

Review Article – Full Translation

血友病遺伝子治療：どこまで進歩しているのか？

Gene therapy for haemophilia: how far have we come?

P. A. Fields and K. J. Pasi

Katherine Dormandy Haemophilia Centre, Department of Haematology, Royal Free Hospital and School of Medicine

遺伝子治療の概念が最初に示されたのは1980年代後半頃であったが、これは血友病の生物学的な理解を通じて、これまでに蓄積されてきた知識と、組換えバイオテクノロジーの出現によるものであった。血友病は単一遺伝子異常症であるため遺伝子治療の標的として広く認められており、凝固因子レベルをわずかに増加するだけで重症患者の出血症状を有意に改善させることができる。確かに血漿由来製剤は有効であるが、製剤の安全性については懸念が残っている。最適の遺伝子療法プロトコールなら、導入遺伝子の複数コピーが核内に入り、転写され、その後生物学的活性のある凝固因子蛋白に翻訳される。理想的には、標的細胞が分裂する際、遺伝子産物が長期にわたり産生できるように宿主細胞ゲノムへの組み込みが一定でかつ予測できるのが望ましい（発がん性を避けるため）。

1995年、本誌に血友病の遺伝子療法の希望と未来について概説した論評が発表された⁽¹⁾。1997年9月の初め、Chapel Hill（ノースカロライナ）で会議が開かれ、2日間にわたって遺伝子治療と血友病について討論された。本稿ではこの2年間でのどの程度進んできたかを概説してみたい。本稿は2つのセクションに分かれており、まず初期の開発とその際に遭遇した問題について解説し、後半のセクションではこれらの問題に対する新しい方法について触れる。また血友病に対する遺伝子治療の将来についても考察する。

血友病遺伝子治療の進歩 – 1997年まで

ウイルスベクター – レトロウイルス

当初試みられたベクターの多くはウイルス由来であった。これらの実験はレトロウイルスベクターを用いた血友病Bに集中しており、細胞系にトランスフェクションしその後齧歯類動物モデルに移植するという *ex vivo* 法によるものであった。初期の段階で、第Ⅸ因子を発現するレトロウイルスベクターによるマウス筋原細胞のトランスフェクションは一応成功し、第Ⅸ因子は6カ月間発現したがレベルは低かった^(2,3)。ベクターの発現が不十分であったことと、異種の遺伝子導入が宿主免疫反応を惹き起こしたため⁽³⁾と考えられる。それから、研究はより大きな動物で検討されたが、第Ⅸ因子の発現は非常に短期間で、また臨床的には意味のないほど低レベルであった⁽⁴⁾。この後、第Ⅸ因子発現レトロウイルスベクターを用いて *in vivo* 法が試みられた。本法では門脈に注入してイヌ肝細胞へ感染させたが、レトロウイルスを取り込ませるために、動物の肝を2/3切除して細胞分裂を誘導するものであった⁽⁵⁾。手順が難しい上、非常に低レベルの第Ⅸ因子しか産生されなかった。いくつかの成果は得られたが、解決しなければならない問題点がさらに残っているのは明らかであった。例えば少ないウイルスのコピー数、標的細胞が分裂する必要性、導入される遺伝子サイズの限界、および、ウイルス力価の低値などであった。さらにベクターについては、親和性、ランダムな組み込みおよび発がん性などと関連する長期安全性についても懸念された。

ウイルスベクター —アデノウイルス

レトロウイルスベクターの安全性に対する懸念から、アデノウイルスなどの他のウイルスベクターに関心が向けられるようになった。レトロウイルスベクターと違って、アデノウイルスは非分裂細胞に感染することができる。門脈注入によりイヌ肝細胞に感染させる同様の試験では、より高いレベルの第IX因子を得ることができたが、発現期間は短かった⁽⁶⁾。この実験系でうまくいかなかったのは、アデノウイルス固有の蛋白発現による感染肝細胞に対する細胞性免疫反応が一部関与していたことにもよる。短い発現期間を克服するためには再投与が必要と考えられた。しかしながらこれは、ベクターを不活化しその結果導入細胞消失を招くような強い免疫反応に対抗して実施される必要がある。これらの問題のため、研究者はアデノウイルスの塩基配列から高い免疫原性を有する配列を除去することに着手した⁽⁷⁾。

非ウイルス性運搬系

遺伝子の直接注入、リポソーム被包化および受容体を介在した導入などの物理的な遺伝子運搬システムが試みられてきたが、あまり成功していない。非ウイルス性運搬システムは安全性およびそれらが導入できる挿入DNAのサイズの点でウイルス性運搬システムより明らかに優れている。しかし、その安定性については不明である。さらに重要なことに、遺伝子導入の効率が悪いいためその役割が限定されている。

初期の遺伝子治療の研究から本法を実行に移すことは明らかに可能であるが、効率よく進行させるためにはより安全なベクター、より有効なベクターおよび凝固因子遺伝子に関する生物学的な理解など、克服しなければならない点が多くある。本研究会では、これらの問題点のいくつかについて、改善されるべき点およびそれらがどのようにすれば有望な結果へと導かれるかについて議論された。

ノースカロライナ大学で発表された最近の遺伝子治療の進歩

RNAウイルスベクター —レトロウイルス

レトロウイルスベクターは、より高いウイルス力価、より優れた親和性および統制される部位特異的組込みを達成することによって改善されることが強調された。特異的な細胞ターゲティング(親和性)を強めるために偽タイプレトロウイルスベクターが開発された(Friedmannら, USCD School of Medicine, USA)。これは、Moloneyマウス白血病ウイルス(MMLV)レトロウイルスゲノムを包みこんだ水疱性口内炎ウイルスG糖蛋白エンベロープ(VSV-G)から構成されている。この偽タイプレトロウイルスはVSVエンベロープのためより強い親和性が得られた。次の発表も偽タイプベクターを用いた内容であったが(Naldiniら, Cell Genesys, USA)、ここでは修飾レンチウイルスが用いられていた。MMLVベクターに対しリコンビナントレンチウイルスベクターの最も重要な特性は分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも効率的に組み込まれることである。レンチウイルスベクターの一部はHIV-1由来で、VSV G蛋白の配列が組み込まれて偽タイプ化されたと説明された。将来このベクターを臨床で応用する際の安全性が懸念されるため、*in vivo*および*in vitro*における細胞に入り込むための最小限のHIV部分が明らかにされた。判明しているすべての発病因子(Vif, Vpr, Vpn および Nef)が除去されたベクターが開発された。HIVの病原性発現に必須である5遺伝子のすべてが除去されかつ安定したHIV由来ベクターシステムの利用は臨床的に応用されるレンチウイルスベクターの実現に向かって一つのステップとなった。

DNAウイルスベクター

第2のセッションではDNAウイルスベクターについて、特にリコンビナントアデノウイルス関連ウイルス(AAV)およびアデノウイルスベクター(Adv)の利用に関する発表が集中した。

アデノ関連ウイルスベクター

遺伝子伝搬に関する AAV ベクターの利点は概説されたが、これは、通常非病原性であること（ヒトの 80% はパルボウイルスに感染している）、幅広い宿主（霊長類、イヌおよびマウスモデル）の分裂および非分裂細胞に感染できることである（Samulski ら、UNC-Chapel Hill, USA）。lac Z 遺伝子を発現している AAV ベクターによって筋肉に導入され、問題となる免疫反応なしに 1 年間の長期にわたって遺伝子発現が達成されたことが明らかにされた。ベクターの毒性が消失したことから、筋肉にターゲットさせる AAV ベクターは遺伝子治療のための魅力的なベクターであることが示唆された。AAV ベクターを用いた研究は大動物モデル（イヌ）で検討され、第 IX 因子が 16 週間発現したことが示された。投与部位に局限した免疫反応が生じたが、これは不活化アデノヘルパーウイルスが残存していたためで、AAV-導入細胞が原因ではなかった。AAV ベクターの利用はさらに発展し、High らは（University of Pennsylvania School of Medicine, USA）、ヒト第 IX 因子遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを Rag-1 マウスの後肢に筋肉内注射した（Rag-1 マウスは抗原刺激に反応する B 細胞および T 細胞活性が低下する突然変異を有する）。このマウス血漿第 IX 因子レベルは 250 ~ 350 ng/ml（正常レベルの 5 ~ 7%）で 40 週間以上持続した。第 IX 因子の発現は免疫蛍光法により正常な免疫能を有する C57/BL6 マウスの組織切片でも認められたが、血漿中には第 IX 因子は存在していなかった。実験ではこれらの動物でヒト第 IX 因子に対する抗体が生じることが明らかにされた。しかし、マウス第 IX 因子を発現する AAV では抗体発生は全く認められなかった。この報告により、種の一致した導入遺伝子を用いれば抗体の出現は避けられることが明らかとなった。これは将来、遺伝子治療で用いられる動物モデルにとって重要なポイントである。

その他、ヒト第 IX 因子は筋細胞内および筋線維の間質にも局在することも示された。最近、コラーゲン IV が第 IX 因子結合蛋白として明らかにされた⁽⁸⁾。

High 博士のグループは、門脈カニューレを介して肝に導入するためプロモーターである EFI の制御下

で、ヒト第 IX 因子を発現する AAV についても検討した。ヒト第 IX 因子の血漿レベルは徐々に上昇し、数週で 120 ~ 130 ng/ml の定常レベルに達し、導入から 16 週間持続した。別のグループ（Kay ら、University of Washington, USA）も、ヒト第 IX 因子 cDNA を成熟マウスの肝に伝搬させるためにリコンビナント AAV ベクターを用いた、肝遺伝子治療について検討している。リコンビナント AAV により遺伝子を導入後、治療濃度（正常の 40% まで）の機能的に完全な第 IX 因子が免疫機能のある動物および免疫不全マウスの血漿中に発現し、少なくとも 50 週間は持続することが認められた。その後実施したサザンブロットおよび RNA 分析により、肝細胞が導入されたものと細胞タイプであることが判明した。病理学的にも、また肝トランスアミナーゼ値を用いても肝毒性は認められなかった。

アデノウイルスベクター

数多くの発表でアデノウイルスのベクターが注目されたが、特に血友病に関連するものが多かった。現在では B ドメイン領域のないヒト第 VIII 因子 cDNA を組み込んだベクターが広く用いられている。ヒト第 VIII 因子 cDNA を付けたアデノウイルス E1, E2a, E3 除去ベクターを血友病マウスに尾静脈より投与したところ（Smith ら、Genetic Therapy Inc., USA）、生物学的に活性のある第 VIII 因子がヒトの治療域より十分高いレベルで 9 カ月にわたって発現した。ベクターが投与された血友病マウスは尾を切っても出血は少なく生存し、出血症状が改善されたことを示した。出血症状の改善は血友病イヌモデルでも認められたが、ヒト凝固因子に対する強い抗体産生を生じたため短期間であった。

さらに、ヒト第 VIII 因子 cDNA をつけた E1, E2a, E3 除去ベクターをカニクイザルに末梢静脈から投与したところ、有効で再現性のある肝への遺伝子導入が得られ、生理学的レベルのヒト第 VIII 因子発現が認められた。

アデノウイルスベクターを用いた場合、ベクターを再投与する必要があるため、免疫反応に対抗するいくつかの方法が開発されている。マウスでベクター投与時に cyclophosphamide と deoxyspergualin

を併用し一時的に免疫を抑制させたところ、2回目のベクター投与時には全例有効で、3回目の投与時には2/3で有効であった。しかし、ヒトでこのような方法が容認されないことは明らかである。

さらに直面した問題はヒトがアデノウイルスに対する抗体をすでに持っている事実である。この問題に対処する方法は、免疫原性の高いアデノウイルス血清型の hexon 5 エピトープを血清型 12 など通常ではあまりみられないアデノウイルス血清型と置換した新しいキメラベクターを開発することである。最近のアデノウイルスベクターに関する努力は、遺伝子導入効率を促進し、ベクターの反復投与に対する免疫反応を回避するようなベクターを開発することに集中しているようである。理想的には、免疫原性のあるアデノウイルス蛋白のすべてが欠損したアデノウイルスが必要である。すべてのウイルス遺伝子は欠損しているが宿主組織特異性の発現に必要な調節要素が残存する“無力化”アデノウイルスベクターが開発されている。無力化リコンビナントアデノウイルスを発生させるためにさまざまな方法が試みられているが、これには高い免疫原性を有する配列を除去するためのCre-Loxシステムの利用などがある⁽⁹⁾。

ベクターの開発に関するさらに新しい考え方は、免疫学および遺伝子工学的手法を用いてアデノウイルス親和性を変化させることによって細胞特異性ターゲティングを得ることに向いている (Curielら, University of Alabama, USA)。この方法ではベクターが特異的な受容体を発現している細胞 (線維芽細胞増殖因子FGF-Rなど) をターゲットするようになり、その結果、遺伝子導入レベルを増加させることができる。細胞ターゲティングと同様、アデノウイルスベクターを調整し遺伝子発現を一過性に増加させるようなキメラベクターも開発されている。この目的のため、レトロウイルスパッケージ機能を組み込んだアデノウイルスベクターが開発された。標的細胞にこれらのキメラベクターを感染させると、安定して隣接細胞に導入させることができる一過性のレトロウイルス産生細胞に変換する。

免疫学的な問題

さらに有効なベクターを開発する方法に加え、会議の全セッションでは導入遺伝子によって発現された蛋白およびベクター自身の抗原性に対する免疫反応を克服するための予防策に関し議論された。現在、アデノウイルスベクターは再投与中に生じる免疫反応のためその使用が限られている。ベクター投与時に一過性に免疫を抑制する方法によりベクターを再投与することは可能である (前述)。さらに、免疫寛容を誘導するような免疫学的方法も探求されている。抗原提示に対する刺激反応を遮断するための抗CTLA-4抗体を利用してT細胞アネルギーに誘導することに成功している。最後に、サイトカインIL-12を利用してT_{H2}反応ではなくむしろT_{H1}反応を誘導することによって免疫変化を誘導するような新しい方法が探求されている。これは、T_{H2}が液性抗体反応を誘発することから、免疫的感受性の高い血友病患者における、これまで認められたことのない導入遺伝子産物に対するインヒビター発現の面で特に重要と考えられる。

したがって、さらに改良されたベクターの開発と並行して有害な免疫反応系を回避する方法を開発することも重要である。

結論および将来への展望

会議では我々がこの数年間で遺伝子治療の分野がどの程度まで進歩を遂げたかに焦点があてられた。特に、凝固因子遺伝子の運搬体として現時点で最も有力な候補と考えられるベクターを特定して示した (アデノウイルスおよびアデノ関連ベクター)。このようなベクターシステムは現在動物モデルでの試験段階に入っており (イヌおよびマウス)、これらの相同遺伝子によりさらに適切な試験ができるようになる。最近マウスモデルではAdVおよびAAVベクターにより高い発現レベルが達成されること、さらにその発現は持続的で出血症状も改善されたことが示された。

しかし、楽観的ではあるが、これらのシステムについて克服しなければならない問題がまだ残っている。AAVベクターに関しては、導入遺伝子について

サイズの制限 (4.7 kB まで) があり第Ⅷ因子遺伝子の利用に制限がある。ベクター (特にアデノウイルスベクター) の反復投与の必要性は、ヒト遺伝子治療における未解決の大きな問題である。その他にも解決されていない問題がいくつかある; ヒトのように AAV および AdV に対しすでに免疫を持っている大動物において、これらのベクターはどのように適合するのか? 現在検討されている動物モデルと比べヒトではベクターの作用が非常に異なっている可能性がある。他の繰り返し取り上げられる問題はベクターの再投与に関するもの、および導入遺伝子産物に対する阻害物質が生じる可能性についてであった。また、このような治療が利用できるようになった場合、どのような患者群が遺伝子治療を受けるべきかについても検討しなければならない。かなりの数の患者がすでに慢性肝障害に陥っていること、またヒト免疫不全ウイルスに感染している患者もいることに留意すべきである。このような疑問はすべて、治療または試験を実行に移す前に慎重に考慮される必要がある。現在のところ、倫理的および道徳的な問題からヒトでの臨床試験が計画されるのは少なくとも 2 年先と考えられている。しかしこれは現在実施されている大動物による試験が成功するかどうかによって左右されるであろう。ただ 1 つ確実なことは、遺伝子治療のトンネルの中で急速に出口が視界に入るようになってきていることである。

本論文中で紹介した発表者の抄録は、インターネットの University of Carolina at Chapel Hill Cen-

ter for Thrombosis and Haemostasis website で入手することができる (<http://www.med.unc.edu/thromb/gene.htm>)。

References

- 1 Peake I. The role of gene therapy in haemophilia. *Haemophilia* 1995; 1: Suppl. 1, 40-3.
- 2 Dai Y, Roman M, Naviaux RK, Verma IM. Gene therapy via primary myoblasts: longterm expression of factor IX protein following transplantation *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 10892-5.
- 3 Yao SN, Kurachi K. Expression of human factor IX in mice after injection of genetically modified myoblasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 3357-61.
- 4 Verma IM, Dai Y. Progress in gene therapy. *Proc XXI Int Congr World Federation of Haemophilia* 1994; 15.
- 5 Kay MA, Rothenburg S, Landen CN, *et al*. *In vivo* hepatic gene therapy of Haemophilia B: sustained partial correction in factor IX deficient dogs. *Science* 1993; 262: 117-9.
- 6 Kay MA, Landen CN, Rothenburg SR, *et al*. *In vivo* hepatic gene therapy: complete albeit partial correction of factor IX deficiency in haemophilia B dogs. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 2353-7.
- 7 Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM. Inactivation of E2a in recombinant adenovirus improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nature Genetics* 1994; 7: 362-9.
- 8 Herzog R, Hagstrom J, Kung S, *et al*. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 5804-9.
- 9 Gu H, Marth J, Orban P, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase gene segment in T cells using cell type specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-6.