

総 説

遺伝子治療の現状と新しい展開

小澤 敬也

自治医科大学血液学講座, 輸血部
分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

CURRENT STATUS AND NEW DEVELOPMENTS OF GENE THERAPY

Keiya Ozawa, M.D., Ph.D.

Department of Hematology

Division of Cell Transplantation and Transfusion

Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine

Jichi Medical School

Key words : Gene therapy, AAV vector, Lentivirus vector, Hematopoietic stem cells

はじめに

遺伝子治療の動きが日本でも最近活発となってきた。日本で最初に遺伝子治療が行われたのは1995年のことであり、稀な遺伝性疾患であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に対するものであった (北海道大学で実施)。次に、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 感染症に対する遺伝子治療 (免疫力を高めることによりエイズの発症を抑えることを狙った方法: 熊本大学で計画) が1997年に承認されたが、臨床研究が先行していた米国でこの方法が無効であることが明らかになったため、翌年、断念となった。その後しばらくの間、欧米で症例数が急増する一方で、日本では足踏み状態が続いていた。1998年秋になって漸く第2例目の遺伝子治療が東大医科研でスタートし (腎癌に対する遺伝子治療)、1999年に入ると肺癌に対する遺伝子治療が岡山大学で実施された。その他にも遺伝子治療臨床研究の申請が相次いでいる。日本の遺伝子治療臨床研究もいよいよ新しい局面に入ってきたといえる。

本稿では、遺伝子治療の現状と最近の動向を紹介する。

遺伝子治療のストラテジーと対象疾患

究極的な遺伝子治療は、病的細胞が持つ「遺伝

子の傷」そのものを治すもの (「遺伝子の治療」) であるが、一般的には、細胞に何らかの遺伝子操作を施して治療を行うもの全般を指して広く遺伝子治療といっている (「遺伝子による治療」)。したがって、対象疾患も遺伝性疾患に限定されず、癌やエイズなど様々な疾患に対して新しい角度からの治療法が模索されている。治療用の遺伝子も、疾患の種類と治療ストラテジーによって様々なものが使われる。ある特定の遺伝子がうまく機能していない場合にはその働きを補うために正常遺伝子が用いられることが多い。その場合、欠陥のある細胞に遺伝子を入れることもあれば (細胞修復技術)、全く関係ない細胞に遺伝子を入れることもある (細胞改変技術: 例えば、本来は肝臓で作られる凝固因子を遺伝子操作により筋肉細胞で作らせるようにする)。また、いわゆる自殺遺伝子 [例えば、ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子の場合で、この遺伝子を導入した細胞は抗ウイルス剤のガンシクロビル (Ganciclovir) の投与により破壊される] に代表されるように、ヒトがもともと体の中に持っていない遺伝子を治療に用いることもある。

さて、最もオーソドックスな遺伝子治療の対象疾患は遺伝性疾患であるが、遺伝子導入がうまく

いけば、治療効果もはっきりと出やすいタイプのものである。患者数こそ少ないが、遺伝子治療の有用性をクリアに示す上では大きな意味を持っている。障害のある組織・臓器により標的細胞としては種々のものが候補になるが、骨髄移植が有効であるような遺伝性疾患では、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法が検討されている。

患者数や社会的関心といった点からは、癌が最も大きな対象疾患となっている。いろいろな治療ストラテジーが存在するが、癌に対する免疫力の増強を目的とした免疫遺伝子治療がこれまで数多く検討されてきている。但し、このような方法は従来の免疫療法と本質的に変わるものではなく、治療成績が著しく向上するとは考えにくい。一方、癌細胞に治療用遺伝子（上述の自殺遺伝子や p53 遺伝子など）を直接導入して癌細胞を破壊していくアプローチは、局所的な腫瘍縮小効果を狙ったものであり、転移巣などの遠隔病巣に対する効果は期待したい。また、癌細胞全てに遺伝子を導入することもできないため、治癒を目指すことは困難である。したがって、癌に対して本当に有効な治療法を開発することは、遺伝子治療でもそう簡単ではないと予想される。癌の場合は遺伝子治療を単独で行うよりは、従来の治療法とうまく組み合わせて少しでも治療成績を改善させることを当面の目標とすべきであろう。

最近では、心血管病変・慢性関節リウマチ・神経変性疾患なども遺伝子治療の対象に含まれるようになり、欧米では既に臨床研究も始まっている。例えば、VEGF 遺伝子の投与により血管新生を刺激するような治療法では、閉塞性動脈硬化症や虚血性心疾患などに対して期待される効果が出始めていると報告されている¹⁾²⁾。癌などの場合より遺伝子治療の効果が得られやすいものと考えられ、慢性疾患に対する治療法の選択肢の一つに遺伝子治療が加えられる日はそれほど遠い先のことではないと予想される。

感染症では、エイズがこれまで大きな対象となってきたが、このところ薬物療法が著しく進歩したため、遺伝子治療に対する期待は以前ほど大きなものではなくなっている。その他、種々

Table 1 The number of protocols and patients of clinical gene therapy in the world

Category	Protocols		Patients	
	Number	%	Number	%
Cancer Therapy	240	63.2	2,166	68.3
Gene Marking	41	10.8	227	7.2
Healthy Volunteers	2	0.5	6	0.2
Infectious Diseases	31	8.2	412	13
Monogenic Diseases	53	13.9	296	9.3
Other	13	3.4	66	2.1
Total	380	100	3,173	100

(Wiley, Co., June 1, 1999)

のウイルスに対する DNA ワクチンの開発が進められている。

遺伝子治療の欧米における実施状況

遺伝子治療の臨床研究は米国を中心に活発に進められてきている。1989 年に遺伝子標識の臨床研究が実施され、それをきっかけに最初の遺伝子治療（ADA 欠損症を対象としたもの）が 1990 年にスタートした。その後、何らかの形で遺伝子の投与を受けた患者数は急激な勢いで増え、昨年（1998 年）中頃には約 3,000 人を突破したといわれている。対象疾患の内訳をみると、癌がやはり最も多く、臨床プロトコルの約 7 割を占めている（Table 1）。しかしながら、期待されたほど遺伝子治療の具体的成果が順調に上がっているわけではない。マウスなどの小動物での実験と異なり、ヒトの場合は遺伝子導入効率が低すぎるのが指摘されており、技術面での大きな壁となっている。特に、元々は理想的な標的細胞と考えられていた造血幹細胞への遺伝子導入は、当初の予想以上に困難であることが明らかとなっている。

また、これまでの臨床研究はその多くが安全性の評価に主眼をおいた臨床第一相試験として実施されてきたこと、また特に癌の場合は、効果を期待しにくい進行癌の患者で主に実施されてきたことも、有効性に関するデータがはっきり出てこない理由となっている。但し、最近では、臨床第二相試験の形で行われる遺伝子治療もかなり増えてきている。

今年、臨床研究がスタートしたものの中では、

血友病Bに対する遺伝子治療が注目される。凝固第IX因子遺伝子を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを筋注するプロトコールで、癌などの場合に比べて効果の有無を判定しやすい。このような臨床研究で遺伝子治療の有用性が明確になることを期待したい。

日本における遺伝子治療臨床研究

日本では癌に対する遺伝子治療臨床研究の試みが最近相次いでいる。東京大学医科学研究所では、腎癌に対する遺伝子治療を昨年(1998年)の秋に開始した。方法は、癌を手術的に摘出した後、癌細胞を培養してGM-CSF遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、それを癌ワクチンとして元の患者に接種するというものである(接種前に放射線照射して癌細胞の増殖力はなくしておく)。接種部位では、GM-CSFの働きにより樹状細胞などの抗原提示細胞が刺激され、その結果、腎癌細胞に特異性を持った細胞障害性Tリンパ球(CTL: cytotoxic T lymphocytes)が効率よく誘導されるようになる。そして、そのようなCTLが全身に残存している腎癌細胞を攻撃していくという戦略である(免疫遺伝子治療)。この方法では大きな癌病巣を消してしまうような劇的な治療効果を望むことは難しいが、癌の再発や転移を抑えるといったことを目的とする場合にはある程度の効果が得られるのではないかと期待されている。

岡山大学では非小細胞肺癌に対する遺伝子治療を計画し、今年3月にスタートした。方法は、p53遺伝子(癌抑制遺伝子)をアデノウイルスベクターで肺癌病巣に直接注入するものである。様々な機序が想定されているが、p53を大量発現するようになった癌細胞はアポトーシスを起こすと考えられており、腫瘍の縮小効果を期待することができる。さらに、腫瘍血管を抑制する効果も指摘されている。また、抗癌剤のシスプラチンを併用する場合と遺伝子治療単独の場合の効果が比較検討される。このような治療法では、ベクターを注入した局所に効果が限定されるため、進行癌ではやはり治癒を目指すことは難しい。気道閉塞などの患者を苦しめる症状を軽減することにより、QOL(quality of life)の改善や延命効果を図るのが

主な目的である。また、同様のp53遺伝子を用いた食道癌の遺伝子治療(千葉大学)が最近承認されており、肝癌を対象とした計画が東京大学医科学研究所で進んでいる。

その他、乳癌に対する遺伝子治療として特殊な方法が癌研究会附属病院より申請されている。造血幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて多剤耐性遺伝子(MDR1遺伝子)を組み込んでおき、癌化学療法の副作用(造血抑制)を軽減しようというものである(骨髓保護療法)³⁾。既に米国で実施された臨床研究では、化学療法を繰り返すにしたがい骨髓抑制が軽減されたようにみえる症例もあったようであるが、やはり遺伝子導入効率がきわめて低く、内在性のMDR1遺伝子の発現が誘導されたか、あるいは薬剤のクリアランスが促進されるようになったものと解釈されている。また、このような方法では、多剤耐性となった造血幹細胞が癌化した場合のことも懸念される。最近、マウスの系であるが、MDR1遺伝子を導入し、造血因子による刺激で体外増幅した造血幹細胞の移植を行うと、骨髓増殖性疾患が惹起されたことが報告され、問題となっている⁴⁾。臨床の実際面でも、造血抑制の問題に関しては、遺伝子組換え型G-CSFの投与や自家末梢血幹細胞移植により癌化学療法を安全に行えるようになっており、MDR1遺伝子を利用した骨髓保護療法の臨床的意義は薄れてきていると思われる。

遺伝子導入法

技術面で遺伝子治療の鍵を握っているのが遺伝子導入技術である⁵⁾。多くの場合、ウイルスが持っている自然の力を利用する(Table 2)。そのようなウイルスベクターの中で代表的なものは、マウス白血病ウイルスをベースとし、複製能力をなくすることにより病原性を失わせたレトロウイルスベクターである。このベクターは特に造血系細胞(造血幹細胞やリンパ球など)への遺伝子導入に適しているが、非分裂細胞へ遺伝子を導入することはできない。癌の遺伝子治療によく用いられるアデノウイルスベクターは、やはり複製能力をなくすることにより安全性を高めてある。このベクターの特徴は、非分裂細胞にも遺伝子導入でき、また導

Table 2 Characteristics of Representative Viral Vectors

	Retrovirus vector	Adenovirus Vector	AAV Vector	Lentivirus Vector
Pathogenicity of wild-type virus	+	+	-	+
Viral genome	RNA	dsDNA	ssDNA	RNA
Viral particles	unstable	stable	very stable	stable
Gene transfer to dividing cells	+	(unfit)	+	(unfit)
Gene transfer to non-dividing cells	-	(unfit)	+	(fit)
Transduction efficiency :				
adherent cells	good	very good	good	good
floating cells	good	poor	bad	good
In vivo transduction	no	yes	yes	yes
Chromosomal integration	+	-	+	+
Gene expression	stable ?	transient	stable ?	stable ?
Adverse effects	- ?	cytotoxic/immune response to transduced cells		risky ?

入した遺伝子の発現レベルが高いことである。但し、レトロウイルスベクターの場合と異なり、導入遺伝子が染色体 DNA に組み込まれないため、増殖する細胞では次第に導入遺伝子が失われていく。また、第一世代のベクターではアデノウイルス自身の遺伝子の大半が含まれており、その遺伝子発現を完全に抑えきれないことから、遺伝子導入細胞は免疫学的に排除されてしまう。したがって、アデノウイルスベクターを用いた場合の遺伝子発現は一過性であり、長期的な遺伝子発現を必要とする遺伝性疾患の治療には適さない。非分裂細胞への遺伝子導入が可能で、かつ導入遺伝子の長期発現が期待できるものとしては、AAV ベクターが注目されている。このベクターは非病原性ウイルスに由来するために安全性の点で有利である。in situ 法により筋細胞⁶⁾、神経細胞⁷⁾、肝細胞⁸⁾などに効率よく遺伝子を導入することができる。但し、臨床グレードの AAV ベクターを大量作製することが難しく、本格的な臨床応用は遅れている。

非ウイルス性のベクターとしては、リポフェクション法がよく利用されている。これは、正荷電リポソーム（脂質二重膜より成る）と負の電荷を持つ DNA の複合体を作り、それを細胞に取り込ませることにより遺伝子導入を行うという方法である。安全性は高いが、遺伝子導入効率と遺伝子

発現持続期間の点でウイルスベクターには及ばない。その他、精製 DNA を直接筋肉注射する方法もある（naked DNA 法）。前述の、VEGF 遺伝子を用いた血管新生療法はこの naked DNA 法によるものであり、目的によっては、このような方法でも十分効果を期待できるようである。

遺伝子治療研究の最近の動向

新しい遺伝子導入法としては、レンチウイルス由来のベクターの開発が脚光を浴びている⁹⁾¹⁰⁾。マウス白血病ウイルスをベースにしたレトロウイルスベクターと異なり、レンチウイルスベクターでは神経細胞・筋細胞・肝細胞などの非分裂細胞や G₀ 期にある造血幹細胞への遺伝子導入も可能である。HIV（ヒト免疫不全ウイルス）を基本骨格として、エンベロープとしては従来のレトロウイルスベクターと同様のマウス白血病ウイルス由来のものや VSV（vesicular stomatitis virus）の G 糖蛋白質を利用したシュードタイプウイルスベクターが主に検討されている。但し、臨床応用に持って行くには、安全性が最大の難点となっており、ヒトに対して非病原性のレンチウイルス（例えば、ネコやサルなどのレンチウイルス）をベースにしたベクターの開発も一つの方向性となっている¹¹⁾。アデノウイルスベクターに関しては、ウイルス遺伝子の部分をすべて取り外した形の gutted アデノウイルスベクターの開発が進められて

いる。これが実用化されれば、アデノウイルスベクターの応用範囲はかなり広がるものと予想される。その他、異なったタイプのウイルスベクターの長所をうまく取り入れたハイブリッドベクターの開発も活発に進められている。

レトロウイルスベクター法では導入遺伝子が染色体 DNA にランダムに組み込まれ、安全性の点で問題が残る。そこで、安全であることが分かっている特定の場所に遺伝子を組み込ませようという新しいテクノロジーの開発が進んでいる。これは、自然の感染ではウイルスゲノムが第 19 番染色体の AAVS1 領域 (19q13.3-qter) に組み込まれることが知られている AAV の性質を利用した方法である。具体的には、AAV の非構造蛋白質である Rep と、AAV ゲノムの両末端に存在する ITR (inverted terminal repeat) の働きを利用するもので、TVI (Targeted Vector Integration) 法と呼ばれている¹²⁾。

造血幹細胞を標的にした遺伝子治療法に関しては、遺伝子導入のレベルでの効率の改善を図るのではなく、遺伝子導入造血幹細胞の体内での増幅を図る方法も検討されている。具体的には、選択的増幅遺伝子 (selective amplifier gene) の開発が進んでいる。G-CSF 受容体/エストロゲン受容体融合遺伝子 (G-CSF 受容体のリガンド結合領域を除いた部分とエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質をコードする遺伝子) をそのプロトタイプとするものである。即ち、G-CSF 受容体の細胞内増殖シグナルを利用するもので、その働きを制御する分子スイッチとしてエストロゲンとその受容体を用いたものである¹³⁾¹⁴⁾。その他、同様の試みとして、FKBP12 ドメイン (FK506 と結合する) とエリスロポエチン受容体、c-kit、あるいは Mpl (トロンボポエチン受容体) とのキメラ蛋白質の遺伝子を導入しておき、FK1012 (FK506 の二量体) あるいはその誘導体を作用させ、標的細胞の増殖を誘導するシステムが開発されている¹⁵⁾。最近、動物実験でもこのようなストラテジーが有効に機能することが示されている。

造血幹細胞遺伝子治療の分野で注目されるもう一つの最近の知見は、外来性遺伝子を導入した細

胞が免疫学的排除から免れることが判明したことである¹⁶⁾。造血幹細胞移植に伴う免疫学的再構築のため、導入遺伝子産物に対する免疫寛容 (トランス) が誘導されたものと考えられる。したがって、遺伝性疾患で障害されている遺伝子の蛋白質発現が生来全くない場合 (null タイプ) であっても、造血幹細胞遺伝子治療の場合には治療用遺伝子産物に対する免疫反応が惹起されないことが示唆される。さらに、体内に元々存在しない外来性蛋白質の遺伝子を治療に用いることも可能であることを示している。この知見は、臓器移植や自己免疫疾患に対する治療法を開発していくうえでも重要なものであると思われる。

癌に対する遺伝子治療の新しいストラテジーでは、腫瘍血管を抑え込む方法 (いわば癌に対する兵糧攻め) が注目されている。例えば、エンドスタチンやアンジオスタチンなどの抗腫瘍効果が注目されているが、このようなものを体内で持続的に働かせるには、遺伝子治療法の応用が適している¹⁷⁾。

その他、導入遺伝子の発現制御に関しても、様々な方法の開発が進んでいる。このようなテクノロジーの進歩は、遺伝子治療の適応疾患の拡大に繋がるものであり、重要テーマである。

おわりに

遺伝子治療研究のここ数年の反省点の一つに、小動物で得られたデータがヒトなどの大動物にそのまま当てはまらないことがあげられる。そこで、ヒトに近い霊長類のサルを用いて新しいテクノロジーの有効性を検証していくことの重要性が改めて認識されている。日本でも最近、筑波霊長類センターに遺伝子治療前臨床試験を行うことができる共同利用施設が整備され、本格的研究がスタートした。大型動物を用いた研究は莫大な経費を要するものであるが、臨床応用に向けた一つのステップとして大きな意義を持っている。遺伝子治療は、現在はまだ実験的医療の段階にあるが、21 世紀には本格的実用化が進むものと予想される先端医療である。欧米で確立されてから導入するという従来のパターンを辿るのではなく、開発段階から日本の研究者や製薬企業が遺伝子治療の分野

で大きな貢献をしていくことが望まれる。

文 献

- 1) Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., et al. : Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97 : 1114—1123, 1998.
- 2) Losordo, D.W., Vale, P.R., Symes, J.F., et al. : Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98 : 2800—2804, 1998.
- 3) Hanania, E.G., Giles, R.E., Kavanagh, J. et al. : Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplant hematopoietic recovery following intensive systemic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 15346—15351, 1996.
- 4) Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., et al. : Transduction of murine bone marrow cells with a MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 92 : 2269—2279, 1998.
- 5) Anderson, W.F. : Human gene therapy. *Nature* 392 : 25—30, 1998.
- 6) Herzog, R.W., Yang, E.Y., Couto, L.B., et al. : Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat. Med.* 5 : 56—63, 1999.
- 7) Fan, D., Ogawa, M., Fujimoto, K., et al. : Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic l-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 9 : 2527—2535, 1998.
- 8) Snyder, R.O., Miao, C.H., Patijn, G.A., et al. : Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat. Genet.* 16 : 270—276, 1997.
- 9) Naldini, L., Blöer, U., Gally, P. et al. : In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 : 263—267, 1996.
- 10) Miyoshi, H., Smith, K.A., Mosier, D.E., et al. : Transduction of human CD34+ cells that mediates long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283 : 682—686, 1999.
- 11) Poeschla, E.M., Wong-Staal, F., and Looney, D.J. : Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* 4 : 354—357, 1998.
- 12) Surosky, R.T., Urabe, M., Godwin, S.G., et al. : Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* 71 : 7951—7959, 1997.
- 13) Ito, K., Ueda, Y., Kokubun, M., et al. : Development of a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic cells. *Blood* 90 : 3884—3892, 1997.
- 14) Matsuda, K.M., Kume, A., Ueda, Y., et al. : Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther.* 6 : 1038—1044, 1999.
- 15) Jin, L., Siritanaratkul, N., Emery, D.W., et al. : Targeted expansion of genetically modified bone marrow cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 8093—8097, 1998.
- 16) Hanazono, Y., Heim, D., Giri, N., et al. : Tolerance induction against a xenogeneic gene production by introduction of the gene via hematopoietic stem cells in a rhesus monkey model. Abstract of the 5th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, p27, 1999.
- 17) Blezinger, P., Wang, J., Gondo, M., et al. : Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat. Biotech.* 17 : 343—348, 1999.