

4) 医療施設について

4-1) 現在、血友病など凝固異常症の診療について主に受診している診療科名は？（ ）科
さらに高校生以上の方にお尋ねします。過去に（ ）科に受診していた。

4-2) 血友病など凝固異常症の診療について全ての方にお尋ねします。引き続き現在の医療施設（診療科）に通う予定ですか？

- ①はい ②いいえ ③決まっていない

（その理由は _____ ）

4-3) 現在、血友病など凝固異常症に関して通院している医療施設を選んで（複数回答可）、（ ）内に数値を記入してください（家から医療施設までの片道の時間）。

①血友病に詳しい医師のいる地元の医療施設

年に（ ）回程度通い、平均（ ）時間（ ）分ぐらいかかる

②血友病に詳しい医師のいる離れた医療施設

年に（ ）回程度通い、平均（ ）時間（ ）分ぐらいかかる

③地元の一般の医療施設

年に（ ）回程度通い、平均（ ）時間（ ）分ぐらいかかる

4-4) 血友病など凝固異常症の治療で通院する回数の最も多い医療施設について該当する数字に○をしてください。

	満足	まあ満足	どちらともいえない	やや不満	不満
①出血時の対応	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
②輸注指導支援	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
③定期診察	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
④製剤の入手しやすさ	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑤救急時対応	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑥情報提供	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑦相談体制	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑧患者会支援体制	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑨他医療施設との連携	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----
⑩総合的に考えて	5-----	4-----	3-----	2-----	1-----

4-5) 小児科から内科への転科についてご意見・困ったことがあればお聞かせください。

4-6) 他の診療科・薬局・医療機関で苦労した体験談・受診の工夫などあればお聞かせください。

5) 社会生活に関することについて

5-1) 生活上の心配・不安をお聞きします。該当するものを選んで下さい(複数回答可)。

- ①子どもへの遺伝 ②身体障害による行動制約 ③就職 ④結婚
⑤老後の生活 ⑥親の介護不安 ⑦特になし
⑧その他()

5-2) 現在、医療面で不安を感じていることはありますか?(複数回答可)

- ①現在の病状 ②希望する医療が受けられない ③病院が遠い ④医療費
⑤健康保険 ⑥特になし
⑦その他()

5-3) 血友病などの凝固異常症を意識して以下のようなことをされているかお聞きします。

a) 家族の方に病名や病気の特徴を知らせていますか?

- ①はい ②一部の人のみ ③いいえ

#③の「いいえ」の方に質問します。

a-1) 知らせない理由は?(複数回答可)

- ①HIV・エイズ ②肝炎 ③遺伝
④差別・イジメ
⑤その他(具体的に)

b) 親戚の方に病名や病気の特徴を知らせていますか?

- ①はい ②一部の人のみ ③いいえ

c) それ以外の人に病名や病気の特徴を知らせていますか?

- ①はい ②一部の人のみ ③いいえ

#③の「いいえ」の方に質問します。

b-1) 知らせない理由は?(複数回答可)

- ①HIV・エイズ ②肝炎 ③遺伝
④差別・イジメ
⑤その他(具体的に)

#①②の方に質問します(複数回答可)。

c-1) 誰に知らせていますか?

- ①学校・職場の責任者
②学校・職場の友人 ③その他の人

c-2) 知らせて良かったことは?

- ①入学・入社ができた ②イジメを受けなくなった
③病気を理解してもらえた
④その他()

c-3) 知らせて都合が悪くなったことは?

- ①入学・入社ができなくなった ②友人が離れていった
③差別・イジメがあった
④その他()

#③の「いいえ」の方に質問します。

c-4) 知らせない理由は?(複数回答可)

- ①HIV・エイズ ②肝炎 ③差別・イジメ
④薬価が高いため保険点数の心配
⑤その他(具体的に)

c) 現在の雇用形態は下記のどれですか？

- ①正社員 ②契約社員 ③嘱託社員 ④派遣社員
⑤パートタイマー・アルバイト

d) 現在の就職は身体障害者枠での採用ですか？

- ①はい ②いいえ

e) 現在、仕事上の不安・心配はありますか？（複数回答可）

- ①出血した場合の止血管理 ②職場の理解 ③職場に病気を伝えていないため
知られないようにする ④身体障害による行動制約 ⑤会社や同僚の差別的対応
⑥通院時間の確保 ⑦希望する仕事に就けない
⑧給料が少ない ⑨体調不良や治療の都合で欠勤が多い ⑩仕事がつい
⑪職場の人間関係に恵まれていない ⑫健康保険証使用による病名漏えいの不安
⑬その他（ ）

f) 仕事に出血した場合、止血管理は主にどうされていますか？

- ①速やかに職場の医務室などで自己注射をする
②速やかに一時帰宅あるいは早退して自己注射をする
③速やかにかかりつけ医に注射に行く
④なるべく会社が終わるまで我慢し、帰宅後に自己注射
⑤なるべく会社が終わるまで我慢し、帰宅後にかかりつけ医で注射
⑥その他（ ）

#6-1)で②「いいえ」を選択した方に質問します。

g) 仕事をしていない理由は何ですか？（複数回答可）

- ①病気を知られたくない ②出血傾向が強い
③全体に体調が悪い ④身体障害による行動制約が大きい
⑤就労での差別不安 ⑥通院時間が確保しにくい
⑦入院している ⑧希望する仕事がない ⑨就職先がない
⑩就職する気がない ⑪給料が少ない ⑫定年退職したから
⑬学生あるいは子供だから ⑭就職する必要がある ⑮その他

#6-1)で③「現在就職活動中」を選択した方に質問します。

h) 以下の中のどれに該当しますか？（複数回答可）

- ①血友病を知らせて就職活動をしている
②血友病を知らせないで就職活動をしている
③身体障害者枠を利用して就職活動をしている
④ハローワークなどに就労先を探しに行っている

生年月日が平成元年4月2日以降（満22歳未満）の方の設問はこれで終了です。引き続きご意見・ご要望等ございましたら16頁の自由記載欄にお進み頂きご記載下さい。

生年月日が平成元年4月1日以前（満22歳以上）の方は、このあとの質問にもお答え下さい。

7) HIV 感染あるいは肝炎について

7-1) HIV ウイルスの感染はありますか？

- ①あり ②なし ③わからない

#①「あり」の方に質問します。

a) 抗HIV薬を服用していますか？

- ①はい ②いいえ ③中断/あるいは休薬中

b) 最近のHIVウイルス量は？

- ①検出感度未満 ②()コピー/ml ③わからない

c) 最近のCD4細胞数は？

- ①()個/ μ L ②わからない

d) エイズを発症していますか、あるいはしたことがありますか？

- ①なし ②今発症している ③発症したが今は治っている ④わからない

7-2) C型肝炎ウイルスの感染はありますか？

- ①あり ②なし ③わからない

#①ありの方に質問します。

a) 現在の病期は？

- ①自然治癒 ②インターフェロンで治癒 ③慢性肝炎 ④肝硬変 ⑤肝癌
⑥わからない

b) インターフェロン治療を受けたことがある、あるいは受けていますか？

- ①これまでに受けた ②現在治療中 ③受けたことはない

#③「受けたことはない」を選択した方に質問します。

c) インターフェロン治療をしない理由は？（複数回答可）

- ①仕事あるいは学校を休めないため ②副作用が怖い/つらいため
③病状が進み治療できないため ④肝機能が正常であり治療開始時期ではないため
⑤治療費が高額のため ⑥その他()

医療関係者へのアンケート調査

1. この調査票の記入者は？
①医師（a内科　b小児科　c整形外科・リハビリテーション科　dそれ以外）
②歯科医師　③看護師　④臨床心理士・ソーシャルワーカー　⑤PT・OT
⑥その他
2. 現在勤務している病院・医院などの医療施設の形態
①個人医院あるいは単科の診療所　②一般病院　③小児病院　④大学病院
⑤その他（具体的に　　）
3. 現在勤務している医療施設の地域
①北海道　②東北　③関東　④甲信越　⑤中部　⑥北陸
⑦近畿　⑧中国　⑨四国　⑩九州・沖縄
4. 血友病など血液凝固異常症の治療に関わる経験年数（延べ）
①1年未満　②1年～2年　③3年～9年　④10年以上
5. 携わった患者の年齢　①小児のみ　②成人のみ　③小児、成人の両者
6. 携わった患者数　①1～4人　②5～9人　③10～49人　④50人以上
7. 血友病など血液凝固異常症患者の QOL（生活の質）を低下させる要因を下記の欄からその重要と思われる順番に記載して下さい（5つ以内）。
a) 小児の血友病など血液凝固異常症患者に対して QOL の低下を来す要因の順位
1番（　　）、2番（　　）、3番（　　）、4番（　　）、5番（　　）
b) 成人の血友病など血液凝固異常症患者に対して QOL の低下を来す要因の順位
1番（　　）、2番（　　）、3番（　　）、4番（　　）、5番（　　）

- | |
|--|
| ①出血　②頻回の静脈注射　③関節障害　④頭蓋内出血の後遺症　⑤インヒビター
⑥HIV感染　⑦肝疾患（肝炎、肝硬変、肝癌）　⑧偏見・差別　⑨病院などの医療施設の不備
⑩診療ネットワークなど医療体制の不備　⑪公費負担制度の問題　⑫幼稚園・学校生活の制限
⑬就業の問題　⑭結婚・遺伝の問題　⑮定年退職後の生活、老後の問題
⑯その他（具体的に　　） |
|--|

有難うございました。

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

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

研究分担者 柿沼 章子 社会福祉法人 はばたき福祉事業団 事務局長

研究要旨

【目的】本研究は、薬害 HIV 感染被害者・家族の現状から、血友病患者の自立など、血友病母子関係における自立・依存の問題、将来計画等について、事例把握、評価を行いつつ、今後の支援ツール開発に向けての展開案を検討することを目的とする。【方法】全国の、薬害 HIV 感染被害者の母親 19 名および HIV 非感染血友病患者の母親 10 名を対象に、出生前から成人までの時期について、家族関係および、医療・学校を含む社会的関係に関して特徴的な生活上の出来事と子育て経験についての半構造化インタビュー調査を行った。【結果・考察】主要な結果として、1) 薬害 HIV 感染被害者および HIV 非感染血友病患者をめぐる子育ての主要な困難は、血友病が遺伝疾患のため、周囲への開示が難しかったが、HIV 感染被害が生じたことによりさらに困難になった。そのため、周囲からの有用な情報や支援を受けにくくなっている。2) 血友病は、現時点では根治療法がなく、継続的な凝固因子補充療法および関連した医療的対処のため、家族に生活上の過度の負担、医療依存が生じやすい。3) 前述 1) 2) の困難は、患者本人の就学上の困難や、就労や社会参加の困難にもつながっている。家庭内では夫婦間の関係やきょうだいの子育てなどに影響が及ぶことが明らかになった。4) 議論により、自立・社会参加支援にむけての今後の課題として、当事者・家族、および医療を含む専門家の協働による支援の必要性とその具体案についてまとめた。これらは、支援ツール作成に向けての今後の展開案として提示した。5) 加えて、従来見逃されがちな「遺伝」と親子関係についての問題点も大きいことが明らかになり、文献検討もあわせて行った。【結論】薬害 HIV 感染被害者・家族の現状から、血友病母子関係をめぐる社会的背景・今後の課題を明らかにし、支援ツール作成のための今後の展開案を提示した。次年度以降、支援創出・支援実施の評価を通じて、QOLの向上を目指す。

A. 研究目的

薬害 HIV 感染被害者は、HIV 感染被害により根底には医療に対する不信がありつつも、血友病に対する根治療法がないなどの医学的な問題を抱えている。さらには、薬害の再発も懸念される、医療者・製薬会社への再依存の傾向なども見られる。そのた

め、血友病患者の自立など、血友病母子関係における自立・依存の問題や将来計画をはじめとする、今後の課題把握及び課題克服への支援が急務と見られる。生活領域全般、および家族も含めた広い視座のもと、薬害被害再発防止のため、経験や教訓を今後の医療・教育・社会全般に生かすとともに

に、被害により影響を受けた現状の生活を今後向上させるために、新たな課題克服のための支援創出につなげる。そこで、以下を目的とした。1) 薬害 HIV 感染被害者・家族等の血友病に於ける医療環境・生活・人生・将来という生涯生活の具体的課題を明らかにする。2) 相談機会・教育機会の創出、情報提供など、相談を契機とした支援を実施し、影響を評価するための、次年度以降の介入研究に有用な基礎資料とする。初年度は、特に薬害 HIV 感染被害者の母親および HIV 非感染血友病患者の母親に焦点を当てる。一連の得られた結果を分析することにより、不安のないサポートなど仕組みを考える。

B 研究方法

(1) 調査対象者について：

薬害 HIV 感染被害者の母親および HIV 非感染血友病患者の母親を対象に、半構造化面接に基づく面接調査を平成 21 年度 5 月～11 月にかけて行った。インタビュー件数は、全 30 件であり、分析対象はインタビュー実施後に参加同意を撤回した 1 件を除く計 29 件(薬害 HIV 感染被害者の母親群(以後ケース群と呼ぶ) 19 件、HIV 非感染血友病患者の母親群(以後対照群と呼ぶ) 10 件)とした。調査対象者のリクルートおよび調査協力依頼は、薬害 HIV 感染被害者の母親および HIV 非感染血友病患者の母親に対し、事前に協力依頼の手紙を出し、了解を得た人へ電話や手紙で確認を取った後、書面にて調査参加への同意を得た。

インタビュー実施については、はばたき福祉事業団本部・支部事務所、対象者の自宅、近隣の会場等で行い、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た。

(2) 調査対象者の群別方法：

全国 8 地域を設定し、インタビュー件数割

り付けを行い、ケース群：薬害 HIV 感染被害者の母親、対照群：HIV 非感染血友病患者の母親のそれぞれについて、目標インタビュー数を設定し割り当てた。これは、主に生活地域の違いによるバイアスを評価する目的である。北陸、中四国を除く以下の 6 地域について、調査対象者のケース群、対照群のセットを得た。(北海道、東北、関東甲信越、東海、近畿、九州・沖縄)。

(3) インタビュー方法：

インタビューには、インタビューアーと記録者の二人一組で行った。質問は、インタビューガイドに沿って実施した。インタビューガイドは、複数の研究者により、患者調査等で比較的多く使用されている形式を検討したのち、今回の調査内容に沿った内容に改定・精査を経て新たに作成したものである。インタビューは概ね 2 時間以内であった。インタビューの際、調査協力者の同意のもと、音声を録音し、テキストデータに書き起こした資料、対象者に関する同意のとれた事前・事後情報、インタビューに同席した研究者による統一した様式によるメモを後の分析で使用した。インタビューを実施または同席した研究者により、インタビュー内容をケースレポートにまとめた。

(5) 質問項目：

質問項目は、医療・教育・社会に関わる生活領域、出来事・経験を中心に、成育歴と関連させながら、聞き取りを行った。

具体的には、出生時から成人後まで、時系列に以下に関連した内容を聞いた。

1) 母親自身の出来事・思い

血友病に対する思い、母親の就労状況、就労状況、子育て方針、当時の考え・態度、等

2) 子ども(血友病患者)との関係

自己注射開始時期、HIV 告知時期、反抗期

の態度、学校の送迎、進路選択、就労等

3) 他のきょうだいとの関係

他のきょうだいの態度、サポート、等

4) 父親との関係

子育て方針と協力、夫婦仲、父親の態度、サポート、等

5) 祖父母、親戚との関係

遺伝開示、サポート、等

6) 学校との関係

疾病開示、学校側の態度、欠席日数(回/月)、体育の参加、修学旅行の参加、友人関係、等

7) 医療との関係

定期受診の頻度、平均出血回数(回/月) 治療歴・病院歴、やりとり、主治医(かかりつけ医、血友病医)との関係)等

8) その他(患者会など)

患者会の有無・参加状況、情報機会、心の支え、サポート、等

9) 全体的な振り返り

(5) インタビュー記録

インタビュー記録は統一した様式の記録用紙に記録した。これは、後の分析の際、インタビュー内容をより系統的に理解するためである。具体的には、インタビュー記録用紙として「出来事シート」を新たに開発した。記入欄は、生育歴の各段階と、各生活領域(医療、学校含む)の交差式の記入欄からなる。これにより、各生活領域での主要な出来事を時系列に把握することが可能になった。

(6) ケースレポート

ケースレポート記録については以下の事項を含む。

1) ケースNO

2) 現在の年齢(母親、血友病患者(子))

3) 現住所、子出生地(都道府県)

4) 血友病型:血友病A(第8因子欠乏症)、血友病B(第9因子欠乏症)、血友病A・B

以外の血友病類縁疾患(ファオンビルブランド病、第7因子欠乏症等)、その他

5) 血友病の症度(重度(1%未満)、中等度(1%~5%未満)、軽度(5%以上)、不明

6) 家族構成(現在の家族構成、他に血友病等のきょうだいの有無、有りの場合血友病等の症度、等)

7) 血友病告知時期

8) 自己注射開始時期

9) HIV感染告知時期

10) ライフステージごと(出生前、幼少期、小学校、中学校、高校、大学、成人)での特徴的な生活上の出来事

またこれらの項目に加えて、インタビューに同席した研究者によりインタビュー概要、母の視点からの生育観および研究者による語りの特徴をA4の記録用紙1枚にケースレポートとしてまとめ、全てのケースについて、研究者による検討会議にて内容の精査を行い、必要な修正を行った後、分析のための基礎資料として用いた。

(4) 分析について

研究者向けに血友病の歴史、医療体制、当事者の経験を学ぶための勉強会を計1回持ち、前提となる背景情報を共有した。インタビュー実施と並行して、計4回にわたりインタビューケース評価のための会議を持ち、ケースレポートの内容の精査の後、全体的な分析と、課題の抽出および系統的な課題の整理を行った。議論により、支援創出にむけての今後の課題を整理した。さらに、各課題について、支援ツール作成に向けての今後の展開案としてまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」等を遵守する形で、社会福祉法人はばたき福祉事業団倫理審査委員会に諮り、平成21年4月12日承認を得た上で、研究を実施した(承認番号1)。インタビューでは、調査

協力者には研究の趣旨・目的を説明し、データの取り扱いについて匿名化を行うこと、成果発表では研究協力者が同定されないよう行うこと、インタビュー記録については、研究目的以外に使用しないこと、参加同意はいつでも撤回でき撤回による不利益はないこと、について、文書同意を得た。事前説明と調査対象者の意向の尊重を徹底することにより、全ての調査協力者は自発的な調査への参加となるようにした。全ての研究協力者に対して、知りえた情報についての取り扱いについて指導を徹底して行い、データ使用に関しては、情報管理・秘密保持について文書にて誓約書を結び、期限付きでデータ使用許可を与えた。

C. 研究結果

(1) 具体的課題の抽出

分析により、薬害 HIV 感染被害者・家族等の血友病に於ける医療環境・生活・人生・将来という生涯生活の具体的課題、および関連する要因が抽出された。

- 1) 血友病の子どもたちの教育・就労問題
 - 2) 血友病児の子育ての困難さ
 - 3) 血友病医療体制の現状、及び主治医との関係
 - 4) 血友病の子どもたちの学校生活
 - 5) 血友病患者のきょうだいの課題と対処の現状
 - 6) 血友病に係わる就労・自立・社会参加支援
- また、本調査のインタビューにより新たに浮上した課題は以下となった。
- 7) 血友病における「遺伝」と親子関係
- なお、各課題については、各論として別冊の報告書にその詳細をまとめ、調査協力者および社会への成果の還元の一助とする。

(2) 支援ツール作成に向けての今後の展開案

系統的に抽出された支援課題を元に、「情報」「場」「相談」「家族関係」という支援カテゴリーを設定し、今後の展開案を提示した。

具体的には、電話相談、血友病キャンプ、血友病についての心理教育、発達心理社会プログラム等であり、当事者の在り方を含めた提案を行った。また、「家族関係」に関する支援対象は「患児を持つ両親」「患者自身」「患児のきょうだい」と広く設定し、具体的な心理教育・教育プログラム・遺伝カウンセリングシステム構築など、具体的に係わる専門家の役割について言及しつつ提案した。

D. 考察

一連の結果から、今後の支援課題を以下に集約した。1) 血友病をめぐる子育ての主要な困難は、血友病が遺伝疾患のため、周囲への開示が難しく、周囲からの有用な情報や支援を受けにくいことから生じている。2) 血友病は根治が難しいことから、継続的な凝固因子補充療法および関連した医療的対処のため、家族に生活上の過度の負担や母子密着、医療依存が生じやすいこと。3) 前述 1) 2) の困難は、患者本人の学校での困難や、就労や社会参加の困難、きょうだいの子育てにも影響が及ぶこと、などが明らかになった。議論により、4) 自立・社会参加支援にむけての今後の課題をまとめ、当事者・家族、および医療を含む専門家の経験と知識と情報の共有および、協働による支援創出の素地を作った。これらは、支援ツール作成に向けての今後の展開案としてまとめた。また、5) 従来見逃されがちな「遺伝」と親子関係についての問題点も指摘し、文献による検討もあわせて行った。

E. 結論

平成 21 年度に薬害 HIV 感染被害者の母親および HIV 非感染血友病患者の母親に対す

る聞き取り調査を行った。薬害 HIV 感染被害者・家族の現状から、血友病母子関係をめぐる社会的背景・今後の課題を明らかにし、支援ツール作成の今後の展開案を提示した。次年度以降、支援創出・支援実施の評価を通じて、QOLの向上を目指す。平成 22 年度はこれを踏まえて、血友病患者、家族の視点を踏まえた自立支援プログラムの検討に入る。平成 23 年度は、支援の継続拡大の観点より、得られた知見を元に支援の普及を目指したい。

G. 研究発表

・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

・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

・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

・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

・久地井寿哉、石谷誓子、大宮朋子、島田恵、池田和子：平成20年度厚生労働省障害者保健福祉推進事業（障害者自立支援調査研究プロジェクト）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事業
HIV感染患者の就労に関する質問紙調査・インタビュー調査報告書（第二報）2009、1-96

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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
Ishiwata A, <u>Mimuro J</u> , <u>Mizukami H</u> , Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, <u>Madoiwa S</u> , Ono F, <u>Shima M</u> , Yoshioka A, <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u> .	Mutant Macaque Factor IX T262A: A Tool for Hemophilia B Gene Therapy Studies in Macaques.	Thromb Res		Feb17. Epub ahead of print	2010
<u>Mimuro J</u> , Mizuta K, Kawano Y, Hishikawa S, Hamano A, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, <u>Madoiwa S</u> , Kawarasaki H, <u>Sakata Y</u> .	Impact of acute cellular rejection on coagulation and fibrinolysis biomarkers within the immediate post-operative period in pediatric liver transplantation.	Pediatr Transplant		Sep29. Epub ahead of print	2010
Ishiwata A, <u>Mimuro J</u> , <u>Mizukami H</u> , Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, <u>Madoiwa S</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u> .	Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice.	J Gene Med	11	1020- 1029	2009
Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, <u>Mizukami H</u> , <u>Ozawa K</u> , Muramatsu S.	A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralizing antibodies.	Ann Clin Biochem	46	508-510	2009
Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, <u>Mizukami H</u> , Kume A, <u>Ozawa K</u> .	Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy.	J Gene Med	11	373-381	2009
Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, <u>Sakata Y</u> , Yoshioka A, <u>Shima M</u> .	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- 3388	2009

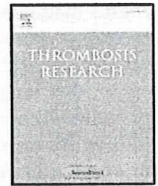
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeda T, Sakurai Y, Tatsumi K, Kato J, Kasuda S, Yoshioka A, <u>Shima M.</u>	Elevation of B cell-activating factor belonging to the tumour necrosis factor [corrected] family (BAFF) in haemophilia A patients with inhibitor.	Thromb Haemost	101	408-410	2009
Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, <u>Shima M.</u>	A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A.	Int J Hematol	90	576-582	2009
三浦 明、伊藤 俊広、嶋 緑倫、 <u>稲葉 浩</u> 、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
清田育男、篠澤圭子、大瀧 学、藤田 進、鈴木 隆史、天野景裕、 <u>稲葉 浩</u> 、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
<u>Takedani H</u> , Kawahara H, Kajiwara M.	Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa.	Haemophilia		in press	2010
山崎哲、山崎法子、鈴木 典子、後藤宏実、高山成伸、 <u>瀧 正志</u>	第 VIII 因子インヒビター測定法 4 法の特異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	167-173	2009

研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Regular Article

Mutant Macaque Factor IX T262A: A Tool for Hemophilia B Gene Therapy Studies in Macaques

Akira Ishiwata^{a,1}, Jun Mimuro^{a,b,*}, Hiroaki Mizukami^c, Yuji Kashiwakura^a, Atsushi Yasumoto^a, Asuka Sakata^a, Tsukasa Ohmori^{a,b}, Seiji Madoiwa^{a,b}, Fumiko Ono^{d,e}, Midori Shima^f, Akira Yoshioka^f, Keiya Ozawa^{b,c}, Yoichi Sakata^{a,b,*}

^a Divisions of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi-ken 329-0498, Japan

^b Hematology Division of Medicine, Jichi Medical University, Tochigi-ken 329-0498, Japan

^c Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi-ken 329-0498, Japan

^d The Corporation for Production and Research of Laboratory Primates, Tsukuba, Ibaraki-ken 305-0843, Japan

^e Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki-ken 305-0843, Japan

^f Department of Pediatrics, Nara Medical University, Kashihara, Nara-ken 634-8522, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2009

Received in revised form 12 January 2010

Accepted 25 January 2010

Available online xxxx

ABSTRACT

Introduction: Gene therapy is expected to be the next generation therapy for hemophilia, and a good animal model is required for hemophilia gene therapy preclinical studies.

Methods: Taking advantage of the human factor IX (FIX) specificity of monoclonal antibody 3A6, the epitope of which resides in the amino acid polypeptide segment including Ala 262 of human FIX, mutant macaque FIX with an amino acid substitution of Thr 262 to Ala (macaque FIX T262A) was generated and its reactivity to monoclonal antibody 3A6, biological activity and expression *in vivo* were studied.

Results: Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and Western blot analyses showed that monoclonal antibody 3A6 bound to human FIX and macaque FIX T262A but not to wild-type macaque FIX. Recombinant macaque FIX T262A exhibited a comparable coagulation activity to wild-type macaque FIX and human FIX. High expression of macaque FIX T262A was achieved in mice by injection of AAV8 vectors carrying the macaque FIX T262A gene and reached levels of up to 31.5 µg/mL (1050% of the normal human FIX concentration). Macaque FIX T262A expressed in the liver of mice was as biologically active as that expressed *in vitro*. In addition, the macaque FIX T262A concentrations determined by a 3A6-based ELISA were not influenced by the presence of normal macaque plasma.

Conclusions: The results of the present study suggest that macaque FIX T262A may be processed appropriately *in vivo* and that the macaque FIX T262A concentration in the macaque circulation can be quantified precisely by a monoclonal antibody 3A6-based ELISA.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

A wide variety of disorders are caused by genetic abnormalities, thereby giving rise to enthusiasm for gene therapy as the next generation therapeutics for many diseases [1–4]. Indeed, many gene therapy clinical trials have been conducted, and some have achieved great successes [5–7]. However, others have been unsuccessful. Furthermore, unpredicted adverse effects occurred in some trials [8,9]. To establish gene therapy technologies, good animal models are required. Advances in developmental biotechnology have allowed us to create a variety of mouse disease models, transgenic mice and gene-targeted mice. However, there are significant species differences

between humans and mice, thus making it difficult under certain circumstances to extrapolate data obtained in mice to human patients [10]. Factor IX (FIX)-deficient mice (hemophilia B mice) and natural hemophilia B dogs have been used to study gene therapy approaches for the treatment of hemophilia B [3,11–13]. However, better animal models may be required because of the limited success in human trials [9,10]. Primates are used successfully as models in disease applications, but there are presently no hemophilic primates available for gene therapy studies. If one can distinguish human molecules from primate molecules *in vivo*, non-human primates may be used for hemophilia gene therapy preclinical studies [11,14,15], despite the fact that this genetic abnormality is not indigenous to these species.

Rhesus macaques have been proposed as a good primate model for hemophilia B gene therapy studies because of the amino acid sequence similarity between human FIX and macaque FIX and the low immunogenicity of human FIX in rhesus macaques [16]. However,

* Corresponding authors. Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi-ken 329-0498, Japan. Tel.: +81 285 58 7398; fax: +81 285 44 7817.

E-mail addresses: mimuro-j@jichi.ac.jp (J. Mimuro), yoisaka@jichi.ac.jp (Y. Sakata).

¹ These authors contributed equally to this work.

rhesus macaques still developed antibodies against human FIX upon receiving adenoviral vectors carrying the human FIX gene despite the high amino acid sequence homology [17], thus making it difficult to study the long-term expression of transgene-derived FIX. We previously reported that a human FIX-specific monoclonal antibody, 3A6, which can distinguish human FIX from cynomolgus macaque FIX in enzyme immunoassays and Western blot analyses, binds to the amino acid segment including the Ala residue at position 262 of the human FIX molecule [18]. Only one amino acid residue at position 262 in this segment differs between macaque FIX and human FIX [16,19]. Therefore, the Thr residue at position 262 of macaque FIX was mutated to Ala (macaque FIX T262A) to examine whether the human FIX-specific monoclonal antibody 3A6 could bind to the mutant macaque FIX in the present study. Here, we show that macaque FIX T262A binds to monoclonal antibody 3A6 and is as active as wild-type macaque FIX and human FIX, that macaque FIX T262A can be efficiently expressed *in vivo* in mice by injection of AAV8 vectors carrying the mutant macaque FIX gene, and that quantification of macaque FIX T262A by a 3A6-based ELISA was not influenced by the presence of macaque plasma. These findings raise the possibility of a potential advantage of mutant macaque FIX T262A over human FIX to study the long-term expression of a FIX transgene in macaques.

Materials and Methods

Cloning of macaque FIX cDNA

Total RNA was isolated from the cynomolgus macaque liver using an RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). The isolated RNA was subjected to RT-PCR to amplify the macaque FIX cDNA based on the nucleotide sequence of a macaque FIX cDNA [19] using *pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and a primer pair (5'-AGG TTA TGC AGC GCG TGA AC-3'/5'-CCA TCT TTC ATT AAG TGA GCT TTG-3'). The DNA fragment of the macaque FIX cDNA was cloned into the plasmid vector pCR Blunt II using a Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) and sequenced. The macaque FIX cDNA was subjected to site-directed mutagenesis to create the cDNA expressing macaque FIX T262A using a QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and a primer pair (5'-CCT CAT CAC AAC TAC AAT GCA GCT ATT AAT AAG TAC AAC CAT G-3'/5'-CAT GGT TGT ACT TAT TAA TAG CTG CAT TGT AG T TGT GAT GAG G-3').

Construction of FIX minigenes

A human FIX cDNA was a generous gift from Dr. George G. Brownlee (Chemical Pathology Unit, University of Oxford, Oxford, UK). The DNA fragment spanning part of exon 1, intron 1 and part of exon 2 of the human FIX gene was amplified from the human gene by PCR and sequenced. After removing part of intron 1 of the FIX gene by Pvu II treatment, the modified DNA fragment spanning parts of exon 1, intron 1 and exon 2 of the human FIX gene was excised with Bcl I and cloned into the Bcl I recognition sequence of the human FIX cDNA in the appropriate orientation to create a FIX minigene that was shown to express human FIX more efficiently than the FIX cDNA [10]. Similarly, the modified DNA fragment spanning parts of exon 1, intron 1 and exon 2 of the human FIX gene was cloned into the Bcl I recognition sequences of the macaque FIX cDNA to create a chimeric macaque FIX minigene.

Expression of macaque FIX *in vitro*

The human FIX minigene, macaque FIX minigene and mutant macaque FIX T262A minigene were cloned into plasmid p1.1c (Avigen Inc., Alameda, CA) in the appropriate orientation to create the plasmids p1.1c-hFIX, p1.1c-macFIX and p1.1c-macFIXT262A expressing human FIX, wild-type macaque FIX, and mutant macaque FIX

T262A, respectively, under the control of the CMV promoter. Human embryo kidney (HEK) 293 cells were transfected with p1.1c-hFIX, p1.1c-macFIX and p1.1c-macFIXT262A in the presence of vitamin K (10 µg/mL), and the human FIX and macaque FIX expression levels in the conditioned media of the HEK 293 cells were analyzed by enzyme-linked immunosorbent immunoassays (ELISAs) and Western blot analyses. The FIX clotting activities in the conditioned media were determined by the APTT method using FIX-deficient human plasma (Dade Behring, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL).

Cloning of the hepatic control region (HCR) of the ApoE/C-I gene locus and the human $\alpha 1$ antitrypsin promoter (HAAT)

The 325-bp DNA fragment spanning the HCR region of the ApoE/C-I locus (nucleotides 1-325) [20-23] was amplified by PCR with a primer pair (sense primer, 5'-CAC TAG TCT GCA GGC TCA GAG GCA CAC-3'; antisense primer, 5'-GAA CCC GGA CCC TCT CAC ACT AC-3') and cloned into the plasmid vector pCR Blunt II. The 297-bp DNA fragment spanning the HAAT promoter (nucleotides -270 to +27) was amplified by PCR and cloned as described previously [24].

AAV vector production

Plasmid vector p1.1c was excised with Spe I and Eco RI to remove the DNA fragments spanning the CMV promoter and the growth factor gene intron 1, and the DNA fragment of HCR was inserted into the same position. Subsequently, the DNA fragment of the HAAT promoter was cloned into the Eco RI site in the appropriate orientation to create the plasmid p1.1HCRHAAT. The macaque FIX T262A minigene was cloned on the 3' side of the HAAT promoter of p1.1HCRHAAT in the appropriate orientation to create p1.1HCRHAAT-macFIXT262A. The DNA fragments spanning the promoter, LacZ gene and polyadenylation signal sequence of pAAV2-LacZ (Stratagene) were replaced with DNA fragments spanning the CMV promoter, macaque FIX T262A minigene and SV40 polyadenylation signal sequences of p1.1c-macFIXT262A to create the gene transfer vector pAAV2-CMV-macFIXT262A, in which these DNA fragments were flanked by ITR sequences of AAV serotype 2 (AAV2) as described previously [24,25]. Similarly, pAAV2-HCRHAAT-macFIXT262A was constructed by replacing the DNA fragment between the two ITRs of pAAV2-LacZ with the DNA fragment spanning the HCRHAAT, macaque FIX T262A minigene and polyadenylation signal sequences of p1.1HCRHAAT-macFIXT262A. The vector production system and HEK 293 cells were kindly supplied by Avigen Inc. The AAV vectors were packaged with the AAV8 capsid by pseudotyping. The chimeric packaging plasmid for AAV8 capsid pseudotyping was a generous gift from Dr. James M. Wilson (Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). For virus vector purification, virus particle-containing samples were treated with DNase (Benzonase; Merck Japan, Tokyo, Japan) and subjected to two rounds of cesium chloride-density gradient ultracentrifugation in HEPES-buffered saline (pH 7.4) in the presence of 25 mM EDTA at 21 °C as described [24,25]. Titration of the recombinant AAV vectors was carried out by quantitative PCR as described previously [24] with the primers 5'-GGT TGT TGG TGG AGA AGA TGC-3' and 5'-GAT AGA GCC TCC ACA GAA TGC A-3', and the probe 5'-FAM- GAT AGA GCC TCC ACA GAA TGC A-3'.

Animal experiments

Male C57BL/6 wild-type mice were purchased from SLC Inc. (Hamamatsu, Japan) and maintained under standard lighting conditions in a clean room. All surgical procedures were carried out in accordance with guidelines approved by the Institutional Animal Care and Concern Committee at Jichi Medical University. Before and after AAV vector injection, blood was drawn from the cervical vein plexus

of the mice and mixed with a 1/10 volume of 3.8% sodium citrate, before platelet-poor plasma was prepared by centrifugation. The AAV vectors were injected into the cervical vein plexus of the mice under anesthesia with isoflurane. Cyclophosphamide (100 µg/body/day; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) and tacrolimus (12.5 µg/body/day; Fujisawa Pharmaceuticals Co., Tokyo, Japan) were subcutaneously administered to the mice 5 times a week for 12 weeks after the vector injection as an immunosuppressant. Mouse plasma samples were subjected to an ELISA for human FIX to determine the plasma concentrations of macaque FIX T262A. Macaque plasma and macaque liver tissues were obtained from macaques under anesthesia according to the Institutional Animal Care and Concern Committee at Tsukuba Primate Research Center.

ELISA for human FIX

The ELISA that detects human FIX but not wild-type macaque FIX was performed as described previously [18]. Monoclonal antibody 3A6-coated microtiter plates (Maxisorp; Nalge Nunc, Rochester, NY) were blocked with 5% casein and then incubated with FIX-containing samples (conditioned media or mouse plasma samples) in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 1% casein and 0.1% Triton X-100. Monoclonal antibody 3A6-bound human FIX or macaque FIX was detected with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human FIX polyclonal antibody (Affinity Biologicals Inc., Hamilton, Ontario, Canada). Purified human FIX was used as a standard. The ELISA that detects human FIX, wild-type macaque FIX and macaque FIX T262A was carried out using a sheep anti-human FIX polyclonal antibody (Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada) and an HRP-conjugated goat anti-human FIX polyclonal antibody (Affinity Biologicals Inc., Ancaster, Canada). Briefly, microtiter plates coated with the sheep anti-human FIX polyclonal antibody (1 µg/mL) were incubated with samples containing FIX. After washing, the microtiter plate-bound FIX was detected with the HRP-conjugated goat anti-human FIX polyclonal antibody.

Results

Binding of monoclonal antibody 3A6 to macaque FIX T262A

Monoclonal antibody 3A6 has been shown to be able to distinguish human FIX from wild-type macaque FIX [18]. Furthermore, it binds to wild-type FIX but not to mutant human FIX with an amino acid substitution of Ala to Thr (the amino acid residue at position 262 of macaque FIX is Thr), suggesting that the epitope for 3A6 resides in the segment including the Ala residue at position 262 of human FIX. Based on these data, we isolated a macaque FIX cDNA and expressed wild-type macaque FIX and mutant macaque FIX with an amino acid substitution of Thr to Ala at position 262 (macaque FIX T262A). Wild-type macaque FIX, mutant macaque FIX T262A and wild-type human FIX were expressed in HEK 293 cells and evaluated for their biological activities and reactivity with monoclonal antibody 3A6. The antigen concentrations of recombinant FIX were quantified by ELISAs using a sheep polyclonal antibody against human FIX and an HRP-conjugated goat polyclonal antibody against human FIX. The polyclonal antibody-based ELISA detected wild-type macaque FIX and mutant macaque FIX T262A, and all the FIX molecules had coagulation activities with similar specific activities (Table 1). Wild-type macaque FIX was not detected by the 3A6-based ELISA, whereas macaque FIX T262A and wild-type human FIX were quantified in a similar manner by this ELISA. The antigen concentrations of macaque FIX T262A determined by the polyclonal antibody-based ELISA were slightly higher than those by 3A6-based ELISA. This may be due to FIX fragments found in the supernatant of vector-transfected 293 cells.

The above data were confirmed by Western blot analyses (Fig. 1), which also showed that 3A6 bound to human FIX and macaque FIX

Table 1
Recombinant factor IX expression *in vitro*.

	Activity (U/mL)	Antigen (ng/mL)	
		Polyclonal Ab ELISA	3A6 ELISA
Wild-type human FIX	0.031	260	100
Wild-type macaque FIX	0.017	120	0
Macaque FIX T262A	0.024	200	101

Polyclonal Ab ELISA: the solid-phase (catching) antibody was a polyclonal anti-human FIX antibody.

3A6 ELISA: the solid-phase (catching) antibody was monoclonal anti-human FIX antibody 3A6.

The normal human plasma FIX concentration is 3 µg/mL by the 3A6 ELISA.

T262A, but not to wild-type macaque FIX, while the polyclonal anti-FIX antibody bound to all the FIX molecules.

Expression of mutant macaque FIX T262A *in vivo*

AAV8 vectors carrying the macaque FIX T262A gene under the control of the CMV promoter (AAV8-CMV-macFIXT262A) or HCRHAAT promoter (AAV8-HCRHAAT-macFIXT262A) (Fig. 2) were injected into wild-type mice, and the expression of macaque FIX T262A was analyzed by the 3A6-based ELISA. Macaque FIX T262A was efficiently expressed in the mice using the AAV8 vectors, and high macaque FIX T262A expression was observed for more than 50 weeks (Fig. 3). In particular, the concentration of macaque FIX T262A in mouse plasma increased to supernormal levels (maximum: 14.4–31.5 µg/mL, 480–1050% of the normal plasma human FIX concentration) with AAV8-HCRHAAT-macFIXT262A at a dose of 5×10^9 vector genome/g. Such high FIX transgene expression was also achieved with the AAV9 vector carrying the same promoter and the macaque FIX T262A gene (data not shown). The mouse plasma samples containing macaque FIX T262A at 5.4–14.4 µg/mL (180–480% of the normal plasma human FIX concentration) were diluted and subjected to the coagulation assay for FIX to study the biological activity of macaque FIX T262A expressed *in vivo*. After subtraction of the basal mouse FIX activity, the FIX activity of mouse plasma containing macaque FIX T262A at the immunological concentration of 10.9 ± 3.9 µg/mL ($n = 5$) was 4.7 ± 9.3 U/mL ($n = 5$), indicating that macaque FIX T262A expressed in mice was biologically active. The plasma levels of macaque FIX T262A in AAV8-HCRHAAT-macFIXT262A-injected mice were approximately 100-fold higher than those in AAV8-CMV-macFIXT262A-injected mice, suggesting that the HCRHAAT promoter worked more efficiently than the CMV promoter *in vivo*.

Detection of macaque FIX T262A in the presence of macaque plasma

To confirm that the 3A6-based ELISA could distinguish macaque FIX T262A from wild-type macaque FIX, recombinant macaque FIX T262A-containing samples were subjected to the 3A6-based ELISA in

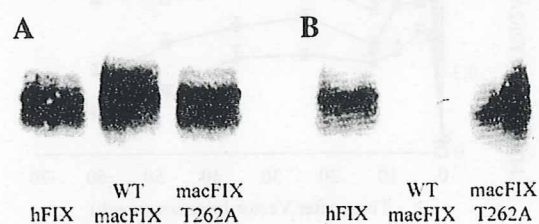


Fig. 1. Western blotting analyses of FIX molecules. Human FIX (hFIX), wild-type macaque FIX (WT macFIX) and macaque FIX T262A (macFIXT262A) expressed in the conditioned media of HEK 293 cells transfected with plasmid vectors carrying the corresponding FIX genes were analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody against human FIX (A) and monoclonal antibody 3A6 (B).

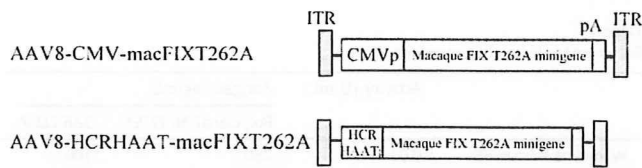


Fig. 2. Schematic representations of AAV8 vectors carrying the macaque FIX T262A gene. The AAV8 vectors carrying the macaque FIX T262A gene used in the present study are schematically illustrated. The promoter sequences, macaque FIX T262A gene and SV40 polyadenylation signal sequences are flanked by AAV2 ITRs.

the presence of increasing concentrations of macaque plasma to analyze the effect of wild-type macaque FIX in the plasma. As shown in Fig. 4, the presence of macaque plasma exhibited no inhibitory effects on the quantification of recombinant macaque FIX T262A expressed *in vivo* by the 3A6-based ELISA. These data confirm that the 3A6-based ELISA can be used to quantify macaque FIX T262A expressed in macaques.

Discussion

To develop gene therapy technologies, good animal models are required. Hemophilia B mice (FIX-deficient mice) and natural hemophilia B dogs are available and have been used to study gene therapy approaches for hemophilia B. In a previous FIX gene transfer study with AAV2 vectors, a vector dose of 1.8×10^{12} vector genome/kg yielded plasma FIX levels of more than 1% in mice, whereas the same vector dose yielded circulating FIX levels of 0.2–0.4% in dogs. In humans, no significant increase in the FIX level was observed with the same vector dose [10]. One possible explanation for the differences in these results is that the transduction efficiency of the type 2 AAV vectors into the skeletal muscles of humans differs from those in the animal models. Unpredicted adverse effects occurred in patients who received an AAV2 vector for FIX gene expression in the liver [9]. In this regard, a primate model may be required to more closely mimic the situation in humans, though non-human primate experiments may not reflect perfectly human situations.

Cynomolgus macaques are native to southern Asia and have been used as simian models in medical research, such as gene therapy studies for Parkinson's disease [26]. As reported previously, human FIX may be immunogenic in macaques under certain conditions, such as expression of human FIX in rhesus macaques with adenoviral

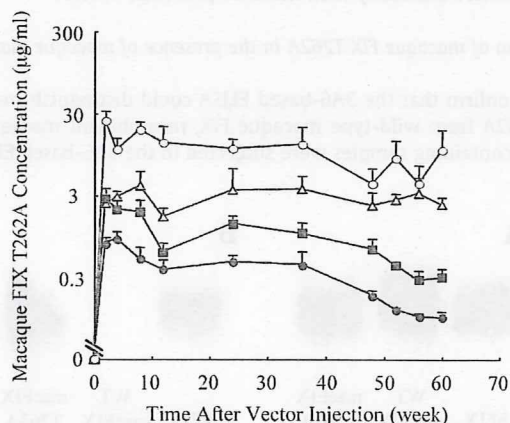


Fig. 3. Expression of macaque FIX T262A in mice using AAV8 vectors. The macaque FIX T262A levels in plasma of mice transduced with AAV8-HCRHAAT-macFIXT262A (open circles, 5×10^9 vector genome/g; open triangles, 5×10^8 vector genome/g) or AAV8-CMV-macFIXT262A (closed squares, 5×10^{10} vector genome/g; closed circles, 5×10^9 vector genome/g) were quantified by the 3A6-based ELISA.

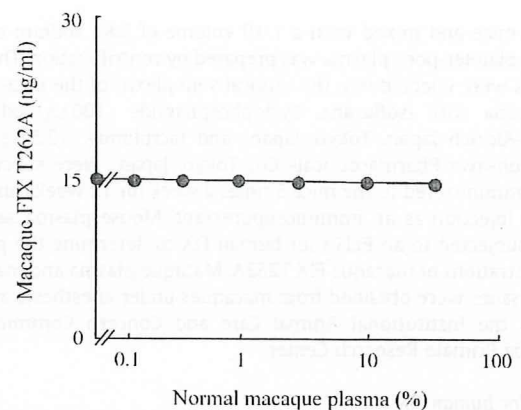


Fig. 4. Macaque plasma has no effect on the quantification of macaque FIX T262A by the 3A6-based ELISA. Mouse plasma containing macaque FIX T262A was diluted with buffer to adjust the macaque FIX T262A concentration to 30 ng/mL, mixed with equal amounts of buffer containing increasing concentrations of normal macaque plasma, and subjected to the 3A6-based ELISA for macaque FIX T262A quantification.

vectors and cynomolgus macaques receiving repeated subcutaneous injections of human FIX in the presence of Freund's adjuvant [17,19]. Therefore, as long as antibodies against human FIX develop in macaques during transduction with vectors carrying the human FIX gene, long-term studies of human FIX expression will be impossible. In this context, FIX molecules that are less immunogenic in macaques may be suitable for long-term expression of FIX transgenes in macaques. Possible candidate FIX molecules for this purpose would be tagged macaque FIX or mutant macaque FIX proteins that can be distinguished from the native wild-type macaque FIX. Anti-FIX monoclonal antibodies were screened for their inability to bind to simian FIX. One antibody was identified, which forms the basis for an ELISA that can quantify human FIX in macaque plasma down to a concentration of 1.7 ng/mL (0.06% of the normal plasma FIX concentration) [18]. In the present study, we developed a mutant macaque FIX that can be detected accurately with this specific anti-human FIX monoclonal antibody.

Macaque FIX is highly homologous to human FIX, with the amino acid sequence identity of 97.1% [16]. Among the 415 amino acid residues of mature FIX, 12 amino acid residues at 11 distinct positions of human FIX are different from those in macaque FIX [16]. Human FIX has two potential N-glycosylation sites, while macaque FIX has three potential N-glycosylation sites, similar to the case for murine FIX, porcine FIX, and bovine FIX. Of the three potential N-glycosylation sites in macaque FIX, two are located at the same positions as the sites in human FIX. Human FIX lacks the potential N-glycosylation site located at position 260 of macaque FIX [18]. Since Thr at position 262 was substituted with Ala in macaque FIX T262A, the consensus sequence Asn-X-Thr for N-glycosylation at this position was mutated, indicating that macaque FIX T262A may lose this potential N-glycosylation site. Asn 260 of macaque FIX may be glycosylated because macaque FIX T262A migrated faster than wild-type macaque FIX on Western blotting. Regarding the carbohydrate composition, macaque FIX T262A may be humanized, but has only a single amino acid substitution. Therefore, the amino acid sequence of macaque FIX T262A may be closer to wild-type macaque FIX than to human FIX. In terms of the coagulation activity of macaque FIX T262A, it has almost the same coagulation activity as wild-type macaque FIX and human FIX. This observation suggests that the macaque FIX T262A conformation may not be significantly altered and that the N-glycosylation at position N260 may not contribute significantly to the coagulation activity of macaque FIX.

We created macaque FIX with a FLAG sequence at the C-terminal end (FLAG-tagged macaque FIX) and analyzed its properties.