

200500694B

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究
(H15-エイズ-009)

平成15年度～17年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 総合(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 ————— 7
(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 ————— 25
(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 ————— 33
(自治医科大学 小林英司)
5. SIVamgベクターの開発と血友病遺伝子治療への応用 ————— 40
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 血友病インヒビター患者の止血治療における活性型第Ⅶ因子製剤の作用機序と
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 ————— 51
(東京医科大学 新井盛夫、天野景裕)
7. 血友病の遺伝子治療に関する研究 ————— 58
(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 ————— 62

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 68

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

血友病患者及びその家族の QOL を高める為に、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。

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。AAV ベクターの臓器特異性に加え、臓器特異的プロモータの利用を図り、マウスでは筋肉細胞、脂肪細胞（世界初）、血管内皮細胞、肝細胞で治療レベルの血友病因子を長期安全に発現する技術がほぼ確立できた。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対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。この方法の最大の利点は、問題時に除去しうる臓器を移植対象に選択できる点にある。さらに、自己幹細胞に体外で血友病遺伝子を導入し、再移植し、特異的プロモータを検討して血小板に発現させ、血小板を運搬と因子の半減期延長、及びインヒビタ対策に利用する試みに期待以上の結果が得られた。SIV ベクターの安全性と産生効率を高める為の検討も順調に進んでいる。

インヒビタ対策では血友病マウスを用いて新生児免疫寛容誘導の方法を確立し、そのメカニズムを明らかにした。胸腺をターゲットにした成熟マウスに免疫寛容誘導することを目指した試みが現在進行中である。

遺伝子治療に向けた血友病患者の遺伝子解析も順調に進みつつある。データベース作成に向けた全国展開が今後の課題である。

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 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、致死的な頭蓋内出血等の予防は不可能である。血中因子レベルを正常の数%に維持できれば不慮の出血を予防できることから、血友病は遺伝子治療の対象疾

患として最適疾患の一つである。成功すれば因子製剤使用量も減らすことが出来、経済的にも社会に資すること大であることから、患者に cure をもたらす遺伝子治療に各方面から大きな期待が寄せられている。本研究では、患者及び患者家族の QOL を高めるために、血友病の遺伝子治療の基礎的技術的検討と、遺伝子治療だけでなく care 治療でも重要な課題であるインヒビタ対策を目的に研究を展開した。

B. 研究方法

A. 遺伝子治療：

効率を考慮すると細胞内遺伝子導入には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、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、恒常的遺伝子発現がえられ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) ベクターを選出した。安全性を目標に、(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) 体外で成熟肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植して導入遺伝子を機能させる場合には SIV ベクターを用いた。

I：体内へ直接投与する場合は、切除可能であることと、発現効率の良いことを標的細胞の選択基準とした。10 種類以上が既に報告されている種々の血清型の AAV の臓器特異性をユビキタスに発現が期待できるプロモータ(PM)を利用して検討した。AAV ベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があり、FVIII 遺伝子は最小で 4.5kb ある。技術的には困難であるが、臓器特異性をさらに高めるために種々の臓器特異的 PM を選択し、

発現臓器を限局する試みを展開した。体内発現分布の解析はルシフェラーゼ遺伝子搭載 AAV を用いて経時的に *in vivo* imaging 装置により検討した。動物実験はまずマウスで検討し、その結果をふまえて大動物で確認する方針で展開した。サルの実験ではまず、ヒト FIX 遺伝子発現を試みた。次に、サル型 FIX 遺伝子の一部をヒト型に改変しサル体内で発現した FIX の定量同定を可能とした“改変サル FIX 遺伝子”の発現を検討した。

II. *ex vivo* で自分の細胞に遺伝子導入し、導入細胞再移植により目的因子を発現させる方法：

1) 成熟肝細胞を単離し、細胞外マトリックスとともに腎皮膜下へ移植、或いは徐放性 FGF の適量を予め皮下へ投与し、機能的血管ネットワークを構築後、皮下に移植する方法を検討した。異所性移植法の利点は、移植後問題が生じたときに速やかに除去できる点にある。移植する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)の肝臓をマウス及びイヌやヒトの移植肝細胞の選択的増殖工場として利用することを試みた。

2) 血小板内に FVIII を発現させ、血小板を止血部位までの運搬に利用する方法は、免疫担当細胞から FVIII が防御されている点と、止血部位で FVIII が放出され局所濃度が上昇し、化学反応論的にインヒビタに阻害されにくいという点で、インヒビタ対策としても優れた方法である。しかし血小板は核を持たないために、これに遺伝子を導入することは不可能である。そこで、マウス由来血液幹細胞に体外で SIV ベクターを利用して FVIII 遺伝子を導入し、血小板に

選択的に FVIII を発現させるための特異的 PM を検討した。最適な PM を搭載した遺伝子を導入した自己血液幹細胞を血友病マウスに再移植し、血小板への持続的選択的発現と止血効果（テールカット法）などを検討した。

SIV ベクターそのものについては第三世代化によるベクター自体の安全性向上と packaging cell の確立などを介した産生向上、及びエンベロープ改変による標的臓器特異性の検討などを進めた。さらに、レンチウイルスベクターとしての random integration の問題についても、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。今回は挿入部位に選択圧がかからない実験条件を選択した。

B. インヒビタ対策：

我々は生下時にヒト FVIII 因子を FVIII ノックアウトマウスに投与して新生児免疫寛容誘導しうることを発見し報告したが、そのメカニズムを寛容誘導された血友病マウスの脾細胞と種々のサイトカインを利用して解析した。さらに成熟マウスでの免疫寛容誘導可能性を超高解像度エコーガイド下に胸腺組織へヒト FVIII, 或いは新生児免疫寛容誘導したマウスの脾臓細胞や種々の細胞を注入し検討した。

C. 患者の遺伝子解析：

臨床研究に向けて血友病患者のコンセン
トを得て遺伝子解析を進めた。新規異常部位については発現実験で病態との関連を検討した。さらに、患者代表とも協議し、解析を全国展開する為の基本方針を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性遺伝子組換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う。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、厚労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

A. (I)直接体内へベクターを導入：マウスにおいては、AAV1 ベクターを用いて、筋肉、脂肪細胞、或いは血管内皮細胞へ、そして AAV8 ベクターで肝臓へ血友病遺伝子を導入し、年余にわたる発現維持が可能になった。経時的発現分布をルシフェラーゼ発現で観察すると、肝特異性が極めて高いと言われる AAV-8 ベクターでも、多臓器分布が明らかとなった。そこで、肝臓特異的 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、 $\alpha 1$ -anti-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、1 年以上発現は持続している。血友

病 B については、CMVPM を利用して筋肉内にそして PAI-1 PM を利用して、血管内皮細胞、脂肪細胞に局所発現を試みた。筋肉内発現により治療レベルの、そして血管内皮細胞では 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。AAV1 ベクターを筋肉に投与したサルでは血中に 3-5% の FIX を得たが、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。そこでサル型の FIX 遺伝子を搭載することを考えた。しかし、遺伝子治療効果をみるには発現蛋白の同定定量が必要になる。ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部に対しては先の実験で抗体産生が見られなかったので、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サル型 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。改変 FIX の長期発現は確認されたが、実験以前からサルに存在した野生型 AAV8 (サル由来のウイルス) に対する小量の中和抗体のため、ベクターが十分に機能せず血中に期待レベルの FIX は得られなかった。

(II) 細胞移植法

1) 成熟肝細胞に遺伝子を導入し、腎皮膜下に移植し、治療レベルの血友病因子を発現させる技術を確認した。肝部分切除刺激により移植細胞の増殖が見られ、異所性移植部位でも肝細胞としての性質を有していることが示された。又、血友病 A マウス腎皮膜下への正常マウス肝細胞移植で片腎のみへの移植でも 5% レベルの FVIII 発現が得られることが明らかとなった。異所性移植には移植細胞の量が治療量の因子発現を得るためにクリティカルである。細胞の *ex vivo* での増殖には困難がつきまとったが、

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、増殖細胞を用いた腎皮膜下移植で安定生着が確認できた。イヌやヒト肝細胞も同様に SCID マウス肝で選択的増殖し、マウス肝細胞の 85% が移植肝細胞に置換されたことからこのシステムが *ex vivo* での細胞増殖工場として使用できることが示唆された。

2) 血小板由来蛋白質の PM を中心に広く PM を検討した結果、GPI b PM が血小板特異性と活性が最も高いことが明らかになった。SIV ベクターを利用して、マウス血液幹細胞へ GPIPM-FVIII を導入し (MOI, 30)、血友病マウスに移植した。移植細胞は高率に生着し、巨核球、血小板に局限して FVIII の発現が見られた。移植マウスの血小板から凝血刺激により FVIII が放出されることが確認され、さらに移植マウスでは尾部切断による出血が非移植血友病マウスに比べ著しく抑制されることが観察された。

SIV ベクターの第三世代化と packaging cell の確立、及び、センダイウイルスの膜蛋白質を利用した新型シェードタイプの作製に成功した。ベクター組み込み部位の解析では、反応条件とデータ検索方法を中心に検討し、幾つか有用な示唆が得られた。又解析数 69 クローンのうち 43 クロー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及び挿入は基本的に random であることが確認された。

B. インヒビタ: 免疫寛容誘導マウスの脾臓リンパ球に対する抗原刺激実験により、寛容はインタフェロン γ 依存性の T 細胞アネルギーに基づくことが明らかとなった。抗マウスリンパ球抗体等も利用して末梢免疫担当細胞も除去したが、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脾細胞の注入

では 60%に寛容誘導が確認された。その他、幾つかの興味深い免疫寛容関連結果が得られ、さらに解析を進めている。

C. 班員の関与する血友病患者の遺伝子解析はかなり進行し、その中で新規異常例も確認された。新規異常例に関しては発現実験により、異常部位が病態に関連していることを明らかにした。全国の血友病患者の遺伝子解析について、血友病患者代表との間で協議し、全国レベルで遺伝子解析を進めることが同意された。

D 考察

10 年遅れの研究開始であり、技術中心で、しかも対外的には異様な競合が存在して、極めて論文にしにくいプロジェクトではある。この 3 年間で、基礎的技術的には欧米と同じレベルに達しており、一部では凌駕している。マウスを用いた遺伝子治療基礎技術に関しては、世界の最先端グループの一つである。

A. (I) AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を安全に長期発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。終末細胞である脂肪細胞を標的臓器に選択したのは世界初で我々のオリジナルである。効率面で改善すべき点は残されているが今後の発展が期待できる。マウスで得られた結果のヒトへの応用には、大動物での長期安全性の検討が必要である。血友病イヌの繁殖が大変なこともあり、血友病ブタ作製の基礎検討も行った。現在では、血友病イヌの繁殖も順調に進行しコロニー化も進んでおり、血友病イヌでの検討も今後進むことが期待されるが、日本で臨床研究に入る前にはサルでの十分な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実験に用いる AAV に対する抗体価の低いサル

個体数の確保はもとより、AAV 利用そのものも容易ではない。選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液との接触を最小限にしてサル肝臓にベクターを投与するなどの投与法検討や、予め副作用の少ない効率よい免疫抑制を施行するなどの工夫が必要であろう。しかし、サル実験においても解決すべき問題点が絞り込まれたので、技術的には克服可能と考える。

(II) 異所性肝細胞移植の技術はほぼ確立した。効率改善のために成熟肝細胞を uPA/SCID マウスで選択的に増殖させたが、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。骨髓巨核球に FVIII を発現させ、血小板に出血部位へ運搬させる方法は、理に適っており、さらに、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止血部位で放出され止血能を有するためにインヒビタ対策としても極めて独創的な方法と考えている。実用化には SIV ベクターの安全性確立と、インシュレータや自殺遺伝子の同時組み込みなどによる random integration 対策が必要である。

B. インヒビタ対策：新生児 FVIII 免疫寛容誘導法(JTH,2004)が、欧米の色々な研究施設で種々の形で応用されている。又、担当した教室の窓岩が日本人で初めて Bayer の Special Project Hemophilia Award を獲得し、表彰された。高解像度超音波機器を利用した外部からの胸腺への抗原、或いは細胞導入は、臓器移植寛容誘導の試みを参考にしている。結果については複雑であり、胸腺に投与したどの細胞が免疫寛容を誘導しうるかなど、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、及び体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法のいずれも長期治療レベル因子の発現がマウスレベルでは確立出来た。しかし、長期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多いために現時点でめざましい結果が得られていないが、克服は時間の問題と考える。臨床研究にすぐ進めるわけではない。しかし、解決すべき問題点が明らかにされてきたので、極めて近いところにきていると確信している。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法の確立が今後の課題である。

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)

総合(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

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治療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と有効性が示された。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 ベクターによりヒト第 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ヒト第 IX 因子の発現が確認され、その血液濃度は治療レベルに達した。しかし、高いアミノ酸配列の相同性にもかかわらず、ヒト第 IX 因子は異種タンパクとして認識され抗体が産生されたためヒト第 IX 因子の長期発現は得られなかった。この問題を解決するために、カニクイザルにおいても検出可能な変異カニクイザル第 IX 因子を発現しえる AAV ベクターをカニクイザルへ投与したところ、導入遺伝子からの変異第 IX 因子の長期発現がえられた。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。さらに、制御性 T 細胞移植による寛容誘導の可能性も示された。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に大きな期待を寄せられている。血友病 A については、ベクター直接投与による遺伝子導入法には、基本的にはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いる。一方細胞移植を応用した遺伝子治療法では、恒常的な遺伝子発現が期待できる、SIV ベクター（レンチウイルスベクター）を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、実験動物を用いて進める。血友病 B の遺伝子治療では先行研究の結果をふまえ、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おこない、AAV ベクターを用いた高効率長期発現法の検討と、安全性の検討を展開する。

治療遺伝子を適切な細胞・臓器に導入することも免疫系との関わりからも重要と考えられるため、組織・細胞特異的プロモーターを用い、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、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、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: 遺伝子治療の検討をヒトへ展開するためには、小動物で有効性のある遺伝子導

入法の検討を定量的に行ったのちに大動物、非ヒト霊長類による有効性と安全性の検討へと進めることとした。

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。第 VIII 因子遺伝子を分割してベクターに投与する Dual vector system と、必要な遺伝子部分のみを用いた single vector system を検討した。BDDFVIIIcDNA は 4.4kb あり、single vector system で 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用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 B 鎖翻訳領域を除いた第 VIII 因子遺伝子 (BDDFVIII cDNA)を搭載した AAV1 ベクターを作製し、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 $\alpha 1$ 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肝臓特異的な遺伝子発現を検討した。

SIV ベクターを用いた第 VIII 因子遺伝子を導入では、第 VIII 因子遺伝子を導入したヒト血液幹細胞の NOD-SCID マウスへの移植とヒト第 VIII 因子の発現を検討した。さらに、血小板特異的発現を可能とする SIV ベクターにより第 VIII 因子遺伝子を導入した血液幹細胞を移植した血友病 A マウスにお

いて血小板に第 VIII 因子の発現がえられ治療効果発揮できるかを検討した。切除可能な遺伝子導入細胞として脂肪細胞を選択しえるかを、SIV ベクターAAV ベクターを用いて検討した。CMV プロモーターの下流に第 VIII 因子遺伝子を搭載した SIV ベクターをマウス皮下脂肪組織に注入し、脂肪細胞における第 VIII 因子の産生と分泌を検討するとともに、マウス組織における第 VIII 因子の発現を免疫蛍光法などにより検討した。非ヒト霊長類での血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を目的としてカニクイザル第 VIII 因子遺伝子 (cDNA) をクローニングするとともに、AAV ベクターにカニクイザル第 VIII 因子を搭載しマウス脂肪組織における発現を検討した。

血友病 B : 血管内皮細胞特異的である PAI-1 プロモーターをもちいて血管内皮細胞へ第 IX 因子(FIX)遺伝子の導入と病的状態における導入 FIX 発現を検討した。非ヒト霊長類モデルとしてカニクイザルを用いて血友病 B 遺伝子治療の検討を行った。ヒト FIX 遺伝子また、変異カニクイザル FIX 遺伝子を発現させる AAV ベクターを、カニクイザルの骨格筋と肝臓へ投与し遺伝子導入と発現を検討した。

インヒビター対策: 免疫寛容誘導研究の基礎的検討を行うために新生仔血友病 A マウスへのヒト FVIII 投与により異種タンパクである FVIII に対して免疫寛容が成立するかを検討した。さらに、制御性 T 細胞移植による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: AAV1 ベクター dual vector system を用いてヒト第 VIII 因子 H 鎖と L 鎖を血友病 A マウスの骨格筋に発現させることで治療域に達する第 VIII 因子活性の上昇を認めた。しかし、H 鎖 L 鎖発現レベルの不均衡があった。Single vector system でも AAV ベクターに β -actin プロモーターをもちいて FVIII 遺伝子を骨格筋で発現させることで治療レベルの第 VIII 因子活性の上昇が得られた。AAV8 ベクターを用いたときには正常域以上の発現も得られ FVIII の長期発現がえられた。さらに、AAV8 ベクターに HAAT プロモーターを組み合わせ、FVIII を血友病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 FVIII 活性の上昇が得られ、最大約 800%へ達する FVIII の発現が得られた。FVIII 活性の上昇は 1 年以上持続した。それぞれのベクター投与マウスの臓器には、導入 FVIII 遺伝子の転写産物また FVIII が免疫組織化学で検出された。これらのことから、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。

FVIII 遺伝子搭載 SIV ベクターをマウス脂

肪組織へ直接投与することでFVIIIの発現を得ることができた。また、血液幹細胞移植による遺伝子治療では、FVIII 遺伝子導入したヒト血液幹細胞を移植した NOD/SCID マウス治療域に達するレベルのヒトFVIIIの発現が確認された。さらに GPIb α プロモーターにより血小板特異的発現を可能とさせえる SIV ベクターを用いてへ FVIII 遺伝子導入をおこなった血液幹細胞を血友病マウスへ移植したところ血小板特異的遺伝子発現が得られ、血液幹細胞を移植した血友病 A マウスは出血症状が改善した。

血友病 B: マウスに 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、ヒト正常 FIX 濃度の約 10%に相当するヒト FIX の発現が 20 週持続し、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、TGF β 1 を投与したときには、FIX の発現が誘導され、さらに敗血症状態 (LPS 刺激) では内在性マウス FIX レベルが低下し、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 の低下はなく、むしろ上昇したことから病的状態における AAV1 CEP FIX ベクターの優位性が示された。

ヒト FIX に結合するがカニクイザル FIX 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、FIX の Ala262 を含むアミノ酸配列がエピトープであることを示した。このモノクロナル抗体をもちいたヒト FIX 特異的 ELISA を確立した。

AAV ベクターを用いてヒト FIX をカニクイザル骨格筋に発現させたときには、最大正常ヒト FIX レベルの 9%に達する発現が得られた。しかし、ヒト FIX に対する抗体が出現し長期発現がえられなかった。導入遺伝子産物に対する抗体産生の問題に対処するため、変異カニクイザル第 IX 因子を作製した。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 FIX の 262 位の Thr を Ala に変異させたところ、変異カニクイザル FIX (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 FIX (正常濃度の約 0.1%) を検出しえた。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正常ヒト FIX レベルの 1000%以上の mac FIX T262A を発現させ得た。同ベクターをカニクイザルに投与し変異カニクイザル FIX の発現を検討したところ、正常ヒト第 IX 因子レベルの 0.1%の低レベルの発現にとどまった。これは、実験に用いたカニクイザル個体に既に AAV8 ウイルスに対する中和抗体が存在していたためであった。

D. 考察

血友病 A マウスで検討した結果からは、マウスにおいては血友病 A の遺伝子治療に AAV ベクターが有用であることが示された。

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 遺伝子治療が有望であると思われた。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 を用いた検討から、脂肪組織をターゲットとした遺伝子治療の可能性が示され、安全な遺伝子治療をめざした切除可能な臓器としての脂肪組織の応用が可能なことの意義が大きい。また、骨髄移植をもちいた遺伝子治療は、SCID の遺伝子治療において成果がえられている。本研究でも、骨髄移植を応用した血小板に特異的に FVIII を発現する遺伝子治療法の可能性が示された。血小板中に FVIII を発現することで、インヒビターの影響を免れえること、また局所で第 VIII 因子が放出されることで止血に有効に働くことができることが示された。

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 FIX 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 FIX 発現レベルが持続したことは、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 FIX 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 FIX の産生が増加することが期待できた。さらに敗血症のような病的状態では CMV プロモーターを用いたときには導入遺伝子発現が低下してしまうが、PAI-1 プロモーターをもちいると遺伝子発現はむしろ上昇することからも、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 を発現できているが、脂肪組織での FIX 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。

カニクイザルを用いた血友病 A の遺伝子治療法開発のための準備としてカニクイザル第 VIII 因子遺伝子のクローニングと発現の確認ができたことは今後の研究の展開を支

えるものである。

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、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遺伝子導入した皮下脂肪組織を外科的に除去可能と安全面でも優れ、他にないユニークな遺伝子治療法である。血管内皮細胞は生理的には休止期にあり、AAV1 ベクターによる遺伝子導入でも、長期発現が行いうる。今回はマウスへのベクター直接投与で第 IX 因子の発現をおこなっているが、*ex vivo*において遺伝子導入した血管を移植する方法や、限定した血管に還流法により遺伝子導入す

る方法をとれば、遺伝子導入した血管を外科的に除去可能と安全面でも配慮できる。米国においては、AAV2 ベクターをもちいた第 IX 因子遺伝子を骨格筋、あるいは肝臓へ導入する臨床治験をおこなっているが、骨格筋では治療域に達する発現レベルが得られず、肝臓への導入では長期発現が得られていない。抗体の出現があったものの治療域に達する第 IX 因子の発現が霊長類で得られたことは、AAV1 ベクターによる骨格筋での第 IX 因子遺伝子導入と発現は適切な戦略と思われ、学問的また医学的意義が大きいと考えられる。

3) 今後の展望

AAV ベクターを用いた血友病 A 遺伝子治療法で高発現、長期発現を目指すとともに、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 FIX 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、ベクター投与法の改善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, 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 efficiency 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. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y: Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *J.Thromb. Haemost.* 2:275-280, 2004.
 19. Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y: Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther.* 11:253-259, 2004.
 20. Mimuro J, Hamano A, Tanaka T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: Hypofibrinogenemia caused by a nonsense mutation in the fibrinogen B β chain gene. *J. Thromb. Haemost.* 1:2356-9, 2003.
 21. Shigeta K, Taniguchi N, Omoto K, Madoiwa S, Sakata Y, Mori M, Hatake K, Itoh K.: In vitro platelet activation by an echo-contrast agent. *J. Ultrasound Med.* 22:365-373, 2003.
 22. Naito M, Mimuro J, Endo H, Madoiwa S, Ogata K, Kikuchi J, Sugo T, Yasu T, Kariya Y, Hoshino Y, Sakata Y: Defective sorting to secretory vesicles in the trans Golgi network is partly responsible for protein C deficiency: Molecular mechanism of impaired secretion of abnormal protein C R169W, R352W and G376D. *Circ. Res.* 92:865-872, 2003.
 23. Kaminishi Y, Aizawa K, Saito T, Misawa Y, Madoiwa S, Sakata Y: Modified bentall operation in a patient with hemophilia A. *Jpn. J.Thor Cardiovasc Surg.* 51(2):68-70, 2003.
- 学会発表
1. 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.
8. 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
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Mimuro J, Ogata K, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y.

- Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for haemophilia A gene therapy. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 7, 2003 San Diego, USA
16. Mizukami, H., Mimuro, J., Ogura, T., Ono, F., Kobayashi, E., Muramatsu, S., Madoiwa, S., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, H., Kume, K., Terao, K., Sakata, Y., Ozawa, K. Muscle-Mediated Human Factor IX Expression in Cynomolgus Monkey using AAV Vectors. Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. June 5, 2003 Washington, DC, USA
 17. Madoiwa, S., Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J., Sakata Y : Neonatal injection of human factor VIII induces immune tolerance in murine hemophilia A. The International Society on Thrombosis and Haemostasis. XIX CONGRESS and 49th Annual SSC Meeting. 2003.7 Birmingham, UK
 18. 三宅 淳、水上浩明、小野文子、高野勝弘、窓岩清治、小倉 剛、松下 卓、岡田尚巳、花園豊、久米晃啓、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一。 カニクイザルをモデルとした血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討 第 65 回日本血液学会、第 45 回日本臨床血液学会 2003 年 8 月 31 日、大阪。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総合（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、好適な条件に関して一定の結論を得た。併せて導入遺伝子の発現に関して全身的な解析を行い、血清型と標的組織特異性についての新たな知見を得た。また、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えられとされる免疫反応に関して様々な測定系を確立し、遺伝子導入の効果との関連について検討した。更には、新生仔マウスに関して至適投与法・投与条件に関する探索を行い有用性を明らかにすると共に、治療域と考えられる水準の凝固第IX因子の血中濃度を達成した。

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検討の成果を利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を検討することで、より良い治療法の開発に寄与する。

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。また、投与後の組織特異性に関して *in vivo* イメージング装置などを用いて全身的な発現解析を行った。ii) 脂肪細胞に対する遺伝子導入法に関して有効な条件が見出されていることから、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。iii) 導入遺伝子の発現に大きな影響を与えられとさ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反応につき解析を行った。また、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検討した。iv) 免疫学的に寛容であり、ベクター使用量が

少なくても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マウスにおける検討を行った。

・遺伝子導入動物実験：特に霊長類（カニクイザル）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（つくば市）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。

なお、肝臓における発現には明瞭な性差があり、雄においてより高い発現が得られる傾向が見られた。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たところ治療域に達する血中濃度（健常人の10%レベル）が見られたが、発現の主体は肝臓であり、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、投与量を増加させても第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 法を用いた場合には多数の陽性個体が認められたものの、中和抗体の陽性率はいずれの血清型についても3%程度であった。なお、ベクター投与後の個体では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型を用いた場合にのみ高い効率が認められた。iv) 新生仔マウスを用いた検討においては、5型及び1型由来のベクターを用いて腹腔内投与を行うことで2型を用いた場合を大きく凌駕する血中濃度が得られた。また、成育マウスの場合とは異なり、8型由来のベクターを骨格筋に投与した場合、発現の主体は骨格筋であり、肝臓における発現は明らかでなかった。また、静脈内投与を行っ