4) 鎌状貧血の遺伝子治療

新潟大学医学部第一内科学教室（主任：柴田　昭教授）
古　川　達　雄

Gene Therapy for Sickle Cell Disease

Tatsuo FURUKAWA
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)

Sickle cell disease is the one of the molecular disease with a point mutation at the 6th amino in β globin gene. This disease is life threatening because of the obstruction of micro-circulation. Although there are some therapeutic ways for the disease, it is difficult for the patients to obtain long term survival. A lot of patients are waiting for developing a new therapy such as a gene therapy. There are several ways for gene therapy of sickle cell disease, we thought that the expression of γ-globin gene at adult stage might be the best way for the therapy. We have developed the backbone of the vector we would try to use for the gene therapy. The vector may consist; (1) insulator at the both sides, (2) globin gene with the promoter, (3) a strong enhancer such as the LCR (Locus Control Region), (4) the gene element for the in vivo selection, such as a drug resistance gene.

Key words: gene therapy, Sickle cell disease, LCR
遺伝子治療，鎌状貧血

1) Sickle cell disease とは

Sickle cell disease はヘモグロビンβ鎖6番目のアミノ酸が，DNA 一塩基置換によって，グルタミン酸からヴァリンへと変化したことによる分子病である．元々熱帯アフリカを中心に最も頻度の高い異常ヘモグロビン症であるが，アメリカにおいても黒人を中心に人口十万人に対して150人前後の割合で存在する．この異常ヘモグロビンにより，酸素解離を起こしたヘモグロビンでは特有の線維束状の結晶構造を形成して赤血球膜を突き上げ，鎌状変形をきたして血流閉塞を生み，臨床病態を形成する．特に小児期には生命予後が悪く，10歳までに10%の致死率といわれている．現在その治療法としては，正常赤血球の輸血以外に，γ-globin 遺伝子の発現を促進させるようなハイドロキシウレアやブチレートといった薬物が期待されているとは言っても長期的な予後の改善とはいかず，新たなる治療法の確率が切望されている．以上のような背景から，分子病である Sickle cell disease を遺伝子治療で治癒をめざすという考えが生まれてくる．

Reprint requests to: Tatsuo FURUKAWA,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
Asahimachi 1-754, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通り1-754
新潟大学医学部第一内科学教室
古川達雄

2) Sickle cell disease に対する遺伝子治療の応用

臨床的に改善が得られるための治療遺伝子の発現レベルというものを考えてみると，多くのヘモグロビンS症例の解析などから，どの様な遺伝子を用いるにしてもその治療遺伝子の発現が高くかつヘモグロビンSの発現が押さえられるという状態を形成するか，または Sickle cell anemia と HPFH や thalassemia の合併症例の臨床的研究の蓄積から，endogenous β-globin の50%ぐらいの γ-globin の発現が得られるとほとんど症状のない，ヘモグロビンFのレベルとなることが明らかにされている．次に，gene therapy のためのアプローチを考えてみますと（**表 1**），先ず第一に homologous recombination によって，異常グロビンを正常のグロビン遺伝子に交換する，という方法が考えられる．これは治療法としては理想的であるが，その recombination の発生頻度を考えると現段階では，全く非現実的であることは明白である．また γ-globin から β-globin への switching を阻害するような遺伝子または，γ-globin を誘導するような遺伝子を導入することも考えられるが，現段階では，そのような factor は発見されていない．ただしつい最近，β-globin 遺伝子の発現に重要な transacting factor である EKLF の発見があり，γ-globin にも同様の働きを持つ factor の存在を連想させることから，現在多くの project が進行中のようである．さて現実的には，β または γ-globin 遺伝子の transfer ということになるが，sickling の阻害という面からは γ-globin の方が有効であるとの結論が得られている．

3) Virus vector の必要条件

次に実際の gene therapy を実現するために必要となる Virus vector の条件を考えてみると，まず挿入したグロビン遺伝子が，adult 赤血球で正しく発現するための調節配列を保持していて，高発現を得るための cis element をもち，さらにベクターは，高率に pluripotent stem cell に transduction されることが必要である．ところで，transgenic mouse や細胞への gene transfer の実験から得られた重要な問題点として，position effect の問題がある．これは，挿入された chromosome の部位に関連して，発現レベルが各クローンによって著しく異なる結果が得られ，このことが stem cell への遺伝子治療の価値を低下されると考えられるものであり，insulator といったはたらきを持つ部位の存在で防ぐことが可能と考えられているものである．この働きは，強力な enhancer の挿入によって起こる可能性のある，近縁遺伝子の活性化を防ぐ意味からも重要であることを強調したい．グロビン遺伝子に関しては，グロビンの switching の研究からこれらの条件をかなりクリヤーできる可能性を持つ領域，すなわち Locus control region (LCR) の発見[1] が遺伝子治療の可能性に大きな進歩をもたらした．この領域は，β-globin の遺伝子の transgenic mice の実験から解明され，ε のさらに5′上流の約 20 kb の領域で，DNAsel に高感受性を持つ部位としての HS1 から HS4 を含んでいる．LCR は β-globin の switching に際して，embryo 期には，ε 遺伝子の promoter と，fetus 期には，γ-globin の promoter と，そして，adult になると，β-globin の promoter と interaction することでそれぞれの遺伝子の発現をつかさどっている．LCR の特徴をまとめてみると，DNasel の感受性が高い領域として検出され，導入 globin 遺伝子の発現に際して挿入部位に関係なく copy number に比例して発現が得られ，globin 遺伝子の発現には必須であることである．その働きとしては，活性化されたクロマチンドメインを形成し，回りの非活性化されたクロマチン領域から独立させ，グロビン遺伝子の発現を enhance することが挙げられる．そこでこの領域を含んだ virus vector というものが構成されていくが，いずれの virus vector を用いても，その中に組み込める遺伝子のサイズに制限がある．そこでまず LCR サイズを縮小する努力が必要となる．現在 LCR core region から重要な transacting factor の binding site をできるだけ結びつけていくような作業を繰り返しながら，最小のサイズで，最大効果を持つ element を開発中である．さて次に γ-globin gene 自身についても，virus vector からの発現の安定性には，第2 intron が不可欠であるが，いっぽうその存在は virus titer の悪化をもたらすといったデーターが報告されたり[2] で，現在は，第2イントロンに deletion を加えて，high titer を有しかつ安定な発現が得られ

表 1 Four approaches proposed for gene therapy of β chain hemoglobinopathies

1)	Replacement of a mutant globin gene by a normal globin gene through homologous recombination
2)	Transfer of β globin gene
3)	Transfer of γ globin gene
4)	Transfer of trans-acting elements that can either prevent the switch from γ to β globin expression or induce γ globin gene transcription

る条件を最大限満たす globin gene の形成を目ざしている[3]．また 3′ end についてや，5′ promoter 領域については，truncation を作ってみるとそこには，positive negative の領域が混在していることが明らかとなり，現在は，−210 bp の領域を主に用い，さらには HPFH 遺伝子の遺伝子異常を加えたり，β-globin の領域と取り替えたりすることで，adult の赤血球にて最大限に発現する治療遺伝子の開発に努めている．こうして開発が進んでいる vector であるが，実際に患者の骨髄 stem cell への導入の問題が次に存在している．stem cell は，その頻度が非常に少ない上に，大部分は，G0 期にある，そして，clonal に増殖してゆくといった特徴を持つ．現在の transduction 効率は，せいぜい 10^{-3} レベルでありまして，とても治療として必要なレベルには届かないことが明らかである．特にそのことは，long term で導入遺伝子の発現を調べたときに明らかであり，その結果から，in vivo selection の必要性が出現する．これは，骨髄毒性効果を持つ drug にたいする耐性を持つ遺伝子をベクターに加え，drug を投与して，virus vector を挿入し得た stem cell を選択的に増殖できる環境を in vivo に作ることで，目的の遺伝子が挿入された stem cell を増幅するものである．そのような考えの元で，MDR (multi drug resistance) gene を導入した血液細胞の選択的濃縮に成功した例も報告されている[4)5)]．さらに同様の目的のために，現在，ブスルファン，ハイドロキシウレア といった薬剤の耐性遺伝子のクローニングが進行中である．このように stem cell への遺伝子治療については，100倍から1,000倍もの導入効率の増加が要求され，そのためには，stem cell に関する研究の進歩や，in vivo selection の確率といった進歩が必要となってくる．

4) ま と め

以上 Sickle cell disease に代表される hemoglobinopathy に対する遺伝子治療のための viral vector の姿は，まず insulator を両側に有し，globin 遺伝子の他に，LCR さらには，in vivo selection のための drug registance gene を含むものであるのではないかと考えられている．さらに将来は non-viral の delivery system や，trans-acting element の発見などが期待されていることをつけ加えておく．最後にこの研究は，Seattle にある University of Washington の George Stamatoyannopoulos の group を中心として進行していることをつけ加えておく．

参 考 文 献

1) **Grosveld, F., van Assendelft, G.B., Greaves, D.R. and Kollias, G.**: Position-independent, high-level expression of the human b-globin gene in transgenic mine, Cell, **51**: 975～984, 1987.

2) **Miller, A.D., Bender, M.A., Harris, E.A., Kaleko, M. and Gelinas, R.E.**: Design of retrovirus vectors for transfer and expression of the human b-globin gene, J. Virol., **62**: 4337～4341, 1988.

3) **Gelinas, R.E. and Novak, U.**: Retroviral vectors for the b-globin gene that demonstrate improved titer and expression, Ann. N.Y. Acad. Sci., **612**: 427～438, 1990.

4) **Sorrentino, B.P., Brandt, S.J., Bodine, D., Gottesman, M., Pastan, I., Cline, A. and Niehuis, A.W.**: selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retrroviral transfer of human MDR1, Science, **257**: 99～103, 1992.

5) **Podda, S., Ward, M., Himelstein, A., Richardson, C., DelaFlor-Weiss, E., Smith, L., Gottesman, M., Pastan, I. and Bank, A.**: Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in live mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 9676～9680, 1992.