

models of retinitis pigmentosa. *J. Gene Med.* 10(12): 1273-1281, 2008

Ohmori T., Ishiwata A., Kashiwakura Y., Madoiwa S., Mitomo K., Suzuki H., Hasegawa M., Mimuro J. and Sakata Y. Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol. Ther.* 16(8): 1359-1365, 2008.

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.

Persistent Gene Expression Over the Life-time of Airway Epithelial Cells Transduced by Lentiviral Vector Pseudotyped with Envelope Proteins F and HN from Sendai Virus Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. *J. Gene Med.* 2006; Vol. 8: p1444

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. (2006) Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ibalpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. *Faseb J* 20: p1522-1524.

Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Shirakura, M., Kanaya, T., Yoshizaki, M., Hironaka, T., Nagai, Y., Iida, A., and Hasegawa, M. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties. *J Gene Med* 6: 1069-1081, 2004.

## 2. 学会発表

Tabata T., Mitomo K., Inoue M., Yoshizaki M., Ikeda Y., Yonemitsu Y. and Hasegawa M. Retinitis pigmentosa gene therapy: Characterization of the integration sites of a Simian lentivirus vector (SIVagm) in the target cells XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy Athens, Greece, 9-12, November (2006)

Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. 第12回日本遺伝子治療学会 東京都千駄木 (日本医科大学) 2006年8月24日-26日: 2006年8月26日: Plenary Session II (Pre-Clinical)

Persistent Gene Expression Over the Life-time of Airway Epithelial Cells Transduced by Lentiviral Vector Pseudotyped with Envelope Proteins F and HN from Sendai Virus

Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Tabata T., Ueda Y., Fujikawa S., Washizawa K., Somerton L., Geddes D.M., Alton E.W.F.W., and Hasegawa M. New Pseudotyping with Sendai Virus Glycoproteins Realized Very Long-Term Gene Expression in Airway Epithelia by Simian Immunodeficiency Virus Vector. The 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, (05. 10. 30.)

October 29–November 1 (Prague, Czech Republic), 2005

Mitomo K., Inoue M., Ueda Y., Ikegami M., Griesenbach U., Alton E.W.F.W. and Hasegawa M. Towards Cystic Fibrosis and airway gene therapy : Evaluation of EGFP Gene Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN. The American society of gene therapy's 8th annual meeting June 1–5 (Saint Louis, MO, USA), 2005

Mitomo K., Inoue M., Ueda Y., Ikegami M., Fujikawa S., Washizawa K., Griesenbach U., Alton E.W.F.W. and Hasegawa M. Evaluation of EGFP Gene

Expression in Murine Nasal Airways Mediated by Simian Immunodeficiency Virus Vectors Pseudotyped with Sendai Virus Glycoproteins F and HN  
International Union of Microbiological Societies XIII International Congress of Virology July 23–28 (San Francisco, California, USA), 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 「2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター」

- ・国際出願 (国際公開番号 W02000/78987)
- ・日本 (登録番号 3526844)、米国 (登録番号 6979568) にて特許権設定登録している。

(2) 「ヘマグルニチン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウィルスベクター」

- ・国際出願 (国際公開番号 W02001/92508)
- ・韓国 (登録番号 10-0807016) にて特許権設定登録している。
- ・米国の出願は、特許査定を受けた。米国において、現在特許権設定登録手続中である。

(3) 「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウィルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」

- ・国際出願 (国際公開番号 W02002/101057)
- ・オーストラリア (登録番号 2002258248)、韓国 (登録番号 10-0682708) にて特許権設定登録している。

(4) 「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウィルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」 (D3-A0204)

・国際出願 (国際公開番号 W02004/22731)

(5) 「SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

・国際出願 (国際公開番号 W02006/90689)

(6) 「PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬」

・国際出願 (国際公開番号 W02006/90697)

(7) 「血液凝固異常の治療方法」

・国際出願 (国際公開番号 W02007/49749)

(8) 「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」

・国際出願 (国際公開番号 W02007/49752)

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
総合(分担)研究報告書

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

研究分担者 天野 景裕 東京医科大学

研究協力者 清田 育男、篠澤 圭子、稲葉 浩 東京医科大学

研究要旨:

血友病を主とした血液凝固因子異常症の遺伝子解析を行い、見出された変異について遺伝子組み換えによる発現実験を行うことで、血友病の分子病理を検討する。本邦での血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、その対象となる患者の遺伝子型の把握は基礎データとして不可欠である。血友病患者の個々の症例において、遺伝子型を把握することは、変異の種類によって異なるインヒビター発生率を考慮し、遺伝子治療の適切な対象者を選択していくための有用な情報となる。また、分子病理の解析は、遺伝子治療として効率の良い第Ⅷ因子(FVIII)や第Ⅸ因子のデザインを作成するための基礎データとなる。この3年間において、以下の解析を行った。

1. 先天性第Ⅴ因子(FV)欠乏症の遺伝子解析と発現実験:血漿中 FV 活性は同様に低下していたが、臨床的な出血症状に差違が認められた 3 症例を解析した。出血症状の差違は、血小板内 FV の抗原量と機能に関連していると考えられた。これは、凝固異常症の遺伝子治療において、凝固因子を発現させる細胞のターゲットを血小板とすることの重要性を示唆している。
2. 血友病 A の遺伝子解析:血友病 A 患者 45 症例(重症 17 例、中等症 3 例、軽症 25 例)を解析した。これまでに報告のない遺伝子異常が多く検出され、血友病 A の病因遺伝子異常は多様性に富んでおり、またそれは人種によって差異があるであろうことが再確認された。これらのことは、血友病 A 患者の遺伝子解析は、今後も継続した解析が必要であることを示唆している。
3. インヒビター発生症例の解析:頻回の FVIII 製剤投与歴があるにもかかわらず人工股関節置換術を持続輸注下で施行後、インヒビターが出現した血友病 A 症例について、血友病 A の遺伝子異常や TNF $\alpha$ 、IL-10G、CTLA-4 遺伝子などの免疫反応修飾物質のポリモルフィズムを解析した。インヒビター発生には、これらの影響に加えて、手術、感染、投与方法など様々な契機となる要因が考えられる。これら要因を多面的に評価・整理していくことが、重要なことである。

A. 研究目的

本邦での血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、その対象となる患者の遺伝子型の把握は基礎データとして不可欠である。血友病患者の個々の症例において、遺伝子型を把握することは、変異の種類によって異なるインヒビタ

一発生率を考慮し、遺伝子治療の適切な対象者を選択していくための有用な情報となる。また、分子病理の解析は、遺伝子治療として効率の良い第Ⅷ因子(FVIII)や第Ⅸ因子のデザインを作成するための基礎データとなる。この3年間において、以下の解析を行った。

## 1. 先天性第V因子欠乏症の遺伝子解析と発

現実験:先天性第V因子欠乏症は内因および外因系凝固にかかわる血液凝固第V因子(FV)の活性が欠乏している遺伝性出血性疾患で、バラ血友病ともいわれている。FVは分子量約330kDaの1本鎖糖タンパクで、FVIIIと同様のドメイン構造をとり、約40%のホモロジーがある。FVIIIにおけるテンエース複合体のように、血小板膜上でカルシウムイオンの存在下に活性化第X因子(FXa)とともにプロトロンビネース複合体を形成し、補因子として働くという凝固因子としての役割もFVIIIに類似している。そこで、先天性第V因子欠乏症のFV遺伝子(F5)解析と分子病理の解析を行った。

2. 血友病Aの遺伝子解析:血友病Aは先天性の出血性疾患であり、X染色体長腕上のFVIII遺伝子の変異に起因する。血友病Aを引き起こす遺伝子変異は非常に多様であり、点変異、逆位、欠損、挿入などがこれまで報告されているが、それぞれの変異、特にその発生頻度に関しては人種間で異なる可能性も高い。そこで我々は、我が国における血友病Aの病因遺伝子変異の特徴を検討すべく、日本人血友病A患者のF8解析を行った。

3. インヒビター発症例の解析:血友病Aの重大な合併症としてインヒビターの発生がある。インヒビターの発生要因は様々であり、患者側因子として血友病Aの遺伝子変異に加え、免疫反応修飾物質の影響が報告されている。そして、治療側因子として凝固因子製剤の投与方法や環境などがあげられている。頻回のFVIII製剤投与歴(Previously Treated Patients: PTPs)があるにもかかわらず人工股関節置換術(total hip arthroplasty: THA)を持続輸注下で施行後インヒビターが出現した血友病A症例を経験したので解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 先天性第V因子欠乏症の遺伝子解析と発現実験

#### ①FV活性(FV:C)、FV抗原(FV:Ag)の測定

3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。FV:Cは自動血液凝固能測定装置を用い、PT試薬とFV欠乏血漿を用いて凝固一段法で測定した。FV:Agはポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法で測定した。

#### ②遺伝子解析

ゲノムDNAを患者末梢白血球よりフェノール・クロロホルム法で抽出し、F5の25のエクソンおよびそのイントロン境界領域を、設計した25対のプライマーを用いPCRで増幅した。それぞれのPCR産物のダイデオキシ法によるダイレクトシーケンシングを行った。

#### ③血小板内FVの解析

1ml中に $10^9$ 個に調整した患者血小板浮遊液のFV:AgをELISA法で測定した。また、血小板中のFV-mRNA発現を確認するために、調整血小板ペレットをホモジナイズ後、RNAを抽出し、それぞれの変異部位をはさんだプライマーを用いて、RT-PCRを行った。

#### ④変異FVプラスミドの作成

野生株FV合成プラスミドpMT2FVを鋳型として、site-directed mutagenesis kitにより変異FVを含むプラスミドを作成した。組み込まれた変異はダイレクトシーケンシングにてその配列を確認した。

#### ⑤リコンビナントFVの発現

精製したプラスミドはHEK293細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションを行った。培養48時間後の上清を回収し、FV:Cを測定した。

## 2. 血友病Aの遺伝子解析

### ①凝固学的検査

#### A) 第VIII因子活性(凝固一段法)

第VIII因子活性(FVIII:C)は第VIII因子欠乏血漿とAPTT試薬を用い、自動血液凝固測定

装置 ACL9000 を用いて測定した。

#### B) 第Ⅷ因子抗原量 (FVIII:Ag)

アセラクロム VⅢIC:Ag キットまたは Matched-Pair Antibody Set for ELISA of human Factor VIII antigen を用いて行なった。

#### ②DNA 解析

##### A) DNA 抽出

末梢血白血球から BioRobot EZ1 を Buffy Coat Protocol にて操作し、EZ1 DNA Blood 350 ul Kit を用いて抽出した。

##### B) 第Ⅷ因子遺伝子 (F8) の解析

F8 の 5' 非翻訳領域 (プロモーター領域)、各エクソンとそのイントロンとの境界領域、3' 非翻訳領域は、合計 34 分割して PCR にて増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて分離・精製し、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。ダイレクトシークエンスは、テキサスレッド標識プライマーと ThermoSequenase™ を用いたサイクルシークエンスで行い、塩基配列の解析は蛍光パーソナルシークエンサーを用いて行なった。

#### 3. インヒビター発症例の解析

##### ①凝固学的検査と第Ⅷ因子遺伝子 (F8) の解析

上記と同様の方法で行った。

##### ③インヒビターに関連する免疫反応修飾物質の遺伝子多型解析

血友病 A とインヒビターの発生に関して Astermark が報告している免疫修飾物質である TNF $\alpha$ 、CTLA4、IL-10G の 3 種類のポリモルフィズムについてそれぞれプライマーを設計し、PCR・ダイレクトシークエンスを行い、患者のアリルを確認した。

##### (倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで

解析を行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 先天性第Ⅴ因子欠乏症の遺伝子解析と発現実験

①患者の F5 遺伝子解析結果、患者血漿中 FV:C と FV:Ag の測定結果、出血症状の重症度、患者血小板内 FV:Ag と血小板内 FV の mRNA 発現量。

症例 1: V1813M のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はそれぞれ 1% 未満、4% で中等度の出血症状を呈していた。血小板内 FV:Ag は、ほとんど認められず、血小板内 FV の mRNA は正常対象の半分程度に低下していた。

症例 2: R2174L のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はそれぞれ 1%、5% で非常に軽度の出血症状であった。血小板内 FV:Ag は正常対象と同等量認められ、血小板内 FV の mRNA も正常対象と同等量認められた。

症例 3: N468S のホモ接合体で、血漿中 FV:C と FV:Ag はともに 3% で出血症状は認められなかった。血小板内 FV:Ag は正常対象に比較して 10% 程度と低下しているが検出された。血小板内 FV の mRNA は正常対象と同等量認められた。

##### ②リコンビナント FV の発現結果

培養上清中の FV:C はそれぞれ野生型を 100% とした時、症例 1: 28 $\pm$ 2%、症例 2: 40 $\pm$ 3%、症例 3: 81 $\pm$ 7% であった。

#### 2. 血友病 A の遺伝子解析

##### ① 重症例 17 例

F8 イントロン 22 に存在する遺伝子内遺伝子 (*int22h1*) に起因する逆位が 6 例 (35%) から検出された。イントロン 1 に存在する *int1h1* に起因する逆位は検出されなかった。点変異は 6 例検出され、このうち 5 例はミスセンス変異であった。これらのうち 3 例はこれまでに報告のない変異であった。欠損変異は 3 家系 4 症例 (25%) で検出された。

これまでの解析では、欠損は小規模である場合が多く報告されているが、今回の解析ではエクソン 2-6 を欠失する大きな規模での欠損が検出された。1例からは変異が同定できなかった。

#### ② 中等症例 3例

検討した3例中2例から、既報告の点変異が検出された。しかしながら既報告例では、一部の症例は軽症に分類されていた。1例からは変異が同定できなかった。

#### ③ 軽症例 25例

全ての症例(25例)から点変異を同定した。このうち23例はアミノ酸の置換を伴う変異であったが、2例はコーディング領域外での変異であった。コーディング領域内で検出された点変異はF8の広範囲に分布していたが、欧米人を中心としたデータベースと比較してTyr473、Arg531での変異が高頻度で検出された。これまでに報告のない点変異が4例検出された。

#### ④ コーディング領域外での変異

コーディング領域内に異常を認めなかった2例ではIVS-10と3' UTRに点変異を検出した。両変異はこれまでに変異やポリモルフィズムとしての報告がなく、また我々の日本人を対象とした解析においても同様の変異が認められなかったことから、非常に稀有なものであることが確認されたが、これが病因であるのかについては不明である。

### 3. インヒビター発症症例の解析

#### ① 症例

20歳代 男性、体重70kg。血友病A重症型で5歳から各種FVIII製剤(非加熱濃縮製剤、加熱濃縮製剤、モノクローナル抗体製剤、遺伝子組み換え製剤)の投与を行い、19歳時硬膜下血腫の際に持続輸注歴(計44000単位)がある。また、定期補充療法歴もあるが、インヒビターを認めたことはなかった。HIV陽性であるがウイルス量が低く、CD4も保たれているため内服治療は行っていない。HCVに対しては、インターフェロン治療は、まだ施行されていない。

血友病性関節症増悪のため右THAをrFVIII製剤4000単位投与後、4単位/kg/hの持続輸注下で施行した。術中出血は少量で、術後も持続輸注を継続し術後15日目より連日2000単位のボラス投与に変更した。経過中に感染は認めなかった。入院中rFVIII製剤を42日間計147,000単位を使用した。抜歯後の止血困難に対し、術後52日目に回収率を確認したところ38%と低下、半減期は1時間と短縮し、インヒビター2.1BU/mlを確認した。週3回rFVIII製剤2000単位の定期輸注を継続し低用量免疫寛容導入療法(immune tolerance induction therapy: ITI)を行ったところ、インヒビター値は最高90.6BU/mlまで上昇したが、徐々に低下し、1年後にはインヒビターは消失し回収率118%、半減期8時間と回復した。その後、左THAをFVIII製剤ボラス投与下で施行した際にはインヒビターは発生しなかった。

#### ② FVIII:CおよびFVIII:Agの測定

FVIII:C、FVIII:Agともに1%未満であり、患者は血友病A重症型でFVIIIタンパクが血漿中に認められないCross-Reacting Material-negative (CRM-)であった。

#### ③ 第VIII因子遺伝子(F8)の解析

第VIII因子BドメインをコードするExon14のGlu1038Lysのミスセンス変異を同定した。イントロン22の逆位は検出されなかった。

#### ④ インヒビターに関連する免疫反応修飾物質の遺伝子多型解析

1)TNF $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の-308(G/A)

インヒビター発生率が高頻度でない-308G/Gであった。

2)CTLA-4 遺伝子プロモーター領域-318(C/T)

インヒビター発生率が高頻度の-318C/Cであった。

3)IL-10G 遺伝子プロモーター領域のCAリピート

IL-10G 遺伝子のCAリピート数は22回である。Astermarkの論文においてインヒビターの発生率の高い134bpアリルはCAリ

ピート数 19 回に対応すると考えられるが、患者の CA リピート数は 20 回と 21 回のヘテロ接合体であり、非 134bp アリルに属することを確認した。

#### D. 考察

##### 1. 先天性第 V 因子欠乏症の遺伝子解析と発現実験

FV は肝臓と巨核球において合成され、FV 総量の 80% は血漿中に、20% は血小板内  $\alpha$  顆粒に存在している。先天性 FV 欠乏症で、臨床的に出血症状を示すのは通常ホモ接合体のみであり、FV 活性は 1% 以下から 10% を示す。出血症状は通常、軽度であることが多いが、外傷や外科的手術後（抜歯を含む）に際しては異常出血のリスクとなり、また硬膜下出血や関節内出血、筋肉内血腫などの重症出血をきたす例も報告されている。血漿 FV 活性が 1% 以下でも全く無症状の症例もあり、血漿 FV 活性のみでは、その出血症状の重症度は予測困難である。

今回、解析した先天性 FV 欠乏症 3 症例の血漿中 FV 活性は 5% 未満と低下しており、それぞれ異なったホモ接合体の変異が検出された。中等度の出血症状を示した症例 1 の V1813M 変異では、血小板内 FV の mRNA 発現が低下しており、血小板内 FV:Ag もほとんど検出されなかった。一方、出血症状が軽度であった症例 2 の R2174L 変異では、血小板内 FV の mRNA も FV:Ag も正常と同等量認められた。このことから、血漿中 FV:C は同程度低下していても、血小板内 FV の存在により、出血症状が規定されている可能性が示唆された。全く無症状であった症例 3 の N468S 変異でも、正常と同等量の血小板内 FV が認められるのではないかと推測したが、結果は低下していた。しかし、リコンビナント発現実験の結果から、N468S 変異 FV は 80% と高い活性を有していることが示されたため、少ない血小板内 FV ではあるが、十分な活性をもった FV であるため

に、局所における止血には機能したと考えられる。以上より、先天性 FV 欠乏症患者の出血症状の重症度は、血小板内 FV の抗原量と機能に関連していることが示唆された。

##### 2. 血友病 A の遺伝子解析

1984 年に F8 がクローニングされて以来血友病 A 患者の F8 の解析は積極的に進められ、これまでにすでに様々な変異が病因として検出されてきた。しかしながらそれは想像以上に多様性に富んでおり、症例の解析件数を増せば増すほど新たな変異が検出される。また一方で F8 に異常が検出されない症例も存在する。今回の 45 例という限られた症例の解析においても、これまでに報告のない遺伝子異常が多く検出され、また同時に遺伝子異常が検出されない症例も確認された。これらのことは、血友病 A 患者の遺伝子解析は、今後も継続した解析が必要であることを示唆している。

軽症例 (25 例) における解析で Tyr473Cys、Arg531Cys、Arg531His 変異がそれぞれ 3 例 (12%)、4 例 (16%)、3 例 (12%) と高頻度で検出されたことは非常に興味深い。欧米人の解析を中心とした血友病 A 変異データベース (HAMStERS) によれば軽症例 769 例の解析において、Tyr473Cys は 5 例 (0.7%)、Arg531Cys は 28 例 (3.6%)、Arg531His は 17 例 (2.2%) しか報告されておらず、日本人での検出頻度が圧倒的に高い。今回の解析が無作為に集められた症例によって行われたものであることを考えると、これらの変異は日本人に特徴的なものである可能性も示唆された。

##### 3. インヒビター発症例の解析

本症例におけるインヒビターの発症要因は以下のようにまとめられる。

###### ●患者側因子

- 低リスク因子: ①TNF $\alpha$  と IL-10G のポリモルフィズムはインヒビター発症高頻度型ではないこと。②第 VIII 因子遺伝子変異がミスセンス変異であること。



□高リスク因子：①血友病 A 重症型 (CRM-)であること。②CTLA-4 遺伝子プロモーター領域がインヒビター発生高頻度型であること。

●治療側因子

□低リスク因子：①PTPsであること。②定期補充療法歴があり、総投与日数 200 日以上であること。

□高リスク因子：①初めての大手術であったこと。②持続輸注で止血管理したこと。

インヒビター発生には、第Ⅷ因子遺伝子異常の種類や免疫反応修飾物質などの影響に加えて、手術、感染、投与方法など様々な契機となる要因が考えられる。

E. 結論

1. 先天性第Ⅴ因子欠乏症の遺伝子解析と発現実験

先天性 FV 欠乏症の遺伝子解析と分子病理の解析により、臨床的出血症状との関連が血小板内 FV に依存している可能性を明らかにすることができた。これは、今後の血友病をはじめとする凝固異常症の遺伝子治療において、凝固因子を発現させる細胞のターゲットを血小板とすることの重要性を示唆している。

2. 血友病 A の遺伝子解析

血友病 A の病因遺伝子異常は非常に多様性に富んでおり、またそれは人種によって差異があるであろうことが再確認された。血友病 A の遺伝子解析は、血友病 A の診断・病態把握に非常に有効であり、遺伝子治療を代表とする先端医療の適応や血友病のオーダーメイド医療には不可欠である。

3. インヒビター発症例の解析

血友病の遺伝子治療を行っていく上で、インヒビター発生は常に注意しなければならない合併症である。インヒビター発生にかかわる要因を多面的に評価・整理してい

くことは、重要なことである。第Ⅷ因子遺伝子異常のみならず、インヒビター発生に関して、日本人における免疫反応修飾物質のポリモルフィズムの特徴を明らかにしていくことが、今後、有用な情報となると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. 天野景裕: 先天性第Ⅴ因子欠乏症、浅野茂隆、池田康夫、内山卓監修、三輪血液病学 第 3 版。東京、文光堂、2006 年、1715-1717
2. 内田泰斗、天野景裕、篠沢圭子、稲葉浩、福武勝幸: 血友病 A 患者に認められた第Ⅷ因子 A1 ドメイン内のミスセンス変異 Asp116Asn の分子病態。東京医科大学雑誌 64(4):380-387、2006
3. 西田恭治、加藤宏基、藤平輝明、沢田貴志、天野景裕: 国際化社会における HIV 感染症診療の問題点。東京医科大学雑誌 64(4):424-434、2006
4. 藤井輝久、高田昇、日笠聡、酒井道生、竹谷英之、櫻井嘉彦、花房秀次、小阪嘉之、天野景裕、嶋緑倫、吉岡章: 日本の血友病類縁疾患患者の入院医療コストの集計: 多施設共同研究。日本血栓止血学会雑誌 17(4):446-453、2006
5. 天野景裕: 臨床的検査データのとらえ方。Medical Technology 34(11):1157-1160、2006
6. Shinozawa K, Amano K, Suzuki T, Tanaka A, Iijima K, Takahashi H, Inaba H, Fukutake K. Molecular Characterization of 3 Factor V mutations, R2174L, V1813M, and a 5-bp Deletion, That Cause Factor V Deficiency. Int J Hematol 86:407-413, 2007
7. 太田祥一、天野景裕、宮城 学、本間

- 宙、武井康悦、小澤拓郎、川原千香子、高城由紀、相内敦子、窪田達也、中村一郎、張替喜世一、関根和弘、高梨利満、岡野谷 純、竹内保男：基礎編 救急医療システムの現状と教育プログラム CPR+AED コースマニュアル 監修：行岡哲男、山科 章、医学書院、東京、2007年
8. 西田恭治、山元泰之、香川和彦、天野景裕、鈴木隆史、篠澤圭子、尾形享一、内田泰斗、高 明志、大瀧 学、加藤宏基、清田育男、福武勝幸：HIV 感染症におけるウィルス性肝炎感染状況と A・B 型肝炎ワクチンの効果に関する研究。日本エイズ学会誌 9(1):30-35、2007
  9. 高 明志、鈴木隆史、篠澤圭子、稲葉浩、辻川昭仁、天野景裕、新井盛大、福武勝幸：血友病 B を引き起こす 4 種の新しいミスセンス変異。日本血栓止血学会誌 18(2):166-174、2007
  10. 天野景裕：最新の血友病の止血管理。Medical Practice 24 (12) :2165-2170、2007
  11. 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：国内における遺伝子組換え活性型凝固第Ⅶ因子製剤（注射用ノボセプン®）の高用量単回投与に関する臨床研究 第Ⅰ相試験結果—安全性についての報告。日本血栓止血学会誌 18(6):614-618、2007
  12. 田中一郎、天野景裕、瀧正志、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、松下正、三間屋純一、吉岡章、嶋緑倫：わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に対するバイパス止血療法の現状。日本血栓止血学会誌 18(6):627-639、2007
  13. 天野景裕：後天性血友病の診断（血友病部会：後天性血友病の診断と治療）第 2 回日本血栓止血学会学術標準委員会 2007 シンポジウム報告。日本血栓止血学会誌 18(4):373、2007
  14. 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
  15. 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 定量キットコバスタqMan HIV-1「オート」の検討。感染症学会雑誌 82(1):20-25、2008
  16. 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
  17. 天野景裕：抗 HIV 療法ガイドライン。治療学 42(5):501-505、2008
  18. 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
  19. 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（注射用ノボセプン®）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
20. 大瀧学、稲葉浩、篠沢圭子、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
  21. 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
  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：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
  23. 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
  24. 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、医薬ジャーナル、東京、2009年. p117-126
  25. 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.
- 学会発表
1. Uchida T, Amano K, Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Fukutake K.: An Asp116Asn mutation within a factor VIII does not make new N-glycosylation site. XXVIIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
  2. Tsujikawa A, Shinozawa K, Inaba H, Suzuki T, Amano K, Fukutake K.: Twenty-five different mutations in factor IX gene were detected from 30 Japanese patients with hemophilia B. XXVIIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
  3. Shinozawa K, Amano K, Suzuki T, Iijima K, Inaba H, Fukutake K.: Arg2174Leu missense mutation in the factor V deficiency with mild bleeding diathesis. XXVIIIth International Congress of the World Federation of Hemophilia, 2006, Vancouver, Canada.
  4. 天野景裕：血友病止血補充療法のガイドライン —欧米のガイドラインの紹介— . 日本血栓止血学会学術標準化委員会 2006 シンポジウム、2006年、東京.
  5. 天野景裕：血友病の検査の基本と最近のトピックス、第 12 回北海道血友病研究会、2006年、札幌
  6. 清田育男、篠沢圭子、加藤宏基、高明志、辻川昭仁、鈴木隆史、天野景裕、稲葉浩、福武勝幸：第IX因子遺伝子に2つの変異が検出された重症型血友病 B の1症例。第 53 回日本臨床検査医学会学術集会、2006年、弘前
  7. 篠沢圭子、天野景裕、鈴木隆史、稲葉浩、飯島憲司、高橋芳右、福武勝幸：先天性第V因子欠乏症の出血症状と血小板内第V因子。第 53 回日本臨床検査医学会学術集会、2006年、弘前
  8. 田中一郎、天野景裕、瀧正志、岡敏明、

- 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、松下正、三間屋純一、嶋緑倫:本邦における後天性凝固因子インヒビターの前方視的調査研究. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会、2006 年、宇都宮
9. 篠沢圭子、天野景裕、高宮修、塩崎尚子、安藤貴志、清田育男、鈴木隆史、稲葉浩、福武勝幸:出血症状が認められない先天性第 V 因子欠乏症:FV N468S ホモ接合体症例の解析. 第 29 回日本血栓止血学会学術集会、2006 年、宇都宮
  10. 西沢生野、高城由紀、五十嵐祐子、武井康悦、川原千香子、天野景裕、太田祥一:AED による院内蘇生例の 1 報告. 日本蘇生学会第 25 回大会、2006 年、浜松
  11. 山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、入沢亮吉、加藤雪彦、斉藤万寿吉、坪井良治、中村哲也、根岸昌功、白坂琢磨:HIV 感染症に対するエムトリシタピン投与による安全性と皮膚変色発現に関する検討(第 2 報). 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会
  12. 久野浩史、北村恵美、高橋友美、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸:当院における FFP 使用状況～適正使用推進にむけて～. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  13. 市川喜美子、北村恵美、高橋友美、久野浩史、高橋かおり、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸:当院における輸血後感染症検査の現状と検査実施率向上への取り組み. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  14. 鈴木隆史、須永和代、久野浩史、市川喜美子、高橋友美、高橋かおり、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸:抗リン脂質抗体症候群で認められたオモテ・ウラ不一致. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  15. 高橋友美、北村恵美、久野浩史、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、高橋陽子、天野景裕、福武勝幸:濃厚血小板製剤による非溶血性副作用が増加している. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  16. 天野景裕、高橋陽子、鈴木隆史、北村恵美、高橋友美、久野浩史、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、福武勝幸:新鮮凍結血漿融解方法の検討—サーモスタット式蛇口と発泡スチロールボックスを用いた温度管理方法—. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  17. 高橋陽子、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸:当院における自己血運営システムの現状と問題点. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  18. 高橋陽子、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸:複数担当医による自己血貯血システム. 第 54 回日本輸血学会総会、2006 年、大阪
  19. 清田育男、大瀧学、内田泰斗、尾形享一、辻川昭仁、山中晃、守谷研二、天野景裕、福武勝幸:小腸壁内血腫を繰り返したインヒビター保有血友病 A 患者の 1 例. 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、2006 年、福岡
  20. 天野景裕、加藤宏基、尾形享一、香川和彦、腰原公人、西田恭治、福武勝幸:MMP(マトリックスメタロプロティナーゼ)-3 は血友病性関節症の評価には有用ではない. 第 53 回日本臨床検査医学会学術集会、2006 年、弘前
  21. Inaba H, Yatomi Y, Shinozawa K, Otaki M, Suzuki T, Amano K, Fukutake K: ANALYSIS OF DISCREPANT ASSAY-DETERMINED ACTIVITY LEVELS OF FACTOR VIII ASSOCIATED WITH R531H MUTATION. XXIst Congress of the

- International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007, Geneva, Switzerland.
22. Shinozawa K, Amano K, Takamiya O, Shiozaki N, Ando T, Seita I, Ogata K, Suzuki T, Inaba H, Fukutake K: FACTOR V DEFICIENCY DUE TO A NOVEL HOMOZYGOUS MUTATION: FV N468S, BUT NO BLEEDING TENDENCY. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007, Geneva, Switzerland.
  23. Seita I, Shinozawa K, Kato H, Koh A, Tsujikawa A, Suzuki T, Amano K, Inaba H, Fukutake K: DOUBLE MUTATION, A 2-BP DELETION AND VAL 211ILE, IN THE BLOOD COAGULATION FACTOR IX GENE IN A PATIENT WITH SEVERE HEMOPHILIA B. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007, Geneva, Switzerland.
  24. Otaki M, Inaba H, Shinozawa K, Tamura A, Fujita S, Suzuki T, Amano K, Fukutake K: CHARACTERIZATION OF A LARGE DELETION THAT LEADS TO CONGENITAL FACTOR XIII DEFICIENCY. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007, Geneva, Switzerland.
  25. Suzuki T, Amano K, Kagawa K, Tsujikawa A, Ogata K, Uchida T, Koh A, Otaki M, Kato H, Seita I, Tamura A, Fujita S, Takahashi Y, Tanaka A, Koshihara K, Nishida Y, Yamamoto Y, Fukutake K: CONTINUOUS INFUSION OF VON WILLEBRAND FACTOR/FACTOR VIII CONCENTRATE IN PATIENTS WITH CONGENITAL VON WILLEBRAND DISEASE. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007, Geneva, Switzerland.
  26. 篠沢圭子, 天野景裕, 鈴木隆史, 大石毅, 伊藤昌之, 稲葉 浩, 福武勝幸: A1 ドメインに検出した先天性第 V 因子欠乏症の新しい変異: FV D68H. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年, 志摩
  27. 松下 正, 天野景裕, 瀧 正志, 岡 敏明, 酒井道生, 白幡 聡, 藤井輝久, 高田 昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠 聡, 福武勝幸, 三間屋純一, 田中一郎, 吉岡 章, 嶋 緑倫: 血友病患者の凝固因子補充療法の標準化. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007 年, 志摩
  28. 篠澤圭子, 鈴木隆史, 稲葉 浩, 清田育男, 大瀧 学, 高 明志, 天野景裕, 福武勝幸: 先天性第 VII 因子欠乏症で検出した複合ヘテロ接合体変異. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会・第 47 回日本臨床化学会年次学術集会連合大会, 2007 年, 大阪
  29. 稲葉 浩, 篠澤圭子, 香川和彦, 鈴木隆史, 天野景裕, 福武勝幸: 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)試薬の第 VIII 因子に対する感受性の多様性と軽症血友病 A. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会・第 47 回日本臨床化学会年次学術集会連合大会, 2007 年, 大阪
  30. 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案。第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
31. 天野景裕：後天性血友病の診断。日本血栓止血学会学術標準化委員会 2007 後天性血友病の診断と治療シンポジウム、2007年、東京
  32. 天野景裕、高橋陽子、鈴木隆史、高橋友美、久野浩史、高橋かおり、市川喜美子、須永和代、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55回日本輸血・細胞治療学会総会、2007年、名古屋
  33. 川原千香子、高城由紀、天野景裕、宮城 学、中野八重美、太田祥一、山科章：AED 使用後の院内事後検証委員会。日本蘇生学会第26回大会、2007年、岡山
  34. 天野景裕、稲葉 浩、篠沢圭子、福武勝幸：血友病インヒビターの分子生物学的側面「血友病シンポジウム：血友病インヒビターはどこまでわかってきたか？どこまで治療できるか？」第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
  35. 白阪琢磨、山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、小田原隆、中村哲也、今村顕史、味澤篤、根岸昌功：日本人における TDF/FTC 合剤 (TVD) の使用経験について。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島
  36. 関根祐介、横張敦子、大西正美、鈴木亜希子、鈴木篤、中村薫、明石貴雄、内田泰斗、鈴木隆史、天野景裕、西田恭治、山元泰之、福武勝幸：東京医科大学病院における抗 HIV 薬の使用動向と薬剤費の推移について。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島
  37. 山元泰之、西田恭治、天野景裕、鈴木隆史、山中晃、福武勝幸、入澤亮吉、加藤雪彦、齊藤万寿吉、坪井良治、小田原隆、中村哲也、今村顕史、味澤篤、根岸昌功、田所丈嗣、白阪琢磨：HIV 感染症に対するエムトリシタピン投与による安全性と皮膚変色発現に関する検討 (第3報)。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島
  38. 山元泰之、篠澤圭子、天野景裕、西田恭治、福武勝幸、今村雅寛、上田敦久：Darunavir、Tiplranavir、Enfuvirtide の使用経験、特に Darunavir を中心として。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年、広島
  39. 天野景裕：HAART に伴う糖代謝異常一症例紹介。第21回日本エイズ学会学術集会ランチョンセミナー、2007年、広島
  40. 大井千愛、山下敦己、武藤真二、浅原美恵子、山崎 哲、篠沢圭子、天野景裕、福武勝幸、瀧 正志：第 IX 因子製剤に対してアナフィラキシー症状を呈する血友病 B high responder における ITI 有効例。第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年、志摩
  41. 内田泰斗、西田恭治、天野景裕、福武勝幸、葉梨喬芳、大島一太、富山博史、山科 章：先天性無フィブリノゲン血症に冠動脈狭窄症を合併した一例。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会、2007年、横浜
  42. 篠澤圭子、清田育男、大瀧 学、高明志、辻川昭仁、田村 睦、鈴木隆史、天野景裕、西田恭治、稲葉 浩、福武勝幸：日本人血友病 B 患者の遺伝子解析—第3報—。第69回日本血液学会・

- 第 49 回日本臨床血液学会合同総会、2007 年、横浜
43. 稲葉 浩、篠沢圭子、天野景裕、鈴木隆史、福武勝幸：軽症血友病 A の解析—第二報—。第 30 回日本血栓止血学会学術集会、2007 年、志摩
  44. 天野景裕、鈴木尚子、鈴木隆史、高橋陽子、西田恭治、腰原公人、上道文昭、福武勝幸：初期臨床研修医に対する系統的臨床検査研修。第 54 回日本臨床検査医学会学術集会・第 47 回日本臨床化学会年次学術集会連合大会、2007 年、大阪
  45. 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.
  46. 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.
  47. 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.
  48. 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.
  49. Takedani H, Amano K.: Establishment of the conventional NovoSeven pulse infusion system. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
  50. 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, Kajiwaru 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.
  51. 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
  52. 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
  53. 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
  54. 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
55. 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
56. 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
57. 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
58. 関根祐介、横張敦子、辻真理子、宍戸紀与、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
59. 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
60. 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
61. 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Ⅷ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
62. 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Ⅷ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
- G. 知的所有権の取得状況  
特に無し。



遺伝子治療の臨床試験を行うための治験病院の体制および血友病患者の HCV・HIV 感染症の検討

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** 血友病患者は血液製剤から C 型肝炎ウイルスや HIV に感染している者が多く、肝障害・免疫障害が関節手術時の障害となるケースがしばしば見られる。このようなケースの手術を安全に行うため、multidisciplinary なスタッフによる臨床チームを組織し、また、術前評価のためのプロトコルも策定して、症例ごとにチーム内で検討を加えることにより、安全性の評価を適切に行えるようにした。現場のチーム医療体制を作るに際しても、治験施設の整備時に重視された考え方（Plan-Do-Check-Act）を取り入れ、常に、より質の高い医療に向けての改善を図っている。臨床治験の実施に際しても、現場のチーム医療体制とその自己チェック機能は重要となると考えている。

日本人集団の中で主に見られる HLA アレルと HIV 慢性期のウイルス量との間に相関が見られないかを網羅的に解析したが、単独で大きな影響を持つ 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スピードとの相関に関しては、さらに時間軸の要素をも加えた解析が必要と考えられた。

#### A. 研究目的

(1) 血友病の遺伝子治療を現実に臨床応用するに際しては、患者を対象とした臨床試験を安全に行える医療体制が必須である。そのためには、①臨床試験を推進・支援する病院の体制、および②血友病の患者をトータルに把握して治療にあたる現場の体制の双方の整備が不可欠と考えられる。

東大医科研病院は、治験病院としてトランスレーショナルリサーチ (TR) を数多く手がけてきており、ハード面では国際基準を満たす治療ベクター開発室を有するのみならず、ソフト面でも臨床試験推進室が治験や TR を支援する体制を整備している（上記①に対応）。我々は、この治験病院のなかに、血友病関節手術を受ける患者をサポートする multidisciplinary な臨床チームを結成し、合併する HIV・HCV 感染症をも的確に評価して、手術を安全に進められる現場体制（上記②に対応）を整備するようにした。臨床場面の Quality を安定して高く維持で

きるシステムの構築は、臨床試験の安全な実施に際しても不可欠と考えている。

(2) 非加熱血液製剤により血友病患者に感染した HIV は、抗ウイルス治療によってコントロールが可能にはなっているものの、体内から排除されるわけではなく、患者が一生抱え続ける感染症である。血友病患者に感染している HIV を性感染群と比較検討した結果から、最近の国内で流行している HIV は、日本人の 7 割近くが有する HLA-A24 によって拘束される CTL からエスケープしたウイルスとなっていることを我々は明らかにしてきた。そこからさらに敷衍して、遺伝的に均質性の高い日本人集団の中で、特定の HLA アレルが感染者の HIV コントロールと相関しないかどうかを検討していく。

#### B. 研究方法

(1) 臨床現場のシステム構築に際しては、治験施設の整備の際に重視された Quality 管理の考え方（とりわけ、ISO9001 の 2000 年改訂以来、

基本的な考え方として冒頭に提示されるようになった Plan-Do-Check-Act の考え方を応用した検討を行っていくことにした。具体的には、血友病関節症の手術をサポートする臨床チームを結成し、過去の手術例の検討や国内外の文献検索を行って手術を安全に施行するための免疫能ならびに肝機能の評価基準を策定したうえで、実際の症例ごとにチーム内での検討を繰り返していくことで、より現実在即した質の高いプロトコルへと改善を重ねていった。

(2) 最近の感染者では HLA-A24 を持つことが病態の進行に不利に働く可能性が考えられたため、血液製剤で感染(当時の米国で流行していたウイルスに感染)した血友病患者と最近の性感染者とを対比して、HLA-A24 の有無によるウイルス量や CD4 数の差がないかどうかを 2007 年に検討した。さらに 2008 年には A24 以外の HLA 多型も含めた網羅的な解析を行った。すなわち、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、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

(1) 2006 年から multidisciplinary なスタッフで構成する臨床チームを結成し、関節手術を受ける血友病患者をトータルに把握していけるようにしたが、手術を安全に遂行するためには、とりわけ、血友病患者が非加熱製剤によって感染してしまった C 型肝炎ウイルス(HCV)による肝障害と HIV による免疫障害との術前評価が欠かせないという認識を皆が持つようになった。Plan-Do-Check-Act のサイクルにより皆が評価を加えつつ改善を図っていけることを目指して、誰が見ても再現性よく適用できるようなプロトコルの作成を行うこととし、2007 年には、肝障害・免疫障害を評価するための手順書+flow chart を作成した(flow chart の

version 1 は 2007 年度の報告書に掲載した)。それに沿って臨床チームが患者の状態評価を行い、実際の症例ごとに検討を加えていくことで(Do-Check)、術前評価用の flow-chart の改訂を繰り返してきている(Act-次の Plan)。現在の評価基準では、HIV 感染症に関しては、CD4 数を重視しているが、CD4 数が低い例でもウイルス量がコントロールされていれば、手術を禁じてはいない。HCV 感染症に関しては、肝臓の予備能と門脈圧亢進の程度をしっかりと評価し、手術侵襲により肝不全が進むのを避けるようにしている。2007 年は 19 例の血友病関節症の手術例中、14 例(74%)が HCV 陽性、9 例(47%)が HIV 陽性(全例が HCV-Ab も陽性)であった。また、2008 年は 19 例の手術例中、16 例(84%)が HCV 陽性(うち 4 例=21%は SVR 例)、5 例(26%)が HIV 陽性(全例が HCV-Ab も陽性)であったが、それぞれの症例ごとに臨床チームがプロトコルに即した術前評価を行い、安全に手術を受けさせることができた。

病院全体の治験体制に関しては、東大医科研病院で行われた観察研究のなかに患者の同意なくされていたものがあったとする新聞報道が 2008 年 7 月にあり、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、治験や 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、観察研究にはそのような支援・モニターの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新たに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ったが、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った。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再確認された。

(2) 現在国内で流行している HIV は、HLA-A24 拘束性 CTL からエスケープしたウイルスとなっ

ているため、日本人の多くが有する HLA-A24 では CTL の HIV 認識ができなくなり、免疫不全の病態進行を速めることになるのではないかと、の仮説のもと、最近の性感染群と血友病患者群とで、HLA-A24 の有無によってウイルス量や CD4 数に差がないか比較検討してみたが、現在流行しているウイルスが HLA-A24 保有者での病態進行を速めているということにはなかった。血友病患者群では、全体として、最近の性感染群よりもウイルス量が低い傾向が見られたが、これはむしろ 1995 年頃まで無治療でも進行しなかった集団（いわゆる slow progressor 群）としての因子を反映していると考えられた。

さらに 2008 年には、他の HLA 多型も含めて網羅的に慢性期 VL との相関を検討したが、調査期間（1995～2006 年）の全体を通じてウイルス抑制との明確な相関が見られた HLA アレルは認められなかった。ただし、時間的な推移をもあわせて解析すると、欧米でウイルス量抑制との相関が見出されている HLA アレルの中には、時間とともに日本人集団の中でのウイルス抑制効果が減弱していると考えられるアレルも認められる。

#### D. 考察

(1) 血友病の患者を合併症をも含めてトータルにケアできる multidisciplinary なチームは、現実的に関節手術の安全な施行に寄与しているだけでなく、将来の臨床試験に際しても有効に機能するチームだと考えられる。臨床チームは、恒常的に患者検討会を開いて患者の状態を把握し、診療データを蓄積するとともに、院内の TRC と連携をはかって、臨床試験を推進できる体制を整えていく。チーム医療ならびに患者評価の向上のためには、Plan-Do-Check-Act のサイクルによる Quality 改善を、チーム内で常に行っていくことが大切だと考えている。

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具体的な基準についても、今後もチーム内で実際の手術症例に即した検討を加えることで、さらに改善をはかっていく方針である。臨床応用に最も近い AAV ベクターによる遺伝子治療では、肝臓が標的臓器の第一の候補となっており、肝臓を標的とする場合の肝機能評価と適応判断をする際

にも、臨床現場での手術適応基準の検討が役に立つと考えている。

また、2008 年には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生じたことから、臨床試験が適切に遂行されるためにどのような院内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と再確認した。

(2) 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で、HLA-A24 の有無によるウイルス量 (VL) や CD4 数の違いを検討した 2007 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。2008 年には、他の HLA 多型も含めて網羅的に慢性期 VL との相関を検討したが、欧米でウイルス抑制との最も高い相関が証明されている HLA-B27 や B57（この 2 つは日本人のほとんどが持っていない）のように、単独で強い相関を示すアレルは認められなかった。ただし、B27/B57 に準じてウイルス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おり、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解析してみると、時間とともに日本人集団内での抑制効果が減弱しているように見えるアレルもある。2007 年の報告書以来強調してきた「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、さらなる解析が望まれる。

#### E. 結論

東大医科研病院は治験病院としてのハード・ソフトの整備を行ってきたが、2008 年には院内の観察研究の倫理的な不備を指摘されたことを契機にして臨床試験の支援体制の見直しが行われた。今まで構築してきた臨床治験の支

援体制には問題がなかったことが確認された（観察研究にはそのような支援体制がなかったことが問題であったと分かった）が、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。臨床現場における 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けるシステムの構築が治験実施に向けて望まれる。

日本人集団のなかでの 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重要と考えられた。

#### F. 研究発表

・ Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, Iwamoto A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial. *J. Med. Virol.* 78: 711-18,

2006.

・ Koga I, Odawara T, Matsuda M, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A. Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis. *Microbes Infect.* 8: 2872-2879, 2006

・ Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* 80:373-382, 2008

・ 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.

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし