

201124001B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
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. 総合(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	12
(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	21
(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	25
(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	55
(自治医科大学 高橋将文、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	60
(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	62
(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	70
(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	74
(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	88
(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	94
(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	100
IV. 研究成果の刊行物・別刷	107

血友病の治療とその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 因子或いは第 IX 因子の遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時に因子製剤を補充する care 中心であり、不慮の頭蓋内出血を予防は困難である。以前に、薬害 HIV や HCV 感染を惹起した製剤は改善され、その利便性も著しく向上した。しかし高頻度に出現する同種抗体対策は重要な課題である。また薬害後に血友病患者に対する社会的偏見は著しく高まった。これらの問題の改善を目指し、次の 3 つの柱を立てて研究を展開した。I. 血友病遺伝子治療、II. 血友病インヒビター(同種抗体)対策、III. 患者 QOL 向上を目指した調査研究。インヒビター研究には今期は旧吉岡班の調査研究も加わった。

I. 血友病遺伝子治療

血友病マウスで実験を繰り返し、サルでの確認とさらなる安全性と効率改善技術を確立するという戦略で研究を進めた。サルには血友病が存在しない。サル因子と 97%以上相同性のある遺伝子導入による発現ヒト血友病因子を識別測定しうる世界唯一の抗 FIX モノクロナル抗体を作製し得たので血友病 B 遺伝子治療技術確立を先行した。これまでの研究から、体内臓器、具体的には肝臓に直接遺伝子を導入する場合は、治療レベルベクター量では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、体外で iPS 細胞や間葉系幹細胞(MSC)に因子を導入し、この細胞を移植する形式の遺伝子治療には、P2 扱いになった改変サル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターを用いることとした。個体が AAV に感染することで生じる抗 AAV 中和抗体が血中に存在すると、AAV ベクターを用いた遺伝子治療は困難になる。種々の工夫により抗 AAV 8 中和抗体測定系感度を世界最高レベルまでにあげ、ヒト・サルで測定するとヒトは血友病患者を含めて約 50%に、サルでは 72%に陽性が確認できた。抗体陰性のサルに、末梢静脈からでも肝臓に比較的特異的に取り込まれる AAV8/FIXベクターを投与することにより、FIX 血中レベルが 10-30%で 3 年間持続が確認されている。サル肝臓にもそれに見合うベクターゲノム量も確認できたが、生殖臓器への移行はみられなかった。抗体陽性サルでは FIX の発現もゲノムの取り込みもみられなかった。バルーンカテーテルを利用して抗体を含む血液に接しない形でベクターを経門脈的に投与すると、5-10%の FIX 発現持続と、それに見合うゲノムの取り込みが肝臓で確認された。いずれの場合も、肝機能は正常で、肝臓に慢性炎症や発がんを示唆する組織学的所見もみられなかった。抗 AAV 中和抗体陽性例への遺伝子導入技術の確立は、染色体に組み込まれない AAV ベクターの効果が数年先に減弱したときに、再治療出来ることを意味し、その AAV ベクター遺伝子治療における意義は極めて大きい。予算の都合で、中国 Vector Gene Technology 社を選択し、研究班グループが当地で指導する形で、精度の高い、遺伝子導入及び発現効率の高い、ヒト投与可能な GMP レベル AAV8/FIXベクター作製に成功した。海外では、昨年暮れに英国 Nathwani 等のグループが、抗 AAV8 中和抗体陰性血友病 B 患者に、double strand AAV8/FIXベクターを用いてヒトで治療レベル FIX の発現が、特別な異常なく、1 年継続していることを報告した。しかし中和抗体陽性例ではうまくいっていない。我々は遺伝子治療プロトコール作成や厚労省申請などの事務的な手続きが

済み次第、臨床研究へ歩を進める予定である。必要量の GMP レベル AAV8/FIX ベクター量作製のための予算獲得もこれからの課題である。血友病 A でも基本的には同様であろうと推測されるが、サルでの発現実験を行う予定である。血友病 A クローンボタの作製にも成功したので欠損動物で発現 FVIII 活性測定も可能な実験系が確立出来た。MSC より樹立した iPS 細胞や MSC に、SIV ベクターで FVIII 遺伝子を導入して、ナノシートを作製し、腹腔内や皮下に移植して FVIII を発現させる実験も着実に進行している。さらに FVIII を導入した MSC を血友病 A マウス関節に注入することで血友病関節症を予防する試みは、期待以上の効果が得られ、臨床応用の可能性を検討中である。

## II. インヒビター(同種抗体)対策

ヒト FVIII を生下時に血友病 A マウス血中へ、或いは生後数日以内に胸腺へ投与して FVIII 特異的寛容誘導する技術は確立し、海外での賞も獲得した。また大量 FVIII 投与による寛容誘導(ITI)を血友病マウスモデルで確立した。間歇・持続投与方法での免疫応答の違いと、その際の脾臓免疫担当細胞などの解析も進めた。また、ITI 誘導には FVIII 至適濃度が存在する可能性などが示唆された。インヒビターレベル測定法としての Bethesda 法は検体希釈に問題のあることから、希釈溶液などに工夫を加えた東京変法などが標準化に向けて検討された。

後方視的調査解析からは、血液由来製剤と遺伝子組み換え FVIII 製剤にインヒビター発症頻度に差がないことが明らかになった。また家族内発生が示唆されたこともあり、前方視的解析の中で血友病遺伝子やサイトカイン遺伝子解析を、倫理審査後開始した。さらに前方視的解析に連動して日本における血友病患者データベースの構築を図っている。日本における血友病疫学調査研究の全ての論理的基盤として期待される。

## III. QOL 向上のための調査研究

二次アンケート調査から、中等症血友病患者も重症患者と同等の頻度で出血することが示唆された。中等症は、分子異常のため、因子が血中に放出されない例が多い。他の凝固因子の空間配置調整作用で補酵素活性を発現する分子量 30 万の巨大分子である FVIII の立体構造変化による生体内止血に果たす役割の変化は、便宜的な試験管内凝固活性で測定できない可能性が高い。遺伝子解析などによる再分類の可能性を世界に発信できることを期待したい。

対象を、患者、母親、医療従事者、教育関係者などに広げ、多くの視点からの切り口を期待した、インタビュー形式による薬害 HIV 感染被害が血友病患者とその家族に与える影響解析は、一片のアンケートでは計り知れない患者の有する問題を浮き彫りにした。HIV 感染が、出血症状を示す血友病の社会的偏見を著しく高めた。HIV 感染の、現状の情報不足が原因していることも多いことから、海外論文の翻訳や、ホームページを立ち上げるなどして正確な知識の周知を図る対策を進めている。また、遺伝に関係しない父親の家族におけるスタンスに問題のあることが明らかになり、遺伝相談も積極的に進める活動を展開し、一定の成果を上げつつある。

研究分担者：

自治医科大学遺伝子治療研究部  
教授 小澤 敬也  
奈良県立医科大学小児科学教室  
教授 嶋 緑倫

自治医科大学バイオイメーjing  
研究部 教授 高橋 将文  
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

## A.研究目的

血友病は血液凝固因子 VIII(FVIII)、或いは IX(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時因子製剤補充療法が中心で、不慮の致命的頭蓋内出血等の予防は不可能である。過去に HIV や HCV 感染の原因となった因子製剤の安全性・利便性は改善されたが、製造時の異物混入などの問題は残る。遺伝子治療はこれらを解決し、血友病に治癒をもたらす。さらに、数%の因子レベル発現で治療目的を達することが出来るので遺伝子治療対象疾患としても血友病は適している。製剤使用量を減少させることが出来れば、経済効果も期待できる。一方、製剤による補充療法では、因子製剤の著しい改良にも関わらず、高頻度に出現する同種抗体(インヒビター)が重要な問題として残る。患者の苦痛という点からのみならず、経済的にも克服しなければならない極めて重要な課題である。患者の QOL に目を向けると、血友病を生き抜くための、患者、および家族の精神的・社会的負担は極めて大きく、その改善のための課題は多い。さらに、過去の薬剤による HIV や HCV 感染は血友病が出血を伴うこともあり、血友病そのものに対する社会的偏見を高めた。その偏見をなくし、患者 QOL を高めるために具体的に取り組むべき問題

の把握とその解決に向けた対策の樹立は極めて重要である。血友病患者のこれらの課題を克服するために、以下の研究を進める。I.遺伝子治療に関しては、臨床研究開始に向けて、サルを用いて、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 8 を用いて肝臓を標的にした血友病遺伝子治療研究を展開する。相同性の高いサルヒトの FIX を識別しうるモノクロナル抗体(世界唯一)を用いて、血友病 B 遺伝子治療技術確立を先行して進める。抗 AAV 抗体測定系の感度改善や、抗体陽性個体に対する安全で確実な治療技術を開発する。ヒト投与可能(GMP レベル)AAV ベクター作製依頼企業を選択し、契約-作製へと歩を進める。血友病 A ではサルでの発現因子測定系確立と、発現 FVIII 活性確認目的に血友病 A クローンブタを作製する。さらに半永久的遺伝子治療を目指して、染色体組み込み型改変 SIV ベクター利用し、iPS 細胞や間葉系幹細胞に血友病遺伝子を導入し、細胞ナノシートを作製して体内臓器へ細胞移植、或いは関節内に注入するなど、除去可能や局所投与という安全のためのキーワードを基礎に検討する。II.インヒビター対策：インヒビターは製剤に対する同種抗体で、血友病特異的なものではなく、生体免疫の基本に関わる問題である。その克服の基礎は血友病因子に対する特異的免疫寛容確立である。基礎研究はこの点に焦点を絞る。まず、血液製剤大量持続投与による免疫寛容誘導(ITI)モデルを血友病マウスに作製し、投与方法などによる免疫応答差などの詳細を解析することで効率的寛容誘導法を検討する。さらに、胸腺投与等による寛容誘導の基礎的検討をマウスで進める。その他、インヒビター測定法標準化を目指した改良を検討する。また、バイパス製剤不応性の問題なども解析を進める。さらに、平成 19 年から

3年間に吉岡班で進められたインヒビターの後方視的解析により得られた情報を解析する。そしてこれを基盤に、前方視調査解析により、患者の遺伝子解析などをおしてインヒビター発症要因を検討する。同時に、日本にこれまで存在しない患者データベース構築を目指す。III.社会的 QOL 改善研究では実施した一次アンケート解析を基にした問題解決の試みと、カバーしきれなかった点などを改良した二次アンケートを実施する。また、薬害 HIV 感染血友病患者の問題解決のために患者・患者母親の聞き取り調査を手始めに、父親と同胞、さらに、医療従事者、教育関係者などへと展開し、解決すべき課題を明らかにし、今後の専門家を交えた支援策創出のための案を提示する。

## 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。以前の検討から体内標的臓器へ直接遺伝子を導入する場合は治療レベルでは殆ど染色体に組み込まれないAAVベクター、そして、*ex vivo*でiPS細胞、或いは幹細胞へ血友病遺伝子を導入し、細胞ナノシートを作製して細胞移植する場合は改変SIVベクターの利用を方針とした。AAVベクターは種差により発現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。

1)血友病B遺伝子治療:肝臓を標的臓器として、比較的特異性の高いAAV8ベクターに、肝臓特異的プロモーターとFIX遺伝子

を組み込み、AAV8FIXを設計した。これまでの検討により、遺伝子導入の可否は、血中抗AAV中和抗体の有無に由ることが示唆されたために、抗AAV8抗体測定系を、系に糖類を加える等の工夫を進めるとともに、測定系に用いる高感度細胞を検索した。この高感度測定系を用いて、サルとヒト(学内倫理審査を受けた後に、全国血友病患者ネットワークの協力を得て血友病患者の検体も収集した)の血中中和抗体を測定した。中和抗体陰性サルに、末梢血管よりAAV8FIXベクターを投与した。陽性サルにはバルーンカテーテルを腸管膜静脈から、肝臓の門脈の枝まで誘導し、血液と接しない形で安全にベクターを投与する技術の確立を図った。治療量のFIX発現を1.5年~2年間確認した後に、肝臓組織中のAAV8ゲノム量、及び生殖器を含むその他の臓器ゲノムの取り込みを検討した。GMPレベルAAV8FIXベクター作製を、予算、当地への視察、技術者との面談などを総合的に考慮して、ディナベック関連企業の中国政府系企業Vector Gene Technology Company (VGT)社に依頼した。作製したGMPレベルAAV8FIXベクターの精製レベル(SDS-PAGE)、empty capsid量(電顕)、等を解析するとともに、マウス、サルを用いて導入効率と発現レベルを検討した。さらに、品質検査を第三者機関に依頼する。

2)血友病A遺伝子治療:サル・ヒトのFVIII相同性は98%以上ある。また、AAVベクターに搭載可能な遺伝子サイズからB領域除去FVIIIの発現が限界である。自作・購入のモノクロナル抗体を用いて、発現させるB領域除去FVIIIをサルFVIIIと識別可能な系の樹立を試みた。さらに、発現した分子の生物活性確認のために農業生物資源研究所との共同研究として血友病Aクローンブタの作製を進めた。

3) 遺伝子導入細胞移植：改変 SIV ベクターを用いてマウス自己間葉系幹細胞 (MSC) に体外で FVIII 遺伝子、或いはルシフェラーゼ遺伝子を導入する。発ガンや、サイレンシングを抑制するために、トリグロビン由来インシュレータ CHS4 の導入方向による効果の検討、LAM-PCR 法による遺伝子組み込み部位の解析などを進めた。また、これらの細胞からナノシートを作製し、腹腔内や皮下、臓器への貼り付けなどによる FVIII 産生効率などを検討した。さらに、FVIII 導入 MSC を用いて、関節内細胞注入による、マウスでの血友病関節症予防効果の検討も行った。

II. インヒビター対策：基礎研究と今期より加わった調査研究の 2 つの小柱を立てて研究を展開した。

基礎研究：本体が同種抗体であることを鑑み、まず効率的で速やかな血友病因子特異的寛容誘導を目指した基礎研究を進めた。これまでの、血友病 A マウスに生下時に静脈から、或いは生後数日以内に胸腺へ直接ヒト FVIII を投与することで、制御性 T 細胞誘導を介する FVIII 特異的寛容が誘導されることから、ヒトへの臨床応用の可能性を探った。さらにプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 はその欠損によりマウスに鼻炎アレルギーの寛容を誘導することから、FVIII・PAI-1 のダブルノックアウトマウスを作製し、FVIII に対する免疫応答を観察した。ヒトに応用されている大量 FVIII 投与 ITI のメカニズム解析のために、感染させずに、ポンプを使用して持続的にヒト FVIII を投与できるシステム構築を目指した。そして、間歇投与と持続投与で免疫応答の差やメカニズムなどの検討を進めた。また、同種抗体に対するバイパス療法不応患者血液を解析して不応の原因を検討した。さらに、検体希釈法に問題のある

Bethesda 法を改良した Nijmegen 変法をさらに改善して Tokyo 変法で測定法標準化の可能性を検討した。

これまで吉岡班で進めてきたインヒビター後方視的調査の解析を進めた。また、前方視的解析を開始し、疫学的解析の基礎になる日本初の血友病患者データベース構築を同時に展開した。インヒビター発症要因探索は血友病遺伝子と炎症性サイトカイン遺伝子解析を解析施設の倫理審査を進めながら展開する。

III. 患者 QOL 向上のための調査研究：患者参加型アンケートは一次アンケートでカバーできなかった領域を含め二次アンケートを作成し、対象も医療関係者にまで広げて展開する。回収率向上のためにアンケート配付を直接依頼するなど幾つかの方法を試みる。

2) HIV 感染の社会的問題をより具体的に把握することも考慮して、まず調査対象としての了解を取り、手紙・電話で確認後、書面で同意を得た後、個人情報に十分配慮しながらインタビュー形式で、さらに当事者参加型アクションリサーチで調査を進めた。1 年目は薬害 HIV 感染血友病患者 20 件、そして非感染血友病患者 10 件と、それぞれその母親、2 年目は患者同胞と父親さらに医療従事者、3 年目は教育関係者へと調査対象を進めながら検討をすすめた。結果は随時発表するとともに、遺伝相談のシステム構築や、偏見を軽減させるために正しい情報の周知を目指してホームページを開設するなど具体的は活動へと展開した。

(倫理面への配慮)

本研究は、全体を通して、治療の効率の探求とともに、安全性に重点を置いて進めていく。遺伝子治療については、ヒトに対して病原性を持たない改変ウイルス vector を利用して遺伝子導入法の開発とその応用を

目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号）を遵守して施行する。各種動物を用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の十分な配慮など）を含めて厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び各大学の動物実験指針規定に沿って行う。霊長類医科学研究センターとの共同研究として独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで実施する予定のサルの実験では、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験ガイドライン」及び霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。臨床研究を実施する場合は、厚生労働省の倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に従い被験者の人権に配慮し、被験者に対する不利益や危険性を出来る限り排除するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して、人権を保障しながら適正に実施する。また、学内審査委員会及び必要な場合は国レベルでの審査を経た上で実施する。疫学調査に関しては疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）を遵守して施行する。

## C 研究結果

### I. 遺伝子治療

1) 血友病 B: AAV 既感染により生じる抗 AAV8 中和抗体は、低レベルでも AAV8 ベクターの効果を完全に阻害する。測定系は、

細胞に膜障害などを来さない低濃度の糖類を系に添加することに感染特異性の高い細胞を選択することで相乗的に改善し、2009年レベルの数百倍、現時点でも世界標準の数10倍高感度の系を確立した。霊長類センターのサル188頭、さらに学内倫理審査を受けて健常人と血栓止血学会の血友病部会の協力を得て血友病患者の検体を測定した。サルで72%、ヒトでは年齢に若干のバラツキはあるが、約半数が中和抗体陽性であった。中和抗体陰性サルに末梢静脈から製剤投与と同じように AAV8/FIX ベクターを投与したサルに3年に及ぶ10-30%のFIXの発現がみられている。中和抗体陽性サルには、まだ数頭ではあるが、バルーンカテーテルを門脈本幹まで誘導し、血流遮断、生食洗浄後、血液に接触しない形でベクターを投与し、5-10%のFIXの年余にわたる発現維持が確認されている。いずれのサルにも肝機能に問題となる異常は見られていない。1.5年経過した後、サルの数頭を安楽死させ解剖して AAV8 ゲノムの組織取り込みを確認した。発現量に見合う遺伝子は殆ど肝臓に確認されたが僅かに脾臓にも認められた。しかし、免疫染色にて脾臓でのFIXの発現は確認されなかった。生殖器へのベクター移行も全く見られなかった。組織学的にも慢性炎症や発ガンは確認されなかった。中和抗体陽性サルでは末梢静脈投与では遺伝子は証明できなかったが、バルーンカテーテル法で投与したサルでは、発現に見合う AAVゲノム量が肝臓に確認された。GMPレベル AAV8 ベクター作製を依頼する VGT 社は、既に技術者面接及び施設確認は終了していたが、まず non-GMP レベル AAV8 ベクター作製を依頼して品質検査の結果、作製依頼が可能であることを再度確認し、GMP レベルベクター作製を正式に依頼した。GMP レベル AAV8 ベクター作製では、



VGT 社のこれまでのヘルペスウイルス利用ヘルパー法が効率が悪く利用できないことが明らかになった。急遽、自治医科大学グループ、及びディナベック技術者が数回にわたり訪中し、プラスミドトランスフェクション法を技術指導し、その後の精製法も頻回に指導し、GMP レベル AAV8.FIX を作製した。SDS-PAGE 解析で精製度は極めて高く、電顕により確認された遺伝子を搭載していない empty capsid も 30% と比較的低いレベルであった。

血友病 B マウス、及びサルを用いて発現実験を試行したところ、これまでサルの実験に用いてきた non-GMP レベル AAV8.FIX ベクターと発現レベルも発現維持に関しても同等レベルであることが確認できた。現在第三者機関に依頼して毒性などの品質検査を進めている。臨床研究開始に向けて、自治医科大学で、これまでのパーキンソン病での遺伝子治療経験などを参考にプロトコル作成の準備を進めている。

2) 血友病 A 遺伝子治療研究：ファージライブラリを利用して作製したモノクロナル抗体に、自作および市販の FVIII モノクロナル抗体を組み合わせることで、サルに発現する B 領域除去 FVIII をサル FVIII と識別して 1% レベルで測定できる系が漸く確立出来た。B 領域除去 FVIII を発現させるために、その活性確認を目的に、動物愛護・倫理的問題を考慮して、サルではなく血友病 A クローンブタを作製した。既に 5 頭まで出産したが、いずれも出血傾向が強く、ヒト FVIII 投与による止血治療にても 1 ヶ月維持が限界であった。実験動物として用いるにはヘテロブタ作製が不可欠でその作製に取り組んでいる。

3) 改変 SIV ベクターを用いた血友病 A 細胞治療：SIV ベクターを用いて、iPS 細胞、或いは間葉系幹細胞(MSC) に FVIII 遺伝

子を ex vivo で導入した。ルシフェラーゼ遺伝子導入による可視化にも成功した。iPS 細胞は血友病 A マウス MSC に山中 4 因子を導入して確立した。まず、random に染色体に取り込まれる SIV ベクターの安全性確認のためにインシュレータ検討と組み込み位置の確認を LAM-PCR 法により行った。トリグロビン由来インシュレータは逆向き挿入によりクローナル増殖抑制効果が確認できた。FVIII やルシフェラーゼを導入した細胞を用いて、細胞ナノシートを作製し、その複数枚を腹腔内、皮下他。複数組織に移植して、移植細胞維持可能期間や血中 FVIII レベルなどを検討している。また FVIII 導入 MSC を、針による血友病 A 関節障害マウスモデルの関節内へ注入し、対照としての FVIII 製剤全身投与や、MSC 単独関節内注入マウスと比較した。FVIII 導入 MSC は、急性出血に対しても、また長期にわたる血友病関節症進行予防にも著明な効果を示した。注入された MSC は組織化学的検査にて、軟骨や、骨に分化するが、分化しても FVIII 因子を発現し続けることも確認できた。

## II. インヒビター対策

1) 基礎研究：血友病 A マウスへヒト FVIII を週 5 回で、60 回投与日にインヒビターかはピークとなり 160-200 回投与後、ピークの 20% 以下に低下した。輸注ポンプで持続的投与すると ITI 誘導の効率が高まることが確認された。ITI 誘導に成功したマウスの解析からは、投与する FVIII 量に至適領域が存在することや、IgG2b および IgG3 の有意な低下が見られることが明らかになった。ITI マウスの脾臓由来細胞とリンパ節由来単離リンパ球では、FVIII 刺激による有意な CD4+T 細胞増殖活性低下が確認できた。次に、PAI-1 をノックアウトした血友病 A マウスは、条件付け無しに、胸腺内

FVIII 投与により誘導される免疫寛容と同様の寛容が存在することが明らかになり、その機序を解析中である。活性化プロトロンビン複合体によるバイパス療法不応例患者血液を解析した結果、不応はロット差のみられる製剤混入外因系インヒビター集積に由ることが明らかになった。インヒビター測定法として古くから使用されてきた Bethesda 法は、検体希釈に血清干渉が強く、希釈検体では値が信頼できないことが明らかにされていた。インヒビターの存在しない血友病 A 血漿で希釈することが最も理にかなっているが、緩衝液を変えて工夫することで、かなり希釈による信頼度が向上することが明らかになった。今回検討した中では東京変法がもっとも優れており、標準化に向けて検討を進めている。

2) 調査研究：後方視的調査を詳細に統計解析した結果、血液製剤由来血友病 A 製剤と、組み換え製剤の間に同種抗体発現頻度に差のないことが明らかになった。また、独立因子ではないが、家族集積のあることも示唆された。前方視的解析は、長期的展望に立ち着実に歩を進めており、患者データベースが蓄積しつつある。同種抗体発症要因としての、患者遺伝子解析は、奈良県立医大、東京医大、名古屋大学医学部などで倫理審査が終了し、血友病遺伝子とサイトカイン遺伝子解析が進行している。

### III. 患者 QOL 向上のための調査研究

1) 定年後の問題など、一次解析で漏れた事項について重点的にアンケート案を作成し、医療関係者も対象に配付した。回収率向上の工夫をしたが、十分ではなかった。しかし、中等症と診断されている患者に、重症患者と同じくらいの頻度で出血エピソードが起きることが示唆された。現在の便宜的重症度の分類に問題があると考え、遺伝子解析や FVIII 分子異常の分子生物学的解析

を計画した。また、幾つかの障害者特例を加味しても就労現状は、血友病患者にとり不利であることなども明らかになった。

3) 薬害 HIV 感染血友病患者とその母 20 例と非感染血友病患者及びその母 10 例のうち、HIV 家系 1 件の同意撤回による離脱を除いて、概ね 2 時間のインタビューは特に問題を生じなかった。HIV 感染被害後、それまでもあった血友病に対する社会的偏見が著しく高まったことが明らかになった。また、遺伝に直接関係のない父親や同胞の、家族内におけるスタンスに問題があり、父親の消極性や遺伝知識の乏しさなどが明らかになった。これらの観点は医療関係者や教育関係者との解析と対策をも盛り込んだアクションリサーチでも同様であり、正確な知識の周知のためにホームページを立ち上げ、また、海外論文の翻訳なども進めた。また遺伝相談所を設立し、正確な遺伝情報を伝える活動も展開した。

## D 考察

### I. 遺伝子治療

1) 血友病 B 遺伝子治療：AAV8 ベクターを利用したサルでの遺伝子治療は我々が最先端にあり、臨床研究開始も可能であると考え。英国 Nathwani 等のグループが昨年暮れに、double strand が AAV8 ベクターを用いて、肝臓を標的にしたヒト血友病 B 遺伝子治療結果を報告した。抗 AAV8 抗体陰性患者に治療レベル FIX を 1 年近く発現維持可能で、高容量ベクター投与例に一次的に肝逸脱酵素の血中内レベル上昇がみられたが、殆ど副作用なく経過している。

しかし、中和抗体陽性例には成功していない。また、サルへヒト FIX 識別可能なモノクロナル抗体を有しないためにサルの実験を必要最小限で済ませている。使用したベクターも empty capsid 含有量が 6 割とさ

れ、我々のベクターの方がこの点でも優れている。使用したベクター量はサルを用いた我々の実験結果と大差はないが、サルとヒトの体重差を考えるとかなり大量の GMP レベル AAV8 $FIX$  の準備が必要と考えられる。中国 VGT 社を指導して作製した我々の GMP レベル AAV8 $FIX$  ベクターはこれまでの解析により品質・活性とも問題のないことが確認されているが、ベクター量確保のための予算が必要になる。約 50% の患者は中和抗体陽性であり、抗体陽性例への我々の投与技術は世界最先端にある。染色体に殆ど組み込まれない AAV ベクターによる治療は細胞分裂に伴い数年先には効果が減弱されてしまう可能性が高い。我々の中和抗体陽性例への投与技術は繰り返し治療可能性を示唆し、その AAV ベクターを用いた遺伝子治療における意味は極めて大きい。英国から報告された血友病 B 遺伝子治療に要した費用は 1 人約 3 万ドルである。ヒトでこれまでに 1 年以上、また我々のサルで 3 年以上発現持続がみられることを考慮すれば十分な経済効果期待できる。日本での事務的手続きに時間を要すること、大量の質の良いベクターが必要なことを考えれば、もう少し時間を要するが、血友病 B については日本でもほぼ準備が整ったといえる。事務的手続きを進める間に中和抗体回避投与技術のブラッシュアップを図り、効率と安全性をさらに高める技術が確立出来ることを期待したい。

2) 血友病 A については基本的に血友病 B と同様に進めうることが期待されるが、発現分子が異なるので、サルで必要な実験を進める必要はある。血友病 A クローンブタも、truncated B 領域除去 FVIII を発現させるので、その活性の確認は意味があるものとする。またインヒビター対策モデルとしても大きな期待が寄せられている。改

変 SIV ベクターの扱いも P2 となり、ディナベックで GMP レベルベクター作製技術もほぼ確立された。SIV ベクターを用いて MSC に FVIII 遺伝子を導入し、関節内注入による血友病関節症の予防治療は、効果・安全性から言っても最も臨床に近く、アンケートにおける QOL を左右する関節内出血に福音をもたらすことが期待できる。SIV による FVIII 遺伝子を導入した MSC や iPS を用いたナノシートは枚数を増加させたときの栄養血管増殖に一定のブレークスルーが必要だが、除去可能部位に貼り付けて半永久的遺伝子治療可能な方法としての魅力は大きい。

## II. インヒビター対策

1) 基礎研究：FVIII 製剤の超早期投与による寛容誘導法の基礎解析は極めて興味深い、フランスのグループから臨床応用の打診があったが、日本では血友病 A ブタなどの高位動物を用いた基礎実験が臨床研究開始には必要であるとする。ITI に用いる FVIII 製剤に量的に至適領域が存在する可能性のあることはさらなる検討が望まれる。また、基礎的検討をとおして、インヒビター患者に ITI 療法が有効か否かのマーカーが同定できれば、大量の製剤による長期治療を鑑みると。経済的にも時間的にも資するところ大なりと考える。

2) 調査研究：後方視的調査の解析により、日本でも、血液製剤由来、或いは組み替え製剤の間に同種抗体産生に差がないことが確認された。エピトープにも差がないかなどは今後の課題であろう。家族内集積が明らかにされたが、重症患者同様、独立した因子ではないかも知れないが、遺伝子解析などの必要性を示唆するものといえよう。前方視的解析は、これまでに日本に存在しない血友病患者データベースの構築という意味で極めて重要な意味を持つ。疫学的解

析の全ての資料になるもので、海外との比較、日本人の特殊性解析、治療法の評価など全ての基本になる。幾つかの施設で倫理審査も終了し、同種抗体産生要因を遺伝子レベルで解析できるようになった意味は大きい。明らかになれば何らかの予防手段確立への一歩となる。

### III.QOL 向上のための調査研究

一次アンケート解析の結果、関節内出血が患者 QOL を左右することが示唆された。今期はその対策として、関節内出血予防のための FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内注入などの具体的対策を検討し、臨床応用可能な期待の持てる成果が得られた。二次アンケートでは一次アンケートで漏れた内容を調査したが、中等症と分類されている患者さんの出血頻度が重症患者とあまり差がみられないことが指摘されたことであった。患者判断であり、回収率の問題、重症患者よりは活動度が高いなど、考慮しなければならない点も多いが、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。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、分泌障害が起きて、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。薬害 HIV 感染血友病患者とその家族、さらに医療関係者、教育関係者の聞き取り調査手法は、多視点から、より具体的に患者の問題点を明らかにして、血の通った政策提言と達成プログラム作成に結びつくことが期待できる。血友病患者とその家族全体の抱える遺伝問題相談の対策やホームページの起ち上げは、情報公開・共有による効果的解決に向けた第一歩と考えられる。

### E.結論

血友病患者 QOL を高めるために 3 本の柱を立てて研究を進めた。

I.血友病遺伝子治療：血友病 B 遺伝子治療はサルでは達成し、技術的には世界最先端にある。AAV8 中和抗体陽性個体への投与技術も世界に先駆けてほぼ確立した。ヒト投与可能な AAV8FIX ベクターも調達可能になった。ただ、Nathwani 等の結果からは、ヒト臨床研究には量的にかなり必要であることが明らかになった。資金準備は必要である。事務的手続きが終了し、必要量の AAV8FIX ベクターの準備が整い次第、臨床研究へ歩を進めることが可能である。血友病 A 遺伝子治療研究もサルでの測定系が確立し、サル実験へ歩を進めることが可能になった。また、発現因子活性確認のための血友病 A クロンプタの作製にも成功した。改変 SIV ベクターを用いて FVIII を導入した MSC より作製したナノシートの体内移植による遺伝子治療にも一定の進歩が得られた。血友病関節症予防のための FVIII 導入 MSC の関節内注入も、長期間効果のあることが確認され、臨床応用可能性が示唆された。

II.インヒビター対策：基礎検討では、生後間もない期間の FVIII 特異的寛容誘導が血友病 A マウスレベルでは可能になった。血友病 A マウスを用いた ITI 研究から投与 FVIII には至適レベルがある可能性が示唆された。インヒビター活性測定法の改善にも一定の進歩がみられた。後方視的インヒビター調査研究解析からは、血漿由来製剤と組み替え製剤にインヒビター発症頻度に差がないことが示された。家族内発生が示唆されたことは前方視的解析における、血友病遺伝子とサイトカイン遺伝子を解析する論理的基盤となる。前方視的解析による

日本の血友病患者データベース作成の確実な歩みが開始された。

III.QOL 向上のための調査解析：患者参加型アンケート調査から、血友病重症度の見直しが患者サイドから指摘されたことは驚きでもある。遺伝子解析による再分類を世界へ発信できることを期待したい。薬害 HIV 感染被害血友病患者とその家族を中心に、医療関係者や教育関係者まで含めた聞き取り調査は、HIV 感染後の血友病への社会的偏見の著しい高まりや、遺伝に関係のない父親の家族における問題などを明らかにした。遺伝相談やホームページの起ち上げによる情報共有などの具体的な対策も進みつつある。

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
総合(分担) 研究報告書

血友病遺伝子治療基礎実験 (分子生物学的解析)、  
血友病遺伝子治療の基礎実験

研究者 坂田洋一 自治医科大学 教授  
三室 淳 自治医科大学 准教授  
窓岩清治 自治医科大学 講師  
大森 司 自治医科大学 講師

研究要旨

血友病 A 遺伝子治療: In vivo へのベクターの直接投与には染色体への組み込みがほとんどおこらないアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用い、ex vivo にて細胞へ遺伝子導入し再移植する遺伝子細胞治療には染色体への組み込みが必要であるため SIV ベクターを用いることとした。肝臓以外の組織・臓器に遺伝子発現を起こさないことが導入遺伝子産物への免疫反応を軽減することに重要であることが示された。ヒト FVIII は血友病 A マウスでは血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、AAV8 ベクターを用いること、および免疫反応を制御することで、血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を 50-100% に維持することが可能となった。よりヒトに近い種属の血友病モデル動物 (血友病 A クローンブタ) の作製に成功した。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。トリグロビン HS4 インスレーターを SIV ベクター-U3 に組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。遺伝子細胞治療として、SIV ベクターをもちいて間葉系幹細胞に導入し、血友病マウスへ移植し効果を確認出来た。血友病 B 遺伝子治療: マウスでの検討を終え、カニクイザルを用いた前臨床実験を遂行している。ヒト FIX 特異的モノクロナル抗体で検出可能な変異カニクイザル FIX (FIXT262A:262 位の Thr を Ala に置換) を発現する AAV8 ベクターを作製し、サル末梢静脈あるいは腸間膜静脈枝から同ベクターを投与したところ、AAV8 中和抗体陰性の 4 頭では治療レベルの導入遺伝子由来 FIX 発現が得られた。しかし、既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価でも存在するサル 3 頭では腸間膜静脈からベクターを投与しても血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。中和抗体の AAV8 ベクターの遺伝子導入阻害を回避するベクター門脈内投与法を抗 AAV8 中和抗体陽性のカニクイザル 3 頭にて試み、治療域に達する FIX 発現がえられた。本手法を臨床手法に近づけるためマイクロカテーテルを用いた門脈内ベクター投与を行い抗 AAV8 中和抗体陽性の 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  $5 \times 10^{11}$ /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、ある週齢のマウスにおいては胸腺に直接ヒト FVIII を投与することでヒト FVIII に対する免疫寛容を誘導することができた。また、マイクロポートインジェクションシステムを用いてヒト免疫寛容誘導療法のマウスモデルを確立した。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。AAV Rep 遺伝子を用いた染色体 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組込を検討した。SIV ベクターヘトリ SH4 インスレーターを組み込み遺伝子導入細胞の増殖への影響を検討した。

血友病 A マウス (血液凝固第 VIII 因子 (FVIII)

欠損マウス) より MSC を分離した。間葉系幹細胞に SIV を用いて FVIII 因子を発現させた。凝固因子を発現する MSC をマトリゲルと共に皮下に移植し血中凝固因子の発現を ELISA で測定した。また関節腔内へ凝固因子発現 MSC を移植し、血友病性関節症の予防効果について検討した。サルの実験ではヒト FIX に対して、抗体産生が見られたために、サル型 FIX 遺伝子をクローニングし、発現 FIX の定量的同定を目的の一部をヒト型に改変した遺伝子を作製し検討した。

B インヒビター対策: 胸腺組織を標的とした FVIII 特異的免疫寛容誘導法、マイクロポर्ट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

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：これまで、導入遺伝子由来 FVIII に対する抗体産生を防ぐためには、肝臓以外の組織に FVIII 遺伝子発現を起こさないことが重要であることが明らかとなった。ヒト FVIII はマウスにおける血液半減期が極めて短く血液レベルを高めることがこれまで困難であったが、HCRHAAT プロモーター搭載ベクターを用いることで血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を正常の 50%以上を上昇させることが可能となった。ヒトでの血友病 A 遺伝子治療臨床研究でも FVIII 遺伝子導入後に FVIII に対し新たにインヒビターを発生する可能性がある。ヒト FVIII は血友病 A マウスに対して免疫原性が強く、インヒビターを高頻度で発生することから、血友病 A マウスを用いて検討したところ、免疫反応を制御することでヒト FVIII 遺伝子導入時のヒト FVIII に対するインヒビター発生抑制にも成功した。この成果はインヒビター対策にもつながる成果と考えられた。トリグロビン HS4 インスレーターを SIV ベクター-U3 に

組み込むことで SIV ベクターによる遺伝子導入血液細胞のクローナルな増殖抑制効果が得られ、SIV ベクターの安全性を高める可能性が示唆された。また、ヒトに近い種属の血友病モデルの作製も順調にすすみ、血友病 A クローンブタを得た。血友病 A クローンブタは血友病 A マウスと異なり生下時から出血傾向を示し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。新たに作製したモノクローナル抗体を用いて、内在性カニクイザル FVIII と導入遺伝子由来のカニクイザル FVIII を識別するための検出方法を構築でき、カニクイザルでの FVIII 発現実験を行っている。AAV Rep 遺伝子を用いた 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組込が高効率で行えることが示唆され、マウスを用いた FVIII 遺伝子を 19 番染色体 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組込んだ FVIII 発現細胞の移植実験を検討中である。SIV ベクターをもちいて間葉系幹細胞に遺伝子導入し、*ex vivo* で作製した細胞シートをマウス腹腔に貼り付けることで、遺伝子発現が確認できた。また、SIV-PAI-1p-FVIII を感染させ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、滑膜肥厚やヘモジデリン沈着など血友病性関節症の発症を有意に抑制した。

血友病 B 遺伝子治療：ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はカニクイサルでは Thr である。この部



に対しては抗体産生が見られなかったので、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るようにした。この変異カニクイザル FIX を発現する AAV1 ベクターをカニクイザル骨格筋に投与することで3頭において変異カニクイザル FIX の血液レベルを 4-40%で長期間維持することが可能であった。しかし、マウスで1000%以上の FIX レベル発現をえることができる第 IX 因子遺伝子搭載 AAV8 ベクターを、抗 AAV8 中和抗体陰性のサル末梢静脈から投与したところ4頭において治療域(2-20%)の FIX 発現が得られた。しかし、既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価であっても存在するサルでは、同ベクターを腸間膜静脈枝から投与しても FIX の発現は 0.1%以下で治療効果に至る発現は得られなかった。AAV8 ベクターによる遺伝子導入を阻害する中和抗体が存在するカニクイザルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を試み、サル3頭において10%前後の FIX 発現がえられた。この手法を、マイクロカテーテルを用いて3頭のサルで行い治療域(2-5%)の FIX 発現が得られたことから、抗 AAV 抗体が存在していても遺伝子治療が可能であると示唆された。また、いずれの実験においても、マウスで高い遺伝子導入効率のある AAV8 ベク

ターも、カニクイザルではマウスと比較し1/10以下の遺伝子導入効率であり、非ヒト霊長類を用いた前臨床実験が必須であることが示唆された。血友病患者血液中の抗 AAV8 抗体を測定したところ、年齢が上がるに比例し抗 AAV8 抗体陽性率が上昇することが分かった。血友病 B 遺伝子治療臨床研究に向けて作製された納入された 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。GMP-AAV8hFIX の純度は電気泳動解析で極めて高く、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  $5 \times 10^{11}$ /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効率は、これまでマウス・サル前臨床研究で用いてきたベクターと同等であった。

インヒビター対策：高解像度超音波ガイド下に、血友病 A マウス胸腺組織にヒト遺伝子組み換え第 VIII 因子を投与したところ、胸腺内非投与群と比較してインヒビターの発生率は有意に低値であった。CD4<sup>+</sup>T 細胞、抗原提示細胞(APC)およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を単離し、*in vitro*でのサイトカン産生を ELISA 法により、CD4<sup>+</sup>T 細胞増殖活性を <sup>3</sup>H-thymidine の取り込み率により評価した。胸腺内投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞は、胸腺内非投与マウス由来 APC 共存下で

第 VIII 因子刺激に対して増殖活性を示さず、IL-2、IL-12 および IFN- $\gamma$  も産生しなかった。胸腺内投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は、第 VIII 因子刺激に対する胸腺内非投与マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制した。この抑制効果はナイーブマウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞ではみられなかった。血友病 A マウスに対して、経皮経頸静脈的にカテーテル先端を上大静脈に留置し、背部皮下にマイクロポート本体を植え込む方法を導入することにより、安全で再現性のある手術技法を確立し、血友病 A マウスに対して、FVIII 投与量や投与間隔を変えることにより、免疫寛容誘導が成立するマウスが得られ、ヒトでのインヒビターに対する免疫寛容誘導療法のモデルが得られた。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 因子の欠損が抗原特異的な免疫寛容をもたらすものと考えられ、PAI-1 を介する免疫応答を明らかにすることで、インヒビター産生制御の手がかりがえられると思われた。新生仔血友病 A マウスへヒト FVIII 遺伝子搭載 AAV ベクターを投与することで抗体の産生を防ぐことができた。FVIIa 遺伝子を搭載した AAV8 ベクターを血友病 A マウスへ投与することで血友病 A マウスの出血症状を完全に抑制できた。FVIIa を血小板に、あるいは肝臓に発現させる試みもインヒビター

対策の一つになると思われる。

#### D. 考察

AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。インスレーターを SIV ベクターに組み込むことで遺伝子組み込みによる周辺遺伝子への影響を抑えることができることが示唆され、SIV ベクターの安全性を高められると考えられた。しかし、ヒト応用には、これらの成果の中型動物での実験と、サルでの長期安全性の検討が必要と考えられる。サルは種々の AAV に既感染のことが多く、中和抗体が存在するためサルの利用は容易ではないが、AAV 抗体測定法の改良によりこの問題も解決されつつある。AAV8 に対する抗体陽性のサルで、選択的バルーンカテーテルを用いてサル肝臓にベクターを投与する投与法は、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められた。血友病患者血液の検討からも既感染に基づく AAV に対する中和抗体による遺伝子導入阻害はヒトにおいても同様な問題であるが、その解決方法がえられた。血友病 B 遺伝子治療研究に向けて作製した GMP グレード AAV8 ベクターは、純度が高く生物学的活性もこれまでのマウス、サルに用いてきたベクターと同等であった。血友病 B 遺伝子治療はサルをもちいた前臨床実験が行えているが、血友病 A 遺伝子治療実験はマウスを用いた実験にとどまっている。中型血友病モデル動物が作製

できつつある。解決すべき問題点は明らかになっており、血友病 A 遺伝子治療の前臨床実験を行うために、導入遺伝子由来サル第 VIII 因子の検出系を確立しつつある。遺伝子細胞治療では、マウスにおいて局所への投与で成果がえられているが、さらに全身的な効果がえられるように検討を進める。

インヒビター対策としてウイルスベクターによる肝臓への遺伝子導入や胸腺を標的とした免疫寛容誘導により一定の成果がえられた。さらにヒト免疫寛容誘導療法のモデルも確立しえたことから、今後の方向性が明らかとなった。また、FVIIa の肝臓あるいは血小板への遺伝子発現はインヒビター治療の方法となりえると考えられる。

#### E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマウスレベルでは確立出来た。しかし、安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗体を持つサルにおいても新たに開発したベクター投与方法により治療レベルに達する第 IX 因子発現がえられているが、現時点ではマウスでの成績に匹敵する結果が得られていない。これらの問題点が明らかにされ、技術的にも克服可

能となってきている。インヒビターに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療の確立が今後の課題であるが解決の糸口も見えてきた。

#### F. 研究発表

##### 1. 原著論文

1. Ohmori, T., 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 therapy 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  $\alpha$ 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. Ohmori T, Madoiwa, S, Mimuro J, Sakata Y.: Development of platelet-directed gene modification by lentiviral vector. *Rinsho Ketsueki.* 51(8):625-31, 2010.
  9. Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y.: Mutant macaque factor IX T262A: a tool for hemophilia B gene therapy studies in macaques. *Thromb Res.* 125(6):533-537, 2010.
  10. Mimuro J, Mizuta K, Kawano Y, Hishikawa S, Hamano A, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Madoiwa S, Kawarasaki H, Sakata Y.: Impact of acute cellular rejection on coagulation and fibrinolysis biomarkers within the immediate post-operative period in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 14(3):369-376, 2010.
  11. Ohmori, T., Kashiwakura, T., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T., Sakata, Y.: Vinculin activates inside-out signaling of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(3) 323-328, 2010
  12. Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Furukawa, Y., Sakata, Y.: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem.* 285(41)31763-31773, 2010.
  13. Ishiwata, A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med.* 11(11):1020-1029. 2009.
  14. Ishikawa, J., Okada, H., Kato, H., Takeshita, S., Honda, S., Kawasaki, T., Suehisa, E., Tuji, H., Madoiwa, S., Sakata, Y., Kojima, T., Murata, M., Ikeda, Y., Kokubo, Y., Okamura, T., Tomoike, H., Miyata, T.: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor- $\beta$  with plasma total tissue factor pathway inhibitor level. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 20(1):22-26, 2009.
  15. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Kobayashi, E., Hakamata, Y., Dokai, M., Makino, N., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 7(5):811-824. 2009.
  16. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 124:14-18. 2009.
2. 学会発表
1. Yoichi, Sakata., Hoyu, Takahashi., Hajime, Tsuji., Jun, Mimuro., Yutaka, Eguchi., Isao, Kitajima., Tadashi, Matsusita., 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. 57<sup>th</sup> Annual SSC M