

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293237

研究課題名(和文) 自己細胞移植による次世代型血友病A治療の創出

研究課題名(英文) Establishment of the next generation treatment for hemophilia A by autologous cell implantation

研究代表者

嶋 緑倫 (Shima, Modori)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30162663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子、細胞治療においてウイルスベクターの全身投与は免疫学的副反応や細胞毒性をきたす危険性がある。我々はpiggyBack トランスポゾンベクターを用いたハイドロダイナミック法(HGD)による非ウイルス性遺伝子伝播法を確立した。血友病Aマウスモデルに本ベクターを用いて全長第VIII因子遺伝子の導入に成功した。その結果、免疫反応なしに第VIII因子が300日にわたって発現することを確認した。次に、血友病AイヌにおいてGFPあるいはFVIIIを発現piggy Backベクターを用いて肝標的HGDを行ったところ、肝4葉の70-80%の肝細胞が120日後も陽性であった。

研究成果の概要(英文)：In the current gene and cell-based therapy, there are concerns over the safety of the systemic delivery of conventional viral vectors such as adverse immunological reactions or virus-mediated cytotoxicity. We established non-viral hydrodynamic gene delivery (HGD) using piggyBack transposon vector. We tested the HGD in hemophilia A mouse model with the combination of non-viral piggyBack transposon vectors which can transfer the full-length FVIII transgene. As a result, we confirmed the sustained FVIII expression for over 300 days without any immune responses. Next, we focused on an assessment of the safety of liver-target HGD of the piggyBack transposon vector in dogs. Liver-targeted HGD was performed using piggyBack transposon vector expressing either GFP or FVIII. By histological examination of liver samples, approximately 70-80% of hepatocytes in all 4 lobes were positive with GFP 120 days after HGD.

研究分野：小児血液学

キーワード：hemophilia A gene therapy piggyBack transposon

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は血液凝固第 VIII 因子(FVIII)の量的・質的異常による先天性出血性疾患である。出血部位は主として関節内が多く、反復すると非可逆的な血友病性関節症を発症するため患者 QOL は著しく障害される。そればかりでなく、筋肉や頭蓋内出血などの重篤な出血もしばしば認めることがある。現在我が国では、血漿由来あるいは遺伝子組換え FVIII 製剤の定期補充療法が行われており、患者 QOL は格段に改善された。しかし確実に出血を防ぐためには最低週 3 回 FVIII 製剤を経静脈投与することが必要で、いまだに患者や家族の身体的・心理的負担には絶大なものがある。また平成 22 年度月額高額医療費の上位 10 件中 9 件(2000 万円以上)が血友病で占められていることからわかるように、製剤は高価であり、我が国の医療財政を圧迫している。さらに、過去に血液製剤に起因する肝炎ウイルスや HIV 感染症が大きな社会問題となった我が国の歴史的背景からもより安全かつ有効な新規治療法の確立が求められている。

最近、血友病 B 患者に対しアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた遺伝子治療の臨床試験が欧米で実施された。その結果、一定期間凝固第 IX 因子(FIX)の発現は確認されたものの、ベクターや発現蛋白に対する免疫応答が発生し、肝臓などに機能障害が認められるなど安全性は確立されていない。血友病 A に対するウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、導入する遺伝子である FVIII cDNA が 7kb と FIX と比べ非常に大きいため、臨床応用をめざした研究の進展には至っておらず、新たな戦略が必要である。

次世代の血友病 A 治療の必要条件として 1) 患者に対する侵襲が軽微である、2) 免疫応答を回避でき、仮に不測の事態には治療が中断できる、3) 長期間治療効果が持続する、の 3 つが挙げられる。我々は、これらすべてを満たす治療法のひとつとして、自己細胞に ex vivo で FVIII 遺伝子を導入する細胞治療が有効と考え研究を行った。

2. 研究の目的

血友病 A 患者とその家族の身体的・心理的負担をなくし、QOL を改善することが可能となる新規治療法を血友病 A 実験モデルで確立し、臨床展開に直結させることを目標とする。

3. 研究の方法

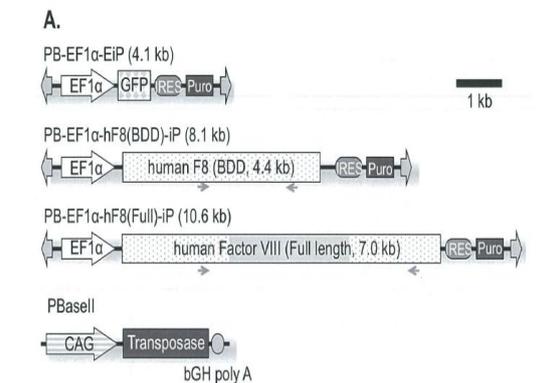
1. *piggyBac* ベクターによる血友病 A 患者 iPS 細胞への FVIII 遺伝子導入の検討

2. 血友病 A イヌ実験モデルを用いた FVIII 発現自己細胞移植による検討

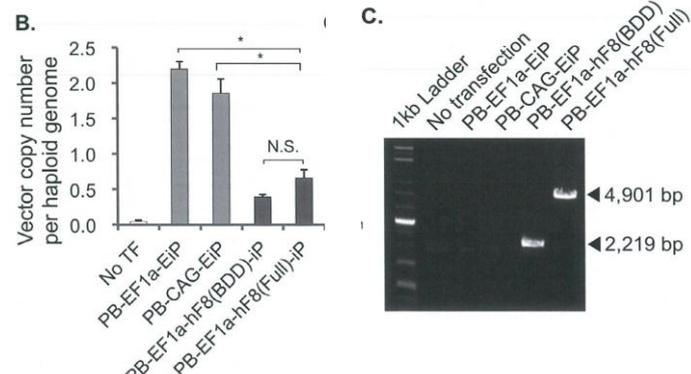
4. 研究成果

本研究では、全長で 7kb を超える巨大な FVIII 遺伝子を効率良く導入するために、*piggyBac* DNA トランスポゾンベクターを用いることで、ウイルスベクターを用いずに全長型の FVIII 遺伝子を導入することができるかどうかを検証した。

まず、*piggyBac* ベクターにサイズの異なる様々な遺伝子を搭載し、ヒト腎臓由来培養細胞 293T 細胞へ遺伝子導入を行った。搭載する遺伝子のサイズは小さいほど導入効率が高かったが、

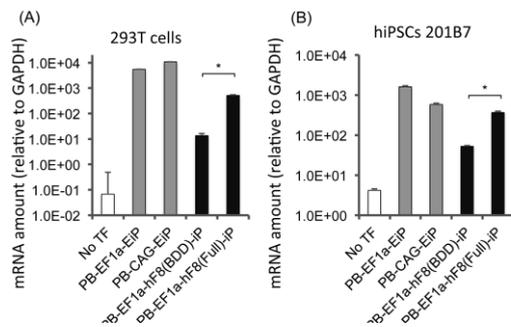


ヒト全長型の FVIII 遺伝子を搭載すると、B ドメイン

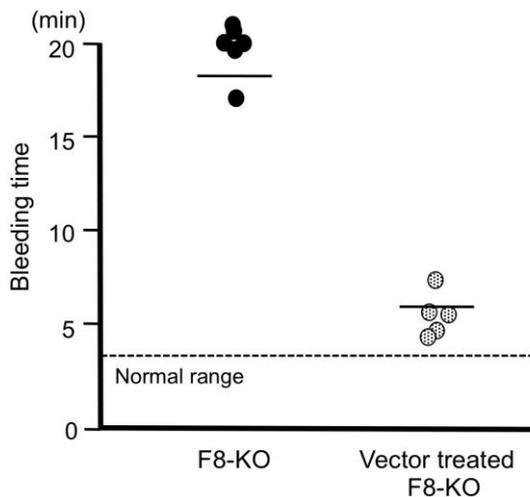


欠損型の FVIII 遺伝子と同程度に遺伝子導入できることを確認した。

次に、B ドメイン欠損型の FVIII 遺伝子と、全長型の FVIII 遺伝子を 293T 細胞とヒト iPS 細胞それぞれへ導入して、遺伝子発現および分泌 FVIII タンパク質の活性を測定した。すると、B ドメイン欠損型に比べて全長型 FVIII 因子を導入した方が双方の細胞で遺伝子発現が高く、293T 細胞では FVIII タンパク質の活性も高いことが観察された。しかしながら、ヒト iPS 細胞では FVIII タンパク質の活性は低く、タンパク質分泌経路が未発達であることが示唆された。



そして、全長型 FVIII 遺伝子を搭載した *piggyBac* ベクターを、血友病 A モデルマウスにハイドロダイナミック注入法を用いて導入した。その結果、300 日以上にわたって活性を持ったヒト FVIII タンパク質が血中に分泌されていることを確認しました。また、*piggyBac* トランスポゾンベクターの注入による遺伝子導入を4週間おきに3回行う事で、さらに FVIII タンパク質の分泌量を増強することができることも確認した。最後に、血友病 A モデルマウスの尾静脈出血時間を測定したところ、ベクター注入が無いと平均 18 分程度出血が続いていましたが、*piggyBac* ベクター注入により遺伝子導入したマウスでは、平均6分ほどで止血し、血液凝固機能が回復していることが確認された。



以上の結果は、学会発表の他、PLOS ONE 誌に掲載を行い、朝日新聞にも取り上げられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

2015

1. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, Fukazawa N, Kawanishi T, Kobayashi S, Shima M. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood*. 査読有, 2016; 127(13): 1633-41. doi: 10.1182/blood-2015-06-650226.

2. Shima M. [New hemophilia treatment employing a bispecific antibody to factors IXa and X]. *Rinsho Ketsueki*. 査読有, 2015; 56(6): 623-31. doi: 10.11406/rinketsu.56.623.

3. Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, Bevan DH, Mant T, Shima M, Engl W, Dyck-Jones J, Fuerlinger M, Patrone L, Ewenstein B, Abbuehl B. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood*. 査読有, 2015; 126(9): 1078-85. doi: 10.1182/blood-2015-03-630897.

4. Nakamura Y, Murata M, Takagi Y, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Kitazawa J, Shima M, Kojima T. SVA retrotransposition in exon 6 of the coagulation factor IX gene causing severe hemophilia B. *Int J Hematol*. 査読有, 2015; 102(1): 134-9. doi: 10.1007/s12185-015-1765-5.

5. Nogami K, Shima M. Phenotypic heterogeneity of hemostasis in severe hemophilia. *Semin Thromb Hemost*. 査読有, 2015; 41(8): 826-31. doi: 10.1055/s-0034-1395349.

2014

1. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 査読有, 2014; 124(20): 3165-71. doi: 10.1182/blood-2014-07-585737.

2. Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka 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*. 査読有, 2014; 9(8): e104957. doi: 10.1371/journal.pone.0104957.

3. Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*. 査読有, 2014; 99(10): e211-3. doi: 10.3324/haematol.2014.109512.

4. Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, and Hotta A. Delivery of full-length Factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. PLOS ONE. 査読有, 2014; 9 (8): e104957
doi: 10.1371/journal.pone.0104957.

2013

1. Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, 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. 査読有, 2013; 8(12): e83280.
doi: 10.1371/journal.pone.0083280.

2. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. Thromb Haemost. 査読有, 2013; 110(4): 761-8.
doi: 10.1160/TH13-04-0345.

3. 嶋 緑倫. 血友病ワールド. 臨床血液. 査読有, 2013; 54(8): 736-43.
doi.org/10.11406/rinketsu.54.736

4. Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. Br J Haematol. 査読有, 2013; 163(1): 104-11.
doi: 10.1111/bjh.12473.

5. Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. Thromb Haemost. 査読有, 2013; 110(2): 316-22.
doi: 10.1160/TH13-02-0159.

6. 嶋 緑倫. 血友病. 臨床血液. 査読有, 2013; 54(2): 189-97.
doi.org/10.11406/rinketsu.54.189

7. Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. Thromb Haemost. 査読有, 2013; 109(6): 1007-15.
doi: 10.1160/TH12-10-0762.

[学会発表] (計 7件)

2016

1. 堀田秋津. iPS細胞を用いた血友病治療戦略 第7回「北関東へモフィリア研究会」栃木県 2016/2/19

2015

1. Noda M, N, Matsui H, Matsunari Y, Ochi S, Fukuoka Y, Sato T, Anai H, Kichikawa K, Nakayama M, Hotta A, Shima M, Sugimoto M. Novel Gene Therapy Strategy for Hemophilia a By Hydrodynamic Gene Delivery Combined with Non-Viral Piggybac Transposon Vector in Canine Model ; The 57th American Society of Hematology, Orlando, USA, 2015/12/7

2014

1. Matsui H, Noda M, Utoh R, Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Sugimoto M, Okano T. Successful long-term phenotypic correction of hemophilia A mice by multi-layered endothelial cell sheet transplantation; The American Society of Gene and Cell Therapy 17th Annual Meeting, Washington DC, USA, 2014/5/23

2. Shima M. Bi-specific antibodies as FVIII mimetics in hemophilia; 60th Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) / ISTH, Milwaukee, USA, 2014/6/25

3. Shima M. New concepts in hemophilia therapy (bi-specific antibody mimicking VIII); The 8th Congress of Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, Hanoi, Vietnam, 2014/10/11

4. 堀田秋津. 血友病 A に対する新規遺伝子/細胞治療戦略～トランスポゾンベクターによる遺伝子治療; 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪市, 2014/5/30

2013

1. 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, 2013/10/11

[図書] (計 2件)

1. 堀田秋津, 石田賢太郎, 佐伯涼太. 文光堂 病理と臨床, 2015 33(6), 126(622-626)

2. 堀田秋津. ニューサイエンス社 細胞 2014 46(5), 50(220-224)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5件)

1. 名称：FVⅢの反応性を測定する方法
発明者：嶋緑倫、野上恵嗣、添田哲弘（中外製薬株式会社）、北澤剛久（中外製薬株式会社）
権利者：奈良県立医科大学、中外製薬株式会社
種類：特許
番号：特願 2014-196974（日本）、PCT/JP2015/076848（PCT）第 104131371 号（台湾）、20150103102（アルゼンチン）
出願年月日：2014/9/26（日本）、2015/9/24（PCT）2015/9/23（台湾）、2015/9/25（アルゼンチン）
国内外の別：国内、国外
2. 名称：血液検体を判定するための方法、システム及びコンピュータプログラム、並びに血液検体分析装置
発明者：嶋緑倫、野上恵嗣、田渕有香（シスメックス株式会社）、黒野浩司（シスメックス株式会社）
権利者：奈良県立医科大学、シスメックス株式会社
種類：特許
番号：特願 2014-257531（日本）、14/969,698（アメリカ）
出願年月日：2014/12/19（日本）、2015/12/15（アメリカ）
国内外の別：国内、国外
3. 名称：凝固第 VIII 因子の複合体形成能に関する情報の取得方法および試薬キット
発明者：嶋緑倫、野上恵嗣、矢田弘史、熊野穰（シスメックス株式会社）、新井信夫（シスメックス株式会社）
権利者：奈良県立医科大学、シスメックス株式会社
種類：特許
番号：特願 2015-114785（日本）
出願年月日：2015/6/5（日本）
国内外の別：国内
4. 名称：血液検体の凝固能の評価方法、並びにその方法に用いるための試薬、試薬キット及び装置
発明者：嶋緑倫、野上恵嗣、松本智子、北澤剛久（中外製薬株式会社）、添田哲弘（中外製薬株式会社）、池田有香（シスメックス株式会社）
権利者：奈良県立医科大学、中外製薬株式会社、シスメックス株式会社
種類：特許
番号：特願 2015-089865（日本）、PCT/JP2016/060566（PCT）
出願年月日：2015/4/24（日本）、2016/3/30（PCT）
国内外の別：国内

5. 名称：血液凝固第 VIII 因子（FVIII）の機能を代替する多重特異性抗原結合分子を含有する、血液凝固第 XI 因子（FXI）異常症の予防および／または治療に用いられる医薬組成物
発明者：嶋緑倫、野上恵嗣、南博明
権利者：奈良県立医科大学、中外製薬株式会社
種類：特許
番号：特願 2015-089709
出願年月日：2015/4/24（日本）
国内外の別：国内

〔その他〕

1. 血液検体を判定するための方法、システム及びコンピュータプログラム、並びに血液検体分析装置
①刊行物：日本検査血液学会雑誌 第 15 巻 学術集会号 第 S154 頁
発行元：日本検査血液学会
発効日：2014 年 6 月 20 日
学会：第 15 回 日本検査血液学会学術集会
開催日：2014 年 7 月 21 日
2. 凝固第 VIII 因子の複合体形成能に関する情報の取得方法および試薬キット
①集会名：56th ASH Annual Meeting and Exposition
開催場所：米国、サンフランシスコ、Moscone Center、West Building、Level 1
開催日：2014 年 12 月 7 日（現時時間）
②刊行物：日本血栓止血学会誌 Vol.26 2015 No.2
学会：第 37 回日本血栓止血学会学術集会
会期：2015 年 5 月 21 日～5 月 23 日
6. 研究組織
(1) 研究代表者
嶋 緑倫（SHIMA, Midori）
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30162663
- (2) 研究分担者
松井 英人（MATSUI, Hideto）
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00571027
- (3) 研究分担者
堀田 秋津（HOTTA, Akitsu）
京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：50578002