

## Review Article – Full Translation

## 血友病の遺伝子療法：このミレニアムに「王家の病」は終焉するか？

## Gene therapy for haemophilia: the end of a 'royal pathology' in the third millennium?

A. Liras

Spanish Federation of Haemophilia and Molecular Biology Centre 'Severo Ochoa,' Facultad de Biología, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

**要 約：**血友病は、単一遺伝子の異常に起因する疾患であるという特徴と、少量の蛋白を発現させることにより一時的に緩和させ得るという事実から、遺伝子療法に適した疾患といえる。これまでのところ、血友病の遺伝子療法に関するほとんどの研究は、導入ベクターとしてレトロウイルスやアデノウイルス、アデノ関連ウイルスに大きく依存しており、これらは治療レベルでの長期にわたる安定した第 VIII 因子 (FVIII) または第 IX 因子 (FIX) の *in vivo* での発現を得るのが主な目的であった。アデノ関連ウイルス

FIX の筋肉内および肝臓内輸注そしてミニアデノウイルスを用いた 2 件の臨床試験が既に食品・医薬品局 [米] (FDA) により承認されている。このミレニアムにおいて血友病治療は遺伝子置換を通じてより高度に進歩すべきであり、行く行くは永久に恒久的かつ安全に血友病を「根絶」できるようになり、血友病が医学史の中のほんの 1 ページにすぎなくなる日が来るかもしれない。

**Key words：**第 IX 因子 (FIX), 第 VIII 因子 (FVIII), 遺伝子療法, 血友病, ウイルスベクター

## 緒 言

血友病は最もよく知られた、かつ重篤な遺伝性出血性疾患の 1 つである。1952 年、Biggs と Aggeler は血友病に 2 つのタイプがあることを発見し、これについて記載した。これらが、現在の血友病 A (古典的血友病とも呼ばれる) と血友病 B (クリスマス病とも呼ばれる) である。いずれのタイプも劣性形質と、類似の関節障害リスクや関節出血リスクなどの臨床徴候により特徴づけられる X 染色体関連の異常に起因する疾患である。血友病 A では第 VIII 因子 (FVIII) 値の、血友病 B では第 IX 因子 (FIX) 値の低下がみられる。

1970 年代には、在宅療法を含め世界規模で FVIII および FIX 濃縮製剤が導入され、これは慢性疾患の予防という点で貴重な 1 ステップであった。しかし、不幸なことに 1980 年代には肝炎、そしてさらに不運なことには HIV が凝固因子濃縮製剤を通じて血友病患者に伝播され、初期の成功に翳りをもたらす結果となってしまった。肝炎や HIV の伝播を抑えられなかった結果、多くの血友病患者が死亡し、患者や医師たちの治療への熱意を殺ぐ結果となってしまった。しかし、世界の医療コミュニティはこの危機的状況に素早く対処し、結果的に前ミレニアムの最後の数年には、濃縮製剤を通じたウイルス伝播を予防するための多大なる研究が積み重ねられた。特に、ヒト血漿の使用を避けるための遺伝子組換え型製剤の開発には特筆すべき努力が注がれ、今日ではこれを用いた療法が理想的な治療法と考えられている。このミレニアムには、血友病治療は遺伝子置換の導入そして一般化と

Correspondence: Dr A. Liras, Spanish Federation of Haemophilia and Molecular Biology Centre 'Severo Ochoa', Facultad de Biología, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.

*Haemophilia* (2001), 7, 441–445  
©Blackwell Science Ltd.

いったより高度なゴールをめざすべきであり、行く行くは永久に恒久的かつ安全に血友病を「根絶」できるようになり、血友病が医学史の中のほんの1ページにすぎなくなる日が来るかもしれない。

## 血友病の遺伝子療法

遺伝子療法とは、欠陥のある細胞を遺伝子的に修復するための個別の遺伝子またはオリゴヌクレオチド配列を挿入し、細胞を生体全体の中で正常に機能するよう修復するためのものである。つまり、挿入された遺伝子またはヌクレオチド配列が、細胞が失われた機能を取り戻せるように働くか、障害のために細胞がそれまで果たせなかった機能を果たせるようにすることを期待するものである。この二重の目的は、健全で完全な遺伝子を細胞に追加するか、あるいは変異を“修復”することによって達成可能である。

血友病は、単一遺伝子異常に起因する疾患であるという特徴と、少量の蛋白を発現させることにより一時的に緩和できる、あるいは少なくとも表現型の重症度を重症から中等症に軽減できる（重症、循環血中の正常因子レベルが1%未満；中等症、1～5%；軽症、5～30%）という事実から、遺伝子療法に適した疾患といえる。さらに、血友病の治療では遺伝子の発現を制御する必要がない。そのうえ、血友病では遺伝子療法プロトコールに関連する間接的な付加的利点がある。凝固因子は主に肝臓で合成されるが、量は少ないが他の組織、例えば線維芽細胞、内皮細胞、筋細胞などでも産生され、これは異なる細胞型を遺伝子導入に利用することを可能とする。さらに、ノックアウトマウス<sup>(1,2)</sup>、血友病イヌ<sup>(3,4)</sup>、また最近ではサル<sup>(5)</sup>など前臨床試験に優れた動物モデルが利用可能である。

このミレニアムの最初の10年において、何が血友病遺伝子療法の最大のハードルになるのであろうか。その答えは恐らくベクターであろう。遺伝子導入のための理想的ベクターが存在するとは必ずしも保証されていないため、仮にこの探究をやめたとしても、そのベクターはこれまでに見いだされているベクターがもつ有害性や欠点を最小限に抑えるものでなければならない。現在のベクターがもつ有害性とは、

挿入による突然変異の誘発や免疫原性、肝毒性、発癌作用である。よって、現在の非ウイルスベクターは、*in vivo*における遺伝子発現が一過性で導入効率が極めて悪い。ウイルスベクターの先駆けであるレトロウイルスは、細胞にとって病原性が強く、憂慮すべき発癌性をもつ。これらは細胞ゲノムに組み込まれ、標的細胞がすべて子孫細胞に分裂すると、結果的に治療遺伝子が各細胞に伝達される。一方で、アデノウイルスは細胞ゲノムには組み込まれず、よってその作用は一過性にすぎない。レトロウイルスと比べた場合の他の利点として、治療遺伝子の内包性に優れることと、細胞分裂を必要とせず安全であることが挙げられる。遺伝子組換え型アデノウイルスを媒介とする遺伝子療法は極めて有望であることが既に示されているが、これらのベクターの使用において最も懸念されることは、短期的な挿入遺伝子の発現をもたらす、ウイルスにより誘導された細胞の反応と液性免疫反応である。最近の研究では、抗CD4モノクローナル抗体<sup>(6)</sup>やE1/E3欠損アデノウイルスベクター<sup>(7)</sup>またはヘルパー依存性アデノウイルスベクター<sup>(8)</sup>を用いることにより、挿入遺伝子が有効に発現できるように宿主免疫反応を調節できることが証明されている。アデノ関連のウイルスベクターは複製において欠陥のあるヒトパルボウイルスに焦点を当てるため、単純ヘルペスウイルスなどの他のウイルスとの重複感染に大きく依存している。これらのウイルスベクターはヒトでは病原性が低く、また分裂細胞および非分裂細胞の両者のトランスフェクションに有効である。最後に、レンチウイルス（HIVをベースとしたレトロウイルス）は分裂細胞と非分裂細胞のどちらにも組み込むことができ、ヒトにおける病原性も低く、幅広い標的細胞へのトランスフェクションに有効である。

今後の血友病遺伝子療法の展望を明確にするためには、これまでの進歩や現在我々がどのような地点にいるのかを評価する必要がある。これまで、標的細胞に正常かつ完全な遺伝子もしくは非機能ドメインからの欠失遺伝子を組み込むアプローチ法に注目しながら、血友病遺伝子療法の有効かつ安全なプロトコールを確立するために多大なる研究がなされてきた。しかしながら、いかなる遺伝子療法プロト

コールにも共通する2つの基本的目標を達成した研究者はほとんどいない。この2つの目標とは、すなわち、少なくとも中等症の表現型を確立できるような凝固因子レベルを得ること、そして長期的な凝固因子の発現を達成することである。

これまで、血友病の遺伝子療法に関する研究は導入ベクターとしてレトロウイルスやアデノウイルス、そしてアデノ関連ウイルスに大きく依存してきた。しかし、Vanden Driesscheによる最近の研究<sup>(9)</sup> (Table 1) では、FVIII値が14か月間正常に保たれ、組織増殖活性化因子による動物の前処理や遺伝子療法での合併症にさらに対処するための部分的肝切除術などの手順を踏むことなしに遺伝子放出のための極めてシンプルなシステムを開発可能であることが示唆されている。Balagué<sup>(10)</sup> はミニアデノウイルスベクターなどのより安全なウイルスベクターを使用することにより、また Connelly ら<sup>(11)</sup> はアデノウイルスを用いることにより、12か月にわたり表現型の重症度を中等症に維持することに成功している。

一般的にはあるが、血友病Aよりも血友病Bに対する遺伝子療法プロトコルのほうが数多く開発されており、これは主に両遺伝子の大きさが異なることによるものである。FIXに関与する遺伝子のほうがFVIIIに関与する遺伝子に比べて小さく、扱いが容易で導入ベクターに内包しやすい。いくつかの研究グループ (Herzog<sup>(12)</sup>, Chao<sup>(13)</sup>, Kay<sup>(14)</sup>, Lozier<sup>(5)</sup>, Verma<sup>(15)</sup>) (Table 1) は、主にアデノウイルスとアデノ関連ウイルスを導入ベクターとして用い、中等症～正常の表現型に相当するFIX値を達成し、有意に長期にわたる凝固因子の発現を認めている。High

ら<sup>(16)</sup> による最も最近の研究では非常に興味深い成績が得られている。この研究では、サイトメガロウイルス即時-早期エンハンサー/プロモーターとヒト骨格アクチンプロモーターの一部とを組み合わせたカセットを含有させたベクターを通常の1/4～1/2の量でマウスに筋注射し、正常ヒトFIXレベルの6%の発現が得られている。

ともあれ、このミレニアムでは凝固因子の発現レベルや *in vivo* での発現時間に加えて、血友病のいかなる治療にも常につきまってきた問題、すなわちFVIIIおよびFIXに対する中和抗体であるインヒビターの発現の問題は避けて通ることができない(発現率はFVIIIで20%、FIXで3%)。インヒビターは個々の患者における突然変異のタイプにより影響され、遺伝子療法の際は、ベクター注入に起因する炎症過程などの外部因子によりこの問題はさらに複雑化される可能性もある。さらに、トランスフェクションでの標的組織のタイプやその免疫反応力、あるいは発現を促進するための組織特異的な要素の挿入などは、この問題と密接に関連する可能性がある。さらに、蛋白は細胞内で産生されるため、クラスI抗原の発現につながる可能性があり、この場合、理論的にはインヒビターの形成が促進されるとも考えられる。

ヒト疾患における遺伝子療法が研究されるようになって以来、多くの年月が経過した。アデノシンデアミナーゼ欠損症を対象とした最初の遺伝子療法試験が1990年9月に実施されて以来、遺伝子療法は未来における一種の万能薬として据えられてきたことを思い出してもらいたい。残念ながら、この宿主側の問題、すなわちインヒビター形成という問題のために、

Table 1. More efficient current protocols in preclinical phase for gene therapy of haemophilia.

Research group	Factor expressed	Animal model	Viral vector	Level in plasma* (ng mL <sup>-1</sup> )	Term of expression (months)
VandenDriessche <i>et al.</i> [9]	VIII	Mouse	Retroviral	> 200	14
Balagué <i>et al.</i> [10]	VIII	Mouse	Miniadenoviral	> 100	> 5
Gallo-Penn <i>et al.</i> (Connelly [11])	VIII	Mouse	Adenoviral	10	12
Herzog <i>et al.</i> [12]	IX	Dog	Adeno-associated	70	12
Chao <i>et al.</i> [13]	IX	Dog	Adeno-associated	100	12
Snyder <i>et al.</i> (Kay [14])	IX	Dog	Adeno-associated	70	8
	IX	Mouse	Adeno-associated	1000	4
Lozier <i>et al.</i> [5]	IX	Macaque	Adenoviral	4000	< 1
Wang <i>et al.</i> (Verma [15])	IX	Mouse	Adeno-associated	> 5000	5

\*Standard values: FVIII, 200 ng mL<sup>-1</sup>; FIX, 5000 ng mL<sup>-1</sup>. Moderate phenotype: FVIII, 4 ng mL<sup>-1</sup>; FIX, 100 ng mL<sup>-1</sup>.

このような未来は未だ我々の手の届かないところに棚上げされたままである。遺伝子療法は理論的には実現可能であるが、これまで遺伝子療法は常に物議をかもし、ある研究者はこれを支持し、他の研究者は明確にこれに対して否定的立場をとってきた。

血友病は、「治癒」へのアプローチという観点から常に遺伝子療法の最適対象疾患の1つと考えられてきた。ここ数年で我々は数多くの重要な知見を得たことは事実であるが、一方で多くの資金的、論理的、方法論的問題が残されていることもまた事実である。これまでに得られているデータからは、*in vivo*において高レベルで持続的な凝固因子の発現を得るのことが示唆される。しかし、これまでに動物モデルで使用されてきたウイルスベクターを用いた様々な遺伝子療法のアプローチ法は安全性が完全に保証されているわけではないことにも留意すべきであろう。同様に、血友病患者におけるHIVおよびC型肝炎ウイルスへの感染も考慮すべき点である。この理由は、感染歴のある肝臓ではこれらのウイルスに由来する重症肝疾患へのリスクが高いためである。さらに、こうした患者への抗レトロウイルス薬の投与は、治療的遺伝子導入を妨害する。発現蛋白の検出あるいは分析のために開発された極めて感度の高い装置が利用可能であることの重要性も過小評価してはならない。高用量のベクターをできる限り回避するにはこれらの装置は必須である。

血友病の遺伝子療法に関するいくつかの臨床試験が現在進行中である。血友病Aに関する臨床試験ではレトロウイルス導入とFVIIIのためのβ欠損遺伝子を*ex vivo*でトランスフェクトした自己線維芽細胞の再移植に焦点が当てられており、血友病Bに関する臨床試験ではFIXを発現するアデノ関連ウイルスベクターの筋注が利用されている。これまでのところ、動物モデルでは中等症の表現型に相当する因子レベルの長期的維持が達成されており、ほとんどの場合は非複製および非突然変異性のウイルスベクターを用いたものである。これらは、ヒトにおいても十分に安全な遺伝子療法のアプローチ法を見いだすことが可能であることを示唆している。

以上をまとめると、血友病の遺伝子療法に関する限り、今後数年間の主要目標は、FVIIIそしてFIXを

治療有効レベルで安定的かつ持続的に*in vivo*で発現させること、安全性の確保、そしてインヒビターの発現を回避することである。

血友病に対する遺伝子療法は今後さらに発展すると考えられ、これまでに血友病治療で最も不幸な医原性効果をもたらした物質、すなわちHIVなどのレトロウイルスは凝固因子であるFVIIIとFIXを効率的に発現することから、今後のウイルスベクター（レンチウイルスベクター）として極めて有望である。しかしながら、これらのウイルスは向リンパ球性であるため、これらのウイルスがウイルス突然変異体を複製しやすい形質に変化させてしまうことが懸念される。

血友病に対する修復遺伝子療法の導入も期待される（最初は短期的に、次いで長期的に）。修復遺伝子療法は、既にチロシナーゼなどの他の遺伝子の修復に利用されている。この治療法では正確に突然変異を修復でき、したがって患者の内因性遺伝子および発現制御因子のいずれにも変化がもたらされることはないという利点がある。

最後の疑問は、これまでに述べてきた目標を達成するのにどの程度の期間を要するかということである。当初遺伝子療法は、元々の理論的概念や根拠から直感的にシンプルであると考えられ、短期間のうちに驚くべき成果が挙げられると信じられていた。しかし、我々はこれまでの経験から、1つの問題の解決後にはさらなる問題が待ち受け、実際はこの繰り返しであることを学んだ（ただし、解決すべき問題は徐々に易しくなっている）。したがって、血友病の治療を目標とした場合、遺伝子療法である程度の成功を収めるまでにどれだけの期間を要するかを予測するのは困難である。さらに、推測不可能でミステリアスである制御機構は急激で望ましくない変化が起こらないよう自然の摂理ともいべき精巧で緻密な機能により守られているが、生命と進化論的適応を可能にしている生体物質であるゲノムがこれらの制御機構を隠し、これらの問題をいっそう解決困難なものにしている。

## 研究の現状

重症血友病AおよびB患者を対象とした2件の臨

床試験が最近 FDA により承認され、現在進行中である。これらの試験で採用されているプロトコールはミニアデノウイルス FVIII とアデノ関連ウイルス FIX の肝臓内および筋肉内送達である。現在のところ、これらの試験はすべて前述の手法の安全性および有効性を決定するための“Phase I”期にあり、今後2年またはそれ以上この期間を継続した後、Phase II 期に入る。対象例の選択基準は、因子レベルが1%以下の重症血友病、余命1年以上、男性、年齢18歳以上、凝固因子濃縮製剤への曝露歴が21日以上、そしてインフォームドコンセントへの同意である。除外基準は、血小板数50,000未満、急性感染性疾患(HIVやC型肝炎ウイルスへの感染)、末期腎疾患、ビリルビン値やトランスアミナーゼ値、またはアルカリホスファターゼ値が高い重症肝疾患をもつことである。これまでのところ特に憂慮すべき有害事象は報告されておらず、精液試料を用いたPCR法によるベクター配列解析では全例が陰性である。アデノ関連ウイルスベクターの筋注を用いたHighら<sup>(17)</sup>の臨床試験では次のような結論が得られている。(i)安全性や遺伝子導入、遺伝子発現の評価の結果、ベクター配列の生殖細胞系への伝播そしてFIXに対するインヒビターの形成を示す証拠はない、(ii)循環血中FIX値およびFIX輸注頻度などの臨床エンドポイントの軽微な変化が、前臨床試験よりも低用量のベクターで認められた、(iii)この治療法により重症血友病Bを著明に改善させることが可能である。

このミレニアムの最初の数十年の間に、遺伝子療法により血友病は医学史の中のほんの1ページにすぎなくなるかもしれない。

## References

- 1 Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE *et al.* Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet* 1995; **10**: 119–21.
- 2 Lin HF, Maeda N, Smithies O *et al.* A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood* 1997; **90**: 3962–6.
- 3 Cameron C, Notley C, Hoyle S *et al.* The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 317–22.
- 4 Evans JP, Brinkhous KM, Brayer GD *et al.* Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 10095–9.
- 5 Lozier JN, Metzger ME, Donahue RE *et al.* Adenovirus-mediated expression of human coagulation factor IX in the Rhesus macaque is associated with dose-limiting toxicity. *Blood* 1999; **94**: 3968–75.
- 6 Ye X, Robinson MB, Pabin C *et al.* Transient depletion of CD4 lymphocyte improves efficacy of repeated administration of recombinant adenovirus in the ornithine transcarbamylase-deficient sparse fur mouse. *Gene Ther* 2000; **7**: 1761–7.
- 7 Fields PA, Armstrong E, Hagstrom JN *et al.* Intravenous administration of an E1/E3-deleted adenoviral vector induces tolerance to factor IX in C57BL/6 mice. *Gene Ther* 2001; **8**: 354–61.
- 8 Zou L, Zhou H, Pastore L *et al.* Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system. *Mol Ther* 2000; **2**: 105–13.
- 9 VandenDriessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I *et al.* Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after *in vivo* retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10379–84.
- 10 Balagué C, Zhou J, Dai Y *et al.* Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 2000; **95**: 820–8.
- 11 Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL *et al.* *In vivo* evaluation of an adenoviral vector encoding canine factor VIII. High-level, sustained expression in hemophilic mice. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1791–802.
- 12 Herzog RW, Yang EY, Couto LB *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* 1999; **5**: 56–63.
- 13 Chao H, Samulski R, Bellinger D *et al.* Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B dogs. *Gene Ther* 1999; **6**: 1695–704.
- 14 Snyder RO, Miao C, Mense L *et al.* Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999; **5**: 64–70.
- 15 Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM *et al.* Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3906–10.
- 16 Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C *et al.* Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood* 2000; **95**: 2536–42.
- 17 Kay MA, Manno CS, Ragni MV *et al.* Evidence for gene transfer and expression of factor IX in hemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000; **24**: 257–61.