

『 血友病 A 遺伝子治療へのステップ、自治医科大学坂田洋一客員教授らが  
ヒトに近いモデル動物「血友病 A ブタ」で血友病 A 次世代治療への取りかかり 』

タイトル：[ 血友病 A のブタモデル ]

出典：「PLoS One. 2012;7(11):e49450. doi:10.1371/journal.pone.0049450.  
Epub 2012 Nov 28.」

著者：Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D,  
Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T,  
Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y.

## 要旨

血友病 A は、凝固因子第 VIII 因子遺伝子 (F8) の異常によって引き起こされる X 染色体伴性遺伝の凝固疾患です。血友病 A 患者は、出血素因があります。脳内での命に関わる出血や関節や筋肉の重篤な出血を罹患しています。遺伝子治療により、治癒する可能性があるため、ヒトに近い種の動物モデルが長い間、求められてきました。

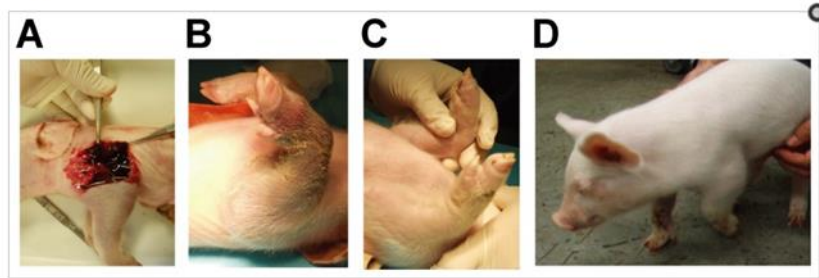
現在の血友病 A マウスモデルは、F8 を標的にした遺伝子に基づいて開発され、マウスとヒトの間の違いのため、予想できる解決困難な点が残っています。本研究では、F8 を標的にした線維芽細胞から核移植クローニングにより、血友病 A のブタモデルの作製をおこないました。

血友病 A は、出生直後に重症出血疾患がみられ、ヒトの重症血友病性と類似しています。対照的に、血友病 A マウスは、標準とする出血状態では、出血はほとんど見られません。ヒト第 VIII 因子の輸注により、止血や、ヒト血友病 A 型のブタの出血頻度が低下することが有効でした。

このような結果は、ヒト血友病 A 型のブタが、血友病 A 遺伝子治療を研究するのみならず、除去率が遅延している（訳注：血中の半減期が長い組み換え型第 VIII 因子製剤）ヒト組み換え型第 VIII 因子変異体のような次世代型の組み換え型凝固因子を研究するための重症血友病 A の動物モデルとなることを示唆しています。

下記は、論文にある図です。血友病 A ブタが血友病の症状を示しています。血友病 A ブタはヒトの凝固因子（第 VIII 因子製剤）投与後、止血し治療できました。また、繰り返される出血のため、この血友病ブタは足を引きずっています。

Figure 4



**The bleeding phenotype of cloned F8 KO piglets.**

(A) A part of macroscopic picture of cloned piglet #1, which died by day 2 after birth is shown. Ecchymosis was seen in the cheek, the forelimb, and the hind limb (not shown). Pathological examination revealed hematomas in these areas of piglet #1. (B) Forelimb of cloned piglet #4 on day 1 after delivery was shown. Ecchymosis had been seen in the left forelimb of cloned piglet #4 since delivery. (C) On day 5 after administration of human FVIII (150 U/kg), the bleeding in the left forelimb was not observed. Macroscopic picture of cloned piglet #4 on day 28 after birth showed that the left forelimb was swollen because of the repeated bleeding (D), causing the piglet to limp (also see video 1).

図4 A) 血友病Aブタモデル クローン・ブタ#1肉眼による写真、生後2日後に死亡。頬、前肢、後肢(写真は示していない)に斑状出血がみられる。病理学的検査により、血腫が明らかになった。B) 出生後、クローン・ブタ#4の前肢を示す。出生後、クローン・ブタ#4の左前肢に血腫が見られる。C) ヒト型第VIII因子(150U/kg)投与後、5日目 左前肢の出血は見られていない。出生後28日目のクローン・ブタ#4の肉眼による写真では、繰り返される出血により、左前肢に腫れが見られ、ブタは足をひきずっている。(ビデオ1参照)

#### 本論文の背景および考察についての翻訳

血友病遺伝子治療は、血友病Bに関しては臨床段階まで踏み込んだ先進的な報告がされており、次世代の治療としておおいに期待されています。著しい成果を見せている血友病Bの研究成果(Manno CS et al, Nature Medicine(2006):12:342-347, Nathwani AC et al, New England Journal of Medicine(2011); 365:2357-2365 とは対照的に、血友病Aに関しては、遺伝子および細胞療法で成果が限られたものとなっています。Roth DA et al, New England Journal of Medicine (2001):344:1735-1742, Powel JS et al, Blood(2003); 102:2038-2045

血友病Aの今後の治療は、血液中で半減期が長い遺伝子組み換えを用いた第VIII因子変異体を用いたものや、血漿由来の活性化プロトロンビン複合体などが挙げられます。インヒビターが出現した血友病A患者用の次世代の治療は、現在は開発段階にあります。次世代の治療を研究するために、優れた動物モデルが求められています。

マウス F8 (第 VIII 因子) を欠損した血友病Aマウスは、血友病A遺伝子治療および第VIII因子変異体の評価として主に用いられてきました。マウスの血液中には、ヒト第VIII

因子は非常に半減期が短いため、遺伝子治療用のヒト第 VIII 因子発現ベクターの有効性もしくは新規の第 VIII 因子変異体を分析することは困難です。代わりに、血友病 A イヌや血友病 A ヒツジがあります。血友病 A イヌは、長い間、代替モデルとして使われてきました。体の大きさ、生理レベル、疾患進行、染色体構造同質さなど、これらの動物とヒトでは種間の違いがある可能性があります。

ブタは、ヒトの疾患の優れた生理的モデルとなりえます。ブタの血液凝固系は、ヒトと非常に似ており、このため、凝固因子アミノ酸の相同性が非常に高いことが知られています。さらに、ブタ第 VIII 因子は、インヒビターが出現した血友病 A 患者の治療として用いられてきました。したがって、血友病 A ブタは、血友病 A を研究する次世代の良いモデルとなります。さらに、ミニブタでは、適度なサイズ 20~30kg にすることが可能です。このため、本論文の研究グループでは、クローン技術を用いて血友病 A ブタを作製することにしました。クローン技術の進歩により、遺伝的に改変した様々な動物を作製することが可能となりました。

これまでも遺伝子を改変したブタの論文がいくつか報告されています。疾患モデルとして嚢胞性繊維症ブタ、異型フマリルアセト酢酸加水分解酵素欠損ブタ、臓器移植用の 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子ノックアウト (KO) ブタなどの報告があります。動物モデルでヒトの疾患の研究の限界を考慮すると、遺伝子標的にしたブタはヒトの疾患やトランスレーショナル・リサーチ（訳注：実験室で行なわれた研究の成果を疾患の新しい診断法や治療法の開発に活用するプロセスを表現した用語）を施行するうえで適しています。

本論文の研究グループは、現在の研究の血友病 A の次世代治療のために F8KO ブタ（血友病 A ブタ）の開発をおこないました。クローン化したブタの遺伝子から、このブタの F8 は適切に組み替えをおこなっており、クローン化した血液凝固因子レベルから重症血友病であることが確認されました。#3 ブタでは、他の凝固因子の低下は軽微でした。#4 では、明らかになりませんでした。アルブミンは減少していたので、このような変化は特異的ではない可能性があります。この変化の可能性のあるメカニズムはエピジェネティクス（訳注：DNA 塩基配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるいは体細胞表現系の変化）がゲノム DNA のメチル化やヒストンアセチル化に影響を与えている可能性があります。核移植技術を用いて作製された血友病 A ブタは、重症血友病の表現系を示しました。対照的に、F8 KO では、標準的な出血条件下で、ほとんど筋肉や関節の自然出血を示しませんでした。従って、血友病 A ブタは、標準的な出血条件下での血友病 A の遺伝子治療のような新しい治療の有効性を評価するのに適応できる可能性があります。

さらに、ヒト第 VIII 因子の予防治療が、治療効果が完全ではない F8 KO#4 ブタの出血を抑えるのに適していました。F8 KO#4 ブタが、新しい第 VIII 因子変異体などの今後の治療用の製剤として、研究用の重症血友病 A の準ヒト型動物モデルとなることを示唆しています。F8 KO#4 ブタが死んだ時に、ヒト第 VIII 因子に対するインヒビターが血漿サンプル中に検出されたので、ヒト第 VIII 因子の治療効果がもはやなく、胃潰瘍による深刻な出血となりました。第 VIII 因子インヒビターに対する免疫寛容導入治療のモデルとして F8 KO を研究する課題があります。