

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

研究分担者 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 本年は院内で臨床研究の不備を指摘された事例があったことを契機に、臨床試験の支援体制の見直しが行われ、臨床試験の安全な実施のために、第三者的な視点で試験のモニターをできる院内体制があることの重要性が再確認された。現場の問題に対応する multidisciplinary なチームとあわせ、常に検証を加えながら改善を図っていくシステムが構築されていることが、臨床試験の実施に向けて望まれる。

日本人集団における HLA 多型と HIV 慢性期のウイルス量との相関を網羅的に調べたが、単独でウイルス量に大きな影響を持つ HLA アレルは見つからなかった。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期進行との相関に関し、さらに時間的な推移の要素をも加えた解析をしていくことが必要と考えられた。

A. 研究目的

A) 血友病の遺伝子治療を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医療体制が必須となる。そのためには、①臨床試験を推進・支援する病院の体制、ならびに②血友病患者の病態をトータルに把握して治療にあたる現場の体制、の両者の整備が必要と考えられる。我々は、臨床の現場から、これらの点を検討することを目的とした。①に関しては、治験病院としての体制作りを行ってきた東大医科研病院の体制を検証することで、望ましい支援体制のあり方について提言していく。②に関しては、血友病患者の関節手術をモデルに、HIV・HCV感染症などの複合した問題を抱えた患者の手術を安全に行うための臨床現場の体制を検討していく。

B) 非加熱血液製剤により血友病患者に感染した HIV は、抗ウイルス治療が可能とはなったものの、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。日本人の血友病 HIV 感染者は海外の報告に比し死亡率が低いとされ（立浪ら J. AIDS res. 2008）、CCR2, RANTES, IL-4 などの遺伝子多型の関与が推測さ

れている。我々は、昨年、日本人集団での頻度が極めて高い HLA-A24（7 割近くの日本人が保有）が、ウイルス量や病態進行に関係していないかどうかを、血友病群と最近の性感染群との比較で検討したが、影響は見られなかった。本年は、さらに他の HLA 多型の影響に関しても網羅的な解析を行った。

B. 研究方法

A) 患者同意の確認がされずに臨床研究が行なわれていたとされる事例が院内であったことから、改めて臨床研究の倫理体制を見直し、院内支援体制の問題点を検証した。

血友病関節症の手術を受ける患者をサポートする臨床チーム内で昨年策定した「手術の安全施行のための免疫能ならびに肝機能の評価基準」を用い、実際に手術症例を重ねるなかで、変更が望まれた点を再検討し、基準の改訂を行った。

B) 東大医科研病院に 1995 年以降 2006 年 9 月までに通院歴のある HIV 感染者 391 人のうち Informed Consent の得られた 141 人の未治療者を対象として、患者が持つ HLA 遺伝子型と

HIV-RNA 量（慢性期で変動の少ない1時点を採用）との相関を解析した。

（倫理面への配慮）

臨床データの解析にあたっては、臨床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

A) 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きた。ところが、2008年7月に、東大医科研病院で行われた観察研究に患者の同意なく行われていたものがあつたとする新聞報道があり、それを受けて、我々は臨床研究の倫理体制を抜本的に見直す必要に迫られた。その結果分かったことは、上述した治験・TRの体制に関しては、TRを支援する臨床試験推進室があり、施行の実際をTRコーディネーター (TRC) がモニターする体制が整備されていたが、観察研究についてはそのような支援・モニター体制がなかったことから、医師がうっかり患者同意を得たものと勘違いして研究を進めてしまっていたという実態であった。医科研病院では、この分析のもと、治験ではない臨床研究に対しても研究倫理支援室を設置して、支援やモニターにあたる方針となつたが、すでに整備を重ねてきた治験の支援・モニター体制に関しては、改めてその重要性・妥当性が再認識される結果となつた。とりわけ、第三者的な視点で治験の不備がないかどうかをモニターできる院内の体制があることが、臨床試験が問題なく遂行されるうえで重要であることが確認された。

臨床現場においては、multidisciplinary なスタッフで構成するチームが血友病患者をトータルに把握して医療を行う体制を整えてきており、手術を安全に遂行する目的で昨年策定した免疫能・肝機能の評価基準に沿い、実際の手術希望例の検討を重ねてきたところ、血小板数の基準は厳しすぎるものが指摘され、また、リスクを説明したうえで患者本人の意思を尊重すべきであると考えられるケースも生じた

ことから、これらの点を改訂した。今後も実際の症例に即した検討・改善を繰り返し、より良質な体制作りを行っていく。

B) HLA-A*2402を保有するか否かでHIVの慢性期ウイルス量 (VL) に対する影響はやはり認められなかったが、B*0702の保有者は非保有者よりVLが低く、また、B*5401やCw*0102の保有者ではVLが高い傾向にあつた。しかしながら、欧米でVLの抑制や病態進行の遅延と強い相関を有することが証明されているHLA-B27やB57は日本人のほとんどが持っておらず、そのような明瞭なHIV抑制効果との相関が認められるHLAアレルは、今回の網羅的な解析でも見つからなかった。

D. 考察

A) 臨床研究に際して倫理的不備を指摘された事例が、院内で現実に生じたことから（幸い患者に不利益が生じる事例ではなかったが）、臨床試験が適切に遂行されるためにどのような体制が重要であるのかを改めて検証することが出来た。東大医科研病院がこれまで進めてきた治験体制の構築は適切なものと考えられ、とりわけ、第三者的な視点で試験に不備がないかどうかをモニターできる院内体制が存在することが重要であることを再確認した。

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作りも、実際の手術症例での検討を加えることにより、改善をはかることができた。肝臓を標的としたベクターを用いて遺伝子治療を行う際の適応判断にも役立つと考えている。また、症例に即して基準の見直しを多数のスタッフの目で行っていくことで、高いQualityの患者ケアが可能となると考えられた。

B) 日本人の6~7割はHLA-A*2402を保有しており、特定のHLAアレルの頻度が極めて高い。最近の国内で流行しているHIVは、このHLAに拘束されるCTLからエスケープしたウイルスとなっていることから、HLA-A24を持つことが病態の進行を速める可能性が考えられたが、血液製剤で感染した血友病患者と最近の性感染者との比較検討を行った昨年の解析結果では、HLA-A24の有無によるVLやCD4数への影響は見

られなかった。今年度は他の HLA 多型も含めて網羅的に慢性期 VL と HLA アレルとの相関を検討したが、全体を通じて VL 抑制との明確な相関が認められた HLA アレルはなかった。欧米でウイルス抑制と最も高い相関が証明されている HLA-B27 や B57 は日本人のほとんどが持っていないアレルだが、B27/B57 に準じて VL 抑制との相関が証明されているいくつかのアレルは日本人も保有しているので、それらの HLA アレルとウイルス量抑制との相関を時間的な変化も合わせてさらに詳細に解析していく必要がある。そうすることで、2007 年の報告書でも強調していた「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気進行との相関」に関して、さらに明らかにしていきたい。

E. 結論

本年は院内の臨床研究の不備を指摘された事例があったことを契機に、臨床試験の支援体制の見直しが行われ、臨床試験の安全な実施のために、第三者的な視点で試験の不備がないかどうかをモニターできる院内体制があることの重要性が再確認された。臨床現場の multidisciplinary なチームによる医療とあわせて、常に検証を加えながら改善を図っていくシステムが構築されていることが、試験実施に向けて望まれる。

日本人集団における HLA 多型と HIV 慢性期ウイルス量との相関を網羅的に調べたが、単独でウイルス量に大きな影響を持つ HLA アレルは見当たらなかった。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気進行との相関に関しては、さらに時間的な推移の要素も加えた解析をしていくことが必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, Okada S. Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol*. 87:442-443, 2008.
- ・ 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.

2. 学会発表

海外

- ・ 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.

国内

- ・ 遠藤宗臣、前田卓哉、鯉渕智彦、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、鳥根
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 鯉渕智彦、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
- ・ 古賀道子、宮崎菜穂子、前田卓哉、中村仁美、鯉渕智彦、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
- ・ 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
- ・ 菊地正、鯉渕智彦、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
- ・ 鯉渕智彦、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

・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

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

血液凝固異常症の QOL に関する研究

研究分担者：瀧 正志（聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科学教授）

研究要旨

本研究は、日本全国の血液凝固異常症における生活状況を調査し、現在何が問題となっているのか、また、その QOL を改善するためには何が必要なのかを把握することを目的として行われた。平成 20 年度は、調査用紙の自由記載欄に形式自由で記載された回答を統計学的に分析し、そこに記された種々の意見を集約し、定量的に解析することを目的とした研究を中心に行った。その結果、形式自由で記載された回答をテキスト型データの解析手法により分析する方法が有効であることが判明した。詳細は、「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」に記載した。

A. 研究目的

本邦における血友病等の血液凝固異常症における QOL（生活の質）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。さらに、1970 年代末から 1980 年代前半に引き起こされた非加熱凝固因子製剤による HIV 感染により、疾患に対する偏見・差別などの社会的問題も存在している。

そこで、日本全国の血液凝固異常症における生活状況を調査し、現在何が問題となっているのか、また、その QOL を改善するためには何が必要なのかを把握することを目的として本研究は行われた。

2008 年度（平成 20 年度）においては、特に調査用紙の自由記載欄に形式自由で記載された回答を分析し、そこに記された種々の意見を集約し、定量的に解析することを目的とした研究を行った。

B. 研究方法

1. 対象および方法

1.1 解析方法

調査票の自由記載欄に書かれた意見をテキスト型データとして扱い、テキスト型データ解析用のソフトウェアである WordMiner（Version 1.150）によって解析した。

今般の調査では自由記載欄の記載方法に全く制限をつけなかったため、無記入のものから長大なものまで、多種多様の回答があり、単一の回答者による記載の中に、明らかに複数の意見が併記されている例もあった。そこで、今般はおおよそ 100 語程度を 1 つの単位とし、1 つの意見ごとに 1 件のデータとして取り扱うこととした。

自由記載欄に記載があった 304 枚の回答用紙から、555 件の意見をテキストデータ化し、WordMiner 中の日本語処理機能によって品詞分解した。品詞分解の結果型化は、555 件の入力データとして扱い、数値分類法の手法による解析をおこなった。これにより、記載された意見の集約と類型化を試みた。

（倫理面への配慮）

調査の実行に関しては、その用紙および調査方法と、集計手順に関して聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会の審査を受け、許可を取得した。

とくに、個人情報の取り扱いに関しては慎重に配慮し、この調査では氏名あるいはそのイニシャルなどは回答項目とせず、また、生年月日に関しても調査時点の年齢のみを回答して頂くこととした。したがって、今般の分担研究で構築したデータベースは、すべて完全に匿名化されているものである。

C. 研究結果

2.1 自由記載欄に記載された文字と単語

自由記載欄への回答があった304件の記載された文字は合計52929文字（句読点、記号等を含む）であった。すなわち、自由記載の回答には1人平均174文字が使用されていた。使用された単語（品詞分解後の語）の総数は1145語と集計され、555件の意見はこれらの単語の出現数を要素とする入力変数として扱った。

自由記載回答の555意見中で、最も出現頻度が高かった単語は「血友病」で136個の意見中で使われていた。ついで、「子・子供」、「治療」、「病院」、「病気」、「不安」の順で高頻度に使われていた。なお、「子」／「子供」／「子ども」あるいは「Dr」／「医者」などはそれぞれ同一語として数えた。

2.2 意見のクラスター分類

555件の意見を単語の出現頻度を要素とする入力変数としてクラスター分析を行い、50個のクラスターに分類した。なお、この50個のクラスターを大分類すると、治療法に関するもの、医療制度に関するもの、医療体制に関するもの、社会・生活に関するもの、病状に関するものの5つに集約され、これらに含まれないその

他の意見は約3%であった。

分類されたクラスターの中で、その中に含まれる意見の件数が30件以上、すなわち占有率が5%以上の大きなクラスターは7つであった。最大であったものは、64件の意見を含んでおり、血友病に対するより一層の理解を希望する記述が多かったが、医療制度やその他のことに関する親の立場としての記載が含まれていた。2番目に大きなクラスターは62件の意見を含んでおり、経口薬や持続時間の長い薬剤の開発といった治療法の進歩への期待が主な内容であった。3番目のクラスターは44個の意見を含む医療制度に関するもので、このクラスター内の記載はほぼ一貫して公的負担の切り捨てに対する不安であった。4番目に占有率が高いクラスター（意見数34）は2つあり、1つは遺伝する疾患としての血友病の悩みや不安が中心で、他方は関節の痛みや出血に関するものであった。6番目と7番目に大きなクラスターは33件と31件の意見から構成されており、それぞれ、生活・仕事への不安と、医療体制に関する記載がまとまっていた。

記載された意見と、回答者の年代との関係をみると、10歳未満の患者をもつ保護者の記載中では、「血友病への理解」、「治療法、注射・製剤の進歩」、「通院・かかりつけの病院」といった内容が最も多く、10歳代と20歳代（保護者の意見も含む）では「治療法、注射・製剤の進歩」、あるいは「血友病への理解」、「医療費助成制度」という内容を含むものが上位を占めた。30歳代の意見では、「血友病への理解」、「生活・仕事への不安」を含む記載が多かった。とくに、「生活・仕事への不安」が、他の年代よりも顕著に高頻度で記載されていた。40歳代以後では、関節の痛みや機能に関する記載と、インヒビターに関するものが、高頻度の意見

として抽出される傾向であった。

HIV 感染に関する記載の内容としては、HIV 治療薬の副作用に関する 40 歳代および 50 歳代の患者による記載が多く、また、少数例ではあるが、エイズに関する偏見を懸念する意見が 10 歳代以下の患者の保護者による記載中に見られた。HCV 感染や肝炎についての意見は 20 歳代から 50 歳代の患者の記載中に分布しており、その内容は副作用の辛さや、よりよい治療薬の開発を望むものが多かった。

D. 考察

昨年度までの研究において、自由記載欄の内容を熟読することによって、その概要をまとめた結果は昨年度の報告書に記載したが、今般の解析結果は、その内容と矛盾するものではなかった。とくに、血友病への理解、現在の治療法のさらなる進歩への期待と、公的負担の切り捨てに対する不安が、多数意見として抽出された点は一致していた。

しかし、テキスト型データの解析手法によれば、多数意見と少数意見との関係、また、意見の年代による相違などを、定量的に掌握することが可能となる。さらに、1 つの意見は 1 つの多次元ベクトルとして取り扱うことができるので、数値分類の手法による種々の類型化が可能になるばかりでなく、その結果を表やグラフに表すことが可能となる。内容の熟読による限りでは、異なる意見の互いの位置関係や、用いられている単語の特徴を見ることは困難で、また、相互の関係性をグラフ等で表すことも不可能である。テキスト型データの数値分類法の出力結果によって、種々の意見の出現頻度や類似性を考察していくことは、偏りのない意見の集約や、より深い解釈を得ることに有用であろうと考える。さらに、これ

によって記載された種々の意見の深層にある現状や問題点を、発見する手掛かりが得られるかもしれない。例えば、記載された意見と該当者の年代との関係などは、内容の熟読によってその関連を見ることは容易ではないが、記載をデータ化すれば可能となる。キーワードとなるような単語、意見の概要をまとめることができ、熟読による分類以上に、計量的に裏打ちされた解釈が可能となってくる。もちろん、このような自由記載欄の解析と、調査用紙に用意した設問への回答状況との比較検討も必要である。

E. 結論

わが国の血液凝固異常症の QOL を改善するためには何が必要なかを調査していくために、今後も用意した設問への応答を集計するものと、自由な記載を解析する双方の調査を継続して行きたい。今回の調査でテキスト型データの解析手法が有効な分析方法であることが判明したが、今後さらに設問を検討していくことにより、こうした分析手法からより有用な情報が導けるように工夫していきたい。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
2. 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
3. S. Tatsunami, J. Mimaya, A.

本研究とは関係がない。

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

4. M. Taki, A. Shirahata: Current situation of regular replacement therapy (prophylaxis) for haemophilia in Japan, *Haemophilia*, 2009, 15:78-82

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

H. 知的所有権の出願・取得状況

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
<u>Madoiwa S.</u> , Yamauchi T., <u>Kobayashi E.</u> , Hakamata Y., Dokai M., Makino N., Kashiwakura Y., Ishiwata A., Ohmori T., <u>Mimuro J.</u> , <u>Sakata Y.</u>	Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A.	J Thromb Haemost		Feb 13 Epub ahead of print	2009
Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y, <u>Madoiwa S.</u> , Mitomo K, Suzuki H, <u>Hasegawa M.</u> , <u>Mimuro J.</u> , <u>Sakata Y.</u>	Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets.	Mol Ther	16	1359-1365	2008
Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpo, M., Urabe, M., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., <u>Ozawa, K.</u>	Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats.	J Gene Med	10	368-374	2008
Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, SI., <u>Mizukami, H.</u> , Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., <u>Ozawa, K.</u>	Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea.	Mol Ther	16	474-480	2008
Tatsumi K, Ohashi K, <u>Shima M.</u> , Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A.	Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B.	Transplantation	86	167-170	2008
Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, <u>Shima M.</u>	Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers.	Biochem Biophys Res Commun	374	106-110	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kasuda S, Kubo A, Sakurai Y, Irion S, Ohashi K, Tatsumi K, Nakajima Y, Saito Y, Hatake K, Pipe SW, <u>Shima M</u> , Yoshioka A.	Establishment of embryonic stem cells secreting human factor VIII for cell-based treatment of hemophilia A.	Thromb Haemost	6	1352-1359	2008
Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, <u>Shima M</u> , 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	883-891	2008
稲葉浩、矢富裕、篠澤圭子、鈴木隆史、 <u>天野景裕</u> 、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	788-795	2008
Nagai H, Iwasaki N, <u>Odawara T</u> , Okada S.	Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan.	Int J Hematol	87	442-443	2008
<u>瀧 正志</u> 、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

研究成果の刊行物・別刷

ORIGINAL ARTICLE

4 1 Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A

S. MADOIWA,* T. YAMAUCHI,* † E. KOBAYASHI, ‡ Y. HAKAMATA, ‡ M. DOKAI,* N. MAKINO,* Y. KASHIWAKURA,* A. ISHIWATA,* T. OHMORI,* J. MIMURO* and Y. SAKATA*

*Research Divisions of Cell and Molecular Medicine, Centre for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi; †Department of Paediatrics, School of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi; and ‡Research Divisions of Organ Replacement Research, Centre for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi, Japan

To cite this article: 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* 2009; DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03314.x.

4 Keywords: ???, ???, ???.

2 Summary Background: Hemophilia A is a congenital bleeding disorder caused by a deficiency of coagulation factor VIII. Approximately 30% of hemophilia A patients develop inhibitors against FVIII following replacement therapy. We have reported that neonatal exposure of FVIII antigen can induce antigen-specific immune tolerance by interferon- γ (IFN- γ)-dependent T-cell anergy in hemophilia A mice. **Objective:** The thymus plays crucial roles in self-tolerance, with negative selection of self-reactive effector T cells and positive selection of self-reactive regulatory T cells. We investigated the possibility of the induction of antigen-specific immune tolerance by intrathymic injection of FVIII in hemophilia A mice. **Methods:** Hemophilia A mice were injected with recombinant FVIII into the thymus under real-time high-resolution image guidance. **Results:** Anti-FVIII inhibitory antibody titers in mice challenged with intravenous administration of FVIII were significantly lower in mice ($n = 22$) that had received thymic FVIII injection than in mice ($n = 18$) without thymic injection (9.4 ± 2.3 vs. 122.5 ± 27.6 BU mL $^{-1}$, respectively, $P = 0.00078$). The CD4 $^{+}$ T cells from thymic-injected mice could not proliferate or produce interleukin (IL)-2, IL-12 and IFN- γ in response to FVIII. The CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells generated from thymic-treated mice but not from naïve mice efficiently suppressed the *in vitro* proliferative response of CD4 $^{+}$ T cells and blocked the *in vivo* development of anti-FVIII antibodies in the adoptive transfer. **Conclusion:** These data suggest that intrathymic administration of FVIII could result in immune tolerance by induction of FVIII-specific regulatory T cells.

Introduction

Hemophilia A is an X-linked hereditary bleeding disorder caused by deficiency in coagulation factor VIII [1]. Plasma-derived or recombinant FVIII is sufficiently available to permit its use for primary prophylaxis to avoid bleeding in patients with severe hemophilia A. A major complication of hemophilia A treatment is the development of neutralizing antibodies against the infused FVIII [2]. We have previously demonstrated that exposure to FVIII antigen within 24 h of birth induces antigen-specific immune tolerance by interferon (IFN)- γ -dependent T-cell anergy in hemophilia A mice [3].

The thymus plays a major role not only in the development of self-tolerance but also in acquired tolerance in autoimmunity and organ transplantation [4,5]. There are two mechanisms in the thymus to establish a self-tolerance system, consisting of negative selection of self-reactive effector T cells, and positive selection of self-regulatory CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells [6,7,4,8]. The CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells are known to be weakly reactive to antigenic stimulation and able to mediate suppression of CD25 $^{-}$ naïve T cells [9,10]. In the thymus, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells are detected during the fetal period in humans, and during the perinatal period in mice [11]. The CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells may be responsible for the translation of tolerance from an antigen-inoculated thymus to a mature but naïve peripheral immune system [12][13]. Injection into the thymus of organs or cells has been successful in the induction of T-cell-mediated immunologic tolerance [14,15,16]. Allogenic grafts of pancreatic islets had better survival when grafted in the thymus, and provided long-term protection against spontaneous autoimmune diabetes if grafted during the early period after birth [17]. The expression or presentation of nominal antigen in the thymus might lead to enhanced deletion of autoreactive T cells or to induction of a number of antigen-specific regulatory T cells. In this study, we investigated the possibility of the induction of antigen-specific immune tolerance by intrathymic

Correspondence: Seiji Madoiwa, Research Division of Cell and Molecular Medicine, Centre for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushi-ji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Tel.: +81 285 58 7398; fax: +81 285 44 7817. E-mail: madochan@jichi.ac.jp

Received 24 May 2008, accepted 4 February 2009

© 2009 International Society on Thrombosis and Haemostasis

injection of FVIII in hemophilia A mice. Our study may open new perspectives for the manipulation of FVIII-specific tolerance in the thymus of hemophilia A patients.

Materials and methods

Hemophilia A mice

FVIII-deficient mice (B6; $129S_{e}F8^{tm1Kaz/J}$) with targeted destruction of exon 16 of the FVIII gene were previously described and kindly provided by H. H. Kazazian Jr (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) [18]. The experimental protocol was approved by the institutional Animal Care and Concern Committee of Jichi Medical University.

Intrathymic injection under the real-time high-resolution imaging system

Hemophilia A mice, 1–3 days old, were anesthetized by inhalation with 2.5% isoflurane in the anesthesia unit (Univentor, ZTN 08, Malta), and were imaged with a 30–50-MHz mechanical sector transducer with 50- μ m axial and 115- μ m lateral resolution (Vevo 770; Visualsonic Inc., Toronto, Canada). Two-dimensional real-time imaging of the thymus was accomplished with a 12 \times 12-mm field of view and an optimal depth of 12.5 mm. When a cross-section with the thymus was located, a glass microcapillary needle (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was placed at the parasternal

area on the chest in the ultrasound imaging plane. Under real-time image guidance, the thymus was punctured with the needle, and 0.05 μ g g^{-1} body weight (BW) of highly purified, albumin-free preparations of recombinant FVIII (Kogenate FS; Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) or 0.005 μ g g^{-1} BW of human albumin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was injected precisely using a microinjector remote control system (Fig. 1A,B). Mice were then stimulated with intravenous FVIII (0.05 μ g g^{-1} BW) every 2 weeks, from 10 to 18 weeks of age. Blood samples were obtained 2 weeks after each of the injections from the jugular vein, and were added at a 9 : 1 (v/v) ratio to 0.38% sodium citrate; plasma was then separated by centrifugation. The plasma samples were subsequently stored at -80°C until further analysis.

Assay for FVIII inhibitors

FVIII inhibitor levels were measured according to the Bethesda methods. In brief, mouse plasma (50 μ L) was incubated with 50 μ L of normal pooled human plasma at 37°C for 2 h. Residual human FVIII activity was measured in a one-stage assay using 50 μ L of FVIII-deficient human plasma (Kokusai-Shiyaku, Kobe, Japan) and a 50- μ L sample from the previous incubation. Samples were mixed with 100 μ L of phospholipid activator, incubated at 37°C for 3 min, and then mixed with 100 μ L of 20 mmol L^{-1} CaCl_2 . Clotting times were measured with a coagulometer (CA-500; Sysmex, Kobe, Japan). Coagutrol N (Kokusai-Shiyaku) was diluted with Owren's Veronal Buffer to

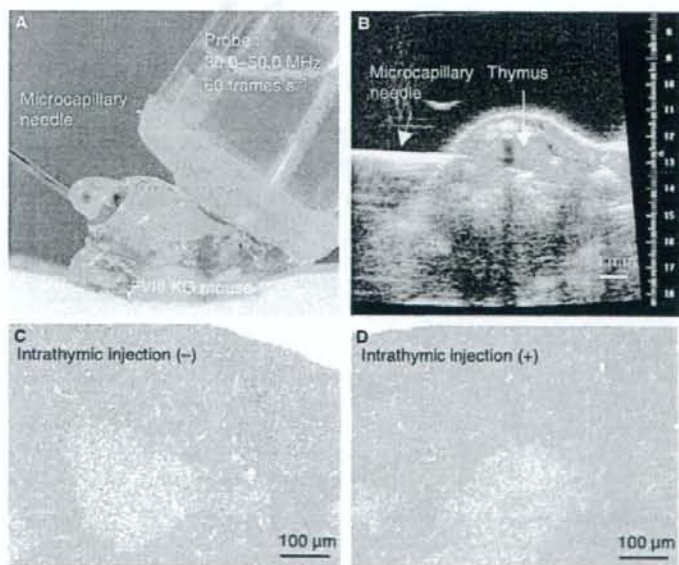


Fig. 1. Intrathymic injection of FVIII antigen using a high-resolution ultrasound system. Under real-time imaging of the thymus (A), a glass microcapillary needle was placed at the parasternal area and used to puncture the thymus (B). (C) The thymic sections were analyzed with hematoxylin and eosin staining 5 days after without (left panel) or with (right panel) of day 1 thymic injection of FVIII in hemophilia A mice.

produce a standard curve of FVIII activity. The measurements were made in the linear portion of the response range.

Anti-FVIII IgG measurements

Anti-FVIII IgG concentrations were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microtiter wells (Nunc, Roskilde, Denmark) coated with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ recombinant human full-length FVIII (Kogenate FS). After blocking with 5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS), serial dilutions of murine plasma were added at 4 °C for 16 h. Each well was washed with 0.5% BSA in PBS containing 0.05% Tween-20. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Cappel, Aurora, OH, USA) was added at 37 °C for 1 h. ABTS Microwell substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA) was added, and the absorbance at 405 nm was read. Anti-FVIII antibody concentrations were estimated from the linear portion of a standard curve obtained using anti-human FVIII monoclonal antibodies (kindly provided by The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan), which bind to FVIII.

Determination of IgG subclass of anti-FVIII antibodies

Microtiter wells were coated with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ recombinant human FVIII in PBS for 16 h at 4 °C. After blocking with 5% BSA in PBS, serial dilutions of murine plasma were added for 2 h at 37 °C. The wells were washed with 0.5% BSA in PBS containing 0.05% Tween-20. The IgG subtypes of anti-FVIII antibodies bound to immobilized human FVIII were determined by incubation with isotype-specific rabbit anti-mouse IgGs (Mouse Typer; BioRad, Hercules, CA, USA) for 1 h at 37 °C. After being washed with 0.5% BSA in PBS containing 0.05% Tween-20, the wells were incubated with goat anti-rabbit HRP conjugate for 1 h at 37 °C. Substrate development was performed for 15 min at 25 °C, using ABTS Microwell substrate as described above.

Tetanus immunization of FVIII-deficient mice

Mice were injected intraperitoneally with 1 Limit of flocculation of tetanus toxoid (TT) vaccine (Takeda Chemical Industries, Tokyo, Japan). Plasma samples were obtained after 3 weeks, and anti-TT antibody titers were determined by ELISA as previously described. In brief, microtiter plates were coated with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ formaldehyde-inactivated tetanus toxin, *Clostridium tetani* (Calbiochem, Darmstadt, Germany), for 16 h at 4 °C. After washing and blocking with Tris-buffered saline containing 5% BSA, mouse plasma samples were added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C. After washing with 0.5% BSA in PBS containing 0.05% Tween-20, 100 μL of HRP-conjugated goat anti-mouse IgG was added for 1 h at 37 °C. Then, the peroxidase substrate was added and the absorbance at 405 nm was measured.

Cell preparation

Mice CD4^+ T cells were prepared by depletion of non- CD4^+ T cells with the autoMACS cell sorting system (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells were isolated by CD25^+ positive selection from CD4^+ T cells with magnetic cell sorting, using a CD4CD25 Isolation Kit (Miltenyi Biotec). The purity of sorted $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells was confirmed to be more than 85% by flow cytometric analysis. Antigen-presenting cells were prepared from mice splenocytes by depletion of T cells using the magnetic sorting system with anti- CD90 (Thy1.2)-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec), followed by irradiation with a single dose of 20 Gy (Gamma Cell; Norton International, ON, Canada), to prevent nonspecific proliferative responses during the *in vitro* FVIII stimulation assay.

Flow cytometric analysis

Cells from teased organs were labeled in PBS containing 1% BSA and 2 mmol L^{-1} EDTA at 4 °C for 30 min in the dark under continuous agitation. The following antibodies were used for phenotypic analysis: allophycocyanin-labeled anti- CD25 IgG (PC61.5; eBioscience, San Diego, CA, USA), fluorescein isothiocyanate-conjugated anti- CD4 IgG, phycoerythrin (PE)-labeled anti- CD45 IgG (30-F11; BD Pharmingen), and forkhead family transcription factor (Foxp3)-PE IgG (eBio7979; eBioscience), used according to the manufacturer's instructions. Isotype-matched irrelevant antibodies (BD Pharmingen) were used as controls. At least three events were analyzed on a FACS Aria (Becton Dickinson).

Proliferation assay with [^3H]thymidine incorporation

To measure T-cell proliferation, 1×10^5 cells per well were cultured with 0–3 nmol L^{-1} human FVIII at 37 °C for 72 h in complete RPMI-1640 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). [^3H]Thymidine (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) was added (0.037 MBq per well) at 37 °C for 18 h. The cells were harvested, and [^3H]thymidine incorporation was determined by scintillation counting (Top count; Packard, Meriden, CT, USA).

Cytokine assays

Splenocytes were incubated in 24-well plates at 1.0×10^6 cells per well in the absence or presence of 3 nmol L^{-1} human recombinant full-length FVIII (Kogenate FS) at 37 °C in 5% CO_2 . Production of the cytokines interleukin (IL-2), IL-4, IL-12 and IFN- γ by CD4^+ T cells derived from each mouse was analyzed at 72 h with the ELISA kits (Biotrak ELISA System; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. In addition, levels of IL-10 were measured at 96 h by the ELISA system (Biotrak ELISA System).

Adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells into syngeneic hemophilia A mice

Single-cell suspensions were prepared and pooled from the spleens of hemophilia A mice without intrathymic administration of FVIII (non-IT mice) or those with intrathymic administration of FVIII (FVIII-IT mice). The pooled cells were purified to obtain CD4⁺CD25⁺ T-cell populations as described above. A total of 0.5×10^6 CD4⁺CD25⁺ T cells per body in 100 μ L of PBS was injected into syngeneic naïve hemophilia A mice via the jugular vein. Mice were challenged with repeated intravenous stimulation by 0.05 u g^{-1} BW FVIII every 2 weeks, and inhibitory antibody titers were followed over time.

Statistical analysis

Two-tailed unpaired *t*-tests with 95% confidence intervals were performed using spss software (SPSS, Chicago, IL, USA). Mean values were considered to be statistically significant if the *P*-values were below 0.05.

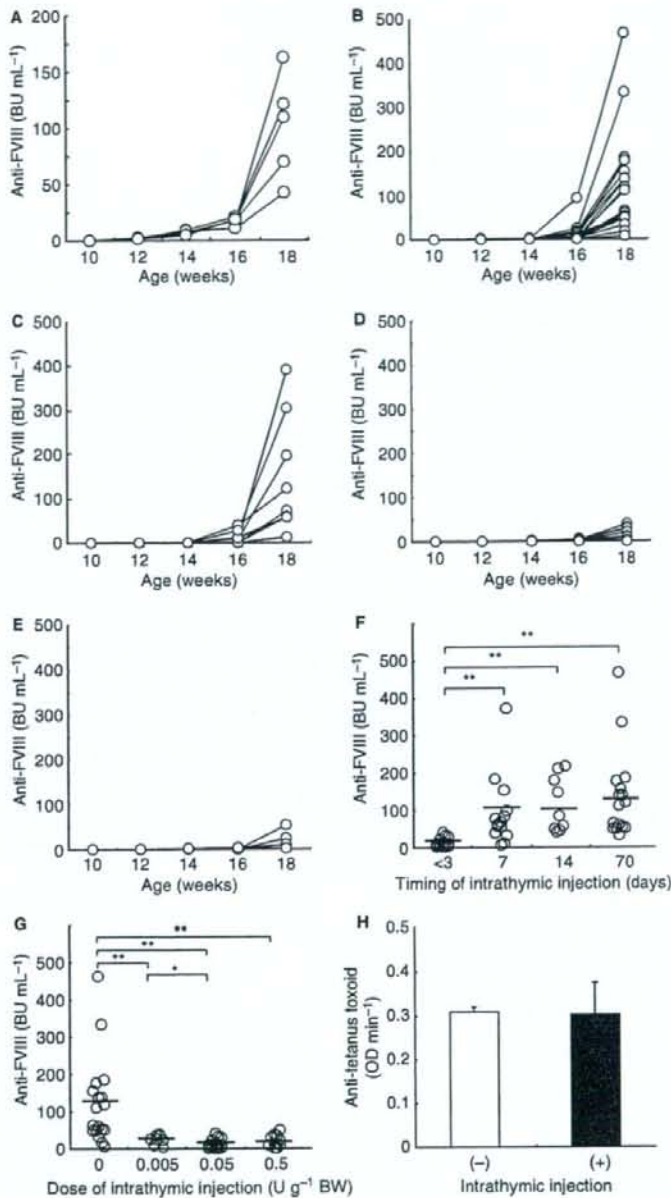
Results

Effect of intrathymic administration of FVIII on anti-FVIII inhibitory antibody formation in hemophilia A mice

We performed histologic analysis of hemophilia A mice 1 day after direct thymic injection of human recombinant FVIII. We analyzed thymus sections 5 days after thymic injection with hematoxylin and eosin staining, and confirmed that there was no bleeding or histologic change in thymic structure, similar to what was seen with untreated mice (Fig. 1C). Then, we studied the impact of intrathymic injection of FVIII on the immune response in hemophilia A mice. For this, we administered FVIII or albumin as control antigen into the thymus of naïve hemophilia A mice, and analyzed anti-FVIII inhibitory antibody formation after repeated intravenous stimulation with FVIII (0.05 u g^{-1} body weight). All non-IT mice developed high titers of anti-FVIII antibodies ($n = 22$, $122.5 \pm 27.6 \text{ BU mL}^{-1}$; Fig. 2B), confirming that human FVIII is highly immunogenic in hemophilic mice [3,19]. In

addition, mice that had been given intrathymic injections of human albumin (Alb-IT mice) showed high titers of antibody against FVIII ($n = 10$, $129.0 \pm 40.6 \text{ BU mL}^{-1}$; Fig. 2C). By contrast, FVIII-IT mice had undetectable or low titers of anti-FVIII antibodies ($n = 18$, $9.4 \pm 2.3 \text{ BU mL}^{-1}$; Fig. 2D). Moreover, FVIII-IT mice did not develop of high titers of anti-FVIII antibodies even after the boosted immune challenges with a combination of FVIII and Freund's adjuvant ($20.1 \pm 8.1 \text{ BU mL}^{-1}$, $n = 5$; Fig. 2E). As shown in Fig. 2F, mice treated on day 7, day 14 and day 70 developed high titers of anti-FVIII antibodies after the fifth intravenous stimulation with FVIII: $118.3 \pm 34.9 \text{ BU mL}^{-1}$ ($n = 15$), $113.9 \pm 31.5 \text{ BU mL}^{-1}$ ($n = 10$), and $120.5 \pm 37.6 \text{ BU mL}^{-1}$ ($n = 16$), respectively. Several researchers have demonstrated that induction of antigen-specific tolerance by intrathymic inoculation of soluble antigens is dose-dependent, and that an optimal dose of soluble antigen is required to induce antigen-specific unresponsiveness [20,21]. We injected FVIII into the thymus of neonatal hemophilia A mice at variable doses (0.005 – 0.5 u g^{-1} BW), and followed this with repeated intravenous stimulation with FVIII at 10, 12, 14, 16 and 18 weeks. As shown in Fig. 2G, intrathymic administration of 0.005 , 0.05 and 0.5 u g^{-1} BW resulted in lower titers of anti-FVIII inhibitory antibodies (24.5 ± 4.4 , 9.4 ± 2.3 , and $18.9 \pm 4.8 \text{ BU mL}^{-1}$, respectively) than those seen without thymic treatment. Interestingly, mice injected intrathymically with 0.005 u g^{-1} BW of FVIII developed significantly higher titers of anti-FVIII antibodies than those injected with 0.05 u g^{-1} BW of FVIII ($P = 0.036$), suggesting that there is some dose-dependency in the ability to induce immune tolerance. Taken together, these findings show that the intrathymic injection of FVIII antigen within 3 days after birth minimizes neutralizing antibody formation in FVIII-deficient mice. To determine whether the suppression of antibody against FVIII was specific, FVIII-IT mice and non-IT mice were immunized intraperitoneally with TT vaccine 2 weeks after the final challenge with FVIII. As shown in Fig. 2H, FVIII-IT mice were able to mount a T-cell-dependent immune response to a different antigen, and the antibody response was similar to that in non-IT mice. These results indicated that the immune suppression observed in our mouse model was FVIII-specific.

Fig. 2. Effect of intrathymic administration of FVIII on anti-FVIII inhibitory antibody formation in hemophilia A mice. Normal B6 control mice [(A), $n = 5$], and hemophilia A mice without thymic treatment [(B), $n = 22$], or with thymic injection of human albumin [(C), $n = 10$] or human FVIII [(D), $n = 18$] within 3 days after birth, were injected intravenously with human FVIII (0.05 u g^{-1} body weight) at 10, 12, 14, 16 and 18 weeks. The anti-FVIII inhibitor titer was determined by Bethesda assay. (E) FVIII-deficient mice with prior intrathymic injection of FVIII were repeatedly stimulated with FVIII and Freund's adjuvant every 2 weeks, and anti-FVIII inhibitor titers were measured. (F) The initial intrathymic injection of FVIII was given within 3 days ($n = 22$), 7 days ($n = 15$), 14 days ($n = 10$) or 70 days ($n = 18$) after birth. Each mouse was then given repeated intravenous injections at 10, 12, 14, 16 and 18 weeks. The mice were bled on day 4 after the fifth treatment, and anti-FVIII inhibitor titers were measured. Bars show means. $^{**}P < 0.03$ (G) Zero unit per gram body weight (saline control, $n = 18$), 0.005 u g^{-1} body weight (saline control, $n = 10$), 0.05 u g^{-1} body weight (saline control, $n = 22$) or 0.5 u g^{-1} body weight (saline control, $n = 11$) of FVIII were injected into the thymus within 3 days after birth, and the mice were then treated with 0.05 u g^{-1} body weight of FVIII at 10, 12, 14, 16 and 18 weeks. The mice were bled on day 4 after the fifth treatment, and anti-FVIII inhibitor titers were measured by Bethesda assay. Bars show means. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.03$ (H) Hemophilia A mice without ($n = 14$, open bar) or with ($n = 15$, closed bar) thymic administration of FVIII were given five doses of intravenous FVIII (0.05 u g^{-1} body weight) every 2 weeks. Each mouse was injected intraperitoneally with one Limit of flocculation (Lf) unit per body of tetanus toxoid vaccine 2 weeks after the last challenge with FVIII. Plasma samples were obtained 3 weeks after the tetanus toxoid injection. Anti-tetanus toxoid antibody titers were measured by enzyme-linked immunosorbent assay as described in Materials and methods. Data are shown as the means \pm standard deviations.



Effect of intrathymic administration of FVIII on anti-FVIII IgG formation in hemophilia A mice

We treated hemophilia A mice with repeated injections of human FVIII, and measured anti-FVIII IgG titers after the fifth injection at 16 weeks. IgG antibodies against FVIII were significantly inhibited in FVIII-IT mice as compared with non-

IT mice ($14.9 \pm 11.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ vs. $665.16 \pm 225.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $P = 0.0038$) (Fig. 3A). As these mice are on a B6 background, we used C57BL/6J mice as normal controls for experiments on the development of anti-FVIII IgG. The B6 control mice developed high titers of anti-FVIII inhibitory antibodies ($101.6 \pm 46.4 \text{ BU mL}^{-1}$; Fig. 2A). Levels of anti-FVIII IgG of FVIII-stimulated B6 control mice ($409.9 \pm 84.8 \mu\text{g mL}^{-1}$)

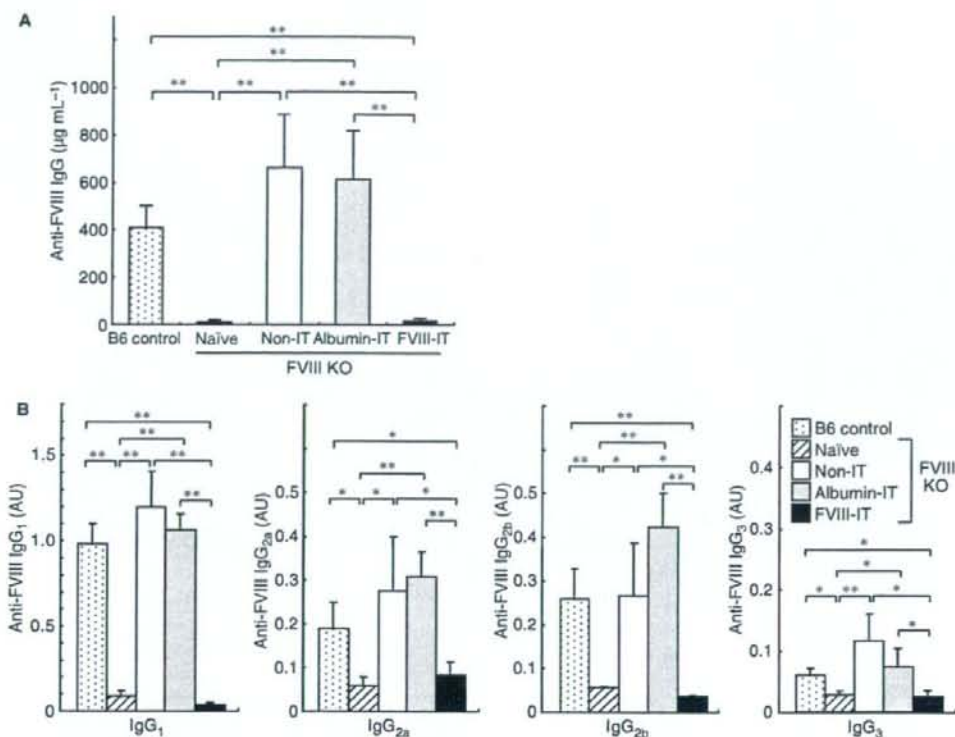


Fig. 3. Effect of intrathymic administration of FVIII on anti-FVIII IgG formation in hemophilia A mice. Normal B6 control mice (B6 control mice, $n = 5$), naïve FVIII-deficient mice (naïve mice, $n = 5$), FVIII-deficient mice without thymic treatment (non-IT mice, $n = 5$) and mice with prior thymic injection of human albumin (Albumin-IT mice, $n = 5$) or human FVIII (FVIII-IT mice, $n = 5$) were injected intravenously with human FVIII every 2 weeks. Each of the mice was bled on day 4 after the fifth stimulation, and total anti-human FVIII IgGs (A) and their titers of IgG subclasses (B) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay as described in Materials and methods. The values [(A), $\mu\text{g mL}^{-1}$; (B), AU] represent the means \pm standard deviations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.03$.

were significantly higher than those of FVIII-deficient naïve ($5.0 \pm 5.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, background values) or FVIII-IT mice. In addition, Alb-IT mice also produced significant amounts of anti-FVIII IgG antibodies ($616.4 \pm 207.9 \mu\text{g mL}^{-1}$). All IgG isotypes of anti-FVIII antibodies in B6 control, Alb-IT and non-IT mice significantly increased as compared with those in FVIII-IT mice (Fig. 3B). These results suggest that intrathymic injection of FVIII efficiently suppressed the formation of antibodies against FVIII in hemophilia A mice.

The anti-FVIII specific CD4⁺ T-cell proliferative response is blocked by intrathymic administration of FVIII.

To evaluate whether intrathymic administration of FVIII had direct suppressive effect on FVIII-specific CD4⁺ T cells, we analyzed the CD4⁺ T-cell proliferative response to *in vitro* FVIII stimulation in the presence or absence of non-IT mouse-derived antigen-presenting cells (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, CD4⁺ T cells isolated from B6 control, naïve, non-IT, Alb-IT or FVIII-IT mice did not proliferate at any

concentration of FVIII when they were cultured without antigen-presenting cells. Moreover, the antigen-presenting cells alone did not respond to the stimulation with FVIII. The CD4⁺ T cells of B6 control, non-IT and Alb-IT mice showed dose-dependent proliferation in response to FVIII when they were cocultured with the antigen-presenting cells (Fig. 4C). By contrast, the CD4⁺ T cells isolated from FVIII-IT mice did not show any proliferative response to FVIII, even if they were cocultured with antigen-presenting cells, indicating that the intrathymic administration of FVIII could be important for the prevention of an immune response to FVIII.

Cytokine responses are suppressed by intrathymic administration of FVIII.

The CD4⁺ T cells from B6 control (Fig. 5A), non-IT (Fig. 5C) and Alb-IT (Fig. 5D) mice produced significant amounts of IL-2, IL-12 and IFN- γ in response to FVIII stimulation. In contrast, the levels of IL-4 and IL-10 in these mice did not change even after addition of FVIII.

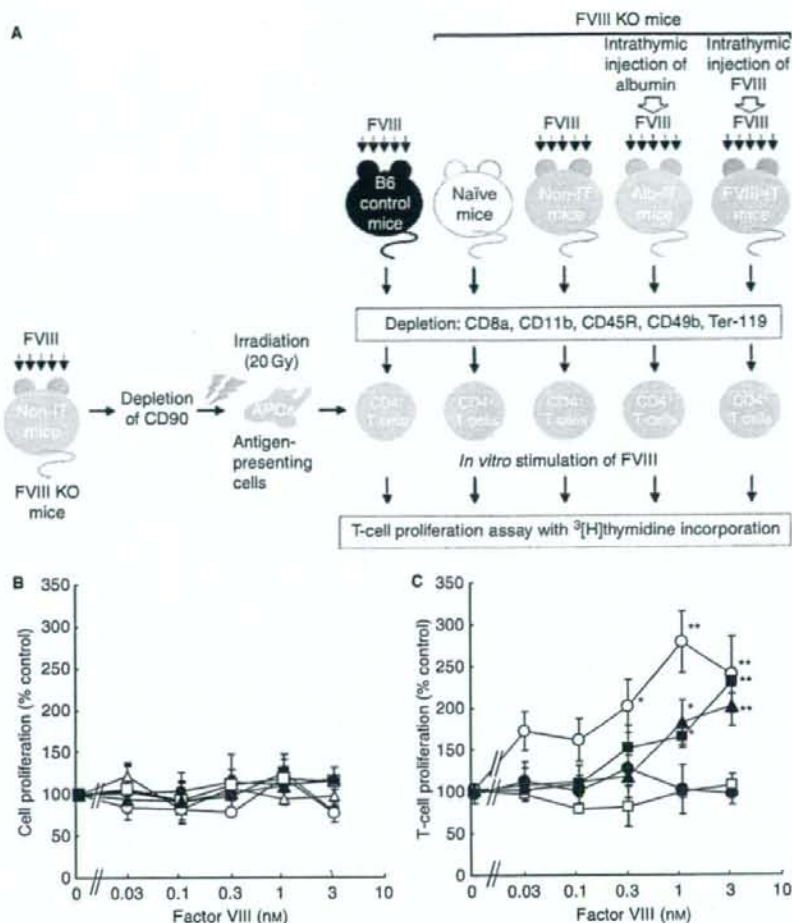


Fig. 4. The anti-FVIII specific T-cell proliferative response is blocked by intrathymic administration of FVIII. (A) B6 control mice, mice without intrathymic administration of FVIII (non-IT mice), mice that had been given intrathymic injections of human albumin (Alb-IT mice) and mice that had been given intrathymic injections of FVIII (FVIII-IT mice) were intravenously injected with human FVIII every 2 weeks. The CD4⁺ T cells were isolated from each of the mice, as well as from naïve FVIII-deficient mice, by depletion of CD8a, CD11b, CD45R, CD49b and Ter119 cells with a cell sorting system. The antigen-presenting cells were isolated from non-IT mice after repeated intravenous stimulation with FVIII with depletion of CD90 cells, followed by 20 Gy of irradiation. Each group of CD4⁺ T cells was stimulated with FVIII in the absence or presence of the antigen-presenting cells. (B) The proliferation of CD4⁺ T cells from B6 control mice (closed triangles, $n = 5$), naïve mice (open squares, $n = 5$), non-IT mice (open circles, $n = 7$), Alb-IT mice (closed squares, $n = 5$) and FVIII-IT mice (closed circles, $n = 7$) was analyzed under *in vitro* stimulation with FVIII (0–3 nmol L⁻¹) in the absence of antigen-presenting cells, as described in Materials and methods. The proliferation of antigen-presenting cells alone was also analyzed (open triangles, $n = 5$). (C) The proliferation of CD4⁺ T cells from B6 control mice (closed triangles, $n = 5$), naïve mice (open squares, $n = 5$), non-IT mice (open circles, $n = 7$), Alb-IT mice (closed squares, $n = 5$), and FVIII-IT mice (closed circles, $n = 7$) was analyzed under *in vitro* stimulation with FVIII (0–3 nmol L⁻¹) in the presence of the non-IT mouse-derived antigen-presenting cells. Data are shown as the means \pm standard deviations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.03$, when compared with the proliferation in the absence of FVIII.

FVIII-IT mice spontaneously produced higher amounts of IL-4 (71.2 ± 40.5 pg mL⁻¹; Fig. 5E) than non-IT mice (14.7 ± 6.8 pg mL⁻¹, $P = 0.016$; Fig. 5C) or Alb-IT mice (26.6 ± 2.9 pg mL⁻¹, $P = 0.035$; Fig. 5D). IL-4 has been shown to be the dominant cytokine required for the development of a Th2 phenotype from naïve CD4⁺ T cells

[22]. The population of CD4⁺ T cells or antigen-presenting cells may be heterogeneous and contain a subpopulation of cells (such as Th3 cells) capable of producing IL-4 in our system [23]. Alternatively, IL-4, as a regulatory cytokine, might tend to suppress Th1 responses and enhance regulatory T-cell function in FVIII-IT mice [24]. In addition, the

FVIII-IT-mouse-derived CD4⁺ T cells did not increase their production of the cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ and IL-10 (Fig. 5E). These results suggest that the FVIII-specific Th1 cytokine response is suppressed by intrathymic administration of FVIII.

Intrathymic administration of FVIII induces antigen-specific regulatory T cells.

To evaluate the role of FVIII-specific regulatory T cells in the induction of thymic tolerance, we analyzed CD4⁺CD25⁺ T cells and FoxP3⁺ cells after *in vitro* stimulation with FVIII

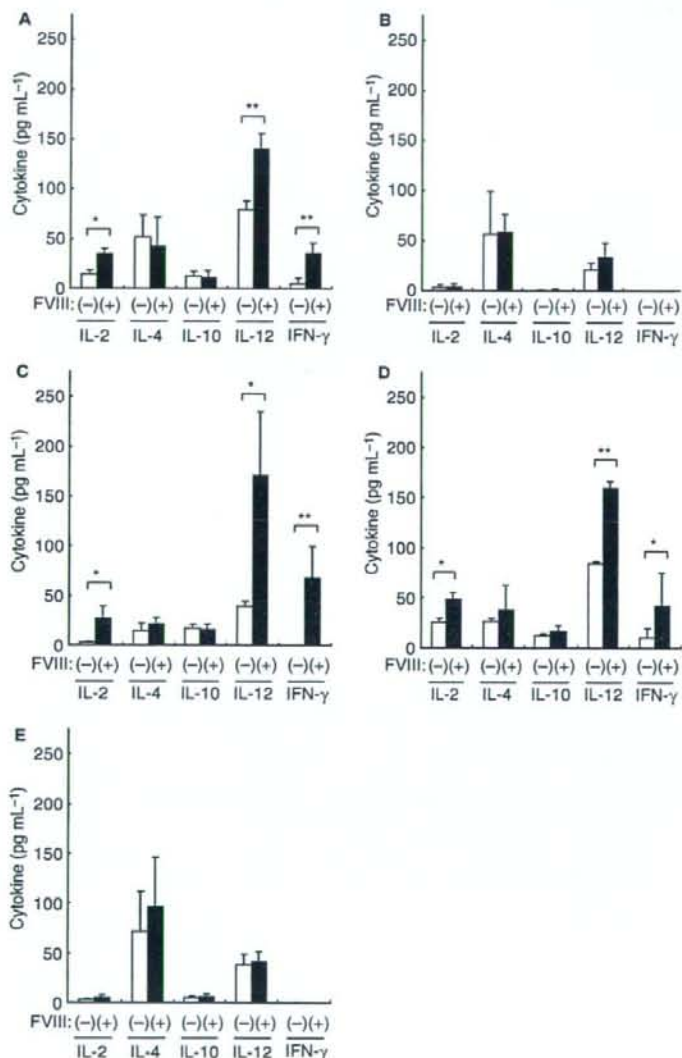


Fig. 5. The Th1 cytokine response is suppressed by intrathymic administration of FVIII. The CD4⁺ T cells isolated from normal B6 control mice [(A), $n = 5$], FVIII-deficient mice without intrathymic administration of FVIII (non-IT mice) [(C), $n = 6$], mice that had been given intrathymic injections of human albumin [(D), $n = 5$] and mice that had been given intrathymic injections of FVIII [(E), $n = 8$] after repeated intravenous stimulation with FVIII were mixed with the antigen-presenting cells derived from non-IT mice with FVIII stimulation. The CD4⁺ T cells from FVIII-deficient naïve mice were also examined with the antigen-presenting cells [(B), $n = 5$]. Each group of cells was cultured in the absence (open bars) or presence of 3 nmol L⁻¹ FVIII (closed bars), and its cytokine production [interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-12, and interferon- γ (IFN- γ)] were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay as described in Materials and methods. The values (pg mL⁻¹) represent the means \pm standard deviations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.03$.

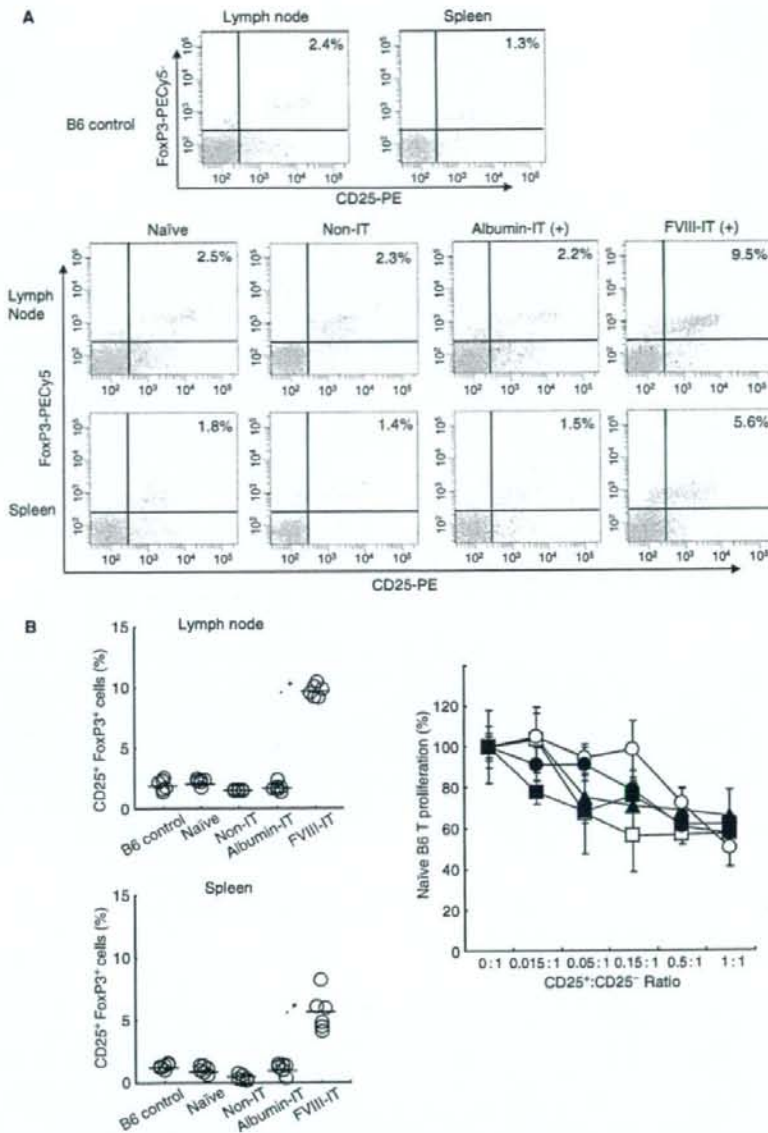


Fig. 6. Injection of FVIII into the thymus increases the numbers of FVIII-specific CD25⁺ FoxP3⁺ cells. (A) The lymph node and spleen-derived CD4⁺ T cells of normal B6 control mice, FVIII-deficient mice without intrathymic administration of FVIII (non-IT mice), mice that had been given intrathymic injections of human albumin (albumin-IT mice) or mice that had been given intrathymic injections of FVIII (FVIII-IT mice) with repeated intravenous FVIII stimulation were cultured with antigen-presenting cells from FVIII-stimulated non-IT mice in the presence of 3 nmol L⁻¹ FVIII for 72 h. The CD4⁺ T cells of FVIII-deficient naive mice were also cultured with antigen-presenting cells and FVIII antigen. The percentage of CD25⁺ FoxP3⁺ cells among CD4⁺ T cells was analyzed by flow cytometry as described in Materials and methods. (B) The frequencies of FVIII-specific-CD25⁺ FoxP3⁺ cells among CD4⁺ T cells isolated from the lymph nodes and spleens of B6 control mice ($n = 6$), naive mice ($n = 6$), non-IT mice ($n = 6$), albumin-IT mice ($n = 6$) or FVIII-IT mice ($n = 6$) were analyzed. ** $P < 0.03$ as compared with those of other groups. (C) The standard regulatory T-cell inhibition assay. Under stimulation by anti-mouse CD3 antibodies (BD Biosciences), the proliferation of naive normal B6-derived CD4⁺ CD25⁻ T cells was analyzed in the presence of CD4⁺ CD25⁺ T cells from B6 control mice (closed triangles, $n = 5$), FVIII-deficient naive mice (open squares, $n = 5$), non-IT mice (open circles, $n = 5$), albumin-IT mice (closed squares, $n = 5$), or FVIII-IT mice (closed circles, $n = 5$), at a variety of ratios. PE, phycoerythrin.