

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) エイズ対策実用化研究事業  
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名： (日本語) 血友病とその治療に伴う種々の合併症克服に関する研究  
(英語) A Research to Overcome Complications Associated with Hemophilia Treatment

研究開発担当者 (日本語) 自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門・教授・大森 司  
所属 役職 氏名： (英語) Tsukasa Ohmori, MD, PhD, Professor, Department of Biochemistry, Jichi Medical University School of Medicine

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 血友病遺伝子治療法の開発・研究総括  
開発課題名： (英語) Development of Gene Therapy for Hemophilia・Study Leader  
研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門・教授・大森 司  
所属 役職 氏名： (英語) Tsukasa Ohmori, MD, PhD, Professor, Department of Biochemistry, Jichi Medical University School of Medicine

分担研究 (日本語) 血友病遺伝子治療法の開発と改良  
開発課題名： (英語) Improvement of Gene Therapy Approaches for Hemophilia  
研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学医学部・客員教授・坂田洋一  
所属 役職 氏名： (英語) Yoichi Sakata, Visiting Professor, Jichi Medical University School of Medicine

分担研究 (日本語) 血友病に対する治療効果評価系の確立と最適化  
開発課題名： (英語) Establishment and optimization of evaluation system for hemophilia therapy  
研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学分子病態治療研究センター分子病態研究部・教授・西村 智  
所属 役職 氏名： (英語) Satoshi Nishimura, MD, PhD, Professor, Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University

分担研究 (日本語) 血友病に対する遺伝子治療法の開発と改良  
開発課題名： (英語) Improvement of gene therapy approaches for hemophilia  
研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部・教授・

水上浩明

所属 役職 氏名： (英 語) Hiroaki Mizukami, MD. PhD, Professor, Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University

分 担 研 究 (日本語) 血友病に対する遺伝子治療法の開発と改良

開 発 課 題 名： (英 語) Improvement of gene therapy approaches for hemophilia

研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部・客員教授  
小澤敬也

所属 役職 氏名： (英 語) Keiya Ozawa, Visiting Professor, Center for Molecular Medicine, Division of Genetic Therapeutics, Jichi Medical University

分 担 研 究 (日本語) 血友病遺伝子治療用 AAV ベクターの GMP 製造開発

開 発 課 題 名： (英 語) Development of GMP grade AAV vector manufacturing procedure for Hemophilia gene therapy

研究開発分担者 (日本語) タカラバイオ株式会社 バイオ産業支援事業部門本部長  
常務取締役 CDM センター長 峰野 純一

所属 役職 氏名： (英 語) Junichi Mineno, Managing Director, President of Bioindustry Business Unit, Takara Bio Inc.

分 担 研 究 (日本語) 臨床研究用候補製剤 (SIV ベクター) の GMP 製造技術開発

開 発 課 題 名： (英 語) Development of manufacturing process for clinical-grade SIV vector

研究開発分担者 (日本語) 株式会社 ID ファーマ 常務執行役員・事業本部長、井上 誠、

所属 役職 氏名： (英 語) Makoto INOUE, Managing Executive Officer, Division of Business Operations  
General Manager, ID pharma Co., Ltd.

分 担 研 究 (日本語) AAV ベクターの品質策定と治験計画の作成

開 発 課 題 名： (英 語) Quality control of AAV vectors and development of clinical protocol

研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学内科学講座神経内科学・特命教授・村松慎一

所属 役職 氏名： (英 語) Shin-ichi Muramatsu, Professor, Department of Neurology, Jichi Medical University  
School of Medicine

分 担 研 究 (日本語) 経門脈的肝選択的 AAV ベクター投与方法の確立

開 発 課 題 名： (英 語) Development of Administration method to Minimize the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody in the Liver

研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学 先端医療技術開発センター・准教授・菱川修司

所属 役職 氏名： (英 語) Shuji Hishikawa, Associate Professor, Center for Development of Advanced Medical Technology, Jichi Medical University School of Medicine

分 担 研 究 (日本語) 血友病に関連する遺伝子解析

開 発 課 題 名： (英 語) Genetic analysis related to hemophilia

研究開発分担者 (日本語) 東京医科大学臨床検査医学分野・講師・稲葉 浩

所属 役職 氏名： (英 語) Hiroshi Inaba, Lecturer, Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University

分 担 研 究 (日本語) 血友病関節手術に関する研究及び血友病患者QOL向上の為の調査研究  
開 発 課 題 名： (英 語) Questionnaire surveillance of quality of life in persons with hemophilia and evaluation of incidence of deep venous thrombosis after total knee replacement for patients with hemophilia

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医科学研究所附属病院関節外科・科長・講師・竹谷英之

所属 役職 氏名： (英 語) Hideyuki Takedani, Chief of department of joint surgery, Senior assistant professor, Department of Joint Surgery, IMSUT Hospital of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo

分 担 研 究 (日本語) 薬害HIV感染被害者・家族等の現状からみた、血友病に係る今後の課題及び課題克服への支援研究

開 発 課 題 名： (英 語) Support and Research Program on HIV-infected people with hemophilia and their families; development of sustainable life recovery resources on the hemophilia-related social conditions.

研究開発分担者 (日本語) 社会福祉法人 はばたき福祉事業団・事務局長・柿沼章子

所属 役職 氏名： (英 語) Akiko kakinuma, Secretary general, Social Welfare Corporation, Habataki Welfare Project

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文) 血友病は凝固第 VIII 因子 (FVIII)、あるいは第 IX 因子 (FIX) 異常による先天性出血性疾患である。過去に血漿製剤による HIV、HCV 感染被害が生じ、多くの問題を生んだ。本研究は、HIV 感染被害者を含む血友病患者の合併症克服のため、1) 遺伝子治療、2) インヒビター対策、3) QOL 調査研究による社会的課題解決を柱として研究を進めた。

**研究開発項目 1：血友病遺伝子治療法の開発** 血友病患者では出血の予防のために週に 2-3 回の血液凝固因子製剤の経静脈投与が必要である。遺伝子治療は血友病の治癒に結びつき、製剤投与の必要性がなくなるため、患者 QOL や医療経済に対する利点は極めて大きい。

- 1) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター：AAV8 ベクターが欧米のヒト血友病 B を対象とした臨床研究で用いられているが、AAV8 の利用には特許料が発生することが障壁となる。本年度は AAV8 ベクターと同様の効果が認められる血清型 X を同定した (大森、水上、坂田、小澤、村松)。今後、この血清型を用いて治験を目指す。先行している AAV8 ベクターを用いた検討では、サルで単回投与によって 8 年以上にわたる治療効果、安全性を確認した。AAV を用いた治験には大量のベクター製造が必要であるため、パキキュロウイルスによるベクター産生を行う。ベクターの作製条件を最適化し、臨床用の current Good Manufacturing Process (GMP レベルの AAV ベクターの品質基準) を策定している (峰野、村松)。AAV ベクターを用いた治療は抗 AAV 中和抗体によって阻害される。本抗体が弱陽性のブタを用いて、静脈投与に遺伝子治療の効果を阻害する閾値を同定した (大森、西村、水上、菱川)。また、ブタなど大動物における遺伝子導入率が発光イメージングにより可視化でき、マイクロレベルではフィブリン血栓形成の動態を捉えるシステムを開発した (西村)。これらの解析法の開発により、遺伝子治療の効果の定量化が可能となった。
- 2) サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター：過去に、凝固因子強発現間葉系幹細胞の関節内投与が、QOL を阻害する血友病性関節症の有効な治療となる事をマウス実験で示した。サル骨髄から間葉系幹細胞を分離・培養し、SIV ベクターを用いて、血液凝固第 VIII 因子を発現させた。5 頭のサルから、間葉系幹細胞を分離し、SIV ベクターを感染させた後に膝関節に投与をおこなった (大森、坂田、水上)。本年度は肉眼での観察において、局所の腫瘍化をみとめず、かつ血液検査値に異常のないことを確認した。SIV の製造法、精製法・製剤化法について検討した (井上)。
- 3) 新規治療：CRISPR/Cas9 を AAV ベクターに応用し、血友病 B マウスの出血傾向を改善させることに成功した (投稿中) (大森、水上)。ゲノム編集の治療効果は、一回の投与で仔から成マウスまで持続するため、小児期での遺伝子治療が可能となる。さらに細胞増殖による AAV ゲノムの希釈は、遺伝子治療の安全性担保の面でも重要である。本手法は、特許出願を行った特願 2017-004198)。今後は、サルを用いた POC 取得を目指す。血友病遺伝子変異を同定、ゲノム編集部位を同定するための次世代シーケンシング法を開発し、実際の血友病患者のゲノム診断に応用している (稲葉)。

**研究開発項目 2：インヒビター対策（嶋）：**血友病患者に凝固因子製剤を投与すると同種抗体（インヒビター）が生じ、以後の止血を困難にする。インヒビター発症機序の解明、制御法の開発は極めて重要である。

- 1) 前向きコホート研究：我が国初の血友病患者を対象とした前向きコホート研究 J-HIS2 を推進した（計 330 症例）。インヒビター発症は 20%に認め、定期補充療法群がオンデマンド群に比し、インヒビター発生が少なかった。遺伝子解析では、血友病 A インヒビター発症例に Nu11 変異が多かった。本コホートのデータが集積されることで、実臨床の実態、インヒビター発生要因が明らかになると期待される。
- 2) インヒビター症例からの新規知見：FVIII 変異アミノ酸は代表的な複数の HLA タイプに対して高い抗原提示能をもつことが知られている。本研究では遺伝子解析を行っているが、インヒビター発症症例のミスセンス変異は、そのような代表的な HLA タイプに対して高い抗原提示能を有すると知られている変異例と一致した。また、インヒビターのエピトープ部位を解析し、変異部位とエピトープが異なる症例も存在することがあり、変異により分子の立体表面構造が変化して抗原性が発現したことが立証された。これは、新たなインヒビター発現メカニズムを示すもので、今後さらに多数例のインヒビターのエピトープ解析が必要である。

**研究開発項目 3：患者 QOL 改善のための調査研究** 全国の血友病患者を対象とした QOL 調査を行い、時代に即した支援ニーズを抽出し、また、保因者・血友病家系女性に対して、総合的な社会支援環境基盤を構築することで、研究の双方向性を確立することが目的である。

- 3) QOL アンケート調査（竹谷）：本年度回収した 753 件のアンケートをもとに、血友病患者の QOL に関する一次解析を行った。今回の特徴点は、半減期延長製剤などの新薬と医療制度について聴取・解析をしたところである。8 割の方が、新薬情報に関心があると回答しており、関心の高さが伺える結果となった。医療制度については、一部の症例で医療費助成制度に関する情報や理解が乏しく、さらなる周知が必要であると考えられた。これらの結果を一次報告書としてまとめ、協力機関や患者会に配布するとともに、調査報告書を分担者のホームページにも掲載した。DVT 調査では 7 名の血友病整形外科手術患者がリクルートされ、2 名に無症候性の DVT が認められた。
- 4) 支援研究（柿沼）：保因者支援の実践として、昨年度に開発した準備性 e-ラーニング（アクセス数 1,240 件、相談件数 57 件）を実際に支援の場で利用した。これを利用して保因者支援を行うことで、個々の事例が抱える問題を整理・分析し、必要に応じて医療・法律・遺伝の専門家への紹介する、というテイラーメイド型個別支援が可能となった。支援後の対応について多職種による多角的な視点から分析し、支援展開の充実を図った。

（英文） Hemophilia is a congenital bleeding disorder caused by genetic mutations of coagulation factor VIII (FVIII) or IX (FIX). Large number of hemophiliacs had infected with HIV and HCV by the contaminated blood product used for treatment, leading to serious social problem. In this study, we aimed to overcome the complications associated with hemophilia treatment by following approaches; 1) Development of gene therapy, 2) Management of inhibitor (alloantibodies against coagulation factor), and 3) QOL survey by questionnaire and development of support method for carriers.

**Development of gene therapy:** Because of the extremely short half-life of factor concentrates, patients are required as frequently as 1-3 times a week. Gene therapy can provide permanent therapeutic effects with a single treatment to resolve the problems in current hemophilia care.

- 1) Adeno-associated virus (AAV) vector: Current clinical trials of gene therapy for hemophilia mainly employs AAV8 vector, however, it may require expensive licensing fee in our planning clinical trials. In this year, we identified other AAV serotype to show similar treatment effect with those by AAV8 vector in macaque (Ohmori, Mizukami, Sakata, Ozawa, Muramatsu). We also confirmed the maintenance of safety and efficacy for over 8 years in monkeys in the experiments with AAV8. We plan to apply baculovirus expression system to produce larger vector doses in hemophilia treatment (Mineno, Muramatsu). We are now formulating a current Good Manufacturing Process to optimize the production system. The treatment effects of AAV vector can be prevented by neutralizing antibodies against AAV capsid. We developed the imaging system to detect luminescence in larger animals, and have set the threshold to inhibit *in vivo* vector transduction using pigs (Ohmori, Nishimura, Mizukami, Hishikawa). In addition, we could succeed to detect dynamics of fibrin thrombus formation *in vivo* (Nishimura).
- 2) Simian Immunodeficiency virus (SIV) vector: Hemophilic arthropathy is the most important factors to determine QOL in hemophilia. We have developed a new cell therapy in which mesenchymal stem cells (MSCs) expressing FVIII using SIV vector are injected to the joint. In this year, we isolated autologous MSCs from monkey bone marrow, and transduced with SIV vector. The transduced MSCs were injected into knee joint of 5 monkeys, and confirmed the safety of the procedure by macroscopic examination (Ohmori, Mizukami). In addition, we optimized the process of production and purification of SIV vector to develop pharmaceutical formulation (Inoue).
- 3) Novel approaches: We applied AAV vector into CRISPR/Cas9, and succeeded to correct bleeding phenotypes of hemophilia B mice (submitted) (Ohmori, Mizukami). Notably, the therapy also cured neonate mice with haemophilia, which cannot be achieved with conventional gene therapy with AAV vector. We also developed the method to detect patient-specific mutation site by next generation sequencer, and have analysed the mutation in Japanese patients (Inaba).

**Management of inhibitor** (Shima): One of the most significant complication of treatment in hemophilia is the development of alloantibodies that inhibit FVIII activity (Inhibitor). The inhibitors abolish efficacy of FVIII

concentrates, thus replacement therapy become ineffective. The analysis to elucidate the mechanisms of the inhibitor development may lead to the development of new approaches to control the inhibitor.

- 1) Prospective cohort study: We conducted prospective cohort study enrolled newly-diagnosed hemophilia patients in Japan (J-HIS2). We have recruited total 330 patients, and found the inhibitor occurred 20% patients. The inhibitor significantly developed in the patients with on-demand treatment, compared with regular replacement therapy. Genetic analysis revealed that null mutation became the risk of the development of the inhibitor.
- 2) New insight from the analysis of inhibitor cases: We analyzed mutation of coagulation factor gene in our prospective cohort, and found that the missense mutation in cases which developed inhibitor contains high antigen-presenting activity against specific HLA types by in-silico analysis. Further, we analyzed epitope of alloantibodies, and found the epitope sometimes differed from mutation site. The alloantibodies recognized three-dimensional structure or surface localization changed due to the mutation.

#### **QOL survey and Development of support method for carriers**

- 1) QOL survey (Takedani): We collected 753 questionnaires from Japanese hemophilia patients, and primary analyzed the availability of new-developed preparation and social compensation for hemophilia in Japan. About 80% patients interested in new preparations, indicating the considerable interest and expectation. Although public funds pay all of cost for the care for hemophilia in Japan, a part of patients could not completely comprehend the system. These data are summarized as a primary report, and distributed to related hospitals and affiliates, and published in our Web site. We also recruited 7 hemophilia patients to DVT study in joint surgery, and diagnosed two asymptomatic DVT in perioperative period.
- 2) Development of support method for carriers (Kakinuma): We developed e-learning system for preparability acquisition for hemophilia carriers in last year (access number 1,240 cases, direct counselling 57 cases). To employ the system, the problems in each individual carrier could be clearly elucidated. We could adequately introduce a client to the specialist of medicine, law, and genetics, as required. This approach realized tailor-made support system for hemophilia carriers. We further analyzed support system from the multidirectional viewpoint by the many types of occupation, and are trying to improve the system.

### **III. 成果の外部への発表**

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 22 件)

1. 大森 司. 遺伝子修復, *Frontiers in Haemophilia*. 2016, 3(2): 77-88.
2. Hirata S, Murata T, Suzuki D, Nakamura S, Jono-Ohnishi R, Hirose H, Sawaguchi A, Nishimura S, Sugimoto N, Eto K. Selective Inhibition of ADAM17 Efficiently Mediates Glycoprotein Iba Retention During Ex Vivo Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Platelets. *Stem Cells Transl Med*. 2016.
3. Kurosaki F, Uchibori R, Mato N, Sehara Y, Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Sugiyama, Y., Kume, A.: Optimization of adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to the respiratory tract. *Gene Ther, in press*.
4. Takaji, M., Takemoto, A., Yokoyama, C., Watakabe, A., Mizukami, H., Ozawa, K., Onoe, H., Nakamura, K., Yamamori, T.: Distinct roles for primate caudate dopamine D1 and D2 receptors in visual discrimination learning revealed using shRNA knockdown. *Sci Rep*. 2016, 6:35809.
5. Isoo, N., Ohno, T., Isowaki, M., Fukuda, S., Murabe, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Mishina, M., Sakurai, M.: The decline in synaptic GluN2B and rise in inhibitory neurotransmission determine the end of a critical period. *Sci Rep*. 2016, 6:34196.
6. Kobayashi, M., Usui, F., Karasawa, T., Kawashima, A., Kimura, H., Mizushina, Y., Shirasuna, K., Mizukami, H., Kasahara, T., Hasebe, N., Takahashi, M.: NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep*. 2016, 6:26489.
7. Csikota, P., Fodor, A., Balázsfi, D., Pintér, O., Mizukami, H., Weger, S., Heilbronn, R., Engelmann, M., Zelena, D.: Vasopressinergic control of stress-related behavior: studies in Brattleboro rats. *Stress*. 2016, 19:349-361.

8. Nakata, M., Yamamoto, S., Okada, T., Darambazar, G., Okano, H., Ozawa, K., and Yada, T.: IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2016, 40(3): 425-433.
9. Muroi, K., Miyamura, K., Okada, M., Yamashita, T., Murata, M., Ishikawa, T., Uike, N., Hidaka, M., Kobayashi, R., Imamura, M., Tanaka, J., Ohashi, K., Taniguchi, S., Ikeda, T., Eto, T., Mori, M., Yamaoka, M., and Ozawa, K.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (JR-031) for steroid-refractory grade III or IV acute graft-versus-host disease: a phase II/III study. *Int. J. Hematol.* 2016, 103(2): 243-250.
10. Maeda, H., Fukuda, S., Kameda, H., Murabe, N., Isoo, N., Mizukami, H., Ozawa, K., Sakurai M.: Corticospinal axons make direct synaptic connections with spinal motoneurons innervating forearm muscles early during postnatal development in the rat. *J Physiol.* 2016, 594:189-205.
11. Hidema, S., Fukuda, T., Hiraoka, Y., Mizukami, H., Hayashi, R., Otsuka, A., Suzuki, S., Miyazaki, S., Nishimori, K.: Generation of *Oxtr cDNAHA-Ires-Cre* Mice for Gene Expression in an Oxytocin Receptor Specific Manner. *J Cell Biochem.* 2016, 117:1099-1111.
12. Kasahara, T., Takata, A., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, A., Mizukami, H., Kaneda, D., Ozawa, K., Kato T.: Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. *Mol Psychiatr.* 2016, 21:39-48.
13. Ninomiya, H., Obara, N., Chiba, S., Usuki, K., Nishiwaki, K., Matsumura, I., Shichishima, T., Okamoto, S., Nishimura, J., Ohyashiki, K., Nakao, S., Ando, K., Kanda, Y., Kawaguchi, T., Nakakuma, H., Harada, D., Akiyama, H., Kinoshita, T., Ozawa, K., Omine, M., and Kanakura, Y.: Interim analysis of post-marketing surveillance of eculizumab for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Int. J. Hematol.* 2016, 104(5): 548-558.
14. Santini, V., Almeida, A., Giagounidis, A., Gröpper, S., Jonasova, A., Vey, N., Mufti, G.J., Buckstein, R., Mittelman, M., Platzbecker, U., Shpilberg, O., Ram, R., Del Cañizo, C., Gattermann, N., Ozawa, K., Risueño, A., MacBeth, K.J., Zhong, J., Séguy, F., Hoenekopp, A., Beach, C.L., and Fenaux, P.: Randomized phase III study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with lower-risk non-del(5q) myelodysplastic syndromes and ineligible for or refractory to erythropoiesis-stimulating agents. *J. Clin. Oncol.* 2016, 34(25): 2988-2996.
15. Nagai, S. and Ozawa, K.: Clinical trial designs to obtain marketing authorization of drugs for haematological malignancy in Japan, the EU and the US. *Br. J. Haematol.* 2016, 174(2): 249-254.
16. Kitanaka, A., Takenaka, K., Shide, K., Miyamoto, T., Kondo, T., Ozawa, K., Kurokawa, M., Akashi, K., and Shimoda, K.: Splenic irradiation provides transient palliation for symptomatic splenomegaly associated with primary myelofibrosis: a report on 14 patients. *Int. J. Hematol.* 2016, 103(4): 423-438.
17. Alton EW, Beekman JM, Boyd AC, Brand J, Carlon MS, Connolly MM, Chan M, Conlon S, Davidson HE, Davies JC, Davies LA, Dekkers JF, Doherty A, Gea-Sorli S, Gill DR, Griesenbach U, Hasegawa M, Higgins TE, Hironaka T, Hyndman L, McLachlan G, Inoue M, Hyde SC, Innes JA, Maher TM, Moran C, Meng C, Paul-Smith MC, Pringle IA, Pytel KM, Rodriguez-Martinez A, Schmidt AC, Stevenson BJ, Sumner-Jones SG, Toshner R, Tsugumine S, Wasowicz MW, Zhu J. Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 2017, 72(2):137-147.
18. Kanazawa M, Ohba H, Harada N, Kakiuchi T, Muramatsu S and Tsukada H: Evaluation of 6-<sup>11</sup>C-methyl-*m*-tyrosine as a PET probe for presynaptic dopaminergic activity: a comparison PET study with β-<sup>11</sup>C-L-DOPA and <sup>18</sup>F-FDOPA in Parkinson disease monkeys. *J Nucl Med.* 2016, 57(2):303-308.

19. Ono S, Sato T and Muramatsu S: Freezing of gait in Parkinson's disease is associated with reduced 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tyrosine uptake in the locus coeruleus. *Parkinsons Dis*, 2016: Article ID 5430920, 5 pages, 2016.
20. Igarashi H, Koizumi K, Kaneko R, Ikeda K, Egawa R, Yanagawa Y, Muramatsu S, Onimaru H, Ishizuka T and Yawo H: A Novel Reporter Rat Strain That Conditionally Expresses the Bright Red Fluorescent Protein tdTomato. *PLoS One*. 2016, 11(5): e 0155687.
21. Higashida H, Yokoyama S, Tsuji C and Muramatsu S: Neurotransmitter release: vacuolar ATPase V0 sector c-subunits in possible gene or cell therapies for Parkinson's, Alzheimer's, and psychiatric diseases. *J Physiol Sci*.2016, 67(1):11-17.
22. Miyazaki Y, Du X, Muramatsu S and Gomez C M: A miRNA-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the *CACNA1A* second cistron. *Sci Transl Med*. 2016, 8(347):347ra94.
23. Taniguchi JB, Kondo K, Fujita K, Chen X, Homma H, Sudo T, Mao Y, Watase K, Tanaka T, Tagawa K, Tamura T, Muramatsu S and Okazawa H: RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair. *Hum Mol Genet*. 2016, 25(20):4432-4447.
24. 稲葉 浩, 血友病領域での次世代遺伝子解析. *日本血栓止血学会誌*. 2017, 28, 24-32.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing using an AAV8 Vector Improves Hemostasis in a Mouse Model of Hemophilia B in vivo, 口頭, Ohmori T, The 25<sup>th</sup>US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Maryland, 2017/3/9, 国外.
2. ひとめでわかる血栓症のいろは, 口頭, 大森 司, 第 94 回地域学術研究会 (黒須病院・バイエル薬品株式会社・塩谷郡市医師会) 2016/5/8, 国内.
3. 血友病遺伝子治療の可能性, 口頭, 大森 司, 奈良県立医科大学小児科学教室主催 特別講演, 2016/5/26, 国内.
4. 血友病遺伝子治療の現状と展望, 口頭, 大森 司, 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会 ミニシンポジウム 遺伝子治療 UP TO DATE, 2016/6/11, 国内.
5. 血友病遺伝子治療の現状と展望, 口頭, 大森 司, 第 38 回 日本血栓止血学会学術集会 教育講演, 2016/6/17, 国内.
6. 血友病遺伝子治療の可能性, 口頭, 大森 司, バクスアルタ Web 講演会, 2016/10/6, 国内.
7. DOACs Update 2016, 口頭, 大森 司, Werfen 血液凝固セミナー in Tokyo 2016, 2016/10/8, 国内.
8. 血友病治療をサイエンスから考える, 口頭, 大森 司, 日本血栓止血学会教育セミナー, 2016/ 10/ 30, 国内.
9. 血友病治療をサイエンスから考える, 口頭, 大森 司, 山形血液グループ研修会, 2016/ 12/ 2, 国内.
10. 静脈血栓症診断のための臨床検査のポイント、口頭, 大森 司, 静岡県東部血栓症研究会, 2017/ 2/ 10, 国内.
11. 生体分子イメージング, 口頭, 西村智, 第 41 回日本脳卒中学会総会, 2016/04/15, 国内.
12. 生体イメージングを用いた無麻酔・自由行動下での代謝研究, 口頭, 西村智, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/05/20, 国内.
13. 生体イメージングで見る血栓・炎症, 口頭, 西村智, 第 17 回日本分子脳神経外科学会 2016/08/26, 国内.
14. multi-scale fluorescent in vivo observation of thrombus formation, 口頭, 西村智, 第 89 回日

- 本生化学大会, 2016/09/25, 国内.
15. 4K/8K CMOS イメージングによるマルチスケール生体全細胞解析, 口頭, 西村智, 第54回日本生物物理学会大会, 2016/11/25, 国内
  16. Current Status of AAV-mediated Gene Transfer and Gene Therapy, 口頭, Mizukami, H. Adaptive Circuit Shift International Workshop on the Strategy for Neuroscience: Viral Vector Technology for Neural Circuit and Pathology Research, Okazaki, 2016/12/ 8-10, 国内.
  17. Duration of factor IX expression in macaques following AAV8-mediated liver transduction, ポスター, Mizukami, H., Ohmori, T., Uchibori, R., Saga, Y., Urabe, M., Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K. American Society of Gene and Cell Therapy 19th Annual Meeting, Washington DC, USA, 2016/5/ 4-7, 国外.
  18. AAV (adeno-associated virus) vector-mediated gene therapy for hereditary and non-hereditary diseases, 口頭, 小澤敬也, 第13回国際人類遺伝学会, 2016/4/5, 国内.
  19. MSCs (mesenchymal stem cells) for the treatment of severe acute GVHD and cancer, 口頭, Ozawa, K. The 9th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research , 2016/5/15, 国外.
  20. 間葉系幹細胞を用いた重症急性GVHDの治療, 口頭, 小澤敬也, 第37回日本炎症・再生医学会, 2016/6/16, 国内.
  21. MSC therapy for severe acute GVHD, 口頭, Ozawa K. CAR-T cells and its applications, 口頭, Ozawa, K. 6th Annual Updates on Hematology and Oncology, 2016/8/25-26, 国外.
  22. CD19-Targeted CAR-Expressing T-Cell Therapy for B-Cell Lymphoma , 口頭, Ozawa K. 2nd Annual PEGS Korea Summit, 2016/9/22, 国外.
  23. CAR (chimeric antigen receptor)-T Gene Therapy for B-cell Malignancies, 口頭, Ozawa K. The 7th Meeting of ACTO, 2016/11/11, 国外.
  24. Recombinant Sendai vaccine delivered mucosally induces Gag-specific functional T-cells or antibody responses in prime-boost regimens in humans, Nyombayire, J., Anzala, O., Gazzard, B., Karita, E., Bergin, P., Hayes, P., Kopycinski, J., Omosa-Manyoni, G., Jackson, A., Bizimana, J., Farah, B., Sayeed, E., Parks, C., Inoue, M., Matano, T., Gilmour, J., Lombardo, A., Fast, P., Laufer, D., Cox, J. and the S001 Study Team, HIV Research For Prevention (HIVR4P), 2016/10/17-21, Chicago, USA, 国外.
  25. Feasibility of Recombinant Sendai Virus Vector Mediated Sentinel Lymph Node Targeted Gene Transfer in an Orthotopic Nude Mouse Model of Head & Neck Squamous Cell Carcinoma, Tanaka Y., Araki, K., Tanaka, S., Miyagawa, Y., Suzuki, H., Kamide, D., Yamashita, T., Tomifuji, M., Ueda, Y., Inoue, M., Shiotani, A. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer, 2016/7/16-20, Seattle, USA, 国外.
  26. iPS 細胞作製用センダイウイルスベクター (CytoTune®-iPS) の開発, 口頭, 井上 誠, 日本線維筋痛症学会第8回学術集会, 2016/9/17-18, 東京, 国内.
  27. Gene Therapy for AADC Deficiency – clinical study in Japan. 口頭, Muramatsu S , 3<sup>rd</sup> International AADC 2-day Medical & Scientific Conference, 2016/5/14, London, 国外.
  28. FMT-PET analysis in gene therapy for AADC deficiency. Asari-Ono S, Nakajima T, Kojima K, Miyauchi A, Saitou J, Saga Y, Mizukami H, Taga N, Takeuchi M, Watanabe E, Ozawa K, Sato T, Kato M, Osaka H, Yamagata T and Muramatsu S , 口頭, 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, 2016/5/18, Kobe, 国内.



29. In vivo monitoring of AADC gene delivery by PET. 口頭, Muramatsu S 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, 2016/5/19, Kobe, 国内.
30. The second clinical study on AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. 口頭, Ando Y, Asari-Ono S, Nakajima T, Watanabe K, Saga Y, Mizukami H, Watanabe E, Sato T, Ozawa K and Muramatsu S , 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, 2016/5/19, Kobe, 国内.
31. 神経疾患の遺伝子治療. 口頭, 村松慎一, 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会, 2016/6/11, 自治医科大学. (ミニシンポジウム) 国内.
32. Gene therapy for AADC deficiency: toward a standard therapy. 口頭, Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Tseng SH, Muramatsu S and Byrne B, The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/7/28, Tokyo, 国内
33. Development and clinical application of gene therapy using AAV for child neurological diseases. 口頭, Yamagata T, Kojima K, Nakajima T, Miyauchi A, Mizukami H, Osaka H and Muramatsu S, The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/7/28, Tokyo, 国内.
34. Improved motor and cognitive function of Aromatic L-Amino acid Decarboxylase(AADC) deficient patients following gene therapy using the AAV2 vector. Kojima K, Miyauchi A, Nakajima T, Asari-Ono S, Saga Y, Mizukami H, Sato T, Muramatsu S, Osaka H and Yamagata T, The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/7/28, Tokyo, 国内.
35. Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Aoki S, FJimbo E, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T and Yamagata T, The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/7/28, Tokyo, 国内.
36. Gene therapy for central nervous system disorders. 口頭, Muramatsu S, The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/7/29, Tokyo, 国内.
37. パーキンソン病にウイルスベクターを用いた遺伝子治療は可能かーYES. 口頭, 村松慎一, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2016/10/7, 京都. 国内.
38. Gene therapy for neurodegenerative diseases. 口頭, Muramatsu S, European Society of Gene & Therapy, October 19, 2016, Florence. 国外.
39. FMT-PET による芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)欠損症に対する定位脳遺伝子治療の評価. 大貫良幸, 小野さやか, 中嶋剛, 小島華林, 斎藤順一, 多賀直行, 渡辺英寿, 小澤敬也, 佐藤俊彦, 平井真洋, 小坂仁, 川合健介, 山形崇倫, 村松慎一, 第 56 回日本定位・機能神経外科学会, 2017/1/28, 大阪. 国内.
40. 血友病遺伝子解析の進歩, 口頭, 稲葉 浩, 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 会長シンポジウム, 2016/6/17, 国内.
41. 骨髄移植を受けた血友病 A の解析から, 口頭, 稲葉 浩, 鈴木隆史, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸, 第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2016/6/18, 国内.
42. PS 欠乏症の病因遺伝子解析に対する次世代シーケンスの応用, ポスター, 一木昭人, 稲葉 浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸, 第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2016/6/18, 国内.
43. 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) による各種第 IX 因子製剤のモニタリングに関する検討, 口頭, 稲葉 浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸, 第 17 回日本検査血液学会学術集会, 2016/8/6, 国内.
44. The Genetic Analysis of Hemophilia A: The Application of Next-Generation Sequencing in the Analysis of Causative Variants Deep inside the Intron of the *F8* Gene, ポスター, Hiroshi Inaba, Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake, 58<sup>th</sup> American Society of

Hematology Annual Meeting & Exposition, 2016/12/3, 国外.

45. 第IX因子製剤の活性評価の現状と課題, 口頭, 稲葉 浩, 第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム, 2017/1/21, 国内.
46. 薬害H I V感染被害患者を支援対象者とした健康訪問相談に於ける支援機能 (第一報) 支援提供者である訪問看護師を対象としたフォーカスグループインタビュー調査, 口頭, 久地井寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 大平勝美, 第52回日本保健医療社会学会大会, 2016/05/14, 大阪, 国内.
47. 典型的なX連鎖劣性遺伝性疾患である血友病の保因者や血友病家系女性に向けたライフステージ支援プログラムの実践 (第一報) 当事者性獲得のための準備性支援 e-learning 教材の開発, ポスター, 柿沼章子, 久地井寿哉, 岩野友里, 大平勝美, 第25回日本健康教育学会学術大会, 2016/6/11, 沖縄, 国内.
48. 典型的なX連鎖劣性遺伝性疾患である血友病の保因者や血友病家系女性に向けたライフステージ支援プログラムの実践 (第二報) 調査データの活用による脆弱性事例のスクリーニング, 久地井寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 大平勝美, 沖縄, 第25回日本健康教育学会学術大会, 2016/6/11, 国内.
49. Pain, walking, and mobility play essential roles for activities of HIV/HCV-infected people with hemophilia in Japan. Poster. A.Kakinuma ,T. Kuchii, T.Iwano, K.Ohira,M.Ogane and J.Fujitani, WFH 2016, 2016/07/25, Orland.FL.USA. 国外.
50. Carrier Career Counseling: Development of e-learning educational tool for hemophilia carriers and women in hemophilia extraction to support acquiring readiness for change. Poster. A. Kakinuma , T.Kuchii , T. Iwano and K. Ohira. WFH 2016, 2016/07/26, Orland.FL.USA. 国外.
51. Life expectancy and lifetime inequalities by settled areas among hemophiliacs with HIV in Japan. Poster, T. Kuchii , A. Kakinuma , T. Iwano and K.Ohira. WFH 2016, 2016/07/27, Orland.FL.USA. 国外.
52. Influence of aging on QOL of HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. Poster, Miwa Ogane, Toshiya Kuchii, Shiomi Shibayama, Akiko Kakinuma, Katsumi Ohira, Megumi Shimada, Kazuko Ikeda Hiroyuki Gatanaga, and Shinichi Oka, WFH 2016, 2016/07/25, Orland.FL.USA. 国外.
53. 血液凝固因子製剤による薬害 HIV 感染被害者の生存曲線推移に関するヒストリカル分析, 口頭, 久地井寿哉,柿沼章子,岩野友里,大平勝美, 第75回日本公衆衛生学会総会, 2016/10/26,大阪, 国内.
54. 薬害H I V感染被害者の健康寿命仮説と生活機能尺度に基づく定量化の提案, 口頭, 久地井寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 大平勝美, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 鹿児島, 国内.
55. 薬害H I V感染被害者の長期慢性炎症による健康悪化 (第一報) ~健康特性の定量化, 口頭, 岩野友里, 久地井寿哉, 柿沼章子, 坂本玲子, 大平勝美,第30回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 鹿児島, 国内.
56. 薬害H I V感染被害者の長期慢性炎症による健康悪化 (第二報) ~対話的相談支援, 坂本玲子, 久地井寿哉, 柿沼章子, 岩野友里, 大平勝美,第30回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 鹿児島, 国内.
57. 薬害H I V感染被害者を対象とした健康訪問相談における支援効果に関する質的評価, 柿沼章子, 久地井寿哉, 岩野友里, 大平勝美,第30回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 鹿児島, 国内.
58. H I V感染血友病患者の就労・非就労に関する問題の抽出と支援の検討, 阿部直美, 大金美和, 久

地井寿哉, 岩野友里, 柿沼章子, 大平勝美, 池田和子, 湯永博之, 菊池嘉, 岡慎一, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 鹿児島, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 医学部・医師について, 大森 司, 骨太のリーダーを育成する高校生のための埼玉版リベラルアーツ事業, 2016/12/20, 国内.
2. 医学部はどんなところ? 医学研究の役割, 大森 司, 茨城県立水戸第一高校体験実習, 2016/8/9, 国内.
3. 医師を目指そう!, 大森 司, 自治医科大学高校生医師体験セミナー, 2016/8/4, 国内.
4. 復活する遺伝子治療の国内外の開発状況と今後の展望, 小澤敬也, 第6回ヒューマンサイエンス調査報告書発表会 (テーマ: 「希少疾患の遺伝子治療等革新的治療法の欧米での進展、および再生医療の周辺技術と規制動向」), 星陵会館ホール, 2016/8/2, 国内.
5. 商業化が見てきた遺伝子治療の最先端-AAV ベクター・腫瘍溶解性ウイルス・CAR-T・ゲノム編集-, 小澤敬也, BioJapan 2016 コーディネーターとして企画, パシフィコ横浜, 2016/10/14, 国内.

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 エイズ対策実用化研究事業  
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名：(日本語) 血友病とその治療に伴う種々の合併症克服に関する研究  
(英語) A research to overcome complications associated with hemophilia treatment

研究開発担当者 (日本語) 奈良県立医科大学・医学部・教授 嶋 緑倫

所属 役職 氏名：(英語) Midori Shima, MD, PhD. Professor, Department of Pediatrics, Nara Medical University

実施期間：平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 第Ⅷ、第Ⅸ因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究、  
血友病 A インヒビターによる凝固抑制機序の解明および  
新たな止血治療戦略の確立に関する研究

開発課題名：(英語) Studies on the mechanism of inhibitor development by factor VIII or factor IX concentrates. Studies on the mechanism of inhibitory effect and establishment of novel therapeutic strategy.

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：自治医科大学・医学部生化学講座病態生化学部門・大森 司 総括研究報告を参照。

研究開発分担者：奈良県立医科大学・医学部小児科学教室・嶋 緑倫

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

Nakamura Y, Ando Y, Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Matsushita T, Shima M, Kojima T. Distinct X chromosomal rearrangements in four haemophilia B patients with entire F9 deletion. *Haemophilia*. 2016, 22(3):433-9

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. わが国における血友病患者の遺伝子変異とインヒビター発生の実態, ポスター, 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 瀧 正志, 小嶋 哲人, 篠澤 圭子, 福武 勝幸, 嶋 緑倫, J-HIS study group, 奈良春日野国際フォーラム, 第38回日本血栓止血学会学術集会, 2016/6/18, 国内.
2. わが国の小児血友病の頭蓋内出血～新規血友病前方視的患者登録システム(J-HIS2)より～, 口頭, 瀧 正志, 嶋 緑倫, J-HIS2 study group, 奈良春日野国際フォーラム, 第38回日本血栓止血学会学術集会, 2016/6/17, 国内.
3. Genotype and risk of inhibitor-development in hemophilia patients in Japan, ポスター, Yada K, Nogami K, Taki M, Kojima T, Shinozawa K, Fukutake K, Shima M, and J-HIS study group, Orange County Convention Center, Orlando, WFH2016 World Congress, 2016/7/25, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし