

## 生効率の比較

産生効率が 1/7 に低下すると、同じ量のベクター製造を行うためには、7 倍の製造スケールが必要になる。製造スケールが大きくなることで、製造にかかる人員・経費も飛躍的に増大するため、製造スケールについてはできるだけ小さくすることが必要である。そのため、AAV8 型ベクターの製造検討で産生効率の上昇が確認できた Suppl.X を添加するとともに、省スペースで効率良く細胞を培養できるハイパーフラスコを用いて製造効率を確認した (図 5)。

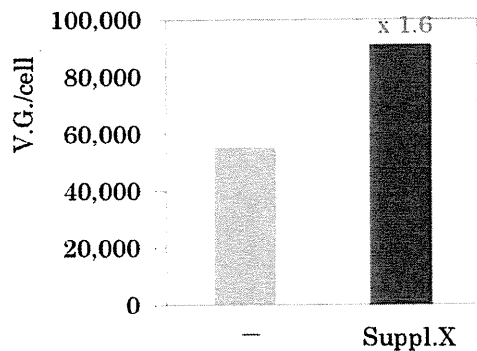


図 5 ハイパーフラスコによる AAV8-FIX 産生

ハイパーフラスコを用いても、通常のフラスコと同等以上の産生効率を示したことから、スケールアップは問題ないことが確認できた。また、Suppl.X の添加により約 1.6 倍程度産生量が増大することも確認できた。そこで、血友病 B に対する遺伝子治療臨床研究を実施する上で必要とされる目標製造量である  $1 \times 10^{15}$  vg を製造するための製造スケールについて、これまでの検討をもとに計算した。図 5 の結果から、ハイパーフラスコ 1 個あたり  $4 \times 10^{12}$  vg 製造できる計算となり、精製効率を 30% と見積もる

と、 $1 \times 10^{15}$  vg を得るためには、ハイパーフラスコが約 800 枚必要と想定された。これは 1 週間あたり 40 枚のハイパーフラスコを処理したとしても 20 週間、約 4 ヶ月強かかることになる。1 週間に 40 枚のハイパーフラスコを処理していくためには、細胞を拡大、準備することも考えると、2 人がかりでほぼかかりきりになって作業しなければいけないこととなる。また、ハイパーフラスコ 1 枚あたりトランスフェクションするプラスミド量として約 200  $\mu$ g 必要であり、800 枚分では 160mg、しかも 4 種類のプラスミド全てについて製造する必要がある。

・バキュロウイルスベクターシステムによる AAV ベクター製造検討：より AAV ベクター製造効率のよい方法を構築するためにバキュロウイルスベクターシステムを利用した製造方法を検討した。既報の文献情報 (Mol. Ther., 17(11), 1886-1896, 2009) 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) を構築した。そのベクター構造について、図 6 に示す。

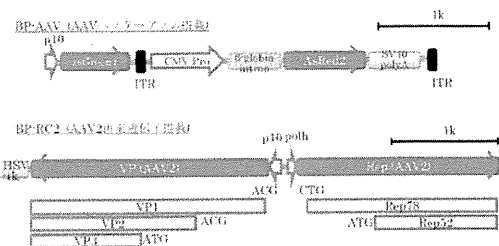


図 6 バキュロウイルスベクター調製用トランスファーベクタープラスミドの構造

それぞれのトランスファーベクターを用いて、それぞれの配列をゲノム内に保持するバキュロウイルスベクター (rBP-AAV 及び rBP-RC2) を調製した。AAV ベクターを調製するためには、これら 2 種類のバキュロウイルスベクターを同時に昆虫細胞に感染させることで行うが、AAV ベクターが実際に産生していることを確認するためには、細胞に感染させたバキュロウイルスベクターを失活させる必要がある。そこで、バキュロウイルスベクターを失活させる効果があるクロロホルムにより粗ウイルス溶液を処理後、ベクターゲノムを測定することで、AAV ベクターが産生しているかどうかを評価した。なお、AAV ベクターはクロロホルムに対して抵抗性があることが知られている。また、コントロールとして、rBP-AAV 単独感染群を設定した。その結果を図 7 に示す。

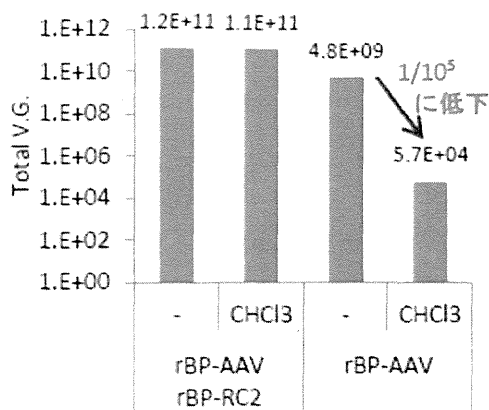


図 7 バキュロウイルスベクターによる AAV ベクター産生の確認

コントロールとして実施した rBP-AAV 単独感染群 (AAV ベクターゲノムを保持するバキュロウイルスベクターのみが存在する状態) において、クロロホルムで処理する

ことにより、ベクターゲノム量は  $1/10^5$  (0.001%) にまで低下しており、このクロロホルム処理によって、バキュロウイルスベクターは効率的に失活できていることが確認できた。一方で、rBP-AAV と rBP-RC2 感染群においては、クロロホルム処理によってもベクターゲノム量の減少はほとんど観察されず、クロロホルム耐性の AAV ベクターが産生していることが示唆された。次にこのようにして得られた粗ウイルス溶液を、AAV ベクターの精製法としては常法である塩化セシウム密度勾配超遠心により簡易的に精製を試みた。その結果、ヘルパーフリーシステムで調製した AAV ベクターとほぼ同じ RI (Refractory Index) のところに集積が確認できた (図 8)。

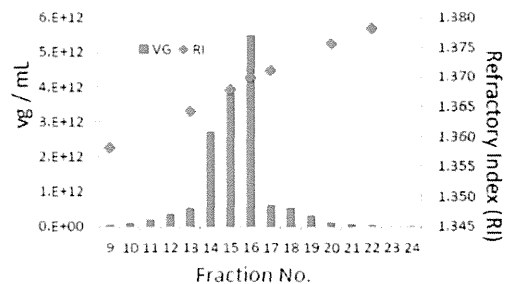


図 8 粗ウイルス液の塩化セシウム密度勾配超遠心精製

AAV ベクターの集積が見られた Fr.14-17 を回収し、透析することにより、精製 AAV ベクター溶液を得た。この精製 AAV ベクターを SDS-PAGE により分析したところ、キャプシドの構成タンパクである VP1、VP2、VP3 が期待される比率で確認できた (図 9)。

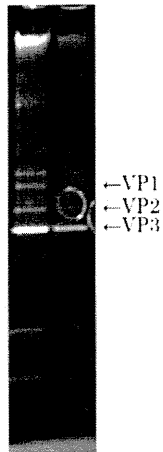


図9  
精製 AAV ベクターの  
SDS-PAGE による解析

さらに、得られた AAV ベクターの感染性を確認するため、AAV293 細胞に感染させ、3 日後に蛍光顕微鏡により観察した (図 10)。

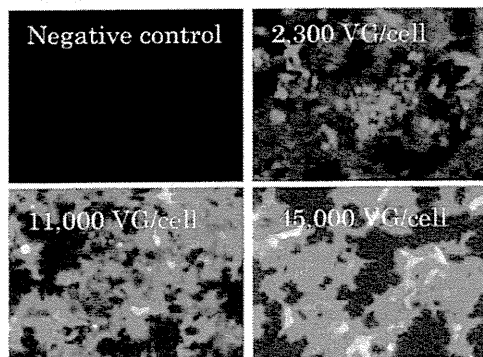


図 10 精製 AAV ベクター (AAV2-AsRed2) の AAV293 細胞への感染性の確認

図 10 に示すように、精製した AAV ベクター (AAV2-AsRed2) は、細胞に感染し、搭載した AsRed2 遺伝子の発現が確認できた。本システムにより得られた AAV ベクター製造量は、 $6 \times 10^{12}$  vg/L であり、目標製造量である  $1 \times 10^{15}$  vg を得るためには、200L 程度の培養を行えば確保できるものと考えられた。

・バキュロウイルスベクターによる AAV8-FIX ベクター産生 : AAV2-AsRed2 ベクターと AAV8-FIX ベクター産生効率をそれぞれのベクター製造用バキュロウイルスベクターを使用することにより比較した。なお血清型による影響を確認するため、AAV2-FIX ベクター及び AAV8-AsRed2 ベクターについても同時に産生効率を確認した。(図 11)。

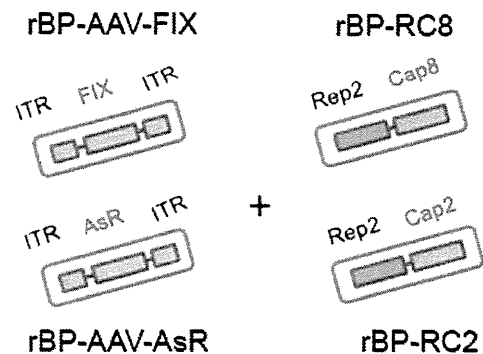


図 11 AAV ベクター製造性を確認したバキュロウイルスベクターの組み合わせ

その結果、血清型による影響はそれほど大きくなく、むしろ AAV8 型の方が産生量は増加したが、FIX 遺伝子を搭載することで、AAV2 型及び AAV8 型のいずれにおいてもベクターの産生効率は大きく低下し、AsRed2 遺伝子を搭載した時と比較して 1/5 ~ 1/10 以下となった (図 12)。

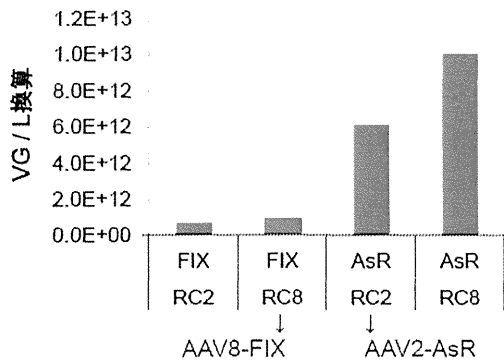


図 12 AAV2 型及び 8 型ベクターにおける AsRed2 及び FIX 遺伝子搭載時のベクター産生性

・ AAV8-FIX ベクター産生性向上の検討：  
AAV ベクターを製造するための条件について種々検討を行った。まず、バキュロウイルスベクター感染後の AAV ベクター回収日およびバキュロウイルス感染時の MOI について確認したところ、回収日によってベクター回収率は大きく変動することが確認された。一方 MOI については MOI=10 まで比率を上昇させると AAV ベクター製造効率は低下するが、MOI=1 と 3 ではほとんど差がなかったことから、ある程度の幅においては安定して製造できることが確認された (図 13)。

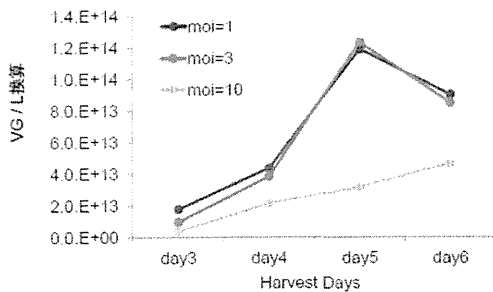


図 13 バキュロウイルス感染時の MOI と AAV ベクター回収日における産生効率

次に市販の昆虫細胞用の培地 3 種類と感染

時のセットアップ細胞数について比較した。この際、各条件によって AAV ベクター回収日に影響があることが予想できたため、継続的に回収し産生効率を確認した。その結果、培地種によって産生効率は相当変動し、さらに、各培地において至適セットアップ細胞数も異なることが認められた (図 14)。

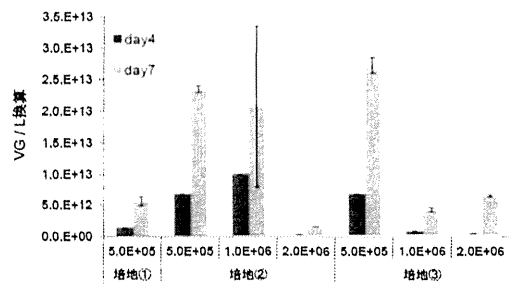


図 14 培養用培地、セットアップ細胞数、回収日による AAV ベクター製造効率の比較

我々が構築したバキュロウイルスベクターによる AAV ベクター産生システムにおいては、2 種類のバキュロウイルスベクターを Sf9 細胞に感染させる。この際、それぞれのベクター比率が AAV ベクター産生効率に影響するかどうかを確認した。しかしながら、どちらか一方のバキュロウイルスベクターの比率を増加させても AAV ベクターの製造量は増加しなかった (図 15)。

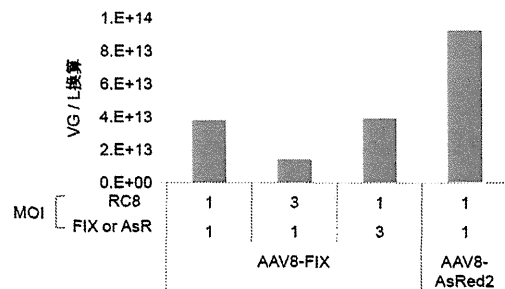


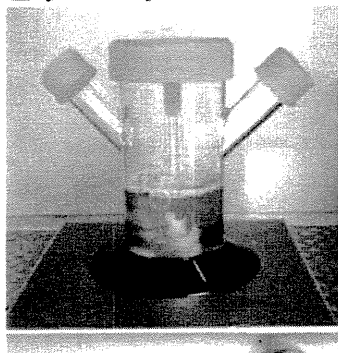
図 15 感染させるバキュロウイルスベク

ターの比率を変動させた時の AAV ベクター  
一産生効率

このことより各バキュロウイルスベクター  
はそれぞれ MOI=1 で感染させることで十  
分であることが確認できた。

・ Sf9MCB 製造条件の検討：これまでに検  
討を実施してきた三角フラスコによる培養  
法に近い条件で培養可能であるスピナーフ  
ラスコと AAV ベクター実製造時に使用する  
予定である Wave Bioreactor により Sf9  
昆虫細胞の増殖性を検討した (図 16)。

### ○スピナーフラスコ



### ○Wave培養システム



図 16 昆虫細胞大量培養に使用されるス  
ピナーフラスコと Wave 培養システム

スピナーフラスコを用いた場合に Sf9 細胞  
は順調に増殖が認められ、短期間で一定量

以上の MCB が製造できることが確認でき  
た。一方で、Wave Bioreactor を用いた場  
合には、当初設定した培養条件では細胞増  
殖がほとんど認められなかった。培養途中  
で wave の揺動速度を上昇させることで、  
細胞増殖が確認できるようになったが、安  
定した MCB 製造のためには、さらなる条  
件検討が必要と考えられた (図 17)。

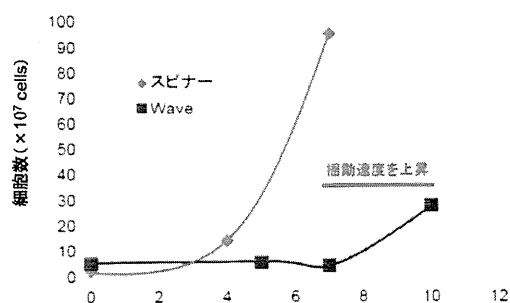


図 17 スピナーフラスコと Wave 培養シス  
テムにおける Sf9 昆虫細胞の培養

・ AAV8-FIX 実製造大スケール検討：これ  
までの三角フラスコを用いた小スケール検  
討の条件を用いて、スピナーフラスコ及び  
Wave bioreactor での AAV8-FIX ベクター  
産生効率を確認した。スピナーフラスコに  
おいては順調な細胞増殖が認められていた  
が、AAV ベクターはほとんど産生しなかつ  
た。一方で、Wave Bioreactor を用いた場  
合には、細胞増殖の至適条件が見い出せて  
いない段階ではあるものの、三角フラスコ  
での小スケール検討と同程度の AAV 産生  
効率が確認できた。すなわち 1L あたり約  $2 \times 10^{13} \text{vg}$  の産生性が得られたことから、  
150L 培養を行うことで、 $3 \times 10^{15} \text{vg}$  製造  
量を確保できる見込みであった (図 18)。

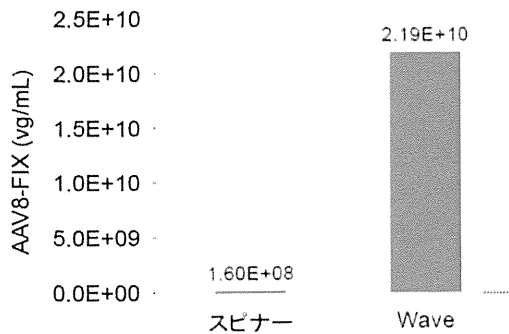


図 18 スピナーフラスコと Wave 培養システムを用いた AAV ベクター大量製造検討

・新培地による AAV 産生効率上昇検討：現段階において、 $1 \times 10^{15}$ vg 製造ができるだけの基本的な条件は確立できたものと考えられるが、製造効率をさらに高めることができれば、ベクター純度、製造コストに大きく寄与できるため、タカラバイオで別途開発を行っていた昆虫細胞培養用培地について試験した (図 19)。

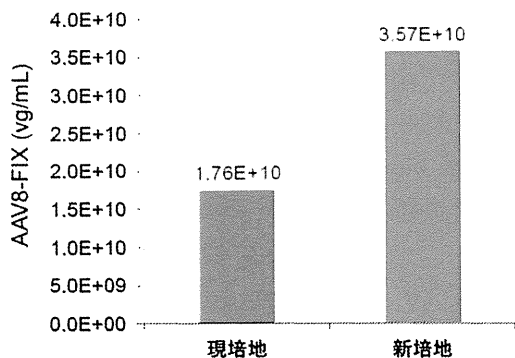


図 19 開発中の新培地による AAV 産生効率

図 19 に示すように、予備試験段階の結果ではあるものの、新培地を用いることで、AAV 製造効率は約 2 倍に上昇した。

#### D. 考察

血友病 B に対する FactorIX 搭載 AAV ベクターによる遺伝子治療は、最近、海外グループによって有望な成果が報告された (N. Engl. J. Med., 365(25), 2357-2365, 2012)。その中で効果が期待できる投与量は  $2 \times 10^{12}$ vg/kg であることが示されたが、これは体重 50kg のヒトで  $1 \times 10^{14}$ vg 投与となり、今後、本邦で同様の遺伝子治療臨床研究を実施するためには、少なくとも  $1 \times 10^{15}$ vg 程度の GMP 準拠で製造した AAV ベクターが必要と考えられる。

AAV ベクターの製造法には種々の方法が知られているが、なかでもアデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスを使用しないヘルパーフリーシステムによる製造法は広く用いられている。実際に前述の海外グループによる遺伝子治療においても、ヘルパーフリーシステムによって治療用ベクターが製造された。しかしながら、彼らの文献によると、セルスタック 10 段フラスコを 400 個以上使用して製造したことが記載されており、そのまま同じように製造するには大変な労力を必要とすることが予想された。そこで、できるだけ製造スケールを小さくすることを考え、これまでタカラバイオが蓄積した AAV ベクター産生効率を上昇させるための技術について検討を行った上で、セルスタック 10 段フラスコよりは取扱いが容易なハイパーフラスコを用いて、製造検討を実施した。しかしながら、それでも  $1 \times 10^{15}$ vg 程度製造するには、ハイパーフラスコが 800 個程度必要であることが試算され、これは、2 人がほぼかかりきりで 4 ヶ月以上作業することになり、さらにはこの製造には  $160\text{mg} \times 4$  種類のプ

ラスミドを調製する必要があることとなる。現実的な問題として、この方法による製造はとてもコストが高くなり、力づくで今回は製造を行ったとしても、得られるベクター量としては数名分であり、さらなる第Ⅱ相の臨床研究や治験等を見据えた時には、その継続性という観点からも、根本的に解決すべき問題と考えられたため、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ベクターを用いた製造システムについて、製造技術開発を行うこととした。

文献情報を参考に、製造系を構築しまずは AsRed2 搭載 AAV2 型ベクター産生性について確認したところ、200L 程度の培養により  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  程度生産できる可能性が示唆された。バキュロウイルスベクターによる AAV ベクター製造については知識、技術、ノウハウがまだあまり蓄積されていないため、今後慎重に検証を進める必要があるが、ヘルパーフリーシステムによりハイパーフラスコ 800 枚を用いて製造することと比較すると、より短期間で、より省力的に製造することが可能と考えられ、さらに、必要なプラスミド量は大幅に少なくなるため、コストは当然下がることが予想された。

しかしながら、バキュロウイルスベクターを用いた AAV ベクター製造は、そのスケールアップの拡張性が高く、有望な技術ではあるが、その製造条件については相当の至適化が必要であった。また、AAV8-FIX ベクターを製造するにあたり、従来法であるヘルパーフリー法を検討した際に、FIX 遺伝子を搭載したベクターの産生効率が低かったが、バキュロウイルスベクターを用いた場合においても同様に産生量の低下が

認められた。そのため、臨床試験に供するための製造量として  $1 \times 10^{15} \text{vg}$  を想定した上で、種々の条件検討を行い、実際に製造可能なスケール (100-200L) での AAV ベクター製造のための条件を設定することができた。さらには実製造に使用予定の Wave Bioreactor を用いての検討においても同程度の効率での AAV ベクター産生性が確認できた。一方で、Sf9 MCB 製造において使用予定のスピナーフラスコにおいては、安定した細胞増殖が認められたものの、AAV ベクター産生効率は極端に悪く、おそらくは温度制御性の不安定性に起因するものと推察された。このことは、Wave Bioreactor での製造についても、不安定要因となりうるものが考えられるが、細胞増殖性が安定しない中で実施した AAV ベクター製造試験において、一定の産生効率が確認できたことで、今後条件検討を進めることで、より安定で効率の高い製造条件を設定できる可能性も強く期待できた。なお、自治医科大学との協議により AAV8-FIX ベクターについてはできる限り早期に少数例での臨床試験を実施することになり、製造に時間を要するバキュロウイルスシステムではなく、従来法であるヘルパーフリー法により一定量のベクターを確保することとなった。そのため、平成 26 年度中に Sf9 昆虫細胞の MCB GMP 製造を実施する予定であったが、一旦とりやめ、ヘルパーフリー法に使用する pHelper プラスミドベクターの GMP 大量製造を実施中である (2/12 現在)。また、ベクター配列の見直しが自治医科大学で実施され、余分な配列を除去した形で pAAV-FIX プラスミドベクターを人工合成した。さらに、ヘルパーフリー法で

は、例え少数例であっても現状の製造条件では必要となるベクター量を確保することは難しいと見込まれるため、産生量を向上させるための検討を実施している。一方で、血友病 A に対する遺伝子治療用製剤となる AAV8-FVIII ベクターについては、症例も多いため、これまでの知見により確立されてきたバキュロウイルスシステムにより製造を行うこととなった。現在、自治医科大学でベクター配列の最終検討を実施中であり、完了次第、バキュロウイルスベクター製造用のトランスファーベクターへの載せ替えから実施する予定である。

#### E. 結論

本研究において、血友病 B に対する遺伝子治療臨床研究用ベクター製剤 AAV8-FIX の大量製造に関する検討を行った。その結果、安定的かつ継続的な大量製造が可能と考えられるバキュロウイルスベクターによる AAV ベクター製造システムについて開発検討を進めることが、最も適当と考えられるだけの結果を得た。しかしながら、FIX 遺伝子を搭載することによるベクター製造効率の低下が確認されたため、種々の検討を行った結果、実現可能なスケールでの AAV ベクター製造条件をある程度確定することができた。さらに、実製造で使用予定の Wave 培養システムによる製造効率ならびに Sf9 昆虫細胞 MCB GMP 製造のための条件についても確認できた。AAV8-FIX ベクターについては、方針の変更によりヘルパーフリー法により少数例分の製造を行うこととなったが、今後血友病 A に対する遺伝子治療用ベクターである AAV8-FIIIIV ベクター製造検討に本バキュロウイルスシステ

ムを適用していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Toshikazu Nishie, Tatsuji Enoki, Masanari Kitagawa, Junichi Mineno, Takashi Okada, Tsukasa Ohmori, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata EXAMINATION ON LARGE SCALE PRODUCTION OF AAV VECTORS FOR CLINICAL USE, 日本遺伝子治療学会, 2014 年、東京

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kashiwakura Y.</u> , <u>Mimuro J.</u> , Onishi A, Iwamoto M, <u>Madoiwa S.</u> , Fuchimoto D, Suzuki S, Misae M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, <u>Ohmori T.</u> , Hashimoto M, Yazaki S, <u>Sakata Y.</u>	Porcine Model of Hemophilia A.	PLoS One	7(11)	e49450	2012
Kashiwakura Y, <u>Ohmori T.</u> , <u>Mimuro J.</u> , Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, <u>Madoiwa S.</u> , Inoue M, <u>Hasegawa M.</u> , <u>Ozawa K.</u> , <u>Sakata Y.</u>	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
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, <u>Mimuro J.</u> , Kashiwakura Y, <u>Madoiwa S.</u> , <u>Sakata Y.</u> , Perry AC, Ishikawa F, Onishi A.	Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs.	Cell Stem Cell	10(6)	753- 758	2012
<u>Ohmori T.</u> , Yano Y, Sakata A, Ikemoto T, Shimpo M, <u>Madoiwa S.</u> , Katsuki T, <u>Mimuro J.</u> , Shimada K, Kario K, <u>Sakata Y.</u>	Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy.	Thromb Res	129 (4)	e36-40	2012
<u>Madoiwa S.</u> , Kobayashi E, Kashiwakura Y, Sakata A, Yasumoto A, <u>Ohmori T.</u> , <u>Mimuro J.</u> , <u>Sakata Y.</u>	Immune response against serial infusion offactor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice.	Haemophilia	18(3)	E323- 380	2012
Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, <u>Mizukami H.</u> , Kume A, <u>Ozawa K.</u>	NF- $\kappa$ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites.	Cancer Res	73(1)	364- 372	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, <u>Mizukami H</u> , Kume A, Muto S, Kusano E, <u>Ozawa K</u> .	Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats.	Gene Ther	19	476-482	2012
Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, <u>Mizukami H</u> , Urabe M, <u>Ozawa K</u> , Kume A.	Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy.	Neuroreport	23	30-34	2012
de Paula EV, Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz SR, Morfini M, Nemes L, Šalek SZ, <u>Shima M</u> , Windyga J, Ehrenforth S, Chuansumrit A; 1804 (adept(TM)1) Investigators.	Recombinant factor VIIa analog (vatreptacog alfa [activated]) for treatment of joint bleeds in hemophilia patients with inhibitors: a randomized controlled trial.	J Thromb Haemost	10(1)	81-89	2012
Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, <u>Shima M</u> , Yoshioka A, Hattori K.	A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model.	Nat Med	18 (10)	1570-1574	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, <u>Shima M</u> , Hara T.	Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a haemophilia A patient with high-titre inhibitor.	Haemophilia	18(3)	e75-77	2012
Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, <u>Shima M</u> .	A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies.	Thromb Haemost	107(2)	288-301	2012
Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, <u>Shima M</u> , Hanabusa H, <u>Takedani H</u> , Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H	Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase I trial: 2nd report.	Haemophilia	19(2)	330-337	2013
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, <u>Hasegawa M</u> , 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)	846-856	2012
<u>Inaba H</u> , Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K.	Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A.	Haemophilia	19(1)	100-105.	2012
Shimada, K. <u>Takedani H</u> , Inoue, K, Yamasaki, K.	Arthroscopic synovectomy of the elbow covered with rFVIIa in a haemophilia B juvenile with inhibitor.	Haemophilia	18(6)	e414-416	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山下敦己、長江千愛、足利 朋子、武藤真二、 <u>瀧 正志</u>	治療歴のある血友病 B 患者 における血漿由来血液凝固 第IX因子製剤（ノバクト <sup>®</sup> M 静注用）の生体内回収率	新薬と臨床	61 (10)	1972- 1978	2012
<u>Mimuro J, Mizukami H,</u> <u>Hishikawa S, Ikemoto</u> <u>T, Ishiwata A, Sakata A,</u> <u>Ohmori T, Madoiwa S,</u> <u>Ono F, Ozawa K,</u> <u>Sakata Y.</u>	Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver with Adeno-associated Virus 8 Vectors.	Mol Ther	21(2)	318- 323	2013
Yasumoto A, <u>Madoiwa</u> <u>S, Kashiwakura Y, Is</u> <u>hiwata A, Ohmori T,</u> <u>Mizukami H, Ozawa</u> <u>K, Sakata Y, Mimuro</u> <u>J.</u>	Overexpression of factor VII ameliorates bleedin g diathesis of factor VII I-deficient mice with in hibitors.	Thromb Res	131	444-44 9	2013
Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim IK, Kanegae K, Kashiwakura Y, <u>O</u> <u>hmori T, Sakata Y, In</u> <u>oue M, Hasegawa M,</u> <u>Okano T.</u>	Genetically modified adi pose tissue-derived stem /stromal cells, using sim ian immunodeficiency vi rus-based lentiviral vect ors, in the treatment of hemophilia B.	Hum Gene T her.	24(3)	283-29 4	2013
<u>Madoiwa S, Kitajima</u> <u>I, Ohmori T, Sakata</u> <u>Y, Mimuro J.</u>	Distinct reactivity of th e commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the mol ecular variants of fibrin degradation products.	Thromb Res	132	457-46 4	2013
Koyama K, <u>Madoiwa</u> <u>S, Tanaka S, Koinuma</u> <u>T, Wada M, Sakata</u> <u>A, Ohmori T, Mimuro</u> <u>J, Nunomiya S, Sakat</u> <u>a Y.</u>	Evaluation of hemostati c biomarker abnormaliti es that precede platelet count decline in critica lly ill patients with sep sis.	J Crit care	28	556-56 3	2013
Takahashi K, <u>Mizukami H, Saga Y,</u> <u>Takei Y, Urabe M,</u> <u>Kume A, Machida S,</u> <u>Fujiwara H, Suzuki M,</u> <u>Ozawa K.</u>	Suppression of lymph node and lung metasta ses of endometrial can cer by muscle-mediate d expression of soluble vascular endothelial g rowth factor receptor- 3.	Cancer Sci	104	1107-1 1	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, <u>Mizukami H</u> , Klinman D.M, <u>Ozawa K</u> , 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	e57606	2013
Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, <u>Shima M</u> , Yoshioka A, Hattori K.	Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation.	J Thromb Haemost	12	206-213	2014
Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, <u>Shima M</u> , Ohashi K, Okano T, Matsui H.	A Novel Cell-Sheet Technology That Achieves Durable Factor VIII Delivery in a Mouse Model of Hemophilia A.	PLoS One	8 (12)	e83280	2013
<u>Shima M</u> .	Hemophilia world.	Rinsho Ketsueki	54 (8)	736-43	2013
Yada K, Nogami K, <u>Shima M</u> .	Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor.	Br J Haematol	163 (1)	104-11	2013
Sakurai Y, Kasuda S, Tatsumi K, Takeda T, Kato J, Kubo A, <u>Shima M</u> .	Repression of Factor VIII Inhibitor Development with Apoptotic Factor VIII-expressing Embryonic Stem Cells.	Hematol Rep	5(2)	30-3	2013
Kajiwara M, <u>Shima M</u> , Yoshioka A.	Two haemophilia patients with inhibitors who became ambulatory after physiotherapy under haemostatic cover with bypassing agents.	Haemophilia	19 (5)	e301-4	2013
<u>Shima M</u> , Thachil J, Nair SC, Srivastava A.	Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications.	J Thromb Haemost	11 (7)	1417-20	2013
Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, <u>Shima M</u> .	Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces.	Thromb Haemost	110 (2)	316-22	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Shima M.</u>	Hemophilia.	Rinsho Ketsueki	54(2)	189-97	2013
Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, <u>Shima M.</u>	The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X.	Thromb Haemost	109 (6)	1007-15	2013
<u>Inaba H</u> , Shinozawa K, Seita I, Otaki M, Suzuki T, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K.	Genotypic and phenotypic features of Japanese patients with mild to moderate hemophilia A.	Int J Hematol.	97	758-64	2013
Hirose, J, <u>Takedani, H</u> , Koibuchi, T.	The risk of elective orthopaedic surgery for haemophilia patients: Japanese single-centre experience.	Haemophilia	19(6)	951-955	2013
Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, <u>Muramatsu S</u> , Saido T C.	Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice.	Sci Rep	3	1472	2013
Iida A, Takino N, Miyachi H, Shimazaki K, <u>Muramatsu S.</u>	Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice.	Bio Med Res Int	2013	974819	2013
Yamashita T, Chai H L, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, <u>Muramatsu S</u> , 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
Kashiwakura Y, <u>Ohmori T</u> , Mimuro J, <u>Madoiwa S</u> , Inoue M, <u>Hasegawa M</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y.</u>	Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector.	Haemophilia	20	e40-e44	2014
Watanabe H, Kikkawa I, <u>Madoiwa S</u> , Sekiya H, Hayasaka S, <u>Sakata Y.</u>	Changes in Blood Coagulation-Fibrinolysis Markers By Pneumatic Tourniquet During Total Knee Joint Arthroplasty With Venous Thromboembolism.	J Arthroplasty	29	569-573	2014
Sakata A, <u>Ohmori T</u> , Nishimura S, Suzuki H, <u>Madoiwa S</u> , Mimuro J, Kario K, <u>Sakata Y.</u>	Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice.	Thromb J	12	1	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koyama K, <u>Madoiwa S</u> , Nunomiya S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, <u>Ohmori T</u> , Mimuro J, <u>Sakata Y</u> .	Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study.	Criti care	18	R13	2014
Wada H, D. I. C. s. J apanese Society of Thrombosis Hemostasis, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, <u>Madoiwa S</u> , Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y.	Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan"	Thromb Res	134	924-925	2014
Sanada Y, Sasanuma H, Sakuma Y, Morishima K, N. Kasahara Y, Kaneda Y, Miki A, Fujiwara T, Shimizu A, Hyodo M, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Ihara Y, Urahashi T, <u>Madoiwa S</u> , Mimuro J, K. Mizuta, Yasuda Y.	Living donor liver transplantation from an asymptomatic donor with mild coagulation factor IX deficiency: report of a case.	Pediatr Transplant	18	E270- E273	2014
Mimuro J, <u>Mizukami H</u> , <u>Shima M</u> , Matsushita T, <u>Taki M</u> , Muto S, Higasa S, Sakai M, <u>Ohmori T</u> , <u>Madoiwa S</u> , <u>Ozawa K</u> , <u>Sakata Y</u> .	The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals.	J Med Virol	86	1990- 1997	2014
Chitlur M, Rivard GE, Lillicrap D, Mann K, <u>Shima M</u> , Young G: Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.	Recommendations for performing thromboelastography/thromboelastometry in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH	Journal of Thrombosis and Haemostasis	12 (1)	103-106	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, <u>Shima M</u> , Banno F, Miyata T, Sugimoto M	Contribution of ADAMT S13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation	Haematologica	99 (10)	e211-e213	2014
Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, <u>Shima M</u> , Yamanka S, Sugimoto M, Hotta A.	Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A	PLoS One	9(8)	e104957	2014
<u>Shima M</u> , Hermans C, de Moerloose P	Novel products for haemostasis	Haemophilia	20 (4)	29-35	2014
Yada K, Nogami K, Kawamura T, Minami H, <u>Shima M</u> .	The first case of interchromosomal inversion in Japanese haemophilia A patients	Haemophilia	20	e399-e443	2014
Matsumoto T, Nogami K, <u>Shima M</u> .	Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors	Journal of Thrombosis and Haemostasis	12 (9)	1503-1512	2014
Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, <u>Shima M</u> .	Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor	International Journal of Hematology	99 (5)	577-587	2014
Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, <u>Shima M</u> .	Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden	Blood	123 (15)	2420-2428	2014
Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, <u>Shima M</u> .	Optimal monitoring of bypass therapy in hemophilia A patients with inhibitors by the use of clot waveform analysis	Journal of Thrombosis and Haemostasis	12 (3)	355-362	2014



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isshiki M, Zhang X, Sato H, Ohashi T, <u>Inoue M</u> , Shida H.	Effects of different promoters on the virulence and immunogenicity of a HIV-1 Env-expressing recombinant vaccinia vaccine.	Vaccine	32(7)	839-845	2014
Nagao A, Hanabusa H, <u>Takedani H</u> .	Continuous infusion of rFVIIa during surgery in a FVII-deficient patient: a case report from Japan.	Haemophilia	20(1)	e110-e112	2014
Goto M, <u>Takedani H</u> , Haga N, Kubota M, Ishiyama M, Ito S, Nitta O.	Self-monitoring has potential for home exercise programmes in patients with haemophilia.	Haemophilia	20(2)	e121-e127	2014
Shimokawa A, <u>Takedani H</u> .	Rehabilitation improved walking ability for three haemophilia patients with inhibitors.	Haemophilia	20(3)	e222-e224	2014
Miyamoto Y, Iida A, Sato K, <u>Muramatsu S</u> , 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	2014
Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, <u>Muramatsu S</u> , Nabeshima T, Uno K, Nitta A.	Overexpression of Shat1/Nat81, 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
Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, Shimizu J, Shimizu S, Tamura T, <u>Muramatsu S</u> , Okazawa H.	HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant a taxin-1 knock-in mice.	EMBO Mol Med	7(1)	78-101	2014

## 研究成果の刊行物・別刷

# Porcine Model of Hemophilia A

Yuji Kashiwakura<sup>1\*</sup>, Jun Mimuro<sup>1\*</sup>, Akira Onishi<sup>2,3</sup>, Masaki Iwamoto<sup>2,3</sup>, Seiji Madoiwa<sup>1</sup>, Daiichiro Fuchimoto<sup>2</sup>, Shunichi Suzuki<sup>2</sup>, Misae Suzuki<sup>2</sup>, Shoichiro Sembon<sup>2</sup>, Akira Ishiwata<sup>1</sup>, Atsushi Yasumoto<sup>1</sup>, Asuka Sakata<sup>1</sup>, Tsukasa Ohmori<sup>1</sup>, Michiko Hashimoto<sup>3</sup>, Satoko Yazaki<sup>3</sup>, Yoichi Sakata<sup>1</sup>

**1** Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi-ken, Japan, **2** Transgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki-ken, Japan, **3** Advanced Technology Development Team, Prime Tech Ltd., Tsuchiura, Ibaraki-ken, Japan

## Abstract

Hemophilia A is a common X chromosome-linked genetic bleeding disorder caused by abnormalities in the coagulation factor VIII gene (*F8*). Hemophilia A patients suffer from a bleeding diathesis, such as life-threatening bleeding in the brain and harmful bleeding in joints and muscles. Because it could potentially be cured by gene therapy, subhuman animal models have been sought. Current mouse hemophilia A models generated by gene targeting of the *F8* have difficulties to extrapolate human disease due to differences in the coagulation and immune systems between mice and humans. Here, we generated a porcine model of hemophilia A by nuclear transfer cloning from *F8*-targeted fibroblasts. The hemophilia A pigs showed a severe bleeding tendency upon birth, similar to human severe hemophiliacs, but in contrast to hemophilia A mice which rarely bleed under standard breed conditions. Infusion of human factor VIII was effective in stopping bleeding and reducing the bleeding frequency of a hemophilia A piglet but was blocked by the inhibitor against human factor VIII. These data suggest that the hemophilia A pig is a severe hemophilia A animal model for studying not only hemophilia A gene therapy but also the next generation recombinant coagulation factors, such as recombinant factor VIII variants with a slower clearance rate.

**Citation:** Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, et al. (2012) Porcine Model of Hemophilia A. PLoS ONE 7(11): e49450. doi:10.1371/journal.pone.0049450

**Editor:** Christopher B. Doering, Emory University School of Medicine, United States of America

**Received:** April 10, 2012; **Accepted:** October 9, 2012; **Published:** November 28, 2012

**Copyright:** © 2012 Kashiwakura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (20591155, 21591249 and 21790920) and the Support Program for Strategic Research Infrastructure from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and Health, Labour and Science Research Grants for Research on HIV/AIDS and Research on Intractable Diseases from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** MI, MH, and SY are employees of Prim Tech Ltd., the developer of Piezo micromanipulators for nuclear transfer, and are collaborative with National Institute of Agrobiological Sciences and Jichi Medical University for basic research. Other authors declare no conflict of interest. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: mimuro-j@jichi.ac.jp

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Hemophilia A is an inherited X-linked bleeding disorder caused by abnormalities in the coagulation factor VIII (FVIII) gene (*F8*). The genetic abnormalities result in FVIII deficiency, which in turn creates a bleeding diathesis, such as life-threatening bleeding in the brain and harmful bleeding in joints and muscles. The morbidity of hemophilia A is one in 5,000 male live births [1]. The current standard therapy for hemophilia A is intravenous injection of recombinant FVIII or monoclonal antibody-purified FVIII from plasma. Prophylactic administration of FVIII is effective in preventing harmful bleeding; however, hemophilia A patients are still not free from the risks of life-threatening intracranial and other harmful bleeding [1] [2]. In addition, severe hemophilia A patients develop antibody against FVIII (inhibitor) upon infusion of FVIII frequently [1].

Gene therapy, that enables sustained elevation of coagulation factor levels, will provide the next-generation therapy for hemophilia [1,3,4]. In fact, gene and cell therapy for hemophilia clinical trials were conducted. Compared with clinical trials of the gene therapy for hemophilia B [5,6], gene and cell therapies for

hemophilia A have had limited successes [7,8]. Upcoming therapeutic alternatives for hemophilia A are FVIII variants with a slower clearance rate. Therapeutic factors, such as recombinant activated factor VII and plasma-derived activated prothrombin complex, are used for the treatment of hemophilia A patients with inhibitors, and the second generation therapeutic factors for hemophilia A patients with inhibitors are also currently under development. For studying next-generation therapeutics, good animal models are required. Hemophilia A mice generated by targeted ablation of mouse *F8* [9] have been the mainstay for assessment of hemophilia A gene therapy and evaluation of FVIII variants. However, there are significant species differences between mice and humans. For example, the half-life of human FVIII in the mouse circulation is very short, making it difficult to analyze the efficacy of human FVIII-expressing vectors for gene therapy or novel FVIII variants. As alternatives, there are natural hemophilia A dogs and hemophilia A sheep. Hemophilia A dogs have been used for gene therapy studies [10,11,12]. Hemophilia A sheep would be an alternative model [13]. There may be interspecies differences, such as body size, physiology, disease

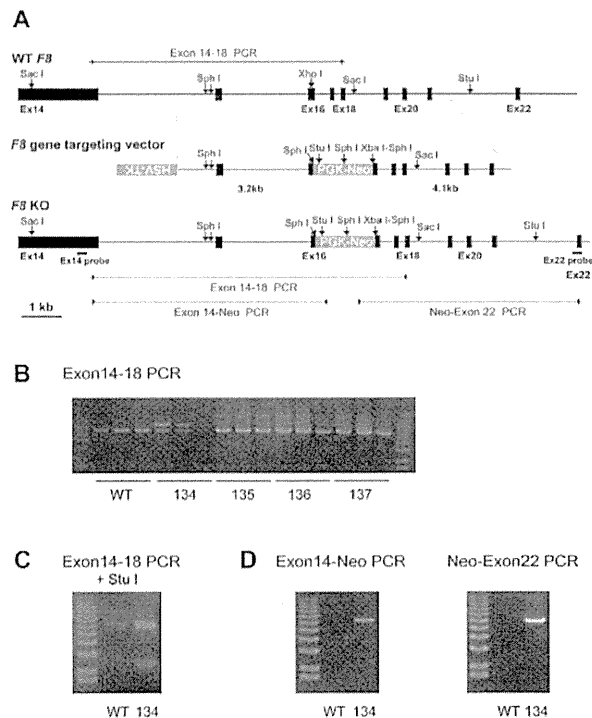
progression and chromosome structure homology, between these animal models and humans.

Pigs are excellent biomedical models of human diseases [14,15]. The porcine blood coagulation system is very similar to that in humans, because of the high homology between the coagulation factor amino acid sequences [16,17,18]. In addition, porcine FVIII has been used to treat hemophilia A patients with FVIII inhibitors [19,20,21]. Therefore, the hemophilia A pig could be a good animal model to study the next-generation therapeutics for hemophilia A. Moreover, a miniature pig strain exists, and thus, cloned pigs could be downsized to an adequate size, approximately 20–30 kg in weight. For these reasons, we decided to generate hemophilia A pigs by cloning technology.

## Results

Firstly, we constructed a *F8* targeting vector (Figure 1A) and targeted *F8* in male porcine embryonic fibroblasts (PEF) with the *F8*-targeting vector as shown in Figure 1. The DNA fragment amplified from the non-transfected PEF DNA migrated at 6.5 kb on agarose gel electrophoresis, whereas two DNA fragments, migrating at 6.5 kb and 8.3 kb, were amplified from PEF colony 134. The 8.3 kb DNA was not amplified from genomic DNA of PEF colonies 135–137. The 8.3 kb fragment PCR-amplified from PEF colony 134 was cleaved into a 2.4-kb fragment and a 5.9-kb fragment by *Stu* I, whereas the PCR-amplified 6.5-kb DNA fragment was not susceptible to *Stu* I digestion. This supports that the PCR-amplified 8.3-kb fragment is derived from the *F8*-targeted genome because a *Stu* I recognition sequence present in the neo-resistant gene but not in the PCR amplified DNA fragment from the wild-type *F8*. The expected DNA fragments were amplified by PCR with Neo primers from genomic DNA from PEF colony 134, but not from wild-type genomic DNA (WT). PCR analysis of genomic DNA with three primer sets revealed a recombination event in *F8* of a colony, 134 (PEF-134). PEF-134 nuclei were then injected into enucleated oocytes. After an electrical pulse, the oocytes were transplanted into the oviduct of a female pig [22,23]. Transplantation of nucleus-transferred oocytes to the oviducts of female pigs was repeated four times. Three months later, a fetus was obtained by induced abortion. Dermal fibroblasts from this PEF-134-derived fetus (134-fetus) were isolated and cultured, and genomic DNA was isolated for analysis by PCR and by Southern blotting (Figure 2). The PCR amplified wild-type (WT) *F8* exon 14–18 fragment migrated at 6.5 kb, whereas the 8.3-kb targeted DNA fragment was amplified solely from 134-fetus fibroblast DNA. PCR-amplified DNA fragments using an *F8* exonic primer and a Neo primer were obtained only from 134-fetus DNA. The PCRs demonstrated insertion of the neomycin-resistance gene in *F8* (Figure 2A). Southern blotting showed that the 5' probe hybridized with the 8.1 kb DNA fragment of *Sac* I-digested wild-type DNA while the 5' probe hybridized with 9.9 kb DNA fragment of *Sac* I-digested 134-fetus DNA. Southern blotting with the 3' probe confirmed recombination in the *F8* gene in the 134-fetus genome because a *Sph* I recognition sequence and a *Xba* I recognition sequence located in the 3' end of the Neo resistant gene of the targeted allele (Figure 2B). Therefore, five transfers of fetal fibroblast nuclei to oocytes followed by oocyte transplantation were performed. Four females became pregnant and each produced a full-term delivery.

Four live offspring were obtained and PCR analysis and Southern blotting were carried out. As shown in Figure 3A, the 8.3 kb DNA fragments were PCR amplified from piglets DNA as same as that of 134-fetus (Figure 2). Similarly, Southern blotting of *Sac* I-treated and *Sac* I and *Stu* I-treated DNA of the piglets with



**Figure 1. *F8* targeting of porcine fetal fibroblasts (PEF).** (A) Schematic diagram of part of porcine *F8*, the positions of the restriction endonuclease sites, the *F8* targeting vector structure, and the targeted *F8* (*F8* KO) allele are shown. The neomycin-resistance gene (PGK-neo) was inserted in the exon 16 DNA fragment with deletion of a part of exon 16 and was flanked by two *F8* DNA fragments (5' arm: 3.2 kb; 3' arm: 4.1 kb) in *F8* targeting vector. The positions of PCR primers (arrowheads), expected amplified DNA fragments (bars), and restriction endonuclease sites used for the Southern blot analysis are indicated in the schema for *F8* KO. (B) *F8* exon 14–18 PCR on genomic DNA from non-transfected PEF (WT), PEF colony 134 (134), and three other PEF colonies (135–137) was shown. (C) The *F8* exon 14–18 PCR products were treated with *Stu* I and analyzed by agarose gel electrophoresis. (D) PCR analyses with two sets of primer pairs for exon 14 and the neomycin resistance gene and for the neomycin resistance gene and exon 22 were shown. doi:10.1371/journal.pone.0049450.g001

the 5' probe confirmed the recombination of *F8* of piglets and showed that each piglet had a single copy of the targeted *F8* (Figure 3, A & B). RT-PCR analysis revealed that FVIII mRNA was not detected in the liver of piglet #3 (Figure 3C). Analysis of the blood of piglets #3 and #4 confirmed that the FVIII level was severely decreased to less than 1%, using an activated partial thromboplastin time (APTT)-based coagulation assay for human FVIII (Table 1). Other coagulation factors were moderately decreased (Table 1). The levels of albumin and cholinesterase of these piglet blood were also measured as the references to study whether the decreased level of coagulation factors II, V, VII, IX, and X were specific or not. The albumin levels of piglet #3 and #4 were decreased significantly compared with the wild type piglets. However, the cholinesterase activities of piglets #3 and #4 were not decreased. The data suggested that synthesis of some proteins in the liver of the cloned piglets was altered. The precise mechanism of the moderately decreased levels of coagulation factors II, V, VII, IX, and X, and albumin was not elucidated in this study.