

200500684 A

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17年度 総括・分担研究報告書

平成18 (2006) 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	17
	(自治医科大学 小澤敬也、水上浩明)	
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.	肝選択的遺伝子導入法の開発とその有用性	27
	(自治医科大学 小林英司)	
5.	SIVベクターの臨床応用を目指した基本性能データの取得	31
	(ディナベック株式会社 長谷川 護)	
6.	血友病 Bの遺伝子解析と発現実験を用いた分子病理に関する研究	37
	(東京医科大学 天野景裕)	
7.	血友病の遺伝子治療用ウイルスベクターの作製に関する研究	40
	(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	42
IV.	研究成果の刊行物・別刷	44

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

血友病に cure をもたらし、血液製剤使用量を減らせることから社会にも資することの大きい血友病遺伝子治療の基礎的検討と、現在の care 中心の補充療法においても問題となるインヒビタ対策についての研究を展開した。本年度は、基礎研究に加えて臨床研究に向けた具体的取り組みを行った。遺伝子治療においては直接体内臓器に遺伝子を導入する場合は AAV ベクターを、そして肝細胞もしくは幹細胞を取り出し *ex vivo* で遺伝子を導入し、細胞を自己へ再移植する場合には SIV ベクターを利用する方針を確立した。体内投与の臓器特異性を高めるためにプロモータの検討も進め、マウスでは筋肉細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、肝細胞を標的として、血友病 A、B とも治療レベルの血友病因子の長期発現を維持することと一定の安全性は確立できた。サルを用いた実験では、AAV ベクターがサル由来であることから、既存の抗 AAV 抗体のためにベクター機能が阻害されたり、発現したヒト因子にたいする抗体産生のため長期の高レベル因子発現は得られなかった。しかし、問題点が明らかとなり、技術的にも早期に克服できる目安がついた。体外で自己肝細胞に血友病遺伝子を導入し、異所性に移植する方法に技術的に大きな進歩が見られた。また自己血液幹細胞に FVIII を導入し、再移植後プロモータを利用して血小板に特異的に発現させ、血小板を運搬とインヒビタ対策に用いる検討にも予想以上の成果が得られ臨床応用可能性が示唆された。胸腺へ抗原を暴露し成熟マウスに血友病因子に対する免疫寛容誘導する方法は、解析しなければならない問題も多いが興味深い現象が観察されている。

血友病患者解析も順調に進行し、臨床研究に向けた実験レベルの準備は整いつつある。ベクターの patents の問題、人体に投与可能なベクターの精製などは今後の重要課題である。

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

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

代表取締役社長 長谷川 護

東京医科大学臨床検査医学講座

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 X 染色体上に存在する血液凝固第 VIII、(FVIII) 或いは IX 因子 (FIX) 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。現在の治療は出血時に因子製剤を投与する care 中心で、致命的な頭蓋内出血の予防は不可能である。患者のみならず、女性キャリアの精神的負担も極めて大きい。患者の QOL を高めるために、血友病に cure をもたらず遺伝子治療と、care 治療でも問題となるインヒビタ対策を目的に研究を展開した。本年度は、遺伝子治療に関してはこれまでの基礎研究をベースに、臨床研究開始のために必要な技術の確立と、安全性の確認に焦点を絞って検討した。インヒビタ対策は有効な免疫寛容誘導法開発とインヒビ

タを回避しうる遺伝子治療の基礎的検討を行った。

B.研究方法

1 遺伝子治療：細胞への導入効率を考慮するとウイルスベクターの使用が現実的である。ウイルスベクターとしては、これまでの基礎実験の結果から染色体への組み込みが殆ど起こらず、非分裂細胞にも導入可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと、非恒常的遺伝子発現が可能なサルやヒトに病原性の報告のない日本オリジナルのアフリカミドリザル由来サルレンチウイルス(SIVagmTYO-1株) (SIV) ベクターを選択した。安全性を前提に、(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合は AAV ベクター、そして、(II) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、自己体内に再移植する場合には SIV ベクターを用いた。

I.体内直接投与：安全性の検証として、投与ベクターの体内分布を、種々の血清型の AAV にルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、経時的に *in vivo* imaging 装置により発現分布を検討した。AAV ベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があるが、発現効率向上と臓器特異性を高めるために 4.5kb の FVIII 遺伝子においても種々の promoter(PM)を検討した。サルを利用した実験で 97%以上ホモロジーのあるヒト FIX に対して、抗体産生が見られたために、サル型 FIX 遺伝子を作製を試みた。血友病 B サルは存在しないので、発現サル FIX の定量的同定を目的に一部をヒト型に改変した遺伝子を作製し検討した。

II.遺伝子導入自己細胞移植法：

成熟肝細胞を単離し、遺伝子導入後、細胞外マトリックスを同時に使用することで腎皮膜下へ、そして除放性 FGF

を予め埋め込み機能的血管ネットワーク構築した後に皮下に移植する方法を実用化に向けて改良した。具体的には体外で治療レベル血友病因子の発現に必要な量の肝細胞数を確保するために、albumin enhancer PM を持つウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータを肝特異的に発現するトランスジェニックマウスと SCID マウスを交配して得られるマウス(uPA/SCID)の肝臓をマウス、イヌ、及びヒトの移植肝細胞の選択的増殖装置として利用を試みた。増殖後、これに遺伝子を導入して移植し、肝細胞としての性質の保持と、血友病因子の発現レベルを検討した。一方、血小板に血友病第 VIII 因子を特異的に発現させ、止血部位までの運搬、半減期の延長、そしてインヒビタ対策血友病などを目指した。血小板は無核の細胞であるためにこれに直接遺伝子を導入することは不可能である。そこで、血液幹細胞に第 VIII 因子遺伝子を導入し、血小板に選択的に発現させることを試みた。その為の血小板特異的 PM を血小板由来蛋白質の PM から検討し選択した。マウス由来幹細胞に体外で血小板特異的 PM を有する FVIII 遺伝子を SIV ベクターを利用して導入し、血友病マウスに再移植し、血小板への選択的発現と、止血部位での血小板からの放出の有無、及びテールカットによる止血効果などを検討した。SIV ベクターの染色体組み込み部位の解析を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)法とヒトゲノムデータベースを利用して検討した。今回はモデル遺伝子として EGFP を用い、挿入部位に選択圧がかからない実験条件を選択した。

2 インヒビタ対策：上記血小板への FVIII 発現の試み以外に、超高解像度エコーガイ

ド下に成熟血友病 A マウスの胸腺組織へヒト FVIII, 或いは新生児免疫寛容誘導したマウスの脾臓細胞などを注入し、免疫寛容誘導の可能性を検討した。

3. 遺伝子解析

以下の倫理規約に則り血友病患者の遺伝子解析を施行した。新規異常に関しては、発現実験を行い病態との関連を明らかにした。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と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ないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、動物倫理面(動物愛護上の配慮など)を含めて各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚生労働省の倫理指針に従い被験者の人権に十分配慮するとともに、インフォームドコンセントをえる。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日文部科学省・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

1. 遺伝子治療

(I) 体内標的臓器へ直接投与

AAV ベクターにルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、マウス体内へ投与後、ルシフェラーゼ発現により経時的発現分布を観察すると、肝臓特異性の高いと言われる AAV-8 ベクターにおいても、多臓器に分布することが明らかとなった。そこで、PM を利用して臓器特異性を高める工夫を進めた。FVIII に関しては、 α 1anti-trypsin の PM の最短長を利用したところ肝臓特異的に発現が見られ 800%にも及ぶ FVIII の血中レベルが得られた。肝機能に異常は見られず、300日以上発現は持続している。血友病 B については、CMVPM を利用して筋肉細胞へ、そして PAI-1 PM を利用して、血管内皮細胞、脂肪細胞に発現を試みた。筋肉細胞でも 5%レベルの FIX の発現が見られたが、血管内皮細胞では 20 週以上約 10%の発現が持続し、TGF- β 投与で PM 活性の制御も可能であった。サルについては、前年度、AAV1 ベクターを筋肉に投与したサルで血中には 3-5%の因子発現が見られたが、ヒト FIX に対する抗体が産生され 4 週間以上の持続が見られなかった。ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部に対しては抗体産生が見られなかったため、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るように工夫した。AAV8 ベクターを利用して予めマウスで 1000%以上の発現を確認した上でサルに門脈から投与した。残念ながら、サルに既存する AAV8 に対する少量の抗体のため、血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。

(II) 遺伝子導入自己細胞の再移植を利用

分離肝細胞を uPA/SCID マウスに移植した結果、移植肝細胞のみの選択的増殖が確認され、ドナーと同系マウスの腎皮膜下に移植したところ 100 日を超えて安定生着し、小肝組織を形成し得た。イヌ肝細胞も同様

に SCID マウス肝で選択的増殖し、抗イヌアルブミンを用いた免疫染色、及びイヌ FIX レベルから 85%がイヌ由来の肝細胞に置換されたことが確認された。

GFP などを用いた種々の発現実験により血小板特異的 PM として GPIbPM の優位性が確認された。血液幹細胞へ GPIbPM を利用して FVIII を導入した (MOI,30) 細胞を血友病マウスに移植したところ、高率に生着し、巨核球、血小板に殆どの発現が確認された。マウス血液を採取し、アゴニストを加えて、血小板凝集を図ったところ血小板からの FVIII の放出が確認された。また、移植マウスでは尾部切断による出血が制御された。SIV ベクターの組み込み部位の検討では、本年度は反応条件とデータ検索方法の検討を中心に展開したが、幾つか有用な示唆が得られた。又解析数 69 クロノンのうち 43 クロノンがデータベースで同定でき、挿入部位の約 50%はイントロン部であることや基本的に integration は random であることが確認された。

2 インヒビタ：予め抗マウスリンパ球抗体で既存 FVIII 反応性末梢 T 細胞を除去したが、FVIII 抗原の胸腺直接投与では寛容は誘導されなかった。しかし、新生児寛容誘導マウスの脾細胞を注入したマウスでは約 60%に寛容誘導が確認された。その他種々の細胞投与により興味深い結果が得られ、現在解析中である。

3.血友病遺伝子解析は着実に進行中である。血友病患者代表と協議した結果、解析を全国レベルで展開することが合意された。

D.考察

1. (I) AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。しかし、ヒト応用には、日本ではサルでの長期安全性の検討が必要

と考えられる。しかし、AAV ベクターがサル由来であるために抗体価の低いサルの確保や投与に工夫が必要など AAV 利用は容易ではない。現在、AAV8 に対する抗体価の低いサルを選んで、選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液と接しない形でサル肝臓にベクターを投与する為の投与法の検討を始めている。又、予め免疫抑制薬を用いて既存のベクターに対する抗体を減少させる試みも進めている。このように、技術的な問題点が明らかになり、その解決のための方針も確立している。

(II)成熟肝細胞を uPA/SCID マウスで選択的に増殖させたが、イヌでもヒト細胞でも可能なことから、細胞移植治療の有力な武器になることが期待される。この方法では緊急時に除去可能な異所性臓器を標的臓器に選択できるところに最大の利点がある。骨髄巨核球に FVIII を発現させ、血小板に出血部位へ運搬させることは、理に適っており、又半減期も延長 (血小板寿命 7 日間) し、インヒビタが存在しても出血部位で放出されるために殆どインヒビタの影響も受けない優れた方法である。実用化には SIV ベクターの一層の安全性確立と、インシュレータや自殺遺伝子の同時組み込みなどが必要である。

2 インヒビタ対策：

新生児免疫寛容誘導の方法は欧米の色々な施設で種々の形で応用されている。この実験を担当した教室の窓岩が日本人で初めて Bayer の Special Project Hemophilia Award を本年度獲得し、オーストラリアで表彰された。臓器移植での結果を手本にした胸腺への抗原暴露は独創的な仕事ではあるが、胸腺に投与した脾細胞のどの細胞が免疫寛容を誘導したかなど、これから解決すべき課題は多い。

E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマウスレベルでは確立出来た。又それぞれに世界初の仕事もあり、又将来性のある技術も確立できた。しかし、安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗体を持つサルが殆どであるために現時点でめざましい結果が得られていないが、技術的問題点が明らかにされているので、克服は時間の問題と考える。ベクターの特許問題、ヒトに投与可能なベクター作製のためのカンパニーの協力などについては、厚労省他の協力が不可欠であると考えている。インヒビタに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療の確立が今後の課題である。

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. *Thromb Res*. 2005 Dec 18 [Epub ahead of print]
2. Madoiwa S, Someya T, Hironaka M, Kobayashi H, Ohmori T, Mimuro J, Sugiyama Y, Morita T, Nishimura Y, Tarumoto T, Ozawa K, Saito K, Sakata Y. Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. *Thromb Res* 2006 Mar 6 [Epub ahead of print]
3. Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y. Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ib alpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB Journal* in press
4. Ishida T, Kitamura K, Tanaka H, Ichimura K, Mimuro J, Madoiwa S, Sakata Y. Acute sensorineural hearing loss and vertigo in a young adult with congenital plasminogen disorder. *Auris Nasus Larynx*. 2006 Feb 22; [Epub ahead of print]
5. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*. 15; 107(4):1737-8, 2006.
6. Watanabe T, Sakata Y, Matsubara S, Yamagishi T, Nagaike K, Kuwata T, Suzuki M. Changes in plasma levels of hepatocyte growth factor and its associated factors during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. Feb 32(1): 10-4, 2006.
7. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Takano K, Ohmori T, Sakata Y. Severe secondary inefficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: Its correlation to development of renal failure. *Blood*. 107(2)528-534, 2006.
8. Yano Y, Kario K, Fukunaga T, Ohshita T, Himeji D, Yano M, Nakagawa S, Sakata Y, Shimada K. A case of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome caused by transient hypercoagulable state induced by infection. *Hypertens Res*. Jul; 28(7):619-23, 2005.
9. Nagai T, Komatsu N, Sakata Y, Miura Y, Ozawa K. Iron deficiency anemia with marked thrombocytosis complicated by central retinal vein occlusion. *Intern Med*. Oct;44(10):1090-2, 2005.
10. Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y. Protection of plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice from nasal allergy. *J Immunology* 174(12) 8135-8143, 2005.
11. Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., Ozawa, K.:

- Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med (in press)*
12. Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.: Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther (in press)*
 13. Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and Ozawa, K.: A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther (in press)*
 14. Urabe, M., Nakakura, T., Xin, KQ., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, RM., Ozawa, K.: Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80:1874-85, 2006.
 15. Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Saito, T.: Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-21, 2005.
 16. Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. *Hum Gene Ther* 16:1212-8, 2005.
 17. Liu, Y., Okada, T., Sheykhosslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12:725-33, 2005.
 18. Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saido, T. C., Arai, H., Sasaki, H.: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 57:832-42, 2005.
 19. Yokoo, N., Saito, T., Uesugi, M., Kobayashi, N., Xin, KQ., Okuda, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Koshino, T.: Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-70, 2005.
 20. Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Matsushita, T., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 113: 54-8, 2005.
 21. Ko S, Tanaka I, Kanehiro H, Kanokogi H, Ori J, Shima M, Yoshioka A, Giles A, Nakajima Y. Preclinical experiment of auxiliary partial orthotopic liver transplantation as a curative treatment for hemophilia. *Liver Transplantation* 11: 579-584, 2005
 22. Morimoto Y, Yoshioka A, Sugimoto M, Imai Y, Kirita T. Haemostatic management of intraoral bleeding in patients with von Willebrand disease. *Oral Disease* 11, 243-248, 2005
 23. Yoshioka A. Products used to treat hemophilia : recombinant products. In *Textbook of Hemophilia*, Blackwell Publishing: 136-141, 2005
 24. Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Nakajima Y, Yokoyama T, Kuge H, Yamanouchi M, Naka H, Yoshioka A, Kay MA. Liver tissue engineering at extra-hepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41: 132-140, 2005
 25. Ori J, Tanaka I, Kubota Y, Shima M, Matsumoto T, Yoshida K, Sakurai Y, Yoshioka A. Highly conserved antigenic structure of the factor VIII C2 domain in some mammals. *Int J Hematol.* 82:351-6, 2005
 26. 吉岡 章 特集I 第23回日本思春期学会学術集会 教育講演 I 思春期の出血症と血栓症思春期学 23: 11-19, 2005
 27. 西野 正人, 吉岡 章 血友病、von Willebrand 病の診断基準・病型分類・重症度. *内科* 95: 1699-1702, 2005
 28. 福武勝幸、新井盛夫、稲葉浩、花房秀次、三間屋純一、高松純樹、吉岡章、嶋緑倫、白幡聡、藤巻道男、リコネイト(PTPs)研究会. 過去に治療歴のある血友病 A 患者に対する遺伝子組換え型血液凝固第 VIII 因子製剤 (リコネイト)

の市販後の多施設臨床評価 (使用成績調査) 日本血栓止血学会誌 16:650-663, 2005

29. Komiya, K., Sato, Y., Wainai, T., Murayama, M., Yamada, A., Hiruta, N., Seo, N., Yoshino, H., Tanaka, H., Kobayashi, E.: Evaluation of intraoperative infusion solution Using a complete anhepatic model In baby pigs. *Transplant proc* 37:2341-2346, 2005.
30. Miki, A., Narushima, M., Okitsu, T., Takeno, Y., S-Gutierrez, A., Rivas-Carrillo, J.D., N-Alvarez, N., Chan Y., Tanaka, K., Noguchi, H., Matsumoto, S., Kohara, M., Lakey, J.R.T., Kobayashi, E., Tanaka, N., Kobayashi, N.: Maintenance of Mouse Rat, and pig pancreatic islet functions by coculture with human islet-derived fibroblasts. *Cell Transplant* (in press).
31. Murayama, T., Sato, Y., Wainai, T., Sato, A., Seo, N., Yoshinori, H., Kobayashi, E.: Effect of continuous infusion of propofol in its concentration in blood without the liver in pigs. *Transplant Proc* 37:4567-4570, 2005
32. Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S. I., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y. Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther* 12: 203-210, 2005.
33. 小櫃由樹生、岩橋徹、松本晶平、田中信大、天野景裕、石丸新、小泉信達、中野八重美：術直前に心停止を来たした卵円孔陥頓血栓を伴う急性肺血栓塞栓症の一救命例。東京医科大学雑誌 63(3):252-262, 2005
34. 天野景裕、太田祥一：院内 AED 運用システムの実際。救急医学 29(6)638-642, 2005
35. 天野景裕：血液検査 血液凝固因子。Medicina 増刊号 42(12):116-117, 2005
36. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, & Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16: 363-373, 2005
37. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal

phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot.* 58: 65-68, 2005

学会発表

1. 大森 司、高野勝弘、柏倉裕志、石渡彰、新村真則、窓岩清治、諏合輝子、三室 淳、見供克之、長谷川 護、坂田洋一：SIV ベクターと GPIIb/IIIa プロモーターを用いた血小板特異的な *in vivo* 遺伝子導入 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
2. 村松慎一、Metzer Daniel、Chambon Pierre、新村真則、三室 淳、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療を目指した遺伝子発現制御 AAV ベクターの開発 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
3. 柏倉裕志、三室 淳、水上浩明、飯野あずみ、石渡 彰、新村真則、高野勝弘、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療を目指したカニクイザル第 VIII 因子 cDNA クローニング 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
4. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、新村真則、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、岡田尚巳、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：ヒト第 IX 因子特異的抗体に認識される改変型カニクイザル第 IX 因子の血友病 B 遺伝子治療への応用 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
5. 水上浩明、小倉 剛、三室 淳、岡田尚巳、松下 卓、卜部匡史、久米晃浩、坂田洋一、小澤敬也：8 型 AAV ベクターの骨格筋及び脂肪内投与における肝臓指向性 (Transgene expression in liver after intramuscular or intra-adipose tissue injection of AAV8 vectors) 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005 9/17-9/19 横浜
6. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、新村真則、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、岡田尚巳、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療：AAV8 ベクターを用いた血友病マウス肝臓への第 VIII 因子遺伝子導入と発現 (Liver-directed Factor VIII Gene Transfer by AAV8 Vectors for Hemophilia A Gene Therapy) 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005 9/17-9/19 横浜
7. Mimuro J, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Sugo T, Mizukami H, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y: Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Carrying the B Domain Deleted Canine Factor VIII Gene. The xxth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis and 51st Annual SSC Meeting. 6-12 August 2005. Sydney Australia.
8. Katsuyuki Mitomo, Uta Griesenbach,

- Makoto Inoue, Toshiaki Tabata, Yasuji Ueda, Satoshi Fujikawa, Kentaro Washizawa, Lucinda Somerton, Duncan M. Geddes, Eric W.F.W. Alton, and Mamoru Hasegawa New Pseudotyping with Sendai Virus Glycoproteins Realized Very Long-Term Gene Expression in Airway Epithelia by Simian Immunodeficiency Virus Vector. The 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, (05. 10. 30.)October 29–November 1 (Prague, Czech Republic), 2005
9. Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, Mie Ikegami, Satoshi Fujikawa, Kentaro Washizawa, Uta Griesenbach, Eric W.F.W. Alton, and Mamoru Hasegawa Evaluation of EGFP Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN International Union of Microbiological Societies XIII International Congress of Virology July 23–28 (San Francisco, California, USA), 2005
 10. Katsuyuki Mitomo, Toshiaki Tabata, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, Mie Ikegami, Satoshi Fujikawa, Kentaro Washizawa, Uta Griesenbach, Eric W.F.W. Alton, and Mamoru Hasegawa Efficient Transduction and Prolonged Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN The Japan Society of Gene Therapy The 11th Annual Meeting, July 28–30 (Tokyo, Japan), 2005
 11. Amano K, Tsujikawa A, Yamanaka K, Moriya K, Fujita S, Tanaka A, Kagawa K, Fukutake K.: Delayed occurrence of autoimmune thyroid dysfunction for HIV infected Japanese after immune restoration with HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, 2005, Kobe, Japan.
 12. Koh (Shu) A, Suzuki T, Shinozawa K, Inaba H, Tsujikawa A, Amano K, Kokaji T, Arai M, Fukutake K: Four novel missense mutations in Factor IX gene were identified as causes of hemophilia B. 20th International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress. 2005, Sydney, Australia
 13. 内田泰斗、山元泰之、尾形享一、大瀧学、天野景裕、鈴木隆史、香川和彦、西田恭治、福武勝幸：HIV 感染症診断法の判定における問題点と実際。第 52 回日本臨床検査医学会総会・第 45 回日本臨床化学年会連合大会、2005 年、福岡
 14. 辻川昭仁、篠沢圭子、稲葉浩、高明志、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸：日本人血友病 B 患者の遺伝子解析。一第 2 報一。第 28 回日本血栓止血学会学術集会、2005 年、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)
状態：出願中（未公開）(2005/10/28)
- (2) 「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」(D4-A0510)
状態：出願中（未公開）(2005/10/28)

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
大森 司 自治医科大学 助手

研究要旨

長期間安定した治療レベルの第 VIII 因子発現が、AAV ベクターを用いた遺伝子導入法により血友病 A マウスにおいて得られ、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、血液幹細胞への遺伝子導入と血小板をターゲットとした血友病 A の遺伝子治療法の可能性が示唆された。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と優位性が示された。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の肝臓への遺伝子導入によりヒト第 VIII 因子に対する免疫寛容が誘導されることが示された。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。昨年度には、単一 AAV ベクターへ改変第 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* で治療域～正常域レベル以上に達する第 VIII 因子の発現が可能であることを示した。本年度は、これらの結果をふまえ、AAV ベクターをもちいて導入した第 VIII 因子遺伝子の長期発現が可能かを検討する。治療遺伝子を適切な細胞・臓器に導入することは免疫系との関わりからも重要と考えられるため、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組織・細胞特異的プロモーターを用いて構築したベクターにより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 β actin プロモーターに着目し、167b の β actin minimum promoter を利用して第 VIII 因子遺伝子 (BDDFVIII cDNA) を搭載したベクターを作製し血友病 A マウスへ投与し導入第 VIII 因子の長期発現を検討した。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 ベクターを作製し血友病 A マウスへ投与し長期発現を検討した。血小板膜タンパク GPIb 遺伝子プロモーターで第 VIII 因子遺伝子を発現する SIV ベクターを用いて第 VIII 因子遺伝子導入した血液幹細胞を、血友病 A マウス移植し、移植された血友病 A マウス血小板に第 VIII 因子の発現がえられて治療効果が得られるかを検討した。

血友病 B、組織特異的プロモーターを用いた第 IX 因子(FIX)発現：血管内皮細胞である 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、AAV 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と肝臓へ変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子導入と発現を検討した。

インヒビター対策:免疫寛容誘導研究をさらに発展させるため、血友病 A 新生仔マウスの肝臓へのヒト第 VIII 因子遺伝子導入により免疫寛容誘導が行えるかを検討した。

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を行った

C. 研究成果

血友病 A:β-actin プロモーターをもちいて第 VIII 因子遺伝子を発現させる AAV ベクターにより治療レベル以上の導入した第 VIII 因子の一年以上にわたる長期発現が血友病 A マウスにおいて得られた。また、AAV8 ベクターに HAAT プロモーターを組み合わせ、イヌ第 VIII 因子を血友病 A マウス肝臓で特異的に発現させたときにもベクター投与量依存性の第 VIII 因子活性の上昇が得られ、最大約 800%へ達する第 VIII 因子の発現が得られた。第 VIII 因子活性の上昇は 1 年以上持続し、インヒビターの産生は 1 匹において

認められたが、その後インヒビターが消失し免疫寛容状態がえられた。GPIb プロモーターにより第 VIII 因子遺伝子を発現させる SIV ベクターを用いてへ遺伝子導入をおこなった血友病 A マウス血液幹細胞を血友病 A マウスへ移植したところ、血小板特異的第 VIII 因子遺伝子発現が得られた。さらに尾カット後には血友病 A マウスは出血が持続し死亡することに対し、遺伝子導入血液幹細胞を移植した血友病 A マウスでは尾カット後にも正常な止血効果も得られた。

血友病 B: PAI-1 promoter によりヒト第 IX 因子(FIX)遺伝子を発現する AAV ベクター AAV1 CEP FIX 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、ヒト正常 FIX 濃度の約 10%に相当するヒト FIX の発現が 20 週以上持続し、CMV プロモーターにより FIX を発現するコントロールベクターを用いたとき以上の発現が得られた。また、TGFβ1 を投与したときには、FIX の発現が誘導された。さらに LPS では内在性マウス FIX 発現が低下し、コントロールベクター由来の FIX も低下するが AAV1 CEP FIX 投与群では FIX の低下はコントロールベクター投与群に比較し有意に少なく AAV1 CEP FIX ベクターの優位性が示された。

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 (mac FIX 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 (AAV1CMVmacFIXT262A) 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。肝臓特異的な第 IX 因子遺伝子導入と発現を検討するため、HCR HAAT プロモーターで FIX を発現しうる肝臓指向性の高い AAV8 ベクター AAV8 HCRHAAT mac FIX T262A を作製しマウスおよびカニクイザルをもちいて検討した。このベクターはマウスでは 1000% 以上の mac FIX T262A を発現させ得たが、カニクイザルでは中和抗体の存在により低レベルの発現にとどまった。

インヒビター対策: 新生仔マウスの肝臓にヒト第 VIII 因子遺伝子導入をおこなうと、低レベルのヒト第 VIII 因子発現が継続し、その後成熟した後にヒト第 VIII 因子遺伝子導入を行ってもヒト第 VIII 因子に対するインヒビターは産生されず、免疫寛容状態が維持された。

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さらに一年以上の長期発現が得られており、臨床応用へ期待されるものである。肝臓特異性が高い HAAT プロモーターにても高いレベルの第 VIII 因子の長期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。HCR 付加により HAAT プロモーターの発現能力を上昇させたプロモーターは、CAG プロモーターや CAG プロモーターより 10 倍以上強い肝臓での遺伝子発現活性を示しており、このプロモーターを用いたベクターを開発することでベクター投与量を減らすことが可能であると考えられる。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、遺伝子導入した血友病 A マウスの血液幹細胞を移植した血友

病 A マウスにおいて GPIb プロモーターを用いることにより血小板に特異的に第 VIII 因子遺伝子発現がえられ、血液幹細胞を移植した血友病 A マウスの出血症状が改善したことは、血小板への第 VIII 因子遺伝子発現が有効に止血効果をだしえることを示唆している。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ふ利点があり今後の展開が期待できる。

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 週以上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 TGFβ1 が放出されるため第 IX 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。さらに、LPS 投与では内在性マウス FIX レベルが低下するのに対し、CEP プロモーターを用いたときには導入遺伝子由来の FIX レベルの低下が少なく、優位性と考えられた。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。カニクイザルに元々存在する AAV に対する中和抗体は AAV ベクターの遺伝子導入効率に強く影響するため、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。

肝臓への遺伝子導入により第 VIII 因子に対する免疫寛容を誘導しうる可能性が示唆されたことの意義は大きいと考えられる。

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 ベクターを用いて長期間の安定した、また細胞・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することで血小板において第 VIII 因子を発現し止血効果を発揮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。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と改変をすすめており、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を進め、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. *Thromb Res*. 2005 Dec 18 [Epub ahead of print]
2. Madoiwa S, Someya T, Hironaka M, Kobayashi H, Ohmori T, Mimuro J, Sugiyama Y, Morita T, Nishimura Y, Tarumoto T, Ozawa K, Saito K, Sakata Y. Annexin 2 and hemorrhagic disorder in vascular intimal carcinomatosis. *Thromb Res* 2006 Mar 6 [Epub ahead of print]
3. Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y. Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ib alpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB Journal* in press
4. Ishida T, Kitamura K, Tanaka H, Ichimura K, Mimuro J, Madoiwa S, Sakata Y. Acute sensorineural hearing loss and vertigo in a young adult with congenital plasminogen disorder. *Auris Nasus Larynx*. 2006 Feb 22; [Epub ahead of print]
5. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*. 15; 107(4):1737-8, 2006.
6. Watanabe T, Sakata Y, Matsubara S, Yamagishi T, Nagaïke K, Kuwata T, Suzuki M. Changes in plasma levels of hepatocyte growth factor and its associated factors during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. Feb 32(1): 10-4, 2006.
7. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Takano K, Ohmori T, Sakata Y. Severe secondary inefficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: Its correlation to development of renal failure. *Blood*. 107(2):528-534, 2006.
8. Yano Y, Kario K, Fukunaga T, Ohshita T, Himeji D, Yano M, Nakagawa S, Sakata Y, Shimada K. A case of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome caused by transient hypercoagulable state induced by infection. *Hypertens Res*. Jul; 28(7):619-23, 2005.
9. Nagai T, Komatsu N, Sakata Y, Miura Y, Ozawa K. Iron deficiency anemia with marked thrombocytosis complicated by central retinal vein occlusion. *Intern Med*. Oct;44(10):1090-2, 2005.
10. Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y. Protection of plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice from nasal allergy. *J Immunology* 174(12) 8135-8143, 2005.

学会発表

1. 大森 司、高野勝弘、柏倉裕志、石

- 渡 彰、新村真則、窓岩清治、諏合輝子、三室 淳、見供克之、長谷川護、坂田洋一：SIV ベクターと GPIIb α プロモーターを用いた血小板特異的な *in vivo* 遺伝子導入 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
2. 村松慎一、Metzer Daniel、Chambon Pierre、新村真則、三室 淳、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療を目指した遺伝子発現制御 AAV ベクターの開発 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
 3. 柏倉裕志、三室 淳、水上浩明、飯野あずみ、石渡 彰、新村真則、高野勝弘、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療を目指したカニクイザル第 VIII 因子 cDNA クローニング 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
 4. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、新村真則、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、岡田尚巳、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：ヒト第 IX 因子特異的抗体に認識される改変型カニクイザル第 IX 因子の血友病 B 遺伝子治療への応用 第 28 回日本血栓止血学会学術集会 2005 11/23-25 福岡
 5. 水上浩明、小倉 剛、三室 淳、岡田尚巳、松下 卓、卜部匡史、久米晃浩、坂田洋一、小澤敬也：8 型 AAV ベクターの骨格筋及び脂肪内投与における肝臓指向性(Transgene expression in liver after intramuscular or intra-adipose tissue injection of AAV8 vectors) 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005 9/17-9/19 横浜
 6. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野勝弘、柏倉裕志、新村真則、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、岡田尚巳、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：血友病遺伝子治療：AAV8 ベクターを用いた血友病マウス肝臓への第 VIII 因子遺伝子導入と発現(Liver-directed Factor VIII Gene Transfer by AAV8 Vectors for Hemophilia A Gene Therapy) 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会 2005 9/17-9/19 横浜
 7. Mimuro J, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Sugo T, Mizukami H, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y：Phenotype Correction of Hemophilia A Mice with Adeno-Associated Virus(AAV)Vectors Carrying the B Domain Deleted Canine Factor VIII Gene. The xxth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis and 51st Annual SSC Meeting. 6-12 August 2005.Sydney Australia.

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、より高い効果を得るためにキャプシド及びプロモーターの点から検討を行い、一定の結論を得た。また、導入遺伝子の標的組織特異性に関してイメージング法などにより全身的に解析を行った。更には、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して測定系を確立するとともに、遺伝子導入の効果との関係についても解析を加えた。

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。また、主に第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討する。

B. 研究方法

・ AAV ベクターに関する基礎研究： i) AAV ベクターの標準的な *in vivo* 投与方法（筋注、門脈内投与）について、血清型や至適プロモーターなどに関して臨床応用を目指した基礎

実験を行った。ii) 脂肪細胞に対する遺伝子導入法に関して、骨格筋、肝臓に代わる標的組織となりうるかどうかにつき更に検討を行った。また、筋注の際の組織特異性に関しても *in vivo* イメージング装置による全身的な発現解析を行った。iii) 一方、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに個体レベルでの解析を行った。更には血清型によって免疫反応の起こりやすさに違いがあるかどうかにつき検討するため、樹状細胞に対する遺伝子導入効率を比較した。

・ 遺伝子導入動物実験：特に霊長類（サル）において様々な構築の AAV ベクターを骨格筋又は肝臓を標的として投与し、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い、有用性を総合的に判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。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。霊長類医科学研究センターとの共同研究として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」および霊長類医科学研究センター「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。その結果、骨格筋を標的とした場合には 1 型由来のキャプシドを用いた場合に最も高い発現が認められ、7, 8, 9 型を用いた場合がこれに次いだ。但し、8, 9 型由来のベクターを用いた場合には注入した骨格筋の他に肝臓において顕著な発現が認められた。 ii) 脂肪細胞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用いて組織内に注入したところ治療域に達する血中濃度が得られたが、導入遺伝子の発現は主に肝臓で認められており、脂肪組織に特異的に発現させるこ

とは困難であった。一方、1 型由来のベクターを用いた場合には、肝臓における発現は認められなかったものの、投与量を高めても第 IX 因子血中濃度は治療域に達しなかった。 iii) 各血清型のキャプシドに対する抗体価及び中和抗体の力価を測定する系を確立した。また、霊長類医科学研究センターにおける未処置のサルを対象として 1, 8, 9 型に対する抗体陽性率を測定したところ、ELISA 法による陽性個体は多数認められたものの、中和抗体はいずれの血清型に関しても 32 頭中 1 頭のみで陽性であった。なお、ベクター投与後の個体では当該ベクターに対する中和抗体は陽性であった。一方、樹状細胞に対する遺伝子導入効率の比較では、5 型を用いた場合に高い効率が認められた。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して 8 型由来のベクターを門脈内投与した。用いた 2 頭のいずれにおいても、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。発現を阻害する因子としてベクターに対する中和抗体、投与後の導入遺伝子産物に対する免疫反応などを解析したが、いずれも陰性であった。

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。これまでの結果を含めて総括すると、マウスにおいては骨格筋を標的とした場合、1 型由来のベクターが最も有効と考えられ、