

- inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 25: 729-35, 2004.
4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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: 275-80, 2004.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.

H. 知的財産権の出願・取得状況

該当なし

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究
肝細胞移植による肝臓外肝組織新生

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

研究要旨；血友病Aの cure という観点から最も確実である肝臓器移植に引き続いて、肝細胞移植による肝臓外肝組織新生について基礎研究を行った。マウス分離肝細胞をラミニンとIV型コラーゲンに富むEHSマトリックスゲルとともにマウスの腎皮膜下に移植することにより、機能的・形態的に本来の肝臓とほぼ同一の小肝組織を作製することができた。また、その小肝組織は肝再生刺激に対しても自己肝と同様に肝再生現象を認めた。血友病Aのモデルマウスを用いた実験においては、腎皮膜下に作製した小肝組織は血流中の第Ⅷ因子活性を上昇させ、血友病Aの治療として効果を認めた。また、腎皮膜下以外の肝組織新生の部位として皮下について検討した。血管ネットワーク構築後、マウス分離肝細胞を移植する二段階法で、マウスの皮下にも小肝組織を作製することができた。

A. 研究目的

血友病Aの cure という観点から、患者が第Ⅷ因子製剤による補充療法に依存するのではなく、自らの生体内で一定の第Ⅷ因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減・脱却を計ることを目的とする。これにより、患者自身のQOLが著明に改善するのみならず、血液製剤由来の既知・未知の感染性病原体伝搬問題の解決や、高価な第Ⅷ因子製剤の使用量の大幅な削減などが期待できる。

これを達成するための方法としては、遺伝子付加による遺伝子治療、生体部分肝臓移植をはじめとした肝臓臓器移植、それに肝細胞移植が考えられる。肝細胞移植については、すでに肝臓移植に替わるあらたな治療法として期待されており、これまでに全世界で70例を超える各種疾患患者への移植が行われ、その有効性が報告されている。肝細胞移植は、ES細胞から肝細胞へ分化誘導を行ったものではなく、成熟肝細胞を利用することによる肝 tissue- engineering を行い、最終的には長期に安定して存在する肝組織の作成と肝臓本来のもつ再生能力を保持した肝臓組織、肝臓臓器新生を目標とする。これにより、血液凝固障害症のみならず肝臓で産生される種々の蛋白質や酵素欠損が原因である代謝疾患など多岐にわたる疾患への応用も可能となる。

肝細胞移植を行うに当たって、移植部位が問題になる。経門脈的に肝臓へ移植する方法と肝臓外へ移植する方法とが考えられるが、それぞれ問題がある。経門脈的に肝臓へ移植する場合、移植可能な細胞数に上限（自己肝臓細胞数の約2%）があり、それを超えると塞栓症を発症する。肝臓外へ移植する場合は、移植細胞の長期生着が困難であるとされている。しかし、肝細胞を肝臓外に長期生着させることが可能となれば、細胞移植により新たな肝組織、肝臓外肝臓器新生も可能と考えられ、このような試みは臓器再生医療の展開において極めて重要なテーマの一つと認識されている。

将来的な新しい血友病治療法の確立を目指して、マウスモデルにおける腎臓被膜下と皮下への肝細胞移植による肝臓臓器新生の検討と、肝細胞移植による血友病治療の試みを行った。特に皮下は、移植肝細胞の生着が最も期待できない場所として考えられてきたが、臨床的にアクセスが容易なこと、侵襲が少ないことなどの理由から検討の余地があると考えられる。

最終的な目標としては、1)自己肝細胞の採取、2)遺伝子導入、3)in vitroでの肝細胞増幅、4)異所性肝細胞移植、5)異所性の肝臓臓器新生というストラテジーを想定している。

B. 研究方法

2. 研究方法

1) 腎被膜下への肝細胞移植

2段階コラゲナーゼ灌流法により成熟マウスから肝細胞を分離し、低速遠心法にて99%以上に精製した後、肝細胞単独群とラミニンとIV型コラーゲンに富むEHSマトリックスゲルを供給した群を検討した。実験に使用した動物は、肝細胞特異的にマーカー蛋白(ヒトアルファ1アンチトリプシン、hAAT)を分泌するマウス(hAAT-トランスジェニックマウス、米国オハイオ州立大より供与)をドナーとして用い、同系野生型マウスをレシピエントとして使用した。移植肝細胞の生着はレシピエントマウスの血中マーカー蛋白(hAAT)の推移および組織学的検討にて評価した。また、腎被膜下に作成した肝組織の再生能力を確かめるために、腎被膜下に肝組織を作成したマウスに自己肝の2/3切除による肝再生刺激を誘導した。

2) 肝細胞移植による血友病治療の試み

第Ⅷ因子ノックアウト(KO)マウスと同系統のマウスから同じ方法で肝細胞を分離し、KOマウスの腎被膜下にEHSマトリックスゲルと共に移植し、経時的に眼窩静脈から採血し、第Ⅷ因子活性を凝固一段法で測定した。

3) 皮下への肝細胞移植

hAAT-トランスジェニックマウスと同系野生型マウスをレシピエントとして、皮下にまず、血管誘導因子としてaFGFを徐放するマイクロスフェアーズを留置し、その10日後にドナーとしてhAAT-TGマウスから採取した肝細胞をEHSマトリックスゲルと共に移植した。移植肝細胞の生着はレシピエントマウスの血中マーカー蛋白の推移にて評価した。

C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

1) マウスを用いた腎被膜下肝細胞移植による肝組織作製

分離肝細胞のみを腎被膜下に(3×10^6 肝細胞/腎)移植すると、移植後2週間という短期間に半数以上が死滅する。この早期細胞死は肝臓以外の部位においては、十分な細胞の接着と進展を示さないことに起因しており、肝細胞接着の際の足場が必要であると判断した。そこで、ラミニンとIV型コラーゲンに富むEHSマトリックスゲルを肝細胞に供給したところ、200日を超えて半永久的に安定して肝

細胞が生着した。 $\alpha 1$ -アンチトリプシンやアルブミンなどの蛋白合成能を保持するのみならず、肝細胞としての特徴ある形態を保ち、血管網と共存しながら索状配列を示すことから、機能的にも構造的にも肝臓に類似した小肝組織の構築に成功した。

肝再生を誘導する実験においては、自己肝の再生が終了する3週間の間に腎被膜下の肝組織も約2.6倍に再生増殖した。再生後も肝組織は疲弊せず、再生した肝組織状態を生体内で維持した。この再生現象は、2度目の肝切除による再度の再生刺激においても同様に観察された。この再生現象は、一部の幹様能力をもつ移植肝細胞によりなされたのではなく、通常の肝再生と同様に、組織を構成する肝細胞ほぼすべてによる細胞増殖によりなされたものと考えられる。

2) 腎被膜下肝組織作製による血友病治療の試み

腎被膜下に肝細胞移植し、肝組織作製を試みたKOマウスの第Ⅷ因子活性レベルは、片側腎への移植モデルでは約5%、両側腎への移植では約10%を示し、観察した移植後5週目までその活性を維持した。また、Tail-cut止血時間も肝細胞移植マウスでは有為な差を持って短縮していた。実際、血友病A患者において5-10%の第Ⅷ因子活性の上昇は、出血症状の著明な改善を示す。よって、血友病治療法として成熟肝細胞移植による肝組織作製の可能性を示したものと考えられる。

3) 皮下への肝細胞移植による肝組織作製

肝細胞単独で皮下に移植した場合50日以内にすべての細胞が死滅してしまう。ラミニンとIV型コラーゲンに富むEHSマトリックスゲルを供給しても生着の改善はみられるものの、長期生存には至らない。この原因は、移植早期における宿主血管系と移植細胞との機能的接続が十分ではないためではないかと考え、あらかじめ皮下において血管ネットワークを構築した後に肝細胞を移植する二段階法を開発した。血中マーカー蛋白の推移で評価する限り、本法により皮下に移植した肝細胞は100日以上長期生着が得られ、小肝組織が作成できたことを確認した。皮下にも安定して存在する肝組織を作成しうることが確認できたことは、今後の研究方向、臨床応用を考えた場合意義は大きい。

E. 結論

肝細胞移植による肝臓外肝組織の作製を目的に、マウス腎被膜下と皮下について実験を行った。腎被膜下肝細胞移植実験において、移植肝細胞が長期生着する方法を確立し、移植肝細胞により構成される小肝組織作製が可能であることを確認した。肝再生刺激実験から、腎被膜下の小肝組織は自己肝の一部として認識されていることを示した。KOマウスを用いた実験から、肝細胞移植による血友病治療の可能性を確認した。皮下においても肝組織作成が可能であった。

F. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：

中宏之、櫻井嘉彦、山内昌樹、田中一郎、嶋緑倫、織順一、松本智子、新谷めぐみ

奈良県立医科大学消化器総合外科学教室：

大橋一夫、久下博之、横山貴司、中島祥介

研究発表

- 1)◎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
- 2)◎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 41:132-140 2005
- 3)◎大橋一夫、中島祥介；肝細胞移植の現況と展望：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
- 4)J.Mimuro, H.Mizukami, F.Ono, F.Madoiwa, K.Terao, A.Yoshioka, K.Ozawa and Y.Sakata: Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. J Thrombo Haemost 2:275-280, 2004
- 5)K.Fukuda, H.Naka, S.Morichika, M.Shibata, I.Tanaka, M.Shima and A.Yoshioka: Inversion of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. Int J Hematol 79:303-306, 2004
- 6)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
- 7)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

- 8)M.Shima: Understanding the hemostatic effects of recombinant factor VIIa by clot waveform analysis. Seminars in Hematology 41(1):125-131, 2004
- 9)NM.Ananyeva, SL.Desmazes, CAE.Hauser, M.Shima, MV.Ovanesov, AV.Khrenov, and EL Saenko: Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives Blood Coagul and Fibrinol 15(2):109- 124, 2004
- 10)K.Ohashi and MA.Kay: Extracellular matrix component cotransplantation prolongs survival of heterotopically transplanted human hepatocytes in mice. Transplant Proc 36:2469-2470 2004
- 11)K.Ohashi, H.Nakai, LB.Couto and MA.Kay: Modified infusion procedures after recombinant adeno-associated virus vector type 2 transduction in the liver. Human Gene Therapy (in press)
- 12)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)

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

肝選択的遺伝子導入法の開発とその有用性

分担研究者：小林 英司 自治医科大学 教授

研究要旨

【目的】 ミニブタへの遺伝子導入実験と成熟マウス胸腺内抗原注入による免疫寛容誘導法の検討を行った。

【方法】 ミニブタにマーカー遺伝子発現を試みた。さらに、成熟血友病マウスにおいて、胸腺内抗原注入により免疫寛容誘導を試みた。

【結果】 カテーテルを使用して、ミニブタ肝臓に亜区域特異的に導入遺伝子発現を認めた。0.1 mlの胸腺内抗原注入により、翌日までに7例中5例の死亡例が見られた。0.05 mlでは、翌日までの死亡例は6例中1例となり、その容量負荷の影響はかなり大きいと思われた。不十分ではあるが、少数の生存例では、阻害抗体の生成の遅延の可能性が示唆された。

【考察】 大動物でも遺伝子導入は可能であった。成熟マウスにおける阻害抗体生成阻止のため、胸腺内抗原投与方法のさらなる適正化及びその結果の検討が必要と考えられる。

A. 研究目的

血友病の遺伝子治療として、欠損凝固因子を遺伝子治療によって補う試みがこれまでなされてきており、我々も種々のウイルスベクターや非ウイルス法を駆使して、遺伝子導入発現実験を行ってきた。今年度はこれまで検討してきたNaked DNAによる肝臓での遺伝子導入法を前臨床を意識してブタで確認した。一方、本来欠損している欠損凝固因子は、その遺伝子治療が成功した場合、宿主にとっては外来の異物蛋白が生じることを意味する。これは、欠損凝固因子を外来性に補充する試みでも同様である。そのため首尾よく欠損凝固因子を発現あるいは補給しえたとしても、その阻害抗体が発現し効果が衰える事態を回避しえない。そこで欠損凝固因子に対する免疫寛容を生じさせることを目的としてノックアウト

マウスを用いて実験を行った。より臨床例を模倣するために、成熟した血友病マウスにおいて、胸腺内抗原注入により免疫寛容誘導が得られるかを基礎検討した。

B. 研究方法

実験 1

ミニブタにおけるNaked DNAによる肝への選択的遺伝子導入法

使用動物：ミニブタを使用した。

バルーン付きカテーテルを肝静脈より挿入しバルーンで流出路を閉鎖した上で静水圧によりEGFP発現プラスミドDNAを肝臓に選択的に導入した。

実験 2 及び 3

使用動物：実験 2 と 3 では成熟第Ⅷ因子欠損マウスを使用した。

既に末梢に現存する第Ⅷ因子反応性のリ

ンパ球を払底させる操作と新たに胸腺より供給される第Ⅷ因子反応性のリンパ球に免疫寛容を誘導する操作の2種を必要と考えそれぞれ実験1と実験2を組んだ。

実験2: ALS(抗リンパ球血清)を使用することにより、Tリンパ球、Bリンパ球を実際に消失させることができるかを、ALS投与後24時間後の血液をフローサイトメーターにより検討した。Tリンパ球は、CD3抗体をそのマーカーとして、Bリンパ球はB220抗体をそのマーカーとして使用した。FSC/SSCのdot plotより白血球のゲートを設定し、その中にしめる当該リンパ球の割合を計算した。

実験3: ALS(抗リンパ球血清)をあらかじめ投与した成熟第Ⅷ因子欠損マウスに対し、0.1 mlあるいは0.05 mlのvolumeで、生理食塩水のみ、あるいは第Ⅷ因子入り生理食塩水を胸腺内に注入し、生存率及び阻害抗体の上昇に対する効果を検討した。胸腺内注入は、上方より胸鎖関節を剥離し、慎重に上胸部を剥離切開した上で、胸骨裏側にある胸腺へと溶液を注入することにより行った。

C. 結果

実験1: カテーテル法により肝臓亜区域に限局してEGFP発現を認めた。

実験2: Tリンパ球、Bリンパ球ともALS(抗リンパ球血清)により大幅な減少が認められたが、その減少はTリンパ球のほうがBリンパ球より大きかった。

1/10量のALSでは、十分な減少効果が得られず、今後の実験では指定通りの量のALSを用いることとした。

表1 ALS投与後24時間の末梢血の 1m^3 中の当該リンパ球数

	生食投与	1/10ALS	ALS
Tリンパ球	2466	1213	84
Bリンパ球	2439	1982	440

実験3: 0.1 mlのvolumeにおける生理食塩水のみ、あるいは第Ⅷ因子入り生理食塩水の胸腺内注入に於いては、生理食塩水、第Ⅷ因子入り生理食塩水の胸腺内投与を併せて7例中6例までが翌日までに死亡した。0.05 mlのvolumeにおける胸腺内注入では、翌日までに死亡したものは6例中1例のみであり、投与Volumeを減少させることにより死亡率の減少が見られた(表2)。生存した0.05 ml投与群で阻害抗体出現まで観察しえたものは、各1匹ずつであったが、その個体において比較すると、第Ⅷ因子入り生理食塩水を投与した個体では阻害抗体の出現が遅れている可能性が示唆された(表3)。

表2 胸腺内投与後の死亡時期
0.1 ml volume 投与群

個体	死亡時期
Saline1	day20
Saline2	day1
Saline3	day1
FactorVIII1	day1
FactorVIII2	day1
FactorVIII3	day0
FactorVIII4	生存

個体	死亡時期
Saline1	生存
Saline2	day1
FactorVIII1	day14
FactorVIII2	day34
FactorVIII3	生存
FactorVIII4	day44

個体	4wks	6wks	8wks	10wks
Saline1	0.0	11.0	493.3	516.6
Factor VIII3	0.5	6.0	76.0	83.8

D. 考察

大動物であるミニブタにおいてカテーテルにより選択的に遺伝子を肝臓に導入することができた。

ALS(抗リンパ球血清)を使用することにより、Tリンパ球、Bリンパ球を実際に大幅に減少させることができた。

さらに胸腺内に第VIII因子の投与を行ったが、その volume が 0.1ml であると、6/7 の翌日までの死亡例が認められたが、0.05 ml とすると、その死亡率は、1/6 までに低下した。その後に感染症等で死亡する個体を除いて、残存する個体 1 匹ずつで阻害抗体の上昇を検討したが、第VIII因子投与個体では、阻害抗体出現が遅れていることが示唆された。

E. 結論

カテーテルを使用しミニブタに選択的に遺伝子を導入することができた。胸腺内第VIII因子投与により、阻害抗体出現の遅延化が起きる可能性が示唆された。より付加の少ない投与方法によりさらなる検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Arai, M., Sugo, T., Mimuro, J. and Sakata, Y.: Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A. J Thromb Haemost 2:754-762, 2004
3. Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K. and Kume, A.: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. Gene

- Therapy 11: 1081-1086, 2004
4. Ogata, Y., Fujishiro, J., Kawana, H., Kobayashi, E.: Adenovirus-mediated gene transfer to the rat heart graft. *Transplantation* 78(9):1408, 2004
 5. 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. and Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 vector in vitro and in vivo. *Nephron Experimental Nephrology* 96(4):119-126, 2004
 6. Fujishiro, J., Kawana, H., Inoue, S., Shimizu, H., Yoshino, H., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Hashizume, K., Kobayashi, E.: Efficiency of adenovirus-mediated gene transduction in heart grafts in rats. *Transplant Proc.* (in press)
 7. Fujishiro, J., Takeda, S., Okada, T., Ogata, Y., Takahashi, M., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kusano, E., Hashizume, K., Kobayashi, E.: Targeting gene transfer to the rat kidney *in vivo* and *ex vivo* using adenovirus vector: transgene expression depends on vector concentration, but not on temperature and contact time in vivo. *Nephrology Dialysis Transplantation*. (in press)
 8. Sato, Y., Ajiki, T., Inoue, S., Yuka, I., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Kobayashi, E.: Gene silencing in rat-liver and limb graft by rapid injection of small interference RNA. *Transplantation* 79(2): 240-243, 2005

2. 学会発表 27件

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

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その応用に関する研究

分担研究者 長谷川 護 ディナベック株式会社取締役社長

研究要旨

レンチウイルスベクターは、分裂期の細胞のみならず分化した非分裂細胞への効率的な遺伝子導入が可能で、かつ治療遺伝子を持続して発現することができる。この特徴を生かして、我々はサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターの血友病遺伝子治療への応用を検討している。このように臨床応用を視野に入れる場合、ベクター構造上の整備が必要であるとともに、その効率的なベクター製造技術の確立が重要になる。今回、ベクター構造整備として、目的に応じたプロモーターや治療遺伝子の置換が容易な構造への改変を行い、ベクター生産方法の改良としては、トランスフェクションによる一過的生産系における生産性の向上、さらにはより多数の患者への臨床応用を考えて、大量生産が可能なパッケージング細胞株を樹立することを試みた。

A. 研究目的

血友病に対して遺伝子治療を行う場合、欠損因子の生産細胞として造血系組織、筋肉および肝臓実質細胞などが考えられているが、これらはすべて非分裂細胞である。すなわち、利用するベクターは非分裂細胞に遺伝子導入できて、治療遺伝子を持続発現する必要がある。レンチウイルスベクターはこの条件を満たしている。そこで、我々が開発している SIV ベクターを血友病遺伝子治療へ応用することを目的として、以下の点の改良をおこなった。(1) 構造整備：標的組織で効率よく発現するプロモーターと治療用遺伝子を容易に置換できるように Gene transfer (GT) ベクターにマルチクロニングサイトを導入する。(2) 生産法の改良：トランスフェクションによる一過的生産系でのベクター生産性を

向上させるとともに、将来的なベクター製造システムとしてのパッケージング細胞株を樹立する。

B. 研究方法

(1) GT ベクターの改変

GT ベクターを用途に応じて使用しやすいように改変した。治療遺伝子を発現するプロモーターとして 2 種類のエレメント (CMV と CAG) を GT ベクターに組み込んだ。また、血友病の治療遺伝子 (第 8 因子あるいは第 9 因子) や、その転写調節エレメント (プロモーターとして CMV や CAG プロモーター以外を使用する場合) を容易に置換できるように、マルチ・クロニングサイトを正方向、あるいは逆方向で挿入した GT ベクターを作製した。

(2) 一過的生産系での生産性向上

薬剤 (Butyrate と Trichostatin A) を添加

しての、生産性向上を試みた。Butyrate および Trichostatin A とともにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として作用し、転写を活性化することによってベクターの生産性を亢進すると考えられている。トランスフェクション後、培地を交換するときに薬剤を添加した。ベクターの生産性は、無添加を対照として 293T への遺伝子導入効率で調べた。

また我々は、ヒト水疱性口内炎ウイルス G 蛋白質 (VSV-G) をエンベロープにしたシュードタイプ化とともに、センダイウイルスエンベロープ蛋白質 (F/HN) でのシュードタイプ化も行っている。その F/HN シュードタイプ SIV の生産系においては、F 蛋白質をトリプシンで開裂し活性化する必要があるため、1% BSA 存在下 (生産時のベクター安定化を目的) で培地にトリプシンを加えて生産していた。しかしながら、動物実験や臨床応用への適用を目的とした場合、BSA の添加は好ましくないため、BSA を除くとともに、ベクター回収後にトリプシン処理を行うというプロトコールの改良を行った。

(3) パッケージング細胞株の樹立

今回、樹立したパッケージング細胞株は VSV-G などのエンベロープ・プラスミドを含まず、パッケージング・プラスミド (PV) のみで作製した細胞株である。PV は機能に関係しない部分を制限酵素で一カ所切断し、DNA を精製後、293T にトランスフェクションした。ハイグロマイシンで選択した各細胞クローンを Gag のプライマーを使用して PCR で選択した。約 50 クローンの性状解析を行い、最終的にクローン No. 2-1-3 と 2-1-21 を得た。パッケージング細胞株の性状はベクター生産力価で評価した。評価用ベクターは、パッケージング細胞株に、GFP 発現用 GT ベクターと VSV-G 発現プラスミドを一過性にトラ

ンスフェクションすることによって生産した。0.45 μm フィルターで濾過したベクター溶液を 293T へ感染し、遺伝子導入効率を GFP 陽性細胞数で算出した。

(倫理面への配慮)

SIV ベクターはアフリカミドリザルから単離された SIVagm TYO-1 株由来であり、宿主に対して病原性はない。また、ヒトにおいても病原性は知られていない。さらに我々はウイルスのパッケージングに必要な遺伝子群と導入用遺伝子、エンベロープ遺伝子を別々のプラスミドに搭載している。また、PV からは LTR、パッケージングシグナルを除き、GT ベクターの LTR は自己不活化 (SIN 化) している。また、PV から Nef, Vif, Vpr, Tat といったエイズウイルスの病原性に関与すると思われる因子を除去したプラスミドも作製・使用している。RT-PCR で調べたところ、ベクター感染細胞からのウイルスができる可能性はほとんどないことがわかっている。この様に実験動物等に与える影響は最小限にとどめる。なお当分担研究では動物等への投与実験は厳選して限定されたものとし、その際には動物愛護の基準に従うものとする。

C. 研究結果

(1) GT ベクターの改変

GT ベクターにマルチ・クローニングサイトを正・逆両方向で挿入した結果、用途別にプロモーターや治療遺伝子を置換しやすくなった。また、治療用遺伝子・第 8 因子の上流に CMV あるいは CAG プロモーターを組み込んだ。

(2) 一過的生産系での生産性向上

一過的生産系での力価を向上させるために薬剤 (Butyrate と Trichostatin A) を用いて検討するとともに、F/HN シュードタ

イブ SIV の生産系において、BSA を除去できる生産方法を検討した。

両薬剤 (Butyrate と Trichostatin A) ともに添加による生産性の向上が見られた (約 2 倍)。また、F/HN シュードタイプベクターに対して、培地回収後にトリプシン処理をおこなうことで BSA の存在しない状態でも生産性を低下することなくベクターを調製できた。処理時間とトリプシン濃度についての精密な条件検討後、生産時に 5 mM Butyrate を使用したときの SIV-EGFP-F/HN ベクターは 10^8 TU/ml の力価で調製することができた。

(3) パッケージング細胞株の樹立

293T 細胞にパッケージング・プラスミドをトランスフェクションしてパッケージング細胞株を樹立した。この細胞株に GT ベクターとエンベロープ・プラスミドをトランスフェクションして、その生産性を評価した。今回樹立したパッケージング細胞株の生産性は 5×10^4 TU/ml だった。

D. 考察

今回の GT ベクターの改変により、治療遺伝子やプロモーターの挿入・置換が容易になり、今後、動物実験によるベクターの性能評価がしやすくなった。

一過的生产系においては、ベクター生産時のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (Butyrate など) の添加は生産性向上に効果があり、利用可能であった。また、F/HN シュードタイプ SIV の生産プロトコルを変更することで、生産時に添加していた BSA を、力価を低下することなく除去できるようになり、異種抗原として免疫系を刺激する可能性がある BSA を除くことで、より不純物の少ない生産方法を確立することができた。以上の改良により精製度の高い治療用ベクターの供給が可能となった。

また、パッケージング細胞株樹立の試みに関しては、現状のレンチウイルスベクターのパッケージング細胞株としては 5×10^4 TU/ml で標準的な生産性であったが、さらに生産力価の高いベクター生産用の細胞株を作製することが実用化に向けて重要である。さらに、エンベロープ・プラスミドもあわせて発現して完全なパッケージング細胞株に仕上げていかなければならない。VSV-G は細胞毒性があることが知られており、細胞株の樹立には VSV-G 発現にはオン・オフ制御が必要であると一般的にいわれている。我々は、より細胞毒性が少なく、かつ広範な感染効率を有するセンダイウイルスの糖蛋白質 F/HN を一過性生産系で使用してきた。パッケージング細胞株の作出においても F/HN を用いれば、独自のパッケージング細胞株を樹立することが可能である。

E. 結論

SIV ベクターを実用的なベクターにするために、すなわち治療遺伝子やプロモーターを置換しやすいように GT ベクターにマルチクロニングサイトを導入した。また、一過的生产系での生産性を向上させた。その結果、遠心濃縮で 10^{10} TU/ml 以上の力価が得られるようになった。さらに、将来的な大量生産にも対応できるように、SIV ベクターの生産細胞を樹立することも重要であり、その前段階として、パッケージング細胞株を作出することを試みた。この細胞株の生産力価は 5×10^4 TU/ml であったことから、さらに生産性の高いパッケージング細胞株を調製する必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takano, K., Hasegawa, M., Ozawa, K. and Sakata, Y. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based ベクター for hemophilia A gene therapy. *Gene Therapy* 11: 253-259. 2004.

2. 学会発表

1) 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 ベクター pseudotyped with Sendai virus F and HN proteins The American society of gene therapy's 7th annual meeting June 2-6, 2004

2) 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 ベクター 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

3) 見供克之、田畑寿晃、上田泰次、Uta Griesenbach、Eric Alton、長谷川護

センダイウイルスの糖タンパク質 F、HN によってシュウドタイプ化したサル免疫不全ウイルスベクターは気道系組織に遺伝子を導入できる 第52回日本ウイルス学会 11月21-23日、2004年、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(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ィルスベクター」

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 B の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 新井 盛夫、天野 景裕 東京医科大学

研究要旨：

27人の日本人血友病B患者末梢白血球よりDNAを抽出し、第IX因子遺伝子解析を行った。PCR法により全エクソンおよびそのイントロン境界領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。27名から21種類（ミスセンス変異13種類、ナンセンス変異5種類、スプライスサイト変異3種類）を検出し、これらはすべて点変異であった。エクソン2のAla28→Pro、エクソン4のGln50→Lys、エクソン7のPro193→Leu、エクソン8のLeu300→Pro、イントロン7のドナースプライス部位でのa→c変異の4例は未報告変異であった。これらは制限酵素切断法及びダイレクトシーケンスによってポリモルフィズムでないことを確認した。1例のインヒビター症例はTrp310(TGG)→Stop(TGA)であった。日本人のF9変異に特有の多様性がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

血友病Bは血液凝固第IX因子（FIX）の質的・量的異常であり、関節出血や筋肉内出血などの反復症状を特徴とする。本症はX染色体性劣性遺伝形式を呈し、本邦では2003年の血液凝固異常症調査で855人の患者の生存が報告がされている。1985年に第IX因子遺伝子（F9）の全塩基配列が決定されて以来、血友病Bにおける遺伝子解析は、生化学的手法の発展と相まって、F9の遺伝子異常に関する多くの知見が蓄積されてきた。また米国では、約10年前から血友病に対する遺伝子治療の研究が本格的に開始されており、新しい治療法の開発に伴い、遺伝子異常を含む患者個々の症例の情報が重要になる。本邦においても遺伝子治療研究は積極的に行われている。そこで、今回我々は、27例の日本人血友病B患者の遺伝子異常を検出することを目的とし、それらの遺伝子型と血漿レベルの表現型との関連について検討した。

B. 研究方法

当科通院中の血友病B患者27人の解析を行った。遺伝子解析にあたりすべての患者及び対照者よりインフォームドコンセントを得た。年齢性別は0歳から64歳の男性であった。

①FIX:C及びFIX:Agの測定

3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。FIX:Cは自動血液凝固能測定装置を用い、APTT試薬とFIX欠乏血漿を用いて凝固一段法で測定した。FIX:Agはポリクロナール抗体を用いたサンドイッチEIA法で測定した。

②遺伝子解析

ゲノムDNAを患者末梢白血球よりフェノール・クロロホルム法で抽出し、F9の8つのエクソンおよびそのイントロン境界領域を、設計した8対のプライマーを用い Polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。それぞれのPCR産物のダイデオキシ法によるダイレクトシーケンスを行った。塩基配列は、Yoshitakeらの報告と比較し、

それぞれの変異を確認した。検出した変異は The Haemophilia B Mutation Database-version 12 にて既存の報告例の有無につき確認を行った。データベースに登録のなかった変異は、制限酵素切断法にて対照者 50 人を用い、その頻度を確認し、変異かポリモルフィズムかの判別をした。制限酵素認識部位に対応のなかった 2 種類の変異は、それぞれ人工的に制限酵素部位を導入するため Mutagenic Primer を作製して PCR を行い、頻度を確認した。

C. 研究結果

①FIX:C 及び FIX:Ag の測定結果と病型

血友病の表現型は、軽症が 4 例、中等症が 6 例、重症が 16 例、検査不能が 1 例であった。抗原を測定できた 18 例のうち、10 例が CRM-positive で、2 例が CRM-reduced 症例であった。また、インヒビターを有していた 1 症例はハイレスポンド(6BU)であり、インヒビター発生前の FIX:C と FIX:Ag はともに 1%未満の重症であった。

②遺伝子解析

解析した 27 名全例から病因と考えられる 21 種類の点変異 (ミスセンス変異 13 種類、ナンセンス変異 5 種類、スプライスサイト変異 3 種類) を検出した。エクソン 2 の Ala28→Pro、エクソン 4 の Gln50→Lys、エクソン 7 の Pro193→Leu、エクソン 8 の Leu300→Pro、イントロン 7 のドナースプライス部位での a→c 変異の 4 例は未報告変異であった。検出した変異の種類は全て点変異であり、欠失や挿入などの遺伝子異常は認められなかった。これらの変異の部位は、FIX 蛋白質の Gla ドメインに 3 種類、EGF 様ドメインに 4 種類、活性化ペプチドに 1 種類、カタリティックドメインに 10 種類と、各ドメインに分散していた。1 例からはナンセンス変異 (116Arg→Stop) とミスセンス変異 (366Gly→Glu) を複合変異として検出した。またインヒビターを保有する 1 例

からはナンセンス変異 (310Trp→Stop) を検出した。未報告の 5 つの変異は制限酵素切断法により、ポリモルフィズムではなく変異であることを確認した。

D. 考察

データベースには、2,511 症例の血友病 B の遺伝子異常が登録されており、それらは 896 種類の遺伝子異常からなり、F9 の変異の多様性が示されている。本研究では 5 種類のナンセンス変異を検出した。一般的にナンセンス変異や挿入・欠失などを有する症例は、成熟蛋白質分子が欠損しているために補充療法で投与された FIX を異物認識し、高率に同種抗体であるインヒビターを発生する可能性がある。本研究の 1 例のインヒビター保有症例もナンセンス変異が検出された。また、今回同定された 5 つの新しい変異のうち 3 種類について考察する。エクソン 2 の Ala28→Pro は、Gla ドメイン内の変異で、患者の FIX:C は 1.0%未満で、FIX:Ag は 39%であり、CRM-positive であった。Ala28 の Pro への置換は、Gla ドメイン高次構造を不安定化させることにより、機能障害をきたすことが推測された。エクソン 4 の Gln50→Lys は、結晶構造解析により、正常な Ca²⁺ 結合能が失われていることが推測された。イントロン 7+3 のドナースプライス部位の変異は、a→c 変異により正常なスプライス機構が障害され、イントロン 7 の開始地点から 374bp 下流にある潜在的スプライス部位が活性化する、または、エクソンスキッピングが起き、異常 mRNA が形成されると考えられた。この患者では FIX:C と FIX:Ag はそれぞれ 12%あることより、一部は正常なスプライシング機構が働いていることを推測させた。

本研究は 27 例という比較的少数検体を用いた解析であるが、21 種類中 5 種類の新しい変異を検出した。このことは、日本人の F9 変異に特有の多様性がある可能性を

示唆させる。

E. 結論

血友病 B 患者の個々の症例において、F9 の遺伝子型を把握することは、ナンセンス変異、欠失、挿入などに起因する重症例における高率なインヒビター出現を考慮し、慎重に補充療法を進めるうえで重要である。また、今後の本邦での遺伝子治療の臨床応用に向け、遺伝子型の把握は基礎データとして不可欠である。

G. 研究発表

論文発表

1. 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
2. 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

学会発表

1. 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
2. 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

3. 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

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

分担研究者 北村義浩 東京大学医科学研究所先端医療研究センター 感染症分野 助教授

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症に対する遺伝子治療に HIV ベクターを用いる場合、すでに感染している HIV とベクターが相互作用して HIV の複製を促進するのではないかとこの状態を模倣するために、プロトタイプ HIV ベクターである HXN ベクターをコードするプラスミド（pHXN）DNA と HIV の感染性クローン（pLAI）DNA をヒト胎児腎細胞 293 に co-transfect して HIV ウイルスの産生量を調べた。pHXN と pLAI が同時に存在すると HIV 産生量は低下した。pHXN に中央部多プリン領域の上流の dZ と呼ぶ領域を挿入したベクター（pHXN-dZ）DNA と pLAI を co-transfect すると HIV の産生量はさらに低下した。中央部多プリン領域の上流の dZ が HIV の RNA 量を低下させることに関わる領域であることが明らかになった。HIV ベクターが野生型 HIV と共存しても必ずしも HIV の増殖を促進するわけではないことが明らかになった。

A. 研究目的

血友病の遺伝子治療に用いるレンチウイルスベクターの開発を行う。導入した遺伝子（本研究では血液凝固第IX因子遺伝子）を発現する細胞が患者の細胞性免疫によって除去されないためには、クラス 1 主要組織適合抗原複合体（MHC-I）分子の発現を低下させる制御技術を付加したレンチウイルスベクターが適当であると考えられる。このためにいくつかのウイルス由来のタンパク質による MHC-I 分子の低下のメカニズムを調べる。

B. 研究方法

MHC-I の発現制御：HIV の Nef 遺伝子または 8 型ヒトヘルペスウイルスの K3 遺伝子をヒト細胞に導入し MHC-I を低下させる能力があるかどうかをしらべる。

（倫理面への配慮）

特記すべきこと無し。

C. 研究結果

K3 タンパク質を発現するセンダイウイルスベクターまたはプラスミドベクター

を使ってヒト培養細胞（HeLa 細胞、CEM 細胞）に K3 タンパク質を発現させたところ MHC-I 分子を低下させた。このとき MHC-I 分子を免疫沈降し抗ユビキチン抗体で免疫プロット法（ウェスタンブロット法）で MHC-I のユビキチン化をみとめた。おそらく、ユビキチン化経路を使って分解されているのではないかと推測された。さらに、K3 の N 末端に存在する RING モチーフの変異体ではユビキチン化が起こらなかった。ユビキチン化には K3 分子の RING モチーフが関わっていることが強く示唆された。

D. 考察

K3 がユビキチンリガーゼとして働いているのかそれともほかのユビキチンリガーゼをリクルートしているのかは明らかで無い。過去の報告に RING を有するタンパク質が E3 ユビキチンリガーゼとして（またはその一部として）働く事例が存在するので、K3 タンパク質も同じようにユビキチンリガーゼとして機能しているのではないかと推測される。この K3 タンパク質の性質を利用して凝固因子を発現さ

せても MHC-I によって抗原提示されることのないステルス型の遺伝子導入ベクターが開発できるかもしれない。

population. J. Virol. 78: 8437-8445, 2004.

E. 結論

8型ヒトヘルペスウイルスのK3タンパク質を用いてMHC-Iを低下させうることをしめした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 発表

(1)原著

1) 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. *in press*, 2004.

2) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, <u>Kobayashi E</u> , Arai M, Sugo T, Mimuro J, <u>Sakata Y</u> .	Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A.	J.Thromb.Haemost	2(5)	754-762	2004
Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, <u>Hasegawa M</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u> .	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
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, <u>Sakata Y</u> .	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
Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., <u>Ozawa, K</u> , Colosi, P.	The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production.	J Gen Virol	85	2209-2214	2004
Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and <u>Ozawa, K</u> .	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., <u>Ozawa, K.</u> , Kume, A.	Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice.	Gene Ther	11	1081-1086	2004
K.Ohashi, JM.Waugh, MD.Dake, T.Yokoyama, H.Kuge, Y.Nakajima, M.Yamanouchi, H.Naka, <u>A.Yoshioka</u> and MA.Kay	Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver disease.	Hepatology		in press	2005
Y.Sakurai, M.Shima, I.Tanaka, K.Fukuda. K.Yoshida and <u>A.Yoshioka.</u>	Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors.	Haematologica	89(6)	696-703	2004
S.Kasuda, I.Tanaka, M.Shima, T.Matsumoto, Y.Sakurai, K.Nishiya, AR.Giles and <u>A.Yoshioka.</u>	Effectiveness of factor VIII infusions in haemophilia A patients with high responding inhibitors.	Haemophilia	10	341-346	2004
Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., <u>Kobayashi, E.</u> , Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., <u>Ozawa, K.</u> , 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 <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> .	Nephron Exp Nephrol	96	e119-126	2004
Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, M., and <u>Kobayashi, E.</u>	Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA DNA-application to the rat liver.	Transplantation	77	997-1003	2004
Takedani H, Mikami N, Kawasaki N, Abe Y, <u>Arai M</u> , Naka H, <u>Yoshioka A.</u>	Excision of pseudotumour in a patient with haemophilia A and inhibitor managed with recombinant factor VIIa.	Haemophilia	10	179-182	2004
佐々木昭仁、永泉圭子、稲葉浩、鈴木隆史、 <u>新井盛夫</u> 、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	15(2)	107-113	2004