

201029008A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）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 _____ 13
(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 _____ 19
(自治医科大学 小澤敬也、水上浩明)
3. 血友病におけるインヒビター発生機序の解明および
治療法の確立に関する研究 _____ 22
(奈良県立医科大学 嶋 緑倫)
4. 第VIII、第IX因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究 _____ 24
(奈良県立医科大学 嶋 緑倫)
5. 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 _____ 39
(自治医科大学 高橋将文)
6. 血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発 _____ 42
(ディナベック株式会社 長谷川 護)
7. 血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究 _____ 44
(東京医科大学 稲葉 浩)
8. ウイルス感染血友病患者の手術適応に関する研究 _____ 49
(東京大学医科学研究所附属病院 竹谷英之)
9. 血液凝固異常症のQOLに関する研究 _____ 53
(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志)
10. 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 _____ 122
(社会福祉法人 はばたき福祉事業団 柿沼章子)
11. 脂肪組織由来幹細胞シートによる細胞遺伝子治療の開発 _____ 128
(東京女子医科大学先端生命医科学研究所 大橋一夫)
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 133
- IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 136

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

血友病は血液凝固因子第 VIII(FVIII)、或いは第 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、不慮の致命的出血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は、利便性を含めて改良されたが、抗血友病因子中和同種抗体（インヒビター）出現はなお重要な課題である。血友病患者に対する社会的偏見は特に HIV 感染被害後顕著になった。これらを克服するために、I 血友病遺伝子治療、II 血友病インヒビター対策、III 患者 QOL を高めるための調査研究の 3 本の柱を立てて、研究を進めた。

I 血友病遺伝子治療：サルを用いた遺伝子治療実験を通して、従来のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによるヒト血友病遺伝子治療がことごとく頓挫した主たる原因がサル・ヒト共通ウイルスである AAV 既感染による抗 AAV 中和抗体が血中に存在するためであることを明らかにした。そこで、抗 AAV8 中和抗体測定感度を数百倍に上昇させ、世界トップクラスの〔現時点で世界標準より感度が数十倍高い〕測定系を確立した。これを用いて測定すると、ヒトでも血友病患者を含め、約 50%例で抗体陽性であることが明らかになった。抗体陰性のサルでは、末梢静脈より AAV8-FIX ベクターを投与しても、十分治療レベルの FIX 発現が得られ、年余にわたる発現持続が観察された。また、抗体陽性例に対しても、抗体を含む血液を回避するバルーンカテーテル法によりベクターを投与することで、同様の効果が得られた。標的臓器である肝臓に発現に見合う量の AAV ゲノムも観察された。生殖臓器にベクターの移行の見られないことも確認された。そこで、これらのサル実験を基盤にヒト遺伝子治療臨床実験開始を計画した。ヒト臨床実験にはヒト投与可能（GMP レベル）AAV8-FIX ベクターが不可欠である。低予算内でこの FIX ベクターを作製しうる技術力を持つ企業を世界に求め、中国政府系企業 Vector Gene Technology (VGT)社を選択し、ベクター作製を依頼した。技術力不足を補うために研究班より自治医大グループとディナベック技術者が複数回訪中し、本年度中にベクター納入のめどが立った。次年度はヒト血友病 B 遺伝子治療プロトコル作成とベクターの質検定を済ませた後、倫理審査を受け臨床研究を開始する予定である。血友病 A 遺伝子治療研究については、技術的には血友病 B と同様と考えられるが、標的臓器特異性を確認するためにサル実験を準備するとともに、発現因子活性確認を目的に血友病 A クローンベクターを作製し、特許申請した。

SIV ベクターを利用した長期持続血友病遺伝子治療研究では、まず、SIV-FVIII ベクターを自己間葉系幹細胞に *ex vivo* で導入した。2つの方向での臨床応用を検討している。一つは、遺伝子搭載細胞を傷害関節に注入することで関節出血による障害を軽減する目的であり、既に血友病 A マウスでは驚異的な効果を確認できている。今ひとつは細胞ナノシートを作製し、これを体内の除去可能部位に移植し、遺伝子治療する方法で、ルシフェラーゼを発現させることで可視化し、効果持続をルシフェラーゼを追跡することで検討を進めている。

II インヒビター研究：繰り返す製剤治療により、血友病因子に対する同種抗体が生じたインヒビター患者の治療法として ITI が知られているが、血友病 A マウスを用いてそのモデル作製に成功した。モデルマウス解析を通して ITI の機序の幾つかを明らかにした。さらに、時間（数年）と金（大

量製剤使用)のかかるヒトの ITI 治療法の適応可能性のある患者選択などに利用できるマーカーを求めて研究を展開している。インヒビター患者の後方視的解析で明らかにされた幾つかの発症要因に関わる仮説を前方視的解析で明らかにする研究をスタートした。またこの解析を通して、日本における正確な血友病患者データベースを構築することも開始した。発症要因の有無を検討するためのサイトカインや血友病因子の遺伝子解析についても、幾つかの施設で倫理審査を受け承認を受けた。

III 患者 QOL を高めるための調査研究：本年度は、一次アンケートの不備〔高齢化に伴う定年の問題など〕を補う形で作成・配付した二次アンケートを回収し、患者代表の参加も含めた解析システムを構築した。一次アンケートで明らかになった血友病患者 QOL を左右する関節障害に対しては、小児の慢性滑膜炎治療、および、成人における関節置換治療に広く整形外科医の関心を高める方策を検討した。また、薬害 HIV 感染被害血友病患者の社会的問題解決のために、本年度は患者の共通の課題としての遺伝問題、特に父親の家族への関与について、患者家族や専門家の聞き取り調査を中心に解析を進めた。血友病遺伝相談体制の著しい不備と血友病遺伝とは関係のない父親や家族の患者家庭に果たす役割に、解決すべき多くの問題があることが明らかにした。

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

東京女子医科大学先端生命医科学

研究所 准教授 大橋一夫

原因となった因子製剤は、利便性を含めて改良されたが、抗血友病因子中和同種抗体(インヒビター)出現はなお重要な課題である。血友病患者に対する社会的偏見は特に HIV 感染被害後顕著になった。これらを克服するために、以下の 3 本の柱を立てて、研究を進める。

I.血友病遺伝子治療：次年度の 8 型アデノ随伴ウイルスベクター(AAV8V)を用いた血友病 B 遺伝子治療臨床研究を視野に計画を遂行する。まず、*FIX* 遺伝子導入・発現の安全と効率改善を目指す。低レベルでも遺伝子導入効率を左右する抗 AAV8 中和抗体測定感度を高める。中国 VGT 社に依頼作製したヒト投与可能(GMP レベル)AAV8・*FIX*ベクターを購入する。血友病 A では、極めて相同性の高いサル FVIII と識別して発現因子量を測定しうる系の確立と、血友病 A クローンブタを作製する。さらに、間葉系幹細胞に *ex vivo* で染色体組み込み型改変 SIV ベクターを利用して *FVIII* 遺伝子を導入し、一次アンケート調査で患者 QOL を左右することの明らかになった関節内出血の治療と、間葉系幹細胞ナノシートを作製し、除去可能部位への移植と、組み込みベクターのリスクを軽減するインシュレ-

A.研究目的

血友病は血液凝固因子第 VIII(*FVIII*)、或いは第 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、不慮の致死性出血の予防は不可能である。過去に HIV や HCV 感染の

タの利用という安全のための2つのキーワードを基礎に半永久的血友病遺伝子治療を検討する。II.インヒビター対策は、血友病Aマウス免疫寛容誘導(ITI)モデルを用いたITI機序の解析と、インヒビター測定法の改良、及び、インヒビター患者血液を用いた種々の基礎解析を進める。さらに、平成19年から3年間に吉岡班で進められたインヒビターの後方視的解析により得られた情報を基盤に、前方視調査解析によりインヒビター発症要因を検討する。また、この解析を通して、日本にこれまで存在しない患者データベース構築を目指す。III.社会的QOL改善研究では、新たに医療関係者をアンケート対象者に組み入れた“患者中心”二次アンケート回収と解析に向けた準備をする。また、薬害HIV感染被害血友病患者の社会的問題解決のために、本年度は患者の共通の課題としての遺伝問題、特に父親の家族への関与について、患者家族や専門家の聞き取り調査を中心に解析を進め、具体的解決策を提案する。

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%以上ある。両者を識別しうるモノクロナル抗体を作製し〔世界唯一〕、我々の確立した識別可能測定系を用いて遺伝子導入で発現したFIXを定量した。AAV8既感染による中和抗体の存在がAAV8ベクター感染効率を左右することから、抗AAV8中和抗体測定感度を高める検討をした。具体的には感染実験反応系への糖類などの添加や高効率感染細胞の選択を進めた。高感度測定法で選択した抗体陰性サルの末梢血管からAAV8-FIXベクターを投与し、発現効果持続と安全性を観察した。抗体陽性サ

ルにバルーン付きマイクロカテーテルを用いて、門脈血液を駆血・洗浄後、肝臓にAAV8-FIXベクターを投与し、発現量と肝臓組織中のAAV8ゲノム量を検討した。サル、健康人、血友病患者における血中抗AAV8中和抗体価を測定した。GMPレベルAAV8-FIXベクター作製をディナベック関連の中国政府系企業Vector Gene Technology Company (VGT)に依頼した。

2.血友病A遺伝子治療：FVIIIは、サルとヒトの相同性は98%以上ある。自作・購入モノクロナル抗体を組み合わせて両者を識別可能な測定系樹立を進めた。発現B領域除去FVIIIの生物活性を確認するために血友病Aクローンブタ作製を進めた。3.遺伝子導入細胞移植：改変SIVベクターを用いて、体外で血友病Aマウス自己間葉系幹細胞(MSC)にFVIII遺伝子を導入した。この細胞のFVIII発現能力を培養系で確認し、注射針で関節内出血を惹起した血友病Aマウス関節内へ搭載細胞を注入し、その関節保護修復効果を検討した。東京女子医大先端研技術を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子、或いはFVIII遺伝子搭載MSCナノシートを作製し、除去可能な皮膚、腹腔内に貼り付けて、発現とその持続を観察した。更にMSCに山中4因子を加えiPS細胞を樹立し、ナノシート作製候補細胞として検討開始した。

II.インヒビター対策：成熟血友病AマウスにFVIIIを頻回投与し作製したITIモデルマウスの脾臓とリンパ節由来細胞を採取し、寛容誘導機作解析を進めた。バイパス療法不応患者血液を用いて不応の原因を検討した。インヒビター測定法の原法であるBethesda法を改良したNijmegen変法をさらに改良したTokyo変法を設定し、インヒビター測定系改善を進めた。インヒビター症例の後方視的解析を基盤に前方視的解析

による要因解析を進めた。インヒビター発症に関与しうる血友病因子、及びサイトカインの遺伝子をインヒビター患者で検討するための倫理審査を準備した。

III.社会的 QOL 向上のための研究:対象を医療関係者までに広げた二次アンケート用紙の配布回収と、解析システム作りを進めた。葉害 HIV 感染血友病患者と非感染血友病患者に共通する問題を半構造化インタビュー調査法を用いて解析した。遺伝問題、特に直接血友病患者の遺伝に関わらない父親や家族の家庭内役割などを、専門家を含めた聞き取り調査や勉強会を行い検討した。

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:中和抗体測定に用いる反応液の改善や、効率のよい AAV8 ベクター感染細胞の選択を進め、抗 AAV 中和抗体測定感度を 2009 年の世界標準レベルの数百倍高めた。欧米でも重要性を認識し、改良を進めているが、我々の系は、現時点でそれより数十倍は感度が高い。末梢静脈から AAV-FIX ベクターを投与した抗体陰性サルに 3 年近く 10-30%FIX 発現持続が得られている。バルーンカテーテル利用して門脈血流遮断、生食で血液洗浄後、血液に接しない形で抗体を回避して AAV8-FIX ベクターを投与することにより、抗体陽性サルにも 5-10%の発現を長期間維持出来た。肝臓組織中にも発現量に見合う AAV ゲノム量の確認も出来た。霊長類センターのサル 188 頭、健常人 58 人、血友病患者 43 人を対象に抗 AAV8 中和抗体を測定した。サルで約 72%、人では約半数が陽性であり、患者もほぼ同等で、有意に高くはなかった。ベクター作製依頼した VGT 社がこれまで AAV2 ベクター作製等に利用してきたヘルペスウイルス利用ヘルパー法では GMP レ

ベル AAV8-*FIX*ベクターの生産効率が悪いことが明らかになった。ディナベック技術者と自治医大グループが複数回訪中し、これまで自治医大で non-GMP レベル AAV8-*FIX* ベクター作製に利用してきたプラスミドトランスフェクション法の技術指導し、年度内ベクター納入のめどが立った。

2. 血友病 A 遺伝子治療: 遺伝子導入により発現したヒト FVIII とサル FVIII をサル血中で識別測定することは、測定レベルの壁を乗り越えるのに大変な労力を要した。しかし、ファージライブラリを利用して作製したモノクロナル抗体を組み合わせることで、漸く 1%以下の発現を測定可能な系が確立でき、サルでの実験の準備は整った。発現 B 領域除去 FVIII の活性を同定する血友病 A クローンブタの作製にも成功した。特許申請中である。

3. 遺伝子導入細胞移植: 体外で改変 SIV-*FVIII*ベクターを間葉系幹細胞 (MSC) に導入した。作製した細胞培養懸置上清を血友病 A マウスに投与し、活性上昇を得た。次に *FVIII* 搭載 MSC を予め放射線照射し増殖を抑えたものを作製した。針で膝関節傷害を与えた血友病 A マウス関節内に生食を対照にこの MSC を注入した。注入 1 日目マウスの関節内出血の程度は MSC を投与したもので有意に少なく、8 日目での関節修復も対象に比べ著しい改善効果が見られた。次にルシフェラーゼ遺伝子搭載 SIV ベクターを MSC に導入した細胞でナノシートを作製した。これにより、体内貼り付け部位の可視化に成功し、また、発現の持続も観察できるようになった。除去可能部位で持続発現可能な貼り付け部位を検討中である。血友病 A マウス MSC に山中 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞に改変 SIV-*FVIII* を導入し、発現を観察中である。脂肪組織からも間葉系幹細胞を樹立

し、細胞シート作製に成功した。

II. インヒビター対策: ITI 血友病 A マウスの解析により以下のようなことが明らかになった: ITI には投与する FVIII 量に至適領域が存在する。イムノグロブリンとしては寛容誘導マウスで IgG2b および IgG3 の有意な低下が見られた。ITI が成功したマウスの脾臓由来細胞及びリンパ節由来単離リンパ球では、FVIII 刺激による有意な CD4+T 細胞増殖活性低下が確認できた。活性化プロトンピン複合体製剤によるインヒビターバイパス療法不応例患者血液を解析した結果、不応はロットにより差のみられる製剤混入外因系インヒビター集積によることが明らかになった。後方視的解析により得られた重症患者ほど高頻度、家族内発生頻度が高いなどのインヒビター発生に関与する要因を、前方視的解析で確認検討を進めつつある。発症要因を探る目的の患者サイトカイン、および血友病因子の遺伝子解析は奈良県立、名古屋大、東京医大で倫理審査の承認を受けた。インヒビター測定法は、国際的推奨の Nijmegen 法を簡便化した Tokyo 変法を検討し、標準化を目的に普及を試みた。

III. 社会的 QOL 向上研究: 第一次アンケート調査の解析で明らかになった血友病患者 QOL を左右する関節障害に対して、小児の慢性滑膜炎治療、および、成人における関節置換治療に広く整形外科医の関心を高める方策を検討した。とくに HIV 感染血友病患者の内科的手術適応判定基準案を作成した。一次アンケートの不備 [老齢化に伴う定年の問題など] を補う形で作成・配付した二次アンケートを回収し、患者代表の参加も含めた解析システムを構築した。薬害 HIV 感染血友病患者は、医療に対する不信感とともに血友病患者共通の問題を抱えている。本年度は、感染の影響を明らかにす

るためにまず共通の問題を聞き取り調査方法により検討した。結果、血友病遺伝相談体制の著しい不備と血友病遺伝とは関係のない父親や家族の患者家庭に果たす役割に、解決すべき多くの問題があることが明らかになった。

D. 考察

I. 遺伝子治療：以前に血友病マウスで得られた成果を基礎に、米国で進められた AAV2 ベクターによる遺伝子治療臨床研究がことごとく頓挫した主たる原因が、抗 AAV 中和抗体であることを明らかにした。現在、世界でサルを用いた AAV ベクターによる遺伝子治療研究は 3 施設あるが、我々が以下の理由により技術的にはその最先端に達したと考えている：1. 我々のみが 97%以上相同性のあるヒトとサルの FIX を識別しうるモノクロナル抗体を作製し、正確に発現 FIX 血中量を定量可能であること。2. 現時点での世界標準の数十倍高感度抗 AAV8 中和抗体測定系を確立したこと。3. 肉体的負担の少ないバルーンカテーテル法を応用することで抗体陽性患者に抗体を回避して遺伝子導入可能な技術を開発した。ヒト臨床研究には GMP レベル AAV8-FIX ベクターが不可欠である。そこで、企業実績・低予算等を考慮し、中国政府系企業 VGT 社にベクター作製を依頼した。しかし、当該企業が AAV2 ベクター作製で成功したヘルペスウイルスを利用する企業定法では AAV8-FIX ベクター作製効率が悪いことが途中で明らかになった。ディナベックと自治医大グループの班員が当地に複数回赴いての技術指導などによりベクターの本年度納入の目安がついた。困難な企業選定や方法変更、さらには尖閣列島問題で頭を抱えている間に、アメリカのユダヤ系医療機関が、高額資金を背景に AAV8 ベクターを欧米で委託作製し、ヒト血

友病 B 遺伝子治療を開始し、数人の患者に数ヶ月間、約 4%の FIX の発現持続が見られていることを 2010 年 12 月のアメリカ血液学会で発表した。しかし、彼らも中和抗体陽性例では成功していない。この点では以前に比べ進歩は見られないが、少なくとも我々と同様の遺伝子治療が数ヶ月ヒトでも安全に進められているということは貴重な情報である。高感度測定法で検査すると、ヒトでは患者グループを含めて約 50%の割合で抗 AAV8 中和抗体が見られる。我々は、抗体陽性例でも投与可能な技術を背景に、次年度は、まず、ベクターの品質検定を第三者企業に依頼し、さらに、ベクターの感染効率を確認する。臨床プロトコール作成は自治医大で先行するパーキンソン病遺伝子治療を参考に効率よく進める予定である。国の審査、及び自治医科大学の倫理審査を受けて臨床研究を開始する。血友病 A 遺伝子治療については、基本的には血友病 B と同様と思われるが、発現臓器特異性、及び必要ベクター量などを検討するためにサルでの実験も施行する予定である。発現 B 領域除去 FVIII の活性は、作製した血友病 A クロンプタで確認する。血友病 A クロンプタも世界初であり、特許申請を済ませた。インヒビター研究への応用も含めて既に複数の製薬会社から引き合いがある。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ないため安全である反面、細胞分裂により数年後には効果が希釈されていく可能性がある。染色体に組み込まれる改変 SIV ベクターも P2 扱いとなり、国内外で臨床研究予定されるまで安全性、及び生産性とも向上している。ex vivo で患者自己細胞に SIV-FVIII ベクターを導入し、安全担保の為のインスレータなどを組み込んで利用する方法は長期安全かつ効果持続遺伝子治療として期待できる。自己細胞と

して選択した間葉系幹細胞はそれ自身抗炎症活性を持ち、*FVIII* を導入し増殖を抑制した形で局所関節腔内に注入する方法は臨床応用に最も近い位置にあるかも知れない。細胞ナノシートを作製し、問題発生時に除去可能な部位に貼り付ける方法も、さらに何らかのブレイクスルーが必要かも知れないが、次世代遺伝子治療法として大いに期待できる。

II. インヒビター対策：ITI 血友病マウスの免疫組織解析により寛容誘導メカニズムの一端が明らかになることが期待される。 インヒビター患者の ITI 治療には数年を要し、莫大な製剤を要し、高額になることから、患者の精神的負担のみならず経済的負担も極めて大きい。ITI モデル解析を通して、有効性の期待できる症例を選択可能なマーカーが見つければ、これらの負担軽減に資するところ大である。インヒビター測定法の標準化は、国際的に同じ基盤で研究を進めるために不可欠であり、今後の展開が期待される。次に新しい切り口としてのインヒビター患者のサイトカインや血友病因子遺伝子解析は発症に関わる素因・誘因解明に大きな意味がある。これまで数年にわたり調査研究という形で実施されたインヒビター患者発症要因を探る後方視的解析を基盤に展開される患者の前方視的解析は、時間のかかる息の長い仕事になる。しかし、この研究はインヒビター発生要因解明だけではなく、日本には未だ存在しない正確な血友病患者データベース構築に資するところも大なりと信じる。

III. 社会的 QOL 向上：患者視点二次アンケートは回収率の悪さが問題ではあるが、次年度の解析による課題提出と政策提言に期待したい。 聞き取り調査により、薬害 HIV 感染血友病患者家族と非感染患者家族に共通の問題が明らかにされた。血友病遺伝に

関わる母を昨年、関与しない父とその他の家族に本年度聞き取り調査を行ったことは患者家族問題を考える上での新視点として評価できる。血友病遺伝に関しては極めて関心が高く、早急に相談体制を確立する必要性が実感された。共通問題の解析が進んだので、その基盤の上に次年度は HIV 感染特有の問題への切り込みが期待される。聞き取り調査という手法は、より具体的に患者の問題点を明らかにし、血の通った政策提言と達成プログラム作成に結びつくことが期待される。しかし、個人情報絡む聞き取り調査は介入研究を含め、患者や家族の視点と利益を十分に踏まえて、注意深く、しかも、大胆に取り組む必要があると考える。

E. 結論

AAV8-*FIX*ベクターを用いた血友病 B 遺伝子治療は、技術的には世界最先端に達し、臨床研究開始可能と考える。最小必要ベクター量検討など安全性担保はさらに必要である。染色体組み込み型改変 SIV ベクターを用いた遺伝子治療も、関節内出血の治療や、長期効果の期待できる治療方法として重要である。血友病 A マウスモデルを用いたインヒビター基礎研究は高額医療となるインヒビター治療への応用が期待でき、経済的にも期待できる。インヒビター前方視的調査研により、具体的インヒビター発生要因が絞り込まれる可能性は高い。患者参加型多視点的アンケート解析から有益な情報が得られている。HIV 感染血友病患者を含む血友病患者家族に対する聞き取り調査は、十分な個人情報配慮は必要であるが、患者の直接的・具体的状況が把握できる有用な解析方法である。血友病遺伝相談体制を早急に確立する必要がある。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

1. Ohmori, T., Madoiwa, S., Mimuro, J., Sakata, Y.: Development of platelet-directed gene modification by lentiviral vector. *Rinsho Ketsueki*. 51(8):625-31, 2010.
2. 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*. 125(6):533-537, 2010.
3. 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*. 14(3):369-376, 2010.
4. Ohmori, T., Kashiwakura, T., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T., Sakata, Y.: Vinculin activates inside-out signaling of integrin α IIb β 3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 400(3) 323-328, 2010
5. Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Furukawa, Y., Sakata, Y.: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem*. 285(41)31763-31773, 2010.
6. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-5, 2010.
7. Lock M, McGorray S, Auricchio A, Ayuso E, Beecham EJ, Blouin V, Bosch F, Bose M, Byrne B, Caton T, Chiorini J, Chtarto A, Clark KR, Conlon T, Darmon C, Doria M, Douar AM, Flotte TR, Francis J, Francois A, Giacca M, Korn M, Korytov I, Leon X, Leuchs B, Lux G, Melas C, Mizukami H, Moullier P, Muller M, Ozawa K, Philipsberg T, Poulard K, Raupp C, Riviere C, Roosendaal S, Samulski RJ, Soltys S, Surosky R, Tenenbaum L, Thomas DL, van Montfort B, Veres G, Wright JF, Xu Y, Zeleniaia O, Zentilin L, Snyder RO.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1723-85, 2010.
8. 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.
9. Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2010. Aug 23. [Epub ahead of print]
10. Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 21: 568-76, 2010.
11. Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, Shima M. Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost*. 104: 105-17, 2010.
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. 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. 嶋緑倫. 出血性疾患の病態と管理 後天性凝固異常症の病態と治療 後天性血友病を中心に. *臨床血液* 51, 1531-1538, 2010.
14. 嶋緑倫. 【小児の治療指針】 血液・腫瘍 血友病. *小児科診療* 73 : 433-436, 2010.
15. Mitomo K, Griesenbach U, Inoue M, Somerton L, Meng C, Akiba E, Tabata T, Ueda Y, Frankel GM, Farley R, Singh C, Chan M, Munkonge F, Brum A, Xenariou S, Escudero-Garcia S, Hasegawa M, Alton EW. Toward gene therapy for

- cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol Ther.* 18(6):1173-1182, 2010.
16. Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T. Inhibition of choroidal neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai viral envelope proteins. *Hum Gene Ther.* 21(2):199-209, 2010.
 17. 篠澤圭子, 天野景裕, 大瀧学, 鈴木隆史, 稲葉浩, 福武勝幸: 遺伝子解析による血友病の保因者診断の検査システムの構築(会議録) 臨床病理(0047-1860)58 巻補冊 Page79, 2010.
 18. 稲葉浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 花房秀次, 山崎雅英, 表美香, 酒井道生, 榎本誠, 高木義弘, 山崎哲, 瀧正志, 矢富裕, 金子誠, 竹谷英之, 松本智子, 嶋緑倫, 藤井輝久, 家子正裕, 内藤澄悦, 松本剛史, 池尻誠, 福武勝幸: 血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第 VIII 因子活性値測定の実態調査(会議録) 臨床血液 (0485-1439)51 巻 9 号 Page1187, 2010.
 19. Takedani H. Continuous infusion during total joint arthroplasty in Japanese haemophilia A patients: comparison study among two recombinants and one plasma-derived factor VIII. *Haemophilia.* 16(5):740-6, 2010.
 20. Takedani H, Kawahara H, Kajiwara M. Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa. *Haemophilia.* 16(2):290-5, 2010.
 21. 瀧 正志: 各種難治性疾患を持つ患児と保護者へのインフォームドコンセント □ 血液疾患 血友病、小児医療とインフォームドコンセント、白幡聡、藤野昭宏(編)、医薬ジャーナル社、2010.4、p 188-194
 22. 瀧 正志: 各種難治性疾患を持つ患児と保護者へのインフォームドコンセント □ 血液疾患 慢性特発性血小板減少性紫斑病、小児医療とインフォームドコンセント、白幡聡、藤野昭宏(編)、医薬ジャーナル社、2010.4、p 195-199
 23. 瀧 正志: 出血・血栓傾向、『小児科臨床ピクシス』症状からみた検査の選び方・進め方、五十嵐隆、石井栄三郎(編)、中山書店、2011.2、p116-118
 24. 長江千愛、瀧 正志: 出血性疾患、その他の先天性凝固因子欠損症の診断と治療、血栓止血誌、21(3):297-300, 2010.6
 25. 瀧 正志: 血友病、von Willebrand 病、小児内科増刊号「必携 小児の薬の使い方」42:587-591, 2010
 26. 長江千愛、瀧 正志: 小児血液疾患最近の知見ー血友病、小児科、51(8):1005-1016, 2010.8
 27. 立浪忍、三間屋純一、白幡聡、仁科豊、花井十伍、大平勝美、桑原理恵、浅原美恵子、瀧 正志: HIV 感染血液凝固異常症における AIDS 指標疾患の報告数について: 血液凝固異常症全国調査に基づく集計、日本エイズ学会誌、12(1):34-41, 2010.4
 28. 武藤真二、長江千愛、庄司朋子、山下敦己、瀧 正志: 新生児・小児 DIC に対する遺伝子組換えヒトロンボモジュリン製剤の治療、日産婦新生児血会誌、18(1):S71-72, 2010
 29. 瀧 正志: 序文ーインヒビター保有先天性血友病患者の quality of life (QOL)、血栓止血誌、21(5):475-476, 2010.10
 30. 山崎 哲、瀧 正志: インヒビター測定の問題点、血栓止血誌、21(5):484-488, 2010.10
 31. Ohashi K, Koyama F, Tatsumi K, Shima M, Park F, Nakajima Y, Okano T. Functional long-term maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule. *J Tissue Eng Regen Med.*, 4: 141-148, 2010.
 32. Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Takagi S, Shima M, Okano T. Engineering liver tissues under the kidney capsule site provides therapeutic effects to hemophilia B mice. *Cell Transplant.*, 19: 807-813, 2010.
 33. Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anti-coagulation factors. *Cell Transplant.*, in press, 2011.
 34. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocyte propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant.*, in press, 2011.
 35. Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Sakurai Y, Ogiwara K, Yoshioka A, Okano T, Shima M. Regulation of coagulation factors during liver regeneration in mice: Mechanism of factor VIII elevation in plasma. *Thromb Res.* in press. 2011.
 36. Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, Kato J, Taminishi S, Takeda T, Ohashi K, Okano T, Hatake K, Shima M. Expression of coagulation

- factors from murine iPS-derived liver cells. *Blood Coagulation Fibrinolysis*. in press. 2011
- 学会発表
1. 窓岩清治、小林英司、石渡 彰、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：マイクロポット植え込み成体血友病 A マウスを用いた持続的 VIII 因子刺激に対する免疫応答能の解析 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 2. Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Hemophilia gene therapy study with mice and non-human primates. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 3. 大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた血小板標的遺伝子導入法の開発 (シンポジウム) 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 4. Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroaki Mizukami, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 5. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Eiji Akiba, Mamoru Hasegawa, Jun Mimuro, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal dominance of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-directed gene therapy. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 6. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Silencing of A targeted protein in platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 7. 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、安本篤史、坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、水上浩明、小野文子、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 A 遺伝子治療研究に向けたヒト BDDFVIII 特異的検出法の確立 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
 8. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、安本篤史、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、久米晃啓、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 B 遺伝子治療研究：末梢静脈投与 AAV8 ベクターによる第 IX 因子遺伝子導入 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
 9. Hiroaki Mizukami, Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroya Yagi, Tsukasa Ohmori, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Successful factor IX expression by IV administration of AAV8 vectors in macaques. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 10. Akihiro Kume, Hiroya Yagi, Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Tomonori Tsukahara, Akira Ishiwata, Jun Mimuro, Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Choice of small-sized promoter for AAV-mediated factor IX expression in skeletal muscle. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 11. 稲葉 浩、篠澤圭子、清田育男、大瀧学、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 F13A1 の部分的重複に起因する先天性第 XIII 因子欠損症の解析 2010 年 鹿児島
 12. 篠澤圭子、天野景裕、尾形享一、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 先天性第 V 因子欠乏症の出血症状における血小板第 V 因子と TFPI 2010 年 鹿児島
 13. 篠澤圭子、天野景裕、大瀧学、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 遺伝子解析による血友病の保因者診断の検査システムの構築 2010 年 東京
 14. Suzuki T, Amano K, Otaki M, Tsujikawa A, Inaba H, Fukutake K. Review of 5 cases with acquired von Willebrand syndrome. WFH meeting 2010 Argentina
 15. 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、花房秀次、山崎雅英、表 美香、酒井道生、榎本 誠、高木義弘、山崎 哲、瀧 正志、矢富 裕、金子 誠、竹谷英之、松本智子、嶋 緑倫、藤井輝久、家子正裕、内藤澄悦、松本剛史、池尻 誠、福武勝幸 血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第 VIII 因子活性測定の実態調査 2010 年 横浜
 16. 篠澤圭子、安倍正博、前田和寿、天野景裕、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 出血症状を示さない先天性第 V 因子欠乏症のミスセンス変異のホモ接合体症例:FV Phe190Ser 2010 年 横浜
 17. Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of L1-mediated large tandem duplication, spanning exon 4 to 10 of F13A1, in a patient with congenital factor XIII deficiency.

- ASH meeting 2010 USA
18. 瀧 正志：インヒビター保有先天性血友病患者のQOL、第33回日本血栓止血学会、2010,4
 19. 山崎 哲、鈴木典子、高山成伸、山下敦己、瀧 正志：凝固第VIII因子に対するインヒビター測定法の問題点、第33回日本血栓止血学会、2010,4
 20. S. Tatsunami, M. Mimaya, A. Shirahata, J. Hanai, Y. Nishina, K. Ohira and M. Taki: Long-term observation of Japanese HIV-infected hemophiliacs: Changes in survival curve and coinfection with HCV, East Asia Hemophilia Forum 2010, 2010,6
 21. 鈴木典子、山崎 哲、山崎法子、高山成伸、浅原美恵子、庄司朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧 正志：ELISA 法による第Ⅱ因子抗体とBethesda 法の比較、第11回日本検査血液学会、2010年7月
 22. M.Taki, S.Tatsunami, A.Shirahata, J.Mimaya, H.Takedani, K.Makino, K.Ohira, K. Kojima I.Wada, K. Yoshikawa: Quality of life in patients with congenital hemophilia and inhibitors in Japan, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
 23. M.Taki, H.Hanabusa, K.Fukutake, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group :Clinical experience with ADVATE during the first 50 exposure days: Data from two post-authorization safety surveillance (PASS) programs in Japan, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
 24. K.Fukutake, M.Taki, H.Hanabusa, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group : Prophylaxis usage among different age groups with hemophilia in Japan: Results from the ADVATE post-authorization safety surveillance (PASS) studies, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
 25. K.Fukutake, H.Hanabusa, M.Taki, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group: Long-term clinical safety of ADVATE [antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method] among Japanese subjects: A two-year update of the post-authorization safety surveillance program, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
 26. Tatsunami S., Ueno T., Taki M., and The Research Committee on QOL regarding Coagulation Disorders in Japan: Analysis of free answered descriptions from patients with coagulation disorders in Japan. The 34th Annual Conference of the German Classification Society & German-Japanese Workshop, 2010.7
 27. 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、花房秀次、山崎 雅英、表 美香、酒井道生、榎本誠、高木義弘、山崎哲、瀧 正志、矢富裕、金子誠、竹谷英之、松本智子、嶋緑倫、藤井輝久、家子正裕、内藤澄悦、松本剛史、池尻誠、福武勝幸：血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第Ⅱ因子活性測定の実態調査、第72回日本血液学会、2010.9
 28. 立浪 忍、三間屋純一、白幡 聡、瀧 正志：本邦の血液凝固異常症における生活習慣病の合併症・既往症の調査結果、第72回日本血液学会、2010.9
 29. Tatsunami S, Kuwabara R, Mimaya J, Shirahata A, Taki M: Status of hepatitis C virus infection in long-term survivors among human immunodeficiency virus-infected Japanese patients with coagulation disorders, 22th Annual Conference of the Australasian Society for HIV Medicine, 2010.10
 30. 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糖尿病、高血圧症、高脂血症の合併について、第24回日本エイズ学会、2010.11
 31. 足利朋子、長江千愛、山下敦己、武藤真二、瀧 正志：当院における過去5年間の血友病入院症例の動向、第52回日本小児血液学会、2010.12
 32. 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Ⅱ補充療法開始時における関節症の画像評価、第52回日本小児血液学会、2010.12
 33. 武藤真二、橘川 薫、長江千愛、山下敦己、庄司朋子、瀧 正志：MRIにて膝関節のヘモジデリン沈着の消失を認めた血友病B乳児例、第52回日本小児血液学会、2010.12
 34. 柿沼章子他、薬害HIV感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる子育ての課題と支援、社会医学会、2010
 35. 柿沼章子他、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（第1報）、日本エイズ学会、2010
 36. 北村弥生、柿沼章子他、血友病患者の母親が感じる患者のきょうだいの課題、日本公衆衛生学会、2010
 37. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Nakai H, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Hepatocyte engineering and genetic modification approaches

- within a living mouse. The Liver Meeting 2010 (The 61th Annual Meeting of the American Society for the Study of Liver Diseases). Oct 29-Nov 2, 2010, Boston, USA.
38. Tatsumi K, Sakurai Y, Ohashi K, Kasuda S, Kato J, Okano T, Shima M. Expression of coagulation factors from murine iPS-derived liver cells. American Society of Gene & Cell Therapy, 13th Annual Meeting. May 19-22, 2010, Washington DC, USA.
 39. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Nakai H, Ehrhardt A, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Hepatocyte Engineering and Genetic Modification Approaches of Hemophilia Hepatocytes within a Living Mouse. American Society of Gene & Cell Therapy, 13th Annual Meeting. May 19-22, 2010, Washington DC, USA.
 40. 辰巳公平、大橋一夫、民西早苗、嶋 緑倫、岡野光夫. 生後の肝臓発育過程における各種凝固因子の遺伝子発現プロフィール. 第 33 回日本血栓止血学会. 2010年4月22日-24日. 鹿児島.
 41. 辰巳公平、櫻井嘉彦、粕田承吾、大橋一夫、岡野光夫、加藤順子、嶋緑倫. 肝細胞様分化 iPS 細胞における血液凝固関連因子発現. 第 17 回肝細胞研究会. 2010年6月18日-19日. 秋田.
 42. 辰巳公平、大橋一夫、立野知世、中井宏之、吉里勝利、嶋緑倫、岡野光夫. Development of a Novel Approach for Cell and Gene Therapy of Hemophilia B based on a Creation of Alter Ego. 第 72 回日本血液学会. 2010年9月24日-26日. 横浜.
 43. 辰巳公平、大橋一夫、立野知世、吉里勝利、嶋 緑倫、岡野光夫. 血液凝固第 IX 因子産生責任細胞の同定～血友病 B の細胞治療確立にむけて～. 第 37 回 日本臓器保存生物医学会. 2010年11月19日-20日. 新潟.

H.知的財産権の出願・登録状況

「血友病Aモデルブタの作出」

出願番号：特願 2010-102569 出願済み。

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アデノ随伴ウイルス (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。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。ヒト FVIII は血友病 A マウスでは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、および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。よりヒトに近い種属の血友病モデル動物 (血友病 A クローンブタ) の作製に成功した。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。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。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、SIV ベクターをもちいて間葉系幹細胞に導入し、血友病マウスへ移植し効果を確認出来た。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遂行している。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 AAV8 ベクターを作製した。このベクターはマウスで 1000% 以上の FIX 発現をえることができる。サルに末梢静脈あるいは腸間膜静脈から同ベクターを投与したところ、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、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。中和抗体の AAV8 ベクターの遺伝子導入障害を回避するベクター門脈内投与法を抗 AAV8 中和抗体が存在するカニクイザル 3 頭にて試み、治療域に達する FIX 発現がえられた。本手法を臨床手法に近づけるためマイクロカテーテルを用いた門脈内ベクター投与を行い治療域に達する導入遺伝子由来 FIX 発現が得られられた。

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ス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

充療法でも致死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ミ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が約 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 遺伝子を用いて組織特異的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。

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、マイクロポー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、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。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。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。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、血友病Aクローンブタを得た。血友病Aクローンブタは血友病Aマウスと異なり生下時から出血傾向を示した。新たに作製したモノクロナル抗体を用いて、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。SIVベクターをもちいて間葉系幹細胞に遺伝子導入し、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。また、FVIII発現間葉系幹細胞の移植実験を行い治療効果が確認された。

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、AAV8に対する中和抗体陰性サル末梢静脈から投与したところ4頭において治療域(2-20%)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。この手法を、マイクロカテーテルを用いて1頭のサルで行い治療域(2-5%)のFIX発現が得られられた。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。この抑制効果はナীব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検討では、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められた。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えているが、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。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モデルも確立したことから、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ると考えられる。

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ている。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. Ohmori T, Madoiwa, S, Mimuro J, Sakata Y: Development of platelet-directed gene modification by lentiviral vector. *Rinsho Ketsueki*. 51(8):625-31, 2010.
2. 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*. 125(6):533-537, 2010.
3. 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.* 14(3):369-376, 2010.
4. Ohmori, T., Kashiwakura, T., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T., Sakata, Y.: Vinculin activates inside-out signaling of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(3) 323-328, 2010
 5. Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Furukawa, Y., Sakata, Y.: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem.* 285(41)31763-31773, 2010.
2. 学会発表
1. 窓岩清治、小林英司、石渡 彰、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：マイクロポート植え込み成体血友病 A マウスを用いた持続的第八因子刺激に対する免疫応答能の解析 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 2. Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Hemophilia gene therapy study with mice and non-human primates. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 3. 大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた血小板標的遺伝子導入法の開発 (シンポジウム) 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
 4. Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroaki Mizukami, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 5. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Eiji Akiba, Mamoru Hasegawa, Jun Mimuro, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal domain of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-directed gene therapy. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 6. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Silencing of A targeted protein in platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
 7. 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、安本篤史、坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、水上浩明、小野文子、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 A 遺伝子治療研究に向けたヒト BDDFVIII 特異的検出法の確立 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
 8. 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、安本篤史、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、久米晃啓、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 B 遺伝子治療研究：末梢静脈投与 AAV8 ベクターによる第 IX 因子遺伝子導入 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 「血友病 A モデルブタの作出」
- 出願番号：特願 2010-102569 出願済み。