

## 血友病 A に対する *in vivo* ゲノム編集治療法の基礎技術開発

早川盛禎

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 A は、血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) を欠損する先天性疾患である。血友病 A の治療は、FVIII 製剤の定期補充療法により飛躍的に進歩し、血友病患者は重篤な出血症状を回避できるようになった。さらに現在、血友病 A の治癒を目指した遺伝子治療研究が進められている。しかし、遺伝子導入ベクターの開発は、FVIII 産生細胞が特定されていないために遅れている。多くの血液凝固因子は肝臓で産生されるが、FVIII のみは重度の肝硬変でも産生が低下せず、その産生細胞が肝実質細胞でないことが示唆されてきた。最近、我々は FVIII 産生細胞を緑色蛍光タンパク質 (EGFP) で可視化できる遺伝子改変マウス (FVIII-KI マウス) を作製し、肝臓の類洞内皮細胞が FVIII 産生細胞であることを見出した。血友病 A の治療法開発を推進するためには、肝類洞内皮細胞を標的にした遺伝子導入システムの構築が急務である。

### 【目 的】

本研究は、独自に作製した FVIII-KI マウスを用いて、肝類洞内皮細胞における FVIII (*F8*) 遺伝子の発現を調べるとともに、肝類洞内皮細胞特異的なプロモーターを搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、血友病 A の *in vivo* ゲノム編集治療法に応用することを目的とする。

### 【方 法】

FVIII-KI マウスは、FVIII 産生細胞において、Cre 依存的な *F8* 遺伝子の欠損とともに EGFP を発現する。これまでに我々は、FVIII-KI マウスを CAG-Cre マウスと交配した成マウスを用いて、CD31、CD146、Lyve1 陽性の肝類洞内皮細胞が FVIII 産生細胞であることを明らかにした。

#### (1) 生体における *F8* 遺伝子発現の検討

FVIII-KI マウスを CAG-Cre マウス、Alb-Cre マウス、Tie2-Cre マウス、Lyve1-Cre マウスと交配し、生まれたマウスの血漿 FVIII 活性を測定した。また、FVIII-KI マウスを CAG-Cre マウスと交配し、胎生期 10 日から新生仔の肝臓を摘出し、FVIII 産生細胞をフローサイトメーター法および免疫組織染色法によって検出した。さらに、成マウスにおいて、セルソーターにより単離した肝類洞内皮細胞、および遠心分離法により単離した肝実質細胞における *F8* 遺伝子の発現を調べた。

#### (2) 肝類洞内皮細胞特異的なプロモーターの選抜、および AAV ベクターの開発

肝類洞内皮細胞特異的なプロモーターは、Ding らの RNA-seq および Proteome の解析結果 (*Mol Cell Proteomics*, 2016) を参考に候補遺伝子を選抜した。候補遺伝子のプロモーター領域は、C57BL/6J マウス、およびヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC から精製したゲノム DNA よりクローニングした。次いで、プロモーターを tdTomato の上流に挿入し、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作製した。候補遺伝子 *Stabilin 2* については、そのプロモーター制御により Cre を発現する transgene を受精卵にインジェクションし、Stab2-Cre トランスジェニックマウスを作製した。

## 【結 果】

生体における FVIII 産生について、血漿 FVIII 活性を指標に検討した。血漿 FVIII 活性は、FVIII-KI マウスと CAG-Cre マウス、Tie2-Cre マウス、Lyve1-Cre マウスとの交配で生まれたマウスにおいて顕著に低下した。この結果から、FVIII は内皮細胞特異的に発現し、産生されることが明らかになった。発生過程における肝臓の EGFP 発現細胞は、胎生期12.5日から類洞形成部位に出現し、新生仔では成マウスとほぼ同じレベルに達した。一方、胎生期10.5日での EGFP 発現は認められなかった。また、成マウスにおける *F8* 遺伝子の発現は、CD31, CD146, Lyve1陽性の肝類洞内皮細胞に特異的であり、肝実質細胞では極めて低かった。

肝類洞内皮細胞特異的な遺伝子として、*F8*に加えて、*Stab2*, *Clec1b*, *Clec4g*を選抜した。市販抗体が入手可能であった CLEC1B については、肝類洞内皮細胞の細胞表面に発現することを確認した。また、マウスおよびヒトの各遺伝子のプロモーターをクローニングし、肝類洞内皮細胞特異的なプロモーター制御下で tdTomato を発現する AAV ベクターを作製した。さらに、肝類洞内皮細胞特異的に Cre を発現する *Stab2*-Cre トランスジェニックマウスを作製した。

## 【考 察】

以上の結果は、生体における FVIII 産生は内皮細胞特異的であり、そのなかでも肝類洞内皮細胞であることが強く示唆された。また、*F8* 遺伝子は胎生期 12.5 日以降から肝臓に発現し、肝成熟とともに類洞形成部位で増加することが明らかになった。今後、*Stab2*-Cre トランスジェニックマウスを用いて、FVIII-KI マウスとの交配実験を実施し、FVIII 産生細胞をさらに詳細に解析する。また、作製した 4 種の肝類洞内皮細胞特異的な AAV ベクターをマウスに導入し、tdTomato の発現を調べることにより、肝類洞内皮細胞における遺伝子発現に効果的なプロモーターをさらに選抜する。これらの AAV ベクターは、肝類洞内皮細胞特異的な遺伝子導入システムの構築に応用可能である。本研究成果をもとに、ゲノム編集技術を利用した血友病 A 治療の実現に向けて、さらに研究を継続する。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

我々の研究室では、世界に先駆けて AAV ベクターとゲノム編集技術を利用した血友病 B の治療法を開発した (*Sci Rep*, 2017, *Int J Hematol*, 2018)。しかしながら、血友病 B 治療用の AAV ベクターは、FIX 産生細胞である肝実質細胞に特異的なプロモーターを利用した発現システムであり、血友病 A には応用できなかった。本研究における FVIII 産生細胞の同定、*F8* 遺伝子の発現開始時期の同定、および肝類洞内皮細胞特異的なプロモーターの選抜の成果は、血友病 A に対するゲノム編集技術を利用した新規治療法の開発に繋がるものと期待できる。血友病 A の有病率は血友病 B の 5 倍であり、血友病 A に対する治療法の実現は臨床的に大きな意味を持つ。近い将来、この遺伝子治療法が確立すれば、FVIII 製剤の輸注回数を抑えることが可能となり、患者の経済的・心理的負担の軽減、さらには医療費の削減に繋がるものと期待される。また、胎生期や小児期での治療が実現すれば、生涯に渡って FVIII 製剤投与を回避できる可能性もある。

## 【参考・引用文献】

1. Ding C, Li Y, Guo F, Jiang Y, Ying W, et al. A Cell-type-resolved Liver Proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2016; 15: 3190-3202.
2. Ohmori T, Nagao Y, Mizukami H, Sakata A, Muramatsu SI, Ozawa K, Tominaga SI, Hanazono Y, Nishimura S, Nureki O, Sakata Y. CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Sci Rep*. 2017; 7: 4159.
3. Ohmori T. Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. *Int J Hematol*; 2018: doi: 10.1007/s12185-018-2513-4.