

の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。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. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表 (原著論文)

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.

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.

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.

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.

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 using adeno-associated virus vectors. **Hum Gene Ther** 17: 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: 990-7, 2006.

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.

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.

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** 118: 627-35, 2006.

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.

H. 知的財産権の出願・取得状況
該当なし

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（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

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、出血症状の軽減一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、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。これまでに我々はマウスを用いた実験において、成熟肝細胞を肝臓以外の部位（腎皮膜下および皮下）に移植し、長期間生着させる肝 tissue engineering の手法を開発し、肝細胞移植が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとしてきた。今回、本法を発展させるため 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の開発に取り組んできた。マウスおよびヒト由来の移植肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、マウス肝の 70%以上を置換するに至った。また移植肝細胞は増殖後も第 IX 因子の合成能を良好に保持していた。本研究は自己の肝細胞を安定して増幅供給し得ること、そして、それら増幅した肝細胞は良好な機能を有していることから、この分野の発展に大きく寄与するものと考えられた。また、今回、われわれは tetracycline 誘導により遺伝子の過剰発現が可能な ES 細胞 (Ainv18) を用いてヒト第 VIII 因子産生細胞の作製を試みた。hFVIII 遺伝子を導入した Ainv18 を培養し、各分化状態において TC アナログである doxycycline (DOX) を投与することによって培養上清中への FVIII の分泌を検討した。未分化 ES 細胞および中胚葉条件で分化誘導した場合には DOX 投与にて第 VIII 因子は検出できなかったが、内胚葉条件では微量ではあるが第 VIII 因子活性および抗原を検出した。マウス ES 細胞からヒト第 VIII 因子分泌細胞へ分化誘導する培養系を確立した。本研究は ES 細胞は血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうることを証明した。

A. 研究目的

血友病AおよびBは、X染色体上の血液凝固第VIII因子遺伝子および第IX因子遺伝子の異常に基づく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因子あるいは第IX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、止血を計ることである。これらの因子補充療法により、血友病患者のQOLは以前に比して飛躍的に向上してきている。しかし、HIV/HCV等の感染は解決したものの、血漿由来はもちろん遺伝子組換え型製剤においても製造工程や安定剤としてのアルブミンの添加など、血漿

由来ウイルス伝搬の危険性を完全には否定できない。また、医療経済という観点からは製剤が極めて高価であるという問題が残されている。これらを解決するために、止血管理を主体とする従来型の治療方針から、自らの生体内で一定の第 VIII (IX) 因子を産生し、必要な止血レベルを維持することが期待される。これまでに我々はマウスを用いた実験において、成熟肝細胞を肝臓以外の部位（腎皮膜下および皮下）に移植し、長期間生着させることによる肝 tissue engineering の手法を開発し、肝細胞移植が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとしてきた。実際の肝細胞移植の臨床応用に際して使用する細胞源としては、免疫抑制剤を必要としない点から自己肝細胞を利用する手法が期待されるが、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の開発に取り組んできた。この uPA/SCID マウスシステムにおいては肝臓特異的に産生される uPA により持続的な肝細胞障害が発生し、この肝臓に野生型の肝細胞を移植すると、uPA を発現しない野生型肝細胞が選択的に増殖し、最終的にはトランジェニックマウスの肝臓全体を占めるまで増殖する。SCID マウスをベースにしているため、イヌやヒト肝細胞等の異種肝細胞もこのシステムで増殖が可能である。今回、血友病治療への応用にむけて、uPA/SCID マウス肝内における移植肝細胞の増殖と凝固因子の発現につき検討した。

また細胞移植療法の細胞源として胚性幹細胞 (ES 細胞) が注目されているが、現在までのところ ES 細胞を用いた血友病 A 治療について、その有効性を証明した報告はない。今回、われわれは外来遺伝子の過剰発現が可能な ES 細胞 (Ainv18) を用いてヒト第 VIII 因子産生細胞の作製を試みた。

B. 研究方法

1) 成熟肝細胞移植による血友病の治療 (uPA/SCID マウスを用いた肝細胞増殖系の確立)

イヌおよびヒト肝組織からイヌおよびヒト肝細胞を分離し、uPA/SCID マウスの肝臓へ細胞移植を行なった。uPA/SCID マウス肝内における移植肝細胞の増殖と凝固因子の発現につき検討した。

2) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞、Ainv18) 移植による血友病 A の細胞療法

Ainv18 は Kyba らによって開発された ES 細胞で (Cell 109:29-37, 2002)、Cre リコンビナーゼを用いた相同組換えにより、Tet オペレーター配列の下流に外来遺伝子を導入できるシステムである。導入遺伝子の高発現が期待でき、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (DOX) で発現の調節が可能である。今回われわれは hFVIII 遺伝子を導入した Ainv18 を培養し、各分化状態において TC アナログである doxycycline (DOX) を投与することによって培養上清中への FVIII の分泌を検討した。

C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

1) 成熟肝細胞移植による血友病の治療 (uPA/SCID マウスを用いた肝細胞増殖系の確立)

マウスおよびヒト由来の移植肝細胞は、uPA/SCID マウスの肝臓において持続的な増殖を示し、マウス肝の 70%以上を置換するに至った。これら増殖した移植肝細胞は凝固第 IX 因子を通常レベルで発現していることを ELISA、免疫組織学的検索、RNA 検索および血液凝固一段法にて確認した。成熟イヌおよびヒト肝細胞は、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た。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た。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。その点において、本研究は自己の肝細胞を安定して増幅供給し得ること、そして、それら増幅した肝細胞は良好な機能を有していることから、この分野の発展に大きく寄与するものと考えられた。

2) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞、Ainv18) 移植による血友病 A の細胞療法

予備実験として Ainv18 に GFP を導入した系では、DOX の誘導により 100% の細胞に GFP の発現を認めた。DOX の添加量に比例して GFP の発現は増強していた。また DOX の繰り返し投与により、GFP はその都度発現し、少なくとも 23 日目まではその効果が持続しており、DOX による発現の on/off 制御が可能であることを確認した。次にヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだ Ainv18 ES 細胞を作製し、DOX で誘導した。mRNA レベルで FVIII 遺伝子の発現を確認したが、培養上清中には FVIII 活性を検出できなかった。未分化 ES 細胞の翻訳後修飾の欠如が原因として考えられ、ES 細胞を分化誘導した。未分化 ES 細胞を血清、無血清条件を組み合わせることで中胚葉系および内胚葉系細胞に分化させることに成功した。未分化 ES 細胞および中胚葉条件で分化誘導した場合には DOX 投与にても第 VIII 因子は検出できなかったが、内胚葉条件では微量ではあるが第 VIII 因子活性および抗原を検出し (~15 mU/ml)、DOX 量に比例していた。本研究は ES 細胞が血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうることを証明した。

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、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

奈良県立医科大学循環器腎臓代謝内科：

久保篤史

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

原著論文

1. Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiyama 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
2. 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.
3. Suzuki H, Shima M, Nogami K, Sakurai Y, Nishiyama 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
4. 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
5. 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
6. 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
 7. 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
 8. 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.
 9. 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
 10. 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
 11. 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(注射用ノボセブン)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
- 口頭発表
1. 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.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 野上 恵嗣, 嶋 緑倫, 西屋 克己, 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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 回肝細胞研究会 2006 年 6 月 30 日.

研究要旨

〔目的〕 Naked DNA を高圧で脈管系から注入することで、ミニブタへの遺伝子導入実験を行った。

〔方法〕 ミニブタに GFP マーカー遺伝子発現を種々の圧条件下で試みた。

〔結果〕 カテーテルを使用して、ミニブタ肝臓に亜区域特異的に遺伝子導入発現を認めた。遺伝子発現には血液の存在が不利であり、また、注入圧による障害を防ぐ必要があった。

〔考察〕 前臨床モデルのブタモデルでも遺伝子導入は可能であった。

A.研究目的

血友病の遺伝子治療として、欠損凝固因子を遺伝子治療によって補う試みがこれまでなされてきており、我々も種々のウイルスベクターや非ウイルス法を駆使して、遺伝子導入実験を行ってきた。今年度はこれまで検討してきた Naked DNA による肝臓での遺伝子導入法を前臨床を意識してブタで確認した。

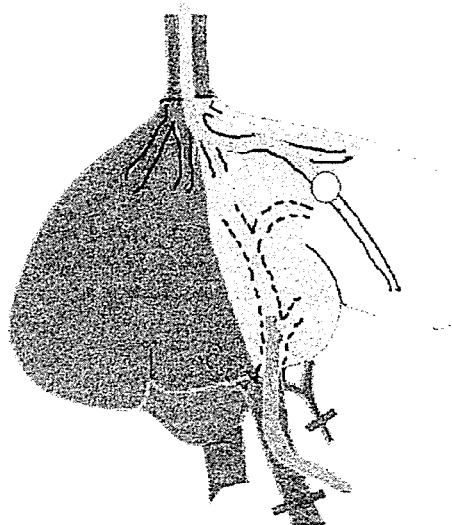


図1：カテーテル挿入法

B.研究方法

ミニブタにおける Naked DNA による肝への選択的遺伝子導入法

使用動物：ミニブタを使用した。
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 を肝臓に選択に導入した（図1及び2）。



図2：パワーインジェクターによる注入

搭載遺伝子の種類によらないで普遍的に SIV ベクターの機能力価を測定できる方法の確立が望まれており、検討が必要である。

(2) ベクター生産性の改良

レンチウイルスベクターは、多くの遺伝子治療の標的である細胞分裂静止期の体細胞に遺伝子導入できる点で、ガンマレトロウイルスベクターにかわる遺伝子治療用ベクターとして期待されている。しかしながら、一般的にレンチウイルスベクターの生産性は低く、臨床応用への障害になっている。SIV ベクターの場合、EGFP 遺伝子を搭載した第 3 世代の VSV-G シュードタイプ化 SIV ベクターでは、293T 細胞培養上清で 5×10^7 transduction units (TU)/ml の生産性がある。この SIV ベクターの生産性をさらに上げるために、また、レンチウイルス間の相同組み換えの可能性をなくし安全性を高めるために、パッケージングプラスミド内の SIV gag と pol 遺伝子内の使用コドンをもとにヒトにおいて使用頻度の高いコドンに変換して、SIV ベクターの生産性および安全性の向上をはかる。

B. 研究方法

(1) SIV ベクターの機能力価 (functional titer) の測定法の確立

SIV ベクターで遺伝子導入した細胞からゲノムを精製して、SIV ベクター組み込み部位の数をリアルタイム PCR で測定した。293T 細胞に遺伝子導入して 3~4 日後にトリプシン・EDTA で細胞を回収した。回収した細胞は血球計数盤で細胞数を測定後、界面活性剤で細胞膜を溶解して核のみを遠心精製した。精製した核は変性剤として尿素を使用して溶解した。その後、フェノー

ル・クロロフォルムとエタノールで 293T ゲノムを精製した。精製 DNA は吸光度比 260/280 で -2 の高度に精製した標品を利用し、細胞あたりのゲノム量 (二倍体細胞で細胞あたり ~ 6 pg) から、ほぼ 100% のゲノム回収率が可能な実験方法を確立した。リアルタイムの検量線には遺伝子導入用プラスミドを分子数で 10^4 から 10^6 分子を使用した。プライマーはヒトゲノム上に類似の配列が存在しない WPRE の配列を利用し、100 ng のヒトゲノム上のインテグラーシヨンの数を測定した。最初に測定しておいた細胞数とリアルタイム PCR で測定した値から、細胞ひとつあたりのインテグレーション数を算出した。

(2) コドン使用頻度の最適化による SIVagm TY0-1 ベクターの改良

SIVagm TY0-1 株遺伝子のコドン使用頻度をヒトのコドン表 (Human Codon Usage (36349745 codons) : www.kazusa.or.jp/codon/) をもとに最適化した。SIVagm 遺伝子のうち gag、pol について、ヒトの最適使用頻度のコドンを使用した遺伝子の全合成をおこなった。

遺伝子の全合成は、それぞれ 12~16 塩基をオーバーラップしている合成オリゴプライマー約 150 本を使用し、PCR によって段階的に接続した。塩基配列の置換法としては Kotsopoulou らの HIV ベクターの gag/pol と GFP 遺伝子を EGFP 遺伝子にした文献 (Zolotukhin et al. J. Virol. 70 巻, p4646-4654 ; Haas et al. Cur. Biol. 6 巻, p315-324, 1996) を参考にした。SIV の gag/pol について、gag と pol 遺伝子で重複している約 300 塩基の領域を除いた、すべ

C.結果

注入圧を40~50mHgで10秒程度打ち込むことで安全に注入ができた(図3)。

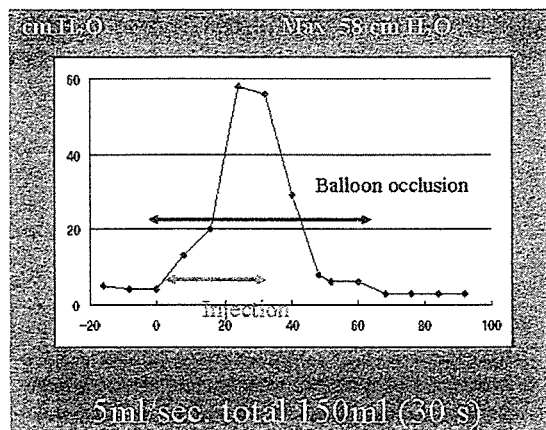


図3：圧データ

カテーテル法により肝臓血管区域に限局してEGFP発現を認めた(図4)。

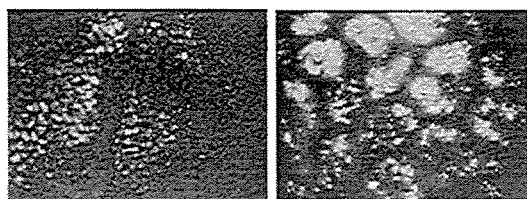


図4：目的領域のGFPの発現

D.考察

大動物であるミニブタにおいてカテーテルにより選択的に遺伝子を肝臓に導入することができた。

E.結論

カテーテルを使用しミニブタに選択的に遺伝子を導入することが出来た。本法により欠損遺伝子を簡便に導入することができる。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Yoshino,H., Hashizume,K., Kobayashi,E., : Naked plasmid DNA Transfer to the porcine liver using rapid injection with large Volume. Gene Thera13: 1696-1702,2006.
2. Komiya,K., Sato,Y., Wainai,T., Murayama,M., Yamada,A., Hiruta,N.,Seo,N.,Yoshino,H., Tanaka, H., Kobayashi,E.: Evaluation of intraoperative infusion solution Using a complete anhepatic model In baby bigs. Transplantproc37 : 2341-2346, 2005.
3. 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 Tansplant 15(4): 325-334, 2006.
4. Murayama,T., Sato,Y.,wainai,T., Sato,A., Seo,N., Yoshinori,H.,

Kobayashi, E. : Effect of
continuous infusion of propofol
in its concentration in blood
without the liver in pigs.
TransplantPoc37:4567-4570.,
2005.

2. 学会等発表 27 件

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者：ディナベック株式会社

代表取締役社長 長谷川 護

研究要旨

レンチウイルスベクターは、静止期体細胞への高い遺伝子導入効率とシュードタイプ化による広範な細胞種への遺伝子導入能を有していることから、血友病に対する遺伝子治療適用可能なベクターとして期待されている。我々が開発したサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターは、生産・精製法の改良が進められており、ヒトへの臨床応用が可能な開発レベルにあるレンチウイルスベクターのひとつである。この SIV ベクターを使用した血友病遺伝子治療を実現するための、ベクター側の基礎的改良をおこなった。本年度の分担研究として検討した課題は(1) 普遍的な機能力価の測定法の検討と(2) ベクター生産性向上と安全性確保を目的とした SIV ベクター遺伝子塩基配列のコドン使用頻度のヒト化についての 2 点である。(1) の機能力価の測定は染色体への組み込み部位数（インテグレーション数）で算出する方法であり、治療用遺伝子の種類に因らず全ての SIV ベクターに適用することができる。正確で安定した算出方法の確立に成功し、信頼性の高い機能力価としての応用が可能になった。また、2) に関しては gag/pol 遺伝子全長のコドン使用頻度をヒト化した遺伝子の全合成を終了し、現在、生産性・安全性の検討が進められている。

A. 研究目的

前臨床試験における治療効果のデータとともに、遺伝子治療用ベクターの場合には GMP の基準に合致したベクター製造法の検討が必須である。GMP とは、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則（GMP：Good Manufacturing Practice）のことで、この基準値をクリアして製造したベクターがヒトの臨床試験に使用できる。GMP 品質のベクターを製造するプロトコル作成にあたって、ベクターの生産性が十分に高いこととともに、ヒトに投与することを前提とした安全性の確保が重要になる。これらの点を考慮して、我々は(1) ベクタ

ーゲノムの宿主細胞染色体へのインテグレーション数による機能力価の測定法の検討と(2) ベクター生産性の向上と安全性の確保を目的とした SIV ベクター遺伝子塩基配列のコドン使用頻度のヒト化についての 2 点の検討を行った。

(1) 機能力価(functional titer)の測定法の検討

GFP や LacZ 以外の治療用遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターの遺伝子導入能の指標としての機能力価測定法については、信頼性における方法は確立していない。前臨床試験、および、臨床試験において SIV ベクターの性能を正確に把握するためにも、

での gag/pol コドンの使用頻度をヒトのコドンの使用頻度にした。

(倫理面への配慮)

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、その取り扱いにおいて、「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」に従って、「組換え 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)を遵守した実験操作法をおこなった。また、本研究において、実験動物等への投与実験は厳選しておこなった。

C. 研究結果

(1) SIV ベクターの機能力価(functional titer)の測定法の検討

SIV ベクターによる組み込み部位を、遺伝子導入した細胞から精製したゲノムを材料にしてリアルタイム PCR で定量することが可能になった。細胞あたりのインテグレーション数は、回収した細胞数で測定した。インテグレーション数の測定が正確に実測できていることは、同時に生産した GFP 搭載遺伝子の GFP 力価とベクター粒子力価の数値を比較することにより確認した。

(2) コドン使用頻度の最適化による SIVagm TY0-1 ベクターの改良

ヒトのコドン使用頻度を利用して、SIV の gag/pol について遺伝子の全合成をおこなった。鋳型を使用しない条件で、12 本のオーバーラップしているプライマーの接続が PCR によって可能であった。12 本のプライマーを接続した 300-350 bp の合成遺伝子を 9 本作製し、PCR で段階的に接続し、完全合成した 4.5 kb の gag/pol 遺伝子を得た。このヒト化 gag/pol 合成遺伝子を用い

て、第 3 世代のパッケージングプラスミドを再構築し、現在、ベクターの生産性を評価している。

D. 考察

(1) 普遍的な機能力価測定法の確立

前臨床試験とともに臨床試験において、SIV ベクターの性能を正確に測定し、搭載遺伝子の種類によらないで、普遍的に SIV ベクターの機能力価を測定できる方法確立しておくことは重要である。インテグレーション数を測定することによって、正確に機能力価の測定が可能になれば、投与量による治療効果の再現性ととも、組み込み数を制御することによって一定の安全性を臨床で確保することができる。また、ベクターの機能としてインテグレーション能を測定することによって、細胞ひとつの染色体に対して一ヶ所の組み込み部位ができるように機能力価を設定することが可能になる。これは組込型のベクターの場合、安全性の面からも非常に重要なベクターの基礎データである。

(2) ベクター生産性の改良

ウイルス由来の遺伝子の哺乳類細胞での発現量は一般的に低く、コドン使用頻度を最適化することによってその発現量を高め、結果的に該ウイルスベクターの生産性を向上させることを期待している。また、パッケージングシグナルと gag 遺伝子の 5'側の配列はオーバーラップしていることから、遺伝子導入用プラスミドとパッケージングプラスミドの間で一部全く同じ DNA 配列が存在し、ベクター生産細胞内での組換えの可能性はある。ヒト化による塩基配列の置換によって、組換えによる複製型のウイル

スの発生率をほとんどゼロにすることができ、高い安全性を確保することができる。

E. 結論

(1) SIV ベクターの機能力価の測定法

GFP および治療遺伝子を搭載した SIV ベクターのインテグレーション部位数を新規のプロトコールを利用して算出し、染色体組み込み数による機能力価測定法を確立した。その結果、治療遺伝子の種類を問わず、SIV ベクターの機能力価を算出できるようになった。

(2) コドン使用頻度の最適化による SIVagm TY0-1 ベクターの改良

SIV の gag/pol 遺伝子のコドン使用頻度を完全にヒト化した遺伝子を合成した。この遺伝子を用いて、第 3 世代のパッケージングプラスミド (3rd PV) を再構築した。現在、搭載遺伝子をかえて SIV ベクターを生産し、評価している。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. J. Gene Med. 2006; Vol. 8: p1444

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. (2006) Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. FASEB J 20: p1522-1524.

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.

2. 学会発表

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 lentivirus vector (SIVagm) in the target cells XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy Athens, Greece, 9-12, November (2006)

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

Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Ueda Y., Fujikawa S., Washizawa K., Somerton L., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. 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

Mitomo K., Inoue M., Ueda Y., Ikegami M., Griesenbach U., Alton E.W.F.W. and Hasegawa M. 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

Mitomo K., Inoue M., Ueda Y., Ikegami M., Fujikawa S., Washizawa K., Griesenbach U., Alton E.W.F.W. and Hasegawa M. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 「2つの外来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：出願済み (未公開)

(7) 「血液凝固異常の治療方法」 (D4-A0506)

状態：出願済み (未公開)

(8) 「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシール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：出願済み (未公開)

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
平成 18 年度 分担研究報告書
先天性第 V 因子欠乏症と血小板内第 V 因子の解析
分担研究者 天野 景裕 東京医科大学

研究要旨:

先天性第 V 因子 (FV) 欠乏症 3 症例の FV 遺伝子 (*F5*) 解析と分子病理の解析を行った。3 症例とも血漿中 FV 活性 (FV:C) は 5% 未満であったが、臨床的な出血症状に差違が認められた。中等度の出血症状を示した症例 1 は V1813M のホモ接合体で、血小板内 FV 抗原量 (FV:Ag) は、ほとんど認められず、血小板内 FV の mRNA は正常対象の半分に低下していた。軽度の出血症状の症例 2 は R2174L のホモ接合体で、血小板内 FV:Ag は正常対象と同等量認められ、血小板内 FV の mRNA も正常対象と同等量認められた。出血症状の認められなかった症例 3 は N468S のホモ接合体で、血小板内 FV:Ag は正常対象に比較して 10% 程度と低下しているが検出された。血小板内 FV の mRNA は正常対象と同等量認められた。リコンビナント FV の発現実験では、培養上清中の FV:C はそれぞれ野生型を 100% とした時、症例 1: 28 ± 2%、症例 2: 40 ± 3%、症例 3: 81 ± 7% であった。以上の結果より、先天性 FV 欠乏症患者の出血症状の重症度は、血小板内 FV の抗原量と機能に関連していると考えられた。これは、凝固異常症の遺伝子治療において、凝固因子を発現させる細胞のターゲットを血小板とすることの重要性を示唆している。

A. 研究目的

本邦での血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、対象となる患者の遺伝子型の把握と分子病理の解析は重要な情報となる。

先天性第 V 因子欠乏症は内因および外因系凝固にかかわる血液凝固第 V 因子 (FV) の活性が欠乏している遺伝性出血性疾患で、パラ血友病ともいわれている。FV は分子量約 330k Da の 1 本鎖糖タンパクで、FVIII と同様のドメイン構造をとり、約 40% のホモロジーがある。FVIII におけるテンエース複合体のように、血小板膜上でカルシウムイオンの存在下に活性化第 X 因子 (FXa) とともにプロトロンビネース複合体を形成し、補因子として働くという凝固因子としての役割も FVIII に類似している。そこで、先天性第 V 因子欠乏症の FV 遺伝子 (*F5*) 解析と分子病理の解析を行った。

B. 研究方法

先天性第 V 因子欠乏症患者 3 人の解析を行った。遺伝子解析にあたりすべての患者よりインフォームドコンセントを得た。

① FV 活性 (FV:C)、FV 抗原 (FV:Ag) の測定

3.2% クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。FV:C は自動血液凝固能測定装置を用い、PT 試薬と FV 欠乏血漿を用いて凝固一段法で測定した。FV:Ag はポリクロナール抗体を用いたサンドイッチ ELISA 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、*F5* の 25 のエクソンおよびそのイントロン境界領域を、設計した 25 対のプライマーを用い 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。

③ 血小板内 FV の解析

1ml 中に 10^9 個に調整した患者血小板浮遊

液の FV:Ag を ELISA 法で測定した。また、血小板中の FV-mRNA 発現を確認するために、調整血小板ペレットをホモジナイズ後、RNA を抽出し、それぞれの変異部位をはさんだプライマーを用いて、RT-PCR を行った。

④変異 FV プラスミドの作成

野生株 FV 合成プラスミド pMT2FV を鋳型として、site-directed mutagenesis kit により変異 FV を含むプラスミドを作成した。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。

⑤リコンビナント FV 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。培養 48 時間後の上清を回収し、FV:C を測定した。

C. 研究結果

①患者の F5 遺伝子解析結果、患者血漿中 FV:C と FV:Ag の測定結果、出血症状の重症度、患者血小板内 FV:Ag と血小板内 FV の mRNA 発現量。

症例 1:V1813M のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はそれぞれ 1%未満、4%で中等度の出血症状を呈していた。血小板内 FV:Ag は、ほとんど認められず、血小板内 FV の mRNA は正常対象の半分程度に低下していた。

症例 2:R2174L のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はそれぞれ 1%、5%で非常に軽度の出血症状であった。血小板内 FV:Ag は正常対象と同等量認められ、血小板内 FV の mRNA も正常対象と同等量認められた。

症例 3:N468S のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はともに 3%で出血症状は認められなかった。血小板内 FV:Ag は正常対象に比較して 10%程度と低下しているが検出された。血小板内 FV の mRNA は正常対象と同等量認められた。

②リコンビナント FV の発現結果

培養上清中の FV:C はそれぞれ野生型を 100%とした時、症例 1:28±2%、症例 2:40±3%、症例 3: 81±7%であった。

D. 考察

FV は肝臓と巨核球において合成され、FV 総量の 80%は血漿中に、20%は血小板内 α 顆粒に存在している。先天性 FV 欠乏症で、臨床的に出血症状を示すのは通常ホモ接合体のみであり、FV 活性は 1%以下から 10%を示す。出血症状は通常、軽度であることが多いが、外傷や外科的手術後(抜歯を含む)に際しては異常出血のリスクとなり、また硬膜下出血や関節内出血、筋肉内血腫などの重症出血をきたす例も報告されている。血漿 FV 活性が 1%以下でも全く無症状の症例もあり、血漿 FV 活性のみでは、その出血症状の重症度は予測困難である。

今回、解析した先天性 FV 欠乏症 3 症例の血漿中 FV 活性は 5%未満と低下しており、それぞれ異なったホモ接合体の変異が検出された。中等度の出血症状を示した症例 1 の V1813M 変異では、血小板内 FV の mRNA 発現が低下しており、血小板内 FV:Ag もほとんど検出されなかった。一方、出血症状が軽度であった症例 2 の R2174L 変異では、血小板内 FV の mRNA も FV:Ag も正常と同等量認められた。このことから、血漿中 FV:C は同程度低下していても、血小板内 FV の存在により、出血症状が規定されている可能性が示唆された。全く無症状であった症例 3 の N468S 変異でも、正常と同等量の血小板内 FV が認められるのではないかと推測したが、結果は低下していた。しかし、リコンビナント発現実験の結果から、N468S 変異 FV は 80%と高い活性を有していることが示されたため、少ない血小板内 FV ではあるが、十分な活性をもった FV であるために、局所における止血には機能したと考えられる。以上より、先天性 FV 欠乏症患者の出血症状の重症度は、血小板内 FV の抗原量と機能

に関連していることが示唆された。

E. 結論

先天性 FV 欠乏症の遺伝子解析と分子病理の解析により、臨床的出血症状との関連が血小板内 FV に依存している可能性を明らかにすることができた。これは、今後の血友病をはじめとする凝固異常症の遺伝子治療において、凝固因子を発現させる細胞のターゲットを血小板とすることの重要性を示唆している。

G. 研究発表

論文発表

1. 天野景裕:先天性第V因子欠乏症、浅野茂隆、池田康夫、内山卓監修、三輪血液病学 第3版。東京、文光堂、2006年、1715-1717
2. 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
3. 西田恭治、加藤宏基、藤平輝明、沢田貴志、天野景裕:国際化社会における HIV 感染症診療の問題点。東京医科大学雑誌 64(4):424-434、2006
4. 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。日本血栓止血学会雑誌 17(4):446-453、2006
5. 天野景裕:臨床的検査データのとらえ方。Medical Technology 34(11):1157-1160、2006

学会発表

1. 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.

2. 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.
3. Shinozawa K, Amano K, Suzuki T, Iijima K, Inaba H, Fukutake K.: Arg2174Leu missense mutation in the factor V deficiency with mild bleeding diathesis. XXVIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
4. 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。
5. 天野景裕:血友病の検査の基本と最近のトピックス。第12回北海道血友病研究会、2006年、札幌
6. 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
7. 篠沢圭子、天野景裕、鈴木隆史、稲葉浩、飯島憲司、高橋芳右、福武勝幸:先天性第V因子欠乏症の出血症状と血小板内第V因子。第53回日本臨床検査医学会学術集会、2006年、弘前
8. 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、宇都宮
9. 篠沢圭子、天野景裕、高宮修、塩崎尚子、安藤貴志、清田育男、鈴木隆史、稲葉浩、福武勝幸：出血症状が認められない先天性第 V 因子欠乏症：FV N468S ホモ接合体症例の解析。第 29 回日本血栓止血学会学術集会、2006 年、宇都宮
 10. 西沢生野、高城由紀、五十嵐祐子、武井康悦、川原千香子、天野景裕、太田祥一：AED による院内蘇生例の 1 報告。日本蘇生学会第 25 回大会、2006 年、浜松
 11. 山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、入沢亮吉、加藤雪彦、斉藤万寿吉、坪井良治、中村哲也、根岸昌功、白坂琢磨：HIV 感染症に対するエムトリシタビン投与による安全性と皮膚変色発現に関する検討(第 2 報)。第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会
 12. 久野浩史、北村恵美、高橋友美、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸：当院における FFP 使用状況～適正使用推進にむけて～。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 13. 市川喜美子、北村恵美、高橋友美、久野浩史、高橋かおり、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸：当院における輸血後感染症検査の現状と検査実施率向上への取り組み。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 14. 鈴木隆史、須永和代、久野浩史、市川喜美子、高橋友美、高橋かおり、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸：抗リン脂質抗体症候群で認められたオモテ・ウラ不一致。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 15. 高橋友美、北村恵美、久野浩史、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸：濃厚血小板製剤による非溶血性副作用が増加している。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 16. 天野景裕、高橋陽子、鈴木隆史、北村恵美、高橋友美、久野浩史、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、福武勝幸：新鮮凍結血漿融解方法の検討—サーモスタット式蛇口と発泡スチロールボックスを用いた温度管理方法—。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 17. 高橋陽子、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸：当院における自己血運営システムの現状と問題点。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 18. 高橋陽子、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸：複数担当医による自己血貯血システム。第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
 19. 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
 20. 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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）

分担研究報告書

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

分担研究者： 小田原 隆 東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科講師

研究協力者： 竹谷 英之 東京大学医科学研究所附属病院関節外科講師

研究要旨： 遺伝子治療の臨床応用へ向けて、治験病院の中に、血友病患者を合併症も含めてトータルに把握・対応できる全科横断的なチームを結成した。このチームは、とりわけ肝障害を合併した血友病患者の関節症手術を安全に施行するうえで有効に機能することが分かった。遺伝子治療の臨床試験に際しても、このようなチーム体制が必須と考えている。

A. 研究目的

国内で血友病の遺伝子治療を現実に臨床応用するに際しては、患者を対象とした臨床試験が安全に行える病院の体制が必要となる。東大医科研病院は、治験病院としてトランスレーショナルリサーチ（TR）を数多く手がけてきており、臨床試験推進室が中心となって毎週開く TR 会議を始め、臨床研究を推進する体制を整備している。我々も、この治験体制のもとで、HIV 感染症治療ワクチンの phase 1 臨床試験を実施してきたが、今回、血友病患者を HIV・HCV 感染症なども含めてトータルに把握してケアできる臨床チームを結成して、血友病性関節症の手術を安全に遂行できる体制を整えたとともに、国際基準を満たしている治療ベクター開発室とも連携し、遺伝子治療の臨床試験を実施に持っていける体制を築き上げることを目指す。さらに、チーム医療を進めるなかから、血友病性関節症の分子成因を解析する臨床研究を行い、多くの血友病患者の QOL を損なう要因となって

いる関節症の発症機構を解明していく。

B. 研究方法

- a) 血友病性関節症の手術を専門とする整形外科医を中心に、肝臓内科医、感染症内科医、小児科医をはじめとして、パラメディカルも加わることで臨床チームを組織し、血友病患者の抱える問題をトータルに把握して、安全に手術を行なえるようにする。
- b) 血友病関節症の患者の末梢血単核球や手術時の検体から得られる滑膜細胞から RNA を抽出し、発現が上昇している遺伝子をマイクロアレイの手法などを用いて網羅的に解析できないかどうか検討する。

（倫理面への配慮）

患者検体を用いる実験は、院内 IRB の承認を受け、患者に十分な説明をしたうえで文書による同意を得て行う。また、個人の人権には特に注意を払い、解析を行なう検体は完全匿名化する。

C. 研究成果