

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 安本篤史

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)

【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 AAV2ITR 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。