

しえたことから、今後の方向性が明らかとなった。また、FVIIa の肝臓あるいは血小板への遺伝子発現はインヒビター治療の方法となりえらると思える。

#### E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマウスレベルでは確立出来た。しかし、安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗体を持つサルが殆どであるために治療レベルに達する第 IX 因子発現がえられているが、現時点ではマウスでの成績に匹敵する結果が得られていない。これらの問題点が明らかにされ、技術的にも克服可能となってきた。インヒビターに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療の確立が今後の課題であるが解決の糸口も見えてきた。

#### F. 研究発表

##### 1. 原著論文

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.

##### 2. 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. 窓岩清治、大森 司、三室 淳、坂田洋一：感染症 DIC を考慮した現厚生労働省診断基準の検討. 第4回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム DIC 部会. 2009年11月21日(土) 東京
  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、秋葉栄治、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
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。  
特記事項なし。

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

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  
研究分担者：自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部  
教授 小澤敬也、講師 水上浩明

研究要旨 AAVベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて基礎的検討を行った。AAVベクターは骨格筋や肝臓などの非分裂細胞への遺伝子導入に有用であるが、より高い効果を得るためにキャプシド及びプロモーターの点から検討を行った。一方、遺伝子導入効率に大きく影響すると考えられるベクターに対する中和抗体に関して測定系を改良し、中和抗体力価と遺伝子導入の効果との関係を明らかにすると共に、中和抗体陰性の個体では末梢静脈へのベクター投与によっても治療域に達する効果が長期間持続することをサルにおいて示すことができた。

#### A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。また、主に第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用してマウス及び霊長類モデルに対する投与を行い、治療法の有効性と安全性につき検討する。

#### B. 研究方法

・ AAV ベクターに関する基礎研究：導入遺伝子の発現に大きな影響を与える免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに動物個体レベルでの解析を行った。特にベクターキャプシドに対する中和抗体は低力価であっても大きな影響を与える事が示唆されたことから、検出感度の向上を目指して改良を行った。

・ 遺伝子導入動物実験：特に霊長類 (カニクイザル) において様々な構築の AAV ベクターを骨格筋又は肝臓を標的として投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。また、ベクター溶液の注入前後

に生理食塩水を大量に注入することでベクターと血液との接触を極力少なくした門脈内への注入法を開発し、中和抗体が弱陽性である個体に対して有用性が認められるかどうかにつき検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境およ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でないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

#### C. 研究結果

・ AAV ベクターに関する基礎研究：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、糖類を培養液に加えることで AAV 感染効率が飛躍的に上昇すること、その効果はアデノウイルス E4 遺伝子

の発現による感染増強と相乗的に作用することを見出し、感染に必要なベクター量を1/100程度に減らすことができた。その結果、中和抗体検出感度を大きく高めることに繋がった。更にはこの成果を利用して様々なサルにおける各血清型に対する中和抗体陽性率を測定した。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第Ⅸ因子遺伝子を搭載した様々な血清型由来のベクターを投与し、治療域に至る効果を得た。また、ベクター溶液の注入前後に生理食塩水を大量に注入することで、中和抗体陽性の3個体全てにおいて治療域に達する導入遺伝子の発現を得ることができた。

#### D. 考察

AAV ベクターを用いて肝臓を標的とする場合には8, 9型の有用性が高いものと期待されているが、これまでのサルにおける検討では、たとえ低力価であっても中和抗体が存在する場合、遺伝子導入は成功していない。従って、実験に際しては事前に中和抗体のスクリーニングを徹底的に行う必要があり、これはヒトに対して治療を行うことになっても同様に必要な検査であると思われる。しかしながらこれまで8, 9型に対する中和抗体の検出感度は不十分であった。これは効率よく感染する細胞が見出されていないため、より多くのベクター粒子が必要であることが主な原因である。本研究ではこのような弱点を大幅に改善することができた。いずれにしても検出法としてはほぼ確立できたと考えられ、今後はサルのコロニーのみならずヒトの集団においても陽性率の検討を行うことで、AAV ベクターの現実的な有用性が明らかになるものと期待される。

中和抗体を克服するための注入法はベクターの注入前後に生理食塩水を注入することで組織に到達したベクターが不活化されるのを遅延させることを目指している。過去の大量注入に関する報告などを参考にしながら安全と思われる量を注入したものであるが、ほぼ同様の条件で行った3頭の全てにおいて効果

が認められており、有望な技術である。ヒトにおいてもカテーテルを使用すれば安全に実施可能と考えられることから、今後は更に高い力価の中和抗体を有する個体において有効であるかどうかを検討していきたい。

8型由来のベクターは肝臓への指向性が高く、マウスでは門脈内投与以外の投与方法によっても肝臓への遺伝子導入が可能であることが知られている。今回の検討ではサルにおいて、末梢静脈からの投与によっても門脈内投与と同等の効果が得られる事が判明した。いうまでもなく血友病患者に投与する際には低侵襲であることが望ましく、末梢静脈からの投与で十分な効率が得られる事は福音である。これまでサルにおける検討で用いてきたベクター量がやや多め( $2-5 \times 10^{12}$  vg/kg)であることから、臨床応用を考える上ではより少ない量で目的を達することが望ましく、この点が今後の課題である。

血友病 B に対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、2型 AAV を用いた方法では効果が不十分と報告されている。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるものと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果を挙げていきたい。

#### E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響する因子を解析し、そのうち最も重要な中和抗体検出法の改良を通じて肝臓への遺伝子導入効率が確保できるようになった。また、その成果を用いて臨床研究を企画するに至った。以上を通じて血友病に真に役立つ遺伝子治療法の開発の進展が期待される。

G. 研究発表

原著論文による発表 (欧文)

1. 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.** 11:1020-9, 2009.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
特になし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

血友病（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

研究分担者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学

研究要旨；第 VIII 因子あるいは第 IX 因子濃縮製剤による補充療法に代えて、自らの生体内で一定の第 VIII (IX) 因子を産生し、必要な止血レベルを維持するという新たな血友病の治療法の確立が期待されている。

これまでに我々はマウスを用いた実験において、血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた遺伝子治療が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとしてきた。我々はマウス血液から血管内皮前駆細胞の分離培養法を確立し、この細胞にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。継代後も第 VIII 因子活性は保持されていた。血友病 A マウスに四塩化炭素を腹腔内投与し肝障害を起こした後、同種同系健常マウスから抽出した EPC を経静脈的に移植した。肝障害を与えないで移植した対照群に較べて、障害肝では多数の標識 EPC が生着した。またこれらの標識 EPC は免疫組織染色で CD34 陽性類洞内皮細胞の部位に分布したことを確認した。肝再生刺激によって、効果的に EPC が生着することが明らかになった。

また、これまで、われわれはヒト第 VIII 因子遺伝子導入 ES 細胞 (Ainv18) を用いた遺伝子治療を試みてきた。我々の結果では、単に F8 を過剰発現させるだけでは未分化 ES 細胞は FVIII を分泌することができず、肝臓条件へ分化誘導することにより第 VIII 因子産生細胞にすることができた。今回、我々の ES 細胞における分化誘導系を iPS 細胞に応用し、凝固因子合成能を検討した。肝細胞へ分化誘導した細胞の fibrinogen、prothrombin、FVII、FIX、FX、FXI、FXII、FXIIIB、protein C、protein S、antithrombin、plasminogen の mRNA 発現、および培養上清中 prothrombin、FIX、FX 活性は、iPS 細胞および内皮・血球誘導条件の iPS 細胞に比べて高値を示した。

さらにインヒビターの治療として、アポトーシスを誘導した FVIII 産生マウス ES 細胞を血友病 A マウスに投与することにより、マウスの FVIII に対する免疫寛容誘導効果を検討した。アポトーシス細胞投与の前処置を行った群では、その後の第 VIII 因子製剤投与に対するインヒビター力価が、非投与群に較べて有意に低値を示した。アポトーシス誘導 FVIII 産生 ES 細胞の前処置により、インヒビターの発生を抑制しうる可能性が示された。

## 1. 研究目的と背景

第 VIII 因子あるいは第 IX 因子濃縮製剤による補充療法に代えて、自らの生体内で一定の第 VIII (IX) 因子を産生し、必要な止血レベルを維持するという新たな血友病の治療法の確立が期待されている。以上の事を達成するための基礎研究として、マウスモデルを用いて、以下の方法で取り組む。

## 2. 研究方法

### 1) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病の遺伝子治療

ex vivo の遺伝子治療はウイルスベクターの全身投与に伴う合併症、発癌および生殖細胞への移行の危険が少なく、安全面から有意義な方法であるが、移植細胞

の viability や発現量の問題から有効な成果が得られていない。EPC は患者末梢血から採取でき、in vitro で大量に増殖可能であるという点で理想的な vehicle であるといえる。これまでの研究で我々は末梢血から分離したイヌ EPC にレンチウイルスベクターを用いて第 VIII 因子遺伝子を導入した後、細胞外マトリックスと共に NOD/SCID マウスの皮下に移植したところ、血中へのイヌ第 VIII 因子の分泌を確認した。しかし、本方法では第 VIII 因子の発現は数ヶ月に限られ、細胞の viability が問題点と考えられた。さらに長期にわたる第 VIII 因子の発現を期待して新たな投与方法を検討する。昨年度、われわれは、血友病 A マウスの末梢血から EPC を分離し、安定的に維持培養する条件を確立した。今年度はレンチウイルスベクターを用いてマウス EPC を

ヒト第 VIII 因子発現細胞に改変し、第 VIII 因子分泌能を評価した。また、これまでの実験で、EPC をマウスに静脈内投与した場合、EPC は健常部位にはほとんど生着せず、障害部位に集積することが判明している。今回、我々は、四塩化炭素にて肝障害をおこしたマウスに EPC を経静脈的に投与し、肝への生着を検討した。

## 2) マウス iPS 細胞移植による血友病 A の細胞療法

我々は、すでに相同組み換えによりマウス ES 細胞内にヒト F8 を組み込み、テトラサイクリン誘導で F8 を過剰発現することによってヒト FVIII を産生する細胞集団を作成することに成功した (Kasuda et al. J Thromb Haemost. 2008;6:1352-9)。我々の結果では、単に F8 を過剰発現させるだけでは未分化 ES 細胞は FVIII を分泌することができず、肝臓条件へ分化誘導することが必要であった。この研究成果の持つ意義は、FVIII を分泌する能力を持つ細胞を発見したことである。ここに、F8-mRNA の発現能を付加すれば、FVIII 産生細胞が完成する。我々の ES 細胞における分化誘導系を iPS 細胞に応用すれば、F8 を人工的に導入せずとも、iPS 細胞から肝臓集団を誘導し、FVIII を産生分泌させることは十分可能であると考えた。

まず、マウスの諸臓器をもちいてマウス正常肝における凝固因子発現を検討するために、肝、肺、脾、心、脳、腎における各種凝固因子 (fibrinogen, prothrombin, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIIIb, protein C, protein S, antithrombin, plasminogen, VWF, ADAMT13) の mRNA 発現について、リアルタイム PCR を用いて検討した。次に、京都大学から配布されている iPS 細胞を用いて、すでに ES 細胞で確立した肝誘導条件および内皮・血球誘導条件に準じて培養した。分化については Rex-1, Gata-1, Flk-1, Alb, Ttr, Tat の mRNA 発現を用いて検討した。さらに肝細胞に分化した iPS 細胞の凝固因子の mRNA 発現、および培養上清中の albumin, fibrinogen を定量し、prothrombin, FV, FVII, FVIII, FIX, FX の活性を測定した。

## 3) マウス ES 細胞を用いた血友病 A インヒビターの発症予防

血友病では、種々の遺伝子治療や細胞治療の試みがなされているが、最終的にはインヒビターの問題が残ることが懸念されている。インヒビターに対しては、今なお十全な治療は存在せず、これまでのものとは全く視点を変えた予防ないしは治療法の開発が望まれている。細胞にアポトーシスを誘導し、そのアポトーシス細胞を用いて免疫寛容を積極的に誘導しようとする研究が進められている。最近、Miyake らは、細胞膜表面にミエリンオリゴ糖蛋白 (MOG) 断片を発現する細胞を作成し、この細胞にアポトーシスを誘導、さらにこのアポトーシス細胞を実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスにあらかじめ血管内投与しておくことで、MOG を注入しても EAE の発症を抑制しうることを見

出した (J Clin Invest. 2007;117:2268-78)。

前処置として、ヒト FVIII 遺伝子を組み込んだヒト FVIII 産生マウス ES 細胞に浸透圧ショックによるアポトーシスを導入し、血友病 A マウス (FVIII-KO マウス) に腹腔内投与した。その後、一定期間を経て、ヒト FVIII を 1 週間間隔で腹腔内に反復投与し、経時的に、インヒビターを Bethesda 法にて測定した。

## 3. 研究結果・考察・今後の展望

### 1) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病の遺伝子治療

血友病 A マウスに四塩化炭素を腹腔内投与し肝障害をおこした後、同種同系健常マウスから抽出した EPC を経静脈的に移植した。EPC は長鎖脂肪酸末端をもつ蛍光色素 (PKH26) で標識し、組織学的に生着を検討した。肝臓は特に中心静脈周囲に重度の肝細胞壊死と線維化、炎症細胞の浸潤を認めた。肝障害を与えないで移植した対照群に較べて、障害肝では多数の PKH 標識 EPC が生着した。またこれらの標識 EPC は免疫組織染色で CD34 陽性類洞内皮細胞の部位に分布したことを確認した。今後、さらに長期にわたる生着を確認するために、GFP 遺伝子を導入したマウス EPC を移植する予定である。肝再生刺激の前処置によって、効果的に EPC が生着することが明らかになった。またマウス EPC にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。10 回の継代後も第 VIII 因子活性は低下しなかった。今後は、この細胞を免疫不全のない第 VIII 因子 KO マウスに移植し、治療効果やインヒビター産生の有無について検討する予定である。

### 2) マウス iPS 細胞移植による血友病 A の細胞療法

マウス諸臓器における mRNA 発現は、protein S, VWF、および ADAMT13 を除くすべての凝固因子において、肝臓での発現が最大であった。肝誘導条件で培養した iPS 細胞は Alb, Ttr, Tat の mRNA 発現を認め、その上清から albumin と fibrinogen を ELISA 法にて検出させた。さらにこの細胞の fibrinogen, prothrombin, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIIIb, protein C, protein S, antithrombin, plasminogen の mRNA 発現、および培養上清中 prothrombin, FIX, FX 活性は、iPS 細胞および内皮・血球誘導条件の iPS 細胞に比べて高かった。iPS 細胞から各種凝固因子を発現可能な肝細胞様細胞へ誘導することができた。誘導方法を改良し、より純度の高い肝細胞集団を作成したい。また今回の検討では肝細胞様細胞集団では FVIII を認め得なかったことから、FVIII 発現細胞はこれとは別の lineage に属するものであることが示唆された。今後は FVIII 産生細胞集団の作成についても試みたいと考えている。

### 3) マウス ES 細胞を用いた血友病 A インヒビターの発

## 症予防

アポトーシス細胞非投与群では、ヒト FVIII の初回投与 1 週間後にはインヒビターを検出しえなかったが、その後は 1 回投与ごとに  $0.18 \pm 0.12$ 、 $24.7 \pm 19.6$ 、 $62.9 \pm 31.8$ 、 $675.2 \pm 196.0$ 、 $1212.0 \pm 250.1$ 、 $1687.2 \pm 309.1$  と上昇を示した。一方、前処置 7 日後に hFVIII 投与を開始した群では、3 回投与後にも  $0.54 \pm 0.27$  と有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )、前処置 14 日後の投与開始群では、3 回投与後にも  $0.37 \pm 0.15$  とさらに低値を示した ( $p < 0.01$ )。これらの結果からアポトーシス誘導 FVIII 産生 ES 細胞の前処置により、インヒビターの発生を抑制しうる可能性が示された。なお、前処置 3 日後にヒト FVIII 投与を開始した群のインヒビター値は、アポトーシス細胞非投与群のそれと比べて高値を示した。前処置からヒト FVIII 初回投与までの期間により、抑制の強さが異なることから、アポトーシス細胞投与後、免疫寛容が生じるまで一定の期間が必要と思われる。今後、アポトーシス細胞の投与方法を工夫することにより、インヒビター発生の完全な抑制を目指したい。現在、インヒビター産生抑制の免疫学的機序についての検討を行っている。

## 4. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：嶋緑倫、田中一郎、柴田 優、櫻井嘉彦、野上恵嗣、矢田弘史、民西早苗。  
クイーンズ大学病理学および分子医学部門：David lillicrap, 松井英人。

奈良県立医科大学消化器外科教室：中島祥介。

奈良県立医科大学循環器腎臓内科学教室：久保篤史。

奈良県立医科大学法医学教室：粕田承吾。

## 5. 研究発表

1. 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.
2. 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].
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Shima M. von Willebrand factor protects the Ca<sup>2+</sup>-dependent structure of the factor VIII light chain. *Br J Haematol.* 146: 531-7, 2009.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.

厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

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

研究分担者 高橋 将文 自治医科大学 教授  
研究協力者 菱川 修司 自治医科大学 講師  
小林 英司 自治医科大学 客員教授

研究要旨：本研究計画の前臨床モデルの確立のため、カニクイザル肝臓に対するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの局所投与の可能性について検討を行った。生体カニクイザルを麻酔下で開腹して腸間膜静脈の分枝より血管留置針を挿入し、擬似ガイドワイヤーとして3-0 ナイロン糸を血管内へと挿入、目的とする門脈左枝へと誘導することに成功した。今後、ガイドワイヤーガイド下でマイクロカテーテルを用いることにより、これまで検討してきた門脈左枝への直接穿刺法に比較してより安全な AAV ベクターの経門脈的投与が可能となることが期待される。

A. 研究目的

血友病の治療として、欠損因子を遺伝子治療によって補う試みがなされている。我々もこれまで、ウイルスベクターによる方法や非ウイルス法を用いて、マウスやラットといった小動物で遺伝子導入実験を行い、その発現を確認してきた。しかし、実際の臨床においては、より局所に、かつ安全に遺伝子を導入する必要性があること、さらには、アデノ随伴ウイルス (AAV) の既感染に基づく AAV ベクターに対する中和抗体のある患者に対しては、その影響を回避するための重要な手法となることから、前臨床試験としてより大きな動物での検討が必要である。そこで、今回、非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて、肝臓へ選択的に遺伝子を導入する手技の開発・確立を目的として研究を行った。特に、これまでカニク

イザル肝臓では門脈本幹への直接穿刺法により遺伝子導入を試みてきたが、より安全性を高めるため、腸間膜静脈からの門脈左枝への選択的アプローチについて検討を行った (図1)。

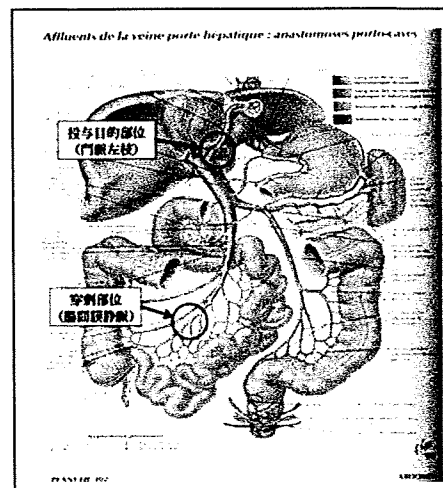


図1 穿刺部位である腸間膜静脈の分枝と目的投与部位である門脈左枝の概略図

## B. 研究方法と結果

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターにて本実験を行った。カニクイザルに全身麻酔をかけ、左季肋下で皮膚を切開して肝門部を明らかとした。まず、脾門部血管などを詳細に検索して穿刺可能部位を探したが、適切な血管はなく、腸間膜静脈分枝のみが穿刺可能であると判断した。次に、門脈本幹ならびに門脈右枝・左枝を露出した。できるだけ末梢で穿刺可能な腸間膜静脈分枝から血管留置針（サーフロー24G, Terumo, Japan）を用いて穿刺し、血液の逆流および生理食塩水のフラッシュによりサーフロー外筒が血管内へ挿入されていることを確認した。サーフロー外筒から擬似ガイドワイヤーとして 3-0 ナイロン糸（Ethicon, USA）を挿入し、門脈本幹から門脈左枝へと誘導した（図2）。

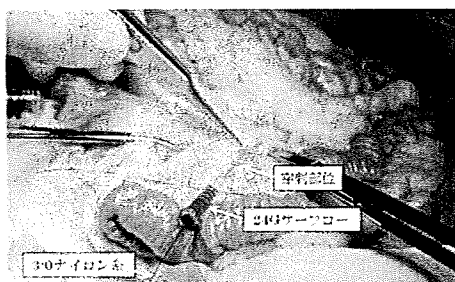


図2 腸管脈静脈への血管留置針および擬似ガイドワイヤーであるナイロン糸の挿入

擬似ガイドワイヤーであるナイロン糸が門脈左枝へと誘導されていることを確認するため、露出した門脈左枝を切開して内腔にあるナイロン糸が留置されていることを確かめた（図3）。

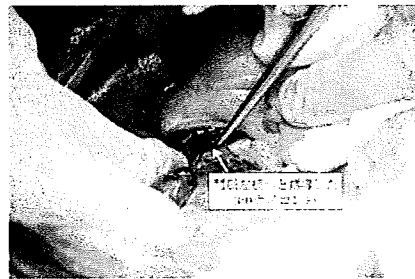


図3 門脈左枝へと誘導されたナイロン糸の確認

## C. 考察と結論

本研究では、血友病の遺伝子治療の前臨床試験における、より選択的で安全な遺伝子投与手技の確立を目的に検討を行った。特に、本方法は AAV の既感染に基づく AAV ベクターに対する中和抗体の影響を回避するための重要な手法となりえると考えられる。今回の検討により、より門脈末梢からアプローチする場合の穿刺部位としては腸間膜静脈分枝以外には困難であること、腸間膜静脈分枝から穿刺してガイドワイヤーを門脈左枝へと選択的に誘導することは特に問題なく可能であることが明らかとなった。使用予定のマイクロカテーテル（Temporary occlusion catheter）は、3.3F の太さ（直径 1.1 mm）で、バルーン径 7 mm であることから、今後、このカテーテルを挿入するためのシースが留置可能であるか、あるいは直接挿入すべきかなどを検討していく必要がある（図4）。これらの検討により、この経カテーテル的な選択的門脈左枝への投与方法が確立されたならば、これまで検討してきた門脈左枝への直接穿刺法に比較してより安全な経門脈的投与

が可能となることが期待される。さらに、本研究では、非ヒト霊長類としてカニクイザル（5～6kg 程度）を用いたが、臨床では約 10 倍（成人の場合）の体サイズがあることから、より容易に穿刺からカテーテルの挿入、門脈左枝への誘導が可能であると予測できる。一方、本研究班グループ（坂田教授ら）では、血友病 A のモデルブタを開発中であり、今後は大動物での治療効果を確認する前臨床試験として、これらモデルブタでの評価も予定している。



図4 3.3F マイクロカテーテルと腸間膜静脈分枝

D. 研究発表  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）

分担研究報告書

血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発

研究分担者：ディナベック株式会社 代表取締役社長 長谷川 護

研究要旨

遺伝子治療の臨床研究を実施するにあたっては、大量のベクターが必要であり、そのため大量生産の技術確立が必須である。またヒトに投与可能な臨床研究用ベクターは、Good Manufacturing Practice (GMP) 基準に準拠したグレードで製造することが必要であり、血友病遺伝子治療に使用するアデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターにおいても、当該基準に則した製造法で生産しなくてはならない。本研究では、血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、GMP 製造と同一の方法での生産を中国の製造受託企業 (CMO) に委託し、non-GMP レベルでのベクター製造を行った。製造物について品質の検定を行い、今後の GMP 製造へ向けた検討の継続に問題はないものと判断した。また、血友病遺伝子治療の次世代ベクターの位置づけであるサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターにおいても、血小板特異的なプロモーター (GpIb  $\alpha$  プロモーター) を用い、大量生産可能でかつ費用効果的なトランスフェクション法の検討を行った。

A. 研究目的

血友病遺伝子治療の臨床研究実施に向けて、アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターの Good Manufacturing Practice (GMP) グレードのベクターを製造することを目的とし、まずその前段階として Non-GMP のベクター生産を実施する。また、血友病遺伝子治療の次世代ベクターとしての位置づけのサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターについても、さらに大量生産可能で費用効果の高い技術を確

立する。

B. 研究方法

(1) hFXI 搭載 AAV8 ベクターの Non-GMP 生産

(i) ヘルパーウイルスの構築 (GMP レベル): AAV8 の rep/cap を発現する Herpes simplex virus 1 (HSV-1) を構築する。(ii) AAV ベクタープラスミドの構築 (GMP レベル): ネオマイシン耐性遺伝子を持つ AAV ベクタープラスミドに HCRHAAT プロモーターおよびヒト第 9 因子を挿入する。(iii) パ

パッケージング細胞の構築 (GMP レベル) : AAV ベクタープラスミドをほ乳類細胞にトランスフェクションし、G418 でスクリーニングを行う。(iv) 細胞の増幅と AAV ベクターの製造 (Non-GMP レベル) : パッケージング細胞の増幅を行い、ヘルパーウイルスを感染させ、AAV ベクターを生産する。(v) AAV ベクターの精製 (Non-GMP レベル) : クロロホルム処理、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等により AAV ベクターの精製を行う。

#### (2) GpIb $\alpha$ プロモーター搭載 SIV ベクターの生産に用いる培地および添加剤 (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、cAMP 上昇剤) の比較検討

GpIb $\alpha$  プロモーター搭載 SIV ベクターは、リン酸カルシウム法により一過的に作製した。細胞は、DMEM 培地または IMDM 培地で培養している 293T/17 細胞を使用した。それぞれの培地で培養している 293T/17 細胞に 4 種類のプラスミド (① pGTV/GpIb $\alpha$ -EGFP : GpIb $\alpha$  プロモーター/EGFP 搭載ジーントランスファーベクター, ② PV 3rd: 第 3 世代パッケージングベクター, ③ pVSVG: VSVG エンベロープ蛋白質発現プラスミド, ④ pCI-rev: Rev 発現プラスミド) をトランスフェクションした。1 日後に、各添加剤 (最終濃度 ; 10mM 酪酸、1 $\mu$ M アピシジン、5mM バルプロ酸、10 $\mu$ M フォルスコリン) を含む培地に交換した。トランスフェクション 2 日後に培養上清を回収、0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過した。それぞれの particle titer (viral genomes: vg/ml) を測定し、生産性の比較検討を行った。particle

titer の測定は、回収した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。

#### (3) CMV プロモーターおよび GpIb $\alpha$ プロモーター搭載 SIV ベクターの生産に用いるトランスフェクション法および培地の比較検討

GpIb $\alpha$  プロモーターまたは CMV プロモーターを搭載した SIV ベクターを、リン酸カルシウム法およびリポフェクション法により一過的に作製した。細胞は 293T/17 細胞を使用し、DMEM 培地または IMDM 培地で培養した。それぞれの 293T/17 細胞に 4 種類のプラスミド (① pGTV/GpIb $\alpha$ -EGFP : GpIb $\alpha$  プロモーター/EGFP 搭載ジーントランスファーベクターまたは pGTV-EGFP : CMV プロモーター/EGFP 搭載ジーントランスファーベクター, ② PV 3rd: 第 3 世代パッケージングベクター, ③ pVSVG: VSVG エンベロープ蛋白質発現プラスミド, ④ pCI-rev: Rev 発現プラスミド) をトランスフェクションした。1 日後に、最終濃度 ; 10mM 酪酸を含む培地に交換した。トランスフェクション 2 日後に培養上清を回収、0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過した。それぞれの particle titer (vg/ml) および functional titer (TU/ml) を測定し、生産性の比較検討を行った。particle titer の測定は、回収した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。functional titer (TU/ml) の測定は、回収した SIV ベクターを巨核芽球系培養細胞株 UT-7/TPO 細胞に感染させ、FACS により、EGFP 陽性細胞の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用している SIV ベクターは、アフリカミドリザルから単離した免疫不全ウイルス (SIVagm TY0-1 株) を基本骨格とし開発されたベクターである。SIVagm TY0-1 株は、サル免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトに対する病原性の報告はない。この点で HIV ベクターに比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために SIV で複製に関与する可能性のある遺伝子領域を欠失させている。レンチウイルスベクターの取り扱いには P2 レベルでの取り扱いが認可されており、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従って、「組換え DNA 実験指針」(平成 4 年 1 月 31 日付け文部科学省告示第 5 号) を遵守した実験操作法を行った。

### C. 研究結果

#### (1) hFXI 搭載 AAV8 ベクターの Non-GMP 生産

中国の CMO において、hFXI 搭載 AAV8 ベクターについて、予定している GMP 製造と同一の方法で non-GMP 製造を実施した。構築した AAV ベクターについては、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、何れの値も基準値を満たしており、他の AAV ベクター (AAV2 等) 製造での実績通りの製造が出来ることが確認された。

#### (2) GpIb $\alpha$ プロモーター搭載 SIV ベクターの生産に用いる培地および添加剤の比較検討

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (酪酸、

アピシジン、バルプロ酸)、cAMP 上昇剤 (フォルスコリン) を生産培地に添加し、生産性を比較検討した結果、IMDM 培地を使用した場合、それぞれの particle titer については、あまり違いは見られなかったが、DMEM 培地を使用した場合は、酪酸、バルプロ酸に比べ、アピシジン、フォルスコリンを添加したベクターの particle titer が高い傾向にあった。DMEM 培地: 酪酸  $2.9 \times 10^9$  vector genome: vg/ml、アピシジン  $5.0 \times 10^9$  vg/ml、バルプロ酸  $2.4 \times 10^9$  vg/ml、フォルスコリン  $2.9 \times 10^9$  vg/ml、IMDM 培地: 酪酸  $1.4 \times 10^9$  vg/ml、アピシジン  $1.9 \times 10^9$  vg/ml、バルプロ酸  $1.9 \times 10^9$  vg/ml /ml、フォルスコリン  $1.9 \times 10^9$  vg/ml)

#### (3) CMV プロモーターおよび GpIb $\alpha$ プロモーター搭載 SIV ベクターの生産に用いるトランスフェクション法および培地の比較検討

particle titer について、プロモーターの違いに関わらず、IMDM 培地よりも DMEM 培地で生産した方が高い傾向にあった。この結果は、異なるトランスフェクション法 (リン酸カルシウム法、リポフェクション法) を用いて生産した場合においても同様であった。リン酸カルシウム法: CMV/DMEM  $6.0 \times 10^9$  vg/ml、CMV/IMDM  $1.6 \times 10^9$  vg/ml、CMV/DMEM  $3.2 \times 10^9$  vg/ml、CMV/IMDM  $1.3 \times 10^9$  vg/ml、リポフェクション法: CMV/DMEM  $9.9 \times 10^9$  vg/ml、CMV/IMDM  $2.5 \times 10^9$  vg/ml、CMV/DMEM  $6.1 \times 10^9$  vg/ml、CMV/IMDM  $2.2 \times 10^9$  vg/ml。FACS で解析した functional titer については、particle titer とは異なり、リポフェクション法で生産した場合、プロモーターの違いに関わらず、DMEM 培地よりも IMDM 培地で生産した方が高い傾向にあった。この結果は、GpIb $\alpha$  プロモーターを除いてリン酸カルシウム法を用いて生産した場合においても同様であった。リン酸カル

シウム法：CMV/DMEM 24.0%、CMV/IMDM 34.3%、CMV/DMEM 23.4%、CMV/IMDM 22.8%、リポフェクション法：CMV/DMEM 39.2%、CMV/IMDM 50.4%、CMV/DMEM 24.2%、CMV/IMDM 39.4%。

また、リン酸カルシウム法の生産性は、リポフェクション法の50%以上あった。

#### D. 考察

hFXI 搭載 AAV8 ベクターの Non-GMP 製造に成功した。中国 CMO での成功は、今後予定している GMP 製造に向けて重要なステップであり、臨床応用へ向けた明確な前進が見られたものと考えている。次年度予定している GMP 対応ベクター製造においても、問題なく実行出来るものと考えている。

SIV ベクターに関連して、酪酸は、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターの生産に使用されるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で、生産性が向上することが知られている。本研究においては、同じヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるアピシジン、バルプロ酸の検討を行った結果、同様の効果が認められた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、クロマチン構造を緩め、遺伝子の転写を活性化することが知られているので、ベクター生産においても同様のメカニズムが働いていると考えられる。フォルスコリンは、cAMP 上昇剤で HIV ベクターの生産性が向上することが知られている。アピシジンおよびフォルスコリンについては、ベクター生産で一般的に使用されている酪酸よりも生産性が高かった。これらの使用は、大量にベクターを生産する場合に有用であると思われる。しかしながら、必ずしも particle titer の高いベクターが、functional titer が高いという結果にはなっていない。臨床に使用するベクターは有効性や副作用を考慮し、functional titer

と particle titer の比ができるだけ低く、質的に高いものが望まれることから、IMDM を用いた生産法が良いと思われる。また、リン酸カルシウム法の実産性は、リポフェクション法の50%以上あり、大きな生産性の違いはなかった。従って、血小板をターゲットとした治療法においては、リン酸カルシウム法の実産性で十分であると思われる。

#### E. 結論

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、hFXI を搭載した AAV8 ベクターの non-GMP 製造に成功した。AAV8 ベクターについても大量製造技術が確立されたことになり、次年度予定の GMP 対応ベクター製造にも対応出来るものと結論される。

SIV ベクターに関連して、一般的に使用されている酪酸に加え、アピシジン、バルプロ酸にも SIV ベクターの生産性を向上させる効果があることが分かった。また、その particle titer は DMEM 培地を使用した方が高く、functional titer は IMDM 培地を使用した方が高いことが分かった。これらの結果は、IMDM 培地を使用した方が、より質の高い SIV ベクターが生産できることを示唆している。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究

研究分担者 稲葉 浩 東京医科大学臨床検査医学講座

研究要旨:

血友病 A は先天性の出血性疾患であり、Xq28 に位置する血液凝固第 VIII 因子遺伝子 (F8) 内の変異によって引き起こされる。血友病 A の原因となる遺伝子変異は患者ごとに異なると言っても過言ではないほど多種多様である。

これまでの解析から F8 遺伝子変異と病態との関係が次第に解明されてきた。たとえば、逆位や大欠失などのいわゆるヌル変異は重症型(第 VIII 因子活性 1%未満)を引き起こし、補充療法の最も深刻な問題である同種抗体(インヒビター)発生の高リスクとなることが明らかとなっている。また近年、インヒビター発生は単に F8 の変異型のみならず免疫応答に関連するサイトカインなどの遺伝子のタイプが影響することも報告されている。

一方で血友病を引き起こす遺伝子変異の構成比は国や地域で異なり、それぞれの特徴を呈することも明らかになってきている。

現行の補充療法や、今後導入が期待されている遺伝子治療・細胞療法を、効果的、かつ安全に行うためには、F8 はもとより免疫系や代謝系で働く他の複数の遺伝子解析を施行し、タンパク質解析データと併せ、患者個々人の病態の特徴を正確に把握することは必須である。またさらに、これらのデータの蓄積は血友病 A 診療のさらなる発展に貢献するものである。

A. 研究目的

本邦における現行の血友病治療(補充療法)、あるいは将来的な血友病治療(遺伝子治療・細胞療法)を、効果的、かつ安全に行うために有用な情報を得る。

1. 稀な遺伝子変異を有する血友病 A 症例の解析からのアプローチ

インヒビターを発生し、非常に重篤な臨床症状を呈する血友病 A 症例について解析する。本症例はインヒビター発生確認のタイミングから後天性血友病の可能性も疑われたため遺伝子解析によって確定診断をつける目的で遺伝子解析を施行した。検出された遺伝子変異は

非常に稀なものであり、血友病 A 発症との関連については未知であった。この症例の血友病 A 発症機構、およびインヒビター発生機構を検討する。

2. 第 VIII 因子遺伝子のハプロタイプ解析からのアプローチ

血友病患者の病因遺伝子変異の構成比は国や地域の単位で異なり、本邦にも特有の構成比が存在するものと考えられる。これまでの我々の研究から日本人血友病 A からは R531C/H と Y473C 変異が高頻度に検出され、特に Y473C 変異は創始者効果である可能性が示唆された。F8 内の SNP と VNTR の解析から日本人の遺伝子変異の特徴について検討

する。

## B. 研究方法

### 1. F8 のゲノム DNA 解析

ゲノム DNA は末梢血白血球から抽出した。F8 の各エクソンとそのイントロンとの境界領域を合計 33 分割して PCR で増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて精製し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

### 2. F8 の mRNA 解析

トータル RNA は末梢血白血球から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) または PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。mRNA のスプライシングの解析はトータル RNA をサンプルとし、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて cDNA を合成し、エクソン内に設計したプライマーを用いて PCR を行いに行った。mRNA 量の定量は、トータル RNA をサンプルとし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit で cDNA (Applied Biosystems) を合成し、これを TaqMan Gene Expression Assay (Hs00240767\_m1、Hs01109547\_m1、Applied Biosystems) を用いて行った。定量は白人男性の肝細胞由来のトータル RNA (Firstchoice human liver total RNA, Ambion) を用い、同様に作製した cDNA を対照としたデルタデルタ Ct 法によって行った。

### 3. F8 ハプロタイプ解析

F8 中に存在する 7 つの SNP (rs6649625、rs1470586、rs1800291、rs4898352、rs4074307、rs1050705、rs6571266) は、それぞれを含む領域を増幅するように設計したプライマーを用いて PCR にて増幅し、増幅産物を制限酵素で切断して解析した。また F8 イントロン 13 の VNTR はこれを含む領域を PCR で増幅し塩基配列を決定してリピートの数を決定した。

### 4. 凝固学的解析

第 VIII 因子活性測定は、自動凝固測定装置 ACL9000 (Instrumentation Laboratory) と APTT 試薬 (HemosIL™ APTT-SP; Instrumentation Laboratory) を用いた凝固 1 段階法で行った。ベセスダ単位の測定の際の希釈液にはイミダゾール緩衝液を用いた。

### 5. インヒビター IgG サブクラス解析

リコンビナント FVIII を固相化し、これに患者血漿を反応させた後、Human IgG Subclass Screening Kit (Cygnus Technologies) を用いて各 IgG サブクラスを捕捉し、これを定量化した。

### 6. インヒビターエピトープのウエスタンブロットによる解析

リコンビナント第 VIII 因子とそのトロンビン消化産物をサンプルとし、非還元下で SDS 電気泳動後、PVDF メンブレンにブロッティングした。ブロッキングの後、患者の血漿を反応させた。患者血漿中のインヒビター IgG を HRP 標識抗ヒト IgG (BIOSOURCE) で捕捉した後、コニカイムノステイン HRP-1000 (Konica) で発色させて検出・観察した。

#### (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施行した。

## C. 研究結果

### 1. 稀な遺伝子変異を有する血友病 A 症例の解析

患者の F8 解析では、翻訳領域に変異が認められなかったが、イントロン 10 内部のエクソ

ン 10 から 325bp 3' 側の位置にアデニンからグアニンへのトランジションを検出した。このトランジションは国際的な血友病 A 変異データベース (HAMSTeRS) に登録がなく、ポリモルフィズムとしての報告もなかったことから、非常に稀な点変異であることが判明し、患者の血友病 A 発症に関与しているものであることが強く示唆された。この点変異はスプライシングに影響を与える可能性がスプライシング予測プログラムによる解析から示唆されたため、患者の mRNA の解析を行ったところ、イントロン 10 内の 226bp の配列がエクソンとして誤認識され、エクソン 10-11 間に挿入された異常 mRNA が患者の主な mRNA として存在していることが確認された。ただ一部、正常なスプライシングを受ける正常 mRNA も存在することも確認された。異常 mRNA は挿入配列中で終止コドンを生じ、mRNA 監視機構により排除されることが推測された。したがって F8 mRNA の低下が本症例における血友病 A 発症機序であると予測された。実際、患者の F8 mRNA は、健常者の約 10 分の 1 程度に低下していることが異所性 mRNA のリアルタイム PCR による半定量で確認された。これらのことから、本症例は先天性の軽症血友病 A であると診断された。

患者のインヒビター力価は 53.2BU でタイプ I 型の阻害様式を示した。またインヒビターは IgG4 を主体とし、IgG1 混在がするオリゴクローナルであり、第 VIII 因子 A2 ドメインと軽鎖にエピトープを有した。インヒビター発生に影響するとされる免疫応答関連因子の多型性の解析では、IL10 と TNF $\alpha$  では低リスク型、CTLA-4 では高リスク型であることが確認された。

## 2. 第 VIII 因子遺伝子ハプロタイプ解析

病因遺伝子変異が判明しており、互いに血縁関係が確認されない血友病 A の 41 症例について F8 内の広範囲に分布する 7 か所の SNP と、1 か所の VNTR を解析した。SNP のうち rs6649625 (IVS-1) と rs1800291 (Exon14) 以

外の 5 か所の SNP は強い連鎖不均衡が認められ、ハプロタイプの解析には無効であった。イントロン 13 内の VNTR については 6 種類のアレルが観察され、ハプロタイプの解析には非常に有効であった。SNP と VNTR を併せることで 41 症例は 11 種類のハプロタイプに分類された。

病因遺伝子変異は日本人で高頻度に検出される R531C/H (4/3 例) と Y473C (5 例) 以外にも、S183R、R698W、R1689C、T1774N (各 2 例)、および逆位 (4 例) が複数症例から検出された。複数症例から検出された点変異は、変異のホットスポット (CpG ダイヌクレオチド) で生じたもの (R531C/H、R698W、R1689C) と、そうでないもの (Y473C、S183R、T1774N) に分類できたが、後者の変異を有する症例の F8 は、それぞれの変異で同一の F8 ハプロタイプを有していた。これに対し、点変異であっても CpG ダイヌクレオチドで生じたものや逆位の 4 症例では複数の F8 ハプロタイプが確認された。

## D. 考察

1. 血友病 A を引き起こす遺伝子変異は多種多様であるが、一般的な方法により F8 を解析すれば、ほとんどの症例で病因遺伝子変異が検出される。しかし、詳細な F8 の解析にもかかわらず、遺伝子変異が検出できない血友病 A 症例が約 2% 存在することが報告されている。今回、確定診断を目的に遺伝子解析を行った症例はイントロンの深い部分に点変異を有する稀な症例で、通常であれば変異が検出できない症例に分類される可能性が高かった。異所性 mRNA の解析から、この変異はスプライシングに異常を来たし、フレームシフトを生じることによって mRNA を低下させ、血友病 A の病因となることが判明した。エクソンとのジャンクション部分以外のイントロンで起きた点変異が血友病を引き起こし得ることが、mRNA の解析から証明された貴重な症例である。

また本症例はインヒビターの発生機序を考

える上でも貴重な症例であった。すなわち、通常のインヒビターはヌル変異による重症例に発生する同種抗体が一般的である。一部の軽症例に発生するインヒビターは、ミスセンス変異による分子異常症から検出され、自らの産生する変異型第 VIII 因子が“自己”と認識され、輸注される野生型が“非自己”と認識されることに起因する。しかし本軽症例の場合、mRNA の解析から、血漿中に存在する第 VIII 因子は野生型であると考えられ、従ってこの症例に発生したインヒビターは性格、発生機序などの点で通常の軽症例に発生するインヒビターとは異なる可能性も示唆された。このような症例の解析からインヒビター発生のメカニズムに関する新たな知見が得られる可能性がある。

2. 血友病患者の病因遺伝子変異には国や地域の単位に特有の構成比を示すものがあり、本邦にもこれが存在するものと考えられる。今回の我々の研究から日本人に高頻度に検出された Y473C のみならず S183R と T1774N は、おそらく起源を同じくする創始者効果によりもたらされ本邦に伝播している変異であろうことがハプロタイプの解析から推測された。これら Y473C、S183R、T1774N に共通するのは、軽症例の日本人から高頻度に検出され、かつ点変異のホットスポットである CpG ダイヌクレオチドで起こっていないことである。このような変異が長い年月の間に創始者効果として浸透し、各国特有の変異の構成比の形成に大きく関与しているであろうことが確認された。

## E. 結論

1. 血友病 A の病因遺伝子変異とインヒビターの発生メカニズムは非常に多様性に富むことが、稀な症例の解析から再確認された。個々の血友病症例の病態を遺伝子的・タンパク質的な解析から得られたデータとともに評価し、これを蓄積していくことは今後の血友病 A 診療に重要である。
2. 軽症血友病 A にみられる創始者効果が、

特有の構成比の形成に大きく関与していることが確認された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 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
- ② 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

### 2. 学会発表

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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