

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18年度～20年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 総合(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 ————— 9  
(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 ————— 19  
(自治医科大学 小澤敏也、水上浩明)
3. 血友病(マウスおよびイスモデル)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 吉岡 章、嶋 緑倫)
4. 血友病治療のための新しい遺伝子導入法の開発 ————— 28  
(自治医科大学 小林英司)
5. 血友病遺伝子治療に向けたサル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターの  
製造システムの構築と安全性評価 ————— 31  
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 血友病の遺伝子解析と発現実験による血友病の分子病理に関する研究 ————— 42  
(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 ————— 55  
(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 ————— 59  
(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 ————— 67

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 73

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 QOL 向上を目指して、次の3プロジェクトを展開した。(I) 血友病遺伝子治療、(II) 血友病インヒビター対策、(III)患者の QOL を高めるための調査研究

(I)遺伝子治療:血友病に cure をもたらす遺伝子治療は、24 時間不慮の出血を予防できる、高価な血友病製剤の使用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。現時点では効率と安全性を鑑み、遺伝子導入は、生体内臓器に直接導入する場合は殆ど染色体に組み込まれないアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、そして、体外で自己幹細胞に遺伝子を導入し、これを体内に移植する場合には、数年内に九州大学眼科での遺伝子治療に利用が予定されている日本版 SIV ベクターを選択した。まず、標的臓器の選択、次にそれぞれの臓器に特異性を持つ AAV ベクターとプロモーターを検討した。結果、骨格筋には、AAV1 ベクターで CMV、或いは CEP (PAI-1 プロモータを修飾したもの) を用い、肝臓では AAV8 或いは AAV9 ベクターに  $\alpha 1$  アンチトリプシン (HAAT) プロモータの組み合わせが選択された。血友病 A と B のいずれの遺伝子治療に関しても、マウス基礎実験で発現効率と安全性を、時間軸を含めて十分に検討し、成果をカンクイザルで検討するという方針を進めた。マウスにおける血友病遺伝子治療技術の確立を基礎にサルを利用した前臨床研究へと歩を進めた。サルには血友病が同定されていない。また、サルとヒトでは血友病因子の相同性が高いため、実験は、導入遺伝子による発現血友病因子の同定がキーとなった。幸い、ヒトとサル FIX を識別しうるモノクロナル抗体を作製 (世界唯一) し得たので、これを利用して、サルでは FIX 遺伝子導入とその発現実験を先行した。発現ヒト FIX に対する抗体産生を減弱させるために、一部のみヒト型を有する改変サル FIXcDNA を作製し、これを利用した。また、AAV 既感染により生じた微量の血中抗 AAV 中和抗体がベクター感染効率を低下させることを明らかにし、これを回避するために、抗体測定法の感度アップ、投与方法の工夫など様々な技術的改善を図った。同時に、臨床研究開始に向けて、ヒト投与可能 AAV ベクターの生産を、国内外の企業に打診した。ディナベックから予算が付けば作製可能の確約がとれ、AAV ベクターを利用した血友病遺伝子治療臨床研究開始のための準備は技術的に整った。遺伝子治療の長期効果持続を目指した研究として、血友病 A マウスの血液幹細胞に体外で SIV ベクターを利用して、FVIII 或いは活性型 FVII(FVIIa)の遺伝子を導入し、血小板に特異的に発現させる方法を検討した。染色体への random integration による発癌などのリスク低下を目的に、LAM-PCR 法による組み込み部位の確認やインシュレータ導入の検討などを進め、一定の成果が得られた。SIV そのものの産生効率と安全性向上のために、いくつかの検討を行った。さらに保存、および輸送などに伴う安定性も検討し、臨床応用可能なベクターに一步近づいた。次の一手を目指した探索的研究として、相同組み換えによる遺伝子修復、染色体の AAVS1 領域への遺伝子の特異的組み込みの検討や、血友病 A クローンボタの作製を進めた。この他、肝細胞の異所性移植による FVIII の産生、ES 細胞や、血管内皮前駆細胞での FVIII 発現などの研究を展開した。

(II)インヒビター対策:血友病 A マウス生下時に、頸静脈より、或いは直接胸腺へヒト FVIII 製剤投

与による免疫寛容誘導とそのメカニズムの解析を進めた。この寛容は FVIII 特異的であり、投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞が関与することを明らかにした。さらに、マウス皮下へマイクロボートを埋め込み製剤を間歇長期投与することによる免疫寛容誘導(ヒト臨床応用されている"ITI")モデルの作製に成功し、その詳細な解析を進めている。

(III)QOL を高めるための調査研究: 血友病患者視点から作成したアンケート調査を行い、その解析を定型アンケート、および自由記載欄の順にコンピュータソフトウェアなどを利用して解析した。結果、血友病に対する社会的偏見が根強く残っていること、そして関節内出血が患者の QOL を決定づける要因であることが確認された。また、自由記載欄の解析から、治療に対する不安、インヒビター、社会の偏見に対する患者の危惧などが明らかになった。

#### 研究分担者:

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

学長 吉岡 章

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

待が寄せられている。また、血友病因子活性が正常の数%存在すれば不慮の出血を予防できるので、血友病は遺伝子治療対象疾患としても適している。

患者 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。遺伝子治療に関しては、効率改善とともに、安全性向上を最大限図ることを目指して研究を展開した。また、早期臨床研究開始に向けて、マウスで基礎実験を繰り返し、得られた成果をサルで確認し、問題点の解決を図るとともに、具体的にヒトに投与可能なベクター産生を依頼しうる企業探索を進めた。また、遺伝子治療効果の長期持続を期待して、血液幹細胞に体外で遺伝子を導入し移植、血小板に血友病因子を発現して止血効果を図る際に利用する SIV ベクターについては、数年以内に九大眼科での遺伝子治療臨床研究に利用される予定になっている。安全性をより確かにすることと、産生効率を上げ、さらに安定性の確認など、ヒト応用レベルベクターへ成長するための検討を進めた。インヒビター対策は血友病 A マウスの生下時に末梢静脈からヒト FVIII 製剤を投与する寛容誘導法に加えて、胸腺へ直接製剤を投与することによる血友病免疫寛容誘導の可能性とメカニズムを検討した。更に現在ヒト

#### A.研究目的

血友病は X 染色体上に存在する凝固第 VIII(FVIII)、或いは第 IX(FIX)因子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。血友病遺伝子治療は、これらの問題を解決し、血友病に cure をもたらすのみならず、高価な製剤使用を減らし経済効果も期待できることから大きな期

応用されている因子製剤大量長期投与による免疫寛容誘導(ITI)のマウスモデル作製を検討した。患者視点から作製したアンケートに基づく調査研究では、定型フォームから患者の QOL を決定づける要因の解析に加え、コンピューターソフトウェアを用いて患者自由記載欄から得られる情報を集積した。

## B.研究方法

**(I)遺伝子治療** :現時点では、遺伝子導入効率を考慮すると、ウイルス由来ベクターの使用が現実的である。安全性の高いベクターとして、これまでにアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとアフリカミドリザルから単離した日本版レンチウイルス由来 SIVagm ベクターを選択し、検討してきた。AAVベクターは治療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である。しかし、染色体に組み込まれないために、細胞分裂により効果が希釈される可能性が高い。そこで、染色体に組み込まれ、効果の長期持続の期待できる SIVベクター使用の可能性を同時に検討してきた。選択したウイルスはアフリカミドリザルだけではなく、他のサルに対しても病原性を持たない。また、ベクターとして、これまでに第三世代化されており、ウイルスとしての危険性を殆ど有しない。また、数年以内に九州大学眼科での遺伝子治療臨床応用も計画されており、産生効率や安全性の問題は著しく改善しつつある。遺伝子導入は、安全性を鑑み、生体内臓器に直接導入する場合は AAV ベクター、そして、体外で自己幹細胞に遺伝子を導入し、これを体内に移植する場合には SIV ベクターを選択した。まず、標的臓器の選択は、細胞分裂の殆ど起きない終末細胞、除去可能臓器、生理的産生臓器などをキーワードに選択し

た。次にそれぞれの臓器に特異性を持つ AAV ベクターとプロモーターを検討した。例えば、骨格筋や血管内皮に導入する場合には AAV1 ベクターで CMV、或いは CEP (PAI-1 プロモータを修飾したもの)を用い、肝臓では AAV8 或いは 9 に  $\alpha 1$  アンチトリプシン(HAAT)プロモータ、そして肝臓での産生を増強する HCR エンハンサーを使用した。FVIII と FIX のいずれも、マウスで発現と安全性を、時間軸を含めて(1年以上)十分に検討し、成果をカニクイザルで検討するという方針で進めた。サルには血友病が同定されていない。サルとヒトの FIX および FVIII は、それぞれ 97、98%以上の相同性がある。従って、実験のキーポイントは如何にして導入した遺伝子により発現した血友病因子を同定するかである。幸い FIX に関しては、ヒトとサルを識別しうるモノクロナル抗体を作製(世界唯一)し得たので、これを利用して定量する系を確立した。FVIII に関しては、AAV ベクターは搭載遺伝子が 5kb 近傍という制約があるため、凝固活性に関与せず、細胞から分泌された後、活性化時に除去される B 領域を除去した BD-lessFVIIIcDNA を導入した。これによる発現因子とサル個体の産生する full length FVIII をモノクロナル抗体を利用して識別しうる系の確立を検討した。まず、サルでは FIX 遺伝子導入とその発現実験を先行した。発現ヒト FIX に対する抗体産生を減弱させるために、モノクロナル抗体のエピトープ部位に相当する、サル Thr262 を Ala262 (ヒト型)になるように cDNA を改変した。また、肝臓への導入では、サルの AAV 既感染により生じた微量の血中抗 AAV 中和抗体がベクター感染効率を低下させることを回避するために、抗体測定法の感度アップ、投与方法の工夫など様々な技術的改良を図った。臨床研究開始

に向けて、血友病患者の遺伝子解析を進めるとともに、ヒト投与可能 AAV ベクターの生産を、DCL、TA、AST など国内外の企業に打診した。

血友病 A マウスの血液幹細胞に体外で SIV ベクターを利用して、FVIII 或いは活性型 FVII(FVIIa)の遺伝子を導入し、血小板に特異的に発現させるためのプロモータを選択した。染色体への random integration による発癌などのリスク低下を目的に、LAM-PCR 法による組み込み部位の確認やインシュレータ導入の検討などを進めた。結果を、血友病 A イヌで確認するための予備実験も進めた。SIV そのものの産生効率と安全性向上のために、次のいくつかの検討を進めた。第 3 世代パッケージングベクターの gag/pol 遺伝子をヒト細胞に最適化するためにコドンの改変を行った。製造システム最適化に向けてプラスミド量と細胞播種密度の検討や生産細胞種による生産性の比較、さらに保存、および輸送などに伴う安定性の検討などである。さらなる安全性向上を中心とした探索的仕事として、相同組み換えによる遺伝子修復、AAVrep 遺伝子を用いた染色体の AAVS1 領域への遺伝子の特異的組み込みとともに、発現 FVIII の止血効果をヒトに近い動物で確認するために血友病 A クローンボタの作製を進めた。この他、肝細胞の異所性移植による FVIII の産生、ES 細胞の利用、血管内皮前駆細胞に FVIII 遺伝子を導入して FVIII を発現させる可能性などの研究を展開した。(II)インヒビター対策：血友病 A マウス生下時に頸静脈より、或いは胸腺へ直接ヒト FVIII 製剤投与による免疫寛容誘導とそのメカニズムの解析、さらに皮下へマイクロポートを埋め込み製剤を間歇長期投与することによる免疫寛容誘導(ヒト臨床応用されている"ITI")モデルの作製などを検討し

た。

(III)QOL を高めるための調査研究：医師、パラメディカルに患者が加わり、血友病患者の視点から作成したアンケート調査を行い、その解析を定型アンケート、および自由記載欄の順にコンピュータソフトウェアなどを利用して解析した。

#### (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

(I) 遺伝子治療 : マウス骨格筋を標的に AAV1 ベクターを用いた GFP 遺伝子導入では、CMV プロモータでは筋肉細胞に、そして CEP プロモータでは血管内皮に発現が認められた。ヒト血友病因子遺伝子を搭載した場合は、いずれのプロモータ使用でも治療レベルの因子発現が長期にわたり観察された。CEP プロモータを利用するとプロモータ活性を刺激する因子投与で血友病因子発現が誘導された。肝臓を標的にした AAV8、9 ベクターを利用した場合も同様の結果であったが、ユビキタスなプロモータに比べ HCRHAAT プロモータを用いると発現臓器がほぼ肝臓に限局され、発現効率も極めて高かったので、投与ベクター量を減量できるなど安全性の面でも有利であることが示唆された。さらに免疫抑制薬使用も、骨格筋標的に比べ短期間で良いことから、肝臓は生理的産生臓器であるという点のみならず、免疫学的にも標的臓器として有利であることが示唆された。遺伝子導入後、肝機能にも異常なく、1年以上因子の高発現が維持された。マウスでは AAV ベクターを利用した血友病遺伝子治療技術とその安全性が確認されたので、サルを利用した前臨床実験へと歩を進めた。サルでは、ヒトとサルの FIX を識別するモノクロナル抗体を用いた系を用いて発現 FIX を

定量した。骨格筋を標的に AAV1 ベクターを用いてヒト FIX 遺伝子導入を図ったが、適量の免疫抑制薬投与下においてもヒト FIX に対する中和抗体が高率に出現し、発現維持は困難であった。そこで、262 位の Thr のみをヒト配列 Ala に変え(モノクロナル抗体のエピトープ)、他の部位はサル型の変異サル FIX 遺伝子を作製しこれを用いて検討した。免疫抑制薬の長期投与は必要であったが、3頭に2年以上、治療域の FIX の発現維持が観察されている。一方、肝臓を標的に腸間膜静脈枝より AAV8 に変異 FIX 遺伝子を搭載してベクターを投与したところ、1頭に5・20%の発現が見られ、長期発現が維持されていた。しかし、3頭のサルは投与初期から全く発現が見られなかった。組織におけるベクター遺伝子の定量などから、サルが AAV に既感染し、微量の中和抗体が血中に存在し、これが感染を阻止していることが示唆された。これまでに世界的に用いられている中和抗体測定法を用いて予めサルを選択したが、既法は、感度の点で実用に供さないことが明らかになった。そこで、感度アップを図るための種々の検討を重ねた。結果、測定に用いる細胞にベクターを感染させるときに糖類を培地に加えることにより、著しい感度アップを図ることが明らかとなった。結合抗体測定法も、使用する AAV8 の精製度を上げることで感度の上昇が図れた。これらの測定法を用いて、中和抗体の存在するサルを選んで、中和抗体を回避する投与技術の開発を進めた。理論的にマイクロバルーンカテーテルを用いて門脈血を遮断し、洗浄し、短時間血液の存在しない状態でベクターを投与すれば、この目的が達せられることが示唆された。残

念ながら、カニクイザルには市販のカテーテルが細すぎて使用できないために、サルでは開腹して門脈部を開いて、ブルドック鉗子、サーフローなどを用いて血液の遮断、生食による洗浄後、ベクターを直接門脈に投与する方法で発現を観察した。結果、使用したサル3頭で、感染阻害はなく、いずれも10%前後のFIXの発現が維持されている。次に、新規測定法にて、殆ど中和抗体の存在しないサルに末梢静脈からベクターを投与して発現を観察したところ、これらのサルでも感染阻害はなく、発現持続が観察されている。サルでの実験の進行に合わせ、ヒト投与可能 AAV ベクター生産依頼をいくつかの企業に打診した。パテントが海外にあることを理由に良い返事をもたらえなかった。しかし、ディナベックから、数千万円の予算が付けば、作製に協力する確約がとれた。

血液幹細胞に遺伝子を導入し、血小板に発現させるためのプロモータを検索した結果、GPIIb $\alpha$ のプロモータが、最も特異性が高かった。そこで、血友病Aマウスの幹細胞を採取し、これに GPIIb $\alpha$ のプロモータとヒト FVIII 或いはマウス FVIIa 遺伝子を搭載した SIV ベクターを体外で感染させ、自己移植した。いずれの遺伝子を導入したマウスも、導入しないマウスに比べ尾切断後の止血に格段の改善が見られた。インヒビターが存在しても、止血局所で血小板から因子が放出されるために十分な止血がみられた。実際、トロンピンによる血小板刺激により定量可能量 FVIII の放出と、FVIIa の血小板表面への移動が免疫電顕で確認された。数百匹のマウス実験で遺伝子導入による腫瘍化は一例も観察されていないが、安全性を担保するため

にインシュレータの利用を検討した。世界的に使用されているトリ $\beta$ グロビン由来インシュレータは enhance 効果の抑制には効果的であったが、silence 効果抑制には無効であった。使用するベクターに、より特異性の高いインシュレータとして、GPIIb $\alpha$  遺伝子近傍の配列から、トリ $\beta$ グロビンとの競合実験などを用いて候補領域を同定した。SIV ベクターは、*gag/pol* 遺伝子をヒト細胞に最適化するためにコドン改変を行い、第3世代パッケージングベクターからウイルス由来の PRE 配列を除去することが可能になった。またジーントランスファベクター最適化によりベクター生産性が向上すること、および、293細胞よりは293T細胞、293T/17細胞の方が生産性の高いことなどが明らかになった。さらに、ベクターの1回凍結融解、ドライシッパー内3日間などで安定性が確認された。

将来の遺伝子治療の改善と安全性向上のために基礎的探索研究としていくつかの課題を検討した。血友病Aマウスの間葉系幹細胞遺伝子を相同組み換えにより修復し、増殖させてマウスへ戻した。同様に間葉系幹細胞に AAV rep 遺伝子を用いて AAVS1 領域へFIX遺伝子の導入にも成功した。また、正常マウス由来成熟肝細胞を腎皮膜下に異所性移植を試み、治療量FIXの発現に成功した。さらに、正常マウス血管内皮前駆細胞を移植して治療量FVIIIの発現に成功した。ES細胞の利用も検討し、テラトーマ出現率は高かったが、FVIIIの発現には成功した。血友病Aクローンブタの作製はFVIII遺伝子組み換え体細胞が確立でき、移植実験を遂行中である。

(II) インヒビター対策：血友病Aマウス生



後1日以内に頸静脈から、或いは生後4日以内に胸腺内へヒト FVIII 製剤投与により免疫寛容が誘導可能であった。詳細な解析の結果、免疫寛容は FVIII 特異的であり、投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞が FVIII 刺激に対する胸腺内非投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制した。この効果はナイーブマウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞では見られなかった。次にヒト FVIII 投与によりインヒビターが生じた成熟マウスに対し、マイクロポートから間歇的に1年近くにわたる FVIII 製剤投与により、ITI 類似の反応をマウスで確認できた。寛容誘導の容易なマウスと困難なマウスが存在した。

- (III) アンケート調査解析：既に、高頻度に血友病製剤の予防投与が行われていることが明らかになった。また、未だ、血友病に対する社会的偏見が存在し、住む町から離れた病院に通院している患者も存在した。さらに、患者の生活の QOL に最も影響するのは関節内出血であることが明らかになった。自由記載欄の解析からは、年齢別に若干キーワードの異なることが推察された。10代では親の意見が主になるが、血友病への理解、治療法、注射・製剤の進歩、かかりつけ病院などが、さらに30代になると生活や仕事への不安が、そして40代以降になると関節痛やインヒビターに関することが高頻度に見られた。また、10歳代の患者保護者からはエイズに関する偏見を懸念する意見が見られた。

#### D 考察

(I) 遺伝子治療：マウスでの血友病遺伝子治療技術は確立した。サルでは血友病は同定されておらず、FVIII、FIX ともヒトとサルで極めて相同性が高いために、サルを用い

た前臨床実験は導入した遺伝子による発現血友病因子の同定定量が実験のキープointになった。幸い、世界唯一のサルとヒト FIX 識別モノクロナル抗体を作製し得たので FIX 発現実験をサルで先行して進めることが出来た。肝臓での FIX、FVIII の発現はマウスではあまり差が見られないので、FIX 発現実験成果を FVIII にも敷衍できると思われる。しかし、安全性を念頭に、発現 FVIII 測定系を確立し、サルでの実験を進めていく予定である。現在最終段階に入った血友病 A クローンブタ作製は、血友病遺伝子治療において発現 FVIII の止血効果を確認するためのみならず、薬剤判定などに資するところが大きいと思われる。AAV に対する中和抗体測定系も数百倍感度がアップし、実用可能なレベルに達した。AAV は病原性を持たないため、ヒトでも知らない間の AAV 感染はかなり頻度が高いものと推測される。抗 AAV 中和抗体測定により、患者ごとに投与方法を選択して、遺伝子治療を施行出来る技術を確認した意義は大きい。AAV ベクターは殆ど染色体に組み込まれないために細胞分裂により長期間の間には効果の減弱が予測される。我々の確立した技術は、このような場合も、抗 AAV 抗体が存在しても、再度、同じ安全性の高いベクターで治療できる可能性を示唆するものであり、長期間遺伝子治療効果を持続させるためのひとつの breakthrough と考えられる。ヒト投与可能ベクター産生の目安もつき、予算が付き次第、臨床研究を開始できる所までほぼ到達できたと考えている。

SIV ベクターも九州大学眼科で数年内に遺伝子治療に利用される予定になっている。開始に向けて加速的にベクターの改善が進むことが期待される。このベクターを用いた血小板運び屋に利用する遺伝子治療は、凝固学的には極めて魅力的である。効

果的なインシュレータの探索を進め、安全性を担保し、この方法をもまた臨床応用できるように検討を進めていきたいと考えている。遺伝子治療のさらなる安全性に向けた探索研究も順調に推移しており、今後の発展が期待できる。

(II)インヒビター対策：頸静脈では生後1日が限界であった FVIII 製剤投与による寛容誘導期間が胸腺へ直接 FVIII 因子製剤を投与することで生後4日まで延びた。フランスのグループから臨床応用の打診があったが、今後検討していくべき課題であると考ええる。ITI のモデルが作製できた意味も大きい。寛容誘導の難易度の差が何に基づくかをマウスリンパ節、脾臓などの解析から明らかにしていくことが今後の課題であろう。さらに、難易度を判定するマーカーを見つけて、治療早期に ITI 続行の適応を判定できるなら、その経済的効果も大きいものになる。

(III)調査研究：患者視点からのアンケート調査は、それ自体独創性の高いものであり、その解析は患者 QOL 向上のために計り知れない価値を有するものと思われる。ただ、今回は回収率がやや低かったので、この点を工夫して次の一手を考案すれば、確信を持って政策提言できるような情報の集積が可能になると信じる。

## E. 結論

AAV ベクターを用いた遺伝子治療はマウスを用いた基礎的検討から、サルを用いた前臨床試験まで、いくつかの問題点を一つ一つ解析し、解決のための技術を確立してきた。予算が付いてヒト投与できるレベルの AAV ベクターが生産できれば臨床研究開始は可能なレベルに到達したと考える。臨床試験のための施設、システムの整備を含めて、歩を進めていく必要がある。SIV ベク

ターの安全性も高まりつつある。長期、効率よく血小板に血友病因子を発現させる我々の技術は凝固学的には意義のあるものであり、魅力的なものである。インヒビター対策も、生下時の免疫寛容誘導法の検討から、成熟後発症したインヒビター対策のためのモデル政策まで、この3年間に格段の進歩が見られた。調査研究は、患者視点に立って作製したアンケートの獨創性にその価値が見られる。QOL 向上のための政策提言が出来るレベルまで解析が進むことが期待される。

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  $\alpha$  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。血友病 B 遺伝子治療: 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) あるいはヒト FIX を発現する AAV ベクターを用いた FIX 遺伝子導入をマウスで検討した。CMV プロモーターと AAV1 ベクターによる FIX 遺伝子の骨格筋への導入では治療域の FIX 発現が長期間得られた。プロモーターを CEP に変えることで、内皮細胞特異的な FIX 発現が得られ、誘導可能な FIX 遺伝子発現が得られた。HCRHAAT プロモーターと AAV8 ベクター、あるいは HCRHAAT プロモーターと AAV9 ベクターを用いた FIX 遺伝子導入では正常以上の FIX 発現が得られた。マウスで FIX 発現がえられたベクターを用いカニクイザルで FIX 遺伝子導入実験を行った。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 1000%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から投与したところ、中和抗体陰性個体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と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療法のマウスモデルを確立した。

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

#### 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)

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 ベクターヘトリ 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、マイクロポー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投与時の導入遺伝子由来 FVIII への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。

### 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、AAV1 ベクターにより骨格筋へのイヌ FVIII 遺伝子導入、また AAV8 ベクターによる肝臓へのイヌ FVIII 遺伝子導入に成功した。骨格筋への遺伝子導入では発現量が低くインヒビター発生の問題が生じた。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、また、インヒビターの発生の問題も解決された。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  $\alpha$  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

一を作製し、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作製を進めている。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 とともに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ため、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。特異的モノクロ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 AAV ベクターを用いた FIX 遺伝子導入をマウスで検討した。CMV プロモーターと AAV1 ベクターによる変異カニクイザル FIX 遺伝子の骨格筋への導入では治療域の FIX

発現が長期間得られた。プロモーターを CEP に変えることで、内皮細胞特異的な FIX 発現が得られ、誘導可能な FIX 遺伝子発現が得られた。HCRHAAT プロモーターと AAV8 ベクター、あるいは HCRHAAT プロモーターと AAV9 ベクターを用いた FIX 遺伝子導入では正常以上の FIX 発現が得られた。マウスで FIX 発現がえられたベクターを用いカニクイザルで FIX 遺伝子導入実験を行った。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る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。

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<sup>+</sup>T細胞、抗原提示細胞(APC)およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞増殖活性を<sup>3</sup>H-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<sup>+</sup>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- $\gamma$ も産生しなかった。胸腺内投与マウス由来CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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、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パルーンを用いて、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、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。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た。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
  8. Ohmori T, Sakata Y: Platelet-directed gene therapy. *Transfus Med Hemoth.* (34)429-439.2007
  9. 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.
  10. Ito, T., Okada, T., Mimuro, J., Miyashita, H., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Takahashi, M., Ikeda, U., Sakata, Y., Shimada, K., Ozawa, K.: Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-6, 2007.
  11. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino 的検討(会議録)臨床血液(0485-1439) 48 巻 9 号 Page843, 2007.
  17. 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(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号 Page437, 2007.
  18. 大森 司: 遺伝子改変動物から学ぶ血栓症血友病遺伝子治療を目指した遺伝子改変マウス(解説)血栓と循環(0919-7036)15 巻 3 号 Page222-225, 2007.
  19. 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
  - 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.
  12. 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.
  13. 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(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441) 18 巻 5 号 Page462, 2007.
  14. 大森 司, 柏倉裕志, 石渡 彰, 窓岩清治, 三室 淳, 坂田洋一: レンチウイ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(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441) 18 巻 5 号 Page477, 2007.
  15. 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(会議録)臨床血液(0485-1439) 48 巻 9 号 Page884, 2007.
  16. 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 of spinal cord injury. *Stem Cells.* 25(1):115-24, 2007.
  20. 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.
  21. Madoiwa S, Nunomiya S, Ono T, Shintani Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y: Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation *Int J Hematol.* 84(5):398-405.2006
  22. Ohmori T, Mimuro J, Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M,

- Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K, and Sakata Y.: Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ib alpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J.* 20(9):1522-4, 2006.
23. Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y.: A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost.* Aug;4(8):1738-46, 2006.
  24. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y.: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J. Thromb. Haemost.* (4)1271-1278.2006.
  25. Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Okada T, Mizukami H, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y.: Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res.* 118(5):627-35, 2006.
  26. Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K.: Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 17(9):921-8.2006.
  27. Ogura T, Mizukami H, Mimuro J, Madoiwa S, Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, Sakata Y, Ozawa K.: Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med.* 8(8):990-7, 2006.
  28. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデルを用いた血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P610, 2006.
  29. 柏倉裕志, 三室淳, 石渡彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 A 遺伝子治療前臨床試験へ向けた標識カニクイザル FVIII の遺伝子導入(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P609, 2006.
  30. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来の AAV ベクターを用いた検討(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P608, 2006.
  31. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 8 型 AAV ベクターの in vivo 投与における効果と肝臓への強指向性(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 Page608, 2006.
  32. 大森司, 高野勝弘, 柏倉裕志, 石渡彰, 新村真則, 窓岩清治, 諏合輝子, 三室淳, 見供克之, 長谷川護, 坂田洋一: 血液凝固第 VII 因子の発現による止血反応を強化した血小板の作成(会議録)日本血栓止血学会誌(0915-7441)17 巻 5 号 P595, 2006.
  33. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子, 松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司, 窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋二, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病 B 遺伝子治療における AAV ベクターの有用性(会議録)臨床血液(0485-1439)47 巻 9 号 P1170, 2006.
  34. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: AAV ベクターによる肝臓を標的とした血友病 B 遺伝子治療の検討(会議録)臨床血液(0485-1439)47 巻 9 号 P1169, 2006.
- 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, 坂田洋二: 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. 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.
  9. 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.
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 石渡 彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森 司, 諏合輝子, 窓岩清治, 岡田尚巳, 久米晃啓, 寺尾恵治, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデルを用いた血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
  16. 柏倉裕志, 三室淳, 石渡 彰, 新村真則, 高野勝弘, 大森 司, 諏合輝子, 窓岩清治, 水上浩明, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデル血友病 A 遺伝子治療前臨床試験へ向けた標識カニクイザル FVIII の遺伝子導入. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
  17. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 窓岩清治, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 新生仔マウスに対する遺伝子導入の効果 各血清型由来の AAV ベクターを用いた検討. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会, 2006 年 11 月 16-18 日 宇都宮
  18. 水上浩明, 小倉剛, 三室淳, 岡田尚巳, 松下卓, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: 8 型 AAV ベクターの in vivo 投与における効果と肝臓への強指向性. 第

29 回日本血栓止血学会学術集会、2006 年  
11 月 16-18 日 宇都宮

19. 大森司, 高野勝弘, 柏倉裕志, 石渡彰,  
新村真則, 窓岩清治, 諏合輝子, 三室淳,  
見供克之, 長谷川護, 坂田洋一: 血液凝固  
第 VII 因子の発現による止血反応を強化し  
た血小板の作成. 第 29 回日本血栓止血学  
会学術集会、2006 年 11 月 16-18 日 宇都  
宮
20. 三室淳: 出血傾向 病態・診断・治療の新  
展開 血友病遺伝子治療. 第 29 回日本血  
栓止血学会学術集会、2006 年 11 月 16-18  
日 宇都宮
21. 水上浩明, 三室淳, 石渡彰, 小野文子,  
松下卓, 岡田尚巳, 卜部匡司, 大森司,  
窓岩清治, 久米晃啓, 寺尾恵治, 坂田洋  
一, 小澤敬也: 骨格筋を標的とした血友病  
B 遺伝子治療における AAV ベクターの有  
用性. 第 68 回日本血液学会総会、第 48 回  
日本臨床血液学会総会、2006 年 10 月 6-8  
日 福岡
22. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子,  
柏倉裕志, 新村真則, 高野勝弘, 大森司,  
諏合輝子, 窓岩清治, 寺尾恵治, 小澤敬  
也, 坂田洋一: AAV ベクターによる肝臓  
を標的とした血友病 B 遺伝子治療の検討.  
第 68 回日本血液学会総会、第 48 回日本臨  
床血液学会総会、2006 年 10 月 6-8 日 福  
岡

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)

状態: 出願中 (未公開) (2005/10/28)

「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)