

学位論文題名

Overexpression of Factor VII Ameliorates Bleeding Diathesis of Factor VIII-deficient Mice with Inhibitors

(凝固第VII因子を過剰発現させることで、インヒビター陽性凝固第VIII因子欠損マウスの出血性素因は改善する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】血友病は血液凝固因子欠乏症のひとつで、本邦で最も多い先天性出血性疾患である。凝固因子製剤を投与していると抗体（インヒビター）が発生することがあり、その発生頻度は重症血友病Aで20-30%であるが、血友病Bでは3%程度と低く、血友病Aで問題となることが多い。インヒビターのために出血時補充療法での止血は困難で、定期補充療法でも出血頻度を下げることができない。

遺伝子治療は凝固因子レベルを持続的に高くすることで不測の致死性出血や傷害性出血を予防することを可能にし、血友病の次世代治療として期待されている。

インヒビター陽性血友病患者への遺伝子治療として、現在、止血療法として行われているバイパス療法の概念を基礎として、活性型第VII因子を持続的に発現させる方法が考えられた。2004年に、血友病Bマウスにマウス活性型第VII因子を遺伝子導入することで治療効果が得られることが報告された。また、活性型第VII因子を発現する血小板を血友病Aマウスに移植することで、出血傾向が改善することを我々は示してきた。2009年に血友病Aイヌヘイヌ活性型第VII因子を遺伝子導入することで治療効果が得られることが報告されているが、インヒビター存在下での効果は検討されていない。

我々はインヒビター陽性血友病Aマウスに第VII因子および、活性型第VII因子をAAV8ベクターで遺伝子導入することで、インヒビター陽性血友病Aマウスの出血性素因が改善すると仮説を立て、*in vitro*、*in vivo*で止血能を評価した。

【方法と結果】遺伝子治療に用いる第VII因子と第VIIa因子を作製するためにマウス肝臓の全RNAからRT-PCR法にてmouse Factor VII cDNA (mFVIIcDNA) をクローニングした。mFVII遺伝子上でFXa切断部位のArg152-Ile153に2つのRKR(arginine/lysine/arginine)を挿入された分子を産生させることでmFVIIaを作製することにした。RKRKRを同部に挿入することで、細胞内でfurinにより開裂しFVIIaと同等の活性を有する2本鎖分子ができることが知られている。

Human alpha-1 antitrypsin (HAAT) プロモーターとApoE遺伝子の最小エンハンサーであるhepatic control region (HCR) の下流に作製したmFVIIとmFVIIaのDNA断片をそれぞれ挿入することで、p1.1-HCRHAAT-mFVII、p1.1-HCRHAAT-mFVIIaを作製した。

アデノ随伴ウイルス8ベクター (AAVベクター) 作製のために、pseudotypingによってAAV8キャプシドでパッケージングした結果、キャプシド蛋白はAAV8由来で、内包されるDNAはAAV2 ITRに配列となる。CsCl密度勾配にて超遠心をしてAAV8ベクターを作製した。血友病Aマウスにヒト第VIII因子製剤を繰り返し使用して、インヒビター陽性血友病Aマウスモデルを作製した。マウス第VII因子をクローニングし、そこから活性型第VII因子を作製し、AAV8ベクターを用いて、インヒビター陽性血友病Aマウスに投与した。野生

型マウス、ベクター非投与血友病 A マウス（以下、血友病 A マウス）をコントロールとして、AAV8-マウス第 VII 因子投与血友病 A マウス（以下、AAV8-FVII 投与マウス）と、AAV8-マウス活性型第 VII 因子投与血友病 A マウス（以下、AAV-FVIIa 投与マウス）の出血性素因が改善するかを評価した。

*in vitro*での止血能評価として Thromboelastography (TEG) を使用した。AAV8-FVIIa 投与マウスは、凝固時間以外のパラメーターは野生型マウスとほぼ同等であり、著明な改善を示した。凝固時間についても血友病 A マウスと比べると著明な改善であった。AAV8-FVII 投与マウスは野生型マウスや AAV8-FVIIa 投与マウスと比べると、止血能の改善に乏しいが、血友病 A マウスと比較すると改善を認めた。

*in vivo*での止血能評価として断尾 (Tail clipping) を行った。断尾後、30 分間の出血量は血友病 A マウスも AAV-FVII 投与マウスも AAV8-FVIIa 投与マウスも同じであったが、24 時間の生存率をみると、血友病 A マウスは 0%、AAV8-FVII 投与マウスは 50%、AAV8-FVIIa 投与マウスは 85.7%と有意差がみられた。

【考察】断尾後の急性期の出血量を測定したが、30 分間では血友病 A、AAV8-FVII 投与マウス、AAV8-FVIIa 投与マウスの間に差はみられなかった。TEG では凝固時間に差がみられていたため、一見するとこれは TEG と断尾とで解離した結果ととれる。凝固因子の異常では二次止血が強固でなく再出血の危険性が高まる。血友病患者で腸腰筋出血や関節内出血といった深部出血が多いのも、この二次止血障害による。血友病 A マウスや、AAV8-FVII 投与マウスで 24 時間後の死亡率が上昇した原因としては、ケージに戻した後の再出血が増加した可能性が考えられる。以上のことより、出血量と死亡率に解離があったことは一次止血ではなく、第 VII 因子欠乏による二次止血障害を裏づける結果であったといえる。

近年、FVIIa を過剰発現の安全性を評価した報告がなされた。16 ヶ月間の観察期間で、野生型マウスは全例生存しているが、mFVIIa の発現レベルを低くした群では 6 ヶ月目から徐々に死亡し、16 ヶ月時点では 50%が死亡した。mFVIIa の発現レベルを高くした群では、1-3 ヶ月目には死亡が増え、9 ヶ月でほとんどのマウスが死亡した。これらの死亡原因は、肺・心臓の血栓であり mFVIIa の過剰発現が原因と結論づけられた。我々の研究では、観察期間が短く評価はできない。FVII 発現は確かに止血能評価で FVIIa 発現に劣る結果であったが、出血傾向を正常化できなくても軽減することで QOL の改善が期待できる。血栓症を起こす可能性も低いかもしれない。FVIIa 発現による遺伝子治療が持つ過凝固状態による肺梗塞、心筋梗塞、脳梗塞などの合併症リスクを考慮すると、ヒトへの臨床試験を前提としたとき FVII 発現ベクターによる遺伝子治療はインヒビターの存在の有無に関わらず FVIII 遺伝子を用いた遺伝子治療の代替となる可能性も秘めていると思われる。

【結論】第 VII 因子の過剰発現は、止血能を正常化させることはないが、出血傾向を軽減させることが可能なため QOL の改善が期待できる。また第 VIIa 因子を過剰に発現させると血栓症という重大な副作用が発症するため、第 VII 因子および第 VIIa 因子発現レベルを変えた実験動物群での安全性の検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	藤田博美
副査	教授	豊嶋崇徳
副査	准教授	田中淳司
副査	教授	佐藤典宏

学位論文題名

Overexpression of Factor VII Ameliorates Bleeding Diathesis of Factor VIII-deficient Mice with Inhibitors

(凝固第VII因子を過剰発現させることで、インヒビター陽性凝固第VIII因子欠損マウスの出血性素因は改善する)

本邦で最も多い先天性出血性疾患である血友病の遺伝子治療は、凝固因子レベルを持続的に高くする次世代治療として期待されている。インヒビター陽性血友病への遺伝子治療として、活性型第VII因子 (FVIIa) をこの AAV ベクターを用いることで持続的に発現させる方法が考えられている。本研究では『第VII因子 (FVII) および FVIIa の AAV8 ベクターによる遺伝子導入で、インヒビター陽性血友病 A マウスの出血性素因が改善する』との仮説を止血能で評価した。

AAV8-FVII 投与群と AAV8-FVIIa 投与群とで、インヒビター産生量や FVII 抗原量に差はみられなかった。Thromboelastography (TEG) では、AAV8-FVIIa 投与マウスは、凝固時間以外は野生型マウスとほぼ同等であり、著明な改善を示した。AAV8-FVII 投与マウスは野生型マウスや AAV8-FVIIa 投与マウスと比べると、止血能の改善に乏しいが、血友病 A マウスよりは明らかに改善していた。Tail clipping では、30 分間の出血量はどの群も同じであったが、24 時間の生存率では野生型は 100%、血友病 A マウスは 0%、AAV8-FVII 投与マウスは 50%、AAV8-FVIIa 投与マウスは 85.7% と有意差がみられた。

AAV8-FVII 投与群は、野生型や AAV8-FVIIa 投与群と比べて TEG でも生存率でも劣っているが、血友病 A マウスよりは明らかに優れており、その有効性が初めて示された。

ただ、本研究では安全性が検討されていない。マウスへの FVIIa 強制発現で、心筋梗塞や肺梗塞により早期死亡するという既報から、本研究での発現量でも血栓症による死亡増加が予想される。しかし、長期の経過観察による血栓症に対する安全性評価は行われなかった。今後、FVII と FVIIa の発現量を調整した時の安全性評価が必要である。

主査・藤田から、血友病の発症原因である遺伝子異常、特に Null 変異における凝固因子の蛋白の性状が質問されたが、Null 変異における凝固因子蛋白の詳細については把握しきれていなかった。また FVIII のバイスペシフィック抗体を用いた治療と、今回の FVII を用いた遺伝子治療では、どちらに将来性があるのか、が問われた。将来的には FVIII や FIX による遺伝子治療が望まれるが、まだ問題が多く、早期のヒト臨床試験の可能性のある FVII や FVIIa を用いた臨床試験を優先することが賢明との解答があった。

副査・豊嶋からは、野生型マウスの血漿を血友病 A マウスに投与してインヒビターを製する方が完結することができるのになぜヒトの製剤を用いたのか、との質問がなされた。これに対し、指摘の方法でマウスへのインヒビターが産生される可能性はあるが、実際にはインヒビターが十分に産生されない。これはマウスの免疫原性がヒトのものとは異なるためなのかもしれないが十分には解明されていない。またヒト FVIII製剤のようにマウスでは製剤は存在しないため、ヒトの製剤を使用せざるを得なかったとの解答があった。

副査・佐藤からは、この研究をするに至る経緯、どのようなプランを立てたのか、FVIIaの強制発現よりも FVIIの強制発現の方が優れているとする考え、将来のヒトへの臨床試験を考えたときの安全性の担保で何かいいアイディアはあるのか、との質問がされた。申請者は、「血友病 A の臨床試験は問題が多く時間を要するが、この FVII発現の方法であれば、ヒトへの臨床試験も早く開始することができる可能性がある。しかし、FVIIa の過剰発現では血栓症を引き起こすことがマウスモデルで示され、安全性が急務である。本研究では FVIIを使用することで理論的には FVIIa よりも血栓症のリスクを低減することができると考えられ、今後、発現量の調整の追加研究が必要である」と解答した。

副査・田中から、TEG 以外での *in vitro* での止血評価が示されていない理由、また Tail clipping 後 30 分後の出血量がほぼ同じなのに生存率に差が出る理由、軽症や中等症の症例でもインヒビターが産生されるのはなぜか、との質問があった。これに対し、本研究では TEG 以外の評価はほとんど行わなかったこと、出血後早期の止血には血小板による一次止血が関与しており、これはすべての群において同じであるため早期の出血量には差がないが、再出血が増加して生存率に差が出ること、ただし Tail Clipping 後の死亡が本当に出血死だったかどうかの詳細な検討はしなかったこと、症状に関わらずインヒビターが産生されるのは、エピトープが異なる可能性、糖鎖が異なる可能性があるとの解答があった。

この論文は、今後の血友病の新たな治療法開発に向けて高く評価され、更なる進展が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。