

プロテイン C 欠損症に対する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】

プロテイン C (PC) 欠損症、特に PC 遺伝子 (*PROC*) の両アレル異常は、出生直後から新生児電撃性紫斑病という全身に致死的な血栓形成をきたす難治性疾患である。PC は血栓形成部位で活性化され、活性化第 V 因子、第 VIII 因子を切断して抗凝固作用を発揮する、いわば、“凝固のブレーキ”である¹⁾。PC 欠損症の治療には、活性化プロテイン C (APC) 製剤が使用されるが、半減期が 15-30 分と極めて短いため十分な治療はできない。慢性期には、ワルファリンや直接型経口抗凝固薬などの抗凝固薬によるコントロールが行われるが、血栓症の制御には強力な抗凝固療法が必要であり、出血合併症の管理に苦慮することも多い。以上より、PC 欠損症、特に *PROC* の両アレル異常を治癒できる画期的な治療法が望まれている。我々は、血友病に対する遺伝子治療に関する開発研究を一貫して続けている。PC は血友病 B で欠損する血液凝固第 IX 因子と同様に肝臓で産生されるタンパク質であるため、PC 欠損症に対して遺伝子治療が一つの治療選択肢となる可能性がある。

【目 的】

本研究では PC 欠損症の治療を目指した画期的治療法の開発を目的とした。治療効果を高めるために活性体として分泌する PC 配列を同定し、研究室のコア技術 (遺伝子治療・ゲノム編集) を組み合わせ、PC 欠損症に対する新たな治療法を提案する。

【方 法】

- 1) 高活性型 PC の樹立: PC は軽鎖、重鎖がトロンビンにより開裂することによって活性化する。同部位に複数のペプチド配列を挿入した発現コンストラクトを作製した。遺伝子導入により効率よく活性体として放出される配列を同定し、ヒト血漿と混合して凝固時間 [活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT)] を測定した。
- 2) AAV ベクターを用いた遺伝子治療: PC を搭載した AAV8 ベクターをマウスに投与し、経時的に血中の PC 活性、凝固時間、第 V 因子、第 VIII 因子活性を測定した。
- 3) ゲノム編集による PC 欠損マウス表現型の改善: ゲノム編集によって PC 欠損マウス (*Proc*^{-/-}) を作製した。高活性型 PC を搭載したドナーベクターを作製し、アルブミン遺伝子座 (*Alb*) を標的とした gRNA と Cas9 を発現する AAV8 ベクターと同時に、*Proc*^{+/-} マウス同士の交配によって得られる新生仔に投与した。

【結 果】

複数のペプチド配列 (9 種類) を *PROC* 遺伝子に挿入し、HEK293 細胞で安定発現細胞株を作製した。その細胞株の上清を蛇毒による活性化せずに PC 活性を測定し、活性体として発現する PC 配列を 4 種類同定した。その中で最も効率よく発現する PC 配列を以後の活性型 PC 配列として使用した。同定した活性型 PC 配列は、ヒト標準血漿と混和すると、濃度依存性に PT、APTT を延長させた。この凝固時間延長効果は、野生型や既報の Gla ドメイン改変型 PC²⁾ よりも強く、プロテイン

S 欠乏血漿でも認めた。次に、野生型、および活性型 PC 配列を AAV ベクターに搭載して野生型マウスに投与した。投与後 8 週まで観察し、血中 PC 抗原量が濃度依存性に上昇することを確認した。興味深いことに、活性型 PC を発現したマウスでのみベクター濃度依存性に凝固時間である APTT が延長し、第 V 因子活性が低下した。さらに活性型 PC を発現によって、活性酸素に依存した病的血栓の形成が阻害された。PC 欠損症の表現型改善を評価するために PC 欠損マウスをゲノム編集技術で作製した (*Proc*^{+/+})。交配で得られる *Proc*^{-/-} マウスは既報どおり、生後 1 週間以内に死亡した。AAV ベクターを用いた治療効果は新生仔では持続しないため、ゲノム編集技術を応用した。アルブミン遺伝子座 (*Alb*) のアルブミンの停止コドンの 3' 領域に既報通りに黄色ブドウ球菌由来 Cas9 (SaCas9) の gRNA を設計し³⁾、効率的に二本鎖 DNA 切断 (DSB) が生じることを確認した。DSB 部位に相同組み換えで遺伝子を挿入するために、2A 配列に続き EGFP、両端に 1 kb の相同配列を結合させた AAV ベクターを作製し、DSB 用の AAV ベクターと同時投与を行った。野生型マウス新生仔への投与によって、肝臓細胞の約 7% に EGFP の発現を認めた。同様の手法で活性型 PC をゲノム編集によって同部位に挿入すると、血中の PC 抗原量は上昇し、*Proc*^{-/-} マウスの長期生存が得られた。

【考 察】

我々は、PC を改変して活性体として発現させることを可能にした。PC は前駆体として血中に存在し、血栓形成部位でトロンビンが生成すると内皮細胞上のトロンボモジュリンと結合し、PC を APC に活性化する。我々の活性型 PC は濃度依存性に第 V 因子活性を阻害し、凝固時間を延長させることから、実際に APC として活性化第 V 因子を分解して止血反応を制御していると予測される。

PC の血中濃度は血友病 B で欠損する第 IX 因子と同程度である¹⁾。そのため、血友病 B 遺伝子治療の技術が応用可能である。一方、血友病 B に対する遺伝子治療が良好な成績をおさめている背景には、高活性型第 IX 因子配列 (FIX Padua) を利用していることが挙げられる⁴⁾。血中に活性体として存在する PC は全体の 1/1,700 であるため⁵⁾、本研究で得られた活性型 PC を利用することで、より効果的な PC 欠損症に対する遺伝子治療やゲノム編集治療に結びつくことが期待される。

活性型 PC を利用したゲノム編集治療によって、*Proc* 欠損ホモマウスの生存が延長できたことは興味深い。この条件下でも血漿 APTT 延長は軽微で、第 V 因子の抑制も 50% 程度であることから、活性型 PC 発現による出血合併症は低いことが期待される。今後、臨床応用に向けて、より大型の動物種を用いた薬理効果の確認や出血合併症を始めとした副反応の検証は必要である。本研究の一部の成果は、第 84 回日本血液学会学術集会、第 44 回日本血栓止血学会学術集会において報告した。現在、論文について投稿準備中である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

PC 欠損症による電撃性紫斑病は致死的な難治性疾患である。適切な治療を受けた生存例でも脳梗塞や抗凝固療法による脳出血により神経学的後遺症を残してしまうことも珍しくない。生涯に渡り、血栓による虚血症状・多臓器不全を防ぐための長期管理が必要である。本研究で開発した活性型 PC を利用した遺伝子治療やゲノム編集は PC 欠損症の患者に対して永続して安定的な治療効果を提供できる可能性がある。

【参考・引用文献】

- 1) J. H. Griffin, *et al.*, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **5**, 73-80 (2007).
- 2) Y.-H. Sun, *et al.*, *Blood* **101**, 2277-2284 (2003).
- 3) A. De Caneva, *et al.*, *JCI Insight* **4**, e128863 (2019).
- 4) L. A. George, *et al.* *N Engl J Med* **377**, 2215-2227 (2017).
- 5) A. Gruber, J. Griffin, *Blood* **79**, 2340-2348 (1992).