



担当医各位

拝啓

「血液凝固異常症の QOL に関する研究」は、厚生労働科学研究事業「血友病の治療とその合併症の克服に関する研究」(班長：坂田洋一教授)の分担研究です。本研究は平成 18 年に実施し、その解析結果を平成 19、20 年に報告しました (<http://www.b-qol.com/>)。今回は前回調査で足りなかった調査項目を追加して最新の情報を集め、QOL の改善のため患者さんが現在何を必要としておられるかを調査します。

この度、先生方には下記 I、II についてご協力をお願い申し上げます。

**I. 血友病などの血液凝固異常症の患者あるいは保護者の皆様への QOL 調査票配布のお願い**

本調査は無記名なので患者さんの同意書は必要ありません。また、聖マリアンナ医大倫理委員会に申請して承認されています。患者さんに下記に示した QOL 調査セットを 1 部ずつ、できるだけ早く(患者さんからのアンケート〆切期日は平成 22 年 6 月末です)お渡し頂き、本調査にご協力頂けるようご説明をお願い申し上げます。

**QOL 調査セットの内容**

患者さんへの依頼文：1 枚 (グリーン色紙)、調査票：1 部  
返信用封筒：1 枚 (返信用封筒は料金後納ですので切手不要です)

**II. 担当医の皆様へのアンケート調査のお願い**

医療関係者と患者が考える QOL 阻害要因は、一致しないことがあります。そこで今回、日頃血友病などの血液凝固異常症治療に携わっている医療関係者にも血液凝固異常症患者の QOL を阻害する要因に関するアンケート調査を実施することに致しました。別紙の医療関係者へのアンケート調査にご回答頂き、同封の返信用封筒(料金後納)でお送り頂きますようお願い申し上げます。

**III. 〆切期日**

患者さんへの QOL 調査票および医療関係者へのアンケート調査ともに〆切期日は平成 22 年 6 末日とさせていただきます。

敬具

「血液凝固異常症の QOL に関する研究」運営委員長

瀧 正志 (聖マリアンナ医大横浜市西部病院小児科)

運営委員 (五十音順)

大平勝美 (はばたき福祉事業団)、小島賢一 (荻窪病院血液科臨床心理)、白幡 聡 (北九州総合病院)、鈴木章子 (静岡県へモフィリア友の会)、竹谷英之 (東大医科研附属病院関節外科)、立浪忍 (聖マリアンナ医大医学統計)、仁科 豊 (仁科・深道法律事務所)、花井十伍 (ネットワーク医療と人権)、堀越泰雄 (静岡県立こども病院血液腫瘍科)、牧野健一郎 (産業医科大学リハビリテーション医学)、松本剛史 (三重大学附属病院輸血部)、吉川喜美枝 (聖マリアンナ医大病院看護部)、和田育子 (荻窪病院看護部)

なお、ご不明な点等ございましたら下記の連絡先まで FAX でご連絡下さい。

連絡先： 瀧 正志 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 小児科

〒241-0081 横浜市旭区矢指町 1197-1 Fax 045-366-1190

## 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、支援の具体化を検討する。二年目となる本年度については、昨年度調査結果に基づき、以下の課題について、支援課題を集約し、明確化する。1) 血友病の遺伝にまつわる家族関係および医療や教育などの社会環境、2) 血友病の遺伝にまつわる医療・相談体制の問題、3) 今後の血友病患者・家族の自立・社会参加支援にむけての情報共有のありかた、4) 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具体的な支援可能性。【方法】半構造化インタビュー調査 (a,c) およびフォーカスグループインタビュー調査(b)、質問紙調査を行った(d)。a)血友病・遺伝に関連した医療従事者 (n=4) に対して、血友病の遺伝に係わる医療の現状と相談体制に関する実態および課題、b)血友病患者の父親 (n=7) を対象に家庭内役割および子育てのかかわりの状況、c)血友病患者のきょうだい (n=2) に対して成育歴および家族関係、d) 養護教諭 (n=37) 血友病患者の学校の受け入れと関連して、現状及び課題。合わせて、e)先行文献の精査、患者会、血友病関連の国際学会等を通じての生活実態動向・家族研究の動向について情報収集した。【結果・考察】主要な結果として、支援課題として以下の3点を得た。1) 血友病が遺伝疾患であることを主因とした、遺伝相談、周囲への開示、医療・教育へのアクセスなどの支援困難事例・環境が存在すること。2) 周囲からの有用な情報や支援を受けにくいことが、患者およびきょうだいへの子育て、家族関係、結婚・出産などに広く影響すること。3) 血友病の高齢化、家族の健康問題、高齢化にむけた医療的対処など、家族に生活上の過度の負担、医療依存、家庭内役割の不明確化が生じやすいため、協働による支援および有効性の評価が必要であること。【結論】薬害 HIV 感染被害者・家族の現状から、今後の支援の優先課題として、遺伝相談体制の確立、情報共有のあり方について、具体的な支援方策についての重要な知見を得た。次年度以降、支援創出・支援実施を通じて、課題克服を目指す。

## 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、患者・家族の自立を妨げる、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、血友病患者の自立や、血友病母子関係における子育てへの影響の問題、将来計画など、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、これまでの被害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、被害により影響を受けた現状の生活を今後向上させる。また、新たな課題克服のための支援創出につなげる。初年度調査では、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を対象に相談機会・教育機会の創出、情報提供など、相談を契機とした支援の実施をめざして、聞き取り調査を行った。また、薬害 HIV 感染被害者・家族等の血友病に於ける医療環境・生涯生活の具体的課題を明らかにした。

二年目となる本年度については、初年度調査結果に基づき、具体的課題克服の検討を行った。

- 1) 薬害 HIV 感染被害が家族への健康・子育てにも影響したこと、
- 2) 薬害 HIV 事件による社会的インパクトは、非感染血友病患者・家族の生活環境にまで及んだこと
- 3) 血友病患者の高齢化等の新たな課題があること

これらの、特徴的な調査結果・示唆を踏まえつつ、複数の重要課題克服に焦点を当てた。いずれの重要課題も遺伝の問題は患者・家族への負担として現在でも重くのしかかっていることに留意する必要がある。

また、これらの課題克服のためには、HIV 非感染血友病患者・家族を含めて、家族支

援・遺伝の問題は避けて通れない事を示唆しているため、以下の優先的な課題を設定した。

- 1) 血友病の遺伝にまつわる家族関係および医療や教育などの社会環境
- 2) 血友病の遺伝にまつわる医療・相談体制の問題、
- 3) 今後の血友病患者・家族の自立・社会参加支援にむけての情報共有のありかた、
- 4) 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和具体的な支援可能性について検討した。

## B 研究方法

(1) 調査対象者および主要な聞き取り内容：

半構造化面接に基づく面接調査を平成 22 年度 5 月～11 月にかけて行った。

対象および主要な聞き取り内容は、以下である。

- a) 血友病・遺伝に関連した医療従事者に対して、血友病の遺伝に係わる医療と相談体制の現状
- b) 血友病患者の父親を対象に子育てのかかわりの実態
- c) 血友病患者のきょうだいに対して家族関係と病気のうけとめ
- d) 血友病患者の学校の受け入れの現状及び課題

また、

e) 先行文献の精査、患者会、血友病関連の国際学会等を通じての情報収集・情報提供・共有のあり方について検討した。

(2) 各インタビューの目的と方法

a) 血友病専門の医療者へのインタビュー

【目的】血友病への医療や支援について、また遺伝の問題を医療者の視点から捉え、

現状を把握し、今後血友病患者家族に対して必要な支援を構築することを目的として、国内で血友病医療に携わる主たる医療者へインタビュー調査を行う。

【対象】国内において血友病治療に携わっている血友病専門医 4名（全て男性）

・首都圏：

①A 病院医師（病院登録患者数約 650 名）

②B 病院医師（病院登録患者数約 400 名）

・関西地方

③C 病院医師（病院登録患者数約 1000 名）

④D 病院医師（病院登録患者数約 200 名）

### 3) 方法

場所：事前にアポイントをとり、直接各医療機関にてインタビューを行った。

内容：血友病医療に携わった時期、きっかけ、血友病医療の変遷、受診患者の状況とその対応、現在の血友病医療の問題、今後の課題などを中心に自由に聞き取った。

所要時間：約 1 時間半～2 時間

### b) 血友病患者の父親へのインタビュー

【目的】家庭内役割および子育てのかかわりの状況に関する課題を明らかにする

【方法】フォーカスグループインタビュー

【対象】首都圏在住の血友病患者の父親 7 人を対象

### c) 血友病患者のきょうだいへのインタビュー

【目的】血友病患者のきょうだいに特有の課題を明らかにすること

【方法】面接法による調査

【対象】

成人きょうだい 1 名（20 歳代後半女性）

成人患者 2 名（60 歳代男性）

学童後期のきょうだいを対象にしたグループワークが、きょうだいの課題への対処に有効であることは知られているが、患者会には学童後期以降のきょうだいは参加しな

かったため、患者会でのグループワーク試行は実現できなかった。

### e) 養護教諭へのインタビュー

【目的】普通学級における病気をもつ子どもの受け入れの現状と課題について明らかにする。

【方法】養護教諭 37 名にその現状と課題について A4 用紙 2～3 枚に自由に記入してもらい、その内容を質的に分析する。

### f) 先行文献の精査、患者会、血友病関連の国際学会等を通じての生活実態動向・家族研究の動向について情報収集および情報提供・情報共有のあり方

【目的】

生活実態動向・家族研究の動向について情報収集を行った。

【方法と内容】

- ・ WFH（世界血友病連盟）総会（場所：アルゼンチン）への参加
- ・ 患者会に対する初年度調査に基づく情報提供及び情報収集
- ・ 初年度調査および追加の血友病患者・家族研究に関する論文の精査

### (3) インタビュー記録：

インタビューの質問は、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レポートにまとめた。

### (4) 分析について

それぞれのインタビュー実施と並行して、計3回にわたりインタビュー結果のための会議を持ち、インタビュー内容の精査の後、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、論点、及び今後の支援策を整理し今後の展開案をまとめた。

#### (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

主要な結果として、以下が得られた。

##### 1) 血友病支援について

- ・ 遺伝カウンセリングを実施している機関：1機関(遺伝相談部門設置)
- ・ 患者の遺伝子診断を実施している機関：2機関
- ・ 保因者の遺伝子診断を実施している機関：2機関
- ・ 他職種との連携：1機関(臨床心理士)

##### 1-2) 課題

- ・ 親子世代の血友病に対する意識の違い
- ・ 保因者であることの不確かさ
- ・ 保因者であることのリスク
- ・ 血友病患者の高齢化の問題
- ・ 血友病患者の就労の問題
- ・ 血友病専門医療者の育成

##### 1-3) 遺伝に関する情報不足像、及び患者家族の混乱を象徴するエピソード

ある医師が、血友病患者に対して「あなたの子どもの病気が出ることはない」という説明だけがなされており、それでも心配を払拭切れない患者が、結婚を控えた娘を連れて「念のため何か検査はできないものか」と受診した際に、検査するまでもなく娘は保因者であることを告げたところ、家族共々大きな心理的混乱に陥った。

##### 2) 父親の子育て役割と母親への負担軽減の意識の違い

###### 2-1) グループインタビューでは以下が語られ、参加者のコンセンサスを得た。

- ・ 各家族で事情が異なる。意識にはばらつきがある。
- ・ 支援の必要な父親が、支援を受けていない可能性。

###### 2-2) 血友病患者の父親ロールモデルの模索・構築に関する課題

- ・ 積極的に係わる経験、(对学校、对病院)説明のマニュアルを独自に作成していた。
  - ・ 一方でそれらに対するサポートを得ていなかった。
  - ・ 情報や相談場所の要望。ネットワーク作り。についてのニーズが得られた。
- これら課題を中心に、父親支援策を検討した。

##### 3) 血友病患者のきょうだいの抱える課題 以下の課題が得られた。

・きょうだいは直接に情報に接する機会が少ない

・遺伝、治療に関する情報に直接関わらない場合がある。

・きょうだいは、発達段階に寂しい思いをする。

・母親の関心・時間は患児に偏る

・きょうだいは発達段階で寂しい思いをする

・成人しても、その記憶が続く

・きょうだいの視点での課題には気づき難い

・患者も母親も、すでに課題をもっている。これらを含め、きょうだい支援の課題として支援策を検討した。

#### 4) 養護教諭の視点による血友病患者の学校への受け入れの課題

##### 4-1) 課題

・施設改修等の予算がない

・教師の病気に対する一般的な知識がない

・医療機関との連携がほとんどない

・保護者-教員関係の問題

・子ども自身の意見が反映されていない等

これらを含め、学校受け入れ支援の課題として支援策を検討した。

#### 5) 先行文献の精査、患者会、血友病関連の国際学会等を通じての生活実態動向・家族研究の動向について情報収集・情報発信・情報共有に関する知見

血友病の高齢化についての課題の認識と取り組みが国際的には始まっているが、国内患者会での取り組みは止血管理を中心としたものであり、患者・家族は漠然とした不安を抱えてはいるが、一般的な福祉・介護の対応の範囲で対応策を認識していることが語られた。

以上を踏まえ、これらを情報提供・情報共有の課題として支援策を検討した。

#### D. 考察

一連の結果から、課題を以下の3点に集約した。

1) 血友病が遺伝疾患であることを主因とした、遺伝相談、周囲への開示、医療・教育へのアクセスなどの支援困難事例・環境が存在すること。薬害 HIV 感染者被害者は直接的な被害、血友病患者は風評被害を経験しているが、共通している点は血友病の遺伝の問題を抱えている点であった。

2) 周囲からの有用な情報や支援を受けにくいことが、患者およびきょうだいへの子育て、家族関係、結婚・出産などに広く影響すること。

3) 血友病患者の高齢化、家族の健康問題、高齢化にむけた医療的対処など、家族に生活上の過度の負担、医療依存、家庭内役割の不明確化が生じやすいため、協働による支援および有効性の評価が必要であることが示唆された。

課題克服のために、

1) 医療・教育・福祉・連携の体制強化、

2) これらの家族課題の克服のために、家族と、家族も考える血友病の問題としてとらえ、ファクトシートやホームページ等を通じた情報提供・情報共有などを契機とした支援の必要性が示唆された。

また、

3) これらの支援は、当事者・家族、各分野の専門家、行政、及び支援者等の協働によるものが有効であることが示唆された。

#### E. 結論

薬害 HIV 感染被害者・家族の現状から、今後の支援の優先課題として、遺伝相談体制の確立、情報提供・情報共有のあり方について、具体的な支援方策についての重要な知見を得た。次年度以降、支援創出・支援実施の評価を通じて、課題克服を目指す。



## G. 研究発表

○柿沼章子他、薬害H I V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

○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

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

### 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

研究分担者 大橋 一夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 准教授

研究協力者 辰巳 公平 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 助教

渡辺 夏巳 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 博士研究員

研究要旨：遺伝子修飾細胞を用いた治療は、遺伝子治療分野ならびに再生医療分野において、新しい開発領域としてその発展が注目されている。本研究においては、脂肪由来幹細胞(ADSC)を用いて血液凝固第 IX 因子を産生する機能的組織を作製することによる新しい血友病 B に対する治療を確立することを最終目的として、基礎的検討を行った。マウス脂肪組織から骨分化能ならびに脂肪分化能を有する ADSC を安定して取得し、5 継代前後まで増殖させる条件を設定した。また、これら培養下 ADSC に対し、サル免疫不全ウイルス由来レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験を行ったところ、MOI=20 で 98%以上の遺伝子導入効率が得られることを明らかとした。さらに、温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide)を固定化した温度応答性培養皿を用いて ADSC シートの作製を試みた。ADSC を播種後 3 日目前後にコンフルエント状態となった段階で、培養温度を 20 度に低下させることにより、培養 ADSC を細胞シート状態で回収することに成功した。

#### A. 研究目的

血友病 B は、血液凝固第 IX 因子の産生異常に起因する先天性出血性疾患で、現行では、第 IX 因子製剤を静脈内投与する治療が行われている。血友病の病態は、1-2%の凝固活性レベルを獲得することができれば劇的な改善が得られるという特性から、欠損凝固因子を産生する細胞を細胞単位で移植する細胞移植、もしくは、その細胞を生体内で組織化させる組織工学による再生医療ベースの新規治療法の確立が期待させる。

本研究においては、血液凝固第 IX 因子を産生する組織を生体内に作製することを主軸とした血友病 B に対する新規治療法の開発を目的とする。本研究の特徴として、患者自己の細胞を用いた治療体系の確立を主眼とすることから、脂肪由来幹細胞(ADSC)を用いた研究を行う。ADSC を選択する

理由は、臨床手技を施行する際に、最も低侵襲下に組織採取が可能なこと、ならびに、すぐれた増殖・分化能を有することである。血液凝固第 IX 因子を強制発現させるために遺伝子導入の課程が必要となるが、本研究においてはサル免疫不全ウイルス由来レンチウイルス(SIV)ベクターを用いる。細胞を用いた組織化の行程においては、東京女子医大で開発した細胞シート工学技術を用いる。これら 3 つの要素技術を組み合わせることにより、より治療効果の高い細胞遺伝子治療の開発を目指すものである。

平成 22 年度においては、マウス脂肪組織からの ADSC の樹立ならびに継代法の検討、ならびに SIV ベクターを用いた ADSC への遺伝子導入の可能性探索を行った。

## B. 研究方法

野生型マウス鼠蹊部から脂肪組織を取り出し、collagenase による分散の後、培養し脂肪組織由来細胞 (mouse adipose-derived stem/stromal cells : mADSCs) を調製した。まず、得られた mADSCs のキャラクターを検証した。未分化 mADSCs の表面抗原をフローサイトメトリーにて解析し、既に報告されている ADSC マーカー発現を確認した。さらに、ADSCs の多分化能を確認するため、骨分化誘導培地または脂肪分化誘導培地で mADSCs を培養した。骨分化を誘導した細胞において、骨分化の指標である Alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定し、また、同じく骨分化の指標であるカルシウム沈着を検出するため Alizarin Red S 染色を行った。脂肪分化を誘導した細胞においては、脂肪分化の指標である脂肪滴の蓄積を Oil Red O 染色により検証した。

マウスから調整した ADSCs ならびに SIV 遺伝子導入後の mADSCs を用いて細胞シートを作製出来るか試みた。SIV- CMVp-EGFP 感染 72 時間後に mADSCs を poly(*N*-isopropylacrylamide) を固定化した温度応答性培養皿 (Type-E UpCell, 35 mm) に播種し直した。2 日-5 日間の培養後、低温処理 (20°C, 20 分間) により mADSC シート剥離を試みた。さらに、回収した mADSC シートを同系マウスの皮下へ貼布移植した。

続いて、mADSCs に対してレンチウイルスベクターによる遺伝子導入が可能か検討した。ウイルスベクターは、DNAVEC と 自治医大に作製頂いたサル免疫不全ウイルス (SIV) 由来非増殖型レンチウイルスを用いた。供与いただいた SIV-CMVp-EGFP を MOI = 1, 20, 30 で *in vitro* にて mADSCs に感染させた。ウイルス感染後、培養 3 日目または 4 日目にフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞数を測定した。

## (倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、東京女子医科大学の定める動物実験指針規定に基づき、動物倫理的側面を十分に配慮した上で行った。また、ウイルスベクターを用いる実験は、遺伝子組み換え実験安全委員会の規定に従って行った。本研究にて使用している SIV ベクター (SIVagm TYO-1 株) は、アフリカミドリザルから単離した免疫不全ウイルスを基本骨格として開発されたベクターである。SIVagm TYO-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とから、HIV ベクターに比べて安全性が高く、環境に与える影響は小さい。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。

## C. 研究結果

mADSCs の細胞表面抗原をフローサイトメトリーにて解析した結果、我々が調製した mADSCs は、CD29 陽性、CD44 陽性、CD90 陽性、CD31 陰性、CD45 陰性であることを確認した。この細胞表面プロファイルは、既報告の Mesenchymal stem cells (MSCs) のそれと同一であった。また、mADSCs を骨分化誘導培地にて培養し、Alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定と Alizarin Red S 染色を行い、骨分化の誘導を確認する事が出来た。脂肪分化についても、脂肪滴の蓄積を Oil Red O 染色により確認した。

次いで、mADSCs から構成させる細胞シートの作製法を検討した。細胞播種数と培養日数の観点から細胞シート回収の至適化を行った。4.5x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>-6x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> の播種密度にて温度応答性培養皿 (Type-E UpCell, 35 mm) で培養を行うと、2-5 日間の培養後の温度変化において、細胞シートとして回収できることを確認した。回収取得した mADSC シートを電子顕微鏡で解析したところ、2 日目回収の mADSC シ

ートでは細胞相互が接着しあう monolayer 構造であった。一方、5 日目回収の mADSC シートでは、コラーゲンを細胞間に豊富に有する 2-3 層の構造をなし、培養期間に応じた構造的特徴を認めた。また、SIV ベクターを用いて遺伝子導入した mADSCs においても同様の条件で細胞シートが作製できることを確認した。

SIV-CMVp-EGF による mADSCs への感染効率の検討を行い、MOI = 1 で 77.20%、MOI = 20 で 98.50%、MOI = 30 で 98.06% の細胞に GFP 遺伝子が導入されたことがわかった。次いで、SIV-CMVp-EGF を感染 (MOI = 20) させた mADSCs を温度応答性培養皿に播種し、培養 5 日目に細胞シートを剥離回収して同系マウス皮下に移植した結果、マウス皮下への GFP 陽性 mADSC シートの生着を認め、薄層組織の形成を確認した。

#### D. 考察

自己細胞を利用した細胞・遺伝子治療による血友病治療体系が確立することができれば、新しい血友病治療選択肢を臨床現場に提供できることから、極めて意義深い開発である。本来は凝固第 IX 因子産生能を欠く血友病患者の自己細胞に遺伝子修飾をし、それら遺伝子修飾済みの自己細胞を患者体内に戻し移植をして生着させることが実現できれば、移植細胞から常時安定した凝固因子産生が得られ、治療効果を血友病患者に提供し得る。このような臨床成果をもたらす治療法は、現状においては存在しない。さらに、本開発は、培養下での増殖力の強い自己細胞を用いることから、理論的には繰り返しの治療もなし得る。つまり、血友病患者個人の病態に応じて治療頻度を調整することによりテーラーメイド的に最適な治療効果を提供し得る可能性も秘めている。

本研究において強調されるべき点は、遺伝子修飾をした自己 ADSC を特殊培養環境下にて細胞シートという移植可能な 2 次元組織体を作製する

ことにある。東京女子医大で開発した温度応答性培養機材システムを基盤として作製される細胞シートは、角膜上皮幹細胞の重度障害の患者に対する口腔粘膜細胞シートの移植治療や、拡張型心筋症の患者に対する骨格筋細胞シートの貼布移植治療で臨床応用が開始されている技術である。このように、臨床応用が可能な技術を取り入れていることは、本研究成果を将来的に臨床応用する際には加速的要素となり、利点は大きいものと考えている。

平成 22 年度の研究成果により、マウスを用いた実験系においてマーカー遺伝子を発現する SIV ベクターを用いることにより ADSC に極めて高い効率で遺伝子導入が可能なが判明した。次年度においては、凝固第 IX 因子遺伝子を遺伝子導入することにより、ADSC からの発現および分泌がいかなるものかについて検討することにより、血友病 B の治療に最適な細胞源を探索したい。また、ADSC シートの作製条件の最適化と ADSC を生体内で生着させる研究を進めることにより、組織化の観点でより最適な組織工学的アプローチを探索することも、重要な検討項目と考えている。

#### E. 結論

平成 22 年度の本研究において、主に得た 3 つの成果を列記する。本研究によって開発される成果は、血友病治療のみならず、様々な疾患に対する遺伝子・細胞治療への応用においても重要な要素技術となり得ることから、開発の意義はさらに強調されるものと考えている。

- 1) マウスからの ADSC 分離・樹立法の確立
- 2) SIV ベクターを用いたマウス ADSC への遺伝子導入条件の設定
- 3) 温度応答性培養皿での培養によるマウス ADSC から成る細胞シートの試験作製

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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 Coagul Fibrinolysis.* in press. 2011.

### 2. 学会発表

## 海外

1. 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.
2. 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, 13<sup>th</sup> Annual Meeting. May 19-22, 2010, Washington DC, USA.
3. 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, 13<sup>th</sup> Annual Meeting. May 19-22, 2010, Washington DC, USA.

## 国内

1. 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ァイル. 第 33 回日本血栓止血学会. 2010 年 4 月 22 日-24 日. 鹿児島.
2. 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.
3. 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.

4. 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学会. 2010 年 11 月 19 日-20 日. 新潟.

#### H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

本研究はモデル動物を用いた治療実験にむけた条件検討中である。動物実験の結果が出た段階で、自治医科大学病態治療研究センター分子病態研究部 (大森司講師) と DNAVEC 株式会社 (井上誠様) と、知的財産権の出願についての随時協議を行う予定である。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohmori T, Kashiwakura T, Ishiwata A, <u>Madoiwa S</u> , <u>Mimuro J</u> , Honda S, Miyata T, <u>Sakata Y</u> .	Vinculin activates inside-out signaling of integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in Chinese hamster ovary cells.	Biochem Biophys Res Commun	400	323-328	2010
Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, <u>Madoiwa S</u> , <u>Mimuro J</u> , Furukawa Y, <u>Sakata Y</u> .	Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function.	J Biol Chem	285	31763-31773	2010
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	125	533-537	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	14	369-376	2010
Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, <u>Mizukami H</u> , Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, <u>Watanabe E</u> , <u>Ozawa K</u> , Nakano I.	A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease.	Mol Ther	18	1731-1735	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	1273-1285	2010
Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, <u>Shima M.</u>	Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity.	Thrombosis and Haemostasis	103	94-102	2010
Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, <u>Shima M.</u>	Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII.	J Thromb Haemost	8	2494-2503	2010
Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, <u>Shima M.</u>	Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII	Blood Coagul Fibrinolysis	21	568-576	2010
Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, <u>Shima M.</u>	Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a).	Thrombosis and Haemostasis	104	105-117	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



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Hasegawa M</u> , Alton EW.	Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes.	Mol Ther	18	1173-1182	2010
<u>Takedani H.</u>	Continuous infusion during total joint arthroplasty in Japanese haemophilia A patients: comparison study among two recombinants and one plasma-derived factor VIII.	Haemophilia	16	740-746	2010
<u>Takedani H</u> , Kawahara H, Kajiwara M.	Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa.	Haemophilia	16	290-295	2010
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、 <u>瀧 正志</u>	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	34-41	2010
<u>瀧 正志</u>	序文—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	475-476	2010
山崎 哲、 <u>瀧 正志</u>	インヒビター測定の問題点	血栓止血誌	21	484-488	2010
<u>Ohashi K</u> , 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
<u>Ohashi K</u> , 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

**研究成果の刊行物・別刷**



## Vinculin activates inside-out signaling of integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in Chinese hamster ovary cells

Tsukasa Ohmori<sup>a,\*</sup>, Yuji Kashiwakura<sup>a</sup>, Akira Ishiwata<sup>a</sup>, Seiji Madoiwa<sup>a</sup>, Jun Mimuro<sup>a</sup>, Shigenori Honda<sup>b</sup>, Toshiyuki Miyata<sup>b</sup>, Yoichi Sakata<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan

<sup>b</sup> National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 August 2010

Available online 20 August 2010

#### Keywords:

Integrin  
Vinculin  
Signal transduction  
RNA interference  
Platelets  
Talin  
Actin

### ABSTRACT

Although vinculin is used frequently as a marker for integrin-mediated focal adhesion complexes, how it regulates the activation of integrin is mostly unknown. In this study, we examined whether vinculin would activate integrin in Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Silencing of vinculin by lentiviral transduction with a short hairpin RNA sequence affected the binding of PAC-1 (an antibody recognizing activated human  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) to a constitutively active form of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ( $\alpha$ 6B $\beta$ 3) expressed on CHO cells, while its inhibitory effects were much weaker than those of talin-1. Overexpression of an active form of vinculin without intramolecular interactions, but not the full length one, induced PAC-1 binding to native  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expressed on CHO cells in a manner dependent on talin-1. On the other hand, silencing of talin-1, but not vinculin, failed to induce cell spreading of  $\alpha$ 6B $\beta$ 3-CHO cells on fibrinogen, even in the presence of PT 25-2, a monoclonal antibody that activates  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Thus, an active form of vinculin could induce  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 inside-out signaling through the actions of talin-1, while vinculin was dispensable for outside-in signaling.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Vinculin is a highly conserved actin-binding protein that is frequently used as a marker for integrin-mediated focal adhesion complexes [1,2]. Although vinculin itself does not directly bind to integrins, it is thought to play key roles in focal adhesion assembly and in cell adhesion by connecting talin and  $\alpha$ -actinin to the actin cytoskeleton [1,3]. Previous studies have suggested that vinculin contains a globular head domain, a flexible neck and a tail domain. The head and tail domain are connected by the flexible proline-rich neck region and interact to form a closed, autoinhibited conformation that masks the binding sites for many other cytoskeletal proteins [2,4]. Vinculin is also critical for proper embryonic development, because all homozygous vinculin<sup>-/-</sup> embryos die be-

cause of brain and heart defects [5]. Despite extensive reports on the structure of vinculin and its associations with other cytoskeletal proteins, its precise roles in directly modulating the ligand-binding capacities of integrins remain to be elucidated.

Blood platelets are terminally differentiated nucleate cells that are responsible for primary hemostasis and pathological thrombosis. Platelets express members of the integrin  $\beta$ 1 subfamily that support platelet adhesion to extracellular matrix proteins, as well as expressing members of the integrin  $\beta$ 3 subfamily [6]. Among them, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, a receptor for fibrinogen, von Willebrand factor, fibronectin and vitronectin, is an essential requirement for platelet aggregation [7]. This molecule is suitable for studies of integrin receptors because it is well characterized with respect to its ligand binding and signal transduction. In this study, we employed CHO cells expressing  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 to investigate the roles of vinculin in modulating the ligand-binding capacities of integrins. We found that the activated form of vinculin can increase the affinity of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 through the actions of talin-1.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Materials

The materials used in this study were obtained from the following suppliers: PAC-1 (a monoclonal antibody (mAb) recognizing

**Abbreviations:** CHO, Chinese hamster ovary; mAb, monoclonal antibody; APC, allophycocyanin; aa, amino acid; EGFP, enhanced green fluorescent protein; HIV, human immunodeficiency virus; sh, short hairpin; MOI, multiplicity of infection; ILK, integrin-linked kinase; PIP2, phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate.

\* Corresponding author. Address: Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3111-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Fax: +81 285 44 7817.

\*\* Corresponding author. Address: Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3111-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan. Fax: +81 285 44 7817.

E-mail addresses: [tohiori@jichi.ac.jp](mailto:tohiori@jichi.ac.jp) (T. Ohmori), [yoisaka@jichi.ac.jp](mailto:yoisaka@jichi.ac.jp) (Y. Sakata).

activated human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) and anti-paxillin mAb (clone 349; BD Biosciences Co., San Jose, CA); horseradish peroxidase-conjugated anti-green fluorescent protein (GFP) polyclonal antibody (Acris Antibodies GmbH, Himmelreich, Germany); allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse IgM (eBioscience Inc., San Diego, CA); anti-talin mAb (clone 8D4; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO); anti-vinculin mAb (clone V284; Chemicon International Inc., Billerica, MA); anti-human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mAb (clone 5B12; DakoCytomation, Glostrup, Denmark); PT 25-2 (a mAb that activates human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3; Takara Bio Inc., Otsu, Japan) [8].

## 2.2. cDNA cloning, construction of lentiviral vectors and virus production

cDNAs for mouse vinculin and talin-1 were cloned as described [9]. Truncated cDNA fragments of vinculin (amino acids (aa) 1–258, 1–880 and 881–1066) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). A constitutively active form of vinculin (T 12) [3] was created using a Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene Corp., La Jolla, CA). The primer pairs used in this study are shown in Supplementary Table 1. Enhanced green fluorescent protein (EGFP)-fusion proteins were created by insertion of various cDNAs into the sequence of pEGFP-C plasmid (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA).

A gene transfer vector, pLL3.7, for constructing replication-defective self-inactivating human immunodeficiency virus (HIV) lentiviral vectors expressing short hairpin (sh) RNA sequences

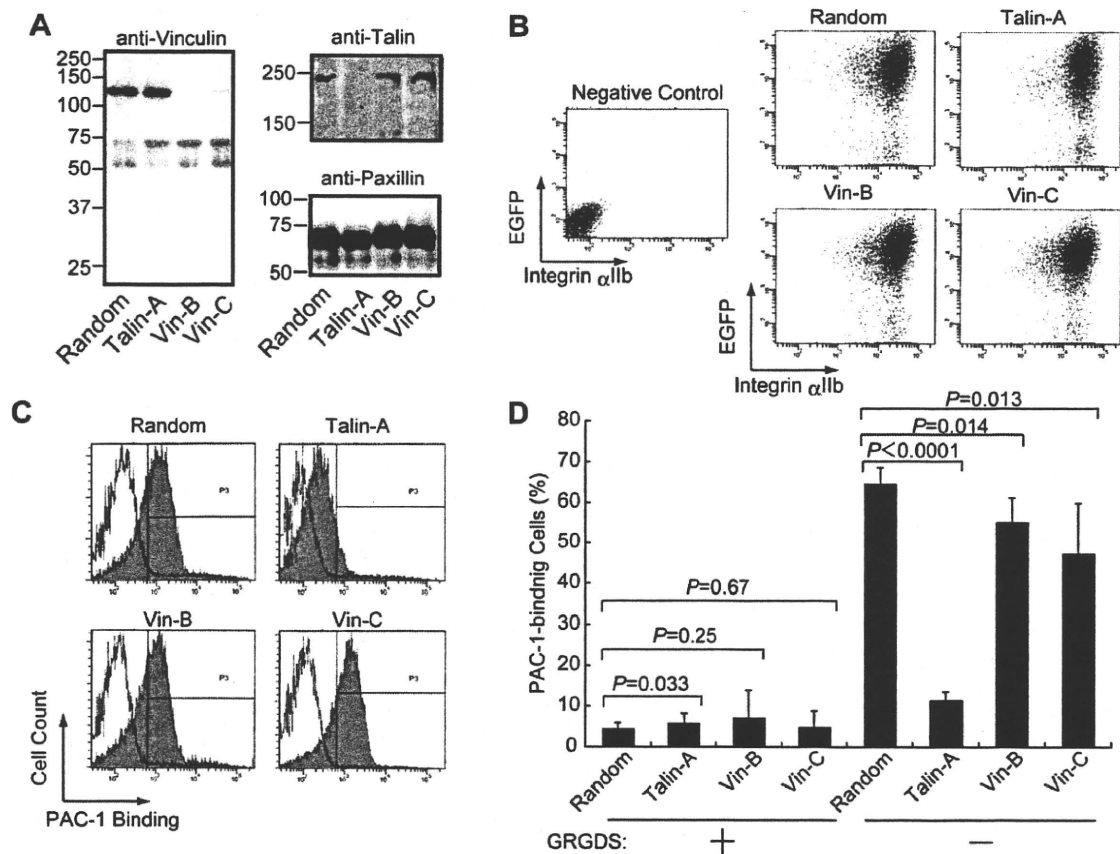
(LentiLox vectors) was purchased from ATCC (Manassas, VA). We selected two shRNA sequences for mouse vinculin, designated Vin-B and Vin-C and cloned them into the pLL3.7 lentiviral vector plasmid (LentiLox) [10]. The shRNA sequences for control (Random) or talin-1 (Talin-A) were as reported [9]. To create HIV lentiviral vectors for protein expression, the pLL3.7 lentiviral vector was digested with XbaI and EcoRI to delete the sequence from the U6 promoter to EGFP and each EGFP-fusion protein sequence driven by the CMV promoter derived from the pEGFP-C plasmid was then inserted. The lentiviral vectors were essentially generated as described [9–11].

## 2.3. Immunoblotting

Immunoblotting with specific antibodies was performed as described previously [9,10].

## 2.4. PAC-1 binding to $\alpha$ IIb $\beta$ 3-CHO cells

A chimera of the  $\alpha$ IIb extracellular and transmembrane domains joined to the  $\alpha$ 6B cytoplasmic domain was cotransfected with integrin  $\beta$ 3 into CHO-K1 cells [12]. The chimeric integrin ( $\alpha$ 6B $\beta$ 3) is a constitutively active form that spontaneously binds to PAC-1 [13]. We also cloned CHO cells expressing the native form of human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. The oligonucleotide primer pairs used for cDNA cloning are shown in Supplementary Table 1. CHO cells ( $2-4 \times 10^4$ ) expressing  $\alpha$ 6B $\beta$ 3 ( $\alpha$ 6B $\beta$ 3-CHO cells) or native human



**Fig. 1.** Loss of vinculin marginally affects the integrin activation status in  $\alpha$ 6B $\beta$ 3-CHO cells. Cells were transduced with the indicated LentiLox vectors at a multiplicity of infection (MOI) of 3. (A) Lysates obtained from the transduced cells were immunoblotted with anti-vinculin, anti-talin and anti-paxillin monoclonal antibodies (mAbs). (B) Enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression (vertical) and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression (horizontal) were examined by flow cytometry after transduction. (C) The affinity state of integrin  $\alpha$ 6B $\beta$ 3 was assessed by PAC-1 binding in the absence (solid gray) or presence (black line) of 1 mM GRGDS. (D) Columns and error bars represent the mean  $\pm$  SD of PAC-1 binding ( $n = 7$ ). Differences between the two groups were analyzed statistically using Student's *t* test.