

法の長期安全性・有効性を引き続き検討した。血友病 A への効果的な治療を行うために FVIII 発現の改善を目的として、ヒト FVIII のコドン最適化を行った。

凝固因子を細胞から発現させる手法にはサル免疫不全ウイルスベクター (SIV) を用いた。昨年度までの検討で、MSC からの FVIII 産生には PAI-1 プロモーターが優れていることが明らかとなった。PAI-1 プロモーターの下流にコドン最適化 FVIII を搭載した SIV を作製し、サル MSC に感染を行い、上清の凝固因子活性を測定した。

(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 に対するベクター直接投与方法によ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 ベクターを作製した。カニクイザルの末梢静脈から同ベクターを投与し、本年度も継続して、その効果、安全性を検討した。最長 7 年以上の治療域の遺

伝子発現を認め、ベクターの長期安全性も問題なかった(図 1)。

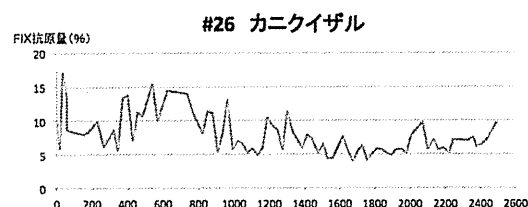


図 1 AAV8-FIX 投与後の長期効果

さらに患者数の多い血友病 A に本法を適用する検討を行った。AAV に挿入できる遺伝子長が 5kb に限られるため、FIX 遺伝子治療に用いた肝臓特異的プロモーター(HCRhAAT)を短縮し、そのプロモーター活性を検討した。現行の 625bp のプロモーターをエンハンサー領域、プロモーター領域に分け切断し、360bp の領域を得た。両者の下流にルシフェラーゼを発現する AAV8 ベクターを作製しマウスに投与した。短縮形のプロモーターでも肝臓におけるプロモーター活性は変わらず、全長 4.5kbp 程度の B ドメイン欠失型 FVIII を効果的に AAV に搭載できるようになった (図 2)。

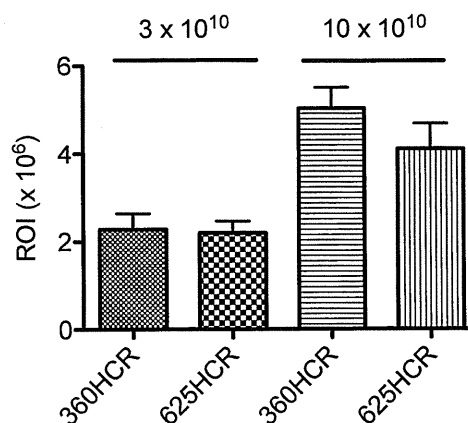


図2 プロモーター短縮によるルシフェラーゼ発現の違い

昨年度、ヒト FVIII をサルに免疫を行い、ヒト FVIII 抗原を特異的に検出し、サル FVIII 抗原とは反応しない測定系を開発した。上記プロモーターの下流で FVIII を発現する AAV8 ベクターを作製し、カニクイザルに投与した。残念ながら FVIII は 1% 前後の上昇しか得られなかった。

効果的な FVIII 産生を可能とするために FVIII のコドン最適化を行った。2 社のコドン最適化プログラムにより 2 種類の FVIII 配列を作製した。プラスミドベクターに同配列を組み込み、これを 293 細胞へトランスフェクションを行った。トランスフェクション後の上清 FVIII は劇的に改善した (図 3)。さらに、コドン最適化 FVIII を発現する AAV8 を作製し、血友病 A マウスに投与した。同様のベクター量で従来法の 40 倍程度の活性値を得た (図 4)。

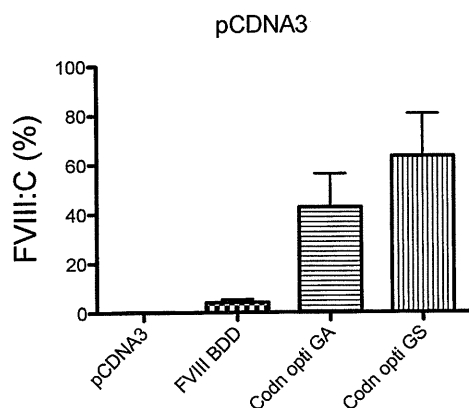


図3 プラスミドトランスフェクション法による

293 細胞上清中の FVIII 活性。2 社のアルゴリズムによる FVIII コドン最適化により FVIII 活性が改善する。

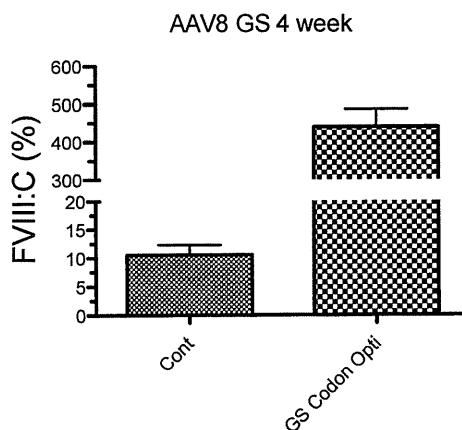


図4 コドン最適 FVIII 搭載 AAV8 によるマウス血友病 A の治療効果

昨年度までに、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。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、サル MSC に感染した。サル MSC からマウス MSC と同様の FVIII 活性の上昇を確認した。サル MSC は継代と共に増殖性が失われ、特に SIV ベクター感染後に細胞増殖が抑制された。そこでコドン最適化 FVIII を SIV ベクターに搭載し、同様の検討を行った所、低用量のベクターでも FVIII の発現を認め、細胞増殖を阻害せずにベクター感染を成立させることができた (図 5)。

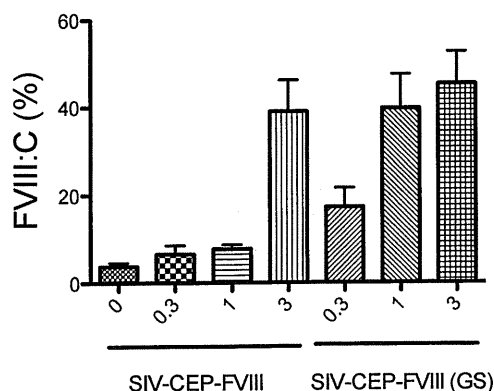


図5 コドン最適化によるサルMSC上のFVIII活性の違い. コドン最適化FVIIIの結果(GS).

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. 非ヒト霊長類において, ここまでの長期効果・安全性の検討を行った報告はない. 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, まさに治癒が可能な治療法である. 臨床試験, 治験の開始には GMP レベルベクターの大量生産が必要である. 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, 本年度に血友病 B 用 AAV8 ベクター産生用の基礎技術開発が終えている. 一方, 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. 我々は, 抗体陽性患者においても, 治療を可能とする系門脈バルーンカテーテル法を開発し, その効果

をサルで検証している.

AAV による治療法は血友病 B が先行し, 血友病 A ではヒト臨床試験が行われていない. 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. 昨年度から, 血友病 A に対する AAV ベクターの応用を本格的に開始し, サル体内でヒト FVIII を検出する測定系を開発した. 本年は, 同測定系を用いてサルでの前臨床試験を行ったが, AAV8 による治療効果は期待されたほどではなかった. しかし, FVIII のコドン最適化によって従来の 40 倍程度の治療効果改善を認め, 血友病 A の AAV 遺伝子治療に関してもある程度の目処がたった.

血友病患者の QOL を阻害する因子の 1 つとして血友病性関節障害の存在が挙げられる. 我々は過去に凝固因子発現 MSC の関節腔内投与が血友病の関節出血, 関節障害を予防しうることをマウスモデルで示した. 本年度は, ヒト MSC やサル MSC で SIV により凝固因子が発現可能であることを明らかとした. また, コドン最適化 FVIII を用いることで FVIII 産生効率が劇的に改善し, 感染に必要なベクター量を減じること成功した. 今後は, サルにより安全性を検討し, その結果を元にヒト臨床試験へと歩を進めたい. また, これまでに開発した血友病 A ブタを用いて関節障害への治療効果も検討したい.

E. 結論

抗 AAV 抗体の保有に関わらず、血友病 B に対する遺伝子治療技術は確立し、GMP グレードベクターが精製できれば臨床研究が可能な段階である。また、開発が遅れていた血友病 A に対する遺伝子治療法を推進するための準備が整った。今後は、得られた知見を、実際の臨床に還元するために効果・安全性の確認を継続する。

F. 研究発表

1. 原著論文

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.* 12: 1, 2014.
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.* 86:1990-1997, 2014.
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. *Criti care.* 18: R13, 2014.
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. Watanabe H, Kikkawa I, Madoiwa S, Sekiya H, Hayasaka S, Sakata Y. Changes in Blood Coagulation-Fibrinolysis Markers by Pneumatic Tourniquet During Total Knee Joint Arthroplasty with Venous Thromboembolism. *J Arthroplasty.* 29: 569-73, 2014.
6. 大森 司, 水上浩明, 窓岩 清治, 小澤敬也, 坂田洋一. 【血栓止血性疾患診療の最前線】血友病に対する治療の進歩 遺伝子細胞治療の面から. *臨床血液.* 55(8):899-907, 2014.
7. 大森 司. 【血液凝固研究/臨床最前線】血液凝固第 IX 因子(解説/特集) 日本血栓止血学会誌. 25(4):458-464, 2014.

8. 大森 司【内科疾患 最新の治療 明日への指針】(第9章)血液 血友病(解説/特集)
内科 113(6):1482-1484, 2014.

2. 学会発表

1. 柏倉 裕志, 大森 司, 三室 淳, 窓岩 清治, 井上誠, 長谷川 護, 小澤敬也, 坂田洋一:
レンチウイルスベクターによるマウス iPS 細胞からの機能的 FVIII の産生 第36回
日本血栓止血学会学術集 2014.5/29-5/31
大阪
2. 大森 司: ITP の病態と ITP 治療における
トロンボポエチン受容体作動薬の役割
第36回日本血栓止血学会学術集会
2014.5/29-5/31 大阪
3. 小山 寛介, 窓岩 清治, 布宮 伸, 鯉沼
俊貴, 和田 政彦, 大森 司, 三室 淳, 西
村 智, 坂田 洋一: 敗血症初期における重
症凝固障害の早期診断に有用なバイオマ
ーカーの検討 第36回日本血栓止血学会
学術集会 2014.5/29-5/31 大阪

G. 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。

「多能性幹細胞再樹立法」

出願番号：特願 2014-203679

研究課題 血友病 A インヒビターの産生制御法の開発に関する研究

研究分担者 窓岩清治（自治医科大学分子病態研究部 講師）

研究要旨

血友病 A インヒビターの制御方法である免疫寛容誘導療法の開発は、今日の血友病臨床において克服すべき重要課題である。本研究において、人工多能性幹細胞(iPSC)に対してサル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターを用いて第 VIII 因子(FVIII)遺伝子を導入後に胸腺髄質上皮細胞(mTEC)への分化誘導をはかり、血友病 A マウス胸腺に選択的な細胞移植を行い、血友病 A インヒビターの産生を効果的に制御する方法を検討した。FVIII 遺伝子を導入した iPSC 由来 mTEC の移植マウスは、iPSC のみの移植マウスに比較して FVIII 反復刺激後の抗 FVIII 価が有意に低下した。FVIII を遺伝子導入した iPSC の胸腺移植により第 VIII 因子に対する免疫寛容誘導状態を示すマウスと血友病 A マウスの免疫組織の比較定量解析から、発現増加を示す複数の免疫応答遺伝子群を特定した。これらの研究成果は、血友病インヒビター発症の予防とともに抗原特異的な新規免疫寛容誘導療法などの血友病インヒビター研究の基盤となる。

A. 研究の目的

本研究は、第 VIII 因子 (FVIII) インヒビターを保有するもしくは発症リスクの高い血友病 A 患者に対して、患者自身の体細胞から樹立した人工多能性幹細胞 (iPSC) を中枢性免疫組織である胸腺を標的とした選択的細胞移植療法により、インヒビター発症に対する特異的制御を実現するという将来的な臨床応用に向けての研究基盤を確立する。特に、血友病 A マウスモデルから樹立した iPSC による胸腺組織の再構築に主眼を置き、第 VIII 因子の遺伝子導入法、*in vivo* イメージングによる胸腺組織への選択的細胞移植手法を組み入れ、抗原特異的な中枢性免疫寛容へ到る可能性を探索し、その成立機序を検証する。

B. 研究方法

1) 血友病 A マウスの皮膚線維芽細胞由来 iPSC の樹立と SIV ベクターを用いた FVIII 遺伝子導入法の確立：(1) 成体血友病マウスの皮膚線維芽細胞を単離後、初期化因子遺伝子を組み込んだ環状 DNA を遺伝子導入し iPSC を樹立した。(2) iPSC を hanging drop 法により embryonic body

を形成させた後に、FGF-7, FGF-10 および BMP-44 存在下で培養し胸腺上皮細胞へ分化誘導した。(3) self-inactivating vector 型サル免疫不全ウイルス (SIV) を用いて、完全長ヒト第 VIII 因子 cDNA と 5'側上流域に CMV プロモーターおよび胸腺上皮細胞特異的な autoimmune regulatory element (AIRE) プロモーターを組み込んだ SIV ベクターを構築した。2) iPSC 由来胸腺髄質上皮細胞(mTEC)の胸腺組織への選択的移植と免疫応答能の検証 (1) 血友病 A 個体に対する免疫応答の制御を目的に胸腺組織への選択的な細胞移植法を、VEVO 超音波システムとマイクロインジェクター法により、胸腺組織へ超選択的な細胞移植を極低侵襲下で実施した。(2) iPSC 由来 mTEC の移植マウスに対して、第 VIII 因子の反復刺激により生じる抗第 VIII 因子抗体を定量し免疫寛容誘導の有無を判定した。(3) マウス免疫組織から CD4+細胞を単離し、第 VIII 因子感作マウス由来抗原提示細胞共存下で精製 FVIII 抗原に対する応答能を評価した。同時に CD4 陽性細胞のサイトカイン産生や CD4+CD25+FoxP3+制御性 T 細胞等の動

態評価を ELISPOT 法および FACS により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、自治医科大学生命倫理委員会の定める動物実験指針の基づき立案され、同倫理委員会により審査、承認されたものである。

C. 研究結果

1) 血友病 A マウスから皮膚線維芽細胞を単離し、Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc 遺伝子、および c-Myc を除いた 3 因子の遺伝子の導入により iPSC を樹立した。2) SIV ベクターを基本骨格としてヒト完全長第 VIII 因子 cDNA、B 領域欠損型第 VIII 因子 cDNA、eGFP および luciferase cDNA を組み込みとともに、これらの 5'側上流に CMV および EF-1alpha、autoimmune regulator

(AIRE)、cadherin 5、CD68 などの細胞特異的プロモーターを配置したコンストラクトを構築し、遺伝子導入用 SIV ウイルスベクターを作製した。3) 血友病 A マウス由来 iPSC 細胞に対して、EF-1alpha プロモーターを用いることにより第 VIII 因子の持続的な高発現細胞が得られること、A マウス胸腺上皮細胞株 IT-76MHC 細胞に対して IRE プロモーターにおいて特異的な発現が得られることを明らかにした。4) in vitro 分化誘導系により血友病 A マウス由来 iPSC が mTEC 様表現系を有することを EpCAM および PDGFRalpha 等の表面抗原解析により確認した。5) 構築した SIV ベクターにより第 VIII 因子やマーカー遺伝子を導入後した上で、セルソーターで分取後、血友病 A マウスの胸腺組織へ選択的に細胞移植をおこなった。eGFP ないしは luciferase の発現動態から血友病 A マウス胸腺に生着することを確認できた。6) 第 VIII 因子を遺伝子導入した iPSC の胸腺移植を行った血友病 A マウスは、iPSC のみの移植マウスに比較して、第 VIII 因子反復刺激後の抗第 VIII 因子価が低下していた。7) 第 VIII 因子を遺伝子導入した iPSC の胸腺移植により第 VIII 因子に対する免疫寛容誘導状態と血友病 A マウスの胸腺、脾臓およびリ

ンパ節の比較定量 mRNA 解析から、発現増加を示す複数の免疫応答遺伝子群を特定することができた。

D. 考察

本研究における免疫応答の制御を目的とした胸腺標的遺伝子細胞療法は、自己体細胞由来 iPSC を用いることにより移植細胞自身の拒絶を回避しながら抗原特異的免疫寛容を誘導し得ると考えられる。iPSC やさらなる mTEC 純化方法や効率が良く再現性の高い手法を確立することや、免疫機能の評価システムを構築することなどが臨床応用に向けた今後の検討課題である。

E. 結論

自己体細胞由来 iPSC と SIV ウイルスベクターによる遺伝子導入法を併用した遺伝子細胞治療法に関する免疫寛容誘導の基礎検討は、血友病インヒビター発症の予防とともに抗原特異的な新規免疫寛容誘導療法などの血友病研究の基盤となるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文論文

1. Madoiwa, S. Endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. J Intensive Care 2015; in press.
2. Watanabe, H., I. Kikkawa, S. Madoiwa, H. Sekiya, S. Hayasaka, and Y. Sakata. Changes in blood coagulation-fibrinolysis markers by pneumatic tourniquet during total knee joint arthroplasty with venous thromboembolism. J Arthroplasty 2014; 29: 569-573.
3. Wada, H., D. I. C. s. Japanese Society

- of Thrombosis Hemostasis, K. Okamoto, T. Iba, S. Kushimoto, K. Kawasugi, S. Gando, S. Madoiwa, T. Uchiyama, T. Mayumi, and Y. Seki. Addition of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan". *Thromb Res* 2014; 134: 924-925.
4. Sanada, Y., H. Sasanuma, Y. Sakuma, K. Morishima, N. Kasahara, Y. Kaneda, A. Miki, T. Fujiwara, A. Shimizu, M. Hyodo, Y. Hirata, N. Yamada, N. Okada, Y. Ihara, T. Urahashi, S. Madoiwa, J. Mimuro, K. Mizuta, and Y. Yasuda. Living donor liver transplantation from an asymptomatic donor with mild coagulation factor IX deficiency: report of a case. *Pediatr Transplant* 2014; 18: E270-273.
5. Sakata, A., T. Ohmori, S. Nishimura, H. Suzuki, S. Madoiwa, J. Mimuro, K. Kario, and Y. Sakata. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thromb J* 2014; 12: 1.
6. Mimuro, J., H. Mizukami, M. Shima, T. Matsushita, M. Taki, S. Muto, S. Higasa, M. Sakai, T. Ohmori, S. Madoiwa, K. Ozawa, and Y. Sakata. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol* 2014; 86: 1990-1997.
7. Koyama, K., S. Madoiwa, S. Nunomiya, T. Koinuma, M. Wada, A. Sakata, T. Ohmori, J. Mimuro, and Y. Sakata. 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* 2014; 18: R13.
8. Kashiwakura, Y., T. Ohmori, J. Mimuro, S. Madoiwa, M. Inoue, M. Hasegawa, K. Ozawa, and Y. Sakata. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 2014; 20: e40-44.
2. 学会発表
1. 窓岩清治, 血友病インヒビターの発症とその制御. 第36回日本血栓止血学会学術集会, 2014年5月, 大阪
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 特記事項無し

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

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

研究分担者 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

客員教授 小澤敬也, 教授 水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて検討を行った。遺伝子導入効率に大きく影響するベクターに対する中和抗体陽性率を測定したところ、サルでは約7割、ヒトでは約3割が陽性であった（8型 AAV の場合）。中和抗体陰性のサルでは末梢静脈へのベクター投与により全例で効果が得られ、治療域に達する効果を得るためのベクター至適用量が判明した。一方、中和抗体陽性の個体でも投与法を工夫することで治療域に至る発現が認められるようになった。更には、臨床研究に向けて必要となる新たな臨床グレードのベクター調製に関して、新たな委託先を決定し、大量調製に向けた検討を進めた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製・精製法、遺伝子導入効率改善法、中和抗体検出法などの基盤技術開発を図る。また、第IX及び第VIII因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用して主に霊長類に対する投与を行って、治療法の有効性と安全性につき検討する。現在までに得られた知見からは肝臓を標的として8型 AAV 由来のベクターを用いることが最適と考えられるため、この方法を利用して臨床への展開を進める。また、AAV ベクターに対する中和抗体が存在する場合には、血液中への通常の投与法では効果が得られないことから、ヒトにおける中和抗体陽性率を検討すると共に、陽性例に対して効果のある投与法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：遺伝子導入効率に大きな影響を与える中和抗体に関して、鋭敏なアッセイ系を確立し、医薬基盤研・霊長類医科学研究センターのカニクイザル188頭及び、日本国内の健常者85人、血友病

者59人を対象とした解析を行った。

・遺伝子導入動物実験：特にカニクイザルにおいて肝臓を標的として AAV ベクターを投与し、遺伝子発現効率の確認及び免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。また、ベクター溶液の門脈内への注入に際して投与法を工夫したところ、中和抗体陽性例でも効果が認められたため、同じ方法をカテーテルによって行うことでより安全かつ有効に実施可能かどうかにつき検討した。これまで行ってきた血友病 B に対する取り組みに加えて、より症例数の多い血友病 A に対する検討を行った。

・臨床研究に向けた取組み：サルにおいて得られた成果をヒトに役立てるため、臨床研究の推進に向けて必要な方策につき検討し、GMP グレードのベクター調製に関する検討を進めた。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境およ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でないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛

護上の配慮など)を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、ヒトサンプルの取扱いに際しては非連結匿名化を行い、測定結果と本人が関連づけられないように配慮した上で実施した。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究：改良した方法で8型のキャプシドに対する中和抗体陽性率をカニクイザル及びヒトにおいて測定したところ、カニクイザルでは抗体陽性率が71.3%に認められた。ヒトでは健康者と血友病者のいずれでも約30%が陽性であり、両グループ間には有意な差を認めなかった。一方、年齢による解析を行うと、若年層では低く年齢と共に上昇する傾向が認められ、1970年以前に出生した群では両グループ共に70パーセント以上の陽性率が認められ、抗体価も高い傾向が見られた。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第IX因子遺伝子を搭載した様々な血清型由来のベクターを投与し、中和抗体陰性例の全てにおいて治療域に至る効果を認め、そのために $(2.0 \times 10^{12} \text{vg/kg}$ またはそれ以上)のベクターが必要であった。一方、中和抗体陽性の個体においてもベクター溶液の注入前後に門脈内にカテーテルにより生理食塩水を注入することで、治療域に達する効果を得ることができた。

・臨床研究に向けた取組み：臨床グレードのベクターに関しては、委託先をタカラバイオ株式会社に変更し、GMPグレードのベクターの大量調製に向けた検討を進めた。

D. 考察

AAV ベクターを用いて肝臓を標的とする場合には静脈内投与で効果が期待できる8型が最も有望と考えられている。一方、これまで

のサルにおける検討では、8型に対する中和抗体の陽性率が高く、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。従って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。これはヒトに対して治療を行う際にも同様である。これまで8型に対する中和抗体の検出感度は不十分であったが、我々はこれまで改良を加えてきており、世界的に見ても最も鋭敏な検出法として確立できたものと考えられる。サルでは8型の陽性率が高いとされ、約7割であったが、ヒトでは健康人、血友病者のいずれにおいても陽性率は約3割であり、大多数の血友病患者において治療効果が期待できる。若年層で陽性率が低い理由は明らかではないが、A型肝炎ウイルスなどでも同様の事象が認められており、公衆衛生の改善、特に下水道の整備による経口感染の減少が影響している可能性がある。今後の追跡調査が必要であるが、この傾向は遺伝子治療の効果が期待できる対象者が増えることを意味しており、遺伝子治療を広く進めていく上で有利な知見である。

中和抗体陽性の場合にも効果を得るための方法として、我々はベクターの注入前後に生理食塩水を注入する方法を開発しており、今回は同じ原理に基づき、より安全に実施することを目指してカテーテルを用いることとした。カテーテルを用いてもほぼ同様に実施可能であり、効果も同じように認められていることからこの方法がより優れているものと思われる。これまでは低力価陽性の個体を選択して行っているが、今後は更に高い力価の中和抗体を有する個体においても有用性を検討していきたい。肝臓に対する遺伝子導入の効果の持続期間に関しては未だ明らかにされていないが、我々の経験では最長7年にわたりほぼ同レベルでの効果が認められることが判明しており、ヒトにおける有効性の持続に関しても大いに期待が持てる。

血友病Bに対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、2型AAVを用いた方法では効果が不十分と考えられ、8型を用いること

で臨床的な効果が期待できると報告されている。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるものと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果を挙げていきたい。

E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響する因子を解析し、そのうち最も重要な中和抗体検出法の改良を通じて肝臓への遺伝子導入効率が確保できるようになった。また、その成果を用いて臨床研究を企画するに至っており、準備を進めている。以上を通じて血友病の医療に役立つ遺伝子治療法の開発を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsukahara, T., Iwase, T., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Yasushi, S., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., Ozawa, K.: The Tol2 transposon system

mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies.

Gene Ther, *in press*.

Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol*, 86:1990-7, 2014.

2. 学会発表

Mizukami, H., Mimuro, J., Ohmori, T., Shima, M., Tadashi Matsushita, T., Masashi Taki, M., Shinji Muto, S., Satoshi Higasa, S., Michio Sakai, M., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Age-related eligibility of hemophilia gene therapy using AAV vectors. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Osaka, Oct. 31-Nov. 2, 2014.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

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

研究分担者 嶋 緑倫（公立大学法人 奈良県立医科大学 小児科学教室 教授）

【研究要旨】

インヒビター（同種抗体）の発生は、血友病治療上、最も深刻であり、解決すべき重大な合併症である。わが国ではインヒビターの発生要因や疫学に関する nation-wide なデータベースはもちろんのこと研究体制も確立されていない。本研究ではインヒビター陽性患者の疫学調査と並行して、全国レベルでの新規血友病の登録システムを新たに構築する。加えてインヒビター検出・診断の検査法の標準化を図るとともに、発生要因の解析と機序の解明を行う。これらは、国際的動向との調和と標準化、さらにインヒビター患者の適正な診療ガイドラインの策定と診療体制の確立に資するものである。その結果、わが国の血友病診療施設が網羅された基盤整備が可能となる。本研究は、平成 19 年から平成 21 年にわたり実施された「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（主任研究者：吉岡 章）」の研究成果を基盤に血友病診療体制の基盤整備と臨床研究を行うことを目的に以下の研究を実施した。

1. 第 1 研究として平成 19 年度から平成 21 年度に「インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究：インヒビター発生患者の実態調査（J-HIS1）と 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研究（J-HIS1/U20）」を実施した結果を受け、平成 22 年度より 2 年間で J-HIS1/U20 の登録データについて、インヒビター発生に関する補充療法関連の要因、特に、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤でのインヒビター発生の影響について、解析を行った。解析可能であった血友病 A 153 例中のインヒビター発生例は 41 例（26.8%）であったが、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤の間でインヒビター発生率に差はなかった、との論文を血栓止血学会並びに Hemophilia へ投稿し掲載された。また、J-HIS1 では、解析可能症例が 106 例集積され、このうち 53 例（50%）でインヒビターが消失していた。この時点で、血液型の病型とインヒビターの消長に影響があるかのデータが得られたため、血液型不明症例の再調査を実施し、再度解析を実施したところ、血液型の影響は消失した。
2. 第 2 研究として「新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究 J-HIS2」を継続実施した。平成 26 年 10 月 10 日現在 245 名の症例登録を得た。
3. 第 3 研究として「インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究」を実施した。血友病の治療において、血液凝固第 VIII 因子活性測定法の標準化とインヒビターを測定するベセスダ法の標準化が重要である。国際的に信頼性の高い測定機器のひとつである ACL 9000 と APTT 試薬ヒーモスアイエル APTT-SP を基準測定法と想定し、第 VIII 因子活性測定法の精度を検討したうえで、臨床の場で現実的に利用できるこれらの検査の精度を検証した。そして、インヒビター測定の原法である Bethesda 法を改良した Nijmegen 変法をさらに改良して、多くの検査室において簡便

に導入できるように Tokyo 変法の設定し、共通の方法として普及させることを試みている。

4. 第 4 研究として第 1 研究ならびに第 2 研究に登録された血友病患者の第 VIII 因子、第 IX 因子、サイトカイン (TNF- α 、IL-10、CTLA-4) の遺伝子解析を実施して、遺伝子異常を明らかにし、臨床的データとを合わせてわが国における血友病患者のインヒビター発生要因を明らかにすることを目的として、多施設協同にて「第 VIII 因子、第 IX 因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」の実実施計画・実施体制の確立を行った。

平成 26 年 10 月末現在、273 症例の検体を入手し 222 名の解析が終了しており、他施設からの受け入れ体制も構築できた。

5. 第 5 研究として、「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」を実施した。重症血友病 A 患者への補充療法により約 20%に抗第 VIII 因子(FVIII)同種抗体(インヒビター)が出現し、止血管理に難渋する。①軽症血友病患者への FVIII 製剤投与によるインヒビター出現症例が存在する。Pro1809Leu および Arg1781His を有する軽症血友病 A 患者のインヒビター出現 2 症例の発生機序を解明した。両インヒビターは type 2 パターンを示し、前者は正常 FVIII を不活化するも、患者 FVIII は不活化しなかった。一方後者は両 FVIII とも不活化した。前者は変異部位と離れた C2 エピトープを認識しており、作製した変異 FVIII (P1809L) の検討から、C2 ドメインの抗原性 (構造変異) 変化を来していることが判明した。②インヒビター除去を目指した免疫寛容導入療法 (ITI) の作用機序は解明されていない。ITI 中のインヒビター-IgG subclass を検討した結果、IgG1 と IgG4 の推移が ITI の効果を反映している可能性が考えられた。③インヒビター保有血友病 A へのバイパス止血療法における止血機序は十分解明されていない。我々は、今までに FVIIa/FX-FVIII 関連凝固機序の生理的存在を示唆してきた。新規バイパス製剤 (MC710; バイクロット) は FVIII 共存下で、凝固初期早期に FVIIa と FX(a)が作用し、インヒビター存在に関係なく、FVIII を活性化し、rFVIIa に比して相乗的に凝固機能を改善することがわかった。

A. 研究目的

血友病における止血療法の原則は、血漿由来 (pd) または遺伝子組み換え型 (r) の第 VIII 因子 (FVIII)、または第 IX 因子 (FIX) 製剤の補充療法である。しかしながら、補充療法の反復の結果、血友病 A、B 患者のそれぞれ 20~30%、3~5%で、FVIII、FIX を不活化 (中和) するインヒビター (同種抗体) が発生する。この場合、以後の止血治療は著しく困難となり、患者の QOL は低下する。インヒビター発生機序は未だ不明であるが、これまでに患者関連の要因として遺伝子異常、凝固因子活性、人種、遺伝学的要因、治療関連の要因として製剤の種類、投与方法、治療開始年齢、定期補充療法、手術や重篤な出血のための高用量治療などが考えられている。特に、遺伝子異常においては、大きな欠失例で最もインヒビター発生率が高く、ミスセンス点変異例では比較的少ないなど変異により発生率が異なることが知られている。また最近、血友病 A の rFVIII 投与群では pdFVIII 投与群に比べてインヒビターの発生頻度が高いとの報告 (Goudemand J, et al. Blood, 107, 2006) があった。さらに、欧州の多施設後方視的調査によるとインヒビターの発生リスクとして、遺伝

子異常、インヒビターの家族歴、初回の強力な治療の有無が最も有力な要因であることが報告された (Gouw SC et al. Blood 109,2007)。インヒビターの発生リスクを正しく評価して治療を計画することはきわめて重要であるが、我が国では国際的報告と比較できるインヒビターに関する nation-wide なデータベースがなく、遺伝子異常に関する情報も少ない。また、その基礎となる血友病に特化した全国レベルでの前方視的な患者登録システムが構築されておらず、インヒビター発生要因の分析や発生機序の解明はほとんど行われていない。さらに、その前提となるインヒビター測定法の標準化も未開発、未確立であり、インヒビターの診断面においても課題が多いのが現実である。ここに、本研究の目的と意義があり、本研究を通じてわが国の血友病診療施設を網羅した血友病診療・研究の基盤整備を構築する。

1. 第 1 研究では、吉岡班で得られた登録症例患者を対象 (J-HIS1/U20) に、患者数、年齢、重症度、製剤の種類、手術や感染症の有無、血液型などインヒビター発生要因に関する調査を継続し、データ解析を行った。

2. 第2研究では、全新規血友病患者の包括的な情報を前方視的に把握し、解析するための全国登録システムを構築し、調査研究を継続した(J-HIS2)。本年度は研究協力者を増やし、症例の登録を促進した。本システムを確立し、適正に運用することによって、わが国の全血友病の実態が判明し、インヒビター発生に関する前方視的観察と発生要因の解析が可能となる臨床研究基盤が整備される。
3. 第3研究では、血友病の治療において生じる重要な問題であるインヒビターの発生を研究するには、まず血液凝固第VIII因子活性測定法の標準化とインヒビターを測定するベセスダ法の標準化が重要である。国際的に信頼性の高い測定機器のひとつである ACL 9000 と APTT 試薬ヒモスアイエル APTT-SP を基準測定法と想定し、第VIII因子活性測定法の精度を検討し、インヒビター測定の方法である Bethesda 法を改良した Nijmegen 変法をさらに改良し、多くの検査室において簡便に導入できるように Tokyo 変法を設定し、実用性の高い測定法を標準法として普及を目指した。

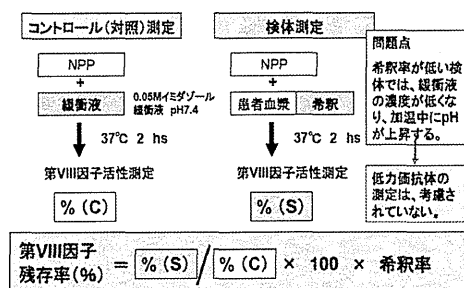


図1 ベセスダ法の問題点

まず、第VIII因子活性の測定法を標準化する必要があるが、これまでの研究において、一般の自動化機器では第VIII因子活性測定法において、希釈液として製造会社指定の希釈液（多くは緩衝液）が使われて標準化の妨げとなることから、検体調整操作の一部を用手法にして機器を超えた応用性の高い測定法を設定した。この方法は、検査室間で共通に使用でき、同一条件で第VIII因子活性の校正が可能な測定法となった。また、インヒビター測定の方法である Nijmegen 変法では正常プール血漿(NPP)の pH を安定させるために、固形のイミダゾールを加えて 0.1N とし 1N の HCl で pH を整えている。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合には操作が難しいことから、

Nijmegen 変法を普及させるために 2N の緩衝化イミダゾール液を用いて、20 分の 1 量を NPP に添加することにより緩衝化 NPP 作成の簡便化を図った Tokyo 変法の実用性を検証した。

これらを受けて、インヒビター標準血漿の作成手順を確立し、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段を検討するために、詳細な手順の統一が必要と考えられ、Tokyo 変法に基づく測定の全行程について、詳細な規定と手順書を策定して、サーベイランス参加施設における従来法による測定と比較し施設間差への影響の違いを検証することを今後の目的とした。

4. 第4研究は、第2研究における血友病データベースにおいて遺伝子異常に関する情報を提供するもので、インヒビター発生要因の評価に必須である。21年度の実績を踏まえ、平成22年度から名古屋大学を解析施設として加え、3施設において全国レベルの遺伝子解析を行うための体制を構築した。本年度は、昨年度に確立した J-HIS 登録症例を対象とした「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」を実施した。本研究により、遺伝子解析結果と治療側要因（製剤の種類や投与法の比較検討）を合わせて解析することで、インヒビター発生のリスクファクターの解明の基盤構築が可能となる。

5. 血友病 A は、X 染色体上の血液凝固第VIII因子(FVIII)遺伝子の異常に基づく先天性凝固障害性の出血性疾患である。ヒト血漿由来あるいは遺伝子組換え型 FVIII 製剤の投与により、血友病患者の QOL は飛躍的に向上してきている。しかし補充療法に伴い重症血友病 A 患者の約 20%に抗 FVIII 同種抗体(インヒビター)が発生する。その結果、インヒビター保有血友病患者の止血管理は極めて困難となる。①一方、軽症血友病 A 患者でも、FVIII 製剤投与によるインヒビター出現症例も散見されているが、その発生機序は不明である。今回、軽症血友病 A 患者でのインヒビター出現を 2 症例経験し、その発生機序を解明することを試みた。②また、インヒビター除去を目指した免疫寛容導

入療法 (ITI) が近年試みられているが、その作用機序は解明されていない。ITI 中の免疫学的側面からの検討としてインヒビターIgG subclass を評価した。③バイパス止血療法はインヒビター患者の止血治療に必須であるが、その止血機序は十分解明されていない。今まで我々は、FVIIa/FX-FVIII 関連凝固機序の生理的存在を示唆しており、今回の新規バイパス製剤 (パイクロット) の凝固反応機序を検討した。

B. 研究方法

1. インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究 (第 1 研究)

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) を実施しているが、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。

2. 新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究 (第 2 研究)

平成 21 年度に構築した前方視的登録システムを用いて、血友病研究の全ての基礎データとなる前方視的な新規患者の全国登録を行う。平成 26 年度は実施計画書の改訂に伴い、兄弟例の把握並びにインヒビター発生率を正確に把握するため、インヒビター発生後に受診した症例か否かの再調査を行った

3. インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究 (第 3 研究)

(1) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

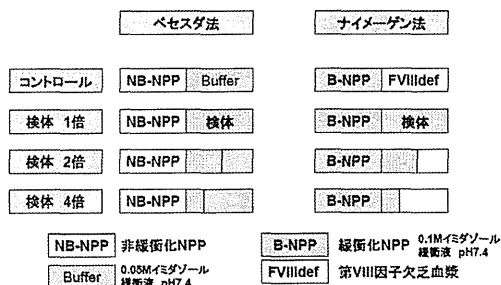


図 2 ベセスタ法とナイメーゲン変法

Bethesda 法を改良した Nijmegen 変法の使用が求められているが、一般の検査室に導入するには障害が多いため、どの検査室においても簡便に導入できるように改変した、Tokyo 変法の設定を試みた。Nijmegen 変法では、被検血漿と正常プール血漿(NPP)を混合した後の pH を安定さ

せるために、NPP に固形のイミダゾールを 0.1N になるよう加えて、1N の HCl 溶液で pH を 7.4 に整える操作が必要であるが、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合にはこの操作が難しい。そこで、2M の緩衝化イミダゾール液を作成し、NPP の 1/20 容を添加し、0.1N イミダゾール加 NPP を作成して操作を簡便化した (Tokyo 変法)。

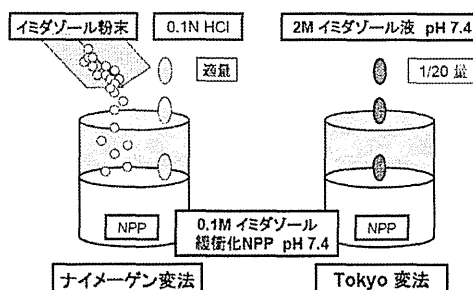


図 3 原法と Tokyo 変法との違い

Bethesda 原法と Tokyo 変法で作成した正常プール血漿を用いて、37°C 2 時間の加温による pH の変化を検討した。

(2) Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響

同様の方法により用意した血漿について第 VIII 因子活性の変化を求めた。

(3) 標準インヒビター血漿の作成

高力価インヒビター保有血漿を、生理食塩水を 1 次希釈液として、約 10BU/ml まで希釈した。さらに 10BU/ml の血漿を、①0.05M イミダゾール緩衝液、②5% ヒトアルブミン液、③ヒト第 VIII 因子欠乏血漿、をそれぞれ 2 次希釈液として希釈し、その影響を検討した。

(4) Tokyo 変法を用いた 再現性の検討

標準インヒビター血漿について生理食塩水を一次希釈液として約 10BU/ml まで希釈した後、第 VIII 因子欠乏血漿を二次希釈液として約 0.5、1.0、1.5、2.0BU/ml へ希釈し、再現性を検討した。

(5) インヒビター力価のサーベイランス

第 VIII 因子インヒビターを測定している主要施設の協力を得て、サーベイ検体、正常者プール血漿、第 VIII 因子欠乏血漿、pH 調整試薬、検体希釈液、測定手順マニュアルを配布し、各施設の標準測定法と研究班の指定する測定法の両法によりサーベイ検体を測定し、測定値の施設間差を調査する。

1) 参加依頼施設

1. 登録衛生検査所

- ① エスアールエル
 - ② ビーエムエル
 - ③ 三菱化学メディエンス
- ### 2. 臨床施設
- ① 奈良医科大学
 - ② 名古屋大学
 - ③ 聖マリアンナ医科大学
 - ④ 東京大学
 - ⑤ 帝京大学
 - ⑥ 東京医科大学

2) 配布材料

1. サーベイランス検体セット (2セット)

- ① 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ② 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ③ 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ④ 標準インヒビター血漿 A
- ⑤ 標準インヒビター血漿 B
- ⑥ 標準インヒビター血漿 C
- ⑦ 標準インヒビター血漿 D
- ⑧ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)
- ⑨ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)
- ⑩ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)

2. 正常者プール血漿

3. 第 VIII 因子欠乏血漿

4. pH 調整試薬 (2M 緩衝化イミダゾール液 pH7.4)

5. 検体希釈液 (0.05M 緩衝化イミダゾール液 pH7.4)

6. 測定手順マニュアル (詳細な規定と手順書)

7. サーベイランス測定結果報告書

8. 各施設測定法比較用調査表

① 各施設の標準測定法による第 VIII 因子インヒビター測定

サーベイランス検体セット (配布時順不同) の 1 セットについて、37°C 10 分間加温して解凍した後、十分混和する。直ちに各施設の標準測定法により第 VIII 因子インヒビターを測定する。全ての試薬は各施設が日常で使用しているものを用いる。各検体の第 VIII 因子インヒビター測定結果を報告書に記載し、各施設の測定手順書の写しと共に返却する。

② 研究班の指定する測定法による第 VIII 因子インヒビター測定

a. 緩衝化正常プール血漿の調整

送付した正常プール血漿を 37°C 10 分間加温して解凍した後、十分混和し、その 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えて十分混和する。

b. 検体の調整

サーベイランス検体セット (配布時順不同) の 1 セットについて、37°C 10 分間加温して解凍した後、十分混和する。検体⑧⑨⑩は添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿を用いて 4 倍 8 倍 16 倍の希釈液を作成する。(各 100 μ L + 300 μ L、50 μ L + 350 μ L、25 μ L + 375 μ L 混合を推奨)

c. 検体と正常プール血漿とのインキュベーション

緩衝化正常プール血漿と各検体 (検体⑧⑨⑩は各希釈検体) とブランクとして添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿を等量混和し、密閉状態で 37°C 2 時間加温する。検体は①から⑦の計 7 本、⑧⑨⑩の 3 濃度の計 9 本、ブランク 1 本の合計 17 本となる。

d. 第 VIII 因子活性の測定

検量線は添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えたものを用いて作成しておく。検体の測定に用いる第 VIII 因子欠乏血漿も、添付の第 VIII 因子欠乏血漿 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えたものを用いる。c で 2 時間のインキュベーションが終わった 17 本の検体について残存第 VIII 因子活性を速やかに各 2 回測定し、報告書に記載し返却する。

e. 第 VIII 因子インヒビター値の報告

指定の換算式により算出し、報告書に記載し返却する。

7. 施設間差等の検証

サーベイランス結果から、各施設の標準測定法と研究班指定の Tokyo 変法を比較し、施設間差などの変動状態を検証する

4. インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解

明に関する研究 (第 4 研究)

J-HIS1・J-HIS2 に登録された患者を対象に遺伝子解析研究「第 VIII 因子、第 IX 因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」を計画し、他施設からの検体の受け入れ体制の構築、国内 3 施設での共通な解析技術の統一をはかり遺伝子検査体制の基盤を強化した。

研究方法概略については以下の通りである。

まず、事務局を通じて他施設の研究参加の意思確認を行い、各研究協力機関における倫理委員会での承認を得る。承認が得られ次第、事務局より各研究機関の責任医師のもとへ必要症例分の検査キットを送付する。研究責任医師は対象となる患者の同意取得と採血を行い、連結匿名化の上、国

内3施設の内、決められた検査実施機関へ検体を速やかに送付する。検体を受領した3施設は、それぞれ決められた手順に従ってDNA抽出を行い、目的とする遺伝子の解析を行う。検査結果については、検査実施施設から事務局を通じて各研究責任医師のもとへ返却し、責任医師より患者への報告説明を行う。

表1 検査実施機関と検査内容

検査実施機関	対象	検査内容
東京医科大学	東日本	血友病A
	全国	免疫系遺伝子
奈良県立医科大学	西日本	血友病A
名古屋大学	全国	血友病B

5. 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 (第5研究)

① 軽症血友病Aインヒビター解析

1) 患者血漿インヒビターIgG精製とエピトープ解析
患者血漿をProtein G Sepharoseによって患者インヒビターIgGを精製した。FVIIIフラグメントでSDS-PAGE/immunoblotによりエピトープを同定した。

2) インヒビターによる正常/患者血漿のFVIII不活化
インヒビターIgGを正常および患者血漿、および変異FVIIIに37°C2時間反応させ、残存FVIII活性を凝固一段法で測定した。

3) インヒビターIgG、変異FVIII蛋白の機能解析

i) すでに確立した microtiter well 上で固相化 von Willebrand 因子およびリン脂質とFVIIIとの直接結合実験およびインヒビターIgGの抑制能をELISA法で評価した。

ii) FVIIIにおけるトロンビンおよびFXa活性化反応、およびインヒビターIgGの抑制能を凝固一段法で評価した。

② ITI中のインヒビターIgG subclassの検討

固相化FVIIIに患者血漿を反応させ、標識各抗IgG subclass抗体にて測定した。

③ MC710によるFVIII活性化

新規バイパス製剤MC710とFVIII/インヒビター共存下でのトロンビン生成能を評価した。微量MC710(1nM)のFVIII活性化作用を凝固一段法やトロンビンやFXa生成試験で評価した。さらに、MC710のFVIII活性化作用における各種FVIIIインヒビター(各種エピトープ)の影響を凝固一段法を検討した。

(倫理面への配慮)

第1~5研究のうち、

第1研究：インヒビター発生患者の実態ならびにイン

ヒビター発生要因に関する後方視的調査研究

1) インヒビター発生患者の実態調査 (J-JIS1)

2) 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)

第2研究：新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究については、

ヘルシンキ宣言、疫学研究に関する倫理指針(平成19年11月1日 文部科学省・厚生労働省)に従って実施する。そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学附属病院臨床研究審査委員会(IRB)の審査承認を得た(平成20年4月22日に承認済)。また、各施設での倫理委員会の承認が必要な場合は、各施設にて取得する。

第3研究：今回の研究は基礎的研究であり患者由来の検体を用いないため個人情報が必要としない。また、先天性第VIII因子欠乏症患者血漿とインヒビター血漿は市販品を用いたので患者の個人情報は取り扱わなかった。

第4研究：「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」では、ヘルシンキ宣言、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)に従って実施する。そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学附属病院 医の倫理審査委員会(IRB)の審査承認を得た(平成22年10月13日に承認済)。また、各施設での倫理委員会の承認が必要な場合は、各施設にて取得する。

第5研究：被験者の血液採取にあたり、informed consent を厳格に行い同意を得て、得られる個人情報については各種法令等遵守し、個人情報等保護に十分配慮し実験を行った。

C. 研究結果

1. インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究 (第1研究)

血友病 A 153 例中のインヒビター発生例は 41 例 (26.8%) であったが、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤の間で、インヒビター発生率に差はなかった。本研究成果を日本血栓止血学会誌並びに Hemophilia に投稿し掲載された (Shirahata A, Shima M, et al. Haemophilia An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with

congenital haemophilia in Japan. Haemophilia. ;17: 771.). また、第 23 回国際血栓止血学会にて発表した (Shirahata A, Shima M, et al. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日)。

2. 新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究 (第 2 研究)

平成 26 年 5 月に未登録血友病患者の人数を把握し、新規登録ファイルを公布した。平成 26 年 7 月には、診断時～平成 26 年 7 月末までの追跡調査を行った。

平成 26 年 10 月 10 日現在の登録状況並びに平成 26 年 7 月末までの追跡結果は以下のとおりである。

登録症例数：245 名 (本年度予定:150 例)

登録施設数：39 施設

表 2 【登録・追跡状況】

病型	血友病 A	213 (86.9%)
	血友病 B	32 (13.1%)
インヒビター発生	血友病 A	46 (21.6%)
	内、Inh 発生後に受診した症例を除く	38
	血友病 B	2 (6.2%)
	内、Inh 発生後に受診した症例を除く	2
最終追跡年	2014 年	201 (82.0%)
	2013 年	19 (7.8%)
	2012 年	12 (4.9%)
	2011 年	1 (0.4%)
	2010 年	2 (0.8%)
	追跡未実施	10 (4.1%)
通院状況	通院中	227 (96.6%)
	転院	7 (3.0%)
	中止	1 (0.4%)
	中止理由：治験参加のため	

表 3 【患者背景】 中央値[最小値・最大値]

性別	男	243 (99.2%)	
	女	2 (0.82%)	
診断時年齢	0 歳 7 ヶ月 [0 歳 0 ヶ月・75 歳 9 ヶ月]		
診断年	2007 年	22 (9.0%)	
	2008 年	39 (15.9%)	
	2009 年	20 (8.2%)	
	2010 年	33 (13.5%)	
	2011 年	48 (19.6%)	
	2012 年	57 (23.3%)	
	2013 年	19 (7.8%)	
	2014 年	7 (2.9%)	
	重症度	重症	172 (70.2%)
		中等症	41 (16.7%)

	軽症	32 (13.1%)
診断の契機	家族歴	70 (28.6%)
	出血	169 (68.9%)
	その他	4 (1.6%)
	未記入	2 (0.8%)
家族歴	なし	133 (54.3%)
	あり	104 (42.4%)
	→内 8 名にインヒビターの家族歴あり	
	不明	8 (3.3%)
兄弟例	16 組 内双胎 3 例	

表 4 【治療状況】 *インヒビター発生例については、インヒビター発生前の事象

治療法*	未治療	13 (5.6%)
	定期補充	144 (61.8%)
	出血時のみ	76 (32.6%)
カテーテルの挿入*	なし	216 (91.9%)
	あり	19 (8.1%)
在宅注射の実施	なし	119 (50.6%)
	あり	116 (49.4%)

表 5 【濃厚治療】 *インヒビター発生例については、インヒビター発生前の事象

DangerEvent*	なし	160 (68.1%)
	あり	75 (31.9%)
重篤出血*	なし	185 (78.7%)
	あり	50 (21.3%)
頭蓋内出血*	なし	210 (89.4%)
	あり	25 (10.6%)
上記以外の重篤出血*	なし	197 (83.8%)
	あり	38 (16.2%)
手術・観血的処置*	なし	222 (94.5%)
	あり	13 (5.5%)

表 6 【初回投与について】 中央値[最小値・最大値] / () 内はパーセント

初回投与年齢	0 歳 10 か月 [0 歳 0 ヶ月・78 歳 5 ヶ月]	
初回投与量	250	[90・2500]
体重当りの初回投与量	34.5	[10・192]
初回使用製剤	アドベイト	120 (55.3%)
	コジネイト FS バイオセット	63 (29.0%)
	クロスエイト M	2 (0.9%)
	コンファクト F	6 (2.8%)
	ノバクト M	9 (4.1%)
	ベネフィクス	14 (6.5%)
	クリスマシン M	1 (0.5%)

表 7 【初回投与の目的】

初回投与の目的	合計 (%)
予備的補充	11 (5.1)
定期補充	17 (7.8)
手術・観血的処置	8 (3.7)
出血	181 (83.4)
A11_その他	7 (4.0)
Ope	1 (0.6)
けが(すり傷、切り傷)	2 (1.1)
口の中(歯肉以外)	26 (14.7)

右かかと	1(0.6)
右大腿(前)	2(1.1)
右肘	1(0.6)
右肩	1(0.6)
右腕	1(0.6)
右膝	8(4.5)
右臀部	2(1.1)
右足首	5(2.8)
大腿(前)	1(0.6)
左下腿	3(1.7)
左大腿(前)	3(1.7)
左肘	1(0.6)
左肩	2(1.1)
左腕	3(1.7)
左膝	12(6.8)
指関節	1(0.6)
採血部位	15(8.5)
歯肉	2(1.1)
消化管出血	6(3.4)
皮下血腫(それ以外)	22(12.4)
皮下血腫(首から上)	3(1.7)
筋肉内出血_その他	1(0.6)
関節内出血_その他	2(1.1)
頭蓋内出血	17(9.6)
頭血腫	3(1.7)
頭部の皮下血腫	20(11.3)
鼻血	3(1.7)

合計 177(100.0)

表 8 【インヒビター】中央値[最小値・最大値] / () 内はパーセント

※診断時インヒビター値、最大値 0 の症例は、その他臨床症状等からインヒビター発生と診断されたためです。

発生年齢	1歳2ヶ月[0歳5ヶ月・4歳2ヶ月]	
総投与日数	13	[4-48]
総投与量	4550	[1000-25400]
診断時インヒビター値	2.46	[0※-47]
最大値	5.6	[0※-1000]
タイプ	High	26 (54.2%)
	Low	22 (45.8%)
出血時治療	出血なし	4 (10.0%)
	バイパス製剤	21 (52.5%)
	中和療法	10 (25.0%)
	中和+バイパス	5 (12.5%)
インヒビター治療	ITI 実施	34 (70.8%)
	未治療	14 (29.2%)
消失状況	消失	28 (58.3%)
	未消失	20 (41.7%)
消失理由	ITI の成功	18 (64.3%)
	自然消失	8 (28.6%)
	その他	1 (3.6%)

今回、解析対象を 25ED 到達あるいはインヒビターが発生した重症血友病 A 患者に限定し、現時点で解析可能な 110 例を抽出して、(1) 患者側の因子、(2) 血友病治療に関する因子に分けてインヒビター発生リスク要因を予備的に検討した。結果は以下のとおりである。

表 9 【発生要因解析-患者背景①】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P 値
2014/7/31 現在日齢	(日)	1657.4	1776.0	0.33
血液型	A	27	13	0.73
	B	7	3	
	O	16	11	
	AB	4	4	
診断の契機	家族歴	23	11	0.98
	出血	61	32	
	その他	2	1	
診断時の年齢	(日)	217.1	209.1	0.85
血友病の家族歴	なし	57	22	0.11
	あり	29	22	
インヒビターの家族歴	なし	73	36	0.37
	あり	3	4	
分娩様式	経膣	60	34	0.62
	帝王切	24	10	
F8遺伝子型	High Risk*	33	23	0.83
	Low Risk**	21	12	

*: large deletions, non-sense mutations, intron 1 and 22 inversions

** : small deletions and insertions, missense mutations, and splice-site mutations

表 10 【発生要因解析-患者背景②】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P 値
在胎週数	(週)	38.43	38.33	0.79
重篤疾患の合併	なし	80	38	0.25
	あり	5	6	
栄養法	母乳	37	20	0.81
	人工乳	6	4	
	混合	40	18	
家族のアレルギー	なし	60	30	0.91
	あり	19	9	
患者のアレルギー	なし	67	38	0.51
	あり	19	7	

表 11 【発生要因解析-患者背景③】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P 値
Danger Event	なし	56	28	0.89
	あり	30	17	
重篤疾患	なし	67	32	0.52
	あり	19	13	
頭蓋内出血	なし	76	36	0.30
	あり	10	9	
上記以外の重篤出血	なし	76	41	0.85
	あり	10	4	
手術・観血的処置	なし	67	38	0.51
	あり	19	7	

表 12 【発生要因解析-患者背景④】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P 値
感染症発生の有無 ¹⁾	なし あり	72 14	42 3	0.20
25ED までに 感染症発生日と輸 注日が同日 ¹⁾	なし あり	80 6	44 1	0.46
感染症発生日と輸 注日が同日	なし あり	77 9	43 2	0.40
ワクチン接種の有 無 ^{1) 2)}	なし あり	14 67	12 28	0.17
25ED までに ワクチンと輸注を 同日実施 ^{1) 2)}	なし あり	53 28	33 7	0.08
ワクチンと輸注を同日 実施 ²⁾	なし あり	38 43	32 8	<0.01

表 13 【発生要因解析-治療に関する因子①】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P 値
初回投与時の 日齢	(日)	333	312	0.63
初回投与日の 投与量	(U/kg)	43.5	46.0	0.68
初回投与の 目的	定期補充 出血 手術・観血的 処置 予備的補充	9 73 2 2	4 35 2 3	0.54
濃厚な治療*	なし あり	63 23	30 15	0.56
治療法**	出血時・予備的 定期補充	1 84	26 19	<0.001
カテーテル 挿入	なし あり	71 15	43 2	0.07
カテーテル 取り出し	なし あり	81 5	45 0	0.24

*: 5 日以上治療を連続する場合を濃厚な治療とした。

** : 定期補充を開始した場合は定期補充とし、それ以外は出血時・予備的とした。

最近、血友病治療は出血時のオンデマンド治療から定期補充療法へと大きな変化がみられている。今回、最近の本邦における新規血友病患者の診断後早期の実態を明らかにする。平成 20 年度開始の新規に診断された血友病患者に関する前方視的患者登録システム (J-HIS2) に登録され、診断後 1 年以上の血友病 A (HA) 202 例 (重症 : S 149、中等症 : Mo 32、軽症 : M 21)、血友病 B (HB) 30 例 (S 16、Mo 9、M 5) を対象に、診断後早期の血友病患者の実態を解析した。

表 14 【診断後早期の実態-診断年齢】

		mild		moderate		severe			
n	26			41		165			
Positive family history	12	0.38	(0.08-2.42)	20	0.54	(0.08-1.1)	68	0.17	(0-0.65)
Negative family history	12	4.46	(2.12-7.23)	21	0.75	(0.56-1.92)	92	0.58	(0.42-0.92)
Un-known	2	22.85	(12.17-33.52)				5	0.58	(0.50-1.00)

Median (25-75percentiles)

表 15 【診断後早期の実態-凝固因子製剤の投与を要した初回出血年齢および初回関節出血年齢】

		mild		moderate		severe			
n	26			41		165			
Age at first bleed needed to treat	14	3.11	(2.31-7.68)	36	1.09	(0.68-2.25)	146	0.85	(0.6-1.2)
Age at first joint bleed	7	3.55	(3.13-6.38)	20	1.81	(0.73-2.96)	76	1.42	(1.02-2.07)

Median (25-75percentiles)

表 16 【診断後早期の実態-初回の出血部位】

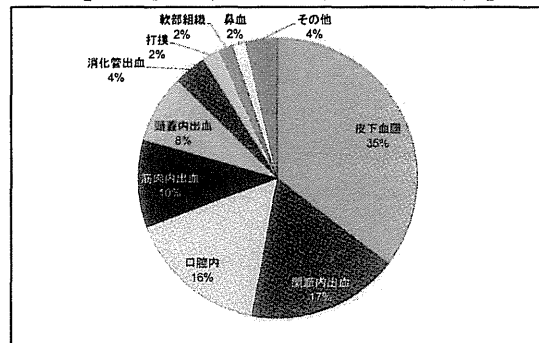


表 17 【診断後早期の実態-初回関節出血の部位】

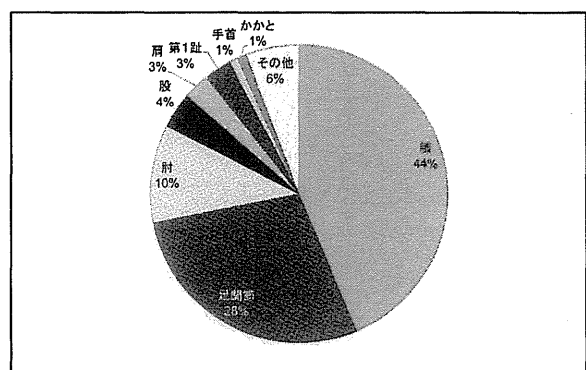


表 18 【診断後早期の実態-診断後 1 年間の出来事】

	全体(223)	重症(160)	中等症(40)	軽症(23)
凝固因子製剤の投与	184 82.5%	145 90.6%	31 77.5%	8 34.8%
定期補充の開始	82 36.8%	75 46.9%	6 15.0%	1 4.3%
家庭治療の開始	26 11.7%	25 15.6%	1 2.5%	0 0%
CVAD挿入	29 12.9%	29 17.9%	0 0%	0 0%
頭蓋内出血	21 9.4%	20 12.5%	1 2.5%	0 0%
重篤出血	17 7.6%	11 6.9%	5 12.5%	1 4.3%
インヒビター発生	34 15.3%	33 20.6%	1 2.5%	0 0%