

200727006A

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19年度 総括・分担研究報告書

平成20（2008）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 ————— 13
(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 ————— 19
(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 ————— 22
(奈良県立医科大学 吉岡 章)
4. カニクイザル肝臓に対する経門脈的遺伝子導入方法の確立 ————— 26
(自治医科大学 小林英司)
5. 遺伝子治療用サル免疫不全ウイルス(SIV) ;SIVベクターの基本性能・生産性
データの取得 ————— 29
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 血友病Aの遺伝子解析 ————— 34
(東京医科大学 天野景裕)
7. 遺伝子治療の臨床試験を行うための治験病院の体制および血友病患者の
HCV・HIV感染症の検討 ————— 40
(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 ————— 44
(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 ————— 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 50

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 QOL を高めるために次の 3 つのプロジェクトを遂行した：(I) 遺伝子治療、(II) 血友病製剤治療及び遺伝子治療で問題になるインヒビター対策、(III) 患者実態に関する調査研究

(I) 血友病患者に cure をもたらし、不慮の出血死を防ぎ、さらに血液製剤使用量を減らしうることから社会的にも経済効果の大きい血友病遺伝子治療には大きな期待が寄せられている。これまでの基礎的検討の結果、遺伝子導入にはウイルスベクターの利用が現実的であり、直接体内臓器へ遺伝子を導入する場合は世界的にも安全といわれているアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを、そして体外で自己細胞染色体に遺伝子を組み込み、これを体内に移植する場合は病原性の報告のないアフリカミドリザル由来のレンチウイルスを基礎に第三世代化し、さらに安全の為の改良を加えた SIV ベクターを選択した。マウスでは血友病遺伝子治療の技術はほぼ確立し、治療レベル因子の長期発現維持が可能になっている。本年度は、臨床研究へ歩を進めるために、非ヒト霊長類を用いた研究を中心に展開した。サルには血友病が同定されていないために実験を進めるには発現因子を相同性の高いサル血友病因子と識別定量するための技術が不可欠である。幸い凝固 IX 因子に関してはサルとヒトの因子を識別し得るモノクロナル抗体を作製し得たので、これを用いて血友病 B 遺伝子治療をまず展開した。筋肉や肝臓を標的にした検討で治療レベルの因子発現の得られるサルも見られたが、全く発現の見られないサルも存在し、個体差がみられた。個体差の原因を解析した結果、サルの AAV 既感染により生じる抗 AAV 中和抗体の有無が遺伝子導入を左右することが明らかとなった。微量抗体の存在でも遺伝子治療導入が著しく抑制されることから、中和抗体測定系の改良を図った。抗体レベルを下げるための治療が極めて困難であることから、中和抗体が存在しても有効に遺伝子導入できる方法を検討した。結果、原理的にはバルーンマイクロカテーテルを用いて、血流の遮断と、血管内血液の洗浄などの方法により、血液と投与ベクターの接触を最小にして肝臓の一葉に肝臓特異的なベクターを導入することで可能なことがサルを用いた実験より示唆された。血友病 A に関しては、発現凝固 VIII 因子(FVIII)と full length FVIII の構造の違いが期待されることから、現在、これらを識別しうる抗体を作製中である。SIV ベクターを用いて、血液幹細胞に FVIII 或いは活性凝固 VII 因子(FVIIa)遺伝子を導入し、血小板特異的プロモータを用いて血小板に発現すると止血効果が見られることは既に報告した。本年度はインヒビター存在下でも効果の見られること、FVIIa は血小板活性化により外部へ放出されないが、血小板膜表面へ移動し、膜上で効率よく凝固反応を活性化することが止血効果発現のメカニズムであることを明らかにした。この方法では染色体に組み込まれるベクターを利用するが、インシュレータ利用により安全性確保が保証しうる結果が得られ、臨床応用可能性が示唆された。この他、血友病患者の遺伝子解析、SIV ベクターの産生効率改善なども着実に進行している。遺伝子治療はこのほか、breakthrough をねらった探索的検討も進めたが、中でもウイルスベクターを用いずに相同組み換えによる異常 FVIII 遺伝子治療の可能性、血友病 A クローンブタ作製などに一定の成果が見られた。

(II) 昨年実験を開始した FVIII を直接マウス胸腺へ投与し誘導される免疫寛容のメカニズムを本年度はさらに詳細に検討した。結果、FVIII 暴露により、昨年推測されていた、抗原特異的制御性 T 細胞が誘導され、これにより免疫寛容が誘導されるメカニズムが実験的に証明された。ヒトに有効に寛容誘導できる方法を開発するには、このメカニズムの解析などが一助になることが期待される。

(III) 出血頻度と疾患重症度、周囲の理解などを含む社会的問題の存在が、患者の視点からのアンケート解析により具体的に明らかになった。これらの問題をいかに解決していくかがこれからの課題となる。

分担研究者：

自治医科大学遺伝子治療研究部

教授 小澤敬也

奈良県立医科大学小児科学教室

教授 吉岡 章

自治医科大学臓器置換研究部

教授 小林英司

ディナベック株式会社

代表取締役社長 長谷川 護

東京医科大学臨床検査医学講座

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

准教授 瀧 正志

A.研究目的

血友病は X 染色体上に存在する血液凝固 VIII、(FVIII)或いは IX 因子(FIX)遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。現在の治療は出血時に因子製剤を投与する care 中心で、致死的な頭蓋内出血などの予防は不可能である。因子製剤は安定剤としてのアルブミン添加不要の製剤が開発され、補充や運搬もかなり改善された。しかし、今日でも、未知ウイルス混入や中和抗体産生の問題は care 治療の大きな課題である。患者の QOL を高めるために、(I) 血友病に cure をもたらし、製剤使用量を減らすことで経済効果も期待できる遺伝子治療と、(II) 因子製剤輸注に伴い高頻度に発生するインヒビタ対策、そして、(III) 血友病における種々の社会的問題の解決に向けて患者視点から諸問題の調査実施を目的に研究を展開する。本年度は、遺伝子治療に関しては、サルを用いた実験を中心に展開し、臨床研究に向けて、技術と安全性向上を目的とした検討を進めた。また breakthrough

をねらった基礎的研究もいくつか展開した。インヒビタ対策は血友病マウス胸腺に因子製剤を導入することにより誘導される免疫寛容のメカニズムを解析し、成人にも適用可能な免疫寛容誘導法の開発を目指した。またインヒビタを回避しうる遺伝子治療の基礎的検討も進めた。患者参加型調査研究では医師、医療スタッフ、患者代表により作成された多視点的アンケートを回収し、一次解析を実施することを目的とした。

B.研究方法

(I) 遺伝子治療：これまでの成果を基礎に臨床応用を目指した研究を進めるとともに、**breakthrough** をねらった探索も行う。治療ベクターとして、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の一種を基礎に、安全性を目的に第三世代化し、さらに HIV 既感染者にも組み換えのおきない様に改良した SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、1) 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、2) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子導入し、体内に移植する場合には SIV ベクターを利用した。実験はマウスで基礎実験を繰り返し、大動物、特に非ヒト霊長類であるサルを用いて結果を確認して、臨床研究へ歩を進めるという方針で展開する。

1) 筋肉細胞や血管内皮細胞には AAV1 ベクターを、そして、肝臓を標的にする場合は肝臓に特異性の高い AAV8 ベクターと AAV9 ベクターを選択した。さらに、臓器特異性を高めるためのプロモータと臓器特異的エンハンサーを併用して発現臓器の限局を図った。サル、或いはヒト由来 AAV の

既感染により生じる中和抗体は遺伝子導入効率を大きく左右する。その血中中和抗体レベルを感度よく測定するための系の改良を目指した。また、AAV に対する中和抗体を有する個体の免疫反応回避を目的に循環血液に接することなく肝臓へ遺伝子導入する方法の検討を開始した。血友病 B に関しては、以前に我々が作製したサルとヒトの FIX を識別しうるモノクロナル抗体（世界唯一）を利用して発現 FIX を定量した。一方、血友病 A については、FVIII がヒトとサルで 98%以上の相同性があるために、これまでに両者を識別しうる抗体は世界に存在せず、発現分子を十分な感度で測定しうる系は確立できていない。そこで、遺伝子に種々のタグを付加してサルの発現 FVIII を同定する検討を進めるとともに、実際の遺伝子治療で発現させている B-domain less FVIII (B-domain は活性発現に影響しない) を特異的に識別しうるモノクロナル抗体作製を開始した。

2) 血友病 A マウス由来骨髄幹細胞へ体外で SIV ベクターを利用して、FVIII、或いは、血友病インヒビタ症例に臨床応用される凝固 VIIa 因子(FVIIa)遺伝子を導入し、血小板特異的な GpIb プロモータを利用して血小板に局限して発現させると有効な止血効果が見られることは既に確認した。この方法の有利な点は、発現因子に対するインヒビターが存在しても、止血局所で血小板が活性化され FVIII, FVIIa が機能するために止血効果が見られることである。本年度は、インヒビタ存在マウスに対する止血効果の観察や、FVIIa 発現による止血メカニズムを解析した。SIV ベクターは染色体へ組み込まれるため、臨床応用を念頭に LAM-PCR 法や、DNA-Walking 法で染色体組み込み部位の解析を進めるとともに、インシュレータ効果による安全性を検討し

た。又、同様の方法を用いて血友病 A イヌでの再現実験を開始した。SIV ベクターについては、臨床使用できる質と量を確保するための生産効率改善と、送付・保存に関わる安定性の問題の検討も進めた。臨床研究に向けて、患者の同意を得て、患者遺伝子解析を進めている。さらに、臨床治験の体制作りを東大医科研の例を参考に検討を始めた。探索的検討として、前年度から進めている血友病 A マウス由来幹細胞に、*ex vivo* で相同組み換えによる遺伝子治療を試み、移植する検討をさらに進めた。また、発現因子活性と止血効果確認のために血友病クローンブタの作製も進めている。この他、前年までの肝細胞の異所性移植の発展形として、正常成熟肝細胞を、血友病 A マウスの脾静脈から再移植し、FVIII 因子産生の可能性を検討した。ES 細胞の利用可能性も検討した。

(II) インヒビタ対策：本年度は、FVIII 因子を直接マウス胸腺へ高感度超音波システムガイド下に投与し、誘導される免疫寛容のメカニズムの詳細な解析を施行した。

(III) 患者 QOL を高めるための調査研究：昨年配布した調査用紙を回収し、一次解析を進めた。

倫理面への配慮

本研究は、全体を通して、治療の効率の探求とともに、安全性に重点を置いて進めていく。遺伝子治療については、ヒトに対して病原性を持たない改変ウイルスベクターを利用して遺伝子導入法の開発とその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な問題が生ずることは基本的にないと考えている。研究は遺伝子治療臨床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 2 号）を遵守して施行する。各種動物を用

いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の十分な配慮など）を含めて厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び各大学の動物実験指針規定に沿って行う。霊長類医科学研究センターとの共同研究として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予定のサルの実験では、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験ガイドライン」及び霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。臨床研究を実施する場合は、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配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除するとともに、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）を遵守して、人権を保障しながら適正に実施する。また、学内審査委員会及び必要な場合は国レベルでの審査を経た上で実施する。疫学調査に関しては疫学研究に関する倫理指針（平成19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) 遺伝子治療：1) マウスでは血友病遺伝子治療は技術的には確立し、年余に渡り治療レベル以上の血友病因子発現が免疫抑制薬なしで可能になった。成果をサルで確認するには、血友病サルが確認されていないために、ヒトと相同性の高いサル FVIII、FIX と発現因子を識別定量しうる系が必要になる。幸い、FIX に関しては、我々の作製したサルとヒトの因子を識別しうるモノ

クロナル抗体を用いて発現 FIX のみを定量出来る系を有している。一方、FVIII では、発現 FVIII への種々のタグ付加を試みたが感度に限界があることが明らかになったため、発現 B-domainless FVIII と full length FVIII を鑑別しうるモノクロナル抗体を作製中である。AAV1 ベクターを用いて、骨格筋に FIX 遺伝子導入したサルでは1頭に30%以上の発現が持続しているが、他の2頭は、3-5%の発現であった。一方、肝臓を標的に腸管膜静脈から AAV8 ベクターを用いて FIX 遺伝子導入したサルでは、1頭では初期から殆ど発現が見られなかったが、別の1頭は30%以上の発現が半年以上持続した。AAV9 ベクターを用いたサルでは5%の発現が維持されている。導入初期からの発現の個体差の原因を、導入部組織の導入遺伝子定量と、AAV ベクターカプシドに対する中和抗体測定法を改良してインヒビタ量を測定し検討した。結果、測定感度に問題は残るが、僅かでも中和抗体が存在すると、遺伝子導入が著しく阻害されることが示唆された。実験3ヶ月前から免疫抑制薬を投与し、既存中和抗体減少を図ったが、通常量免疫抑制薬では感度以下に下げることが難しいことが明らかとなった。現在測定系を改良しながら臨床研究を念頭にヒトでの血中中和抗体レベルを検討中である。マウスでは、 $\alpha 1$ アンチトリプシン由来のプロモータを利用して肝臓特異性を高め、さらに肝臓でのタンパク産生エンハンサー hepatic control region (HCR) を加えることで、AAV8 ベクター量を減らすことが出来て、他臓器へのベクター導入を最小限にすることが可能となった。結果、血友病マウス肝臓に FVIII 発現を限局することが可能となり、免疫抑制薬を全く使用しない条件で、インヒビター産生が見られず、長期間 FVIII の血中レベルを維持することが可能になった。

そこで、標的臓器を肝臓にしぼり、肝臓移植外科の専門家の助けを借りて、バルーン付きマイクロカテーテルを用いて、肝左葉門脈血流を遮断し、門脈内を生理食塩水で充満し、肝臓左葉内血液を短期間遮断して、AAV ベクターを投与するという方法の検討をサルで開始した。しかし、サルでは血管サイズが細すぎて、市販のバルーン付きマイクロカテーテルが使用できないため、開腹して同様の効果が得られるように計画し実験を開始した。腸間膜静脈からのベクター投与では、全く遺伝子導入の見られないレベルの AAV-8 中和抗体が存在するサルを選んで実験をこの方法で施行した。結果は、期待通り 8 週以上 20%近い FIX の発現持続が確認された。2) 血友病 A マウスを用いた実験で、血小板内発現 FVIII にはインヒビター存在下でも止血効果が確認された。FVIIa を血小板に発現させた時にみられる止血メカニズムを解析した。血小板からの FVIIa 放出は認められなかったが、静的血小板では血小板全体に発現が確認される FVIIa が、血小板活性化に伴い、凝固反応進行の場となる血小板膜表面に移動し、止血に寄与していることを示唆する結果が免疫電顕でえられた。安全性検討としての、ベクター組み込み部位解析では、特異的組み込み傾向は見られず、これまでにガン遺伝子近傍に組み込まれる例も見られなかった。しかし、稀にクローナルに増殖する(癌化はしない)例も存在した。N 数を増やして検討したが、搭載遺伝子にトリβグロビン由来インシュレータを組み込むことで、このクローナル増殖は抑制できた。現在、血友病 A イヌでマウスと同様の効果が得られるかの検討を開始している。SIV ベクター生産性向上のための検討を進め、至適プラスミド量(大量生産前に血友病遺伝子の組み込まれている pGTV 量を最適化すること

により数倍生産性が向上) やトランスフェクション細胞数(15cm シャーレあたり 1×10^7 個) が得られた。凍結融解やドライシッパ一内でも最低 3 日間は安定であることなども確認された。血友病患者の遺伝子解析も新倫理規約に基づき進行中である。この解析を通して、第 VIII 因子活性と臨床における出血傾向に若干ずれの見られる症例が存在することも明らかになった。

探索的研究の結果を次に示す: a) 相同組み換えによる遺伝子修復は血友病 A マウスからの採取幹細胞を用いた *ex vivo* 実験では可能になった。b) 血友病 A マウスの脾静脈を介して導入した正常マウス成熟肝細胞の生着は FISH 法で確認され、1-2%の FVIII 発現が 5 週まで維持された。6 年前よりサル ES 細胞などの利用は検討してきたが、テラトーマ発生率が高いため、足踏み状態であった。今回、ES 細胞を内胚葉条件で分化させると FVIII が検出されるようになり、SCID マウス脾臓へ移植することにより 13-43%の FVIII の発現が達成できることが確認できた。しかし、テラトーマの形成も観察された。c) ブタ胎児線維芽細胞の FVIII 遺伝子組み換え(KO 細胞)を作り、血友病 A クローンブタ作製へと歩を進めている。

(II) インヒビタ対策: 寛容誘導された FVIII 胸腺内投与マウス由来 CD4⁺T 細胞は非投与マウス由来抗原提示細胞共存下で FVIII 刺激に対して増殖活性を示さず、IL-2, IL-12, 及び IFN- γ も産生しなかった。さらに胸腺内投与マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞は FVIII 刺激による非投与マウス由来 CD4⁺T 細胞の増殖を抑制したが、ナイーブマウス由来の CD4⁺CD25⁺T 細胞では抑制は見られなかった。

(III) 調査研究: 関節内出血回数は疾患重症度と相関し、関節内出血は患者 QOL に影

響していることが明らかになった。頭蓋内出血は全体の 22.1%にも及び、そのうち 21%に後遺症が認められた。在宅自己注射療法は血友病 A で 72%,B で 61%に施行されていた。定期補充療法は重症例に多く、血友病 A の約 1/3 に、B の 1/5 に実施されていた。

医療機関の選択は過去 5 年間であまり改良は見られず、知り合いに会わない病院を選択する傾向も見られた。また学校においても、周囲学生の血友病に対する理解が高学年になっても、必ずしも進んでいないことが明らかになった。アンケートには自由記載欄を設けたが、その解析は次年度へ繰り越した。

D.考察

(I) 遺伝子治療：血友病は、数パーセントの因子発現で治療目的が達成されるため、遺伝子治療対象疾患としても適している。しかし、care 治療とはいえ、濃縮製剤による代換え治療が可能のため、治療の安全性については、必要十分な対策が必要である。血友病遺伝子治療技術はマウスではほぼ確立した。サルでも血友病 B に関しては、AAV ベクターを利用して個体差はあるが筋肉、及び、肝臓で治療域レベル FIX の長期発現が可能となっており、近いうちに臨床研究に進むことも可能であると思われる。AAV ベクターは安全性の高いベクターとして世界的に評価されているが、生体内投与で安全性が長期間確保されるかについてはさらにサルでの検討数を増やして基礎的検討が必要だと思われる。標的臓器としては肝臓が有利であることが示唆された。しかし、AAV ベクターがサル由来であるために、AAV 既感染による中和抗体の存在が、遺伝子導入効率を極端に低下させる問題を解決しなければならない。ヒトにも既感染によ

り AAV に対する中和抗体が存在する可能性が高い。ヒトでは免疫抑制薬使用は最小限にとどめたい。まだ 1 頭のみの検討ではあるが、ベクターと抗体を含む血液を接触させないで肝臓へ遺伝子導入することでこの問題を解決できる目安が立った。ヒトではサルより門脈血管が太いので、最小限の観血操作を含むバルーンカテーテル利用で目的は達せられることが期待される。さらに頭数を増やし効率と安全性を検討するとともに、例えば血液洗浄液の質と量の改良を図るなど技術的確立が望まれる。この方法が確立すれば、中和抗体を考慮しなくても良くなる。従って、染色体に殆ど組み込まれない AAV ベクターを利用して導入された治療遺伝子が細胞分裂などで希釈されても、同じ遺伝子治療を繰り返すことで血友病因子の血中レベルを維持しうることが期待できる。血友病 A に関しては、発現 FVIII 測定法が樹立できれば、血友病 B と同様の手順で臨床研究へ歩を進めることは可能である。いずれも、現時点における問題点は明らかであり、その解決は不可能ではない。SIV ベクターを用いて、血小板に FVIII や F VIIa を発現させる方法は、止血局所で因子濃度を高め、インヒビタの影響も無視できる極めて有効な遺伝子治療法であると考えられる。現在、大動物を用いての検討に進んでおり、その臨床応用も夢ではない。SIV ベクターの染色体組み込みの問題は、インシュレータの利用で危険を回避するための好ましい結果が得られている。より特異的で確実なインシュレータの発見と利用がのぞまれる。

生体内投与法か体外遺伝子導入法かの選択は、安全性と長期発現を目指したそれぞれの今後の技術開発の展開による。臨床応用を進める上で、ベクターの特許問題解決と、ヒトに投与可能なベクター作製に

はカンパニーと厚労省の協力が必要であり、そして、遺伝子治療の遂行には血友病患者さんの協力が不可欠である。

血友病クローンブタ作製は、もし成功すれば血友病遺伝子治療だけではなく、治療薬評価などに極めて有用な武器になりうる事が期待される。ES細胞の利用は現時点ではテラトーマの問題があり現実的ではないが、ES細胞研究領域に **breakthrough** が見られれば、これもまた強力な治療法になる事が期待される。

(II) インヒビタ対策: 胸腺組織への FVIII 暴露により抗原特異的制御性 T 細胞が誘導され、免疫寛容が誘導される可能性が明らかにされた。インヒビタは care 治療でも遺伝子治療でも克服しなければならない重要な問題である。免疫寛容メカニズムの解析を通して効率的寛容誘導法の検討を進めていくことがこれからの課題である。

(III) 調査研究: 患者参加型のアンケート調査はそれ自身独創性の高いものである。結果解析は順調に進められており、二次解析を加えることでさらに目的達成のための情報がそろえることが期待される。

E. 結論

ウイルスベクターを利用した血友病遺伝子治療技術はマウスレベルではほぼ確立できた。しかし、長期安全性確保を目指した基礎的検討は尚必要である。大動物や非ヒト霊長類のサルを用いた安全性を根幹に据えた前臨床試験の充実は臨床応用開始に不可欠である。技術的な問題点が明らかにされてきており、少しずつ克服されている。遺伝子治療臨床研究への必要な準備は着実に進行しており、近々歩を進めることが可能になりつつある。

インヒビタ対策としては、マウスでは寛容誘導のメカニズムが明らかにされてきた

が、そのメカニズムの解析を通して得た結果を利用して、インヒビター症例に対する有効で効率的な免疫寛容療法の確立が今後の課題である。患者視点からの QOL 向上を目的とした調査研究は一次解析が終了したが、数多くの新しい情報が集積されつつある。この情報を元に明らかになった問題をいかに解決していくかがこれからの課題となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yano, Y Ohmori, T Hoshide, S Madoiwa, S Yamamoto, K Katsuki, T Mitsuhashi, T Mimuro, J Shimada, K Kario, K Sakata, Y: Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in dual-antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *European Heart Journal* 2008; doi: 10.1093/eurheartj/ehn027
2. Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y: Unbalanced Expression of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Mouse Endotoxemia. *Thrombosis Res.* 2007 doi: 10.1016/j.thrombosis.2007.09.011
3. Niwa K, Mimuro J, Miyata M, Sugo T, Ohmori T, Madoiwa S, Tei C, Sakata Y: Dysfibrinogen Kagoshima with the amid acid substitution □Thr-314 to lle: Analyses of molecular abnormalities and thrombophilic nature of this abnormal molecule. *Thrombosis Res.* 2007 doi: 10.1016/j.thrombosis.2007.07.007
4. Ohmori T, Sakata Y: Platelet-directed gene therapy. *Transfus Med Hemoth.* (34)429-439.2007
5. Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y: Silencing of a targeted protein in vivo platelets using a lentiviral

- vector delivering short hairpin RNA sequence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(10):2266-72, 2007.
6. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-6, 2007.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：肝臓特異的に FVIII を高発現する AAV8 ベクターを用いた血友病 A マウスへの FVIII 遺伝子導入(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page462, 2007.
 10. 大森 司、柏倉裕志、石渡 彰、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた shRNA 発現による血小板蛋白のノックダウン(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page477, 2007.
 11. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一：血友病 B 遺伝子治療の非ヒト霊長類モデルにおける基礎的検討(会議録)臨床血液(0485-1439)48 巻 9 号 Page884,2007.
 12. 窓岩清治、山内忠彦、小林英司、大森 司、三室 淳、坂田洋一：胸腺組織を標的とした血友病 A インヒビター産生制御の基礎的検討(会議録)臨床血液(0485-1439)48 巻 9 号 Page843,2007.
 13. 窓岩清治：血友病インヒビターはどこまでわかってきたか？どこまで治療できるか？マウスモデルを用いた血友病 A インヒビター産生制御の検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page437, 2007.
 14. 大森 司：遺伝子改変動物から学ぶ血栓症 血友病遺伝子治療を目指した遺伝子改変マウス(解説)血栓と循環(0919-7036)15 巻 3 号 Page222-225,2007.
 15. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpō, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med in press.*
 16. Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. *Mol Ther in press.*
 17. Ito, T., Okada, T., Miyashita, H., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Maeda, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101: 734-41, 2007.
 18. 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.* 2007. 18: 1-7.
 19. Nogami K, Shima M, Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A. Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain. *Int J Hematol.* 2007. 85: 317-22.
 20. 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.
 21. Sakurai Y, Sugimoto H, Yoshida K, Tanaka I, Shima M, Tanaka Y, Takeda M, Nonomura A, Yoshioka A. Superficial

- fibromatosis mimicking subcutaneous hematoma: an unusual and difficult diagnosis in a patient with mild hemophilia A. *Int J Hematol.* 85: 1-4, 2007.
22. Takeyama M, Kasuda S, Sakurai Y, Shima M, Takeda T, Omura S, Naka H, Yoshioka A. Factor VIII-mediated global hemostasis in the absence of von Willebrand factor. *Int J Hematol.* 85: 397-402, 2007.
 23. 福島優理, 吉田幸一, 黒澤知子, 櫻井嘉彦, 安原肇, 高橋幸博, 嶋緑倫, 吉岡章. 臍出血で発症した重症血友病Aの新生児例. *日本小児血液学会雑誌* 21: 29-31, 2007.
 24. 嶋緑倫, 松本智子. 血栓・止血検査の最前線(2)・トロンビン生成試験の実際と応用. *日本血栓止血学会誌* 18: 217-225, 2007.
 25. 嶋緑倫. 出血性疾患の实地診療. 最新の知見を踏まえた日常臨床・出血性疾患の实地診療の実際. 先天性凝固因子欠乏症へのアプローチ. 血友病を中心に. *Medical Practice* 24: 2119-2124, 2007.
 26. 櫻井嘉彦, 吉岡章. 血液疾患の免疫病態とその治療・血友病インヒビターの病態と治療. *血液・腫瘍科* 55: 634-642, 2007.
 27. 嶋緑倫. 凝固線溶系・血友病インヒビターの病態と治療. *Annual Review 血液* 2007: 247-255, 2007.
 28. Wakai, T., Tanaka, H., Yamanaka, K., Sugimura, S., Sasada, H., Kawahara, M., Kobayashi, E., Sato, E.,; Introduction of estrus in pubertal miniature gilts. *Anim Reprod Sci* 103(1-2), 193-198, 2008.
 29. Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kobayashi, E., Morita, T.,; Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat real cancer allograft medel systems. *Urology*, 70(6): 1230-1236, 2007.
 30. Shinozawa K, Amano K, Suzuki T, Tanaka A, Iijima K, Takahashi H, Inaba H, Fukutake K. Molecular Characterization of 3 Factor V mutations, R2174L, V1813M, and a 5-bp Deletion, That Cause Factor V Deficiency. *Int J Hematol* 86:407-413, 2007
 31. 高明志, 鈴木隆史, 篠澤圭子, 稲葉浩, 辻川昭仁, 天野景裕, 新井盛大, 福武勝幸: 血友病Bを引き起こす4種の新しいミスセンス変異. *日本血栓止血学会誌* 18(2):166-174, 2007
 32. 天野景裕: 最新の血友病の止血管理. *Medical Practice* 24 (12): 2165-2170, 2007
 33. 白幡聡, 嶋緑倫, 岡敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡章: 国内における遺伝子組換え活性型凝固第VII因子製剤(注射用ノボセブン®)の高用量単回投与に関する臨床研究 第I相試験結果-安全性についての報告. *日本血栓止血学会誌* 18(6):614-618, 2007
 34. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 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, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫: わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に対するバイパス止血療法の実状. *日本血栓止血学会誌* 18(6):627-639, 2007
 35. Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, and Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* 80:373-382, 2008
 36. 瀧正志: 血友病、小児科診療ガイドライン-最新の治療方針-(五十嵐隆編集)(総合医学社発行): 226-229. 2007
 37. Tatsunami S, Taki M, Kuwabara R, Mimaya J, Shirahata A: Tracing patients with lipodystrophy on the bubble chart of antiretroviral drug usage resulted from categorical principal component analysis. 56th Session of the ISI 2007, 4 pages in CD Rom, 2007
 38. 栗原健, 奥村直哉, 小島賢一, 他: 抗HIV療法の実施状況と副作用調査に関する研究、服薬アドヒアランスの向上・維持に関する研究班平成18年度研究報告書(白阪琢磨編): 39-50. 2007
 39. 岩室紳也, 磐井静江, 小島賢一, 他: 「ソーシャルワークとカウンセリング(上・下)」公衆衛生(医学書院) 71: 66-72. 2007
 40. 白幡聡: 海外における遺伝子組換え活性型凝固第VII因子製剤投与に関する臨床研究. *日血栓止血学会誌* 18:255-264. 2007
 41. 三間屋純一: Kasabach-Merritt 症候群の治療. *小児科* 48: 445-452 2007
 42. 竹谷英之: HIV陽性患者の人工関節後感染、リウマチ科、37:531-536, 2007
 43. 瀧正志, 大平勝美, 小島賢一, 白幡聡, 竹谷英之, 立浪忍, 仁科豊, 花井十伍, 牧野健一

郎、三間屋純一、吉川喜美枝、和田育子：血液凝固異常症の QOL に関する研究—平成 19 年度調査報告書（厚生労働省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班（主任研究者 坂田洋一）分担研究。（血液凝固異常症 QOL 調査運営委員会発行）2008. 2

学会発表

1. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Hakamata Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. : Induction of factor VIII specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. XXI ISTH Congress 7/6-12 2007. Geneva, Switzerland.
2. Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y. : Silencing of A targeted protein in in vivo platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. XXI ISTH Congress 7/6-12 2007. Geneva, Switzerland.
3. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：肝臓特異的に FVIII を高発現する AAV8 ベクターを用いた血友病 A マウスへの FVIII 遺伝子導入. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩
4. 大森 司、柏倉裕志、石渡 彰、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた shRNA 発現による血小板蛋白のノックダウン. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩
5. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一：血友病 B 遺伝子治療の非ヒト霊長類モデルにおける基礎的検討. 第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日本臨床血液学会総会、2007 年 10 月 11-13 日 横浜
6. 窓岩清治、山内忠彦、小林英司、大森 司、三室 淳、坂田洋一：胸腺組織を標的とした血友病 A インヒビター産生制御の基礎的検討. 第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日本臨床血液学会総会、2007 年 10 月 11-13 日 横浜
7. 窓岩清治：血友病インヒビターはどこまでわかってきたか？どこまで治療できるか？マウスモデルを用いた血友病 A インヒビター産生制御の検討. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩
8. Kazuo Ohashi, Kohei Tatsumi, Miho Kataoka, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Akira Yoshioka, Teruo Okano, Yoshiyuki Nakajima. Hepatocyte propagation in vivo for liver tissue engineering. American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting. May 30-June 3, 2007, Seattle, WA
9. Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Miho Kataoka, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Michiyoshi Hisanaga, Hiromichi Kanehiro, Masaru Shibata, Midori Shima, Yoshiyuki Nakajima, Akira Yoshioka. A novel approach to proliferate factor IX-producing hepatocytes using urokinase-type plasminogen activator transgenic SCID mice for establishment of cell-based therapy of hemophilia B. American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting. May 30-June 3, 2007, Seattle, WA
10. Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Miho Kataoka, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato, Michiyoshi Hisanaga, Hiromichi Kanehiro, Midori Shima, Yoshiyuki Nakajima, Akira Yoshioka. A successful in vivo proliferation of factor IX-producing hepatocytes in mice for cell-based therapy of hemophilia B. Joint Conference (CTS-IPITA-IXA). Sept 15-20, 2007, Minneapolis, MN.
11. 辰巳公平、大橋一夫、嶋 緑倫、中島祥介、吉岡 章. 血友病 B に対する肝細胞移植治療の有効性. 第 43 回日本移植学会. 2007 年、仙台.
12. 辰巳公平、大橋一夫、柴田 優、嶋 緑倫、片岡美穂、立野知世、吉里勝利、久永倫聖、金廣裕道、中島祥介、吉岡 章. 血友病 B に対する肝細胞療法の実現化をめざした肝細胞増殖系の確立. 第 6 回日本再生医療学会. 2007 年、横浜.
13. 辰巳公平、大橋一夫、駒井悠一、別所由佳、嶋 緑倫、中島祥介、吉岡 章. 血友病 B に対する肝細胞移植治療～マウスモデルにおける検討～. 第 6 回日本再生医療学会. 2007 年、横浜.
14. 辰巳公平、大橋一夫、嶋緑倫、中島祥介、吉岡章. 血友病 B に対する肝細胞移植治療の有効性～マウスモデルにおける検討～. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年、志摩.
15. 粕田承吾、櫻井嘉彦、辰巳公平、嶋緑倫、吉岡章. ヒト第 VIII 因子発現マウス ES 細胞を用いた血友病 A 細胞療法. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年、志摩.
16. Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Hitoshi Iwaski, Toshiaki Tabata, Mariko Yoshizaki, Noriko Nagashima, Kentaro Washizawa, Satoshi Fujikawa, Eiji Akiba,

- Duncan M. Geddes, Uta Griesenbach, Eric W.F.W. Alton and Mamoru Hasegawa. Evidence of Progenitor Cell Transduction in Mouse Nasal Epithelium with Lentiviral Vector Pseudotyped with Sendai Virus Envelopes. 第10回アメリカ遺伝子治療学会、2007年、米国・シアトル
17. Katsuyuki Mitomo, Makoto Inoue, Hitoshi Iwasaki, Toshiaki Tabata, Mariko Yoshizaki, Noriko Nagashima, Kentaro Washizawa, Satoshi Fujikawa, Eiji Akiba, Duncan M. Geddes, Uta Griesenbach, Eric W.F.W. Alton and Mamoru Hasegawa. DETECTION OF CLUSTERED GFP POSITIVE CELLS TRANSDUCED BY LENTIVIRAL VECTOR PSEUDOTYPED SENDAI VIRUS ENVELOPES IN MOUSE NASAL EPITHELIUM. 第13回日本遺伝子治療学会、2007年、名古屋
 18. Inaba H, Yatomi Y, Shinozawa K, Otaki M, Suzuki T, Amano K, Fukutake K: ANALYSIS OF DISCREPANT ASSAY-DETERMINED ACTIVITY LEVELS OF FACTOR VIII ASSOCIATED WITH R531H MUTATION. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.
 19. Shinozawa K, Amano K, Takamiya O, Shiozaki N, Ando T, Seita I, Ogata K, Suzuki T, Inaba H, Fukutake K: FACTOR V DEFICIENCY DUE TO A NOVEL HOMOZYGOUS MUTATION: FV N468S, BUT NO BLEEDING TENDENCY. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.
 20. Seita I, Shinozawa K, Kato H, Koh A, Tsujikawa A, Suzuki T, Amano K, Inaba H, Fukutake K: DOUBLE MUTATION, A 2-BP DELETION AND VAL 211ILE, IN THE BLOOD COAGULATION FACTOR IX GENE IN A PATIENT WITH SEVERE HEMOPHILIA B. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.
 21. Suzuki T, Amano K, Kagawa K, Tsujikawa A, Ogata K, Uchida T, Koh A, Otaki M, Kato H, Seita I, Tamura A, Fujita S, Takahashi Y, Tanaka A, Koshihara K, Nishida Y, Yamamoto Y, Fukutake K: CONTINUOUS INFUSION OF VON WILLEBRAND FACTOR/FACTOR VIII CONCENTRATE IN PATIENTS WITH CONGENITAL VON WILLEBRAND DISEASE. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.
 22. 松下 正、天野景裕、瀧 正志、岡 敏明、酒井道生、白幡 聡、藤井輝久、高田 昇、高松純樹、竹谷英之、花房秀次、日笠 聡、福武勝幸、三間屋純一、田中一郎、吉岡 章、嶋 緑倫: 血友病患者の凝固因子補充療法の標準化. 第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
 23. 稲葉 浩、篠澤圭子、香川和彦、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸: 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)試薬の第VIII因子に対する感受性の多様性と軽症血友病A. 第54回日本臨床検査医学会学術集会・第47回日本臨床化学会年次学術集会連合大会、2007年、大阪
 24. 天野景裕: 後天性血友病の診断. 日本血栓止血学会学術標準化委員会 2007後天性血友病の診断と治療シンポジウム、2007年、東京
 25. 天野景裕、稲葉 浩、篠沢圭子、福武勝幸: 血友病インヒビターの分子生物学的側面「血友病シンポジウム: 血友病インヒビターはどこまでわかってきたか? どこまで治療できるか?」第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
 26. 大井千愛、山下敦己、武藤真二、浅原美恵子、山崎 哲、篠沢圭子、天野景裕、福武勝幸、瀧 正志: 第IX因子製剤に対してアナフィラキシー症状を呈する血友病B high responderにおけるITI有効例. 第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
 27. 篠澤圭子、清田育男、大瀧 学、高明志、辻川昭仁、田村 睦、鈴木隆史、天野景裕、西田恭治、稲葉 浩、福武勝幸: 日本人血友病B患者の遺伝子解析—第3報—. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会、2007年、横浜
 28. 稲葉 浩、篠沢圭子、天野景裕、鈴木隆史、福武勝幸: 軽症血友病Aの解析—第二報—. 第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
 29. Kawana-Tachikawa A, Miyazaki E, Tomizawa M, Odawara T, and Iwamoto A. Highly restricted T cell receptor repertoire against an immunodominant HIV-1 CTL epitope with a stereotypic amino acid substitution. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. (Sydney, Australia) July 22-25, 2007
 30. Kawana-Tachikawa A, Motose M, Odawara T, Fujii T, and Iwamoto A. Maintenance of proliferative PD-1 low memory CD8+ T cells specific for eradicated virus in HIV-1 patients with high CD4 count. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Boston, USA) February 3-6, 2008
 31. 鯉渕智彦、古賀道子、松村武史、古賀

- 一郎、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉. HAARTを施行した HIV/HBV 重複感染者の解析. 第 81 回日本感染症学会総会、2007 年 4 月 10-11 日、京都
32. 中山香、立川(川名)愛、小田原隆、藤井毅、小島直也、岩本愛吉. HIV セットポイントを規定する免疫関連因子の探索. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21-23 日、札幌
33. 立川(川名)愛、宮崎恵利子、富澤麻利子、本瀬真樹子、小田原隆、岩本愛吉. エスケープ変異を伴うエピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21-23 日、札幌
34. 宮崎菜穂子、中村哲也、小田原隆、伊賀睦了、鯉淵智彦、遠藤宗臣、藤井毅、細野治、森本畿夫、吉田久博、岩本愛吉. 当院外来患者へのアンケート調査で見られた服薬の問題点と服薬指導の意義. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
35. 遠藤宗臣、坂本勇一、前田卓哉、鯉淵智彦、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HIV プロテアーゼ阻害剤アタザナビル of 長期投与における臨床効果に関する検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

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 准教授
窓岩清治 自治医科大学 講師
大森 司 自治医科大学 講師

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療: In vivo へのベクターの直接投与には染色体への組み込みがほとんどおこらない AAV ベクターを用い、Ex vivo にて細胞へ遺伝子導入し再移植するときには染色体への組み込みが必要であるため SIV ベクターを用いることとしている。これまで、血友病イヌでの検討を視野に入れ、種々のプロモーターの下流にイヌ FVIII 遺伝子を搭載したベクターを作製し、血友病 A マウスで発現を検討したところ、AAV8 ベクターと強力な肝臓特異的な HCRHAAT-プロモーターを用い肝臓に限定してイヌ FVIII を発現させることで、イヌ FVIII 活性を免疫抑制なしに正常イヌ FVIII 活性の 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、HCRHAAT-プロモーターを用いることで血友病 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 マウスにおいて AAV ベクターをもちいた 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 (奈良県立医科大学より自治医科大学に導入済み) を用いた FVIII 発現実験を行うことを遂行中である。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。さらに、血友病 A マウスを用い、FVIII 遺伝子の異常を是正する検討では、血友病 A マウスより樹立した間葉系幹細胞の FVIII 遺伝子異常を相同組み換えにより是正できた。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 マウスにて長期発現が得られた。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確立できたが、測定感度を高める検討を行っている。SIV ベクターを用いて血液幹細胞へ FVIII 因子遺伝子を導入し GPIb α プロモーターを用い血小板へ特異的に FVIII を発現させることで血友病マウスの出血症状を改善しえ、さらに、活性化型 FVII 因子を血小板に発現させることで血友病 A マウスの全血凝固が改善し尾切断後の死亡率も改善しえた。血友病 B 遺伝子治療: ヒト FIX 特異的モノクロナル抗体で検出可能な変異カニクイザル FIX (FIXT262A:262 位の Thr を Ala に置換) を発現する AAV1 ベクターを 3 頭のカニクイザル骨格筋に投与することで変異カニクイザル 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 FIX 発現をえることができる AAV8、AAV9 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、AAV9 に対する中和抗体が低力価でも存在すると血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。しかし、それぞれのベクター投与群にの各 1 頭においては 20%前後と治療域に達する FIX の発現が得られた。中和抗体が存在するカニクイザルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を試み、高い FIX 発現がえられた。

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。

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問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プロモーターを検討した。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 遺伝子をクローニングし、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: 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、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、肝臓特異的な HCR-HAAT プロモーターに肝臓特異的なエンハンサーを結合させ改変することで強力な肝臓特異的プロモーターを作製した。AAV8 ベクターに HCR-HAAT プロモーターを組み合わせることで、低用量のベクター投与によってもイヌ 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。また、高用量のベクターを用いることで血友病 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し、血友病 A イヌを奈良県立医科大学より導入した。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。さらに、血友病 A マウスを用い、FVIII 遺伝子の異常を是正する検討では、血友病 A マウスより樹立した間葉系幹細胞の FVIII 遺伝子異常を相同組み換えにより是正できた。血友病 B 遺伝子治療：サルについては、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（前年度に報告）、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ので、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 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 AAV8、AAV9 に対する中和抗体が低力価でも存在すると血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。しかし、それぞれ 1 頭においては 20%前後と治療域に達する FIX の発現が得られた。低力価の中和抗体が存在するカニ

タイザルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を試み、20%前後の FIX 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髓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 を血小板特異的に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。この効果は FVIII 因子に対するインヒビターを作成した血友病 A マウスにおいても出血症状の改善を認めた。

インヒビター対策：高解像度超音波ガイド下に、血友病 A マウス胸腺組織にヒト遺伝子組み換え第 VIII 因子を投与したところ、胸腺内非投与群と比較してインヒビターの発生率は有意に低値であった。CD4⁺T 細胞、抗原提示細胞(APC) および CD4⁺CD25⁺T 細胞を単離し、*in vitro* でのサイトカン産生を ELISA 法により、CD4⁺T 細胞増殖活性を ³H-thymidine の取り込み率により評価した。胸腺内投与マウス由来 CD4⁺ T 細胞は、胸腺内非投与マウス由来 APC 共存下で第

VIII 因子刺激に対して増殖活性を示さず、IL-2、IL-12 および IFN- γ も産生しなかった。胸腺内投与マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞は、第 VIII 因子刺激に対する胸腺内非投与マウス由来 CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制した。この抑制効果はナイーブマウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞ではみられなかった。新生仔血友病 A マウスへヒト 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、サルは種々の AAV に既感染のことが多く、中和抗体が存在するためサルの利用は容易ではない。AAV8 に対する低抗体価のサルで、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投与方法の検討では、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められた。AAV に対する中和抗体による遺伝子導入抑制はヒトにおいても同様な問題であるが、その解決方法の手がかりがえられた。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が導入されたので、実験を遂行する予定である。さらに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。解決すべき問題点は明らかになっており、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る

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と考えられる。

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、技術的にも克服可能となってきた。インヒビター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

論文発表

1. Yano, Y Ohmori, T Hoshide, S Madoiwa, S Yamamoto, K Katsuki, T Mitsuhashi, T Mimuro, J Shimada, K Kario, K Sakata, Y: Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in dual-antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *European Heart Journal* 2008; doi: 10.1093/eurheartj/ehn027
2. Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y: Unbalanced Expression of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Mouse Endotoxemia. *Thrombosis Res.* 2007 doi: 10.1016/j.thrombosis.2007.09.011
3. Niwa K, Mimuro J, Miyata M, Sugo T, Ohmori T, Madoiwa S, Tei C, Sakata Y: Dysfibrinogen Kagoshima with the amid acid substitution γ Thr-314 to Ile: Analyses of molecular abnormalities and thrombophilic nature of this abnormal molecule. *Thrombosis Res.* 2007 doi: 10.1016/j.thrombosis.2007.07.007
4. Ohmori T, Sakata Y: Platelet-directed gene therapy. *Transfus Med Hemoth.* (34)429-439.2007
5. Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y: Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(10):2266-72, 2007.
6. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-6, 2007.
7. 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.
8. 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.

carcinomatosis. Thromb Res. 119(2):229-40. 2007.

9. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：肝臓特異的に FVIII を高発現する AAV8 ベクターを用いた血友病 A マウスへの FVIII 遺伝子導入(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page462, 2007.
10. 大森 司、柏倉裕志、石渡 彰、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた shRNA 発現による血小板蛋白的検討(会議録)臨床血液(0485-1439)48 巻 9 号 Page843, 2007.
14. 窓岩清治：血友病インヒビターはどこまでわかってきたか？どこまで治療できるか？マウスモデルを用いた血友病 A インヒビター産生制御の検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page437, 2007.
15. 大森 司：遺伝子改変動物から学ぶ血栓症血友病遺伝子治療を目指した遺伝子改変マウス(解説)血栓と循環(0919-7036)15 巻 3 号 Page222-225, 2007.

学会発表

1. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Hakamata Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. : Induction of factor VIII specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. XXI ISTH Congress 7/6-12 2007. Geneva, Switzerland.
2. Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y. : Silencing of A targeted protein in in vivo platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. XXI ISTH Congress 7/6-12 2007. Geneva, Switzerland.
3. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一：肝臓特異的に FVIII を高発現する AAV8 ベクターを用いた血友病 A マウスへの FVIII 遺伝子導入第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩
4. 大森 司、柏倉裕志、石渡 彰、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた shRNA 発現による血小板蛋白のノックダウン, 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩
5. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一：血友病 B 遺伝子治療の非ヒト霊長類モデルにおける基礎的検討. 第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日本臨床血液学会総会、2007 年 10 月 11-13 日 横浜
6. 窓岩清治、山内忠彦、小林英司、大森 司、三室 淳、坂田洋一：胸腺組織を標的とし

のノックダウン(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page477, 2007.

11. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、寺尾恵治、小澤敬也、坂田洋一：血友病 B 遺伝子治療の非ヒト霊長類モデルにおける基礎的検討(会議録)臨床血液(0485-1439)48 巻 9 号 Page884, 2007.
12. 窓岩清治、山内忠彦、小林英司、大森 司、三室 淳、坂田洋一：胸腺組織を標的とした血友病 A インヒビター産生制御の基礎

た血友病 A インヒビター産生制御の基礎的検討第 69 回日本血液学会総会、第 49 回日本臨床血液学会総会、2007 年 10 月 11-13 日 横浜

7. 窓岩清治：血友病インヒビターはどこまでわかってきたか？どこまで治療できるか？マウスモデルを用いた血友病 A インヒビター産生制御の検討. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年 11 月 15 日-17 日 志摩

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)