

- 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.
12. 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.
 13. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y. Porcine model of hemophilia a. *PLoS One.* 7(11):e49450. 2012.
 14. Makino, N., Ookawara, S., Madoiwa, S., Ohta, Y., Ishikawa, T., Katho, K., Takigami, S., Kanazawa, T., Matsuo, O., Ichikawa, M., Mimuro, J., Sakata, Y., Ichimura, K.: Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bulbectomy. *The Journal of Laryngology & Otology.* 126 (11) 114-1120. 2012.
 15. Yano, Y., Ohmori, T., Shimada, K., Sakata, Y., Kario, K.: Association of sleep onset of acute coronary syndrome with sleep apnea syndrome and abnormal diurnal variation of hemostasis and adipokine levels. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 23(7):590-596. 2012.
 16. Suzuki, S., Iwamoto, M., Saito, Y., Fuchimoto, D., Sembon, S., Suzuki, M., Mikawa, S., Hashimoto, M., Aoki, Y., Najima, Y., Takagi, S., Suzuki, N., Suzuki, E., Kubo, M., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Madoiwa, S., Sakata, Y. Perry, AC., Ishikawa, F., Onishi, A.: I12rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell.* 14;10(6):753-8. 2012.
 17. Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Yasumoto, A., Ishiwata, A., Sakata, A., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y.: Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 10(9):1802-1813.

- 2012.
18. Norimatsu, Y., Ohmori, T., Kimura, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Seichi, A., Yatomi, Y., Hoshino, Y., Sakata, Y.: FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 180(4):1625-1635. 2012.
 19. Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y.: Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 129(4):e36-40. 2012.
 20. Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion offactor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 18(3):e323-30. 2012.
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
 4. 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
 5. 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
 6. 坂田 飛鳥, 大森 司, 西村 智, 鈴木 英紀, 窓岩 清治, 三室 淳, 荻尾 七臣, 坂田 洋

- 二：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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 柏倉裕志、大森 司、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、三室 淳、坂田洋二：人工多能性幹細胞を用いた新規血友病治療法に対する基礎的検討 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都
11. 窓岩清治、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：A role of plasminogen activator-plasmin system for the immune in murine hemophilia A 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都
12. 水上浩明、三室 淳、塚原智典、卜部匡司、久米晃浩、大森 司、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也：Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates using AAV8-based vector 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都
13. 坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：Paxillin negatively regulates integrin signaling pathways in mouse platelets 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都
14. 小山寛介、窓岩清治、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：敗血症性 DIC における血小板減少の予測因子としての凝固・線溶系マーカーの評価 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京
15. 窓岩清治、小林英司、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：第 FVIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロボードを用いた連続的抗原投与モデルの構築 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京
16. 柏倉裕志、大森 司、三室 淳、安本篤史、

石渡 彰, 坂田飛鳥, 窓岩清治, 井上 誠,
長谷川 護, 小澤敬也, 坂田洋一:FVIII 遺
伝子導入MSC の関節内移植は血友病Aマ
ウスの血友病性関節症を改善する 第 34
回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9
東京

17. 大森 司, 矢野裕一郎, 坂田飛鳥, 池本智
一, 新保昌久, 窓岩清治, 勝木孝明, 三室
淳, 島田和幸, 荻尾七臣, 坂田洋一:血清パ
ラオキシナーゼ活性は抗血小板薬投与下
の凝集能と関連しない 第 34 回日本血栓
止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京

18. 小山寛介, 窓岩清治, 坂田飛鳥, 大森 司,
三室 淳, 坂田洋一:敗血症性 DIC—下部
消化器官穿孔における凝固障害の特徴—
第 34 回日本血栓止血学会学術集会
2012.6/7-9 東京

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 出願済み

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

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ける重要な研究課題である。本研究では、線溶系調節因子である PAI-1 を制御するシステムを血友病 A マウスモデルに導入することにより、また人工多能性幹細胞(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開発した。FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスを用いた解析により、血友病 A 個体における線溶系応答の効果的な制御が免疫寛容をもたらシインヒビターの発症を予防する可能性が示された。特に PAI-1 を制御できる本マウスや線溶系遺伝子改変システムを用いることにより、線溶系と免疫系との関わりを多角的に具現化できると考え得られる。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研究の基盤となるものと考えられる。

A. 研究の目的

重症型血友病 A 患者の約 30%において、止血治療目的で補充する FVIII 製剤に対する同種抗体（血友病 A インヒビター）が発生する。血友病 A インヒビター陽性患者は止血管理が極めて困難な状態に陥るために、QOL の著しい低下のみならず生命の危機に直面する。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ける重要な研究課題である。

プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系（線溶系）は、止血栓の溶解機構

として作用するのみならず、様々な生体反応に深く関与する。線溶系調節因子である PAI-1 を効率的に制御するシステムを血友病 A マウスモデルに導入することにより、抗 FVIII 抗体の発生に関わる線溶系と免疫系との有機的連関を個体レベル、細胞および分子レベルで解明し、血友病 A インヒビター発症の予防と治療に繋げる方法を開発することを目指す。

次に、血友病 A マウスから樹立した iPSC に対して、FVIII 遺伝子を導入後に 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施す。

一連の治療法により特異抗原遺伝子を導入された iPSC 由来胸腺上皮細胞が、宿主胸腺組織において免疫応答を修飾し抗原特異的な免疫寛容を誘導する可能性を探る。

B. 研究方法

1. 線溶系調節因子 PAI-1 の制御による血友病 A インヒビター産生の制御

FVIII ノックアウトマウスとともに新規に作製した FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスに対して、ヒト FVIII 抗原の経静脈的な反復刺激により生じる抗 FVIII 抗体価を Bethesda 法により定量比較した。各マウスのリンパ組織から免疫細胞を単離し、リンパ球刺激試験、IL-2, IL-4, IL-10 および IFN- γ などのサイトカイン産生量を定量しリンパ球の応答性や Th バランスおよび制御性 T 細胞誘導能の差異について検討した。

2. 血友病 A インヒビター産生制御への iPSC の応用

血友病 A マウスの皮膚線維芽細胞から初期化因子遺伝子を導入することにより樹立した 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、mTEC へ分化誘導させた。完全長ヒト FVIII cDNA と EF-1 および胸腺上皮細胞特異的な AIRE プロモーターを組み込んだ SIV ベクターを構築し、iPSC に感染させた。VEVO 超音波システムとマイクロインジェクターにより胸腺組織へ選択的な細胞移植を実施した。FVIII を発現する iPS 細胞由来胸腺上皮細胞の移植マウスに対して、FVIII の反復刺激により生じる抗 FVIII 抗体価を Bethesda 法により定量した。

C. 研究結果

FVIII 抗原の経静脈的反復感作に対する免疫応答性は、FVIII^{+/+}PAI-1^{+/+}が 62.6 ± 16.4 BU/mL (n=21)であったのに対して、FVIII^{+/+}PAI-1^{-/-}では 38.7 ± 22.7 BU/mL (n=13)、FVIII^{-/-}PAI-1^{-/-}で 10.9 ± 4.8 BU/mL (n=16)と、PAI-1 遺伝子を欠損させることにより産生される抗 FVIII 抗体価の有意な減少を認めた。FVIII 反復刺激を行った FVIII^{+/+}PAI-1^{-/-}の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 細胞性アネルギーおよび MHC-ClassII 拘束性 CD25⁺FoxP3⁺制御性 T 細胞が誘導された。pLL3.7 に PAI-1shRNA 塩基を組み込むことにより shRNA 導入用レンチウイルスシステムを構築し、血友病マウス由来骨髓細胞 c-kit⁺sca-1⁺Lin⁻(KSL) 分画に感染させ、放射線照射レシピエントマウスに移植することにより、PAI-1 shRNA 導入血友病 A マウスを作製した。得られたマウス個体は、PAI-1 scrRNA 導入個体に比較して FVIII 反復刺激後の抗体価が有意に低下した (1.0 ± 1.4 BU/mL, n=5 vs 6.7 ± 5.7 BU/mL, n=5, $p=0.0013$)。

EF-1 プロモーターを用いることにより血友病 A マウス由来 iPSC において FVIII の持続的な発現を得ることができた。mTEC への *in vitro* 分化誘導系により、血友病 A マウス由来 iPSC が EpCAM かつ PDGFRalpha を発現することを確認した。SIV ベクターにより FVIII 遺伝子を導入した後に mTEC 分画を分取し、血友病 A マウスの胸腺組織へ細胞移植を

行なうことにより、血友病 A マウスの胸腺に生着できることを eGFP ないしは luciferase の発現動態により確認できた。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 (24.8 ± 37.0 vs 98.9 ± 69.1 BU/mL, $p=0.025$)。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 マウスの胸腺、脾臓およびリンパ節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することができた。

D. 考察

FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスを用いた解析により、血友病 A 個体における線溶系応答の効果的な制御が、抗原特異的な免疫寛容をもたらすインヒビターの発症を予防する可能性が示された。特に免疫応答の調節に線溶系が能動的に関わるとする知見は新規であり、PAI-1 を制御できる本マウスや線溶系遺伝子改変システムを用いることにより、線溶系と免疫系との関わりを多角的に具現化できると考え得られる。

一方、胸腺組織を標的とする遺伝子細胞療法は、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な免疫寛容を誘導し得るという優位性を有している。iPSC や 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検討課題と考えられる。

E. 結論

本研究で得られた研究成果は、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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Yasumoto, A., S. Madoiwa, Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, T. Ohmori, H. Mizukami, K. Ozawa, Y. Sakata,

- and J. Mimuro. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thromb Res* 2013; 131: 444-449.
5. 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* 2013.
6. Mimuro, J., H. Mizukami, S. Hishikawa, T. Ikemoto, A. Ishiwata, A. Sakata, T. Ohmori, S. Madoiwa, F. Ono, K. Ozawa, and Y. Sakata. Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther* 2013; 21: 318-323.
7. Hosoya, Y., M. Matsumura, S. Madoiwa, T. Zuiki, S. Matsumoto, S. Nunomiya, A. Lefor, N. Sata, and Y. Yasuda. Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. *Surg Today* 2013; 43: 670-674.
8. Ashizawa, M., S. Kimura, H. Wada, K. Sakamoto, M. Sato, K. Terasako, M. Kikuchi, H. Nakasone, S. Okuda, S. Kako, R. Yamazaki, K. Oshima, K. Matsuura, T. Ohmori, S. Madoiwa, J. Nishida, J. Mimuro, K. Tabei, Y. Sakata, and Y. Kanda. Acquired factor V inhibitor associated with life-threatening bleeding and a mixing test result that indicated coagulation factor deficiency. *Hematology* 2013; 18: 300-304.
9. Suzuki, S., M. Iwamoto, Y. Saito, D. Fuchimoto, S. Sembon, M. Suzuki, S. Mikawa, M. Hashimoto, Y. Aoki, Y. Najima, S. Takagi, N. Suzuki, E. Suzuki, M. Kubo, J. Mimuro, Y. Kashiwakura, S. Madoiwa, Y. Sakata, A. C. Perry, F. Ishikawa, and A. Onishi. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 753-758.
10. Madoiwa, S., E. Kobayashi, Y. Kashiwakura, A. Sakata, A. Yasumoto, T. Ohmori, J. Mimuro, and Y. Sakata. Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia* 2012; 18: e323-330.
11. Kashiwakura, Y., T. Ohmori, J. Mimuro, A. Yasumoto, A. Ishiwata, A. Sakata, S. Madoiwa, M. Inoue, M. Hasegawa, K. Ozawa, and Y. Sakata. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1802-1813.
12. Kashiwakura, Y., J. Mimuro, A. Onishi, M. Iwamoto, S. Madoiwa, D. Fuchimoto, S. Suzuki, M. Suzuki, S. Sembon, A. Ishiwata, A. Yasumoto, A. Sakata, T. Ohmori, M. Hashimoto, S. Yazaki, and Y. Sakata. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One* 2012; 7:

e49450.

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

2. 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, 2013 年 9 月, 札幌

3. Seiji Madoiwa., Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 reduces immune response to Factor VIII in Murine Hemophilia A. 2013 East Asia Hemophilia Forum, 2013 年 9 月, Seoul, South Korea.

4. Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Toshio Miyata, Takashi Dan, Yuji Kashiwakura, Asuka Sakata, Jun Mimuro, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Hitoshi Endo, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Osamu Matsuo, Keiya Ozawa and Yoichi Sakata., Regulation of plasminogen activator inhibitor -1 promotes immune tolerance to factor VIII in murine hemophilia A., XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2013 年 7 月, Amsterdam, Netherland.

5. Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Jun Mimuro, Yoichi Sakata., Development of novel strategies for regulation of inhibitor formation in hemophilia. The 9th Nikko International Symposium, 2012 年 10 月, Shimotsuke, Japan.

6. 窓岩清治, 小林英司, 坂田飛鳥, 柏倉裕志, 大森司, 三室淳, 坂田洋一, 第

VIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロポートを用いた連続的抗原投与モデルの構築, 第 34 回日本血栓止血学会学術集会, 2012 年 4 月, 東京

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）
総合（分担）研究報告書

研究課題：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に関して測定系を改良し、サル及びヒトにおける陽性率を判定した。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治療域に達する効果が得られることを示すと共に、サルにおけるベクターの至適用量につき結論を得た。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。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る。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、血友病患者 59 人を対象とした解析を行った。また、更に感度の高いアッセイ系の確立を目指して基礎的な検討を行った。

・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に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。また、更に鋭敏なアッセイ系の開発を目指して、より検出感度の高いルシフェラーゼなどを用いたシステムを探索したが、全体としての検出感度にはほとんど差が見られなかった。

・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（ 2.0×10^{12} 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既に作製済みであるが、実際に必要なベクター量は当初の見込みよりも10倍程度多く必要と考えられ、以前作製を委託したVGTCでは対応することが困難であったことから、再度の作製に向けて国内外の施設に関して改めて調査と交渉を行った。その結果、委託先をタカラバイオ株式会社に決定し、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。

F. 研究発表 (欧文論文)

1. 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*.
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.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. **J Med Virol**, 86:1990-7, 2014.
3. 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.
4. 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.

5. Mimuro, J., Mizukami, H., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Ishiwata, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Ozawa, K., Sakata, Y.: Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver with Adeno-associated Virus 8 Vectors. **Mol Ther**, 21:318-23, 2013.
6. Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. **Cancer Res**, 73:364-72, 2013.
7. Ogura, M., Urabe, M., Akimoto, T., Onishi, A., Ito, C., Ito, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Muto, S., Kusano, E., Ozawa, K.: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. **Gene Ther**, 19:476-82, 2012.
8. Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H., Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M., Ozawa, K., Kume, A.: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. **Neuroreport**, 23: 30-4, 2012.

(学会発表)

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

「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）

「血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究」

総合（分担）研究報告書

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 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、平成 24 年度～26 年度において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 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。平成 24 年度からは、平成 19-23 年度に実施した「J-HIS1 インヒビター発生患者の実態調査」に登録されたインヒビター発生患者 107 名の調査結果に基づき、インヒビターの消長に関する因子の抽出と統計学的解析を実施し、論文に発表する。平成 25 年度以降の遺伝子解析研究（第 4 研究）の結果と合わせることでインヒビター発生

要因・消長の解析のための基盤的知見の探究を模索している。

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 25 年度には調査項目を見直し、より有効的なデータの蓄積が可能となり、平成 23 年度 77 名であった登録者数から 168 例の新規登録の増加となり、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方法である 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 変法を設定した。
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、臨床的データとをあわせてわが国における血友病患者のインヒビター発生效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」を実施した。

平成 23 年度遺伝子解析の終了は、34 例であったが、平成 24 年度には 160 症例の検体を入手し 90 名の解析完了、平成 25 年度は、230 症例の検体を入手し 178 名の解析が完了し、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、全国規模での研究実施体制を確立した。

5. 第 5 研究として「血友病におけるインヒビター発生机序の解明および治療法の確立に関する研究」を実施した。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ことが多い。①止血管理はバイパス製剤により行われるが、治療効果を正確に凝血学的モニタリングする簡便な方法はなかったが、凝固波形解析により止血モニタリングを確立することができた。特にエラグ酸/組織因子をトリガーとして、得られたパラメータ(CT, |Min1|, |Min2|)が凝血学的効果を良く反映した。さらに周術期のバイパス製剤による止血管理も本法を用いて安全に止血管理できた。②軽症血友病患者のインヒビター出現もしばしば認められるが、発生机序は不明であった。我々は Pro1809Leu 変異をもつ軽症血友病 A インヒビター出現の発生机序を解明した。変異部位は A3 ドメイン内であるが、インヒビターは C2 エピトープを認識していた。作成した変異 FVIII (P1809L) の蛋白機能解析により、変異により C2 ドメインの抗原性(構造変異)変化を来し、インヒビターが出現することが示唆された。③インヒビター除去を目指した免疫寛容導入療法 (ITI) の作用機序は不明である。今回 ITI

中のインヒビターIgG subclassの変動に着目し、IgG1とIgG4の推移がITIの効果を反映していることがわかった。④バイパス止血療法での止血機序は十分解明されていない。我々は、今までにFVIIa-FVIII関連軸による凝固機序の生理的存在を示してきた。今回、新規FVIIa/FX製剤を用い、FVIII共存下で凝固初期早期にFVIIaとFX(a)が作用し、FVIIIを活性化し、rFVIIaに比して相加的に凝固機能を改善すること、この反応はインヒビター存在に関係なく作動していた。

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)。平成 22 年度は、研究の進捗が穏やかな原因を模索し、データ集積の効率化を進め、実施計画書の見直しを行い、平成 23 年度から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原法である 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。

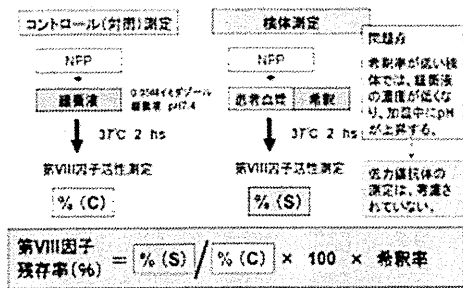


図1 ベセスダ法の問題点

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 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。平成 22 年度から名古屋大学を解析施設として加え、東京医大・奈良医大の 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する。

平成 23 年度からは、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」の計画・実施体制の確立を行った。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 および B は、X 染色体上の血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) 遺伝子および FIX 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み換え FVIII や FIX 濃縮製剤の投与により、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) が発生することも知られている。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。本研究分担班は以下の4つの研究を行った。①インヒビター患者に対する止血療法として活性型プロトロンビン複合体製剤(aPCC)や活性型 FVII 製剤(rFVIIa)によるバイパス療法があるが、バイパス製剤使用時の凝血学的治療効果を正確にモニタリングする汎用性かつ簡便な方法は確立されていない。インヒビター保有患者の止血モニタリングに凝固波形解析を用いた新規 assay の確立を試みた。②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、新規 Pro1809Leu 点変異を有する軽症血友病 A 患者でのインヒビター出現を経験し、その発生機序を解明することを試みた。③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、その作用機序はほとんど分かっていない。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 に着目し、その推移を評価した。④バイパス止血療法は上述のように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-FVIII 関連凝固機序の新たな生理的存在を明らかにしており、今回の FVIIa/FX 新規バイパス製剤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 24 年度からは、平成 19-23 年度に実施した「J-HIS1 インヒビター発生患者の実態調査」に登録されたインヒビター発生患者 107 名の調査結果に基づき、インヒビターの消長に関する因子の抽出と統計学的解析を実施し、論文に

発表する。平成 25 年度以降の遺伝子解析研究 (第 4 研究) の結果と合わせることでインヒビター発生要因・消長の解析のための基盤的知見を得る。

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 19 年度から構築してき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継続する。平成 25 年度には、より多くの症例集積を進めるため研究計画の見直しを行い、実施計画書を改定し調査研究を継続実施する。

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) 凝固因子活性測定法の検討

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、凝固 1 段法による第 VIII 因子活性測定法の精度を検討する。

本機の凝固因子活性定量系を利用して第 VIII 因子活性を測定する際の検量線の再現性について検討した。第 VIII 因子活性として、①1.563%、②3.125%、③6.25%、④25.0%、⑤50.0%、⑥100.0%相当の 6 濃度の測定点における凝固時間の再現性を求めた。希釈液には 0.05M イミダゾール緩衝液を用いて、本機の所定の方法により因子測定の自動測定を行った。

(2) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

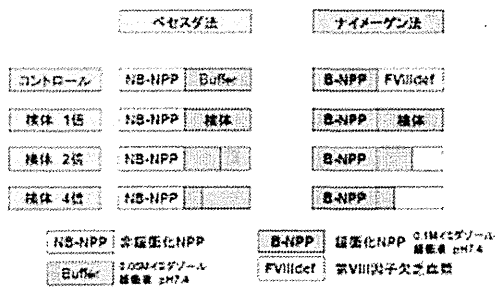


図2 ベセスダ法とナイメーゲン変法

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。

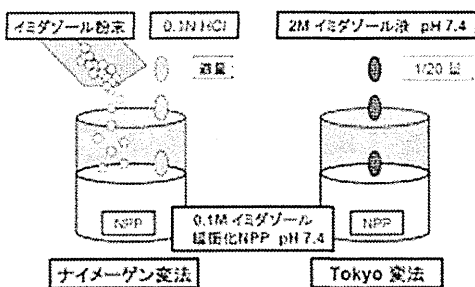


図3 原法と Tokyo 変法との違い

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、2N 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)。

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。

(3) 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。

(4) 標準インヒビター血漿の特性

既知の 68 ベセスダ単位 (BU) を示すインヒビター血漿を標準インヒビターとして使用するために、特性の確認を行った。0.05M イミダゾール緩衝液にて 5BU/ml まで希釈後、第 VIII 因子欠乏血漿で二次希釈を行った検体を用いてベセスダ法によりインヒビターの特性を確認した。

(5) 標準血漿の希釈法の開発

標準インヒビター血漿の希釈液として適当な組成を検討した。生理食塩水を一次希釈液として標準インヒビター血漿を約 10BU/ml まで希釈した後、① pH 7.4、0.05M イミダゾール緩衝液、② pH 7.4、0.05M イミダゾール緩衝液加、5% ウシアルブミン、③ 第 VIII 因子欠乏血漿の 3 種類を二次希釈液として、それぞれ約 0.5、1.0、1.5、2.0 BU/ml へ希釈して検討した。

(6) Tokyo 変法を用いた再現性の検討

標準インヒビター血漿を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、2.0 BU/ml へ希釈し、再現性を検討した。

(7) Tokyo 変法を用いたインヒビター検出法の改善に向けての検討

これまでの検討の中で、Bethesda 法においては、計算の過程で誤差を拡大することが検証されたが、Bethesda 法の実際の測定範囲が 2.0 BU 以下であることから、この測定範囲の誤差の発生を最小限にする計算方法の開発が必須である。少なくとも、臨床試験上に問題となりやすい低力価のインヒビターを再現性良く判定する方法を開発する。

(8) 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°C10 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°C10 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°C10 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°C2 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