

(2) 医療制度・医療体制について

医療制度および医療体制については、「血友病」という単語が一番多く使用されていた。これと近い単語としては「専門医」、「病院」、「医療」、「不安」といった単語が位置していた。

「医療費」という単語も高い頻度で使われており、直結する単語として「保険」、「病気」、「健康」などが配置された。さらに、公的な助成制度について記載した回答を反映し、「恒久的」、「公的」および「助成」の3つの単語が「医療費」に近接する単語として抽出されていた。

医療体制について記載された意見の中では、「専門医」という単語を用いたものも多く、「専門医」も高出現率の単語の1つとなっていた。「専門医」と関係性の強い単語としては、「Dr・医師」が筆頭であったが、「いない」、「不足」、「育成」といった単語も抽出されていた(図5.1)。

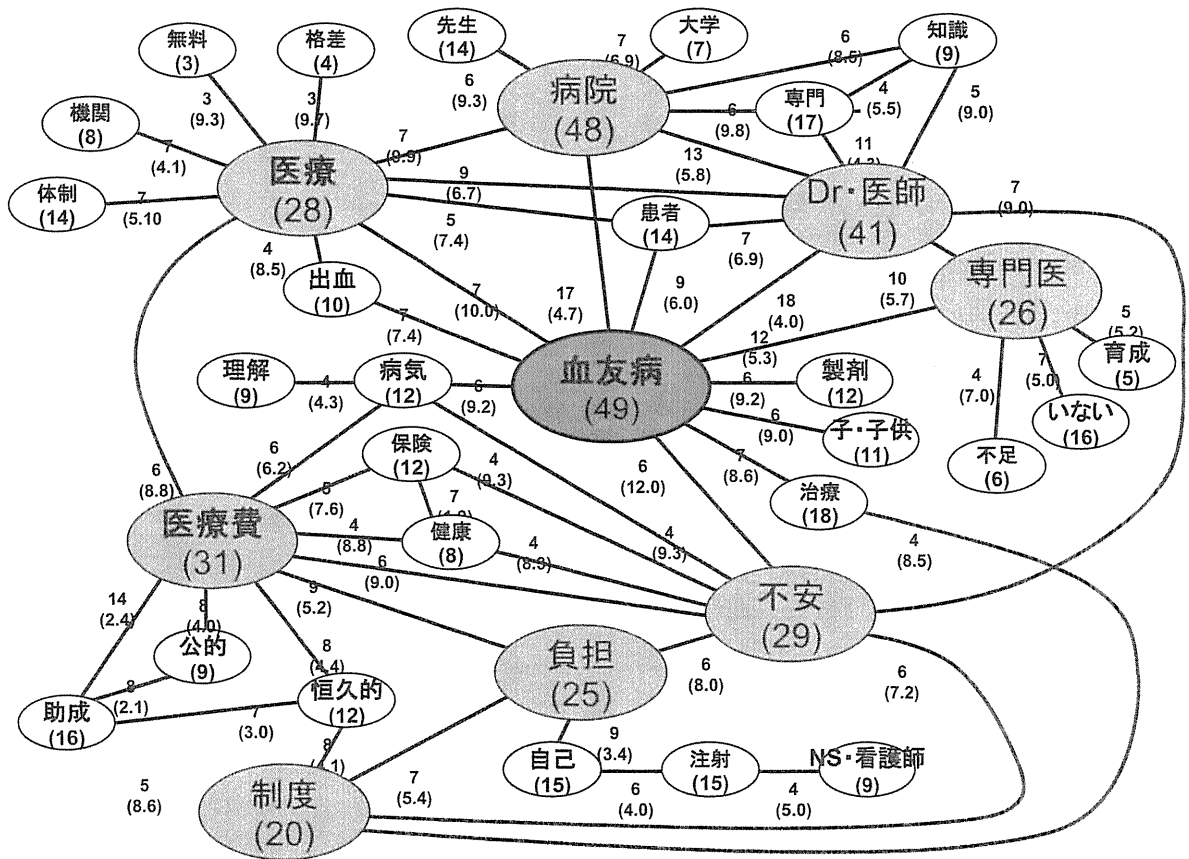


図 5.1 医療制度・医療体制についての回答に使用された単語の関係性

(3) 社会・生活について

この項目の記載においては、文章の中で「社会」と「生活」が使用された例が多く、「生活」と関係性の強い単語としては、「血友病」とともに「不安」が近接していた。さらに、この「不安」と近い関係にある単語として、「結婚」、「学校」、「年金」などが配置され、その「年金」という単語とは「障害」が、さらに「障害」には「関節」が最も近傍に位置していた。

また、医療制度・医療体制について使用された「血友病」の時とは異なり、「血友病」に近い単語として「偏見」と「差別」がプロットされていた(図5.2)。





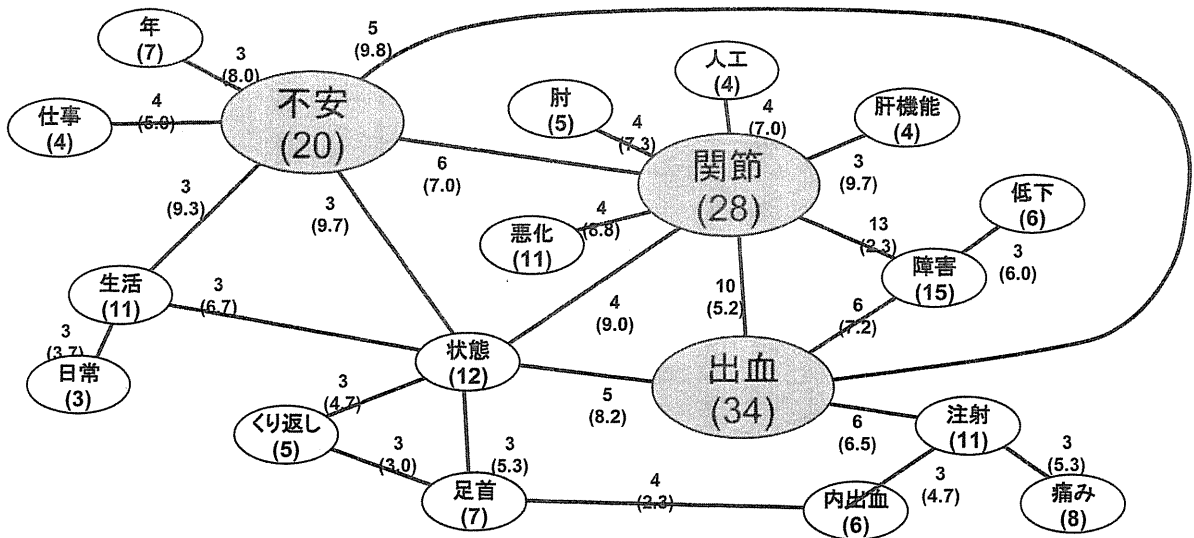


図 5.4 病状についての回答に使用された単語の関係性

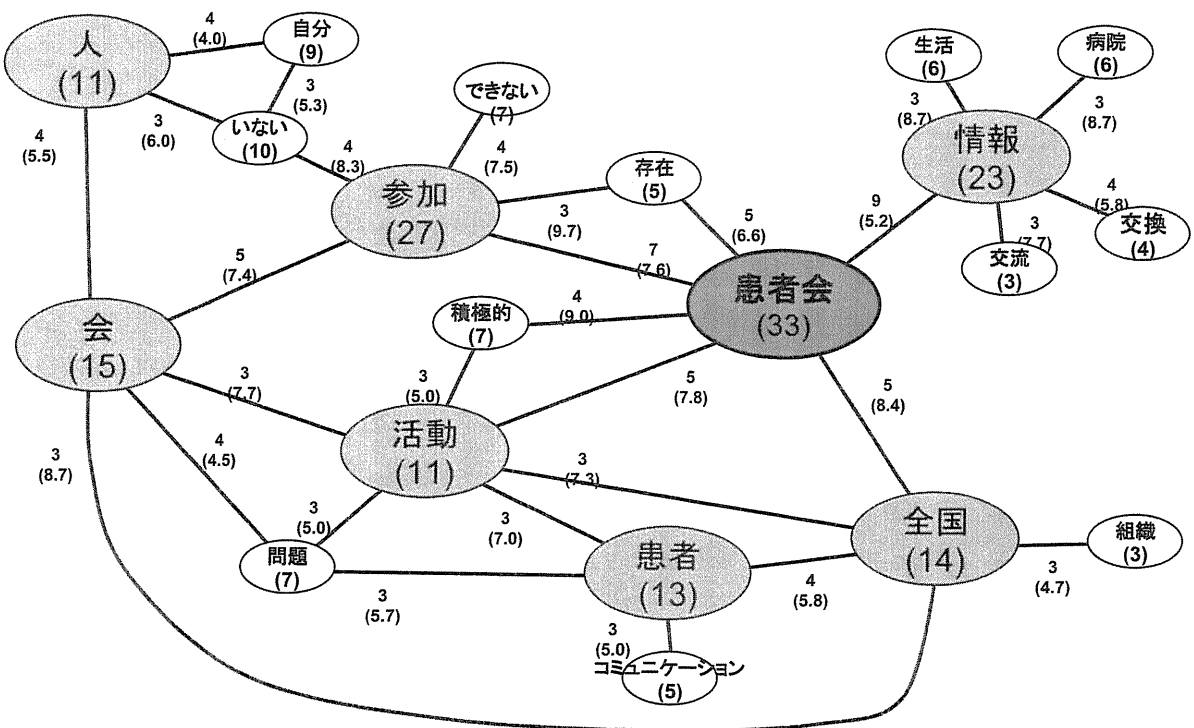


図 5.5 患者会などについての回答に使用された単語の関係性

(7) その他（今回の調査票の内容についてなど）の項目について

その他についての記載の中では、設問文中にある「調査」という単語が多く使用され、これには「結果」、「QOL」、「心」といった単語が近傍に位置していた。

「調査」以外で最も使われた単語は「患者」と「血友病」で、次いで「子・子供」が多く使用されていた（図 5.6）。

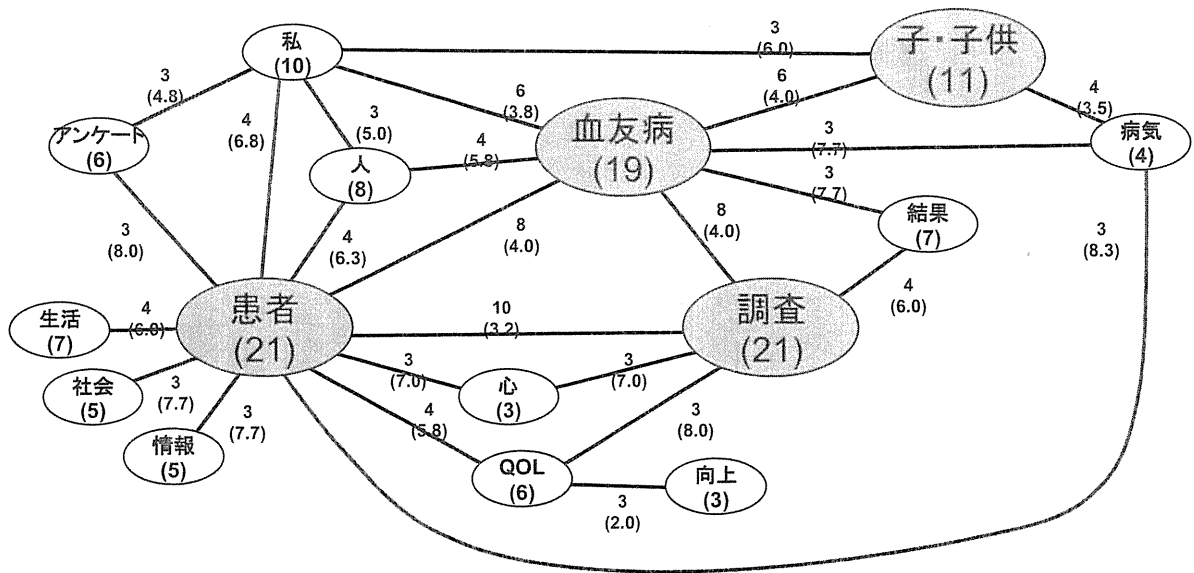


図 5.6 その他についての回答に使用された単語の関係性

## 6. いくつかの単語と使用頻度と背景因子との関係

この調査は血液凝固異常症という特定の疾患を対象としているが、それぞれの患者の背景は多様であり、自由記載の内容と背景因子との関係性を考察することは難しい。そこで、使用頻度の高い単語について、血友病の種類と重症度、年齢および社会的な背景因子について、使用頻度の変化を解析した。

血友病の種類と重症度については、血友病 A 重症、血友病 A の中等症および軽症、血友病 B 重症、血友病 B の中等症および軽症、血友病（血友病 A または血友病 B）で現在インビターがある患者、の 5 群とした。

年齢および社会的な背景については 1 歳以下、2～3 歳、4～5 歳、小学生、中学生、高校生、大学および大学院生あるいは専門学校生、就労者、就労年齢該当の非就労者、退職者の 10 分類とした。就労者、就労年齢該当の非就労者、退職者の区分は、年齢と就学あるいは就職しているか否かを問う設問への回答によって行った。

医療制度・医療体制、社会・生活、治療法、病状についての各項目についての回答において、それぞれ「医療費」、「不安」、「完治」、「関節」の単語に注目し、上記 5 群および 10 分類について、これらの単語が使用された頻度と各群の該当者数（当該項目に回答された記載例数）との比を算出して比較した。

血友病の種類と重症度についての比較を図 5.7 に示した。図に示したように、4 つの単語とも同程度の頻度で変動していたが、現在インビターがある患者からの回答では、「医療費」という単語は使用されていなかった。

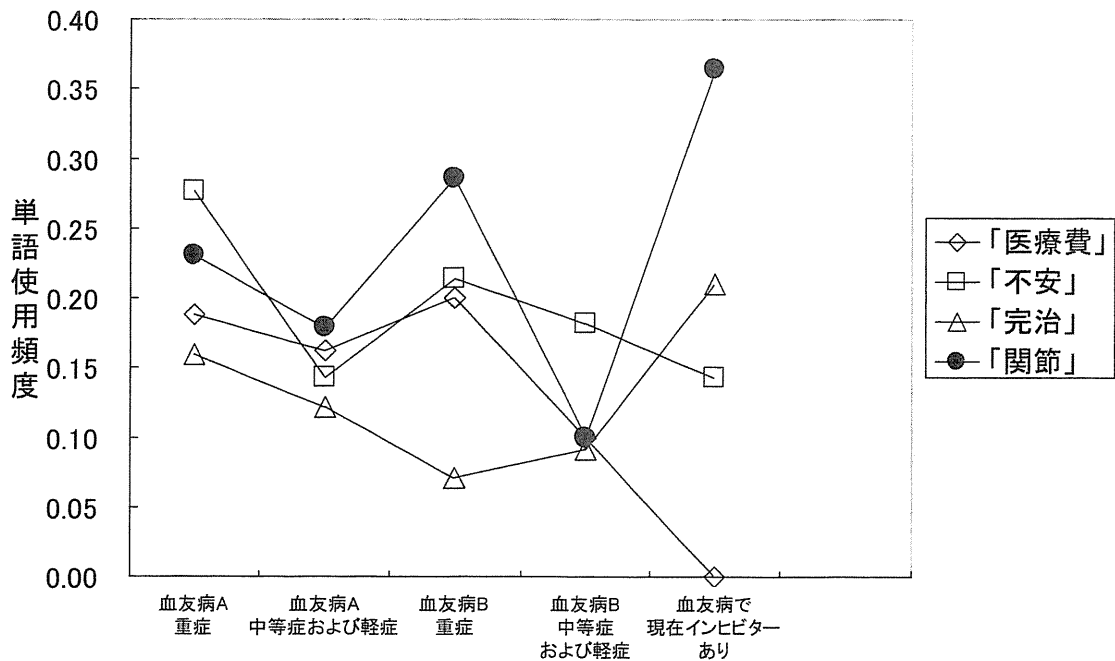
一方、「関節」という単語については、現在インビターがある患者からの回答における出現頻度が最も高い結果になっていたが、群の違いによる頻度の差に統計学的な有意差はみられなかった。

年齢および社会的な背景についても、図 5.8 に示したように 4 つの単語とも同程度の頻度で変動してい

たが、退職者の記載中には4つの単語は使用されていなかった。

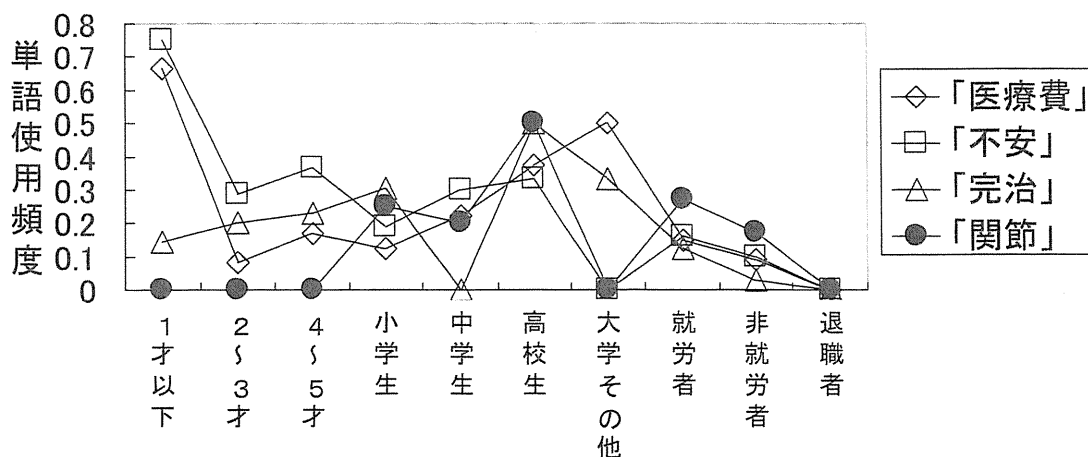
「医療費」と「不安」を使用した頻度が1歳以下の群においてかなり高率であったが、他の区分との間に統計学的な有意差はみられなかった。

なお、図5.7および5.8については、群ありは区分によって該当者数（当該項目に回答された記載例数）が少ないものもあるので、分母となった例数を各図の下に表示した。



	分母となった記載例数				
	血友病A 重症	血友病A 中等症および軽症	血友病B 重症	血友病B 中等症および軽症	血友病で現在インヒターあり
「医療費」	85	37	15	10	12
「不安」	65	28	14	11	14
「完治」	88	33	14	11	19
「関節」	52	28	7	10	11

図 5.7 血友病の重症度と単語の使用頻度



	分母となった記載例数									
	1才以下	2~3才	4~5才	小学生	中学生	高校生	大学その他	就労者	非就労者	退職者
医療費	3	12	12	24	9	8	4	89	33	5
不安	4	7	11	21	10	3	5	69	30	2
完治	7	10	13	23	12	8	3	88	34	3
関節	2	7	7	16	5	2	2	66	23	3

図 5.8 年齢および社会的な背景と単語の使用頻度

## 7. 自由記載欄の解析の考察

今回の調査票では、前回の自由記載欄の解析結果を踏まえ、記載項目を 6 つに分類し、それぞれに記載して頂いたため、前回よりも記載内容の分類の方向性が明らかであった。

その他を除く 5 つの項目については、回答数や意見に使用された文字数および単語数に大きな差はなく、全体の意見の大枠を分類する項目として、1)医療制度・医療体制について、2) 社会・生活について、3) 治療法について、4) 病状について、5) 患者会などについて、という今回の項目はほぼ適切であったと考えられる。

医療制度・医療体制については恒久的な公的医療制度が切望されており、これは前回の調査と同様であった。また、血友病治療に携わる専門医の不足や、その育成の必要性に関する回答もあり、医療者同様に、この問題については患者においても関心が高いようであった。

社会・生活に関しては、「血友病」という単語が「偏見」や「差別」といった単語と結びついており、また、「病気」という単語は「イジメ」という単語とも近い。偏見や差別の問題が、前回の調査の時と同様に、未だ問題となっていることが示唆される。

治療法についての回答の中では、「遺伝子治療」の単語を用いた記載が増え、単語の配置図にも登場した (図 5.3)。

一方、図 5.3 において出現頻度の高い「飲み薬」という単語は「注射」および「効果」とつながっている。図 5.3 に見られる単語の使用頻度と相互の位置関係は、経口投与薬の登場に寄せる大きな期待を反映しているものであろう。同時に、現在の薬の持続時間の延長を期待する意見も多く、これらのことは前回の調査と同様の傾向であった。

病状に関する記載では、関節についての記載が多かったが、「整形」あるいは「整形外科」という単語は高頻度では使用されていなかった。

病状に関して高頻度で使用された「関節」という単語は、医療体制・医療制度あるいは治療法についての配置図では高頻度単語として現れず、社会・生活についての記載において登場している。症状のところでは「関節」が「出血」および「不安」と結びついているので、関節障害というのは「治療できないもの」、「医療体制とか治療の対象ではなくて、不安対象でしかない」という現状を反映しているのかもしれない。

さらに、病状に関しての記載中では、肝炎についての記載があまり多くはなかった。C型肝炎ウイルスに起因する重篤な肝疾患が、本邦の血液凝固異常症の死亡例の多くを占めてきている現状を考えると、意外な結果であった。

患者会などについての記載の中では、「参加」という単語が「できない」とも結びつきが強く、患者会が情報交換に有用であると考えられる回答が多いながら、「参加できない」という回答も無視できないことが示唆された。

以上のように、テキストデータの分類手法による自由記載の解析結果は、内容の熟読作業による前年度の要約と矛盾しないものであったが、作図によって改めて認識された部分もあった。テキストデータとしての解析を用いると、単語の使用頻度と関係性をプロットすることができ、項目ごとの記載意見の特徴を把握するのに有用であった。



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H I V感染被害者・家族等の現状からみた、  
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）

研究要旨 本研究では、当事者参加型実証研究として、薬害H I V被害者・家族に対し、血友病とともに生きる生活の質の向上、心理社会的な問題の解決、薬害被害の歴史を伝える等の観点から、1) 支援課題を整理し、支援理論を構築した。2) 理論展開に基づき具体的な支援プログラムを立案した。3)患者中心の意思決定のための情報支援として、WEBや小冊子による情報提供と解説、海外支援事例の紹介などを実施した。

#### A. 研究目的

薬害 HIV 感染被害者は、原疾患の血友病の問題に加え、30年以上の間、薬害 HIV 由来の困難の克服、その後の生活構築に努力してきた。1996年3月29日に薬害 HIV 裁判の和解によって国の責任とした恒久的な対策の一環として、医療福祉環境の充実が図られることになった。しかし、薬害被害の経年的な影響により、生活領域においての被害は広範囲・長期・深刻であり、生活の質の充実の実現について道のりは険しい<sup>4)</sup>。こうした状況に加え、今後も、地域における HIV/AIDS に対する差別偏見の影響による生活上の困難の継続があるとみられる。薬害H I V感染被害者に対する就労・自立支援、および、被害者家族への継続的なケアの充実・実現の必要性が従来指摘されているが、有効な支援策については不明であった。そこで、薬害H I V感染被害者・家族等の現状の課題について、当事者参加型アクションリサーチ・面接調査等で得たケース事例を系統的に把握・分析し、また血友病、遺伝に係わる医療従事者、教育関係者（養護教諭等）からの聞き取り・

紙面調査も並行して行う。諸外国における薬害H I V感染被害者・家族等への課題克服の現状および支援の動向を踏まえつつ、重要課題の克服のための支援の在り方や具体的方法を検討・開発することにより、今後の課題克服へ向けた支援につなげることを目的とする。

#### B. 研究方法

1) 全国の薬害H I V感染被害者家族（母親(n=19)、父親(n=16)、きょうだい(n=6)への面接調査、比較対象群としての全国の血友病患者家族への面接調査(n=9)、および実態把握手法の開発（インタビューガイドの作成、面接票の開発、フォーカスグループインタビューを用いた血友病家族の支援役割上の問題点の抽出）、遺伝相談・血友病関連の医療従事者への面接調査(n=6)、教育関係者への質問紙調査(n=37)について、さらに精査を行い、実態に基づき、支援理論を構築・展開する。

2) 諸外国の薬害H I V感染被害者家族向け支援事例の情報収集、海外の支援動向に関する情報収集と分析を行った。外国で

の先行事例などを参考に、日本語版血友病ファクトシート開発を行った。情報としては、1) 血友病に関する事実、2) 歴史的事実の内容 3) 今後の血友病の課題について、A4サイズ 18 ページにまとめた。血友病患者当事者、専門家、当事者による協働で内容の作成を行い、外部の専門家から医療的内容や制度、および全体的な評価について、助言と監修を得て、適宜修正した。

3) インターネットを通じ、情報提供のサイト構築およびコンテンツ制作を行った。

(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)

## C. 研究結果

### 1) 支援課題の精査と、支援理論の構築

初年度、二年目に得た領域別課題を小括すると、薬害HIV感染被害者・家族は、血友病患者としての将来に対する、中立的な意思決定に関する情報の不足と、漠然とした無力感・不安を抱えていることが新たに抽出された。

従来から指摘のあるニーズの高い支援としては治療、就労、婚姻、育児などの支援があるが、さらに包括したあり方を検討し支援理論を構築した。支援課題として、血友病患者としての家族内関係・社会関係構築が抽出された。血友病のライフステージに応じた事前的な将来計画支援を行った。抽出された課題を踏まえ、具体的な課題克服のあり方と支援法の検討し、萌芽的な位置づけで、HIV薬害被害者・家族を対象

とした中立的な意思決定を支援するための、情報支援を実施した。

### 2) 支援実施と支援理論展開

海外での支援事例などを参考に、情報提供のための血友病情報提供ホームページの開設・運営を行い、リスクや不確実性も高いが有用性が期待された先進的な治療選択に役立つ情報を含む、最新の国際的な血友病に関する医療情報・動向に接する機会を提供した。血友病に関するファクトシートの作成や、「血友病の保因者」などの海外文献の翻訳および解説、提供を行った。また、引き続き家族・医療従事者への面接調査を行い、結果の解釈妥当性向上に努めた。

血友病ファクトシートの構成は以下となった。1) 血友病とは 2) 血友病の疫学 3) 血友病の症状 4) 血友病の治療 5) 留意点(副作用・インヒビター) 6) 血友病における遺伝 7) 医療費助成制度 8) 薬害エイズ事件～発生・拡大・裁判・和解まで 9) 血友病の将来となった。

## D. 考察

血友病の遺伝の問題は恒久的な課題として、血友病患者・家族の社会生活の質の向上を考える上で重要である。先行研究において、遺伝の課題はリプロダクティブ・ヘルス(出生)に関するものが中心であった。また、血友病・遺伝に関する支援範囲は、血友病に特有の医療圏に特徴づけられるものが中心で、相互支援は主に患者会を中心とした活動によるものにとどまり、生活圈構築に関する提案や、具体的な社会的な支援構築を視野に入れた具体的な支援の実現には至っていないとみられた。自己支援や相互支援の不足によるこれらの困難は先行研究に

より一部指摘されているが、本研究により新たに血友病の遺伝の問題を背景とする、典型的な支援困難事例の報告を行い、その社会心理的支援についてあらためて考察した。

#### 1) 支援課題の精査と、支援理論の構築

本研究による初年度、二年度目の実態調査の結果を合わせて考えると、現状の課題としては、遺伝相談や血友病治療の患者・家族による主体的な選択が優先的でなく、有効な支援が少ない実態が浮かび上がった。諸外国の血友病の支援の有用事例によると、血友病、特にC型肝炎、関節障害、服薬等による副作用などを含む医療対応、そして患者・家族の生活圏の制約条件を緩和するという観点から、サテライト的な血友病医療圏を構築されており、我が国においても支援構築の上での将来像や設計思想として参考になる事例であった。

家族内での情報共有の課題も並行して克服すべき課題として抽出した。本研究では、インターネットによる情報提供を行い、今後も継続的な情報支援が望まれる。今後、内容を一層充実させるとともに、家庭内対話・関係構築の支援、患者・家族・専門家協働による情報共有と課題克服の取り組みが望まれる。

そこで、現状の課題に基づき、支援理論の構築と、今後の展開案の検討を行った。高次の支援概念を構築するにあたり、以下の支援要件に配慮した。

1-1) 課題領域ごとの支援に加え、血友病のライフステージに応じた将来計画に基づく重層的な支援体制構築が今後の課題である。

1-2) 薬害HIV感染被害者・家族等は現

状でも生存とHIV差別偏見への対処が重荷となっており、将来への見通しや計画は差別忌避・生存のための医療を優先するためやむなく事後対処的になっている事例が多い。

これらを、家族内関係・社会関係構築の課題としてとらえ、そのための社会的資源不足やアクセスの問題、また支援機会につなげるための情報の不足が本質的な問題であることが示唆された。

#### 2) 支援実施と支援理論の展開

これらの支援課題は、薬害HIV被害者・家族に対し、長年にわたる十分な情報提供、気づきの促し、行動への動機づけが不十分であった。その結果、対象者の社会心理的困難の共通の背景となっていることが示唆された。そこで、生活再構築のための具体的な支援として、血友病に関する基礎的・中立的な意思決定に役立つ内容を検討し、情報提供による支援として血友病ファクトシートの作成を行った。

本ファクトシートでは、内容は、患者・家族向けの基本的な医学的・社会的事実を包括する情報を提供した。また支援資材開発にあたり、血友病遺伝の相談体制や、血友病に対する前向きな受け止め、患者・家族の予見的・中立的な意思決定、制度構築の経緯を知ることによる社会不安解消に配慮した。

#### E. 結論

本年度研究により、より高次の支援概念として、家族内関係・社会関係構築の課題を得た。今後の課題について以下の3点にまとめた。特に、血友病の遺伝の課題は恒久的な課題として、出生にはじまり、きよ

うだいとの関係なども含む家族関係構築と、保健・医療・成育環境とも深くかかわる社会関係構築に影響し、人生上の発達と社会生活の質の向上と関連した克服課題である。今後、相談体制などの構築、適切な情報提供による恒久的な支援が重要であることが示唆される。

1) 血友病患者・家族の将来計画に役立つ継続的な情報提供が必要である。また同時に、今後、情報に接する機会を創出する必要があると考える。患者・家族の社会生活に対する準備性を高める支援のノウハウを蓄積することが重要だと考えられた。

2) 本研究による新たな知見として、将来計画や生活の質向上に向かうべき生活資源確保の観点から、血友病の遺伝の問題を支援実施する上での視点に導入することの重要性が示唆された。

3) 血友病患者・家族のライフステージに応じ、予見的に計画・設計するための医療支援・社会的支援を重層的に構築することが重要である。

これらは、本研究により新たに得られた当事者視点による新たな支援概念に資する知見であり、薬害エイズ事件の教訓から得られた貴重な薬害HIV被害者・家族等の課題克服と支援方策の今後の方向性を示すものであると考えられる。

#### 引用文献

- 1) 関由紀子：日本の薬害 HIV 感染被害者の歴史と現状、有信堂 HIV 感染被害者の生存・生活・人生—当事者参加型リサーチから—（関由起子、山崎喜比古・瀬戸信一郎編）：3-11、2000、
- 2) Green J & Thorogood N. Qualitative

Methods for Health Research. SAGE, London, 2004

3) 関由紀子：被害認識と感情、HIV 感染被害者の生存・生活・人生—当事者参加型リサーチから—（関由起子、山崎喜比古・瀬戸信一郎編）：3-11、134-143、146-155、有信堂 2000、

4) 関由起子、清水準一：HIV 感染の告知と説明の当時のあり方、山崎喜比古・井上洋士編。薬害 HIV 感染被害者遺族の人生当事者参加型リサーチから：51-71 東京大学出版会 2008、

5) How families in Japan view the disclosure of terminal illness: a study of iatrogenic HIV infection  
AIDS Care 21(4):422-30 2009

Seki Y, Yamazaki Y, Mizota Y, Inoue Y

6) Should We Tell the Truth? Why Families in Japan Chose to Tell Their Loved Ones They Were Victims of Iatrogenic HIV Infection  
Qual Health Res 19(6):723-31 2009

Seki Y, Yamazaki Y, Mizota Y, Inoue

#### 謝辞

本研究は以下の協力研究者の尽力によりなされたことに深く御礼申し上げます。

井上 佳世(お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科)、井上 洋士(放送大学)、北村 弥生(国立障害者リハビリテーション研究所)、久地井 寿哉(社会福祉法人はばたき福祉事業団)、関 由起子(埼玉大学教育学部学校保健講座)、玉井 眞理子(信州大学医学部保健学科)、丹 明彦(目白大学人間学部心理カウンセリング学科)、長濱 輝代(大阪市立大学大学院生活科学研究科)

## F. 研究発表

### 口頭発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

## G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

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 助教

In Kyong Shim 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。昨年度の本研究事業においては、野生型マウス脂肪組織からの ADSC の樹立、培養下でサル免疫不全ウイルス由来非増殖型レンチウイルスベクター(SIV)によるヒト第 IX 因子の遺伝子導入、およびその遺伝子導入細胞の細胞シート化に成功した。本年度は、血友病個体(マウス)から同様に ADSC を樹立し、その特性解析、SIV による培養下での遺伝子導入条件の設定、細胞シート化条件の検討を行った。結果、血友病個体由来 ADSC や野生型 ADSC と相違ない細胞特性を有し、SIV による高効率な遺伝子導入が可能であった。また、その細胞から産生される第 IX 因子は機能的凝固活性も有していた。さらに、温度応答性培養皿を用いた ADSC シートの作製も可能であった。

#### A. 研究目的

生体内に機能的組織を作製する再生医療は、次世代の医療としてその確立が大きく期待されている分野である。血友病の新規治療としても、再生医療の実現化の期待は高い。再生医療開発の意義は、現行治療である血液凝固因子補充療法という単一治療の現状において、新たな治療選択として提供することにより、より高いレベルの治療効果をもたらすことを目標とする。本研究では、自己細胞を基盤とした細胞・遺伝子治療による血友病新規治療の開発を開発骨子として展開する。具体的には、細胞としては、脂肪組織から分離・増殖が期待できる脂肪組織由来幹細胞(ADSC)を用いる。ADSC への遺伝子修飾には、サル免疫不全ウイルス(SIV)由来非増殖型レンチウイルスベク

ターを用いる。昨年度の本研究事業において SIV が ADSC の遺伝子導入に有効であることを明らかにした。本年度は、血友病個体(マウス)からの ADSC 分離・増殖手技の確立、血友病由来 ADSC への遺伝子導入ならびに、遺伝子導入 ADSC の血液凝固因子産生能の評価等を中心に行う。さらに、我々が势力的に開発している細胞シート工学を積極的に応用し、それら細胞を用いた組織化を目指すことが本研究の主題である。

#### B. 研究方法

血友病 B マウスからの脂肪組織由来細胞(mouse adipose tissue-derived stem/stromal cells : mADSCs)の樹立- 血友病 B マウス(FIX-KO)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 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より解析し、既報告の ADSC マーカー発現を確認した。

SIV を用いた FIX-KO mADSCs への GFP 遺伝子導入効率の検討- DNAVEC と 自治医大から供与を受け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 SIV-CMVp-EGFP を MOI = 1, 5, 10 で in vitro にて FIX-KO マウス由来 mADSCs に感染させた。ウイルス感染後、培養 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。FIX-KO mADSC による細胞シート作製の試み - FIX-KO mADSCs を用いて細胞シートを作製出来るか試みた。第 4 passage の mADSCs を温度応答性培養皿 (Type-E UpCell, 35 mm) に播種し 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。

SIV を用いた mADSC への hFIX 遺伝子導入および産生タンパクの機能評価 -自治医大から供与を受け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 SIV-CMVp-hFIX を MOI = 10 で in vitro にて FIX-KO マウス由来 mADSCs に感染させた。導入 24 時間後に培地交換し、その時点から 24 時間の培地中への分泌 hFIX タンパク量を特異的 ELISA で定量し、タンパク機能を凝固一段法にて評価した。

(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 TY0-1 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 TY0-1 株は、サル免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトに対する病原性の報告はないことから、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

FIX-KO マウス由来 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 陰性であることが確認された。この細胞表面プロファイルは、既報告の Mesenchymal stem cells (MSCs) や前年度報告した野生型マウス由来 mADSCs のそれと同一であった。

SIV-CMVp-EGF による遺伝子導入効率の検討の結果、MOI=1 では 67%, MOI=5 では 93%, MOI=10 では 98% の遺伝子導入効率であった。MOI=10 で SIV 感染後の細胞増殖を観察したところ、顕著な影響が見られなかったことから、血友病 mADSCs に対し MOI=10 での SIV 感染が、細胞毒性を発生させず、98% とほぼ全ての細胞に遺伝子導入をなし得る条件と選定した。

また、FIX-KO mADSCs を温度応答性培養皿に播種し、培養 5 日目に培養温度を 20°C, 20 分間の低温処理を行うことにより、野生型マウス由来 mADSC 時と同様、細胞シートを剥離回収できた。

SIV により hFIX 遺伝子導入された野生型 mADSC から分泌される hFIX 抗原量は、MOI=10 で約 850 ng/mL/24h であった。分泌される hFIX 機能活性は、培地への添加ビタミン K<sub>2</sub> 量に依存し、添加ビタミン K<sub>2</sub> 濃度が 10 µg/mL の条件の 24 時間蓄積培地にて、正常血漿の 7.2% の FIX 活性が得られた。

### 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ことが判明した。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至適化と 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 23 年度の研究において、血友病個体の脂肪組織からも正常個体と同じ phenotype を有する ADSC の樹立が可能であることが明らかとなった。本結果は、自己細胞を基盤とした再生医療を今後展開するにあたり、患者脂肪組織 ADSC を軸とした治療体系の有用性を強く示唆するものである。また、①SIV による ADSC への高効率遺伝子導入、②FIX 導入 ADSC からの効率的な FIX 産生・分泌、ならびに③移植用組織体としての ADSC 細胞シート作製の成功という一連の成果は、治療用組織を生体内に組み上げることでの新規血友病治療の開発という最終目標を目指すにあたって極めて重要な成果である。これらの成果を基に、次年度は血友病 B モデルマウスにおける ADSC シートを用いた組織作製法の開発と、治療効果の掌握を計画している。また、ラグタイムなく実験成果を臨床へ橋渡しすることを念頭に、ヒト ADSC を用いた研究展開も進捗をみながら企画したい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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]
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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).
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Takagi S, Ohno M, Ohashi K, et al. Cell shape regulation based on hepatocyte sheet engineering technologies. *Cell Transplantation*, 2012, in press.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
- ## 2. 学会発表
- ### 海外
- 1) 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
- ### 国内
- 1) 渡辺夏巳、大橋一夫、辰巳公平、鶴頭理恵、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
  - 2) 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. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

研究は現在、モデル動物を用いて、治療実験にむけた条件検討中にある。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
<u>Ohmori T</u> , <u>Yano Y</u> , <u>Sakata A</u> , <u>Ikemoto T</u> , <u>Shimpo M</u> , <u>Madoiwa S</u> , <u>Katsuki T</u> , <u>Mimuro J</u> , <u>Shimada K</u> , <u>Kario K</u> , <u>Sakata Y</u> .	Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy.	Thromb Res		Epub ahead of print	2011
<u>Madoiwa S</u> , <u>Kobayashi E</u> , <u>Kashiwakura Y</u> , <u>Sakata A</u> , <u>Yasumoto A</u> , <u>Ohmori T</u> , <u>Mimuro J</u> , <u>Sakata Y</u> .	Immune response against serial infusion offactor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice.	Haemophilia		Epub ahead of print	2011
<u>Watanabe H</u> , <u>Madoiwa S</u> , <u>Sekiya H</u> , <u>Nagahama Y</u> , <u>Matsuura S</u> , <u>Kariya Y</u> , <u>Ohmori T</u> , <u>Mimuro J</u> , <u>Hoshino Y</u> , <u>Hayasaka S</u> , <u>Sakata Y</u> .	Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement.	Thromb Res	128	e137- e143	2011
<u>Mimuro J</u> , <u>Sakata Y</u> .	Gene and cell thrapy for hemophilia:recent advances.	Rinsho Ketsueki	52	361- 367	2011
<u>Dokai M</u> , <u>Madoiwa S</u> , <u>Yasumoto A</u> , <u>Kashiwakura Y</u> , <u>Ishiwata A</u> , <u>Sakata A</u> , <u>Makino N</u> , <u>Ohmori T</u> , <u>Mimuro J</u> , <u>Sakata Y</u> .	Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous $\alpha$ 1-antitrypsin in lipopolysaccharide primed hematological cells.	Thromb Res	128	283- 292	2011
<u>Yagi H</u> , <u>Sanechika S</u> , <u>Ichinose H</u> , <u>Sumi-Ichinose C</u> , <u>Mizukami H</u> , <u>Urabe M</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Kume A</u> .	Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy.	Neuroreport	23	30-34	2012
<u>Yagi H</u> , <u>Ogura T</u> , <u>Mizukami H</u> , <u>Urabe M</u> , <u>Hamada H</u> , <u>Yoshikawa H</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Kume A</u> .	Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector.	J Gene Med	13	114- 122	2011
<u>Takahashi K</u> , <u>Saga Y</u> , <u>Mizukami H</u> , <u>Takei Y</u> , <u>Urabe M</u> , <u>Kume A</u> , <u>Suzuki M</u> , <u>Ozawa K</u> .	Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer.	Cancer Sci.	102	2272- 2277	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikuchi Y, Kume A, Urabe M, <u>Mizukami H</u> , Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, <u>Ozawa K</u> .	Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells.	J Stem Cell Regener Med	17	61-68	2011
Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, <u>Shima M</u> .	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	107 (2)	Epub ahead of print	2012
Shibata M, Nakagawa T, Akioka S, Giddings JC, Kanehiro H, Matsumoto T, Ogiwara K, Yada K, <u>Shima M</u> .	Hemostatic Treatment Using Factor VIII Concentrates for Neutralizing High-Responding Inhibitors Prior to CVAD Insertion for Immune-Tolerance Induction Therapy.	Clin Appl Thromb Hemost	18(1)	66-71	2012
Ogiwara K, Nogami K, <u>Shima M</u> .	Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms.	Thromb Haemost	106 (4)	665-674	2011
Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, <u>Shima M</u> .	Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII.	Thrombosis and Haemostasis	105 (6)	989-998	2011
Tatsumi K, <u>Ohashi K</u> , Taminishi S, Sakurai Y, Ogiwara K, Yoshioka A, Okano T, <u>Shima M</u> .	Regulation of coagulation factors during liver regeneration in mice: Mechanism of factor VIII elevation in plasma.	Thrombosis Research	128 (1)	54-61	2011
Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Miyama JI, Oka T, <u>Shima M</u> , Takamatsu J, <u>Takami M</u> , Taneichi M, Yoshioka A.	An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan.	Haemophilia	17(5)	771-776	2011
<u>Inaba H</u> , 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.	18	e43-e44	2012