

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書（平成19年度）

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うとともに、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し、遺伝子導入の効果との関係を明らかにした。

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（カニクイザル）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。

・骨髄間葉系幹細胞を利用した研究：骨髄の間葉系幹細胞（MSC）は遺伝子を導入し再び生体内に戻して、蛋白質の補充療法として利用することができる。野生型 AAV が第 19 番染色体の AAVS1 領域（19q13.4）に特異的に組み込まれる機構を用い第Ⅸ因子遺伝子を同部位に特異的に組み込み、挿入変異を起こしにくい第Ⅸ因子を恒常的に発現する MSC クローンを樹立した。また MSC クローンをマウスに移植し凝固因子の補充療法の基礎的検討を行った。

（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で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。医薬基盤研・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、比色法の採用や好適な標的細胞に関する探索を通じて実験条件の最適化を行い、結果として検出感度を高めることができた。この方法を用いて過去のサンプルを再検討した結果、8型ベクターの門脈内注入によっても効果の見られなかった3頭はいずれも中和抗体が陽性であることが判明した。

・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%相当の濃度に達した。一方、8型のベクターでは、改良法にて中和抗体陰性と判定した個体において最高で健常人の29%に至る血中濃度が認められ、長期的な発現が得られた。また、9型のベクターを門脈内に投与した2頭のうち1頭では治療域の血中濃度が長期にわたり持続した。

・骨髄間葉系幹細胞を利用した研究：AAVS1 領域に第IX因子遺伝子が組み込まれたMSC クローンを計4クローン樹立した。培養上清の第IX因子量は正常血清の値を100%とすると、5%前後であった。 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個 NOD/SCID マウスの皮下に移植し経時的に血中第IX因子の量を測定したところ、正常値の0.1%未満で移植後8週までに分泌量が低下した。

### 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型の有用性が高いものと考えられている。今回の検討の結果、たとえ低力価であっても中和抗体が存在すれば遺伝子導入に対する影響が非常に大きいものと考えられた。従って、実験に際しては事前に中和抗体のスクリーニングを徹底的に行う必要があり、これはヒトに対して治療を行う際にも必須の検査であると思われる。9型に対する中和抗体の検出感度に関しては今のところ不十分と思われ、今後更に改良が必要である。これは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・肺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。

これまでの霊長類における検討では免疫抑制剤を長期にわたり使用してきたが、ヒトへの投与に際しては免疫抑制剤の使用はできるだけ避けたいのが実情である。骨格筋への直接の注入は導入遺伝子産物に対する免疫反応を惹起させやすいことから、骨格筋を標的にする場合には血管経由でベクターを投与する技術に関しても今後検討が必要と思われる。また、肝臓を標的にする場合には免疫抑制が不要であるとする報告も散見されるようになってきたことから、この点からの検討も行っていきたい。

MSC を利用した第IX因子の補充療法は、生体内での第IX因子の分泌量が治療域に達していないことから現時点の方法では実用性は低いと判断した。個々のMSCの第IX因子の分泌量を増加させる必要があると考えられる。

血友病Bに対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的とし

て2型 AAV を用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても長期的な効果は認められなかったと最近報告されている。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、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。また、間葉系幹細胞を用いたアプローチについても検討を行った。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）

Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, 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*.

Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, SI., 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*.

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.

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.

#### H. 知的財産権の出願・取得状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（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・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削減などが期待できる。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にしてきた。今回、血友病 B における肝細胞移植の治療効果をマウスモデルを用いて検討した。C57B16 野生型のマウスから肝細胞を分離・精製し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの肝臓に脾臓経由で移植した。移植群では 1-2% の活性の上昇がえられ、移植後 5 週まで維持された。FISH 解析により、移植細胞の生着を確認した。成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対する有用な治療法となりえることを示した。

また、これまで、われわれは tetracycline (DOX) 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に取り組んできた。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、内胚葉条件では第Ⅷ因子活性および抗原が検出された。さらに第Ⅷ因子産生 ES 細胞を SCID マウスの脾臓へ移植したところ、移植後 3 週間でヒト第Ⅷ因子抗原をマウス血中に検出した (13~43%)。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。

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。補充療法を主とする従来の治療方針から脱却して、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可能となる新規治療としての遺伝子治療や細胞治療の完成が期待される。こ

れまでに我々はマウスを用いた実験において、成熟肝細胞移植が血友病 A に対して有効な治療手段となることを明らかにしてきた。今回我々は、第Ⅸ因子も肝細胞で産生されるという点に着目して、血友病 B における肝細胞移植の治療効果をマウスモデルを用いて検討した。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。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を持つ ES 細胞 (Ainv18) を用いてヒト第 VIII 因子産生細胞の作製を試行した。

## B. 研究方法

### 1) 肝細胞移植

C57BL6 野生型のマウスからコラゲナーゼ灌流法にて肝細胞を分離・精製し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの肝臓に脾臓経由で移植した。移植後経時的に採血を行い第 IX 因子活性を測定した。肝細胞を移植したマウスから RNA を抽出し第 IX 因子 mRNA の発現を定量した。また、肝組織標本作製し、FISH 解析を用いて移植細胞の生着率を評価した。

### 2) ES 細胞を用いたヒト第 VIII 因子産生細胞の作製

ヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだ Ainv18 ES 細胞を作製し、中胚葉系、内胚葉系細胞に分化誘導を行い、培養上清中の第 VIII 因子を測定した。また得られた第 VIII 因子産生細胞を SCID マウスの脾臓に移植した。

## C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

### 1) 肝細胞移植

25 匹の血友病 B マウスに細胞移植したところ、移植群では 1-2% の活性の上昇がえられ、移植後 5 週まで維持された。sham operation 群では活性の増加は認めなかった。レシピエントマウスに明らかな肝障害はみられなかった。雄性肝細胞を雌性肝臓に移植したマウスを選択し、FISH 解析を行なったところ、レシピエントの肝組織標本に Y 染色体が検出され、移植細胞の生着が確認できた。一部のマウス群では移植後 15 日目に再度開腹して 2 回目の細胞移植を行なったところ、相加的な血中第 IX 因子活性の増加を認めたことから、「繰り返し

移植の有効性」も証明された。移植マウス肝では第 IX 因子 mRNA の発現が認められ、また脾臓でもわずかに第 IX 因子 mRNA の発現をみとめた。肝細胞は移植後もその第 IX 因子合成能を保持しており、成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対する有用な治療法となりえることを示した。

### 2) ES 細胞を用いたヒト第 VIII 因子産生細胞の作製

未分化 ES 細胞の培養上清中には第 VIII 因子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考えられ、ES 細胞を分化誘導したところ、内胚葉条件で第 VIII 因子活性および抗原を検出した ( $\sim 15$  mU/ml)。B-domain 改変体ヒト第 VIII 因子 226aa/N6 construct を用いることにより FVIII の分泌効率が著明に向上した。第 VIII 因子産生 ES 細胞を SCID マウスの脾臓へ移植することにより、移植後 3 週間でヒト第 VIII 因子抗原をマウス血中に検出した (13~43%)。なお脾臓にはテラトーマが形成されており、今後の検討が必要であるが、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

## E. 研究発表

原著論文

1) 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.
- 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
- 口頭発表
- 1) Kazuo Ohashi, Kohei Tatsumi, Miho Kataoka, Chise Tatenos, 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
  - 2) Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Miho Kataoka, Chise Tatenos, 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
  - 3) Kohei Tatsumi, Kazuo Ohashi, Miho Kataoka, Chise Tatenos, 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

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

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

分担研究者：小林英司 自治医科大学 教授

（研究協力者：菱川 修司 自治医科大学 講師）

研究要旨： 昨年度までは、マウス実験において導入が確認されている AVV ベクターによる肝臓への遺伝子導入に関し研究を行ってきた。今年度はカニクイザルを対象にした手術手技を開発することを目的とし実験を行い検討した。結果、門脈本幹直接穿刺法が適当と思われた。下記にその 2 つの実験方法を説明する。

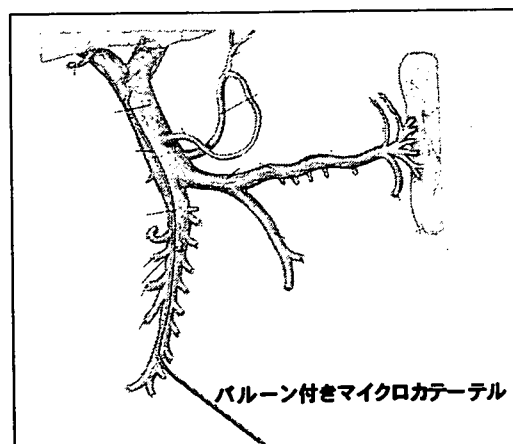
### A. 研究目的

血友病の遺伝子治療として、欠損凝固因子を遺伝子導入によって補う試みがこれまでなされてきており、我々も種々のウィルスベクターや非ウィルス法を駆使して、遺伝子導入実験を行ってきた。今年度は、現在までマウス実験において導入が確認されている AVV ベクターによる肝臓への遺伝子導入に関し、前臨床としてカニクイザルを対象とした手術手技を開発することを目的とした。

先に述べたように、AVV ベクターの門脈注入による肝臓における遺伝子発現は、マウスを対象にした実験では確認されているが、現在までのところ前臨床となるサルを使ったそれでは成功していない。原因として「対象とするカニクイザル血液中に AVV ベクターに対する中和抗体が存在し、注入後ベクターが肝臓に到達する前に抗体により中和されてしまう」という理由が推測された。よって今回は「ベクター注入開始前に門脈血流を遮断し、生理食塩水等で門脈内を flash out させた後に AVV ベクターを注入する」方法を検討した。

### B. 研究方法①

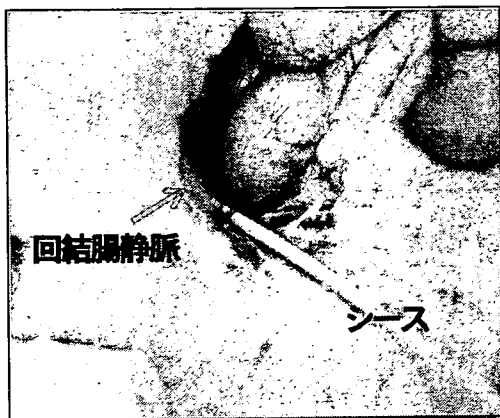
実験 1：右図のように回結腸静脈よりバルーン付きマイクロカテーテルを挿入し、カテ先を肝門部・門脈左枝まで誘導した後に、バルーンを拡張させ門脈血流を遮断、カテ先から生理食塩水を注入し門脈内を充満させた後に AVV ベクターを注入するシステムを検討した。しかしながら、対象とするカニクイザルの体重が 3～7kg と人間に比し軽量であるため、使用するカテーテル径が限定されるなど、実際の処置内容に関し問題が残った。





### C. 研究結果①

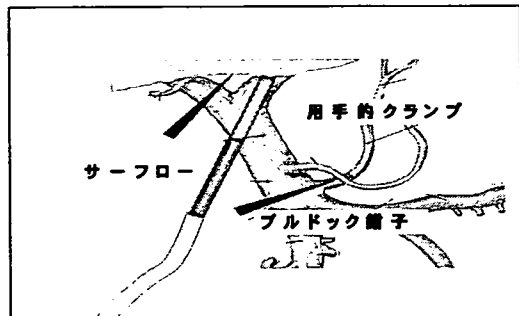
開腹後腹腔内を検索したところ、十二指腸付近と下大勢脈周囲に生理的と思われる癒着が認められ、同部の剥離が必要であった。回腸末端を検索したところ、人間に比較して（上行結腸が後腹膜に固定されていないためか）同部腸間膜が捻じれており、回結腸静脈の確認がやや困難だった。同静脈にガイドワイヤーを挿入し、シースまでは設置できたが、準備したマイクロカテーテルは挿入不可能であった。よって今後、同様な体格のカニクイザルを使用した場合、回結腸静脈にバルーン付きカテーテルを挿入できるような太いシースを挿入することは非常に困難（ほぼ不可能）と思われた。



### B. 実験方法②

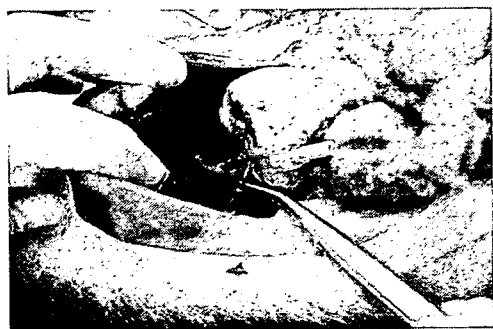
次に、直接門脈にアプローチする方法を検討した。すなわち、門脈本幹に直接カテを穿刺し用手的に門脈左枝をクランプし、カテ先から生理食塩水を注入し門脈内を充

満させた後に AVV ベクターを注入するという方法である。



### C. 研究結果②

肝門部を観察したところ、同部の解剖はほぼ人間と同様と思われた。門脈本幹径は約 5~6mm であった。肝門部漿膜を最小限剥離した後、肝門部全体並びに門脈本幹にサーフローを挿入し先端を左枝まで誘導した。門脈左枝を用手的にクランプした後にサーフローより墨汁（5CC）を注入したところ、肝左葉に墨汁が広がったことが観察された。また、摘出後の肝臓を確認したところ左葉全体が黒く染色されており、墨汁が十分に肝内に浸透していることが確認された。





#### D. 考察・結論

ウィルスベクターの門脈注入による肝臓における遺伝子発現実験において、バルーン付きマイクロカテーテルによる操作は技術的に及び、門脈本幹直接穿刺法を検討した。特に後者は、カテ操作が無く確実にベクターを注入でき、また、肝門部を一時クランプするため血液が混入する心配もない本実験に適した手技と思われた。今後は、同手技を用い生体カニクイザルを対象とした遺伝子導入実験を行い、その導入効果に関して詳細に検討する。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Madoiwa, T., Yamauchi, T., Kobayashi, E., Hakamata, Y., Dokai, M., Makino, N., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Ohmori, J., and Sakata, Y., : Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. (in press)

学会発表 31 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

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のポテンシャルを有するベクターとして捉えられている。我々が開発したサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターは、有効性、安全性試験の実施あるいは製造法の構築が進められており、開発が進んでい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、ベクター側の基本性能・生産性データを取得した。本年度の分担研究として検討した課題は、(1)SIV ベクター生産条件の再検討 (2)SIV ベクター遠心濃縮条件の検討 (3)SIV ベクターの安定性試験についての 3 点である。(1)の SIV ベクター生産条件については、トランスフェクションに使用するプラスミド量および細胞数について検討を行い、(2)では、高速遠心機によるベクター濃縮時の遠心力の検討を行った。(3)に関しては凍結融解処理、液体窒素ドライシッパーは中における安定性を検討した。

A. 研究目的

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応のポテンシャルを有するベクターとして期待されている。

一方で、他のウイルス由来のベクターよりもベクター生産性が低いこと、臨床試験例が少ないことがあげられる。そこで、本年度はベクター生産性を向上するための生産プロトコルの条件検討とベクターを使

用する際に必要なベクター安定性に関する検討を行った。

B. 研究方法

(1) SIV ベクター生産条件の検討

1-1. 生産条件検討項目：プラスミド量

SIV ベクターは現在、一過性のトランスフェクションで生産、回収している。このトランスフェクションに使用する 4 種類のプラスミド； pGTV, 3<sup>rd</sup> PV, pVSVG, pCI-rev の使用量比と生産性を比較することによって、プラスミド使用量の最適値を求めた。

1-2. 生産条件検討項目：細胞数

SIV ベクターの生産には、293T/17 細胞を使用している。細胞播種密度とベクター生産性を比較検討した。

### (2) SIV ベクター濃縮条件の検討

SIV ベクターを動物投与実験に使用する場合、高速遠心法でベクターを濃縮、精製している。高速遠心におけるベクター回収率を検討した。

### (3) SIV ベクターの安定性試験

精製した SIV ベクターを動物実験等を使用する場合の安定性について、(1)ベクターを保存状態から融解して使用するときの安定性と凍結融解の繰り返しに対するベクター安定性 (2)ドライシッパーによる輸送時の安定性の2点について検討した。

#### 3-1. 安定性試験検討項目：凍結融解の繰り返し

濃縮精製し、力価を測定した SIV ベクターは、1ml のセラムチューブに 200  $\mu$ l の容量で分注し、使用時まで-80℃で保存している。凍結融解は 37℃で急速融解、ドライアイスエタノールバスによって急速凍結を行った。凍結融解の繰り返しは 10 回まで行い、そのベクター安定性を検討した。

#### 3-2. 安定性試験検討項目：ドライシッパー

ドライシッパーは、液体窒素の層の内側にベクターを保存する空間があり、液体窒素とベクターは直接触れない構造になっている。ベクター輸送を考慮した実験条件として、-80℃の保存温度から-195℃のドライシッパーにベクターを移して 3 日間放置した。その後、再び通常の保存温度である-80℃に移し、一晩おいてから力価を測定した。対照のベクターは-80℃に試験期間保存しておいたベクターを用いた。温度変化が予想さ

れる移動は迅速に行い、力価の測定は急速融解を基本操作とした。

(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 レベルで認可されており、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に従って、「組み換え DNA 実験指針」(平成 14 年 1 月 31 日付文部科学省告示第 5 号)を遵守した実験操作を行った。また、本研究において、実験動物への投与実験は厳選して行った。

## C. 研究結果

### (1) SIV ベクター生産条件の検討

#### 1-1. 生産条件検討項目：プラスミド量

SIV ベクターを一過性のトランスフェクションで生産する場合に使用するプラスミドの基本使用量比を再検証した。決定した量比での生産性は、マーカー遺伝子 GFP の場合、約  $5 \times 10^7$  TU/ml であった。pGTV は実験によって搭載遺伝子の種類が異なる。血友病では血液凝固因子が治療用遺伝子として pGTV に組み込まれている。搭載遺伝子の異なる SIV ベクターを大量生産する必要があるときには、大量生産前に pGTV の量を最適化すると SIV ベクターの生産性は数倍向上することがわかった。

#### 1-2. 生産条件検討項目：細胞数

トランスフェクション前日に 15cm シャーレに播種する 293T の細胞数を再検討した。15cm シャーレ 1 枚あたりに使用する細胞数は約  $1 \times 10^7$  の場合に生産性が高く  $5 \times 10^7$  TU/ml であった。また粒子力価もあわせて比較検討した結果、同条件で粒子力価と機能力価の比が最も小さかった。すなわち、

この細胞数を用いた生産条件で回収したベクターの質が良いことを示唆している。

### (2) SIV ベクター濃縮条件の検討

SIV ベクターを濃縮するとき、従来は 20,000xg で 4 時間行っていた。作業時間を短縮するために 40,000xg、2 時間の条件と比較検討した。その結果、従来の半分の時間の 2 時間でも 40,000xg であれば 60%以上のベクターを回収可能であることがわかった。

SIV ベクターの濃縮には、高速遠心機；ベックマン製 Avanti J-251 を使用している。使用ローターはベックマン製 JA-18, fixed angle である。SIV ベクターの遠心濃縮には swing type の SW ローターよりも fixed angle type のローターを用いた方が回収率は高かった。また、遠心管の材質も回収率に影響を与え、これまでの検討ではポリカーボネート製の遠心管を使用した場合が最も良好な回収率であることが確認されている。

### (3) SIV ベクターの安定性試験

#### 3-1. 安定性試験検討項目：凍結融解の繰り返し

SIV ベクターの凍結融解の繰り返しは、37℃での急速融解、ドライアイスエタノールバスでの急速凍結を基本操作として行い、ベクター容器は標準的に使用している 1ml のセラムチューブに 200  $\mu$ l のベクター量で行った。温度変化は-80℃→37℃→4℃である。その結果、 $1 \times 10^9$  TU/ml に濃縮精製したベクターの機能力価の変化は認められなかった。動物実験等でベクターを使用する時には、通常-80℃から 1 回のベクターの融解操作なので、測定した力価どおりの値で実験操作が可能であることがわかった。

#### 3-2. 安定性試験検討項目：ドライシッパ

##### 二

ベクターの長距離輸送時の安定性のデータを把握することは、生産プロトコルの確立と同様に必要不可欠なデータである。今回は、濃縮精製した  $2 \times 10^9$  TU/ml のベクターを使用した。このベクターをドライシッパ内に 3 日間保存した条件で安定性を検討した。温度変化は、通常の保存温度が-80℃で、ドライシッパが-195℃、3 日後にもう一度-80℃のフリーザーに戻した後、SIV ベクターを融解して力価を測定した。その結果、SIV ベクターは、本実験条件において、その力価は対照の-80℃に保存しておいたものが  $(2.0 \pm 0.2) \times 10^9$  TU/ml であるのに対し、ドライシッパでは  $(2.1 \pm 0.3) \times 10^9$  TU/ml の測定力価であった。このことから、ドライシッパ内で少なくとも 3 日間は SIV ベクターの力価は安定であることが示された。

#### D. 考察

SIV ベクターの生産条件として（１）生産時に使用するプラスミド量（２）生産に用いる 293T 細胞数（３）ベクター濃縮精製条件について検討した。その結果、治療用遺伝子を搭載した場合でも、これらの条件を使用することにより、従来よりも数倍のベクター生産を期待できることが分かった。また、生産条件により SIV ベクターの品質も異なることが分かった。品質は主に粒子力価と機能力価の比で表される。一般的に粒子力価の方が機能力価よりも大きく、このことは生産した SIV ベクター粒子の中に非感染性の粒子が含まれていることを意味する。トランスフェクション時に最適な細

胞数を使用することにより、粒子力価と機能力価の比を小さくすることができる。すなわち、より品質の高いベクター生産が可能であることが判明した。また、培地から牛由来のタンパク質をできる限り除去することも重要であり、免疫反応は一般的に低い方が遺伝子治療の成績が良くなる傾向も報告されている。FBS の添加の有無などベクター回収用培地の検討が必要である。

SIV ベクターの安定性試験は、ベクター使用時を想定した繰り返し凍結融解と輸送を想定したドライシッパー内での安定性試験を実施した。いずれの条件でも SIV ベクターの力価はほとんど変化しなかった。低分子化合物と異なり遺伝子治療用ベクターなどのバイオリジックスの場合は、特に安定性が問題となるが、SIV ベクターでは適切な基本操作を行っている限り、その安定性には特に問題ないことが分かった。

#### E. 結論

SIV ベクターを動物実験等に用いるためには、大量生産を行い、濃縮精製する必要がある。また、ベクター力価の安定性が保たれる条件で *in vivo* 投与実験を行うことにより実験の再現性が保証される。

本年度の検討項目はベクターの基本性能

・生産性データを取得することを目的に、

(1) SIV ベクターの生産条件の再検討

(2) SIV ベクターの濃縮条件の検討を行った。生産条件については、プラスミド量、細胞数、培地等の最適条件を再検証した。

(3) 濃縮条件については、ベクター回収率を指標として遠心力、時間、ローター、遠心管の材質等を検討した。その結果、従来のプロトコールに比べて数倍のベクター

力価が回収可能であることが示された。

また、SIV ベクター使用時、輸送時の安定性試験を行った。使用時のベクターの凍結融解は通常 1 回であるが、10 回の凍結融解を繰り返し行った場合でも、SIV ベクターの力価が減少することはなく、きわめて安定であることが判明した。さらに、長距離輸送に使用されるドライシッパー内でも安定であることが分かった。以上の結果より、SIV ベクターは他のレンチウイルスベクターと同等あるいはそれ以上に使用しやすい実用的なベクターであることが証明できた。

#### G. 研究発表

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. 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

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

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：出願済み（未公開）

(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 19 年度 分担研究報告書

血友病 A の遺伝子解析

分担研究者 天野 景裕 東京医科大学

研究協力者 稲葉 浩 東京医科大学

研究要旨:

我が国における血友病 A の病因遺伝子変異の特徴を検討すべく、日本人血友病 A 患者の *F8* 解析を行った。血友病 A 患者 45 症例(重症 17 例、中等症 3 例、軽症 25 例)を解析した。重症例では逆位(6例:35%)と点変異(6 例)と欠損(4 例)が検出され、1 例は変異を同定できなかった。点変異のうち 3 例はこれまでに報告のない変異であった。中等症例では 3 例中 2 例から、既報告の点変異が検出され、1 例は変異を同定できなかった。軽症例では、全ての症例(25 例)から点変異を同定した。このうち 23 例はアミノ酸の置換を伴う変異であったが、欧米人を中心としたデータベースと比較して Tyr473、Arg531 での変異が高頻度で検出され、これらの変異は日本人に特徴的なものである可能性が示唆された。また、これまでに報告のない点変異が 4 例検出された。これまでに報告のない遺伝子異常が多く検出され、また同時に遺伝子異常が検出されない症例も確認された。血友病 A の病因遺伝子異常は非常に多様性に富んでおり、またそれは人種によって差異があるであろうことが再確認された。これらのことは、血友病 A 患者の遺伝子解析は、今後も継続した解析が必要であることを示唆している。

また、軽症血友病 A 患者の解析において、一部の変異体第 VIII 因子では、APTT 試薬に対する感受性の相違から、用いる APTT 試薬によって第 VIII 因子活性が大きく異なることを確認した。軽症血友病 A の診断においては、十分に注意すべき事項である。

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。

血友病 A は先天性の出血性疾患であり、X 染色体長腕上の第 VIII 因子遺伝子の変異に起因する。血友病 A を引き起こす遺伝子変異は非常に多様であり、点変異、逆位、欠損、挿入などがこれまでに報告されているが、それぞれの変異、特にその発生頻度に関しては人種間で異なる可能性も高い。そこで我々は、

また、軽症血友病 A 患者の解析において、一部の変異体第 VIII 因子では、APTT 試薬に対する感受性の相違から、用いる APTT 試薬によって第 VIII 因子活性が大きく異なることを確認したので併せて検討した。

B. 研究方法

① 凝固学的検査

A) 第 VIII 因子活性(凝固一段法)

第 VIII 因子活性(FVIII:C)は第 VIII 因子欠乏血漿と APTT 試薬を用い、自動血液凝固測定装置 ACL9000 を用いて測定した。

B) 第 VIII 因子活性(発色性合成基質二段法)

発色性合成基質を用いる二段法はコATEST SP VIII キットを用いて行なった。

C) 第 VIII 因子抗原量(FVIII:Ag)

アセラクロム VIII:Ag キットまたは Matched-Pair Antibody Set for ELISA of human Factor VIII antigen を用いて行なった。

② DNA 解析

A) DNA 抽出

末梢血白血球から BioRobot EZ1 を Buffy Coat Protocol にて操作し、EZ1 DNA Blood 350 ul Kit を用いて抽出した。



## B) 第 VIII 因子遺伝子 (F8) の解析

F8 の 5' 非翻訳領域 (プロモーター領域)、各エクソンとそのイントロンとの境界領域、3' 非翻訳領域は、合計 34 分割して PCR にて増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて分離・精製し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンスは、テキサスレッド標識プライマーと ThermoSequenase™ を用いたサイクルシーケンスで行い、塩基配列の解析は蛍光パーソナルシーケンサーを用いて行なった。

(倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで解析を行った。

## C. 研究結果

### ① 重症例 17 例

F8 イントロン 22 に存在する遺伝子内遺伝子 (*int22h1*) に起因する逆位が 6 例 (35%) から検出された。イントロン 1 に存在する *int1h1* に起因する逆位は検出されなかった。点変異は 6 例検出され、このうち 5 例はミスセンス変異であった。これらのうち 3 例はこれまでに報告のない変異であった。欠損変異は 3 家系 4 症例 (25%) で検出された。これまでの解析では、欠損は小規模である場合が多く報告されているが、今回の解析ではエクソン 2-6 を欠失する大きな規模での欠損が検出された。1 例からは変異が同定できなかった。

### ② 中等症例 3 例

検討した 3 例中 2 例から、既報告の点変異が検出された。しかしながら既報告例では、一部の症例は軽症に分類されていた。1 例からは変異が同定できなかった。

### ③ 軽症例 25 例

全ての症例 (25 例) から点変異を同定した。このうち 23 例はアミノ酸の置換を伴う

変異であったが、2 例はコーディング領域外での変異であった。コーディング領域内で検出された点変異は F8 の広範囲に分布していたが、欧米人を中心としたデータベースと比較して Tyr473、Arg531 での変異が高頻度で検出された。これまでに報告のない点変異が 4 例検出された。

### ④ コーディング領域外での変異

コーディング領域内に異常を認めなかった 2 例では IVS-10 と 3' UTR に点変異を検出した。両変異はこれまでに変異やポリモルフィズムとしての報告がなく、また我々の日本人を対象とした解析においても同様の変異が認められなかったことから、非常に稀有なものであることが確認されたが、これが病因であるのかについては不明である。

### ⑤ 軽症例における FVIII:C 乖離

FVIII:C の詳細な解析を行った軽症 25 例のうち 10 例 (40%) から、測定法によって FVIII:C が乖離する変異 (A284P ; 1 例、R531C ; 4 例、R531H ; 3 例、W688L ; 1 例) が検出された。これらの変異は第 VIII 因子の A2 と A1、A2 と A3 ドメインの境界面に位置することが高次構造の推測により確認された。

### ⑥ 変異 FVIII に対する APTT 試薬の感受性

FVIII:C に乖離を呈した変異 FVIII (R531H、A284P) の解析から、各種 APTT 試薬のこれら変異体に対する感受性が著しく異なることが確認された。またこの感受性の差異は野生型 FVIII のそれとも異なっていた。

## D. 考察

1984 年に F8 がクローニングされて以来血友病 A 患者の F8 の解析は積極的に進められ、これまでにすでに様々な変異が病因として検出されてきた。しかしながらそれは想像以上に多様性に富んでおり、症例の解析件数を増せば増すほど新たな変異が検出される。また一方で F8 に異常が検出されない症例も存在する。今回の 45 例という限られた症例の解析においても、これまでに報告のない遺伝子異常が多く検出され、また

同時に遺伝子異常が検出されない症例も確認された。これらのことは、血友病 A 患者の遺伝子解析は、今後も継続した解析が必要であることを示唆している。

軽症例(25例)における解析で Tyr473Cys、Arg531Cys、Arg531His 変異がそれぞれ 3 例 (12%)、4 例 (16%) 3 例 (12%) と高頻度で検出されたことは非常に興味深い。欧米人の解析を中心とした血友病 A 変異データベース (HAMSTeRS) によれば軽症例 769 例の解析において、Tyr473Cys は 5 例 (0.7%)、Arg531Cys は 28 例 (3.6%)、Arg531His は 17 例 (2.2%) しか報告されておらず、日本人での検出頻度が圧倒的に高い。今回の解析が無作為に集められた症例によって行われたものであることを考えると、これらの変異は日本人に特徴的なものである可能性も示唆された。

軽症例のうち、A284P、R531C、R531H、W688L 変異を認めた 10 例は、凝固一段法による FVIII:C 測定の際、用いる APTT 試薬によって得られる値に乖離がみられた。これには FVIII 分子 A2 ドメインの解離が関与していると考えられる。A2 ドメインはイオン結合にて A1、A3 ドメインと弱く結合しており、このドメインの分子からの解離が FVIII の不活化につながるということが分かっている。FVIII:C 測定の際の APTT 試薬に起因する何らかの条件によりこの A2 ドメインの解離が試薬ごとに異なることが FVIII:C の乖離を導くと考えられた。

## E. 結論

①血友病 A の病因遺伝子異常は非常に多様性に富んでおり、またそれは人種によって差異があるであろうことが再確認された。

②軽症 (分子異常症) 例に対して行われる APTT に基づく検査は、APTT 試薬の変異 FVIII に対する感受性の差異から必ずしも患者の病態を正確に反映していない可能性があり、十分な注意が必要である。

血友病 A の遺伝子解析は、血友病 A の診断・病態把握に非常に有効であり、遺伝子治療を代表とする先端医療の適応や血友病

のオーダーメイド医療には不可欠である。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 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
2. 太田祥一、天野景裕、宮城 学、本間 宙、武井康悦、小澤拓郎、川原千香子、高城由紀、相内敦子、窪田達也、中村 一郎、張替喜世一、関根和弘、高梨利満、岡野谷 純、竹内保男：基礎編 救急医療システムの現状と教育プログラム CPR+AED コースマニュアル 監修：行岡哲男、山科 章、医学書院、東京、2007 年
3. 西田恭治、山元泰之、香川和彦、天野景裕、鈴木隆史、篠澤圭子、尾形享一、内田泰斗、高 明志、大瀧 学、加藤宏基、清田育男、福武勝幸：HIV 感染症におけるウイルス性肝炎感染状況と A・B 型肝炎ワクチンの効果に関する研究。日本エイズ学会誌 9(1):30-35、2007
4. 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
5. 天野景裕：最新の血友病の止血管理。Medical Practice24 (12) :2165-2170、2007
6. 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

7. 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現状．日本血栓止血学会誌 18(6):627-639、2007
8. 天野景裕：後天性血友病の診断（血友病部会：後天性血友病の診断と治療）第2回日本血栓止血学会学術標準会委員会 2007 シンポジウム報告．日本血栓止血学会誌 18(4):373、2007

#### 学会発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. Otaki M, Inaba H, Shinozawa K, Tamura A, Fujita S, Suzuki T, Amano K, Fukutake K: CHARACTERIZATION OF A LARGE DELETION THAT LEADS TO CONGENITAL FACTOR XIII DEFICIENCY. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.
5. 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.
6. 篠沢圭子、天野景裕、鈴木隆史、大石毅、伊藤昌之、稲葉 浩、福武勝幸：

- A1 ドメインに検出した先天性第 V 因子欠乏症の新しい変異：FV D68H. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年、志摩
7. 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
  8. 篠澤圭子、鈴木隆史、稲葉 浩、清田育男、大瀧 学、高 明志、天野景裕、福武勝幸：先天性第 VII 因子欠乏症で検出した複合ヘテロ接合体変異. 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
  9. 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
  10. 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：インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン案. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年、志摩
  11. 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
  12. 天野景裕、高橋陽子、鈴木隆史、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：初期研修医の輸血教育を救命救急センター研修開始時に施行する試み. 第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会、2007 年、名古屋
  13. 川原千香子、高城由紀、天野景裕、宮城 学、中野八重美、太田祥一、山科章：AED 使用後の院内事後検証委員会. 日本蘇生学会第 26 回大会、2007 年、岡山
  14. 天野景裕、稲葉 浩、篠澤圭子、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
  15. 白阪琢磨、山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、小田原隆、中村哲也、今村顕史、味澤篤、根岸昌功：日本人における TDF/FTC 合剤 (TVD) の使用経験について. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年、広島
  16. 関根祐介、横張敦子、大西正美、鈴木亜希子、鈴木篤、中村薫、明石貴雄、内田泰斗、鈴木隆史、天野景裕、西田恭治、山元泰之、福武勝幸：東京医科大学病院における抗 HIV 薬の使用動向と薬剤費の推移について. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年、広島
  17. 山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、入澤亮吉、加藤雪彦、齊藤万寿吉、坪井良治、小田原隆、中村哲也、今村顕史、味澤篤、根岸昌功、田所丈嗣、白阪琢磨：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