

### 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、わが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。血液凝固異常症の QOL の阻害要因は大別すると、1) 病状、2) 血友病に対する治療法、3) 社会生活、偏見・差別、不安、4) 医療体制、5) 医療制度、の 5 つに分けられる。本調査研究の解析結果を中心にわが国の血液凝固異常症の QOL の阻害要因とその対策について総括し、行政、医療関係者、患者さんおよびご家族への血液凝固異常症 QOL 調査運営委員からの提言を行った。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

患者の QOL (Quality of life) は、病態の解明や治療法の改善、進歩などにより時代と共に変化し、また多様化する。また、医療者と患者の考える QOL およびその阻害要因に相違が在ることは稀ではない。したがって、一定の期間ごとに患者の状態を知り、そして意見を聞くことは患者 QOL の向上のためにはきわめて重要と考えられる。そこで今回、血友病を代表とする血液凝固異常症の QOL 調査を血液専門医のみならず整形外科医、リハビリテーション科医、看護師、臨床心理士、医学統計学者、さらに患者代表を加えた委員会で討議を重ねて調査票を作成した。この調査は、出血、出血の結果として生じる筋骨格系障害などの合併症、凝固因子製剤による HIV 感染、肝炎などの医療転帰からの評価だけではなく心理的側面、社会的側面などの問題点を引き出す包括的な研究を目指して行った。また、調査項目以外に自由記載欄を設け、統計学的手法を用いて患者の意見を定量的に解析した。

#### B. 研究方法

##### 1. 対象および方法

全国の血液凝固異常症患者を対象とした。調査方法はアンケート形式で、血液凝固異常症全国調査で構築されたネットワークをもとにした全国の医療施設の担当医および患者組織を介し患者および保護者に配布した。調査票の回収は無記名で同封した封筒に入れ返送して頂いた。調査票の自由記載欄に書かれた意見は、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、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)

この調査の実施にあたり、疫学研究に関する倫理指針 11 「他の機関等の試料の利用」に

基づく本調査の運用形態（調査用紙、調査方法、集計手順）について、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. 血液凝固異常症の QOL の阻害要因とその対策について総括

本調査研究の解析結果を中心にわが国の血液凝固異常症の QOL の阻害要因とその対策について総括する。血液凝固異常症の QOL の阻害要因は大別すると、1) 病状、2) 血友病に対する治療法、3) 社会生活、偏見・差別、不安、4) 医療体制、5) 医療制度、の5つに分けられる。

### 1. 病状

病状の中で、出血、関節内出血、関節機能障害、頭蓋内出血の後遺症、インヒビター、HIV 感染症、肝炎（特に HCV 感染症）が主たる QOL の阻害要因であることが示された。

#### 1.1 出血

年間総出血回数は血友病 A と B では差異はなく、血友病の重症度と関連し（重症>中等症>軽症）、またインヒビター例では多いことが再確認された。年齢別にみると加齢とともにゆるやかに出血回数は多くなり、6歳で約1割、20歳以上で約2割の患者が年間50回以上の頻回出血者であることが示され、出血回数と身体障害による行動制約には有意な関連が示された。学校生活の欠席日数などへの影響はみられなかったが、クラブ活動の参加に影響を及ぼしていることが示された。平成12年の調査では、HIV感染を合併している患者の出血頻度が多かったが、今回の調査ではHIV感染とHCV感染はいずれも出血回数には影響していないことが示された。周囲への病気の開示の割合は、学校では91%と高率であったが、職場では65%とその割合は少なかった。病気について「少なくとも一部の人に知らせている」かどうかと、出血した場合の速やかな止血治療とは関連する可能性が示された。

#### 1.2 関節内出血

血友病の年間関節内出血回数はフォンヴィレブランド病などの他の凝固異常症と比べて有意に多いが、血友病 A と B では差異はないことが再確認された。関節内出血の頻度も総出血回数と同様に血友病の重症度（重症>中等症>軽症）および加齢に関係することが示された。年齢別にみると10歳代から頻度が増加し、20歳から49歳ではその頻度はさらに増加し、50歳以降はやや減少傾向であった。また、関節内出血の頻度と標的関節の存在とは、重症度、年齢別ともに有意に関連していることが示された ( $p<0.001$ )。関節内出血の頻度は総出血回数と同様に身体障害による行動制約と有意な関連が示された（図1）。

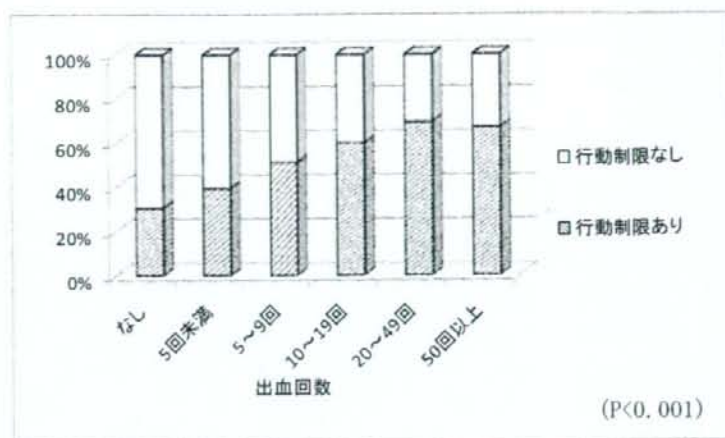


図1. 関節内出血の頻度と身体障害による行動制限との関連

さらに、関節内出血は、欠席日数、遠足・林間/臨海学校・修学旅行など学校行事への参加、体育の授業への参加、クラブ活動への参加、のすべての項目に影響を及ぼしていることが示された。

以上、出血の中でも関節内出血は、日常生活、学校生活、社会生活のQOLに大きな影響を及ぼしていることが示された。しかしながら、関節障害に対する患者の関心は低く、日常生活に支障をきたすようになって初めて関節機能障害の重大性に気付く傾向であることが示唆された。

### 1.3 頭蓋内出血の後遺症

頭蓋内出血の既往がある割合は22%と高率であった。その中で後遺症が約2割に認められ、後遺症の内容は、運動障害、知能障害、症候性てんかんなどであった。

### 1.4 インヒビター

インヒビター保有血友病はインヒビターのない患者に比べ、総出血回数、関節内出血回数、標的関節を有する例が多いことが示された。また、インヒビターが頭蓋内出血の原因であったか止血のための集中的な治療の結果インヒビターが発生したかは不明であるが、今回の調査でインヒビター保有患者の頭蓋内出血の頻度が非保有患者に比して高いことが示された。インヒビター患者では、その止血薬について高価、注射回数が多いなどの不満の記載も見られた。

### 1.5 HIV感染症

凝固因子製剤に起因するHIV感染者数は1,431人であり、すでに622人が死亡している(血液凝固異常症全国調査 平成19年度報告書、エイズ予防財団)。HIV感染は感染者のみならず、血液凝固異常症のHIV非感染者およびその家族に対しても偏見・差別など多大なQOLを低下させる因子となった。その一端は、3) 社会生活、偏見・差別、不安の項で後述する受診する病院の選択でHIV感染者の実に39%が凝固異常症であることを意識して地元の人や知人に会う機会が少ない病院を選択していることから推定される。HIV感染症に対する治療法では、抗レトロウイルス薬の多剤併用療法により

1997年以降 HIV ウイルスの制御は比較的良好な状況であり、HIV 関連疾患による死亡者数は減少しているが、未だ完治することはできず服薬を継続する必要がある。抗レトロウイルス薬の長期連用による副作用であるリポジストロフィーや乳酸アシドーシスなどの新たな問題も発生している。

#### 1.6 肝疾患（特に HCV 感染）

HCV 感染に起因する肝硬変、肝がんの死亡報告が最近増加しており、最近では死因の半数を占めるようになってきている（血液凝固異常症全国調査平成 19 年度報告書、エイズ予防財団）。今回の QOL 調査では HCV 感染は欠勤日数などには直接影響しなかったとの結果であったが、肝疾患により身体的な制約が起こってくるのは病期が肝硬変・肝癌へ進行した後であり、多くの感染患者は症状のない慢性肝炎の状況であること、インターフェロン治療の普及率が未だ十分でないことも影響している可能性がある。最近の死因の経年的変化より推測すると、今後 HCV 感染は QOL を阻害する大きな因子となることが懸念される。

#### 【対策】

出血への対策では、1) 在宅自己注射を早期から開始し、出血時の早期輸注ができるようにすること、2) 適切に予備的補充療法を行うこと、3) 定期補充療法を行うことにより出血を未然に防ぐこと、が重要である。特に、重症患者を対象とし、関節障害のない 2 歳前後から開始する一次定期補充療法は関節障害の予防や重篤な出血の軽減に役立つ可能性が高い。4) さらに、学校や職場で出血時の早期治療ができるよう患者は周囲の人々に理解を求めよう努め、少なくとも一部の人に病状を知らせておくことが重要である。

関節機能障害に対する対策では、1) 定期的な関節評価、2) 関節評価に基づいた整形外科治療、リハビリテーション治療の介入、3) 予備的補充療法や二次定期補充療法により出血を予防、4) 適切なスポーツや筋力トレーニングで関節支持能を高める、などが重要である。特に 1) は、患者のみならず医療者もその重要性を再認識すべきである。

頭蓋内出血への対策では、母親が保因者の場合は産科と新生児科・小児科が緊密に連携して出血のリスクが高い分娩法を回避するとともに、もし、頭蓋内や帽状腱膜下に出血した時には速やかに対応できる体制を講じておく。その後は早期診断・早期治療ができるよう患者・家族への教育が重要である。また、家族がいない場での頭蓋内出血に備えて少なくとも一部の人には病気について知らせておくことも早期対応に繋がるであろう。事故で意識がなくなった時に備えて血友病カードや血友病手帳を常に持参することも大切である。

インヒビターへの対策は、現状では十分とはいえず、血友病治療に残された重大な問題である。インヒビター発生機序の解明、インヒビター制御法の確立、インヒビター保有患者の止血法および出血予防法など多くの今後解決すべき課題が残されている。

HIV 感染、HCV 感染への対策は、HIV 感染者に対しては、より有効性が高く、副作用が少なくそして服薬回数が少ないなどの利便性のある薬剤の開発のみならず、疾患に対する偏見・誤解を無くすようできるだけ多くの国民に疾患に対する理解を深めてもらう施策を講ずるなど医療面だけではなく心理的、社会的な面からの対策も重要である。

HCV 感染者に対しては、インターフェロン未治療の場合や過去にインターフェロン

単独治療では完治しなかった場合は、以前の治療法に比べ有効率が上がった PEG インターフェロンとリバビリンの併用療法を速やかにそして時期を逸することなく実施することが望まれる。

両感染症ともに、より有効性が高く、副作用が少ない新たな治療薬の開発が期待される。

## 2. 血友病に対する治療法

従来の治療の原則は、出血後に速やかに凝固因子の補充を行うことであった。在宅自己注射の導入により出血時の早期輸注は可能となり、わが国の在宅自己注射療法の普及率は、血友病 A、B それぞれ 72%、61% に達した。本治療法に対して、継続の希望、頻回の通院の不便がなくなった、出血時の不安の減少、活動範囲が広がったなど肯定的意見が多かった。しかし、重症、あるいは一部の中等症の患者では、この治療法では関節障害を阻止できず加齢と共に関節障害が進行することが判明している。関節障害が発生する以前の 2 歳前後から定期的に凝固因子製剤を輸注する一次定期補充療法が欧米では乳幼児の重症血友病の標準的な治療となろうとしているが、わが国では未だその施行率は少ない。ただし、頻回の輸注を要する定期補充療法、特に輸注の難しい乳幼児に開始する一次定期補充療法は、かえって注射の負担から QOL を低下させる危険性もある。

### 【対策】

小児血友病患者に対する一次定期補充療法は、開始時期、注射の頻度や量などの詳細な検討課題は残るが、今後、わが国においても新規に診断された重症患者の標準的治療となるよう、また実施できるよう努力する必要がある。定期補充療法は週に 2 あるいは 3 回の輸注が標準的な方法である。本治療法を在宅治療として行わず通院で行う場合に、近医で行えない場合はかえって QOL の阻害要因となる。また、血管確保の困難な乳幼児の場合、頻回の輸注は逆に QOL の阻害要因となる場合もあろう。このような場合は、定期補充療法を週に 1 回から開始するなど回数を最初は少なく始め、慣れてきたら回数を増やすなどの弾力的運用、血管確保ができるようになるまでの短期間は留置カテーテルの挿入を行うことなどの工夫が大切である。また、近医との連携により家族の負担を減らすことなども考慮する。定期補充療法のアドヒアランスを良好に保つためには、このような工夫が極めて重要である。

さらに、これらの問題を解決するには頻回の輸注を必要としない長時間作用型の凝固因子製剤の開発や経口薬の開発が待たれる。

新規に診断された中等症や軽症の血友病患者に関しては原則的には一次定期補充療法の適応とはならないが、出血頻度が増加した場合は二次定期補充療法を行うことを考慮する。

既に関節障害があり、出血の多い患者に対しては重症のみならず中等症、軽症の患者に対しても二次定期補充療法を行うことを考慮する。

遺伝子治療、細胞治療などの先進医療の臨床応用、更には疾患の治癒をめざした遺伝子を正常化させる治療法は、現在精力的に研究が行われており、その成果に今後大きな期待がかかる。

## 3. 社会生活、偏見・差別、不安

生活面、医療面、経済面それぞれに多くの不安を感じている現状が明らかとなった。生活面では、老後の健康不安、身体障害による行動制約、こどもへの遺伝、就職、結婚、

親の介護など多岐にわたった。医療面では、現在の病状、専門病院まで遠い、健康保険、医療費、希望する医療が受けられない、などであった。経済面では、生命保険加入、年金支給、給料などであった。凝固異常症であることを意識して地元の人や知人に会う機会が少ない病院を受診している割合が HIV 感染者の 39%のみならず、HIV 非感染者においても 25%と高率であり、血液凝固異常症における偏見・差別あるいは偏見・差別に対する不安がまだ強く残っていることが推測された（図 2）。

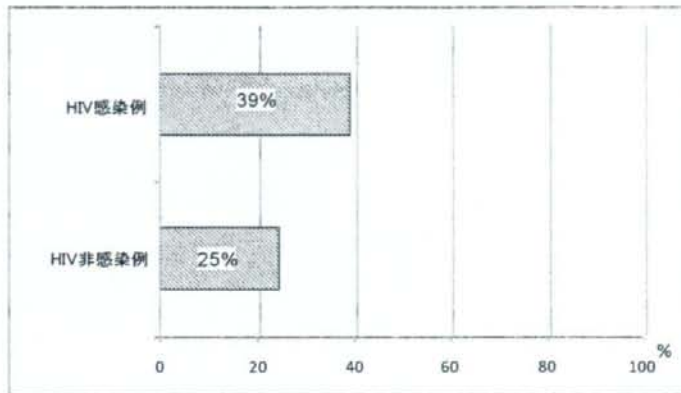


図 2. 地元の人や知人に会う可能性の少ない病院を受診している割合

#### 【対策】

現在行いうる方策としては、具体的に問題となっている社会生活、偏見・差別、不安について関係する行政、医療関係者、学校、職場などがそれぞれの立場で提示された患者の要望がかなえられるよう努力をすることである。特に、さまざまな不安に対しては、臨床心理士、カウンセラーの配備、看護師のサポート、患者会の役割は大きいと考えられる。偏見・差別あるいは偏見・差別に対する不安に対しては、行政、医療関係者のみならず患者自身も周囲の人々に疾病についての理解を求めめる努力が必要であろう。

#### 4. 医療体制

現在診てもらっている医療機関への感想は、主治医への評価は高く、8割以上が積極的な対応を評価し、その信頼は厚いことが示唆された。しかし、血友病専門医の高齢化を心配し、若い血友病専門医の不足を危惧する意見もみられた。看護師への評価も高いが、対応への積極性では約5割の評価に留まった。理学療法士、薬剤師、ソーシャルワーカー、カウンセラーについては、治療への参画が少ないことが示された。

#### 【対策】

病状等をよく説明するなどの信頼される血友病専門医の養成、主治医をサポートするだけではなく、薬剤師、ソーシャルワーカー、カウンセラー、理学療法士、医療事務員と協力し血友病に対する理解および血友病患者を取り巻く環境に対して理解できる血友病専門の看護師の養成は重要であろう。そのためには血友病認定看護師を制度的に創設することを含め、少なくとも血友病担当看護師が役割を發揮できる環境を医師は働きかける必要がある。さらに、医療体制としてカウンセラーやソーシャルワーカーを配備

した血友病センターを各地域に設置し、血友病センターを中心に血友病治療ネットワークを作ることは今後の重要な対策であろう。

#### 5. 医療制度

現在わが国では治療費は公費負担制度により守られているが、この制度の切り捨てへの不安がきわめて強いことが判明した。

#### 【対策】

血液凝固異常症患者に対する公費負担制度の存続が必須であり、また患者はこの制度の切り捨てへの不安が強いことを行政は十分理解する必要がある。更新の手続きの簡素化、病院の受け付けや役所の窓口でのプライバシーの保護にも十分な配慮が必要である。

D. 行政、医療関係者、患者さんおよびご家族への血液凝固異常症 QOL 調査運営委員からの提言

#### 行政への提言

- 1) トータルケアの実践ができるよう積極的に地域別に血友病センターを創設する。
- 2) 安全な血液凝固因子製剤を安定供給する。
- 3) HIV 感染、HCV 感染に対する研究および治療を推進する。
- 4) 血液凝固異常症患者に対する公費負担制度を存続させ、併せて更新手続きを簡素化する。
- 5) 国民の血液凝固異常症患者への偏見・差別を払拭させる。
- 6) 疾患の治癒をめざした遺伝子異常を正常化させる治療法、遺伝子治療、細胞療法などの先進医療の研究を推進する。

#### 医療関係者への提言

- 1) トータルケアの実践ができるように努める。
- 2) 血友病診療ネットワークの構築を行い、専門病院と地域の診療所、病院との役割分担をする。
- 3) 定期的にインヒビター、関節評価などを行い、適切な治療介入を行う。
- 4) 新規に診断された重症患者に対して関節障害発症予防や重篤な出血予防のため在宅自己注射に基づいた一次定期補充療法を患者・家族の負担にならぬよう工夫して導入する。
- 5) 既に関節障害があり、出血が多い患者に対して在宅自己注射に基づいた二次定期補充療法の導入と積極的な理学療法を行う。
- 6) 耐久性の優れた人工関節の開発、損傷した関節を治癒すべく再生医療の研究を行う。
- 7) インターフェロン未治療あるいはインターフェロン単独治療では完治しなかった HCV 感染者に対して、積極的にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法を薦める。
- 8) 最新の医療情報を提供する。
- 9) 患者・家族会と連携する。
- 10) 遺伝子治療、細胞療法などの先進医療を研究し、臨床応用を図る。

1 1) 遺伝子異常を正常化させる治療法を研究し、疾患の治癒を図る。

#### 患者さんおよびご家族への提言

- 1) 定期的に専門医療機関を受診し健康状態、特にインヒビター発生や関節状態の評価を受け、時期を逸することなく治療を受けましょう。
  - 2) 在宅自己注射を早期に開始するよう努力しましょう。
  - 3) 重症型の血友病と診断された保護者の方は専門医と相談の上積極的に一次定期補充療法の開始を考慮しましょう。
  - 4) 関節障害があり、出血が多い場合は、二次定期補充療法の実施を考慮しましょう。
  - 5) 自分自身（あるいはお子さん）の病気の理解を深める努力をしましょう。
  - 6) 周囲の人たちへ病気に対する理解を求める努力をしましょう。
  - 7) 主治医と相談の上できる範囲で学校行事やクラブ活動に積極的に参加しましょう。
  - 8) 小児期から自己管理を試みるなど自立に向けた行動をしましょう。
  - 9) 患者・家族会へ積極的に参加しましょう。
- 1 0) C型肝炎にかかっている患者さんで、まだ一度もインターフェロン治療を受けたことがない場合や過去に行われたインターフェロン単独治療では完治しなかった場合には、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法を速やかに実施することをお勧めします。C型肝炎は症状がなくとも病期は進行し、症状が出たときには肝硬変・肝癌になっている危険性が高いからです。主治医とよく相談して下さい。



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
Ohmori T, <u>Mimuro J</u> , Takano K, <u>Madoiwa S</u> , Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, <u>Hasegawa M</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u>	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	1522-1524	2006
Ishiwata A, <u>Mimuro J</u> , Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, <u>Madoiwa S</u> , <u>Mizukami H</u> , Okada T, Naka H, <u>Yoshioka A</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u>	Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene.	Thromb Res	118	627-635	2006
<u>Mizukami H</u> , <u>Mimuro J</u> , Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, <u>Sakata Y</u> , <u>Ozawa K</u>	Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors.	Hum Gene Ther	17	921-928	2006
Urabe, M., Xin, KQ., Obara, Y., Nakakura, T., <u>Mizukami, H</u> , Kume, A., Okuda, K., <u>Ozawa, K</u>	Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression.	Mol Ther	13	823-828	2006
Ogura T, <u>Mizukami H</u> , <u>Mimuro J</u> , <u>Madoiwa S</u> , Okada T, Matsushita T, Urabe M, Kume A, Hamada H, Yoshikawa H, <u>Sakata Y</u> , <u>Ozawa K</u>	Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer.	J Gene Med	8	990-997	2006
Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, <u>Yoshioka A</u>	Mechanisms of Plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: A crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation.	J Biol Chem	282	5287-5295	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, Yoshida K, Tanaka I, Sakurai Y, Giles AR, <u>Yoshioka A.</u>	The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay.	J Thromb Haemost	4	377-384	2006
Inoue T, Shima M, Takeyama M, Matsumoto T, Nishiyama K, Tanaka I, Sakurai Y, Giddings JC, <u>Yoshioka A.</u>	Higher recovery of factor VIII (FVIII) with intermediate FVIII/von Willebrand factor concentrate than with recombinant FVIII in a haemophilia A patient with an inhibitor.	Haemophilia	12	110-113	2006
Yoshino,H., Hashizume,K., <u>Kobayashi,E.</u>	Naked plasmid DNA Transfer to the porcine liver using rapid injection with large Volume.	Gene Ther	13	1696-1702	2006
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ドメイン内のミステンス変異 Asp116Asn の分子病態。	東京医科大学雑誌	64	380-387	2006
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、 <u>天野景裕</u> 、嶋緑倫、 <u>吉岡章</u>	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	446-453	2006
Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, <u>Odawara T.</u> Hosoya N, Iwamoto A.	Peptide- loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase I trial.	J. Med. Virol	78	711-718	2006
白幡聡、岡敏明、福武勝幸、新井盛大、花房秀次、 <u>瀧正志</u> 、長尾大、三間屋純一、芳賀信彦、高松純樹、神谷忠、嶋緑倫、垣下栄三、竹谷英之、高田昇、小林正夫、内田立身、小野織江、 <u>吉岡章</u>	インヒビター保有血友病患者における遺伝子組換え活性型血液凝固VII因子製剤（注射用ノボセプンR）の長期安全性および有効性：5年間の市販後調査中間解析報告。	日本血栓止血学会雑誌	17	331-344	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山崎哲、細谷由紀子、鈴木典子、山崎法子、安室洋子、高山成伸、大井千愛、 <u>瀧正志</u>	循環抗凝血素を有する症例における凝固因子活性測定.	日本検査血液学会誌	7	270-277	2007
Ohmori T, <u>Sakata Y.</u>	Platelet-directed gene therapy.	Transfus Med Hemoth	34	429-439	2007
Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, <u>Madoiwa S.</u> <u>Mimuro J.</u> <u>Sakata Y.</u>	Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	27	2266-2272	2007
Ito T, Okada T, <u>Mimuro J.</u> Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, <u>Mizukami H.</u> Kume A, Takahashi M, Ikeda U, <u>Sakata Y.</u> Shimada K, <u>Ozawa K.</u>	Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats.	Hypertension	50	531-536	2007
Ito T, Okada T, Miyashita H, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, <u>Mizukami H.</u> Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, <u>Ozawa K.</u>	Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats.	Circ Res	101	734-741	2007
Nogami K, Shima M, Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, <u>Yoshioka A.</u>	Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain.	Int J Hematol	85	317-322	2007
Takeyama M, Kasuda S, Sakurai Y, Shima M, Takeda T, Omura S, Naka H, <u>Yoshioka A.</u>	Factor VIII-mediated global hemostasis in the absence of von Willebrand factor.	Int J Hematol	85	397-402	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi M, Okada T, Murakami T, Ozawa K, Kobayashi E, Morita T.	Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems.	Urology	70	1230-1236	2007
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	166-174	2007
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	627-639	2007
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, and Iwamoto A.	Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells.	J Med Virol	80	373-382	2007
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 19 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（主任研究者 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）				2008
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 Epub ahead of print	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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

研究成果の刊行物・別刷

## Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Iba $\alpha$ promoter: *in vivo* model for platelet-targeting gene therapy

Tsukasa Ohmori,\* Jun Mimuro,\*<sup>†</sup> Katsuhiko Takano,\* Seiji Madoiwa,\*<sup>†</sup> Yuji Kashiwakura,\* Akira Ishiwata,\* Masanori Niimura,\* Katsuyuki Mitomo,<sup>‡</sup> Toshiaki Tabata,<sup>‡</sup> Mamoru Hasegawa,<sup>‡</sup> Keiya Ozawa,<sup>†,§</sup> and Yoichi Sakata\*<sup>†,1</sup>

\*Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; <sup>†</sup>Hematology Division of Department of Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan; <sup>‡</sup>DNAVEC Corp., Ibaraki, Japan; and <sup>§</sup>Research Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

**ABSTRACT** Platelets release several mediators that modify vascular integrity and hemostasis. In the present study, we developed a technique for efficient transgene expression in platelets *in vivo* and examined whether this targeted-gene-product delivery system using a platelet release reaction could be exploited for clinical applications. Analysis of luciferase reporter gene constructs driven by platelet-specific promoters (the GPIIb, GPIb $\alpha$ , and GPVI) revealed that the GPIb $\alpha$  promoter was the most potent in the megakaryoblastic cell line UT-7/TPO and human CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes. Transduction of UT-7/TPO; CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes; and c-Kit<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>, and Lineage<sup>-</sup> (KSL) murine hematopoietic stem cells with a simian immunodeficiency virus (SIV)-based lentiviral vector carrying eGFP resulted in efficient, dose-dependent expression of eGFP, and the GPIb $\alpha$  promoter seemed to bestow megakaryocyte-specific expression. Transplantation of KSL cells transduced with SIV vector containing eGFP into mice showed that there was preferable expression of eGFP in platelets driven by the GPIb $\alpha$  promoter [7–11% for the cytomegalovirus (CMV) promoter, 16–27% for the GPIb $\alpha$  promoter]. Furthermore, transplantation of *ex vivo*-transduced KSL cells by SIV vector carrying human factor VIII (*hFVIII*) driven by the GPIb $\alpha$  promoter induced the production of detectable transcripts of the *hFVIII* gene and the *hFVIII* antigen in bone marrow and spleen for at least 90 days and partially corrected the hemophilia A phenotype. Platelet-targeting gene therapy using SIV vectors appears to be promising for gene therapy approaches toward not only inherited platelet diseases but also other hemorrhagic disorders such as hemophilia A.—Ohmori, T., Mimuro, J., Takano, K., Madoiwa, S., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Niimura, M., Mitomo, K., Tabata, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y. Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glyco-

protein Iba $\alpha$  promoter: *in vivo* model for platelet-targeting gene therapy. *FASEB J.* 20, E769–E779 (2006)

**Key Words:** hemophilia A • lentiviral vector • stem cell transplantation

BLOOD PLATELETS, the principal cells responsible for primary hemostasis, play major roles in thrombosis, atherosclerosis, tumor metastasis, and inflammation. At the site of vascular injury, activated platelets aggregate and release several mediators that modify vascular integrity and hemostasis (1). Platelet-derived bioactive products are released by exocytosis of the three types of granules (dense-core, alpha, and lysosome) within platelets; this process is mediated by soluble NSF attachment protein receptor proteins and VAMP-3 (2). Taking advantage of the platelet-release reaction as a delivery system for a specific factor would be a reasonable approach for therapy for individuals deficient in the factor because it provides a way to enhance the local concentration of target substances at the site of vascular injury, while minimizing the influence of plasma proteins that may inhibit their activities.

In transgenic settings, platelet-targeting gene transfer has been reported to enable the storage of the targeted substance within platelets. Platelet expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) using a megakaryocyte-specific platelet factor 4 promoter enabled u-PA to be stored in platelets and then released within developing thrombi when the platelets became activated (3). Furthermore, platelet-specific expression of coagulation factor VIII (FVIII) could be achieved in

<sup>1</sup>Correspondence: Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Minamikawachi, Tochigi 329-0498, Japan. E-mail: yoisaka@jichi.ac.jp

doi: 10.1096/10.1096/fj.05-5161fj



a transgenic setting with the resultant FVIII predominantly or exclusively stored in platelet granules rather than being released into the plasma (4). When transgenic mice were crossed onto a FVIII null background, whole blood clotting time was partially corrected (4). These findings have facilitated the development of methods for gene therapy that use platelets to deliver therapeutic agents to the site of vascular injury.

The present study aimed at megakaryocyte- and platelet-directed gene transfer using a platelet-specific promoter that could be directly applicable to gene therapy for not only inherited platelet disorders but also coagulation factor deficiencies such as hemophilia. Since megakaryocytes have a finite life span, hematopoietic stem cells are preferable targets for genetic transfer to establish *in vivo* long-term expression of the target protein in platelets. When retroviral vector containing the *Glycoprotein (GP) IIIa* gene driven by the GPIIb promoter was transduced into CD34<sup>+</sup> cells from a Glanzmann thrombasthenia patient with defects in the GPIIIa gene, GPIIb/IIIa were detected after *in vitro* megakaryocyte differentiation (5). Furthermore, retrovirus transduction of FVIII driven by the virus promoter into human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells reportedly enabled FVIII-transduced megakaryocytes to store human FVIII with von Willebrand factor (VWF; ref 6). Although the concept of platelet-targeting gene therapy is very attractive and some reports have clinical implications as described above (3–6), there have been no evaluations of whether gene transduction of hematopoietic stem cells effectively results in sufficient genetic information being given in platelets so that they synthesize enough transgene products to correct the phenotype of the hemorrhagic disorder.

In this study, we used GPIIb promoter to achieve platelet-specific gene expression, based on analyses of the promoter activities of three platelet-specific genes, *GPIIb*, *GPIIb $\alpha$* , and *GPVI*, in megakaryocytes and then we assessed the gene transfer efficiency to platelets *in vivo* by transducing hematopoietic stem cells with simian immunodeficiency lentivirus vector (SIV). We also examined whether FVIII ectopically expressed in platelets corrected the hemorrhagic phenotype of FVIII-deficient mice by using the platelet release reaction.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Hemophilic A mice with targeted destruction of exon 16 of the *FVIII* gene were kindly provided by H. H. Kazazian Jr. (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA; ref. 7). C57BL/6 (B6-Ly5.2) mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). C57BL/6 mice congenic for the Ly5 locus (B6-Ly5.1) were purchased from Sankyo-Lab Service (Tsukuba, Japan). All animal procedures were approved by the institutional Animal Care and Concern Committee at Jichi Medical School, and animal care was performed in accordance with the guidelines of the committee (8).

### Cytokines and antibodies

Recombinant human thrombopoietin (TPO) and recombinant human stem cell factor (SCF) were gifts from Kirin Brewery (Gunma, Japan). The following materials were obtained from the indicated suppliers: recombinant human interleukin (IL)-6, recombinant human soluble IL-6 receptor (sIL-6R), recombinant human basic fibroblast growth factor (b-FGF), and recombinant human Flt3-Ligand (Flt3-L; PeproTech EC, London, UK); recombinant human IL-3 (IL-3; TECHNE, Minneapolis, MN); antimouse c-Kit monoclonal antibody (MoAb; clone 2B8), antimouse Sca-1 MoAb (clone D7), antimouse Ly5 (CD45) MoAb (clone 30-F11), and antimouse Ly5.1 (CD45.1) MoAb (clone A20; BD Pharmingen, CA); antimouse GPIIb MoAb (clone Xia.G5; Emfret Analytics, Wurzburg, Germany); and anti-human GPIIb/IIIa MoAb (clone 5B12), anti-human GPIIb MoAb (clone AN51), and anti-human CD34 MoAb (clone BIRMA-K3; DakoCytomation, Glostrup, Denmark).

### Cell culture

The human megakaryoblastic cell line UT-7/TPO was kindly provided by Dr. Norio Komatsu (Yamanashi University, Yamanashi, Japan; ref. 9). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% FBS and 10 ng/ml of TPO. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained and maintained as described previously (10). U937, a myelomonocytic cell line, and K562, an erythroleukemic cell line, were obtained from the American Type Culture Collection and were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. 3T3 fibroblasts were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 supplemented with 10% FBS. Human aortic smooth muscle cells (SMC) were purchased from the Applied Cell Biology Research Institute (Kirkland, WA) and maintained in DMEM/F-12 with 10% FBS and 10 ng/ml of b-FGF.

### Megakaryocyte differentiation

Human umbilical cord blood was obtained during normal full-term deliveries. The institutional review board of Jichi Medical School approved the study protocols, and informed consent was obtained from all donors. Human CD34<sup>+</sup> cells derived from cord blood were isolated using the AutoMACS magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotec., Auburn, CA) according to the manufacturer's instructions. The purity of isolated CD34<sup>+</sup> cells was >90% (data not shown). CD34<sup>+</sup> cells were expanded and differentiated into megakaryocytes with IMDM containing 1% fatty acid-free BSA, 200  $\mu$ g/ml of human iron-saturated transferrin, and 10  $\mu$ g/ml of human recombinant insulin, supplemented with 50 ng/ml of TPO and 10 ng/ml of IL-3 (11). After 14 days of culture, 75–90% of cells were positive for GPIIb/IIIa.

### Construction of luciferase reporter plasmid, transient transfection, and luciferase assay

The DNA fragments for the promoter, which reportedly each had maximum promoter activity [GPIIb promoter: -554 to +33 (12), GPIIb $\alpha$  promoter: -254 to +330 (13), GPVI promoter: -320 to +28 (14)], were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using human genomic DNA as template. Since the region surrounding the translation start site of GPIIb gene at position -5 from the initiator ATG codon is important for transgene expression (15), we selected the DNA fragment just before the first ATG sequence, as reported previously (13). The oligonucleotide primer pairs used for

the cloning of the promoter sequence were as follows: 5'-CCATTCCAGAAGGTGTGAAG-3' (sense) and 5'-GTTCCCTCAGCCCTGCTCTG-3' (antisense) for GPVI promoter (GenBank #AF521646); 5'-CTAAAGCTTGGCTCAAGACG-3' (sense) and 5'-CTTCCCTTCTCCACAACCTC-3' (antisense) for GPIIb promoter (GenBank #M33319); and 5'-GTTCTGGGATTACAGGCATGAG-3' (sense) and 5'-GAGGACCTGTGGCAAGGAG-3' (antisense) for GPIb promoter (GenBank #M22403).

After being subcloned into pCR-Blunt-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), the fragment was subsequently cloned into pGL3-basic, a promoterless luciferase plasmid (Promega, Madison, CA). Five hundred thousand cells (UT-7/TPO, CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes, K562, and U937) plated in IMDM (without FBS or growth factors) or subconfluent cells (HUVEC and SMC) in each well of six-well plates were transfected with 4  $\mu$ g of plasmid DNA using DMRIE-C Reagent (Invitrogen). After 4 h, an equal volume of IMDM supplemented with 2 $\times$  growth factors was added to each well. Cells were incubated for 48 h at 37°C, and luciferase activities were assayed according to the manufacturer's instructions (Luciferase Assay System, Promega).

### Construction and production of SIV vectors

Replication-defective self-inactivating (SIN) SIV vector was created by deletion of the U3 region of 3' long terminal repeat (LTR), which contains two NF- $\kappa$ B sites, three Sp-1 sites, and a TATA box, as described previously (ref. 16; Gene Bank association number: #X07805). The transduction efficiency of the SIN vector did not differ from the intact U3 sequence-containing vector (16).

The full-length human *FVIII* (*hFVIII*) cDNA was a generous gift from Dr. J.A. van Mourik (Blood Coagulation, Sanquin, Amsterdam, Netherlands), and the human *B domain-deleted* (*BDD*) *FVIII* (*hBDD-FVIII*) cDNA was generated by PCR-based mutagenesis as described previously (17). *eGFP* or *hBDD-FVIII* driven by the CMV promoter (SIV-CMV-eGFP/*hFVIII*) or GPIIb promoter (SIV-GPIIb-eGFP/*hFVIII*) was inserted between the LTR-containing elements of an SIV-derived vector (see Results).

The gene transfer plasmid was transfected together with three packaging plasmids (encoding *gag-pol*, *rev*, and *VSV-G env*) into 293T cells using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen). After 12 h, the culture medium was replaced to start harvesting virus particles; harvesting was undertaken at 48 h and virus particles were concentrated by ultracentrifugation. Transduction units of SIV vectors carrying *eGFP* were measured by infection of 293 cells followed by measurement of *eGFP* expression by FACS analysis. The average infectivity of the SIV-CMV-eGFP vector was in the range of 2–5  $\times 10^8$  TU/ml. To compare viral infectivity between different promoters or targeted genes, viral particle titer was simultaneously measured by real-time quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR. Viral RNA was isolated using QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA), and the isolated RNA was reverse-transcribed using SuperScript II (Invitrogen). Quantification of vector particles was performed by measuring copies of vector-specific post transcriptional regulatory element derived from the wood-chuck hepatitis virus (WPRE) sequences by real-time quantitative PCR using the QuantiTect Probe PCR system (QIAGEN). The WPRE sequence was amplified with WPRE forward primer 5'-GCTTTGATTTCCTCCTCT-3' and WPRE reverse primer 5'-GGCCCAACTCCTCATAA-3'. The FAM-labeled probe sequence was 5'-ATCCTGGTTGCTGTCTC-3'. The PCR started with an initial incubation step of 15 min at 95°C. Thermal cycling consisted of 45 cycles of 94°C for 15 s, 56°C for 30 s, and 76°C for 30 s. During the annealing phase of PCR, reporter fluorescent dye from a specific probe was detected with a ABI

PRISM 7700 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). The standard curve of the viral titer was estimated by serial dilution of the gene transfer vector plasmid. The average virus particle titer of the SIV-based vector was in the range of 1–2  $\times 10^{10}$  TU/ml. The infectivity of SIV vectors [multiplicity of infection (MOI)] was estimated from the ratio of particle titer to SIV-CMV-eGFP.

For the transduction of UT-7/TPO and CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes with SIV vectors, 1  $\times 10^5$  cells were resuspended in 100  $\mu$ l of culture medium containing 8  $\mu$ g/ml of polybrene. Cells were transduced with SIV vectors at various MOIs indicated in the test for 24 h. Cells were then resuspended in 300  $\mu$ l PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA, and eGFP-positive cells were subjected to FACS analysis. When CD34<sup>+</sup> cells were transduced with SIV containing *eGFP* followed by differentiation of megakaryocytes *in vitro*, we could not observe sustained eGFP expression during the differentiation. This was probably due to the short life span of the eGFP-expressing differentiating cells *in vitro*. Hence, CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes, at an indicated day after the start of differentiation, were transduced with SIV to examine the influence of megakaryopoiesis on promoter activity.

### Hematopoietic stem cell isolation and viral transduction

Bone marrow cells obtained from mouse femur and tibia were depleted for cells expressing lineage cell markers B220, CD5, CD11b, Gr-1, and Ter-119 by magnetic sorting using a Lineage Cell Depletion kit (Miltenyi Biotec.) and then sorted for Sca-1<sup>+</sup> and c-kit<sup>+</sup> cells (KSL) by FACS (FACSAria Cell Sorter, Becton-Dickinson).

When freshly isolated KSL cells were directly infected with SIV vectors, PI-positive cells (dead cells) increased after the transduction and the efficacy of the transduction decreased (data not shown). Hence, we examined the culture conditions of KSL cells to improve SIV transduction and cell viability. When isolated KSL cells were cultured with IL-3, IL-6, and SCF, SIV transduction of the eGFP gene into KSL cells resulted in lower transduction efficiencies (25–35%; MOI of 30) and a significant increase in PI-positive cells (20–30%; data not shown). On the other hand, high proportions of eGFP positive cells were obtained by culturing the KSL cells with SCF, IL-6, sIL-6R, Flt-3L, and TPO for 3–7 days (see Results), and PI-positive cells after eGFP transduction were significantly decreased (8–12%). Hence, KSL cells were precultured with IMDM 1% fatty acid-free BSA, 200  $\mu$ g/ml of transferrin, and 10  $\mu$ g/ml of insulin, supplemented with 100 ng/ml of SCF, 10 ng/ml of TPO, 100 ng/ml of IL-6, 100 ng/ml of Flt-3L, and 400 ng/ml of sIL-6R before viral transduction in accordance with a method for human CD34<sup>+</sup> expansion (18). Infection of cells with SIV was carried out in a plate coated with 50  $\mu$ g/ml of RetroNectin (TakaraBio, Tokyo, Japan). Cultured KSL cells (1 $\times 10^5$  or 1 $\times 10^6$  cells) were resuspended in 100  $\mu$ l or 1 ml of IMDM with 10% FBS. The cells were transduced with SIV vectors at various MOIs as indicated in the text for 12 h in the presence of the same cytokine combination and incubated at 37°C. Since the use of polybrene (up to 4  $\mu$ g/ml) *per se* did not significantly improve the transduction efficiencies of mouse KSL and human CD34<sup>+</sup> cells (data not shown), our procedure for stem cell transduction was performed without polybrene. Cells were then resuspended in 100  $\mu$ l of PBS containing 1% BSA for stem cell transplantation or incubated for the indicated number of days for FACS analysis.

### Stem cell transplantation

Bone marrow cells were obtained from B6-Ly5.1 to allow us to distinguish between donor and recipient cells. Recipient mice

(8–12 wk old B6-Ly5.2) were irradiated with a single lethal dose of 9.5 Gy ( $^{60}\text{Co}$ , Gamma Cell; Norton International, Ontario, Canada). One hundred thousand cultured KSL cells from B6-Ly5.1 without or with SIV transduction were injected together with  $5 \times 10^5$  freshly isolated Ly5.2 unfractionated bone marrow cells. Since the transplantation procedure without unfractionated bone marrow cells increased mortality to 60–80%, we simultaneously transplanted KSL cells with non-transduced bone marrow cells as competitor cells. To assess the reconstitution of bone marrow, peripheral blood was drawn from the retro-orbital sinus with heparin-coated micropipettes and analyzed for the percentages of Ly5.1 (donor-derived) lymphoid and myeloid cells by flow cytometry. In our transplantation procedure, engraftment by Ly5.1 cells was 40–55% in lymphoid and myeloid cells 4 months after transplantation. For secondary transplantations,  $2 \times 10^6$  unfractionated marrow cells collected from primary recipient mice 4 months after primary transplantation were used to reconstitute lethally irradiated recipients (9.5 Gy). The animals with relatively high eGFP levels after transplantation were chosen as donors for the secondary bone marrow transplantation.

#### Detection of the transcripts of hFVIII transgene

Detection of *hFVIII* transgene transcripts was performed by RT-PCR (19). RNA was isolated from mouse organs using an RNA isolation kit (RNeasy Protect Kit; QIAGEN). RNA samples were subjected to RT-PCR using a pair of primers for *hFVIII* (19) and an RT-PCR kit (SuperScript One-Step RT-PCR System, Invitrogen). A primer pair for mouse *GAPDH* mRNA (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used in the control RT-PCR experiments.

Quantification of SIV vector-derived mRNA expression was examined by real-time quantitative RT, using the QuantiTect Probe RT-PCR system (QIAGEN). Mouse *GAPDH* (*mGAPDH*) control reagents (QIAGEN) were used to estimate the amount of RNA analyzed. A standard curve was established by analyzing duplicate aliquots of serial dilutions of SIV gene transfer vector. Fifty nanograms of purified RNA from tissues as indicated in the text were used as a template. For each sample, the amounts of WPRE sequences compared with the standard control curve were estimated, and the quantities of the WPRE sequences were determined by dividing the copy number of the WPRE sequences by those of the *mGAPDH* sequences.

#### Integration of vector sequence into genomic DNA

Genomic DNA was extracted from bone marrow cells of mice 4–5 months after transplantation using a DNA isolation kit (DNeasy Tissue Kit; QIAGEN). WPRE sequence derived from the SIV vector was amplified using real-time quantitative PCR with a QuantiTect Probe PCR system as described above. For each sample, the amounts of WPRE sequences compared with the standard control curve were estimated, and the integration of the vector sequence was calculated from dividing the copy number by the cell count corresponding to the DNA quantity.

#### Immunohistochemistry

Bone marrow cells attached to glass slides using a Cytospin3 (Shandon, ThermoShandon) were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and then permeabilized with 0.2% Triton X-100. After being blocked with 1% BSA, samples were incubated with polyclonal anti-hFVIII antibody (Ab) conjugated with biotin at 4°C for 2 h, washed with PBS, and then

incubated with streptavidin conjugated with Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) and FITC-labeled anti-mouse GPIIb MoAb. Immunofluorescent staining was observed and photographed using a fluorescent microscope with an attached camera.

For detection of hFVIII molecules in mouse tissues by immunohistochemistry, the spleen was fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 2 h at 4°C, incubated with PBS containing sucrose (10–30%), and then frozen in the presence of OCT compound in dry ice/ethanol. Sections were prepared from frozen tissues at  $-25^\circ\text{C}$  and attached to polylysine-coated glass slides. For detection of hFVIII, tissue sections were blocked with 1% rabbit serum in PBS containing Triton-X 100 (0.1%) and incubated with sheep polyclonal anti-human FVIII Ab (Cedarlane Laboratories, Hombly, Ontario, Canada) at 4°C for 16 h. After being washed with PBS, sections were incubated with biotin-conjugated rabbit anti-sheep IgG Ab followed by the avidin-biotin complex (ABC) reagents (Vectastain ABC Elite kit; Vector, Burlingame, CA) and a 3,3'-diaminobenzidine kit (Vector).

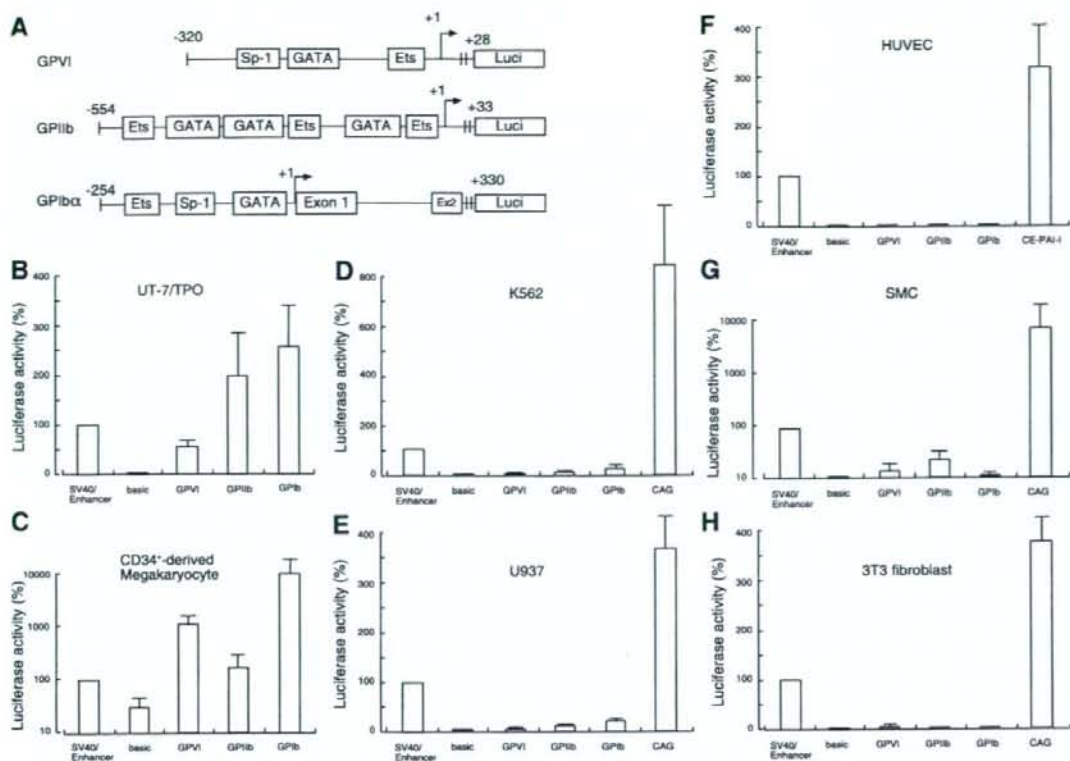
#### Measurement of hFVIII antigen, neutralizing antibodies, and phenotypic correction

hFVIII antigens were measured by an anti hFVIII-specific ELISA kit (Affinity Biological, Hamilton, Ontario, Canada) and compared with those in pooled human normal plasma. Two hundred and seventy microliters of whole blood were drawn from the superior vena cava of anesthetized mice using a syringe containing 30  $\mu\text{l}$  of sodium citrate and 1  $\mu\text{M}$  PGI<sub>2</sub> to inhibit platelet activation. When indicated, 1  $\mu\text{M}$  phorbol myristyl acetate (PMA) and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen were added to the blood to activate platelets. After centrifugation, the platelet-poor plasma was frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed for FVIII antigen. Analyses of neutralizing antibodies against hFVIII developed in mice were performed by the Bethesda method as described using FVIII deficient plasma and normal pooled plasma (8). Phenotypic correction was tested in some of the transplanted mice by anesthetizing them with diethyl ether and clipping 1.5 cm of their tails. The mice were then observed for survival after 24 h.

## RESULTS

#### Comparison of luciferase reporter expression driven by platelet-specific promoters

To achieve efficient expression of genes targeted in platelets, we first compared the promoter activities of three platelet-specific genes, *GPIIb*, *GPIIb $\alpha$* , and *GPVI*, in megakaryocytic cells. **Figure 1A** shows a schematic diagram of the platelet-specific promoters used in this study with their unique regulatory elements. The luciferase reporter gene was used to compare promoter activities among different promoters. We used the nucleotide region in promoters that had the highest activity in previous studies (12–14). The *GPIIb* promoter directed the most powerful expression of luciferase in UT-7/TPO cells, a megakaryoblastic cell line (Fig. 1B), and its relative efficiency was even more marked in CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes (Fig. 1C). Since *GPIIb* and *GPVI* were reportedly expressed in endothelial cells (20,21), we examined whether these platelet-specific promoter activities were stimulated in



**Figure 1.** Comparison of platelet-specific promoter activities. A) A schematic presentation of platelet-specific promoters used in experiments is shown. Each construct along with a promoter-less vector (basic) or a positive control vector (SV40/Enhancer) was transfected into UT-7/TPO (B), CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes (C), K562 (D), HUVECs (F), SMC (G), and 3T3 fibroblasts (H). Luciferase activities were measured 48 h after transfection and are shown relative to the activity driven by the SV40 promoter (SV40/Enhancer). Each experiment was carried out 5 times with duplicate samples. Columns and error bars are mean  $\pm$  SD.

endothelial cells. Under conditions in which the PAI-1 promoter (22) efficiently directed luciferase expression, the GPIIb, GPIb $\alpha$ , and GPVI promoters did not direct luciferase expression in HUVECs (Fig. 1). We further examined promoter specificity by using other cells including K562, an erythroleukemic cell line; U937, a myelomonocytic cell line; human aortic artery SMC and 3T3 fibroblast cell. In these cells, the platelet-specific promoters drove less reporter gene than SV40/Enhancer and CAG promoter (Fig. 1). Hence, the specificities of the platelet glycoprotein promoters did not differ, and the activity of GPIb $\alpha$  promoter was the strongest in megakaryocytes.

#### Efficient transformation of megakaryocytic cells by SIV-based vectors

Next, we constructed SIV-based lentiviral vectors containing the *eGFP* gene under the control of either the CMV promoter (SIV-CMV-eGFP), GPIb $\alpha$  promoter (SIV-GPIb $\alpha$ -eGFP), GPIIb (SIV-GPIIb-eGFP), or GPVI (SIV-GPVI-eGFP). The transgene located downstream

of the promoter was inserted between the LTR-containing elements of a SIV-derived vector (Fig. 2A). To increase gene expression in the transduced cells, a post-transcriptional regulatory element derived from woodchuck hepatitis virus (WPRE) was inserted downstream of the gene expressed (Fig. 2A). To investigate *eGFP* gene transduction of megakaryocytes, UT-7/TPO or CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes were cultured for 24 h in the presence of various concentrations of the indicated SIV vector. SIV-GPIIb-eGFP, SIV-GPIb $\alpha$ -eGFP, SIV-GPVI-eGFP, and SIV-CMV-eGFP efficiently transduced the *eGFP* gene into UT-7/TPO and CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes (Fig. 2B, C). There were no significant differences in *eGFP* expressions among cells transfected with SIV-GPIIb-eGFP and SIV-GPIb $\alpha$ -eGFP (Fig. 2B and C).

We next investigated whether *ex vivo* megakaryocyte differentiation affects gene expression. *eGFP* expression in CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells transduced with SIV-GPIb $\alpha$ -eGFP or SIV-GPVI-eGFP was <10%, whereas  $\approx$ 20% of the cells transduced with SIV-GPIIb-eGFP were positive for *eGFP* (day 0 in Fig. 2D), indicating that the GPIIb promoter worked at an