

200932017A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究
(H21-エイズ-一般-001)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22 (2010) 年 3 月

研究代表者 坂 田 洋 一
(自治医科大学)

目 次

I. 総括研究報告

- 血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究 _____ 1
(自治医科大学 坂田洋一)

II. 分担研究報告

1. 血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、血友病遺伝子治療の
基礎実験 _____ 14
(自治医科大学 坂田洋一、三室 淳、窓岩清治)
2. アデノ随伴ウイルスベクターを用いた血友病遺伝子治療の基礎的検討 _____ 21
(自治医科大学 小澤敬也、水上浩明)
3. 血友病 (マウスおよびイヌモデル) の遺伝子治療および成熟肝細胞・ES細胞を
用いた細胞治療 _____ 24
(奈良県立医科大学 嶋 緑倫)
4. AAVベクターの局所投与における選択性・安全性の評価：
カニクイザル肝臓に対する経門脈的投与法の確立 _____ 28
(自治医科大学 高橋将文)
5. 血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発 _____ 31
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
6. 血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究 _____ 35
(東京医科大学 稲葉 浩)
7. ウイルス感染血友病患者の手術適応に関する研究 _____ 40
(東京大学医科学研究所附属病院 竹谷英之)
8. 血液凝固異常症のQOLに関する研究 _____ 43
(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志)
9. 薬害HIV感染被害者・家族の現状からみた、
血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究 _____ 67
(社会福祉法人 はばたき福祉事業団 柿沼章子)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 72

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 74

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究
研究代表者 坂田洋一 自治医科大学 教授

研究要旨

血友病患者の QOL 向上を目指し、以下の 3 つのプロジェクトを進めた：(I) 血友病遺伝子治療、(II) 血友病インヒビター対策、(III) 血友病患者の社会的 QOL 改善に向けた調査研究。

(I) 遺伝子治療 血友病患者に cure をもたらず遺伝子治療は、不慮の出血を防げる、薬剤に含まれる可能性のある病原体、或いは作製途中に混入する異物など(薬害)の問題を解決する、さらに、高価な血液製剤の使用量を減らすことが出来るなどの理由により、大きな期待が寄せられている。我々は、2 つの方法で遺伝子治療研究を展開している。まず、血友病遺伝子を、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)ベクターを、そして、体外で自己幹細胞や iPS 細胞などに遺伝子導入し、これを体内に移植する場合(“細胞治療”)には、数年以内に九州大学眼科で臨床応用に利用される予定の SIVagm 由来ベクター(SIV ベクター)を主として用いた。マウスを用いた血友病遺伝子治療の成果を基礎に、非ヒト霊長類カニクイザルを用いて、AAV ベクターを利用した臨床研究開始に向けた効率と安全性の向上をキーワードに、前臨床研究を精力的に展開した。サルにはこれまでに血友病は同定されていない。また、サルとヒトでは凝固第 VIII 因子(FVIII)、第 IX 因子(FIX)とも極めて相同性が高く、既存のヒト因子測定系では遺伝子導入による発現因子定量は不可能である。FIX については、ヒトとサルの因子を識別して認識するモノクロナル抗体を作製し得た。これを用いてこれまで進めてきたサル FIX 発現実験を、本年度はサルの頭数増加や投与方法を工夫し検討した。マウスを用いた実験から、肝臓に因子発現を出来るだけ限局することでインヒビター産生が低下することが示唆されたので、肝臓に特異性の高い AAV8 ベクターとプロモータをベクター構築に利用した。基本的に FVIII の肝臓での発現もマウスでの結果からは FIX と同様の技術で可能と思われる。しかし、新規作製した FVIII のモノクロナル抗体を組み合わせ、発現 FVIII を 1%以下のレベルで測定可能な系が本年度ほぼ完成したので次年度サル実験を計画した。発現 FVIII の止血効果確認を目的にした血友病 A クローンブタの作製もほぼ成功した。FIX 遺伝子の導入と発現は、既感染による AAV に対する中和抗体の有無により左右されることはこれまでに報告した。ヒトへのベクター投与方法を抗体の有無により選択することを念頭に、これまでに進めてきた測定系の感度上昇研究をさらに展開した。糖類を細胞感染時に加えることで感度上昇させた系を用いて、数多くのサルでの中和抗体測定を進め、その実用性を検討した。昨年度、抗体陽性サルを選択して、抗体を含む血液と接触させないでベクター投与したサルの、治療レベル FIX の発現が長期持続することを確認した。また、生検、および一部安楽死させ組織を検討し、導入遺伝子維持も確認された。抗体価が零に近いサルに末梢静脈からベクターを投与し、FIX を発現させたサルにおいても年余にわたる発現維持と肝臓での発現が確認された。これまでに、血友病 B 遺伝子治療臨床研究開始の準備はかなり整いつつある。そこで、2 年後の臨床研究開始を目指し、ヒト投与可能な GMP レベルベクター作製委託可能な企業を、技術力、費用などを基盤にグローバルな視点で検討した。ディナベック関連の Vector Gene Technology Company 社を選択し、班員数名が訪問し、技術者面接、設備視察を実行し、委託可能であることを確認した。そこで、non-GMP レベルベクター作製をまず依頼し、製造物の品質検討の結果、GMP

レベル AAV8 ベクター製造に向けて技術的に問題ないことが確認された。

ウイルスとしての危険性を除いた改変 SIV ベクターを用いて、血液幹細胞に FVIII 或いは FVIIa 遺伝子を導入し、血小板に特異的な GPIb α プロモータを用いて血小板に発現させる血友病 A 細胞治療可能性は既に報告した。さらに安全性を高めるために除去可能な部位へ細胞移植する技術として細胞ナノシートの利用の検討を本年度開始した。改変 SIV ベクターに FVIII 遺伝子を搭載したベクターを血友病マウスより採取した間葉系幹細胞に導入し、ナノシートを作製後、除去可能部位として血友病マウス腹腔内へ数枚移植した。結果、治療レベル FVIII 発現が可能であることが示唆された。嶋等は、市販レンチウイルスベクターを用いて、血管内皮前駆細胞に FVIII 遺伝子を導入し、経静脈的に血友病 A マウスに投与する細胞移植実験を展開した。結果、肝障害を惹起させたマウスで肝臓の CD34 陽性類洞細胞に生着が確認された。次に、SIV ベクターの染色体への random integration による危険性の軽減を本年度は検討した。まず、LAM-PCR 法の技術改善を進め、組み込み部位を高レベルで同定可能になり、安全な移植細胞選択へ一歩前進した。さらなる安全性を担保するためにインシュレータの検討を進めた。トリ β グロビン由来のインシュレータをコントロールに GPIb α 遺伝子近傍の sequence から GPIb α 特異的インシュレータを同定・検討し、報告準備中である。

遺伝子治療の安全性と効率性を更に高めるために以下のような発展的検討も進めている。1) マウス ES 細胞、或いは iPS 細胞の分化誘導とこれらに遺伝子導入した細胞治療可能性の検討も進めている。移植細胞数確保には有利であるが、免疫の問題、テラトーマ発生の問題など解決しなければならない課題も多い。2) AAV-Rep 遺伝子を用いて、16 番染色体 AAVS1 領域へ部位特異的に FVIII 遺伝子を導入する研究にも一定の進歩が見られた。II) インヒビター陽性患者に大量長期に FVIII を投与し、免疫寛容を誘導することが臨床応用されている (ITI 治療)。FVIII を投与し、インヒビターを誘導した血友病 A 成熟マウスの皮下にマイクロポートを埋め込み、間欠的に或いはポンプを用いて持続的に長期に製剤を投与することで ITI モデルを作製した。詳細な解析を進めている。また、FVIII 遺伝子、およびサイトカイン遺伝子などの遺伝子多様性がインヒビター産生に関わるという海外の報告に基づき、日本人患者の多様性の検討も開始した。(III) 調査研究 本年度は過去 3 年間に実施した患者視点のアンケートをさらに改良し、二次アンケートを作成した。患者を含めた QOL 調査研究委員を新たに選定した。また回収率の向上を目指して、個人情報に配慮した上で、患者代表を通してアンケートを配布するなどの案を作成した。さらに、今回新たに医療関係者にもアンケート調査を行い、多角的視点から解析を進める方針とした。次年度、調査票を送付し、回収・解析へと歩を進める。前回のアンケートで関節内出血が血友病患者の QOL を大きく左右することが明らかになった。その対策課題として、竹谷は整形外科的視点から関節内出血を検討した。関節内出血に関しては、HIV 感染者では、整形外科的対応だけではなく、非観血的滑膜治療法の導入や、免疫力低下に配慮した内科的対応の必要性が認識され、その検討を始めた。次に、薬害 HIV 感染血友病患者の持つ課題および課題克服による QOL 向上研究では、感染被害血友病患者母親 19 名と非感染血友病患者母親 10 名を対象に、患者出生から成人までの時期について家族関係、および社会的関係に関するインタビュー調査を展開した。結果、1) 血友病が遺伝性疾患である上に、HIV 感染被害が加わることにより家族・社会的関係がさらに困難になったことが明らかになった。2) 血友病の根治が現時点で不可能なことに関与して、遺伝と親子関係の問題点も大きいことが明らかになった。今後、当事者と家族、および医療を含む専門家が協働し支援ツールを確立するための検討を進める。

分担研究者：

自治医科大学遺伝子治療研究部

教授 小澤敬也

奈良県立医科大学小児科学教室

教授 嶋 緑倫

自治医科大学バイオイメージング

研究部 教授 高橋将文

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 稲葉 浩

東京大学医科学研究所附属病院

講師 竹谷 英之

聖マリアンナ医科大学

教授 瀧 正志

社会福祉法人はばたき福祉事業団

事務局長 柿沼章子

A.研究目的

血友病は血液凝固因子 VIII(FVIII)、或いは IX(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時因子製剤補充療法が中心で、致命的頭蓋内出血等の予防は不可能である。過去に HIV や HCV 感染の原因となった因子製剤の安全性は改善されたが、未知ウイルス混入や製造時の異物混入などの問題は残る。遺伝子治療はこれらを解決し、血友病に治癒をもたらす。さらに、数%の因子レベル発現で治療目的を達することが出来るので、遺伝子治療対象疾患としても血友病は適している。この他、治療に関しては、因子製剤の著しい改良にも関わらず、同種抗体(インヒビター)出現が問題として残る。患者の苦痛という点からのみならず、経済的にも重要な課題である。一方、患者の QOL に目を向けると、遺伝性疾患である血友病を生き抜くための、患者、および家族の精神的・社会的負担は極めて大きく、その改善のための課題は多い。さ

らに、過去の薬剤による HIV や HCV 感染は血友病が出血を伴うこともあり、大きな社会的偏見を生んだ。その偏見をなくし、患者 QOL を高めるために具体的に取り組むべき問題の把握とその解決に向けた対策の樹立は極めて重要である。血友病患者のこれらの課題を克服するために、以下の研究を進める。

I 遺伝子治療に関しては、肝臓を標的に染色体に殆ど組み込まれないアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた血友病 B 遺伝子治療臨床研究を 3 年目に開始することを視野に計画を遂行する。まず、AAV に対する抗体などの有無で投与患者を選択し、投与方法を工夫するなど、FIX 遺伝子導入・発現のさらなる安全と効率改善を目指す。ヒト投与可能(GMP レベル)AAV ベクター作製依頼企業の選択と契約に向けて歩を進める。血友病 A ではサルでの発現因子測定系確立と、発現 FVIII 活性確認目的に血友病 A クロームプラズマを作製する。さらに半永久的遺伝子治療を目指して、染色体組み込み型改変 SIV ベクター利用を、組み込み部位同定による細胞選択、インシュレーターと細胞ナノシートという安全のためのキーワードを基礎に検討する。II インヒビター対策は、血液製剤大量持続投与による免疫寛容誘導(ITI)モデルを血友病マウスに作製し、詳細を解析することで効率的寛容誘導法を検討する。III 社会的 QOL 改善研究では実施した一次アンケート解析を基にした問題解決の試みと、カバーしきれなかった点などを改良した二次アンケート作成を検討する。また、薬害 HIV 感染血友病患者の問題解決のために患者・患者家族の聞き取り調査を通して、解決すべき課題を明らかにし、今後の専門家を交えた支援策創出のための案を提示する。

B.研究方法

I.遺伝子治療：1.血友病B遺伝子治療：サルには血友病は確認されていない。ヒトとサルの FIX 相同性は 97%以上であるが、我々は既に両者を識別しうるモノクロナル抗体を作製した(世界唯一)。これを用いて遺伝子導入により発現した FIX を定量する。これまでに個体の AAV 既感染による抗体が、AAV ベクターの感染効率を阻害することを明らかにし、高感度抗 AAV 抗体測定法の開発を試みた。バイオアッセイ系に糖類を加えることで、100 倍の感度上昇を得ていた。本年度はアデノウイルス E4 遺伝子の発現など、さらなる感度上昇を惹起する因子を検討し、抗体陰性サルを同定して、末梢血管から抗体を含む循環血液中へ AAV ベクター投与して遺伝子導入効率を検討した。以前に報告した抗体回避ベクター投与は、細いサルの門脈、に使用可能なバルーン付きマイクロカテーテルの検討を進めた。さらに肝動脈からの投与も検討を開始した。ヒトも AAV 感染可能性は高い。抗体有無による投与方法選択を目的に、全国血友病患者管理医師ネットワークを利用して抗 AAV 抗体測定を依頼する為の学内倫理審査を受けた。腸間膜静脈、或いは抗体回避法で経門脈的 AAV ベクターを投与し、500 日以上経過したサルを順次安楽死させ、解剖(倫理的配慮)し、導入組織の変化、導入遺伝子量と分布、生殖器を含むその他臓器への遺伝子の広がりや、免疫系の変化などを検討した。GMP レベル AAV ベクター作製を依頼する企業を、技術力、実績、費用の点から検討し選択した。選択企業に評価目的に、まず non-GMP レベル AAV ベクターの作製を依頼し、作製物を検討した。2.血友病A遺伝子治療：FVIII については、AAV ベクター搭載可能遺伝子長の制限から、生体内で活性化されたときに除去されるペプチド部

位を除いた B 領域除去 FVIII の発現を目的とした。サルとヒトの FVIII 相同性は 98%以上あり、識別しうる抗体は世界中に存在しない。そこで、多数の新規モノクロナル抗体を作製し、これらを組み合わせてサル個体の産生する完全長と遺伝子治療で発現させる B 領域除去 FVIII を識別可能な測定系作製を進めた。またこの発現因子の生体内止血活性確認のために、ヒトに近いブタを用いて血友病 A クローンブタ作製を進めた。農業生物資源研究所でのクローンブタの誕生を待ち、検討を進める。血友病遺伝子治療臨床研究開始を視野に入れた患者遺伝子解析も倫理面に配慮し施行した。3.遺伝子導入細胞移植：改変 SIV ベクターは眼科領域で臨床応用が検討されている(P2 扱い)。幹細胞、或いは iPS 細胞に、*ex vivo* で SIV ベクターを利用して遺伝子導入する。増殖分化させ、安全な細胞を選択し移植、或いは細胞ナノシートを作製して動物の除去可能部位に移植して発現する方法を検討した。さらに、トリグロビン由来インシュレータ CHS4 の正向き、逆向きでの効果検討、我々の同定した血小板 GPIIb 由来 C1、C2 インシュレータ効果の検討、染色体組み込み部位確認のための LAM-PCR 法の技術確立、など安全性向上を目指した。安全性向上を目指した探索研究として、以下の 2 つの研究も進めた：(1)血友病 A マウスの末梢血から血管内皮前駆細胞(EPC)を分離培養し、これに市販のレンチウイルスベクターを用いてヒト第 VIII 因子遺伝子を導入した。この細胞を血友病 A マウスへ静脈内投与し、正嫡を検討した。(2)先に報告した AAV-Rep 遺伝子を用いて第 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的 FVIII 遺伝子組み込み効率の改善を図った。II.インヒビタ対策：生下時に、全身、或いは胸腺への FVIII 投与で、抗原特異的制御性 T 細胞が誘導され、免疫

寛容が誘導されることを報告した。その臨床応用の可能性をはかる。本年度は成熟血友病 A マウスにマイクロポートシステムを導入して、これまでの間歇投与に加えて、ポンプを用いて FVIII を持続投与し、作製した ITI の血友病 A マウスモデルの解析を進めた。 III 社会的 QOL 向上のための研究:一次アンケート解析結果の反映を図る。特に QOL を左右する関節出血については、整形外科的・内科的視点から、HIV 感染血友病患者を中心に検討する。被害 HIV 感染血友病患者の母親 20 件、HIV 非感染血友病患者母親 10 件を調査対象とし、了解を得た人に手紙、電話で確認をとった後、書面で調査参加の同意を得る。インタビュー場所に関しては、調査協力者の意向の尊重とプライバシーの確保に留意して選択する。解析に関わる研究者向けに血友病に関わる勉強会を複数回開催し、インタビューケース評価を実施し、全体的な分析と課題抽出と系統的整理を行う。

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 vector を利用して遺伝子導入法の開発とその応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号）を遵守して施行する。各種動物を用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の十分な配慮など）を含めて厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び各大学の動物実験指針規定に沿って行う。霊長類

医科学研究センターとの共同研究として独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで実施する予定のサルの実験では、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験ガイドライン」及び霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。臨床研究を実施する場合は、厚生労働省の倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 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 1.血友病 B 遺伝子治療: AAV の既感染により生じる抗 AAV 抗体は低レベルでも AAV ベクターを利用した遺伝子治療を阻害する。AAV8 に対する中和抗体測定系は、測定に用いる細胞に感染特異性の高いものがなく、測定には大量の AAV8 ベクターが必要となり、血清中の低レベル中和抗体の測定はこれまで不可能であった。本年度、検討したアデノウイルス E4 遺伝子の発現による感染増強と測定系への糖類付加は感度上昇に相乗的に作用し、抗 AAV 中和抗体の阻害活性測定感度を 100 倍改善することができ、実用的な測定系が樹立できた。多くのサルにおける中和抗体を測定し、選別した抗体陰性サル 3 頭へ末梢から肝臓特異性の高いプロモータと FIX 遺伝子を搭載した AAV ベクター投与で、全サルに

10—33%FIX 発現持続がみられた。経過中、肝機能にも異常は見られなかった。これらのサルを長期観察後、安楽死させて、サル組織解析をすすめたところ、肝臓に発現量に見合う導入遺伝子維持が確認された。他臓器としては脾臓に僅かに導入遺伝子が確認されたが、免役染色上、発現 (-) であった。組織学的に腫瘍化や慢性炎症は認めなかった。抗 AAV 抗体陽性のサルでは、開腹して門脈血流遮断後、生理食塩水で血管内血液を洗浄し、ベクターと抗体を含む血液が接しないようにして AAV ベクターを投与することで、30%レベルの FIX 発現維持をサルで確認できたことは既に報告した。ヒト応用ではバルーンカテーテルを用いて理論的に同様の方法でベクターを投与する予定である。ただし、ヒトでは血管サイズに問題なく臨床でも門脈カテーテルは利用されているが、カニクイザルの腸間膜静脈は細く、確認実験のための適当サイズ市販カテーテルが存在しない。そこで、ヒトへの応用も考慮して、肝動脈側からのアクセスも循環器内科と移植外科ドクターの助言の下に検討を開始した。ヒトの遺伝子治療方法選択を目的としたヒト抗 AAV 抗体測定のための学内倫理審査承認を受け、日本血栓止血学会 SSC 委員会血友病部会を中心に血友病管理医師並びに患者代表に協力を依頼した。また、ヒトに投与可能な GMP レベル AAV8 ベクター作製依頼企業を、費用と実績の面から検討した。結果、ディナベック関連の Vector Gene Technology Company 社(中国血友病 B 臨床研究利用 AAV2 作製、米 FDA 承認実績あり)を、班員数名が訪問し、技術者面接、設備視察を実行し、これを選択した。次いで、FIX 遺伝子を搭載した non-GMP レベル AAV8 ベクター作製を依頼した。予定している GMP レベル製造と同一の方法で作製された

non-GMP レベル AAV8 ベクターの、1)無菌試験、2)治療用遺伝子の確認、3)純度試験、4)マイコプラズマ否定試験、5)ベクター定量試験を実施した。何れの値も基準値を満たしており、AAV2 ベクター作製の実績どおり GMP レベルベクター作製依頼が可能であることが確認された。2.血友病 A 遺伝子治療：作製した複数のモノクロナル抗体を組み合わせて、発現 FVIII 1%近傍レベルをサル FVIII と識別測定可能な系が確立できた。サルに FVIII 搭載 AAV ベクターを投与予定である。血友病 A クローンブタ作製はまず家畜豚を用いて胚移植を試み、ほぼ成功した。3.遺伝子導入細胞移植：移植細胞への遺伝子導入に利用する改変 SIV ベクターは、九大眼科での遺伝子治療に向けて、生産効率や安全性など GMP レベルベクター作製に向けて格段に進歩し、血友病遺伝子治療への応用も視野に入れることが可能となった。しかし、AAV ベクターと異なり random に染色体に組み込まれる。組み込まれた遺伝子の生体内がん遺伝子などへの影響を遮断するインシュレータを以前から検討してきた。トリグロビン由来インシュレータ CHS4 は、逆向き挿入がクローナル増殖抑制に有利であることが確認された。血小板膜糖タンパク質 GP1b 遺伝子由来 C1,C2 にも CHS4 と同レベルのクローナル増殖抑制効果は確認できたが、サイレンシング抑制は弱かった。LAM-PCR 法技術確立により、インシュレータ効果の解析や染色体導入部位を同定できるようになり、安全で適切な細胞選択が理論的に進められるようになった。ルシフェラーゼ遺伝子、或いは FVIII 遺伝子搭載改変 SIV ベクターを血友病 A マウス間葉系幹細胞に導入し、*ex vivo* で作製した細胞ナノシートを複数枚血友病マウス腹腔に貼り付け、量依存性、治療レベル因子発現が確認できた。探索検討と

して進めている血管内皮前駆細胞に *ex vivo* で遺伝子導入して、細胞を静注する細胞治療では、健常部位には殆ど生着せず、四塩化炭素で肝障害を起こした障害肝に多数の EPC の生着が見られた。II インヒビタ対策：血友病 A マウスへヒト FVIII を週 5 回、60 回投与時にインヒビター価はピークとなり、160—200 回投与後その 20%未満に低下した。さらに輸注ポンプを併用し持続投与すると、ITI はより効率よく誘導可能であった。免疫グロブリン、サイトカインの変異などを血液、リンパ組織を用いて解析し、投稿準備中である。III 社会的 QOL 向上研究：一次アンケート解析の結果、関節内出血が QOL を左右することが明らかとなった。そこで、関節置換、滑膜除去術、放射性同位元素を用いた滑膜処理などの関節治療の QOL に与える risk-benefit の検討を始めたが、薬害 HIV 感染により免疫不全の見られる血友病患者の治療には整形外科的な視点のみではなく内科的な手術適応基準の確立が必要であることが示唆された。新たに研究協力者を血液凝固異常症 QOL 調査運営委員会委員として選定するとともに、患者、および医療従事者の視点を基に作成された以前の一次アンケートの結果解析に基づき、その発展とさらに検討点を加えた二次アンケート案の作成を実施した。今回はアンケートの配布回収方法に個人情報配慮した上での工夫と、アンケート対象に医療者側も含めることを計画した。薬害 HIV 感染血友病患者の母 20 件(1 件はインタビュー実施後に参加同意を撤回)非感染血友病患者母 10 件(全国分布、年齢 3 群)の聞き取り調査を行った。インタビューは概ね 2 時間以内に終了し、離脱の 1 例を除き特に問題は生じなかった。支援創出に向けて今後の課題を整理した。結果、支援必要要件として、子供たちの学校生活、血友病

の遺伝と親子関係を含む家族関係、医療機関確保、教育、就労、HIV/AIDS・血友病に対する偏見などが明らかとなった。

D. 考察

I. 遺伝子治療：AAV8 ベクターを用いて、サル 10 頭に肝臓で、治療レベル FIX 発現を安全に数年間維持可能になった。組織解析の結果、導入遺伝子が維持されていることも確認された。バルーンカテーテル法の確認は必要であるが、技術的に AAV8 ベクターを利用した遺伝子治療は臨床研究開始可能レベルにほぼ達したと思われる。遺伝子投与方法選択にクリティカルな抗 AAV 抗体測定系は我々の報告以来世界的に改良が進んでいるが、我々の系は一桁感度が高い。実際、この系で陰性と判断されたサルでは、末梢からの AAV8 ベクター投与で、十分な FIX の発現が確認された。本年度、測定系のさらなる改善がすすみ、患者抗 AAV8 抗体測定も学内倫理審査で承認された。全国レベルでの測定を次年度に展開する予定である。これまでの実績と委託経費等も考慮し、さらに現地視察を加えてディナベック関連企業でもある中国企業に GMP レベル AAV8 ベクターを作製依頼する方針を立てた。まず、non-GMP レベル AAV8 ベクター製品の作製依頼し、製品を日本で厳格に評価した結果、基準に達していると判断した。次年度、GMP レベル AAV ベクター作製を依頼予定である。臨床研究に向けたシステムも自治医科大学血液科で整いつつあり、3 年目には開始可能と考えている。FVIII についても FIX と技術的には差はないと考えるが、念のためサルで実験を施行する予定である。ところで、AAV ベクター搭載可能遺伝子長の制限から FIX と異なり、FVIII は一部活性化で除去される部位の遺伝子を除去した遺伝子を搭載している。

Truncated 遺伝子による発現因子の止血能確認のために、血友病 A クローンブタの作製を試みた。その作製にもほぼ成功したが、クローンブタは、遺伝子治療以外にも様々な応用が期待される。ところで、AAV ベクターは治療量では殆ど染色体に組み込まれず、安全性は高い。しかし、細胞分裂により徐々に効果が希釈されていく欠点を持つ。数年間は AAV ベクターを利用して導入した遺伝子により治療レベル血友病因子の発現維持できると思われるが、10 年以上は不明である。我々が“二の矢”と考えている染色体に組み込まれる改変 SIV ベクターも P2 扱いで、眼科で臨床研究予定されるまで安全性は向上している。臨床応用に向けて生産性も現実的なものになった。ex vivo で細胞に SIV ベクターを利用して FVIII 遺伝子を導入し、安全な細胞を選択し、細胞ナノシートの形で、問題が生じても除去可能な部位に移植する方法は 10 年以上安全かつ効果持続遺伝子治療として期待できる。安全な細胞として選択した自己血管内皮前駆細胞への血友病遺伝子の導入とその移植は、障害肝にのみ効率よく生着が見られたことから、臨床応用には、まだ解決すべき課題の多いことが示唆された。II インヒビタ対策：対象が血友病 A マウスであるため、出血コントロールを筆頭に多大な労力と技術を要する。また、統計的にも言うには実験マウス数や条件に苦慮する研究であるが、ITI マウスモデル作製に成功し、その解析が進みつつある。ITI 可能性を予測できる因子などが明らかになれば、高額医療となるインヒビター治療選択に資するところも大である。III 社会的 QOL 向上：患者視点アンケート一次調査から、すぐ対応できる問題点提起と二次アンケートの必要性が示唆された。研究協力者を追加選択し、QOL 向上のための研究基盤が充実

した。また、QOL を左右する関節出血に関しては、薬害 HIV 感染血友病患者の場合には、整形外科のみならず、放射性同位元素を利用した非観血的滑膜治療法の導入や低下した免疫力への配慮など複数の臨床科が解決に向けて知恵を出し合うシステム構築が必要であることが示唆された。薬害 HIV 感染血友病患者母と非感染母との間に偏見や心身負担などの共通する問題点や、感染患者母の療養態度に、より医療者・製薬会社依存など保護志向が強いことなども聞き取りから明らかになり、方法の有用性が示唆された。当事者・家族、医療を含む専門家の色々な視点からの協働作業により具体的な支援ツール作成への展開が今後の課題である。

E. 結論

血友病患者 QOL を向上させるために 3 本の柱を立てて研究を展開した。I. 血友病遺伝子治療は AAV8 ベクターを用いた血友病 B 遺伝子治療が、技術的にはほぼ臨床研究開始可能レベルに達した。GMP レベル AAV8 ベクター調達の目途もたった。さらなる安全性担保のための研究と、長期治療効果の期待出来る染色体組み込み型改変 SIV ベクターを用いた血友病遺伝子治療“二の矢”の準備も着実に進みつつある。II. ITI 血友病マウスモデルを用いたインヒビタ研究も一定の成果を上げつつある。ITI メカニズム解析とそれに基づく治療に新局面を開く可能性がある。III. 患者参加型多視点的アンケート解析から QOL 向上のための有益な情報が得られた。二次アンケートによりさらに詳細が明らかになり、治療と社会生活の向上のために有益な提言作成が期待出来る。また、HIV 感染血友病患者を含む血友病患者母に対する聞き取り調査方法の有用性が確認され、次年度介入研究に必要な情

報が得られた。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

1. Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. : Mutant Macaque Factor IX T262A: A Tool for Hemophilia B Gene Therapy Studies in Macaques. *Thromb Res.* 2010 Feb 17. Epub ahead of print
2. Mimuro J., Mizuta, K., Kawano Y., Hishikawa, S., Hamano, A., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Kawarasaki, H., Sakata Y.: Impact of acute cellular rejection on coagulation and fibrinolysis biomarkers within the immediate post-operative period in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2009 Sep 29. Epub ahead of print
3. Ishiwata A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata Y.: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med.* 11(11):1020-1029. 2009.
4. Ishikawa, J., Okada, H., Kato, H., Takeshita, S., Honda, S., Kawasaki, T., Suehisa, E., Tuji, H., Madoiwa, S., Sakata, Y., Kojima, T., Murata, M., Ikeda, Y., Kokubo, Y., Okamura, T., Tomoike, H., Miyata, T.: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor-[beta] with plasma total tissue factor pathway inhibitor level. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 20(1):22-26, 2009.
5. 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.* 7(5):811-824. 2009.
6. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 124:14-18. 2009.
7. Ito, T., Yamamoto, S., Hayashi, T., Koderu, M., Mizukami, H., Ozawa, K., Muramatsu, SI.: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralizing antibodies. *Ann Clin Biochem.* 46:508-10, 2009.
8. Sato, K., Date, S., Aoyagi, Y., Kasahara, Y., Nawa, A., Mizukami, H., Hidema, S., Ozawa, K., Nishimori, K.: Generation of adenovirus vector enabling functional expression of oxytocin receptor and fluorescence marker genes using the human eIF4G internal ribosome entry site element. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73:2145-8, 2009.
9. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med.* 11:373-81, 2009.
10. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Machida, S., Fujiwara, H., Ozawa, K., Suzuki, M.: Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol.* 35:725-9, 2009.
11. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, KI., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular

- remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther.* 16:383-91, 2009.
12. Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost.* 103: 94-102, 2010.
 13. Ohashi K, Koyama F, Tatsumi K, Shima M, Park F, Nakajima Y, Okano T. Functional life-long maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009 Dec 4 [Epub ahead of print].
 14. A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. *Int J Hematol.* 90: 576-82, 2009.
 15. Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Takagi S, Utoh R, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Effects on coagulation factor production following primary hepatomitogen-induced direct hyperplasia. *World J Gastroenterol.* 15: 5307-15, 2009.
 16. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Nishiya K, Ogiwara K, Shima M. Identification of a protein S-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Thromb Haemost.* 102: 645-55, 2009.
 17. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Shima M. von Willebrand factor protects the Ca²⁺-dependent structure of the factor VIII light chain. *Br J Haematol.* 146: 531-7, 2009.
 18. Kasuda S, Kudo R, Morimura Y, Tatsumi K, Sakurai Y, Shima M, Hatake K. von Willebrand factor in cadaveric urine for forensic investigation. *Leg Med.* 11: 245-7, 2009.
 19. Tanaka Y, Shinohara Y, Narikawa K, Kumai T, Takakura Y, Sakurai Y, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic synovectomies combined with reduced weight-bearing using patella tendon-bearing braces were very effective for progressed haemophilic ankle arthropathy in three paediatric patients. *Haemophilia.* 15: 833-6, 2009
 20. Yamashita A, Matsuda S, Matsumoto T, Moriguchi-Goto S, Takahashi M, Sugita C, Sumi T, Imamura T, Shima M, Kitamura K, Asada Y. Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 206: 418-26, 2009.
 21. Huth-Kühne A, Baudo F, Collins P, Ingerslev J, Kessler CM, Lévesque H, Castellano ME, Shima M, St-Louis J. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. *Haematologica* 94:566-75, 2009
 22. Takeda T, Sakurai Y, Tatsumi K, Kato J, Kasuda S, Yoshioka A, Shima M. Elevation of B cell-activating factor belonging to the tumour necrosis factor [corrected] family (BAFF) in haemophilia A patients with inhibitor. *Thromb Haemost* 101: 408-10, 2009.
 23. Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *J Biol Chem* 284: 6934-45, 2009.
 24. Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor xase complex. *J Biol Chem* 284: 3379-88, 2009.
 25. 田中一郎, 嶋緑倫. 凝固線溶系 後天性血友病における免疫応答. *Annual Review 血液* 2010: 191-195, 2010.
 26. 野上恵嗣, 嶋緑倫. 【小児疾患診療のための病態生理】 血液・腫瘍性疾患 血

- 友病(解説/特集). 小児内科 41: 1124-1129, 2009.
27. 嶋緑倫. 先天性および後天性血友病の検査診断の最前線(解説). 日本検査血液学会雑誌 10: 29-37, 2009.
 28. 三浦 明、伊藤 俊広、嶋 緑倫、稲葉 浩、福武 勝幸、新井 盛大、鈴木 宗三、石川 正明、酒井 秀章. 化膿性股関節炎の術後重篤な出血をきたし、インヒビターが一過性に出現した異常第 VIII 因子 (Thr1774Asn) を有する軽症血友病 A (CRM+) の一例 日本血栓止血学会誌 20: 56-65, 2009
 29. 清田育男、篠澤圭子、大瀧 学、藤田 進、鈴木隆史、天野景裕、稲葉 浩、福武勝幸 重症型血友病 B の第 IX 因子遺伝子内に検出された2つの遺伝子変異の検討 臨床病理 57:417-424, 2009
 30. Takedani H, Kawahara H, Kajiwara M. Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa. Haemophilia. In press.
 31. 竹谷英之. 合併症の予防と治療、血友病性関節症の整形外科治療. みんなに役立つ血友病の基礎と臨床. 白幡聡編. 2009.198-206
 32. 瀧 正志: 血友病に対する補充療法の革新—定期補充療法—、聖マリアンナ医科大学雑誌、37(5):319-325,2009
 33. Shirahata A, Fujisawa K, Ishii E, Ohta S, Sako M, Takahashi Y, Taki M, Mimaya J, Kubota M, Miura T, Kitazawa J, Kajiwara M, Bessho F: A nationwide survey of newly diagnosed childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in Japan, J Pediatr Hematol Oncol 31(1):27-32, 2009
 34. 山崎哲、山崎法子、鈴木典子、後藤宏実、高山成伸、瀧 正志: 第 VIII 因子インヒビター測定法 4 法の特性比較と補正值による評価法の検討、日本検査血液学会雑誌 10(2):167-173,2009
 35. 大槻知子、柿沼章子、高久陽介、大平勝美、長谷川博史、生島嗣: HIV 陽性者のための学術集会参加支援プログラムの取り組みと、そのニーズと効果についての考察日本エイズ学会誌 Vol.11 No.4、2009、274
 36. 久地井寿哉、後藤智己、大宮朋子、島田恵、池田和子、石谷誓子、岩野友里、柿沼章子、山崎喜比古、岡慎一、大平勝美: HIV に係る障害者の社会参加に係る偏見と差別不安解消と自立支援の在り方に関する調査研究 (第一報) —社会参加および自立の阻害要因の明確化—日本エイズ学会誌 Vol.11 No.4、2009、280
 37. 後藤智己、久地井寿哉、大宮朋子、島田恵、池田和子、石谷誓子、岩野友里、柿沼章子、山崎喜比古、岡慎一、大平勝美: HIV に係る障害者の社会参加に係る偏見と差別不安解消と自立支援の在り方に関する調査研究 (第二報) —当事者の HIV/AIDS 感染に関する病い経験・認知の変化—日本エイズ学会誌 Vol.11 No.4、2009、280
 38. 大宮朋子、久地井寿哉、後藤智己、島田恵、池田和子、石谷誓子、岩野友里、柿沼章子、山崎喜比古、岡慎一、大平勝美: HIV に係る障害者の社会参加に係る偏見と差別不安解消と自立支援の在り方に関する調査研究 (第三報) —職場における疾患名開示に関する検討—日本エイズ学会誌 Vol.11 No.4、2009、281

学会発表

1. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J and Sakata Y Intrathymic administration of factor VIII results in immune tolerance by induction of factor VIII-specific regulatory T cells in murine hemophilia A. XXII ISTH Congress July 16, 2009. Boston, USA
2. 窓岩清治、三室 淳、大森 司、坂田洋一: 敗血症における凝固線溶系異常 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 日本血栓止血学会・日本救急医学会ジョイントシンポジウム 平成 21 年 6 月 5 日北九州
3. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Dokai M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Development of immune tolerance induction by intrathymic administration of Factor VIII in murine hemophilia A. 2009 East Asia Hemophilia Forum June 7, 2009. Kitakyushu, Japan
4. 水上浩明、三室 淳、石渡 彰、八木洋也、大森 司、窓岩清治、卜部 匡司、久米晃浩、坂田洋一、小澤敬也: Robust and sustained factor IX

- expression following IV injection of AAV8-based vectors in magaques. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
5. 久米晃浩、八木 洋也、水上浩明、卜部 匡司、塚原 智典、石渡 彰、三室 淳、窓岩清治、大森 司、坂田洋一、小澤敬也：Promoter selection for muscle-directed self-complementary AAV toward hemophilia B gene therapy. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
 6. 大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：Platelet-directed gene modification by lentiviral vector: Application to therapies for inherited bleeding disorders and research into platelet signal. シンポジウム 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
 7. 和田英夫、川杉和夫、久志本成樹、岡本好司、岡村 孝、畑田 剛、内山俊正、関 義信、窓岩清治、丸藤 哲：DIC 診断基準作成のためのプロスペクティブスタディの途中経過報告 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
 8. 伊東哲男、林 司、古寺美加、水上浩明、小澤敬也、三室 淳、坂田洋一、村松慎一：中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試験の開発 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
 9. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、三室 淳、坂田洋一：高純度 AAV8、AAV9 ベクター精製法ノ確立 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
 10. 大森 司、青木慎也、Thasinas Dissayabutra、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉榮治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：GPIIb 遺伝子近傍のクロマチンインスレーター配列の同定 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
 11. 篠澤圭子、田中朝志、天野景裕、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 先天性第 V 因子欠乏症複合ヘテロ接合体症例における血小板 FV の検討 日本検査血液学会 2009 年 甲府
 12. 篠澤圭子、鈴木隆史、天野景裕、稲葉 浩、福武勝幸 シグナルペプチドに検出した先天性第 VII 因子欠乏症のミスセンス変異(L-48P)の解析 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
 13. 佐藤哲司、酒井道生、白幡 聡、稲葉 浩、嶋 緑倫、福武勝幸、山下 文、上玉利 彰 血友病 A 分子異常症の 1 例 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
 14. 稲葉 浩、小山高敏、篠澤圭子、福武勝幸 稀な遺伝子異常を病因とする血友病 A に発生した抗第 VIII 因子抗体 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
 15. 篠澤圭子、大瀧 学、天野景裕、清田育男、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 血友病 B 患者の遺伝子解析における MLPA 法の検討 日本臨床検査医学会 2009 年 札幌
 16. 大瀧 学、篠澤圭子、清田育男、鈴木隆史、稲葉 浩、天野景裕、福武勝幸 先天性アンチトロンビン欠乏症の遺伝子解析に MLPA 法を用いた一例 日本臨床検査医学会 2009 年 札幌
 17. 篠澤圭子、稲葉 浩、天野景裕、清田育男、大瀧 学、鈴木隆史、福武勝幸 血友病 A の遺伝子解析における MLPA 法の検討 日本血液学会 2009 年 京都
 18. 稲葉 浩、篠澤圭子、小山高敏、矢富裕、三浦 明、福武勝幸 日本人血友病 A 患者の病因遺伝子異常とその由来・第 VIII 因子遺伝子ハプロタイプの解析から 日本血液学会 2009 年 京都
 19. 長江千愛、瀧 正志：血栓性疾患（分野別シンポジウム：小児の出血性・血栓性疾患）、第 112 回日本小児科学会、2009 年 4 月
 20. 山下敦己、長江千愛、武藤真二、瀧正志：CVC 血を用いた凝固能検査によりインヒビター出現が疑われた血友病 A 重症型の乳児例、第 112 回日本小児科学会、2009 年 4 月
 21. 瀧 正志：QOL の阻害要因とその対策：第 32 回日本血栓止血学会、2009 年 6 月
 22. 橘川 薫、竹谷 英之、瀧 正志、日本小児血液学会血友病委員会：乳幼児重症型血友病に対する定期補充療法研究における関節症の画像評価（第一報）、第 32 回日本血栓止血学会、2009 年 6 月
 23. 天野景裕、瀧 正志、家子正裕、山崎雅英、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、竹谷英之、田中一郎、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、松下正、三間屋純一、三室淳、吉

- 岡章、嶋緑倫：後天性血友病Aの診断ガイドライン案、第32回日本血栓止血学会、2009年6月
24. 松下正、酒井道生、藤井輝久、家子正裕、新谷憲治、山崎雅英、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、田中一郎、三間屋純一、三室淳、吉岡章、嶋緑倫：後天性血友病Aの止血療法ガイドライン(案)、第32回日本血栓止血学会、2009年6月
 25. 日笠聡、新谷憲治、花房秀次、毛利博、天野景裕、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、瀧正志、竹谷英之、田中一郎、福武勝幸、藤井輝久、松下正、三間屋純一、三室淳、吉岡章、嶋緑倫：後天性血友病Aの免疫抑制療法ガイドライン案、第32回日本血栓止血学会、2009年6月
 26. 山崎 哲、後藤宏実、鈴木典子、高山成伸、山下敦己、瀧正志：13種のAPTT 試薬の比較—ヘパリン感受性について—、第10回日本検査血液学会、2009年7月
 27. M.Taki, K.Fukutake, H.Hanabusa, J.Takamatsu, M.Shima, A.Shirahata, G. Advate Pass Study: Post authorization safety surveillance (PASS) program of antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method (RAHF-PFM) for Japanese hemophilia A patients. XXIIth Congress of ISTH, 2009年7月
 28. T. Matsushita, K. Amano, M. Taki, T. Oka, M. Sakai, A. Shirahata, N. Takata, J. Takamatsu, H. Takedani, H. Hanabusa, S. Higasa, K. Fukutake, T. Fujii, I. Tanaka, J. Mimaya, A. Yoshioka, M. Shima: The Japanese guideline for the practical replacement therapy for acute bleeding and surgical prophylaxis in hemophilia without inhibitors. XXIIth Congress of ISTH, 2009年7月
 29. Yamashita A, Nagae C, Muto S, Asahara M, Morimoto M, Kondo K, Kinoshita A, Yamazaki S, Takayama S, Taki M: Effects of L-asparaginase therapy on thrombin generation in children with acute leukemia. XXIIth Congress of ISTH, 2009年7月
 30. S. Muto, C. Nagae, T. Shoji, A. Yamashita, J. Hiramoto, S. Yamazaki, M. Taki: Case of an infant with a severe hemophilia A diagnosed due to the development of spinal epidural hematoma. XXIIth Congress of ISTH, 2009年7月
 31. I. Tanaka, K. Amano, M. Taki, T. Oka, M. Sakai, A. Shirahata, N. Takata, J. Takamatsu, H. Takedani, H. Hanabusa, S. Higasa, K. Fukutake, T. Fujii, T. Matsushita, J. Mimaya, A. Yoshioka, M. Shima: The Japanese guideline for the hemostatic therapy of patients with congenital hemophilia and inhibitors. XXIIth Congress of ISTH, 2009年7月
 32. 立浪 忍、三間屋純一、白幡 聡、竹谷英之、牧野健一郎、瀧 正志：血液凝固異常症の QOL に関する調査における自由記載欄の解析、71回日本血液学会、2009年10月
 33. S.Tatsunami, T.Ueno, R.Kuwabara, J.Mimaya, A. Shirahata and M. Taki: Estimation of benefits from interferon therapy among HIV-positive hemophiliacs coinfectet with HCV. 欧州エイズ学会議 (EACS)、2009年11月
 34. 瀧 正志：小児血友病患者のQOLを考える、第51回日本小児血液学会、2009年11月
 35. 山下敦己、長江千愛、庄司朋子、武藤真二、青葉剛史、長江秀樹、濱野志穂、古田繁行、島秀樹、脇坂宗親、北川博昭、瀧正志：乳幼児の重症型血友病患者に対する中心静脈カテーテル(CVADs)の使用経験、第51回日本小児血液学会、2009年11月
 36. 立浪 忍、桑原理恵、浅原美恵子、三間屋純一、白幡聡、瀧 正志：HIV感染血液凝固異常症におけるインターフェロンによる治療状況：2006年6月1日から2008年5月31日までの期間における集計。第23回日本エイズ学会、2009年11月

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

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

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

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療: In vivo へのベクターの直接投与には染色体への組み込みがほとんどおこらない AAV ベクターを用い、ex vivo にて細胞へ遺伝子導入し再移植する遺伝子細胞治療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た。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、肝臓以外の組織・臓器に遺伝子発現を起こさないことが導入遺伝子産物への免疫反応を軽減することに重要であることが示された。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、AAV8 ベクターと HCRHAAT-プロモーターを用いることと免疫反応を制御することで、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。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り、モデル動物の作製ができ次第 FVIII 遺伝子導入実験に移る。遺伝子細胞治療として、AAV Rep 遺伝子を用いた 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的 FVIII 遺伝子組込が効率よく行えることが確認できた。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。今後は遺伝子改変細胞の移植を、血友病 A マウスをもちいて行う予定である。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、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、カニクイザルでの FVIII 発現実験を開始した。SIV ベクターを用いて血液幹細胞へ FVIII 因子遺伝子を導入し GPI b α プロモーターを用い血小板へ特異的に FVIII を発現させることで血友病マウスの出血症状を改善しえ、さらに、活性化型 FVII 因子を血小板に発現させることでも血友病 A マウスの全血凝固が改善し、インヒビター陽性血友病マウスでも尾切断後の死亡率も改善しえた。トリグロビン HS4 インスレーターを SIV ベクター-U3 に組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。遺伝子細胞治療として、染色体組み込み型改変 SIV ベクターをもちいて間葉系幹細胞に導入し、ex vivo で作製した細胞シートをマウス腹腔に貼り付けることで、遺伝子発現が確認できた。血友病 B 遺伝子治療: マウスでの検討を終え、カニクイザルを用いた前臨床実験を行っている。ヒト FIX 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 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枝から投与したところ、中和抗体陰性の 3 頭では治療レベルの導入遺伝子由来 FIX 発現が得られた。しかし、サルに既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価でも存在するサル 3 頭では腸間膜静脈枝からベクターを投与しても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も、中和抗体の AAV8 ベクターの遺伝子導入阻害を回避するベクター投与法を 3 頭のサルにて試み、治療域に達する FIX 発現がえられた。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

モデルを確立しえた。また、免疫反応を制御することでヒト FVIII を血友病 A マウスで長期発現させることも可能となった。

A. 研究目的

血友病は X 染色体上に存在する血液凝固第 VIII、(FVIII) 或いは IX 因子 (FIX) 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。定期補充療法でも致命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モドリザルから単離したレンチウイルス由来 SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合は AAV ベクター、そして、(II) 体外で細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する遺伝子細胞治療には SIV ベクターを用いた。AAV Rep 遺伝子を用いた染色体 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組込を検討した。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 遺伝子を用いて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。ex vivoで SIV ベクターを利用して間葉系幹細胞に遺伝子導入し、細胞を選択後に移植、或いは細胞シートを作製して動物の除去可能部位に移植して遺伝子発現を検討した。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た FVIII 特異的免疫寛容誘導法、マイクロポットインジェクションシステムを用いたヒト免疫寛容誘導療法のマウスモデル作製、そしてウイルスベクターによる免疫寛容誘導の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応

用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚生労働省の倫理指針に従い被験者の人権に十分配慮するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。

C. 研究結果

血友病 A 遺伝子治療：これまで、血友病イヌでの検討を視野に入れ、AAV8 ベクターに HCR-HAAT プロモーターを組み合わせることで、低用量のベクター投与によってもイヌ FVIII を血友病 A マウスに発現させ 100%以上に保つことができ、導入遺伝子由来 FVIII に対する抗体産生を防ぐためには、肝臓以外の組織に FVIII 遺伝子発現を起こさないことが重要であることが明らかとなった。また、一方、ヒト FVIII はマウスにおける血液半減期が極めて短く血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、HCRHAAT プロモーター搭載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、免疫反応を制御することでヒト 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。この成果はインヒビター対策にもつながる成果と考えられた。SIV ベクターを用いて血液幹細胞へ FVIII 因子遺伝子を導入し GPI b α プロモーターを用い血小板へ特異的に FVIII を発現させることで血友病マウスの出血症状を改善しえ、さらに、活性化型 FVII 因子を血小板に発現させることでも血友病 A マウスの全血凝固が改善し、インヒビター陽性血友病マウスでも尾切断後の死亡率も改善しえた。トリグロビン HS4 インスレーターを SIV ベクター U3 に組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。中型血友病 A モデルの自然発症血友病イヌを用いた FVIII 発現実験を行うことを目的としてベクターを作製し、血友病 A イヌを奈良県立医科大学より導入した。また、ヒトに近い種属の血友病モデルの作製も順調にす

すみ、誕生を待つのみとなっている。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新たに作製したモノクロナル抗体を用いて構築でき、カニクイザルでのFVIII発現実験を行っている。AAV Rep 遺伝子を用いた 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的FVIII 遺伝子組込が高効率で行えることが示唆され、マウスを用いたFVIII 遺伝子を 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組込んだFVIII 発現細胞の移植実験を検討中である。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。また、染色体組み込み型改変 SIV ベクターをもちいて間葉系幹細胞に導入し、*ex vivo*で作製した細胞シートをマウス腹腔に貼り付けることで、遺伝子発現が確認できた。

血友病 B 遺伝子治療：ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はカニクイザルでは 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。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。いずれの実験においても、マウスで高い遺伝子導入効率のある AAV8 ベクターも、カニクイザルではマウスと比較し1/10以下の遺伝子導入効率であり、非ヒト霊長類を用いた前臨床実験が必須であることが示唆された。

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

胞は、胸腺内非投与マウス由来 APC 共存下で第 VIII 因子刺激に対して増殖活性を示さず、IL-2、IL-12 および IFN- γ も産生しなかった。胸腺内投与マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞は、第 VIII 因子刺激に対する胸腺内非投与マウス由来 CD4⁺T 細胞の増殖を抑制した。この抑制効果はナイーブマウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞ではみられなかった。血友病 A マウスに対して、経皮経頸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。FVIIa 遺伝子を搭載した AAV8 ベクターを血友病 A マウスへ投与することで血友病 A マウスの出血症状を完全に抑制できた。FVIIa を血小板に、あるいは肝臓に発現させる試みもインヒビター対策の一つになると思われる。

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。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 に対する抗体陽性のサルで、選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液と接しない形でサル肝臓にベクターを投与する投与法の実験では、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められ、既感染に基づく AAV に対する中和抗体による遺伝子導入阻害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っているが、血友病 A 遺伝子治療実験はマウスを用いた実験にとどまっている。今後は自然発症血友病イヌが導入されたので、実験を遂行する予定である。さらに中型血友病モデル動物が作製できつつある。解決すべき問題点は明らかになっており、血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うために、導入遺伝子由来サル第 VIII 因子の検出系を確立しつつある

インヒビター対策としてウイルスベクターによる肝臓への遺伝子導入や胸腺を標的とした免疫寛容誘導により一定の成果がえられた。さらにヒト免疫寛容誘導療法のモデルも確立