

without the liver in pigs.  
Transplant Proc37: 4567-4570,  
2005.

学会発表等            75 件

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

SIVagm ベクターの開発と血友病遺伝子治療への応用

分担研究者 長谷川 護 ディナベック株式会社

研究要旨 血友病の遺伝子治療に適用できるレンチウイルスベクターとして、アフリカミドリザルから分離したサル免疫不全ウイルス（SIVagm）をベクター化した。レンチウイルスベクターは非分裂細胞へ効率的に遺伝子導入が可能であり、さらに治療遺伝子を持続発現させることができる。これらの性能を利用して SIVagm ベクターを血友病の治療に使用できるように、治療遺伝子やプロモーターの交換などが容易にできるようにベクターデザインの改変をおこなった。また、ヒトへの応用を考えた場合、ベクターデザインとともに、遺伝子治療用ベクターを高い生産性でまた臨床応用可能な生産系で製造することが重要である。現在、SIVagm ベクターは一過性のトランスフェクションで生産しているが、実用的レベルで生産できるようなシステムへの改良をおこなった。また臨床適用可能な閉鎖系での生産を検討し、従来の開放系ではなく閉鎖系ベクター生産システムを使用した場合でも十分な生産効率を確保できることを確認した。さらに将来的な生産システムとして、SIVagm ベクター生産細胞を作製することも重要な手法の一つであり、この前段階としてパッケージング細胞株を樹立することを試み、SIVagm ベクターの生産性を評価した。最終年度は、SIVagm ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて、必要とされるベクター基本性能として SIVagm ベクターのゲノム挿入部位の指向性および導入遺伝子の持続発現期間に関して検討をおこなった。以上の改良および解析の結果から、SIVagm ベクターは血友病遺伝子治療において、極めて有効に利用できるポテンシャルを有することを示した。

#### A. 研究目的

血友病を治癒することを目的に、遺伝子治療をおこなう場合、欠損因子の生産細胞は、細胞周期で静止期にある体細胞が対象である。これらの細胞の多くは非分裂細胞であり、レンチウイルスベクターはこれら静止期の体細胞に遺伝子を導入できる。我々は SIVagm ベクターを血友病遺伝子治療へ応用することを目的として、遺伝子導入プラスミドの改良およ

び、改良したプラスミドを使用してベクターの生産性を評価する。標的組織で効率よく発現するプロモーターと治療用遺伝子を容易に置換できるように遺伝子導入プラスミドにマルチクローニングサイトを導入する。このような改良により標的組織によってプロモーターを代えることを可能とする。また、血友病 A, B によって治療遺伝子を選択して SIVagm ベクターに搭載することを可能にする。

(初年度) 現在のレンチウイルスベクターの生産系は一過性のトランスフェクションが主流で、いくつかのパッケージング細胞株の報告があるのみである。多数の患者への適用を考慮した場合、大量に、しかも品質の高いベクターを生産する必要がある。我々の SIVagm ベクターも 4, 5 種類のプラスミドのトランスフェクションによる一過性の生産をおこなっている。SIV などのレンチウイルスベクターは、その生産の煩雑さ(トランスフェクション)や生産性の低さが課題として指摘されている。実用的レベルで生産できるシステムとするために SIVagm ベクター製造法の改良をおこなう。

(次年度) さらに臨床対応可能な閉鎖系でのベクター生産方法で、使用可能な機能力価を得る方法の検討をおこなう。また、生産細胞作製の前段階に相当する SIVagm パッケージング細胞を樹立することを試みる。エンベロープタンパク質を発現するプラスミドを除いて、ベクターのパッケージングに必要な遺伝子群のみを発現する細胞株を樹立し、その生産性を調べる。

(最終年度) SIVagm ベクターによる血友病遺伝子治療臨床試験の実施を可能にする技術の検討を行う。検討課題は、(1) ベクター安全性基礎データとして染色体組込み部位の解析および(2) 昨年度に、閉鎖系の生産性を検討したセンダイウイルス F/HN シュードタイプ化 SIVagm ベクターを使用した持続発現期間の検討である。

SIVagm ベクターはインテグラーゼの働きでゲノムに治療遺伝子を組み込むことによって、その遺伝子を長期間発現することから安定し

た治療効果が期待できる。この特徴は一方で、遺伝子挿入部位の位置によっては、がんを発生する可能性があることを示唆している。遺伝子挿入部位の網羅的な解析をおこない、このベクターの挿入部位の指向性を把握し、癌原性遺伝子への影響は無いか或いは極めて少ないことを示すことを目的とする。

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターに比べて、非分裂細胞に遺伝子を導入しやすいこと、幹細胞に遺伝子を導入した場合のジーンサイレンシングが起きにくいことなどが大きな利点としてあげられる。実際に、SIVagm ベクターによって導入した遺伝子が、どのくらいの期間持続発現するかを検討することは臨床学的にも、きわめて重要であり、導入遺伝子の発現期間を検討した。

これらの研究を実施することで、SIVagm ベクターを使用した遺伝子治療による、血友病の完治・根治療法の確立を目指す。

## B. 研究方法

(初年度)

### (1) 遺伝子導入プラスミドの改変

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

## (2) 一過性の生産系における SIVagm ベクター生産性の向上

薬剤（酪酸ナトリウムとトリコスタチン A）を添加してベクター生産性の向上を試みた。酪酸ナトリウムおよびトリコスタチン A はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として作用し、転写を活性化することによってベクターの生産性を亢進すると考えられている。トランスフェクション後、培地を交換するときに薬剤を添加した。ベクターの生産性は、無添加を対照として 293T 細胞株への遺伝子導入効率で調べた。

また我々は、ヒト水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) をエンベロープにしたシールドタイプ化とともに、センダイウイルスエンベロープタンパク質 (F/HN) でのシールドタイプ化もおこなっている。F/HN シールドタイプ SIVagm ベクターの生産系においては、F をトリプシンで開裂し活性化するため、1% ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下（生産時のベクター安定化を目的）で培地にトリプシンを加えて生産していた。しかしながら、動物実験や臨床応用への適用を目的とした場合、BSA の添加は好ましくないため、BSA を除くとともに、ベクター回収後にトリプシン処理をおこなうというプロトコールの変更をおこなった。

(次年度)

## (1) 閉鎖系の生産系における SIVagm ベクター生産性の検討

ヒトへの臨床に使用するベクターの生産は、開放系（15-cm ディッシュ）よりも、外部からの影響がほとんどない閉鎖系（225-cm<sup>2</sup> フラスコ）で SIVagm ベクターを生産することが望

ましい。しかし一般的には、一過性のトランスフェクションは開放系で、DNA とトランスフェクション試薬の複合体を開放系で滴下する方法が採られている。臨床で使用可能な閉鎖系で SIVagm ベクターを生産し、従来の開放系と比較してどの程度の生産効率の違いがあるかを検討する。

## (2) パッケージング細胞株の樹立

今回、樹立したパッケージング細胞株は VSV-G などのエンベロープ発現プラスミドを含まず、パッケージングプラスミド (PV) のみで作製した細胞株である。PV は機能に関係しない部分を制限酵素で一カ所切断し、DNA を精製後、293T 細胞株にトランスフェクションした。ハイグロマイシンで選択した各細胞クローンを Gag のプライマーを使用して PCR で選択した。約 50 クローンの細胞の性状解析をおこない、最終的に No. 2-1-3 と 2-1-21 を得た。パッケージング細胞株の性状はベクター機能力価で評価した。評価用ベクターは、パッケージング細胞株に、GFP 遺伝子を搭載した遺伝子導入プラスミドと VSV-G 発現プラスミドを一過性にトランスフェクションすることによって生産した。0.45 マイクロメートルのフィルターで濾過したベクター溶液を 293T 細胞株へ感染し、遺伝子導入効率を GFP 陽性細胞数で算出した。

(最終年度)

## (1-1) LAM-PCR による SIVagm ベクター挿入部位のクローニング：LAM-PCR 法のプロトコール確立

染色体組込み部位の解析は LAM-PCR (Linear amplification-mediated PCR) 法を用いて行った。まず、LAM-PCR のプロトコール

ル作成（条件検討）とヒトゲノムデータベースを利用した染色体組込み部位の解析についての方法論を確立し、臨床に対応できる基礎データの取得をおこなえる体制を築くことを目指した。LAM-PCR 法によりヒト上皮細胞株を使用して、SIVagm ベクターによる挿入部位を同定した。モデル遺伝子として EGFP 遺伝子搭載 SIVagm ベクターを使用した。非分裂状態にした静止期の細胞株にベクター感染をおこない、3 日後に、この細胞からゲノムを精製した。本実験では、なるべく挿入部位に選択圧がかからないような実験条件にして、SIVagm ベクターの挿入部位の傾向を網羅的に解析した。また、精製したゲノムの SIVagm ベクター挿入部位の総数はリアルタイム PCR で概算し、この精製ゲノムから LAM-PCR 法で、SIVagm ベクターを含む DNA フラグメントを選択的に増幅後、TA クローニングした。次にクローニングベクターのユニバーサルプライマーを利用して塩基配列を解読した。

#### (1-2) ヒトゲノムデータベースを利用した SIVagm ベクター挿入部位の解析

挿入部位の解析は、ヒトゲノムデータベース (NCBI Human Genome Resources および UCSC Genome Bioinformatics) 上で検索した。検索項目は (1) CpG 配列、(2) LINE、SINE などの繰り返し配列、あるいは (3) 遺伝子内 (イントロンかエクソン) か、(4) 癌原性遺伝子、癌抑制遺伝子内か、(5) 遺伝子近傍の挿入部位の場合は転写開始点からの距離等を調べた。また、(6) 挿入部位の偏りの検定にはコンピュータ・シミュレーションによる *In Silico* 実験を対照に比較検討し、SIVagm ベクター安全性の基礎データを作成する体制を整えた。

#### (2) SIVagm ベクターによって導入した遺伝子の発現期間の検討

昨年度に、臨床に対応可能な閉鎖系での生産性を検討した F/HN シュードタイプ SIVagm ベクターを使用し、220 日までの遺伝子発現を GFP の蛍光で観察した。一般にシュードタイプに使用されている VSV-G ではなく、気道感染系ウイルス (パラミクソウイルス) であるセンダイウイルスの 2 つのエンベロープ蛋白質 (F と HN) でシュードタイプすることで、気道組織に存在する粘液を貫通して粘膜気道上皮細胞に効率的に遺伝子導入することが可能になる。F/HN-シュードタイプ SIVagm ベクターのマウス鼻腔への投与はカテーテルを使用した。鼻腔は、完全に組織表面が粘液で覆われており、VSV-G-シュードタイプをコントロールとした場合、F/HN-シュードタイプの粘液貫通能および遺伝子導入効率を容易に評価できる。遺伝子発現の解析は、鼻骨上面からの肉眼的所見を GFP 蛍光の透過光で観察し、さらに同試料から鼻腔の凍結切片を調製し詳細に解析した。

#### (倫理面への配慮)

SIVagm ベクターはアフリカミドリザルから分離した免疫不全ウイルスの一種であるが、自然宿主であるアフリカミドリザルに対しても病原性はなく、ヒトに対しても病原性の報告はない。ウイルスの病原性の点から HIV に比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために我々のベクターデザインではウイルスのパッケージングに必要な遺伝子群、治療遺伝子とエンベロープタンパク質を別々のプラスミドに搭載して

いる。さらにパッケージングプラスミドからは LTR、パッケージングシグナルを除いている。したがって、これらのベクター改良によって、感染した細胞からウイルスが生じる可能性はほとんどないと考えられる。また、免疫不全ウイルスに共通する病原性に関与すると思われる補助因子を除去して第三世代化することで、より安全なベクター化をおこなっている。レンチウイルスベクターの取り扱いには P2 での取り扱いが認可されており、法令を遵守した実験操作法をおこなった。ベクターの生産・精製は P2A クラス安全キャビネットを使用し、P2 実験室でおこなった。動物実験はおもに P2 クラスの設備で実施した。また、本研究において動物実験等に与える影響は最小限にとどめ、動物等への投与実験は厳選しておこなうものとし、その際には動物愛護の基準にしたがっておこなわれた。また本研究を実施するにあたり、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律およびその関連法規を遵守した。

## C. 研究結果

### (1) 遺伝子導入プラスミドの改変

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

### (2) 一過性の生産系における SIVagm ベクター生産性の向上

一過性の生産系での力価を向上させるために薬剤（酪酸ナトリウムとトリコスタチン A）

を用いて検討するとともに、F/HN シュードタイプ SIVagm ベクターの生産系において、BSA を除去できる生産方法を検討した。両薬剤（酪酸ナトリウムとトリコスタチン A）ともに添加による生産性の向上が見られた（約 2 倍）。また、F/HN シュードタイプ化ベクターに対して、培地を回収後、トリプシン処理をおこなうことで BSA の存在しない状態でも生産性を低下することなくベクターを調製できた。処理時間とトリプシン濃度についての条件検討後、生産時に 5 mM 酪酸ナトリウムを使用したときの SIV-EGFP-F/HN ベクターは  $5 \times 10^7$  TU/ml の力価で調製することができた。

### (3) 閉鎖系の生産系における SIVagm ベクター生産性の検討

初年度に検討した生産条件を適用して、開放系と閉鎖系でのベクター生産性を機能力価で比較検討した。両生産システムの比較には、VSV-G および F/HN でシュードタイプ化した EGFP 搭載 SIVagm ベクターを使用した。その結果、開放系（15-cm ディッシュ）と閉鎖系（225-cm<sup>2</sup> フラスコ）では、その機能力価の比較において SIVagm ベクターの生産性の違いは認められなかった。

### (4) パッケージング細胞株の樹立

293T 細胞株にパッケージングプラスミドをトランスフェクションしてパッケージング細胞株を樹立した。この細胞株に遺伝子導入プラスミドとエンベロープタンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクションして、その生産性を評価した。今回樹立したパッケージング細胞株の生産性は  $5 \times 10^4$  TU/ml だった。

### (5) SIVagm ベクター染色体組込み部位の解析

LAM-PCR のプロトコールの確立（反応条件

の検討)とデータ検索の方法を検討した。モデルシステムとして、染色体構造(染色体の倍加や部分的な欠損)に問題の少ないことが報告されているヒト上皮細胞株と VSVG シュードタイプ EGFP 搭載 SIVagm ベクターを使用した。レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターの LAM-PCR 用プライマーは、一般的に LTR のリピート部分が使用されている。このプライマーに加えて、ベクターLTR の内側でデザインした独自のプライマーを使用した。クローニングされた部位の多様性で比較したところ、独自のプライマーを使用した方が、さまざまなクローンが同定された。また、ネスト PCR ではプライマーの組み合わせが重要であることが示唆された。

ヒトゲノムデータベースはおもに UCSC Genome Bioinformatics を、補足的に NCBI のデータベースを使用した。解析数は 69 クローンで、ヒトゲノムデータベースで 43 クローンが同定できた(効率としては 63%の判明率)。判明した SIVagm ベクター挿入部位の約 50% は遺伝子内(その多くはイントロン部分に挿入)であった。今回の予備検討の結果、各クローン部位の多様性から、大規模解析が可能であることが示唆された。

#### (6) SIVagm ベクターによって導入した遺伝子の発現期間の検討

SIVagm ベクターによって導入した遺伝子発現期間の検討の結果、投与後 10 日目において、VSV-G では全くマウス鼻腔に遺伝子の導入はみられなかったが、F/HN では効率よく遺伝子導入がされていることが搭載遺伝子として EGFP を使用してわかった。さらにベクター性能評価として、長期発現実験をおこなった。

現在までに 220 日までの遺伝子発現の持続を確認しており、マウス鼻腔気道上皮の幹細胞への遺伝子導入が示唆された。

#### D. 考察

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

一過性の生産系においては、ベクター生産時のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(酪酸ナトリウムなど)の添加は生産性向上に効果があり、利用可能であった。また、F/HN シュードタイプ化 SIVagm ベクターの生産プロトコールを変更することで、生産時に添加していたトリプシン、および BSA を、力価を低下することなく除去できるようになり(トリプシンはベクター回収後に添加)、異種抗原として免疫系を刺激する可能性がある BSA を除くことで、より不純物の少ない生産方法を確認することができた。ベクター生産時のこれらの改良点を利用することで、臨床対応可能な閉鎖系でも生産性をおとすことなくベクターを製造することが可能になった。以上の改良により精製度の高い治療用ベクターの供給が可能となった。

また、パッケージング細胞株樹立の試みに関しては、現状のレンチウイルスベクターのパッケージング細胞株としては  $5 \times 10^4$  TU/ml で標準的な生産性であったが、さらに機能力価の高いベクター生産用の細胞株を作製することが実用化に向けて重要である。さらに、エンベローププラスドもあわせて発現して完全なパッケージング細胞株に仕上げていかな

ければならない。VSV-G は細胞毒性があることが知られており、細胞株の樹立には VSV-G 発現にはオン・オフ制御が必要であると一般的にいられている。我々は、より細胞毒性が少なく、かつ広範な感染効率を有するセンダイウイルスの糖タンパク質 F/HN を一過性の生産系で使用してきた。パッケージング細胞株の作製においても F/HN を用いれば、独自のパッケージング細胞株を樹立することが可能である。

LAM-PCR 法で挿入部位を同定するにあたって、(1) 各挿入部位に選択圧をかける場合がある。細胞株では、数十代継代して最終的に選択されてくる挿入部位を同定する方法である。もうひとつの方法は (2) なるべく選択圧をかけずに、たとえば SIVagm ベクターではインテグラーゼの組み込み指向性をできるだけ純粋に評価する条件設定である。本年度は、方法の検討がおもな目的だったので、(2) の条件を用いて細胞株からゲノムを精製し、使用した。LAM-PCR で多様なクローンを取得するには最初のステップであるプライマー伸長反応に使用するプライマーのデザインが最も重要であった。さらに、その後のネスト PCR のプライマーの組み合わせによってもクローン取得の効率が変わってくる可能性が示唆された。これまで検討項目の結果、最良の条件設定を用いれば、少量の臨床試料を使用しても SIVagm ベクター挿入部位の解析が十分に可能であると判断され、現在数百クローン単位での解析が進行中である。

SIVagm ベクターによる搭載遺伝子の発現は、今回十分に持続することが確認できた。基本的性能としての、*in vivo* での長期遺伝子発

現が再確認できたとともに、粘液で覆われている鼻腔上皮細胞での長期発現ができたことから、同様に投与方法を変えれば肺を標的臓器とした場合も持続発現が期待できる。肺は各種遺伝子疾患で欠損している蛋白の生産臓器になる可能性が指摘されていることから、血友病の遺伝子治療にも応用できる可能性はある。再生医療において治療ポテンシャルが高いと言われている ES 細胞は、非自己の細胞であることから、臓器移植と同様に拒絶の問題が指摘されている。肺に存在する患者の組織幹細胞に SIVagm ベクターを使用して、補充療法で使用されている蛋白の生産・供給をおこなえば、より安全で患者に負担の少ない治療が可能であると考えられる。

## E. 結論

### SIVagm ベクターの改良

治療遺伝子やプロモーターを置換しやすいようにするために、遺伝子導入プラスミドにマルチクローニングサイトを導入した。

### ベクター生産性の向上

一過性のトランスフェクションによる生産系での生産性を向上させた。酪酸ナトリウムの添加、トリプシン処理濃度と処理時間の検討や生産時のベクター安定化剤として加えていた BSA の除去の結果、遠心濃縮で  $10^{10}$  TU/ml 以上の機能力価が得られるようになった。

### 閉鎖系によるベクター生産性の検討

ベクター生産性を向上するために検討した実験条件を使用した場合、一過性のトランスフェクションによる生産系において閉鎖系のベクター生産性は従来の開放系の生産性と同



程度であった。

#### パッケージング細胞樹立の試み

将来的なベクター大量生産に対応できるように、SIVagm ベクターの生産細胞を樹立することも重要であり、その前段階として、パッケージング細胞株を作出することを試みた。この細胞株の機能力価は  $5 \times 10^4$  TU/ml であったことから、さらに生産性の高いパッケージング細胞株を調製する必要があると考えられた。

#### SIVagm ベクターのゲノム挿入部位の解析

LAM-PCR による挿入部位のクローニングおよびヒトゲノムプロジェクトのデータベースを利用した解析方法を確立した。今回の検討項目によるデータから、方法的に問題はなく、少量の試料からでも十分な検出感度で挿入部位を同定できることが示された。したがって、将来的に血友病治療遺伝子を搭載した SIVagm ベクターを使用して、治療が予定されている組織あるいは細胞で十分なデータ解析が可能になった。

#### SIVagm ベクターの持続発現期間の検討

また、SIVagm ベクターの持続発現期間の検討では、マウス鼻腔を使用した場合、現在まで少なくとも 220 日間持続発現していることが確認された。上皮細胞の寿命は一般的に 90 日と報告されており、間接的な証拠ではあるが、幹細胞に遺伝子導入されていることが示唆された。さらに SIVagm ベクターによる導入遺伝子の発現はメチレーションなどのエピジェネティクス制御の影響を強く受けていない可能性がある。さらに自治医科大学と共同で血友病の患者で欠損している因子の生産細胞・組織を検討すれば、臨床応用に大きく近

づくことになる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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., and Sakata, Y. Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34+ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTY01-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med* 6: 1049-1060, 2004.

Ogata, K., Mimuro, J., Kikuchi, J., Tabata, T., Ueda, Y., Naito, M., Madoiwa, S., Takanò, K., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTY01-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther* 11: 253-259, 2004.

Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Shirakura, M., Kanaya, T., Yoshizaki, M., Hironaka, T., Nagai, Y., Iida, A., and Hasegawa, M. Recombinant Sendai virus

vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties.

J Gene Med 6: 1069-1081, 2004.

Miyazaki, M., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Goto, Y., Sakamoto, T., Tabata, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Tobimatsu, S., Ishibashi, T., and Sueishi, K. Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats.

Gene Ther 10: 1503-1511, 2003.

Ikeda, Y., Goto, Y., Yonemitsu, Y., Miyazaki, M., Sakamoto, T., Ishibashi, T., Tabata, T., Ueda, Y., Hasegawa, M., Tobimatsu, S., and Sueishi, K. Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats.

Gene Ther 10: 1161-1169, 2003.

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., Nakatsuji, N., and Shimada, K. Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells.

J Gene Med 5: 921-928, 2003.

Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Kanaya, T., Shirakura, M., Tokusumi, T., Hirata, T., Nagai, Y., Iida, A., and Hasegawa, M.

A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading.

J Virol 77: 6419-6429, 2003.

Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Kanaya, T., Tokusumi, T., Nagai, Y., Iida, A., and Hasegawa, M. Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins.

J Virol 77: 3238-3246, 2003.

Kobayashi, M., Iida, A., Ueda, Y., and Hasegawa, M. Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus.

J Virol 77: 2607-2614, 2003.

Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Sakamoto, T., Ishibashi, T., Ueno, H., Kato, A., Nagai, Y., Fukumura, M., Inomata, H., Hasegawa, M., and Sueishi, K. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: efficient gene transfer by brief exposure. Exp Eye Res 75: 39-48, 2002.

Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tanii, M., Komori, K., Nakagawa, K., Hou, X., Nagai, Y., Hasegawa, M., Sugimachi, K., and Sueishi, K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. Circ Res 90: 966-973,

2002.

## 2. 学会発表

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

Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, Mie Ikegami, Uta Griesenbach, Eric Alton, Mamoru Hasegawa. Towards Cystic Fibrosis and airway gene therapy : Evaluation of EGFP Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN. The American society of gene therapy's 8th annual meeting June 1–5 (Saint Louis, MO, USA), 2005

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

Shirohzu, S., Mitomo, K., Tabata, T., Griesenbach, U., Hyde, S., Alton, E., Ueda, Y., and Hasegawa, M. Efficient in vivo transduction of mouse airway epithelial cells by the simian immunodeficiency virus vector pseudotyped with Sendai virus F and HN proteins. The American society of gene therapy's 7th annual meeting June 2–6, 2004

## 国内

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

見 供 克 之、 田 畑 寿 晃、 上 田 泰 次、 Uta Griesenbach、 Eric Alton、 長 谷 川 護

センダイウイルスの糖タンパク質 F、HN によってシュウドタイプ化したサル免疫不全ウイルスベクターは気道系組織に遺伝子を導入できる

第 52 回日本ウイルス学会 11 月 21–23 日、2004 年、横浜

Ueda, Y., Mitomo, K., Shirohzu, H., Tabata, T., Griesenbach, U., Hyde, S., Alton, E., and Hasegawa, M.

Efficient transduction of mouse alveolar and bronchiolar cells by pseudotyped simian immunodeficiency virus ベクター with Sendai virus F and HN protein

The Japan Society of Gene Therapy The 10th Annual Meeting, August 5-6 (Tokyo, Japan), 2004

#### G 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

(1) 「2 つの外來遺伝子を発現させるためのベクター」

出願番号：特願平 11-175646 (1999/6/22)

登録番号：3526844 (2000/9/28)

存続期限：2020/9/28

状態：登録済み

(2) 「ヘマグルニチン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウィルスベクター」

出願番号：特願 2002-500700 (2000/6/1)

状態：出願公開中

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

出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態：審査請求済み

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

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態：出願公開中

(5) 「SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞

におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

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

出願番号：特願 2005-048064 (2005/2/23)

状態：出願中 (未公開)

(7) 「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)

状態：出願中 (未公開) (2005/10/28)

(8) 「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)

総合(分担)研究報告書

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

分担研究者 新井 盛夫、天野 景裕 東京医科大学

研究要旨:

(1) 遺伝子組換え活性型第 VII 因子(rFVIIa)は、インヒビター保有血友病患者の止血治療薬として臨床で広く用いられている。FVIIa は組織因子の存在下に第 X 因子および第 IX 因子を活性化することに加えて、リン脂質膜上で第 X 因子を直接活性化する機序が知られている。本研究ではプロトロンビンとFVIIaとの相互作用を検討した。FVIIaは陰性荷電リン脂質の存在下で濃度依存性にプロトロンビンの活性化を促進させ、その効果は第 Va 因子の存在下で著明に促進された。FVIIa は治療レベルの血漿濃度(50 nM)において、活性化血小板膜表面上でプロトロンビンおよび第 Va 因子と複合体を形成し、止血局所でのトロンビンバーストに寄与することが推測された。

(2) 27 人の日本人血友病 B 患者末梢白血球より DNA を抽出し、第 IX 因子遺伝子解析を行った。PCR 法により全エクソンおよびそのイントロン境界領域を増幅し、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。27名から 21 種類(ミスセンス変異 13 種類、ナンセンス変異 5 種類、スプライスサイト変異 3 種類)を検出し、これらはすべて点変異であった。エクソン 2 の Ala28→Pro、エクソン 4 の Gln50→Lys、エクソン 7 の Pro193→Leu、エクソン 8 の Leu300→Pro、イントロン 7 のドナースプライス部位での a→c 変異の 5 例は未報告変異であった。そのうちエクソン領域の 4 種のミスセンス変異 (A28P、Q50K、P193L、L300P) の変異体を作製し、哺乳動物細胞に発現させ、その細胞内合成、分泌動態を野生型と比較、検討した。4 種の変異体の発現実験の結果から、遺伝子解析で認められた各々の変異が FIX 活性の低下をもたらす血友病 B の原因となっていることが確認された。

A. 研究目的

1. 遺伝子組換え活性型第 VII 因子(rFVIIa)は、臨床的止血効果が高く、血栓性副作用が少ないことから、インヒビター保有血友病患者の止血治療薬として、臨床で広く用いられている。FVIIa は組織因子の存在下に第 X 因子および第 IX 因子を活性化することに加えて、リン脂質膜上で第 X 因子を直接活性化する機序が知られている。一方で、FVIIa は第 X 因子欠損症の止血に有効であったとする症例報告がある。また、FVIIa が第 X 因子欠乏血漿のプロトロンビン時間を短縮することも示されており、第 X 因子を介在しない止血機序の可能性

も示唆されている。我々は、FVIIa がウロキナーゼ(uPA)のクリングルドメインに結合し、線溶活性を増強させることを報告した(第 24 回日本血栓止血学会学術集会)。このような FVIIa のクリングルドメインとの相互作用を鑑み、2 個のクリングルドメインを有するプロトロンビンとの相互作用を検討した。

2. 血友病 B は血液凝固第 IX 因子(FIX)の質的・量的異常であり、関節出血や筋肉内出血などの反復症状を特徴とする。本症は X 染色体性劣性遺伝形式を呈し、本邦では 2004 年の血液凝固異常症調査で 872 人の患者の生存が報告されている。1985 年に第 IX 因子

遺伝子(F9)の全塩基配列が決定されて以来、血友病 B における遺伝子解析は、生化学的手法の発展と相まって、多くの知見が蓄積されてきた。血友病に対する遺伝子治療の応用のためには、遺伝子異常を含む患者個々の症例の情報が重要になる。そこで、本研究では、日本人血友病B患者の遺伝子異常を検出し、未報告の変異に関しては哺乳動物細胞による発現実験を行い、各遺伝子型と血漿レベルの表現型との関連や細胞内合成、分泌動態について検討した。

## B. 研究方法

### 1.

#### ① リン脂質リボソームの作成

phosphatidylserine (PS) および phosphatidylcholine (PC)をモル比 20:80 で混和し、ガラス試験管内で乾燥固着後、TBS 緩衝液中で超音波処理し、さらに孔径 50nm の膜を通して均一化したリボソームを作成した。対照として PC 100%のリボソームを同様に作成した。

#### ② FVIIa によるプロトロンビンの活性化

純化系でFVIIaによるプロトロンビンの活性化を、リン脂質リボソーム(PS/PC, 20/80; mol/mol)、第 VIII 因子(FVIII)、第 V 因子(FV)、第 Va 因子(FVa)の各種の組み合わせの存在下で測定した。各種濃度の各因子の混合液を 37°C で 20 分間反応後、トロンビンの生成を S-2238 の水解活性速度の変化から測定した。

#### ③ FVIIa とプロトロンビンの結合実験

Biotin-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone(BFPRck)で活性基をブロックした FVIIa をアビジンが誘導された SA センサーチップに固定化し、プロトロンビンとの結合性を表面プラズモン共鳴により測定した。

#### ④ FVIIa によるプロトロンビンの経時的な水解

FVIIa によるプロトロンビンの活性化反応を、経時的に 60 分後までサンプリングし、

SDS-PAGE 後に抗プロトロンビン抗体で western blotting した。別のサンプルは S-2238 の水解速度を測定した。

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

#### ① FIX 活性(FIX:C)および FIX 抗原量(FIX:Ag)の測定

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

#### ② 遺伝子解析

ゲノム DNA を患者末梢白血球よりフェノール・クロロホルム法で抽出し、F9 の 8 つのエクソンおよびそのイントロン境界領域を、設計した 8 対のプライマーを用い Polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。それぞれの PCR 産物のダイデオキシ法によるダイレクトシーケンシングを行った。塩基配列は、Yoshitake らの報告と比較し、それぞれの変異を確認した。検出した変異は The Haemophilia B Mutation Database-version 12 にて既存の報告例の有無につき確認を行った。データベースに登録のなかった変異は、制限酵素切断法にて対照者 50 人を用い、その頻度を確認し、変異かポリモルフィズムかの判別をした。制限酵素認識部位に対応のなかった 2 種類の変異は、それぞれ人工的に制限酵素部位を導入するため Mutagenic Primer を作製して PCR を行い、頻度を確認した。

#### ③ 変異 FIX プラスミドの作成

A28P、Q50K、P193L、L300P の 4 種を作成した。F9 発現のためのベクターには pcDNA3.1 を用い、F9 野生型を挿入し、発現ベクターを構築した。これをテンプレートとして、site-directed mutagenesis kit を用い、それ

ぞれの変異 FIX 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを得た。組み込まれた変異はダイレクトシーケンスにてその配列を確認した。

#### ④ リコンビナント FIX の発現

精製したプラスミドは HEK293 細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションを行った。ビタミン K1 を含む培養液で培養し、48 時間後の上清ならびに細胞を回収した。回収した細胞は凍結融解処理した後、細胞抽出液 NP40 を用い、細胞内抗原量測定用とした。

#### ⑤ 分子高次構造モデリング

変異タンパクの解析には、PDB(Protein Data Bank) コード「1PFX」、「1EDM」をもとに分子グラフィックスソフト RasMol を用いて FIX モデルを作成した。

### C. 研究結果

1. FVIIa は陰性荷電リン脂質(PS/PC)の存在下で濃度依存性にプロトロンビンの活性化を促進させた。その反応は補因子として FVIII による影響は認めなかったが、FVa の存在下で著明に促進し、水解効率は 2989 倍に高まった(km:  $4.6 \mu\text{M} \rightarrow 1.1 \mu\text{M}$ , kcat:  $0.0002 \text{ min}^{-1} \rightarrow 0.1429 \text{ min}^{-1}$ )。FV および FVa は共に濃度依存性に FVIIa によるプロトロンビンの活性化を促進させたが、後者は前者の約 10 倍の効率を示した。プロトロンビンと BFPRck-VIIa は KD 43 nM で結合した。FVIIa は PS/PC、FVa の存在下で 78 kDa のプロトロンビンを経時的に水解し、36 kDa の $\alpha$ -トロンビンのバンドが出現した。

#### 2.

##### ① FIX:C 及び FIX:Ag の測定結果と病型

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

満の重症であった。

#### ② 遺伝子解析

解析した 27 名全例から病因と考えられる 21 種類の点変異(ミスセンス変異 13 種類、ナンセンス変異 5 種類、スプライスサイト変異 3 種類)を検出した。エクソン 2 の Ala28 $\rightarrow$ Pro (A28P)、エクソン 4 の Gln50 $\rightarrow$ Lys(Q50K)、エクソン 7 の Pro193 $\rightarrow$ Leu(P193L)、エクソン 8 の Leu300 $\rightarrow$ Pro(L300P)、イントロン 7 のドナースプライス部位での a $\rightarrow$ c 変異の 4 例は未報告変異であった。これらの変異の部位は、FIX 蛋白質の Gla ドメインに 3 種類、EGF 様ドメインに 4 種類、活性化ペプチドに 1 種類、カタリティックドメインに 10 種類と、各ドメインに分散していた。1 例からはナンセンス変異(116Arg $\rightarrow$ Stop)とミスセンス変異(366Gly $\rightarrow$ Glu)を複合変異として検出した。またインヒビターを保有する 1 例からはナンセンス変異(310Trp $\rightarrow$ Stop)を検出した。未報告の 5 つの変異は制限酵素切断法により、ポリモルフィズムではなく変異であることを確認した。

#### ③ 発現実験による解析

A28P の血漿中 FIX:C は<1%の重症型、Q50K は 7%の軽症型、P193L と L300P は<1%の重症型であり、発現実験の結果、培養液中の FIX:C はそれぞれ 6%、4%、1%、<1%であった。4 種の血漿中 FIX:Ag は 39%、16%、未測定、<1%であるのに対し培養液中の FIX:Ag は 64%、77%、5%、5%であった。また、トランスフェクション後に回収した HEK293 細胞を破碎し測定したそれぞれの細胞内の FIX:Ag は 70%(A28P)、67%(Q50L)、92%(P193L)、39%(L300P)であった。

### D. 考察

1. 治療血漿濃度(50 nM)の rFVIIa は、酸性リン脂質膜上で FV (FVa)の存在下にプロトロンビナーゼ複合体(FVIIa/プロトロンビン/FV(a)/リン脂質)を形成し、局所にトロンビンを生成させることが推測された。出血局所に粘着

した血小板はその活性化に伴いリン脂質二重膜内側の酸性リン脂質が外側に反転 (flip-flop) し、さらに血小板内の FV は血小板活性化により $\alpha$ 顆粒から細胞膜表面に移動する。FVIIa とプロトロンビンの反応の場が、局所に濃縮、増幅されることは効率的な止血機序として極めて重要であると考えられる。FVIIa とプロトロンビンの反応動態の各パラメーターからは、本機構は、血中の生理的 FVIIa 濃度の約 500 倍の rFVIIa を付与した時に現れる薬理学的な止血機序と考えられ、また、これらの反応は液相中では起こらないことが理解できる。臨床的に rFVIIa 治療による血栓症や DIC の有害事象が非常に少ないことも本研究の知見が裏付けとなる。

rFVIIa は、元来インヒビター保有血友病患者の止血治療薬として臨床応用された。その後、各種の凝固因子欠損症や異常症、血小板機能異常症の出血治療にも応用され、さらには健常者の難治性出血、外科的出血、外傷出血にも有効であることが示されている。本研究で得られた知見はこれらの一般的止血機序の一部を説明しうるものであり、今後、各疾患で予定されている rFVIIa の臨床試験における基礎データとなる。

2. データベースには、2,511 症例の血友病 B の遺伝子異常が登録されており、それらは 896 種類の遺伝子異常からなり、F9 の変異の多様性が示されている。本研究では 5 種類のナンセンス変異を検出した。一般的にナンセンス変異や挿入・欠失などを有する症例は、成熟蛋白質分子が欠損しているために補充療法で投与された FIX を異物認識し、高率に同種抗体であるインヒビターを発生する可能性がある。本研究の 1 例のインヒビター保有症例でもナンセンス変異が検出された。4 種の変異体の発現実験の結果から、遺伝子解析で認められた各々の変異が FIX 活性の低下をもたらす血友病 B の原因となっていることが確認された。立体構造解析と発現実験結果により、各々の

変異についてその分子病理を考察する。

A28P は、Gla ドメイン内の変異で、患者の FIX:C は 1.0% 未満で、FIX:Ag は 39% であり、CRM-positive であった。分子高次構造モデリングの検討では、Ala28 からイミノ酸である Pro への置換は、Gla ドメイン全体の高次構造を歪ませることが考えられた。また、これは同一ヘリックス上に位置する Gla27 と Gla30 に影響を及ぼし、結果として  $Ca^{2+}$  結合の機能障害をきたすことが推測された。発現実験においては、A28P 変異体は、野生型 100% に比較して、培養上清中の FIX:C は 6% であり、患者血漿同様に分子異常を示した。しかし、培養上清中の活性が 6% あったことは、この変異体は  $Ca^{2+}$ -リン脂質結合が不完全ではあるが、残りの  $Ca^{2+}$  結合によって若干の活性を維持することが示唆された。

Gln50 $\rightarrow$ Lys (Q50K) は、FIX 分子の EGF-1 ドメイン内に検出したミスセンス変異であり、EGF-1 ドメインの点変異は、データベースには 179 例が登録されている。立体構造予測から、Q50K 変異体は、正常な  $Ca^{2+}$  結合配位は保たれず、野生型と異なった新たな EGF-1 ドメイン分子構造を呈し、 $Ca^{2+}$  結合機能が弱まるために機能異常を示すと考えられた。発現実験では培養上清中の FIX 抗原量は、患者血漿中の抗原量より増加していた。これは、変異 FIX タンパクの構造上の不安定さにより、血漿中においては、なんらかの作用を受け、易分解となっている可能性が示唆される。

2 つの変異、P193L と L300P は、プロテアーゼドメイン内に位置する変異である。データベースには、プロテアーゼドメイン内の変異は多数報告されており、またそれに相当する多彩な表現型が示されている。発現実験では、両変異とも、野生型とほぼ同程度に十分な細胞内合成が行われているが、高度な細胞外への分泌障害が認められた。立体構造解析からは、検出した両変異のアミノ酸の位置は、セリ



ンプロテアーゼ触媒活性に直接反応する活性触媒基などのアミノ酸残基からは離れて位置しており、これら 2 箇所の位置でのアミノ酸置換がセリンプロテアーゼ活性に直接的に影響を及ぼすことは少ないと考えられた。一方、両変異はそれぞれ、ドメイン分子表面上ではなく、分子内部に向かってβターンを形成していた。分子内部のターン上にあるアミノ酸に置換が起こると、そのアミノ酸近傍だけではなく、分子構造全体が破壊される可能性が推測された。

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

## E. 結論

1. 治療濃度の FVIIa(>50 nM)は、酸性リン脂質上でプロトロンビン、FV(a)と共にプロトロンビナーゼ複合体を形成し、トロンビンを生成する。
2. 血友病 B 患者の個々の症例において、F9 の遺伝子型を把握することは、ナンセンス変異、欠失、挿入などに起因する重症例における高率なインヒビター出現を考慮し、慎重に補充療法を進めるうえで重要である。また、今後の本邦での遺伝子治療の臨床応用に向け、遺伝子型の把握は基礎データとして不可欠である。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 日笠 聡、三間屋純一、新井盛夫、白石 陸、小松京子、吉岡章 ほか: 血友病家庭療法の再評価と保険適応外治療の方向性. 血栓止血誌 2003; 14(2):134-159
2. 萩原剛、新井盛夫、山中晃、藤田進、高橋一郎、川田和秀、大石毅、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸: 血友病ハイ

レスポンドーインヒビター保有患者に対する凝固因子製剤によるインヒビターの中和と持続輸注療法. 血栓止血誌 2003; 14(4):337-344

3. 日笠 聡、新井盛夫、嶋緑倫、白幡聡、田昇、高松純樹、瀧正志、花房秀次、福武勝幸、三間屋純一、吉岡章: 血友病在宅自己注射療法の基本ガイドライン. 血栓止血誌 2003; 14(4):350-358
4. 新井盛夫: Inhibitors in Patients with Haemophilia 日本語版刊行にあたって. 2003
5. Kaneko M, Cuyun-Lira O, Takafuta T, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Ohtsuki K, Ohnishi M, Arai M, Yatomi Y, Ozaki Y: Mechanisms of platelet retention in the collagen-coated bead column. J lab Clin Med 2003; 142:258-267
6. Nagaizumi K, Inaba H, Amano K, Suzuki M, Arai M, Fukutake K: Five novel and four recurrent point mutations in the antithrombin gene causing venous thrombosis. Int J Hematol 2003; 78:79-83
7. 佐々木昭仁、永泉圭子、稲葉 浩、鈴木隆史、新井盛夫、福武勝幸: 日本人血友病 B 患者に認められた 18 種類の遺伝子変異. 血栓止血誌 2004; 15(2):107-113
8. Takedani H, Mikami N, Kawasaki N, Abe Y, Arai M, Naka H, Yoshioka A: Excision of pseudotumour in a patient with haemophilia A and inhibitor managed with recombinant factor VIIa. Haemophilia 2004; 10:179-182
9. 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

10. 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
11. 天野景裕:血液検査 血液凝固因子. Medicina 増刊号 42(12):116-117、2005

#### 学会発表

1. 新井盛夫、高山朋子、高橋敬: 活性化第 VII 因子によるプロトロンビンの活性化.
2. 高橋敬、新井盛夫、中村伸: クリングルと凝固因子 VII/ 組織因子(TF)で再構成したグリセリン処理細胞の線溶・凝固活性. 第 26 回日本血栓止血学会学術集会、2003 年、東京
3. Amano K, Fujita S, Tanaka A, Nishida Y, Arai M, Fukutake K. Serious cervical bleeding in hemophilia. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 18, 2004 Bangkok, Thailand
4. Suzuki T, Arai M, Sasaki A, Shu A, Uchida T, Otaki M, Ogata K, Amano K, Nishida Y, Fukutake K. A single-center clinical survey on the treatment of acquired Haemophilia: A series of 14 cases. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 20, 2004 Bangkok, Thailand
5. Suzuki Y, Fukutake K, Amano K, Uchida T, Kagawa K, Nishida Y, Arai M. The assessment of home

treatment in long-term prevention of chronic arthropathy in patients with haemophilia. XXVIth International Congress of the World Federation of Hemophilia. October 20, 2004 Bangkok, Thailand

6. 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
7. Fukutake K, Nakayama H, Nishiwaki K, Oyo Y, Baba Y, Tanabe H, Koshihara K, Kagawa K, Amano K: Standardization of assays for plasma fibrin-fibrinogen degradation products. 20th International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress. 2005, Sydney, Australia
8. Shinozawa K, Inaba H, Amano K, Suzuki T, Takahashi H, Iijima K, Tanaka A, Arai M, Fukutake K: Factor V mutations, Arg2174Leu, a 5-bp deletion and Val1813Met, are associated with Factor V deficiency and a bleeding tendency. 20th International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress. 2005, Sydney, Australia
9. 天野景裕:血友病における検査. 第 6 回ヘモフィリア・ケアナースセミナー、2005 年、仙台
10. 辻川昭仁、鈴木隆史、加藤宏基、天野景裕、高明志、清田育男、福武勝幸:

RIPA-test kit を用いて止血管理を行った von Willebrand 病の手術 5 症例。  
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

11. 藤井輝久、高田昇、日笠聡、酒井道生、竹谷英之、櫻井嘉彦、花房秀次、小阪嘉之、天野景裕、嶋緑倫、吉岡章：日本の血友病患者の入院医療コストの集計他施設共同研究。第 28 回日本血栓止血学会学術集会、2005 年、福岡
12. 篠澤圭子、天野景裕、鈴木隆史、稲葉浩、飯島憲司、高橋芳右、福武勝幸：出血症状が異なる先天性第 V 因子欠乏症ホモ接合体 2 症例：R2174L と V1813M。第 28 回日本血栓止血学会学術集会、2005 年、福岡
13. 尾形享一、辻川昭仁、加藤宏基、天野景裕、西田恭治、森康治、勝又健次、青木達也、福武勝幸：後天性 von Willebrand 病の大腸癌手術における止血管理を経験した一例。第 47 回日本臨床血液学会、2005 年、横浜
14. 辻川昭仁、篠澤圭子、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

#### G. 知的所有権の取得状況

特に無し。

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

血友病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者 北村義浩

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 助教授

#### 研究要旨

血友病の遺伝子治療において治療遺伝子を標的細胞に効率よく導入し安定的に維持させて当該遺伝子を発現させることが必要である。まずこの目的にウイルスの高い火難先生あるいは持続感染能力を利用することを考えた。まずヒト免疫不全ウイルス（HIV）を基にしたベクターが用いる事を考えた。しかし、効率の良い安全な HIV ベクターを確立するためには未だ解明すべき点が多い。HIV は感染後細胞内でウイルスゲノム RNA を相補 DNA に変換して組み換え前複合体を形成し、その後核内に移行し宿主染色体に入り込む。この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにし、これをベクター開発に応用することを目的とし研究を行った。HIV のウイルス中央多プリン配列 (cPPT) を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるといよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量を低下させる働きのあることも明らかにした。次いで血液凝固因子は肝臓で合成されるので、肝臓細胞に遺伝子を安定的に維持させる方法として慢性肝炎の起因ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) をもとにして遺伝子ベクターを開発することを考えた。劇症肝炎由来の HCV に由来する RNA レプリコンを作製し、培養肝臓細胞に導入した。マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を用いた場合にはで長期にわたって維持された。しかし緑色蛍光タンパク質遺伝子をマーカー遺伝子として用いた場合には維持されなかった。今後マーカーによる違いのメカニズムを明らかにし、血液凝固因子を安定的に維持させる方法を開発する必要がある。

#### A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD 4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素 (RT) によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素(IN)を

含む様々なタンパク質とともに沈降係数が 300S 以上の大きな核酸-タンパク質複合体 (組み込み前複合体、preintegration complex; PIC) を形成する。しかし、この構造について、cDNA、IN、RT が含まれること以外は、具体的なことはほとんど分かっていない。PIC に Vpr、MA、な