIII 因子が恒常的に保たれていることから、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、

脂肪組織への遺伝子導入と第 FVIII 因子の発現も安全な遺伝子治療法へつなぐと考えられる。

Dual AAV ヘクターを用い第 VIII 因子重鎖、軽鎖を発現させる遺伝子治療法は安全面からも今後の展開が期待できる。

血友病 B の遺伝子治療は、米国において臨床試験が行われつつある。AAV2 ヘ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試験が行われ、その途中ではあるか結果が報告された。しかし、肝臓をターゲットとし遺伝子導入においても、第 IX 因子の発現はえられたものの一過性で十分な効果が得られなかった。臨床試験で用いられた AAV2 ヘ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 因子遺伝子を導入したところ、AAV1 ベクターを用いると十分な治療域に達するヒト第 IX 因子の発現がえられていることが示唆された。ヒトに近い種であるサルにおいてこのような結果が得られたことから、適切なヘクターを選択することで血友病 B の遺伝子治療が可能となると考えられる。

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、脂肪組織をターゲットとした安全な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と遺伝子治療への展開が可能と思われた。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

論文発表

- 1 Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y Expression of human coagulation factor VIII in adipocyte transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy Gene Therapy in press
- 2 Mimuro J, Ogata K, Mizukami H, Kikuchi J, Sugo T, Madoiwa S, Hanazono Y, Kume A, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y A primate model for hemophilia B gene therapy research British Journal of Haematology in press
- 3 Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Madoiwa S, Sugo T, Naito M, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y Sustained transgene expression by human cord blood-derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice British Journal of Haematology in press
- 4 Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yase T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y Defective sorting to secretory vesicles in the trans Golgi network is partly responsible for protein C deficiency Molecular mechanism of impaired secretion of abnormal protein C R169W, R352W and G376D Circulation Res in press
- 5 Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo Te, Mimuro J, Sakata Y Successful Induction of Immune Tolerance by Neonatal Injection of Human Factor VIII in Murine Hemophilia A J Thromb Haemostat, in press
- 6 Sigeta K, Taniguchi N, Omoto K, Madoiwa S, Sakata Y, Mori M, Hatake K, Itoh K In vitro platelet activation by an echo-contrast agent J Ultrasound Med in press
- 7 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 Nephron in press
- 8 Kamimishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y Modified Bentall Operation in a Patient With Hemophilia A Jpn J Thorac Cardiovasc Sur 51(2)68-70,2003
- 9 Watanabe T, Ohkuchi A, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Wada T, Onagawa T, Sato I Perioperative changes in plasma antithrombin activity and platelet counts in patients undergoing gynecologic surgery Seminars in Thrombosis and Hemostasis 28(6) 519- 524 ,2002
- 10 Sugo T, Sakata Y, Matsuda M Structural alterations in hereditary dysfibrinogens Current Protein and Peptide Sci 3 239-247,2002
- 11 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 Clinica Chimica Acta 318 25-32,2002
- 12 Miyoshi T, Otsuki T, Omine K, Kirito K, Nagai T, Izumi T, Komatsu N, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y, Ozawa K Acute promyelocytic leukemia accompanied by retinoic acid syndrome with complications of acute myocardial infarction and cerebral infarction during treatment with all-trans retinoic acid Rinsho Ketsueki 43 954-959,2002

学会発表

- 1 宍岩清治、山内忠彦、新井盛夫、小林英司、三室 淳、諏合輝子、坂田洋一
第VIII因子欠損マウスを用いた新生児免疫寛容誘導の試み 第25回日本血栓止血学会学術集会 2002 11
- 2 内藤雅夫、三室 淳、遠藤仁司、宍岩清治、尾形享一、菊池次郎、諏合輝子、坂田洋一
先天性プロテインCの欠乏症の分子機構 ゴルシネネットワークから分泌顆粒への輸送障害(Defecut of sorting to secretory vesicles in the Golgi is responsible for type I protein C deficiency)第64回日本血液学会総会 2002 9
- 3 菊池次郎、三室 淳、尾形享一、上田泰治、久米晃啓、宍岩清治、諏合輝子、内藤雅夫、長谷川 護、水上浩明、花園 豊、小澤敬也、坂田洋一
SIVヘクターを用いたCD34陽性細胞への凝固第VIII因子遺伝子導入による血友病Aの遺伝子治療法の検討(Transplantation of Human Factor VIII producing Cord Blood derived CD34+cells into NOD/SCIDmice)第64回日本血液学会総会 2002 9
- 4 尾形享一、三室 淳、菊池次郎、上田泰治、水上浩明、内藤雅夫、宍岩清治、諏合輝子、長谷川 護、花園 豊、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一
血友病A遺伝子治療の基礎検討(Haemophilia A Gene Therapy Expression of Factor VIII Transgene in Adipocytes)第64回日本血液学会総会 2002 9
- 5 宍岩清治、坂田洋一 「癌の凝固線溶系への挑戦」第3回日本検査血液学会学術集会シンポジウム 2002 7
- 6 Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Ogata K, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y
Sustained Production of Human Factor VIII from Human Cord Blood-Derived CD34 + Cells Transduced by Simian Immunodeficiency Virus agmTYO1-Based Vectors Carrying the Human Factor VIII Transgene in NOD/SCID Mice American Society of Hematology 44th Annual Meeting and Exposition 2002 12 (p-200)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

AAV ヘ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
研究協力者 水上浩明 自治医科大学遺伝子治療研究部 助手
同 松下 卓 自治医科大学ウイルス学講座 助手

研究要旨

AAV ヘクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて基礎的検討を行った。AAV ヘクターは骨格筋や肝臓などの非分裂細胞への遺伝子導入が可能であるか、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最適化を行い、得られた条件下でマウス及びサルをモデルとして、骨格筋を標的とする遺伝子導入を行った。その結果、血友病 B 及び A のいずれに対しても治療域に達する遺伝子発現がみられた。しかしながら、その後の経過において血中凝固因子レベルの低下とインヒビターの生成が認められ、本研究の遂行に際しては免疫学的側面に関しても充分留意する必要があるものと考えられた。

A 研究目的

アテノ随伴ウイルス（AAV）ヘクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関して、高効率のヘクター作製法、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った。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、昨年度までにマーカー遺伝子で得られた成果を応用して、マウス及びヒノコ類のサルの系で前臨床研究を行い、治療法の有効性と安全性につき検討した。

B 研究方法

(1) 血友病Bに関する検討

血友病Bに関しては主に骨格筋を標的とし、前年度までに得られたAAVヘクターのin vivo投与法の基礎実験の結果から、CMVプロモーター及び各血清型由来のキャプシドを利用して凝固第Ⅸ因子遺伝子を搭載したヘクターを作製した。これらをSCIDマウスの前脛骨筋に 1×10^{11} ヘクターケノム/個体の用量で注入し、各血清型の違いに基づき第Ⅸ因子の発現を比較した。同ヘクターを用いてカンクイサルでも同様の検討を試みたか、使

用できる頭数の制約から、今回は1型・2型・5型に対応したヘクターについて実験を行った。投与量は 1×10^{12} ヘクターケノム/kg、1箇所あたり最大 5×10^{11} ヘクターケノムとし、大腿四頭筋及び下腿三頭筋に注入した。また、凝固第Ⅸ因子及び各血清型のキャプシドに対する抗体の測定系を主にELISA法を用いて確立し、ヘクター投与に伴う動物個体レベルでの免疫反応を解析した。

(11) 血友病Aに関する検討

血友病 A に関しても骨格筋を標的として有用性の検討を行った。重鎖及び軽鎖の遺伝子を別々に搭載する二つのヘクターを、いずれも1型由来のキャプシドを用いて作製し、混合して筋肉内注入することによって共感染させる方式をとった。SCIDマウス及び第Ⅷ因子ノックアウトマウスの系で、導入遺伝子由来する血中凝固因子レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するヘ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。マウ

スを用いた動物実験は自治医大で実施するか、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。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サルの実験では、国立感染症研究所「動物実験カイトライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C 研究結果

(1) 血友病 B に関する検討

凝固第 IX 因子発現 AAV ヘクターの筋注法について、SCID マウスの系で各血清型の比較検討を行った。1x10¹¹ ヘクターゲノム/個体を前脛骨筋に投与したところ、1 型を用いた場合が最良であり、およそ 200 ng/ml の血中濃度が得られ、5 型ではおよそ 10 ng/ml レベルでこれに次ぎ、その他の血清型の場合には更に低かった。また、いずれの場合にも第 IX 因子の血中濃度は投与後 10 週間の観察期間にわたってほぼ一定のレベルを保っていた。同様の検討をカニクイサルで行ったところ、1 型を用いた場合には用いた 3 頭中 2 頭において高い発現が得られ、それぞれ 138 及び 86 ng/ml に達した。2 型を用いた場合にも 66 ng/ml に達する発現が認められる個体があったか、残りの 2 頭では極めて低かった。5 型を用いた群ではいずれの個体においても発現は認められなかった。尚、いずれの個体でも注入後 6 週を過ぎると血中濃度は著明に低下し、検出限界以下となった。検討の結果、ヒト型第 IX 因子に対する抗体が出現していることが判明した。また、ヘクターに対する抗体価も検討したところ、注入した血清型に対する抗体価が投与後 2 週から 4 週にかけて急上昇しており、中和活性を有していることが判明した。

(11) 血友病 A に関する検討

血友病 A に対しては、血友病 B で得られた知見も参考にしつつ、骨格筋を標的として 1 型由来のヘクターを用いて遺伝子導入を行った。SCID マウスでの検討では投与後 2 週間で 100% を越える抗原量が見出され、その後も有効な血中濃度が

10 週間以上続いたため、治療効果を判定する目的で第 VIII 因子ノックアウトマウスに対して同様に筋肉内注入を行った。その結果、投与後 2 週間で 5% 程度の凝固因子活性が認められた。しかしながら、4 週間後には活性の低下が認められ、以後ハッククラウントレベルとなった。抗体価を検討したところ第 VIII 因子に対する極めて高い抗体価が検出された。

D 考察

今年度は、血友病 B に関しては凝固第 IX 因子遺伝子を用い、骨格筋を標的として血清型の比較を行った。その結果、マウスのみならず霊長類モデルでも 1 型に由来するキャプントを利用した場合に他を大きく凌駕する効果が得られ、昨年度までに LacZ 及びエリスロポエチンで得られた成績とほぼ同様の傾向を示した。このことはヒトに対する治療法の選択においても、1 型が有用であることを強く示唆するものと考えられる。今回の検討では、霊長類モデルの場合にも注入後の第 IX 因子発現レベルは正常の 5% 程度に到達しており、充分治療域を達成したもののといえる。

有効なレベルの発現が見られた一方で、免疫学的側面の関与も極めて大きいことが明らかとなった。霊長類における第 IX 因子の発現では、ヒト型第 IX 因子に対する強い免疫反応が認められた。サル型とヒト型の第 IX 因子の相同性はアミノ酸配列で 97% 以上であり、このような反応は予想を遙かに上回るものであった。実際の臨床研究の際には同種の分子を投与するためにこの点は問題とはならないか、霊長類を用いた前臨床試験を設計するに際しては重要なポイントである。この問題を回避するためにはサルに対する免疫原性を惹起させているエピトープを決定し、該当部位をサル型に変更することか肝要であるが、その際にサル型と区別して測定が可能であるかどうかか焦点である。或いは投与に際して免疫抑制を行うことも選択肢の一つであり、いずれにしても今後の検討が必要である。今回の検討では 1 型を用いた 3 頭のうち 2 頭で治