

遺伝子治療の現状と将来

大阪大学医学系研究科遺伝子治療学
金田安史*

はじめに

最初の正式な遺伝子治療臨床研究が、1990年9月14日に ADA (adenosine deaminase, アデノシンデアミナーゼ) 欠損症の患者に対して始められて以来、遺伝子治療は将来の有望な治療手段として社会の注目を集めてきた。アメリカでは2000年6月の時点で、400以上の遺伝子治療プロトコルが提出され実施患者数も3,400人を超えた。そのプロトコルの70%が癌の遺伝子治療であり、単一遺伝子病、HIV 感染症がそれぞれ約10、10%をしめる。日本においても9つの臨床プロトコルが実施中もしくは準備中である。しかし現時点で遺伝子治療による劇的な改善を収めた症例は数少なく、遺伝子治療の将来性を疑問視する声も出ている。この論文では遺伝子治療の標的疾患と遺伝子導入ベクターについて現状を解説し、将来の方向性についての示唆を与えたい。

遺伝子治療の標的疾患

1. 単一遺伝子異常による遺伝病

現在までの遺伝子治療はすべて補充療法であり、原因遺伝子の治療ではない。この観点からは単一遺伝子の変異がもとでおこる遺伝病の治療は困難であろうと考えられてきたが、1999年にあいついで成功例が報告された。すなわち血友病 B¹⁾ と X連鎖性重症複合免疫不全症²⁾ である。これらは治療域の広い疾患と言われ、現在の不十分な遺伝子治療技術であっても変異遺伝子が一部正常化されるだけで形質が改善することが予想される疾患である。

全ての遺伝病が遺伝子治療の対象になる日はまだまだ遠いが、疾患を選べば遺伝病といえども現在の技術で治療が可能と考えられる。

2. 癌の遺伝子治療

遺伝子治療の臨床プロトコルの約70%が癌を対象としたものである。しかし遺伝子治

Gene therapy ; current status and future prospect

Yasufumi Kaneda (Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan)



*かねだ・やすふみ : 1980年3月 大阪大学医学部卒業。1984年10月 大阪大学細胞工学センター助手。1982年8月 大阪大学細胞生体工学センター助教授。1998年7月 大阪大学医学部教授。1999年4月 大阪大学医学系研究科遺伝子治療学領域教授(現職)

Key words

- 遺伝子治療
- 遺伝子導入
- 遺伝子発現

療の有効性はまだ癌においては明らかにされていない。癌遺伝子治療法で最も古くから用いられてきたのは腫瘍免疫を活性化する免疫遺伝子治療法である。この腫瘍免疫活性化にはサイトカインなどにより個体全体の免疫系を活性化する方法と腫瘍抗原をワクチンとして用いて特異的に腫瘍免疫を活性化して癌の発症を抑制する方法とがある³⁾。しかし癌自体の抗原性の低さ、癌患者に於ける免疫能の低下、免疫担当細胞への遺伝子導入効率の低さなどから目立った成功は収めていない。このほかに自殺遺伝子治療法、腫瘍血管抑制法、p53 遺伝子による腫瘍増殖抑制法等が行われている。中でも自殺遺伝子治療法は全ての癌細胞への遺伝子導入効率が低くても癌全体を殺傷できる可能性があり注目されてきた。

この代表的なものは HSV-TK (herpes virus thymidine kinase, ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) 遺伝子を癌細胞に導入、発現させ抗ウイルス剤の GCV (gancyclovir, ガンシクロビル) をプロドラッグとして投与する方法である⁴⁾。HSV-TK 遺伝子を導入された癌細胞は HSV-TK と自身のチミジンキナーゼによって GCV をリン酸化し、三リン酸化型の GCV を形成する。この三リン酸化型の GCV は DNA ポリメラーゼを阻害するために、DNA 複製をおこす細胞はアポトーシスに陥り死滅する。さらに三リン酸化型の GCV はギャップジャンクション (gap junction) を通って隣接細胞へも取り込まれ遺伝子導入がない隣接細胞でも DNA 合成が阻害され死滅する (bystander effect, 傍観者効果)。この方法は癌細胞のすべてに遺伝子導入されなくても癌細胞を死滅できること、増殖のはげしい細胞が選択的に死滅すること、癌細胞の死滅によって癌抗原が提示され腫瘍免疫が活性化されること、腫瘍血管の新生も bystander effect によって抑制されること、といった多

くの作用を 1 つの遺伝子導入で達成することができる。副作用は当初ないということであったが、その後、神経の脱髄、肝障害などが報告され、癌細胞特異的な遺伝子発現が必要である。

3. 生活習慣病

最近、VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮細胞増殖因子) や FGF (fibroblast growth factor, 線維芽細胞増殖因子) 遺伝子を用いた内皮再生、血管新生療法による ASO (arteriosclerosis obliterance, 閉塞性動脈硬化症)、狭心症、心筋梗塞などの遺伝子治療のプロトコールが提出され成功例が現れ始めている。特にタフツ大学のイスナー博士によって施行されている VEGF 遺伝子による ASO の遺伝子治療は VEGF のプラスミド DNA を ASO で下肢に潰瘍が生じた患者の閉塞部位に導入するだけであるが、VEGF による血管新生効果により血流が改善され、下肢切断を免れたことが報告され、ようやく遺伝子治療の有効性が示されてきた⁵⁾。図 1 に示すように、このストラテジーの特長は、閉塞部位は放置し、その周囲に新生血管を作らせて末梢への血流を確保しようとするところにあり、血管新生がおこる間だけ、し

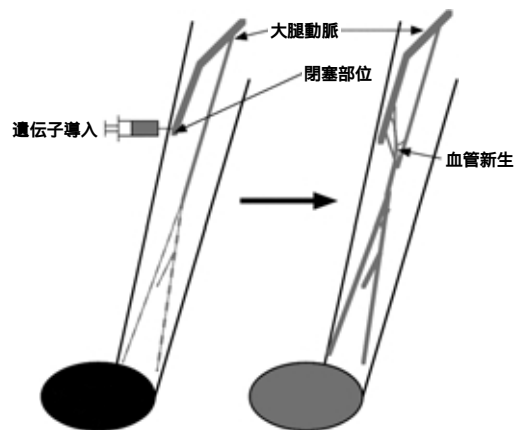


図 1 閉塞性動脈硬化症の遺伝子治療の概念図

かも局所的に導入遺伝子を発現させるだけでよい。従って現在の遺伝子治療技術でも従来法に勝る治療効果が収められるであろうと予想される。大阪大学の森下らは、HGF (hepatocyte growth factor, 肝細胞増殖因子) が VEGF, FGF よりも強い血管内皮増殖作用をもつことを見出し、HGF による虚血性疾患治療の道を開いた⁶⁾。ラットの下肢虚血モデルを作成し、これに HGF 遺伝子を導入すると、著明な血管新生がおこり末梢の血流が改善することがレーザードップラー血流計や血管造影により確認されている。そこで大阪大学では HGF 遺伝子の直接注入による ASO のヒト遺伝子治療プロトコルを提出し、遺伝子治療ワーキンググループによる承認が下され、国内ではじめての生活習慣病に対する遺伝子治療が新規遺伝子を用いて行われている。

同様のストラテジーは重度の狭心症においても有効であろうと考えられ、HGF 遺伝子導入によりラット⁷⁾やイヌの心筋梗塞モデルで、心臓の血流改善と心機能改善を認めており、大阪大学の学内倫理委員会で審査が行われている。

このほか血管再狭窄、心不全、心筋症、脳梗塞、肺高血圧などが治療対象として動物実験が進められている。

遺伝子治療技術

遺伝子治療の鍵を握る遺伝子導入技術については、表1のようにウイルスベクターと非ウイルスベクターに分類され、それぞれが長所、短所を併せ持っている。この技術をさらに高めるアプローチとして、従来のベクターの短所を克服するための方法、新たなウイルスや生体親和性物質、導入効率増強剤の開拓による新技術の開発など刻々と開発が進められている。もう1つの方向性は各々の遺伝子導入ベクター系のもつ問題点を複数のベクター系を組み合わせるハイブリッドベクターの開発である。各々の遺伝子導入ベクター系は長所もあるが短所も多い。そこで、複数のベクター系を組み合わせるハイブリッドベクターともいべき概念が生まれてきた。

我々は非ウイルスベクターにウイルスコン

表1 臨床応用に用いられている遺伝子治療ベクターの特徴

レトロウイルスベクター：
(長所) 安全性が確認、遺伝子挿入による長期遺伝子発現可能
(短所) 血液中で不安定、非分裂細胞への導入困難、遺伝子挿入がランダム、挿入遺伝子の発現抑制
アデノウイルスベクター：
(長所) 高い発現効率、非分裂細胞へも導入可能
(短所) 一過性の遺伝子発現、抗原性・細胞障害性高い、安全性に疑問
アデノ随伴ウイルスベクター：
(長所) 長期遺伝子発現
(短所) 発現効率低い、導入 DNA サイズ小、大量生産困難、ヒトが抗体を有する、染色体特定領域への遺伝子挿入については不明
リポソーム/ DNA 複合体：
(長所) 抗原性低い、導入 DNA サイズ大
(短所) 非分裂細胞での低い発現、一過性の遺伝子発現
Naked DNA：
(長所) 調整容易、局所での安全性確認
(短所) 炎症惹起、非分裂細胞での発現低い、一過性の遺伝子発現

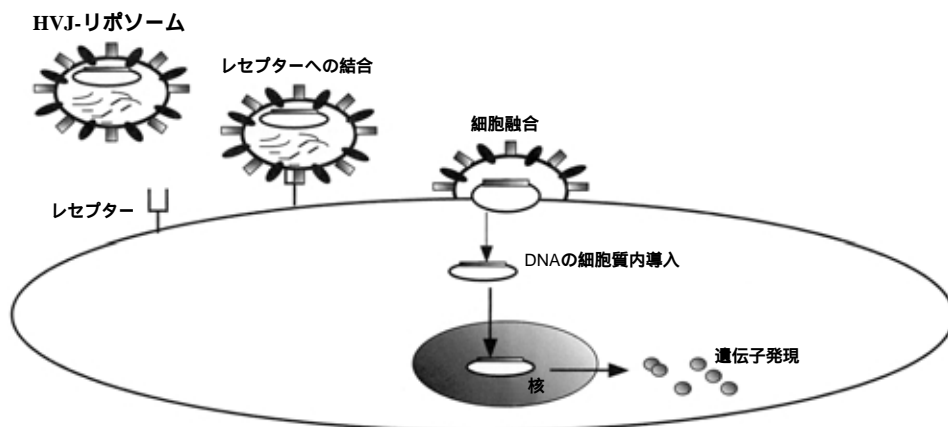


図2 HVJ-リボソームによる遺伝子導入

ポーネントを取り入れたハイブリッド型リボソームを開発してきた。すなわち図2のように生体組織への遺伝子導入効率を高めるためにリボソームに封入した遺伝子を細胞融合ウイルスであるHVJ (hemagglutinating virus of Japan; 別名センドライウイルス) を利用し、細胞融合を利用して直接細胞質内に導入できるHVJ-リボソームが開発された⁸⁾。この方法ではDNA (と核蛋白質) を封入した一枚膜リボソームを不活化HVJと融合させ、HVJ由来の融合蛋白FとHNを含むベジクルが作製される。HVJはF、HNの共同作用によってリンパ球以外の殆どの細胞に融合し遺伝子の導入が可能であり、約10分のインキュベーションでほぼ融合、導入が完成する。DNAサイズは100kbまでなら10-20%の率でリボソームに封入できる。細胞の分裂、非分裂を問わず遺伝子の導入、発現が可関であり、連続投与も可能である。アンチセンスオリゴヌクレオチドやRNA、蛋白や薬剤の導入にも極めて有効であることがわかった。またこのベクターは負電荷を帯びており培養細胞系での細胞との接着は弱い、組織への浸透性に優れ血管内皮をすりぬけ組織内部へ拡がり様々な細胞に遺伝子導入が可能であり遺伝子治療研究に汎用されている。このベクターの

サルでの安全性試験も終了し、ヒトへの応用が期待されている。

【文献】

- 1) Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., et al.: Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.*, 24, 257-261 (2000)
- 2) Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bay, S., de Saint Basile, G., et al.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency(SCID)X1 disease. *Science* 288, 669-672, (2000)
- 3) Pardoll, D.M.: Cancer vaccines *Nature Med.* 4, 525-531, (1998)
- 4) Oldfield EH, Ram Z, Culver KW, et al. : Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous gancyclovir. *Hum. Gene Ther.* 4, 39-69, (1993)
- 5) Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., et al.: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with clinical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123, (1998)
- 6) Hayashi,S., Morishita,R., Higaki,J., et al. : Autocrine-paracrine effects of over-expression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220, 539-545, (1996)
- 7) Aoki, M., Morishita, R., Taniyama, Y., et al. : Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. *Gene Ther.* 7, 417-427, (2000)
- 8) Kaneda Y, Saeki Y, Morishita R. : Gene therapy using HVJ-liposomes; the best of both worlds. *Mol. Med. Today* 5, 298-303, (1999)

討 論

[演者]

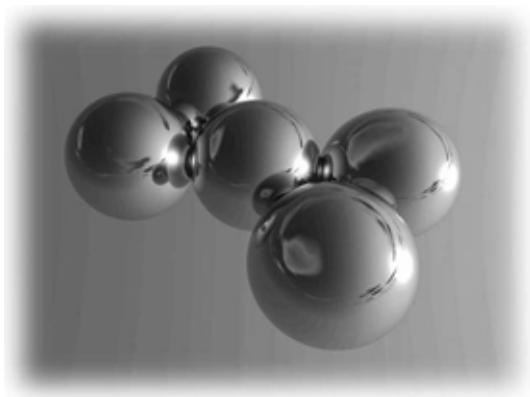
金田 安史

大阪大学医学系研究科遺伝子治療学領域教授

[司会]

崎山 幸雄

北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療客員教授



司会：金田先生ありがとうございました。少し時間がございます。どなたかご質問はいかがでしょうか。はいどうぞ。

大石：かずさDNA研究所の大石でございます。確かにDNAを使いますとエクスペクションが続いて起こりますから、いわゆるプロダクトを注入するよりは確かに効率的とは思いますが、問題は実際にさっきのアンジオテンシンの入れた場合、それが継続しすぎて何らかの副作用が...、もう使命が終わった後でもそれが残るためにいろんな副作用が、場合によっては一生とはいいませんけど非常に長期間起こる可能性があるわけなので、その場合は実際にあるところまでいって、もう不必要になった場合には、それを止めるというんですか、それは何かアイデアございますか。

金田：細胞の中での遺伝子の運命を見ておりますと、まず最初に発現が徐々に先ほども示しましたように止まってまいります。これはだいたい組織によっても違うんですけども、普通の細胞ですとだいたい1週間くらい。骨格筋ですと2・3週間で止まってしまいます。その後特に染色体外に残ったものは恐らくヌクレアーゼの働きで徐々に分解されていきまして、培養細胞ではほぼ3週間くらいで、それから筋肉ですと1カ月か2カ月の間で自然に分解されていきますので、その間であれば特に大きな変化が起こらないんじゃないかと思っています。確かに先生がおっしゃるように、それが骨格筋に止まっていれば安全でありますけれども、例えば他の分裂するようなところに入るという可能性もあるわけです。ですからむしろ導入するところのターゲティングというのがひとつは必要じゃないかと考えています。入れた遺伝子を実際に積極的に壊すということ、これは非常に難し

いです。

司会：今日の先生のお話は遺伝子治療自体は10年経ったわけですけれども、少なくとも遺伝性疾患でのその効果といいますか可能性は何となくおぼろげながらですけどわかってきたような気がするんです。先生もお示しになりましたが、血友病とか、先天性免疫不全症でもあるタイプですと、ある程度の効果というのはだいたい見通しがついたのではないかという気がするのです。大部分の対象疾患というのは、がんとか生活習慣病ですので、そういう疾患に対する遺伝子治療は先生が今日お示しになったように、従来の治療方法とどういう風に考えて組み合わせてその遺伝子を使った治療というのを位置づけていくかということが大きな問題だと思います。もうひとつはいかに効率よく、安全に遺伝子を導入して発現できるかという方法論の問題とこの2つをお示しいただいたような気がするんですけど、大阪大学で治療がはじまっている血管新生の治験は遺伝子導入は何例なされているのでしょうか。

金田：今のところ5例です。

司会：遺伝子導入はウイルスベクターですか。

金田：これはネイキッドプラスミドで。

司会：直接打たれているわけですね。そうですか。はいどうぞ。

高久：日本医学会の高久です。血行が回復することはありえても、ファンクションはいかがなんでしょうか、末梢とかそういうのが血行不全に陥って癒痕化していると。そこに血管が増殖しても、ファンクションとして果たしてそれが機能を十分回復しうるものなのかどうかという、その点をちょっとお聞かせいただきたい。

金田：確かに先生がおっしゃるように患者さ

んを選定する段階でその反応性のある人たちを選定するという事は非常に大切だと思っております、実際にも組織としてはもう回復しないという判断した場合には我々は対象にしないというか、患者選定委員会というのはいづぶん厳しいものが大阪にはございまして、そここのところの適用を厳しく見定めているところです。確かに心臓の場合ですね、心筋梗塞というのではなく重度の狭心症といったものが対象になりますので、すでに機能もなくなった場合には恐らく、今度はその幹細胞と遺伝子というかたちの組み合わせをとる必要があるのではないかと。ですからそこに細胞治療の意味があるんじゃないかという風に思っています。

司会：はい、どうぞ。

高久：日本医学会の高久です。面白い話、どうもありがとうございます。私も先生がおっしゃったように癌の場合には、化学療法と放射線療法とを併用するのが今のところ一番効果的ではないかと思っています。ひとつお伺いしたいのは一時期心筋梗塞の治療のためのアンギオプラスティのあとの再狭窄を防ぐためにいろいろなことが試みられましたね。あれは最近はあまり行われていないのでしょうか。

金田：あれに関しましては特にフィンランドのグループが積極的に VEGF を使った血管内皮の再生という形で血管のリモデリングを行うということで行ったり、あるいはアンセンスのオリゴヌクレオチドで増殖を抑制するという形で行ったりしておりますけれども、最初我々も非常によいモデルだという風に思ったんですが、よくよく研究が進んでまいりますと、やはりそのマウスのモデルと人の血管再狭窄とはあきらかに病因が違う。マウスでやってみますととにかく増殖さえ止めてしまえば何でも効くと…。しかし人の場合はも

ちろんそれだけじゃなくてさまざまなファクターが長期に効いてくるわけですから、もっとそのターゲットを絞り込む必要があるだろうということで、ちょっと今、実は控えているところなんですね。それでもうひとつはですね、この血管再狭窄を本当に遺伝子治療のターゲットとして適当かどうかということも我々は少し疑問なところがあります。と申しますのは、血管再狭窄に関して70%は治るわけですね。それで30%はもう一度再狭窄が起こってくると。そういった場合に遺伝子治療をおこなって本当に効果があったといえるだろうかということがありますので、今のところわたしは遺伝子治療のターゲットとしては不向きじゃないかなという風に考えております。

司会：よろしゅうございますでしょうか。はい、どうぞ。

松田：北海道医療大学の松田です。大変面白いお話を聞かせていただきましたけど、そのネイキッドプラスミドを入れましたね。先生の計算では、何%くらいが本当に細胞の中にインテグレーションされるのかということをお聞きしたいです。

金田：はい、インテグレーションはされませんけれどもエピゾームに、即ち、核内で染色体外にとどまります。取り込まれている細胞は数%だと思います。ですから構造タンパクを中で発現させて何か治療を行おうということこれは非常に難しい。分泌タンパクだからこそそのわずかな細胞であってもバラクライン的に効くのだろうという風に考えていますので、ネイキッドプラスミドはいけるんじゃないかという風に今の場合は考えております。

松田：先ほど先生のお話で、もしもインテグレートされるなら問題だけれども、エピゾームに入っている限りエピゾームでもってエクスペクションしているのであれば、まあそれ

は一代で終わってしまうわけだから、そこから先は心配しなくていいという風に考えていいのですね。

金田：それは一応サルなどの実験で証明されておりますので大丈夫だというように考えております。

松田：もう一つ伺いたいのはこの遺伝子だから数%なんであって、他の遺伝子の場合もっと低いとか、そういう遺伝子によるエクスペレクションの差というのはあるんですか。

金田：導入方法に依存しますのでプラスミドを用いて直接インジェクションしている限りはその程度の割合というふうに考えています。ただし何でもかんでも効率が高い導入法がよいとは限らないと思うんですね。ですからこの時に非常に高い導入効率をもっている例えばアデノウイルスベクターであるとかレンチウイルスのベクターであるとかを使ったり、あるいは非常にタンパクの発現が高いものを使うとむしろ逆効果になる可能性、即ち副作用だけ出る可能性があると考えています。

松田：まあ、たまたまという失礼だけど、

これはうまくいきそうだけれども、同じようなストラテジーではどうかという問題がありますよね。いろいろ症例とかタンパク発現の問題とかその量とかそういったものを全部勘案しないというと簡単に他に応用できないだろうという結論ですね。

金田：遺伝子が違って、ファンクションが違ってくれば、それぞれに対して非常に細かい条件をとる必要があると思います。

松田：どうもありがとうございました。

司会：よろしゅうございますか。それでは金田先生ありがとうございました。そろそろ時間でございますので今日の午後の第2セッションをこれで終わらせていただきます。門脇先生には生活習慣病をゲノム、分子レベルで理解をしてそれを将来の治療に応用できないか、金田先生にはさらに遺伝子を使った治療に展開できないかというお話を、将来的な医とゲノムのお話をさせていただいたように思います。改めてお二人の先生ありがとうございました。皆様、遅くまでご参加いただきましてありがとうございました。