

201226018A

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
(H24-エイズ-一般-004)

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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	15
(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	29
(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	42
(自治医科大学 菱川修司)	
6. 臨床研究用ベクターのGMP製造と品質検査法の確立に関する研究	46
(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	48
(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	53
(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	60
(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	65
(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	70
(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	75
IV. 研究成果の刊行物・別刷	78

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 名誉・客員教授

研究要旨

血友病は血液凝固第 VIII (FVIII)、或いは第 IX 因子(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療はそれぞれ FVIII、FIX 因子製剤投与が中心であるが、製剤で多くの患者が HIV や HCV に感染し、患者と家族に対する社会的偏見を生んだ。製剤による同種抗体（インヒビター）出現も、重要な克服課題である。これらを改善するために、血友病遺伝子治療、血友病インヒビター対策、そして血友病患者 QOL 向上のための調査研究の 3 本柱を立てて研究を進めてきた。本年度は、血友病 B 遺伝子治療では、臨床研究へ歩を進めるために、昨年中国企業を指導して作製した GMP レベルアデノ随伴ウイルス(AAV) 8 ベクターの、純度、発現活性、毒性などの品質検査を施行した。また、遺伝子治療効果を左右する AAV 既感染による抗 AAV 中和抗体が存在する個体でも遺伝子治療可能な抗体回避ベクター投与技術の確立と安全性をサル・ブタで検討した。作製した GMP レベル AAV8 ベクターの純度は極めて高く、empty vector は少なく、発現効率も non-GMP レベルベクターと差は見られなかった。品質検査でも毒性もなくヒト使用可能と判断された。しかし、欧米で先行する同じ AAV8 ベクターを用いた治療からは、我々のサルでの試算の 10 倍量ベクターを要することが示唆され、増産を図ったが、残念ながら尖閣問題勃発のため、中国企業での追加生産は不可能になった。急遽、新規ベクター産業を開始した日本タカラバイオとミーティングを重ね、悲願であった日本製で安全・高品質 AAV8 ベクター生産の約束を取り付けた。抗体回避ベクター投与実験ではサルでは被検 6 頭全てに治療レベル FIX の発現とその持続、そして安全性が確認された。ヒト投与へのシミュレーションとして大型動物ブタでも同投与方法の循環動態へ与える影響なども検討したが問題のないことが確認された。この技術により、欧米の技術では不可能な、AAV 既感染による中和抗体陽性患者(30%以上)にも血友病遺伝子治療が可能となった。さらに、この事は、肝臓を標的臓器とする遺伝子治療において、数年先に効果減弱が見られても、抗 AAV 中和抗体存在下で、繰り返し、染色体に組み込まれない安全な AAV ベクターを利用した遺伝子治療が可能であることを示唆し、画期的技術革新であり、その持つ意義は極めて大きい。血友病 A においては、FVIII のヒトサル相同性が極めて高いために、識別可能なモノクロナル抗体作製に困難を極めている。止血効果判定に必要な発現因子活性確認も視野に入れて、血友病 A クローンブタも作製した。また、アンケートで明らかになった患者 QOL を左右する関節内出血に対し、血友病 A マウスを用いて、改変サル免疫不全ウイルスベクターを利用して FVIII 遺伝子を導入した自己間葉系幹細胞を関節内へ注入することで、安全で有効に関節内出血予防・治療が長期にわたり可能であることを明らかにした。臨床応用に向けて研究を進めている。ちなみに、上記欧米で進められた血友病 B 遺伝子治療では 1 回の治療で、費用は一人約 300 万円と試算されている。単純に、3 年から 5 年間効果が持続すると仮定しても血液製剤による治療に比べ、遺伝子治療費用は 1/10 以下で済み、患者 QOL を高めるのみならず、医療経済的にも極めて優れた治療法であることが示唆される。血液製剤によるインヒビター対策として

は、基礎研究として線溶系因子とのダブルノックアウトマウスなどを利用して、免疫寛容誘導メカニズムを明らかにした。また、患者インヒビターエピソード解析を進めるとともに、前方視的日本初の患者データベース作成にリンクさせ、患者血友病因子遺伝子、及びサイトカイン遺伝子とインヒビター発生の関連を検討開始した。また、外的発生要因としての薬剤の違いなどについても検討を開始した。インヒビター測定の安定性と標準化を図る事を試み、希釈に少量高濃度緩衝液を添加する東京変法を確立した。また検体希釈には因子欠損血漿が最適であることを明らかにした。患者 QOL 向上を目指した調査研究として、まず、個人情報に十分配慮した上で、薬害 HIV 感染被害者とその家族 5 件に聞き取り調査し、分析討論会を通して、課題克服に向けた理論化と実践への示唆を得た。また、社会的課題として極めて大きな意味を持つ血友病保因者の結婚・妊娠問題などについて、準備性支援、遺伝相談などを視野に入れ、当事者参加型研究を目的に、本年度は自記式質問紙票の開発と配票を完了した。また、これまでの幾つかのアンケートで明らかにされた本邦血友病患者 QOL に関わる問題点を諸外国の患者と比較するために、本年度は、SF-36 を主体とした患者 QOL 調査表を作成し、配布した。

分担研究者：

自治医科大学分子病態研究部

准教授 三室 淳

講師 窓岩 清治

講師 大森 司

自治医科大学分子病態研究部

教授 小澤 敬也

准教授 水上 浩明

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

A.研究目的

血友病は血液凝固第 VIII (FVIII)、或いは第 IX 因子(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は高額な FVIII、或いは FIX 因子製剤投与が中心であるが、製剤で多くの患者が HIV や HCV に感染し、患者と家族に対する社会的偏見を生んだ。製剤は改良されたが、製剤による同種抗体 (インヒビター) 出現は、尚、重要な克服課題である。これらを改善するために以下の 3 研究を進める。

I. 血友病遺伝子治療:サルと、ヒトの FIX は 97%以上相同性がある。血友病のいないサルで導入遺伝子由来ヒト FIX 発現量定量は世界唯一の識別抗体を持つ我々のみが可能で、サルを用いて詳細な検討もできる。我々は、アデノ随伴ウイルス 8 型(AAV8)ベクターを用いて、サルでは血友病 B 遺伝子治療技術をほぼ確立した。このベクターによる標的臓器への遺伝子導入は既感染による血中抗 AAV8 中和抗体の有無に左右される(30%以上陽性で高齢者ほど陽性率は高い)。欧米では、抗体陰性ヒトのみで血友病 B 遺伝子治療臨床研究を開始し、約 1 年の発現維持を得ている。我々は高感度抗体測定系を開発し、陽性例に抗体回避遺伝子導入法をサルで検討

し、その技術の確立を図る。中国企業を指導し、GMP レベル AAV8 ベクターも作製し、品質管理検査契約も整った。作製したベクターを詳細に解析し、さらに、安全性・発現効率をサルで確認するとともに、臨床研究プロトコルを作成し、大学倫理委員会や国の許可取得にむけた手続きを進める。血友病 A 遺伝子治療については、血友病 B と同様の方法を応用するために、これまで成功していないサルとヒト FVIII(98%以上の相同性)を識別する抗体作製をさらに進めるが、同時に、血友病 A クローンブタの利用も視野に入れて遺伝子治療研究を進める。また、これまでのこの班におけるアンケート結果から、関節内出血が血友病患者の QOL を左右する大きな要因であることが明らかにされた。FVIII 遺伝子を改変サル免疫不全ウイルス (SIV) 由来ベクターを導入した間葉系幹細胞(FVIIIMSC)から作製した細胞ナノシートの移植効果や、細胞の関節内注入による関節出血抑制持続効果を検討する。血友病 A マウス由来 iPS 細胞も確立する。

II. インヒビター対策：血友病 A マウスを用いた寛容誘導基礎検討を線溶系インヒビター(PAI-1)の関与を中心に展開する。また、患者に生じたインヒビターエピトープ解析と、インヒビター測定法改善などの研究を進める。さらに、患者血友病・サイトカイン遺伝子や、製剤種類によるインヒビター産生の違いなどを、前方視的に本邦血友病患者データベース構築を図りながら解析する。

III. 患者 QOL 向上を目指す調査研究：HIV 感染被害血友病患者とその家族、さらに血友病キャリアーである女性を対象に、聞き取り調査を中心に必要な支援課

題検索や遺伝相談支援などを展開する。また、本邦血友病患者を対象にしたこれまでの QOL アンケート調査によりえられた結果を基礎に、SF-36 を用いて他の疾患や本邦と他国の血友病患者 QOL などを客観的に比較する。

B. 研究方法

I. 遺伝子治療：当班研究員が現地に赴き、100%指導により中国で作製した FIX 遺伝子搭載 GMP レベル AAV8 ベクターを抗 AAV8 中和抗体陰性サルに静注し、FIX 発現維持を観察する。SDS-PAGE や電子顕微鏡を用いてベクター純度を検定するとともに第 3 者機関に委託して、毒性、物性など品質管理検査を進める。必要な倫理規定を織り込み、血友病 B 遺伝子治療臨床研究プロトコルを作成する。また、抗 AAV 中和抗体陽性サルでバルーンカテーテル法による肝臓内遺伝子導入最適化を図り、ヒトに近い大動物、ブタでも安全性を検証する。また、自己間葉系幹細胞(MSC)、或いは、iPS 細胞を血友病 A マウスより作製して染色体組み込み型改変 SIV ベクターで FVIII 遺伝子を導入し、その利用を図る。これらの細胞からナノシートを作製し、臓器貼り付けなどの細胞治療を検討する。さらに、細胞を関節内注入して関節内出血を予防する技術の安全性と効果持続の検討をする。

II. インヒビター対策：インヒビター症例血液より抗 FVIII 同種抗体のエピトープを同定する。また、希釈法などに問題のあるインヒビター測定法の改善と標準化を図る。前方視的解析により、インヒビター発生に関わる内因子：血友病遺伝子、サイトカイン遺伝子など、また外因子として製剤種類や投与方法などを検討する。

並行して全国血友病患者データベース作成を試みる。効率的インヒビター寛容誘導を目的に、FVIII と PAI-1 のダブルノックアウトマウスを作製し、PAI-1 ノックアウトにより誘導される寛容メカニズムを詳細に解析する。

III. QOL 向上のための調査研究：HIV 感染被害血友病患者とその家族や、或いは、血友病キャリアーの女性、そして、医療関係者の参加するアクションリサーチ法により、当事者ニーズ・提案を研究に取りこむ。そして血友病ファクトシート改訂に取り組む。また、遺伝相談システムを改善し、遺伝問題解決支援も進める。以前の当班における研究結果に基づき、SF-36 を用いて、我が国血友病患者 QOL の 8 個の下位尺度と PCS、PMS のサマリースコアを算出する為のアンケート用紙を作成配布する。

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

中国 Vector Gene Technology(VGT) 社で作製した GMP レベル AAV8/FIX ベクターのマウスを用いた発現実験では、抗原量に見合う FIX 活性が確認された。また、サルを用いた発現効率は期待通りで、副作用もなく、1 年間発現も持続した。SDS-PAGE を用いた解析でも極めて純度は高く、電子顕微鏡を用いた解析でも、empty vector の混入は低く抑えられていた。毒性他品質試験も問題なく終了した。しかし、欧米での血友病 B 遺伝子治療臨床研究では、10 の 15 乗 vg の AAV8 ベクター製造が必要であったと報告され

た。我々のサル実験からの試算の 10 倍量以上だが、尖閣問題が勃発し、中国 VGT 社からのベクター供給追加は不可能となった。急遽、新規ベクター産業を開始した日本タカラバイオへ研究班参加と協力依頼を試み、数度にわたるミーティングを経て日本製 GMP レベルベクター作製が約束された。バルーンカテーテルを用いたサルでの抗体回避遺伝子投与実験は 6 頭全頭遺伝子由来 FIX の治療量発現が確認され、副作用も見られなかった(論文受理)。ブタでのシミュレーションでも肝容量 25%相当量ベクター溶液門脈急速注入では循環障害などを惹起しなかった。バルーンカテーテル法で門脈左枝とその分岐内に 1 分以上造影剤を停留させる技術も確立した。臨床研究プロトコール作成は自治医大パーキンソン病遺伝子治療に関わった医師を中心に開始している。世界で初めて血友病 A ブタ作製も成功した(論文受理)。また、血友病 A マウス関節内へ FVIII 遺伝子を導入した MSC を注入することで、長期に関節出血予防可能な技術を確立した(論文受理)。血友病 A マウス由来線維芽細胞から iPS 細胞の樹立に成功し、遺伝子治療・インヒビター研究への応用可能となった。インヒビター発症予防のための患者遺伝子解析と血友病患者データベース化(151 例)を中心とする前方視的解析は順調に進んでいる。Bethesda 法では低力価インヒビター測定において、希釈割合が低いいため、緩衝液効果が十分得られない。これを改善した Nijmegen 変法を改良した東京変法インヒビター測定法の開発など診断標準化を目指した研究も一定の成果を上げた。検体希釈に因子欠損血漿を用いる事で測定再現性が担保されることも明

らかになった。血友病 A マウスに PAI-1 をノックアウトしたダブルノックアウトマウスは FVIII 投与に対し免疫寛容を示したが、そのメカニズムとして MHC-II 抗原提示能低下とともに、T 細胞アネルギー、および MHC-ClassII 拘束性 T 細胞誘導によることが明らかにされた。薬害 HIV 感染被害者とその家族 5 件に聞き取り調査し、分析討論会を通して、課題克服に向けた理論化と実践への示唆を得た。また、社会的課題として極めて大きな意味を持つ血友病保因者を対象とした準備性支援、遺伝相談などを視野に入れ、当事者参加型研究を目的に、本年度は自記式質問紙票の開発と配票を完了した。本年度は、SF-36 を主体とした患者 QOL 調査表を作成し、配布した。

D. 考察

I. 遺伝子治療: 英国グループから報告された AAV8 ベクターによる血友病 B 遺伝子治療臨床研究では抗 AAV 中和抗体陰性患者のみに効果が見られている。ヒトでは血友病患者を含め 30%以上に中和抗体が存在する。サルとヒト FIX を識別可能な抗体を有する我々のみが発現させたヒト FIX を定量可能である。サルでヒトでは試すことの出来ない基礎的検討を高い信頼度で遂行できる。まず、世界最高感度の抗 AAV8 抗体測定系を確立した。陽性サルにバルーンカテーテルを用いて抗体を含む血液を排除・洗浄して、肝臓局所へ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。サルは体重が 5kg 位であるために、ヒトとの体重差を考慮した循環動態への影響などはヒトに近い動物、ブタを用いた安全性確認が進んでいる。作製した世

界初の血友病 A ブタもこれに寄与することが期待される。AAV ベクターは染色体に組み込まれないために安全性は高いが数年先に効果減弱が危惧される。一回の治療で確実に抗 AAV 抗体は産生される。抗体陽性個体を遺伝子治療できる技術の確立は、染色体に組み込まれない安全な AAV ベクター遺伝子治療を繰り返し施行可能であることを意味しその意義は大きい。血友病患者の製剤を用いた治療には年間 1-1.5 千万円を要する。欧米での中和抗体陰性患者に対する遺伝子治療には 1 回 300 万円が必要と試算されている。3-5 年効果持続が期待できれば、治療費は製剤の 1/10 となる。しかも、我々の確立した技術で数年おきの安全な繰り返し治療が可能となれば、まさに医療経済的にも画期的な治療となりうる。中国で作製した GMP レベル AAV8FIX ベクターは、精製度も高く、サルでの発現効率も十分に、品質検査でも問題のないことが明らかになった。だが、欧米での臨床研究では、サルでの試算の 10 倍量以上のベクターが必要であった。尖閣問題のために、中国企業からのベクター供給追加は不可能となったが、新規ベクター産業へ歩を進めつつあるタカラバイオの研究班参加とベクター作製協力約束をとりつけたことにより、長年の悲願であった安全・高効率・高純度の日本製 GMP レベルベクターの利用が可能となった。突発的中国問題のために、必要量確保には若干スケジュールは遅延するが、準備が整えば臨床研究開始可能である。ディナベックの努力により、ほぼ GMP レベルまでに精製度等が高められた改変 SIV ベクターを利用して FVIII 遺伝子を導入した FVIII MSC の関節腔内投与による長期にわた

る血友病関節症予防はインヒビターの存在するマウスでも効果が見られ、さらに細胞が関節内にとどまる優れた治療法である。サル・血友病ブタで効果と安全性が確認でき次第臨床応用可能と考える。

II. インヒビター対策：インヒビターのエピトープ解析や寛容誘導などの基礎検討は、世界に注目される業績を発表しつつあり、今後のさらなる展開が期待できる。臨床的にも前方視的遺伝子解析などによる内的・外的要因解析は、インヒビター発症予防につながる可能性が高い。インヒビター測定法の改良も一定の成果を上げている。また日本で始めて取り組が始まっ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や薬剤治療効果の彼我の比較などの基盤になる。測定法の標準化も診断と解析における意義は大きい。

III. QOL 向上のための調査研究：面接による聞き取り調査研究で、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。血友病キャリアー女性の抱える大声で議論されることの少ない、しかし極めて深刻な妊娠・出産に関わる社会的課題に患者参加型で取り組む初めての試みは、準備性支援につながり、遺伝問題相談を含めた展開は効果的解決に向けた極めて意味のある一歩と考える。妊娠をためらう血友病キャリアー女性の遺伝子治療に期待するところは極めて大きい。客観的指標として SF-36 を利用した QOL 調査研究により諸外国の血友病患者や他の疾患との比較や、重症度、HIV・HCV 感染などが QOL に影響しているかを明らかに出来る。

E. 結論

我々の AAV8 ベクターを用いた血友病 B 遺伝子治療技術は世界最先端にあり、バルーンカテーテルを用いた抗体回避ベクター投与法は、投稿した海外雑誌にもトピックとして特に取り上げて賞賛された。懸案の日本製 GMP レベルベクター調達の目処も立った。技術的にはヒト臨床研究へ歩を進めるレベルに達した。血友病 A 遺伝子治療についても確実に歩を進めつつある。その医療経済効果は極めて大きく、また血友病保因者の女性の抱える社会的問題の軽減にも極めて有効である。インヒビター対策も時間のかかる研究ではあるが、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 調査解析研究として、HIV 被害血友病患者・家族などとの直接面談による問題把握と具体的支援策の構築や、血友病保因者の抱える極めて大きな社会的課題に真正面からとりくみ、その支援対策を検討することは独創的で有用である。本邦血友病患者と海外患者との QOL 比較を SP-36 を利用して検討する調査表の準備も整った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y.: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther*. 21(2):318-23. 2013 Feb.
2. Makino N, Madoiwa S, Ohmori T, Katoh K, Ookawara S, Kanazawa T,

- Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Ichimura K, Sakata Y.: Tissue plasminogen activator deficiency promotes early phase regeneration in the olfactory epithelium after bulbectomy. *Inpress* 2012 Nov 28. doi: 10.1002/alr.21124.
3. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y.: Porcine model of hemophilia a. *PLoS One*. 7(11):e49450. 2012.
4. Makino, N., Ookawara, S., Madoiwa, S., Ohta, Y., Ishikawa, T., Katho, K., Takigami, S., Kanazawa, T., Matsuo, O., Ichikawa, M., Mimuro, J., Sakata, Y., Ichimura, K.: Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bulbectomy. *The Journal of Laryngology & Otology*. 126 (11) 114-1120. 2012. Nov.
5. Hosoya, Y., Matsumura, M., Madoiwa, S., Zuiki, T., Matsumoto, S., Nunomiya, S., Lefor, A., Sata, N., Yasuda, Y.: Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. *Surg Today*. 2012 Aug 14. [Epub ahead of print]
6. Yano, Y., Ohmori, T., Shimada, K., Sakata, Y., Kario, K.: Association of sleep onset of acute coronary syndrome with sleep apnea syndrome and abnormal diurnal variation of hemostasis and adipokine levels. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 23(7):590-596. 2012 Oct.
7. Suzuki, S., Iwamoto, M., Saito, Y., Fuchimoto, D., Sembon, S., Suzuki, M., Mikawa, S., Hashimoto, M., Aoki, Y., Najima, Y., Takagi, S., Suzuki, N., Suzuki, E., Kubo, M., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Madoiwa, S., Sakata, Y., Perry, AC., Ishikawa, F., Onishi, A.: I12rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell*. 14;10(6):753-8. 2012 Jun.
8. Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Yasumoto, A., Ishiwata, A., Sakata, A., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y.: Intra-articular injection

- of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 10(9):1802-1813. 2012 Sep.
9. Norimatsu, Y., Ohmori, T., Kimura, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Seichi, A., Yatomi, Y., Hoshino, Y., Sakata, Y.: FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 180(4):1625-1635. 2012 Apr.
 10. 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.* 129(4):e36-40. 2012 Apr.
 11. Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 18(3):e323-30. 2012 May.
 12. Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res.* 73: 364-372, 2013.
 13. 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.* 19:476-82, 2012.
 14. 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.
 15. Shima M. Overview of current treatment for hemophilia: needs of tailor-made treatment. *Rinsho Ketsueki.* 53(10):1737-44. 2012
 16. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 18(10):1570-4. 2012
 17. 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. Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase I trial: 2nd report. *Haemophilia.* 2012 [Epub ahead of print]
 18. Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 4:81-8. 2012
 19. de Paula EV, Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz SR, Morfini M, Nemes L, Šalek SZ, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S, Chuansumrit A; 1804 (adept(TM)1) Investigators. Recombinant factor VIIa analog (vatreptacog alfa [activated]) for treatment of joint bleeds in hemophilia patients with inhibitors: a randomized controlled trial. *J Thromb Haemost.* 10(1):81-9. 2012
 20. Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T. Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a haemophilia A patient with high-titre inhibitor. *Haemophilia.* 18(3):e75-7. 2012
 21. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost.* 107(2):288-301.

- 2012
22. Griesenbach U, Inoue M, Meng C, Farley R, Chan M, Newman NK, Brum A, You J, Kerton A, Shoemark A, Boyd AC, Davies JC, Higgins TE, Gill DR, Hyde SC, Innes JA, Porteous DJ, Hasegawa M, Alton EW. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 186(9):846-56, 2012.
 23. Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A. *Haemophilia.* 2013 Jan;19(1):100-5. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02906.x. Epub 2012 Jul 9.
 24. 瀧 正志：血友病治療の現状と今後の展望、日本医事新報、No.4596, 69-74, 2012
 25. 瀧 正志：定期補充療法、みんなに役立つ血友病の基礎と臨床 改訂版、白幡聡編集、医薬ジャーナル社、p192-201, 2012
 26. 長江千愛、瀧 正志：補充療法(iv)類縁疾患、みんなに役立つ血友病の基礎と臨床 改訂版、白幡聡編集、医薬ジャーナル社、p165-174, 2012
 27. 瀧 正志：Comment from an expert 血友病B患者に対する定期補充療法の開始、継続に関するヒント、血液フロンティア、22(9)：1381-1388, 2012
 28. 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、瀧 正志：治療歴のある血友病B患者における血漿由来血液凝固第IX因子製剤（ノバクト^{RM} 静注用）の生体内回収率、新薬と臨床、61(10):1972-1978, 2012
 29. Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Potential of lentiviral transduced adipose tissue-derived stem/stromal cells for gene and cell therapies toward hemophilia B. *Hum. Gene Ther.* 2013, in press.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.* 21: 1-10, 2012.
 33. 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: 3188-3191, 2011.
 34. Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocyte propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant.* 21: 429-436, 2012.
 35. 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 Medi.* 3: 25-31, 2012.
 36. Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anti-coagulation factors. *Cell Transplant.* 21: 437-445, 2012.
 37. Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials* 33: 4526-4534, 2012.
 38. 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.

学会発表

1. 窓岩清治：凝固線溶系データを読み解く (Morning Discussion) 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
2. 柏倉裕志、大森 司、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：人工多能性幹細胞を用いた新規血友病治療法に対する基礎的検討 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
3. 窓岩清治、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：A role of plasminogen activator-plasmin system for the immune in murine hemophilia A 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
4. 水上浩明、三室 淳、塚原智典、卜部匡司、久米晃浩、大森 司、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也：Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates using AAV8-based vector 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
5. 坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：Paxillin negatively regulates integrin signaling pathways in mouse platelets 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
6. 小山寛介、窓岩清治、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：敗血症性 DIC における血小板減少の予測因子としての凝固・線溶系マーカーの評価 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
7. 窓岩清治、小林英司、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：第 FVIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロボドを用いた連続的抗原投与モデルの構築 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
8. 柏倉裕志、大森 司、三室 淳、安本篤史、石渡 彰、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、小澤敬也、坂田洋一：FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内移植は血友病 A マウスの血友病性関節症を改善する 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
9. 大森 司、矢野裕一郎、坂田飛鳥、池本智一、新保昌久、窓岩清治、勝木孝明、三室 淳、島田和幸、苅尾七臣、坂田洋一：血清パラオキシナーゼ活性は抗血小板薬投与下の凝集能と関連しない 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
10. 小山寛介、窓岩清治、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：敗血症性 DIC—下部消化器官穿孔における凝固障害の特徴— 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
11. An optimal monitoring on bypassing therapy for hemophilia A patient with inhibitor using aPTT-based clot waveform analysis with the presence of minimal TF. Haku J, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yada K, Shima M. 54th the annual meeting American Society of Hematology, Dec 8-12 2012, Atlanta, GA
12. 白潤夏、荻原建一、松本智子、野上恵嗣、矢田弘史、嶋緑倫. 凝固波形解析を用いた血友病 A インヒビターバイパス止血療法の新規モニタリング. 第 74 回日本血液学会 2012. 京都
13. 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、福武勝幸 血友病 A の病因遺伝子変異はイントロンの深部にも隠れている 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 東京
14. 鈴木隆史、天野景裕、清田育男、村松 崇、稲葉 浩、福武勝幸 重症型血友病 A の成人患者に発生した高力価インヒビターに対する免疫寛容導入療法 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 東京
15. 篠澤圭子、鈴木隆史、天野景裕、荻原 剛、稲葉 浩、田中朝志、福武勝幸 重症型先天性血液凝固第 V 因子欠乏症の血小板 FV のトロンビン生成 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 東京
16. 血友病 A インヒビターの免疫寛容療法に活性型第 VII 因子製剤定期投与併用で出血頻度が低下した 1 例 天野景裕、近澤悠志、篠澤圭子、村松 崇、清田育男、大瀧 学、尾形享一、荻原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 東京
17. 血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子イントロン 16 内で検出された LINE-1 挿入変異 稲葉 浩、篠澤圭子、大瀧 学、天野景裕、福武勝幸 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 京都市
18. Genetic analysis of antithrombin deficient patients with deep vein thrombosis. Keiko Shinozawa、Hiroshi Inaba、Manabu Otaki、

- Takeshi Hagiwara, Takashi Suzuki, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 京都市
19. 血友病 B 患者で同定した 3 つの遺伝子変異 近澤悠志、篠澤圭子、天野景裕、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 京都市
 20. 新たに第 XI 因子欠乏症の合併が診断された軽症型血友病 A の一例 大瀧 学、篠澤圭子、近澤悠志、清田育男、稲葉 浩、天野景裕、福武勝幸 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 京都市
 21. 長江千愛、足利朋子、山下敦己、武藤真二 瀧 正志：小児血友病 B 患者に対する定期補充療法の有効性、第 115 回日本小児科学会、2012.4
 22. 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、秋田美恵子、山崎哲、高山成伸、瀧 正志：インヒビター歴のない血友病 A 患者における凝固第 VIII 因子製剤の回収率に関する検討、第 34 回血栓止血学会、2012.6
 23. 新居登紀子、鈴木典子、高橋儀行、辻村浩司、山崎哲、瀧 正志：ACL-TOP500 による第 VIII 因子活性測定の見直し、第 13 回日本検査血液学会、2012.7
 24. 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見直し—凝固因子感受性—、第 13 回日本検査血液学会、2012.7
 25. Shinobu Tatsunami, Junichi Mimaya, Akira Ahirahata, Masashi Taki : Analysis on annual number of deaths in HIV-negative Japanese patients with coagulation disorders. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2012.10
 26. 立浪 忍、三間屋純一、白幡聡、大平勝美、仁科豊、花井十伍、桑原理恵、秋田美恵子、瀧 正志：HIV 感染血液凝固異常症における肝疾患の治療状況について：平成 23 年度血液凝固異常症全国調査より、第 26 回日本エイズ学会、2012.11
 27. 瀧 正志 (教育講演)：出血性疾患に対する臨床的ならびに検査からのアプローチ、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11-12
 28. 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、秋田美恵子、山崎哲、高山成伸、瀧 正志 (シンポジウム)：L-asparaginase による凝固障害の発症機序、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11-12
 29. 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 from post-authorization safety surveillance in Japan: Five years update. XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 30. Katsuyuki Fukutake, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: A prospective post-authorization safety surveillance (J-PASS) evaluating clinical experience in Japanese PTPs with antihemophilic factor (recombinant) plasma/albumin free method (rAHF-PFM). XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 31. Takeshi Matsumoto, Shinobu Tatsunami, Katsumi Ohira, Terue Suzuki, Yutaka Nishina, Jugo Hanai, Yasuo Horikoshi and Masashi Taki: Income and anxiousness of working people with hemophilia in Japan, XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 32. Shinobu Tatsunami, Rie Kuwabara, Mieko Akita, Junichi Mimaya, Akira Ahirahata, Masashi Taki: Number of patients with coagulation disorders in Japan : 2010 annual report from the Research Committee for the National Surveillance on Coagulation Disorders in Japan. XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 33. Shinobu Tatsunami, Akira Shirahata, Masashi Taki: Quantitative word mapping of hemophiliac patients' opinions based on free-answer descriptions on a quality-of-life questionnaire. XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 34. Atsuki Yamashita, Chia Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Masashi Taki: Large individual differences in the in

- vivo recovery of factor VIII concentrates in Japanese hemophilia A patient. XXX International Congress of the WFH, 2012.7
35. Shinji Muto, Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Chiaki Okuse, Masashi Taki: HCV infection of hemophilia and the associated disease patients in St. Marianna University Hospital. XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 36. Kagehiro Amano, Michio Sakai, Hideyuki Takedani, Ichiro Tanaka, Kazuko Kudo, Masashi Taki, The Committee for Improvement of Adherence with prophylaxis in haemophilia: Observational study for improving adherence with prophylaxis in haemophilia, XXX International Congress of the WFH, 2012.7
 37. Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Mieko Akita, Kenji Uehara, Hiroyuki Onuma, Kimie Yoshikawa, Masashi Taki: An effectiveness of a continuous infusion of rFVIIa for synovectomy in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology, 2012.11 – 12
 38. Akira Yoshioka, Eisaburo Ishii, Tamaki Ueno, Ikuya Usami, Masao Kobayashi, Ryoji Kobayashi, Akira Shimada, Akira Shirahata, Takashi Suzuki, Masashi Taki, Kiriko Tokuda, Tadashi Matsushita: The principal results of the International Immune Tolerance Induction Study including 16 Japanese subjects in the inhibitor patients with hemophilia A. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology, 2012.11 – 12
 39. Takashi Suzuki, Katsuyuki Fukutake, Kagehiro Amano, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Michio Sakai, Masahiro Iizuka and Yoshiyuki Shibasaki: Evaluation of the Safety, Efficacy of Recombinant Factor IX (nonacog alfa) in Japanese Patients with Hemophilia B ·Interim Result of Post Marketing Surveillance Study-. , The 54th ASH, 2012.12
 40. 柿沼章子, 久地井寿哉, 井上佳世, 関由紀子, 北村弥生, 玉井真理子, 井上洋士, 大平勝美. 薬害H I V感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究(第三報)—生活の再構築支援と支援展開 健康の多様性 (Health Diversity) の観点から—第 38 回日本保健医療社会学会大会. 2012.5
 41. 久地井寿哉, 柿沼章子, 井上洋士, 井上佳世, 関由紀子, 北村弥生, 玉井真理子, 大平勝美. 薬害H I V感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究(第四報)—生活再構築のための、自己支援・相互支援・専門的支援の連携における課題—, 第 38 回日本保健医療社会学会大会. 2012.5
 42. 柿沼章子, 久地井寿哉, 井上佳世, 玉井真理子, 大平勝美, 薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築 (第一報) ~自立と意思決定に関する課題: 第 53 回日本社会医学会特別号 (0910-9919)2012page111-112(2012.07)
 43. 久地井寿哉, 柿沼章子, 井上佳世, 玉井真理子, 大平勝美: 薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築 (第二報) ~情報支援とFACTアプローチ: 第 53 回日本社会医学会特別号 (0910-9919)2012page113-114(2012.07)
 44. 井上佳世, 玉井真理子, 久地井寿哉, 柿沼章子, 大平勝美. 薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築 (第三報) ~遺伝性疾患であることの課題と支援: : 第 53 回日本社会医学会特別号 (0910-9919)2012page115-116(2012.07)
 45. Akiko Kakinuma , Toshiya Kuchii, Yukiko Seki, Yoji Inoue, Yayoi Kitamura, Yayoi Kitamura, Mariko Tamai, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Restructuring and improving QOL in Japanese HIV victims with hemophilia and their families: How do we rebuild our life with effective support? : WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE
 46. Yukiko Seki, Akiko Kakinuma , Mariko Tamai, Yayoi Kitamura, Yoji Inoue, Toshiya Kuchii, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Difficulties faced by haemophilic students in Japan :

- Yukiko Seki (Saitama University):
WORLD FEDERATION OF
HEMOPHILIA, WFH 2012 World
Congress, 8-12 July, 2012, Paris,
FRANCE
47. Yayoi Kitamura, Akiko Kakinuma, Toshiya Kuchii, Yukiko Seki, Yoji Inoue, Yayoi Kitamura, Mariko Tamai, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Feelings, Experiences on the Sibling Relationship and the Perception of Heredity on Hemophilia by Patients and Siblings. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE
48. Eiichi Mizukoshi, Akiko Kakinuma, Ysuhiko Sugwara, Shinichi Oka, Katsumi Ohira A 10-year follow up of an HIV/HCV co-infected hemophilia A after living donor liver transplantation: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE
49. 久地井寿哉、柿沼章子、関由紀子、岩野友里、大平勝美. 職域における HIV/AIDS と就労に関する意識調査. 第 21 回日本健康教育学会学術大会. 2012.7
50. 柿沼章子、久地井寿哉、関由紀子、岩野友里、大平勝美. 慢性疾患患者の自立・将来計画支援～、血友病・遺伝に関する情報支援プログラムの開発. 第 21 回日本健康教育学会学術大会 2012.7
51. 久地井 寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美、近年における薬害 HIV 感染被害者の累積死亡者数および粗死亡率の地域特性に関する分析, 第 71 回日本公衆衛生学. 2012.10
52. 柿沼章子. 岩野友里. 久地井寿哉. 大平勝美. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究 (第一報) 患者背景. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11
53. 岩野友里, 柿沼章子, 久地井寿哉, 大平勝美. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究 (第二報) 困難経験の類型化. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11
54. 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、田中純子、大津留晶. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究 (第三報) ADL の社会心理特性評価. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11
55. Watanabe N, Ohashi K, Inkyong Shim, Tatsumi K, Utoh R, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Okano T. Potential of lentiviral transduced adipose tissue-derived stem/stromal cells toward hemophilia B using cell sheet technology. European Society of Gene and Cell Therapy Congress 2012 (Versailles, France) 2012年10月25日-29日
56. Inkyong Shim, Ohashi K, Watanabe N, Tatsumi K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Okano T. Potential of bioengineered cell sheets prepared with lentivirally transduced adipose tissue-derived stem/stromal cells for hemophilia B therapy. 3rd TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress 2012 (Vienna, Austria). 2012年9月5日～8日
57. Ohashi K. In-animal Propagation of Hemophilic Hepatocytes toward Gene Transduction and Cell Therapy. 11th Workshop On Novel Technologies and Gene Transfer for Hemophilia. The Children's Hospital, Philadelphia, USA. 2012年3月2日～3日
58. 渡辺夏巳、大橋一夫、辰巳公平、鶴頭理恵、沈仁卿、鐘ヶ江佳寿子、柏倉裕志、大森司、坂田洋一、井上誠、岡野光夫 細胞シート工学を用いた血友病に対する新規遺伝子細胞治療法の開発 第 11 回日本再生医療学会 (横浜) 2012年6月12日～14日
59. 大橋一夫 細胞の単層配列から展開する肝臓/膵組織創生とその意義. 第 39 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 2012年11月15日～17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ィルス 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。

「shRNA 発現ベクターによる D1,D2 ドーパミン受容体をノックダウンしたモデル動物の作出法」基礎生物学研究所・生理学研究所・自治医科大学により知的財産権共同出願中(平成 24 年 9 月 12 日職務発明認定・権利譲渡済)

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 客員教授
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 A 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。遺伝子細胞治療として、SIV ベクターをもちいて第 VIII 因子遺伝子を導入した間葉系幹細胞を血友病マウスへ移植し関節出血に対する効果を確認出来た。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た。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 活性は一致した。ベクター投与量を $5 \times 10^{12}/\text{kg}$ 増やすとマウスでは FIX 発現は同ベクターの FIX 発現活性を 1000-4000% 以上に上昇した。同ベクターの活性を、サル 1 頭を用い検討したところ治療域の FIX 発現 (5-10%) を約 1 年間みとめた。サルにおけるベクターの FIX 遺伝子発現能力はマウスでの 1/100 であった。

インヒビター陽性血友病に対する遺伝子治療とインヒビター産生制御: 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。血友病 A に対する遺伝子細胞治療は、ウイルスベクターなどを用いて *in vivo* へ第 VIII 因子遺伝子を導入するか、第 VIII

因子発現細胞を移植する細胞治療が行われているが、この方法ではインヒビター陽性血友病 A 患者には適応できない。マウス第 VIII 因子に交差阻害活性を有するインヒビター陽性血友病 A マウスを確立し、第 VII 因子あるいは活性型第 VII 因子を強発現させる AAV ベクターを投与し治療効果を検討したところ第 VII 因子・活性型第 VII 因子の強発現はいずれもインヒビター陽性血友病 A マウスの出血傾向を軽減しえたことから、第 VII 因子・活性型第 VII 因子の強発現はインヒビター陽性血友病遺伝子治療の候補となると考えられた。

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。恒常的凝固因子レベルを上昇させることで、これらの出血を防ぐことが出来る次世代の治療として血友病遺伝子細胞治療の基礎的検討を行った。また、血友病治療の最大の阻害要因であるインヒビターに対する遺伝子細胞治療とインヒビター産生制御・予防の可能性を検討した。

B. 研究方法

血友病遺伝子治療：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で安全なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを選択した。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 AAV ベクターの遺伝子導入効率と影響因子、安全性を検討した。臨床研究にむけ GMP グレード AAV ベクターの純度とベクター活性を検定した。血友病 A マウスの膝関節に凝固因子発現 MSC を注入し、関節内出血量を定量することおよび関節障害の程度を組織学的に検討した。iPS 細胞を既法により作成した。第 VIII 因子/PAI-1 ダブルノックアウトマウス (FVIII/PAI-1dKO) を交配により確立した。第 VIII 因子/PAI-1 ダブルノックアウトマウス (FVIII/PAI-1dKO) と FVIIIKO マウスにおける免疫応答を検討した。

また、shRNA ベクターを用いて骨髄細胞の関与を検討

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

血友病 A 遺伝子治療：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 AAV8 ベクターを用いることで血友病 A マウスにおいてヒト FVIII 活性を正常の 50%以上に上昇させることが可能となった。また、ヒトに近い種属の血友病モデルとして血友病 A クローンブタを得た。血友病 A クローンブタは血友病 A マウスと異なり生下時から出血傾向を示した。凝固因子発現 MSC による血友病 A マウスの関節内出血予防効果は少なくとも 8 週は持続した。また低力価のインヒビター (2U/ml) 存在下でも、その治療効果が認められ、高力価のインヒビター (10 - 50U/ml) 存在下でも細胞数を増加させることで効果が認められた。SIV ベクターにより iPS 細胞から機能的な凝固因子の発現を認めた。得られた凝固因子発現 iPS 細胞をヌード・マウスに移植すると奇形腫の発生に伴い血中の凝固因子レベルが治療域に達した。

血友病 B 遺伝子治療：ヒト FIX 特異的モノクロナル抗体のエピトープをヒト型アミノ酸に改変し、このモノクロナル抗体で検出可能な変

異カニクイザル FIX を発現する AAV ベクター作製しカニクイザルでの発現検討を行った。FIX 遺伝子搭載 AAV8 ベクターを、AAV8 に対する中和抗体陰性サルの末梢静脈から投与したところ 4 頭において治療域 (2-20%) の FIX 発現が得られた。しかし、既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価であっても存在するサルに、同ベクターを腸間膜静脈枝から投与しても FIX の発現は得られなかった。AAV8 ベクターによる遺伝子導入を阻害する中和抗体が存在するカニクイザルに於いて、中和抗体の遺伝子導入阻害を回避するベクター注入を門脈内直接注入法・マイクロカテーテル法、それぞれ 3 頭のサルで行い治療域 (2.5-10%) の FIX 発現が得られた。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。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 5×10^{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 活性は一致した。ベクター投与量を 5×10^{12} /kg 増やすとマウスでは FIX 発現は同ベクターの FIX 発現活性を 1000-4000%以上に上昇した。同ベクターの活性を、サル 1 頭を用い検討したところ治療域の FIX 発現

(5-10%) を約1年間みとめた。サルにおけるベクターの FIX 遺伝子発現能力はマウスでの1/100であった。

野生型 AAV の既感染に基づく免疫(中和抗体)の存在は AAV ベクターを用いた遺伝子治療の大きな阻害要因である。日本人の抗 AAV 中和抗体を検討した結果、AAV1, 2, 5, 8, 9 の抗体保有率はいずれも約 30%であるが、低年齢層では低く年齢の上昇とともに抗体保有率も上昇する。この傾向は健常人でも血友病患者でも同様であった。特に 50 歳以上では抗体保有率は極めて高く AAV ベクターを用いた遺伝子治療の阻害要因となることが明らかとなった。

D. 考察

血友病遺伝子細胞治療：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。しかし、ヒト応用には中型動物での実験と、サルでの長期安全性の検討が必要と考えられる。サルは種々の AAV に既感染のことが多く、中和抗体が存在するためサルの利用は容易ではないが、AAV 抗体測定法の改良によりこの問題も解決されつつある。AAV8 に対する抗体陽性のサルで、選択的カテーテルとバルーンを用いて、血液と接しない形でサル肝臓にベクターを投与する投与法の検討では、抗体の存在にもかかわらず良好な FIX の発現が認められた。既感染に基づく AAV に対す

る中和抗体による遺伝子導入阻害はヒトにおいても重要な問題であるが、その解決方法がえられた意義は大きい。血友病 B 遺伝子治療に関してはサルをもちいた前臨床実験をほぼ終え、GMP グレードベクターも作製でき検定が行えている。同ベクターの製品検定に加え長期安全性として腫瘍形成性の検討を行う必要がある。これにはさらに大規模で長期間の検定が必要である。血友病 A 遺伝子治療に関しては、マウスでは血友病性関節症に対する間葉系幹細胞を用いた細胞治療の検討もできた。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が、中型血友病モデル動物が作製でき、また解決すべき問題点は明らかになっており、血友病 B 遺伝子治療の成果を踏まえて血友病 A 遺伝子治療に進む。

インヒビター陽性血友病に対する遺伝子治療とインヒビター産生制御：血友病 A に対する遺伝子細胞治療は、ウイルスベクターなどを用いて *in vivo* へ第 VIII 因子遺伝子を導入するか、第 VIII 因子発現細胞を移植する細胞治療が行われているが、この方法ではインヒビター陽性血友病 A 患者には適応できない。マウス第 VIII 因子に交叉阻害活性を有するインヒビター陽性血友病 A マウスを確立し、第 VII 因子あるいは活性型第 VII 因子を強発現させる AAV ベクターを投与し治療効果をトロンボエラストグラフィと Tail clipping で検討した。第 VII