

201124001A

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23年度 総括・分担研究報告書

平成24（2012）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	17
(自治医科大学 坂田洋一、三室 淳、窓岩清治、大森 司)	
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	23
(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	26
(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	28
(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：肝臓に対する経門脈的投与法の確立	40
(自治医科大学 菱川修司)	
6. 血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発	44
(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	46
(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	51
(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	54
(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	107
(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	112
(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	117
IV. 研究成果の刊行物・別刷	120

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

血友病は血液凝固第 VIII 因子(FVIII)、或いは題 IX 因子(FIX)の遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は、原則的には出血時因子製剤補充療法が中心で、不慮の頭蓋内出血等致死出血予防は不可能である。HIV や HCV の薬害被害の原因となった因子製剤は、遺伝子組み換え製剤の参入とその改良を経て、利便性は高まった。しかし、抗血友病因子中和同種抗体(インヒビター)出現は尚重要な問題である。HIV 感染被害後、血友病患者に対する社会的偏見は著しく顕著になった。これらの課題を克服するために、本年度も、I 血友病遺伝子治療、II.血友病インヒビター対策、そして 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 遺伝子治療研究：血友病マウスで得られた遺伝子治療研究成果をそのままヒトに応用したこれまでの臨床研究は全て失敗した。我々は非ヒト霊長類で十分な検討を進めてからヒト研究へと歩を進める戦略で研究を展開している。サルでは血友病は存在せず、サルとヒトの血友病因子は 97% 以上の相同性があるため発現因子をサルの因子と識別して測定することは極めて困難である。幸い我々は世界唯一のヒトとサルの FIX を識別可能なモノクロナル抗体を作製し得たので、血友病 B 遺伝子治療の技術確立を先行して進めた。臨床研究に用いるベクターはこれまでの検討から、まず治療レベルではヒトの染色体に殆ど組み込まれないアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを選択した。また、肝臓を標的臓器に選択し、これに特異性の高い AAV8 ベクターを選んで *FIX* 遺伝子と肝臓特異的プロモータを搭載したベクターを設計し、検討を進めてきた。ヒトやサルは AAV ベクターの由来である AAV に感染しても発症しないが抗体はできる。AAV8 ベクターによるサル血友病遺伝子治療の可否はこの抗体の有無によることが、これまでの数多くの実験より明らかになった。高感度測定系でヒトとサル血液中の抗 AAV8 中和抗体を測定したところ、約 50% の例で陽性であった。開腹して直接門脈穿刺して効果が得られる技術を確認後、下腹の末梢血管よりバルーンカテーテルを誘導し、抗体を含む血液を回避する形でベクターを投与することにより、抗体陽性例でも治療レベル因子の発現を得ることが可能となった。この方法は AAV8 ベクターによる遺伝子治療効果が、数年後に細胞分裂により希釈され減弱した時にも、再治療可能性を担保する。ヒト臨床研究を視野に、中国 VGT 社に委託し、当地に赴いて当研究班の指導・助言の下に極めて精製度の高い GMP レベル AAV8 *FIX* ベクター作製に成功した。これを血友病マウスとサルで発現させたところ、non-GMP レベルベクターと遜色ない FIX の発現とその維持が確認された。品質検査の契約も終了し、現在進行中である。自治医科大学で臨床研究に向けたプロトコールを作成し、厚労省認可を受けて、臨床研究へと歩を進める予定である。改変サル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターもダイナベック社にて、技術的に GMP レベル製造が可能になった。間葉系幹細胞単独、及び血友病マウスへのヒト FVIII 全身投与などを対照にして、SIV ベクターを利用して *FVIII* 遺伝子を導入した間葉系幹細胞を関節内注入し、血友病関節症の予防効果を解析し、著明な効果が確認された。

II インヒビター対策：後方視的調査解析により血漿由来製剤と組み換え製剤にインヒビター発症頻度に差がないことや家族内集積発症傾向が明らかになった。前方視的解析によりこれまでの解析結

果を確認しつつ、全ての血友病調査解析基盤となる血友病患者データベース化を進めている。血友病遺伝子と炎症性サイトカイン遺伝子などのインヒビター発症要因になる可能性の高い遺伝子解析も複数の施設で解析を進めている。臨床的に用いられている免疫寛容誘導法をより効率よく施行するための基礎研究として、血友病マウスにポンプを用いて FVIII 製剤を投与し、持続投与と間歇投与の免疫応答差などの解析を進めている。またプラスミノゲンアクチベーターインヒビタ欠損による寛容誘導効果が血友病寛容誘導でも同様であるかを観察するために血友病 A とのダブルノックアウトマウスを作製し検討し、陽性結果を得た。そのメカニズムの解析を進めている。同種抗体レベル測定に用いられる Bethesda 法の検体希釈における問題点を東京変法で克服できることを明らかにした。標準化へ向けての一步と考えられる。

III.QOL 向上のための調査研究：患者や医療従事者が作成に関与したアンケート調査からは、本年度は回収率は低いものの、中等症に分類される患者でも重症患者と同じくらいの頻度で出血エピソードが見られるという示唆が得られた。殆どが分子異常症である中等度患者評価に便宜的に凝固アッセイが用いられているが、生体内止血機能を反映していない可能性は高い。遺伝子レベルでの再評価が必要と思われた。HIV 感染被害患者、及び家族の聞き取り調査を本年度は、医療従事者及び教育関係者まで輪を広げて展開した。感染被害後、血友病患者への偏見が高まったことや、遺伝知識が少ないことが明らかになった。HIV や遺伝の正確な知識のみならず、世界の情報を共有できる様に、ホームページの起ち上げなど、様々な対策活動を展開した。

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

自治医科大学先端医療技術開発セ

ンター 准教授 菱川 修司

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

は第 IX(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時に各因子製剤の補充療法が主であるが、不慮の致死的出血予防は困難である。HIV や HCV 感染の原因となった因子製剤は利便性も含めて改善されたが、同種抗体（インヒビター）出現は尚重要な問題である。感染被害後血友病患者に対する社会的偏見が顕著になった。これらを克服し、患者 QOL 改善のために以下の 3 本柱を立てて研究を進める。

I. 遺伝子治療: 染色体へ殆ど組み込まれない 8 型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた血友病遺伝子治療臨床応用を目指した研究を進める。昨年度、中国 Vector Gene Technology (VGT) 社に技術的助言・指導を行いながら、GMP レベルベクター AAV8VFIX を作製した。その品質検討と、マウス・サルを用いて、ベクターの体内発現活性と安全性を検討する。抗 AAV 中和抗体測定法改善と、陽性個体への遺伝子導入技術改善を進める。染色体組み込み型改変 SIV ベクターを用いて血友病遺伝子を導入

A. 研究目的

血友病は血液凝固因子第 VIII(FVIII)、或い

した自己間葉系幹細胞(MSC)移植による遺伝子治療についても検討する。II.インヒビター対策:後方視的調査解析の総括と、前方視的調査によるインヒビター発生要因解析と患者データベース構築をリンクさせて進める。また、標準化を目指して、血友病因子活性やインヒビター活性測定法の改善を検討する。さらに、精製 FVIII, 及び血友病マウスや患者血液を用いて、同種抗体の抗原となる FVIII 分子そのものの基礎的検討をすすめる。III.社会的 QOL 改善:患者中心二次アンケートの解析を進める。また、聞き取り調査による薬害 HIV 感染血友病患者・家族の解析をさらに医療関係者、教育関係者を含めたグループに拡大して検討を進めるとともに、問題解決に向けた具体的解決案を策定する。

B.研究方法

I.遺伝子治療:サルには血友病は確認されていない。ヒトとサルの血友病因子相同性は97%以上と高い。AAV ベクターは種差により効率に差がみられる。ヒト応用には、少なくとも、非ヒト霊長類で発現持続と安全性の確認が必要である。サルでの実験では、発現血友病因子とサル産生因子を識別定量することが不可欠である。サルとヒトの FIX を識別可能な世界唯一のモノクロナル抗体を作製しえた。そこで、血友病 B 遺伝子治療技術確立を先行して進めてきた。GMP レベル AAV8VFIX の品質検討と活性確認、そして、抗 AAV8 中和抗体をもつ個体へのバルーンカテーテルを用いた遺伝子導入技術の改善を試みた。また、遺伝子治療臨床研究に向けたプロトコール作成準備を進めた。染色体組み込み型改変 SIV ベクターは GMP レベル対応製造技術の確立を目指した。このベクターで骨髄由来自己 MSC へ FVIII 遺伝子を導入し、この MSC

の血友病 A マウス膝関節内注入による関節出血予防と、ナノシートを作製して臓器貼り付け遺伝子治療可能性について検討した。II.後方視的調査解析では、血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤の、インヒビター発生率差を中心に検討した。また、インヒビター発生要因解析として、血友病因子とサイトカインの遺伝子解析を施行した。さらにインヒビター検出・診断の標準化のために、検体希釈方法を中心に検査法の改善を検討した。精製 FVIII を用いて、その活性化の新規機序などを分子生物学的に解析した。血友病マウスを用いて、プラスミノゲンアクチベータインヒビター 1 (PAI-1) のインヒビター寛容誘導への関与を検討した。さらに血友病 A マウスへ間歇的に静注でヒト FVIII を投与し、ITI(免疫寛容誘導)を誘導する方法と、持続的投与方法で導く場合の、効率の差と免疫担当細胞の反応の差を検討するために、長期にわたり感染しないでポンプでヒト VIII を投与する方法を確立した。III.患者中心アンケート二次解析は、患者の訴えを中心に、出血等のエピソードや社会的問題等を解析した。さらに、試験管内凝固活性で分類してきた血友病患者重症度の見直しを大目標として、FVIII の生体内凝固線溶反応の基礎的解析を開始した。血友病薬害 HIV 感染被害者家族と、非感染血友病患者家族から、血友病関連医療従事者、教育関係者へと面接調査を拡大し、当事者参加型アクションリサーチを進めた。これらの成果や海外支援活動の情報収集等を元に、血友病情報提供ホームページ開設などを計画した。

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:VGT 社に委託作製した GMP レベルベクターは SDS-PAGE や電子顕微鏡的解析などでは、極めて純度が高いこと

が確認された。品質の第三者機関による検討は無事契約が整い、現在進行中である。GMP レベルベクターは、マウスでは non-GMP レベルベクターと同等の発現活性を示した。サルでの発現確認は、震災と原子力発電所事故により、霊長類科学研究中心におけるサル実験が節電のため実施できず、開始は 12 月にずれ込んだ。6 週間までの結果ではあるが、5-10%の治療レベルヒト FIX の発現が維持されており、これまでの non-GMP レベル AAV8FIX ベクターとほぼ同等であることが確認されている。また、抗 AAV 中和抗体測定系は最適化され、感度がさらに高まった。サルコロニー 190 頭を対象にした検討では、陽性個体が過半数を占めた。健常人と血友病患者でも陽性率はほぼサルと同様で 50%近傍であった。陽性サルに我々の確立した技術で non-GMP レベルベクターを投与したサルでも、治療レベル FIX の長期発現持続が確認された。循環負荷軽減のための血液洗浄液量検討や、ベクターと細胞の接触時間延長による導入効率 up と虚血時間が肝臓に与える影響のバランスなどを検討中である。臨床研究プロトコール作成は、パーキンソン病遺伝子治療臨床研究や、海外での血友病 B 遺伝子治療臨床研究などを参考に準備を進めている。SIV ベクターについては産生・精製工程の最適化と品質検査項目を検証し、GMP レベル製造が可能であることを確認した。血友病 A マウス関節内に投与した FVIII 遺伝子を導入した自己 MSC は関節内に長期にとどまり、針穿刺による急性期出血抑制のみならず、内膜障害や血管新生などを伴う血友病性関節症発症も抑制した。MSC は組織学的検討で軟骨細胞に分化していることが示唆された。II.インヒビター対策:155 例の日本人血友病患者解析では血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤との

間にインヒビター発生率に差は無かった。遺伝子解析は倫理指針に則り進行中である。従来のインヒビター測定法である

Bethesda 法の血漿希釈時の血清干渉の問題は東京変法でかなり改善されることが示された。血友病 A マウスと PAI-1 ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスでは FVIII 抗原投与に対して容易に免疫寛容が誘導され、機序として制御性 T 細胞誘導等が確認された。FVIII 分子の高濃度 FVIIa による活性化機序の解明など分子生物学的検討も進んだ。III.QOL 向上のための調査研究では、患者判断による出血回数が中等症でも重症に匹敵するくらいの頻度であった。また、薬害 HIV 感染被害者母親には、遺伝問題、感染告知遅れによる子供への心理的負担など数多くの対策課題が明らかになった。遺伝に関する情報不足や、養護教諭のストレスなども明らかになり、支援策として血友病情報提供ホームページの立ち上げやファクトシートを作成した。

D.考察

I.遺伝子治療：我々は、非ヒト霊長類で十分な基礎検討を進めて、ヒト臨床研究へ歩を進めるというストラテジーで、安全性重視で血友病遺伝子治療研究を進めてきている。世界最高感度の抗 AAV8 抗体測定系を確立した。陽性サルにベクターを投与する技術もほぼ確立し、我々がサル遺伝子治療では世界最先端にあると考えている。我々の一本鎖 AAV8 ベクターの効果発現最低量は 2×10^{12} vg/kg 程度であった。2011 年 12 月に英国グループから報告された二本鎖 AAV8 ベクターによる抗 AAV8 抗体陰性血友病 B 患者を対象にした遺伝子治療臨床研究において効果の見られた用量と同等の投与量であり、ヒトとサルで効果発現量にあまり差の無いことが示唆された。中和抗体陽性例

ではうまくいっていない。我々は、抗体陽性例にも治療量発現可能な基本技術をサルで確立している。陽性サルにベクター投与可能であることは、AAV ベクターが殆ど染色体に組み込まれないために 5 年、10 年後に効果が減弱したときに、微量の抗 AAV 抗体が存在しても同じベクターで再度遺伝子治療可能であることも意味し、その技術確立は極めて重要であると考えている。ヒト利用可能な GMP レベルベクターも研究班の指導により作製技術を確立し、委託作製し得たが、ヒトとサルの体重差を考えると臨床研究開始にはさらなるベクター量が必要であることが確認された。助言・指導などの形で関与することで、ベクターに対する多くのノウハウも獲得でき、VGT 社との信頼関係も確立できた。本年度は災害のためサル実験が遅れたが、次年度には品質検査も含めた全てのデータがそろそろ。ヒト臨床研究開始に向けた基礎的準備はほぼ整ったと考える。臨床研究に向けて、プロトコル作成と学内倫理委員会承認、そして厚労省承認に必要な事務的手続きを効率よく進める必要がある。成人では血友病性関節症の効果的な治療法は無い。MSC の抗炎症作用を期待して、変形性膝関節症に対する臨床試験はすでに行われている。血友病遺伝子を導入した MSC の関節腔内投与は、MSC 単独よりも遙かに優れた関節症予防効果が得られ、MSC の軟骨・骨細胞への分化も考慮すると、血友病関節症に対する優れた治療法と考えられる。II.同種抗体対策：前方視的遺伝子解析などによる要因解析は、インヒビター発症予防につながる可能性がある。また患者データベース構築は日本における血友病のすべての調査解析の基盤になる。インヒビター寛容誘導の基礎的検討も、マウスレベルでは、世界に注目される業績を発表しつつある。複数視点から

その本体への切り込みが行われており、免疫寛容誘導の効果的技術が確立出来れば、インヒビター治療にブレークスルーが期待できる。III.調査研究から、重症度分類が、臨床的には問題のあることが示唆された。患者判断であり、回収アンケート数、重症度に応じた活動レベルの違いなど考慮しなければならぬ点も多いが、単純な試験管内凝固検査による便宜的分類に問題のある可能性は高い。軽症でも出血頻度の高い血友病患者の存在することから、以前より当班でも血友病患者遺伝子解析を進めてきた。結果はミスセンス変異、逆位、欠失、挿入など多彩である。FVIII は酵素活性を持たない。巨大分子でその機能部位で多くの因子と特異的結合し、複数分子の立体的配置調節により凝固反応を調節している。分子異常により、構造変化が惹起され、わずかに漏れ出てきた異常因子の、ある条件下の凝固活性値で便宜的に分類することを見直す時期にきていると考える。面接による調査研究で、薬害 HIV 感染被害血友病患者家族の持つ多くの問題が明らかにされた。HIV 感染被害血友病家族や、医療従事者、学校関係者などの面接による問題提起とその解析は、母親と父親の遺伝問題など問題を明らかにし、血友病患者全体の抱える遺伝問題相談を含めた、ホームページの立ち上げやファクトシート作成など、情報共有による効果的解決に向けた具体的対策が稼働し始めている。

E.結論

我々の AAV8 ベクターを用いた非ヒト霊長類での血友病 B 遺伝子治療技術は世界最先端にある。GMP レベルベクターも作製技術を確立し、ヒト臨床研究へ歩を進めるレベルに達した。インヒビター対策も調査解析、基礎検討ともに極めて順調に研究が進みつ

つある。QOL 調査解析で、血友病重症度の見直しが患者視点から指摘されたことは驚きでも有り、世界への発信につながることを期待したい。患者・家族などとの直接面談による問題把握とその解析、そして対策の確立は極めて独創的で有用である。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

1. Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y.:Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 2011 Nov 23. [Epub ahead of print]
2. Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion offactor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice.Haemophilia. 2011 Nov 2. doi: [Epub ahead of print]
3. Kurosaki, H., Hiratsuka, M., Imaoka, N., Iida, Y., Uno, N., Kazuki, Y., Ishihara, C., Yakura, Y., Mimuro, J., Sakata, Y., Takeya, H., Oshimura, M.: Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. *J Hum Genet.* 56(10):727-33.2011.
4. Watanabe, H., Madoiwa, S., Sekiya, H., Nagahama, Y., Matsuura, S., Kariya, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Hoshino, Y., Hayasaka, S., Sakata, Y.: Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement. *Thromb Res.*128(6): e137-143. 2011.
5. Mimuro J, Sakata Y: Gene and cell thrapy for hemophilia:recent

- advances. *Rinsho Ketsueki*. Jun;52(6):361-7. Review. 2011.
6. Dokai, M., Madoiwa, S., Yasumoto, A., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Makino, N., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous α 1-antitrypsin in lipopolysaccharide primed hematological cells. *Thromb Res*.128.283-292. 2011.
 7. Madoiwa, S., Tanaka, H., Nagahama, Y., Dokai, M., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 127. 349-355. 2011.
 8. Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H., Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M., Ozawa, K., Kume, A.: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. *Neuroreport*, 23: 30-4, 2012.
 9. Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther*. 2011 Nov 24. doi: 10.1038/gt.2011.183. [Epub ahead of print]
 10. Kikuchi, Y., Kume, A., Urabe, M., Mizukami, H., Suzuki, T., Ozaki, K., Nagai, T., Ozawa, K.: Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells. *J Stem Cell Regener Med*, *in press*.
 11. Rahim, A., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Reduction of MBS85 gene expression after the targeted integration of a transgene into the AAVS1 site using adeno-associated virus integration machinery. *Int J Genet Gene Ther*, *in press*.
 12. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci*, 102:2272-7, 2011.
 13. Kaneda, K., Kasahara, H., Matsui, R., Katoh, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Watanabe, D., Isa, T.: Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin. *PLoS One* 6:e18452, 2011.
 14. Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., Kume, A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 13:114-22, 2011.
 15. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired hemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies *Thrombosis and Haemostasis* 2012 107(2) [Epub ahead of print]
 16. Shimizu T, Kido A, Honoki K, Murata K, Fujii H, Higuchi B, Ishihara T, Takeshita Y, Shima M, Yajima H, Akahane M, Tanaka Y. A Successful Reconstruction Using a Frozen Autograft and a Pedicled Latissimus Dorsi Flap after a S12345B Shoulder Girdle Resection in a Patient with Osteosarcoma. *J Reconstr Microsurg* 2011 [Epub ahead of print]
 17. Ljung R, Oldenburg J, Auerswald G, van den Berg M, Shima M, Dimichele D. Report of the Fifth Meeting of the International Network for Pediatric Hemophilia: a focus on prophylaxis and immune tolerance induction. *Int J Hematol* 2011 [Epub ahead of print]
 18. Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost* 2011 22;106(5) [Epub ahead of print]

19. Ogiwara K, Nogami K, Shima M. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost* 2011 106(4):665-674
20. Shibata M, Nakagawa T, Akioka S, Giddings JC, Kanehiro H, Matsumoto T, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Hemostatic Treatment Using Factor VIII Concentrates for Neutralizing High-Responding Inhibitors Prior to CVAD Insertion for Immune-Tolerance Induction Therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011 [Epub ahead of print]
21. Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya JI, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi M, Yoshioka A; STUDY GROUP ON FACTORS INVOLVED IN FORMATION OF INHIBITORS TO FACTOR VIII AND IX PREPARATIONS. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. *Haemophilia* 17(5):771-6.
22. Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. *Haemophilia*. [Epub ahead of print]
23. Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M. Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):968-80.
24. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):989-98.
25. 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 induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2011 22(4):271-9.
26. Teitel J, Berntorp E, Dolan G, Fischer K, Gringeri A, Kessler C, Lambert T, Leissing C, Nemes L, Shima M. A consensus statement on clinical trials of bypassing agent prophylaxis in inhibitor patients. *Haemophilia* 2011 17(3):516-21.
27. 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. *Thrombosis Research*. 2011 128(1):54-61.
28. Tsukamoto S, Tanaka Y, Matsuda T, Shinohara Y, Taniguchi A, Kumai T, Tomiwa K, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic ankle arthrodesis for hemophilic arthropathy: Two cases report. *The Foot* 2011 21(2):103-5.
29. Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, Taniguchi S, Shima M. Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery. *Paediatric Anaesthesia*. [Epub ahead of print]
30. Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Suzuki T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K: Factor VIII haplotypes of Japanese population show similarity to those of Caucasian populations. *Haemophilia*. 2011 Dec 19. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02715.x. [Epub ahead of print]
31. 瀧 正志：血友病、小児科診療ガイドライン第2版、総合医学社（五十嵐隆編集）、p276-279, 2011
32. 山下敦己、長江千愛、庄司朋子、武藤真二、吉川喜美枝、脇坂宗親、北川博昭、瀧 正志：乳幼児の重症型血友病患者に対する中心静脈カテーテル(CVADs)の使用経験、日小血会誌、25(3):123--129, 2011

33. 田中一郎、天野景裕、瀧 正志、岡敏明、酒井道生、嶋緑倫、白幡 聡、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、堀越泰雄、松下正、松本剛史、三室淳、吉岡章：東日本大震災で被災された血友病患者への支援、血栓止血誌、22(5):259-265, 2011
34. Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Tanaichi M, Yoshioka A, Study group on factors involved in formation of inhibitors to factor VIII and IX preparations: An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. *Haemophilia*, 17:771-776, 2011.11
35. Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*. 92: 1231-6, 2011.
36. Kim K, Ohashi K, Utoh R, Kano K, Okano T. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials*. 33: 1406-13, 2012.
37. Tatsumi K, Ohashi K, Teramura Y, Utoh R, Kanegae K, Watanabe N, Mukobata S, Nakayama M, Iwata H, Okano T. The non-invasive cell surface modification of hepatocytes with PEG-lipid derivatives. *Biomaterials*. 33: 821-8, 2012.
38. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A. Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London. *Cell Transplant*. 2011. [Epub ahead of print]
39. 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 induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 22: 271-9, 2011.
40. 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*. 128: 54-61, 2011.
41. Goto Y, Ohashi K, Utoh R, Yamamoto M, Okano T. Hepatocyte transplantation through the hepatic vein: a new route of cell transplantation to the liver. *Cell Transplant*. 20: 1259-70, 2011.
42. Kim K, Ohashi K, Okano T. Cell sheet engineering technology utilizing temperature responsive culture dish. *Polymer Science and Technology* 22: 9-13, 2011. (in Korean).
43. 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 Transplantation*, 2012, in press.
44. Ohashi K, Mukobata S, Utoh R, Yamashita S, Masuda T, Sakai H, Okano T. Production of islet cell sheet using cryopreserved islet cells. *Transplant Proc*. 43:3188-91, 2011.
45. Takagi S, Ohno M, Ohashi K, et al. Cell shape regulation based on hepatocyte sheet engineering technologies. *Cell Transplantation*, 2012, in press.
46. 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 Transplantation*, 2012, in press.
47. Tatsumi K, Ohashi K, Mukobata S, Kubo A, Koyama F, Nakajima Y, Shima M, Okano T. Hepatocyte is a sole cell type responsible for the production of coagulation factor IX in vivo. *Cell Medicine*, 2012, in press.
48. Ohashi K, Matsubara Y, Tatsumi K, Kohori A, Utoh R, Kakidachi H, Horii A, Tsutsumi M, Okano T.

Cell therapy using adipose-derived stem cells for chronic liver injury in mice. Cell Medicine, 2012, in press.

学会発表

1. Yoichi, Sakata., Hoyu, Takahashi., Hajime, Tsuji., Jun, Mimuro., Yutaka, Eguchi., Isao, Kitajima., Tadashi, Matsusits., Tatsuhiko, Kuroda.: Post marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都..
2. Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Atsushi, Yasumoto., Asuka, Sakata., Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Leukocyte elastase as an alternative pathway for fibrinolysis. 57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都..
3. Seiji,Madoiwa., Hideyuki,Tanaka., Yutaka,Nagahama., Yuji, Kashiwakura., Asuka,Sakata., Atsushi,Yasumoto., Tsukasa,Ohmori., Jun,Mimuro., Yoichi,Sakata.:Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.
4. Yuji, Kashiwakura., Tsukasa,Ohmori., Jun,Mimuro., Atsushi,Yasumoto., Akira,Ishiwata., Asuka,Sakata., Seiji,Madoiwa., Makoto,Inoue., Mamoru,Hasegawa., Natsumi,Watanabe.,Kohei,Tatsumi., Kazuo,Ohashi., Teruo,Okano., Yoichi,Sakata.:Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28. 京都.
5. Seiji Madoiwa :Alternative pathway for fibrinolysis: Clinical significance and therapeutic opportunities,leukocyte elastase. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.
6. Shima M. Basis and clinical practice for hemophilia with inhibitor. 52nd spring meeting of the Korean society of hematology Seoul,Korea 2011年5月23日
7. Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsumoto T, Shima M. Functional characterization of immobilized factor VIII in intrathrombus fibrin network formation under whole blood flow conditions with high shear rates XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
8. Chikasawa Y, Amano K, Shinozawa K, Matsumoto T, Inaba H, Shima M, Fukutake K. Diagnosis of type 2n von willebrand disease in a Japanese patient by pharmacokinetics, factor VII binding assay and gene analysis. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
9. Hori Y, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Shima M, Fujimura Y. Isoelectric focusing analysis with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of adamts13, unbound and bound to von willebrand factor,in plasma milieu XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
10. Kitsukawa K, Takedani H, Shima M, Taki M. Imaging evaluation of arthropathy at the beginning of prophylactic therapy for severe hemophilia children XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
11. Higasa S, Amano K, Hanabusa H, Muto S, Matsushita ,T Shima M,

- Fujii T, Sakai M. Fine (feiba inhibitor entry) post-authorization safety surveillance (pass) : capturing long-term experience in Japanese inhibitor subjects under routine clinical management. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
12. Sugimoto M, Hamada M, Matsui H, Doi M, Matsunami Y, Fukushima H, Nishino K, Yoshioka A, Shima M. Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
 13. Fujii N, Souri M, Shima M, Tomoyasu C, Isoda K, Ichinose A. Markedly shortened half-life of the administered factor XII concentrates during first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXII deficiency. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
 14. Fukutake K, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. The post-authorization safety surveillance program confirmed actual clinical safety and efficacy of recombinant plasma/albumin-free method factor VII in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月26日
 15. Taki M, Hanabusa H, Fukutake K, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. Clinical experience previously untreated patients with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method from post-authorization safety surveillance in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011年7月26日
 16. Matsushita T, Hanabusa H, Fukutake K, Taki M, Shima M, Akira S. Prospective advate immune tolerance registry in Japanese hemophilia a patients with inhibitors: an interim report. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月26日
 17. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M. Coagulation velocity and acceleration correlate with clinical phenotype of patients with acquired factor V inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月26日
 18. Paula E (BR), Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz S.R, Morfini M, Nemes L, Salek S.Z, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S, Andersen H.F, Chuansumrit A, on behalf of 1804 (adeptTM 1) Investigators. Clinical and laboratory results from adeptTM 1, a phase 2 trial investigating the use of recombinant activated FVII analogue in congenital haemophilia patients with inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011年7月27日
 19. Matsushita T, Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase 1 trial. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月27日
 20. Sugita C, Yamashita A, Matsuda S, Goto S, Moriguchi, Matsumoto T, Inoue O, Iwakiri T, Matsuura Y, Shima M. Elevated plasma levels of factor VII enhance thrombus formation though excess thrombin generation in rabbit jugular vein. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月27日

21. Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Shima M. The first national survey of pediatric thromboembolism in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
22. Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi M, Yoshioka A. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
23. Furukawa S, Yoshizawa H, Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Tanaka I, Yoshikawa Y, Shima M. Perioperative hemostatic management for coarctation of aorta in an early infant with severe haemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
24. Ogiwara K, Nogami K, Hosokawa K, Matsumoto T, Shima M. Procoagulant effect of tranexamic acid with minimal urokinase on ex vivo human hemophilia model under blood flow XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
25. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Mild clinical phenotype in a severe hemophilia A with age178his substitution associated with increased factor Xa generation. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
26. Shinozawa K, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Shima M, Fukutake K. A novel missense mutation of factor V(factor V nara:W1920R)manifested thrombosis and demonstrated a positive result of activated protein C resistance assay XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
27. Nishiya K, Nogami K, Tanaka I, Shibata M, Ogiwara K, Matsumoto T, Shima M. Dynamics of plasma factor VII during the continuous infusion factor VII concentrates in twenty patient with hemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
28. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A novel mechanism of Enhancing the Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate(APCC) in Hemophilia A Patients with Inhibitor American Society of Hematology San Diego 2011 年 12 月 10 日
29. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A novel mechanism of Enhancing the Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate(APCC) in Hemophilia A Patients with Inhibitor American Society of Hematology San Diego 2011 年 12 月 10 日
30. Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M, Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Matsumoto T "Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System. American Society of Hematology San Diego 2011 年 12 月 10 日
31. Ogiwara K, Shinozawa K, Nogami K, Matsumoto T, Nishiya K, Tsujii N, Yada K, Fukutake K, Shima M. Mechanism of the Potent Activated Protein C Resistance of Novel Factor V Mutation with W1920R (FV Nara) Relative to R506Q (FV Leiden) American Society of Hematology San Diego 2011 年 12 月 12 日
32. Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Matsumoto T, Shima M. Pharmacokinetics of Continuous Infusion Therapy of Factor VIII Concentrates in Hemophilia A Patients with

- Inhibitors American Society of Hematology San Diego 2011年12月12日
33. Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System American Society of Hematology San Diego 2011年12月13日
 34. 荻原 建一, 野上 恵嗣, 篠澤 圭子, 松本 智子, 古川 晶子, 西屋 克己, 福武 勝幸, 嶋 緑倫 活性化プロテイン C 抵抗性の新規凝固第 V 因子分子異常症 (W1920R) の凝血的特性と抗凝固療法の確立 第 73 回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日
 35. 松井 英人, David Lillicrap, 杉本 充彦, 嶋 緑倫 自己血管内皮前駆細胞移植による血友病 A インヒビターに対する新規免疫寛容導入療法 第 73 回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日
 36. Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Nakadate H, Shima M The first national survey of thrombotic disorders in Japanese children. Division of Hematology, National Center for Child Health and Development 73 回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日
 37. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Evaluation of coagulation function on the clinical phenotype with acquired FV inhibitor patients 第 73 回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日
 38. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M Effects of anti-FVIII inhibitors on the FVIII neutralization for hemophilia A with inhibitor 第 73 回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月14日
 39. 西屋 克己, 柴田 優, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 田中 一郎, 松本 智子, 嶋 緑倫 血友病 A インヒビター保有患児における第 III 因子製剤によるインヒビター中和/持続輸注療法の凝血的検討 第 53 回 日本小児血液・がん学会 第 9 回 日本小児がん看護学会 前橋市 2011年11月25日
 40. 古川 晶子, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 細川 和也, 松本 智子, 西屋 克己, 嶋 緑倫 第 III 因子欠乏型出血症状であると凝血的に診断できた type 3 von Willebrand 病の 1 例 第 53 回 日本小児血液・がん学会 第 9 回 日本小児がん看護学会 前橋市 2011年11月25日
 41. Inaba H Laboratorial heterogeneity in moderate to mild hemophilia A. 第 4 回東アジア血友病フォーラム 2011年6月 天津市
 42. Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Otaki M, Seita I, Ogata K, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Hagiwara T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K Mutation analysis of hemophilia A in the Japanese population: increased prevalence of Tyr473Cys caused by founder effect. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市
 43. Shinozawa K, Maeda K, Amano K, Abe M, Inaba H, Fukutake K Factor V deficiency due to FV Phe190Ser homozygous mutation, but no bleeding tendency. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市
 44. Chikasawa Y, Amano K, Shinozawa K, Matsumoto T, Inaba H, Shima M, Fukutake K Diagnosis of type 2N von Willebrand disease in a Japanese patient by pharmacokinetics, factor VIII binding assay and gene analysis. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市
 45. 篠澤圭子, 沖本由理, 天野景裕, 萩原剛, 角田治美, 鈴木隆史, 稲葉 浩, 福武勝幸 重度の出血症状を示す先天性第 V 因子欠乏症の新しい複合ヘテロ接合体変異 第 73 回日本血液学会学術集会 2011年10月 名古屋市
 46. Hagiwara T, Shinozawa K, Amano K, Inaba H, Yamamoto Y, Suzuki T, Ogata K, Otaki M, Seita I, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Fukutake K Female hemophilia B with homozygous missense mutation p.Ala337Val in the factor IX gene. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011年10月 名古屋市
 47. 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 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011 年 11 月 岡山市
48. Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K The etiology of hemophilia hiding deep inside the *F8* intronic sequence. 第 53 回米国血液学会 2011 年 12 月 サンディエゴ市
 49. Shinozawa K, Okimoto Y, Amano K, Kakuda H, Hagiwara T, Suzuki T, Inaba H, Fukutake K Severe factor V deficiency caused by a novel compound heterozygous mutation: factor V G1617V and 1-bp insertion. 第 53 回米国血液学会 2011 年 12 月 サンディエゴ市
 50. 瀧 正志：(教育講演) 血友病治療の現状と展望、第 12 回日本検査血液学会、2011.7
 51. 山崎 哲、鈴木典子、山崎法子、高山成伸、瀧 正志、血栓止血検査標準化小委員会：APTT 標準化に向けたパネル血漿作成の検討—ヘパリン感受性—、第 12 回日本検査血液学会、2011.7
 52. 鈴木典子、山崎 哲、辻村浩司、高山成伸、瀧 正志、向出佳恵：VWF 測定試薬「BC フォンビレブランド試薬および vWF Ag 試薬」の評価、第 12 回日本検査血液学会、2011.7
 53. Masashi Taki, Hideji Hanabusa, Katsuyuki Fukutake, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group :Clinical experience of previously untreated patients (PUPs) with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method (rAHF-PFM) from post-authorization safety surveillance (PASS) program in Japan, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 54. Chiai Nagae, Tomoko Shoji, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Masashi Taki: The interim results of the usefulness of primary prophylaxis in hemophilia patients at our hemophilia center, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 55. Kaoru Kitsukawa, Hideyuki Takedani, Midori Shima, Masashi Taki, Hemophilia Committee, Japan Society of Pediatric Hematology: Imaging evaluation of arthropathy at the beginning of prophylactic therapy for severe hemophilia children, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 56. Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Tomoko Shoji, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Chiai Nagae, Masashi Taki: Interpretation and significance of anti-FVIII antibodies detected by ELISA and Western blotting, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 57. Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Tomoko Shoji, Shinji Muto, Masashi Taki: Comparison of in vivo recovery of recombinant factor IX and plasma derived factor IX in previously treated Japanese hemophilia B patients, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 58. Katsuyuki Fukutake, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: The post-authorization safety surveillance (PASS) program confirmed actual clinical safety and efficacy of antihemophilia factor (recombinant) plasma/albumin-free method factor VIII among Japanese subjects, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 59. Tadashi Matsushita, Hideji Hanabusa, Katsuyuki Fukutake, Masashi Taki, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: Prospective Advate immune tolerance registry (PAIR) in Japanese hemophilia A patients with inhibitors: an interim report, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
 60. 長江千愛、庄司朋子、山下敦己、武藤真二、瀧 正志：二度目の免疫寛容導入療法で免疫寛容が得られた血友病 A インヒビターの 2 症例、第 114 回日本小児科学会、2011.8
 61. 山下敦己、足利朋子、武藤真二、長江千愛、浅原美恵子、鈴木典子、山崎法子、山崎 哲、高山成伸、瀧 正志：免疫寛容導入療法中のインヒビター測定に関する検討—Bethesda 変法と ELISA 法の比較—、第 114 回日本小児科学会、2011.8
 62. 武藤真二、長江千愛、足利朋子、山下敦己、平本準、橘川薫、瀧正志：

- 脊髄硬膜外血腫を来した血友病の 2 症例、第 114 回日本小児科学会、2011.8
63. 瀧 正志：(コーポレートセミナー 27) 日本における血友病患者の QOL の現状と課題、第 73 回日本血液学会、2011.10
 64. Chiaï Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Kaoru Kitsukawa, Kimie Yoshikawa, Satoshi Yamazaki, Masashi Taki: Usefulness of primary prophylaxis in hemophilia patients. The 73rd annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2011.10
 65. Shinobu Tatsunami, Jyunichi Mimaya, Akira Shirahata, Masashi Taki: 2010 update on the number of patients with coagulation disorders in Japan. The 73rd annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2011.10
 66. 長江千愛、小倉妙美、堀越泰雄、工藤寿子、瀧 正志：血友病包括医療における今後の課題 ～静岡県立こども病院でのアンケート調査の結果をもとに～ 第 53 回日本小児血液・がん学会、2011.11
 67. 藤野和恵 下村由美、吉川喜美枝、熊田知佳、足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧正志：血友病患者の心理的援助を考える～思春期を向かえた患児を通して学んだこと～、第 53 回日本小児血液・がん学会、2011.11
 68. 長江千愛、足利朋子、武藤真二、吉川喜美枝、山下敦己、瀧 正志：わが国における定期補充療法のあり方 -CVAD も含めて-、第 6 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2012.1
 69. 関由起子、柿沼 章子、久地井 寿哉、大平 勝美、普通学級における病気をもつ子どもの受け入れ上の課題 -養護教諭と血友病の子どもを持つ母親の視点から-、第 37 回日本保健医療社会学会大会、2011
 70. 柿沼 章子、久地井 寿哉、大平 勝美、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(第二報) ～支援課題の明確化、第 37 回日本保健医療社会学会大会、2011
 71. 三浦 萌海、柿沼章子、他、慢性疾患(慢性疾患(血友病)の子ども)の学校生活上・教育上の課題、第 70 回日本公衆衛生学会総会、2011
 72. 久地井寿哉、柿沼章子 他、近年における薬害 HIV 感染被害者の生存人口動態および粗死亡率の分析、第 70 回日本公衆衛生学会総会、2011
 73. 久地井 寿哉、柿沼章子、岩野友里、石射いずみ、後藤智巳、大平勝美、近年における薬害 HIV 感染被害者の出生コホート別生存率および粗死亡率の分析、日本エイズ学会、2011
 74. 石射いずみ、後藤智巳、大平勝美、近年における薬害 HIV 感染被害者の出生コホート別生存率および粗死亡率の分析、日本エイズ学会、2011
 75. Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Gene and cell therapy for Hemophilia B using Adipose tissue-derived stem/stromal cells transduced with a self-inactivating SIV lentivirus vector. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (Seattle, USA) 2011.5.18-21
 76. 渡辺夏巳、大橋一夫、辰巳公平、鵜頭理恵、柏倉裕志、大森司、坂田洋一、井上誠、長谷川護、岡野光夫. 脂肪組織由来細胞シートによる皮下組織作製・遺伝子欠損症に対する新規治療法の開発を目指して-. 第 10 回日本再生医療学会(東京) 2011 年 3 月 1 日～2 日
 77. Watanabe N. 細胞シート工学を用いた分泌タンパク欠損症に対する新規遺伝子治療. 理研 Genomic Sciences Research Complex (GSC) セタミーティング 2011 (横浜). 2011 年 8 月 25 日
- 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。
- 「ヘマグルチニン活性を有するシュードタイプレトロウイルス vector」
- 出願番号：特願 2000-169090
- 海外出願各国移行済み
- 「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」(D3-A0103)
- 出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)
- 状態：審査請求済み

「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウィルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」(D3-A0204)

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態：出願公開中。

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。ヒトに近い種属の血友病モデル動物 (血友病 A クロンプタ) の作製に成功した。血友病 A ブタは出生後から出血傾向を示し、遺伝子治療効果判定に優れたモデル動物である。完全長 FVIII と導入遺伝子由来の B 領域欠如型 FVIII を識別するための検出方法を確立でき、非ヒト霊長類のカニクイザルを用いた血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うことを目的として、カニクイザルでの FVIII 発現実験を開始した。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。AAV8 ベクターの遺伝子導入を阻害する中和抗体陽性サルで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 3 頭のサルにおいて治療域に達する導入遺伝子由来 FIX 発現が得られ、抗 AAV8 抗体が存在していても遺伝子治療が可能であることが示された。血友病 B 遺伝子治療臨床研究に向けて作製され納入された GMP グレードヒト FIX 遺伝子搭載 AAV8 ベクター (GMP-AAV8hFIX) の純度および生物学的活性を検討したところ、SDS-PAGE にて GMP-AAV8hFIX の純度は極めて高く、電子顕微鏡による解析でも empty vector の混入は低く抑えられていた。生物学的活性は血友病 B マウスを用いた検討では $5 \times 10^{11}/\text{kg}$ で平均 58% の活性発現がえられマウス血漿中の FIX 蛋白濃度と FIX 活性は一致し、GMP グレードベクターの遺伝子導入活性が確認できた。

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、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、FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスは、FVIII 単独欠損マウスと比較して FVIII 抗原の経静脈的反復感作に対する免疫応答が有意に低下し、PAI-1 の関わる免疫反応を明らかにすることで FVIII インヒビター制御する可能性が示唆された。

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。恒常的に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治療の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、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、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。

血友病 A マウス(血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) 欠損マウス) より分離した間葉系幹細胞に SIV を用いて FVIII 因子を発現させ、関節腔内へ凝固因子発現間葉系幹細胞を移植し、血友病性関節症の予防効果について検討した。サルの実験では抗 AAV 抗体陽性サルにおいてカテーテルを用いたベクター投与実験を行った。ヒト臨床研究に向けた GMP グレードベクターの純度および生物学的活性を検討した。

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。FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスのインヒビター産生反応性を解析した。

(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、厚労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：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遺伝子治療の効果を評価するために適したモデル動物であると考えられた。 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 ベクターで FVIII 遺伝子導入した間葉系幹細胞を血友病 A マウスの関節腔に投与すると針穿刺による膝関節腔内の出血を減少させ、滑膜