

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16年度 総括・分担研究報告書

平成17 (2005) 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 _____ 9
(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 _____ 16
(自治医科大学 小澤敬也、水上浩明)
3. 肝細胞移植による肝臓外肝組織新生 _____ 21
(奈良県立医科大学 吉岡 章)
4. 肝選択的遺伝子導入法の開発とその有用性 _____ 24
(自治医科大学 小林英司)
5. 遺伝子治療用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
作製と応用に関する研究 _____ 28
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 血友病 Bの遺伝子解析に関する研究 _____ 32
(東京医科大学 新井盛夫、天野景裕)
7. 血友病の遺伝子治療用レトロウイルスベクターの開発に関する研究 _____ 35
(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 _____ 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 40

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

血友病遺伝子治療は、care を中心とした現在の補充療法でも防げない不慮の致命的な出血を防ぐための有効な方法であり、補充療法回数を減少させることから経済的意味も大きい。また、欠乏する凝固因子レベルを数%上昇することで治療目的を達成できることから遺伝子治療に適した疾患といえる。本年度は治療の安全性と効率の確保を目的にベクターと標的臓器の絞り込み、プロモーターの検討を中心に展開した。長期及び標的臓器特異性発現などに血友病 A、B ともに一定の成果が得られ、SIV ベクター、及び AAV ベクターを用いた遺伝子治療の臨床応用に一步近づいたといえる。サルを用いた前臨床実験も一步前進した。さらに、細胞療法と遺伝子治療を併用した独創的な血友病遺伝子導入法も promising な結果が得られ、ブレイクスルーへの期待も大きい。同時に取り組んでいるインヒビター（自己抗体）産生に対する免疫寛容誘導法に関して、新生児だけでなく、成人にも誘導する方法の検討が進められ、この点にも一步前進が見られた。

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

自治医科大学臓器置換研究部

教授 小林英司

ディナベック株式会社

取締役社長 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

助手 天野景裕

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、現在は出血時に因子製剤を補充する care 中心の治療が行われている。欠乏する凝固 VIII 因子(FVIII) (血友病 A)、或いは凝固 IX 因子(FIX) (血友病 B) の血中レベルを正常の数%に維持できれば、製剤投与では不可避の不慮の出血を予防できる。この目的に血友病遺伝子治療が大きな

期待を寄せられている。本年度は実用化に向けたベクターと標的臓器の絞り込みと安全性の向上を目指して、主としてマウスを用いて研究を展開する。血友病 A では血友病 A マウスを用いて、日本オリジナルのサル免疫不全ウイルス(SIVagmTYO-1 株)ベクター(SIVV)とアデノ随伴ウイルスベクター(AAVV)を用いた遺伝子治療法の開発をさらに推進する。細胞療法との併用を指向して血小板内での FVIII 発現と、成熟肝細胞の異所性移植法による FVIII 遺伝子導入法の基礎的検討を行う。サルを用いた前臨床研究では因子の長期発現の検討と、安全性のデータの蓄積を図る。具体的にはサルを対象にサル型 FIX 遺伝子を AAVV の AAV1V を利用して筋肉細胞へ、また AAV8V を用いて肝臓へ導入して検討する。さらに、遺伝子治療の成否にも関わるインヒビター対策を血友病マウスへの免疫寛容誘導という観点から検討する。

B.研究方法

ベクターと標的臓器の絞り込み：安全性と長期安定発現、さらにパテントを考慮して、

最終目標としてはベクターは十分な安全性の確認の上で SIVV の利用を考える。ベクター量の確保と応用範囲の拡大を目指して、まず、研究班において当研究のための SIVV の promoter(PM)などの改変許可と生産許可の契約を結び、検討を進めた。同時に発現期間や標的臓器に制限はあるが安全性の確認されている AAVV も並行して検討し、これも積極的に採用する方針で展開した。標的細胞としては、筋肉細胞、脂肪細胞等の終末細胞と血管内皮細胞、及び肝細胞に絞り込み検討した。

まず AAVV の血清型の違いによる臓器特異性の差をユビキタスな PM である CAG や CMV を利用して FIX や LacZ、ルシフェラーゼの発現をマーカーに検討した。さらに PM を臓器特異的に発現する蛋白質のそれに変えて、臓器特異性を高めたり、発現制御の可能性についても検討した。有効な AAVV があれば、機能発現に必要な最小遺伝子：B ドメイン除去 FVIIIcDNA(BDD FVIIIcDNA) (= 4.5 kb) を用いて、搭載可能遺伝子サイズ 5 kb 近傍になるように短い PM を選択し検討した。具体的には 167b の β actin minimum promoter 及び 300b の肝臓特異的 α 1 antitrypsin promoter を利用して AAV1V と AAV8V を作製してマウス脂肪組織、骨格筋、及び肝臓へ投与し、長期 FVIII 発現と安全性を検討した。さらに SIVV の利用を前提に骨髄巨核球、そして血小板への特異的発現を目指して、種々の PM を検討した。異所性移植に関しては、正常マウス成熟肝細胞を血友病 A マウスの腎皮膜下へ移植して検討した。又皮下への肝細胞移植の可能性を aFGF を含有するマイクロスフェアーズを予め埋め込み、血管床を作製してから皮下へ移植する方法の検討を行った。サルを用いた前臨床実験では、長期発現を

阻害するインヒビタ産生を抑制することを目的に免疫原性の低いと思われるサル型 FIX 遺伝子を作製し、その利用を図った。サル血中での発現因子の同定のために、種々のタグ遺伝子の付加や、ヒトの FIX と反応するが、サルの FIX と反応しないモノクロナル抗体のエピトープを明らかにして、この部位をヒト型に変えたキメラサル型第 IX 因子遺伝子を作製し検討した。次に、変異遺伝子を AAV1V を利用して筋肉に、また AAV8V を利用して肝臓に投与して、発現持続性と、肝機能の推移を含めて安全性データを集積することを目指した。

遺伝子治療基礎的技術検討：因子の臓器特異的発現はインヒビタ産生のみならず、germinal transmission の検討などの点でも極めて重要である。マウスを用いて種々の血清型の AAVV にルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、ベクターの投与経路、標的臓器などでどのようにベクターの分布と発現が変化していくかを観察する方法を検討した。SIVV の安全性の向上とエンベロプ改変による標的臓器の拡大と産生効率の改善も検討した。

インヒビタ対策：新生児免疫寛容誘導法と遺伝子治療とのカップリングのための最適条件の検討と、不幸にもインヒビタが産生された症例を想定して、胸腺細胞へ直接 FVIII を提示することによる成熟マウスでの免疫寛容誘導の可能性を検討した。

ヒト遺伝子解析：遺伝子治療に向けて、倫理指針に則り、血友病 B、ついで血友病 A 患者の遺伝子解析を施行する。

【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

AAVVの特異性: AAV1Vを用いてCMVPMとの組み合わせでFIXをマウス新生仔筋肉へ、またPAI-1 PMと組み合わせてadultマウスの血管内皮に発現させた。いずれの場合も300日以上に渡り、血中に治療量のFIXの発現が観察された。それぞれ組織にもそのメッセージが確認された。また、PAI-1PMを利用した例ではPAI-1の産生をアップレギュレーションするTGF- β 投与がFIXの産生を増加させることからPMを利用した発現調節可能性も示唆された。AAV8Vについてはルシフェラーゼの発現系を用いて経時的に観察した結果、投与経路にかかわらず肝臓に発現が移行集積する結果が確認された。このようなAAV8Vのベクターとしての肝臓特異性は肝特異的に発現するPMを組み合わせることでさらに

高まることも確認された。AAV1VとAAV8Vの利用をさらに血友病Aへ展開した。マウス骨格筋で発現させた時にはベクター量依存性に血中FVIII活性の上昇がみられた。活性は4週間持続したが、中和抗体の産生がみられ6週以降漸減した。AAV8Vにより肝臓で発現させた場合も、ベクター量依存性の発現が確認され、この場合は100-700%にも活性値が達した。12週以上インヒビタ産生も見られず活性上昇が持続した。高発現が見られたが肝機能、肝細胞に異常は見られなかった。正常マウス肝細胞を血友病Aマウス腎皮膜下に移植したところ、移植後5週目まで、片側腎では5%のそして両側腎移植モデルではFVIII活性が10%を示し、Tail-cut止血時間も短縮した。皮下へ血管床作製後移植した肝細胞は生着し、肝切除刺激に応答し増殖することも確認できた。

ヒト型FIXを筋肉に発現させ、血中に治療レベルのFIX発現が確認されたサルにおいて、組織においてFIXの転写産物が検出され、2ヶ月後に血中レベルが低下したのは、ヒト型FIXに対する抗体産生が原因であることが確認された。サル型FIX遺伝子にタグを付加したものは、産生蛋白の細胞からの分泌が十分でなく、また凝固活性の比活性も低値であった。ヒト型FIXをサル型と区別出来るモノクロナル抗体のエピトープ相当部位262Thrをヒト型のAlaに変異させたキメラサル型FIXは、凝固活性も見られ、このモノクロナル抗体を利用したELISAで0.1%まで測定できることが確認された。現在サルに投与し経過を観察中である。

技術的検討: 発現ルシフェラーゼの観察により、ベクターの血清型違い、ベクターの投与経路、マウスの週齢、マウスの性差により、経時的な発現を簡便に追跡すること

が可能となった。自己肝細胞移植を目指して、*ex vivo*での肝細胞へ遺伝子導入効率を検討した結果、分離後、短時間のうちに *suspension* 状態で行うことが良いことが明らかとなった。

インヒビタ対策：超高解像度エコーを利用して胸腺内に出血なく十分量の FVIII 投与し、免疫寛容を誘導する方法が確立できた。N 数は少ないが一定の寛容誘導効果は確認できた。

D. 考察

AAVV を利用して遺伝子導入した動物で FIX の 1 年以上の発現が確認された意義は大きい。さらに血友病 A の治療にも AAVV を用いて長期発現を得ることが可能であることが示唆されたことは、ヒト臨床研究への実用化に向けて一歩前進したといえる。また、AAV8V の利用により FVIII の長期高発現が得られたことから、標的臓器として肝臓はとても魅力的ではある。しかし、患者の殆どが HCV(+)であることを考えると、肝臓への影響については安全性という面から十分な検討が必要と考える。また AAVV では染色体に治療遺伝子が組み込まれることが殆どない。従って、論理的には標的臓器は終末細胞よりなる筋肉や、脂肪組織などが長期発現に有利であろう。これらの臓器でさらに数年以上の長期安定発現を得られるかが AAVV を実用化できるか否かの鍵と思われる。この AAVV 応用の論理は血友病 B の遺伝子治療でも同様である。長期発現という点では日本版 SIVV は有利であり、安全性の十分な確認の上でという条件付きでこれを最終目標ベクターとした。今年度、SIVV の PM 部の修飾や基本骨格に関係ない部位の一定の改変を行いうることと、生産を大学で行うための契約が成立した。SIVV の血友病遺伝子治療実用化に向けて

この契約の意義は次の 2 点にある。①大動物を実験対象にするには大量のベクターが必要である。②遺伝子がランダムに組み込まれるために、安全確保にはまず、自殺遺伝子の組み込みや *insulator* の搭載が必要であり、さらに PM を工夫して組織特異性を高める必要がある。現在、自治医科大学での SIVV の生産体制は整いつつある。細胞療法を併用して FVIII の血小板内発現や、成熟肝細胞を利用した異所性移植による血友病遺伝子導入法はブレイクスルーの可能性を秘めている。これらに一定の成果が見られた意味は大きい。我々の確立した新生児免疫寛容誘導法は既に欧米で引用されて利用され始めている。さらに、胸腺細胞への抗原直接提示などの方法を試みている。研究そのものの独創性は高いが特異性の高い免疫寛容誘導法を確立するにはまだ解決すべき問題が多いというのが現状である。

E. 結論

今年度目標としたベクターの絞り込みや PM の検討には一定の成果が見られた。AAVVIV と AAV8V を利用した動物実験でも、血友病 A、B ともに長期治療量発現が可能になり、臨床応用へ一歩近づいたといえる。また AAVV の血友病遺伝子治療への応用可能性も示唆されたといえる。条件付きではあるが最終目標ベクターとして選択した SIVV に関しては契約も整い今後の新展開への期待が膨らむ。ただし既に *care* とはいえ代換え医療の存在する血友病では安全性の確保は限りなく 100%に近くなければならない。そのための基礎検討にはまだかなり時間を要する。血小板や肝細胞を用いた細胞療法と遺伝子治療とを *coupling* させた遺伝子導入治療は独創性の高いものであり、対インヒビタ、及び安全性の面でも優れており今後の展開が期待できる。しかしなが

ら、実用化には安全性のよりいっそうの保証、パテントの問題、社会問題など、乗り越えなければならない壁はまだ高い。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

1. Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y: Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-associated Virus Vectors Carrying the B Domain-Deleted Canine Factor VIII Gene. *Mol Ther*. 2005 in press.
2. Hamano A, Umeda M, Ueno Y, Tanaka S, Mimuro J, Sakata Y: Latex Immunoturbidimetric Assay for Soluble Fibrin Complex. *Clin Chem*. 51:183-188, 2005.
3. Satoh Y, Kita H, Kihira K, Mutoh H, Osawa H, Satoh K, Ido K, Sakata Y, Sugano K: Gastrointestinal angiodysplasia in a patient with type 2 von Willebrand's disease and analysis of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Am J Gastroenterol*. 99(12):2495-8, 2004.
4. Iimura O, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y, Kusano E.: Effect of ureteral obstruction on matrix metalloproteinase-2 in rat renal cortex. *Clin Exp Nephrol*. 8(3)223-9, 2004.
5. Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y: Expression profiles of fibrinolytic components in nasal mucosa. *Histochem Cell Biol*. 122:61-73, 2004.
6. 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*. 103(8):3045-3050, 2004.
7. 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*. 2(5):754-762, 2004.
8. Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, 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*. 6:1049-1060, 2004.
9. Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11: 1772-9, 2004.
10. Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K., Ozawa, K.: Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 25: 729-35, 2004.
11. Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Colosi, P.: The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. *J Gen Virol* 85: 2209-14, 2004.
12. 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* 11: 1081-6, 2004.
13. 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* 8: 9-18, 2004.
14. 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* 27: 7-14, 2004.
15. Toyo-Oka, T., Kawada, T., Nakata, J., Xie, H., Urabe, M., Masui, F., Ebisawa, T., Tezuka, A., Iwasawa, K., Nakajima, T., Uehara, Y., Kumagai, H., Kostin, S., Schaper, J., Nakazawa, M., and Ozawa, K.: Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 7381-7385, 2004.
 16. 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- β peptide in mouse brain. *J. Neurosci.* 24: 991-998, 2004.
 17. Okada, T., Caplen, N.J., Ramsey, W.J., Onodera, M., Shimazaki, K., Nomoto, T., Ajalli, R., Wildner, O., Morris, J., Kume, A., Hamada, H., Blaese, R.M., and Ozawa, K.: In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 6: 288-289, 2004.
 18. 大橋一夫、中島祥介；肝細胞移植による異所性肝組織の作製と再生増殖 *Frontiers in Gastroenterology* 9(4):338-345, 2004.
 19. K. Ohashi, JM. Waugh, MD. Dake, T. Yokoyama, H. Kuge, Y. Nakajima, M. Yamanouchi, H. Naka, A. Yoshioka and MA. Kay; Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver disease (*Hepatology* in press)
 20. 大橋一夫、中島祥介；肝細胞移植の現状と展望：血友病の次世代治療の確立にむけて *血栓止血誌* 15(6):541-546 2004.
 21. Y. Sakurai, M. Shima, I. Tanaka, K. Fukuda, K. Yoshida and A. Yoshioka: Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica* 89(6):696-703, 2004.
 22. S. Kasuda, I. Tanaka, M. Shima, T. Matsumoto, Y. Sakurai, K. Nishiya, AR. Giles and A. Yoshioka: Effectiveness of factor VIII infusions in haemophilia A patients with high responding inhibitors. *Haemophilia* 10:341-346, 2004.
 23. K. Ohashi and MA. Kay: Extracellular matrix component cotransplantation prolongs survival of heterotopically transplanted human hepatocytes in mice. *Transplant Proc.* 36:2469-2470, 2004.
 24. K. Ohashi, MA. Kay, T. Yokoyama, H. Kuge, H. Kanehiro, M. Hisanaga, S. Ko, and Y. Nakajima: Stability and Repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplantation* (in press)
 25. 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 Exp Nephrol* 96: e119-26, 2004.
 26. 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.* 77:997-1003, 2004.
 27. Sato, Y., Endo, H., Ajiki, T., Hakamata, Y., Okada, T., Murakami, T., Kobayashi, E.: Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *BBRC* 319; 1197-1202, 2004.
 28. Takedani H, Mikami N, Kawasaki N, Abe Y, Arai M, Naka H, Yoshioka A: Excision of pseudotumour in a patient with haemophilia A and inhibitor managed with recombinant factor VIIa. *Haemophilia* 2004;10:179-182
 29. Amano K, Fujita S, Tanaka A, Nishida Y, Arai M, Fukutake K. Serious cervical bleeding in hemophilia. *Haemophilia*(2004), 10, (Supple. 3), 68
 30. Suzuki Y, Fukutake K, Amano K, Uchida T, Kagawa K, Nishida Y, Arai M. The assessment of home treatment in long-term prevention of chronic arthropathy in patients with haemophilia. *Haemophilia*(2004), 10, (Supple. 3), 115
 31. 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(2) : 107-113
 32. Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in

- the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J. Virol.* 78(16):8437-8445, 2004.
33. Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, and Kitamura Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy.* 9(6): 929-935, 2004.

学会発表

1. Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata. Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Carrying the B Domain Deleted Canine Factor VIII Gene. 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 6, 2004 San Diego, USA
 2. Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: Anovel method for in vivo gene transfer to adipose tissue using adeno-associated virus(AAV)vectors. The 10th Annual Meeting The Japan Society of Gene Thrapy. 2004.8.5-6, 東京.
 3. 松下卓、三室 淳、石渡 彰、窓岩清治、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也 Hemophilia A Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Dual Vector System: Improved FVIII activity by balanced expression of heavy and light chains of FVIII. 第10回日本遺伝子治療学会年次集会 2004.8.5-6, 東京.
 4. 窓岩清治、山内忠彦、袴田陽二、小林英司、新井盛夫、諏合輝子、三室 淳、坂田洋一 新生児血友病Aマウスに対するヒト第VIII因子の投与はT細胞性アネルギーを誘導する 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
 5. 高野勝弘、三室 淳、水上浩明、石渡彰、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 PAI-1 promoter を用いた血管内皮細胞特異的ヒト第IX因子遺伝子導入と発現 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
 6. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 第VIII因子欠乏マウスへのシングル AAV1 ベクターをもちいた第VIII因子遺伝子導入と発現 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
 7. 水上浩明、三室 淳、小倉 剛、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也: AAV ベクターをもちいた脂肪組織への in vivo 遺伝子導入法の開発 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
 8. Shirohzu, S., Mitomo, K., Tabata, T., Griesenbach, U., Hyde, S., Alton, E., Ueda, Y., and Hasegawa, M. Efficient in vivo transduction of mouse airway epithelial cells by the simian immunodeficiency virus vector pseudotyped with Sendai virus F and HN proteins The American society of gene therapy's 7th annual meeting June 2-6, 2004.
 9. Ueda, Y., Mitomo, K., Shirohzu, H., Tabata, T., Griesenbach, U., Hyde, S., Alton, E., and Hasegawa, M. Efficient transduction of mouse alveolar and bronchiolar cells by pseudotyped simian immunodeficiency virus vector with Sendai virus F and HN protein 第10回日本遺伝子治療学会 8月5-6日、2004年、東京
 10. Amano K, Fujita S, Tanaka A, Nishida Y, Arai M, Fukutake K. Serious cervical bleeding in hemophilia. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 18, 2004 Bangkok, Thailand
 11. Suzuki T, Arai M, Sasaki A, Shu A, Uchida T, Otaki M, Ogata K, Amano K, Nishida Y, Fukutake K. A single-center clinical survey on the treatment of acquired Haemophilia: A series of 14 cases. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 20, 2004 Bangkok, Thailand
 12. Suzuki Y, Fukutake K, Amano K, Uchida T, Kagawa K, Nishida Y, Arai M. The assessment of home treatment in long-term prevention of chronic arthropathy in patients with haemophilia. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 20, 2004 Bangkok, Thailand
- H.知的財産権の出願・登録状況
- (1) 「2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター」
出願番号：特願平 11-175646 (1999/6/22)
登録番号：3526844 (2000/9/28)
存続期限：2020/9/28
状態：登録済み
 - (2) 「ヘマグルニチン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクター」
出願番号：特願 2002-500700 (2000/6/1)

状態：出願公開中

(3)「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞 への遺伝子導入」

出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態：審査請求済み

(4)「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」(D3-A0204)

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態：出願公開中

(5)「SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

(6)「PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

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 因子発現が、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、また、肝臓をターゲットとした AAV8 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。さらに、SIV ベクターを用い、血液幹細胞、脂肪組織をターゲットとした血友病 A の遺伝子治療法の可能性に加え、血小板をターゲットとした遺伝子導入法の可能性も示唆された。組織・臓器特異的遺伝子導入をめざした試みにおいて、PAI-1 プロモーターを用いた血管内皮細胞をターゲットとする血友病 B 遺伝子治療法の可能性が示された。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行い、カニクイザル骨格筋に AAV ベクターにより変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子を発現させ、カニクイザルにおいて導入遺伝子からの第 IX 因子の発現がえられた。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 因子の欠乏 (血友病 A)、あるいは凝固 IX 因子の欠乏 (血友病 B) 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命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、実験動物を対象にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターと、レンチウイルスベクターのなかで、非病原性ウイルス由来で安全性が高い SIV 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。

安全性が高く、導入遺伝子の長期発現も得られるなど、遺伝子治療のためのベクターとしての適性を備えている AAV ベクターは、

搭載遺伝子が ITR、プロモーター、poly A 付加配列も含め約 5kb に制限されるため、第 VIII 因子遺伝子の搭載が困難とされてきた。このため、これまでは第 VIII 因子遺伝子を分割し、異なった AAV ベクターへ搭載する dual vector system を用いてきた。本年度は、単一 AAV ベクターへ第 VIII 因子遺伝子を搭載するため、minimum promoter を用い、改変第 VIII 因子遺伝子 (B domain をコードする遺伝子領域を除いた BDD FVIII cDNA) を 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。また、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、治療遺伝子(第 VIII 因子遺伝子、第 IX 因子遺伝子)を組織・臓器特異的に発現できるようにベクターを構築し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に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ー対策として、血友病 A マウスを利用して、新たな免疫寛容導入法の可能性を検討する。

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、安全の高い AAV ベクターを血友病 A 遺伝子治療に利用できないかを検討した。BDDFVIIIcDNA は 4.4kb あり、AAV ベ

クターへ搭載するためには、塩基長の極短いプロモーターしかもちいることができない。我々は強力な actin プロモーターに着目し、167b の β actin minimum promoter”を利用して B 鎖翻訳領域を除いた第 VIII 因子遺伝子 (BDDFVIII cDNA) を搭載した AAV 1 ベクターを作製し、免疫抑制剤投与下に血友病 A マウス骨格筋に注入し、第 VIII 因子の発現を検討した。また、肝臓への遺伝子導入効率の高い AAV8 ベクターへも同様に第 VIII 因子遺伝子を搭載し、血友病 A マウスへ投与し第 VIII 因子の発現を検討した。さらに、human α 1 Anti-trypsin (HAAT) promoter 下流に第 VIII 因子遺伝子を配置した AAV8 ベクターを作製しマウスへ投与した。第 VIII 因子遺伝子搭載 SIV ベクターにより遺伝子導入した血液幹細胞を移植したマウスにおいて血小板にも第 VIII 因子の発現がえられており、プロモーターの改変を検討した。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 因子遺伝子の導入と発現誘導を試みた。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 因子はカニクイザルに対し免疫原性が高く、ヒト第 IX 因子をカニクイザルに発現させるとヒト第 IX 因子に対して中和抗体 (インヒビター) が産生されるため、免疫原性が低いと考えられる変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子を発現させることとし、内在性カニクイザル第 IX 因子と識別し、特異的に検出しえる変異カニクイザル第 IX

因子遺伝子の作製と、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 ベクターへ変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子を搭載し、カニクイザルの骨格筋に注入し変異カニクイザル第 IX 因子の発現を、検討した。

インヒビタ対策：血友病 A マウス（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。また、新たに、寛容誘導のための遺伝子導入実験も行った。

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骨格筋で発現させたときには、ベクター投与量依存性の第 VIII 因子活性の上昇が認められた。第 VIII 因子活性の上昇はベクター投与後 4 週間持続したが、免疫抑制剤投与中にもかかわらず、中和抗体（インヒビター）が産生されたため 6 週目以後漸減し、血液中には導入第 VIII 因子は検出されなくなった。single vector 法により AAV8 ベクターにより

イヌ第 VIII 因子を血友病マウス肝臓で発現させたときにもベクター投与量依存性の第 VIII 因子活性の上昇が認められた。高ベクター量投与群では第 VIII 因子活性は 100%以上に上昇し、最大 600%以上にも達した。第 VIII 因子活性の上昇は 12 週以上持続し、インヒビターの産生も、ベクター投与後 12 週目まではすべてのマウスに認められなかった。HAAT プロモーターを用いて第 VIII 因子を肝臓特異的に発現させる試みにおいても、 3×10^{11} gc/bocypy 投与において第 VIII 因子活性は約 50%へと上昇し、治療域に達する第 VIII 因子の発現が得られた。それぞれのベクター投与マウスの臓器には、導入第 VIII 因子遺伝子の転写産物が RT-PCR 法にて、また第 VIII 因子が免疫蛍光法で検出された。AAV ベクターの血友病 A 遺伝子治療への利用の可能性が示唆された。

血友病 B:マウス骨格筋へ AAV1 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。AAV1 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。また、AAV CEP FIX を投与したマウスに対し TGFβ1 を投与したときには、FIX の発現が誘導された。

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は、第 IX 因子の Ala262 を含むアミノ酸配列がエピトープである。カニクイザル第 IX 因子の 262 位は Thr であるため、カニクイザル第 IX 因子の 262 位の Thr を Ala に変異させたところ、変異カニクイザル第 IX 因子 (macFIX T262A) はヒト特異的モノクロナル抗体に結合することが分かった。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変異カニクイザル第 IX 因子 (正常濃度の約 0.1%) を検出しえた。カニクイザル骨格筋に変異カニクイザル第 IX 因子 遺伝子搭載 AAV1 ベクター (AAVICMVmacFIXT262A) を注入し変異カニクイザル第 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 1%に相当するヒト第 IX 因子が検出された。

D. 考察

Single vector 法 AAV ベクターにより骨格筋、肝臓に第 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。とくに、

AAV8 ベクターを用いて肝臓へ第 VIII 因子遺伝子を導入したときには、血友病 A マウスにおける第 VIII 因子レベルを完全に正常化し得ており、臨床応用へ期待される。肝臓特異性が高い HAAT プロモーターにても高い第 VIII 因子の発現が得られているため、HAAT プロモーターをもちいた肝臓特異的な第 VIII 因子発現による血友病 A 遺伝子治療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。

SIV を用いた検討では、CMV プロモーターをもちいても血小板において第 VIII 因子の発現が得られている。プロモーターの特異性と遺伝子発現能を検討した結果、GPIb プロモーターが適していることが明らかとなった。現在 GPIb プロモーターにより遺伝子発現が可能なベクターを構築中である。

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。さらに TGFβ1 刺激など

により第 IX 因子の発現が実際に誘導された。出血時には血小板の活性化から TFGβ1 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、このプロモーターの優位性が示唆された。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が、脂肪組織での第 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。強力な脂肪細胞特異的プロモーターの探索を進めており、プロモーターの改変を進める予定である。カニクイザルへのヒト第 IX 因子遺伝子搭載 AAV1 ベクター投与した場合の課題であったヒト第 IX 因子に対する抗体産生の長期発現の検討のために、カニクイザルにおけるカニクイザル第 IX 因子遺伝子導入実験系を確立できたことの意義は大きいと考えられる。今後は、プロモーターの改変、肝臓を含めた遺伝子導入臓器の検討と適切なベクターの選択を検討する。

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 AAV 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している。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が、発現を高めることを検討する必要がある。カニクイザルに変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子導入を行い、変異カニクイザル第 IX 因子の発現が得

られ、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試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、長期発現を目指すとともに、マウスでえられた成果を血友病 A イヌまた、カニクイザルを視野に入れ大動物へ展開する。

脂肪細胞特異的な遺伝子発現系の確立を進める予定である。強力な脂肪細胞特異的プロモーターの探索をすすめており、プロモーターの改変により第 IX 因子とともに第 VIII 因子遺伝子発現可能な短くとも強力な脂肪細胞特異的プロモーターの開発を進める。

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。

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。

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、モノクロナル抗体で認識しうる変異カニクイザル第 IX 因子の発現増強、などの実験を計画し実行中である。

血友病 A, B ともインヒビター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、免疫寛容誘導と遺伝子治療を組み合わせた方法も開発にも取り組み、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、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、インヒビター対策の手がかりが得られた。

F. 研究発表

論文発表

1. Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y: Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-associated Virus Vectors Carrying the B Domain-Deleted Canine Factor VIII Gene. *Mol Ther*. 2005 in press.
2. Hamano A, Umeda M, Ueno Y, Tanaka S, Mimuro J, Sakata Y: Latex Immunoturbidimetric Assay for Soluble Fibrin Complex. *Clin Chem*. 51:183-188, 2005.
3. Satoh Y, Kita H, Kihira K, Mutoh H, Osawa H, Satoh K, Ido K, Sakata Y, Sugano K: Gastrointestinal angiodysplasia in a patient with type 2 von Willebrand's disease and analysis of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Am J Gastroenterol*. 99(12):2495-8, 2004.
4. Iimura O, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y, Kusano E.: Effect of ureteral obstruction on matrix metalloproteinase-2 in rat renal cortex. *Clin Exp Nephrol*. 8(3):223-9, 2004.
5. Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y: Expression

profiles of fibrinolytic components in nasal mucosa. *Histochem Cell Biol.* 122:61-73, 2004.

6. 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.* 103(8):3045-3050, 2004.
7. 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.* 2(5):754-762, 2004.
8. Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, 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.* 6:1049-1060, 2004.

学会発表

1. Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata. Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Carrying the B Domain Deleted Canine Factor VIII Gene. 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 6, 2004 San Diego, USA
2. Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Okada, T., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: A novel method for in vivo gene transfer to adipose tissue using adeno-associated virus(AAV)vectors. The 10th Annual Meeting The Japan Society of Gene Therapy. 2004.8.5-6, Tokyo.
3. 松下卓、三室 淳、石渡 彰、窓岩清治、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也 Hemophilia A Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Dual Vector System: Improved FVIII activity by balanced expression of heavy and light chains of FVIII. 第10回日本遺伝子治療学会年次集会 2004.8.5-6, 東京.
4. 窓岩清治、山内忠彦、袴田陽二、小林英司、新井盛夫、諏合輝子、三室 淳、坂田洋一 新生児血友病 A マウスに対す

るヒト第 VIII 因子の投与は T 細胞性アレルギーを誘導する 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.

5. 高野勝弘、三室 淳、水上浩明、石渡 彰、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 PAI-1 promoter を用いた血管内皮細胞特異的ヒト第 IX 因子遺伝子導入と発現 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
6. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 第 VIII 因子欠乏マウスへのシングル AAV1 ベクターをもちいた第 VIII 因子遺伝子導入と発現 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.
7. 水上浩明、三室 淳、小倉 剛、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也: AAV ベクターをもちいた脂肪組織への in vivo 遺伝子導入法の開発 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9.17-19, 京都.

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：自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

教授 小澤 敬也

講師 水上 浩明

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に有用であるが、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った。また、脂肪への遺伝子導入法につき更に検討を加えたところ、8型を用いた場合には標的とした組織に加えて肝臓においても導入遺伝子の発現が起こっていることが判明した。その他、新生仔マウスに関して至適投与方法・投与条件に関する検討を行い、治療域と考えられる凝固第IX因子の血中濃度を得ることができた。

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基礎的検討を行い、高効率ベクター作製法、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。また、治療用遺伝子として主に第IX因子遺伝子を用い、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：i) AAV ベクターの *in vivo* 投与方法については、これまでの検討の成果をふまえて、様々な構築のベクターを用いて発現効率を比較検討した。ii) 免疫学的に寛容であり、ベクター使用量が少なく済むなどの点で有利と考えられる胎児及び新生児に対する遺

伝子導入法に関しても、マウス個体レベルで検討を行った。iii) 脂肪細胞に対する遺伝子導入法に関しては、より高い効果を期待して新規血清型を用いた検討を行った。更に、脂肪ないしは骨格筋を標的としてベクターを注入した後の発現臓器の分布に関して、イメージング及びベクターゲノム数の解析などの点から検討した。

・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。

（倫理面への配慮）

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

が、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労働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」を遵守して行った。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究： i) AAV ベクターの *in vivo* 投与法についてはこれまでの検討の成果をふまえて、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。骨格筋を標的とした場合には7型由来のキャプシドを用いることで1型を用いた場合と同程度の高い発現が認められた。また、8型由来のベクターを用いることで肝臓における高い発現が認められた。肝臓における発現には性差があり、雌においてより低い傾向が見られた。 ii) 新生仔マウスに対する遺伝子導入法に関しては、8型由来のベクターを静脈内に投与することで、雌においても雄と同等の発現レベルが得られた。 iii) 脂肪細胞に対する遺伝子導入法に関してはヒト第IX因子を搭載する8型由来のベクターを用いたところ、1型由来のベクターを用いた場合を大きく凌駕する血中濃度（健常人の10%レベル）が得られた。しかしながら脂肪組織の摘除などによる検討の結果、発現の主体は遺伝子導入を行った脂肪組織ではなく肝臓であることが判明した。更に、骨格筋を標的として8型のベクターを注入した場合にも肝臓における発現が主体であることが明らかとなった。

・遺伝子導入実験：マウス及び霊長類（サル）においてベクターを筋肉内投与し、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ところ、対象としたサル3頭に関しては、発現は認められたものの、その効果は治療域に達しないものであった。一方、ベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応は検出可能であった。

D. 考察

骨格筋に対する遺伝子導入法に関しては自験例を含めて世界中で様々なノウハウの蓄積が見られ、用いるベクターの血清型及びプロモーターについても条件の最適化が進行している。骨格筋に対しては1型及び7型由来のベクターが有効と考えられ、マウスではそのような結果が認められたが、今年度用いた3頭の霊長類モデルにおいては現在までのところ十分な凝固第IX因子血中濃度が認められていない。この点については未だ結論には至っていないものの、種による特異性、導入遺伝子産物に対する免疫反応による発現の急速な低下などの様々な可能性があり、今後更に検討を行う必要がある。また、肝臓を標的とした場合には8型を用いた場合に高い効果が認められており、マウス以外にも犬などで高い効果が報告されていることから、このアプローチを霊長類で試していくかどうかに関しても更に検討する必要がある。

脂肪組織を標的とする方法では1型を用いた場合には十分な効果が得られなかったため、8型を用いて検討を行った。その結果、治療域に達する凝固第IX因子の血中濃度が得られたが、解析の結果、肝臓における発現が大部分を占めていることが判明した。このことから骨格筋に注入した場

合の発現状況を確認したが、やはり同様の結果であった。これまで8型由来のベクターは骨格筋に注入した場合にも高い効果が期待できるとされていたが、その発現は主に肝臓に起因するものであると考えられた。骨格筋注入後の極めて早期に8型のベクターは骨格筋外に移動しており、肝臓に集積する傾向が見られた。これは8型由来のベクターの肝臓に対する組織特異性が極めて高いことに起因する現象と考えられる。肝臓に親和性の高い他のベクターシステム、例えばアデノウイルスベクターなどにおいても同様の現象が起きている可能性があるが、これまで記載されたものはないようである。いずれにしても特定の臓器組織に対して極端に親和性が高いベクターを使用する場合には発現臓器に関して注意が必要と考えられた。

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、骨格筋を標的として2型 AAV を用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても十分な効果は認められていない。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかりそうである。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いて検討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 ベクター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。これらの技術的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繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

論文発表

1. Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11: 1772-9, 2004.
2. Kikuchi, J., Mimuro, J., Ogata, K., Tabata, T., Ueda, Y., Ishiwata, A., Kimura, K., Takano, K., Madoiwa, S., 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* 6: 1049-60, 2004.
3. Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K., Ichimura, K., Ozawa, K.: Topoisomerase