

検討 (第3報). 第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島

18. 山元泰之、篠澤圭子、天野景裕、西田恭治、福武勝幸、今村雅寛、上田敦久：Darunavir、Tipranavir、Enfuvirtideの使用経験、特にDarunavirを中心として. 第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島
19. 天野景裕：HAARTに伴う糖代謝異常一症例紹介一. 第21回日本エイズ学会学術集会ランチョンセミナー、2007年、広島
20. 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
21. 内田泰斗、西田恭治、天野景裕、福武勝幸、葉梨喬芳、大島一太、富山博史、山科 章：先天性無フィブリノゲン血症に冠動脈狭窄症を合併した一例. 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
22. 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 患者の遺伝子解析一第3報一. 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
23. 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 の解析一第二報一. 第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
24. 天野景裕、鈴木尚子、鈴木隆史、高橋陽子、西田恭治、腰原公人、上道文昭、福武勝幸：初期臨床研修医に対する系統的臨床検査研修. 第54回日本臨床検

査医学会学術集会・第47回日本臨床化学学会年次学術集会連合大会、2007年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況 特に無し。

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

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 血友病患者は血液製剤により C 型肝炎ウイルスや HIV に感染している者が多く、肝障害・免疫障害が関節手術時の障害となるケースがしばしば見られている。Multidisciplinary なスタッフによる臨床チームを組織したことで、このような問題を抱えたケースの手術も安全に行える体制が整い、今年度は術前評価のプロトコルを策定したうえで、実際の症例ごとに検討を加え、安全性の術前評価をよりの確に行えるようにした。今後も、さらに現場の症例を検討していくなかで、評価手順の改善・標準化をはかりたい。肝障害等の評価は、遺伝子治療の臨床試験プロトコル作成に際しても重要となると考えている。一方、血友病患者が感染した HIV は、最近国内で流行し性感染している HIV とは、HLA-A24 拘束性 CTL に対するエスケープ変異のうえで差があることが我々の解析で分かっている。患者が HLA-A24 を有するかどうかと、HIV 感染症の進行との間に相関がないかどうかを、血友病患者と最近の性感染症患者とを対比しながら検討した。

A. 研究目的

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を安全に行える病院の体制が必要となる。具体的には、①臨床試験を推進・支援する病院の体制、および②血友病の患者をトータルに把握して治療にあたれる現場の体制の両方の整備が不可欠と考える。

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、臨床試験推進室が治験や TR を支援する体制を整備している (上記①に対応)。我々は、この治験病院のなかに、血友病患者の関節手術をサポートする multidisciplinary な臨床チームを結成し (上記②に対応)、合併する HIV・HCV 感染症による免疫障害・肝障害を的確に評価して、手術を安全に進められる体制を整備することにした。今年度は、術前評価のプロトコルを策定し、実際の症例ごとに検討を加えることで、現実的な評価手順を確立することを目指した。また、医師主導の TR ではないが、国内で開発された血液製剤の

臨床治験を実施する機会を得たので、臨床試験推進室や TRC (TR コーディネーター) と上記の臨床チームとの連携をはかることにした。

非加熱血液製剤により血友病患者に感染した HIV は、抗ウイルス治療による増殖のコントロールが可能にはなっているものの、体内から排除されるわけではなく、患者が一生抱え続ける感染症である。血友病患者に感染しているウイルスの特徴とその予後に関して、性感染群との比較で検討した。

B. 研究方法

(1) 血友病関節症の手術をサポートする臨床チームのなかで、過去の手術例の検討や国内外の文献検索を行い、手術を安全に施行するための免疫能ならびに肝機能をどのように評価するかを検討し、手術適応の基準を策定する。原案を策定後に、実際の症例ごとに検討を加えていくことで、より現実に即したプロトコルとしていく。

(2) 最近の国内で流行している HIV は、日本人

の6割以上が有するHLA-A24によって拘束されるCTLからエスケープしたウイルスとなっていることを我々は明らかにしてきた。最近の感染者ではHLA-A24を持つことが病態の進行に不利に働く可能性が考えられたため、血液製剤で感染（当時の米国で流行していたウイルスに感染）した血友病患者と最近の性感染者とを対比して、HLA-A24の有無によるウイルス量やCD4数に差がないかどうかを解析した。

（倫理面への配慮）

臨床データの解析にあたっては、疫学研究に関する倫理指針を遵守して行ない、患者本人に説明して包括的な疫学研究の同意が得られている場合のみを、解析対象とした。

C. 研究結果

（1）昨年度から、multidisciplinaryなスタッフで構成する臨床チームが血友病患者をトータルに把握していく体制を整えてきたが、手術を安全に遂行するためには、とりわけ、血友病患者が製剤によって感染してしまったC型肝炎ウイルス（HCV）による肝障害とHIVによる免疫障害との術前評価が欠かせないという認識を皆が持つようになったことから、今年度は、肝障害・免疫障害の評価手順書を作成し、それに沿って臨床チームが患者の状態評価を行い、無事に手術を受けさせる体制を整備した。

術前評価のプロトコルは実際の症例ごとに検討を加えて、改訂を繰り返しており、2008年2月現在では図1となっている。HIV感染症に関しては、CD4数を重視しているが、CD4数が低い例でもウイルス量がコントロールされていれば、手術を禁じてはいない。HCV感染症に関しては、肝臓の予備能と門脈圧亢進の程度をしっかりと評価し、手術侵襲により肝不全が進むのを避けるようにしている。2007年4月～2008年2月の間に東京大学医科学研究所附属病院では21件の血友病関節症の手術を行っており、15件（71%）がHCV陽性での手術であり、そのうちの7件（全体の3分の1）はHIV/HCVの重複感染者であった（そのほか、HCV抗体は陽性だがウイルスを検出しない症例が4件あり、うち2件はHIVが陽性であった）。それぞれの症例ごとに臨床チームがプロトコルに即した術前評価を行い、安全に手術を受けさせ

ることができた。

また、医師主導のTRではなかったものの、血液製剤の臨床治験を行った際には、臨床試験推進室の積極的な協力を得ることができ、臨床チームを構成する各科スタッフとTRCとの緊密な連携をとることができた。

（2）現在国内で流行しているHIVは、HLA-A24拘束性CTLからエスケープしたウイルスとなっているため、日本人の多くが有するHLA-A24によっては細胞性免疫の認識ができなくなり、免疫不全の病態進行を速めることになるのではないかとの仮説のもと、最近の性感染群と血友病患者群とで、HLA-A24の有無によってウイルス量やCD4数を比較してみたが、現在流行しているウイルスがHLA-A24保有者での病態進行を速めているということではなかった。血友病患者群では、全体として、最近の性感染群よりもウイルス量が低い傾向が見られたが、これはむしろ1995年頃まで無治療でも進行していなかった集団（いわゆるslow progressor群）としての因子を反映していると考えられた。

D. 考察

（1）どのような肝機能・免疫状態であれば血友病患者の手術を安全に行えるかの基準は、今後も実際の手術症例での検討を加えることで、さらに改善をはかっていく方針である。臨床応用に最も近いAAVベクターによる遺伝子治療では、肝臓が標的臓器の第一の候補となっており、肝臓を標的とする場合の肝機能評価と適応判断をする際に、臨床現場での手術適応基準の検討が役に立つと考えている。

血友病の患者を合併症も含めてトータルにケアできるmultidisciplinaryなチームは、現実的に手術の安全な施行に寄与しているだけでなく、将来の臨床試験に際しても有効に機能すると考えられる。臨床チームは、恒常的に患者検討会を開いて患者の状態を把握し、診療データを蓄積していくとともに、院内のTRCとも引き続き連携をはかって、臨床試験を推進できる体制をさらに整えていく。次年度には、遺伝子治療臨床試験のプロトコル試案も作成していくことを目指す。

（2）HLA-A24拘束性CTLからエスケープしたHIVが蔓延していると考えられる現在の国内の状況

下で、HLA-A24 を有することは病態進行に不利に働く可能性を予測していたが、HLA-A24 によるウイルス量や CD4 数への影響は見られなかった。HLA-A24 の遺伝子頻度がきわめて高い日本国内で HLA-A24 拘束性 CTL からエスケープした変異ウイルスであっても、HLA-A24 を有する宿主の病態進行への影響がすぐに顕在化するほど単純ではないことが分かった。遺伝的に均質性の高い集団のなかで起きるウイルス進化と、その集団内の成員における病態進行との相関に関しては、さらに細かな検討が必要と考えられた。

E. 結論

血友病患者は血液製剤により C 型肝炎ウイルスや HIV に感染している者が多く、肝障害・免疫障害が手術時の障害となるケースがしばしば見られている。Multidisciplinary なスタッフによる臨床チームを組織したことで、このようなケースへの対応がスムーズとなり、今年度は術前評価の手順書を策定することもできたので、今後、さらに現場の症例を検討するなかで、評価手順の改善・標準化をはかりたい。遺伝子治療の臨床試験プロトコルを作成するに際しても、肝障害等の評価が重要になると考えている。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2. 学会発表

(国際学会)

1) 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

2) 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

(国内学会)

1) 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

2) 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

3) 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

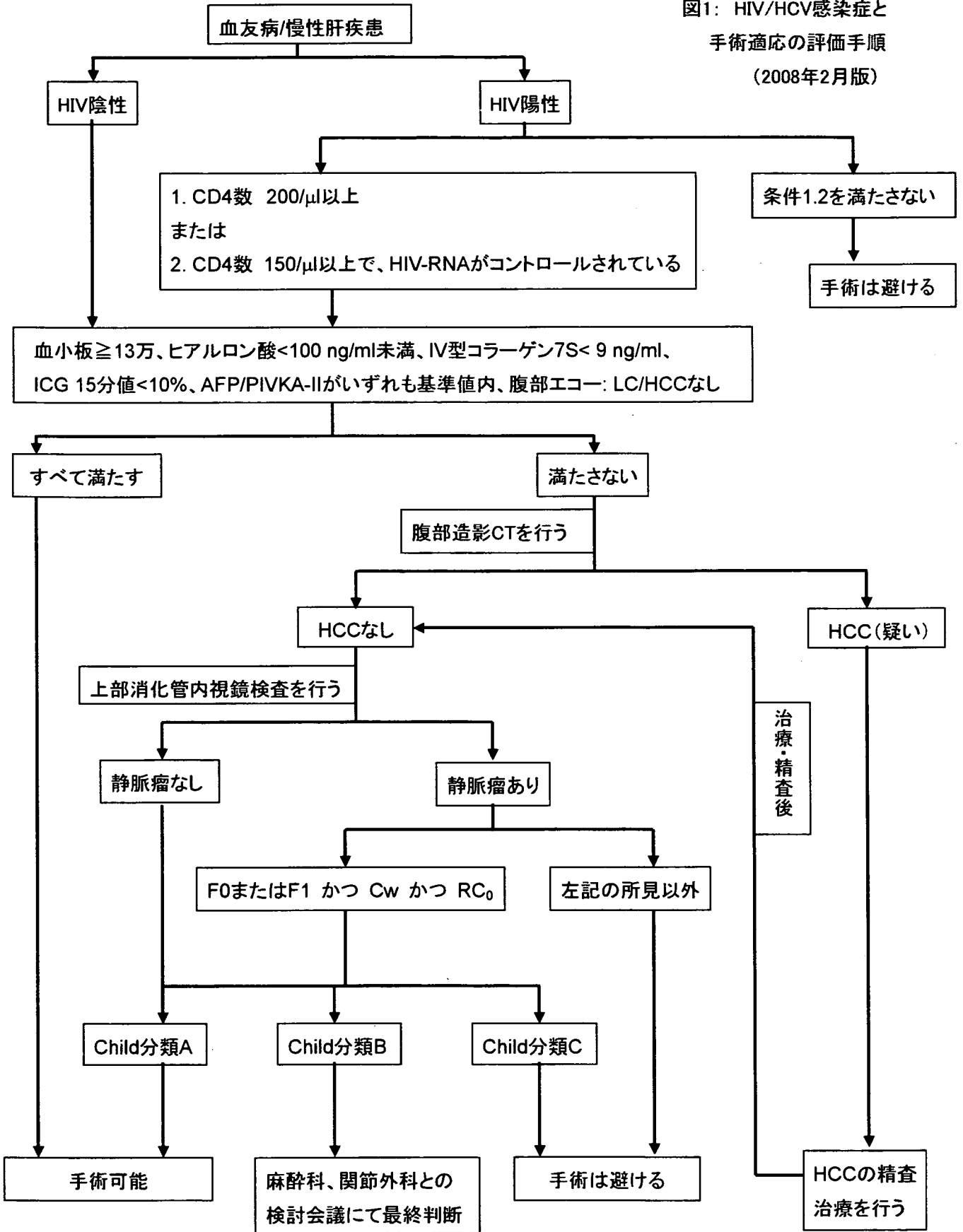
4) 宮崎菜穂子、中村哲也、小田原隆、伊賀睦了、鯉渕智彦、遠藤宗臣、藤井毅、細野治、森本畿夫、吉田久博、岩本愛吉. 当院外来患者へのアンケート調査で見られた服薬の問題点と服薬指導の意義. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

5) 遠藤宗臣、坂本勇一、前田卓哉、鯉渕智彦、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

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

図1: HIV/HCV感染症と
手術適応の評価手順
(2008年2月版)



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

血液凝固異常症の QOL に関する研究

分担研究者：瀧 正志（聖マリアンナ医科大学准教授 聖マリアンナ医科大学横浜市西部
病院小児科部長兼周産期センター長）

研究要旨

血友病等の血液凝固異常症の QOL は、出血そのもの、筋骨格系障害や頭蓋内出血などの出血の結果生じる合併症、HIV 感染症、HCV や HBV 感染に基づく肝疾患など多くの要因に影響され、さらに疾患に対する偏見・差別などの社会的問題の関与が非加熱凝固因子製剤に因る HIV 感染により加味された。本研究は、血液凝固異常症の QOL 調査を包括的に
行い、血液凝固異常症患者の治療の向上と QOL の向上に貢献することを目的とするものである。包括的な調査を行なうため血友病医療に関係する各職種および患者を含めた研究協力者を血液凝固異常症 QOL 調査運営委員として選定した。調査方法はアンケート形式で、全国の医療施設の担当医のみならず患者組織を介し患者および保護者に配布し、調査用紙は匿名で事務局に直接返送された。本年度は、集計された結果を基に血液凝固異常症の出血、HIV 感染、肝疾患、筋骨格筋障害、医療機関、社会生活、差別などについて包括的に解析した。さらに、血液凝固異常症患者の治療の向上と QOL の向上に貢献できるよう患者の視点から行政・医療従事者・製薬企業への要望、医療者側の視点から患者・家族の方への提言をまとめた冊子を作成した。

A. 研究目的

血友病等の血液凝固異常症の QOL は、出血そのもの、出血の結果として生じる筋骨格系障害、頭蓋内出血などの合併症のほか、HIV 感染症、HCV や HBV 感染に基づく肝疾患など多くの要因に影響されることが推測される。疾患に対する偏見・差別などの社会的問題の関与が 1980 年台前半に惹き起こされた非加熱凝固因子製剤に因る HIV 感染により加味され社会的にも解決されるべき多くの課題が残されている。本研究は血液凝固異常症の QOL 調査を包括的に患者の視点に立脚して行うことにより、血液凝固異常症の出血、HIV 感染、肝疾患、社会的問題の面から総合的に評価し、血液凝

固異常症患者の治療の向上と QOL の向上に貢献することを研究目的とする。

B. 研究方法

患者の視点に立脚した調査となるよう医師のみならず血友病治療に関係する患者を含めたさまざまな職種の研究協力者による包括的な研究を目指した。調査項目は、疾患、出血頻度、在宅自己注射、定期補充療法、筋骨格系障害、HIV 感染、肝炎、ADL(activity of daily living)、社会生活、差別などについて調査した。調査方法は、血液凝固異常症全国調査で構築されたネットワークをもとに全国の医療施設の担当医および協力の得られた全国各地の患者組織

を介して患者および保護者に調査票を配布した。調査用紙の回収と整理は聖マリアンナ医科大学小児科で行い、集計および解析は同大学附属研究施設で行った。18年度は調査項目の作成と調査用紙の発送および回収を行い、19年度は一次解析結果および血液凝固異常症のQOL改善のための要望・提言をまとめた冊子を作成した。

(倫理面への配慮)

研究対象者である血友病等の血液凝固異常症患者に対する人権擁護上の配慮は、患者個人が特定できる調査項目を調査項目に含めず、調査の趣旨に同意を得た患者本人あるいはご家族が無記名で記載するなど倫理面への配慮には十分留意した。また、この調査の実施にあたり、疫学研究に関する倫理指針11「他の機関等の試料の利用」に基づく本調査の運用形態について、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会に審査を申請し、承認された。

C. 研究結果

QOL調査票は831例が回収され、その属性は血友病A653人、血友病B129人、その他の凝固異常症41人などであった。回答者のうち23.9%がHIVウイルスの感染者で、そのうち現在エイズを発症している患者は4.0%、過去に発症したが現在はエイズ指標疾患が治癒している患者は8.0%であった。ウイルス量が検出感度以下に制御されている割合は66.3%であった。肝炎ウイルス感染者の原因の多くはC型肝炎ウイルスであったが、一部B型肝炎ウイルスの感染者もみられた。C型肝炎ウイルス感染者の病期の多くは慢性肝炎であったが、肝硬変と肝癌が計8.1%を占めた。インターフェ

ロン治療の実施率は現在治療中を含め49.0%であった。そのうち、現在治療中の患者を除きウイルスが血中から消失しかつ肝機能が正常化した割合は41.2%であった。

血友病患者のうちインヒビター保有者は、現在保有が50人(6.0%)、過去保有していたが現在無しは42人(5.1%)であった。

a)医療

昨年1年間の近似平均による出血回数は、血友病A、血友病B、その他でそれぞれ21.5回、16.6回、16.2回であった。血友病の昨年1年間の近似平均による出血回数は、重症、中等症、軽症、インヒビターそれぞれ23.8回、18.7回、7.2回、22.7回と4群間に有意差が認められた。

昨年1年間の近似平均による関節内出血回数は、血友病A、血友病B、その他でそれぞれ15.2回、10.8回、3.9回であり、血友病とその他で有意な差異が認められ、一方、血友病Aと血友病Bの2群間に差異は認められなかった。頻回に出血する関節、すなわちtarget jointを有する割合は、血友病A、血友病Bそれぞれ70.4%、65.1%であった。

出血頻度および関節内出血頻度と身体障害による行動制約の間にそれぞれ有意な関連があることが示唆された。さらに関節内出血頻度は学校生活での活動性に大きく影響していることが示唆された。頭蓋内出血の既往は全体の22.1%に認められた。重症度別にみると、重症25.1%、中等症20.4%、軽症8.6%であり、重症と軽症の間に有意差が認められた。後遺症は20.9%に認められた。

在宅自己注射療法は血友病A、Bそれぞれ

れ72%、61%に実施されていた。在宅自己注射実施群と未実施群では治療環境満足度に差異はみられなかったが、在宅自己注射についての意見・感想は、継続したい(80.2%)、出血の度に通院する不便がなくなった(69.7%)、出血時の不安がなくなった(64.1%)活動範囲が広がった(51.2%)、などの肯定的な意見が多数を占めた。

定期補充療法(週に2回以上)の施行率は、血友病A、血友病Bそれぞれ36.8%、20.2%であった。開始年齢は、2歳未満が血友病A12.1%、B15.2%と少なく、2歳以降20歳未満がともに約60%、それ以後が約30%であり、関節障害発症前に開始する一次定期補充療法は少なく、関節障害の発症後に開始する二次定期補充療法が主であることが示唆された。また、定期補充療法実施群は未実施群よりも治療環境満足度が高い傾向が示された。

b)筋骨格系障害、ADL

患者の多くは関節機能障害を少なからず自覚しているものの関節の診察を受けている割合は少なく、関節症に対する認識は低いことが示唆された。血友病性関節症は管理が不十分な場合に進行性の経過をたどる疾患であり、明らかな関節機能障害が起こる前に血友病性関節症の状況を認識し、関節機能障害の進行を予防し、障害の程度に合わせた治療が必要であることを、患者側そして医療者側の双方が認識する必要性があることが示唆された。

c)医療機関について

患者と主治医の間での信頼関係の構築については、主治医は患者に病状等をよく説

明すること、看護師が血友病患者を取り巻く環境に対して医師などから血友病と患者についての知識を得て理解に努め、理解を深めること、さらに、カウンセラーやソーシャルワーカーの配備、血友病医療への参画と役割の広報など、社会環境の整備が血友病患者のQOL向上に必要と考えられた。

d)社会生活、差別

学校および職場で最も望まれているのは「病気への理解」、保険・年金制度については「制度におけるプライバシーの確保」で、医療に関しては「治療の進歩」とともに「恒久的な医療助成」が多くの回答例において選択されていた。これらは、自由記載欄の総括に記載されていることとも類似していた。

e)自由記載欄

自由記載欄には現実的な観点に立ち、安全で利便性の高い製剤を安定供給して欲しいという意見が多数寄せられた。とくに(1)静脈注射をしなくても良い製剤として経口薬や坐薬(2)静脈注射が必要な場合は作用時間(半減期)の長い製剤(3)常温で保存できる製剤の開発などである。また、血液で媒介される感染症に対する万全の対策と凝固因子製剤により感染したC型慢性肝炎に苦しんでいる多くの患者から、さらに強力な治療薬の開発を望むとの意見が寄せられた。その他に血友病医療体制については血友病専門医(小児科医、内科医)のみならず、血友病に詳しい整形外科医、歯科・口腔外科医、看護師を養成して欲しいという要望が寄せられた。さらに、カウンセラーやソーシャルワーカーも配置した血友病

センターを各地に設置して医療者間の連携システムを構築することが提案された。医療保障については更新手続きの簡素化についても多くの意見があった。

D. 考察

国際的には日本の血液凝固異常症のQOLの貴重な資料として、社会的には、血液凝固異常症患者の治療の向上とQOLの向上に貢献するための提言をする貴重な資料となるものと考えられた。

E. 結論

調査票の解析結果から、血液凝固異常症患者の現在の治療状況、問題点などが明らかとなり、血液凝固異常症患者の治療の向上とQOLの向上に貢献するためいくつかの提言を行った。その詳細は報告書に示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 瀧 正志：血友病、小児科診療ガイドラインー最新の治療方針ー(五十嵐隆編集)(総合医学社発行)：226-229. 2007

2. 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

3. 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

4. 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

5. 白幡 聡：海外における遺伝子組換え活性型凝固第Ⅷ因子製投与に関する臨床研究. 日血栓止血会誌18:255-264. 2007

6. 三間屋純一：Kasabach-Merritt症候群の治療 小児科 48：445-452 2007

7. 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

8. 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に関する研究ー平成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

H. 知的所有権の出願・取得状況

本研究とは関係がない。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohmori T, <u>Sakata Y.</u>	Platelet-directed gene therapy.	Transfus Med Hemoth	34	429-439	2007
Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, <u>Madoiwa S.</u> , <u>Mimuro J.</u> , <u>Sakata Y.</u>	Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	27	2266-2272	2007
Ito T, Okada T, <u>Mimuro J.</u> , Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, <u>Mizukami H.</u> , Kume A, Takahashi M, Ikeda U, <u>Sakata Y.</u> , Shimada K, <u>Ozawa K.</u>	Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats.	Hypertension	50	531-6	2007
Ito T, Okada T, Miyashita H, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, <u>Mizukami H.</u> , Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, <u>Ozawa K.</u>	Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats.	Circ Res	101	734-41	2007
Nogami K, Shima M, Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, <u>Yoshioka A.</u>	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	85	317-22	2007
Takeyama M, Kasuda S, Sakurai Y, Shima M, Takeda T, Omura S, Naka H, <u>Yoshioka A.</u>	Factor VIII-mediated global hemostasis in the absence of von Willebrand factor.	Int J Hematol	85	397-402	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 renal cancer allograft model systems.	Urology	70	1230-1236	2007
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	166-174	2007
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	627-639	2007
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	2007
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

研究成果の刊行物・別刷

Platelet-Directed Gene Therapy

Tsukasa Ohmori Yoichi Sakata

Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University School of Medicine, Tochigi, Japan

Key Words

Lentiviral vector · Hematopoietic stem cells · Stem cell transplantation · Hemophilia

Summary

Beyond their prominent role in hemostasis and thrombosis, platelets are characterized by expert functions in assisting and modulating vascular integrity, inflammatory reactions and immune responses. These pleiotropic functions are partly achieved by the release of a multitude of secretory proteins at the site of vascular injury. Since platelets can circulate throughout the body and release a number of mediators on demand, targeting platelets as a circulating delivery system would seem a reasonable approach to modify hemostasis and thrombus formation. Gene transfer in platelets requires gene transduction into hematopoietic stem cells (HSCs) using integrating vectors that directly regulate the expression of the targeted substance by a platelet-specific promoter, because platelets are anucleate cells and their precursor megakaryocytes have a limited life span. Recent studies show that gene transduction of HSCs results in sufficient genetic information been given in platelets so that they synthesize sufficient transgene products during megakaryopoiesis. Indeed, phenotype correction of a mouse model of inherited platelet disorder and hemophilia A by platelet-directed gene transduction has been demonstrated. This review highlights the cellular advantages of platelets as delivery vesicles of a specific factor, the recent advances of transgenic mice, and transduction of HSCs to establish the efficient expression of the targeted protein in platelets.

Schlüsselwörter

Lentiviraler Vektor · Hämatopoetische Stammzellen · Stammzelltransplantation · Hämophilie

Zusammenfassung

Neben ihrer zentralen Rolle in der Hämostase und Thrombose sind Thrombozyten auch von einzigartiger Bedeutung für die Unterstützung und Modulation der vaskulären Integrität sowie von inflammatorischen und immunologischen Reaktionen. Die pleiotropen Wirkungen basieren teilweise auf der Freisetzung einer Vielzahl von sezernierten Proteinen an Orten vaskulärer Verletzungen. Aufgrund der typischen Zirkulation der Thrombozyten im gesamten Körper und der gezielten Freisetzung von Mediatoren, stellen die Thrombozyten ein ideales zirkulierendes System zur Abgabe von Substanzen mit dem Ziel der Modifikation der Hämostase und der Thrombusbildung dar. Der Gentransfer in Thrombozyten setzt eine Gentransduktion in hämatopoetischen Stammzellen (HSZs) mit Hilfe von integrierenden Vektoren voraus, die eine direkte Regulation der Expression von Zielsubstanzen über thrombozytenspezifische Promotoren steuern, da Thrombozyten als anucleäre Zellen und auch die Megakaryozyten als Vorläuferzellen nur eine sehr begrenzte Lebensdauer aufweisen. Aktuelle Untersuchungen zeigten, dass bei der Gentransduktion von HSZs eine ausreichende Menge genetischer Information an Thrombozyten übertragen wird und eine genügende Menge des Transgens während der Megakaryopoese synthetisiert wird. In der Tat konnte eine phänotypische Korrektur nach dem auf die Thrombozyten gerichteten Gentransfer in einem Mausmodell mit hereditärem Thrombozytendefekt und Hämophilie A nachgewiesen werden. Dieser Übersichtsartikel beleuchtet neben den zellulären Vorteilen von Thrombozyten als zirkulierende Vesikel für die Übermittlung hämostasespezifischer Faktoren auch die aktuellen Entwicklungen im Bereich der transgenen Mausmodelle sowie den Wissensstand der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen zur Etablierung einer effizienten Expression von Zielproteinen in Thrombozyten.

Introduction

Platelets are an essential element of the body's hemostasis system, but through their involvement in thrombosis are also a major cause of morbidity and mortality [1, 2]. Since platelets are anucleate cells and have a limited lifespan of 7–10 days, they must be continually manufactured from their precursor megakaryocytes and released into circulating blood from bone marrow [3]. When stimulated, circulating platelets adhere and aggregate with each other to generate primary hemostasis and release a variety of substances, thus initiating the coagulation cascade and protecting the integrity of the vasculature [1, 2]. Platelets have an attractive future as a delivery system of various substances because they circulate throughout the body and specifically and locally release appropriate substances at the site of thrombus formation. These platelet-specific characterizations indicate that platelet-directed gene therapy is a very attractive therapeutic application for both inherited platelet disorders and coagulation factor deficiencies. In this review, the first section covers the mechanisms by which platelets are activated, and the involvement of platelets in the coagulation cascade for a better understanding of why platelets are utilized as targeted cells. We then discuss results from the use of transgenic mice, recent advances in the transduction of hematopoietic stem cells (HSCs) by viral vectors, and the application of platelet-directed gene therapy.

Platelet Activation and Release Reaction

Circulating platelets do not normally encounter the connective tissue matrix that lies beneath vascular endothelial cells [4]. Once a break within the integrity of this vascular lining occurs, platelets are exposed to, and interact with, collagen via interactions of the glycoprotein (GP) Ib α / GPV / GPIX complex on the platelet surface with von Willebrand factor (VWF) (fig. 1) [5]. Platelet interactions with collagen not only provide a surface for platelet adhesion through the GPIb α /GPV/GPIX complex (CD42b+CD42c/CD42d/CD42a), but also serve as a strong stimulus for platelet activation through its collagen receptors GPVI and GPIIb/IIIa (also known as integrin α 2 β 1, CD29/CD49b) [6, 7]. This results in signaling pathways that induce platelets to change their shape, spread along collagen fibrils and secrete thromboxane A₂ (TxA₂) and adenosine diphosphate (ADP) into circulation [4, 6, 7]. The released TxA₂ and ADP stimulate neighboring platelets, causing them to become activated and in turn secrete additional TxA₂ and ADP. Activated platelets directly bind to the abundant plasma protein fibrinogen, via the platelet receptor GPIIb/IIIa (also known as integrin α IIB β 3; CD41/CD61) [8]. This platelet-fibrinogen-platelet interaction initiates the process of platelet aggregation (fig. 1).

Another important function of platelets is the release of a variety of substances that modulate the coagulation cascade

Table 1. Major bioactive substances and glycoproteins within platelet granules

	Bioactive substances	Glycoproteins
α -Granules	<i>Cytokine, growth factors</i> platelet factor-4 (PF-4) β -thromboglobulin (β -TG) thrombospondin (TSP) platelet-derived growth factor (PDGF) vascular endothelial cell growth factor (VEGF) insulin-like growth factor (IFG) fibroblast growth factor (FGF) hepatocyte growth factor (HGF) RANTES <i>Coagulation factor, fibrinolytic factor</i> PAI-1, coagulation factor V VWF, fibrinogen	GPIIb/IIIa GPIb/V/IX GPVI GLUT-3 P-selectin PECAM-1 CD40L
Dense granule	ADP, ATP serotonin calcium	LIMP-1(CD63) Ral, Rab
Lysosome	β -hexosaminidase β -glycerophosphatase collagenase	LIMP-1, -2, -3

and/or functions of platelets and other cells [9, 10]. These can regulate thrombus formation and affect its mechanical properties as well as contribute to cell-adhesive events, immunity, and the growth of vascular cells. During circulation, platelets are reactive to various stimuli and release materials stored in specific granules. Platelets thus transport specific compounds throughout the body and release a variety of substances at sites of vascular injury.

Platelets contain 3 types of granules within cytoplasm; lysosomes, dense granules, and α -granules (table 1). These three specific granule populations store different types of constituents, some at high concentrations. Dense granules contain the small non-protein molecules responsible for autocrine and/or paracrine platelet activation, including serotonin and ADP [9, 10]. Recently, Slc35d3, an orphan member of a nucleotide sugar transporter family, was shown to specifically regulate the contents of platelet-dense granules [11]. α -Granules, the most abundant granules in platelets, contain proteins (e.g., fibrinogen, fibronectin, vitronectin, VWF) that enhance the adhesive process, along with a large number of growth factors and cytokines that interact with other cells (table 1) [9]. α -Granules also have coagulation and fibrinolytic factors that modulate thrombus formation. Platelets contribute approximately 20% of the factor V (FV) present in whole blood, with nearly all of it in α -granules. Platelet FV is stored within platelets as partially proteolyzed molecules, ranging in molecular mass from 115 to 330 kDa [12]. Platelet FV exhibit significant cofactor activity upon release from platelets demonstrating a 2- to 3-fold increase in cofactor activity upon further ac-

Fig. 1. Platelet activation at sites of vascular injury. The initial interaction of platelets with subendothelial collagen under high shear conditions is mediated by the plasma protein VWF, which binds collagen and platelet GPIb (adhesion, top left). This unstable interaction facilitates transient tethering and rolling. GPIb-mediated adhesion is superseded by more stable binding to collagen by GPVI and GPIIb/IIIa (activation, top right). Collagen receptors mediate platelet activation signalling, which results in spreading and in the secretion and release of thromboxane A₂ and ADP (release reaction, bottom left). Finally, GPIIb/IIIa affinity becomes up-regulated, resulting in fibrinogen-mediated platelet aggregation through binding to GPIIb/IIIa (aggregation, bottom right)

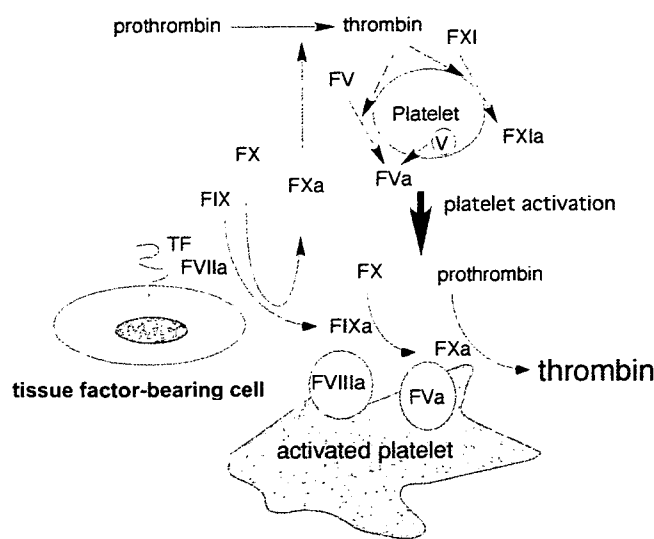
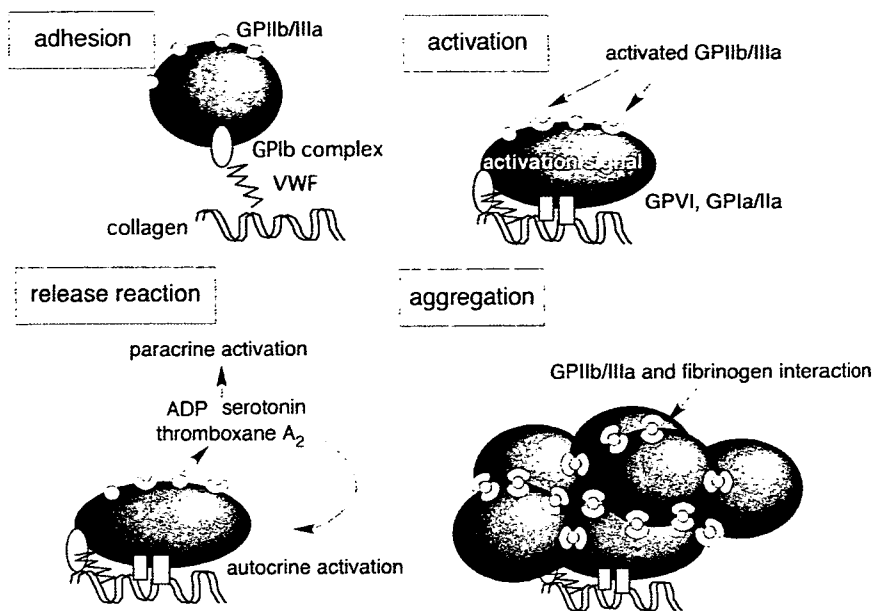


Fig. 2. Involvement of platelets in the coagulation cascade. Cofactors FVa (released from activated platelets) and FVIIIa are rapidly colocalized to the platelet membrane surface. FIXa formed by the FVIIa/TF complex binds to the surface of activated platelets. Activated platelets bind FIXa and promote the formation of FIXa/FVIIIa complexes. Once the platelet-tenase complex is assembled, FX is activated to FXa on the platelet surface. FXa then associates with FVa on the surface to generate a burst of thrombin sufficient to clot fibrinogen.

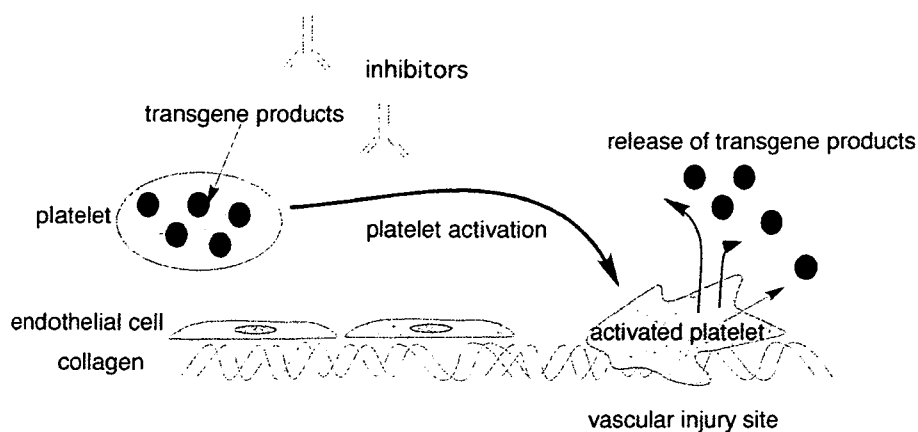
activation with activated factor Xa (FXa) or thrombin [13]. Platelet-derived FV appears to support hemostasis even in patients with an acquired FV inhibitor [14], suggesting that platelets can deliver coagulation factor and protect degradation by any circulating inhibitors. Lysosomal granules contain glycosidases and proteases that have an unclear function in platelet biology [9].

Building upon lessons learned about the role of the SNARE complex (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) in neuronal cell exocytosis [15], there has been a substantial increase in our understanding of platelet secretion. Platelets have the three basic components of the SNARE machinery: t-SNAREs (target receptors), v-SNAREs (vesicle-associated membrane receptors), and soluble components (including NSF and NSF-attachment proteins) [16]. The SNARE machinery regulates the association and subsequent fusion of vesicles with membranes. The molecular mechanisms of the platelet release reaction have been reviewed in detail elsewhere [10, 16].

Involvement of Platelets in Coagulation Cascade

Platelets also play an important role in localizing clotting reactions to the sites of vascular injury (fig. 2). Platelets adhere and aggregate at the same sites where tissue factor (TF) is exposed [17, 18]. Once platelets are activated, cofactor-activated FV (FVa) (released from activated platelets) and activated factor VIII (FVIIIa) are rapidly colocalized to the platelet membrane surface [19, 20]. Cofactor binding is mediated in part by the exposure of phosphatidyl serine on the platelet membrane, a process resulting from a flip-flop mechanism whereby phosphatidyl serine on the inner leaflet of the membrane bilayer flips to the outside [20]. Activated factor IX (FIXa) formed by the factor VIIa (FVIIa) / TF complex binds to the surface of activated platelets. Specific receptors on the activated platelets bind FIXa and promote the formation of FIXa/FVIIIa complexes. Once the platelet tenase complex is assembled, factor X (FX) is recruited from the plasma and activated to FXa on the platelet surface. FXa then associates

Fig. 3. Advantages of platelet-directed gene therapy. Platelets provide a way to enhance the local concentrations of target substances at sites of vascular injury while minimizing the influence of plasma proteins that may inhibit their activities. Platelet-mediated protein delivery may also inhibit the emergence of neutralizing antibodies because platelets store target substances protected within their cytoplasm.



with FVa on the surface to generate a burst of thrombin sufficient to clot fibrinogen and form a hemostatic plug [20]. As well, factor XI (FXI) can bind to GPIb on platelet surfaces and be activated by thrombin, bypassing the need for factor XIIa [21]. This suggests that FXI acts an enhancer of thrombin generation on the platelet surface. In hemophilia patients, an individual has a markedly decreased ability to generate FXa on the platelet surface, resulting in decreased prothrombinase activity [20].

Advantage of Platelets as a Delivery System – Lessons from Transgenic Mice

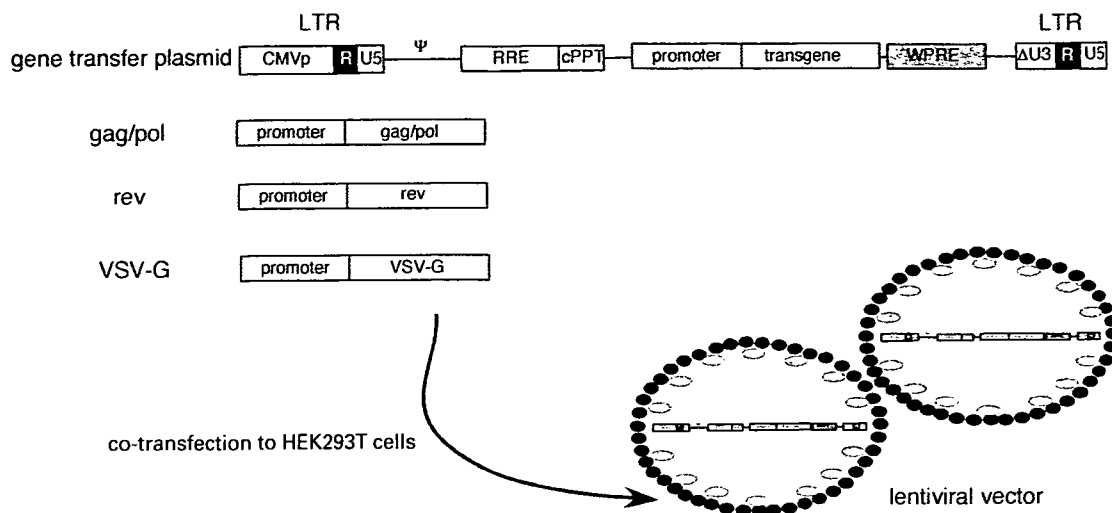
As described above, activated platelets aggregate and release a number of mediators that modify vascular integrity and hemostasis at sites of vascular injury [9, 10]. There are several advantages of the platelet-release reaction as a delivery system for a specific factor (fig. 3). One is that it provides a way to enhance the local concentration of target substances at sites of vascular injury. Given the evidence that platelets play a central role and provide the scaffold for the coagulation cascade, this would be a reasonable approach for delivering therapy to individuals deficient in the coagulation factor. Platelet-mediated protein delivery may also abolish the emergence of neutralizing antibody that often limits applications of hemophilia gene therapy. In patients with neutralizing antibodies, platelets are a very attractive delivery system because they specifically store protein in the bloodstream and then specifically release it at sites of thrombus formation, thereby minimizing the influence of any circulating inhibitors.

In 2003, Poncz and coworkers [22] proposed and demonstrated the feasibility of gene transfer into platelets and their precursor megakaryocytes using transgenic mice. They showed that platelet-directed gene transfer enable the storage of targeted substances within platelets. Platelet expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) using a megakaryocyte-specific platelet factor 4 (pf4) promoter enabled u-PA to be stored in platelets and then released within developing thrombi when the platelets became activated [22]. The platelet

u-PA not only resulted in a mild bleeding diathesis in adult transgenic mice, but transfusion of the platelets into wild-type animals blocked untoward thrombosis, suggesting that platelets can store a thrombolytic protein and release the protein of interest at sites of developing thrombi [22]. Further, platelet-specific expression of FVIII could be achieved in a transgenic setting with the resultant FVIII predominantly or exclusively stored in platelet granules rather than being released into the plasma [23]. When transgenic mice were crossed onto a FVIII null background, whole blood clotting time was partially corrected [23]. These data suggest that the platelet-specific expression of FVIII can be achieved by platelet-specific promoter and predominantly or exclusively stored in the platelet granules rather than being released into plasma. Recently, Shi et al. [24] clearly demonstrated that ectopically expressed FVIII in platelets could treat hemophilia in the absence as well as in the presence of circulating inhibitors using a transgenic model. The expression of human B-domain-deleted FVIII driven by GPIIb promoter can correct the bleeding phenotype of FVIII-deficient mice in spite of the lack of detectable FVIII in plasma, as described above. Correction of the hemorrhagic phenotype in hemophilia A can be achieved by bone marrow cell transplantation or platelet transfusion from transgenic mice [24]. Of note, targeting FVIII expression to platelets still supports hemostasis under conditions of a high titer of FVIII-neutralizing antibodies [24]. These findings have facilitated the development of methods for gene therapy that employ platelets to deliver therapeutic agents such as specific coagulation factor to sites of vascular injury.

The conditional expression of targeted protein in megakaryocytes and platelets has recently been demonstrated in transgenic mice. Nguyen et al. [25] reported that the tetracycline/doxycycline system in conjunction with the pf4 promoter yields conditional overexpression of genes *in vivo*. Alternatively, the bacterial artificial chromosome-derived pf4-Cre transgene allowed efficient and lineage-restricted excision of a loxP target gene [26]. These transgenic mice promise to be a very useful tool to study megakaryopoiesis, platelet formation, and platelet function.

Fig. 4. Structure and production of lentiviral vector. A minimal lentiviral vector plasmid consisting of the CMV/LTR chimera promoter followed by the packaging signal (Ψ), rev-binding element RRE for cytoplasmic export of the RNA, the transgene expression consisting of internal promoter and transgene, and the 3' self-inactivating LTR. All genes coding for enzymatic or structural HIV or SIV proteins



have been removed. Together with the vector plasmid, a packaging plasmid encoding gag-pol, rev, and an envelope-expressing plasmid are co-transfected to HEK293T cells. Lentiviral vector is produced in the supernatant from the HEK293T cells.

Methods for Platelet-Directed Gene Therapy

Gene Transfer Vectors

Since platelets and their precursor megakaryocytes have a finite lifespan, HSCs are a preferable target for genetic transfer to establish long-term expression of the targeted protein in platelets *in vivo* [27]. HSC gene transfer, using viral vectors, has been actively investigated for more than 20 years, and oncoretroviral vectors have been most vigorously pursued [28–30]. However, recent clinical studies suggest that the standard transduction protocols used in conjunction with oncoretroviral vectors generally do not lead to levels of gene transfer that are clinically relevant [29, 31, 32]. Oncoretroviruses require cell division for integration. As repopulating HSCs are largely quiescent, oncoretroviral vectors are largely inefficient for such targets [33]. On the other hand, lentiviruses are capable of infecting certain types of quiescent cells [34–36]. Thus, there has been significant interest in the application of lentivirus-derived vectors to the transduction of HSCs. Indeed, the use of lentiviral vectors has been shown to achieve high-level expression of transgenes in HSCs [37–39]. As well, lentiviral genomes contain fewer CpG dinucleotides than oncoretroviral vectors, leading to the experimental observation that lentiviral vectors are more resistant to silencing [40]. Although adeno-associated virus (AAV) vectors are an alternative for the transduction of HSCs, there is controversy regarding the ability of AAV to transduce HSCs [41, 42]. The structure of a lentivirus vector plasmid and the packaging and helper plasmid is shown in figure 4. To prevent the generation of replication-competent lentiviruses, the native sequence in lentiviral vector constructs is considerably deleted and/or altered [43–45]. Cis-elements within the transfer vector are minimized and necessary trans-elements are supplied from

packaging and envelope helper constructs. Lentivirus vector was produced in supernatants from HEK293T cells transfected with these vector plasmids [43, 44, 46]. The minimal transgene expression cassette of gene transfer vector contains the long-terminal repeat (LTR), the packaging signal (Ψ), a heterogenous promoter, and the transgene of interest. The central polypurine tract (cPPT) sequence enhances lentiviral vector efficiency by facilitating nuclear translocation of preintegration complexes [47, 48]. The lentivirus native envelope is typically replaced with a helper plasmid expressing heterologous envelope GP. This process, termed pseudotyping, can greatly modify both the cell and the host range tropism of the vector [49]. The vesicular stomatitis virus GP (VSV-G) has been extensively used to transduce HSCs [50, 51]. Other viral envelopes have successfully been applied to pseudotype lentiviral particles, including those from lyssaviruses, arenaviruses, flaviviridae, baculovirus, and alphaviruses [52–54]. Of the lentiviral vectors, human immunodeficiency virus (HIV), simian immunodeficiency virus (SIV), and feline immunodeficiency virus (FIV) have been used for various basic research investigations [44, 52, 54]. There are reasons, other than commercial, to select the lentiviral vector with different types of lentiviral vector. We used the SIV lentiviral system for efficient platelet-targeting gene transduction because of its probable safety [44]. The SIV lentiviral system was derived from SIVagmTYO1, and is non-pathogenic to both its natural host and to experimentally infected Asian macaques [44]. Replication-competent virus particles were not detected in vector-infected cells, and the risk of development of replication-competent lentivirus particles in HIV carrier patients may be theoretically lower than that for the HIV-based vectors [55]. It is also worth noting that HIV-1-based lentiviral vector was found to transduce cytokine-mobilized rhesus

macaque CD34+ cells very poorly [56]. On the other hand, SIV vectors efficiently transduce macaque CD34+ cells as assayed in vitro [56], suggesting that SIV vectors appear promising for evaluating gene therapy approaches in non-human primate models.

Risk of Insertional Mutagenesis and Recent Vector Modifications to Improve Safety

While lentiviral vectors and retroviral vectors offer a means to permanently correct genetic diseases by stably expressing a transgene by integration to chromosomal DNA, all current integrating gene transfer vectors carry a finite risk of insertional mutagenesis [57]. Insertional mutagenesis resulting in retroviral enhancer-mediated activation of the T-cell proto-oncogene LMO2 has occurred in children with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) after retroviral gene therapy, indicating the potential genotoxicity of retroviral integration in HSCs [57, 58]. Molecular analysis of affected patients cells from X-SCID gene therapy suggest that the problems are likely disease-specific [58] because there have been no reports of adverse effects from insertional mutagenesis in patients with adenosine deaminase deficiency treated with oncoretroviral vector [59]. Clonal dominance in humans with chronic granulomatous disease and the ability of retroviral integration to immortalize normal bone marrow cells with an integrating virus has the potential to alter subsequent biologic behavior [60, 61]. On the other hand, there would be insufficient numbers of gene-corrected cells to achieve a sustained therapeutic effect in the absence of such clonal expansions. Only long-term follow up of patients will determine the true safety of gene transduction to HSCs.

Studies on the integration preferences of oncoretroviruses and lentiviruses suggest that the patterns of integration of both vectors are quite different. The integration of oncoretrovirus into chromosomes was favored near transcription units, based on the association of the integration site with a DNAase I-hypersensitive site and CpG islands, a situation often associated with transcribed genes [62, 63]. On the other hand, the lentiviral vector integration sites were more evenly distributed throughout the coding sequences of targeted genes [57, 63]. Thus, compared to oncoretroviral vectors, lentiviral ones may be less prone to insertional mutagenesis. Several strategies can be implemented to decrease the risks of insertional mutagenesis by improving the vector structure. Self-inactivating (SIN) vector systems, in which the U3 region of the viral 3'-LTR is deleted, have been developed and are currently used in a variety of lentiviral vectors [43, 44]. SIN vectors are expected to improve safety profiles by eliminating viral LTR promoter activity. Conventional oncoretroviral vectors, such as those used in the X-SCID trial, used 5'-LTR as a functional promoter for the transgene [64]. Although intact LTR can promote transcription of downstream sequences, and/or an enhance element of LTR can interact with nearby promoters, SIN vectors usually rely on a single internal promoter to drive transcrip-

tion of the transgene [43, 44, 54]. In addition, the use of a cell lineage-specific promoter as an internal promoter in a SIN vector may be safer than using a viral or ubiquitous promoter. A further solution for preventing insertional mutagenesis is the incorporation of chromosomal insulators into the viral vector [54, 57, 65, 66]. Insulators are genetic elements near chromatin domain boundaries that function as barriers against the repressive effects of neighboring inactive chromatin, or they prevent inappropriate activation of a promoter by heterologous enhancers [67, 68]. There are two benefits in utilizing a chromosomal insulator. First, insulators can abolish the potential of a proviral genome to activate a gene encoding a transactivator when integrated near that gene, which can lead to insertional mutagenesis. Second, chromatin insulators protect gene expression by the targeted gene from neighboring silencers, preventing transcriptional silencing of oncoretroviral vectors [69]. To date, the best-characterized chromatin insulator is the 5' DNase I-hypersensitive site 4 (cHS4) core from the chicken β -globin locus control region [67, 68]. Insertion of cHS4 in SIN lentiviral vectors results in higher and less variable expressions of human β -globin, similar to observations with cHS4-containing retroviral vectors carrying the human γ -globin gene [65, 66]. The levels of β -globin expression achieved from insulated SIN lentiviral vectors were sufficient to phenotypically correct the thalassemia phenotype of 4 patients with human thalassemia major in vitro; this correction persisted long term for up to 4 months in xenotransplanted mice in vivo [38]. Recently, it has been shown that reduction of the risk of insertional mutagenesis in integration-deficient lentiviral vectors can mediate sustained transgene expression in vivo in rodent ocular and brain tissues [70]. Mutations in the integrase coding sequence results in integration-defective lentiviral vector, and class I mutations achieved normal DNA synthesis, integration failure, and accumulation of DNA in the cell nucleus as double-stranded circles [71]. The use of this vector system is particularly attractive for postmitotic tissues. However, application to HSC transduction is regarded as an exception because these vectors lack replication signals and are progressively diluted as a result of cell division [72].

Platelet-Specific Promoter

To establish an efficient transduction of megakaryocytes and platelets, at least a platelet-specific promoter must be utilized. The use of a cell lineage-specific promoter may provide some assurance of vector safety, as describe above. As well, transplantation of HSCs transduced with a lentiviral vector expressing the eGFP gene driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter resulted in efficient eGFP expression in CD45+ cells, but not in platelets [73] (see fig. 6). On the other hand, transduction of HSCs with a lentiviral vector harboring a platelet-specific promoter resulted in efficient gene marking to platelets. It is not entirely understood why the eGFP expression driven by the CMV promoter was significantly decreased in platelets, as opposed to the high transduction effi-

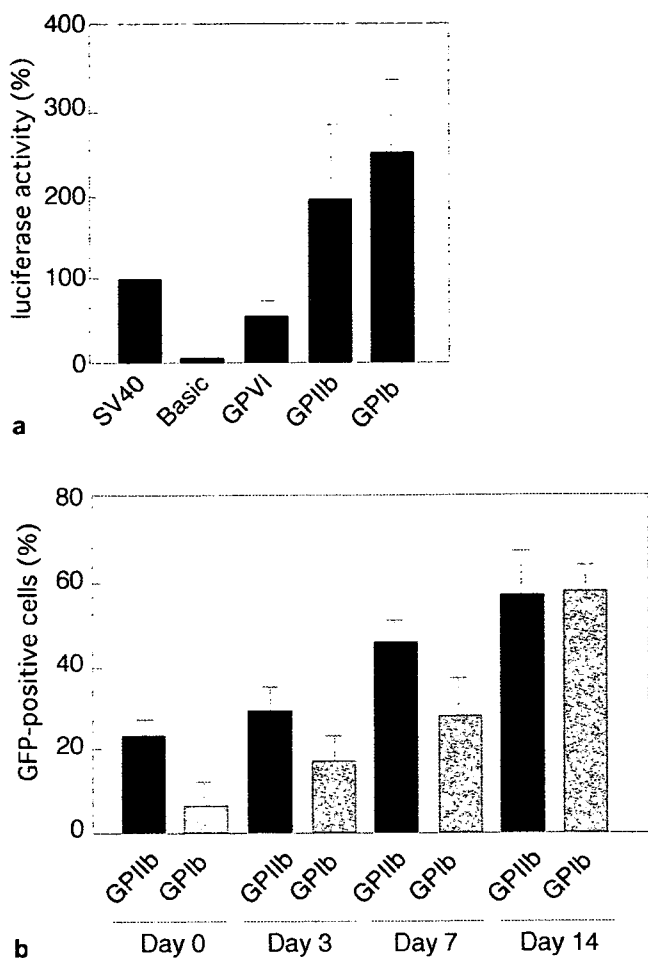


Fig. 5. Advantage of GPII α promoter as a platelet specific promoter. **a** Comparison of platelet-specific promoter activities. Each construct along with a promoter-less vector (basic) or a positive control vector (SV40) was transfected into the UT-7/TPO megakaryocytoblastic cell line. Luciferase activities were measured 48 h after transfection and are shown relative to the activity driven by the SV40 promoter (SV40/Enhancer) ($n = 5$). **b** CD34 $^{+}$ cell-derived megakaryocytes at day 0, 3, 7, and 14 after the start of megakaryocytic differentiation were transduced with a SIV lentiviral vector equipped with eGFP driven by a GPII α promoter or GPIIb promoter at a MOI of 30. Columns and error bars represent the percentage of GFP-positive cells (mean \pm SD; $n = 3$).

ciencies of CD45 $^{+}$ cells. Generally, the reduction of transgene expression caused by a shortened protein half-life is even more pronounced in terminally differentiated blood cells [74]. The decreased expression might have been mediated by the down-regulation of the transgene during differentiation; the stability of the encoded protein is at least as relevant for the expression of a transgene as the choice of the promoter or cis-elements influencing RNA processing in differentiated cells [74]. Candidates for a promoter sequence for megakaryocyte- and platelet-specific expression include the promoter sequences of the GPIb/GPIX/GPV complex, GPIIb, p4, and GPVI [25, 26, 73, 75]. These promoter sequences have a potential site to bind the transcription factors including

GATA-1, Ets, FOG-1 and NF-E2, which are essential regulators of distinct stages in megakaryocyte differentiation [3,76]. We are now utilizing the GPII α promoter as a platelet-specific promoter because the promoter activity of GPII α is more potent than that of GPIIb in UT-7/TPO and CD34 $^{+}$ cell-derived megakaryocytes [73] (fig. 5a). Another reason is that the GPII α promoter works at a late stage of megakaryopoiesis [77] (fig. 5b). Although the GPIIb gene is expressed in platelets and megakaryocytes, it is an early gene for megakaryopoiesis [77]. In conditional knockout mice in which the thymidine kinase gene was driven by the GPIIb promoter, the administration of gancyclovir led to a dramatic reduction in the platelet count [78]. In bone marrow, erythroid and myeloid progenitors were also affected, which indicated the presence of GPIIb in progenitor cells [78]. Indeed, 18% of human CD34 $^{+}$ HSCs already express GPIIb, and so the appearance of GPIb was markedly delayed as compared to that of GPIIb, indicating that GPIb is a later marker of megakaryocytic maturation [73, 77]. Therefore, we believe that platelet-directed gene therapy using the GPII α promoter will allow more specific and restricted expression of gene products in megakaryocytes and platelets.

Phenotype Correction of Mouse Models of Hemorrhagic Diseases by Platelet-Directed Gene Therapy

Inherited Platelet Disorder

Abnormalities of platelet function manifest themselves primarily as excessive hemorrhage at mucocutaneous sites, with petechiae, epistaxis, gingival hemorrhage, and menorrhagia most common [79]. Glanzmann's thrombasthenia (GT) is a rare autosomal-recessive hereditary disorder characterized by the severe reduction of platelet aggregation due to qualitative or quantitative abnormalities of GPIIb/IIIa [80]. More than 100 distinct genetic defects have been characterized for GT, with an even distribution in both genes [80]. For gene therapy for GT, megakaryocyte-specific expression of GPIIb/IIIa is potentially important because the expression of the platelet-specific integrin in neutrophils, erythrocytes, or monocytes might alter the adhesive properties of these cells, resulting in the unexpected progression of thrombosis. Wilcox and colleagues [27, 75, 81–83] have consistently reported the feasibility of gene therapy for inherited platelet disorder. They initially used a SIN oncoretroviral vector encoding the GPIIIa gene or the β -galactosidase gene driven by GPIIb promoter and found that the transduced CD34 $^{+}$ HSCs with the vector specifically express the targeted gene transcript after differentiation into megakaryocytes [75]. When a retroviral vector containing the GPIIIa gene driven by the GPIIb promoter was transduced into CD34 $^{+}$ cells from a GT patient with defects in the GPIIIa gene, GPIIb/IIIa were actually detected after in vitro megakaryocyte differentiation [81]. Recently, the same authors showed that transplantation of transduced cells with a

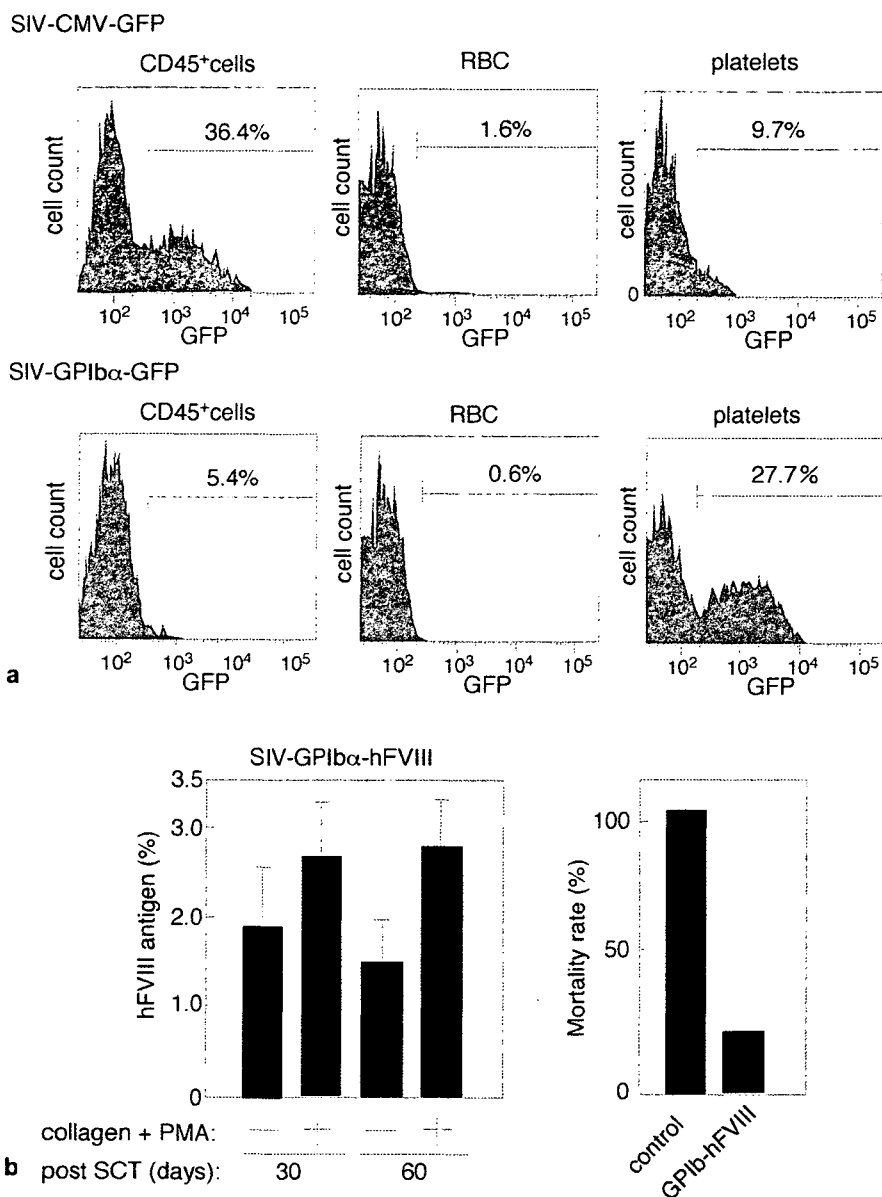


Fig. 6. Efficient expression of transgene in platelets using lentiviral vector harboring GPIb α promoter. **a** KSL cells were transduced with a SIV lentiviral vector equipped with eGFP driven by a CMV (SIV-CMV-eGFP) or GPIb α (SIV-GPIb α -eGFP) promoter at a MOI of 30. Representative flow cytometric analyses of eGFP-positive cells in CD45⁺ lymphocytes and granulocytes, red blood cells (RBC), and platelets in peripheral blood after transplantation are shown. **b** Phenotypic correction of hemophilia A in mice by platelet-directed gene therapy. Blood from FVIII-deficient mice transplanted with KSL cells transduced without or with SIV-GPIb α -hFVIII was stimulated in the presence or absence of 50 μ g/ml of collagen and 1 μ mol/l PMA for 15 min. hFVIII antigen levels in platelet-poor plasma were measured (n = 4 per group) (left panel). Mortality rate within 24 h after tail clipping in mice transplanted with control or SIV-GPIb α -hFVIII-transduced KSL cells (n = 10 for control, n = 8 for GPIb α) (right panel).

lentivirus vector equipped with the human integrin β 3 gene under control of the GPIIb promoter resulted in phenotypic correction of a mouse model of GT, integrin β 3-deficient mice [82]. These data indicate the possibility of gene therapy for better management of patients with inherited platelet disorder, including GT and Bernard-Soulier syndrome.

Coagulation Factor Deficiencies

Hemophilia A is an X chromosome-linked bleeding disorder caused by defects in the FVIII gene and affects approximately 1:5,000 males [84]. Hemophilia A is considered suitable for gene therapy because it is caused by a single gene abnormality and therapeutic coagulation factor levels may well vary across a broad range (5- to 100%) [85, 86]. Although sustained therapeutic expression of FVIII has been achieved in preclinical studies using a wide range of gene transfer technologies targeted at different tissues, the emergence of neutralizing anti-

body often limits clinical applications [86-88]. The targeting of HSCs is not an exception; lentiviral FVIII gene transduction of HSCs is able to produce therapeutic levels of FVIII by ubiquitous promoters [89], but the emergence of neutralizing antibodies to FVIII has resulted in decreased levels of FVIII activity [90].

Retrovirus transduction of FVIII driven by the virus promoter into human CD34⁺ HSCs enables FVIII-transduced megakaryocytes to store human FVIII with VWF within α -granules [91]. This is a very important finding because VWF is the natural carrier protein of FVIII, and FVIII interaction with VWF within platelet α -granules may enable the stable storage of FVIII. As well, transplantation of bone marrow cells transduced with lentiviral vector having FVIII driven by a platelet-specific promoter improve the hemostatic function of FVIII-deficient mice, despite there being undetectable or scant levels of FVIII in plasma (fig. 6b) [73, 92]. FVIII levels in plasma