

血液凝固因子遺伝子の胎盤特異的な導入・発現による 血友病胎児の治療に関する研究

所属： 大阪大学 薬学研究科 生命薬学領域

助成対象者： 櫻井 文教

共同研究者： 水口 裕之

概要

血液凝固第 IX 因子 (FIX) 遺伝子の変異を原因とする血友病 B を罹患する新生児では、出生時に頭蓋内出血等の致命的合併症を発症する可能性があることから、その有効な治療法の開発が期待されている。本研究では、母体マウスにて FIX を過剰発現させることで、FIX を胎児マウスに送達することを試みた。血友病 B 妊娠マウスで野生型 FIX を過剰発現させたところ、生まれた新生仔マウスにおける血中 FIX 濃度は検出限界以下であった。そこで改変型 FIX を過剰発現させたところ、新生仔マウスにて治療域を超える FIX が検出された。以上の結果より、FIX に遺伝子改変を加えることで FIX を胎児に送達可能であることが示された。

abstract

There is a possibility that neonates with hemophilia A and B, which are X-linked recessive bleeding disorders, have severe damages, including intracranial and extracranial haemorrhage, at delivery. Development of innovative therapies for prevention of severe damages in hemophilia neonates at delivery have been expected. In this study, we tried to deliver FIX to fetus by over-expressing FIX in hemophilia B pregnant mice. When wild-

type FIX was over-expressed in hemophilia B pregnant mice, detectable levels of FIX was not found in the blood of neonates. On the contrary, therapeutic levels of modified FIX was detected in the neonates when the modified FIX was over-expressed in the pregnant mice. These data suggested that modified FIX can be delivered from pregnant to fetus through placenta.

研究内容

【背景】

血友病患者は、胎生期にはすでに血液凝固反応に異常が見られるため、産道で外圧がかかることで出生時に頭蓋内出血を引き起こし、後に障害を負うことが報告されている(1,2)。そのため、胎生期の血友病患者に対する有効な治療法の開発が求められる。しかしながら、血液凝固因子の胎児移行性は極めて低く、また成人の血友病患者に投与されている第8因子、第9因子(FIX)製剤についても胎児移行性は明らかとなっていない。そこで本研究では、FIX遺伝子に改良を加え、胎盤透過性を付与することで、母体への静脈内投与による低侵襲的な手法でFIXを胎児へと送達し、血友病胎児に治療を行えないかと考えた。胎盤は母体血液と胎児血液との間で物質交換を行う臓器であるが、幾重もの細胞層により構築される「血液胎盤関門」によって、免疫グロブリンG(IgG)を含む一部のタンパク質以外は胎児側へと移行しない。IgGは、重鎖内の定常領域であるFc領域が胎児型Fcレセプター(FcRn)と結合することで、トランスサイトosisにより母体血液から胎児血液へと移行する(3,4)。つまり、IgGのFc領域をFIXに融合することで、FIXに胎盤透過性を付与することが可能になると期待される。

【目的】

そこで本研究では、Fc領域を融合させたFIX(FIXFc)遺伝子を構築し、アデノウイルス(Ad)ベクターを用いて妊娠マウスで発現させることで、胎生期の血友病Bマウスに対して治療が行えるか検討することを目的とした。

【結果】

1. Fc融合FIXの胎盤透過性の評価

野生型 FIX、および Fc 領域を融合した FIX (FIXFc) が胎盤透過性を有するか検討するため、野生型 FIX もしくは FIXFc を発現する Ad ベクターを妊娠 13 日のマウスに静脈内投与後、生後 0 日の新生仔マウスより血液を回収し、血漿中の FIX 量を測定した。その結果、野生型 FIX を発現する Ad ベクター投与群では、母親マウス血漿中において 4339 ± 3519 ng/mL の FIX が検出されたものの、新生仔マウス血漿中からは FIX は検出されなかった。その一方、FIXFc を過剰発現させた群では、母親マウスの血漿中から、 1044.6 ± 301 ng/mL の FIX が検出され、さらに、新生仔マウス血漿中においても、 46.2 ± 13.1 ng/mL (正常値の 0.92 %) の FIX が検出された。次に、新生仔マウス血漿中から検出された FIX に、Fc 領域が融合されているか検討するため、母体および新生仔マウス血漿に対してウエスタンブロッティングを行った。その結果、母親マウスと同様に、新生仔マウス血漿サンプルにおいても、抗 FIX 抗体および抗ヒト IgG 抗体により、FIXFc の分子量と一致する 110 kDa 付近にバンドが検出された。以上の結果により、Fc 融合 FIX が胎盤を透過し、胎児血中に移行可能であることが示された。

2. FIXFc の体内動態評価

新生仔マウス血中における FIXFc の血中滞留性を評価するため、生後 0~3 日の各日齢のマウスより採血を行い、血漿中 FIX 量を経日的に測定した。その結果、生後 0 日から生後 1 日にかけて、血中の hFIX 濃度は 49.6% に減少し、生後 1 日から生後 2 日にかけては 23.7% に減少した。この結果により、FIXFc の新生仔マウスにおける血中半減期は約 24 時間であると明らかとなった。

3. FIXFc の血友病 B 胎児における治療効果

FIXFc を母体で過剰発現させることで、血友病 B 胎児に対する治療が可能か検討するため、FIXFc 発現 Ad ベクターを妊娠 13 日の血友病 B モデルマウスに静脈内投与した。まず、生後 0 日の新生仔マウス血漿中 FIX 量を測定したところ、 86.3 ± 42.0 ng/mL の値を示し、正常値の 1.72% に相当する FIX 量が検出された。次に、血漿中 FIX の活性値を評価したところ、正常値の約 3.5 % の値を示した。上記の結果により、FIXFc を血友病 B モデル妊娠マウスで過剰発現させることにより、活性を有する FIX を胎児へと高効率に送達可能であることが示された。

次に、新生仔マウスの止血能を検討するため、生後 0 日の新生仔マウスに対して、尾を切断後 24 時間における生存率を評価する Tail clip challenge を行った。まず、PBS を投与した母親マウスから産まれた新生仔マウスでは、アッセイを行った 5 匹中 1 匹のみが生存した。また、野生型 FIX を過剰発現させたマウスでは、アッセイを行った 4 匹中生存したマウスは 0 匹であった。その一方で、FIXFc を過剰発現させた母親マウスより生まれた新生仔マウスでは、アッセイを行った 21 匹中 20 匹が生存しており、止血能の大幅な改善が認められた。この結果により、FIXFc を母体で過剰発現させることによって、血友病 B 新生児の止血能を改善可能であることが示された。

【今後】

本研究により、FIXFc を妊娠個体で過剰発現させることにより、胎児に FIXFc を送達可能であることが示された。本研究では Ad ベクターを用いて FIX を妊娠個体で過剰発現させたが、FIX 遺伝子は X 染色体にコードされているため、血友病 B の女性患者は極めて少ない。従って、遺伝子導入ベクターを用いて FIX を疾患を持たない保因者で過剰発現させることになり倫理的問題点が生じる可能性がある。そこで今後は、遺伝子組換え FIXFc 製剤を開発し、胎児に対する治療効果を検討する必要があるものと思われる。

引用文献

1. Ljung RCR. Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *Brit J Haematol.*, 140, 378-384 (2007).
2. Chalmers EA. Haemophilia and the newborn. *Blood Reviews.* 18, 85-92 (2004).
3. Jeffrey HG, Carole V, Yun T, Gul NS, Amy FM, William SS. Infused Fc-tagged β -glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8375-8380 (2008).
4. Gupta N, Culina S, Meslier Y, Dimitrov J, Arnoult C, Delignat S, Gangadharan B, Lecerf M, Justesen S, Gouilleux-Gruart V, Salomon BL, Scott DW, Kaveri SV, Mallone R, Lacroix-Desmazes S. Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance. *Sci. Transl. Med.* 7, 275ra21. (2015).

5.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

該当事項なし

[口頭発表]

櫻井文教、飯塚俊輔、大橋一夫、水口裕之. アデノウイルスベクターを用いた Fc 融合型血液凝固第 IX 因子の過剰発現による胎児期血友病治療に関する検討. 第 35 回日本 DDS 学会 学術集会 (横浜)

[ポスター発表]

該当事項なし