

## FVIII の異所性発現における ER ストレス応答メカニズムの解明と血友病 A 治療への応用

柏倉裕志

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】

近年、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた血友病に対する遺伝子治療の有効性が複数の臨床試験から報告されている。しかし血友病 A 遺伝子治療では、時間経過と共に治療因子として導入した第 VIII 因子(FVIII)の発現が低下し、長期持続的な治療効果が得られない可能性がある<sup>1)</sup>。治癒を目的とした血友病 A 遺伝子治療の実現のためには、長期的に安定した FVIII 発現が必須である。AAV ベクターによる血友病遺伝子治療では、肝実質細胞を標的として治療凝固因子を発現させる。ほとんどの凝固因子は肝実質細胞で産生されるが、FVIII は類洞内皮細胞で発現する<sup>2)</sup>。現在の血友病 A 遺伝子治療では、非生理的産生細胞を FVIII 遺伝子発現細胞の標的としており、FVIII の発現低下は、生理的産生細胞以外での FVIII の異所性発現による小胞体(ER)ストレス応答が一因として推測されている<sup>3)</sup>。我々は、複数のアミノ酸変異導入により改変型 FVIII を構築し、ヒト肝臓細胞株 Huh7 において FVIII 発現時に ER ストレス応答が著減する低 ER ストレス応答型改変 FVIII\_Ver.4 を得た。長期に効果的な血友病 A 遺伝子治療に繋げることを目標とし、改変型 FVIII\_Ver.4 の詳細な解析を進めている。

## 【目 的】

血友病 A 遺伝子治療において、肝実質細胞での異所性の FVIII 発現が ER ストレスを誘導して FVIII 発現を低下させ、治療効果を減弱させる可能性が報告されている。ER ストレス応答を検出可能なヒト肝細胞株を用い、肝細胞の FVIII 発現時に ER ストレスを低減する改変型 FVIII を見出した。本研究では、肝細胞での FVIII 異所性発現による ER ストレス応答のメカニズムを明らかにすることを目的とし、ER ストレス応答に重要な変異導入部位の同定を検討した。肝実質細胞での安定発現を実現する改変型 FVIII を利用した血友病 A 遺伝子治療およびゲノム編集治療の開発に繋げる。

## 【方 法】

ER ストレス応答は、ER ストレス応答経路の1つである IRE-1 経路のセンサー遺伝子 XBP1 とルシフェラーゼの融合遺伝子(XBP1-Luc)をヒト肝臓細胞株 Huh7 細胞で安定発現株を樹立し、XBP1-Luc 安定発現株への FVIII プラスミド導入時のルシフェラーゼ活性として評価した。*In vitro* の FVIII 発現スクリーニングは、Huh7 細胞へのプラスミドトランスフェクション後の培養上清を凝固一段法および合成基質法にて測定した。AAV ベクターは、マウス肝臓への遺伝子導入効率の良い 8 型血清を選択し、ヒト肝臓特異的(HCRhAAT)プロモーター下流に FVIII 遺伝子を配した遺伝子発現カセットを搭載した。血友病 A (F8KO)マウスへ  $1 \times 10^{11}$  vg/kg の AAV ベクターを静脈投与後に、経時的な採血を行い、血漿中の FVIII 活性および抗原量を測定した。細胞内貯留 FVIII の解析は、Huh7 細胞への FVIII 遺伝子導入後の細胞内タンパクのウェスタンブロット解析により評価した。

## 【結 果】

低 ER ストレス応答型改変 FVIII\_Ver.4 は、アミノ酸変異導入部位が 36 箇所あり、Huh7 細胞での ER ストレス応答が野生

型に比べ著減する。また、肝臓を発現標的とした血友病 A マウスへの AAV ベクター投与実験において、改変 FVIII<sub>Ver.4</sub> の血中 FVIII 発現は野生型 FVIII と比較して、凝固一段法による FVIII 活性で 8.2 倍、合成基質法による FVIII 活性で 3.4 倍、FVIII 抗原量で 4.3 倍と、高活性および高分泌を示した。改変型 FVIII の免疫原性の減少のため、また FVIII 活性上昇と ER ストレス低減に寄与する変異導入部位を同定するため、36 箇所のアミノ酸変異導入部位各々について凝固一段法活性での比較スクリーニングを検討したところ、凝固一段法活性上昇に重要と思われる 12 箇所を同定し、その改変型 FVIII<sub>S12</sub> を得た。さらに FVIII<sub>S12</sub> の変異部位において合成基質法活性上昇に重要と思われる 4 箇所を同定し、その改変型 FVIII<sub>S4</sub> を得た。S12 および S4 の Huh7 細胞での ER ストレス応答は Ver.4 ほど著減しなかった。また血友病 A マウスへの AAV ベクター投与実験では、S12 および S4 の血中 FVIII 活性値は Ver.4 と同等であったものの、血中 FVIII 抗原量では低値を示し、肝実質細胞での FVIII 分泌性能が Ver.4 よりも低く、FVIII 抗原あたりの FVIII 比活性が高かった。FVIII の分泌性能評価のため、Huh7 細胞へ遺伝子導入した際の細胞内 FVIII 分子の貯留を比較検討した。Ver.4 は野生型 FVIII よりも FVIII 軽鎖の貯留が著減し、FVIII の重鎖および軽鎖の分子量が増加していた。S12 および S4 で検証したところ、細胞内 FVIII 軽鎖の貯留は野生型よりもむしろ増加していた。また、S12 および S4 双方で FVIII の重鎖の分子量が増加していた。S12 と S4 に共通する A1 ドメイン内の 1 箇所の変異導入部位が FVIII 重鎖の分子量の増加に、Ver.4 における a3 ドメイン内の 1 箇所の変異導入部位が軽鎖の分子量増加を起因する変異導入部位であると同定した。一方、Ver.4 における a3 ドメイン内の 2 箇所の変異導入部位が、FVIII 軽鎖の細胞内貯留の著減に寄与していた。これら同定した変異部位の導入による ER ストレス低減効果は認められなかった。Huh7 細胞での FVIII 分泌効率の良い改変型を Ver.4 から得るため、合成基質法活性での比較スクリーニングを検討した。この検討から、幸運にも 13 箇所の変異導入をもつ低 ER ストレス応答改変型 FVIII<sub>Ver.12</sub> を得た。Ver.12 は、細胞内 FVIII 軽鎖の貯留は示すが、Ver.4 と同等の低 ER ストレス応答を示し、Huh7 細胞での FVIII 活性は合成基質法活性と凝固一段法活性に差がなく、野生型の 4 倍であった。

## 【考 察】

欧米で承認された血友病 A 遺伝子治療薬 Roctavian は、比較的高用量の AAV ベクターの投与により治療効果が得られるが、投与 1 年後から FVIII レベルの減衰傾向が認められ、FVIII 発現の半減期は 2 年 5 ヶ月と推測されている<sup>4)</sup>。また薬価は約 290 万ドルとされ、非常に高額となる。一方、血友病以外の AAV 遺伝子治療臨床試験では、非常に高いベクター量（血友病治療の数 100 倍～10 倍）を投与した際に、肝障害による死亡例や心筋障害・血栓性微小血栓症など重篤な副反応が報告されている。これらは大量 AAV ベクターを投与した際の自然免疫の惹起や補体反応が関与していることが示唆され、低用量ベクターによる高い治療効果となる治療戦略が安全性と薬価削減の面から求められている。その一つとして、高機能型の治療遺伝子を搭載させる戦略がある。実際に血友病 B 遺伝子治療薬では、野生型の約 8 倍の凝固因子活性を持つ Padua 型変異体を搭載することで、AAV ベクター投与量の削減に成功している。改変型 FVIII<sub>Ver.4</sub> は高発現・高活性・低 ER ストレス応答であり、血友病 A 遺伝子治療においてベクター量削減と持続的治療効果を期待できる治療遺伝子シードである。本研究では、Ver.4 における高活性・細胞内タンパク低貯留・低 ER ストレス応答において重要な変異部位を明らかにした。まず、Ver.4 の FVIII 活性上昇には、凝固一段法活性で 12 箇所、合成基質法活性で 4 箇所の重要な変異部位を同定した。これらの改変型 FVII では FVIII 抗原あたりの FVIII 比活性が高く、分泌や ER ストレス応答には直接的に関与しないことが推察された。また、Ver.4 に認められる FVIII 軽鎖の細胞内貯留低減に起因する a3 ドメイン内の 2 箇所も同定した。この 2 箇所の変異導入は分泌向上には影響するが、ER ストレス低減には関連しないことが明らかとなった。Ver.4 における ER ストレス応答低減には 13 箇所の変異導入部位が重要であることが明らかになった。本研究では、Ver.4 における重要な変異導入部位を同定したが、実際にどの変異導入部位の組み合わせが長期的治療効果を示す治療遺伝子であるかを明らかにしていない。ER ストレス低減効果のある FVIII<sub>Ver.12</sub> を改良した高機能型改変 FVIII の *in vivo* での比較検討が必要となる。一方で、高活性型 FVIII である S12 と S4 については、ER ストレス応答は著減しないが Ver.4 と同等およびそれ以上の FVIII 活性を持つことから、ER ストレス応答を想定しなくとも良い FVIII の生理的産生細胞を遺伝子導入の標的とした長期持続可能な遺伝子治療への貢献が考えられる。これらの成果から本研究は、長期安定的な血友病 A 遺伝子治療や効果的な血友病 A ゲノム編集治療に繋がるものと期待される。

**【臨床的意義・臨床への貢献度】**

本研究により、AAV ベクターを用いた血友病 A 遺伝子治療を、長期に治療効果を望める治療へと成熟させることが可能となる。また従来の遺伝子治療では対象とならない小児患者や若齢患者の根本的治療に焦点を当てた血友病 A ゲノム編集治療につながることを期待される。

**【参考・引用文献】**

- [1] Samelson-Jones, BJ, and George LA. Annu. Rev. Med. 74: 231-247, 2023.
- [2] Hayakawa M, Sakata A, Hayakawa H, et al. Sci Rep. 11: 14824, 2021.
- [3] Fong S, Yates B, Sihh CR, et al. Nature Med. 28: 789-797, 2022.
- [4] Mahlangu, J., Kaczmarek, R., Von Drygalski, A., et al. N Engl J Med 388: 694-705, 2023.