

201319010A

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26（2014）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、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	22
(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	27
(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	43
(自治医科大学 菱川修司)	
6. 臨床研究用製剤候補 (SIVベクター) のGMP製造技術： 臨床応用技術開発	47
(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	49
(東京医科大学 稲葉 浩)	
8. 血友病患者の手術適応に関する研究	54
(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	58
(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	128
(社会福祉法人 はばたき福祉事業団 柿沼章子)	
11. AAVベクターの生物学的多様性評価と高効率ベクターの開発	134
(自治医科大学 村松 慎一)	
12. 血友病治療用AAVベクター大量製造法の開発	137
(タカラバイオ株式会社細胞遺伝子治療センター 峰野 純一)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	144
IV. 研究成果の刊行物・別刷	147

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 因子 (FVIII)、第 IX 因子 (FIX) 活性が欠損する先天性出血性疾患である。治療は凝固因子製剤だが、血漿製剤による HIV、HCV 感染を引き起こし、社会的に多くの問題を生んだ。本研究では、HIV 感染者を含む血友病患者の合併症を克服するために、遺伝子治療、インヒビター対策、ならびに患者ニーズ抽出による QOL 改善を目的とした調査研究を 3 本の柱として研究を推進する。1) 遺伝子治療：常法の血友病 B に対する GMP レベル AAV ベクター作製技術は確立し、その効果をサルで検証した。本手法を用いたサル肝臓に対する遺伝子導入の効果は最長で 7 年にわたって持続中であり、安全性も問題ない。しかし、従来のベクター精製技術で臨床試験に必要な量を概算すると粗ウイルス調製で 4 ヶ月以上、コストも消耗品のみで数千万円を超えた。より実現可能な製造システムとして、バキュロウイルスによる AAV 製造システムを開発し、より安価に必要な量を生産できる目処がついた。本治療成功の鍵となる抗 AAV 中和抗体の鋭敏な測定法を開発した。同抗体は、血友病の 3~4 割が陽性であり（若年ほど陰性が多い）、6~7 割の患者は AAV ベクターによる遺伝子治療の恩恵を受ける。AAV 中和抗体陽性患者への治療法として、抗体陽性サルにカテーテルを用いた門脈内への投与方法を開発した。実験ブタのシミュレーションでは、循環動態や肝機能障害への影響が最小限であることを確認した。血友病 A の前臨床試験を目的として、血友病が存在しないサル体内ヒト FVIII（サルと 98%以上相同性）を検出する手法を開発した。細胞治療法では、ヒト間葉系幹細胞や iPS 細胞からの凝固因子の発現、血友病性関節症への効果を確認した。2) インヒビター対策：インヒビターの新規治療として線溶修飾（PAI-1 抑制による免疫寛容誘導）の可能性を見出した。軽症血友病 A 患者に生じたインヒビターの機能解析を行いエピソードや凝固抑制機序を解明し、新たな検査手法・治療戦略の確立に近づいた。インヒビター測定標準化のために標準血漿を作製し、臨床の場で現実的に利用できる検査の精度を検証した。新規血友病患者に関する我が国初の前向きコホート（J-HIS-2）では 40 施設 219 例の登録を完了した。インヒビター発生要因の検索のために 162 検体を受領し、臨床的情報と分子生物学的情報の 2 つの側面から検討を開始した。過去のデータベース（J-HIS1）を用いインヒビター発症要因を解析し、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤との間にインヒビターの発生率に差がないことを明らかとした。3) QOL 向上のための調査研究：国際的 QOL 基準 SF-36 調査票の回収を終え、血友病患者では身体に関する下位尺度がいずれもわが国の国民標準値よりも低いことが示された。薬害 HIV 感染被害者・家族等 QOL の向上と心理社会的課題（遺伝相談支援構築）の解決のために、計 39 件の薬害 HIV 感染被害者・家族等に面接調査・集合調査、及び 30 件の質問紙調査を実施し、準備性指標を評価することで保因者の支援経験に関するニーズを予測するモデルを作成した。保因者の支援経験や健康予防行動に個人差があり、個別支援の必要性が明らかとなった。

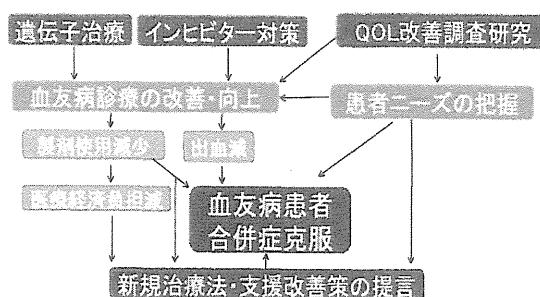
分担研究者：

自治医科大学分子病態研究部
講師 窓岩 清治
講師 大森 司
自治医科大学遺伝子治療研究部
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
自治医科大学医学部神経内科
特命教授 村松慎一
タカラバイオ株式会社 細胞・遺
伝子治療センター
センター長 峰野 純一

A. 研究目的

血友病は血液凝固第 VIII 因子 (FVIII)、または第 IX 因子 (FIX)異常による遺伝性出血性疾患である。治療に用いられた凝固因子製剤に起因する HIV や HCV 感染により、患者健康は著しく阻害された。本研究は血友病患者の合併症を克服するために、製剤投与に頼らない新規治療（遺伝子治療）の開発を行う。さらに治療を阻害しうる凝固因子インヒビターの発症要因の同定とその対策を講じ、本研究の双方向性を担保するための QOL 調査研究、および聞き取り調査により患者支援ニーズを抽出する。

図 本研究の目的と意義



B. 研究方法

研究を 3 つの柱に分けるが、各班員が情報を共有し、密に連携することで効率よく目的を達成するよう研究を進める。

①遺伝子治療：これまでにアデノ随伴ウイルス (AAV) 8 型ベクターによる血友病 B 遺伝子治療技術を確立した。本遺伝子治療は 1 回の末梢静脈からのベクター投与により、凝固因子産生部位の肝臓から、ほぼ永続的に凝固因子産生が可能となる。平成 25 年度はヒト臨床試験を想定した日本製ベクターを作製を試みた。作製ベクターをサルに静注し、治療凝固因子レベルを定量した。本遺伝子治療の成功には、血中の抗 AAV 抗体が存在しないことが肝要である。鋭敏な測定法を開発し、抗 AAV 抗体の保有率を実際の血友病患者で検討した。我々は過去に、バルーンカテーテルを用いて経門脈的に AAV ベクターを投与することで、抗 AAV 抗体陽性サルにおいても治療を可能とする技術を世界に先駆けて開発した。本年は、実験ブタを用いてこのバルーンカテーテルによる抗体回避遺伝子導入法の循環動態・肝障害への影響を評価した。これらの治療法を患者数の多い血友病 A に適応するため、サルに対してヒト FVIII を免

疫し、サル体内でヒト FVIII を特異的に検出する抗体を作製した。過去の QOL 調査から血友病患者 QOL を阻害する因子として、繰り返す関節内出血による血友病性関節障害が重要であった。本研究班で開発した血友病関節障害に対する FVIII 遺伝子導入間葉系幹細胞の関節内投与法をヒトに応用するためにヒト細胞を用いた検討を行った。

②インヒビター対策：血友病患者の 20-30%に凝固因子インヒビター（阻害抗体）が生じ、治療抵抗性となる。過去に線溶抑制因子 PAI-1 が免疫に関与することを明らかとしたが、PAI-1 制御によるインヒビター抑制効果をマウスモデルで検討した。さらに凝固因子発現 iPS 由来胸腺上皮細胞を作成し、その胸腺投与による凝固因子インヒビター発生率を検討するために、iPS 細胞の樹立、ならびに遺伝子発現手法の最適化を試みた。実際の患者インヒビターのエピトープ、その凝固阻害機構を検討した。実臨床では、標準化血漿を作成し、インヒビター活性測定法の標準化を進めた。また、我が国初めての全国的な血友病患者を対象とした前方視的コホートへの患者登録を進め（J-HIS2）、その解析から、インヒビター発生とその消長に関わる患者関連要因、及び製剤種類や投与方法など治療関連要因の解析を開始した。平成 19 年より継続して 20 歳未満血友病患者のインヒビター発生に関する後方視的調査研究（J-HIS1/U20）の結果を解析し、本年度はインヒビターの消失要因についても調査を行った。

③QOL 向上のための調査研究：実患者のニーズを抽出すべく、血友病患者に配布

した QOL 評価表 SF-36 を用いたアンケートを回収した。その中から、一次解析として本邦の患者健康観を検討した。HIV 感染被害血友病患者とその家族参加型のアクションリサーチを施行し、ファクトシート改訂や遺伝相談を展開した。これにより支援経験評価、遺伝に関わる心理検査に関する分析を実施した。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療開発、動物実験は国の法律・指針と各大学・施設の規定を遵守する。臨床研究は最新の各省庁の倫理指針を遵守し、学内、必要な場合は国の審査を経た上で実施する。特に聞き取り調査では個人情報保護に格段の注意を払う。

C. 研究結果

①遺伝子治療：常法により血友病 B 用 GMP レベル AAV ベクターを作製し、サルで長期に治療効果が得られた。カニクイザルでの治療はすでに 7 年に渡り治療効果・安全性が確認できた。しかし、本法をヒト臨床試験に当てはめると、従来 AAV 同作製法でヒトでの必要量を得るためには、粗ウイルス調製で 4 ヶ月以上、コストも消耗品で数千万円を超えた。より実現可能な製造システムを目指し、より安価に必要な量を生産できる新たなバキュロウイルスによる AAV ベクター製造システムを開発した。200L 程度の培養系で、5・6 名の臨床試験が可能なベクター量が確保できると考えられる。本治療の成功の鍵となる抗 AAV 中和抗体同定のための、より感度の高い検査方法を確立した。この方法を用いると血友病患者の 3-4 割に抗 AAV 抗体が陽性であった。抗 AAV 中

和抗体陽性サルへの門脈内ベクター投与方法を世界に先駆けて開発し、実験ブタのシミュレーションで循環動態や肝機能障害への影響は認めなかった。サルでヒトFVIII（サルと98%以上相同性）を認識する特異的抗体を作製し、血友病Aに対する同遺伝子治療をサルで検討する目処があった。細胞治療法として、ヒト間葉系幹細胞やiPS細胞からの凝固因子の発現、治療効果を確認した（一部論文受理）。また、細胞治療に用いる第3世代サル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターのGMP作成技術を開発した。

②インヒビター対策：PAI-1 ノックアウトマウスではFVIIIに対するインヒビターが減じ、PAI-1 抑制薬によるインヒビター制御法の可能性を見出した。iPS細胞を用いた免疫寛容誘導手法のためのiPS樹立、ならびに適切な凝固因子発現手法を確立した。実患者より得られたインヒビターの解析として、抗FVIII-A2ドメイン抗体が存在すると重症血友病Aよりも凝固能が阻害されること、バイパス製剤APCCが微量のFVIIIを限定分解し初期の凝固促進に寄与することを示した。また、血友病A患者においてmRNAの解析を用いて、従来手法では困難であったイントロン1に起因する逆位を同定した。インヒビター測定標準血漿を作製し検査手法の確立に近づいた。新規血友病患者に関するコホート（J-HIS2）は40施設219例の登録を完了し、臨床的情報と分子生物学的情報の2つの側面から検討を開始した。219名中41症例にインヒビターを認め、インヒビター発症要因として、治療法（出血時 vs 定期）の相違がインヒビター発生に関連している可能性が示唆された（定期補充療法にインヒ

ビター発症が少ない）。また、血漿由来・遺伝子組み換えの製剤種によるインヒビター発症率に差を認めなかった。

③QOL向上のための調査研究：SF-36を用いたQOL調査票の回収を終え、一次解析を開始した。血液凝固異常症患者全体では、身体に関する下位尺度がいずれもわが国の国民標準値よりも低いことが示された。これらを低下させる因子として、重症度、頻回の出血、関節の出血や不自由に感じる関節の存在、HIVやHCVの感染が挙げられた。計39件の薬害HIV感染被害者・家族等に面接調査・集合調査、及び30件の質問紙調査を実施し、統計的モデルでの検討を行った結果、支援期待量を予測する要因は、年齢調整の元では支援経験量が有意であった。媒介要因として、出産経験、知識量が有意であった。保因者の支援経験や健康予防行動に個人差があり、個別支援の必要性が明らかとなった。

D. 考察

血友病BはGMPグレードAAVベクターが作製し得れば臨床試験を開始できる。GMPグレードのAAVベクターを年度中に作製予定であったが、より現実的な新規作製技術を開発し、持続的な遺伝子治療の提供に対する基盤が得られた。一見遠回りだが、バキュロウイルスを用いた新規AAVベクター作製法を開発したことは、高品質ベクターの安定した供給体制を自国で整備する意義として大きい。この遺伝子治療の特徴は1回の投与で長期に効果が得られる点であるが、AAV中和抗体が存在する場合には、たとえ低力価であっても遺伝子導入は成功していない。

そのため、事前に中和抗体のスクリーニングを徹底的に行う必要がある。我々は世界的に見ても最も鋭敏な検出法を確立し、本手法を用いて、ベクター感染を阻害する抗AAV抗体が6-7割の患者で陰性であることを明らかにした（特に若年者に陰性が多い）。よって、多くの患者に本治療の効果が期待できる。残りの3-4割でも本研究班により開発された抗体回避法の安全性が確認され、臨床応用可能なレベルに近づいた。さらに、患者数が多い血友病Aの遺伝子治療基礎検討が非ヒト霊長類で行える抗ヒトFVIII抗体の作製の意義も大きい。今後、より多くの患者を対象とした治療への提言が行えると考えている。QOL阻害因子である関節障害に対する細胞治療法も、ヒト間葉系幹細胞による凝固因子発現を確認したため、サルなどで安全性が担保されれば臨床試験が可能である。

インヒビター治療法の開発や、データベースを用いた我国のインヒビター発症要因の解明は、今後の実臨床におけるインヒビター対策に寄与すると考えられる。本年度は、PAI-1修飾による新たなインヒビター制御機構の可能性を明らかとした。すでにPAI-1阻害薬は臨床試験も行われているため、臨床応用も視野にいれることができる。また、iPS細胞を用いた免疫寛容誘導を行うための基盤も構築できたため、来年度は自己細胞をもちいた免疫寛容療法の可能性を見いだしたい。インヒビターの発症要因を探る臨床試験では、昨年度にカテーテルの挿入、治療法の項目で有意差が見られたが、本年度の検討では多変量解析の結果、治療法の相違がインヒビター発生に関連している可能性が示唆された。更に症例数を増や

しての検討が必要である。今後はJ-HIS1（後方視野的研究）や血友病の原因となる遺伝子異常の解析と合わせて、インヒビター発症要因の同定に結びつける。

今回のSF-36調査票は過去よりも多い患者より解答が得られた。血液凝固異常症患者は身体に関する下位尺度がいずれもわが国の国民標準値よりも低い。一方、精神に関する下位尺度は国民標準値との差異が極めて少ないことが示された。さらに、アクションリサーチによる調査では、相談者（主に母親の立場）だけでなく、支援対象者（主に娘の立場）自らが自発的に相談し、円滑に意思決定ができるよう、準備性に配慮した支援環境を整える必要があると考えられた。QOL調査票、ならびに個別調査の結果を併せ、さらなる解析により新たな支援法の提言に結びつくこと期待される。以上より、本研究の3つの柱から、我が国において、総合的に血友病患者の合併症を克服するための基盤・体制が構築されつつある。

E. 結論

血友病Bを対象としたAAVベクター臨床研究の基礎的技術、ならびにベクター大量作製の効率化技術の開発に成功した。今後、GMP製造のためのMCB、MVB作製等へと進め、本技術を用いて血友病B臨床研究を行う。さらに、より多くの患者が恩恵を受けられるよう、本治療の血友病Aへ応用、並びに、関節局所を標的とした細胞治療の開発を継続する。これら遺伝子細胞治療だけでなく、凝固因子インヒビター発症の機序解明・制御手法の開発、さらに調査研究による患者自身のニーズ抽出という、3つの研究結果を

有機的に統合することで、日本における血友病患者・HIV 薬害患者を取り巻く環境を改善し、合併症の克服に結びつけるように研究を継続させる。

E. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Sakata A, Ohmori T, Nishimura N, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thromb J*. Epub ahead of print
2. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol*. Epub ahead of print
3. Koyama K, Madoiwa S, Nunomiya S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. Epub ahead of print
4. Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 20:e40-44, 2014.
5. Yasumoto A, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Mimuro J. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thromb Res*. 131:444-449, 2013.
6. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, Mimuro J. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Res*. 132: 457-464, 2013.
7. Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim I, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B. *Hum Gene Ther*. 24: 283-294, 2013.
8. Koyama K, Madoiwa S, Tanaka S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Nunomiya S, Sakata Y. Evaluation of hemostatic biomarker abnormalities that precede platelet count decline in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care*. 28: 556-563, 2013.
9. Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Machida S, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K. Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Sci*, 104:1107-11, 2013.
10. Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami H, Klinman D.M, Ozawa K, Okuda K. Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of

- an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLoS One*, 8(3):e57606. 2013.
11. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost.* 12: 206–2. 2014.
 12. Chitlur M, Rivard GE, Lillicrap D, Mann K, Shima M, Young G; Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for performing thromboelastography/thromboelastometry in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 12(1):103-6. 2014.
 13. Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, Ohashi K, Okano T, Matsui H. A Novel Cell-Sheet Technology That Achieves Durable Factor VIII Delivery in a Mouse Model of Hemophilia A. *PLoS One.* 8(12):e83280. 2013.
 14. Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Optimal monitoring of bypass-therapy in hemophilia A patients with inhibitor using clot waveform analysis. *J Thromb Haemost.* 2013[Epub ahead of print]
 15. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 110(4):761-8. 2013.
 16. Shima M. [Hemophilia world] *Rinsho Ketsueki.* 54(8):736-43. 2013.
 17. Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 163(1):104-11. 2013.
 18. Sakurai Y, Kasuda S, Tatsumi K, Takeda T, Kato J, Kubo A, Shima M. Repression of Factor VIII Inhibitor Development with Apoptotic Factor VIII-expressing Embryonic Stem Cells. *Hematol Rep.* 5(2):30-3. 2013.
 19. Kajiwara M, Shima M, Yoshioka A. Two haemophilia patients with inhibitors who became ambulatory after physiotherapy under haemostatic cover with bypassing agents. *Haemophilia.* 19(5):e301-4. 2013.
 20. Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 11(7):1417-20. 2013.
 21. Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. *Thromb Haemost.* 110(2):316-22. 2013.
 22. Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. *Thromb Haemost.* 110(1):62-75. 2013.
 23. Oh J, Lim Y, Jang MJ, Huh JY, Shima M, Oh D. Characterization of anti-factor VIII antibody in a

- patient with acquired hemophilia A. *Blood Res.* 48(1):58-62. 2013.
24. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. *J Thromb Haemost.* 11(5):902-10. 2013.
 25. Shima M. [Hemophilia]. *Rinsho Ketsueki.* 54(2):189-97. 2013.
 26. Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. *Thromb Haemost.* 109(6):1007-15. 2013.
 27. Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim IK, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B. *Hum Gene Ther.* Mar;24(3):283-94. 2013.
 28. Inaba H, Shinozawa K, Seita I, Otaki M, Suzuki T, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K. Genotypic and phenotypic features of Japanese patients with mild to moderate hemophilia A. *Int J Hematol.* 2013 Jun;97(6):758-64. doi: 10.1007/s12185-013-1341-9. Epub 2013 Apr 27.
 29. Hirose J, Takedani H, Koibuchi T. The risk of elective orthopaedic surgery for haemophilia patients: Japanese single-centre experience. *Haemophilia.* 19:951-5. 2013.
 30. 長江千愛、瀧 正志：小児科領域のDIC、臨床に直結する血栓止血学、朝倉英策（編著）p 227-234、中外医学社（発行）2013
 31. Hideaki Imamura, Yuko Akioka, Masashi Taki, Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Motoshi Hattori: Successful living-related kidney transplantation in a boy with inherited dysfibrinogenemia. *Pediatric Nephrology,* 17(7): E161-E164, 2013.
 32. 白幡 聡、桑原光弘、福武勝幸、日笠 聡、酒井道生、嶋 緑倫、藤井輝久、堀越泰雄、瀧 正志、花房秀次、吉岡 章：インヒビター保有先天性血友病患者の出血エピソードにおける遺伝子組換え活性型血液凝固第Ⅶ因子製剤（ノボセブン[®]）の有効性および長期的安全性：10年間の市販後調査解析結果、血栓止血誌、24(6):593-602, 2013
 33. Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, Japan Childhood Thrombophilia Study Group: Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int.* 55(3):267-71, 2013.
 34. 瀧 正志：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、日本小児血液・がん学会雑誌、50(3)：450-456、2013.
 35. 橋川薫、中島康雄、長江千愛、瀧 正志：血友病の画像診断、画像診断、33(13):1484-1495, 2013.
 36. 酒井道生、瀧 正志、家子正裕、井田孔明、大平勝美、勝沼俊雄、高橋芳右、野上恵嗣、日笠 聡、福武勝幸、松下 功、松本雅則、窓岩清治：インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン：2013年改訂版、血栓止血誌、24(6):640-658, 2013.
 37. Saji T, Echizen H, Fukushima M, Hamaoka K, Hayashi M, Honda M, Ichikawa S, Matsuura H, Murakami T, Nakagawa M, Nakanishi T, Niwa K, Ogawa S, Okada T, Sumitomo N, Suzuki Y, Taki M, Yoda H: Guidelines for drug therapy in pediatric patients with cardiovascular diseases (JCS2012) –Digest version–,

- Circulation J 78(2):507-533, 2014.
38. Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu S, Ozawa K, Yamada K and Nabeshima T: Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int JNP*, 16:1559-1567, 2013.
 39. Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, Muramatsu S, Ichinose H and Hwu W-L: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-aminoacid decarboxylase deficiency. *Neurobiol Dis*, 52:177-190, 2013.
 40. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S and Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*, 3:1472, 2013.
 41. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K and Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med Res Int*, 2013:974819, 2013.
 42. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S and Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-*ADAR2* delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med*, 5:1-10, 2013.
 43. Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S and Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. *Adv Pharmacol*, 68:273-84, 2013.
 44. Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. Clinical implications of fetal transplantation in Medicine (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, London, 193-203, 2013.
 45. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植, アクチュアル脳・神経疾患の臨床 パーキンソン病と運動異常, 辻省次 壮編集, 高橋良輔 専門編集, 中山書店, 東京, 2013, pp384-391.
 2. 学会発表
 1. 柏倉 裕志、三室 淳、大西 彰、岩元 正樹、窓岩 清治、淵本 大一郎、鈴木 俊一、鈴木 美佐枝、千本 昭一郎、石渡 彰、安本 篤史、坂田 飛鳥、大森 司、橋本 径子、矢崎 智子、坂田 洋一: 血友病 A クローンブタ 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 2. 笠原 浩二、原 裕太、兼田 瑞穂、飯田 和子、林 もゆる、下仲 基之、大森 司、一瀬 白帝、山本 正雅、三木 俊明: 血液凝固第 XIII 因子基質としての血小板ビンキュリン分解産物 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 3. 坂田 飛鳥、大森 司、西村 智、鈴木 英紀、窓岩 清治、三室 淳、苅尾 七臣、坂田 洋一: Paxillin は Rap1b の修飾を介して血小板活性化を負に制御する 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 4. 清水 徹一郎、堀江 久永、細谷 好則、佐田 尚宏、安田 是和、窓岩 清治、大森 司、三室 淳、篠原 貴子、丹羽 康則: 当科における術後深部静脈血栓・塞栓症ハイリスク症例への対応 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013.4/11-13 福岡
 5. 窓岩 清治、大森 司、三室 淳、小澤 敬也、坂田 洋一: 静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者における PT-INR 自己測定的安全性に関する臨床研究 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013/10/31 神戸
 6. 窓岩 清治: Progression of thrombosis and hemostasis 血友病におけるインヒビター発生機序とそ

- の制御手法 第75回日本血液学会学術集会 2013.4/11-13 福岡
7. 窓岩 清治 : DIC 分子マーカーでどこまで分かるか 第14回日本検査血液学会学術集会 2013/7/27-28 東京
 8. 清水 徹一郎、窓岩 清治、大森 司、三室 淳、堀江 久永、細谷 好則、佐田 尚宏、安田 是和 : 当科における術後静脈血栓塞栓症予防の現状 第75回日本臨床外科学会総会 2013.11/21-23 名古屋
 9. Mizukami, H., Mimuro, J., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Precise evaluation of NAb status against adeno-associated viral vectors and an approach toward managing its inhibitory effect. The 16th Annual meeting, American Society for Gene and Cell Therapy, Salt Lake City, UA, May 15-18, 2013.
 10. Mizukami, H.: Hemophilia gene therapy – recent progress and current perspectives. In Symposium II: “genetic diseases”. The 19th Annual meeting, Japan Society of Gene Therapy, Okayama, July 4-6, 2013.
 11. Mizukami, H., Mimuro, J., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Accurate measurement of NAb status against AAV vector capsids and an approach toward managing its inhibitory effect. The 21st Annual meeting, European Society of Gene and Cell Therapy, Madrid, Spain, October 25-28, 2013.
 12. Yada K, Nogami K, Takeyama M, Shima M. A novel mechanism of development of the inhibitor associated with Pro1809Leu mutation in factor VIII. 第75回日本血液学会学術集会 2013 札幌
 13. 稲葉 浩、篠澤圭子、鈴木隆史、清田育男、大瀧 学、萩原 剛、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35回日本血栓止血学会学術集会 2013年5月 山形
 14. Yushi Chikasawa, Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Kyoichi Ogata, Takeshi Hagiwara, Takashi Suzuki, Hiroshi Inaba, Katsuyuki Fukutake. Novel homozygous mutation Met362Thr identified as a cause of cross-reacting material reduced factor X deficiency in Japanese brother patients. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.
 15. Hiroshi Inaba, Keiko Shinozawa, Manabu Otaki, Takeshi Hagiwara, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake. Identification and characterization of an L1 insertion in intron 16 of F8 in a patient with hemophilia A. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.
 16. Manabu Otaki, Keiko Shinozawa, Hiroshi Inaba, Yushi Chikasawa, Ikuo Seita, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake. A newly diagnosed with congenital factor XI deficiency in a mild hemophilia A patient by gene analysis. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.
 17. Keiko Shinozawa, Hiroshi Inaba, Takeshi Hagiwara, Manabu Otaki, Takashi Suzuki, Kagehiro Amano, Fukutake Katsuyuki. Sixteen different mutations in the SERPINC1 gene with antithrombin deficiency causing venous thrombosis. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4

- Amsterdam Netherlands.
18. 村松 崇、稲葉 浩、篠澤圭子、近澤悠志、備後真登、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 遺伝子解析によって確定診断に至った軽症血友病 A 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 11 月 神戸市
 19. 篠澤圭子、天野景裕、萩原 剛、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への取り組み 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 11 月 神戸市
 20. Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Noriko Suzuki, Noriko Yamazaki, Masashi Taki, Masahiro Ieko, Yoko Kawai, Standardization Subcommittee of Laboratory test for Thrombosis and Hemostasis: Reevaluation of activated partial thromboplastin time (APTT) reagents in Japan, XXVIth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, 2013
 21. Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pathogenesis of hemostatic abnormalities by L-asparaginase in children with acute leukemia. XXIVth ISTH, 2013
 22. Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Chiai Nagae, Mieko Akita, Noriko Suzuki, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pulsed methylprednisolone therapy markedly increases thrombin generation potential in a rabbit experiment. XXIVth ISTH, 2013
 23. Masashi Taki, Hideji Hanabusa, Katsuyuki Fukutake, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: What we can learn from real-life clinical experience data from a post authorization safety surveillance in PUPs/treated with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin free method in Japan. XXIVth ISTH, 2013
 24. Katsuyuki Fukutake, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and J-PASS study group: A prospective post-authorization safety surveillance study in 384 hemophilia A patients with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin free method demonstrates safety and efficacy in Japan. XXIVth ISTH, 2013
 25. Midori Shima, Katsuyuki Fukutake, Hideji Hanabusa, Tadashi Matsushita, Masashi Taki, Michio Sakai, Soyoku Nobeyama, Toshiyuki Hirakata, Alison Innes, Shuanglian Li, Wildon Farwell, Alvin Luk, Baisong Mei, Glenn Pierce : Japanese patients subpopulation analysis in a phase 3 study (B-LONG) of long-lasting recombinant factor IX Fc. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.
 26. Shinobu Tatsunami, Junichi Mimaya, Akira Shirahata, Masashi Taki: Factors associated with adult intracranial hemorrhage in hemophiliacs: From the Surveillance 2012. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013.
 27. Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Mieko Akita, Dai Keino, Ryou Ooyama, Mizuho Morimoto, Kimie Yoshikawa, Akitoshi Kinoshita, Masashi Taki: A study of the pharmacokinetics and the usefulness of primary prophylaxis in hemophilia patients of children, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society of

- Pediatric Hematology and Oncology, 2013.
28. 山下敦己、長江千愛、足利朋子、瀧正志：良好な止血管理ができた von Willebrand 病 type2A 合併妊娠の一例、第 116 回日本小児科学会、2013
 29. 足利朋子、長江千愛、山下敦己、瀧正志：急性期の診断が困難であった von Willebrand 病 type1 の腸骨筋出血、第 116 回日本小児科学会、2013
 30. 長江千愛、足利朋子、山下敦己、瀧正志：インヒビター発生に複数の danger signal の関与が疑われた重症血友病 A の PTP 症例、第 116 回日本小児科学会、2013
 31. 足利朋子、山下敦己、長江千愛、秋田美恵子、鈴木典子、山崎哲、高山成伸、瀧正志：ステロイドパルス療法は第 VII 因子活性増加を介してロビン生成能を増加させる、第 35 回日本血栓止血学会、2013
 32. 鈴木典子、山崎法子、辻村浩司、山崎哲、高山成伸、新井次郎、瀧正志：LA 測定における希釈ラッセル蛇毒時間のロット間差改善の試み、第 35 回日本血栓止血学会、2013
 33. 山崎哲、鈴木典子、高山成伸、秋田美恵子、山下敦己、瀧正志：FX 阻害薬 Ribaroxaban の添加試験における PT、APTT の延長に関する検討—異なる試薬による比較、第 35 回日本血栓止血学会、2013
 34. 福武勝幸、花房秀次、瀧正志、松下正、嶋緑倫、白幡聡、アドベイト PASS スタディグループ：遺伝子組換え第 VIII 因子製剤販売後調査結果から見た血友病患者の治療における課題、第 35 回日本血栓止血学会、2013
 35. 大谷政樹、新居登紀子、鈴木典子、山崎法子、山崎哲、高山成伸、瀧正志：ヘパリン類および FXa 阻害薬に対する APTT 試薬 4 種の感受性の比較、第 14 回第日本検査血液学会、2013
 36. 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の検討—LA 感受性—、第 14 回第日本検査血液学会、2013
 37. 鈴木典子、山崎法子、山崎哲、高山成伸、瀧正志：(テクニカルセミナー) APTT を取り巻く凝固検査の現状、第 14 回第日本検査血液学会、2013
 38. 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生存解析：2012 年 5 月 31 日まで、第 26 回日本エイズ学会、2013
 39. 酒井道生、天野景裕、工藤寿子、竹谷英之、野上恵嗣、瀧正志：血友病患者における疾患理解度とアドヒアランスの関連性の検討、第 55 回日本小児血液・がん学会、2013
 40. 瀧正志：血友病に対する定期補充療法の過去・現在・未来、第 55 回日本小児血液・がん学会、2013
 41. 瀧正志：血液凝固異常症の QOL に関する研究、第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2014
 42. 柿沼章子、久地井寿哉、岩野友里、藤谷順子、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 1 報) ICF (国際生活機能分類) に基づく生活機能尺度の開発第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11
 43. 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、藤谷順子、大平勝美 HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 2 報) 生活機能の社会経済的格差の分析、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11
 44. 岩野友里、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 3 報) 自己観察記録に基づく期間健康特性の分析 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11
 45. 柿沼章子、久地井寿哉、小俣智子、西牧謙吾、大平勝美、小児がん患者等の多職種協働による病気を持つ子どもの自立を実現するための動的教育支援システム分析、第 60 回日本学校保健学会、2013.11
 46. 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美、「エイズ患者/HIV 感染者」に対する長期療養時代の施設受

- け入れ可能性～北海道介護・福祉施設調査、第 72 回日本公衆衛生学会、2013.10
47. Toshiya Kuchii, Akiko Kakinuma, Tomosato Iwano, Katsumi Ohira, A nationwide survey of SRH and Socio-economic positioning for HIV/AIDS patients in Japan. ;The International Conference on Social Stratification and Health 2013:Interdisciplinary Research and Action for Equity, 2013.8.
 48. 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズの検討(第一報)―薬害 HIV 感染被害者・家族を事例としたパイロット調査について―、第 54 回日本社会医学会総会、2013.7
 49. 久地井寿哉、柿沼章子、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズの検討(第二報)―薬害 HIV 感染被害者・家族を事例とした支援モデルの検討―、第 54 回日本社会医学会総会、2013.7
 50. 井上佳世、柿沼章子、久地井寿哉、大平勝美、血友病家系女性の心理社会的課題と健康状況の調査研究報告 血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズ検討(第三報)、第 54 回日本社会医学会総会、2013.7
 51. 柿沼章子、久地井寿哉、小俣智子、西牧謙吾、大平勝美、小児がん患者等の多職種協働による病気を持つ子どもの自立を実現するための教育支援システム分析、第 22 回日本健康教育学会学術大会、2013.6
 52. 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、石射いずみ、大平勝美、日本の自発的無償献血(VNRBD)に関する健康教育上の課題、第 22 回日本健康教育学会学術大会、2013.6
 53. 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討(第一報) 薬害 HIV 感染被害者・家族を事例としたパイロットスタディ、第 39 回日本保健医療社会学会、2013.5
 54. 久地井寿哉、柿沼章子、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討(第二報)―薬害 HIV 感染被害者・家族における支援特性・支援環境構築の検討―、第 39 回日本保健医療社会学会、2013.5
 55. Muramatsu S: Gene therapy clinical trial update for AADC. Cell and Gene Therapies for Inherited Metabolic Disease, April 17, 2013, London.
 56. 村松慎一：パーキンソン病の AADC 遺伝子治療：長期効果遺伝子発現の検証。第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 31 日、東京。(プログラム p137)
 57. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
 58. Miyamoto Y, Iegaki N, Sumi K, Ishikawa Y, Furuta T, Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of shati/nat8l in the dorsal striatum affects emotional behaviors via dysfunction of serotonergic neuronal system in mice. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
 59. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of neurons in the primate brain using intrathecal injection of AAV vectors. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
 60. Iwashita Y, Tokuoaka H, Munezane H, Muramatsu S and Ichinose H: Distinct regulation mechanism of the dopamine content in the striatum from that in the midbrain. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
 61. Nitta A, Ishikawa Y, Iegaki Y, Sumi K, Hurukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Miyamoto Y: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the

- responses to methamphetamine between in mice nucleus accumbens and dorsal striatum. The 36th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
62. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread neuronal transduction in the primate brain via intrathecal administration of adeno-associated virus vectors. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 4, 2013, Okayama. (abstract p125)
63. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Muramatsu S and Saido TC: Global and effective gene delivery of neprilysin to the brain via intravascular administration of AAV vector in Alzheimer's disease mice. The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 5, 2013, Okayama. (abstract p179)
64. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治: 多系統萎縮症 (NSA-P) の FMT-PET 解析. Movement Disorder Society Japan 第7回学術集会, 2013年10月11日, 東京. (抄録集 p59)

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

エンベロープを含むウイ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
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

血友病は血液凝固第 VIII 因子 (FVIII)、第 IX 因子 (FIX) 活性が欠損する先天性出血性疾患である。現在の治療は凝固因子製剤の補充療法が一般的だが、血漿製剤による HIV、HCV 感染を引き起こし、社会的に多くの問題を生んだ。本研究では、HIV 感染者を含む血友病患者の合併症を克服するために、治癒を目指した遺伝子治療開発研究を推進する。常法の血友病 B に対する GMP レベル AAV ベクター作製技術は確立し、その効果をサルで検証した。本手法を用いたサル肝臓に対する遺伝子導入の効果は最長で 7 年にわたって持続中であり、安全性も問題なかった。本治療成功の鍵となる抗 AAV 中和抗体の鋭敏な測定法を開発し、同抗体は、血友病患者の 3~4 割に陽性であった (若年ほど陰性が多い)。6~7 割の患者は AAV ベクターによる遺伝子治療の恩恵を受けると推測される。AAV 中和抗体陽性患者への対策として、抗体陽性サルにカテーテルを用いた門脈内への投与方法を開発した。血友病が存在しないサル体内でヒト FVIII (サルと 98%以上相同性) を検出する手法を開発した。より患者数の多い血友病 A に対する遺伝子治療法の効果、安全性をサルで検討できる目処があった。細胞治療法では、ヒト間葉系幹細胞や iPS 細胞からの凝固因子の発現、血友病性関節症への効果を確認した。さらに、インヒビターの新規治療として線溶修飾 (PAI-1 抑制による免疫寛容誘導) の可能性を見出した。

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) 或いは第 IX 因子 (FIX) 遺伝子の異常に起因する遺伝性出血性疾患である。濃縮凝固因子製剤の投与が一般的な治療であるが、その半減期は短く頻回の治療を必要とすることが、患者 QOL を著しく阻害している。また、血中濃度が低下した際の予期せぬ出血合併症

の危険性も払拭できていない。我々は血友病患者の QOL 改善を目的として、疾患の治癒を目指した遺伝子治療法の開発を行っている。さらに、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新規免疫寛容誘導療法の確立を目標とする。

B. 研究方法

1) 血友病遺伝子治療：遺伝子治療には、その導入効率からは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。特に AAV8 型の AAV ベクターは、経静脈的に単回投与するだけで肝臓特異的な遺伝子の発現が可能となる。本年度は、臨床研究にむけ、本手法の長期安全性・有効性を引き続き検討した。AAV による遺伝子治療の成功の鍵をにぎる血中の AAV 抗体の保有率を、血栓止血学会学術標準化委員の協力を得て、実際の血友病患者を用いて検討した。AAV8 による遺伝子治療法をより患者数の多い血友病 A に外挿するために、サル体内でヒト FVIII を検出する系の作製を試みた。カニクイザルに遺伝子組換えヒト FVIII 製剤を Rapido adjuvant (Recenttec、Taiwan) と共に皮内投与を2週毎に2回行った。定期的に採血を行い、ヒト FVIII にのみ阻害活性を持つサル血清から、アフィニティークロマトグラフィーを用いて抗ヒト FVIII 抗体を精製した。我々は昨年度に血友病 A マウスの膝関節に凝固因子発現間葉系幹細胞 (MSC) を注入する細胞治療法が血友病関節出血・関節障害を予防しうることを報告した。本年度は、ヒト MSC を用い、マウス細胞と同様にサル免疫不全ウイルスベクター (SIV) により凝固因子発現が可能かどうかについて検討した。

また、iPS 細胞を既法により作成し、SIV によって凝固因子を発現しうるかを検討した。

2) インヒビター新規治療法の開発：第 VIII 因子/PAI-1 重複欠損マウス (FVIII/PAI-1dKO) を交配により確立した。FVIII/PAI-1dKO と第 VIII 因子欠損マウスにおける免疫応答を検討した。我々は過去に胸腺への凝固因子投与が血友病 A マウスのインヒビター発症を抑制しうることを見出した。iPS 由来自己胸腺上皮細胞を用いた免疫寛容誘導を確立するために、山中 4 因子の遺伝子導入により血友病 A マウス由来の iPS 細胞を作成した。作成した iPS 細胞には、様々なプロモーターをもつ SIV ベクターを感染させ、胸腺上皮細胞に効率よく凝固因子を発現するプロモーターを同定した。

(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 B に対する遺伝子治療法を検討するた

めに、肝臓特異的プロモーターと FIX 遺伝子搭載 AAV8 ベクターを、カニクイザルの末梢静脈から投与した。4 頭全例において治療域 (2-20%) の FIX 発現が得られた。本年度も継続して治療域の遺伝子発現を認め、最長 7 年の遺伝子発現、ならびにベクターの長期安全性を確認した。AAV の既感染に基づく中和抗体の存在は 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した。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が単純に適応できないことが明らかとなった。逆に、本結果は AAV を用いた遺伝子治療が 60-70% の患者、特に若年層の大部分に応用可能なことを示している。一方、中和抗体が陽性であっても、我々は上腸間膜静脈～門脈の一過性の血流遮断 (カテーテル法) により、遺伝子治療法が可能な技術を開発している。

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であったが、ヒト臨床試験を行うにあたり、非ヒト霊長類を用いた基礎的検討は必須である。これ迄、ヒト FVIII とサル FVIII を区別しうる測定系は存在しなかったが、カニクイザルにヒト

FVIII を免疫することにより、サル FVIII 活性を阻害せず、ヒト FVIII 活性を阻害するサル個体を得ることができた。このサル血清からアフィニティークロマトグラフィーで得た IgG を純化し、ELISA の系を構築した。本手法はヒト FVIII 抗原を特異的に検出し、サル FVIII 抗原とは反応しなかった。検出限界は 0.3-1% であり、少なくともサル血漿が 30% の条件下でもバックグラウンドの上昇は認めなかった。血友病患者の QOL を阻害する重要な因子である血友病性関節障害の新規治療法として凝固因子を強発現させた MSC の関節内投与手法を開発した。本手法を、ヒト臨床試験に応用するために、ヒト細胞での遺伝子発現の検討を行った。PAI-1 プロモーターの下流に FVIII を発現しうる SIV ベクターを作成し、ヒト MSC (理研より購入) に種々のウイルス濃度で感染させると、MOI 10-30 の条件下で上清に 40-100% の FVIII 活性が得られ、マウス MSC と同レベルの遺伝子発現が可能になった。

我々は iPS 細胞の血友病治療・インヒビター新規治療法への応用を考え、まずは野生型マウス、血友病 A マウス、血友病 B マウスから iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は、SIV ベクターにより機能的な凝固因子の発現が可能となった。この凝固因子発現 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。iPS か

ら効率的に凝固因子を発現するプロモーターとして EF1 α プロモーターが優れていた。胸腺上皮細胞特異的な発現には AIRE プロモーターが適していた。

FVIII/PAI-1dKO と第 VIII 因子欠損マウスにおける免疫応答を検討すると、PAI-1 欠損により、FVIII 反復刺激によるインヒビター発症が減少することが明らかとなった。リンパ節および脾臓では、CD11b+細胞や CD45R+細胞における MHC-II 抗原提示能の低下とともに、サイトカインプロファイルから T 細胞性アレルギー および MHC-ClassII 拘束性 CD25+FoxP3+制御性 T 細胞が誘導された。PAI-1 阻害薬(東北大学 宮田 博士より供与)も、FVIII 反復刺激による免疫応答を抑制した。さらに、骨髄細胞中の PAI-1 を阻害することで、同様の所見が得られた。

D. 考察

血友病 B に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療の基礎技術は確立している。すでに、非ヒト霊長類において、長期効果・安全性の検討も終えている。後は GMP レベルベクターの大量生産が可能となれば、臨床試験が開始できる状況である。すでにタカラバイオ株式会社の協力を得て、GMP グレードベクター産生のための基礎的技術開発が同時に進行しており、来年度には臨床試験のための礎が築けると考え

ている。本遺伝子治療は一回の経静脈的投与で、長期に渡って治療が可能であり、まさに治癒を目的とした治療である。一方で、この治療法は既感染に伴う抗 AAV 抗体が存在しているとベクターの感染そのものが成り立たない。本年度は、実際の血友病患者における抗 AAV 抗体の保有率を検討し、約 70%の患者が陰性であった。特に若年層においては抗体陽性者が少なく、本遺伝子治療の恩恵を受けることが明らかとなった。抗体陽性患者においても、AAV ベクターと血液との接触を最小限にすることで、ベクター感染を引き起こす系門脈バルーンカテーテル法を開発し、その効果をサルで検証した。本研究結果は、米国遺伝子細胞治療学会誌 (Molecular Therapy) の Editorial にも大きく取り上げられ、本手法の注目度の高さを示している。安全性を確立しつつ、GMP グレードベクターの精製が可能となれば、すぐにでも臨床研究が開始できるように準備していきたい。

AAV による治療法は上述の通り血友病 B が先行している。血友病 A に関しては、我々もマウスレベルでの検討は終えているが、残念ながらヒト臨床試験のレベルには達していない。その 1つの理由として、血友病の存在しないサル体内でヒト FVIII を検出する測定系が開発できなかったことが大きな理由である(血友病 B に関してはサル体内での検出系を世界で先駆けて開発・報告した)。本年度は血友病 A に対す