

研究発表

主任研究者

岡 慎一

- 1) Bi, X., Gatanaga, H., Koike, K., Kimura, S., and Oka, S. Reversal periods and patterns from drug resistant to wild type HIV-1 after cessation of anti-HIV therapy. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 23: 43-50, 2007.
- 2) Yamanaka, H., Gatanaga, H., Kosalaraksa, P., Matsuoka-Aizawa, S., Kimura, S., and Oka, S. Novel mutation of human polymerase γ associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J. Infect. Dis.* 195: 1419-1425, 2007.
- 3) Gatanaga, H., Ibe, S., Matsuda M., Yoshida, S., Asagi, T., Kondo, M., Sadamasu, K., Tsukada H., Masakane, A., Mori, H., Takata, T., Minami, R., Tateyama, M., Koike, T., Itoh, T., Imai, M., Nagashima, M., Gejyo, F., Ueda, M., Hamaguchi, M., Kojima, Y., Shirasaka, T., Kimura, A., Yamamoto, M., Fujita, J., Oka, S., and Sugiura, W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 75: 75-82, 2007.
- 4) The ESPRIT Research Group (Kikuchi, Y., Takano, M., Oka, S. as members of Japan National Trial Coordinating Center). Predictors of CD4 count change over 8 months of follow up in HIV-1-infected patients with a CD4 count >300 cells/ μ l who were assigned to 7.5 MIU interleukin-2. *HIV. Med.* 8: 112-123, 2007.
- 5) Gatanaga, H., Hayashida, T., Tsuchiya, K., Yoshino, M., Kuwahara, T., Tsukada, H., Fujimoto, K., Sato, I., Ueda, M., Horibe, M., Hamaguchi, M., Yamamoto, M., Takata, N., Kimura, A., Koike, T., Gejyo, F., Matsushita, S., Shirasaka, T., Kimura, S., and Oka, S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1230-1237, 2007.

分担研究者

小池隆夫

- 1) 佐藤典宏. シンポジウム9「みんなで作るチーム医療、医師の立場から」. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会、2007年、広島.

伊藤 俊広

- 1) 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史郎、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、瀧永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、秦 真美、溝上泰司、森 治代、南留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 亙、金田次弘. 日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ. *日本エイズ学会誌.* 9:136-146, 2007.

下条文武

- 1) 佐藤みさ子、牧野麻由子、小林美佐江、石川朋子、川口 玲、内山正子、手塚貴文、太田求磨、田邊嘉也、津畑千佳子、佐藤 牧、下条文武. 新潟大学医歯学総合病院におけるチーム医療の実例. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会、2007年、広島.

上田幹夫

- 1) Gatanaga, H., Ibe, S., Matsuda M., Yoshida, S., Asagi, T., Kondo, M., Sadamasu, K., Tsukada H., Masakane, A., Mori, H., Takata, T., Minami, R., Tateyama, M., Koike, T., Itoh, T., Imai, M., Nagashima, M., Gejyo, F., Ueda, M., Hamaguchi, M., Kojima, Y., Shirasaka, T., Kimura, A., Yamamoto, M., Fujita, J., Oka, S., and Sugiura, W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 75: 75-82, 2007.

濱口元洋

- 1) Fujisaki, S., Fujisaki, S., Ibe S., Asagi, T., Itoh, T., Yoshida, S., Koike, T., Oie M., Kondo, M., Sadamasu, M., Nagashima, M., Gatanaga, H., Matsuda, M., Ueda, M., Masakane, A., Hata, M., Mizogami, Y., Mori, H., Minami, R., Okada, K., Watanabe, K., Shirasaka, T., Oka, S., Suigura W., and Kaneda. T. Performance and

Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 113-117, 2007.

白阪琢磨

- 1) 白阪琢磨, 上平朝子, 織田幸子, 下司有加, 龍香 織, 治川知子, 谷口智宏, 矢嶋敬史郎, 笹川 淳, 富成伸次郎, 渡邊 大, 矢倉裕輝, 永井聡子, 牧江俊雄, 山本善彦, 吉野宗宏, 栗原健. 国立大阪医療センターにおけるキードラッグの推移と長期処方症例の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会総会, 2007年, 広島.
- 2) 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総会, 2007年, 広島.

木村 昭郎

- 1) Gatanaga, H., Hayashida, T., Tsuchiya, K., Yoshino, M., Kuwahara, T., Tsukada, H., Fujimoto, K., Sato, I., Ueda, M., Horibe, M., Hamaguchi, M., Yamamoto, M., Takata, N., Kimura, A., Koike, T., Gejyo, F., Matsushita, S., Shirasaka, T., Kimura, S., and Oka, S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1230-1237, 2007.

山本政弘

- 1) 山本政弘. シンポジウム HIV 陽性者の治療認識 (Treatment Literacy) - 医療現場と自助活動の連携・協働の可能性を探る - 医師の立場から見た治療情報の提供. 第21回日本エイズ学会学術集会総会, 2007年, 広島.

前田憲昭

- 1) 前田憲昭, 溝部潤子. HIV 感染者治療時における針刺し事故経験の検証. 第21回日本エイズ学会学術集会総会, 2007年, 広島.

島田 恵

- 1) Nishigaki, M., Shimada, M., Ikeda, K., Kazuma, K., Ogane, M., Takeda, K., Yamada, Y., Fukuyama, Y., Ito, S., Kishigami, F., and Kimura, S. Process and contents of telephone consultations between registered nurses and clients with HIV/AIDS in Japan. *JANAC* 18: 85-96, 2007.

山中京子

- 1) Yamanaka, K. An Analysis of Individual Counseling for Women Who Visited HIV Test Site in Osaka. *International Society of Psycho-Somatic Medicine for Woman*, May14-17, 2007, Kyoto, Japan.

田中千枝子

- 1) 田中千枝子, 小西加保留, 菱川 愛. エンパワメント・エヴァリュエーションにおける受療環境の整備について. 第21回日本エイズ学会学術集会総会, 2007年, 広島.

満屋裕明

- 1) Koh, Y., Matsumi, S., Amano, M., Das, D., Davis, D., Li, J., Leschenko, S., Baldrige, A., Shioda, T., Yarchoan, R., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. Non-peptidyl small molecule inhibitors of HIV-1 protease dimerization. *J. Biol. Chem.* 282: 28709-28720, 2007.

杉浦 互

- 1) Fujisaki, S., Fujisaki, S., Ibe S., Asagi, T., Itoh, T., Yoshida, S., Koike, T., Oie M., Kondo, M., Sadamasu, M., Nagashima, M., Gatanaga, H., Matsuda, M., Ueda, M., Masakane, A., Hata, M., Mizogami, Y., Mori, H., Minami, R., Okada, K., Watanabe, K., Shirasaka, T., Oka, S., Suigura W., and Kaneda. T. Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 113-117, 2007.
- 2) Gatanaga, H., Ibe, S., Matsuda M., Yoshida, S., Asagi, T., Kondo, M., Sadamasu, K., Tsukada H., Masakane, A., Mori, H., Takata, T., Minami, R., Tateyama, M., Koike, T., Itoh, T., Imai, M., Nagashima, M., Gejyo, F., Ueda, M., Hamaguchi, M., Kojima, Y., Shirasaka, T., Kimura, A., Yamamoto, M., Fujita, J., Oka, S., and Sugiura, W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 75: 75-82, 2007.

研究課題：HIV 診療ネットワークを活用した診療連携の利活用に関する研究

課題番号：H17-エイズ一般-001

主任研究者：菊池 嘉（国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 臨床研究開発部長）

分担研究者：秋山昌範（東京医科大学 医療情報学講座 客員教授）

山本隆一（東京大学大学院情報学環 准教授）、

木内貴弘（東京大学医学部附属病院医療情報ネットワーク研究センター 教授）

岩本愛吉（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野・感染免疫内科 教授）

橋本康昭（東京都荒川区福祉部介護保険係 係長）

岡村牧男（特定非営利活動法人ネットワーク医療と人権 理事）

1. 研究目的

HIV 診療支援ネットワーク（以下 A-net）は、我が国で初めて導入された診療情報共有システムであり、エイズ治療・研究開発センター（以下 ACC）とエイズ治療ブック拠点病院及びエイズ治療拠点病院を結んだネットワークシステムである。平成 11 年年末からの本格運用の後、順調に利用者を増やして、同意を得た多くの患者参加をえて、ある時期は全国の HIV 患者の 20%弱が参加するまでのネットワークとなっていた。平成 10 年当時のセキュリティー技術としては最高度の機密性の高い Virtual Private Network (VPN: 仮想専用線網) を利用し、これまで 9 年間以上の期間で個人情報の漏洩事故は皆無であった。このように、A-net は当時の最高の技術を投入して構築されたが老朽化のため使い勝手が悪くなり、近年は利用者離れが進んでいる。利用者に魅力あるネットワークとはどうあるべきかを見極め、新しい診療ネットワークのあり方を探るための研究を行った。

2. 研究方法

実際の A-net の利用がどういう状況であるのか、A-net 利用者数・登録患者数・参加施設数・A-net アクセス数、累積データ数を保守センターから調査する。

A-net ユーザーより利用状況の意見を聴取。データ入力者からの自由記載型の聞き取り調査を実施する。

HIV 感染患者の病気に対する理解は非常に高く、毎回の受診時には、CD4 やウイルス量などを記録していくことが多い。患者からもデータを閲覧できるシステムを導入して欲しいという声があり、患者参加型の擬似ネットワークを構築する。市販のされているカルテシステムをインターネット上で展開して、擬似ネットワークをつくり、研究者が患者役、医療者役となって、データの閲覧が出来るシステムを作成する。

オーストラリアの HIV ネットワークシステムを視察し、その考え方および現状を学ぶ。

（倫理面への配慮）

今回の検討では特に個人情報扱う物ではないので、特段の配慮は不要である。

3. 研究結果

●A-net の利用状況

①A-net 利用者数

平成 19 年 4 月には 232 名でスタートし、異動などで減少し 9 月には 213 名にまで落ち込んだが、10 月に A-net 説明会を開き新規登録があり、12 月末現在で 223 名の登録者（A-net ユーザー）であった。

②登録患者数

年度当初 510 名で、12 月末に 511 名でわずかに 1 名の増加に留まった。

③A-net 参加施設数（稼働施設数）

年度当初 119 施設あり、12 月末には 118 施設となっている。その内訳は、国立及び国立病院機構に属する施設は 57 施設、非国立系は 51 施設であった。12 月末現在でユーザー無し施設が、国立系で 14 施設、非国立系で 37 施設あった。

④A-net アクセス数

本年 11 月は 1033 件、12 月は 1229 件であり、毎月約 1000 件のアクセスがあった。

⑤累積データ数

年度当初 31,203 件から始まり、12 月末現在 32,727 件であり、毎月約 200 件のデータの増加がみられた。

●ユーザーからの意見聴取

ブロック拠点病院、拠点病院いずれのユーザーからも、パフォーマンスの低さに対する不満が多かった。参加施設の大半で病院独自のオーダリングシステムないし電子カルテシステムが導入されており、A-net が開発された当初の経時的なデータを参照させる A-net の独自の機能が、各施設の自施設の検査参照システムから A-net を使用するよりも短時間で示されるようになり、利用度が益々落ち込

んでいる。パスワードの更新のためにアクセスした際に、全国のバックグラウンドデータを参照したりするのみで、普段は自施設の検査システムを参照することが多くなり、利用価値が落ちている。説明の上、同意をとることが必要であるが、一般の内科診療よりも治療方針、治療継続に要する説明時間を多く必要としているため、限られた外来診療時間内で A-net の概要を説明することは困難であり、自施設の検査システムが充実した今日では、もはや利用価値が薄れているという認識が多かった。

●擬似カルテシステムの運用実験

ノーバメデイコ社製の、院内カルテシステム MyProdoc をインターネット上で運用し、擬似ネットワークシステムとして電子カルテの運用実験を行った。本来イントラネット環境で行うように設計されているシステムであるが、接続設定の変更によりインターネット上でも使用することが出来た。この設定変更には技術的に難易度が高く、ネットワークシステム会社に委託することによって実現した。病院・診療所役となった分担研究者がデータを入力し、患者役の分担研究者が CD4 数と HIV ウイルス量をネットワーク上で参照できた。データアクセスする際に、USB 指紋認証システムを加えることにより、セキュリティのレベルが向上した。擬似カルテシステムは抄録提出時点でも、実用試験中であり詳細な結果は成果発表会までに間に合わせたい。

●オーストラリアにおける National HIV data base の視察

オーストラリア、ニューサウスウェールズ州立大学に付属の National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research (NCHECR) に出向き、同国の HIV data base を見学した。一般病院から、用手入力されたデータをコンピューターに登録するシステムであり、10 年以上前から構築されている。データベースに参加している病院から、CD4、HIV ウイルス量などの検査データと、診察の概略、処方内容などが記載され、それを NCHECR のホストコンピューターに一元登録する。作られた当初から各施設からのデータ送付に関しては、ネットワークを介したものは構成されておらず、用紙記入式のデータベースであった。患者の同意に関しては不要としており、その理由はサーベイランスと臨床研究は異なるものであり、同データベースはサーベイランスを目的にしており、臨床研究ではないので、同意は不要という判断であった。

4. 考察

A-net は HIV 原告団との和解の上に要望された診療ネットワークであり、当時の最高の技術を投入してネットワー

クが構築されたが、老朽化に伴い利用価値が薄れている。各診療機関で電子カルテ化が進んだことにもよるが、患者からの賛同が得られていない背景もある。今日、患者不在の医療は受け入れられない時代となり、患者が主体的に参加したいと思える特徴が無ければ診療ネットワークシステムの存続も危うい。HIV 患者の病気に対する理解はすすみ、CD4 やウイルス量が自分から入手できるような、患者参加が可能なネットワークを構築することで、参加者を増加させることが出来るのではないかと感じた。

5. 自己評価

1) 達成度について

医療者にとっていくら優れた診療ネットワークであっても、患者から賛同を得られないシステムは長続きしない。HIV 感染者は HAART の恩恵を受け、前向きに生きる人が多くなり、自身のデータに関する興味も高まっている。患者と医療者がデータを共有できる新 A-net を作る足がかりが今年度出来たと考えている。患者よりデータ閲覧が可能なネットワークになれば参加したいという感触を得た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

未だ研究は途上であるが、国レベルでの HIV ネットワークシステムが再構築されれば、サーベイランスに直結して各種の指標を容易に得ることが可能となる。国レベルでのネットワークシステムを完備すれば国際的にも最も進んだレベルに到達したことになり意義深い。

3) 今後の展望について

今日、患者からの要望を無視した医療は成り立ちえない。患者へ公開することも念頭にいたれたネットワークを早急に構築したい。

6. 結論

A-net は HIV 原告団との和解の上に要望された診療ネットワークであり、当時の最高の技術を投入してネットワークが構築されたが老朽化のため使い勝手が悪くなり、利用者離れが進んでいる。患者が参加できるシステムにすることが今後活用される活路になると考えられた。電子カルテとしての存在ではなく、サーベイランスのためにも効果を発揮するデータベース構築を目指したい。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究発表

主任研究者

菊池 嘉

原著論文による発表

欧文

- 1) Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. Intern Med. 46: 359-62, 2007
- 2) Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. AIDS. 21: 264-5, 2007

口頭発表

海外

- 1) Honda, H., Tsukada, H., Yazaki, H., Tanuma, J., Honda, M., Gatanaga, H., Teruya, K., Tachikawa, N., Kikuchi, Y., Oka, S. Low incidence of abacavir-associated hypersensitivity reaction in Japanese HIV-1 infected patients. 4th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention. Sydney 2007

国内

- 1) 菊池 嘉 A ネットの現状と課題 医療安全教育セミナー2007 春期 東京
- 2) 立川夏夫、柳澤邦雄、後藤耕治、神村麻穂子、渡辺珠代、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、菊池 嘉、仲村秀太、塚田訓久、岡 慎一 AIDS リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) 18 例の臨床的特徴の検討 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島。
- 3) 渡辺珠代、安岡 彰、後藤耕治、柳澤邦雄、仲村秀太、神村麻穂子、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一 当院における HAART 時代の HIV 日和見合併症の動向 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島。
- 4) 神村麻穂子、後藤耕治、柳澤邦雄、仲村秀太、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一 抗 HIV 療法 naive 患者 124 例における Atazanavir の治療成績 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島。
- 5) 林田庸総、瀧永博之、菊池 嘉、岡 慎一 Efavirenz の血中濃度に関わる CYP2B6 の遺伝子多型についての解析 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島。

木内 貴弘

原著論文による発表

和文

- 1) 木内貴弘、青木則明. 臨床試験登録制度の現状と今後. 臨床薬理. 38 (2) :7S-8S, 2007
- 2) 高橋優三、浜西千秋、栗原幸男、川崎勝、犬塚裕樹、石川澄、木内貴弘、椎橋実智男、松村明、山本皓二、太田吉夫. 患者の個人情報医学教材に使用するにあたってのガイドライン委員会案. 医学教育 38 (3) :173-177, 2007
- 3) 伊藤貴子、中島和江、ルエラ・松永、木内貴弘、吉田謙一. 英国の国立患者安全機構と'世界初' 国家医療事故報告制度. 日本医事新報 (4331) :76-80, 2007
- 4) 木内貴弘. 治験の電子化—医療機関内の電子化を中心に (第 3 回 DIA 総合ワークショップ講演全記録). 臨床医薬, 23 (7) :597-622, 2007

口頭発表

海外

- 1) Motomura N, Takamoto S, Miyata H, Tsukihara T, Okada M, Kiuchi T. The Risk of Model of Thoracic Surgery in 4707 Cases from Single Race Nationwide Population, via Web-based Data Entry System: a First Report of 30-day and Operative Outcome Risk Model on Thoracic Aortic Surgery. Proceedings of American Heart Association Scientific Sessions 2007, 2007 (Accepted for presentation)
- 2) Aoki N, Kiuchi T. UMIN - its History and Current Status. Proceedings of the 12th World Congress on the Internet in Medicine (MEDNET 2007) , Leipzig, 2007 (Accepted for presentation)
- 3) Koide D, Matsuba H, Furukawa H, Kubota K, Kiuchi T. Pharmaceutical Safety Reporting System on UMIN. MEDINFO 2007, IOS Press, P131, 2007 (CD-ROM)
- 4) Sato T, Kiuchi T, Aoki N, Watanabe H, Kubota K. Risk Management of Unapproved Drugs in Japan: An Academic Activity for Safety Data Exchange via the Internet Pharmacoeconomics and Drug Safety (Supplement) 16: S182, 200

岩本 愛吉

原著論文による発表

欧文

- 1) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T, Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:686-692, 2007.
- 3) Liu, H., Nakayama, E.E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P, Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *International J. Immunogenetics*. 34: 325-335, 2007. Manuscript ID:IJIG DOI- 10.1111/j.1744-313X.2007.00694.x
- 4) Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. In press. *J. Medical Virology*, 2007.

研究課題：ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発

課題番号：H18-エイズ-002

主任研究者：押村 光雄（鳥取大学・大学院医学系研究科 教授）

分担研究者：谷口 英樹（横浜市立大学大学院・医学研究科 教授）、落谷 孝広（国立がんセンター研究所・がん転移研究室 室長）、香月 康宏（鳥取大学・大学院医学系研究科 助教）、井上 敏昭（鳥取大学・医学部 准教授）、加藤 基伸（鳥取大学・医学部 助教）、武谷 浩之（鳥取大学・医学部 准教授）

1. 研究目的

我々はヒト人工染色体(HAC: Human Artificial Chromosome)ベクターの開発に成功した。カセット方式で遺伝子導入できるこのベクターは自律複製する極小染色体であるがゆえ遺伝子搭載サイズに制限なく、またベクターと名のつくとおりにあらゆる細胞に移入することが可能である。このような HAC ベクターの利点を生かし、持続的改善と患者の経済的・肉体的負担の大幅軽減をもたらす血友病治療法をマウスで検証する。それは Factor VIII 発現ユニット多コピーを HAC に搭載し、自己間葉系幹細胞及び皮膚線維芽細胞に導入、皮下移植するという最少数自己移植細胞による補充療法である。

2. 研究方法

HAC は細胞中で単一コピーの自律的な極小染色体として振る舞うベクターであり、遺伝子導入サイズに制限がなく、ホストゲノムを破壊しない。この利点を生かし血友病の安全な遺伝子治療を目指し、Factor VIII cDNA を多数タンデムに HAC ベクター上に搭載し、ヒト間葉系幹細胞及び皮膚由来線維芽細胞に導入し高効率発現システムを構築する。モデル系としてこれをマウス皮下に移植し、発現を定量化し、最少数の移植細胞による長期補充療法を検証する。さらにクラニアルウインドウ法にてリアルタイムで細胞生着のプロセス、細胞動態、Factor VIII の分泌動態を長期にわたり解析し、安全性・機能性を評価し、臨床応用に向けた礎とする。

（倫理面への配慮）

本研究は将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウスで確立することを目標としており、患者個体への適用を含むものではない。ヒト間葉系幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はそれぞれ CAMBREX 社、KURABO 社から研究用として販売されているものを購入、利用する。

3. 研究結果

今年度は微小核融合法により Factor VIII cDNA を 4 コピー搭載した人工染色体を不死化した間葉系幹細胞へ導入したクローンにおいて Factor VIII の機能性発現を確認した。Factor VIII 発現 CHO 細胞を A 型血友病モデルマウスに移植後、血中での Factor VIII の発現確認を Clotting assay 及び Tail Clipping assay により調べた。空 HAC ベクターを保持する CHO 細胞移植後をコントロールとしたとき Factor VIII を搭載した HAC ベクターを

保持する CHO 細胞移植後はマウスでの血液凝固活性は陽転し、尾切断後の出血死を免れたことから本研究で目指す戦略が有効であることが示された。

染色体改変技術を用いてマウス ES 細胞に肝細胞特異的なマーカーとしてアルブミンプロモーターとその下流に Luciferase をつなげた配列を導入したクローンを取得した。これを *in vitro* で肝細胞へ分化誘導後、ルシフェリンを添加すると発光することがわかった。将来的に Factor VIII に肝臓由来、あるいは血小板由来のプロモーターをつなげたものを染色体改変により導入すればより生理的な発現制御の下で HAC ベクター上の遺伝子を発現できる可能性が見出された。

4. 考察

モデルマウスへの移植結果から Factor VIII 発現 CHO 細胞は 4 copy を搭載するだけでもレスキューするには十分効果を発揮することがわかった。間葉系幹細胞においても多コピーの発現ユニットが搭載できたので、今後 CHO 細胞と同様の発現解析が必要である。モデルマウス由来 ntES への Factor VIII 搭載 HAC ベクター導入後、クローンを取得しつつあり、今後 ES を肝臓へ分化、あるいは血小板を含む血液系へ分化誘導させたときに Factor VIII がどの程度発現するか、最低限必要なコピー数を知る上でも重要であると考えられる。さらにこの HAC ベクターは HSV-TK を搭載させているためヌードマウスへ移植後にガンシクロビル投与による腫瘍形成阻害効果を確認するため Factor VIII 発現 ES 細胞取得は本研究課題において重要な役割を担っていると考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定した発現を保障するという HAC ベクターの特性が十分に生かされたと言え、予想通りの結果が得られていると言える。モデルマウスでの検証結果から血友病の新規治療法としての HAC ベクターの将来的な利用に目処がついたと言える。

予定では本年度の早い段階で 16 コピーの発現ユニットを構築することであったが、実際には HAC ベクターに搭載する前の 16 コピーのコンストラクト作製までである。ゆえに空 HAC ベクターを保持する CHO 細胞内での再構築は 4 コピーにとどまっている点が達成できていな

い事項であるが、この点について3月までには達成できる見込みである。

他は概ね予定通り進んでいるといえ、計画書に示したように多コピーの Factor VIII 搭載 HAC ベクターを保持する間葉系幹細胞及び線維芽細胞移植によるモデルマウスでの検証結果を得ることを最優先していく。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Factor VIII に着目した血友病遺伝子治療は、すでに臨床実験が行われているが、残念ながら十分な成果を上げてはいえない。例えば患者由来の線維芽細胞にプラスミドで Factor VIII を導入した場合、発現が一過性で消失する。レトロウイルスを静脈内投与する方法も行われつつあるが、リスクが伴う。非病原性レンチウイルスを用いた場合、クッパー細胞でのベクターの貪食をいかに防ぐかが問題となっている。そもそもウイルスベクターでは搭載遺伝子サイズの問題があるため、ミニジーンが用いられないという制限がある。

一方、HAC ベクターを用いることで、安全性の問題が克服できるだけでなく、導入サイズに制限がないことは大きな利点となる。タンデムに多コピーつなぐことによる Factor VIII の高効率産生系の確立も HAC ベクターを用いてはじめて可能になる。すでに我々はインスレーター配列の利用により、プロモーターの活性を長期にわたって安定に維持できること、実際に発現ユニットのコピー数に応じて発現量が増加することを確認しており、本研究で目指す Factor VIII の高発現については、実現の可能性が非常に高い。

再生医療、とくに患者本人に由来する幹細胞（造血幹細胞、間葉系幹細胞、ヒト ES 細胞、mGS 細胞）を用いた遺伝子治療の技術が進み、さらにヒト iPS 細胞が樹立されその応用が期待されている。本年度は多コピー cDNA 搭載による補充療法に特化した、我々のもつ HAC ベクター操作技術を利用すれば、欠損遺伝子のゲノムを導入した幹細胞を取得でき、幹細胞操作技術の発展が HAC ベクターを用いたゲノムレベルでの遺伝子治療の実現を実現可能なものとしつつある。このことによって cDNA では実現不可能であったな導入遺伝子の時空間的発現、量的な遺伝子発現の再現、スプライシングフォームの再現が可能になる。

このように安全で効果的なベクターとしての HAC の応用範囲は広く、本研究が、我が国における HAC ベクター利用に関連する研究の活性化及び水準向上の契機となる。知的所有権の確保を含め、この研究領域に強みを持つことは国家戦略上非常に重要と思われる。

3) 今後の展望について

今後、コピー数をさらに増やした Factor VIII cDNA 8 コピー及び 16 コピー搭載 HAC ベクターの構築を優先する。順次この HAC ベクターの間葉系細胞への移入、マウス皮下移植行い、効果・安全性検証を予定通り進

める。

長期的な視点に立脚した場合、幹細胞操作技術を併用する HAC ベクターでのゲノム補正が可能であることを血友病で示すことも重要であると考えている。そのため Factor IX ゲノムを搭載した HAC ベクターを Factor IX -/-マウス ES 細胞に導入し、Factor IX -/-ES 細胞とのキメラマウスを作出し、個体レベルでの表現型の改善を確認する。ES への Factor IX 導入も既にスタートしている。

相互補完的なこれらに方向の研究により HAC ベクターを用いる血友病の新遺伝子治療法の道筋がつき、臨床応用へのステップになると考えている。

6. 結論

HAC ベクターを用いる血友病の新遺伝子治療法の開発は概ね予定通り進んでいると言える。安定であり、コピー数依存的発現可能な Factor VIII 搭載 HAC ベクターを構築し、今年度の研究（間葉系幹細胞への移入、皮下移植、効果と安全性の検証）を着々と進めている。

今後、本研究でめざす新規血友病治療法を完成させ、HAC ベクターを用いた遺伝子治療において我が国が世界的リーダーとなるよう長期的な展望に立ち研究を進めたい。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特願 2006-127372：内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター

【出願人】：国立大学法人鳥取大学、有限会社 chromocenter

【発明者】：押村 光雄、香月 康宏、松岡 隆之

【出願日】2006年5月1日

特願 2002-292853：ヒト人工染色体（HAC）ベクター、

【出願人】：キリンビール株式会社

【発明者】：押村 光雄、加藤 基伸、富塚 一磨、黒岩 義巳、掛田 実

【出願日】2002年10月4日

特願 2000-565717：国際出願番号：PCT/JP99/04518：染色体の改変方法

【出願人】：麒麟麦酒株式会社

【発明者】：富塚 一磨、吉田 均、花岡 和則、押村 光雄、石田 功、黒岩 義巳

【出願日】：1999年8月23日、国際公開日：2000年3月2日

特願2005-002606、米国特許出願番号：11/210,337号

：ヒト肝細胞様細胞およびその利用

【出願人】：株式会社エフエクター細胞研究所

【発明者】：落谷 孝広、寺谷 工

【出願日】：2005年1月7日（国際出願日：2005年11月30日）

研究発表

原著論文(欧文)による発表のみ記載

主任研究者

押村 光雄

- 1) Nagahama Y, Ishimaru M, Osaki M, Inoue T, Maeda A, Nakada C, Moriyama M, Sato K, Oshimura M, Ito H.: Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1. *Cancer Sci.* 99:23-30, 2008.
- 2) Murakami K, Oshimura M, Kugoh H.: Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1. *J Hum Genet.* 52:926-33, 2007.
- 3) Osaki M, Inoue T, Yamaguchi S, Inaba A, Tokuyasu N, Jeang KT, Oshimura M, Ito H.: MAD1 (mitotic arrest deficiency 1) is a candidate for a tumor suppressor gene in human stomach. *Virchows Arch.* 451:771-9, 2007.
- 4) Itaba-Matsumoto N, Maegawa S, Yamagata H, Kondo I, Oshimura M, Nanba E.: Imprinting status of paternally imprinted DLX5 gene in Japanese patients with Rett syndrome. *Brain Dev.* 29:491-5, 2007.
- 5) Tomimatsu N, Tahimic CG, Otsuki A, Burma S, Fukuhara A, Sato K, Shiota G, Oshimura M, Chen DJ, Kurimasa A.: Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem.* 282:10138-45, 2007.
- 6) Ishihara K, Oshimura M, Nakao M.: CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell.* 23:733-42, 2006.
- 7) Ren, X, Tahimic CGT, Katoh, M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M.: Human artificial chromosome vectors meet stem cells: New prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev.* 2:43-50, 2006.
- 8) Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T.: Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8018-23, 2006.

分担研究者

谷口 英樹

- 1) Chiba T, Zhen YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H.: Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 133:937-950, 2007.
- 2) Yamamoto Y, Togo S, Yun-wen Zheng, Kubota T, Taniguchi H, Shimada S.: Adult rat hepatic bipotent progenitor cells remain dormant even after extensive hepatectomy. *Stem Cells* 15:422-429, 2007.
- 3) Kita K, Watanabe T, Ohsaka K, Hayashi H, Kubota Y, Nagashima Y, Aoki I, Taniguchi H, Noce T, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Tanaka H, Ogura A, Ogawa T.: Production of Functional Spermatozoa from Mouse Germline Stem Cells in Ectopically Reconstituted Seminiferous Tubules. *Biol Reprod.* 76:211-7, 2007.
- 4) Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, Taniguchi H.: Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132:720-732, 2007.
- 5) Okamura A, Zheng Y W, Hirochika R, Tanaka J, Taniguchi H.: In vitro reconstitution of hepatic tissue architectures with neonatal mouse liver cells using three-dimensional culture. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7:721-5, 2007.
- 6) Zhao W, Hirose T, Ishikawa M, Oshima Y, Hirai S, Ohno S, Taniguchi H.: Neonatal pancreatic cells redifferentiate into both neural and pancreatic lineages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352:84-90, 2007.

落谷 孝広

- 1) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T.: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 46:219-28, 2007.
- 2) Hanai K, Takeshita F, Honma K, Nagahara S, Maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T.: Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann NY Acad Sci.* 1082:9-17, 2006.
- 3) Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T.: A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res.* 66:7532-9, 2006.
- 4) Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K.: Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol.* 29:541-8, 2006.
- 5) Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T.: FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J.* 20:1484-5, 2006.
- 6) Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I.: MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 20:1321-30, 2006.
- 7) Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T.: Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from murine embryonic stem cells. *Hepatology.* 42:558-67, 2005.

香月 康宏

- 1) Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Oshimura M,

- Ogura A, Shinohara T.: Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev Biol.* 1:312:344-52, 2007.
- 2) Kurosaki H, Kazuki Y, Hiratsuka M, Inoue T, Matsui Y, Wang CC, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T, Toda T, Oshimura M.: A comparison study in the proteomic signatures of multipotent germline stem cells, embryonic stem cells, and germline stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 9:353:259-67, 2007.
 - 3) Mizuta E, Furuichi H, Kazuki Y, Miake J, Yano S, Bahrudin U, Yamamoto Y, Igawa O, Shigemasa C, Hidaka K, Morisaki T, Kurata Y, Ninomiya H, Kitakaze M, Shirayoshi Y, Oshimura M, Hisatome I.: Delayed onset of beating and decreased expression of T-type Ca²⁺ channel in mouse ES cell-derived cardiocytes carrying human chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:126-32, 2006.
 - 4) Suda T, Katoh M, Hiratsuka M, Takiguchi M, Kazuki Y, Inoue T, Oshimura M.: Heat-regulated production and secretion of insulin from a human artificial chromosome vector. *Biochem Biophys Res Commun.* 340:1053-61, 2006.
 - 5) Kazuki Y, Kimura M, Nishigaki R, Kai Y, Abe S, Okita C, Shirayoshi Y, Schulz TC, Tomizuka K, Hanaoka K, Inoue T, Oshimura M.: Human chromosome 21q22.2-qter carries a gene(s) responsible for downregulation of *mlc2a* and *PEBP* in Down syndrome model mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:491-9, 2004.
 - 6) Kazuki Y, Schulz TC, Shinohara T, Kadota M, Nishigaki R, Inoue T, Kimura M, Kai Y, Abe S, Shirayoshi Y, Oshimura M.: A new mouse model for Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 67:1-20, 2003.

井上 敏昭

- 1) Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M.: The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle.* 2:6:1011-8, 2007.
- 2) Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, Nakano S, Katoh M, Ito H, Oshimura M.: SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene.* 15:26:945-57, 2007.
- 3) Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, Toda T, Murakami K, Jeang KT, Ito H, Inoue T, Oshimura M.: Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics.* 5:3205-3213, 2005.
- 4) Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N.: *ZAC*, *LIT1* (*KCNQ10T1*) and *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res.* 33:2650-60, 2005.
- 5) Mori K, Matsuda K, Furusawa T, Kawata M, Inoue T, Obinata M.: Subcellular localization and dynamics of *MysPDZ* (*Myo18A*) in live mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 326:491-8, 2005.
- 6) Yoshida M, Inoue T, Shoji W, Ikawa S, Obinata M.: Reporter gene stimulation by *MIDA1* through its *DnaJ* homology region. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:326-32, 2004.
- 7) Mori K, Furusawa T, Okubo T, Inoue T, Ikawa S, Yanai N, Mori KJ, Obinata M.: Genome structure and differential expression of two isoforms of a novel PDZ-containing myosin (*MysPDZ*) (*Myo18A*). *J Biochem.* 133:405-13, 2003.

加藤 基伸

- 1) Kawahara M, Inoue T, Ren X, Sogo T, Yamada H, Katoh M, Ueda H, Oshimura M, Nagamune T.: Antigen-mediated growth control of hybridoma cells via a human artificial chromosome. *Biochim Biophys Acta.* 1770:206-12, 2007.
- 2) Yamada H, Kunisato A, Kawahara M, Tahimic CG, Ren X, Ueda H, Nagamune T, Katoh M, Inoue T, Nishikawa M, Oshimura M.: Exogenous gene expression and growth regulation of hematopoietic cells via a novel human artificial chromosome. *J Hum Genet.* 147-50, 2006.
- 3) Ayabe F, Katoh M, Inoue T, Kouprina N, Larionov V, Oshimura M.: A novel expression system for genomic DNA loci using a human artificial chromosome vector with transformation-associated recombination cloning. *J Hum Genet.* 50:592-9, 2005.
- 4) Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Kuroiwa Y, Kakitani M, Katoh M, Oshimura M, Tomizuka K.: Human artificial chromosome vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. *Gene Ther.* 12:852-6, 2005.
- 5) Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, Shirayoshi Y, Oshimura M.: Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun.* 321:280-90, 2004.
- 6) Kouprina N, Ebersole T, Koriabine M, Pak E, Rogozin IB, Katoh M, Oshimura M, Ogi K, Peredelchuk M, Solomon G, Brown W, Barrett JC, Larionov V.: Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 31:922-34, 2003.
- 7) Yawata T, Kamino H, Kugoh H, Katoh M, Nomura N, Oishi M, Horikawa I, Barrett JC, Oshimura M.: Identification of a \approx 600-kb region on human chromosome 1q42.3 inducing cellular senescence. *Oncogene.* 22:281-90, 2003.

武谷 浩之

- 1) Kijiyama N, Ueno H, Sugimoto I, Sasaguri Y, Yatera K, Kido M, Gabazza EC, Suzuki K, Hashimoto E, Takeya H.: Intratracheal gene transfer of tissue factor pathway inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:1113-9, 2006.
- 2) Takeya H, Gabazza EC, Aoki S, Ueno H, Suzuki K.: Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Blood.* 102:1693-1700, 2003.
- 3) Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Takeya H, Yasuda S, Ichikawa K, Tsutsumi A, Suzuki K, Koike T.: Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with beta(2)-glycoprotein I deficiency. *Blood.* 96:1594-5, 2000.

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H18-エイズ一般-003

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 教授）

分担研究者：小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、吉岡 章（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、天野 景裕（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、小林 英司（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター臓器置換研究部 教授）、小田原 隆（東京大学医科学研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 准教授）

1. 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、致命的な頭蓋内出血などの予防は不可能である。因子製剤は組み換え体を含め、かなりのレベルまで改善されたが、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、1) 血友病にcureをもたらす遺伝子治療と、2) インヒビタ対策3) 患者視点から血友病に関する諸問題の調査研究を目的に研究を展開する。遺伝子治療に関しては、技術の向上と安全性を目的とした基礎的検討をさらに展開し、臨床研究の準備と実施を目指す。インヒビタ対策は血友病マウスに誘導された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す。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する。

2. 研究方法

A. 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ベクター(AAV)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レンチウイルスの一種であるSIVベクター(SIV)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、そして、(II) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子導入し、体内に再移植する場合にはSIVV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を進める。(I) 筋肉細胞や血管内皮細胞にはAAV1を、肝臓を標的にする場合はAAV8とAAV9を選択した。さらに、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既感染による中和抗体測定系の改良を目指した。また、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に関してはサルとヒトのFIXを識別しうるモノクロナル抗体を利用して発現FIXを定量した。一方、血友病Aについては、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、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。(II) 血友病Aマウス由来骨髄幹細胞へ体外でSIVV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限局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。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。安全性確保のために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を検討した。又、次のステップとして、血友病Aマウスでの再現実験を開始した。臨床応用を念頭にSIVV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。又、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FVIIIKO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、再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、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。**B. 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。**C. 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)

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 霊長類医学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、厚生労働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。

3. 研究結果

A. 遺伝子治療：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。成熟肝細胞移植も着生し、短期間FVIII産生が確認された。

(I) 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量定量と、AAV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ヒトでの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量を著しく減らす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で発現因子に対するインヒビタは出現しなかった。そこで、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、門脈血流を遮断し、門脈内を生理食塩水で充満し、肝臓内血液を短時間遮断して、AAV 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るため、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。(II)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、凝固反応進行の場となる血小板膜表面に、血小板活性化に伴いFVIIaが移動し、止血に寄与していること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生産性向上のための至適プラスミド量やトランスフェクション細胞数が得られた。凍結融解やドライシッパー内での短時間安定性なども確認された。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。探索的研究の結果を次に示す：1) 相同組み換えによる遺伝子修復はFVIII KO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。2) プ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。B. 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APC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。C. 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30%にも及び、うち21%に後遺症が認められた。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。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。

4. 考察

A. 遺伝子治療：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、個体差はあるが筋肉、及び、肝臓で治療レベル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。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がサル由来であるために、AAV既感染による中和抗体が、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。ヒトでは免疫抑制剤使用は最小限にとどめたい。ベクターと血液を接触させないで肝臓へ遺伝子導入する技術を開発することが現時点で最も可能性の高い解決法であると考えられる。ヒトではサルより門脈血管が太いので、バルーンカテーテル操作で目的は達せられることが期待される。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を用いて、血小板にFVIIIやFVIIa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、大動物を用いた検討が進んでおり、その臨床応用も夢ではない。SIV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。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ことを期待される。B. 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。C. 調査研究：患者参加型のアンケート調査の解析

は慎重に進められており、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。

5. 自己評価

1) 達成度について

現在、血友病基礎研究では海外と差がないと考えている。世界的にも血友病遺伝子治療法開発はまだ初期段階であり、我々が先頭グループの一つとしてこれに貢献できる部分は大きい。サルを用いた血友病B遺伝子治療研究でも、正確な発現因子の定量は我々のモノクロナル抗体の利用なくしては不可能である。又治療レベルFIXの長期発現に成功しているのは世界的に我々を含めて3グループに留まる。AAV、及び、SIVを用いた遺伝子治療法も技術的にかなりの進展が見られ、まだいくつか解決しなければならない問題はありますが、昨年よりもさらに一步臨床研究開始に近づいたと信じる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

サルを用いた前臨床試験の一步前進、そして、血小板特異的なFVIII、及び、FVIIaの発現と止血メカニズムの解析、さらにその安全性の検討などは学術的にも評価が高く、国内外の評価も高い。患者さんのアンケートでも遺伝子治療に対する期待が圧倒的に高い。達成されれば、製剤の使用量も減り、QOL向上に最も貢献すると思われる。我々の血友病インヒビタ解析は独創的な仕事であり、世界的にも注目されている。この解析を基により効率的な免疫寛容法の開発につながることを期待される。医師、医療スタッフ、及び患者代表からなるグループにより作成されたアンケート内容は、多視点的であり、これまで把握できなかった患者病態や社会生活との関わりが明らかにされたと考えられる。今後、自由記載欄の解析なども含めた二次解析が進むことにより患者QOLを高めるための貴重な情報が得られることが期待できる。

3) 今後の展望について

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、濃縮製剤による代替治療が可能のため、治療の安全性については、必要十分な対策が必要である。AAV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基礎的検討が必要だと思われる。生体内投与方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方法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。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課題である。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予定である。アンケートによる患者QOL向上については、結果を解析し、明らかになった問題点を如何に解決していくかの検討を進める予定である。

6. 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が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なってきており、少しずつ克服されていくものと期待される。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、インヒビター症例に対する有効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。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

「血液凝固異常の治療方法」出願済み(未公開)

研究発表

主任研究者

坂田 洋一

- 1) 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. *Thromb Res.* (in press)
- 2) Ohmori T, Sakata Y.: Platelet-directed gene therapy. *Transfus Med Hemoth.* 34:429-439, 2007.
- 3) 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.
- 4) 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(3):531-6, 2007.
- 5) 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.
- 6) 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.

口頭発表

- 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: レンチウィ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

分担研究者

小澤 敬也

- 1) 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: 734-741, 2007.
- 2) Wang X.T, Liu P.Y, Tang J.B, Mizukami H, Xin K.Q, Ozawa K., Ushijima H.: Tendon healing in vitro: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. *Plast. Reconstr. Surg.* 119: 227-234, 2007.
- 3) Ideno J, Mizukami H, Takehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S, Ozawa K.: Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int. J. Mol. Med.* 19: 75-79, 2007.

吉岡 章

- 1) 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.* 85: 317-22, 2007.
- 2) 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.

- 3) 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.

口頭発表

- 1) Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Hisanaga M, Kanehiro H, Shibata M, Shima M, Y Nakajima Y, Yoshioka A.: 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
- 2) Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Hisanaga M, Kanehiro H, Shibata M, Shima M, Y Nakajima Y, Yoshioka A.: 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 柏田承吾、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.

長谷川 護

口頭発表

- 1) Mitomo K, Minoue M, Iwasaki H, Tabata T, Yoshizaki M, Nagashima N, Washizawa K, Fujikawa S, Akiba E, Geddes DM, Griesenbach U, Alton EFWF, Hasegawa M.: 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

天野 景裕

口頭発表

- 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) 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.
- 3) 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

小林 英司

- 1) Haga J, Wakabayashi G, Shimazu M, Tanabe M, Takahara T, Azuma T, Sato Y, Hakamata Y, Kobayashi E, Kitajima M.: In vivo visualization and partially repeated transplantation of bone marrow cells in rats with liver damage. *Stem Cells Dev* 16(2):319-327, 2007.
- 2) 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* 2008, Jan 15 : 103(1-2) 193-198, Epub 2007 Apr 18
- 3) Ohsawa I, Uemoto S, Kobayashi E, Murakami T.: Control of cyclosporine A-induced tumor progression using 15-deoxyspergualin for rat cardiac transplantation. *Transplantation* .84(3):424-428. 2007.

小田原 隆

- 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, Iwamoto A.: Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* in press

瀧 正志

- 1) 山崎 哲、鈴木典子、瀧 正志、他: Bethesda 法、Nijmegen 法およびその他の Bethesda 変法による第VIII因子インヒビター測定と比較検討、日本血栓止血誌（投稿中）

研究課題：抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif との結合領域および特性の解明と、その阻害化合物の検索

課題番号：H19 - エイズ - 若手 - 002

主任研究者：武田 哲（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2グループ 研究員）

1. 研究目的

今日の HIV-1 感染症の標準的な治療方法として多剤併用療法が定着し、疾病予後の改善に大きな成果が挙がってきている。しかし、HIV-1 が既存の薬剤に耐性を獲得したために十分な治療を行えない症例も多数存在し、深刻な問題になっている。さらに、個々の多剤併用療法の観点では、長期的治療ゆえに、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現を常に危惧しなければならない。このような困難を克服するためには、一つでも多く選択可能な、かつ既存のものとは交差しない治療薬剤を開発することが求められている

我々の体には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子 APOBEC3G（以下、A3G）が発現している。しかし、HIV-1 は、ウイルスタンパク Vif を感染細胞で発現し、A3G を細胞内より枯渇させ、宿主防御機構から逃れることができる。

本研究では、宿主の A3G の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行う。宿主の抗ウイルス因子である APOBEC3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、抗 HIV-1 薬剤を開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的とする。

2. 研究方法

A3G タンパクをバキュロウイルスの発現系を利用して発現し、酵素活性をもつ A3G を精製した。A3G と核酸あるいは Vif への結合実験には Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を、核酸結合特性の解析には Fluorescence Polarization Binding Assay (FPBA) と Single-Molecule DNA Stretching Assay (SMDSA) を行った。

（倫理面への配慮）

当研究は、遺伝子組換え実験を含むので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。またクラス3の病原体 HIV-1 を用いた実験を含む。このため、実験計画は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会に承認をえて同委員会の認可をえた実験者が同委員会の認定した実験室にて行なう。

3. 研究結果

(1) A3G と Vif タンパクの結合における生化学的な特性を決定した

A3G タンパクと核酸の結合は塩濃度に強く影響され、500 nM 以上の NaCl では解離反応が増加した。一方、Vif と A3G の結合には塩濃度による強い影響が認められなかった。EDTA による A3G の核酸への影響や Deaminase 活性への影響は認められなかったが、1,10-Phenanthroline (Zn キレーター) は両活性を強く阻害した (IC₅₀ = 3 mM)。このことから、A3G の Zn 配位は A3G の生化学的活性をもつための構造維持に重要であることが推測された。Mg 濃度と pH の影響は A3G の核酸および Vif に対する結合に関して認められなかった。これらの一連の結果よりライブラリスクリーニング用の *in vitro* 結合実験用 ELISA 系に必要な至適条件が分かった。

(2) 抗ウイルス作用メカニズムにつながる A3G の生化学的な特性の発見した

A3G が一本鎖核酸に結合した場合、HIV-1 の逆転写酵素の伸長反応を阻害する現象を見いだした。さらに、SMDSA により A3G の核酸への結合解離速度がかなり遅い特性を見いだした。A3G と逆転写酵素の結合が認められなかったことから、A3G は物理的に逆転写酵素のスライディングを阻害すると考察された。この現象が A3G の抗ウイルス作用の Deaminase-independent な分子メカニ

ズムであること提唱した。

4. 考察

最近、A3G と Vif の結合に重要な A3G の領域（アミノ酸配列上）が Malim らのグループによって報告された。現在、我々と共同研究を進めている Gronenborn のグループによるコンピューターモデルを用いた構造解析の結果から、その領域が A3G が核酸に結合に重要であると考えられる領域の近傍である結果が得られた。さらに興味深いことに、それらの領域が構造上 Zn フィンガー（ZnF1）にも近いことが分かった。我々の研究で得られた結果（Zn 配位が A3G の核酸結合と酵素活性に必須である）を加味すると、Vif が A3G に結合した場合、A3G に 2 通りの生化学的あるいは構造学的な変化がおりうる可能性が考えられる。すなわち、Vif が A3G の Zn 配位に、あるいは A3G の核酸結合部位に影響を与える（あるいは両方の）可能性である。本年度はこれらの可能性も検証しながら、構造学的／生化学的な結合特性を解析する必要があると考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

A3G の生化学的な特性を解析して行く中で、A3G の抗ウイルスメカニズムにつながる現象を見いだした。さらに、新規薬剤をスクリーニングするシステムに必要な至適条件結果が概ね得られ、次年度の目標であるケミカルスクリーニングのための ELISA 系の完成の目処がたったことから、本年度の目標は概ね達成した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究を行うことにより A3G と Vif の構造学的／生化学的な相互作用が明らかになると期待される。また、構造学的／生化学的な理解の深まりは両者を標的とした新薬開発に大きく貢献することが期待される。新規作用機序による抗 HIV 薬剤の実用化は、既存の抗 HIV 薬剤に対して多剤耐性 HIV を獲得した治療困難症例を救済することが期待される。多剤耐性症例だけでなく、新たな登場は薬の選択肢を増やすため、副作用を回避できるチャンスも高くなり薬剤治療者の負担軽減が期待される。さらに、従来の抗ウイルス剤にはない、宿主の生体防御機構を活用した作用機序をもつ薬剤開発という新たな分野にも道を広げることが期待できる。

3) 今後の展望について

本研究目標である Vif の A3G 結合阻害剤の探索は、

治療という実益面で有用だけでなく、学問的にもウイルス複製と宿主との相互作用を理解するうえでも重要な知見が得られると予測される。特に、次年度は構造学的なアプローチも加え、本題である A3G と Vif の結合特性やインターフェイスの詳細な解析に焦点を絞るために興味深い結果を得ることができることを期待している。さらに、本年度のように、阻害薬探索という目標だけにとらわれず、この一連の研究で得られる知見を展開して論文などにまとめあげるように心がけていく。

6. 結論

ウイルスの構成因子（逆転写酵素など）やその複製に必要な生体因子（ケモカインレセプターなど）を阻害する既存の抗 HIV-1 薬剤とは全く異なり、生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行っている。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新規抗 HIV-1 薬剤開発への新たな道を模索している。平成 19 年度は、初年度として A3G と Vif あるいは核酸への結合特性を生化学的に進め、ケミカルスクリーニングに必要な至適条件を見い出してきた。さらに、結合特性の解析の中で、A3G の抗ウイルス作用の分子メカニズムにつながる重要な現象も見いだした。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

研究発表

主任研究者

なし

研究課題：重篤な日和見感染症の早期発見と最適治療に関する研究

課題番号：H18-エイズ-一般-008

主任研究者：安岡 彰（長崎大学医学部・歯学部附属病院 教授）

分担研究者：照屋 勝治（国立国際医療センター 医長）、片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部 室長）、竹内 勤（慶応大学医学部 教授）、古西 満（奈良県立医科大学 准教授）、山崎 善隆（信州大学医学部附属病院 助教）、永井 英明（国立病院機構東京病院 医長）、堀場 昌英（国立病院機構東埼玉病院 医長）

1.研究目的

日本では HIV に伴う日和見感染症は増加の一途にあり、エイズ治療・研究開発センターなど専門施設から、一般病院へと診療の場を変えつつある。これに対応するため 1) HIV 合併日和見感染症の早期発見、2) 日和見感染症の適切な治療についての標準化、診断マーカーや新しい治療薬についての研究、3) 免疫再構築症候群の病態把握とその回避や対処法、などを検討し、一般病院への情報提供を行うことが重要となっている。本研究班は、日和見感染症の動向を継続して調査するとともに、重要な日和見感染症の早期発見の方法を確立し、免疫再構築症候群を考慮に入れた適切な治療を確立し、その情報発信も最終目標としている。

2.研究方法

本研究では重点項目として以下の点を中心に検討した。

1) 日和見感染症の動向と頻度の調査：1995 年以降の日和見感染症の全国動向データの集積に、本年度もさらにデータを積み重ねた。また本年度は HIV 感染者の悪性腫瘍も集計した。（安岡）

2) HIV 合併日和見感染症の早期発見：

a) 結核：結核の早期診断に用いられるようになってきた結核特異的インターフェロン γ 産生能検査（Quontiferon TB-2G; QFT）は、細胞性免疫不全である HIV 感染者での有用性はまだ明らかではない。HIV 感染者での使用適否について検討した。（永井）

b) 非結核抗酸菌症：HAART 療法の阻害因子としても本症は重要な疾患であることから、発症の背景と免疫再構築症候群として発症する因子について検討した。（照屋）

c) サイトメガロウイルス（CMV）：免疫再構築症候群として発症した患者の治療前のウイルス検出がマーカーとなるかどうかを検討した。（照屋）

d) 悪性リンパ腫：増加しつつある EB ウイルス非関連リンパ腫について、それ以外のウイルス感染との関連を検討した。（片野）

e) 原虫症：日本において診断が困難な AIDS 指

標疾患の一つであるクリプトスポリジウム症の、病原体の同定、遺伝子定量法について検討した。（竹内）

3) 日和見感染症の治療法・免疫再構築症候群への対処に関する研究：

a) 免疫再構築症候群：免疫再構築症候群の発症因子を明らかにするため、発症群と非発症群の臨床的背景の差を比較した。（古西）

b) ニューモシスチス肺炎（PCP）：昨年度の診断に引き続き、PCP の治療成績と治療薬の効果、副作用について検討した。（堀場）

c) 非結核抗酸菌症：抗酸菌を気管支上皮細胞内で増殖させる系を確立し比較的低濃度のクラリスロマイシンによる細胞内殺菌の効果を検討した。（山崎）

d) トキソプラズマ症：原虫特異的酵素で治療標的となる NTPase と PyKII についての構造解析をおこなった。（竹内）

（倫理面への配慮）

HIV 感染症の特殊性に配慮し患者のプライバシー保護には特段の注意を払った。日和見感染症の全国調査を行うに先立って長崎大学医学部・歯学部附属病院の倫理審査に諮り、承認を得て研究を行った。このほかにも臨床研究や臨床検体の採取と利用、患者個人へのアンケートなどを行う際には各倫理指針に従い、必要な場合は各施設で倫理委員会に諮って承認を得た上、文書及び口頭で患者に対して十分説明を行い任意の参加を得るよう徹底した。

3.研究成果

1) 日和見感染症の動向と頻度の調査：日和見感染症の全国調査を継続した。2005 年までの結果では日和見感染症は増加を続けており、初発疾患としてのニューモシスチス肺炎や結核、数ヶ月経過後の CMV 感染症や MAC 症の重要性が明らかとなった。また悪性リンパ腫やカポジ肉腫といった悪性腫瘍が急増していた。2006 年分について現在集計作業中であり、本年度は指標疾患以外の悪性腫瘍についても集計している。

2) HIV 合併日和見感染症の早期発見:

a) 結核: QFT は HIV 感染者の結核でも陽性となることが明らかとなり、これまでのツベルクリン反応などより有用性が高かった。また非結核 HIV 患者での QFT 陽性コントロールが陰性となる例はなく QFT は HIV 感染者でも結核の診断に使用できることが確認された。

b) 非結核抗酸菌症: 非結核抗酸菌症は HAART 時代になった後には過半数が免疫再構築症候群として発症していた。MAC 発症者は免疫改善作用が強い lopinavir 投与群で頻度が高かった。

c) サイトメガロウイルス (CMV): 免疫再構築症候群として発症した患者 3 例のうち 2 例では治療前のウイルスが検出されており、開始前での CMV ウイルスの検出および発症前投与を検討する余地が考えられた

d) 悪性リンパ腫: 悪性リンパ腫組織から EBV, HHV-8, HIV のほか CMV, HBV, HHV-6, HSV, TTV などのウイルスが検出され、非疾患部と比較しウイルス量が多い傾向が認められた。

e) 原虫症: リアルタイム PCR を用いたクリプトスポリジウム遺伝子の定量系を構築し、接種オースト数との相関が得られた。

3) 日和見感染症の治療法・免疫再構築症候群への対処に関する研究:

a) 免疫再構築症候群: 非発症 AIDS 群と比較して免疫再構築症候群を発症した群ではヘモグロビン、CD4 数、CD8 数、総蛋白の低値と HIV-RNA の高値が認められた。

b) ニューモシスチス肺炎 (PCP): ST 合剤による治療は全例有効であったが、副作用発現の頻度が高く、ステロイドホルモンや入院時 IgE 値と副作用出現には明らかな関連がなかった。

c) 非結核抗酸菌症: 1/4MIC と比較的低濃度のクラリスロマイシンによっても細胞内殺菌が亢進され、サイトカイン・ケモカインの産生が抑制されていた。このことはクラリスロマイシン予防投薬により免疫再構築症候群が抑制される可能性が示唆される結果であった。

d) トキソプラズマ症: NTPase と PyKII の構造解析を進めている。

4. 考 察

日和見感染症の動向は、増加傾向や発症時期による日和見感染症の違いが明らかになるとともに、疾

患様相が年々変化していることも明らかとなり、我が国唯一の疫学データとして貴重な成果が得られた。診断では結核症に対する新しいマーカである QFT が日本の HIV 感染者にも用いることができることが明らかとなり、また悪性リンパ腫発症に様々なウイルスが関与する可能性が示唆されるなど貴重な成績が得られた。

免疫再構築症候群の発症に低免疫、HIV-RNA の高値や、治療薬として lopinavir 投与の関連が明らかになるなど今後の治療方針に根拠となる成績が得られた。また発症予防のための非結核抗酸菌症に対するクラリスロマイシン、CMV 感染症のウイルス量測定による予防投薬などが方策となる可能性が示唆された。

5. 自己評価

1) 達成度について

日和見感染症の早期発見、新しい診断法や治療法の開発、免疫再構築症候群への対処など、成果が明らかとなり、研究 2 年目として予定していた内容を達成できていると考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米諸国とは異なる、日本の HIV 感染症に伴う日和見合併症の動向や、問題点について全国集計、アンケート、その他の検討によってデータを集積しており、国内では他で得られない貴重なデータが集積されたと考えている。

3) 今後の展望について

抗 HIV 療法が長期にわたるようになり、日和見感染症の様相も変化してきていることが明らかになり、また QFT など新しい診断法や免疫再構築症候群への対処法に関する示唆に富むデータの集積など本研究を継続し、新たな問題点を検討する必要がある。さらに本研究で得られた知見を加え、一般診療担当者への情報提供も今後積極的に行っていきたい。

6. 結 論

重篤な日和見感染症の早期発見と最適治療に関して、現在問題となっている疾患や症候群に対する病態の解析や対処法について明らかにした。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特記事項なし。

研究発表

主任研究者

安岡 彰

- 1.安岡 彰. エイズ(HIV 感染症)の肺病変. 呼吸器疾患最新の治療 2007-2009. 2007. 380-384.
- 2.安岡 彰. サイトメガロウイルス. 今日の治療指針 2007. 2007. 170-171.
- 3.安岡 彰. 遺伝子検査 12)感染症 (14)原虫. 臨床検査 増刊号. 2007. 51:1537-1539.
- 4.安岡 彰. 針刺しに関わる基礎知識. 感染対策 ICT ジャーナル. 2007. 2:249-253.
- 5.安岡 彰. 真菌感染症診療の実際. 深在性真菌症～SFI Forum～. 2007. 3:30-31.

分担研究者

片野晴隆

- 1.Ishak Mde, O., Martins, R.N., Machado, P.R., de Souza, L.L., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Katano, H., Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A.C., and Ishak, R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. *J. Med. Virol.*, 79: 1537-1544, 2007.
- 2.Katano, H., Sato, Y., Hoshino, S., Tachikawa, N., Oka, S., Morishita, Y., Ishida, T., Watanabe, T., Rom, W., Mori, S., Sata, T., Weiden, M., and Hoshino, Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 9: 1581-1589, 2007.
- 3.Kuhara, T., Yoshikawa, T., Ihira, M., Watanabe, D., Tamada, Y., Katano, H., Asano, Y., and Matsumoto, Y. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 144: 79-85, 2007.
- 4.Ueno, T., Mitsuishi, T., Kimura, Y., Kato, T., Hasegawa, H., Katano, H., Sata, T., Kurane, S., and Kawana, S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. *Eur. J. Dermatol.*, 17: 539-540, 2007.

竹内 勤

- 1.Saito T, Maeda T, Nishi M, Hashimoto H, Wu B, Roos DS, Takeuchi T, Asai T. A Novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* is targeted to both the mitochondrion and the apicoplast. *J. Biol. Chem.*, 2008 (in press)
- 2.Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Differences in protein profiles of the isolates of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) ProteinChip assays. *Parasitol Res*, 2007, 102, 103-110.
- 3.Tachibana H, Cheng XJ, Kobayashi S, Okada Y, Itoh J, Takeuchi T. Primary structure, expression and localization of two intermediate subunit lectin of *Entamoeba dispar* that contain multiple CXXC motifs. *Parasitol*, 2007, 134, 1989-1999.
- 4.Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T. Profiles of a pathogenic *Entamoeba histolytica*-like variant with variations in the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA isolated from a primate (De Brazza's Guenon). *J Zoo Wild Life Med*, 2007, 38, 471-474.
- 5.Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, Kawamura A, Nakamura K, Takeuchi T, Tanabe M. An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell*, 2007, 129, 617-631.
- 6.Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimiura T, Takeuchi T, Ishizaka A. Serum indicator for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*, 2007, 131, 1173-1180.

古西 満

- 1.Shigeki Hoshino, Binlian Sun, Mitsuru Konishi, Mari Shimura, Tatsuya Segawa, Yoshiaki Hagiwara, Yoshio