

20030559

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
(H15-エイズ-009)

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16 (2004) 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	
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	11
(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	18
(自治医科大学 小澤敬也)	
3. 第3世代レンチウイルスベクターを用いた血友病 A 遺伝子治療(イヌモデル)および肝臓外肝細胞移植による肝組織新生の試み	22
(奈良県立医科大学 吉岡 章)	
4. センダイウイルス F、HN タンパク質を用いたシュウドタイプ SIV ベクター開発と血友病遺伝子治療への応用	26
(株式会社ディナベック研究所 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. 肝選択的遺伝子導入法の開発とその有効性の検討	32
(自治医科大学 小林英司)	
7. 血友病の遺伝子治療用のレンチウイルスベクターの開発と安全性の評価に関する研究	37
(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	40
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

厚生労働科学研究費補助金（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 坂田洋一 自治医科大学 教授

研究要旨

本年度は、昨年度のフランスにおける先天性免疫不全症に対する遺伝子治療の副作用（遺伝子治療成功例 9/11 例のうちの 2 例に T 細胞性白血病様病態の発症）を教訓に血友病遺伝子治療のさらなる安全性と、長期発現効率の維持の可能性を検討した。具体的には、1) ゲノムに integration されず、比較的 safety の確認された adeno-associated virus (AAV) ベクターの血友病 A への利用の可能性の検討、2) 摘出可能な標的臓器への限局した遺伝子導入法の検討、3) integration されるが長期安定発現の期待できるサル免疫不全ウイルス [SIVagmTYO-1 株] (SIV) ベクターの安全性と効率の改善、4) 前臨床として意味を持つサルを用いた血友病 B 遺伝子治療の長期安全性のさらなる確認、5) 肝細胞移植と遺伝子治療の併用の検討、6) 遺伝子治療に関わるインヒビタ対策などである。これらについて概説する：1) AAV ベクターと血友病 A 遺伝子治療：AAV ベクターに搭載可能な遺伝子サイズは 5 kb が限界というのがこれまでの金科玉条であった。第 VIII 因子の必要最小限 cDNA サイズは 4.4 kb でプロモータなどを考慮すると殆ど工夫の余地はない。そこで、 β アクチンプロモータの一部を利用した第 VIII 因子遺伝子治療と、第 VIII 因子の軽鎖と重鎖をコードする cDNA を別々に AAV-1 ベクターに搭載し、発現後プロセッシングにより再構築される可能性を血友病 A マウスを用いて検討した。それぞれ一定量の発現が見られ、使用可能性が示唆された。また、肝細胞特異性が極めて高く、搭載遺伝子も 5.4 kb 迄可能という AAV-8 ベクターが最近報告されたことによりこの可能性は更に現実的なものとなった。2) 脂肪細胞への遺伝子導入の際に安全な界面活性剤を添加することで効率改善が図れた。また導入脂肪組織を手術的に除去することで、レスキュー可能であることが確認された。骨格筋細胞、肝臓に長期特異的発現する AAV ベクターの検討も展開した。3) SIV ベクターは第三世代化、及び、発現効率増強配列を導入することに成功した。また、導入細胞の種類を幅を広げるために、エンベロープ部をセンダイウイルスベクターのそれに代えた新型シュドタイプ SIV ベクターの開発も進んだ。4) サルを用いた血友病 B の遺伝子治療では、9% レベルの因子発現は見られるが、3ヶ月ぐらいで 97% 以上相同性が見られるヒト第 IX 因子に対するインヒビタが出現したことから、サル型の第 IX 因子の cDNA にタグ塩基配列を付けた遺伝子を作製した。これをサルに投与し、長期安全性の検討を開始している。5) マウスを用いて分離肝細胞を、腎皮膜下へ異所性移植する実験を施行し、これに成功した。今後は移植する細胞に予め血友病遺伝子を導入することと、皮下への移植を検討する予定である。6) 生下時に血友病 A マウスにヒト第 VIII 因子製剤を投与することで、“免疫寛容”が誘導可能であることは既に確認した。本年度は、寛容誘導マウスの脾臓リンパ球を用いて、抗原刺激による細胞増殖と、サイトカインの発現レベルの検討を施行した。抗原刺激により、IL-2 は産生されるが、IF γ の産生が抑制されており細胞増殖がおきないこと、及び IL-12 を外部から系に加えることで、細胞増殖と IF γ 産生が回復することが明らかとなった。また、生下時、及び 10 週後に第 IX 因子 cDNA を搭載した AAV-1 ベクターを投与する実験では、生下時投与例のみに長期第 IX 因子発現が見られた。実際の遺伝子治療にこれらの免疫寛容をいかに利用するかは今後の検討課題である。

臨床応用に進むには解決すべき問題点は多いが、彼方に見えた明かりが確かなものになりつつあるというのが現状である。

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講座

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

欠乏している凝固 VIII 因子(血友病 A)、あるいは凝固 IX 因子(血友病 B)のレベルを数%に維持できれば、血友病で不慮の出血を来すことは殆どない。現在施行されている因子製剤輸注による care を中心とした治療から、cure をもたらす治療として、医学的にもまた因子製剤の使用量を減少させることによる社会への貢献という点からも血友病遺伝子治療が大きな期待を寄せられている。しかしながら、最近、フランスにおける先天性免疫不全症の遺伝子治療成功例(9/11 例)の 2 例において T 細胞白血病様の病態が発症したと報告された。この治療には、IL-2 レセプタの γ 鎖遺伝子を搭載したマウス白血病細胞由来レトロウイルスベクターが用いられている。遺伝子が LMO-2 という oncogene 近傍に integration されたことが原因であることが推測されているが、その本態解明は更に進行中である。用いたベクターと搭載した遺伝子も発症に関与していると思われるが、random integration されるベクターの危険性が現実化した可能性が高い。この遺伝子治療全

般への警鐘を教訓に、安全性を第一に考え、まず、ベクターとしては、より安全の保証されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを最優先に考え、血友病遺伝子治療におけるその限界を極める展開を開始する。しかしながら、長期安定発現を考慮すると、integration されるベクター(具体的にはレンチウイルスベクター)の基礎検討と、安全性を高めるための検討は不可欠であり、この点にも配慮して研究を進める。

本年度は血友病 A については、AAV ベクターの利用可能性の検討と、レンチウイルスベクターの安全性の向上と、効率の改善を目指した検討を進める。AAV ベクターの搭載可能遺伝子サイズは 5kb までとされ、凝固第 VIII 因子の cDNA は、必要最低サイズが 4.4kb である。安全性を高めるための組織特異性を導入するプロモータ等を工夫する余地は殆どないが、この壁をいかに乗り越えるかが一つの課題となる。またレンチウイルスベクターの安全性には、ベクターそのものの改良とともに、もし問題が起きても除去できる臓器の選択と標的臓器特異的な投与法の開発なども重要な検討課題となる。血友病 B については、サルを用いて AAV ベクターを利用した高効率長期発現法の検討と、安全性の検討を昨年に引き続き更に展開する。遺伝子治療においてますます重要視されつつあるインヒビタ対策としては、血友病 A マウスを利用して、免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにする。また、新生児遺伝子治療の可能性も検討する。

B.研究方法

1) AAV ベクターの血清型の選択：安全性を考慮して、長期間発現時の臓器特異性を、第 IX 因子遺伝子を搭載した血清型の異なる AAV ベクターで検討した。SCID マウスを用いて 1 年間にわたる長期発現を観察し

た。

2) プロモータの検討：安全確保と、臨床利用を考慮して、臓器特異性と、発現調節の2点をキーワードに検討した。

本年度はプラスミノゲンアクチベータインヒビター1 (PAI-1)の修飾プロモータ(CEPプロモータ)を中心に、CMVプロモータなど広範囲組織発現を目指した既存のものと比較する形でマウス骨格筋、脂肪細胞などを標的臓器に選んで *in vivo* で検討した。

3) 標的細胞：本年度は除去可能な脂肪細胞と骨格筋細胞に対して、導入効率の改善と、発現の特異性とレスキューの可能性を詳細に検討した。種々のサルに病原性のみられないレンチウイルスベクターであるサル免疫不全ウイルス [SIVagmTYO-1株] (SIV)ベクター、あるいは AAV-1ベクターに脂肪細胞と血管内皮細胞で特異的に発現する PAI-1プロモータを搭載し、それぞれ第VIII因子或いは第IX因子のcDNAを搭載して、導入効率を上げるために安全性が確かめられているプルロニック系界面活性剤を添加するなど投与条件をいろいろと工夫し、マウスの脂肪細胞での発現を観察した。また、遺伝子導入後、投与脂肪組織除去によるレスキューの可能性を検討した。解析は別途 GFP 遺伝子搭載ベクターを利用して、さらに、免疫学的手法による因子の組織発現レベルと血中因子レベルを測定することで行った。

4) 異所性肝細胞移植：昨年までに日本において生体部分肝移植によるヒト及びイヌ血友病Aの治癒可能性が示唆された。そこで分離肝細胞に遺伝子を導入し、切除可能部位へ移植することによる治療可能性を検討した。ヒト α 1アンチトリプシン(hAAT)のトランスジェニックマウスの肝細胞を採取し、これをNOD/SCIDマウスの腎被膜下に移植して、生着をhAATの血中レベルと

組織の観察により確認した。肝切除による増殖刺激の移植片反応性も検討した。

5) 血友病A、AAVベクターの利用可能性を2つの方法で検討した：1)搭載可能な短いプロモータ“ β actin promotorの一部(150bp)”を利用してB鎖を除く第VIII因子cDNAを搭載したAAVベクター1、及び8型を作製し、マウス骨格筋あるいは肝臓に注入した。2)第VIII因子の重鎖、及び軽鎖をコードするcDNAを別々のAAV-1ベクターに搭載し、発現後プロセッシングによる重鎖と軽鎖の結合を期待して血友病Aマウス骨格筋に注入した。

6) 血友病B：ヒト第IX因子発現 AAV-1ベクターをサル骨格筋に種々の免疫抑制剤投与下に注入した。また長期発現観察のために免疫学的に有利なサル第IX因子cDNAにタグを付けた遺伝子を搭載したAAV-1ベクター〔後にAAV-8ベクター〕の作製を試みた。

7) 遺伝子治療基礎的技術検討：SIVベクターの安全性を高める検討と発現効率に関わるcPPT配列、WPRE配列導入などの基礎的検討を行った。また標的臓器の巾広げるために、センダイウイルスのエンベロープタンパク質FHN癒合蛋白をエンベロープとした新型シュードタイプの作製を検討した。更に、危険が生じたときに臓器の切除レスキューを目的とした肝臓区域内ベクター投与法の検討もブタを用いてすすめた。

8) インヒビタ対策：第VIII因子KOマウスにヒト第VIII因子投与により免疫寛容を誘導し、そのメカニズムを抗原刺激による脾リンパ球の増殖とサイトカイン産生レベルを観察することで解析した。免疫寛容を利用して、マウスを用いて、種々のAAVベクター血清型に第IX因子cDNAを搭載し、新生児期遺伝子導入の効果を成熟マウスと比較する形で検討した。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、非病原性のベクター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、倫理的問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウス、イヌを用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて奈良県立医大、自治医大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、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して、国の倫理指針（平成15年7月30日に施行された厚生労働省告示第255号）に準拠し、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： β アクチンプロモータの一部を用いて、或いは、第 VIII 因子重鎖・軽鎖を別々に搭載して AAV ベクターの利用を図り、それぞれ、短期間 35%、および、1-3% の因子発現がえられた。インヒビタ産生により血中レベルの維持は困難であったが、方法論的に AAV ベクター利用の可能性が示唆された。脂肪細胞への導入に関しては、生体に無害なプルロニック系界面活性剤の併用により顕著な発現増強効果が得られた。また CEP プロモータの使用により脂肪細胞

での発現増強と、骨格筋組織でも血管を中心とした特異性の高い発現が観察された。また外部より TGF- β を投与することにより、一過性の因子発現の増強が確認され、CEP プロモータに存在する TGF- β -responsive element が発現調節に利用できる可能性が示唆された。血中レベルも長期間、治療量が維持され、また投与部除去により全例が完全にレスキューされて、安全面も確認された。

血友病 B：サル骨格筋にヒト第 IX 因子を搭載した AAV-1 ベクターを筋注投与した結果、正常の 9% の血中濃度が得られた。種々の免疫抑制剤を一定量併用したが、ヒト型第 IX 因子に対する抗体が遺伝子導入後 4-6 週で生起しており、12 週後にはこれによる血中濃度の低下が観察された。この間、サルに安全面で問題となる変化は確認できなかった。

遺伝子治療技術：分離肝細胞を腎被膜下にラミニンと 4 型コラーゲンに富む BMM-Gel と共移植したところ、肝細胞は 100 日を超えて安定して生存し、更に肝切除など肝再生刺激により増殖がみられた。SIV ベクターの第三世代化とセンダイウイルスのエンベロープタンパク質を利用した新型シュードタイプの SIV ベクターの作製に成功した。また、発現効率改善配列の導入により、ほぼ期待通りの効果が得られた。またラット、ブタに血管カテーテルを用いて肝選択的に遺伝子を発現誘導する技術が確立しつつある。

インヒビタ：新生マウスへの第 VIII 因子製剤を用いた免疫寛容はヒト第 VIII 因子特異的であり、*in vitro* での脾臓リンパ球に対する抗原刺激実験による IL-2 産生はあるものの、IL-4、-10、IFN γ の産生がなく、増殖能を有さなかった。また、IL-12 の添加により増殖能、サイトカイン産生の回復がみられた。

以上より、免疫寛容は IFN γ 依存性の T 細胞アネルギーに基づくことが推察された。新生仔マウスにヒト第 IX 因子遺伝子導入を試みた例では、腹腔内投与で、強いインヒビタの産生もみられず、5-10%の血中レベルが長期間観察された。生後 10 週経過したマウスに同様に導入した例では、第 IX 因子の発現は殆ど見られなかった。

D. 考察

第 VIII 遺伝子を AAV ベクターに搭載可能であることが示唆された。本年度後半に AAV-8 ベクターが極めて肝臓特異的で、搭載遺伝子も 5kb をこえて 5.4kb でも高効率に発現が得られることがアメリカから報告された。プロモータの選択により発現臓器の限局と発現調節の可能性が示唆された我々の結果を生かす AAV ベクター利用の戦略に与える示唆は大きい。脂肪細胞は分泌の盛んなしかも増殖の見られない終末細胞の一つである。投与法の工夫による発現効率の改善と特異性増強に改善がみられたことと、外科的除去でレスキューされることが実際に確認されたことにより標的細胞として確立できたと考える（世界初）。サルを用いた血友病 B の遺伝子治療実験はヒトへの前臨床として極めて重要である。3ヶ月間ではあるが、尿中排泄などを含め、安全性の確認がされたことと、骨格筋細胞投与でも十分な治療量の因子の発現がみられたことの意味は大きい。しかし、臨床研究に入るには、更に長期間の観察が必要と考える。また、ヒト第 IX 因子とサル因子は 97%以上の相同性をもつにも関わらず、インヒビタが産生されたことは、インヒビタ対策が遺伝子治療の鍵を握ることを強く示唆するものといえる。その意味で、今回検討した新生仔マウスの遺伝子治療の予想を上回る結果と、製剤を用いたアネルギー誘

導のメカニズムの解析は、今後の遺伝子治療研究に与える影響は大きい。今回は遺伝子導入していないが分離肝細胞が、一側は除去可能な腎臓の皮膜下に移植できたことは極めて興味深い。患者個人の肝細胞に *ex vivo* で血友病遺伝子を導入し、皮下へ肝細胞を移植する治療に向けた方法の一部が確立された意味は大きい。

E. 結論

これまでの研究により、多くの新知見が得られており成果の学術的意義は高い。技術的にも SIV ベクター及び AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けた一定レベルの成果が得られた。またいくつかの問題点も明らかとなった。今後は、大動物を対象に安全性の確認、長期発現の工夫、免疫反応対策などを検討していく必要がある。臨床応用に進むには解決すべき問題点は多いが、彼方に見えた明かりが確かなものになりつつあるというのが現状である。社会的には血友病遺伝子治療に寄せる期待は極めて大きい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Itoh T, Kitamura N, Nishinarita S, Takano K, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Niwa K, Ono T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of γ Ala-327 to Thr: Formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. Blood in press.
2. Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa

- S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. : Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *J.Thromb. Haemost.* 2:275-280, 2004.
3. Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y.: Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A. *J.Thromb. Haemost.* in press.
 4. Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. : Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther.* 11:253-259, 2004.
 5. Mimuro J, Hamano A, Tanaka T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y.: Hypofibrinogenemia caused by a nonsense mutation in the fibrinogen B β chain gene. *J. Thromb. Haemost.* 1:2356-9,2003.
 6. 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. *J.Gene Med.* in press.
 7. Shigeta 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.* 22:365-373,2003.
 8. Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu 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. *Circ. Res.* 92:865-872, 2003.
 9. Kaminishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y. : Modified bentall operation in a patient with hemophili A. *Jpn. J.Thor Cardiovasc Surg.* 51(2) :68-70 2003.
 10. Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and Ozawa, K.: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol. Biotechnol.* in press.
 11. Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K, Kume, A.: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther.* in press.
 12. Mochizuki, S., Mizukami, H., Kume, A., Muramatsu, S., Takeuchi, K., Matsushita, T., Okada, T., Kobayashi, E., Hoshika, A., Ozawa K.: Adeno-Associated Virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther and Mol Biol.* in press.
 13. Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E, Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K, Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K.,

- Asano, Y., Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Virus Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 Vectors *In Vitro* and *In Vivo*. *Nephron*. in press.
14. Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K. and Saido, T.C.: Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J. Neurosci* 24: 991-998, 2004.
 15. Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol Ther* 8: 895-902, 2003.
 16. Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., and Ozawa, K.: Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res.* 63: 5091-5094, 2003.
 17. Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and Ozawa, K.: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J. Gen. Virol.* 84: 2127-2132, 2003.
 18. Xin, K.Q., Ooki, T., Jounai, N., Mizukami, H., Hamajima, K., Kojima, Y., Ohba, K., Toda, Y., Hirai, S., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV. *J. Gene. Med.* 5: 438-445, 2003.
 19. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Katsura, K., Katayama, Y., and Ozawa, K.: Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci. Lett.* 340: 153-157, 2003.
 20. Lu, Y.-Y., Wang, L.J., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I.: Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci. Res.* 45: 33-40, 2003.
 21. Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, A., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 10: 51-58, 2003.
 22. Yoshioka A., Fukutake K, Takamatsu J, Shirahata A, and the Kogenate Post-Marketing Surveillance Study Group: Clinical Evaluation of a Recombinant Factor VIII Preparation (Kogenate) in Previously Untreated Patients with Hemophilia A. *Int. j. Hematol.* 78: 467-474, 2003
 23. Shibata M, Shima M, Misu H, Okimoto Y, J.C. Giddings and Yoshioka A: Management of haemophilia B inhibitor patients with anaphylactic reactions to FIX concentrates. *Haemophilia* 9: 269-271, 2003
 24. Matsutani T, Sakurai Y, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Shima M, Yoshioka A: Replacemant therapy with plasma-derived factor VIII concentrates induces skew in T-cell receptor usage and

- clonal expansion of CD8+ T-cell in HIV-seronegative hemophilia patients. *Thromb. Haemost.* 90: 279-292, 2003
25. Morimoto Y, Yoshioka A, Shima M, Kirita T: Intraoral Hemostasis Using a Recombinant Activated Factor VII Preparation in a Hemophilia A Patient With Inhibitor. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 61: 1095-1097, 2003
 26. 嶋 緑倫: 第Ⅷ因子インヒビター陽性血友病A 臨床血液44(2):90-101, 2003.
 27. 松本智子、嶋 緑倫: 凝固波形解析と第Ⅷ因子微量測定への応用 血栓止血誌 14(2):122-127, 2003
 28. 嶋 緑倫、田中一郎、河合陽子、辻 肇、中村 伸、森田隆司: 本邦における血液凝固後天性インヒビターの実態: 血栓止血誌 14(2)107-121, 2003
 29. 嶋 緑倫: 血友病インヒビター症例における ITI と国際研究 日児血会誌 17:157-161 2003
 30. Fukuda K, Naka H, Morichika S, Shibata M, Tanaka I, Shima M. and Yoshioka A: Inversion of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. *Int. J. Hematol.* in press.
 31. Park F, Ohashi K, Kay MA. The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Mol Ther.* 8(2):314-23, 2003
 32. Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee SY, Salazar FH, Marion PL, Ohashi K, Meuse L, Kay MA, Casey JL, Sebt SM, Hamilton AD, Glenn JS. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest.* 112(3):407-14, 2003
 33. Ohashi K, Kay MA. Extracellular matrix component co-transplantation prolongs survival of heterotopically transplanted human hepatocytes in mice. *Transplantation proc.* (2004, in press).
 34. 日笠 聡、三間屋純一、新井盛夫、白石 睦、小松京子、吉岡章 ほか: 血友病家庭療法の再評価と保険適応外治療の方向性. 血栓止血誌 2003; 14(2):134-159
 35. 萩原剛、新井盛夫、山中晃、藤田進、高橋一郎、川田和秀、大石毅、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸: 血友病ハイレスポンドーインヒビター保有患者に対する凝固因子製剤によるインヒビターとの中和と持続輸注療法. 血栓止血誌 2003; 14(4):337-344
 36. 日笠 聡、新井盛夫、嶋緑倫、白幡聡、田昇、高松純樹、瀧正志、花房秀次、福武勝幸、三間屋純一、吉岡章: 血友病在宅自己注射療法の基本ガイドライン. 血栓止血誌 2003; 14(4):350-358
 37. 新井盛夫: Inhibitors in Patients with Haemophilia 日本語版刊行にあたって. 2003
 38. Kaneko M, Cuyun-Lira O, Takafuta T, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Ohtsuki K, Ohnishi M, Arai M, Yatomi Y, Ozaki Y: Mechanisms of platelet retention in the collagen-coated bead column. *J. Lab. Clin Med.* 2003; 142:258-267
 39. Nagaizumi K, Inaba H, Amano K, Suzuki M, Arai M, Fukutake K: Five novel and four recurrent point mutations in the antithrombin gene causing venous thrombosis. *Int. J. Hematol.* 2003; 78:79-83
 40. 佐々木昭仁、永泉圭子、稲葉 浩、鈴木隆史、新井盛夫、福武勝幸: 日本人血友病B患者に認められた18種類の遺伝子変異. 血栓止血誌 2004;15 (印刷中)
 41. 新井盛夫、高山朋子、高橋敬: 活性型第Ⅶ因子によるプロトロンビンの活性化. 血栓止血誌 2003; 14(5):436 (抄録)
 42. 高橋敬、新井盛夫、中村伸: クリッグルと凝固因子Ⅶ/Ⅲ組織因子(TF)で再

- 構成したグリセリン処理細胞の線溶・凝固活性. 血栓止血誌 2003; 14(5): 448 (抄録)
43. Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, M., and Kobayashi, E.: Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA. DNA-application to the rat liver. Transplantation. in press.
 44. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. Transplant. Immunol. 11:7-14, 2003
 45. Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatsuji, N. and Shimada, K.: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. J. Gene. Med. 5(11): 921-928, 2003
 46. Sato, Y., Ajiki, T., Inoue, S., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., and Kobayashi, E.: A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: Long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. Transplantation. 15;76(9): 1294-8, 2003.
 47. Nakamura, M., Wang, J., Murakami, T., Ajiki, T., Hakamata, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okamoto, H., Mayumi, M. and Kobayashi, E.: DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. Transplantation 76:1369-75, 2003
 48. Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A. "Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy." J Med Virol. 70(4):497-505, 2003.
 49. Sakuma R, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y. "Inhibitory and enhancing effects of insertion of central polypurine tract sequence on gene expression with vectors derived from human immunodeficiency virus type 1." Biochem Biophys Res Commun. 302(3):489-95, 2003.
 50. 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):1589-94, 2003.

学会発表

1. Mimuro J, Ogata K, 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 adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for haemophilia A gene therapy. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 7, 2003 San Diego, USA
2. Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Ono, F., Kobayashi, E., Muramatsu, S., Madoiwa, S., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, H., Kume, K., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K. Muscle-Mediated Human Factor IX Expression in Cynomolgus Monkey using AAV Vectors. Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. June 5, 2003 Washington, DC, USA
3. Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y : Neonatal injection of human factor VIII induces immune tolerance in murine hemophilia A. The International Society on Thrombosis and Haemostasis. XIX CONGRESS and 49th Annual SSC

- Meeting. 2003.7 Birmingham, UK
4. 三室 淳、水上浩明、小野文子、高野勝弘、窓岩清治、小倉 剛、松下 卓、岡田尚巳、花園豊、久米晃啓、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一。カニクイザルをモデルとした血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討 第 65 回日本血液学会、第 45 回日本臨床血液学会 2003 年 8 月 31 日、大阪。
 5. Takahashi, M., Nagata, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Hasegawa, M., Suemori, M., Nakatani, N., Ikeda, U., Kobayashi, E., Shimada, K.: Efficient Transduction of Primate Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using a Simian Immunodeficiency Virus Vector. The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, March 28-30, 2003. (Circulation Journal 67(Suppl. 1):305, 2003)
 6. 安食孝士、佐藤友紀、木村敦、袴田陽二、金子隆志、高橋将文、村上孝、刈谷裕成、星野雄一、小林英司：移植四肢への新しい非ウイルス性遺伝子導入法の応用。第 22 回日本運動器移植・再生医学研究会、大阪、2003 年 10 月 25 日（抄録集 p32）
 7. 小林英司、井上成一朗、安食孝士、佐藤友紀、武田真一、清水尚、吉野浩之、藤代準、竹野勇一、五十嵐友香、袴田陽二、金子隆志、村上孝、高橋将文：移植臓器への遺伝子導入法とその応用。第 39 回日本移植学会総会、大阪、2003 年 10 月 26-27 日 移植 38:135, 2003
 8. 高橋将文、袴田陽二、武田真一、佐藤友紀、井上成一朗、清水尚、吉野浩之、安食孝士、藤代準、竹野勇一、五十嵐友香、金子隆志、村上孝、高橋利一、上田正次、小林英司：移植・再生研究に有用なレポーター遺伝子トランスジェニックラットの開発。第 39 回日本移植学会総会、大阪、2003 年 10 月 26-27 日 移植 38: 142, 2003
 9. 佐久間龍太、北村義浩、HIV-1 cPPT/CTS の隣接配列のベクター産生に及ぼす影響、日本ウイルス学会、2003 年 10 月

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

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 助教授

窓岩清治 自治医科大学 講師

研究要旨

治療効果が期待できるレベルの第 VIII 因子発現を、マウス骨格筋をターゲットとした AAV1 ベクターを用いた遺伝子導入法により得られ、AAV ベクターを用いた安全性が高い血友病 A 遺伝子治療法の可能性が示された。また、AAV ベクター、SIV ベクターを用い、脂肪組織をターゲットとした血友病 A、血友病 B の遺伝子治療法の可能性、組織特異的プロモーターを用いた血管内皮細胞をターゲットとした血友病 B 遺伝子治療法の可能性も、マウスにおいて示された。カンクイザルをもちいた血友病 B 遺伝子治療の前臨床実験を行い、カンクイザル骨格筋に AAV ベクターによりヒト第 IX 因子遺伝子を発現させ、カンクイザルにおいて治療域に達するヒト第 IX 因子の発現が 100 日にわたりえられたことが確認され、ヒトでの血友病 B 遺伝子治療の可能性が示唆された。さらに、血友病新生仔マウスにおいてヒト第 VIII 因子に対する免疫寛容が誘導され、そのメカニズムが anergy であることが示された。これらの結果は安全な血友病遺伝子治療が可能であることを示唆するとともに、臨床でも遺伝子治療においても問題となるインヒビター対策への手がかりとなるものと考えられる。

A. 研究目的

血友病は、凝固 VIII 因子 (血友病 A)、あるいは凝固 IX 因子 (血友病 B) の欠乏により重篤な出血をきたす遺伝性出血性疾患である。現在施行されている凝固因子製剤輸注による care を中心とした治療では致死的な脳出血などを防ぐことはできないが、欠乏する凝固因子レベルを恒常的に数%に維持でき、脳出血などの致命的な出血を来すことを防ぐことができる次世代の治療法として血友病遺伝子治療が大きな期待を寄せられて

いる。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ベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた安全で効率の良い遺伝子治療法の開発に向けた基礎的検討を進める。安全性が確立している AAV ベクターへ第 VIII 因子遺伝子を搭載するため、第 VIII 因子遺伝子を 2 分割し、活性発現に必要な重鎖をコードする遺伝子領域と軽鎖をコードする遺伝子領域を異なるベクターへ搭載して同一細胞へ遺伝子導入し、細胞内で第 VIII 因子重鎖と軽鎖を会合させる dual vector 法を取

ってきた。本年度は、B domain をコードする遺伝子領域を除いた BDD FVIII cDNA を、短いプロモーターにより発現できるように単一の AAV vector へ搭載し *in vitro*、*in vivo* で第 VIII 因子遺伝子の発現が可能であるかを検討する。治療遺伝子を適切な細胞・臓器に導入することも免疫系との関わりからも重要と考えられるため、組織・細胞特異的プロモーターを用いて治療遺伝子(第 VIII 因子遺伝子、第 IX 因子遺伝子)を発現できるようにした種々のベクターを用いて遺伝子導入発現実験を行い、細胞・組織特異的遺伝子発現を検討する。また、カニクイザルをもちいた血友病 B 遺伝子治療の前臨床実験を継続し、AAV ベクターを用いた高効率長期発現法の検討と、安全性の検討を昨年引き続き更に展開する。遺伝子治療において重要視されつつあるインヒビタ対策としては、血友病 A マウスを利用して、免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

血友病 A、搭載遺伝子サイズに 5kb という制限はあるが、安全の保証された AAV ベクターを旨く利用できないかを検討した。短い“ β actin promotor”を利用して B 鎖を除く第 VIII 因子 cDNA を搭載した AAV 1 ベクターを作製し、マウス骨格筋に注入した。レンチウイルスベクターとしては安全性の高い SIV ベクターへ第 VIII 因子遺伝子を搭載し、マウス皮下脂肪組織に注入した、脂肪細胞における第 VIII 因子の産生と分泌を検討するとともに、マウス組織における第 VIII 因子の発現を免疫蛍光法などにより検討した。

血友病 B、組織特異的プロモーターを用いた第 IX 因子発現：血管内皮細胞、脂肪細胞特異的である PAI-1 プロモーターをもちいて血管内皮細胞、脂肪細胞へのマーカー遺伝子、第 IX 因子遺伝子の導入を試みた。カニクイザルを用いた血友病 B 遺伝子治療の検討：ヒト第 IX 因子をカニクイザル第 IX 因子と識別し、特異的に検出しえるモノクロナル抗体のエピトープ解析と、そのモノクロナル抗体を用いた EIA、免疫組織化学法の確立を行った。また、AAV1 ベクターへヒト第 IX 因子遺伝子を搭載し、カニクイザルの骨格筋に注入しヒト第 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用いて検討した。

インヒビタ対策：第 VIII 因子 KO マウスにヒト第 VIII 因子投与により免疫寛容を誘導し、因子に対する寛容を抗原刺激による脾リンパ球の増殖とサイトカイン産生レベルを観察することで解析した。遺伝子治療への応用を目指して、寛容誘導に至適な抗原量の検討も行った。倫理面への配慮

本研究は、非病原性のベクターを用いており倫理的な問題が生ずることはないと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大動物実験指針規定に沿って行った。カニクイザルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して厚生労働省霊長類共同利用施設で実施行った

C. 研究成果

血友病 A: single vector 法により AAV1 ベクターによりイヌ第 VIII 因子を血友病マウス筋肉で発現させたときには 7-34%の第 VIII 因子活性

の上昇が認められた。Dual vector 法により第 VIII 因子重鎖・軽鎖を血友病 A マウスの骨格筋において発現させたときには短期間 1-3%の因子発現が認められ、方法論的に AAV ベクター利用の可能性が示唆された。第 VIII 因子を搭載した SIV ベクター(SIV FVIII)を培養脂肪細胞へ感染させると、脂肪細胞は 1 週間後より第 VIII 因子を産生し始め、pulse chase 実験から効率よく脂肪細胞から分泌されることが明らかとなった。マウス脂肪細胞へ同ベクターを注入したときには、投与 11 日目に正常 VIII 濃度の 2%に相当する VIII 因子の発現がマウス末梢血液にみいだされたが、ヒト第 VIII 因子に対する抗体が出現したために第 VIII 因子の検出は困難になった。しかし、マウス脂肪組織には導入第 VIII 因子遺伝子の転写産物が RT-PCR 法にて、またヒト第 VIII 因子が免疫蛍光法で検出された。

血友病 B: マウス骨格筋へ AAVICMV Lac Z (CMV promoter により LacZ 遺伝子を発現) 注入したときには、骨格筋内に Lac Z 遺伝子産物の β -galactosidase が X-gal 染色法で検出された。AAVICMVFIX (CMV promoter により第 IX 因子遺伝子を発現) を投与したときには、ヒト第 IX 因子も同様に骨格筋内に免疫組織法で検出された。一方 AAVI CEP Lac Z (PAI-1 promoter により LacZ 遺伝子を発現) をマウス骨格筋に投与したときには、骨格筋には β -galactosidase は認められず、骨格筋周囲の血管内皮細胞に β -galactosidase の発現が認められた。AAVI CEP FIX (PAI-1 promoter により第 IX 因子遺伝子を発現) を投与したときにはヒト第 IX 因子は骨格筋周囲の血管内皮細胞に見いだされ、その発

現は血管内皮細胞のマーカーである PECAM-1 の発現と一致した。また、マウス末梢血液のヒト第 IX 因子を ELISA で測定したところ、AAVICMV FIX を投与したときにはヒト正常 FIX 濃度の約 5%に相当する FIX の発現が認められたが、AAV CEP FIX を投与したときには正常 FIX 濃度の約 10%に相当するヒト FIX の発現が 20 週持続した。マウス脂肪組織へ AAVICMV Lac Z を注入したときには、脂肪細胞に Lac Z 遺伝子産物の β -galactosidase が X-gal 染色で検出されたが、その発現は弱かった。一方 AAVI CEP Lac Z をマウス脂肪組織に投与したときには、脂肪細胞と血管内皮細胞に β -galactosidase の発現が認められた。AAVI CEP FIX を投与したときにはヒト第 IX 因子は脂肪細胞と血管内皮細胞に見いだされた。また、マウス末梢血液のヒト第 IX 因子を ELISA で測定したところ、AAVICMV FIX を投与したときにはヒト正常 FIX 濃度の約 0.2%に相当する FIX の発現が認められ、AAVI CEP FIX を投与したときには正常 FIX 濃度の約 0.4%に相当するヒト FIX の発現が 10 週持続した。

カニクイザルを用いた血友病 B 遺伝子治療の検討: ヒト第 IX 因子に結合するカニクイザル第 IX 因子にはまったく反応せず、両者を識別しうるモノクロナル抗体のエピトープ解析をした結果、第 IX 因子の Ala262 を含むアミノ酸配列がエピトープであることが明らかとなった。カニクイザル第 IX 因子は Asn260 に糖鎖が結合する可能性があるが、この糖鎖はモノクロナル抗体の結合に影響を与えないことも判明した。このモノクロナル抗体を用いた ELISA はカニクイザル血漿中の微量のヒト第

IX 因子（正常濃度の約 0.06%）を検出し、カニクイザル肝臓組織中のカニクイザル第 IX にも全く反応しないことが明らかとなった。カニクイザル骨格筋にヒト第 IX 因子遺伝子搭載 AAV1 ベクター(AAV1CMVFIX)を注入しヒト第 IX 因子の発現を ELISA と免疫組織化学により検討したところ、カニクイザルの骨格筋内にヒト第 IX 因子を検出し、末梢血液中に最高で正常ヒト第 IX 因子濃度の約 9%に相当するヒト第 IX 因子が検出された。ヒト第 IX 因子に対する抗体産生を抑制するため cyclosporin A を 4 週間投与したが抗体産生を抑制できず、ベクター投与後 98 日以後はカニクイザル血液からはヒト第 IX 因子は検出できなくなった。

インヒビタ：新生マウスへの第 VIII 因子製剤を用いた免疫寛容はヒト第 VIII 因子特異的であり、*in vitro* での脾臓リンパ球に対する抗原刺激実験より IL-2 産生はあるものの、IL4、-10、IFN γ の産生がなく、増殖能を有さなかった。また、IL12 の添加により増殖能、サイトカイン産生の回復がみられた。IFN γ 依存性の T 細胞アネルギーに免疫寛容が基づくことが推察された。

D. 考察

Single vector 法、Dual vector 法で AAV ベクターにより骨格筋に第 VIII 因子遺伝子を導入したときには、いずれの方法においても第 VIII 因子活性を血友病 A マウスで発現しえており、方法論的に血友病 A 遺伝子治療における AAV ベクター利用の可能性が示唆された。AAV ベクターは染色体へのインテグレーションがほとんどおこらないことから、安全性が高く非分

裂細胞への遺伝子導入も可能など遺伝子治療へもちいるベクターの適性をそなえており、AAV ベクターによる血友病 A 遺伝子治療の可能性が示されたことの意義は大きいと考えられる。脂肪細胞は終末分化した細胞で活発な分泌能を有し多くの生理活性物質を産生分泌している。導入した第 VIII 因子遺伝子から発現される第 VIII 因子は脂肪細胞から効率良く分泌されていたことから、脂肪細胞をターゲットとした遺伝子導入法は、必要となったときには遺伝子導入脂肪細胞を除去できうるという有用性とあわせ、血友病の遺伝子治療法として可能性を秘めていると思われる。PAI-1 promoter をもちいた血管内皮細胞特異的な遺伝子発現系を AAV1 ベクターへ搭載し、マウスへ骨格筋内に投与し血管内皮細胞で第 IX 因子を発現することができている。CMV promoter をもちいた場合を上回るヒト第 IX 因子発現レベルが 20 週以後も発現が持続したことは、血管内皮細胞で発現された分子が直ちに血流へ分泌されること、血管内皮細胞が活発な分泌機能を持っていることに基づくと思われる。PAI-1 promoter は TGF β 1 刺激などにより発現誘導される性質をもち、出血時には血小板の活性化から TGF β 1 が放出されるため第 FIX 因子の産生が増加することが期待できる。また、脂肪細胞においても同様に特異的に FIX 因子を発現できている。第 IX 因子の発現レベルは筋肉への投与に比較すると低いため、発現レベルを上昇させる必要があると考えられる。カニクイザルへの第 IX 因子遺伝子搭載 AAV1 ベクター投与後の治療レベルの第 IX 因子の発現が得られたことは、骨格筋をターゲットとした AAV1 ベクターに

よる遺伝子導入法の有用性を示唆している。しかし、ヒト第 IX 因子と相同性の高い第 IX 因子を持つカニクイザルにおいて Cyclosporin A 投与にてもヒト第 IX 因子に対する抗体産生を抑制できず長期発現が検討できなかったことは今後の課題である。

ヒト因子と相同性が高いサルを用いたにもかかわらずインヒビタが産生されたことは、インヒビタ予防が遺伝子治療の鍵を握ることを強く示唆するものといえる。その意味で、今回検討した新生仔マウスへのアネルギー誘導のメカニズムの解析は、今後の遺伝子治療研究に与える影響は大きい。

自己評価

1) 達成度について

本研究において、AAV ベクターを血友病 A 遺伝子治療に用いること、また AAV1 ベクターを用いて細胞・組織特異的に遺伝子発現をおこなうという目的は達成できた。また、SIV ベクターではプロモーターを改変出来ていず、今後プロモーターを置換する必要があるが、脂肪細胞において第 VIII 因子、第 IX 因子を発現することも達成できた。カニクイザルにヒト第 IX 因子遺伝子導入を行い、治療域に達するヒト第 IX 因子の発現が約 3 ヶ月にわたりえられたことは、AAV1 ベクターが骨格筋をターゲットとした第 IX 因子遺伝子導入が適切であることが確認でき、当初の目標は達成できた。

2) 研究成果の学術的意義

AAV ベクターは染色体へのインテグレーションはほとんどおこらないことから、安全性が高く非分裂細胞への遺伝子導入も可能など、遺伝子治療へもちいるベクターの適性をそなえて

おり、AAV ベクターによる骨格筋をターゲットとした血友病 A 遺伝子治療の可能性が示されたことの学術的意義は大きいと考えられる。また、脂肪細胞をターゲットとした遺伝子導入法は、遺伝子導入により障害が発生したときには機能不全を残すことなく外科的に遺伝子導入した皮下脂肪組織を除去可能と安全面でも優れ、他にないユニークな遺伝子治療法である。血管内皮細胞は生理的には休止期にあり、AAV1 ベクターによる遺伝子導入でも、長期発現が行いうる。今回はマウスへのベクター直接投与で第 IX 因子の発現をおこなっているが、*ex vivo* において遺伝子導入した血管を移植する方法や、限定した血管に還流法により遺伝子導入する方法をとれば、遺伝子導入した血管を外科的に除去可能と安全面でも配慮できる。米国においては、AAV2 ベクターをもちいた第 IX 因子遺伝子を骨格筋、あるいは肝臓へ導入する臨床治験をおこなっているが、骨格筋では治療域に達する発現レベルが得られず、肝臓への導入では長期発現が得られていない。抗体の出現があったものの治療域に達する第 IX 因子の発現が霊長類で得られたことは、AAV1 ベクターによる骨格筋での第 IX 因子遺伝子導入と発現は適切な戦略と思われ、学問的また医学的意義が大きいと考えられる。

3) 今後の展望

AAV ベクターを用いた血友病 A 遺伝子治療法で高発現、長期発現を目指す。また、細胞、組織特異的な遺伝子発現を血管内皮細胞、脂肪細胞以外の細胞にも応用する。とくに骨髄巨核球での凝固因子発現は血小板内に凝固因子を保存し、その半減期を飛躍的に延ばし、インヒビ

ターからも隔絶されうるという利点があり、確立をめざしたい。

また、*ex vivo* で血管に遺伝子導入し、再度移植する方法や還流法による局所血管への遺伝子導入を検討する。

カニクイザルにおいて導入第 IX 因子の長期発現を検討するため、(1)免疫抑制剤 FK507 と cyclophosphamide の投与下のヒト第 IX 因子発現 (2)Tag 付加したカニクイザル第 IX 因子の発現 (3)モノクロナル抗体で認識しうるカニクイザル第 IX 因子の発現、など 3 実験を計画し実行中である。

血友病 A、B ともインヒビタの問題は最後まで残る可能性が高い。免疫寛容誘導のメカニズムをさらに検討し、インヒビター産生を回避する手段開発にも主眼をおいて取り組み、血友病遺伝子治療の実現を図りたい。

E. 結論

AAV ベクターを用い骨格筋をターゲットとした血友病 A 遺伝子治療法の可能性を示した。細胞・組織特異的な遺伝子導入は遺伝子治療法にとって重要でかつ有用な試みと考えられ、本研究では脂肪細胞・組織、血管内皮細胞をターゲットとした血友病の遺伝子治療法の基礎的検討が行え、有用性を示し得た。カニクイザルを用いた骨格筋をターゲットとした血友病 B 遺伝子治療の検討は、長期発現の問題は残るものの優れた前臨床実験成果と考えられた。免疫寛容誘導機序が解明でき、インヒビタ対策の手がかりが得られた。

F. 研究発表

論文発表

1. Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Itoh T, Kitamura N, Nishinarita S, Takano K, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Niwa K, Ono T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of γ Ala-327 to Thr: Formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. Blood in press.
2. Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. : Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. J.Thromb. Haemost. 2:275-280, 2004.
3. Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y. : Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A. J.Thromb. Haemost in press.
4. Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. : Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. Gene Ther. 11:253-259, 2004.
5. Mimuro J, Hamano A, Tanaka T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y. : Hypofibrinogenemia caused by a nonsense mutation in the fibrinogen B β chain gene. J. Thromb. Haemost. 1:2356-9,2003.
6. 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. J.Gene Med. in press.
7. Shigeta 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. 22:365-373,2003.
8. Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu 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. *Circ. Res.* 92:865-872, 2003.

9. Kaminishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y. : Modified bentall operation in a patient with hemophilia A. *Jpn. J. Thor Cardiovasc Surg.* 51(2) :68-70 2003.

学会発表

1. Mimuro J, Ogata K, 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 adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for haemophilia A gene therapy. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 7, 2003 San Diego, USA
2. Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Ono, F., Kobayashi, E., Muramatsu, S., Madoiwa, S., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, H., Kume, K., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K. Muscle-Mediated Human Factor IX Expression in Cynomolgus Monkey using AAV Vectors. Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. June 5, 2003 Washington, DC, USA
3. Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y : Neonatal injection of human factor VIII induces immune tolerance in murine hemophilia A. The International Society on Thrombosis and Haemostasis. XIX CONGRESS and 49th Annual SSC Meeting. 2003.7 Birmingham, UK
4. 三室 淳, 水上浩明, 小野文子, 高野勝弘, 窓岩清治, 小倉 剛, 松下 卓, 岡田尚巳, 花園豊, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一. カニクイザルをモデルとした血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討 第 65 回日本血液学会、第 45 回日本臨床血液学会 2003 年 8 月 31 日、大阪.

H. 知的所有権の出願

組織特異的な遺伝子導入は出願予定である。

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

研究協力者 水上浩明、小倉剛、松下卓、岡田尚巳、久米晃啓

研究要旨

AAV ベ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 ベ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最適化を行い、得られた条件の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効果がみられた。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、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用してマウス及び霊長類モデルに対する投与を行い、治療法の有効性と安全性につき検証する。

B. 研究方法

・ AAV ベクターに関する基礎研究：AAV ベクターの *in vivo* 投与方法（筋注、門脈内投与）についてはこれまでの検討の結果、骨格筋では CMV プロモーターと 1 型由来のキャプシドを用いることで高い発現が得られていることから、この条件の下で様々な導入遺伝子を用いた際の発現効率を個体レベルで比較検討した。

また、脂肪細胞に対する遺伝子導入法の開発に向けて医薬品添加物である界面活性剤の主なものを入手し、Db/Db マウスを用いて *in vivo* における効果を検討した。更に、免疫学的に寛容と考えられる胎児及び新生児に対する遺伝子導入に関してもマウス個体レベルで検討を行った。

・ 凝固第Ⅷ、第Ⅸ因子遺伝子を搭載した AAV ベクターの開発：基礎実験の結果に基づき骨格筋に好適な CMV プロモーターと 1 型由来のキャプシドを有するベクターを用い、ヒト第Ⅸ因子遺伝子の場合は cDNA をそのまま単一ベクターに、サイズの大きいヒト第Ⅷ因子遺伝子の場合は cDNA を重鎖と軽鎖の二つのベクターに分けて搭載し、発現及び免疫反応につき検討した。

・ 遺伝子導入実験：特に霊長類（サル）においてベクターを筋注投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行った。