

血友病 A の治癒を目指した遺伝子治療法の開発

大森 司

自治医科大学医学部 生化学講座 病態生化学部門

【研究の背景】

血友病は血液凝固第 VIII (FVIII)、または第 IX 因子 (FIX) の異常による遺伝性出血性疾患である。1 回で恒久的に治療効果が得られる遺伝子治療は血友病診療が抱える問題点を解決するために期待される [1]。現段階では血友病遺伝子治療にアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いることが主流である。AAV には様々な血清型が知られ、その違いにより臓器・細胞指向性が異なる。UK のグループより AAV8 ベクターを用いた血友病 B のヒト Phase I 研究の成功例が報告された[2]。一方、血友病 A に対する本手法の応用は現実的なものとなっていない。近年、肝実質細胞ではなく肝類洞内皮細胞が FVIII の生理的な産生細胞として着目されている[3]。事実、肝硬変では他の凝固因子と異なり FVIII は殆ど低下しないことを経験する。現行の AAV8 を用いた治療法は、肝細胞特異的なプロモーターと AAV8 という組み合わせにより肝細胞からの FIX 高発現を得ているが、血友病 A で欠損する FVIII を高発現させるためには、さらに適したアプローチが存在する可能性がある。

【目 的】

本研究では、より多くの患者が存在する血友病 A に対する効率的な遺伝子治療法の基礎技術開発を行う。

【方 法】

種々のプロモーターをもつ AAV8 ベクターをマウスに投与し、肝臓細胞、類洞内皮細胞に適したプロモーターを選択する。さらに FVIII を発現する AAV ベクターを血友病 A マウスに投与し、FVIII 産生能を検討する。これらの血清型、およびプロモーターの選択を行うことで、血友病 A への遺伝子治療の基礎技術を開発する。

【結 果】

CMV プロモーター、内皮細胞特異的な PAI-1 プロモーター、または肝臓特異的な HCRhAAT プロモーターの下流にルシフェラーゼ、および EGFP を発現する AAV8 ベクターをマウスに投与した (1×10^{11} vc/body)。ルシフェラーゼで評価した際の遺伝子発現効率は HCRhAAT プロモーターが最も優れていた (図 1)。類洞内皮細胞のマーカーである CD146 を用いた検討では、内皮細胞への EGFP 発現効率に差を認めなかった (発現は肝細胞と比較して低い) (図 1)。FVIII は B ドメイン欠失型でも 4.5 kbp と大きく AAV への搭載が困難である。そのために用いるプロモーターを任意の部位で切断し短縮形を作製した。PAI-1 プロモーターを 872bp から約 300bp まで、肝臓特異的なプロモーターである HCRhAAT も約 350 bp まで短縮可能であった。これら短縮したプロモーターの下流で FVIII を発現する AAV8 ベクターを作製し、血友病 A マウスに投与した。HCRhAAT プロモーターの FVIII 産生効率と比較すると、PAI-1 プロモーターによる FVIII 活性は低かった (図 2)。AAV 血清型の検討では、HCRhAAT プロモーターの下流で FVIII 産生を行う種々の血清型 (AAV3、5、8、9) を作製し、血友病マウスに投与した。現段階では AAV8、9 の発現効率がよく、次いで AAV5 に高発現を認めた。

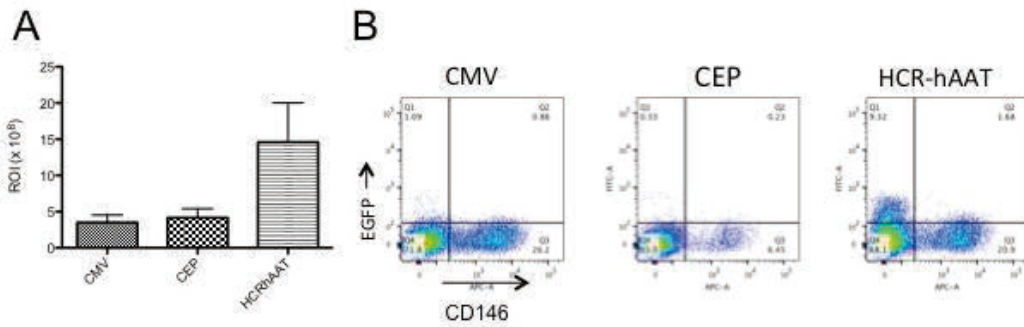


図1 各種プロモーターの活性の違い CMV、PAI-1 (CEP)、または HCR-hAAT プロモーターの下流にルシフェラーゼと EGFP を発現する AAV8 をマウスに投与した (1×10^{11} vc/body)。投与後4週でのルシフェラーゼ活性(A)および肝臓での EGFP 発現の FACS 解析(B)。展開図は縦軸に EGFP、横軸に類洞内皮細胞マーカーである CD146 の発現。

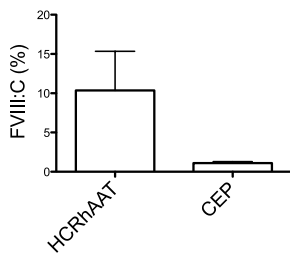


図2 血友病 A マウスの表現形の変化 短縮形の HCRhAAT、または PAI-1 プロモーター (CEP) の下流で Bドメイン欠失型 FVIII を発現する AAV8 ベクターを作製し血友病 A マウスに投与した。投与後4週での血漿 FVIII 活性を示す。

【考 察】

AAV8を用いた場合、内皮細胞特異的プロモーターよりも肝臓特異的プロモーターのほうが FVIII の産生効率がよかった。AAV 血清型では AAV8、9により同程度の活性が得られた。以上より、現段階では FVIII の非生理的な発現細胞ではあるが、肝実質細胞をターゲットとする血友病 B と同様の手法を用いることが現実的である。これは肝臓での実質細胞の全体量が相対的に多いこと、並びに用いた AAV 血清型の細胞・臓器特異性が起因していると考えられる。現段階の遺伝子治療は外来遺伝子を発現させる手法が一般的である。このような手法では種々の AAV 血清型による感染効率が優れた細胞を発現細胞として選択するのがよい。現在では CRISPR/Cas9 を初めとしたゲノム編集技術の応用が盛んとなっている。ゲノム編集の場合は、異常遺伝子を修復するため、生理的な FVIII 産生細胞への効率的な遺伝子導入が成功の鍵となる。今後、血友病 A に対するゲノム編集技術を成功させるには、効率的な FVIII 産生細胞への遺伝子導入技術を明らかにしていく必要がある。我々は、FVIII の発現が Cre で切断されると発現細胞から EGFP が出現するノックインマウスの作製も試みた。現段階でヘテロマウスの産生まで得られており、今後、このマウスをもちいて FVIII 産生細胞が可視化出来ることで、より正確に FVIII 産生細胞を標的とした遺伝子発現手法の開発が進むと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

血友病 A 患者は血友病 B 患者の 5 倍存在する。治療に用いる凝固因子製剤の半減期は短く、出血予防・治療には頻回の静脈投与を必要とする。本研究の応用により血友病患者の静脈注射の必要性が減じ、より多くの血友病患者の QOL が改善すると期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Ohmori T, et al. J Thromb Haemost. 2015;13 Suppl 1:S133-42.
- 2) Nathwani AC, et al. N Engl J Med. 2011;365(25):2357-65.
- 3) Everett LA et al. Blood. 2014;123(24):3697-705.