

- post-authorization safety surveillance study in 384 hemophilia A patients with antihemophilic factor (recombinant) plasma / albumin free method demonstrates safety and efficacy in Japan, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
64. K. Amano, K. Fukutake, H. Hanabusa, M. Taki, T. Matsushita, M. Shima, M. Sakai, H. Yamaguchi, T. Karumori: Evaluation of the safety and efficacy of recombinant factor IX (nonacog alfa) in Japanese patients with hemophilia B - The second interim analysis of 304 patients in post marketing surveillance study -, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
65. A. Yamashita, C. Nagae, T. Ashikaga, M. Akita, S. Yamazaki, S. Takayama, S. Tatsunami, M. Taki: Challenges to establishment of monitoring method for anticoagulant effect of anti factor Xa inhibitor, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
66. T. Ashikaga, M. Mori, A. Yamashita, C. Nagae, M. Taki: Prevalence of arthropathy in patients with mild and moderate hemophilia, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
67. M. Mori, C. Nagae, T. Ashikaga, A. Yamashita, D. Keino, R. Oyama, A. Kinoshita, M. Taki: Acute coronary syndrome in a patient with haemophilia A, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
68. Tatsunami S, Shirahata A, Mimaya J, Kuwabara R, Nishina Y, Hanai J, Ohira K, Taki M: Long-term observation of hemophiliacs with HIV infection in Japan: Follow-up of survival and status of HCV infection, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
69. Tatsunami S, Shirahata A, Mimaya J, Kuwabara R, Nishina Y, Hanai J, Ohira K, Taki M: Prevalence and status of HCV infection among Japanese hemophiliacs, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
70. Hiroaki Mizukami, Jun Mimuro, Tsukasa Ohmori, Midori Shima, Tadashi Matsushita, Masashi Taki, Shinji Muto, Satoshi Higasa, Michio Sakai, Ryosuke Uchibori, Tomonori Tsukahara, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Seiji Madoiwa, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa : Age-related eligibility of hemophilia gene therapy using AAV vectors. 76<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31
71. Shinobu Tatsunami, Jyunichi Mimaya, Akira Shirahata, Masashi Taki: Prevalence of chronic kidney disease and osteoporosis among Japanese hemophiliacs. 76<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.11.1
72. Hideji Hanabusa, Midori Shima, Keiji Nogami, Tadashi Matsushita, Katsuyuki Fukutake, Masashi Taki, Michio Sakai, Baisong Mei, Yingwen Dong, Srividya Neelakantan, Wildon Farwell, Glenn F Pierce: Recombinant factor VIII Fc fusion protein in Japanese subjects from the A-LONG study with severe hemophilia A,

76<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.11.2

73. Midori Shima, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Tetsuji Sato, Katsuyuki Fukutake, Koichiro Yoneyama, Naoki Fukazawa, Takehiko Kawanishi, Keiji Nogami: Safety and prophylactic efficacy profiles of ACE910, a humanized bispecific antibody mimicking the FVIII cofactor function, in Japanese patients with hemophilia A: First-in-patient phase 1 study. ASH, 2014.12.8

H. 知的所有権の出願・取得状況

本研究とは関係がない。

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：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

研究分担者：柿沼 章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団）

研究要旨

本研究では、当事者参加型実証研究として、薬害 HIV 被害者・家族に対し、血友病とともに生きる生活の質の向上、心理社会的な問題の解決、薬害被害の歴史を伝える等の観点から、機縁法による面接調査および自記式質問紙による支援ニーズ調査等を実施、あわせて困難事例については支援を実施し、支援ニーズの抽出を行った。分析の結果、薬害 HIV 感染被害者・家族等の人生上の発達と社会生活の質の向上に関連した潜在的な支援要因「支援準備性」を発見し、克服課題の鍵となることが示唆された。克服すべき主要な課題は、1) ライフステージにおいて、当事者性の獲得や意思決定の出発点となる「準備期」を含む長期 QOL 対策 2) 支援の欠如、特に長期に渡り「薬害 HIV 被害克服」ならびに「血友病根治」への困難が継続していること、3) 薬害 HIV 被害と関連した負の経験は、血友病の「遺伝」や「保因」といった社会的課題の形で次世代に継承する可能性、であった。これらを教訓に、集約的な支援機能を持つ「血友病センターの設置」が必要である。あわせて、中立的な第三者支援機関による、疫学・データベース・相談録などの分析実施、最新の医学的な知見を患者・家族に情報提供するなどの支援が望まれる。

A. 研究目的

薬害 HIV 感染被害者・家族等の現状と困難経験については、血友病・HIV と関連した病気の受け止めやその後の意思決定・将来計画について顕著な困難を継続していることが明確化しつつあり、準備性支援の欠如が課題となっている。血友病家系の女性に対する支援は、慢性疾患・遺伝子性疾患特有の家族問題等に対応できる遺伝相談体制、自己決定に関する情報共有に課題があり、世界的にもアウトリーチの重要課題である（MARK W. SKINNER, Haemophilia,2012）。

そこで、本研究は、血友病家系女性、特に血友病保因者の心理社会的影響や、保因者自身の健康状態についての十分な調査が我が国では十分に行われていない現状を踏まえ、まず、保因者女性に対してパイロットスタディとしてインタビュー調査を実施する。一連の健康史を把握したうえで、課題を抽出し、遺伝相談に関わる支援プロセスについて分析と検討を行う。つぎに、本研究では、保因者における準備性の課題を焦点化し、分析と検討を行う。準備性とは、保因者が血友病・遺伝に関する個別の課題に対し、意思決定する前段階

(無関心期・関心期・準備期) のことである。

さらに本研究では、保因者の支援特性を多角的に明らかにし、今後の課題克服・支援に必要な情報共有・相談体制の構築のために必要となる科学的・論理的・実践的な枠組みを提供したい。

## B. 研究方法

### 1) 調査準備～分析計画の策定 (平成 24 年度)

遺伝・血友病はケースセンシティブなテーマであり、調査目的、意義、調査内容の説明に慎重な配慮を要する。また分析にあたり、対象者の準備性段階に応じて情報提供や支援のあり方、社会関係性の違い、自らの保因情報の獲得・共有・開示状況、ならびに生活構造が異なるという仮説を立て、複数の研究者、医療従事者、当事者らにより分析計画を策定した。

### 2) 聞き取り調査・自記式質問紙調査 (平成 25 年度)

機縁法により質問紙調査 (n=30) を行い、個人情報に配慮し、非連結により分析を行った。

質問項目は、遺伝および血友病の保因に関わる生活史、および検査・告知に関わる出来事、情報の共有・開示範囲、開示意图等について尋ねた。

あわせて、生活史を中心に支援脆弱性についての血友病保因者 (5 名) に対する半構造化インタビュー調査を行った。

### 3) 分析 (平成 26 年度)

質問紙調査については、単純集計を行い、

基本属性に基づく一元配置分散分析を行った。その後の統計的推論では、準備性要因の探索のため、多変量解析を用いたベイズ推定ならびにモデル化を行った。

準備性支援においては、ケース対応を基本にし、準備性評価を行い、支援目標の設定を行った。準備性評価については、予防行動採用理論 (Precaution Adoption Process Model : PAPM(Glanz, et al., 2008))を用いた。ステージ 1～ステージ 7 (問題の無認識～意思決定の維持が) が定義されており、準備性段階にはステージ 1～4 が対応している。その後、複数の研究者、遺伝カウンセラー、医療従事者、当事者によって、対象者の支援特性について支援計画の検討を行った。

聞き取り調査については、新たにケースとして追加された 5 件を含む、インタビューデータ合計 34 件を対象に、特に遺伝に関する語りを中心に、質的研究の手法を用いて内容を分析する。逐語トランスクリプトをコーディング⇒カテゴリーを作成、妥当性を高めるために、共同研究者間で検討し、課題ならびに支援プロセスの類型化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」等を遵守する形で、社会福祉法人はばたき福祉事業団倫理審査委員会に諮り、平成 21 年 4 月 12 日承認を得た上で、研究を実施した (承認番号 1)。

また質問紙調査については、「生物医学的研究に関する倫理指針」等を遵守する形で、お茶の水女子大学生物医学的研究の倫理特別委員会に諮り、平成 24 年 12 月 13 日承認を得た上で、研究を実施した。(通知

番号第 24-20 号)

### C. 研究結果

#### 1) 調査準備～分析計画の策定（平成 24 年度）について

本研究では、分析計画策定段階で、参加型活動研究 (participatory action research) 型の研究デザインを採用した点が特徴である。理由として、対象者らは、心理的侵襲性、スティグマや PTSD 等に関するフォロー体制が必要であったことがある。あわせて、医療的な調査対応として当面は薬害 HIV 感染被害者・家族に限ることの条件で医療機関側からの支援協力が得られたこと、丁寧に調査内容、対応について事前説明を丁寧に行う、などの配慮を行った。あわせて、質問紙調査（調査対象：血友病保因者、30 名、機縁法）を計画した。

#### 2) 聞き取り調査・自記式質問紙調査、支援実施（平成 25 年度）

自記式質問紙票の開発、配票を完了した。あわせて、困難事例を中心にケースアプローチ (5 件) による準備性評価と予防行動採用ステージ分類を行い、支援目標を設定した。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。

#### 3) 分析（平成 26 年度）

血友病家系女性へのアンケート調査の分

析の結果、対象者への支援がほとんど行き届いていない現状があった。支援の未経験率は、心理カウンセリング (90.0%)、電話相談 (86.7%)、ホームページ等 (80.0%)、遺伝カウンセリング (76.7%)、ピアカウンセリング (63.3%) 等であった。また、これらの支援経験の状況を元に、事後的な支援経験の程度からベイズ推定を行ったところ、潜在的な支援要因として、「支援準備性」が新たに発見された。また、 $GFI = 0.930$ 、 $CFI = 1.000$ 、 $RMSEA < 0.001$  と、適合度の高い説明モデルが得られた。

あわせて、聞き取り調査データの質的分析の結果、血友病家系女性の遺伝をめぐる状況と問題として、「母親たちの保因者に関する認識を形成する経験」が「保因者に関する認識と受け止め」に影響を与え、その結果、以下 3 点の問題へと繋がっていた。

1) 保因者に関する認識が与える影響（血友病児を出産する不安、保因者可能性のある娘への対応、夫婦関係の変化）、2) 遺伝子医療の意味と役割（出生前診断、遺伝子診断、遺伝カウンセリング）、3) 血友病家系女性にとって必要な支援（相談窓口、適切な情報提供）

### D. 考察

薬害 HIV 感染被害者・家族等の現状と困難経験として、支援準備性の欠如ならびに、薬害 HIV 被害による社会的課題が明確化した。特に、「血友病の根治」が可能ではないこと、「薬害 HIV 被害克服」が十分でないことを背景に以下が示唆された。1) 事後的なライフイベントへの対処スタイルは、医師＝患者パターンリズム関係を強

化し、さらに家族関係の疎外を招いた。2) 薬害 HIV 被害とその後の支援の欠如が特に被害者の母親たちの血友病の保因に関する認識形成の機会喪失を招いた。3) 薬害被害経験への負の対処スタイルは、娘や孫へ次世代へと「負の遺産 (negative legacy)」として継承されていた。一方で、準備性支援、人生設計といったライフイベントに対する事前的な対処について、専門的な支援状況、ピアへの支援状況、支援環境ともに十分ではなかった。本研究においては、この困難類型について、予防行動採用理論を拡張する形で、準備性のステージ 0 にかかわる課題と位置づけ、支援を提案した。また、具体的な取り組みとして、血友病家系女性・保因者のための情報サイト」開設を行い、準備性に関する支援を行った。URL: <http://hemophilia-line.info/>

#### E. 結論

本研究により、薬害 HIV 感染被害者・家族等の現状からみた、血友病に係わる課題克服と支援について、新たな知見として、潜在的な支援要因「支援準備性」を発見した。人生上の発達と社会生活の質の向上に関連した克服課題であり、当事者性の獲得や意思決定の出発点となる重要な支援である。

また、薬害 HIV 被害者・家族は、長期に渡り「薬害 HIV 被害克服」ならびに「血友病根治」の課題が重なる困難が継続しており、さらにその負の経験が「遺伝」や「保因」の社会的課題の形で、次世代に継承する困難の歴史にいる。これらの解決のために、治療開発・支援開発含む集約的な支援機能を持つ血友病センターの設置、中立的

な第三者支援機関による最新の情報提供や相談機会の提供、具体的な社会的課題克服のための支援開発と実施は可能であり、これらは将来に対する継続的な支援方法として有用性が期待できる。

これらは、本研究により新たに得られた知見であり、薬害エイズ事件の教訓から得られた貴重な薬害 HIV 被害者・家族等の課題克服と支援方策の今後の方向性を示すものであると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1) 柿沼章子、久地井寿哉、岩野友里、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 6 報) ～薬害 HIV 感染被害者の長期療養と今後の支援の方向性と提言、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014.12

2) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 5 報) ～薬害 HIV 感染被害者の長期間生存データに基づく生存予測分析、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014.12

3) 岩野友里、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 4 報) ～生活困難状況ならびに生活機能との関連、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014.12

4) 大金美和、塩田ひとみ、小山美紀、柴山志穂美、久地井寿哉、岩野友里、柿沼章子、大平勝美、池田和子、瀧永博之、岡慎一、HIV 感染血友病患者の健康関連 QOL の実態調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014.12

5) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美. 乳がんサバイバーにおける生活機能の原状回復に関するパイロットケーススタディ、第 73 回日本公衆衛生学会総会、2014.11

6) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美. 血友病保因者の遺伝に関する予防行動採用に関わる準備性評価の試み～薬害 HIV 感染被害者・家族を事例としたパイロット調査より第 23 回日本健康教育学会大会、2014. 7

7) 板垣貴志、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美、岩野友里、根岸麻歩由. 肝炎患者の就労と病気の治療・療養の両立に関する相談事例の類型化、第 23 回日本健康教育学会大会、2014. 7

8) 白坂るみ、久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美. HIV 感染者の北海道福祉施設への受け入れ促進を目的とした地域実践の試み、第 23 回日本健康教育学会大会、2014. 7

9) 柿沼章子、榎本哲、久地井寿哉、大平勝美. 乳がんサバイバーの生活機能実態に関する ICF を活用した患者参加型研究 (第一報) : 基本設計と意義～生活機能の

原状回復に関連するライフ要因探索～、第 55 回日本社会医学会総会、2014.7

10) 板垣貴志、久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美. 血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討 (第三報) —テキストマイニングによるインタビューデータ分析の試み—. 第 40 回日本保健医療社会学会大会、2014.5

11) 岩野友里、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美. 血液凝固因子製剤による HIV 感染被害者の生活困難度の推定 (第三報) ICF サブセット (HIV/HCV : 個別疾患群項目) を用いた生活困難度の検討、第 40 回日本保健医療社会学会大会、2014.5

12) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美. 血液凝固因子製剤による HIV 感染被害者の生活困難度の推定 (第二報) J-SEC (新社会経済的階層分類) を用いた社会経済的地位および規定要因の検討、第 40 回日本保健医療社会学会大会、2014.5

13) 柿沼章子、久地井寿哉、岩野友里、大平勝美. 血液凝固因子製剤による HIV 感染被害者の生活困難度の推定 (第一報) ICF コアセット (7 項目版) を用いた年齢階級別の分析、第 40 回日本保健医療社会学会大会、2014.5

14) Miwa Ogane, Toshiya Kuchii, Fumihide Kanaya, shiomi Shibayama, Akiko Kakinuma, Katsumi Ohira, Junko Tanaka, Megumi Shimada,

Kazuko Ikeda, Shinichi Oka: Barrier Assessment in Establishing Comprehensive Client-Level Coordination for Treatment and Medical Welfare of People Living with Hemophilia and HIV/AIDS in Japan.WFH, 2014.5.

15) Seki Yukiko , Akiko Kakinuma, Toshiya Kuchii, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Strategies by Japanese Mothers of Children with Hemophilia Regarding Hemophilia Disclosure at School, WFH, 2014.5.

16) Kayo Inoue , Hironao Numabe, Akiko Kakinuma, Toshiya Kuchii, Yukiko Seki, Katsumi Ohira: The bleeding symptom of women in the Japanese hemophilia families ,WFH, 2014.5.

17) Toshiya Kuchii, Akiko Kakinuma, Kayo Inoue, Yukiko Seki, Katsumi Ohira:Life events, support taking experiences and health readiness: psychosocial difficulties among hemophilic carriers in Japan (A pilot).WFH, 2014.5.

18) Akiko Kakinuma, Toshiyuki Kuchii, Kayo Inoue, Yukiko Seki, Katsumi Ohira :How we address support needs and hereditary issues in Japanese hemophilic carriers? Narrative case study based on

semi-structured interviews (A pilot).WFH, 2014.5.

19) 柿沼章子、久地井寿哉、岩野友里、藤谷順子、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 1 報) ICF (国際生活機能分類) に基づく生活機能尺度 の開発 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11

20) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、藤谷順子、大平勝美 HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 2 報) 生活機能の社会経済的格差の分析、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11

21) 岩野友里、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美、HIV/HCV 重複感染患者の支援特性 (第 3 報) 自己観察記録に基づく期間健康特性の分析 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013.11

22) 柿沼章子、久地井寿哉、小俣智子、西牧謙吾、大平勝美、小児がん患者等の多職種協働による病気を持つ子どもの自立を実現するための動的教育支援システム分析、第 60 回日本学校保健学会、2013.11

23) 久地井 寿哉、柿沼章子、岩野友里、大平勝美、「エイズ患者/HIV 感染者」に対する長期療養時代の施設受け入れ可能性～北海道介護・福祉施設調査、第 72 回日本公衆衛生学会、2013.10

24) Toshiya Kuchii, Akiko Kakinuma, Tomosato Iwano, Katsumi Ohira, A



nationwide survey of SRH and Socio-economic positioning for HIV/AIDS patients in Japan. ;The International Conference on Social Stratification and Health 2013:Interdisciplinary Research and Action for Equity, 2013.8.

25) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズの検討（第一報）—薬害 HIV 感染被害者・家族を事例としたパイロット調査について—、第 54 回日本社会医学会総会、2013.7

26) 久地井寿哉、柿沼章子、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズの検討（第二報）—薬害 HIV 感染被害者・家族を事例とした支援モデルの検討—、第 54 回日本社会医学会総会、2013.7

27) 井上佳世、柿沼章子、久地井寿哉、大平勝美、血友病家系女性の心理社会的課題と健康状況の調査研究報告 血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズ検討(第三報) , , 第 54 回日本社会医学会総会、2013.7

28) 柿沼章子、久地井寿哉、小俣智子、西牧謙吾、大平勝美、小児がん患者等の多職種協働による病気を持つ子どもの自立を実現するための教育支援システム分析、第 22 回日本健康教育学会学術大会、2013.6

29) 久地井寿哉、柿沼章子、岩野友里、石射いずみ、大平勝美、日本の自発的無償献血 (VNRBD) に関する健康教育上の課題、第 22 回日本健康教育学会学術大会、2013.6

30) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討（第一報）薬害 HIV 感染被害者・家族を事例としたパイロットスタディ、第 39 回日本保健医療社会学会、2013.5

31) 久地井寿哉、柿沼章子、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討（第二報）—薬害 HIV 感染被害者・家族における支援特性・支援環境構築の検討—、第 39 回日本保健医療社会学会、2013.5

32) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、関由紀子、北村弥生、玉井真理子、井上洋士、大平勝美. 薬害 HIV 感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究(第三報)—生活の再構築支援と支援展開 健康の多様性 (Health Diversity) の観点から—第 38 回日本保健医療社会学会大会. 2012.5

33) 久地井寿哉、柿沼章子、井上洋士、井上佳世、関由紀子、北村弥生、玉井真理子、大平勝美. 薬害 HIV 感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究(第四報)—生活再構築のための、自己支援・相互支援・専門的支援の連携における課題—、第 38 回日本保健医療社会学会大会. 2012.5

34)柿沼章子 ,久地井寿哉, 井上佳世, 玉井真理子, 大平勝美, 薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築(第一報)～自立と意思決定に関する課題: 第 53 回日本社会医学会特別号  
(0910-9919)2012page111-112(2012.07)

35)久地井寿哉, 柿沼章子, 井上佳世, 玉井真理子, 大平勝美: 薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築(第二報)～情報支援とF A C Tアプローチ: 第 53 回日本社会医学会特別号  
(0910-9919)2012page113-114(2012.07)

36)井上佳世, 玉井真理子, 久地井寿哉, 柿沼章子 ,大平勝美薬害H I V感染被害者・家族の支援環境構築(第三報)～遺伝性疾患であることの課題と支援: : 第 53 回日本社会医学会特別号  
(0910-9919)2012page115-116(2012.07)

37) Akiko Kakinuma , Toshiya Kuchii, Yukiko Seki, Yoji Inoue, Yayoi Kitamura, Yayoi Kitamura, Mariko Tamai, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Restructuring and improving QOL in Japanese HIV victims with hemophilia and their families: How do we rebuild our life with effective support?: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE

38)Yukiko Seki, Akiko Kakinuma ,

Mariko Tamai, Yayoi Kitamura, Yoji Inoue, Toshiya Kuchii, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Difficulties faced by haemophilic students in Japan : Yukiko Seki (Saitama University): WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE

39)Yayoi Kitamura, Akiko Kakinuma , Toshiya Kuchii, Yukiko Seki, Yoji Inoue, Yayoi Kitamura, Mariko Tamai, Kayo Inoue, Katsumi Ohira: Feelings, Experiences on the Sibling Relationship and the Perception of Heredity on Hemophilia by Patients and Siblings. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE

40) Eiichi Mizukoshi , Akiko Kakinuma, Ysuhiko Sugwara, Shinichi Oka, Katsumi Ohira A 10-year follow up of an HIV/HCV co-infected hemophilia A after living donor liver transplantation: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE

41)久地井寿哉、柿沼章子、関由紀子、岩野友里、大平勝美. 職域におけるH I V/ A I D S と就労に関する意識調査. 第 21 回日本健康教育学会学術大会. 2012.7

11)柿沼章子, 久地井寿哉, 関由紀子, 岩野友里, 大平勝美. 慢性疾患患者の自立・将来計画支援～, 血友病・遺伝に関する情報支援プログラムの開発. 第 21 回日本健康教育学会学術大会 2012.7

42)久地井 寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 大平勝美, 近年における薬害 HIV 感染被害者の累積死亡率数および粗死亡率の地域特性に関する分析, 第 71 回日本公衆衛生学.2012.10

43)柿沼章子, 岩野友里, 久地井寿哉, 大平勝美. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究(第一報) 患者背景. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11

44)岩野友里, 柿沼章子, 久地井寿哉, 大平勝美. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究(第二報) 困難経験の類型化. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11

45)久地井寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 田中純子, 大津留晶. HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究(第三報) ADL の社会心理特性評価. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

謝辞

本研究は以下の協力研究者の尽力によりなされたことに深く御礼申し上げます。

井上 佳世(お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科)、久地井 寿哉(社会福祉法人はばたき福祉事業団)、関 由起子(埼玉大学教育学部学校保健講座)、望月美栄子(株式会社アクセライト)、板垣貴志(株式会社アクセライト)、

血友病に対する遺伝子治療：臨床研究の課題と対策

研究分担者 村松慎一

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

研究要旨

アデノ随伴ウイルス(AAV)を応用した血友病に対する遺伝子治療を目標として、8型 AAV (AAV8) の第一種使用における生物学的多様性評価を行った。治療用遺伝子の発現高率を高めるため AAV の外被蛋白の一部のチロシンをフェニルアラニンに置換した AAV ベクターを作製した。日本人に多い遺伝子変異に対してゲノム編集技術を応用した遺伝子治療の基礎研究を行った。

A. 研究目的

1. 血友病に対する遺伝子治療の臨床応用を目標として、アデノ随伴ウイルス 8 型 (AAV8) 由来のベクターの生物学的多様性評価を行う。また、臨床応用における課題を抽出し、その対応を考察する。
2. 治療用遺伝子の発現高率を高めるため、改変型 AAV ベクターを開発する。
3. 血友病 A の遺伝子変異を *in vivo* で修正する新たな遺伝子治療を目標として、ゲノム編集を AAV ベクターに応用した基盤技術を開発する。

B. 研究方法

1. 2007 年に自治医科大学で実施した芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 遺伝子を搭載した AAV2 ベクターを脳内に注入するパーキンソン病に対する遺伝子治療と、台湾で実施した AADC 欠損症に対する遺伝子治療を参考とした。血友病 B に対する遺伝子治療として第 IX 因子を肝臓特異的プロモーターで発現する AAV8 ベクターの第 1 種使用における生物学的多様性への影響を評価した。
2. AAV9 を使用して、外被蛋白 VP の cDNA における 1,337 位と 2,192 位のチミジンをアデニンに置換することによりアミノ酸 446 位および 731 位のチロシンをフェニルアラニンに変換した。神経細胞特異的プロモーターにより緑色蛍光蛋白 GFP を発現するベクターを作製し、C57BL/6 マウスの血管内に投与した。4 週間後に組織を回収し GFP の発現を解析した。

3. CMV promoter により CAS9 を発現するカセットと、U6 promoter により GFP に対する sgRNA を発現するカセット各々構築し、それぞれ AAV3 の ITR 配列間に挿入した。HEK293 細胞に transfection して GFP の発現抑制効果を定量解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験と動物実験は施設内委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 野生型 AAV8 はほ乳動物に感染し植物及び微生物に感染するとの報告はない。ベクターは増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びアデノウイルス等との三重感染がないかぎり、環境中で増殖することはない。極めて微量のベクター由来の replication-competent AAV (以下 RCA) の環境中への放出も完全には否定できないが、AAV 粒子へパッケージングできる DNA のサイズに上限があるため、RCA は野生型 AAV8 と同じになるか、あるいは短い外来遺伝子を含んでも野生型 AAV8 に極めて近い構造になると考えられる。RCA の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は野生型 AAV8 と同等であり、ヒト及び他のほ乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。今回の臨床研究では生物多様性に影響はないと判断した。
2. 外被蛋白の 2 か所のチロシンをフェニルアラニンに変換した変異型 AAV9 ベクターを投与した

マウスの脳と脊髄では、広範な領域の神経細胞で GFP の発現が認められた。

ゲノム編集技術の応用

3. CAS9 あるいは GFP に対する sgRNA を搭載した AAV のトランスフェクションにより、GFP の発現が抑制された。

#### D. 考察

1. アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科デペンドウイルス属に分類されている。霊長類では 100 以上の型に分けられており、今回の血友病に対する遺伝子治療では 8 型 (AAV8) を宿主として作製する。AAV8 は自然界に広く分布しており、哺乳類に感染する。ヒトへの病原性は知られていない。米国で実施された血友病 B に対してヒト凝固第 IX 因子を搭載する組換え AAV2 ベクターを骨格筋内に投与する遺伝子治療では、尿中への遺伝子組換えウイルスの排出は注入後 2 日目以降では検出されなかった。一方、ヒト凝固第 IX 因子を搭載する遺伝子組換え AAV2 ベクターを肝動脈に注入した臨床試験では、術後 2 日目以降にも血清中にベクターゲノムが検出され、そのうち 1 名では 20 週まで末梢血単核細胞中で検出された。しかし、今回の臨床研究における第一種使用等の方法によるかぎり、自然環境中でベクター由来のゲノムが生物多様性に影響を生ずるおそれはないと考えられる。

2. 現在、治療用遺伝子の発現レベルを上げるために二本鎖 AAV self-complementary AAV (scAAV) ベクターが応用されることが多い。しかし、scAAV ベクターは搭載可能な cDNA サイズが通常の半分に制限されている。今回、使用した外被蛋白のチロシン→フェニルアラニン変異型 AAV ベクターは標的細胞内で外被蛋白の分解を抑制し導入遺伝子の核内移行を増加させることにより発現高率を上昇させる。そのため、比較的弱い特異的プロモーターが利用できる。

3. 血友病 A の第 VIII 因子遺伝子変異で日本人に多い inversion に対して、ゲノム編集技術を応用した遺伝子治療が期待されている。最近、3.5kb 以下の

CAS9 も開発され、AAV ベクターに搭載して in vivo の遺伝子編集も可能になりつつある。

#### E. 結論

血友病の遺伝子治療において AAV8 ベクターは生物学的多様性に影響しないと考えられる。改変型 AAV ベクターにより細胞特異的プロモーターの応用が可能になる。今後、バキュロウイルス法の製造工程と品質基準を確立し、薬事承認を目標とした治験の早期実現が望まれる。また、ゲノム編集技術と AAV ベクターを組み合わせた遺伝子治療も期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miyazaki M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S and Sobue G: Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*, 18(7):1136-1141, 2012.
2. Hwu WL, Muramatsu S, Tseng SH, Tzen KY, Lee NC, Chien YH, Snyder RO, Brnne BJ, Tai CH and Wu RM: Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med*, 4:134-161, 2012.
3. Jin D, Muramatsu S, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S and Higashida H: Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. *Neurochem Int*, 61(6):907-912, 2012.
4. Nakamura K, Ota M, Kawata A, Isozaki E, Muramatsu S and Matsubara S: Careful clinical observation is essential for diagnosis of Huntington disease. *Arq Neuropsychiatr*, 70(8):646, 2012.
5. Popiel H A, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S, Toda T, Wada K and Nagai Y: Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS ONE*, 7(11):e51069, 2012.
6. Muramatsu S: Gene therapy for continuous dopamine production in Parkinson's disease. *Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects* (editors: Endo Kudo and Yuriko Fujii), Nova Publishers, 283-286, 2012.
7. Muramatsu S, Asari S: Assessment of dopaminergic function in Parkinson's disease by SPECT/PET.

Horizons in Neuroscience Research Volume 7 (editors: Andres Costa and Eugenio Villalba), Nova Publishers, 219-224, 2012.

8. Muramatsu S: Headache. Textbook of Traditional Japanese Medicine (editors: Arai M, Hioki C, Kosoto H, Yoshikawa M, Muramatsu S, Katai S, Namiki T, Hanawa T and Togo T), Health and Labour Sciences Research Grant, 104-107, 2012.
  9. 村松慎一: 神経難病の治療のトピックス 遺伝子治療・細胞治療, 神経難病のリハビリテーション-症例を通して学ぶ Journal of Clinical Rehabilitation 別冊, 江藤文夫, 中馬孝容, 葛原茂樹 監修, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2012, pp15-20.
  10. 村松慎一: パーキンソン病のAADC遺伝子治療, Parkinson's Disease 2012, 山本光利 編, アルタ出版, 東京, 2012, pp115-120.
  11. Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu S, Ozawa K, Yamada K and Nabeshima T: Intrastratial gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. Int JNP, 16:1559-1567, 2013.
  12. Lee N-C, Shieh Y-D, Chien Y-H, Tzen K-Y, Yu I-S, Chen P-W, Hu M-H, Hu M-k, Muramatsu S, Ichinose H and Hwu W-L: Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-aminoacid decarboxylase deficiency. Neurobiol Dis, 52:177-190, 2013.
  13. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S and Saido TC: Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. Sci Rep, 3:1472, 2013.
  14. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K and Muramatsu S: Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. Bio Med Res Int, 2013;974819, 2013.
  15. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S and Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. EMBO Mol Med, 5:1-10, 2013.
  16. Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S and Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. Adv Pharmacol, 68:273-84, 2013.
  17. Kondo Y, Okuno T, Asari S and Muramatsu S: Cell therapy for Parkinson's disease. Clinical implications of fetal transplantation in Medicine (editors: Stubblefield P and Bhattacharya N), Springer-Verlag, London, 193-203, 2013.
  18. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療・細胞移植, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 パーキンソン病と運動異常, 辻省次 壮編集, 高橋良輔 専門編集, 中山書店, 東京, 2013, pp384-391.
  19. Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. Int J Neuropsychopharmacol, 17:1283-1294, 2014.
  20. Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, Muramatsu SI and Okazawa H: HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. EMBO Mol Med, 7(1):78-101, 2014.
  21. Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, and Nitta A: Knockdown of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice. Int JNP, in press.
  22. Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SGM, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker EE, Richi T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM and Okazawa H: In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. Mol Psychiatry, in press.
- ## 2. 学会発表
1. Muramatsu S: AADC Gene therapy for Parkinson's disease: results of 3-5 years of follow up. The 15th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, May 16, 2012, Philadelphia. (program p32)
  2. 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease. 第53回日本神経学会総会シンポジウム, 2012年5月24日, 東京.
  3. 浅利さやか, 村松慎一, 藤本健一, 齋藤順一, 佐藤俊彦, 中野今治: パーキンソン病のすくみ足と青斑核のFMT-PE T解析. 第53回日本神経学会学術大会, 2012年5月25日, 東京. (プログラム p134)
  4. 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第11回日本再生医療学会総会 パネルディスカッション, 2012年6月12日, 横浜. (再生医療 Vol.11 Supp1, p137, 2012)
  5. Sumi K, Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Muramatsu S, Hibi Y, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: The differences of the action of shati between the nucleus accumbens and dorsal striatum on the methamphetamine-induced addictive behaviors in mice. The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Oct 2, 2012, Kobe. (Journal of Neurochemistry, Vol .123 (supp 1) p79, 2012)
  6. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Progress and current challenges. 2012 Annual meeting of Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease, Oct 9, 2012, Seoul. (program p18)
  7. 浅利さやか, 中村優子, 川上忠孝, 池口邦彦, 佐藤

- 俊彦, 村松慎一, 福嶋敬宣, 藤本健一, 中野今治: パーキンソン病の遺伝子治療における AADC 遺伝子長期発現. Movement Disorder Society Japan 第 6 回学術集会, 2012 年 10 月 13 日, 京都. (抄録集 p84)
8. 村松慎一: AADC 欠損症の遺伝子治療. 日本人類遺伝学会 第 57 回大会, 2012 年 10 月 26 日, 東京. (プログラム・抄録集 p84)
  9. 村松慎一: AAV ベクターによる神経疾患の遺伝子治療. 日本薬学界北陸支部 特別講演会, 2012 年 11 月 12 日, 富山.
  10. 村松慎一: Parkinson 病遺伝子治療の長期効果. Long-term outcomes of gene therapy for Parkinson disease. 第 52 回日本定位・機能神経外科学会, 2013 年 1 月 19 日, 岡山. (プログラム p42)
  11. Muramatsu S: New frontiers in gene therapy of Parkinson Disease. Nuove frontiere nella terapia del Parkinson, Feb 22, 2013, Italy.
  12. Muramatsu S: Gene therapy clinical trial update for AADC. Cell and Gene Therapies for Inherited Metabolic Disease, April 17, 2013, London.
  13. 村松慎一: パーキンソン病の AADC 遺伝子治療: 長期効果遺伝子発現の検証. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京. (プログラム p137)
  14. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  15. Miyamoto Y, Iegaki N, Sumi K, Ishikawa Y, Furuta T, Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Nitta A: Overexpression of shati/nat8l in the dorsal striatum affects emotional behaviors via dysfunction of serotonergic neuronal system in mice. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  16. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of neurons in the primate brain using intrathecal injection of AAV vectors. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  17. Iwashita Y, Tokuoka H, Munezane H, Muramatsu S and Ichinose H: Distinct regulation mechanism of the dopamine content in the striatum from that in the midbrain. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  18. Nitta A, Ishikawa Y, Iegaki Y, Sumi K, Hurukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K and Miyamoto Y: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in mice nucleus accumbens and dorsal striatum. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 22, 2013, Kyoto.
  19. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread neuronal transduction in the primate brain via intrathecal administration of adeno-associated virus vectors. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 4, 2013, Okayama. (abstract p125)
  20. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Muramatsu S and Saido TC: Global and effective gene delivery of neprilysin to the brain via intravascular administration of AAV vector in alzheimer's disease mice. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 5, 2013, Okayama. (abstract p179)
  21. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治: 多系統萎縮症(NSA-P)の FMT-PET 解析. Movement Disorder Society Japan 第 7 回学術集会, 2013 年 10 月 11 日, 東京. (抄録集 p59)
  22. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Advances and challenges. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, June 21, 2013, Kyoto.
  23. 村松慎一: Parkinson 病に対する遺伝子治療の現状と課題. 第 53 回日本定位・機能神経外科学会シンポジウム, 2014 年 2 月 7 日, 大阪. (プログラム p63)
  24. Iida A, Takino N, Miyauchi H, Itoh M, Shibata H, Ono F and Muramatsu S: Widespread transduction of brain and spinal neurons following intra-thecal injection of AAV9/3 vectors in nonhuman primates and pigs. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014", March 17, 2014, Tokyo.
  25. 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease in Japan: Current status and problems. 第 55 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2014 年 5 月 22 日, 福岡. (プログラム p60)
  26. 浅利さやか: パーキンソン病の遺伝子治療: AADC 発現の 5 年間の評価. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日, 福岡. (プログラム p180)
  27. 飯田麻子, 滝野直美, 嶋崎久仁子, 伊藤美加, 村松慎一: 大型動物の広範な中枢神経領域に遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルスベクターの開発. 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 9 月 29 日, 奈良.
  28. 村松慎一, 新田淳美: パーキンソン病の遺伝子治療. AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明～基礎から臨床まで～, 第 57 回日本神経化学学会大会, 2014 年 10 月 1 日, 奈良. (神経化学 Vol.53(No.2), 2014, p82)
  29. 村松慎一: 遺伝子治療と細胞治療. 神経変性の制御をめざして, 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2014 年 10 月 3 日, 京都. (プログラム p 21)
  30. 小野さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 佐藤俊彦, 村松慎一: FMT-PET によるパーキンソン病のすくみ足の病態解析. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2014 年 10 月 4 日, 京都. (プログラム p101)
  31. 村松慎一: Parkinson 病の遺伝子治療. 第 32 回日本神経治療学会総会, 2014 年 11 月 22 日, 東京. (特別講演) (神経治療学 Vol.31(5), p547)
  32. Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson Disease. The First Asian Symposium on AADC Deficiency,

Dec 21, 2014, Taipei.

H. 知的所有権の取得状況  
該当なし



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

血友病治療用 AAV ベクター大量製造法の開発

研究分担者 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

研究要旨 血友病 B 遺伝子治療臨床研究用に FactorIX 搭載 AAV8 型ベクターの大量製造法の検討を実施した。常法であるヘルパーフリーシステムによる生産性を検討し、 $1 \times 10^{15} \text{vg}$  製造に必要なスケールを概算した。この過程においてこれまでタカラバイオが開発したベクター産生を向上させる技術についても試験し、その一部については効果が確認できた。また、ハイパーフラスコによる製造条件についても検討し、製造のスケールアップに目途がついたが、これら検討を総合して換算すると  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  を製造するには、持続的な製造の実現という観点からは現実的ではないことが確認された。そのため、根本的な AAV ベクターの大量製造システムの構築が必要と考えられ、大量製造が比較的容易と考えられるバキュロウイルス製造システムについて、文献情報等をもとにモデル系として AAV2-AsRed ベクターを作製するための試験系を構築した。その結果、200L 培養で  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  程度生産できる可能性が示唆された。しかしながら、AsRed 遺伝子の代わりに FIX 遺伝子を搭載した場合に、ヘルパーフリー法と同様にベクター産生性が大きく低下することが認められた。そのため、細胞濃度、回収日、培地、MOI、バキュロウイルスベクター比率等について至適化を行い、実現可能なスケールで  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  製造できる条件を設定することができた。さらに、GMP 製造の第一段階となる Sf9 昆虫細胞の MCB 製造のための細胞培養条件を確認するとともに、実製造で使用予定の Wave 培養システムによる製造検討も実施し、改良の余地はあるものの現段階においても、小スケールで得られていた産生効率と同等の効率が確認でき大きな前進が認められた。今後、実製造を進める段階であったが、バキュロウイルスシステムではベクターを供給できるまでに、まだもう少しばかり時間が必要であるため、AAV8-FIX ベクターについては少数例での臨床試験を早期に実施することを優先して、ヘルパーフリー法でベクターを確保することになり、現在、プラスミド GMP 製造、ベクター製造条件の検討を進めている。一方で、より症例の多い血友病 A 遺伝子治療臨床研究用ベクターである AAV8-FVIII 製剤については、今回得られた知見・技術を用いてバキュロウイルスシステムによる製造検討を、今後、実施する予定である。

A. 研究目的

重症型血友病 B 患者に対する AAV ベクターを用いた FactorIX 遺伝子治療においては、大量のベクター製造 ( $1 \times 10^{15}$

vg(vector genomes)以上)が必要となる。

近年、海外のグループによって、AAV ベクターを用いた血友病 B に対する遺伝子治療に関して有望な成果が報告されたが、約

2x10<sup>15</sup>vg の AAV ベクターを製造するために、セルスタック 10 段フラスコを 400 個以上使用したことが報告されている (Hum Gene Ther., 22: 595-604, 2011)。このようなスケールでの治験薬 GMP に準拠した AAV ベクターの製造実績ならびに製造された AAV ベクターの品質試験について、国内ではこれまで実施された例がなく、本遺伝子治療の臨床研究を実施する上で、AAV ベクターの GMP グレードでの大量製造方法を確立し、その品質を担保するための多くの試験方法を開発することは必須となる。本研究においては、その大量製造方法を開発する上で、現実問題として大きな障壁と考えられる 400 個を超える 10 段フラスコの使用をできる限り少なくできるように、ベクター産生系及び製造工程の改良を検討する。また、現実問題として例え 400 個を超える 10 段フラスコを使用し製造したとしても得られるベクター量が数名分程度という問題を根本的に解決すべく、遺伝子治療用 AAV ベクター製造で実績があるバキュロウイルスを用いた製造システムについて、GMP 準拠での製造技術開発を行う。

## B. 研究方法

・AAV8 型ベクター製造の基礎検討：タカラバイオでは、これまでにヘルパーフリー法による AAV ベクター製造時に、AAV2 型ベクターの産生を向上させる種々の因子を見出してきた。これら因子について、蛍光タンパク AcGFP1 発現遺伝子搭載 AAV ベクタープラスミド、AAV8 型ヘルパーベクタープラスミド (pRC8) を使用して、AAV8 型ベクターへの産生量向上への寄与につい

て試験した。これらの因子のうち、hsa-miR342 については、AAV2 型ヘルパープラスミド (pRC2) に組み込んだ形で効果が確認できていたので、新たに pRC8 に組み込んだ。

・FactorIX 遺伝子搭載 AAV8 型ベクターの産生：FactorIX 遺伝子搭載 AAV ベクタープラスミドを使用して、AAV8 型ベクター (AAV8-FIX) の産生性を確認した。また、AcGFP1 搭載 AAV ベクタープラスミドを用いた検討により、AAV8 型ベクターにおいても産生増強効果が確認できた因子について、AAV8-FIX 産生に及ぼす影響を確認した。さらに、大量製造を見据えて、多層培養できる容器であるハイパーフラスコを使用して、その産生性を確認し、目標製造量である 1x10<sup>15</sup>vg を確保するための製造スケールを見積もった。

・バキュロウイルスベクターを用いた AAV ベクター製造の基礎検討：安定的かつ低コストで AAV ベクターを製造できるシステムとしてバキュロウイルスベクターを用いた AAV ベクター製造のための基礎検討を行った。文献情報を参考に ITR 間に蛍光タンパク AsRed2 遺伝子発現ユニットを配置した AAV ベクターゲノム搭載トランスファーベクター (pBP-AAV)、ならびに Rep と Cap 遺伝子 (AAV2 型) を昆虫由来プロモーター下に逆方向に配置したトランスファーベクター (pBP-RC2) を、BacPAK expression system (クロンテック社製) を用いて構築した。昆虫細胞 Sf21 にこれらトランスファーベクターとバキュロウイルスゲノム DNA (BacPAK6: クロンテック社製) をトランスフェクションし、それぞれのバキュロウイルスベクター rBP-AAV な

らびに rBP-RC2 を得た。これらバキュロウイルスベクターを再度 Sf21 細胞に感染させることで、AAV2-AsRed2 ベクターを産生させ、その効率について検討した。さらに産生した AAV2-AsRed2 ベクターを、常法により簡易精製し、培養細胞への感染性について確認するとともに、ヘルパーフリー法での製造検討と同様に目標製造量である  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  を得るための製造スケールを見積もった。

・AAV8-FIX ベクター産生用バキュロウイルスベクターの構築：構築した AAV2 型ベクター産生用トランスファープラスミドの Cap 部分を AAV8 Cap 配列に置換した。また AsRed2 遺伝子部分を FactorIX (FIX) 遺伝子に置換した。

・AAV8-FIX ベクター産生性の検討：ITR 内に FIX 遺伝子配列を保持するバキュロウイルスベクターおよび AAV8CapAAV2Rep 配列を保持するバキュロウイルスベクターを、それぞれ力価を指標に高産生ウイルスをセレクションし preMVB (master virus bank) とした。AAV2-AsRed2 ベクターとの産生性を比較するために、昆虫細胞用培地を含む三角フラスコに Sf9 細胞を培養後、それぞれのバキュロウイルスベクターを感染させて AAV ベクターを製造し、そのゲノムタイターをリアルタイム PCR 法により測定することで確認した。

・AAV8-FIX ベクター産生性向上の検討：バキュロウイルスベクターによる AAV8-FIX ベクター製造の産生性を向上させるための条件検討として、バキュロウイルスベクター感染時の MOI (multiplicity of infection)、感染後の AAV ベクター回収日、Sf9 細胞をセットアップする際の細胞

数、昆虫細胞培養用培地、感染させるバキュロウイルスベクターについて AAV ゲノムをもつものと AAV8Cap をもつものの比率について確認した。AAV ベクター産生性はリアルタイム PCR 法によりゲノムタイターを測定することで評価した。

・Sf9 MCB 製造条件の検討：Sf9 昆虫細胞の master cell bank (MCB) 製造条件検討のため、培養器材としてスピナーフラスコ及び Wave bioreactor を用いて、経時的に培養液量を増加し細胞増殖性を測定した。

・AAV8-FIX 実製造大スケール検討：Sf9 MCB 製造条件の検討と合わせて、スピナーフラスコ及び Wave bioreactor により培養中の Sf9 細胞にバキュロウイルスベクターを感染させ、AAV8-FIX ベクター製造性を検証した。

(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と考えられる。また、本研究においては、動物及びヒトサンプルは取り扱わない。

### C. 研究成果

・ヘルパーフリーシステムによる AAV ベクター製造検討：タカラバイオではこれまでに AAV2 型ベクターの産生効率を増大させる因子である hsa-miR342 ならびに Suppl.X (ヒト由来遺伝子で発現プラスミドとして細胞に供給される。タカラバイオの持つノウハウのため遺伝子名は現時点では非公開) を見出している (図 1)。

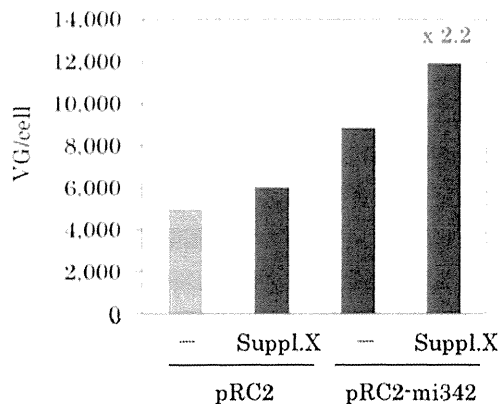


図 1 AAV2 型ベクター製造における hsa-miR342 と Suppl.X の効果

hsa-miR342 は、AAV2 型のヘルパープラスミドに発現ユニットを組み込む形で供給しており、AAV8 型ベクターでの効果を確認するために、AAV8 型のヘルパープラスミドの同じ位置に発現ユニットを組み込んだものを構築した (pRC8-mi342)。また、Suppl.X は AAV2 型の時と同様に、別のプラスミドで供給した。これらにより、AAV8 型ベクターの産生効率を確認したところ、hsa-miR342 については、増強効果が確認できなかったものの、Suppl.X については、約 1.5 倍程度上昇させる作用が認められた (図 2、図 3)。

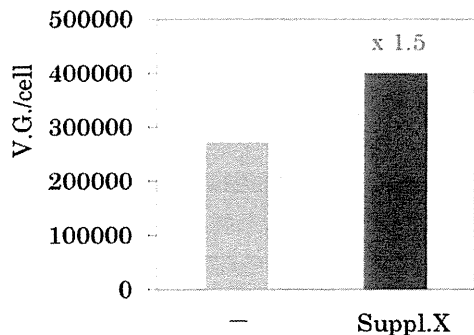


図 2 AAV8 型ベクター製造における hsa-miR342 の効果

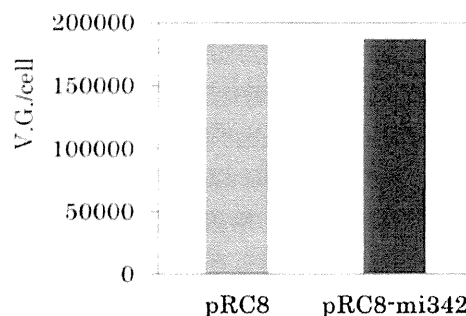


図 3 AAV8 型ベクター製造における Suppl.X の効果

AAV ベクターの製造において、治療用遺伝子を搭載した場合に、蛍光タンパク遺伝子搭載時と比較して、その産生効率が低下することがある。このため、実際の製造スケールを想定するためには、治療用遺伝子、本研究においては FactorIX 遺伝子を搭載した AAV ベクタープラスミドを用いて検討する必要がある。そこで、FactorIX 遺伝子搭載 AAV ベクタープラスミドと AAV8 型ヘルパープラスミド pRC8 を用いて、AAV8-FIX の産生効率を確認したところ、AcGFP 搭載 AAV ベクタープラスミドを使用した場合と比較して、約 1/7 程度に産生効率が低下することが確認された (図 4)。

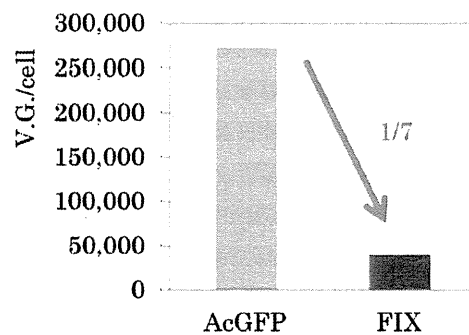


図 4 AcGFP 遺伝子と FactorIX 遺伝子搭載 AAV ベクタープラスミドによる AAV 産