

201421004B

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～26年度 総合研究報告書

平成27（2015）年3月

研究代表者 坂田 洋一  
(自治医科大学)



# 目 次

I.	総合研究報告	
	血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究	1
	(自治医科大学 坂田 洋一)	
II.	総合(分担)研究報告	
1.	血友病遺伝子治療基礎研究	11
	(自治医科大学 大森 司、坂田 洋一)	
2.	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	23
	(自治医科大学 窓岩 清治)	
3.	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	28
	(自治医科大学 小澤 敬也、水上 浩明)	
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	32
	(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	69
	(自治医科大学 菱川 修司)	
6.	臨床研究用候補製剤 (SIV ベクター) の GMP 製造技術：臨床応用技術開発	73
	(ディナベック株式会社 井上 誠)	
7.	血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究	75
	(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	83
	(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	87
	(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志)	
10.	薬害 HIV 感染被害者・家族等の現状からみた、 血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究	101
	(社会福祉法人はばたき福祉事業団 柿沼 章子)	
11.	血友病に対する遺伝子治療：臨床研究の課題と対策	110
	(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	115
	(タカラバイオ株式会社バイオ産業事業部門 峰野 純一)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	127
IV.	研究成果の刊行物・別刷	136

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。治療には凝固因子製剤の補充療法が行われるが、非加熱血漿製剤によるウイルス感染を引き起こし、社会的に多くの問題を生んだ。製剤によるウイルス感染症は、薬害被害から 30 年が経過した今も患者 QOL を阻害している。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：遺伝子治療は 1 回の治療で永続的に治療効果が得られるため、患者 QOL を改善し、その対費用効果も高い。我々は、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) による血友病 B の遺伝子治療法を検討している。種々の血清型の中で AAV8 ベクターは肝臓からの生理的な凝固因子発現が可能である。カニクイザルに対して、1 回のベクター投与により 7 年以上の治療域の凝固因子発現を確認した。副作用も認められなかった。AAV8 を用いた臨床試験を行うために、GMP グレードベクターを効率よく生産するシステムとして、バキュロウイルスによる AAV 製造システムを立ち上げた。血友病 B に使用する FIX 発現ベクター産生の条件を検討し、概算で 150L の培養系によって臨床研究に必要なベクター量が得られる試算となった。AAV ベクターによる遺伝子治療を阻害する抗 AAV カプシド中和抗体は、血友病の 3~4 割が陽性であった。AAV 中和抗体陽性患者に対しては、バルーンカテーテルを用いた経門脈ベクター投与法を開発した。本治療の安全性について、マイクロミニブタを用いて検討した。本法による循環動態や肝障害への影響が最小限であることを確認した。より患者数の多い血友病 A の前臨床試験を目的として、サルに FVIII 発現 AAV8 ベクターを投与した。血友病 B と同様の手法で、従来の FVIII cDNA を用いた場合、サルにおいては十分な血中抗原量は得られなかった。しかし、FVIII のコドン最適化によって、マウスでは、従来法と比較し、治療効果が 40 倍改善した。細胞治療法では、凝固因子発現間葉系幹細胞 (MSC) の関節内投与による新たな血友病関節障害・関節出血の治療法を開発した。本法の臨床応用を目指し、SIV ベクターによるサル、ヒト MSC での凝固因子発現を確認した。さらに SIV ベクターの GMP 製造技術を確立した。また、新規血友病動物モデルとして血友病 A ブタを産出させた。

2) インヒビター対策：血友病患者へのインヒビター (同種抗体) の発生は製剤の効果を減じる深刻な問題であり、解決すべき重大な合併症である。新規治療法として、線溶系調節因子である PAI-1 阻害によるインヒビター発症の抑制、さらに SIV ベクターで FVIII を発現させたマウス iPS 細胞由来の胸腺上皮細胞投与による免疫寛容法を開発した。実臨床では、過去のデータベース J-HIS1 の解析から、血漿由来と遺伝子組み換え製剤間のインヒビター発生率に差はなかった。我が国初の新規血友病患者に関する前向きコホート (J-HIS2) では、研究期間に新

規患者 168 例を順調に組み入れ、最終年度 10 月の段階で 245 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 J-HIS1, J-HIS 2 の 273 症例の検体から凝固因子・サイトカインの遺伝子解析を開始した。遺伝子背景からは, null 変異がインヒビター群で高率であり (77%), サイトカイン遺伝子多型 TNF  $\alpha$  -308 の A アレルとインヒビター発症に相関を認めた。F8 解析には, より簡便な次世代シーケンス法を導入し, 同義的変異 (c. 120C>A; p. (L40=)) を同定した。実臨床におけるインヒビター診断のために, より安定して簡便に測定できる Tokyo 変法を開発し, 検査の標準化を進めた。本法は, 既法と比べ擬偽陽性反応が少なく, その再現性も優れていた。免疫寛容誘導療法 (ITI) 治療時の IgG サブクラスは初期に IgG1 の一過性の上昇, 再燃時には IgG4 の上昇を認めた。インヒビター発症時の止血治療としてバイパス治療が行われるが, 本治療の止血効果のモニタリングに凝固波形解析が有用なこと, さらに新規バイパス治療薬を用いて, インヒビター存在下での新たな止血機序を見出した。さらに軽症血友病患者のインヒビター発症メカニズムを明らかとした。

3) QOL 向上のための調査研究 : 他国との QOL 比較が可能な SF-36 を用いた本邦初の血友病患者 QOL 調査を行った。本研究は世界で最も大規模な血友病患者 QOL 調査となった。血友病患者では身体に関する下位尺度が我国の国民標準値よりも低いことが示された。中等症でも重症と同様に身体下位尺度が低下した。国際比較では他国と同様の QOL パターンを示した。QOL を阻害する因子として血友病関節症, ウイルス感染, 重症度, 注射回数が関連した。血友病患者の整形外科的関節手術時のリスク因子を検討すると, 術後死亡や感染症にウイルス感染に起因する肝障害の重症度, インヒビターの発症などが関与した。当事者参加型研究として機縁法, 自記式質問票を用い, 保因者に支援ニーズ調査を実施した。新たな保因者に対する潜在的な支援要因として「支援準備性」が明らかとなった。具体的な取り組みとして, 「血友病女性・保因者のための情報サイト」を開設し, 準備性に関する支援を行った。

研究分担者 :

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

客員教授 小澤 敬也

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

取締役 井上 誠

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バイオ産

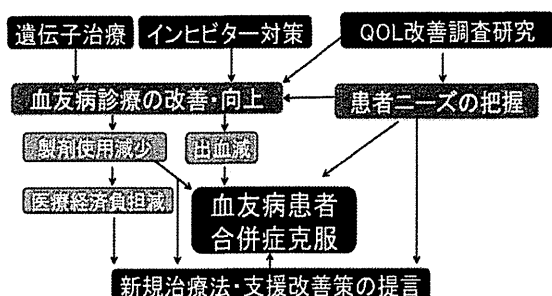
業事業部門

常務取締役・本部長 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。過去の非加熱製剤に起因する HIV や HCV 感染により血友病患者の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ことを目的に, 1) 遺伝子治療の開発, 2) インヒビター発症要因の解明と治療法の開発, 3) 患者支援ニーズを抽出するための QOL 調査研究・聞き取り調査を行う (図)。

図 本研究の目的と意義



1) 遺伝子治療：血友病は単一の遺伝子異常に起因する出血性疾患であり，凝固因子濃度の治療域が広いことから，遺伝子治療の良い対象疾患と考えられてきた。現在，血友病患者には凝固因子製剤の補充療法が行われる。しかし，製剤の半減期は極めて短く，頻回の投与が必要であり，これが患者 QOL を著しく阻害している。1 回の治療で永続的に治療効果が得られる遺伝子治療に対する期待は大きい。我々は血友病 B に対するアデノ随伴ウイルス 8 型ベクター (AAV8 ベクター) を用いた遺伝子治療技術の開発を進めてきた。本手法の長期治療効果と安全性を確認すると共に，

本技術を患者数の多い血友病 A に応用するための基礎技術開発を行う。臨床試験に必要な大量の AAV 製造を可能とするバキュロウイルスを用いたシステムの GMP 準拠での製造技術開発を行う。AAV ベクターを用いた手法は，患者に存在する抗 AAV カプシド抗体の存在に左右される。抗 AAV カプシド抗体の高感度検出法を確立し，血友病患者や健康人における保有率を検討する。また抗体陽性患者における手法として開発した門脈左枝への選択的投与による AAV 中和抗体回避法の臨床応用を目指し，その安全性を大動物で確立する。我々の QOL 調査表の結果から，患者 QOL 阻害因子として繰り返す関節出血に起因する関節症の存在が大きいことが明らかとなった。この血友病関節障害に対する特異的な治療法を考案し，動物モデルでその効果・安全性試験を行う。また，細胞治療に用いる新たな細胞ソースとして iPS 細胞に着目し，その臨床応用を模索する。これらの細胞治療にはサル免疫不全ウイルスベクター (SIV) による凝固因子産生が効果的である。この SIV ベクターの GMP 製造法を開発し，臨床応用に近づける。

2) インヒビター対策：血友病患者では補充療法の結果，血友病 A, B 患者のそれぞれ 20~30%，3~5% に，投与された製剤に対するインヒビター (同種抗体) が発生する。この場合，以後の製剤による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、インヒビター発症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確立であり、診断面においても課題が多い。本研究ではインヒビターの発症要因を基礎、および臨床面から検討し、その本体に迫る。我が国初の血友病患者登録システムを構築することで、コホートによるインヒビター発症の統計学的解析、ならびに患者血漿の取得が全国から可能とする。本データベースを基軸とした統計解析、ならびに生化学的解析により、インヒビターの発生機序を解明し、新規診断法・治療法を開発する。

3) 調査研究：これまでの調査により国内の血友病患者のQOL阻害因子として、出血、出血合併症以外にも、非加熱製剤に起因するHIV感染、肝疾患などの身体的、社会的問題・差別など社会的にも解決されるべき多くの課題が残されていることを明らかとしてきた。今回は、国際的に定量化されたSF-36質問票を用い、血友病QOLを評価する。特に病型、重症度、出血、関節障害、HIV、HCVなどのウイルス感染などの影響を検討し、各国との比較、他の慢性疾患との比較を行う。QOLを阻害する血友病性関節障害は、高齢化による退行性変性が影響し、より重篤な関節障害をきたす症例が増加している。血友病患者の全身状態と整形外科手術後の経過を元にして、観血的処置の際の問題点を解析し、血友病患者に適切な周術期管理を確立する。さらに、血友病保

因者女性の心理社会的影響や、保因者自身の健康状態に十分な調査が行われていない現状を踏まえ、まず、インタビューにより一連の健康史を把握した上で、遺伝相談に関わる支援プロセス課題の抽出・分析を行い、保因者の支援支援に必要な相談体制の構築を目指す。

## B. 研究方法

1) 遺伝子治療：血友病B遺伝子治療では、FIXを発現するAAV8を末梢静脈、および門脈から投与し、長期治療効果を観察した。血友病Aへの本法の応用を考え、カニクイザル体内でFVIIIを検出する系を開発した。遺伝子組換えヒトFVIIIをカニクイザルに皮内投与を行い、抗ヒトFVIIIポリクローナル抗体を得て、これを用いたELISA系を構築した。さらにFVIIIを発現するAAV8ベクターをカニクイザルに投与し、本測定系を用いて、その治療効果を検討した。AAV遺伝子導入効率を阻害する中和抗体の保有率を日本国内の健常者90人、血友病患者68人を対象として解析を行い、各血清型に対する中和抗体の保有率を検討した。AAV8-FIXベクター産生用バキュロウイルスベクターを構築し、臨床試験に必要な用量を得るために生産性向上の検討を行った。経門脈的ベクター投与手法の臨床応用が実施可能な条件を構築するために、マイクロミニプタを用いた安全性試験を行った。血友病Aマウスより間葉系幹細胞(MSC)を樹立し、SIVベクターを用いて凝固因子を発現させた。この凝固因子発現MSCを血友病Aマウスの膝関節

に投与し、関節障害が改善するかを観察した。さらに、ヒト、サル MSC を分離し、同様に SIV ベクターにより FVIII 産生が可能かどうかを検討し、適切な感染・培養条件を探った。GMP 準拠 SIV ベクターの大量生産・浮遊培養による生産性を検討した。

ブタ線維芽細胞に遺伝子ターゲティングの手法によりブタ F8 遺伝子の Exon16 にネオマイシンカセットを挿入し、同細胞の核移植によって、遺伝子改変細胞由来のブタを生誕させた。

2) インヒビター対策：マウス血友病モデルを用いてインヒビターの制御法を開発した。線溶制御因子である PAI-1 の関与を明らかにするために PAI-1 と FVIII と二重欠損マウスを作製し、FVII 投与後のインヒビター発生を観察した。さらに、iPS 由来胸腺組上皮の胸腺への細胞移植によるインヒビターの発生制御を試みた。実臨床では、平成 19 年度から構築した前方視野的な登録システムにより新規血友病患者の全国登録を継続した(J-HIS2)。また、インヒビター症例を対象としたケースコントロール研究と併せ、インヒビター発症要因を分析した。これらの臨床データから、凝固遺伝子、サイトカイン遺伝子の検索を行い、遺伝背景からもインヒビターの発症要因を検討した。凝固一段法による FVIII 活性測定法の精度を検討し、インヒビター測定には Nijmegen 変法である Tokyo 変法(2N イミダゾール緩衝液の添加)を用いた。既知のインヒビター血漿を標準血漿として作製し、この特性・希釈法、ならびに Tokyo 変法を用いた時の再現性を検討した。

またインヒビター力価の各施設間のサーベランスを行うため標準血漿、インヒビター血漿、血友病血漿を主要施設に配布した。軽症血友病 A 患者に生じたインヒビターの凝固抑制機序を検討した。免疫寛容療法(ITI)での IgG サブクラス変動の検討を行った。新規バイパス製剤の治療効果に対する種々の患者インヒビター存在下での凝固制御機序を検討した。

3) QOL 調査研究：血液凝固異常症全国調査で構築されたネットワークをもとに配布した QOL 調査用紙を集計した。SF-36 の QOL 下位尺度と各患者データの関連性を統計解析し、諸外国、他の慢性疾患と比較した。アクションリサーチでは質問紙調査(n=30)により遺伝保因に関わる生活史、検査・告知に伴う出来事、開示を集計し、モデル化を行った。準備性支援では対象者の支援特性について支援計画の検討を行った。血友病整形外科手術 117 例に術後発生した合併症(感染、創部治癒遷延、死亡)と術前の血液検査結果を比較・解析した。

(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・施設の規定を遵守した。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した。

## C. 研究結果

1) 遺伝子治療：血友病 B の遺伝子治療法の開発として、複数のカニクイザルへ FIX を発現する AAV8 を投与した。抗

AAV 抗体陰性の全例で治療域に至る効果を認め、1回の静脈投与により7年以上にわたる治療域の凝固因子発現を認めた。サルを用いた血友病 A 前臨床試験を開始するために、ヒト FVIII 免疫により、カニクイザルより抗ヒト FVIII ポリクローナル抗体を得て、これを基礎にして、サル体内でヒト FVIII を検出する ELISA 法を確立した。AAV8-FVIII をカニクイザルに投与したが、FIX 搭載ベクターと同量では治療域のヒト FVIII は得られなかった。一方、ヒト FVIII のコドン最適化を行うことで、血友病 A マウスにおいてサル実験に用いた通常の AAV8 よりも FVIII 発現は 40 倍上昇し、血友病 A 遺伝子治療への応用が期待された。抗 AAV 中和抗体が存在すると AAV 遺伝子治療の効果を認めない。我々はより感度の良い抗 AAV カプシド抗体の測定法を開発し、この方法で AAV8 のカ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。カニクイザルでは抗体陽性率が 71.3%に認められた。ヒトでは健常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。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た。中和抗体陽性個体においても全例で門脈内カテーテル投与方法により 5 年以上治療域に達する効果を得た。マイクロミニブタを用いた本投与方法の安全性試験では門脈急速注入による循環動態の変動は認めず、一過性の ALT、 $\gamma$  GTP の上昇を認めたが 2 週間には正常化した。組織学的な異常は認めなかつ

た。臨床応用を視野にいれ、バキュロウイルスによる AAV 製造を FIX 遺伝子に応用したが、これまで手法の単純な外挿では産生効率率は 1/5 以下となった。種々の培養・精製条件を検討し、AAV ベクター実製造時に使用する Wave Bioreactor で小スケール検討と同程度の AAV 産生条件が設定出来た。SIV ベクターにより FVIII をマウス MSC に発現させ、これを血友病 A マウスの膝関節腔内に投与すると、関節出血、および関節障害の進行が抑制された。本研究結果を元にサル、ヒト MSC による検討を行った。サルやヒト MSC はマウス MSC と異なり継代や SIV による遺伝子導入後に細胞増殖が低下した。しかし、コドン最適化 FVIII を使用することにより低濃度のベクターでも凝固因子発現レベルが担保できた。また、本法に用いる GMP グレード SIV ベクター作製の条件検討も終えた。遺伝子治療の開発に用いる新たな血友病モデルとして血友病ブタの作製を試みた。ブタ線維芽細胞の Exon16 をネオマイシンカセットに相同組換えにより置換し、2,000 クローンの中から、サザン解析で陽性の 1 クローンを得た。得られた線維芽細胞の核を移植しクローン技術により血友病 A ブタの産出に成功した。得られた血友病ブタはイヌ血友病と異なり関節出血を呈した。出生後、致命的な出血を引き起こしたが、出血にヒト FVIII 製剤による止血効果が認められた。

2) インヒビター対策 : PAI-1 と FVIII の二重欠損マウスは FVIII 欠損マウスと比較して、FVIII の反復刺激による免疫応答性が減少した。サイトカインプ



ロファイルから MHC-ClassII 拘束性制御性 T 細胞の誘導が認められた。SIV ベクターにより FVIII を遺伝子導入した iPS 細胞の胸腺移植により血友病 A マウスの FVIII に対するインヒビター発症が抑制され、本免疫寛容で発現変化を示す複数の免疫応答遺伝子群を特定した。

J-HIS1 の解析では、血友病 A153 例中、インヒビターは 26.8% に生じたが、製剤種による発症率への影響はなかった。コホート研究には本年 10 月までに 245 名が登録され、血友病 A の 21.6% にインヒビターが発生した（発症年齢 1 歳 2 ヶ月、総投与日数 13 日）。製剤やデンジャーイベントの有無によるインヒビター発症に差異はなかった。定期補充療法群が出血時治療群に比べ、インヒビター発症が少なかった。遺伝子背景からは、null 変異がインヒビター群で高率であり（77%）、サイトカイン遺伝子多型 TNF $\alpha$  -308 の A アレルとインヒビター発症に相関を認めた。F8 解析には、より簡便な次世代シーケンス法を導入し、同義的変異 (c.120C>A; p.(L40=)) を同定した。新規インヒビター検査法である Tokyo 変法は既法と比べ、長時間 pH が安定し、残存活性が保たれ擬陽性が減じた。インヒビターを希釈するには FVIII 欠損血漿が優れていた。その再現性も CV% で 6.5~24.9% を示し、中でも 1.5 BU/ml あたりの再現性が最も優れていた。一方、0.5 BU/ml 程度の低領域では日差再現性は信頼性を保つことが困難であった。施設間差サーベイランスのためにインヒビター測定手順マニュアルを作製した。インヒビター患者のバイパス製剤の止血モ

ニタリングとして、Elg/TF 法による凝固波形解析が、実患者の止血効果を反映する上でも極めて有効であった。軽症患者インヒビターのエピトープを同定し、一部は正常 FVIII 活性のみを濃度依存的に抑制した。ITI 治療時の IgG サブクラスは初期に IgG1 の一過性の上昇、再燃時には IgG4 の上昇を認めた。新規バイパス製剤 MC710 (FVIIa/FX) はインヒビター存在下でのトロンビン生成を FVIII 存在下で相加的に増加した。

3) QOL 調査研究：883 症例の情報から解析を行った。諸外国と共通して、身体的面 QOL 低下が精神的面よりも大きく、健康関連 QOL は年齢と共に低下するが、20 歳前後は標準値とほぼ同じであった。身体的側面と関係する因子として、関節出血、年齢、重症度、血縁の病気に対する理解者の存在が関連した。全体的健康観 (GH) には重症度、HIV や HCV のウイルス感染、関節症の存在、重症度、出血が関与した。他疾患との比較では、身体に関する下位尺度の低下が大きく、特にインヒビター症例では顕著であった。我が国の慢性心不全患者との比較では血友病患者の下位尺度はステージ A/B とステージ C/D の中間となった。

参加型活動研究では、30 名の保因者に質問紙調査を行い、困難事例を中心に 5 例のケースアプローチ、インタビューデータ 34 件を解析した。支援ニーズとして、1) 保因者の健康支援 2) 世代継承に関する相談支援 3) 意思決定の共有 (shared decision making) ならびに準備性支援が抽出され、具体的な支援事例から、薬害 HIV 感染被害の影響は 1) ~3) にかかわる課題克服プロセスの阻害要因

であることが示唆された。さらに血友病家系女性への調査より、対象者への支援は十分行き届いておらず、潜在的要因として“支援準備性”が明らかとなった。また、保因者の認識（血友病児出産、保因者の対応、夫婦関係の変化）、遺伝子診断・カウンセリングの役割、適切な支援（相談窓口、適切な情報提供）、が解決すべき問題として抽出された。血友病家系・保因者のための情報サイトの開設を行い、準備性に関する支援を開始した。

計 117 症例の整形外科手術に伴う解析から、術後感染はインヒビター保有例で有意に発生した。HIV 感染例に細菌性感染発症との関連は認めなかったが、術後 1 年以内に死亡した 4 例ではウイルス感染に起因する肝機能不全を示していた。血栓症の合併は認めなかった。

#### D. 考察

欧米でのヒト血友病 B 遺伝子治療の成功は記憶に新しいが、血友病 B の頻度、AAV 中和抗体の有無を勘案すると同手法の恩恵をうける患者は全体の 10-15% にすぎない。よって、血友病患者全体を見据えた遺伝子治療法の開発は開発途上であり、本研究班の研究成果が国際的にも貢献できる部分は大きい。特に AAV 中和抗体陽性患者への対応、血友病 A 患者への治療応用、並びに関節症に対する局所治療は特に重要な鍵となる。我々の開発した中和抗体回避法による肝障害の程度は軽微で可逆的なものと判断された。今後も低侵襲性、安全性を追求し臨床応用に近づきたい。本研究期間内にサル体内で FVIII を検出する測定法を確立し、マウスレベルではあるが、血友病 A に対して従来法

よりも 40 倍高率な投与手法が得られたことから、本法の今後の臨床応用も期待される。さらに AAV 遺伝子治療法を多くの患者に安定して供給するには抜本的な製造過程の見なおしが必要である。海外の血友病 B に対する遺伝子治療では、約  $2 \times 10^{15}$  vg の AAV ベクターを製造するために、セルスタック 10 段フラスコが 432 個使用された。パキユロウイルスベクターを用いる製造手法は拡張性が高く有望な技術であるが、その製造条件については相当の至適化が必要であった。臨床試験に供するためのベクター量を想定した場合に、コストの問題は残るものの、本年度に実際に製造可能なスケール（100-200L）での製造条件を設定することができた。本研究班の調査研究により、血友病患者の QOL を阻害する因子として血友病性関節症の重要性が浮き彫りとなった。我々は、血友病性関節障害に特化した細胞治療法として、凝固因子発現間葉系幹細胞の関節内投与法を開発した。本法による血友病関節症治療もサル、ヒト MSC での検討を終え、SIV の GMP 製造も目処がつき、各シーズを組み合わせヒト臨床試験に向かいたい。これらの遺伝子治療法はサルでの安全性試験を行うが、サルでは治療効果の検討はできない。マウスとヒトを繋ぐ動物モデルとして血友病 A ブタを産出させた。本モデル動物は遺伝子治療の効果だけでなく、製剤の効果確認にも使用可能である。本研究班の遺伝子治療の取り組みは、国際的に高く評価され、2015 年国際血栓止血学会 State of Art lecture に選択された。

インヒビター対策は、新規血友病患者

者データベースを構築し、本年度までに 245 名と多症例が順調に集積されつつある。中間段階であるものの、定期補充群がオンデマンド群に対してインヒビター発症が低いことが示された。本データベースは血友病患者の治療プロフィールも明らかにすることができ、登録患者の約 50%に定期補充療法が導入されている現状が明らかとなった。過去のデータベースと併せ、インヒビター発症に対する null 変異、TNF $\alpha$ -308 の A アレルとの関連が見出され、今後の症例集積からも新たな知見が導き出せると期待される。次世代シーケンスの導入によりイントロン部位も含め、血友病責任遺伝子部位の同定がより迅速・安価に可能となった。本邦の血友病患者の 1/20 にあたる症例の遺伝子異常が本研究班にて同定されている。本研究班から提唱されたインヒビター測定法である Tokyo 変法は pH 変動が少なく再現性に優れた結果であり、今後標準化をさらに進めたい。各検査室の測定基準の違いから詳細な手順統一が必要である。今後はより詳細な手順書により、各施設間の標準化のためのサーベイランスを行う。ITI 治療中には IgG サブクラスの変動が認められ、これが ITI の効果判定、治療継続の判断になる可能性があるため、新たな予測因子として興味深い。これ迄、インヒビター患者に投与されるバイパス製剤の止血モニタリングは不可能であったが、E1g/TF を用いた凝固波形解析を利用して簡便な止血モニタリングを確立した。これにより、今後、インヒビター患者に止血管理を容易にすることが期待される。FVIII を FVIIa/FX と同

時に投与することにより効果的な止血が得られることから、新規バイパス製剤 MC710 と FVIII の同時投与が新たな治療戦略になると期待される。マウスモデルを用いた検討から、線溶系が能動的に免疫に関与すると考えられ、PAI-1 阻害薬のインヒビター制御の可能性が示された。さらに、胸腺への iPS 細胞による免疫寛容誘導は、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いう優位性を有した新規治療法と成りうる。

QOL 調査は 800 症例を超える本邦血友病患者を対象とした世界でも最も大規模な QOL 調査となった。本邦の血友病患者 QOL は諸外国と同様に身体的側面の低下が大きく、過去の我々の調査からも関節症に対する予防・治療が重要である。さらに若年層は国民基準値と変わらない傾向も認められた。身体下位尺度の低下はインヒビター患者でとりわけ著しかった。定期補充の QOL 効果は認めなかったが、これは既に関節障害などで QOL 低下が進んでいる患者群にも定期補充が行われていることによると思われる。同一患者のクロスオーバー試験などが必要であろう。また、血液製剤によるウイルス感染は、薬害被害から長期経過がたった今も QOL や術後の早期死亡にも影響を及ぼしている。現段階で血友病の根治が可能ではなく、薬害 HIV 被害克服も充分でないことが、家族関係の疎外、保因認識形成の機会喪失、薬害被害経験の次世代への継承、に結びついている。具体的な支援技術の向上とともに、地域、保険、発達等の専門家の参画を検討し、支援とその内容の改善が今後の課題で

ある。

以上の本研究班の取り組みは、根治的な血友病治療・包括的支援に結びつき、国民への還元を考慮した政策への提言、診療ガイドライン策定や治療の標準化、効果的な医療財源の節約にも寄与すると考えられる。

## 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の長期安全性・効果が確認された。今後、本技術を用いた血友病 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に、血友病 A へ応用、門脈注入法の安全性追求、大量精製技術を用いた治験準備、および関節局所を標的とした細胞治療の開発を継続する。患者登録データベースから新たな遺伝子異常、インヒビター発生要因が明らかとなり、インヒビター測定の標準化に近づいた。また調査研究では世界随一の QOL 調査が集計され、個別支援窓口の設置を行った。本研究班は、遺伝子治療、インヒビター対策、QOL 調査というこれら 3 つの研究結果を有機的に統合し、日本における血友病患者・HIV 薬害患者を取り巻く環境の改善に寄与している。

## E. 健康危険情報

特になし。



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

血友病遺伝子治療基礎研究

研究者 大森 司 自治医科大学 分子病態研究部 講師  
坂田洋一 自治医科大学 分子病態研究部 客員教授

研究要旨

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、疾患の治癒を目指した血友病遺伝子治療の開発研究を推進する。血友病 B に対する GMP レベル AAV8 ベクター作製技術は確立し、その治療効果をサルで長期間検証した。本手法を用いた治療の効果は 1 回の投与で最長で 7 年にわたって持続しており、安全性も問題なかった。本治療成功の鍵となる抗 AAV カプシド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。この AAV 中和抗体陽性患者への対策として、カテーテルを用いた門脈内への投与法を開発した。また、本研究期間に患者数の多い血友病 A への応用を進めた。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。FVIII を発現する AAV8 ベクターをサルに投与したが、1%前後の FVIII 抗原量しか得られなかった。ヒト FVIII 発現量を改良するために FVIII のコドン最適化を行い、マウスレベルで従来法の 40 倍程度の発現量増加を認め、血友病 A に対する AAV 遺伝子治療法の目処がついた。細胞治療法では、SIV ベクターによって FVIII を発現させたヒト間葉系幹細胞の膝関節投与による新規血友病関節症治療法を開発した。ヒト臨床試験に向けて、同手法によるサル、ヒト MSC での効果的な凝固因子発現を確認した。さらにコドン最適化 FVIII を用いることで必要なウイルス量を減少させ、感染後の細胞毒性を最小限にし得た。SIV ベクターによる iPS 細胞からの凝固因子の発現、および凝固因子発現 iPS 細胞のマウス投与による抗原量の増加を認めた。新たな血友病 A 疾患モデルとしてブタ血友病 A の作製に成功した。以上の研究成果は、頻回の製剤投与に頼らない新規治療としての遺伝子治療を、より多くの血友病患者に提供するための基盤となるものと考えられる。

A. 研究目的

血友病は血液凝固第 VIII, (FVIII), または第 IX 因子(FIX)遺伝子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。頻回の製剤投与、出血による

関節障害、過去の非加熱濃縮製剤によるウイルス感染症、などの様々な要因が、患者 QOL を著しく阻害している。本研究は薬害 HIV 感染者を含む血友病患者の合併症を克服するために、疾患の治癒を目指した遺伝子治療法の開発を目的とする。

## B. 研究方法

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) ベクターを用いた。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抗 AAV カプシド抗体の保有率を、実際の血友病患者から得られた検体を用いて検討した。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 (Recentec, 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。さらに FVIII 発現を改善するためにヒト 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 (SIV) ベクターを用いた。様々なプロモーターの下流に FVIII を発現するベクターを作製し luciferase 活性を測定し適切

なプロモーターを選択した。血友病 A マウスの膝関節に FVIII 発現間葉系幹細胞 (MSC) を注入し、血友病関節出血、関節障害を減じるかを検討した。さらに、ヒト MSC を用い、マウス細胞と同様に SIV ベクターにより凝固因子発現が可能かどうかについて検討した。

山中 4 因子のプラスミドトランスフェクションにより、マウス iPS 細胞を作成した。SIV ベクターによって iPS 細胞に凝固因子を発現させ、これをヌードマウス投与後に凝固因子活性が上昇するかどうかをうかを検討した。

ブタ線維芽細胞に遺伝子ターゲティングの手法によりブタ F8 遺伝子の Exon16 にネオマイシンカセットを挿入し、同細胞の核移植によって、遺伝子改変細胞由来のブタを生誕させた。

### (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 遺伝子を搭載した AAV8 ベクターをカニクイザルの末梢静脈から投与した。全例において治療域の 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 (表 1), 最長 7 年以上の遺伝子発現, ならびにベクターの長期安全性を確認した (図 1)。

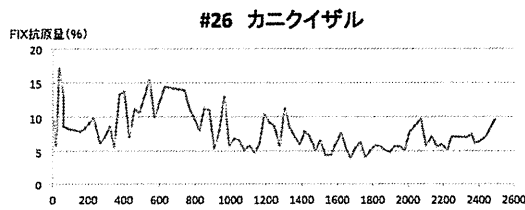


図 1 AAV8-FIX 投与後の長期効果

血液型	投与方法	FIX (%)	抗AAV抗体
AAV8	腸間膜静脈	0.1%	陽性
AAV8	腸間膜静脈	0.3%	陽性
AAV8	末梢静脈	0.2%	陽性
AAV8	腸間膜静脈	28.9%	—
AAV8	末梢静脈	37.9%	—
AAV8	末梢静脈	13.1%	—
AAV8	末梢静脈	10.7%	—
AAV8	末梢静脈	12.3%	—
AAV8	末梢静脈	21.7%	—

表 1 カニクイザルの AAV8 による遺伝子治療

AAV の既感染に基づく抗 AAV カプシド中和抗体の存在は 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 (表 1)。日本人の抗 AAV 中和抗体を測定した結果, 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 ベクターを用いた末

梢静脈からの遺伝子治療が全例に行えないことが明らかとなった。一方, 我々は中和抗体が陽性の患者に対する新規治療法を開発した。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考案し (図 2), 治療効果の長期発現, 安全性を確認している。

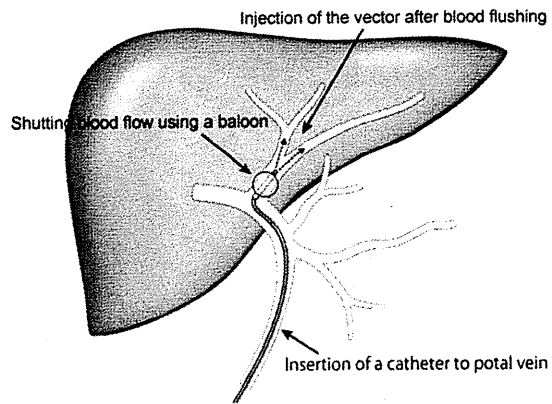


図 2 抗 AAV8 中和抗体回避法

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。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 (図 3)。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。

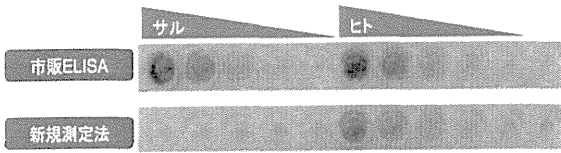


図3 サル体内でヒト FVIII を検出する ELISA 法

FVIII を発現する AAV8 をカニクイザルに投与し、同手法をもちいて効果を検討したが、残念ながら 1%前後の FVIII 上昇しか得られなかった。さらに、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。コドン最適化により FVIII の産生効率は劇的に改善し、血友病 A マウスに AAV8 を用いてコドン最適化 FVIII を発現させると、同様のベクター量で従来法の 40 倍程度の活性値を得ることができた (図 4)。

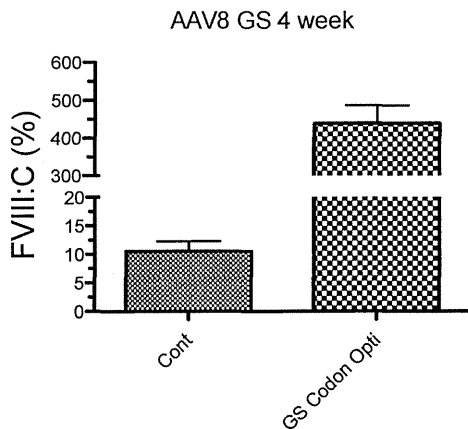


図4 コドン最適 FVIII 搭載 AAV8 によるマウス血友病 A の治療効果

血友病患者の QOL を阻害する血友病性関節

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 (図 5)。

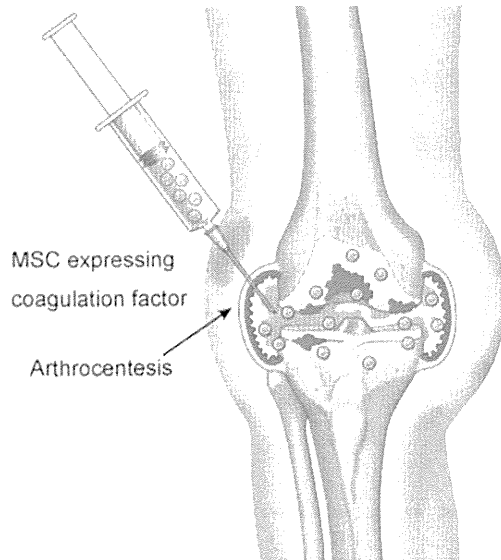


図5 関節腔内への凝固因子発現 MSC 投与による血友病性関節障害の治療

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、これをマウス MSC に感染させた。感染後の MSC は効率よく FVIII を産生した。FVIII 産生 MSC を血友病 A マウス関節腔内に投与すると、関節出血、ならびに関節障害が予防できた (図 6)。

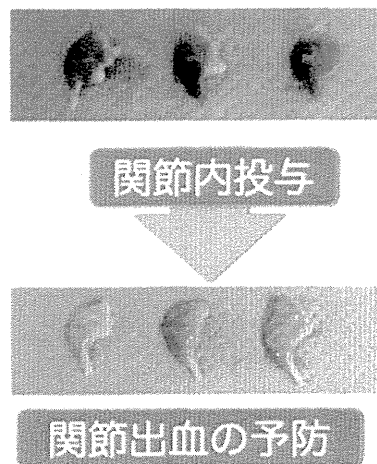




図6 凝固因子発現 MSC による血友病関節出血の予防効果

本手法を、ヒト臨床試験で応用するために、ヒトMSCを用いた遺伝子発現の検討を行った。同様に 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)、またサル MSC 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 活性が得られた。またコドン最適化 FVIII を使用することによりベクター用量を減じることができた。

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 (図7)。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 $\alpha$  プロモーターが優れていた。

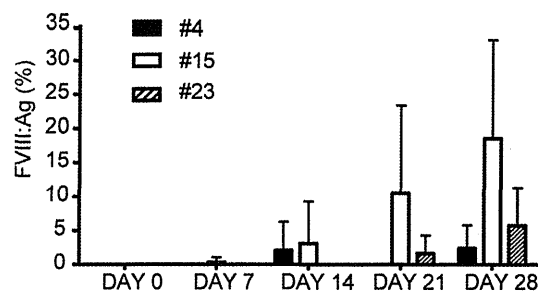


図7 FVIII 産生 iPS 細胞をヌードマウスに移植後の血中 FVIII 抗原量変化

遺伝子治療の開発に用いる新たな血友病モデルとして血友病ブタの作製を試みた。ブタ線維芽細胞の Exon16 をネオマイシンカセットに相同組換えにより置換し、2,000 クローンの中から、サザン解析で陽性の 1 クローンを得た。得られた線維芽細胞の核を移植しクローン技術により血友病 A ブタの産出に成功した (図7)。得られた血友病ブタはイヌ血友病と異なり関節出血を呈した。出生後、致死的な出血を引き起こしたが、出血にヒト FVIII 製剤による止血効果が認められた。



図7 血友病ブタは関節障害を引き起こす

#### 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。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、現段階で 150L 程度の培養系で臨床試験に必要なベクター量が得られる試算となっている。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、まさに治癒が可能な治療である。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。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、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)。我々は、カニクイザルにヒト FVIII を免疫することで、サル体内でヒト FVIII を検出するポリクローナル抗体を得ることに成功した。この抗体を用いた ELISA ではサル FVIII と 98% 以上の相同性をもつヒト FVIII を見事に区別できる。検出限界は 0.3~1% であり、十分にサルでの前臨床試験が可能である。本測定系を用いて、FVIII 遺伝子を搭載した AAV8 ベクターをカニクイザルに投与し、FVIII 抗原量を測定したが、残念ながら FVIII 発現は 1% 前後と低かった。しかし、コドン最適化 FVIII を用いることで、マウス血友病 A では、その治療効果 (活性値) が従来法の 40 倍にも上昇した。今後は、コドン最適化 FVIII を用いて、さらにカニクイザルでの検討を継続したいと考えている。本研究により、より患者数の多い血友病 A に対して遺伝子治療法が提供できるようになると考えられる。

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。本研究結果は2012年の国際血栓止血学会誌 (J Thromb Haemost) の Best article の1つに選ばれ、Peter Muccini Award を受賞した。さらにヒト臨床試験を視野にいれ、ヒト、およびサル MSC を用いて、レンチウイルスベクターである SIV ベクターにより凝固因子が発現可能であることを明らかとした。サル MSC を用いた安全性試験を予定したが、SIV ベクター感染後の増殖が悪く、十分な細胞数が得られなかった。一方、コドン最適化 FVIII を用いることで、必要ベクター量が減じ、感染に伴う細胞のダメージを最小限にすることができた。さらに、カニクイザルを用いて安全性を検討し、ヒト臨床試験へと歩を進めたい。また、我々が開発した血友病 A ブタを用いて関節障害への治療効果も検討したい。

我々の作製した血友病クローンブタは、イヌ血友病と比較して重症の出血症状、関節障害を引き起こした。また、ヒト FVIII 製剤の治療効果も認めることから、マウスからヒトへの遺伝子治療の橋渡し研究に使用できるだけでなく、新たな凝固因子製剤の開発にも役立つ。さらに、関節障害の存在は、我々が開発した関節障害に特化した細胞治療法の治療効果を観察するのに適したモデルと考えられる。

## E. 結論

抗 AAV 抗体の保有に関わらず、血友病 B に対する AAV ベクター遺伝子治療技術は確立した。効率的な GMP グレードベクター技術により、必要量の AAV ベクターが精製できれば臨床研究が可能である。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徐々に整いつつある。また、間葉系幹細胞をもちいた細胞治療法の有効性・可能性を提唱でき、新たな関節障害治療法として期待される。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とともに、さらに効果的な新規治療法の可能性について探る。

## 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. *Crit 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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