

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究
(H18-エイズ一般-003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21 (2009) 年 3 月

研究代表者 坂 田 洋 一
(自治医科大学)

目 次

I. 総括研究報告

- 血友病の治療とその合併症の克服に関する研究 _____ 1
(自治医科大学 坂田洋一)

II. 分担研究報告

1. 血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、血友病遺伝子治療の
基礎実験 _____ 13
(自治医科大学 坂田洋一、三室 淳、窓岩清治)
2. AAVベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験 _____ 20
(自治医科大学 小澤敬也、水上浩明)
3. 血友病 (マウスおよびイヌモデル) の遺伝子治療および成熟肝細胞・ES細胞を
用いた細胞治療 _____ 23
(奈良県立医科大学 嶋 緑倫)
4. カニクイザル肝臓に対する経門脈的遺伝子導入方法の確立 _____ 26
(自治医科大学 小林英司)
5. 遺伝子治療用サル免疫不全ウイルス (SIV) ; SIVベクターの基本性能・生産性
データの取得 _____ 29
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 長期頻回の第Ⅷ因子製剤投与歴にもかかわらず、手術を契機としてインヒビター
を発生した血友病A症例の解析 _____ 33
(東京医科大学 天野景裕)
7. 遺伝子治療の臨床試験を行うための治験病院の体制および血友病患者の
HCV・HIV感染症の検討 _____ 39
(東京大学医科学研究所附属病院 小田原 隆)
8. 血液凝固異常症のQOLに関する研究 _____ 43
(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 49

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

血友病の治療とその合併症の克服に関する研究
研究代表者 坂田洋一 自治医科大学 教授

研究要旨

血友病患者の QOL 向上を目指し、次の 3 つのプロジェクトを進めた：(I) 血友病遺伝子治療、(II) 血友病インヒビター対策、(III) 患者実態解明のための調査研究。

(I) 遺伝子治療 血友病患者に cure をもたらす遺伝子治療は、不慮の出血を防げる、高価な血液製剤の使用量を減らすことが出来るなどの理由により、大きな期待が寄せられている。遺伝子を、生体内臓器に直接導入する場合はアデノ随伴ウイルスベクター(AAVV)、そして、体外で自己幹細胞に導入し、これを体内に移植する場合には、数年以内に九州大学眼科で臨床応用に利用される予定の SIVagm 由来ベクター(SIVV)を用いた。これまでのマウスを用いた血友病遺伝子治療の成果を基礎に、非ヒト霊長類カニクイザルを用いて、臨床研究開始に向けた、前臨床研究を精力的に展開した。サルにはこれまでに血友病は同定されていない。また、サルとヒトでは凝固第 VIII 因子(FVIII)、第 IX 因子(FIX)とも極めて相同性が高い。そこで、サルでの実験は遺伝子導入による発現因子をいかに定量するかが、キーポイントになる。幸い、FIX については、ヒトとサルの因子を識別して認識しうるモノクロナル抗体を作製し得たので、これを用いて、サル FIX 発現実験を先行して進めた。AAV8V を用いて、プロモータを工夫して肝臓での発現を意図した。FVIII の肝臓での発現もマウスでの結果からは基本的に同様の技術で可能と思われる。本年度は、FVIII のモノクロナル抗体を組み合わせて、発現 FVIII の測定系の感度上昇を図った。FIX 遺伝子の導入と発現は、既感染によると思われる AAV8 に対する中和抗体の有無により左右されることが昨年までの検討で明らかであったので、ヒトへの投与方法選択を念頭に、まず測定系の感度上昇を図った。中和抗体測定法では、糖類を細胞感染時に加えることで、また結合抗体測定法では AAV8V の精製レベルを上げることで、著明な感度上昇が図れた。本年度はこの測定系を用いて、あえて抗体陽性のサルを選択して、抗体を含む血液と接触しない形でベクターを投与することで、治療レベル FIX の発現を持続させる技術を確認した。安全性には導入後の時間経過も重要な要素となる。特に安全性に問題なく、導入した 3 頭に既に数ヶ月から年余にわたる発現が維持されている。抗体価が零に近いサルには末梢静脈から AAV8V に搭載した FIX 遺伝子を導入した。導入障害はなく、治療レベル因子発現が確認された。SIVV を用いて、血液幹細胞に FVIII 或いは FVIIa 遺伝子を導入し、血小板に特異的な GPIIb α プロモータを用いて血小板に発現させることで止血に著明な効果が見られることは既に報告した。SIVV のウイルスという側面から見た危険性は第三世代化を始めとする改変でほぼ完全に除かれている。また SIVV の産生効率、保存安定性なども急速に改善され、臨床応用できるレベルのベクターに近づきつつある。しかし、染色体への random integration の危険性は残る。この危険性を回避するためにインシュレータの検討を昨年から進めている。トリ β グロビン由来のインシュレータは世界的に汎用されているが、我々の例では enhance 効果抑制には効果が見られたが、silence 効果の抑制には無力であった。そこで GPIIb α 遺伝子近傍の sequence から GPIIb α 特異的インシュレータを探索した。いくつかの候補を同定し、現在検討中である。

遺伝子治療の安全性を更に高めるために以下のような探索的検討も引き続き進めている。1) 遺伝子治療発現因子の止血効果を見ることを意図した血友病 A クローンブタの作製は最終段階に入っ

ている。2)血友病 A マウス血液間葉系幹細胞の相同組み替えによる遺伝子修復も成功した。3) 成熟肝細胞やマウス ES 細胞の移植、血管内皮前駆細胞へ FVIII 遺伝子を導入し、これを体内に戻して FVIII 発現を試みた実験など細胞移植を中心とした遺伝子治療では、一定の効果は得られたが、免疫の問題、テラトーマ発生の問題など今後の検討課題も明らかになった。

II)マウス胸腺内へ直接 FVIII を投与して誘導される免疫寛容の特異性とメカニズムの解析を更に進めた。インヒビター陽性患者に大量長期に FVIII を投与し、免疫寛容を誘導することが臨床応用されている (ITI 治療)。FVIII を投与し、インヒビターを誘導した血友病 A 成熟マウスの皮下にマイクロポートを埋め込み、間欠的に長期に製剤を投与することで ITI モデルを作製することにほぼ成功した。今後詳細な解析を進める予定である。

(III) 調査研究 本年度は自由記載欄を、文字解析に有用なコンピュータソフトウェアを用いて解析した。記載者の年代別にキーワードを検討した結果、それぞれの年代特有の意見が存在することが明らかになった。

分担研究者：

自治医科大学遺伝子治療研究部

教授 小澤敬也

奈良県立医科大学小児科学教室

教授 嶋 緑倫

自治医科大学臓器置換研究部

教授 小林英司

ディナベック株式会社

代表取締役社長 長谷川 護

東京医科大学臨床検査医学講座

講師 天野景裕

東京大学医科学研究所附属病院

講師 小田原 隆

聖マリアンナ医科大学

教授 瀧 正志

A.研究目的

血友病は X 染色体上に存在する FVIII、或いは FIX 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。出血時に濃縮因子製剤を投与する care 中心の医療が現在行われているが、致死的な不慮の出血を防ぐことは出来ない。因子製剤は利便性、安全性とも格段に改良されたが、未だ夾雑物混入や中和抗体 (インヒビター) 産生の問題は残る。患者の QOL を高めるために、(I) 血友病遺

伝子治療、(II) 血友病インヒビター対策、そして (III) 血友病関連の社会的問題について、患者視点から作成したアンケート調査の解析を進めた。本年度は、遺伝子治療に関しては、臨床研究に向けた具体的な準備と、安全性向上に向けた研究を展開した。インヒビター対策は胸腺の関与する血友病免疫寛容誘導の特異性を検討するとともに、臨床応用されている大量、長期因子製剤投与による免疫寛容誘導 (ITI) モデルを血友病マウスで作製することを目的に検討した。調査研究では、コンピュータソフトウェアを用いて患者自由記載欄の解析を進めた。

B.研究方法

(I) 遺伝子治療：臨床研究開始を意識したサルを用いた遺伝子治療実験と、開始に必要な検査の確立、そしてヒトに投与可能レベルのベクター調達方法を検討した。更に、安全性の一層の向上を目指した探索的研究も精力的に展開した。臨床研究は、まず、治療ベクターとして、治療レベル量では染色体への組み込みが殆ど起こらず、非分裂細胞にも導入可能な AAV を選択した。さらに、次の一手として、治療の永続性を考慮して、宿主のサルにも病原性を持たないレンチウイ

ルスの一種で、既に第三世代化を始めとしたウイルスの危険性を除去した SIVagm ベクター（数年以内に九州大学医学部眼科で臨床応用に利用予定）を選択し検討した。そして、安全性を考慮して、1)体内臓器に直接遺伝子導入を図る場合には AAVV を、2)体外で幹細胞に遺伝子導入し、これを移植する場合には SIV ベクター(SIVV)を利用した。

1) 本年度は、肝臓を標的に AAV8V を用いて肝臓特異的プロモータを利用して、サル肝臓での FIX 発現とその持続を検討した。昨年、腸間膜静脈よりベクター投与したところ、サルの AAV8 既感染により生じた中和抗体が、微量でも、肝臓への遺伝子導入を著しく阻害することが明らかとなった。そこで本年は、まず、抗 AAV8 中和抗体、および結合抗体測定法の感度上昇を図るための様々な検討を重ねた。そして、新規測定法で抗 AAV8 抗体の存在するサルと、存在しないサルを同定し、それぞれに異なる方法(a. 抗体を含む血液に接しない条件で、直接、門脈からベクターを導入する。b. 末梢静脈からベクターを導入する)でベクターを導入し、発現を観察した。一方で、ヒト投与可能レベルの AAV8V 作製を依頼するためにいくつかの企業と折衝した。

2) 血友病 A マウスより幹細胞を採取し、これに FVIII 或いは FVIIa 遺伝子を SIVV を利用して導入し、血小板特異的 GPIb α プロモータを用いて血小板に発現させると、たとえインヒビターが存在しても著明な止血効果が見られることは報告した。SIVV は、臨床応用に向けて、生産効率を上げるための生産細胞検討と、ベクターの安定性

試験を種々の方法で検討した。染色体への random integration による発癌などの危険を抑制するためにはインシュレータの利用を検討している。汎用されているトリ β グロビン由来インシュレータは、enhance 効果は抑制するが、silence 効果の抑制が見られないことが明らかとなり、GPIb α 遺伝子周辺を検索し、各種動物で保存されている領域を中心に、プロモータへの影響や、トリ β グロビンを対照とした競合実験などで特異的なインシュレータの検索を進めた。

3) 探索的研究としては、遺伝子治療発現 FVIII の止血効果を確認するためのモデルとして、ヒトに近いとされる血友病 A ブタの作製をクローン技術を利用して検討した。更に血友病 A マウスから間葉系幹細胞を分離し、その FVIII を相同組み替えにより修復することを検討した。

(II) インヒビター対策：本年度は胸腺への FVIII 製剤導入による免疫寛容誘導の特異性解析を進めた。また、製剤投与によりインヒビターを産生させた血友病 A 成熟マウスにマイクロプレートを皮下に埋め込み、間歇的に長期製剤投与することで寛容を誘導するモデルの作製を検討した。

(III) 調査研究：本年度は自由記載欄記述をテキスト型データ解析ソフトウェアである WordMiner を用いて解析した。

倫理面への配慮

本研究は、全体を通して、治療の効率の探求とともに、安全性に重点を置いて進めていく。遺伝子治療については、ヒトに対して病原性を持たない改変ウイルスベクターを利用して遺伝子導入法の開発とその応用を目指したものであり、周辺環境及び実験

従事者の安全性に関して倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号）を遵守して施行する。各種動物を用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の十分な配慮など）を含めて厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び各大学の動物実験指針規定に沿って行う。霊長類医科学研究センターとの共同研究として独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで実施する予定のサルの実験では、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験ガイドライン」及び霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。臨床研究を実施する場合は、厚生労働省の倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）に従い被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して、人権を保障しながら適正に実施する。また、学内審査委員会及び必要な場合は国レベルでの審査を経た上で実施する。疫学調査に関しては疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）を遵守して施行する。

C. 研究結果

- (1) 遺伝子治療: 昨年 AAV1V を用いて、筋肉内に FIX 遺伝子を導入したサル 3 頭は、半年後からは免疫抑制薬なしで、安全性にも問題なく、既に 2 年近く、治療量の FIX 発現が維持さ

れている。昨年、腸間膜静脈より AAV8V を用いて肝臓へ FIX 遺伝子を導入したところ、1 頭に高発現が得られた(既に 1 年以上発現が持続している)が、他の 2 頭は投与初期から全く発現が見られなかった。この原因が、サルの AAV8 既感染による微量の中和抗体にあることを昨年報告したが、これまで、世界的に使用されている中和抗体測定系が感度の点で使用に満たないものであることが明らかになった。中和抗体測定法では培養細胞へベクターを感染させる時に、細胞障害を惹起しないレベルの糖類を培地に加えることで、感染効率が飛躍的に増強することが明らかになり、感度を著しく高めることが可能になった。また、結合抗体法ではプレートにコーティングする AAV8V の精製レベルをカラムを用いて一ランク上げることで、感度を高められることも明らかになった。ヒトでも高率に抗体陽性例が存在することが予測される。そこで、新規開発測定系を用いて抗体陽性サルをあえて選択して実験を施行した。サルでは血管が細くて、後述する市販のバルーン付きマイクロカテーテルを利用できないため、開腹して、肝門部を明らかにして、ブルドック鉗子、血管留置針などを用いて、門脈血遮断、生食で洗浄、そして門脈内へ AAV8V を用いて直接 FIX 遺伝子を肝臓へ導入した。短時間後に血流を再開し、手術を終えた。実際のヒトへの投与にはバルーン付きマイクロカテーテルを用いて門脈まで誘導し、血液に接しない条件でベクターを投与する。投与サルは、初期から

20%近いFIXの発現が2ヶ月以上持続している。肝機能にも殆ど異常は見られなかった。免疫抑制薬も遺伝子導入後4週間投与だけでほぼ十分であることが明らかになった。次に、抗体陰性サルに末梢静脈よりAAV8Vを利用して、FIX遺伝子を肝臓に導入したところ、導入阻害は見られず、これも1ヶ月以上治療レベルFIXの発現が持続している。SIVVの生産性比較には293細胞、293T細胞、または、293T/17細胞にEGFP搭載ジーントランスファプラスミド、第3世代パッケージングベクター、VSVGプラスミド、Rev発現プラスミドをトランスフェクションし、functional titer測定を行って検討した。293細胞に比べ、293T細胞、293T/17細胞は約400倍効率が良かった。RNA titerもほぼ同様の結果であった。安定性検討では4℃で10時間、ドライシッパー内意で約1週間functional titerが保たれることが明らかになった。安全性の観点からは、SIVV利用により動物に腫瘍誘発の報告はこれまでにない。我々の血小板へ血友病因子を発現させる実験でもこれまでに既に数百匹のマウスを用いて検討しているが遺伝子導入による癌化例はない。しかし、更に安全性を担保するために、インシュレータ利用の検討を2年前より開始した。トリβグロビンのインシュレータ効果はsilence効果に無効であることが明らかになったので、GPIIb遺伝子周囲の配列をマウス、ラット、ヒト間で比較し、推定保存領域からC1,C2,C3,C4の4配列をクローニングし、GPIIbα上流にそ

れぞれを挿入しルシフェラーゼ発現によるレポーターアッセイを施行した。インシュレータ効果発揮には、DNA塩基配列にCTCFというDNA結合タンパク質の結合が必要であると報告されている。そこでゲルシフトアッセイにより、トリβグロビンインシュレータ領域のCTCF結合に対する阻害活性を検討した。結果、C1領域が候補として選択され、現在その効果を検討中である。

探索研究では、ブタ胎児線維芽細胞のFVIII遺伝子組み換え(KO細胞)の作製に成功し、現在血友病Aクローンブタ作製の最終段階へと歩を進めている。

相同組み換えによる遺伝子修復は血友病Aマウスからの間葉系幹細胞を用いた*ex vivo*実験では可能になった。効率上昇のための検討を現在進めている。

- (II) インヒビター対策：胸腺内FVIII製剤投与により寛容誘導されたマウスのCD4⁺CD25⁺T細胞が、FVIII刺激によるインヒビター産生を特異的に抑制することが明らかになった。またこの寛容誘導は生後4日目投与までは可能性のあることが明らかになった。FVIII製剤を皮下に埋め込んだマイクロポートより持続的に長期間投与することで、インヒビター産生マウスに免疫寛容が誘導できるITIモデルが得られた。
- (III) 調査研究：解析を各世代毎に分けて進めたところ、10・20代では(保護者の意見も含む)血友病の理解、医療費助成、治療法進歩などのキーワードが多く、30代になると、生活や仕事への不安の記載が多くなった。

40歳代以降では、関節痛、インヒビターに関するものの頻度が高くなった。HIV感染に関しては、10歳代以下の患者家族からは、エイズに対する偏見が、成人以降ではHIV治療薬副作用に関する意見が多かった。

D. 考察

AAV8Vを用いた肝臓を標的にした血友病B遺伝子治療は、ヒト投与可能レベルのAAV8Vが出来れば、技術的には可能なレベルにある。条件を満たすAAV8Vの作製に関しては、国内外の複数の企業にこれまで、また本年度も打診したが、パテントが海外にあるという理由で良い返事はもらえなかった。しかし、本年度、ディナベックから予算さえ付けば作製可能であると確約を得た。数千万円になるが、具体的に予算化を考えて、臨床研究を開始したいと考えている。開始するための施設としては、自治医科大学血液内科とし、システム構築は東京大学医科学研究所の例を習って早急に組み立てる予定である。全国レベル遺伝子解析も順調に進んでおり、これに開発した抗AAV8抗体測定系を用いて、投与法の検討をすることで、患者選択も進むと考えられる。抗AAV8抗体回避投与方法技術の確立の意味は、大きい。染色体に組み込まれないAAVVを利用する以上、長期的には細胞分裂による効果減弱は避け得ない。しかし、抗体が存在しても治療可能ならば、同じベクターの繰り返し投与が出来る為、必ずしも、染色体組み込みベクターを用いて永続治療をはからなくても、長期発現維持が可能になる。血友病Aについても、マウスで見ると、肝臓からのFVIII発現分泌が見られる故、同様の技術で進めることは可能であると考えられる。しかし、サルでの測定系が確立次第、サルで確認、或いは血友病A

クローンブタを用いて効果と安全性を確認した上で臨床研究に入ることを予定している。二度と被害を起こさないという金科玉条を胸に安全性には最大限の努力を払わねばならない。そのために、相同組み換えによる遺伝子修復や、染色体のAAVS1領域に特異的に組み込むなど、安全性では優れているが、効率面ではまだ劣っている方法の効率アップの為のbreakthroughを図っていききたい。

一方、SIVVを用いて、血液幹細胞に血友病因子を導入し血小板に発現させて、血小板を因子運搬体に用いる方法は、止血効率、インヒビター対策という両面から極めて魅力的な方法である。SIVVが数年以内に九州大学眼科での遺伝子治療に利用されると言うことから、その安全性を始めとするヒト投与可能ベクターとして確立するための研究が加速度的に進むことが期待される。我々の、インシュレータを利用した安全性向上の試みも一定のレベルに達してきており、実験動物種をヒトに近づけて確認し、臨床研究へ歩を進めうる基盤を作りたいと考えている。また、LAM-PCR法などによる組み込み部位の解析を通して、安全性向上を更に一歩進めることも必要な研究であると考えられる。

インヒビター研究は、胸腺にFVIIIを投与することで、寛容誘導期間が生後4日間に延長可能となった。フランスのグループから臨床応用の話もあり、今後の検討課題の一つとしたい。ITIモデル作製に成功した。寛容誘導のレスポンスに個体毎に差があることが、明らかになり、その差が何に由来するか、今後、リンパ節、脾臓由来細胞を用いた解析を進めていく予定である。また、早期に寛容誘導困難を明らかに出来るマーカが求められれば、高価な製剤を大量用いて施行するITIにおける経済効果も大きい。

ただ、長期実験期間（マウスで1年くらい）を要し、しかも高価な製剤を用いる実験なので、実験規模や解析時期に限界があり、長い目で見た根気強い支援が必要であろう。患者中心アンケートを元にした、自由記載欄解析は、解析論理も難しく、さらに、アンケート回収の数が少なかったこともあり、極めて困難であったことが予測される。しかし、定型のアンケートでは得られない情報を集積できる可能性もあるため、まず回収率をいかに上げるかを検討して、再度、論理を整理してチャレンジする価値はあると考える。

E. 結論

AAV8 ベクターを用いて、肝臓を標的にした血友病 B 遺伝子治療は技術的には、臨床研究開始が可能となった。ヒト投与可能ベクター調達も目安が立ったが、作製のための予算と時期が開始時期を決める重要なファクターである。但し、安全性を更に確保するための研究は今後とも、精力的に進めることが重要である。血友病 A 遺伝子治療も技術的には差はないものと思われる、SIV ベクターを用いた血小板への血友病因子発現を利用した遺伝子治療も、SIV ベクターが実際に九州大学眼科で臨床利用される計画が進み始めたことからにわかに現実味を帯びたものになった。染色体に組み込まれるベクターであることから例えばインシュレタを用いた安全性の確認が我々の班の果たすべき課題である。インヒビター対策は、ITI モデルが作製出来たことから、ITI 臨床応用に有用な情報が今後得られることが期待される。

患者中心のアンケート調査解析は一区切りが付き、一定の成果が得られた。政策提言に役立つ情報を整理することが今後の課題

である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Hakamata Y, Dokai M, Makino N, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y: Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost*. Feb 13, 2009 (Epub ahead of print)
2. Ohmori T, Yano Y, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Is thrombogenesis related to residual platelet function in ischaemic heart disease? Reply. *Eur Heart J*. 2008 Oct 25. [Epub ahead of print]
3. Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Mitomo K, Suzuki H, Hasegawa M, Mimuro J, Sakata Y. Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol Ther*. 16(8):1359-65, 2008.
4. Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells Toward an Area of Brain Infarction. *Stroke*. 39(12):3411-7, 2008.
5. Yano Y, Ohmori T, Hoshide S, Madoiwa S, Yamamoto K, Katsuki T, Mitsuhashi T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J*. 29(14):1729-38. 2008.
6. Yamaguchi M, Ohmori T, Sakata Y, Ueki M. Oligo(tyrosine sulfate)s as heparin pentasaccharide mimic: evaluation by surface noncovalent affinity mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*. 15;16(6):3342-51. 2008.
7. Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y,

- Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y: Unbalanced Expression of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Mouse Endotoxemia. *Thrombosis Res.* (122):91-97, 2008
8. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther (in press)*
 9. Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H., Takayama, T., Ohwada, M., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. *Mol Cancer Ther* 7: 704-11, 2008.
 10. Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med* 10: 368-74, 2008.
 11. Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, SI., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. *Mol Ther* 16: 474-80, 2008.
 12. Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J Biol Chem.* 2008 Dec 1. [Epub ahead of print]
 13. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol.* 143: 409-20, 2008
 14. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Sakurai Y, Matsumoto T, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Selective factor VIII and V inactivation by iminodiacetate ion exchange resin through metal ion adsorption. *Br J Haematol.* 142: 962-70, 2008
 15. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation.* 86: 167-70, 2008.
 16. Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 106-10, 2008.
 17. Kasuda S, Kubo A, Sakurai Y, Irion S, Ohashi K, Tatsumi K, Nakajima Y, Saito Y, Hatake K, Pipe SW, Shima M, Yoshioka A. Establishment of embryonic stem cells secreting human factor VIII for cell-based treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 6: 1352-9, 2008.
 18. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost.* 99: 883-91, 2008.
 19. Uchida Y, Sakurai Y, Ogiwara K, Chiyonobu T, Higuchi B, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Successful management of Mallory-Weiss syndrome in a haemophilia A patient with inhibitor by recombinant activated factor VII. *Haemophilia.* 14: 841-3, 2008.
 20. Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Biochim Biophys Acta.* 1784: 753-63, 2008.
 21. Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, Yoshioka A, Shima M. Identification of a thrombin-interactive

- site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol.* 140: 433-43, 2008.
22. 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. 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会. インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン. *日本血栓止血学会誌.* 19, 520-539, 2008.
 23. 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. わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査 予後因子に関する検討. *日本血栓止血学会誌* 19: 140-153, 2008.
 24. Miyazaki M., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Goto Y., Kohno R.I., Murakami Y., Inoue M., Ueda Y., Hasegawa M., Tobimatsu S., Sueishi K. and Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *J. Gene Med.* 10(12): 1273-1281, 2008
 25. Murakami Y., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Onimaru M., Nakagawa K., Kohno R., Miyazaki M., Hisatomi T., Nakamura M., Yabe T., Hasegawa M., Ishibashi T. and Sueishi K. Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am. J. Pathol.* 173(5): 1326-1338, 2008.
 26. 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸: 血友病. 染色体遺伝子検査の分かりやすい説明ガイドラインII, 日本染色体遺伝子検査学会, 東京, 2008年
 27. 照屋勝治, 岡慎一, 福武勝幸, 天野景裕, 古谷茂之, 林邦彦, 真崎夕美子, 木村哲: リアルタイム PCR 法による HIV-1 RNA 定量キットコバス TaqMan HIV-1「オート」の検討. *感染症学会雑誌* 82(1):20-25, 2008
 28. 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: わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査—予後因子に関する検討—. *日本血栓止血学会誌* 19(1):140-153, 2008
 29. 天野景裕: 抗 HIV 療法ガイドライン. *治療学* 42(5):501-505, 2008
 30. 天野景裕: HIV 検査関連項目 新臨床検査項辞典, 監修: 櫻林郁之介、熊坂一成, 医歯薬出版, 東京, 2008年
 31. 白幡聡, 嶋緑倫, 岡敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡章: 国内のインヒビター保有血友病患者における遺伝子組み換え活性型凝固第VII因子製剤(注射用ノボセブン®)の高用量単回投与に関する臨床研究. *日本血栓止血学会誌* 19(2):244-256, 2008
 32. 大瀧学, 稲葉浩, 篠澤圭子, 藤田進, 天野景裕, 福武勝幸: 第XIII因子遺伝子の Large deletion を病因とする先天性第XIII因子欠損症の解析. *臨床病理* 56(3):187-194, 2008
 33. 松下正, 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, 田中一郎, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫: インヒビターのない血友病患者の急性出血, 処置・手術における凝固因子補充療法のガイドライン. *日本血栓止血学会誌* 19(4):510-519, 2008
 34. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫: インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン. *日本血栓止血学会誌* 19(4):520-539, 2008
 35. 稲葉浩, 矢富裕, 篠澤圭子, 鈴木隆史, 天野景裕, 福武勝幸: 軽症血友病Aから検出される第VIII因子 R531H 変異の第VIII因子活性とその特徴. *日本血栓止血学会誌* 19(6):788-795, 2008
 36. 天野景裕: II. 診断 2. 検査所見. みんなに役立つ血友病の基礎と臨床,

- 編：白幡聡、医葉ジャーナル、東京、2009年、p117-126
37. 天野景裕：C. 血栓・止血2. 凝固異常の臨床。臨床病理レビュー特集第142号「臨床検査Yearbook 2009 血液検査編」。臨床病理刊行会、東京、2009年 p99-105.
 38. Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, Okada S. Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol.* 87:442-443, 2008.
 39. Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao FG, Iwamoto A. Highly restricted TCR repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS.* In press.
 40. 瀧 正志：血友病に対する一次定期補充療法の動向、日小血会誌、22(3):173-178, 2008
 41. 立浪 忍、三間屋純一、白幡聡、花井十伍、仁科豊、大平勝美、桑原理恵、浅原美恵子、瀧 正志：本邦のHIV感染血友病におけるHIV/AIDS関連の集計数、日本エイズ学会誌、10(3):131-136, 2008.10
 42. S. Tatsunami, J. Mimaya, A. Shirahata, J. Zelinka, I. Horova, J. Hanai, Y. Nishina, K. Ohira, M. Taki: Current status of Japanese HIV-infected patients with coagulation disorders: coinfection with both HIV and HCV, *Int J Hematol.* 88:304-310, 2008
 43. M. Taki, A. Shirahata: Current situation of regular replacement therapy (prophylaxis) for haemophilia in Japan, *Haemophilia.* 2009, 15:78-82
 44. 瀧 正志：血友病インヒビターの産生と制御、臨床検査、52(13):1593-1597, 2008.12
 45. 白幡 聡、酒井道生：インヒビター保有患者の治療、バイパス製剤をめぐる最近の話題 日小血会誌 22(3)：167-172, 2008 酒井道生、白幡 聡：血友病Aの凝固因子補充療法とEBM、血液フロンティア、18(9):51-61, 2008
 46. 堀越泰雄、三間屋純一：血友病の包括医療と患者会との連携、日小血会誌 22(3)：188-198, 2008
 47. 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20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(研究代表者 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) 2009.2印刷中
- 学会発表
1. 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、山中一央、土海桃子、青木慎也、大森 司、窓岩清治、坂田洋一：異常第VIII因子遺伝子正常化による血友病A遺伝子治療の試み。第31回日本血栓止血学会学術集会、2008.11/20-22 大阪。
 2. 大森 司、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉栄治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：クロマチンインスレーター挿入による安全性を高めた血小板への遺伝子導入法。第31回日本血栓止血学会学術集会、2008.11/20-22 大阪。
 3. 青木慎也、柳川芳江、原田修二、山本哲也、坂田洋一、勝村成雄、五十嵐靖之:N,N,N-トリメチルスフィンゴシン類縁化合物によるFVIIa活性の阻害効果 第31回日本血栓止血学会学術集会 2008.11/20-22 大阪
 4. 大森司、石渡彰、柏倉裕志、窓岩清治、鈴木英紀、見供克之、長谷川護、三室淳、坂田洋一：血小板への活性化型血液凝固第VII因子の発現による血友病遺伝子治療 第70回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
 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、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類モデルにおける血友病B遺伝子治療の基礎的検討 第70回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
 6. 水上浩明、八木洋也、三室淳、石渡彰、窓岩清治、卜部匡司、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也：AAVベクターを用いた遺伝子導入法と免疫反応 血友病Bに関する検討を中心に 第70回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
 7. 原陽子、卜部匡司、伊藤孝幸、水上浩明、三室淳、坂田洋一、久米晃啓、小澤敬也：AAVを利用した第19番染色体AAVS1領域特異的遺伝子組込み法導入遺伝子の発現期間に関する検討

- 第 70 回日本血液学会総会
2008.10/10-12 京都
8. Amano K., Katoh H., Ogata K., Seita I., Nishida Y., Fukutake K: Matrix metalloproteinase(MMP)-3 is not effective for evaluating hemophilic arthropathy. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 9. Shinozawa K., Hanabusa H., Kinai E., Suzuki T., Amano K., Fukutake K: Severe factor VII deficiency caused by compound heterozygous mutation (Tyr68Cys and newly 1-bp deletion). XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 10. Suzuki T., Yamamoto Y., Koh A., Otaki M., Seita I., Tamura A., Fujita S., Amano K., Kagawa K., Nishida Y., Fukutake K: Idiopathic alveolar hemorrhage in a patient with hemophilia B. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 11. Otaki M., Amano K., Seita I., Kamamoto H., Moriyasu F., Fukutake K: Management of intra-arterial embolization therapy for a severe haemophilia A patient with inhibitor. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 12. Takedani H., Amano K.: Establishment of the conventional NovoSeven pulse infusion system. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 13. Shirahata A., Shima M., Oka T., Amano K., Hanabusa H., Taki M., Mimaya J., Matsushita T., Takamatsu J., Higasa S., Kosaka Y., Suga K., Sakai M., Kajiwara M., Takata N., Yoshioka A: Results of clinical study for single/high dose treatment by recombinant activated factor VII in Japan. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
 14. 高橋陽子、鈴木隆史、天野景裕、高橋友美、高橋かおり、久野浩史、市川喜美子、須永和代、福武勝幸: 当院における輸血関連インシデント報告について. 第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会、2008 年、福岡
 15. 天野景裕、福武勝幸: 初期研修医の輸血教育を救命救急センター研修開始時に施行する試み. 第 40 回日本医学教育学会大会、2008 年、東京
 16. 川原千香子、天野景裕、佐々木博一、本間宙、太田祥一、行岡哲男、宮城学: 院内 AED 使用の現状と検証結果の検討—院内蘇生教育効果から—. 第 36 回日本救急医学会総会学術集会、2008 年、札幌
 17. 篠沢圭子、天野景裕、今西大介、宮崎泰司、朝長万左男、松本智子、稲葉浩、嶋緑倫、福武勝幸: FVPro1618Arg と IVS7+5G>C: 先天性第 V 因子欠乏症の新しい複合ヘテロ接合体変異. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年、大阪
 18. 篠沢圭子、稲葉浩、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸: 血友病の分子病態の進歩と臨床応用の展望. 血友病の遺伝子解析の現状と今後の課題. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年、大阪
 19. 篠沢圭子、天野景裕、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、稲葉浩、福武勝幸: 遺伝子解析による血友病 B の保因者診断で生じた問題の検証と課題. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、2008 年、名古屋
 20. 四本美保子、天野景裕、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、西田恭治、香川和彦、山元泰之、福武勝幸: HIV 陽性者における慢性腎臓病の有病率とその背景. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
 21. 関根祐介、横張敦子、辻真理子、穴戸紀与、佐藤由利子、金子亜希子、中村薫、明石貴雄、鈴木隆史、天野景裕、西田恭治、山元泰之、福武勝幸: 抗 HIV 薬における簡易懸濁法の検討. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
 22. 四本美保子、山元泰之、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、西田恭治、天野景裕、香川和彦、福武勝幸: HIV-1RNA 測定法のリアルタイム PCR 法への変更に伴う問題点. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
 23. 稲葉浩、篠沢圭子、清田育男、大瀧学、

- 藤田進、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸：日本人軽症血友病Aの原因となるミスセンス変異では Tyr473Cys が高頻度に検出される。第70回日本血液学会総会、2008年、京都
24. 篠沢圭子、鈴木隆史、天野景裕、稲葉浩、福武勝幸：シグナルペプチドに検出した先天性第Ⅶ因子欠乏症のミスセンス変異(L48P)。第70回日本血液学会総会、2008年、京都
 25. 清田育男、天野景裕、篠沢圭子、稲葉浩、大瀧学、鈴木隆史、福武勝幸：頻回の第Ⅶ因子製剤投与歴にもかかわらず術後にインヒビターが発生した血友病Aの1成人例。第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年、大阪
 26. Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Koga M, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Contribution of Gag-specific CD8+ T cells to HIV control in a population lacking HLA-B57/27. Keystone Symposia: HIV Immunobiology. Infection to immune control. Keystone. Mar 2009.
 27. 遠藤宗臣、前田卓哉、鯉淵智彦、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。抗HIV療法中のHIV-1感染者に発症した自己免疫性膵炎の1例。日本感染症学会、2008年、島根
 28. 中山香、立川愛、小田原隆、藤井毅、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。日本ウイルス学会、2008年、岡山
 29. 小田原隆。ガイドライン改訂を踏まえた抗HIV療法の導入。日本エイズ学会、2008年、大阪
 30. 鯉淵智彦、中村仁美、菊地正、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。HAART 導入時に急性肝障害を生じ、1ヶ月後にHBe抗体陽性となったHBVキャリアの1例。日本エイズ学会、2008年、大阪
 31. 古賀道子、宮崎菜穂子、前田卓哉、中村仁美、鯉淵智彦、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。HAARTによるHIVウイルス量抑制の時代変遷について。日本エイズ学会、2008年、大阪
 32. 中村仁美、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。超多剤耐性患者における新規抗HIV薬 Etravirin, Darunavir, Raltegravir の併用効果。日本エイズ学会、2008年、大阪
 33. 菊地正、鯉淵智彦、片寄智規、小柳津直樹、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。特異な経過を辿り診断に難渋した結核による免疫再構築症候群の1例。日本エイズ学会、2008年、大阪
 34. 鯉淵智彦、中村仁美、菊地正、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。HAART を施行した HIV/HBV 重複感染者 13 例の解析。日本エイズ学会、2008年、大阪
 35. 古賀道子、立川(川名)愛、小田原隆、岩本愛吉。日本人集団においてHLA多型性が慢性感染期血中HIV-1ウイルス量に与える影響の解析。日本エイズ学会、2008年、大阪

H.知的財産権の出願・登録状況

- (1)「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)
状態：出願中(未公開)(2005/10/28)
- (2)「RNAウイルスのスパイクタンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」(D4-A0510)
状態：出願中(未公開)(2005/10/28)

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、
血友病遺伝子治療の基礎実験

研究者 坂田洋一 自治医科大学 教授
三室 淳 自治医科大学 准教授
窓岩清治 自治医科大学 講師
大森 司 自治医科大学 講師

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療: In vivo へのベクターの直接投与には染色体への組み込みがほとんどおこらない AAV ベクターを用い、ex vivo にて細胞へ遺伝子導入し再移植するときには染色体への組み込みが必要であるため SIV ベクターを用いることとしている。これまで、血友病イヌでの検討を視野に入れ、種々のプロモーターの下流にイヌ FVIII 遺伝子を搭載したベクターを作製し、血友病 A マウスで発現を検討したところ、AAV8 ベクターと強力な肝臓特異的な HCRHAAT-プロモーターを用い肝臓に限定してイヌ FVIII を発現させることで、イヌ FVIII 活性を免疫抑制なしに正常イヌ FVIII 活性の 100%以上に保つことができた。一方、ヒト FVIII はマウスにおける血液半減期が極めて短く血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、AAV8 ベクターと HCRHAAT-プロモーターを用いることで血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を 50-100%に維持することが可能となった。中型血友病 A モデルの自然発症血友病イヌ (奈良県立医科大学より自治医科大学に導入済み) を用いた FVIII 発現実験を行うことを遂行中である。また、よりヒトに近い種属の血友病モデル動物の作製も成功しつつある。さらに、血友病 A マウスを用い、FVIII 遺伝子の異常を是正する検討では、血友病 A マウスより樹立した間葉系幹細胞の FVIII 遺伝子異常を相同組み換えにより是正できた。非ヒト霊長類のカニクイザルを用いた血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うことを目的としてカニクイザル FVIII 遺伝子をクローニングし、その発現を in vitro と in vivo において検討した。野生型カニクイザル FVIII と tag 付加カニクイザル FVIII とも良好な発現と生物学的活性を有し、血友病 A マウスにて長期発現が得られた。完全長 FVIII と導入遺伝子由来の B 領域欠如型 FVIII を識別するための検出方法を確立でき、測定感度を高める検討を行っている。今後はカニクイザルをもちいて FVIII 発現実験を行う予定である。SIV ベクターを用いて血液幹細胞へ FVIII 因子遺伝子を導入し GPI b α プロモーターを用い血小板へ特異的に FVIII を発現させることで血友病マウスの出血症状を改善しえ、さらに、活性化型 FVII 因子を血小板に発現させることで血友病 A マウスの全血凝固が改善し、インヒビター陽性血友病マウスでも尾切断後の死亡率も改善しえた。トリグロピン HS4 インスレーターを SIV ベクター-U3 に組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。血友病 B 遺伝子治療: ヒト FIX 特異的モノクローナル抗体で検出可能な変異カニクイザル FIX (FIXT262A;262 位の Thr を Ala に置換) を発現する AAV1 ベクターを 3 頭のカニクイザル骨格筋に投与することで変異カニクイザル FIX の血液レベルを 4-40%で長期間維持することが可能であった。マウスで 100%以上の FIX 発現をえることができる AAV8 ベクターをサルに末梢静脈あるいは腸間膜静脈枝から投与したところ、中和抗体陰性の 3 頭では治療レベルの導入遺伝子由来 FIX 発現が得られた。しかし、サルに既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価でも存在するサル 4 頭では血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。抗 AAV8 中和抗体が存在するカニクイザルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を 3 頭のサルにて試み、治療域に達する FIX 発現がえられた。腸間膜静脈枝からの AAV9 ベクター投与群は 2 頭と少ないが、1 頭においては 20%前後と治療域に達する FIX の発現が得られた。

インヒビター対策: ヒト FVIII はマウスに発現させると短期間に中和抗体が生ずるが、ある週齢のマウスにおいては胸腺に直接にヒト FVIII を投与することでヒト FVIII に対する免疫寛容を誘導することができた。また、マイクロポートインジェクションシステムを用いてヒト免疫寛容誘導法のマウスモデルを確立しえた。

A. 研究目的

血友病は X 染色体上に存在する血液凝固第 VIII、(FVIII) 或いは IX 因子(FIX) 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。定期補充療法でも致死的な頭蓋内出血や障害性出血を防ぐことはできない。恒常的凝固因子レベルを上昇させることで、これらの出血を防ぐことが出来る次世代の治療として血友病遺伝子治療の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

血友病 A 遺伝子治療: 免疫系による排除の問題はあるが遺伝子導入効率を考慮するとウイルスベクターの使用が現実的と考えられる。ウイルスベクターとしては、染色体への組み込みが殆ど起こらず、非分裂細胞にも導入可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと、非分裂細胞に導入可能でサルやヒトに病原性の報告のないアフリカミドリザルから単離したレンチウイルス由来 SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合は AAV ベクター、そして、(II) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する場合には SIV ベクターを用いた。AAV ベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があるが、発現効率向上と臓器特異性を高めるために 4.5kb の FVIII 遺伝子においても種々のプロモーターを検討した。SIV ベクターへトリ SH4 インスレーターを組み込み遺伝子導入細胞の

増殖への影響を検討した。サルの実験ではヒト FIX に対して、抗体産生が見られたために、サル型 FIX 遺伝子をクローニングし、発現 FIX の定量的同定を目的の一部をヒト型に改変した遺伝子を作製し検討した。さらにサル第 VIII 因子遺伝子をクローニングしベクターへ搭載しマウスを用いて発現実験を行った。

B インヒビター対策: 胸腺組織を標的とし、*ex vivo* 遺伝子導入細胞の胸腺組織への移植による MHC クラス I およびクラス II 分子を介する免疫寛容誘導、マイクロポットインジェクションシステムを用いたヒト免疫寛容誘導療法のマウスモデル作製、そしてウイルスベクターによる免疫寛容誘導の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚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。

C. 研究結果

血友病 A 遺伝子治療：これまで、血友病イヌでの検討を視野に入れ、AAV8 ベクターに HCR-HAAT プロモーターを組み合わせることで、低用量のベクター投与によってもイヌ FVIII を血友病 A マウスに発現させ 100%以上に保つことができた。また、一方、ヒト FVIII はマウスにおける血液半減期が極めて短く血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、高用量のベクターを用いることで血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を正常の 50%以上に上昇させることが可能となった。ヒトでの血友病 A 遺伝子治療臨床研究でも FVIII 遺伝子導入後に FVIII に対し新たにインヒビターを発生する可能性がある。ヒト FVIII は血友病 A マウスに対して免疫原性が強く、インヒビターを高頻度で発生することから、血友病 A マウスを用いて検討したところ、ヒト FVIII 遺伝子導入時のヒト FVIII に対するインヒビター発生抑制にも成功した。SIV ベクターを用いて血液幹細胞へ FVIII 因子遺伝子を導入し GPI b α プロモーターを用い血小板へ特異的に FVIII を発現させることで血友病マウスの出血症状を改善しえ、さらに、活性化型 FVII 因子を血小板に発現させることでも

血友病 A マウスの全血凝固が改善し、インヒビター陽性血友病マウスでも尾切断後の死亡率も改善しえた。トリグロビン HS4 インスレーターを SIV ベクター U3 に組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。中型血友病 A モデルの自然発症血友病イヌを用いた FVIII 発現実験を行うことを目的としてベクターを複製し、血友病 A イヌを奈良県立医科大学より導入した。また、よりヒトに近い種属の血友病モデルブタの複製を進めている。非ヒト霊長類のカニクイザルを用いた血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うことを目的としてカニクイザル FVIII 遺伝子をクローニングし、その発現を *in vitro* と *in vivo* において検討した。野生型カニクイザル FVIII と tag 付加カニクイザル FVIII とも良好な発現と生物学的活性を有し、血友病 A マウスにおいても 10%以上の活性が維持された。内在性カニクイザル FVIII と導入遺伝子由来のカニクイザル FVIII を識別するための検出方法を構築でき、測定感度のアップを検討中である。さらに、血友病 A マウスを用い、FVIII 遺伝子の異常を是正する検討では、血友病 A マウスより樹立した間葉系幹細胞の FVIII 遺伝子異常を相同組み換えにより是正できた。

血友病 B 遺伝子治療：ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部に対して

は抗体産生が見られなかったので、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るようにした。この変異カニクイザル FIX を発現する AAV1 ベクターをカニクイザル骨格筋に投与することで3頭において変異カニクイザル FIX の血液レベルを 4-40% で長期間維持することが可能であった。しかし、マウスで FIX レベル 1000% 以上の発現をえることができる第 IX 因子遺伝子搭載 AAV8 ベクターをサル末梢静脈あるいは腸間膜静脈枝から投与したところ3頭において治療域 (5-20%) の FIX 発現が得られた。しかし、既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価であっても存在するサルに、同ベクターを腸間膜静脈枝から投与しても期待レベルの FIX の発現は得られなかった。AAV8 ベクターによる遺伝子導入を阻害する低力価の中和抗体が存在するカニクイザルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を試み、サル3頭において 10% 前後の FIX 発現がえられた。AAV9 ベクターを用いた FIX 遺伝子導入実験は2頭に実施し1頭においては20% 前後と治療域に達する FIX の発現が得られた。血友病モデル動物として遺伝子改変マウスと自然発症血友病イヌがあるが、いずれもヒトとの種差は大きい。凝固学的にブタがヒトに近縁であることを考えク

ローン技術を用いて血友病ブタを作製中である。現時点では第 VIII 遺伝子組み換え体細胞を確立でき核移植実験を遂行中である。間葉系幹細胞を用いた遺伝子異常の正常化実験では、血友病 A マウス由来細胞の第 VIII 因子遺伝子異常の是正が確認できた。

マウスにおいては、GPIIb α プロモーター搭載 SIV ベクターで遺伝子導入した骨髄細胞を移植することで血小板特異的な発現をえることができた。血小板に FVIII を発現させると、血漿中に血小板刺激依存性の FVIII 抗原が出現し、血友病 A マウスの尾切断後の死亡率が有意に改善した。また、外因系凝固カスケードのイニシエーターである活性化型血液凝固 VII 因子 FVIIa を血小板特異的に発現させることにより血友病 A マウスの全血凝固能と尾切断後の死亡率が有意に改善した。この効果は FVIII 因子に対するインヒビターを作成した血友病 A マウスにおいても出血症状の改善を認めた。

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

は、胸腺内非投与マウス由来 APC 共存下で第 VIII 因子刺激に対して増殖活性を示さず、IL-2、IL-12 および IFN- γ も産生しなかった。胸腺内投与マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞は、第 VIII 因子刺激に対する胸腺内非投与マウス由来 CD4⁺T 細胞の増殖を抑制した。この抑制効果はナイーブマウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞ではみられなかった。血友病 A マウスに対して、経皮経頭静脈的にカテーテル先端を上大静脈に留置し、背部皮下にマイクロポート本体を植え込む方法を導入することにより、安全で再現性のある手術技法を確立し、血友病 A マウスに対して、FVIII 投与量や投与間隔を変えることにより、免疫寛容誘導が成立するマウスが得られた。新生仔血友病 A マウスへヒト FVIII 遺伝子搭載 AAV ベクターを投与することで抗体の産生を防ぐことができた。また FVIIa を血小板に発現させる試みもインヒビター対策になると思われる。

D. 考察

AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。インスレーターを SIV ベクターに組み込むことで遺伝子組み込みによる周辺遺伝子への影響を抑えることができることが示唆され、SIV ベクターの安全性を高められると考えられた。しかし、ヒト応用には、これらの成果の中型動物での実験と、サルでの長期安全性の検討

が必要と考えられる。しかし、ヒト応用には、中型動物での実験とサルでの長期安全性の検討が必要と考えられる。しかし、サルは種々の AAV に既感染のことが多く、中和抗体が存在するためサルの利用は容易ではないが、AAV 抗体測定法の改良によりこの問題も解決されつつある。AAV8 に対する低抗体価のサルで、選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液と接しない形でサル肝臓にベクターを投与する投与方法の検討では、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められた。既感染に基づく AAV に対する中和抗体による遺伝子導入抑制はヒトにおいても同様な問題であるが、その解決方法の手がかりがえられた。血友病 B 遺伝子治療に関してはサルをもちいた前臨床実験が行えているが、血友病 A 遺伝子治療実験はマウスを用いた実験にとどまっている。今後は自然発症血友病イヌが導入されたので、実験を遂行する予定である。さらに中型血友病モデル動物が作製できつつある。解決すべき問題点は明らかになっており、血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うために、導入遺伝子由来サル第 VIII 因子の検出系を確立しつつある

インヒビター対策としてウイルスベクターによる肝臓への遺伝子導入や胸腺を標的とした免疫寛容誘導により一定の成果がえられた。さらにヒト免疫寛容誘導療法のモデルも確立しえたことから、今後の方向性が明らかとなっ

たことから、今後の方向性が明らかとなった。
また、FVIIa の血小板への遺伝子発現はインヒ
ビター治療の方法となりえると考えられる。

E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投
与する方法においても又体外で遺伝子を導入
した細胞を移植する方法でも効率の面ではマ
ウスレベルでは確立出来た。しかし、安全性確
保のための十分な基礎的実験はなお必要であ
る。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗
体を持つサルが殆どであるために治療レベル
に達する第 IX 因子発現がえられているが、現
時点ではマウスでの成績に匹敵する結果が得
られていない。これらの問題点が明らかにされ、
技術的にも克服可能となってきている。インヒ
ビターに対する免疫寛容誘導法に関しては新
生児では一定の成果が得られたが、成人に対す
る有効な治療の確立が今後の課題である。

F. 研究発表

論文発表

1. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Kobayashi, E., Hakamata, Y., Dokai, M., Makino, N., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost.* Feb 13, 2009 (Epub ahead of print)
2. Ohmori T, Yano Y, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Is thrombogenesis related to residual platelet function in ischaemic heart disease? Reply. *Eur Heart J.* 2008 Oct 25. (Epub ahead of print)
3. Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y,

Madoiwa S, Mitomo K, Suzuki H, Hasegawa M, Mimuro J, Sakata Y. Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol Ther.* 16(8):1359-65, 2008.

4. Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells Toward an Area of Brain Infarction. *Stroke.* 39(12):3411-7, 2008.
5. Yano Y, Ohmori T, Hoshide S, Madoiwa S, Yamamoto K, Katsuki T, Mitsuhashi T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J.* 29(14):1729-38, 2008.
6. Yamaguchi M, Ohmori T, Sakata Y, Ueki M. Oligo(tyrosine sulfate)s as heparin pentasaccharide mimic: evaluation by surface noncovalent affinity mass spectrometry. *Bioorg Med Chem.* 15:16(6):3342-51, 2008.
7. Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y: Unbalanced Expression of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Mouse Endotoxemia. *Thrombosis Res.*(122):91-97, 2008

学会発表

1. 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、山中一央、土海桃子、青木慎也、大森 司、窓岩清治、坂田洋一：異常第 VIII 因子遺伝子正常化による血友病 A 遺伝子治療の試み。第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008.11/20-22 大阪。
2. 大森 司、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉栄治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：クロマチンインスレーター挿入による安全性を高めた血小板への遺伝子導入法。第 31 回日本血栓止血学会学術集会、