

た場合には主に肝臓において発現が見られたが、明らかな性差は認められなかった。

・遺伝子導入実験：特に霊長類（カニクイザル）においてベクターを骨格筋ないし門脈内に投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行った。骨格筋への遺伝子導入では、1型を用いた場合に高い効果が得られる傾向があり、最高で正常の5%程度の血中濃度が得られた。しかしながら遺伝子導入後4ないし6週でヒト型凝固第IX因子に対する抗体が生起し、ほぼ同時期に血中濃度の低下が観察された。また、8型由来のベクターを門脈内投与したところ、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。導入遺伝子の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、7, 8, 9型が次善と考えられた。但し肝臓において意図しない発現が見られることから、8, 9型を用いるに際しては注意が必要と考えられる。サルにおいても骨格筋に対しては

これまでのところ1型が最も有効であった。現時点では分子基盤は不明であるが、1型のベクターと骨格筋の間には高い親和性があるものと考えられる。一方、肝臓を標的とした場合には8, 9型を用いることでマウスにおいて高い効果が認められており、8型に関しては更にイヌでも高い効果が報告されていることから、霊長類においても同様の傾向が見られるものと期待された。しかしながら今回の検討では投与量を上げてても余り効果は得られなかった。この原因を明らかにするため、遺伝子導入・発現の過程に阻害的に働く因子の解析を行った。これまでのところ注入前の中和抗体の力価及び導入遺伝子産物に対する免疫反応は明らかでないことから、8型のベクターを用いた場合の効果には種特異性が存在する可能性がある。一方、9型を用いることで霊長類においても効果が期待できる可能性もあることから、この点についても現在検討を行っている。

脂肪組織を標的とした投与方法では、LacZ、ルシフェラーゼ及びエリスロポエチン遺伝子を用いた場合には1型のベクターを用いることで顕著な結果が得られたものの、凝固第IX因子遺伝子を用いた場合には投与量を上げてても十分な効果が得られなかった。8型のベクターを用いることで、治療域に達する凝固第IX因子の血中濃度が得られたものの、肝臓における発現が大部分を占めていることが判明した。以上の結果から、エリスロポエチンなどとは異なり凝固第IX因子を用いた場合には脂肪組織における導入遺伝子産物の合成・修飾・分泌などのいずれかの過程で効率が悪い

ものと考えられた。また、このことから骨格筋に注入した場合の発現組織を確認したところ、同様に肝臓が主たる発現臓器であることが判明した。これまで8型由来のベクターは骨格筋に注入した場合にも高い効果が期待できるとされていたが、その発現は主に肝臓に起因するものであると考えられた。ベクターの動態を追跡したところ、骨格筋への注入後極めて早期に8型のベクターは骨格筋外に移動しており、肝臓に集積する傾向が見られた。これは8型由来のベクターの肝臓に対する組織特異性が極めて高いことに起因する現象と考えられる。肝臓に親和性の高い他のベクターシステム、例えばアデノウイルスベクターなどにおいても同様の現象が起こっている可能性があるが、これまで余り注目されていないようである。いずれにしても特定の臓器・組織に対して極端に親和性が高いベクターを使用する場合には発現臓器に関して注意が必要と考えられた。

近年、導入遺伝子の発現と免疫反応の関係が次第に認識されるようになってきており、たとえ低力価であっても中和抗体が存在することで発現に影響が出ることが示唆されている。今回霊長類医科学センターのサル血清を用いた検討では、1型の抗体価陽性例は散見されるものの、中和抗体の陽性例は少なかった。8, 9型に関してはまだ報告はないものと思われるが、実際の臨床応用を視野に入れた場合、ヒト及びサルにおける抗体の陽性率は重要な意味を持ってくるものと思われる。一方でその他の理由により、遺伝子導入の効果に関して種による大きな違いが存在する可能

性もあり、この点についても今後の検討が必要である。

樹状細胞に対する遺伝子導入効率に関しては、5型を用いた場合に顕著な結果が認められた。導入遺伝子の発現を長期に維持するためには5型以外のベクターを用いることが望ましいと考えられるが、逆に免疫遺伝子治療やワクチン開発などのように免疫反応を積極的に利用する領域において5型のベクターの応用が期待できる知見と考えられる。

血友病 B に対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的として2型 AAV を用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても長期的な効果は認められなかったと最近報告された。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるものと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いて検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果を挙げていきたい。

E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。また、これらの条件を用いることで霊長類モデルにおいても治療域に達する効果を認めた。

以上の技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発に通じることが期待される。

F. 研究発表 (原著論文)

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)*

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)*

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 (in press)*

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)*

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.

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.

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.

Liu, Y., Okada, T., Sheykholslami, 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.

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.

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.

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.

Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpō, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11: 1772-9, 2004.

Kikuchi, J., Mimuro, J., Ogata, K., Tabata, T., Ueda, Y., Ishiwata, A., Kimura, K., Takano, K., Madoiwa, S., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y.: Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34(+) cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med* 6: 1049-60, 2004.

Kanazawa, T., Mizukami, H., Nishino, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Kitamura, K.,

Ichimura, K., Ozawa, K.: Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 25: 729-35, 2004.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 vector for hemophilia A gene therapy. Gene Ther. 11: 253-259, 2004.

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.

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.

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.

Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. Mol Ther 8: 895-902, 2003.

Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpō, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., and Ozawa, K.: Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. Cancer Res 63: 5091-5094, 2003.

Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and Ozawa, K.: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. J Gen Virol 84: 2127-2132, 2003.

Xin, K.Q., Ooki, T., Jounai, N., Mizukami, H., Hamajima, K., Kojima, Y., Ohba, K., Toda, Y.,

Hirai, S., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.:
A DNA vaccine containing inverted terminal
repeats from adeno-associated virus increases
immunity to HIV. J Gene Med 5: 438-445, 2003.

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K.,
Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y.,
Kume, A., Katsura, K., Katayama, Y., and Ozawa, K.: Distinct patterns of gene transfer to gerbil
hippocampus with recombinant adeno-associated
virus type 2 and 5. Neurosci Lett 340: 153-157,
2003.

Lu, Y.-Y., Wang, L.J., Muramatsu, S.,
Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H.,
Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A.,
Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I.:
Intramuscular injection of AAV-GDNF results in
sustained expression of transgenic GDNF, and its
delivery to spinal motoneurons by retrograde
transport. Neurosci Res 45: 33-40, 2003.

Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T.,
Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, A., Takeuchi,
K., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.:
Suicide gene therapy using
AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with
irradiation results in regression of human head
and neck cancer xenografts in nude mice. Gene
Ther 10: 51-58, 2003.

G. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業） 総合研究報告書

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

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、患者が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標にレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療および肝細胞移植の研究を行った。

これまで第Ⅷ因子ノックアウトマウスを用いたほとんどすべての遺伝子治療の研究は導入遺伝子産物の低発現と第Ⅷ因子インヒビターの発生により、十分な治療効果がえられていない。今回、従来のベクターの作製法に改良を加え、免疫機構が未成熟と考えられる新生仔マウスに投与したところ、インヒビターを発生することなく、長期間にわたって第Ⅷ因子を発現しうることを初めて証明した。ベクターのプロモーターの種類および投与経路が免疫寛容の導入に際して重要であることも証明した。

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。さらに移植肝細胞の調達的手段として uPA/SCID マウスを分離肝細胞の増殖プラントとして利用する方法に取り組んだ。マウスあるいはイヌ正常肝細胞を uPA/SCID マウスの肝臓に移植したところ、移植細胞は生着して増殖し、uPA/SCID マウス肝はほぼ移植細胞に置換されることを明らかにした。また移植肝細胞は第Ⅸ因子産生能等の肝細胞としての機能を良好に保持していることも明らかにされ、uPA/SCID マウスは肝細胞の増幅供給システムとして有用であることが証明された。

A. 研究目的

血友病Aは、X染色体(Xq28)に存在する血液凝固第Ⅷ因子遺伝子の異常に起因する先天性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナン

トの第Ⅷ因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計る、という補充療法を主体とする血友病の care である。今後さらに進めた血友病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、非常に高価な第Ⅷ因子製剤の使用量の大幅な減少などが期待できる。これを達成するため、血友病Aの動物モデルを用いて、第3世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療と成熟肝細胞移植及び、肝臓外肝組織新生の基礎的研究を行った。

これまで第Ⅷ因子ノックアウトマウスを用いたほとんどすべての遺伝子治療の研究は導入遺伝子産物の低発現と第Ⅷ因子インヒビターの発生により、十分な治療効果がえられていない。持続的に高発現の得られるベクターシステムの開発および第Ⅷ因子インヒビター発生メカニズムの解明とその克服が重要な課題であると考えられる。今回、われわれは第3世代レンチウイルスベクターを免疫機構が未成熟と考えられる新生仔マウスに経静脈的に投与し、第Ⅷ因子に対する免疫寛容が獲得されるか否かを検討した。

肝細胞移植については、すでに肝臓移植に代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と肝臓臓器の新生を目標とする。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。これまでの肝細胞移植の細胞移植部位は、経門脈的に

肝臓へ移植する方法が中心であり、肝細胞を肝臓外へ移植する研究においては、移植細胞の長期生着が困難であった。今回、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移植肝細胞の長期生着法の確立と血友病治療への応用を検討した。また、実際の肝細胞移植の臨床応用に際し問題となるのは、これまでの培養法等において分離肝細胞を継代増殖する手法が存在しないことである。そこで、uPA/SCID マウスを分離肝細胞の増殖プラントとして利用する方法にも取り組んだ。

B. 研究方法

I. 第3世代レンチウイルスベクターを用いた新生仔血友病Aマウスの遺伝子治療

(カナダ・クイーンズ大学と共同研究)

細胞培養プレートへの poly-L-lysine のコーティング、Chen-Okayama トランスフェクション法、酪酸ナトリウムおよび無血清培地を用いた方法を用いて、Bドメイン欠失型第Ⅷ因子遺伝子を組み込んだ第3世代レンチウイルスベクターを作成した。肝特異的プロモーター (HCR-hAAT) を有するベクター (hAAT-cFVIII-LV) および CMV プロモーター制御下のベクター (CMV-cFVIII-LV) の2種類を作製した。これらのベクターを日齢2以内の新生仔 Balb/c 血友病Aマウスに静脈内 (経側頭静脈的)、腹腔内および皮下の3ルートで投与し、第Ⅷ因子の発現およびインヒビター発生率を検討した。

II. 肝細胞移植

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。

4) uPA/SCID マウスを用いた肝細胞の増殖 （広島県産業科学技術研究所との共同研究）

アルブミンエンハンサープロモーター下にウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを免疫不全マウスである SCID マウスと交配した uPA/SCID マウスは肝臓特異的に産生される uPA により持続的な肝障害を発生する。この肝臓に uPA を産生しない野生型の肝細胞を移植すると、移植肝細胞の選択的な増殖が誘導され、このトランスジェニックマウスの肝臓の大部分あるいはほぼ全体を占めるまでの増殖がおこることにより、移植細胞により置換された肝臓が形成される。基礎的実験としてマウスから分離した正常肝細胞

ならびにイヌ正常肝細胞を uPA/SCID マウスの肝臓に移植し、移植細胞の増殖形態ならびに uPA/SCID マウスの肝臓の形態的变化について検索を行った。イヌ肝細胞を用いた実験においては、マウス体内において移植し増殖したイヌ肝細胞から産生される血液凝固第 IX 因子抗原を検索した。

C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

I. 第 3 世代レンチウイルスベクターを用いた新生仔血友病 A マウスの遺伝子治療

hAAT-cFVIII-LV を投与したマウスのうち、静脈内投与群の 6 匹では 5 匹に第 VIII 因子活性をみとめた。3 匹のマウスで 70 日以上にわたって第 VIII 因子活性を検出した。腹腔内および皮下投与群では第 VIII 因子活性は検出されなかった。また、静脈内投与群ではインヒビターは発生しなかったのに対し、腹腔内および皮下投与群ではすべてのマウスがインヒビターを発生した。CMV-cFVIII-LV を静脈内投与したものでは、第 VIII 因子活性は検出されず、5 匹中 4 匹にインヒビターを検出した。これらの実験結果から、レンチウイルスベクターの新生仔マウスへの投与により、インヒビターを発生することなく、長期間にわたって第 VIII 因子を発現しうることを初めて証明した。ベクターのプロモーターの種類および投与経路が免疫寛容の導入に際して重要であることも証明された。ウィルスベクターの全身投与については、遺伝子付加に伴う癌遺伝子の活性化や生殖細胞への影響など解決すべき問題点は多いが、インヒビターの発生を回避する手段として、血友病 A の新生児（仔）に対する治療は今後も考慮され、発展されるに値するものと考えられた。

II. 肝細胞移植

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

胞／両腎）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、300日を超えて半永久的に安定して肝細胞が生着した。 α 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つつ、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、一部の幹細胞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

腎被膜下に正常肝細胞を用いて肝組織作製を行った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意に短縮していた。本結果は、血友病の新しい治療法の確立において、肝細胞を利用することの有用性を示したものである。

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、移植早期におけるホスト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。

4) uPA/SCID マウスを用いた肝細胞の増殖

allogeneic なマウスの肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、移植5週間には、uPA/SCID マウスの肝臓を構成するほぼ全ての肝細胞が移植した肝臓により置換していることを確認した。この実験において増殖置換したマウス肝細胞を分離／精製し、ドナーと同系マウスの腎被膜下に移植した。その結果、腎被膜下において100日を超えて安定して生着し、小肝組織を作製することに成功した。

イヌ肝細胞移植を行った8匹のuPA/SCID マウスのうち、移植後5週目において5匹のマウスから66～81%のイヌ由来の第Ⅸ因子抗原ならびに活性を検出した。55日目に摘出したイヌ第Ⅸ因子抗原陽性マウスの肝臓の観察において、uPA/SCID マウス肝の肝細胞は約85%が移植したイヌ由来の肝細胞に置換されていることを、形態学的ならびに抗イヌアルブミン抗体を用いた免疫染色において確認した。これらの結果は、異種であるイヌ成熟肝細胞も、uPA/SCID マウスの体内で活発な増殖が可能であり、増殖後も第Ⅸ因子の合成能を良好に保持していることを示している。

これらの実験結果は、これまでには存在し

なかった、分離肝細胞を増幅する全く新しいシステムを確立したことを示している。肝細胞移植治療による有用性はこれまでに様々な実験系あるいは臨床試験において示されてきているが、今後の発展においてその細胞源をいかに確保するかが重要な問題と認識されている。その点からも、本研究は肝細胞をその機能を維持した状態で増幅供給し得ることを明らかとしたものであり、この分野の発展に大きく寄与するものと考えている。

D. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：

柴田 優、嶋緑倫、田中一郎、野上恵嗣、櫻井嘉彦、辰巳公平、粕田承吾、中宏之、山内昌樹、織順一

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
クイーンズ大学病理学及び分子医学部門：

David Lillicrap

広島県産業科学技術研究所：

片岡美穂、立野知世

E. 研究発表

1) Kuge H, Ohashi K, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Koyama F, Bumgardner GL, Kosai K-I, Nakajima Y. Genetic modification of hepatocytes towards hepatocyte transplantation and liver tissue engineering. *Cell Transplantation*, in press.

2) Yokoyama T, Ohashi K, Kuge H, Kanehiro H, Yamato M, Iwata H, Nakajima Y. In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *American Journal of Transplantation* 6: 50-9, 2006

3) Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nakajima Y. Stability and repeat regeneration potential of the

engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplantation*, 14: 621-627, 2005

4) Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nagao M, Sho M, Nakajima Y. Heterotopically transplanted hepatocyte survival depends on extracellular matrix components. *Transplantation Proceedings*, 37: 4587-4588, 2005

5) 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

6) Yoshioka A. Products used to treat hemophilia : recombinant products. In *Textbook of Hemophilia*, Blackwell Publishing: 136-141, 2005

7) 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

8) Ohashi K, Nakai H, Couto LB, Kay MA. Modified infusion procedures affect recombinant adeno-associated virus vector type 2 transduction in the liver. *Hum Gene Ther.* 16:299-306, 2005

9) Nogami K, Zhou Q, Myles T, Leung LL, Wakabayashi H, Fay PJ. Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *Journal of Biological Chemistry* 280:18476-18487, 2005

- 10) Nogami K, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood* 105:4362-8, 2005
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 福武勝幸、新井盛大、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. 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
- 15) 櫻井嘉彦. 血友病インヒビター患者における免疫寛容療法の基礎—免疫学的観点から. *日本血栓止血学会誌* 16:330-333, 2005
- 16) 田中一郎、嶋緑倫. 後天性血友病の標的自己抗原エピトープ. *臨床免疫* 43:507-513, 2005
- 17) 田中一郎、嶋緑倫. 後天性血友病—本邦における実態と抗第 VIII 因子自己抗体の免疫生化学的特性. *臨床血液* 46:91-98, 2005
- 18) 大橋一夫 肝 tissue engineering による次世代療法の確立にむけて *昭和医学会雑誌* in press
- 19) 大橋一夫、中島祥介 肝ティッシュエンジニアリングによる次世代療法の確立にむけて. *分子細胞治療* 4: 306-312, 2005
- 20) 大橋一夫 肝ティッシュエンジニアリングにおける新展開—シート工学を応用した新規肝再生治療 *東京女子医科大学雑誌* in press
- 21) Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa F, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2:275-280, 2004
- 22) Fukuda K, Naka H, Morichika S, Shibata M, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Inversion of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. *International Journal of Hematology* 79:303-306, 2004
- 23) Sakurai Y, Shima M, Tanaka I, Fukuda K, Yoshida K, Yoshioka A. Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica* 89:696-703, 2004
- 24) Kasuda S, Tanaka I, Shima M, Matsumoto T, Sakurai Y, Nishiya K, Giles AR, Yoshioka A. Effectiveness of factor VIII infusions in haemophilia A patients with high responding inhibitors. *Haemophilia* 10: 341-346, 2004
- 25) Shima M. Understanding the hemostatic effects of recombinant factor VIIa by clot waveform analysis. *Seminers in Hematology* 41:125-131, 2004
- 26) Ananyeva NM, Desmazes SL, Hauser CAE, Shima M, Ovanesov MV, Khrenov AV, Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 15:109-124, 2004
- 27) Ohashi K, Kay MA. Extracellular matrix component cotransplantation prolongs survival of heterotopically transplanted human hepatocytes in mice. *Transplantation Proceedings* 36:2469-2470 2004

- 28) Nogami K, Wakabayashi H, Ansong C, Fay PJ. Localization of a pH-dependent, A2 subunit-interactive surface within the factor VIIIa A1 subunit. *Biochimica Biophysica Acta*. 1701(1-2):25-35, 2004
- 29) Nogami K, Freas J, Manithody C, Wakabayashi H, Rezaie AR, Fay PJ. Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *Journal of Biological Chemistry* 279:33104-33113, 2004
- 30) Nogami K, Lapan KA, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337-372 of the factor VIII heavy chain. *Journal of Biological Chemistry* 279:15763-15771, 2004
- 31) Hayashi T, Tanaka I, Shima M, Yoshida K, Fukuda K, Sakurai Y, Matsumoto T, Giddings JC, Yoshioka A. Unresponsiveness to factor VIII inhibitor bypassing agents during haemostatic treatment for life-threatening massive bleeding in a patient with haemophilia A and a high responding inhibitor. *Haemophilia* 10:397-400, 2004
- 32) 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* 9:338-345, 2004
- 33) 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* 15:541-546, 2004
- 34) 田中一郎、吉岡章. 遺伝カウンセリングケースレポート-血友病. *小児科診療* 67:2274-2275, 2004
- 35) 吉岡章、福武勝幸、新井盛大、稲葉浩、花房秀次、三間屋純一、高松純樹、嶋緑倫、白幡聡、藤巻道男、リコネイト(PTPs)研究会. 過去に治療歴のない血友病 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(特別調査) *日本血栓止血学会誌* 15:522-534, 2004
- 36) 吉岡章. 血友病治療と国内自給. *血液事業* 26:607-611, 2004
- 37) Yoshioka A, Fukutake K, Takamatsu J, Shirahata A, the Kogenate Post-Marketing Surveillance Study Group. Clinical Evaluation of a Recombinant Factor VIII Preparation (Kogenate) in Previously Untreated Patients with Hemophilia A. *International journal of Hematology* 78: 467-474, 2003
- 38) Shibata M, Shima M, Misu H, Okimoto Y, Giddings JC, Yoshioka A. Management of haemophilia B inhibitor patients with anaphylactic reactions to FIX concentrates. *Haemophilia* 9: 269-271, 2003
- 39) Matsutani T, Sakurai Y, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, Shima M, Yoshioka A. Replacemant therapy with plasma-derived factor VIII concentrates induces skew in T-cell in HIV-seronegative hemophilia patients. *Thrombosis and Haemostasis* 90: 279-292, 2003
- 40) Morimoto Y, Yoshioka A, Shima M, Kirita T. Intraoral Hemostasis Using a Recombinant Activated Factor VII Preparation in a Hemophilia A Patient With Inhibitor. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 61: 1095-1097, 2003
- 41) Park F, Ohashi K, Kay MA. The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Molecular Therapy*. 8:314-23, 2003
- 42) Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee SY, Salazar FH, Marion PL, Ohashi K, Meuse L, Kay MA, Casey JL, Sebti SM, Hamilton AD, Glenn JS. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical*

Investigation 112: 407-14, 2003

43)Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ.
Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage
of the factor VIIIa A1 subunit resulting in
cofactor inactivation. Journal of
Biological Chemistry 278:16502-16509, 2003
44)Nogami K, Wakabayashi H, Schmidt K, Fay
PJ. Altered interactions between the A1 and
A2 subunits of factor VIIIa following
cleavage of A1 subunit by factor Xa.
Journal of Biological Chemistry 278:
1634-1641.

45)嶋 緑倫. 第Ⅷ因子インヒビター陽性血友
病A 臨床血液 44:90-101, 2003

46)松本智子、嶋 緑倫. 凝固波形解析と第
Ⅷ因子微量測定への応用 日本血栓止血学会
誌 14:122-127, 2003

47)嶋 緑倫、田中一郎、河合陽子、辻 肇、
中村 伸、森田隆司. 本邦における血液凝固
後天性インヒビターの実態：日本血栓止血学
会誌 14: 107-121, 2003

48)嶋 緑倫. 血友病インヒビター症例にお
ける ITI と国際研究 日本小児血液学会雑誌
17: 157-161 2003

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

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：遺伝子治療や細胞治療などの先端医療を用いた治療法が血友病患者に応用されようとしているが、その具体的な方法論は十分に確立されていない。本研究では、初年度マウス等の小動物モデルで肝選択的な遺伝子導入方法の開発を行い、ウイルス性及び非ウイルス性ベクターによる肝臓での発現特性とともに、血液凝固因子遺伝子を肝垂区域に導入する技術の開発に成功した。次年度では、実際、臨床応用可能なミニブタにおいてカテーテル法により選択的に遺伝子を肝臓に導入することができた。また、最終年度では次世代型の遺伝子改変中型動物の作出方法（クローン技術）を通じて血友病疾患モデルであるミニブタが作成できることが示唆された。これらの成果は有効な血友病治療のトランスレーショナルリサーチの礎となる。

A. 研究目的

遺伝子治療や細胞治療などの先端医療を用いた治療法が血友病患者に臨床応用が検討されている。しかし、治療用ベクターの安全性や細胞ソースなど、克服すべき問題は多い。このような先端医学を臨床応用する場合、実際の臨床を見立てた方法論を確立することが極めて重要となる。特に、解剖学的にも生理学的にもヒトと類似しているモデルが不可欠である。本研究では、カテーテル操作などの治療行為を行う点で実際の臨床を模倣可能な小・中型モデル動物に焦点を絞り、肝臓に対する効果的な種々の遺伝子導入方法を検討した（平成 15、16 年度）。さらに、現在利用されているイヌ血友病モデルの直面している問題（繁殖性など）や新しい中型疾患動物の要求から、核移植クローン技術による遺伝子改変ブタの作出の取組みを行なった（平成 17 年度）。これら包括的な肝選択的な遺伝子導入方

法の開発と次世代型遺伝子改変中型動物の試みは臨床応用に向けた有効な血友病治療のトランスレーショナルリサーチの基礎となる。

B. 研究方法

- 1) アデノウイルスベクターを用いて全身投与時の全身臓器での発現を確認した。次に全身投与及び肝動脈内投与による遺伝子発現量を比較した。さらに 1～5 型の AAV ベクターを用いて全身投与での肝臓での発現を比較検討した。また通常では遺伝子導入効率が極めて悪い臓器での導入効率を上げるため、血管カテーテルを用いてベクターと臓器の接触時間を上げ、その発現を検討した。
- 2) 大量の溶液とともに Naked DNA を注入すると筋肉や肝臓に遺伝子発現が得られることに注目して、カテーテルを用いてそれぞれの臓器に安

全に遺伝子導入を行う方法をラット及びブタを用いて検討した。ラットでは門脈経由で、ミニブタでは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。

- 3) 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として認識される。しかし、欠損凝固因子の発現に成功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できない。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成熟第Ⅷ因子欠損マウスを用いて実験を行った。
- (ア) ALS (抗リンパ球血清) の使用により、T および 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 **FACS** により検討した。
- (イ) ALS 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 0.05ml で、生理食塩水あるいは第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。
- 4) 遺伝子改変ブタ作出のためのクローン技法の基礎データを確立するために以下の実験を行なった。
- ①ドナー核として GFP (+/-) でのクローン胚の発育率への影響

②クローン胚への活性化による発育率への影響

③仮腹ブタへの発情同期化法の検討

④クローン胚を仮腹ミニブタに移植してクローン産子の作出試験

C. 研究結果

- 1) アデノウイルスベクターを全身投与した際は肝のみでの発現が認められた。同量のベクターを投与する際は、肝動脈から投与することでより強い発現が得られた。1～5 型の AAV ベクターの内、全身投与で肝臓に発現が得られるものは 5 型のみであった。しかしその際も遺伝子マーカー陽性肝細胞はアデノウイルスベクターによるものに比し極めて少なかった。しかし発現が誘導できない腎においても血管カテーテル法を用いることで AAV-2 によるマーカー遺伝子の発現が得られた。
- 2) 肝静脈からのカテーテル法で Naked DNA を注入したところ、全葉に極めて高い発現が一過性に得られた。さらに亜区域にバルーンを誘導し、遺伝子を導入することでその区域に局限して GFP 遺伝子陽性細胞を得た。同法は、ブタ肝でも確認され臨床応用の可能性を示した。
- 3) (ア) 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、十分な ALS が必要であることが判明した (表 1)。
- (イ) 0.1 ml 用量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おいては、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、投与用量を減少させることにより死亡率の減少が観察された(表 2-1 および表 2-2)。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 1 ALS 投与後 24 時間の末梢血の
1m³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

表 2-1 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

表 2-2 0.05 ml volume 投与群

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

表 3 胸腺内注入後の阻害抗体の推移

個体	4wks	6wks	8wks	10wks
Saline 1	0.0	11.0	493.3	516.6
VIII3	0.5	6.0	76.0	83.8

4) ① エレクトロポレーションにより GFP 遺伝子を挿入した細胞を、ドナー細胞に用いたクローン胚の胚盤胞期胚への発育率は、GFP(－)と有意な差は認められなかった。

② クローン胚への活性化法として、電気刺激とシクロヘキシミド処置後に、サイトカラシン B 処置はクローン胚の発育率を有意に向上させた。

③ ミニブタに5種類のホルモン to 投与量で発情同期化を行い、仮腹ブタとして移植予定日に、卵巢の反応と排卵された成熟卵子を回収し、比較検討した結果、PMSG200 (IU)+HCG100 (IU)+HCG100 (IU) の組

み合わせが発情誘起率、推定反応卵胞数ともに最良であった。

- ④ この低単位ホルモン処置による発情誘起後、自然交配をして 60% (3/5) で受胎し、妊娠が維持されることが確認された。
- ⑤ ブタでは妊娠が成立するためには 12 日まで 4 個以上の胚が子宮角に生存維持される必要がある。そこで、クローン胚を仮腹ミニブタに移植してクローン産子の作出試験で、単為発生胚を供移植してその効果を検討した。その結果、単為発生胚を供移植した 4 頭のうち 3 頭が妊娠し、1 頭で妊娠が維持されてクローン産子が得られた。残り 2 頭は、50 日以降に胎児死滅が起こったが、黄体が維持され、子宮粘膜が水腫を起した状態で 113 日無発情状態が維持された。単為発生胚を供移植しなかったクローン胚のみでは妊娠せず発情回帰が認められた。

D. 考察

- 1) 一般にアデノウイルスベクターは高発現であるか、短期一過性発現である一方、AAV ベクターは発現が低いものの長期に安定である。本研究により血管内カテーテルを用いて肝への選択性を高めることが可能であり、これらのウイルスベクターと臓器との適度な接触時間を保つことにより効率かつ選択的な遺伝子発現を誘起することができた。また、今回開発された肝亜区域誘導型の遺伝子導入法は肝指向性の強いベクターとの組み合わせによりこれまでに

ない安全な遺伝子導入方法として期待がもてる。

- 2) 中型動物であるミニブタにおいて、カテーテル法を組み合わせることにより、Naked DNA を用いた非ウイルス性遺伝子導入方法であっても、肝選択的な遺伝子導入が可能となる。
- 3) 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、その用量が 0.1ml であると、85% の個体が翌日までに死亡してしまう。しかし、0.05 ml まで用量を下げることで、その死亡率は、16% 程度にまでに低下した。その後に感染症等で死亡する個体を除いて、残存する個体において阻害抗体の上昇を検討した結果、第Ⅷ因子投与個体では、阻害抗体の出現が遅延することが示唆された。
- 4) 人獣共通感染症や家畜間特性疾病などの微生物コントロールが容易な実験動物としてのミニブタをクローン胚移植用の仮腹ブタとドナー細胞由来ブタに用い、医学部実験施設でも飼養管理の容易な小型のミニブタを用いてクローン産子を得ることができたことは、血友病治療に限らず新たなトランスレショナルリサーチとして大きな価値をもつ。

E. 結論

ウイルス性及び非ウイルス性ベクターによる肝臓での発現特性を明らかにした。また、血液凝固因子遺伝子を肝亜区域に導入する技術を開発した。実際、

臨床応用可能な中型動物であるミニブタにおいてカテーテル法により選択的に遺伝子を肝臓に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。また、遺伝子改変ブタ作出のためのクローン技法の基礎データ分析から、血友病疾患モデルであるミニブタ作成の可能性が示唆された。本結果をもとに今後ノックアウトベクターを作成し、第Ⅷ因子KO細胞の樹立と第Ⅷ因子KOブタ作出に取り組みたい。

F 研究発表
論文発表

1. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y., : Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method . Transplant Immunol 11: 7-14, 2003.
2. Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., and Kobayashi, E.: A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: Long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. Transplantation 15:76(9):1294-8, 2003
3. 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,
4. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Arai, M., Sugo, T., Mimuro, J. and Sakata, Y. : Induction of immune tolerance by of cold-preserved renal grafts using HSP70 or Bcl-2 HVJ-Liposome method. Transplant Immunol 11:7-14, 2003.
5. Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatusgi, N., and Shimada, K. : Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. J Gene Med 5(11): 921-928, 2003.
6. 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

7. Ogata, Y., Fujishiro, J., Kawana, H.,
gene transfer to the rat heart graft.
Transplantation 78(9):1408, 2004.
8. Takeda, S., Takahashi, M., Mizuka
mi, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K.,
Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamam
oto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi,
K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano,
Y., and Kusano, E.: Successful Gene
Transfer Using Adeno-Associated V
ectors into the Kidney: Comparison
among Adeno-Associated Virus Sero
type 1 to 5 vector in vitro and in vivo.
Nephron Experimental Nephrology
96(4):119-126, 2004
9. 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 37 :67-69.2005.
10. 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 385-95, 2005.
11. 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.
12. Komiya, K., Sato, Y., Wainai, T.,
Murayama, M., Yamada, , Hiruta, N
Seo, N., Yoshino, H., Tanaka, H.,
Kobayashi, E.: Evaluation of
intraoperative infusion solution
Using a complete anhepatic model
In baby pigs. Transplantproc37:
2341- 2346, 2005.
13. 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).
14. Murayama, T., Sato, Y., wainai, T.,
Sato, A., Seo, N., Yoshinori, H.,
Kobayashi, E., : Effect of
c ontinuous infusion of propofol
in its concentration in blood