

AT-siRNA の基礎と臨床

澤田暁宏*

Basics and clinic of AT-siRNA

Akihiro SAWADA

要約：アンチトロンビン (antithrombin) -small interference RNA (AT-siRNA) は、RNA 干渉により肝臓での AT 産生を阻害し、血液を過凝固に rebalance する事で血友病の出血傾向を抑制する新規の non-factor 製剤である。血友病治療は、血友病性関節症を回避する為の凝固因子製剤の定期補充療法がまだ標準的治療であるが、定期補充療法は頻回の静脈穿刺が Quality of Life (QOL) 低下の要因となる。AT-siRNA 製剤の Fitusiran は、月 1 回皮下投与の製剤であり、従来の定期補充療法における頻回の静脈穿刺による QOL 低下を改善できる可能性がある。また、血友病 A または B、インヒビターの有無を問わず効果を発揮できる。本稿では、現在臨床試験が進行中の Fitusiran に関して、第 1/2 相試験の結果を中心に概説する。

Key words: hemophilia, fitusiran, antithrombin, small interference RNA, non-factor agents

1. はじめに

アンチトロンビン (antithrombin: AT) は、肝臓で産生されるセルピンスーパーファミリーの一つで、血液凝固系プロテアーゼのうち主にトロンビンと Xa 因子および IXa 因子を標的として結合し、その機能を阻害することで凝固抑制的に作用する凝固制御因子である。この AT による凝固制御作用は、ヘパリン様グリコサミノグリカンの存在下で約 1,000 倍に促進される¹⁾。AT が欠乏すると、その凝固制御作用が低下し血栓傾向となるが、先天性 AT 欠乏症のような血栓性素因を併発している血友病患者では、重症度が改善する事が示唆されており²⁾、血友病 A モデルマウスでは、ヘテロの AT 欠乏を併存している場合に出血を抑制する事が示されている³⁾。こうしたことから、血友病において、AT を意図的に低下させることで血液を血栓傾向に補正し出血傾向を抑制する、止血の rebalancing therapy が考案された。この

考えに基づき、non-factor 製剤の一つとして、肝臓での AT 産生を抑制し AT を低下させる RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 治療薬の AT-small interference RNA (siRNA) が開発された。

2. RNAi 治療薬

Zhang らによる総説を基に RNAi 治療薬について以下に解説する⁴⁾。RNAi は、20 年以上前より認識されているもともと生体内に備わる遺伝子サイレンシングメカニズムで、真核細胞において遺伝子活性を直接強力に抑制する。RNAi を起こす因子は、siRNA と言われる二本鎖 RNA である。生体内では、長い二本鎖 RNA または短いヘアピン RNA がエンドリボヌクレアーゼダイサーで切断され siRNA となる。siRNA は、ダイサーや Ago-2 といった内在性タンパクなどで構成された RNA-induced silencing complex (RISC) に組み込まれた後に、センス鎖とアンチセンス鎖に分離され、アンチセンス鎖が標的となる messenger RNA (mRNA) と結合し、mRNA の切断と分解が開始される。RNAi 治療薬として、siRNA 製剤が現在開発されている。siRNA 製剤は、標的となる mRNA 配列に対して相補的な配列に設計した siRNA を作成

*責任者連絡先：

兵庫医科大学呼吸器・血液内科
〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町 1-1
Tel: 0798-45-6886, Fax: 0798-45-6887
E-mail: a-zawa@hyo-med.ac.jp

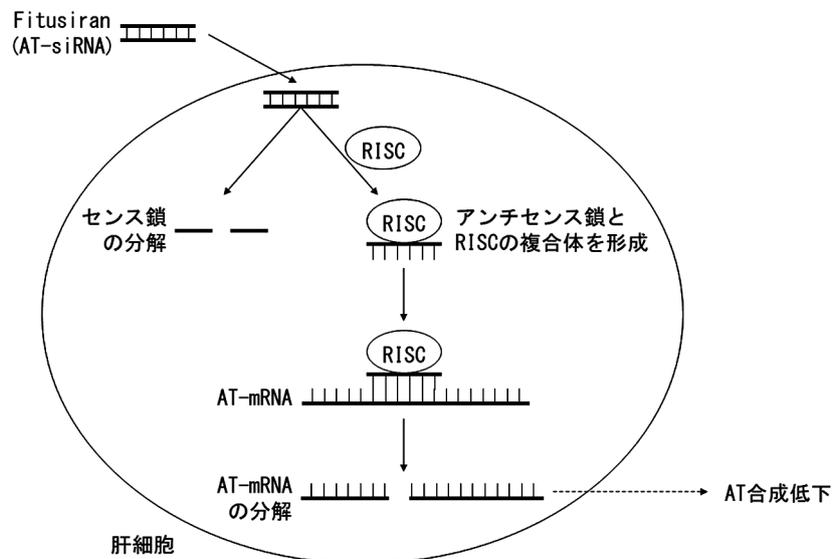


図1 Fitusiran の作用

Fitusiran は、肝細胞で AT-mRNA と結合し、mRNA を分解する事で AT 遺伝子発現が抑制され、AT 合成が低下する。RISC : RNA-induced silencing complex, AT : Antithrombin. (著者作成)

し生体内に投与する事で、siRNA が標的 mRNA と特異的に結合し、mRNA の切断と分解が促進され、目的とする遺伝子発現を特異的に阻害し効果を発揮する。siRNA 分子は親水性であり、そのままでは細胞膜を通過できない。細胞内へのデリバリー戦略として、一部の新型コロナウイルス mRNA ワクチンにも用いられているような脂質ナノ粒子をキャリアとするか、もしくは、標的細胞に発現する特定の受容体に結合するリガンドをコンジュゲートする方法が用いられている。2018 年 8 月に米国食品医薬品局 (FDA) が世界初の siRNA 製剤として、遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスに対する Patisiran を承認した。その後、現在までに急性肝性ポルフィリン症に対する Givosiran、原発性高シュウ酸尿症 I 型に対する Lumasiran が FDA により承認されている。現在、いくつかの siRNA 製剤の第 3 相臨床試験が行われており、AT-siRNA である Fitusiran もその一つである。

3. AT-siRNA の基礎

AT-siRNA の前臨床データは Sehgal らにより報告されており、その概要を以下に示す⁵⁾。Fitusiran は、

AT をコードする SERPINC1 遺伝子 mRNA の 23 ヌクレオチド領域を特異的に標的とし、肝臓での AT 産生を阻害する RNAi 治療薬の AT-siRNA 製剤である (図1)。肝細胞で発現する asialoglycoprotein receptor のリガンドである *N*-acetylgalactosamine とコンジュゲートする事で、皮下投与によって肝細胞へ効率的にデリバリーされるように設計されている。Fitusiran を投与すると、肝臓で SERPINC1 遺伝子 mRNA と結合して AT 産生を阻害し、AT によるトロンビン、Xa 因子、IXa 因子の不活化が抑制される結果としてトロンビン生成が促進する。Fitusiran は、マウスおよび非ヒト霊長類において、用量依存のかつ持続的な AT レベルの低下を示し、血友病マウスモデルでは、Fitusiran 投与によるトロンビン生成の改善や、出血モデルにおいて止血促進が認められた。これらのモデルに基づいて、AT レベルを 50% 未満へ低下させることで、血友病の出血症状を軽減させる可能性が示唆された。

4. AT-siRNA の臨床

1) 臨床試験

第 1/2 相試験の概要を表 1 に示す。Fitusiran の第 1

表1 Fitusiran の第 1/2 相臨床試験 (著者作成)

試験	対象	用量・用法	AT 低下率 (平均±標準誤差)	ABR	安全性	文献	
第 1 相試験	パート A	18~40 歳 健康男性 4 名	プラセボ/Fitusiran 0.03 mg/kg 単回皮下投与	19±4.4%		有害事象 5 件 うち頭痛 1 件が関連の 可能性あり	6)
	パート B	18~65 歳 インヒビター非保有	用量漸増 0.015 mg/kg 0.045 mg/kg 0.075 mg/kg 週 1 回皮下投与	0.075 mg/kg 投 与時 61±8%		有害事象 19 例 (76%) うち関連あり 9 例 (36%) 重篤な有害事象 2 件 ・ HCV 再活性化 ・ ウイルス性肺炎	
	パート C	血友病 A/B 男性 25 名 (凝固因子活性 5% 以下) パート B 12 例 パート B 18 例 (5 名が B/C 重複)	用量漸増 0.225 mg/kg 0.45 mg/kg 0.9 mg/kg 1.8 mg/kg 固定用量 80 mg 月 1 回皮下投与	0.225 mg/kg 投 与時 70±9% 1.8 mg/kg 投与時 89±1% 80 mg 投与時 87±1%		重度有害事象 3 例 ・ 高 TG 血症, 歯破損, 歯痛 ・ ウイルス性肺炎 ・ 非心臓性胸痛 その他軽度の注射部位反 応, ALT 高値, D ダイマー 高値など	
	パート D	18~65 歳 インヒビター保有 血友病 A/B 男性 17 名	固定用量 50 mg 80 mg 月 1 回皮下投与	50 mg 投与時 82.0±2.2% 80 mg 投与時 87.4±0.7%	中央値 0	関連のある重度以上の有 害事象無し 注射部位反応, ALT 高値, D ダイマー高値など	7)
第 2 相試験	18~65 歳 インヒビター保有/非保有 血友病 A/B 男性 33 名	固定用量 50 mg 80 mg 月 1 回皮下投与	78~88%	インヒビターなし 中央値 1.7 インヒビターあり 中央値 0	脳静脈洞血栓症 1 件	8)	

相試験は、18 歳以上を対象とし、連続する 3 つのパートで行われた健常被検者 4 名およびインヒビターの無い血友病 A および血友病 B 患者 25 名を対象とした用量漸増試験⁶⁾と、インヒビター保有血友病 A および血友病 B 患者 17 名を対象とした固定用量試験⁷⁾の 4 つのパートで行われた。最初のパート A フェーズは無作為化単盲検試験で、健常被験者に対し Fitusiran 0.03 mg/kg またはプラセボが単回投与された。次のフェーズは、インヒビターの無い血友病 A または血友病 B 患者に対する 2 つのパートによる非盲検試験で、パート B の Fitusiran 0.015 mg/kg, 0.045 mg/kg, 0.075 mg/kg 皮下投与週 1 回、または、パート C の Fitusiran 0.225 mg/kg, 0.45 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.8 mg/kg, 固定用量 80 mg 皮下投与月 1 回が行われた。パート D では、インヒビター保有血友病 A または血友病 B 患者に対し、非盲検で Fitusiran 固定用量 50 mg または 80 mg の皮下投与月

1 回が行われた。

その後続く第 2 相延長試験には、第 1 相試験に登録されたインヒビターの無い血友病患者とインヒビター保有血友病患者を含む 33 名が登録され、固定用量 50 mg または 80 mg の皮下投与月 1 回で継続された⁸⁾。

第 3 相試験は、以下の 3 つの試験で行われている：

①12 歳以上のインヒビターの無い血友病 A または血友病 B 患者を対象とした、Fitusiran 投与群と凝固因子製剤の出血時治療群の非盲検ランダム化比較試験の ATLAS-A/B (NCT03417245), ②12 歳以上のインヒビター保有血友病 A または血友病 B 患者を対象とした、Fitusiran 投与群とバイパス製剤の出血時治療群の非盲検ランダム化比較試験の ATLAS-INH (NCT03417102), ③12 歳以上のインヒビターの有無を問わない血友病 A または血友病 B 患者で、凝固因子製剤による定期補充療法から Fitusiran への切り替

えによる非盲検一方向クロスオーバー試験のALTAS-PPX (NCT03549871) である。主要評価項目は年間出血率 (annualized bleeding rate: ABR) であり、主要な副次評価項目として、年間自然出血率 (annualized spontaneous bleeding rate: AsBR)、年間関節出血率 (annualized joint bleeding rate: AjBR)、Haem-A-QOL スコアで測定される生活の質 (Quality of Life: QOL) 評価などが含まれる。これらの第3相試験を完了した患者は、長期安全性および有効性試験であるATLAS-OLE (NCT03754790) へ移行し評価中である。

12歳未満の小児血友病患者に対しては、AT値とその変化率を一次評価項目とする第2/3相試験として、インヒビター保有血友病Aまたは血友病B患者を対象としたATLAS-PED (NCT03974113) が行われている。

2) 有効性

第1相試験における有効性評価の概要は以下のとおりである^{6,7)}。ベースラインのAT値は、健常被験者で平均102.7% (範囲: 97.8~109.7%)、インヒビターの無い血友病患者は平均103.3% (範囲: 84.9~121.0%)、インヒビター保有血友病患者では、50 mg および80 mg 投与群でそれぞれ平均 (±標準誤差) 109.5±4.4%、100.2±4.8%であった。パートAでは、単回皮下投与後21日目にAT値の低下率が平均19±4.4%と最も大きくなり、56日目までにベースライン値まで回復した。パートBでは、用量依存的なAT値の低下が観察され、最高用量の0.075 mg/kg 投与時の平均最大低下率は61±8%であった。パートCでも同様に用量依存的なAT値の低下が観察され、平均最大低下率は、0.225 mg/kg 投与時の70±9%から、1.8 mg/kg 投与時の89±1%の範囲であった。固定用量80 mg が投与された被験者のAT値の平均最大低下率は87±1%であった。Fitusiran 投与中止後のAT値の回復率は、平均10~15%/月であった。AT値がベースラインから75%以上低下した場合に、血友病患者の最大トロロン産生量の中央値は、軽症血友病患者で報告される値に相当した。第1相試験には有効性評価は含まれていないが、パートBおよびCの探索的評価において明らかな出血エピソード発生率の低下が示された。パートDでは、AT値の低下率

が50 mg および80 mg 投与群でそれぞれ82.0±2.2%、87.4±0.7%であった。パートDで探索的に評価されたABRの中央値は0であり、65%の患者が観察期間中に出血を認めなかった。パートDに含まれているQOL調査では、Haem-A-QoLスコアにおいて、身体的健康領域と合計スコアで臨床的に意味のある患者QOLの改善が報告された。

第2相延長試験では、インヒビターの無い血友病患者のABRは1.7、インヒビター保有血友病患者のABRは0であり、全体のABRの中央値は1で、48%の患者は観察期間中に出血が無かった。また、4人の患者で5つの外科的処置 (内視鏡的胆嚢摘出術、鼻中隔矯正術、開胸肺区域部分切除術、臼歯抜歯、小臼歯抜歯) が行われ、臼歯抜歯以外の4処置では凝固因子製剤による止血治療が行われた。これらの患者では、AT値はベースラインの20%未満に低下しており、術後の出血は最小限であった⁸⁾。

3) 安全性

第1相試験での安全性評価の概要は以下のとおりである^{6,7)}。パートA~Cでの有害事象の多くは軽度の注射部位反応であった。パートAの健康男性で、Fitusiran と関連の可能性がある頭痛が1件報告された。パートBおよびCでは、19例 (76%) に有害事象が報告され、Fitusiran と関連ありと判定されたものは9例 (36%) であった。パートBおよびCでは、重度の有害事象が3例報告された。1例は、0.45 mg/kg が投与された被験者で、高トリグリセリド血症、歯牙破損、歯痛であった。もう1例は、1.8 mg/kg が投与された被験者で、ウイルス性肺炎を認めた。この2例ではFitusiran の投与は継続された。もう1例は、固定用量80 mg が投与された被験者で、重度の非心臓性胸痛が出現し、CRP、AST、ALT、Dダイマーの増加を伴っていたが、精査で血栓症は否定された。この1例は45日目に試験中止となった。Fitusiran に対する抗薬物抗体の発生は無かった。ALTの上昇が9例 (36%) に見られたが、そのうちの8例は未治療のC型肝炎ウイルス感染を合併していた。一部の被験者でDダイマーの増加が見られたが、Fitusiran との用量反応関係や、他の凝固パラメーターの変化は見られなかった。パートDでは、試験中止、血栓症イベント、Fitusiran に関連する重篤な

表2 出血マネジメントのガイドライン⁹⁾

	第VIII因子製剤	SHL 第IX因子製剤	EHL 第IX因子製剤	aPCC	rFVIIa
単回投与の推奨	10 IU/kg	20 IU/kg	20 IU/kg	30 IU/kg	≤45 µg/kg
単回投与の上限	20 IU/kg	30 IU/kg	30 IU/kg	50 IU/kg	45 µg/kg
反復投与の手順	2回目の投与の前に臨床研究センターに連絡する必要がある；臨床研究センターでの評価と治療を検討する				3回目の投与の前に臨床研究センターに連絡する必要がある
	24時間以内の再投与はすべきでない	24時間以内の再投与はすべきでない	5～7日以内の再投与はすべきでない	24時間以内の再投与はすべきでない	2時間以内の再投与はすべきでない
	2回以上の投与が必要な場合は、48～72時間以内に臨床研究センターで診察を受ける必要がある（評価のための活動のスケジュールを参照）				3回以上の投与が必要な場合は、48～72時間以内に臨床研究センターで診察を受ける必要がある

より高用量，より高頻度，または複数回の反復投与が必要な状況では，研究医療モニターおよび臨床アドバイザーとの話し合いが推奨され，AT補充を検討する必要がある 抗線溶薬を凝固因子製剤もしくはバイパス製剤と併用してはならない

出血時の補助的治療は標準的治療で実施する必要がある

SHL: standard half life. EHL: extenden half life. aPCC: activated prothrombin complex concentrate. rFVIIa: recombinant activated factor VII. AT: antithrombin.

有害事象は認めなかった。パートDでのすべての有害事象は軽度から中等度であり，注射部位反応，AST，ALT，Dダイマーの上昇が見られた。肝機能障害は，50 mg 投与群より80 mg 投与群でより多かったが，それらの患者はHCV感染を合併していた。Dダイマーの上昇が47%で観察され，80 mg 投与群でより多かったが，他の凝固パラメーターに臨床的に有意な変化は見られなかった。

第2相試験でも，第1相試験と同様に，中間解析まではほとんどの有害事象は軽度から中等度までであり忍容性は良好であった。しかし，中間解析後に血栓塞栓症による患者死亡が発生し，試験が一時中断した⁴⁾。この患者は，運動誘発性の股関節痛を発症し，それに対して3回の凝固因子補充療法を受けた後，脳静脈洞血栓症を発症した。不幸な事に，当初はFitusiranとは関連の無いくも膜下出血と誤診され，さらに追加で凝固因子製剤が補充され，最終的に脳浮腫によって亡くなられた。後の検討で，実際には，発症時から脳静脈洞血栓症であったことが判明し，Fitusiranと関連する重篤な有害事象として試験が中断された。その後，出血マネジメントのガイドラインが作成され（表2），試験が再開された。それ以降は，インヒビターの有無にかかわらず，被験

者における全ての出血イベントは，凝固因子製剤およびバイパス製剤により問題なく管理されている⁹⁾。

5. AT-siRNAの課題

AT-siRNAのようなnon-factor製剤による治療は，従来の凝固因子製剤による定期補充療法の代替療法の位置づけである。血友病患者において，血液の止血機能を完全に正常化するものではない為，出血症状を完全には抑制出来ない。したがって，出血時に凝固因子製剤による止血治療を必要とする場合がある。Fitusiran投与下では，血液が過凝固にrebalanceされており，凝固因子を補充する事で血栓症の発症が懸念される。表2のガイドラインに示されるように，出血時の凝固因子投与量は，通常用いられるものより減量する必要がある。現在臨床試験が進行中であり，Fitusiran投与下での出血時，外傷時，観血的処置時などの場合，どの程度の出血もしくは侵襲があれば追加の凝固因子補充が必要となるのか，凝固因子製剤の補充が必要な場合に，投与量，投与頻度はどの程度必要かなどの疑問に対する最適解はまだ明らかではない。AT-siRNAの薬効は，AT値の測定で判断できるが，AT値と出血症状との相関関係は

不明である。また、ATは補充療法が可能であり、必要となればAT値を正常化させる事も可能と考えられるが、どのような状況でそれが必要となるかも未解決の課題である。

6. おわりに

血友病に対する標準的治療である凝固因子製剤の定期補充療法は、頻回の静脈穿刺が必要でありQOLを低下させる。Fitusiranは、月1回の皮下投与であり、頻回の静脈穿刺によるQOL低下を改善できる可能性がある。現時点で、血友病Aでは、すでに承認されている皮下投与のnon-factor製剤である第VIII因子機能代替2重特異性抗体製剤（エミシズマブ）が使用可能であり、インヒビター非保有血友病Bは、半減期延長第IX因子製剤により定期補充療法の投与頻度を減らす事が可能となっているため、最もFitusiranの有益性が高いのは、バイパス製剤以外の有効な止血治療が無いインヒビター保有血友病Bと考えられる。とはいえ、臨床試験では、血友病AまたはB、インヒビターの有無を問わず有効性が認められており、全ての血友病患者において治療選択肢の一つになる可能性がある。このまま順調に承認された際には、現在の治療レジメンと比較し、止血効果やQOL、アドヒアランスなどを改善できる可能性を検討し、未解決の課題も考慮して適用を判断する必要がある。

著者の利益相反（COI）の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Patnik MM, Moll S: Inherited antithrombin deficiency: A review. *Haemophilia* **14**: 1229–1239, 2008.
- 2) Franchini M, Montagnana M, Targher G, et al.: Interpatient phenotypic inconsistency in severe congenital hemophilia: A systematic review of the role of inherited thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* **35**: 307–312, 2009.
- 3) Bollinger D, Azlam F, Suzuki N, et al.: Heterozygous antithrombin deficiency improves in vivo haemostasis in factor VIII-deficiency mice. *Thromb Haemost* **103**: 1233–1238, 2010.
- 4) Zhang MM, Bahal R, Rasmussen TP, et al.: The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochem Pharmacol* **189**: 114432, 2021.
- 5) Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, et al.: An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med* **21**: 492–497, 2015.
- 6) Pasi KJ, Rangarajan S, Georgiev P, et al.: Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with RNAi therapy. *N Engl J Med* **377**: 819–828, 2017.
- 7) Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, et al.: Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran—Results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost* **19**: 1436–1446, 2021.
- 8) Machin N, Ragni MV: An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B. *J Blood Med* **9**: 135–140, 2018.
- 9) Pipe S, Ragni MV, Négrier C, et al.: Fitusiran, an RNAi therapeutic targeting antithrombin to restore hemostatic balance in patients with hemophilia a or B with or without inhibitors: Management of acute bleeding events. *Blood* **134** (Suppl_1): 1138, 2019.