

第 Ixa・X 因子結合 bispecific 抗体製剤 (ACE910)は血友病Aの凝固能を止血可能域に改善する 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 5 月 31 日

25) 古川 晶子, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 矢田 弘史, 南 博明, 松本 智子, 嶋 緑倫 ROTEM を用いたインヒビター保有血友病A患者の周術期バイパス止血製剤モニタリングの体系化 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 5 月 31 日

26) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 松本 智子, 古川 晶子, 南 博明, 嶋 緑倫 凝固一段法による第 VIII 因子活性 (FVIII:C)が臨床的重症度を過小評価した軽症血友病Aの 1 例 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 5 月 31 日

27) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 松本 智子, 古川 晶子, 南 博明, 細川 和也, 嶋 緑倫 血流下血栓形成測定検査(T-TAS)は 1型 von Willebrand 病の臨床的重症度を反映する 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 5 月 31 日

28) 内場 光浩, 副島 見事, 松本 智子, 嶋 緑倫. 中毒性皮膚表皮壊死症に合併した後天性フォンビルブランド病. 第 35 回 日本血栓止血学会. 山形市 2013 年 6 月 1 日

29) 南 博明, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 矢田 弘史, 古川 晶子, 松本 智子, 嶋 緑倫 第 VIII 因子重鎖 Arg372 開裂を制御する第 VIII 因子上のトロンビン結合部位の同定 山形市 2013 年 6 月 1 日

30) 南 博明, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 矢田 弘史, 古川 晶子, 松本 智子, 嶋 緑倫 第 VIII 因子重鎖 Arg372 開裂を制御する第 VIII 因子上のトロンビン結合部位の同定 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

31) 古川 晶子, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 松本 智子, 矢田 弘史, 南 博明, 嶋 緑倫 凝固初期相において組織因子は

VWF 存在下で活性型第 X 因子による凝固第 VIII 因子活性化を惹起させる 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日
32) 武藤 厚, 北沢 剛久, 吉橋 一隆, 武田美奈子, 添田 哲弘, 井川 智之, 三瓶全次郎, 坂本裕一郎, 西田由紀子, 齊藤浩之, 川邊 良樹, 嶋 緑倫, 吉岡 章, 服部 有宏 第 VIII 因子(FVIII)補因子機能を代替する bispecific 抗体 ACE910 の血友病Aモデルにおける止血効果 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日
33) 南 博明, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 古川 晶子, 櫻井 嘉彦, 松本 智子, 柏木 浩和, 鈴木 英紀, 細川 和也, 中井寛明, 嶋 緑倫 血小板放出顆粒異常症の診断における Total Thrombus-formation Analysis System の有用性について 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

34) 土井 政明, 松井 英人, 竹田 征治, 斎藤 能彦, 武田麻衣子, 松成 泰典, 西尾 健治, 嶋 緑倫, 坂野 史明, 秋山正志, 小亀 浩市, 宮田 敏行, 杉本 充彦 マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

35) 松井 英人, 土井 政明, 武田麻衣子, 松成 泰典, 西尾 健治, 嶋 緑倫, 副島見事, 粕田 承吾, 坂野 史明, 宮田 敏行, 杉本 充彦 マウス骨髄移植モデルにおける ADAMTS13 の移植ドナー細胞生着促進効果 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

36) 石原 卓, 荻原 建一, 竹下 泰史, 山田 佳世, 松本 智子, 矢田 弘史, 古川 晶子, 南 博明, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 小児急性リンパ性白血病の L-asparaginase 投与時における凝固能/抗凝固能の包括的検討 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

37) 内場 光浩, 副島 見事, 松本 智子, 嶋 緑倫 中毒性皮膚表皮壊死症に合併した後天性フォンビルブランド病 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

38) 南 博明, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 古川 晶子, 櫻井 嘉彦, 松本 智子, 柏木 浩和, 鈴木 英紀, 細川 和也, 中井 寛明, 嶋 緑倫 血小板放出顆粒異常症の診断における Total Thrombus-formation Analysis System の有用性について 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 6 月 1 日

39) 嶋 緑倫 これからの血友病診療 第 5 回 両毛小児科フォーラム 太田市 2013 年 6 月 13 日

40) 濱中 瑛里, 吉澤 弘行, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 感染性胃腸炎から急性脳症と横紋筋融解症を合併したダウン症候群・房室中隔欠損の乳児例 第 27 回 日本小児救急医学会 宜野湾市 2013 年 6 月 15 日

41) 石川 智朗, 利根川 仁, 矢田 弘史, 範 新萍, 本田 繁則, 宮田 敏行, 吉田 瑤子, 松本 雅則, 藤村 吉博, 嶋 緑倫 C3 遺伝子変異を認めた非典型溶血性尿毒症症候群の 1 例 第 48 回 日本小児腎臓病学会 徳島市 2013 年 6 月 28 日

42) Seita I, Amano K, Higasa S, Sawada A, Kuwahara M, Shima M. Treatment of acute bleeding episodes in acquired haemophilia with recombinant activated factor VII (rFVIIa): Analysis from 10-year Japanese post-marketing surveillance 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Amsterdam. 2013 年 7 月 1 日

43) Muto A, Kitazawa T, Yoshihashi K, Takeda M, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. In vivo hemostatic potency of a factor VIII

function-mimetic, bispecific antibody to factors IXa and X (ACE 910) against on-going bleeds in an acquired hemophilia A model 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013 年 7 月 1 日

44) Taki M, Hanabusa H, Fukutake K, Matsushita T, Shima M, Shirahata A, Study Group Advate Pass. 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 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013 年 7 月 1 日

45) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Minami H, Shima M. Evaluation of the hemostatic potentials in a mild hemophilia A with a novel factor VIII mutation Thr677Ile 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013 年 7 月 1 日

46) Minami H, Nogami K, Ogiwara K, Sakurai Y, Kashiwagi H, Suzuki H, Hosokawa K, Shima M. Availability of a microchip flow chamber system as a screening test of platelet storage pool disease 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Amsterdam 2013 年 7 月 1 日

47) Ogiwara K, Nogami K, Yada K, Furukawa S, Minami H, Haku J, Kitazawa T, Hattori K, Shima M. A novel bispecific antibody (ACE 910) against coagulation factors IXa and X

improves procoagulant activity of patients with hemophilia A ex vivo to hemostatic level 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013年7月2日

48) Amano K, Shirahata A, Fukutake K, Takamatsu J, Shima M, Higasa S, Fujii T, Migita M, Kawakami K, Saito H. Results of haemostatic efficacy, safety, and

pharmacokinetics/pharmacodynamics of a plasma-derived factor VIIa and factor X (MC710) in haemophilia patients with inhibitors : Phase II clinical trial 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013年7月2日

49) Matsui H, Doi M, Matsunari Y, Takeda M, Nishio K, Shima M, Soejima K, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 accelerates the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Amsterdam 2013年7月4日

50) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Minami H, Shima M. Different neutralizing effects of factor VIII concentrates associated with von Willebrand factor and the inhibitor epitopes. 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013年7月4日

51) Takedani H, Shima M, Horikoshi Y, Koyama T, Fukutake K, Kuwahara M, Ishiguro N. Recombinant activated factor VII use for surgical/invasive procedures in congenital haemophilia

with inhibitors and acquired hemophilia: Analysis from 10-year Japanese post-marketing surveillance 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Amsterdam 2013年7月4日

52) 嶋 緑倫 血友病の遺伝と保因者への配慮・留意点など. 2013年度ネットワーク医療と人権研修会 大阪市 2013年7月15日

53) 嶋 緑倫 これからの血友病診療 第17回 山梨血液研究会サマーセミナー 甲府市 2013年7月18日

54) 松本 智子, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 新規凝固機能検査による評価; T-TASとThrombin generation testの基本と臨床 第14回 日本検査血液学会 東京都 2013年7月27日

55) 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 自動凝固分析装置(CS-2000i)を用いた新規APTT凝固波形解析の有用性. 第14回 日本検査血液学会 東京都 2013年7月27日

56) 井上 創輝, 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 凝固波形解析による内因系凝固機能に及ぼす高濃度第VIII因子の影響について 第14回 日本検査血液学会 東京都 2013年7月27日

57) Ohga S, Ichiyama M, Ochiai M, Urata M, Hotta T, Ishiguro A, Takahashi H, Shima M, Taki M, Kang D, Hara T. Heritable thrombophilias in Japanese children. 5th East Asia Hemophilia Foundation Seoul, Korea 2013年9月8日

58) Shima M. Monitoring therapy to manage outcomes in hemophilia the Asia Pacific Measuring and Optimising Outcomes in Hemophilia Treatment meeting Seoul, Korea 2013年9月6日

59) Hara R, Tanaka Y, Inagaki Y, Shima M. Usefulness of musculoskeletal

- ultrasonography of haemophilic arthropathy. 5th East Asia Hemophilia Foundation. Seoul, Korea 2013年9月7日
- 60) Yada K, Shima M. Management of Bypassing Therapy in Hemophilia Patients with Inhibitors Utilizing Global Coagulation Assay 5th East Asia Hemophilia Foundation Seoul, Korea 2013年9月8日
- 61) Shima M. Treatment Situation in Japan Bayer Asia Pacific Advisory Board Seoul, Korea 2013年9月8日
- 62) 嶋 緑倫 紫斑と出血素因について 奈良皮膚・小児疾患研究会 奈良市 2013年9月26日
- 63) 嶋 緑倫 血友病の診断と治療の進歩 第8回 四国ナノピア凝固・線溶研究会 南国市 2013年9月28日
- 64) Matsui H, Sugimoto M, Tatsumi K, Ohashi K, Shima M., Okano T. Establishment of novel cell-based therapy for hemophilia A 第75回 日本血液学会 札幌市 2013年10月11日
- 65) 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 札幌市 2013年10月12日
- 66) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Usefulness of thrombin generation assay (TGA) for diagnosis of prolonged aPTT with positive LA 第75回 日本血液学会 札幌市 2013年10月12日
- 67) Shima M., Fukutake K, Hanabusa H, Matsushita T, Taki M, Sakai M, Hirakata T, Innes A, Li S, Farwell W, Luk A, Mei B, Pierce G. Japanese patient subpopulation analysis in a phase 3 study (B-LONG) of long-lasting recombinant factor IX Fc fusion 第75回 日本血液学会 札幌市 2013年10月12日
- 68) 嶋 緑倫 後天性出血性凝固異常症 日本血栓止血学会第1回教育セミナー 東京都 2013年10月20日
- 69) Kitazawa J, Nollet KE, Kojima T, Yoshioka A, Shima M. Ile66Thr missense mutation results the reduction of activity but complete molecule formation of clotting factor IX Joint Scientific Meeting of HSA NZ, ANZSBT & ASTH 2013 Gold Coast, QLD, Australia 2013年10月20-23日
- 70) Shima M. How might long-acting products be introduced into clinical practice in Japan? Japanese perspective of differentiated long-acting FVIII products; International Advisory Board meeting Athens 2013年10月25日
- 71) Shima M. Management of Hemophilia A with current FVIII products: Securing optimum outcomes Pharmacokinetic based dosing how valuable is this approach? International Advisory Board meeting Athens 2013年10月26日
- 72) 中川 智子, 武山 雅博, 高橋 幸博, 嶋 緑倫 新生児に対する臍帯血培養の臨床的有用性 第45回 日本小児感染症学会 札幌市 2013年10月27日
- 73) 嶋 緑倫 後天性血友病の病態と治療 UP DATE 近畿地区後天性血友病研究会 大阪市 2013年11月2日
- 74) 天野 逸人, 木村 弘, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 製剤の交互療法により止血コントロールに成功した後天性血友病の1例 近畿地区後天性血友病研究会 大阪市 2013年11月2日
- 75) 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 Thrombin/Plasmin 生成同時測定による新

規包括的凝固線溶検査 第 60 回 日本臨床検査医学会学術集会 神戸市 2013 年 11 月 2 日

76) 嶋 緑倫 血友病の遺伝と保因者～配慮と留意点～血友病に関する最近のトピックス～治療製剤の動向～ 東北ブロック医療等相談会 仙台市 2013 年 11 月 3 日

77) 嶋 緑倫 血友病. 第 5 回 若手臨床血液学セミナー 神戸市 2013 年 11 月 10 日

78) 中村ふくみ, 小川 拓, 中川 智子, 武山 雅博, 嶋 緑倫, 吉川 正英, 三笠 桂一 奈良医大海外渡航者外来におけるワクチン接種の現状 第 8 回 奈良ワクチン研究会 奈良市 2013 年 11 月 14 日

79) 田村健太郎, 朴 永銖, 中瀬 裕之, 榊原 崇文, 嶋 緑倫. 小児難治性てんかんに対する慢性頭蓋内脳波記録および脳機能マッピングの有用性. 第 49 回 奈良エPILEプシークラブ 橿原市 2013 年 11 月 22 日

80) 高谷 恒範, 田畠 歩, 辻中 彩香, 加藤 順子, 山本さよみ, 吉田 秀子, 内池 敬男, 水野 麗子, 山崎 正晴, 本田 晃生, 榊原 崇文, 嶋 緑倫, 田岡 俊昭, 高橋 幸博 脳波スペクトル解析による MR 画像上でのてんかん焦点同定の試み 第 49 回 奈良エPILEプシークラブ 橿原市 2013 年 11 月 22 日

81) 南 博明, 野上 恵嗣, 矢田 弘史, 古川 晶子, 嶋 緑倫 血友病インヒビター症例の手術治療における診療連携の取り組み 第 55 回 日本小児血液・がん学会 福岡市 2013 年 11 月 29 日

82) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 Investigation of risk factors for hemophilic arthropathy in mild/moderate hemophilia A 第 55 回 日本小児血液・がん学会 福岡市 2013 年 11 月 30 日

83) 石原 卓, 竹下 泰史, 松本 智子, 武山 雅博, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 小児

急性リンパ性白血病の L-asparaginase 投与時における凝固線溶能の包括的検討 第 55 回 日本小児血液・がん学会 福岡市 2013 年 11 月 30 日

84) Matsui H, Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Sugimoto M, Okano T. Successful Long-Term Phenotypic Correction Of Hemophilia A Mice By Engineering Functional Factor VIII Delivery System In Vivo Using Autologous Endothelial Cell Sheets 55th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition New Orleans, USA 2013 年 12 月 8 日

85) Yada K, Nogami K, Takeyama M, Fay PJ, Shima M. Reduced affinity to VWF induced by a novel mutation at Pro1809Leu (factor VIII-Tenri) is the cause of mild hemophilia A developing anti-factor VIII inhibitor 55th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition New Orleans, USA 2013 年 12 月 8 日

86) Minami H, Nogami K, Yada K, Shima M. Identification Of The Thrombin-Binding Site On Factor VIII Regulating Arg372 Cleavage In The Factor VIII Heavy Chain 55th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition New Orleans, USA 2013 年 12 月 9 日

87) 嶋 緑倫 後天性血友病 A の病態と治療 第 2 回 後天性血友病研究会 東京都 2013 年 12 月 14 日

(2012 年)

1) 高谷 恒範, 豆田 清美, 山本さよみ, 今井 竜子, 内池 敬男, 岡本 康幸, 高橋 幸博, 榊原 崇文, 嶋 緑倫, 筏義人 脳波と自律神経機能(心拍変動周波

数解析) —発作時脳波について— 第 28
回 奈良小児てんかん研究会 橿原市
2012年2月16日

2) 西屋 克己, 田中 一郎, 野上 恵嗣,
荻原 建一, 松本 智子, 嶋 緑倫 イン
ヒビタ-保有血友病 A 患者における第
VIII 因子持続輸注療法における薬物動態
第 115 回 日本小児科学会 福岡市
2012年4月21日

3) 西山 敦子, 荻原 建一, 中川 隆志,
矢田 弘史, 西屋 克己, 野上 恵嗣, 田
中 一郎, 嶋 緑倫 長期間免疫寛容導
入療法(ITI)を実施しているインヒビタ-陽
性血友病 A3 例の検討 第 115 回 日本小
児科学会 福岡市 2012年4月22日

4) 中川 隆志, 西屋 克己, 大仲 雅之,
村上 志穂, 金廣 裕道, 嶋 緑倫 呼
吸不全を主訴とした乳児特発性胃破裂の 1
例 第 115 回 日本小児科学会 福岡市
2012年4月22日

5) 利根川 仁, 榊原 崇文, 森近 省吾,
嶋 緑倫 MR ワクチン接種後に発症し
た急性散在性脳脊髄炎(ADEM) 第 54 回
日本小児神経学会総会 札幌市 2012年
5月18日

6) Matsui H, Tatsumi K, Ohashi K,
Sugimoto M, Shima M, Okano T.
Proliferative endothelial progenitors as a
therapeutic vehicle for the treatment of
hemophilia American Society of Gene
and Cell Therapy 15th Annual Meeting
Philadelphia, USA 2012年5月19日

7) 榊原 崇文, 利根川 仁, 高橋 幸博,
嶋 緑倫 Pallister-Killian syndrome に
おける発作時ビデオ脳波の検討 第 46 回
奈良エPILEプシ-クラブ 橿原市

2012年5月25日

8) 荻原 建一, 細川 和也, 野上 恵嗣,
松本 智子, 大西 朋子, 矢田 弘史, 嶋
緑倫 新規血流下血栓形成測定装置を用
いた von Willebrand 病(VWD)の臨床病型
と治療効果の評価 第 34 回 日本血栓止
血学会 東京都 2012年6月8日

9) 中川 隆志, 荻原 建一, 佐道 俊幸,
野上 恵嗣, 松本 智子, 矢田 弘史, 嶋
緑倫 反復流産の既往を持つ妊婦の
PC/PS 経路依存性抗凝固能評価 第 34 回
日本血栓止血学会 東京都 2012年6
月8日

10) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 篠澤 圭子,
松本 智子, 古川 晶子, 西屋 克己, 矢
田 弘史, 福武 勝幸, 嶋 緑倫 第 V
因子変異 R506Q(FV Leiden)より強い APC
レジスタンスを示した FV 変異
W1920R(FV Nara) 第 34 回 日本血栓
止血学会 東京都 2012年6月9日

11) 松井 英人, 辰巳 公平, 大橋 一夫,
杉本 充彦, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 自
己血管内皮前駆細胞シート移植による新規
血友病 A 細胞療法の確立. 第 34 回 日本
血栓止血学会 東京都 2012年6月9日

12) 松本 智子, 野上 恵嗣, 荻原 建一,
矢田 弘史, 嶋 緑倫. 新規
Thrombin/Plasmin Generation Assay に
よる凝固線溶能の評価. 第 34 回 日本
血栓止血学会 東京都 2012年6月9日

13) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 荻原 建一,
松本 智子, 嶋 緑倫 活性型プロトロン
ビン複合体製剤による第 VIII 因子活性
化機構 第 34 回 日本血栓止血学会
東京都 2012年6月9日

14) 山田 佳世, 西山 敦子, 竹下 泰史,

嶋 緑倫, 石西 綾美, 早川 正樹, 松本 雅則, 藤村 吉博 乳児 ALL 再発例に対して U-BMT を実施し, 発熱と FDP 上昇を指標に rTM を投与し速やかな症状改善を認めた 1 例 第 20 回 奈良県造血細胞移植研究会 奈良市 2012 年 6 月 23 日

15) 松井 英人, 杉本 充彦, Lillicrap D, 嶋 緑倫 microRNA 制御凝固第 VIII 因子発現レンチウイルスベクターによる新規血友病 A 遺伝子治療 第 19 回 肝細胞研究会 札幌市 2012 年 6 月 29 日

16) Shima M, Nair C, Thachil J, Srivastava A. Standardization of methods for performing the clot wave form analysis Subcommittee of Biorheology, in the 58th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting of International Society on Thrombosis and Haemostasis Liverpool, UK 2012 年 6 月 29 日

17) 吉澤 弘行, 林 環, 辻井 信之, 吉川 義朗, 嶋 緑倫 陽陰圧体外式人工呼吸器(RTX)にて呼吸障害による肺高血圧を治療したダウン症候群の乳児例 第 48 回 日本小児循環器学会学術集会 京都市 2012 年 7 月 6 日

18) Shima M. Clot waveform analysis :Does it have a role? World Federation of Hemophilia 2012 World Congress Paris, France 2012 年 7 月 9 日

19) Inagaki Y, Tanaka Y, Tsukamoto S, Kumai T, Uematsu K Taniguchi A, Ogawa M, Matsuda T, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic ankle arthrodesis for hemophilic arthropathy

World Federation of Hemophilia 2012 World Congress Paris, France 2012 年 7 月 9 日

20) Chambost H, Rafowicz A, Guillaume Y, Liesner R, Nolan B, Shima M, Shapiro A, Ljung R. Perinatal practices in the context of hemophilia carrier: Expert opinion from an international pediatric panel World Federation of Hemophilia 2012 World Congress Paris, France 2012 年 7 月 10 日

21) Taki M, Hanabusa H, Fukutake T, Matsushita T, Shima M, Shirahata A, A STUDY GROUP. Clinical experience of previously untreated patients (PUPs) with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method from postauthorization safety surveillance in Japan: 5-year update World Federation of Hemophilia 2012 World Congress Paris, France 2012 年 7 月 11 日

22) Tanaka Y, Taniguchi A, Inagaki Y, Matsuda T, Hara R, Kumai T, Shima M, Tanaka I, Yoshioka A. Arthroscopic synovectomy with joint distraction using a patella tendon bearing brace for severe hemophilic ankle arthropathy World Federation of Hemophilia 2012 World Congress Paris, France 2012 年 7 月 11 日

23) 西屋 克己, 鈴木 康之, 嶋 緑倫 小児科卒前臨床実習におけるポ・トフォリオの教育効果 第 44 回 日本医学教育学会大会 横浜市 2012 年 7 月 27 日

24) 吉賀 正亨, 小宮山 豊, 松本 智子,

尾崎 吉郎, 野村 明代, 寺内 里恵, 大倉ひろ枝, 嶋 緑倫, 野村 昌作 複数の凝固因子低下とトロンビン産生低下による出血傾向を認めた全身性エリトマトーデス症例 第 13 回 日本検査血液学会 高槻市 2012 年 7 月 28 日

25) 水町 邦義, 矢田 弘史, 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 血友病 B における微量第 IX 因子活性の測定意義 第 13 回 日本検査血液学会 高槻市 2012 年 7 月 29 日

26) 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 自動凝固分析装置による von Willebrand 因子リストセチン・コファクタ-活性測定の検討 第 13 回 日本検査血液学会 高槻市 2012 年 7 月 29 日

27) 宮座 静香, 松本 智子, 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 凝固波形解析を用いたフィブリン形成過程における各種凝固因子の関与に関する検討 第 13 回 日本検査血液学会 高槻市 2012 年 7 月 29 日

28) 嶋 緑倫 こどもの健康を守るために 奈良県立医科大学公開講座 くらしと医学 橿原市 2012 年 9 月 8 日

29) 桐村 章太, 荻原 建一, 大塚 敬太, 嶋 緑倫, 森近 省吾, 赤澤 英樹 胸部 CT が診断上重要であったマイコプラズマ細気管支炎の 11 歳男児例 第 109 回 日本小児科学会奈良地方会 天理市 2012 年 10 月 13 日

30) 嶋 緑倫 血友病診療の展望-個別化治療の必要性- 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 19 日

31) Matsui H, Sugimoto M, Shima M, Fujimoto N, Hotta A. Establishment of

the novel piggyBac transposon vector for the treatment of hemophilia A 第 74 回 日本血液学会京都市 2012 年 10 月 20 日

32) Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Matsumoto T, Yada K, Furukawa S, Minami H, Shima M. Hemostatic effect of the administration of factor XIII for hemophilia A patients 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 20 日

33) Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, Yasumoto Y, Sakata T, Ogiwara K, Shima M, Niimi H, Kitajima I, Asakura H, Ohtake S. A novel factor V mutation which causes deep vein thrombosis 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 20 日

34) 白 潤夏, 荻原 建一, 松本 智子, 野上 恵嗣, 矢田 弘史, 西屋 克己, 嶋 緑倫 凝固波形解析を用いた血友病 A インヒビタ-バイパス止血療法の新規モニタリング 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 20 日

35) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 西屋 克己, 松本 智子, 古川 晶子, 南博明, 嶋 緑倫 Pro1809Leu 変異に伴う軽症血友病 A 患者に生じた抗第 VIII 因子抗体の発生及び抑制機序 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 20 日

36) 松本 智子, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 嶋 緑倫 後天性第 V 因子インヒビタ-の作用機序と臨床的多様性の関連性 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 20 日

37) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M, Jian-Ming Gu, Ji-Yun Kim, Sim D, Laux V, Murphy J,

Myles T. Anti-hemophilic properties of BAY 86-6150, a recombinant FVIIa variant, under whole blood flow 第 74 回 日本血液学会 京都市 2012 年 10 月 21 日

38) 中川 智子, 西屋 克己, 嶋 緑倫 無莢膜型インフルエンザ菌による硬膜下膿瘍合併細菌性髄膜炎の 1 例 第 44 回 日本小児感染症学会 北九州市 2012 年 11 月 24 日

39) 大塚 敬太, 西屋 克己, 中川 智子, 嶋 緑倫 家族内感染が疑われ重症呼吸障害を呈した乳児百日咳 3 症例の検討 第 44 回 日本小児感染症学会 北九州市 2012 年 11 月 25 日

40) 榊原 崇文, 矢田 弘史, 嶋 緑倫 PRRT2 遺伝子解析が診断に有用であった ICCA 症候群の一家系 第 47 回 奈良エピレプシクラブ 橿原市 2012 年 11 月 28 日

41) 山田 佳世, 石原 卓, 竹下 泰史, 嶋 緑倫, 早川 正樹, 松本 雅則, 藤村 吉博 小児造血幹細胞移植における VWF/ADAMTS13 と凝固障害 第 54 回 日本小児血液・がん学会、第 10 回 日本小児がん看護学会、第 17 回 公益財団法人がんの子どもを守る会 公開シンポジウム 横浜市 2012 年 11 月 30 日

42) 利根川 仁, 竹下 泰史, 山田 佳世, 金廣 裕道, 天野 逸人, 田中 晴之, 森井 武志, 嶋 緑倫 肝芽腫に対する自家造血幹細胞移植後に治療関連骨髄異形成症候群を発症した 2 例 第 54 回 日本小児血液・がん学会、第 10 回 日本小児がん看護学会、第 17 回 公益財団法人がんの子どもを守る会 公開シンポジウム 横浜市 2012 年 11 月 30 日

43) 高橋 幸博, 白 潤夏, 武山 雅博, 新居 育世, 金廣 裕道, 國島 伸治, 林 環, 竹下 泰史, 山田 佳世, 片岡 美香, 倉本智津子, 福田 和由, 釜本 智之, 村上 志穂, 内田優美子, 西久保敏也, 嶋 緑倫 一過性骨髄異常増殖症と肝線維症に、少量 Ara-C 療法と茵陳蒿湯を用い軽快が得られたダウン症候群の 2 例 第 54 回 日本小児血液・がん学会、第 10 回 日本小児がん看護学会、第 17 回 公益財団法人がんの子どもを守る会 公開シンポジウム 横浜市 2012 年 11 月 30 日

44) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 松本 智子, 片岡 美香, 竹田 知広, 竹田 洋樹, 松本 尚子, 嶋 緑倫 基礎疾患なく線溶亢進型 DIC 類似の症状を呈した 1 例 第 54 回 日本小児血液・がん学会、第 10 回 日本小児がん看護学会、第 17 回 公益財団法人がんの子どもを守る会 公開シンポジウム 横浜市 2012 年 11 月 30 日

45) 西山 敦子, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 矢田 弘史, 南 博明, 西屋 克己, 嶋 緑倫 免疫寛容導入療法 (ITI) 長期継続中、腸腰筋出血後にインヒビタ-が著増した重症血友病 A の 1 例 第 54 回 日本小児血液・がん学会、第 10 回 日本小児がん看護学会、第 17 回 公益財団法人がんの子どもを守る会 公開シンポジウム 横浜市 2012 年 12 月 1 日

46) Matsui H, Sugimoto M, Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Okano T. Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A 7th Congress of Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis Melbourne, Australia 2012 年 10 月 30 日

47) Doi M, Matsunari Y, Takeda M, Nishio K, Shima M, Soejima K, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 improving the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition Atlanta, USA 2012年12月8日

48) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. The characteristics and mechanism(s) of anti-factor VIII antibody developed in mild hemophilia a associated with a novel mutation Pro1809Leu. 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. Atlanta, USA 2012年12月9日

49) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Wakagayashi H, Fay P, Shima M. A coagulation mechanism for the mild bleeding tendency in a patient with severe hemophilia A possessing an Arg1781His mutation. 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition Atlanta, USA 2012年12月9日

50) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Furukawa S, Minami H, Hosokawa K, Shima M. Total-thrombus-formation analysis system using a microchip flow chamber reflects bleeding severity of patients with type 1 von Willebrand disease. 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. Atlanta, USA 2012年12

月9日

51) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Coagulation functions with clinical phenotype and inhibitory mechanisms in acquired factor V inhibitors 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition Atlanta, USA 2012年12月9日

52) Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. Protective role of ADAMTS13 for myocardium in the mouse model of experimental myocardial infarction 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition Atlanta, USA 2012年12月9日

53) Haku J, Ogiwara K, Matsumoto T, Yada K, Shima M, Nogami K. An optimal monitoring on bypassing therapy for hemophilia a patients with inhibitor using aPTT-based clot waveform analysis with the presence of minimal TF 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition Atlanta, USA 2012年12月10日

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得
血液凝固因子の活性化方法及び血液凝固因子不活性化試料（特許 4671823）
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
総合(分担)研究報告書

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

研究分担者：菱川 修司 自治医科大学 准教授
研究協力者：池本 智一 自治医科大学 循環器内科 講師
： 牧村 幸敏 自治医科大学 動物資源開発部門 助教

研究要旨：血友病患者に対するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた遺伝子治療の実現に向けて、日本人の半数以上が陽性とされているAAV中和抗体陽性患者に対して「中和抗体の影響を回避するためのベクター投与方法を確立する」ことを目的に研究を行った。我々は現在までにマイクロカテーテルを用い経門脈的・肝区域選択的にAAVベクターを投与し、肝細胞へ遺伝子を導入する独自の方法を開発している。さらに同方法を用い、AAV抗体陽性サルに対し導入遺伝子由来の第IX因子の発現(5~10%)させることにも世界に先駆け成功している。同方法は今後治療が想定されるAAVベクター中和抗体陽性症例に対して、その影響を回避するための有力な手段となると考えられる。今後はさらに臨床治療に配意し、より効率的でかつ対象患者の負担の少ない投与条件の適正化を図り、近い将来同手技を用いた臨床治療を実現させたいと考えている。

A. 研究目的

血友病の治療として、これまで関連欠損因子を遺伝子治療によって補う試みがなされてきた。当研究班の前分担班である小林班はマウスやラットといった小動物を対象として、ウイルスベクターや非ウイルス法を用いた遺伝子導入実験を行い、その発現と導入効率を確認してきた。本研究班は同成果を発展させ、「血友病患者に対するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた遺伝子治療」の実現に向けて、特に日本人のほぼ半数が陽性であるとされているAAV中和抗体陽性患者に対して「中和抗体の影響を回避するためのベクター投与方法を確立する」ことを目的に研究を行っ

ている。現在までに我々は、肝門脈分枝に選択的にカテーテルを誘導し、同カテーテルより順次「生理的食塩水→AAVベクター溶液→生理的食塩水」を血管内に注入することによりAAVベクターを極力血液に接触させない、いわゆる「サンドイッチ式経門脈的肝区域選択的AAVベクター投与方法」を開発した。同法を用い現在までにAAV中和抗体陽性非ヒト霊長類 (カニクイザル) を対象とする投与実験を行ったところ、全例に導入遺伝子由来の第IX因子の発現が確認され、既にその成果を世界に先駆け発表している。(Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, etc. Mol

Ther.Feb ;21(2) : 318-23 2013.)。

現在はさらに臨床を配意し「より効率的でかつ患者の負担の少ない投与条件の確立」を図るために、実験ブタに対しサル実験と同じ条件で門脈急速注入処置を実施し、循環動態や肝機能を中心に副事象発現の有無やその程度に関して検証を行っている。

B. 研究方法

自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、以下の実験を行った。

対象：マイクロミニブタ(オス)(n=4)

対象実験ブタに対し、全身麻酔下に傍正中切開法にて開腹し、腸間膜静脈分枝に血管留置針を穿刺、同血管内にガイドワイヤーを挿入留置した。同ガイドワイヤーを X 線透視下に門脈本幹から目的分枝へと誘導し、マイクロカテーテル(イーグマン:3.3F、バルーン径 10 x 6mm、Temporary occlusion catheter)を挿入留置した。カテーテル先端付近のバルーンが血管喫入に適正な位置にあることを確認した後に、同バルーンをインフレーションし同血管の血流を一時的に遮断した。遮断直後に同カテより生理的食塩水を可及的速やかに注入した。注入量は注入対象肝容積相当量とした。注入終了後 1 分間は門脈血流遮断を継続し、その後遮断を解除した。処置終了後カテーテルを抜き(穿刺部は結紮閉鎖)、術後飼育室にて管理した。

抗生剤投与方法：術中にセファゾリン(セファメジン α 点滴用キット)1gを経静脈的に、さらに術後にアモキシシリン(パセトシンカプセル 125mg)1錠を3日間経口投与した。検査内容は以下の通りである。

① 門脈急速注入前後に収縮期血圧

(BP(sys))・酸素飽和度(SpO₂)・心拍数(HR)を測定した。

② 事前に IVH カテーテルを挿入留置し、同カテーテルより継時的に非拘束下に採血を行い、門脈急速注入直後から術後 14 日目まで肝機能(ALT/ γ GTP)、凝固能(PT)ならびに血算を観察した。また門脈急速注入直後ならびに術後 2 週間後に急速注入部領域の肝生検を行い、病理学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、自治医科大学における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護の精神で実施した。

C. 研究結果

① 急速注入時の循環動態の変化：

門脈急速注入前後に BP(sys)・SpO₂・HR を測定したところ、注入中に若干の血圧上昇が認められたものの、その他の測定値に明らかな変化は認められなかった。(図 1)

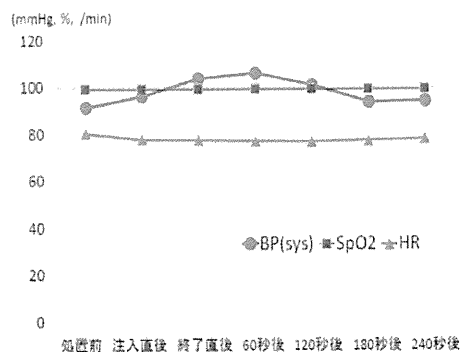


図 1：門脈急速注入時のバイタル

② 急速注入前後の肝機能・血算の変化：

術翌日に ALT の軽度上昇・PT 延長、また術後約 1 週間後に γ GTP の上昇が認められたが、いずれのデータも 2 週間後には正常化した。(図 2)

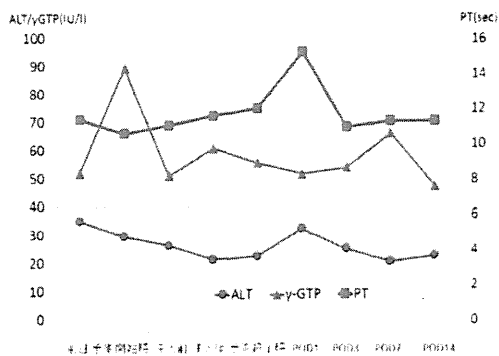


図2：急速注入前後の肝機能・凝固能

肝病理学的検索では、門脈急速注入直後には「軽度から中等度の類洞の拡張像」が認められたものの(図3)、術後14日目では明らかな異常は認められなかった。(図4)

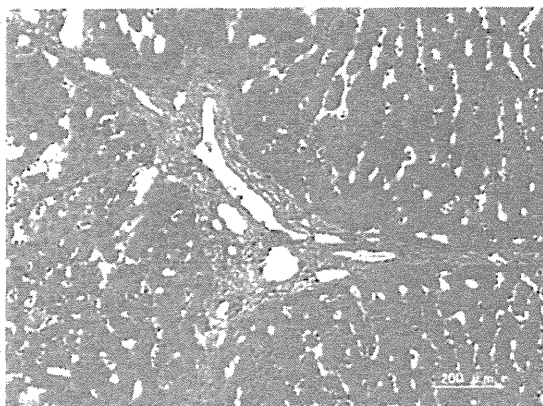


図3：門脈急速注入直後の肝組織像(類洞に軽度から中等度の拡張像が認められる)

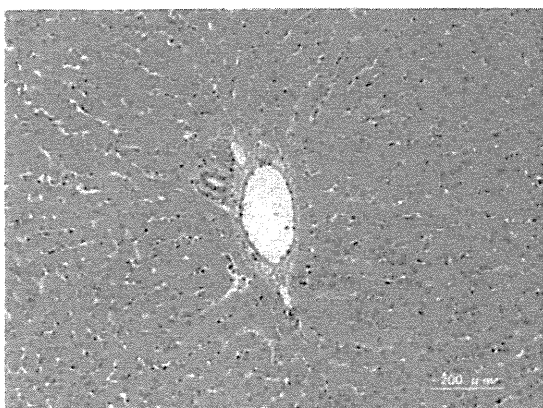


図4：術後14日目の肝組織像(明らかな異常は認められない)

血算系の検索では術翌日より白血球数が上昇し2週間後まで高値が持続した。血小板は術後1週間後に数値の上昇が認められたが、2週間後には正常化した。(図5)

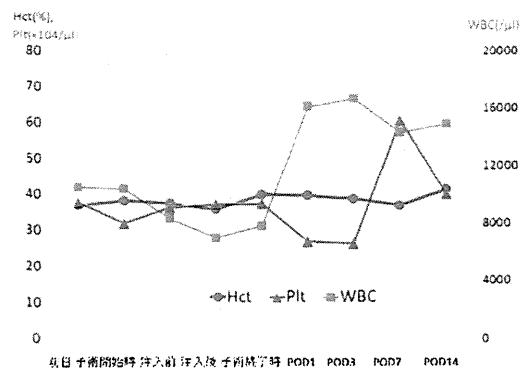


図5：急速注入前後のヘマトクリット、血小板、白血球値

D. 考察

現在までに我々は、肝臓の一部に AAV ベクターを投与し、肝細胞へ遺伝子を導入する独自の方法を開発した。既に同手技を用い、AAV 抗体陽性サルに対し遺伝子導入実験を行い、導入遺伝子由来第 IX 因子の発現(5~10%)を長期間維持することにも世界に先駆け成功している。現在はさらに臨床治療に配意し、より効率的でかつ対象患者の負担の少ない投与条件の適正化を図り、近い将来同方法による臨床治療が実施可能な状態を構築するために、検討を行っている。

具体的には、実験ブタを用い前述した方法で門脈分枝の血流を一時的に遮断した後に、注入対象肝容積量に相当する生理的食塩水を急速注入したところ、術中の循環動態への影響は軽微なことが判明し、また術後の経過も一般的な開腹手術とほぼ同等であることが分かった。

また門脈血流遮断や門脈急速注入等の一連の操作による肝臓への障害の程度を検討したところ、血液生化学的検索では一旦上昇した肝機能 (ALT、γGTP) が2週間後に

は正常化し、また病理学検索でも処置直後は類洞の拡張が認められたものの2週間後には正常化しており、総じて肝細胞への障害は軽微で可逆的なものと判断された。しかしながら白血球は術後より比較的急激に上昇し2週間後も高値を保ったままであった。同現象は単なる手術操作による影響とは考えにくく、門脈急速注入が個体に与えた副事象である可能性が高いと思われる。今後も実験を重ね本現象の原因を追究する予定である。

E. 結論

我々が開発した経門脈的遺伝子導入手技に関し、現在想定している注入対象肝容積量に相当する注入負荷では生体に重大な障害を与える程の循環動態ならび肝細胞への副事象はないものと思われた。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

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

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社 取締役

研究要旨

アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8 : AAV8）ベクターの GMP 製造および前臨床安全性試験実施計画において、CMO 候補及び CRO との協議における必要なサポートを行なった（初年度のみ）。また当該血友病遺伝子治療の次世代ベクターとして重要であるサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについて、接着培養法による製造・精製法を確立し、GMP 製造システム確立のために CMO に対する技術移転を行った。また将来的な更なる大量・安定製造を見越し、浮遊培養法での検討も開始し、予備検討において応用可能であることを確認した。

A. 研究目的

本研究に於いて、アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8 : AAV8）ベクターの利用は、血友病遺伝子治療の臨床研究の実現を最優先視するものであり、我々はそれに必要な製造および前臨床安全性試験実施に関わるサポートを実施している。一方、サル免疫不全ウイルス（Simian Immuno-deficiency Virus : SIV）ベクターは、AAV8 ベクターのバックアップ及び次世代技術としての性能を持たせ、AAV に問題等があった場合いつでも代替可能な状況にしておくことを目的として、臨床研究に対応可能な GMP 製造技術を整備する。

B. 研究方法

(1) AAV8 ベクターの臨床研究準備サポート：

CMO 候補における AAV8 ベクターの GMP 製造、及び製造したベクターを用いた前臨床安全性試験を実施するにあたり、ベクター開発の経験に基づきその準備と実施のサポートを行う。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

SIV ベクターについて、臨床研究の実施が可能なレベルにまで製造技術を向上させる。特に、血友病治療の被検薬として大量製造が可能なシステムを構築する。また繰り返して製造を行うことで、製造の安定性についても検証した。

(3) SIV ベクターの GMP 製造技術について CMO への技術移転：

SIV ベクターの製造技術の中で、接着培養・遠

心法を用いた製造技術について、実際の GMP 製造施設での製造検討を行う。

(4) SIV ベクターの浮遊培養法の予備検討：

大量の治験薬を高品位・均質に提供することを可能にするために、浮遊培養法での製造の予備検討を開始した。

（倫理面への配慮）

現在用いている実験材料・方法について倫理的な問題は付随しない。

C. 研究結果

(1) AAV8 ベクターの臨床研究準備サポート：

GMP 製造および前臨床安全性試験の実施計画において、CMO 及び CRO との協議における必要なサポートを行なった。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

SIV ベクターの製造について、接着培養法による培養工程（トランスフェクション）から下流工程（精製条件）まで全体の検証を行い、遠心法を用いた製造技術について、プロトコルを確立した。同システムで複数回の製造を実施し、安定して製造出来ることを確認した。

(3) SIV ベクターの GMP 製造技術について CMO への技術移転：

実際の臨床研究薬・治験薬は GMP 製造システムを有する CMO で実施することから、接着培養法での SIV ベクターの製造技術について、実際に GMP 製造施設での検討を行い CMO への技術移転を行った。

(4) SIV ベクターの浮遊培養法の予備検討：

浮遊培養法において、モデル遺伝子を用いてトランスフェクションによるベクター製造を検討し、製造が可能であることを確認した。今後、本臨床研究用候補製剤（被検薬）に応用するとともに、具体的に製造法・精製法・製剤化法の開発を行う。

D. 考察

AAV8 ベクターの GMP 製造および安全性試験の実施について、引き続きサポート出来る体制を維持しており、必要な場合に対応可能である。

SIV ベクターについては、血友病治療の被検薬として、接着培養系による大量製造システムを構築、CMO への技術移転も実施したことにより、臨床研究実施へのバックアップ体制は整ったものと考えられる。また、将来的な応用の拡大を目指し、製剤の安定化や、大量・安定的な製造が可能な浮遊培養法についての検討も重要である。

E. 結論

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、AAV8 ベクターの GMP 製造および安全性試験の実施につき、サポート出来る体制を引き続き構築・維持している。SIV ベクターについても、接着培養法による GMP 製造技術を確立するとともに、製剤の安定化へ向けた改善、および将来的な更なる大量・安定製造を目指し、浮遊培養法についても検討を開始した。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Griesenbach U, **Inoue M**, Meng C, Farley R, Chan M, Newman NK, Brum A, You J, Kerton A, Shoemark A, Boyd AC, Davies JC, Higgins TE, Gill DR, Hyde SC, Innes JA, Porteous DJ, **Hasegawa M**, Alton EW. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 186(9):846-56, 2012.
- 2) 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):1802-13, 2012

- 3) 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.* 24(3):283-94, 2013.
- 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(1):e40-4. 2014.

2 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

「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に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。

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

血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究

研究分担者 稲葉 浩 東京医科大学臨床検査医学分野

研究要旨:

血友病診療は、患者の特徴に基づいた個別化医療の時代を迎えている。個々の患者の特徴を把握するうえで遺伝子情報は重要であり、特に、責任遺伝子における病因変異情報は、重症度の把握やインヒビター発生予測に有効である。これまで我々は、日本人血友病 A 患者を対象に病因変異の解析を精力的に進め、血友病診療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。また副次的に、効果的な解析法やストラテジーを確立することについても検討してきた。しかし、血友病の病態と病因変異の多様性ゆえに、目的の達成にはより多くの症例の解析が必要であり、継続的な遺伝子解析を進めている。

今期は 44 例(重症 20 例、中等症 10 例、軽症 14 例)の新規血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子 (*F8*)解析を施行した。これまでの知見に合致し、検出された病因変異は多種多様であった。今期の解析において、これまで本邦では確認されていたなつたイントロン 1 に起因する逆位が検出された。また、軽症例の 1 例から、病因となっている可能性が強く示唆される同義的変異(c.120C>A; p.(L40=))を検出した。この変異は新たな血友病 A 発症メカニズムの発見に繋がる非常に興味深いものであった。

また、病因遺伝子変異とインヒビター発生リスクについても検討した。これまでの解析から諸外国で確認されている知見、すなわち、インヒビターの発生頻度はヌル変異を有する患者で高く、また、ヌル変異の中でも複数のエクソンを欠くような大規模欠失が最も高頻度であり、変異のタイプによって発生頻度に明らかな差があることが、本邦においても確認された。

さらに、*F8* を網羅的に解析することを目指し、次世代シーケンズの導入を試みた。我々の設計・施行した次世代シーケンズ法は良好に機能し、*F8* の詳細な解析に極めて有効であることが確認された。また、次世代シーケンズは、多検体を低コストで解析することも可能であることが示唆された。

血友病の理解を深め、診療に役立つ知見の獲得と集積には、継続的な遺伝子解析が必要である。

A. 研究目的

血友病は、遺伝子変異に基づく血液凝固第 VIII 因子または第 IX 因子の量的・質的異常によって引き起こされる。個別化医療の時代を向かえ、診療を効果的かつ安全に行うために、ま

た今後、さらに高度な診療を実現するには、個々の患者の遺伝情報、とりわけ病因遺伝子情報は必要不可欠である。

これまで我々は、日本人血友病患者の病因遺伝子変異の同定・解析を精力的に行ってきた

た。しかしながら病因遺伝子変異は多種多様であり、また同一のジェノタイプに由来する患者のフェノタイプも決して画一的ではなかった。

本研究ではより多くの症例の責任遺伝子解析、特に病因遺伝子変異解析から血友病診療に応用可能な知見の獲得を目指す。

B. 研究方法

1. 核酸抽出

ゲノム DNA と mRNA は末梢血白血球からそれぞれ、EZ1 DNA Blood 350 μ l キット(キアゲン)、QIAamp RNA Blood Mini Kit (キアゲン)を用いて抽出した。

2. *F8* 塩基配列解析

F8 の塩基配列解析には、エクソンとその近傍を解析する PCR-ダイレクトシーケンス法と、*F8* 全体を網羅的に解析する次世代シーケンス法を用いた。

PCR-ダイレクトシーケンス法は、まず、各エクソンとそのイントロンとの境界領域を 33 の領域に分割し PCR で増幅した。得られた PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (キアゲン)を用いて精製した。この精製 PCR 産物をテンプレートとしてサンガー法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は *F8*-001 transcript (ENST00000360256)の塩基配列と比較した。

次世代シーケンス法(NGS)は、まず、*F8* の全体を、互いにオーバーラップする 14 の領域に分割してロング PCR で増幅した。得られた PCR 産物は illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE ヘルスケア)で精製した。精製した PCR 産物は、それぞれが等モルとなるように混合し、Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ)を用い、プロトコールに従って、断片化、増幅、精製、ライブラリーノーマライゼーション処理を行い、シーケンス用のサンプルを調製した。MiSeq (イルミナ)と MiSeq reagent kit nano v2 (イルミナ)を用い、フ

ローセルへのハイブリダイゼーション、ブリッジ PCR によるクラスター形成を行い、Paired-End でシーケンスした。得られた配列は GRCh37/hg19 の *F8* にアライメントして解析した。カバレッジは生殖細胞変異を解析するには十分となるように調整した。

3. *F8* mRNA の解析

末梢血白血球から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出し、サンプルとした。mRNA の解析は El-Maarri らの報告した二段階 RT-PCR 法を用いて行った。すなわち、全長の *F8* mRNA をまず 4 分割して RT-PCR にて増幅後、各増幅産物をさらに 2 分割して通常の PCR にて増幅し、得られた産物を観察した。mRNA 量は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)で cDNA を合成した後、4 種類の TaqMan Gene Expression Assay (Hs00240767_m1; エクソン 1-2 間を増幅、Hs01109548_m1; エクソン 6-7 間を増幅、Hs01109541_m1; エクソン 14-15 間を増幅、Hs01109543_m1; エクソン 20-12 間を増幅、Hs00252034_m1; エクソン 25-26 間を増幅、Applied Biosystems)を用いて定量化を試みた。定量は白人男性の肝細胞由来の total RNA (Firstchoice human liver total RNA, Ambion) から同様の操作にて作製した cDNA を対照とし、デルタデルタ Ct 法を用いた半定量を行った。

4. MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)解析

F8 の MLPA 解析は、Salsa MLPA kit P178 (MRC-Holland)を用い、製品のプロトコールに従って行った。

5. 凝固学的解析

第 VIII 因子活性測定は自動凝固測定装置 ACL9000(Instrumentation Laboratory)と APTT 試薬(HemosIL™ APTT-SP; Instrumentation Laboratory)を用いた凝固 1 段階法で行った。

6. バイオインフォマティクス解析

NGS 結果の解析には、VariantStudio (イルミナ)、BreakDancer、CNVnator を用いた。アミノ酸置換が機能に与える影響(有害度)は PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)および SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) で解析した。スプライシング予測は GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)および Berkeley Drosophila Genome Project (<http://www.fruitfly.org/index.html>)で行った。第 VIII 因子の高次構造解析は PDB 2R7E を、分子可視化ソフト Chimera を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで施行した。

C. 研究結果

1. 血友病 A 症例の第 VIII 因子遺伝子解析

今期は新規血友病 A 患者 44 例(重症 20 例、中等症 10 例、軽症 14 例)の *F8* の解析を行った。検出された変異は 1 塩基置換が 26 例(ミスセンス 21 例、ナンセンス 2 例、スプライス部位 2 例、同義的変異 1 例)と最も多く、次いで X 染色体の逆位が 9 例(イントロン 22 起因 8 例、イントロン 1 起因 1 例)、欠失 6 例(小規模 5 例、大規模 1 例)、重複が 2 例であった。1 例では網羅的に *F8* を解析したにも関わらず病因となるような遺伝子変異が検出できなかった。検出された 26 例の点変異のうち 14 例(p.Leu40=、p.Phe78Leu、p.Asn109Ser、p.Asp186Phe、p.Trp401Cys、p.Arg490Ser、p.Met586Leu、p.Trp707Leu、p.Arg1783Gly、p.Trp2248Arg、

p.Trp2248*、p.Gly2304Glu、c.143+8C>T、c.6274-8A>G)は HADB (Haemophilia A Mutation Database)に登録のない変異であった。

L40=(c.120C>A)は第 VIII 因子活性を 20%程度有する軽症患者のエクソン 1 内から検出された。この患者の *F8* の他の部分には、NGS で網羅的な解析を行っても病因変異の候補となる異常は検出できなかったことから、L40=がこの患者の病因変異である可能性が強く示唆された。

稀有な重複変異が 2 例検出された。1 例はエクソン 2-6、もう 1 例はエクソン 7-18 が重複しているもので、どちらも HADB に登録されていないものであった。

大規模欠失を有していた症例ではインヒビターの発生が確認された。

2. 病因遺伝子変異とインヒビター発生に関する解析

我々がこれまでに行った 241 名の日本人血友病 A 患者の病因遺伝子変異解析結果をもとに、インヒビター発生との関連性について検討した。対象患者の重症度は、重症 135 例、中等症・軽症 106 例であり、各群におけるインヒビター発生はそれぞれ 18 例(13.3%)、5 例(4.7%)であった。重症例においては、1 エクソン以上の大規模欠失でのインヒビター発生頻度が 42.9%と最も高く、次いでナンセンス変異が 25%で、逆位では 14.5%であった。

逆位患者 2 名の異所性発現での解析では、非常に少量ではあるが検出可能な量の *F8* mRNA が確認された。

非重症症例でインヒビターを発生した 5 例の病因遺伝子変異は、点変異 4 例(p.Gly498Arg、p.Arg1800His、p.His1878Pro、c.1478+325A>G)と、1 塩基欠失が 1 例であった。

3. NGS の検討

23 名(新規症例 10 例、既解析症例 13 例)の血友病 A 患者の *F8* 解析に NGS を施行した。

我々の設計・施行した NGS では、10 例の点変異をほぼ理論的な変異体検出頻度で検出できた。欠失については概ね良好な検出状況であったが、変異体検出頻度は点変異に比べて低く、また、既解析の 1 例では検出できない可能性が示唆された。今回用いた解析ソフトでは、逆位や重複は検出できなかった。NGS による網羅的な解析を行っても、明らかに病因と判定できるような遺伝子異常を検出できない症例が 3 例存在した。また、この 3 例を含めた 15 例から、計 24 か所の意義が不明な塩基置換を検出した。

D. 考察

1 血友病 A 症例の *F8* 解析

血友病 A 症例の病因遺伝子変異は多種多様であることが再確認された。この結果は、今後の血友病診療の有効性・安全性の向上を目指したオーダーメイド化に向け、個々の患者で *F8* 解析を施行することの必要性を示唆するものである。

2002 年の欧米からの報告を契機に、諸外国から次々と報告されたものの、わが国では検出されていなかったイントロン 1 に起因する逆位が、今期 2 例検出された。諸外国ではイントロン 1 の逆位は、重症の 1-5% に検出されると報告されている。我々の解析では 2/135 (1.5%) となり、低頻度に検出される国と同様の割合で本邦にもこの逆位が存在することが確認された。

今期の解析において 2 例の大規模重複変異が確認された。2015 年 1 月末の時点で HADB に登録されている大規模な重複変異症例はわずかに 7 例のみである。重複は遺伝子内の相同配列による相同組換え (homologous recombination) によるものと考えられる。ヒトゲノム中には多くの反復配列が存在し、大規模な重複にはおそらくこれらの反復配列が関与している可能性が高いと考えられる。*F8* は巨大であり、イントロンのサイズも一般的な遺伝子を

大きく上回る。ヒトの遺伝子におけるイントロンのサイズの中央値は 1,334bp とされている。*F8* は 25 のイントロンを有し、このうち 19 イントロンは中央値より大きく、さらにこのうち 6 イントロン (イントロン 1、6、13、14、22、25) は 15kb を超えるものである。HADB に登録されている重複変異と今回同定された重複変異の計 9 種類のうち 8 種類は、両端または片端がこれら 6 つのイントロンであった。重複変異を考える際、これら 6 イントロンは重要なポイントとなる。MLPA 法はエクソンのコピー数を定量できる解析法であり、重複変異を検出するためには一般的に MLPA 法の施行が不可欠である。これまでの *F8* 解析の戦略として、まず Long-PCR で逆位と、PCR-ダイレクトシーケンスで微細な変異を確認し、変異が検出されなかった場合にのみ MLPA 法を施行してきた。しかし、患者のフェノタイプが、得られたジェノタイプとは異なる場合もあり、このような場合にはさらに重複変異も存在する可能性も考えられる。したがって MLPA 法は可能な限り多くの症例に施行した方がより正確に患者のジェノタイプを把握できる可能性もあるのではないだろうか。

2. 病因同義的変異の同定

今期の解析において、明らかに病因と考えられる変異を持たなかった非常に軽症の患者から 1 塩基置換 (c.120C>A; p.(L40=)) を検出した。このシトシンからアデニンへのトランスバージョンは、エクソン 1 にコードされている Leu40(CTC) の第 3 番目のシトシンで検出されたため、アミノ酸置換を伴わず、サイレントであろうことが予測された。しかしながら患者の *F8* の他の部位には、NGS を用いた網羅的な解析を行っても血友病を起こし得るような遺伝子変異が検出されず、さらに、この置換が変異やポリモルフィズムとしても報告されていなかったことは、この置換が血友病 A の病因となっていると考えざるを得ないものであった。この置換が第 VIII 因子の産生に影響する可能性として、まずスプライシングに異常をきたす可能性が