

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
(H18-エイズ-一般-003)

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19（2007）年3月

主任研究者 坂 田 洋 一
(自治医科大学)

目 次

I.	総括研究報告	
	血友病の治療とその合併症の克服に関する研究	1
	(自治医科大学 坂田洋一)	
II.	分担研究報告	
1.	血友病遺伝子治療基礎実験(分子生物学的解析)、血友病遺伝子治療の基礎実験	11
	(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.	血友病(マウスおよびイヌモデル)の遺伝子治療および成熟肝細胞・ES細胞を用いた細胞治療	20
	(奈良県立医科大学 吉岡 章)	
4.	血友病治療のための新しい遺伝子導入法の開発	25
	(自治医科大学 小林英司)	
5.	遺伝子治療用SIVベクターのデザインならびに治療用遺伝子搭載ベクターの作製とその応用に関する研究	29
	(ディナベック株式会社 長谷川 護)	
6.	先天性第V因子欠乏症と血小板内第V因子の解析	34
	(東京医科大学 天野景裕)	
7.	遺伝子治療の臨床試験を安全に行うための治験病院としての体制構築 —— 血友病性関節症の手術におけるチーム医療をモデルにして	38
	(東京大学医科学研究所附属病院 小田原 隆)	
8.	血液凝固異常症のQOLに関する研究	41
	(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	56
IV.	研究成果の刊行物・別刷	59

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究
主任研究者 坂田洋一 自治医科大学 教授

研究要旨

血友病患者の不慮の出血死を防ぎ、cure をもたらし、さらに血液製剤使用量を減らすことが可能なことから、社会にも資することの大きい血友病遺伝子治療の臨床応用に向けた基礎的検討と、血液製剤使用で問題になるインヒビタ対策、そして患者の QOL を高めるための調査研究アンケート作成についての研究を展開した。遺伝子治療においては、マウスを用いた実験の結果、直接体内臓器を標的に遺伝子導入する場合の AAV ベクター血清型を、筋肉、脂肪細胞などの終末細胞には 1 型を、そして肝臓には AAV8 と AAV9 ベクターを、適切なプロモータとともに選択した。一方、自己の幹細胞、もしくは肝細胞を取り出し、*ex vivo* で遺伝子導入し、細胞を自己へ再移植する場合は、SIV ベクターと、AAV Rep 遺伝子を利用した。AAV ベクターを利用したマウスを用いた遺伝子治療実験では、免疫抑制剤なしに既に第 VIII、第 IX 因子とも 2 年近く治療レベルの発現が維持されている。サルではヒトとサルの第 IX 因子を鑑別しうるモノクロナル抗体を作製し、AAV1 ベクターを用いて筋肉細胞へ遺伝子を導入し、治療レベルの第 IX 因子発現が長期に維持できている。AAV9 ベクターを利用した肝臓への遺伝子導入は、治療レベルの第 IX 因子の発現が得られた。しかし、最もマウスで高発現の見られた AAV8 ベクターを利用した遺伝子治療は、既にサルに存在した抗 AAV8 中和抗体のために治療レベルの因子発現は得られなかった。抗 AAV 中和抗体測定系の感度改善を行うとともに、免疫抑制剤の使用方法を工夫して、新規実験を実施中である。体外でマウス自己血液幹細胞に SIV ベクターを用いて FVIII 遺伝子を導入し、GPIIb プロモータを利用して、*in vivo* で血小板に FVIII を発現させることでインヒビタ対策と局所止血能を高める技術は、ほぼ完成した。インヒビタ対策も念頭に血小板に FVIIa を発現させる応用編も期待以上の止血効果が得られた。検討中のインシュレータの応用を含めた安全性が確認できれば臨床応用も可能であると考ええる。自己肝細胞を用いた異所性移植は、*ex vivo* で特殊なマウスを工場として移植肝細胞の増殖を図ることが可能になった。AAV S1 領域に特異的に目的遺伝子の組み込みを図ることが可能な AAV Rep 遺伝子を用いた遺伝子治療の基礎的検討の結果、*ex vivo* 実験では、期待できる結果が得られた。胸腺を標的にした免疫寛容誘導は一定の成果が得られ、寛容誘導の機序として Th1 応答性低下と FVIII 特異的制御性 T 細胞誘導が確認された。患者 QOL 向上を目指した調査研究の調査案が医師、医療スタッフ、患者代表の協力で完成し、次年度配布の準備が整った。

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

講師 天野景裕

東京大学医科学研究所附属病院

講師 小田原 隆

聖マリアンナ医科大学

助教授 瀧 正志

A.研究目的

血友病は血液凝固第 VIII、(FVIII)或いは、第 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 が中心である。因子製剤の改良により HIV や HCV の感染は解決し、安定剤としてのアルブミン添加なしで安定な製剤が開発され、補充や運搬も以前に比べると容易になった。しかし、製造過程に伴う種々の夾雑物の混入や未知のウイルスに対する問題は依然として残っている。また、生命予後に最も関連の深い不慮の頭蓋内出血の予防は不可能である。その他、因子製剤輸注に伴うインヒビタ発生の問題や、これまでの血友病の歴史に見られる種々の社会的問題など解決すべき問題は数多い。そこで、患者 QOL を高めるために(I)血友病に cure をもたらし、製剤使用量を激減させることで経済効果も期待できる遺伝子治療と、(II)遺伝子治療でも問題となるインヒビタ対策の研究と、(III)患者の視点から血友病における社会的諸問題の調査研究を目的に研究を展開する。本年度は、遺伝子治療は、マウスを用いた動物実験の総括と、近未来の臨床応用を視野に、中型動物を対象にした検討を開始することを、インヒビタ対策は成人にも適用可能な免疫寛容誘導法開発とインヒビタを回避しうる遺伝子治療の基礎的検討を、そして、患者参加型の調査研究については、薬剤の副作用のみならず患者を取り巻く環境の社会的問題を含めて多面的に患者の視点に立って調査研究しうるアンケート案の作成を、目的とした。

B.研究方法

(I) 遺伝子治療：これまでの成果を基礎に展開する研究と併行して、いくつか breakthrough を狙った探索的検討も行う

た。

治療に用い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、特定の AAV S1 領域に組み込み可能な AAV Rep 遺伝子の利用、さらに、非分裂細胞に遺伝子導入可能でサルやヒトに病原性の報告のないアフリカミドリザルから単離したレンチウイルスの一種である SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、(a) 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、(b) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する場合には AAV Rep 遺伝子或いは SIV ベクターを用いた。実験は、まずマウスを用いて、基礎的検討を繰り返し、ついで成果を血友病イヌとサルで確認するという方針で進める。

1) AAV ベクターの利用では、臓器特異性を指標に AAV ベクター血清型とプロモータを選択して、発現効率の改善と安全性を高める検討をした。サルには血友病は存在しないし、実験的に血友病サルを作製することは倫理的に問題がある。サルに血友病因子を遺伝子組み込みにより発現させた場合、その因子を既存の因子と区別して測定することが組み込みの成果を検討するために不可欠である。幸い FIX に関してはサルとヒトの FIX を区別可能なモノクロナル抗体の生成に成功した。そこで、サルの実験ではインヒビタ産生を減少させるため一アミノ酸のみヒト型に置換した点変異改変サル型 FIXcDNA を調整し、発現因子をこのヒト型アミノ酸を含む構造に特異的なモノクロナル抗体で定量して遺伝子治療効果を判定した。しかし、FVIII に関しては、これまでに特異なモノクロナル抗体作製に成功していない。その作製計画を続行するとともに、発現因子に c-Myc や FLAG など

の Tag を付加し、これを利用して測定する試みを検討した。

また、遺伝子治療において極めてクリティカルなベクターの感染効率を左右するサルに既存する抗 AAV 中和抗体の既存の測定系の測定感度を上げるための工夫を進めた。

2) 血友病マウス由来血液幹細胞に体外で GPIIb プロモーターの下流に配置した FVIII 遺伝子を SIV ベクターを利用して導入し、血友病マウスに再移植し、血小板への選択的発現と止血効果などを検討した。ベクターの染色体への random integration に対する安全性を担保するために、インシュレーターを導入を図った。SIV ベクターの gag/pol および rev のコドン全てをヒト使用のコドンにしたヒト化 gag/pol 合成遺伝子を作製し、パッケージングプラスミドの再構築を図り、安全性と産生効率向上を目指した。さらに、より普遍的な SIV ベクターの機能力価測定法として SIV ベクターの遺伝子組み込み部位の数を測定する方法を検討した。AAV の ITR 部位の Rep 結合部位と相同な配列が染色体の AAV S1 領域に存在することにより組み込み部位特異性がもたらされる AAV Rep 遺伝子を用いて間葉系幹細胞に第 IX 遺伝子導入を図った。成熟肝細胞を単離し、細胞外マトリックスを利用して、腎皮膜下に移植する方法を実用化に向けて改良した。移植細胞数を実用化レベルにあげるために uPA/SCID マウスの肝臓をマウス及びイヌの移植肝細胞の選択的増殖工場として利用を試みた。探索的検討としては、AAV ベクターを利用した相同組み換えによる完全な遺伝子治療の試みや、ES 細胞の利用、さらに発現 BDDFVIII の生理機能確認のためのよりヒトに近い動物、血友病ブタの作製の基礎実験も進めた。

II. インヒビタ対策：上記血小板への FVIII 発現の試み以外に、インヒビター患者に用いられる FVIIa を血小板へ特異的に発現する検討も始めた。また、超高解像度エコーガイド下に成熟血友病 A マウスの胸腺組織へヒト FVIII 或いは FVIIIcDNA 搭載ベクターを注入し、免疫寛容誘導の可能性を検討した。寛容誘導機序の解明は寛容マウス、インヒビター出現マウス脾臓より、抗原提示細胞、T 細胞、さらに CD4⁺CD25⁺細胞を分離し、T 細胞の増殖を thymidine の取り込みを比較観察することで検討した

III. 調査研究：これまでの凝固異常症全国調査のネットワークを基に医療施設の担当医、その他の医療スタッフ、そして患者代表の方に参加して頂き、疾患、出血頻度、自己注射、定期補充療法、筋骨格障害、HIV/HCV 感染、肝炎、ADL 社会生活、差別などについてのアンケート調査用紙を作成し、これを配布する。

(倫理面への配慮)

ウイルスベクターの取り扱いについては「遺伝子組み換え生物らの使用らの規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、「組み替え DNA 実験指針」(平成 14 年 1 月 31 日付け文部科学省告示第 5 号)を遵守して施行する。

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)を遵守して施行する。動物実験は、動物倫理面(動物愛護上の配慮など)を含めて各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究セ

センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚生労働省の倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）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とる。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16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守し、国の倫理指針（平成15年7月30日施行、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。又、学内委員会及び必要な場合は国レベルの審査を経た上で実施する。疫学調査に関しては疫学研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第1号）を遵守して施行する。

C. 研究結果

(I)

1) マウスでは AAV1 ベクターを用いて、血管内皮細胞、筋肉細胞、脂肪細胞などで治療レベルの、又 AAV8 ベクター（サル由来）や AAV9 ベクター（ヒト由来）を利用して肝臓で 100%以上の血友病因子の年余にわたる発現が免疫抑制剤なしで可能となっている。安全性にも問題はない。血友病 B モデルでは、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 プロモータを利用することで、TGF- β 投与でプロモータ活性を制御し、FIX の発現調整可能であった。この成果を基にサルで検討した。サルについては、まず、サル型 FIX- Thr262Ala の点変異 cDNA を搭載した AAV1 ベクターを筋肉に投与し、数%から 40%の血中レベルが長期間観察されている。次に、AAV8 がサル由来であることから、既存の抗体測定法で抗体陰性のサルを選んで、マウスでは数 100%もの血中レベルがえられる AAV8 ベクター

を用いて肝臓でサル型改変 FIX 発現を試みたが、1%以下の発現しか得られなかった。改変 FIX に対するインヒビターは存在しなかった。既存の感度の低いアッセイ系を改善し、測定すると AAV8 に対する中和抗体が管理下の殆どのサルに存在することが明らかになった。中和抗体活性の殆ど見られない AAV9 ベクターを用いて肝臓での発現を試みると、治療量の発現持続が確認され、肝臓での長期発現は期待できることが明らかになった。そこで、既存の抗 AAV8 ベクター抗体を、予め数ヶ月前から免疫抑制剤を投与して低下させ、肝臓へ遺伝子を導入する試みが現在進行中である。

2) 血液幹細胞に *ex vivo* で SIV ベクターを用いて遺伝子を組み込み、GPIb プロモータを利用して血小板に第 VIII 因子、或いは第 VIIa 因子(FVIIa)を発現させる方法は、血小板活性化に伴い血中に因子が放出されることや、血友病マウスの凝固時間を短縮することが明らかになった。また、tail-cut 後の出血抑制に効果的であり、*in vivo* でも機能していることが示唆された。トリβグロビン遺伝子のインシュレータ組み込みは、導入遺伝子のエンハンサー機能の抑制や導入遺伝子のサイレンシング抑制などに一定の機能を果たすことが確認された。SIV ベクターの産生効率と安全性向上の試みは当初の計画通り進行中である。AAV Rep 遺伝子を利用した間葉系幹細胞の染色体 AAVS1 領域への FIX 遺伝子の特異的組み込み効率は、組み込み陽性細胞の約 10%と高値であった。現在、マウスへの移植実験が進行中である。分離肝細胞を uPA/SCID マウスに移植した結果、移植肝細胞のみの選択的増殖が確認され、ドナーと同系マウスの腎皮膜下への安定生着も確認できた。マウス ES 細胞 (Ainv18) へヒト第 VIII 因子遺伝子を導入後、マウス移植した実験

では、内胚葉系分化条件下で微量のヒト FVIII の発現が観察された。

(II) インヒビタ：インヒビタ治療に用いる FVIIa を血小板内に限局発現させる遺伝子治療は、循環血液中に FVIIa は認めず、しかも局所で止血を促進させる可能性が示唆された。胸腺組織への FVIII の *in vitro* 暴露で抗原特異的免疫寛容が誘導され、機序として Th1 応答性低下と FVIII 特異的制御性 T 細胞誘導が確認された。

(III) 患者 QOL を高めるための調査研究の調査案が医師、医療スタッフ、患者代表の協力で完成し、次年度配布の準備が整った。

D. 考察

(I) 遺伝子治療：全体として、かなりの進歩が見られ、臨床研究に入る準備は徐々に整いつつあると思われる。

1) 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。ヒト応用には、日本では高次動物及び非ヒト霊長類での長期安全性の十分な検討が必要と考えられる。しかし、マウスで得られた結果をサルで確認するにあたり、問題点が2つある。一つはサルには血友病が存在しないことである。従って、実験の評価には正常サルに遺伝子導入をして、発現した血友病因子を定量する手段が不可欠である。サルとヒトでは FVIII と FIX は 97%以上の相同性がある。幸い FIX に関しては識別するモノクロナル抗体を作製し得たために、これを利用して実験を進め、既に治療レベルの因子を発現しうる技術は達成した。しかし、FVIII に関しては、識別のためのこれまでの試みは未だ実用レベルに達していない。今後の課題であり、全力を挙げて取り組んでいる。もう一つの問題は、AAV ベクターがヒト或

いはサル由来であるために、既にベクターに対する抗体を有しているサルが多いことである。遺伝子治療効率を上げるためには、治療前に存在する抗ベクター抗体への対処が重要である。抗体価測定系の改良をさらに進め、サルを慎重に選択するとともに、免疫抑制薬の効果的な使用方法なども今後の課題であろう。

2) 骨髄巨核球に FVIII を発現させ、血小板に出血部位へ運搬させることは、理に適っている。インヒビタが存在しても出血部位で放出され局所濃度が上昇するために殆どインヒビタの影響も受けない優れた方法で、国際的にも評価されており、学術的価値も高い。インヒビタ治療に用いられる FVIIa を血小板に発現させる方法は、まだ十分な解析は進んでいないが、インヒビタ症例には極めて有効であろう。実用化には SIV ベクターの一層の安全性確立と実用レベルの産生確保が必要である。インシュレータ組み込み効果を今後詳細に検討予定である。AAV Rep 遺伝子を利用した染色体特異部位への FIX 遺伝子の組み込みは、効率も高く発ガン性などの危険のない、究極的な遺伝子治療に発展する可能性を秘めている。異所性移植では uPA/SCID マウスで選択的に増殖させた成熟幹細胞の特異的な分離が今後の課題になる。

臨床研究実施のための実質的な取り組みを開始しているが、ベクターの Patent の問題は国レベルの支援が必要になると思われる。遺伝子治療が達成できれば、患者の cure、キャリアの精神的解放、製剤の使用量の減少など社会的意義ははかりしれない。

(II) インヒビタ対策：寛容誘導は遺伝子治療への利用だけではなく、製剤によるインヒビタ産生に対する治療にも応用可能である。

取り組んでいる方法は独創的ではあるが、

これから解決すべき課題は多い。AAV ベクターに対する寛容誘導が得られれば、繰り返し治療も可能になり、遺伝子治療に果たす役割も大きい。

(III)調査研究:患者参加型の QOL 向上のためのアンケート案作成は、一応の完成を見たが、ウェブの利用などを通してフィードバックしながら質を高めていく必要があると考える。

E.結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても、又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマウスレベルでは確立出来た。しかし、ベクターの安全性を含めて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。血友病イヌ及びサルを用いた前臨床試験の充実がヒト臨床応用開始前に不可欠であるが、問題点が明らかにされているので、克服は時間の問題であると思われる。インヒビタに対する免疫寛容誘導法に関しては成人に対する有効な治療の確立が今後の課題である。患者の QOL 向上のための調査研究も大きな一歩を踏み出した。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

1. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells*. 25(1):115-24, 2007.
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*. 119(2):229-40, 2007.
3. Madoiwa S, Nunomiya S, Ono T, Shintani Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y: Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol*. 84(5):398-405, 2006.
4. 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 J*. 20(9):1522-4, 2006.
5. Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y: A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost*. Aug;4(8):1738-46, 2006.
6. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J. Thromb. Haemost*. (4)1271-1278, 2006.
7. Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Okada T, Mizukami H, 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*. 118(5):627-35, 2006.
8. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*. 17(9):921-8, 2006.
9. 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*. 8(8):990-7, 2006.
10. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田

- 洋一:非ヒト霊長類モデルを用いた血友病B遺伝子治療の基礎的検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17巻5号P610,2006.
11. 柏倉裕志, 三室淳, 石渡彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病A遺伝子治療前臨床試験へ向けた標識カニクイザルFVIIIの遺伝子導入(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17巻5号P609,2006.
 12. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来のAAVベクターを用いた検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17巻5号P608,2006.
 13. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋二, 小澤敬也: 8型AAVベクターのin vivo投与における効果と肝臓への強指向性(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17巻5号Page608,2006.
 14. 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: 血液凝固第VII因子の発現による止血反応を強化した血小板の作成(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17巻5号P595,2006.
 15. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病B遺伝子治療におけるAAVベクターの有用性(会議録)臨床血液(0485-1439)47巻9号P1170,2006.
 16. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: AAVベクターによる肝臓を標的とした血友病B遺伝子治療の検討(会議録)臨床血液(0485-1439)47巻9号P1169,2006.
 17. Ideno, J., Mizukami, H., Kakehashi, A., Saito, Y., Okada, T., Urabe, M., Kume, A., Kuroki, M., Kawakami, M., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19: 75-9, 2007.
 18. Takei, Y., Mizukami, H., Saga, Y., Yoshimura, I., Hasumi, Y., Takayama, T., Kohno, T., Matsushita, T., Okada, T., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 120: 278-84, 2007.
 19. Wang, X.T., Liu, P.Y., Tang, J.B., Mizukami, H., Xin, KQ., Ozawa, K., Ushijima, H.: Tendon healing *in vitro*: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. *Plast Reconstr Surg* 119: 227-34, 2007.
 20. Xin, KQ., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa, K., and Okuda, K.: The induction of robust immune responses against HIV is supported by the inherent tropism of AAV5 for DC. *J Virol* 80: 11899-910, 2006.
 21. Zhang, Y., Wang, C., Mizukami, H., Itoh, H., Kusama, M., Ozawa, K., Jinbu, Y.: Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 25: 417-23, 2006.
 22. 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* 13: 823-8, 2006.
 23. 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* 13: 738-46, 2006.
 24. Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A. Mechanisms of Plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: A crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem.* 282: 5287-95, 2007
 25. Takeyama M, Sakurai Y, Shima M, Matsumoto T, Nogami K, Tanaka I, Takeda T, Giddings JC, Yoshioka A. Heparin-induced inhibitory effects of a prothrombin complex concentrate on global tests of haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 18: 1-7, 2007.
 26. Suzuki H, Shima M, Nogami K, Sakurai Y, Nishiya K, Saenko EL, Tanaka I, Yoshioka A. Factor V C2 domain contains a major thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed factor V activation. *J Thromb Haemost.*

- 4: 1354-60, 2006
27. Yoshioka A, Fukutake K, Takamatsu J, Shirahata A. Kogenate Post-Marketing Surveillance Study Group. Clinical evaluation of recombinant factor VIII preparation (Kogenate) in previously treated patients with hemophilia A: descriptive meta-analysis of post-marketing study data. *Int J Hematol*. 84:158-65, 2006
 28. Kuwahara M, Yurugi S, Takeda M, Fukuda K, Yoshioka A. Hemophilia B diagnosed by hematoma at the columella base. *Plast Reconstr Surg*. 117:1647-8, 2006
 29. Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, Giles AR, Yoshioka A. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*; 4: 377-84, 2006
 30. Inoue T, Shima M, Takeyama M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Sakurai Y, Giddings JC, Yoshioka A. Higher recovery of factor VIII (FVIII) with intermediate FVIII/von Willebrand factor concentrate than with recombinant FVIII in a haemophilia A patient with an inhibitor. *Haemophilia*. 12: 110-3, 2006
 31. Sakurai Y, Shima M, Imai Y, Omura S, Kirita T, Yoshioka A. Successful use of recombinant factor VIII devoid of von Willebrand factor during multiple teeth extractions in a patient with type 3 von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 17:151-4, 2006.
 32. 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, 大阪嘉之, 天野景裕, 嶋緑倫, 吉岡章. 日本の血友病類縁疾患患者の入院医療コストの集計 多施設共同研究. *日本血栓止血学会誌* 17: 446-453, 2006
 33. 白幡聡, 岡敏明, 福武勝幸, 新井盛大, 花房秀次, 瀧正志, 長尾大, 三間屋純一, 芳賀信彦, 高松純樹, 神谷忠, 嶋緑倫, 垣下榮三, 竹谷英之, 高田昇, 小林正夫, 内田立身, 小野織江, 吉岡章. インヒビター保有血友病患者における遺伝子組換え活性型血液凝固第VII因子製剤(注射用ノボセプン)の長期的安全性および有効性, 5年間の市販後調査中間解析報告. *日本血栓止血学会誌* 17: 331-344, 2006
 34. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. : Naked plasmid DNA Transfer to the porcine liver using rapid injection with large Volume. *Gene Ther* 13: 1696-1702, 2006.
 35. Miki, A., Narushia, 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., 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* 15(4):325-334, 2006.
 36. Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. Persistent Gene Expression Over the Life-time of Airway Epithelial Cells Transduced by Lentiviral Vector Pseudotyped with Envelope Proteins F and HN from Sendai Virus. *J. Gene Med.* 8:1444 2006
 37. 内田泰斗, 天野景裕, 篠沢圭子, 稲葉浩, 福武勝幸: 血友病 A 患者に認められた第VIII因子 A1 ドメイン内のミスセンス変異 Asp116Asn の分子病態. *東京医科大学雑誌* 64(4) : 380-387, 2006
 38. 天野景裕: 臨床的検査データのとらえ方. *Medical Technology* 34(11) : 1157-1160, 2006
 39. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, Iwamoto A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase I trial. *J. Med. Virol.* 78: 711-18, 2006.
 40. Koga I, Odawara T, Matsuda M, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A. Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis. *Microbes Infect.* 8: 2872-2879, 2006
 41. 山崎哲, 細谷由紀子, 鈴木典子, 山崎法子, 安室洋子, 高山成伸, 大井千愛, 瀧正志: 循環抗凝血素を有する症例における凝固因子活性測定. *日本検査血液学会誌* 7(2) : 270-277, 2006
- 学会発表
1. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデルを用いた血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討. 第29回日本血栓止血学会学術集会、2006年11月16-18日 宇都宮
 2. 柏倉裕志, 三室淳, 石渡彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 A 遺伝子治療前臨床試験へ向けた標識カニクイザル FVIII の遺伝子導入. 第29回日本血栓止血学会学術集会、2006年11月16-18日 宇都宮
 3. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 下部匡司, 久米晃

- 啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来のAAVベクターを用いた検討. 第29回日本血栓止血学会学術集会, 2006年11月16-18日 宇都宮
4. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 8型AAVベクターのin vivo投与における効果と肝臓への強指向性. 第29回日本血栓止血学会学術集会, 2006年11月16-18日 宇都宮
 5. 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: 血液凝固第VII因子の発現による止血反応を強化した血小板の作成. 第29回日本血栓止血学会学術集会, 2006年11月16-18日 宇都宮
 6. 三室淳: 出血傾向 病態・診断・治療の新展開 血友病遺伝子治療. 第29回日本血栓止血学会学術集会, 2006年11月16-18日 宇都宮
 7. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病B遺伝子治療におけるAAVベクターの有用性. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日 福岡
 8. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: AAVベクターによる肝臓を標的とした血友病B遺伝子治療の検討. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日 福岡
 9. 辰巳公平, 大橋一夫, 駒井悠一, 片岡美穂, 立野知世, 吉里勝利, 久永倫聖, 金廣裕道, 嶋緑倫, 中島祥介, 吉岡章. uPA/SCIDマウスを用いた血友病B肝細胞移植治療モデルの確立. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日.
 10. 松本智子, 野上恵嗣, 嶋緑倫, 武山雅博, 田中一郎, 吉岡章. 活性型第VII因子(F VII a)による第VIII因子(F VIII)活性化機構. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日.
 11. 武山雅博, 野上恵嗣, 松本智子, 櫻井嘉彦, 田中一郎, 吉岡章, 鈴木司, 服部有宏, 嶋緑倫. 第VIII因子活性増強作用を有する第VIII因子(F VIII)A1/A3ドメイン認識抗体. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日.
 12. 野上恵嗣, 嶋緑倫, 西屋克巳, EvgueniSaenko, 武山雅博, 田中一郎, 吉岡章. 第VIII因子(F VIII)重鎖A2ドメイン上におけるプラスミンの結合部位の同定. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日.
 13. 粕田承吾, 櫻井嘉彦, 嶋緑倫, 久保篤史, 吉岡章. 血友病A細胞療法に向けたヒト第VIII因子発現マウスES細胞の樹立. 第68回日本血液学会総会, 第48回日本臨床血液学会総会, 2006年10月6-8日.
 14. 櫻井嘉彦, 吉田幸一, 吉岡章. 免疫寛容療法施行中のインヒビター保有血友病A患者におけるT細胞レセプターレパトワの経時的変動. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2006年5月30-6月1日.
 15. 武山雅博, 野上恵嗣, 添田哲弘, 吉岡章, 嶋緑倫. プロテインSによる第VIII因子制御機構. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 16. 野上恵嗣, 嶋緑倫, 西屋克巳, 武山雅博, 田中一郎, 吉岡章. 第VIII因子軽鎖A3ドメイン上におけるプラスミン結合部位の同定. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 17. 竹田知広, 櫻井嘉彦, 嶋緑倫, 武山雅博, 吉田幸一, 野上恵嗣, 柴田優, 田中一郎, 吉岡章. 蛍光ビーズを用いた新規抗第VIII因子抗体測定法の開発. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 18. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 松下正, 三間屋純一, 嶋緑倫. 本邦における後天性凝固因子インヒビターの前方視的調査研究. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 19. 嶋緑倫, 松本智子, 野上恵嗣, 櫻井嘉彦, 武山雅博, 吉田幸一, 田中一郎, 吉岡章. 後天性血友病Aタイプ2におけるトロンビン生成能. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 20. 濱田匡章, 杉本充彦, 水野智寛, 志田泰明, 西尾健治, 吉岡章. 全血流動状況下でのメシル酸ガベキサートの抗血小板メカニズムの解析. 第29回日本血栓止血学会学術集会 2006年11月16-18日.
 21. 辰巳公平, 大橋一夫, 久永倫聖, 金廣裕道, 片岡美穂, 立野知世, 吉里勝利, 中江大, 嶋緑倫, 吉岡章, 中島祥介. 分離肝細胞の遠距離輸送試験および移植実験-肝細胞移植治療の実現化に向けた検討. 第13回肝細
 22. Tabata T., Mitomo K., Inoue M.,

- Yoshizaki M., Ikeda Y., Yonemitsu Y. and Hasegawa M. Retinitis pigmentosa gene therapy: Characterization of the integration sites of a Simian lenti-virus vector (SIVagm) in the target cells XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy Athens, Greece, 9-12, November (2006)
23. Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Geddes D.M., Alton E.W.F.W. and Hasegawa M. 第12回日本遺伝子治療学会 東京都千駄木 (日本医科大学) 2006年8月24日-26日: 2006年8月26日: Plenary Session II (Pre-Clinical) Persistent Gene Expression Over the Life-time of Airway Epithelial Cells Transduced by Lentiviral Vector Pseudotyped with Envelope Proteins F and HN from Sendai Virus
 24. Uchida T, Amano K, Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Fukutake K.: An Asp116Asn mutation within a factor VIII does not make new N-glycosylation site. XXVIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
 25. Tsujikawa A, Shinozawa K, Inaba H, Suzuki T, Amano K, Fukutake K.: Twenty-five different mutations in factor IX gene were detected from 30 Japanese patients with hemophilia B. XXVIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
 26. 天野景裕: 血友病止血補充療法のガイドライン —欧米のガイドラインの紹介— 日本血栓止血学会学術標準化委員会 2006 シンポジウム、2006年、東京.
 27. 清田育男、篠沢圭子、加藤宏基、高明志、辻川昭仁、鈴木隆史、天野景裕、稲葉浩、福武勝幸: 第IX因子遺伝子に2つの変異が検出された重症型血友病Bの1症例. 第53回日本臨床検査医学会学術集会、2006年、弘前
 28. 清田育男、大瀧学、内田泰斗、尾形享一、辻川昭仁、山中晃、守谷研二、天野景裕、福武勝幸: 小腸壁内血腫を繰り返したインヒビター保有血友病A患者の1例. 第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会、2006年、福岡
 29. 天野景裕、加藤宏基、尾形享一、香川和彦、腰原公人、西田恭治、福武勝幸: MMP(マトリックスメタロプロテイナーゼ)-3は血友病性関節症の評価には有用ではない. 第53回日本臨床検査医学会学術集会、2006年、弘前
 30. 瀧正志: 血友病治療一定期補充療法 — 第109回日本小児科学会 2006
 31. Taki M, Tatsunami S, Ohi C, Mimaya J, Shirahata A: Severity and therapeutic response of liver diseases in Japanese HCV-infected patients with coagulation disorders. The XXVth WFH 2006
 32. 立浪忍、瀧正志、三間屋純一、白幡聡: 本邦の血液凝固異常症における2000年から2005年までの死亡例について—血液凝固異常症全国調査より—. 第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会 2006
 33. 瀧正志、立浪忍、白幡聡、三間屋純一: HIV感染血液凝固異常症におけるC型肝炎の現状と2005年までの治療状況について: 2005年度血液凝固異常症全国調査より. 第20回日本エイズ学会 2006
 34. 立浪忍、浅原美恵子、桑原理恵、白幡聡、三間屋純一、瀧正志: HIV感染血液凝固異常症におけるリポジストロフィーと乳酸アシドーシスの状況. 第20回日本エイズ学会 2006
- H.知的財産権の出願・登録状況**
- (1)「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)
状態: 出願中 (未公開) (2005/10/28)
 - (2)「RNAウイルスのスパイクタンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」(D4-A0510)
状態: 出願中 (未公開) (2005/10/28)

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、

血友病遺伝子治療の基礎実験

研究者 坂田洋一 自治医科大学 教授

三室 淳 自治医科大学 助教授

窓岩清治 自治医科大学 講師

大森 司 自治医科大学 助手

研究要旨

長期間安定した治療レベルの第 VIII 因子発現が、AAV ベクターを用いた遺伝子導入法により血友病 A マウスにおいて得られ、AAV ベクターを用いた安全性が高い血友病 A 遺伝子治療法の可能性が示された。さらに、SIV ベクターを用い、血液幹細胞への血小板特異的プロモーターをもちいた第 VIII 因子遺伝子あるいは活性化第 VII 因子遺伝子導入と骨髄移植により血友病 A の遺伝子治療法の可能性が示唆された。組織・臓器特異的遺伝子導入をめざした試みにおいて、PAI-1 プロモーターを用いた血管内皮細胞をターゲットとする血友病 B 遺伝子治療法の可能性と優位性が示された。カニクイザルをもちいた血友病 B 遺伝子治療の前臨床実験を行い、カニクイザルに AAV1 ベクター、AAV9 ベクターを用いることで変異カニクイザル第 IX 因子遺伝子を発現させ、カニクイザルにおいて導入遺伝子からの治療レベルにいたる第 IX 因子の長期発現がえられた。さらに、血友病 A マウス胸腺へのヒト第 VIII 因子投与、血友病 A 新生仔マウスの肝臓への遺伝子導入によりヒト第 VIII 因子に対する免疫寛容が誘導されることが示された。これらの結果は安全な血友病遺伝子治療が可能であることを示唆するとともに、臨床でも遺伝子治療においても問題となるインヒビター対策への手がかりとなるものと考えられる。

A. 研究目的

血友病は 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。出血時に因子製剤を投与する現在の治療は致死的な頭蓋内出血や障害性出血を防ぐことはできな

い。恒常的凝固因子レベルを上昇させることで、これらの出血を防ぐことが出来る次世代の治療として血友病遺伝子治療の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

血友病 A 遺伝子治療: 免疫系による排除の間

題はあるが遺伝子導入効率を考慮するとウイルスベクターの使用が現実的と考えられる。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、非分裂細胞に導入可能でサルやヒトに病原性の報告のないアフリカミドリザルから単離したレンチウイルス由来 SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合は AAV ベクター、そして、(II) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する場合には SIV ベクターを用いた。AAV ベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があるが、発現効率向上と臓器特異性を高めるために 4.5kb の FVIII 遺伝子においても種々の promoter (PM) を検討した。サルの実験ではヒト FIX に対して、抗体産生が見られたために、サル型 FIX 遺伝子を作製し、発現 FIX の定量的同定を目的の一部をヒト型に改変した遺伝子を作製し検討した。さらにサル第 VIII 因子遺伝子をクローニングしベクターへ搭載しマウスを用いて発現実験を行った。

B インヒビター対策：上記血小板への凝固因子発現の試み以外に、胸腺組織を標的とし、*ex vivo* 遺伝子導入細胞の胸腺組織への移植による MHC クラス I およびクラス II 分子を介する免疫寛容誘導とウイルスベクターによる新生児免疫寛容誘導の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚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とる。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を遵守する。

C. 研究結果

血友病 A 遺伝子治療：これまで、血友病イヌでの検討を視野に入れ、イヌ FVIII を血友病 A マウスに発現させ 100%以上に保つことができた。一方、ヒト FVIII はマウスにおける血液半減期が極めて短く血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、強力な肝臓特異的な HCR-hAAT プロモーターを改変することで血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を 10-50% に維持することが可能となった。血友病 A マウ

スをもちいた FVIII 発現実験は完了し、中型血友病 A モデルの自然発症血友病イヌを用いた FVIII 発現実験を行うことを目的としてベクターを作製中である。また、よりヒトに近い種属の血友病モデル動物の作製を試みている。非ヒト霊長類のカニクイザルを用いた血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うことを目的としてカニクイザル FVIII 遺伝子をクローニングし、その発現を *in vitro* と *in vivo* において検討した。野生型カニクイザル FVIII と tag 付加カニクイザル FVIII とも良好な発現と生物学的活性を有し、血友病 A マウスにおいても 10%以上の活性が維持された。内在性カニクイザル FVIII と導入遺伝子由来のカニクイザル FVIII を識別するための検出方法を構築中である。

血友病 B 遺伝子治療：AAV ベクターで CMV プロモーターを用いて FIX を発現させると、急性炎症反応時には FIX の発現が低下してしまうが、PAI-1 をもちいることで、導入遺伝子発現の低下を防ぐことができた。サルについては、前年度、AAV1 ベクターを筋肉に投与したサルで血中には 3-9%の因子発現が見られたが、ヒト FIX に対する抗体が産生され4週間以上の持続が見られなかった。ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部に対しては抗体産生が見られなかったため、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るように工夫した。

この変異カニクイザル FIX を発現する AAV1 ベクターをカニクイザル骨格筋に投与することで3頭において変異カニクイザル FIX の血液レベルを 4-40%で長期間維持することが可能であった。しかし、マウスで 1000%以上の発現をえることができる第 IX 因子遺伝子搭載 AAV8 ベクターをサルに門脈から投与したが、サルに既存する AAV8 に対する少量の中和抗体のため、期待されるレベルの FIX の長期発現は得られなかった。一方、AAV9 ベクターを用い肝臓へ遺伝子導入したときには 4-5%の治療域のレベルの第 IX 因子発現がえられた。

マウスにおいては、GPIIb α プロモーター搭載 SIV ベクターで遺伝子導入した骨髄細胞を移植することで血小板特異的な発現をえることができた。血小板に FVIII を発現させると、血漿中に血小板刺激依存性の FVIII 抗原が出現し、血友病 A マウスの尾切断後の死亡率が有意に改善した。また、外因系凝固カスケードのイニシエーターである活性化型血液凝固 VII 因子 (FVIIa) FVIIa を発現させることにより血友病 A マウスの全血凝固能と尾切断後の死亡率が有意に改善した。

インヒビター対策：ヒト FVIII はマウスに発現させると短期間に中和抗体が生ずるが、ある週齢のマウスにおいては胸腺に直接にヒト FVIII を投与することでヒト FVIII に対する免疫寛容を誘導することができた。新生仔血友病 A マウ

スヘイト FVIII 遺伝子搭載 AAV ベクターを投与することで抗体の産生を防ぐことができた。また FVIIa を血小板に発現させる試みもインヒビター対策になると思われる。

D. 考察

AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。しかし、ヒト応用には、中型動物での実験とサルでの長期安全性の検討が必要と考えられる。しかし、AAV ベクターがサル由来であるために AAV 利用は容易ではない。AAV8 に対する抗体価の低いサルを選んで、選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液と接しない形でサル肝臓にベクターを投与する為の投与方法の検討を始めている。血友病 B 遺伝子治療に関してはサルをもちいた前臨床実験が行えているが、血友病 A 遺伝子治療実験はマウスを用いた実験にとどまっている。今後は自然発症血友病イヌを用いた実験を行う予定である。に加えて、中型血友病モデル動物を作製も視野にいれ検討を進めている。血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うために、導入遺伝子由来サル第 VIII 因子の検出系を確立しつつあり、解決すべき問題は明らかになった。

インヒビター対策としてウイルスベクターによる肝臓への遺伝子導入や胸腺を標的とした免疫寛容誘導により一定の成果がえられたことから、今後の方向性が明らかとなった。ま

た、FVIIa の血小板への遺伝子発現はインヒビター治療の方法となりえる。

5. 自己評価

1) 達成度について

10 年遅れの研究開始であり、技術中心の極めて論文にしにくいプロジェクトではあるが、基礎的技術的には欧米と同じレベルに、又一部では凌駕していると考えている。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。前臨床試験としてのサルの実験については、使用できるサルの入手が困難などの研究以前の問題があるが、解決すべき問題は明らかになったので、技術的には克服可能と考える。成熟肝細胞移植、及び幹細胞を用いた血小板系への FVIII 発現に関しては期待以上の成果が得られた。臨床研究開始にはまだ安全性確認の研究が不十分であるが、極めて近いところに来ていると確信している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

サルを用いた前臨床試験や、マウスでは脂肪細胞への遺伝子導入（世界初）、成熟肝細胞異所性移植と移植細胞のための生体工場の確立、血小板系への FVIII 発現による有効止血の工夫とインヒビタからの防御などに関しては、いずれも国際的に評価されており、学術的価値も高い。遺伝子治療に関しては、臨床応用が可能になった段階で、患者の cure, キャリアの精神的

解放、製剤の使用量の減少など社会的意義ははかりしれない。

3) 今後の展望について

サルの実験はAAVベクターに対する既存抗体対策が鍵となる。既に幾つか解決法を考案しており、展望はあるものと思われる。又、滞っていた血友病イヌのメーティングが進みコロニー化が進みつつあり、前臨床試験としての利用も考えられる。生体内ベクター投与方法では切除可能な臓器を中心にさらに基礎検討を続けていきたいと考えている。長期発現と安全性の問題を常にバランスにかけながら、直接生体内ベクター投与方法が良いか、体外遺伝子導入細胞移植法がよいかを決定し臨床研究を開始したいと考えている。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。

E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマウスレベルでは確立出来た。しかし、安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験はAAVに対して抗体を持つサルが殆どであるために治療レベル

に達する第 IX 因子発現がえられているが、現時点ではマウスでの成績に匹敵する結果が得られていない。これらの問題点が明らかにされているので、克服は時間の問題と考える。インヒビタに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療の確立が今後の課題である。

F. 研究発表

1. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells*. 25(1):115-24, 2007.
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*. 119(2):229-40, 2007.
3. Madoiwa S, Nunomiya S, Ono T, Shintani Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y: Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol*. 84(5):398-405, 2006.
4. 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 J*. 20(9):1522-4, 2006.
5. Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y: A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost*. Aug;4(8):1738-46, 2006.
6. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J. Thromb. Haemost*. (4)1271-1278, 2006.
7. Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Okada T, Mizukami H, 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*. 118(5):627-35, 2006.
8. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T,

Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K.: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*. 17(9):921-8, 2006.

- 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*. 8(8):990-7, 2006.
- 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 A 遺伝子治療前臨床試験への標識カニクイザル FVIII の遺伝子導入の基礎的検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P610, 2006.
- 柏倉裕志, 三室淳, 石渡彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P609, 2006.
- 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来の AAV ベクターを用いた検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P608, 2006.
- 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 8 型 AAV ベクターの in vivo 投与における効果と肝臓への強指向性(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 Page608, 2006.
- 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: 血液凝固第 VII 因子の発現による止血反応を強化した血小板の作成(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P595, 2006.
- 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病 B 遺伝子治療における AAV ベクターの有用性(会議録)臨床血液(0485-1439)47 巻 9 号 P1170, 2006.
- 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: AAV ベクターによる肝臓を標的とした血友病 B 遺伝子治療の検討(会議録)臨床血液(0485-1439)47 巻 9 号 P1169, 2006.

学会発表

- 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデルを用いた血友病 B 遺伝子

治療の基礎的検討. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮

- 柏倉裕志, 三室淳, 石渡彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 A 遺伝子治療前臨床試験への標識カニクイザル FVIII の遺伝子導入. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
- 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来の AAV ベクターを用いた検討. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
- 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 8 型 AAV ベクターの in vivo 投与における効果と肝臓への強指向性. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
- 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: 血液凝固第 VII 因子の発現による止血反応を強化した血小板の作成. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
- 三室淳: 出血傾向 病態・診断・治療の展開 血友病遺伝子治療. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
- 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病 B 遺伝子治療における AAV ベクターの有用性. 第 68 回日本血液学会総会, 第 48 回日本臨床血液学会総会, 2006 年 10 月 6-8 日 福岡
- 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: AAV ベクターによる肝臓を標的とした血友病 B 遺伝子治療の検討. 第 68 回日本血液学会総会, 第 48 回日本臨床血液学会総会, 2006 年 10 月 6-8 日 福岡

G. 知的所有権の出願・取得状況

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

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

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 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部
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った。また、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して測定系を改良するとともに、遺伝子導入の効果との関係についても解析を行った。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。また、主に第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用してマウス及び霊長類モデルに対する投与を行い、治療法の有効性と安全性につき検討する。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに動物個体レベルでの解析を行った。特にベクターキャプシドに対する中和抗体は低力価であっても大きな影響を与える事が示唆されたことから、検出感度の向上を目指して改良を行った。
・遺伝子導入動物実験：特に霊長類（サル）において様々な構築の AAV ベクターを骨格筋又は肝臓を標的として投与し、

遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を

目指した改良を行った。具体的には、従来用いてきた X-Gal 染色法に比べて更に鋭敏な検出法である比色法の採用やアデノウイルスの共感染による AAV 感染効率の向上をはじめとした実験条件の最適化を行い、結果として 8 型に対しては検出感度を 10-30 倍程度高めることができた。また、この方法を用いることで、カニクイザルコロニーにおける 8 型のキャプシドに対する中和抗体の陽性率が数パーセントから過半数へと上昇した。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第 IX 因子遺伝子を搭載した様々な血清型由来のベクターを投与した。1 型を骨格筋に投与した 3 頭においてはいずれも治療域に達する血中濃度が長期にわたって認められ、最高で正常値の 40 パーセント相当の濃度に達した。一方、8 型のベクターを用いた 2 頭では、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。この原因を検討した結果、低力価の中和抗体の存在によるものと結論づけられた。また、9 型由来のベクターを門脈内に投与した 1 頭では長期にわたり治療域の血中濃度が持続した。

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、マウスのみならず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いる。今回の霊長類における検討では十分な効果が得られなかったが、その原因は種による違いなどよりはむしろ中和抗体の影響によるものと考えられた。最近になり、他の施設から 8 型のベクターを用いてサルの肝臓に効率よ

く遺伝子導入が可能であるとする報告が見られるようになり、中和抗体が真に陰性である個体を選択することで効果が認められる可能性が高い。今後は改良した方法でスクリーニングを行った個体を用いて検討を行う予定であり、既に新たな 2 頭において 8 型のベクターを用いた検討を開始した。8 型・9 型の中和抗体の検出法は改良した方法においても 1 型・2 型などに比べると感度が低いものと考えられ、これは 8 型・9 型のベクターが効率よく感染する細胞が見出されていないため、より多くのベクター粒子が必要であることが主な原因である。従って、より好適な細胞を見出す事が重要であり、肝臓由来の細胞株などを幅広く試すと共に、他の施設における情報にも気を配る必要がある。一方、9 型を用いることで治療域に達する効果が得られていることから、この方法に関しても更に対象を増やして有効性を検討していきたい。

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ている。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