

5) 小児科領域における遺伝子治療の現状と展望

新潟大学医学部小児科学教室

里方 一郎・内山 聖

Current Aspect and Future Prospect of
Human Gene Therapy in Childhood

Ichiro SATOKATA and Makoto UCHIYAMA

*Department of Pediatrics,
Niigata University School of Medicine*

Almost four years have passed since the first human gene therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency had been performed. Gene therapy protocols for cystic fibrosis, familial hypercholesterolaemia and hemophilia B were also started during this period. In this review, we reported and discussed the current aspect and the future prospect of gene therapy for inherited disease in childhood.

Key words: gene therapy, inherited disease
遺伝子治療, 先天異常症

緒 言

1990年に米国 NIH において世界最初の遺伝子治療がアデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase; ADA) 欠損症の女児に行われて以来、海外では約30のプロトコルで、100人以上の患者に対し遺伝子治療が行われている¹⁾。本邦においては、やや遅れた感はあるが、厚生省および文部省から遺伝子治療のガイドラインが最近発表され、本年8月には、北海道大学医学部小児科で、ADA欠損症患者に対し、日本で最初の遺伝子治療が行われようとしている。先天異常症を扱う機会の多い小児科では、遺伝子治療に対する期待は以前より高かったが、この時期に、小児科領域における遺伝子治療の現状を先天異常症に絞って概説し、その将来について考察を加える。

1. 遺伝子治療の現状

遺伝子治療の対象となりうる疾患には、他に有効な治療法がないという前提以外に、現段階ではいくつかの条件が存在する。第1に、疾患の原因遺伝子がクローニングされていること。第2に、グロビン遺伝子やホルモン遺伝子のように複雑な調節を受けていないこと。第3に、原因遺伝子がある程度発現すれば、症状の改善に有効で、たとえ過剰発現しても有害でないこと。第4に原因遺伝子を目的とする細胞に導入可能であること。以上の条件を満し、米国 NIH の組換え DNA 委員会 (Recombinant Advisory Committee; RAC) により承認された遺伝子治療のプロトコルは50以上にのぼる。先天異常症では、ADA 欠損症、線維性嚢胞症、家族性高コレステロール血症、血友病、Gaucher 病のプロトコルが RAC

Reprint request to: Ichiro SATOKATA,
Department of Pediatrics, Niigata
University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1-757,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1-757
新潟大学医学部小児科学教室

里方 一郎

表 1 現在行われている先天異常症の遺伝子治療

疾 患	標 的 細 胞	遺伝子導入法	導入遺伝子
ADA 欠損症	末梢リンパ球	レトロウイルス	ADA
	造血幹細胞	レトロウイルス	ADA
嚢胞性線維症	気道上皮細胞	アデノウイルス	CFTR
家族性高コレステロール血症	肝細胞	レトロウイルス	LDL レセプター
血友病 B	皮膚線維芽細胞	レトロウイルス	第Ⅸ凝固因子

の承認を受け、前3者は、医薬品局 (Food and Drug Administration ; FDA) の承認も受けて、実施に移されている。血友病については、中国で既に遺伝子治療が実施されている (表 1)。現在、プロトコールが進行中のため、一定の結論が得られているものは少ないが、ADA 欠損症の遺伝子治療については臨床効果が認められ、この成功は、遺伝子治療を推進させる原動力になった。以下、現在までの遺伝子治療の成績を簡単に紹介する。ADA 欠損症は、ADA 遺伝子の変異のために、ADA 酵素活性が失われ、結果として、T細胞の機能不全をきたし、ひいては重症複合免疫不全症 (SCID) をきたす先天異常症である。最初のプロトコールは、患者末梢血リンパ球を採取し、in vitro でレトロウイルスベクターを用いて ADA cDNA を導入し、再び体内に戻すという方法であったが、この治療を受けた2人の患児は、免疫能の改善が認められ、普通の生活ができるようになったと報告されている²⁾。しかし、このプロトコールでは、末梢T細胞が標的細胞となるため、T細胞の寿命を考慮して1~2カ月間隔で治療をくり返す必要があり、持続性が期待できる骨髓幹細胞への遺伝子導入のプロトコールが、その後実施されたが、3例の患児のいずれも骨髓細胞中には ADA 遺伝子の導入は証明されなかった^{3)~5)}。一方、臍帯血幹細胞を用いたプロトコールでは、数カ月間にわたり末梢血リンパ球で ADA 遺伝子が確認されている⁶⁾。ADA 欠損症の遺伝子治療は、米国以外では、オランダとイタリアで開始されている。線維性嚢胞症については、アデノウイルスベクターに CFTR 遺伝子を組込み、鼻粘膜あるいは気管支上皮に直接投与するプロトコールが実施され、in vivo での遺伝子導入と細胞機能の改善が認められたが⁷⁾⁸⁾、肺炎という重篤な副作用が併発することが問題になった。家族性高コレステロール血症の治療については、レトロウイルスベクターを用いて LDL レセプター遺伝子を導入した肝細胞を門脈から注入することにより、低い効率で患者の肝臓組織に遺伝子が検出され、一時的にコレステロールの低下も認

められているが、明らかな治療効果を認めるまでに至っていない⁹⁾。さらに、外科的侵襲が大きいため、実用化は困難と考えられている。血友病Bについては、中国で皮膚線維芽細胞を用いて行われたが、少なくとも1例については第Ⅸ因子が2~3倍上昇し、凝固系の改善も認められている。Gaucher 病については、造血幹細胞に glucocerebrosidase 遺伝子を導入するプロトコールが RAC で認可されている。米国では、当初は、他に治療法のない致死的な疾患が対象になっていたが、最近では、血友病や Gaucher 病などのように致死の疾患でなく、また、酵素補充療法など他に有効な治療法が存在する疾患にも適応が拡がりつつある。

2. 遺伝子治療の展望

遺伝子治療には、高率に標的細胞に遺伝子を導入する技術が要求される。レトロウイルスベクターは、現在行われている遺伝子治療の多くに用いられているが、非分裂細胞 (神経細胞や通常の造血幹細胞、肝細胞、筋細胞など) に遺伝子導入ができない点と増殖性ウイルスによる発癌性が問題になる。アデノウイルスベクターは、気道上皮細胞、肝細胞、筋細胞など非分裂細胞にも遺伝子を高率に導入できるが、染色体に組込まれないため一定の間隔で遺伝子導入をくり返す必要があり、嚢胞性線維症の遺伝子治療で認められたウイルス粒子の免疫原性、細胞毒性も問題になる。AAV (adeno-associated virus) ベクターは、非分裂細胞へ遺伝子導入できるが、感染効率が低く、4 kb 以上の遺伝子を導入することができない欠点がある。この他に、ヘルペスウイルス、センダイウイルス、HIV を用いたベクターや、ウイルスを用いない物理化学的方法の開発が試みられているが、どの方法にも問題点があり、満足できる遺伝子導入技術の開発には今しばらく時間を要するものと思われる。

さて、現在試みられている遺伝子治療は、ADA 欠損症などのように、異常遺伝子を修復することなしに正常遺伝子を導入・付加することにより欠損している蛋白

(酵素)を補う付加的遺伝子治療 (gene augmentation) であり、主に劣性遺伝病が対象疾患になっている。しかし、異常蛋白の産生が症状を惹起するような疾患に対しては、付加的遺伝子治療は無効であり、異常遺伝子を正常化する遺伝子修正 (gene correction) が必要になる。遺伝子修正には、特異的部位の遺伝子改変技術が必要になるが、現段階では、相同組換え (homologous recombination) によるジーンターゲティングが最も期待される方法と思われる。相同組換えとは、標的遺伝子の一部と同じ塩基配列の領域 (相同領域) を外来遺伝子の両端に付加して遺伝子導入すると、相同領域の両端で組換えが生じて外来遺伝子が目標とする部位に挿入される現象であり、ランダムに遺伝子が染色体に組込まれる頻度より相当に低い率 (遺伝子導入された細胞 $10^2 \sim 10^3$ 個に1個の割合) で起こるために、頻度を人為的に高める方法の開発が必要である (図 1)。そのためには、哺乳動物細胞における相同組換えの機序を解明することが重要と考えられる。大腸菌では、Rec A という相同組換えを行う酵素が単離されていること、マウス MHC 領域に

相同組換えのホットスポットが複数存在することなどを手がかりにして、動物細胞の相同組換えに関与する酵素が単離されることが待たれる。遺伝子修正が技術的に可能になると、現在、遺伝子治療の対象外とされている優性遺伝病にも目が向けられることになるが、その場合、必然的に、現在禁止されている生殖細胞遺伝子治療 (germline cell gene therapy) の是非も論議されることになるだろう。遺伝子修正は、理想的な遺伝子治療と考えられるが、現在のところ、その実現は遠い将来の事と思わざるを得ない。しかし、分子遺伝学のこの10年間の進歩は、10年前には不可能とされていた難問を次々に解決してきたことを考えると、遺伝子修正の技術も案外早く開発されるかもしれない。

近未来に遺伝子治療が実現されると予想される先天異常症を、標的細胞別に表 2 に示した。これらの先天異常症に対する遺伝子治療のプロトコルを実施に移す前に、疾患モデル動物を用いたプロトコルの検討が必要である。そのためには、自然界には存在しない疾患モデル動物を作製する必要に迫られることが多いと思われる。

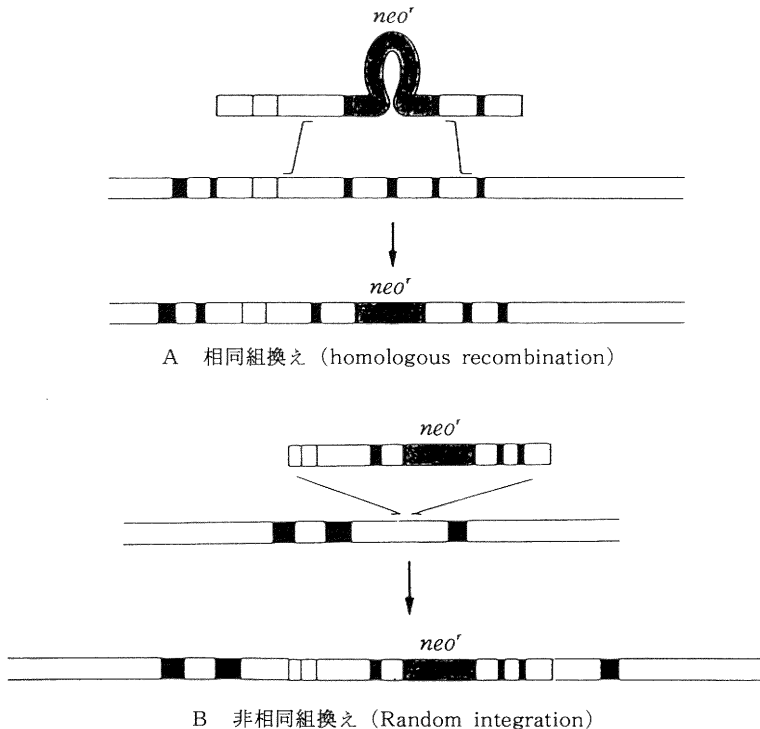


図 1 相同組換えの模式図

表 2 遺伝子治療が考えられる先天異常症

1. 肝細胞	アミノ酸代謝異常症, 尿素サイクル異常症, <u>血友病</u> , <u>家族性高コレステロール血症</u>
2. 骨髄細胞	免疫不全症候群 (<u>ADA</u> 欠損症, 慢性肉芽腫症など), 酵素欠損による溶血性貧血, リソゾーム蓄積症 (Gaucher 病, ムコ多糖症など), 副腎白質変性症
3. ケラチノサイトおよび皮膚線維芽細胞	<u>血友病</u> , 成長ホルモン欠損症
4. 気道上皮細胞	<u>囊胞性線維症</u>
5. 筋細胞	Duchenne 型筋ジストロフィー
6. 腎糸球体	Alport 症候群

(下線で示した疾患は、既に遺伝子治療が実施されている。)

現在では、ジーンターゲットングによるノックアウトマウス作製技術が確立され、目的とする疾患モデルマウスの作製が可能になっているが、今後は、ブタやサルなど、よりヒトに近い疾患モデル動物の作製技術の開発も、遺伝子治療を推進する上で重要な基礎研究の1つになると考えられる。

最後に、本稿では、遺伝子治療の倫理的問題については触れなかった。現段階では、遺伝子治療には克服すべき技術的課題が山積しており、研究者は、これらに果敢に挑戦すべきだが、ヒトへの実施に際しては、社会に十分な情報を提供し、社会の合意を得てから治療を開始することを忘れてはならない。

参 考 文 献

- 1) **Morgan, R.A. and Anderson, W.F.:** Human gene therapy. *Annu Rev Biochem*, **62**: 191~217, 1993.
- 2) **Blease, R.M. et al.:** Treatment of severe combined immunodeficiency (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with autologous lymphocytes transduced with a human ADA gene. *Hum Gene Ther*, **4**: 521~527, 1993.
- 3) **Hoogerbrugge, P.M. et al.:** Clinical protocol; Treatment of patients with severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase (ADA) deficiency by autologous transplantation of genetically modified bone marrow cells. *Hum Gene Ther*, **3**: 553~558, 1992.
- 4) **Bordignon, C. et al.:** Clinical protocol; Transfer of ADA gene into bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes for the treatment of patients affected by ADA-deficient SCID. *Hum Gene Ther*, **4**: 513~520, 1993.
- 5) **Hoogerbrugge, P.M. et al.:** Gene therapy in 3 children with adenosine deaminase deficiency. *Blood*, **82** (10)(Suppl.): 315a, 1993.
- 6) **Blease, R.M.:** Development of gene therapy for immunodeficiency: Adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res.*, **33** (Suppl.): S49~S55, 1993.
- 7) **Zabner, J. et al.:** Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*, **75**: 207~216, 1993.
- 8) **Crystal, R.G. et al.:** Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genet*, **8**: 42~51, 1994.
- 9) **Grossman, M. et al.:** Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet*, **6**: 335~341, 1994.

司会 遺伝子治療というのは、社会的に非常に注目されておりますけれども、1つの大きな焦点というのはやっぱり、運び屋、vector の安全性という問題が、なかなかうるさい問題として立ちはだかっているというのが、実情ではないかと思います。そういう点で、斉藤先生はアデノウイルスを使うという方法、それから森山先生はレトロウイルスを使うという方法であった訳ですが、そ

れのきちんとした安全性についてのチェックという問題について、斉藤先生いかがでしょうか。

斉藤 まだアデノウイルスについては、特に日本ではというか、全体的にも、アメリカでもあまり例数が多くなくて、私の話でも出て来ます様に、「こんなことが起こるのか。」というのが昨年度の状態だと思います。従って、どういう問題が起きてどういうふうに解決するかという事自体が、今一番新しい問題ですので、アデノに関してはまだしばらくこの様な状態が続くのではないかと思います。レトロに関してはもうかなり出来上がってきているのではないのでしょうか。

司会 森山先生どうぞ、その安全性のチェックについて。

森山 レトロウイルスに関しては、アメリカで既に遺伝子治療が開始されて5年を経過していますが4百人以上既に遺伝子治療が行われ、少なくとも急性の副作用がないということが確認され、かなり安全性が高いと思われます。しかし、ガンに関しては今のところあまり期待できるような成果が得られていないのが現状です。

司会 田中先生はリポソームという、ウイルス以外の運び屋というものを使った訳ですけども、田中先生、このリポソームに関しては、危険性というのは全くないのでしょうか。

田中 全くない訳ではないと思いますが、1つは、物事の見方としてですね、これはあくまで合成された物質です。ウイルスというのは生物界の生き物であると。だから、そういう観点ですね。例えば、ウイルスというのはこの辺をフラフラしている訳であります。いろいろ sequence が分かったとしても、分からない事がある。ところが、リポソームそのものは lipid を合成して、化学式、亀の子が分かっているという、そういうものであると、それが根本的に違うのではないかと。また DDS として臨床でもかなり使われた経験があるというようなことで、安全性についてはかなり違うのではないかと。またアメリカの RAC においてもレトロよりもこっちの場合かなり審査が、正確には企業秘密でデータが出ておりませんが、かなり楽だったのではないかと、そういうふうな話は聞き及んでおります。よろしいでしょうか。

司会 はい。

一般的な、社会的なコンセンサスを得るという点では、この点がやっぱり一番大きな問題だと思うのです。昨年新潟で1月25日の倫理委員会で、森山先生の申請に OK を出したときに、マスコミからうるさく言われたのはそ

このところなんです。ね。「本当に、絶対にないのか。」と言われると、濱田先生、その点どうでしょうか。絶対に危険はないのかと言う点ですね。なかなか絶対という事は有り得ないと思うのですが、世の中の人はずいぶんそういう事を聞くのです。ね。やっぱり。

濱田 これも物の見方の問題だと思いますけれども、先生方良く御承知の様に、薬ですね、絶対に安全で絶対に副作用がないなんていう物は、私は皆無だと思います。基本的な考え方としては、私自身は、やはり遺伝子治療の使われます、特に現在焦点になっておりますのは vector の安全性でございませうけれども、大変、演者の先生方には失礼な言い分になるかも知れませんが、絶対安全というか、絶対副作用のない vector というのは私はまず出て来ないと思います。問題はやはり、リスク・アセスメントと言いましようか、副作用をある程度考慮致しましても、得られる効果、遺伝子治療によって得られる効果が数倍大きいという場合に、やはり基本的には世間として、それを容認すべきだと、私はそういうふうに思っています。

司会 ありがとうございます。

その次の問題は、目的の遺伝子を導入する効率の問題であると思うのですが、これは森山先生はかなり苦労されて、20%~30%近くの導入効率を上げられた。その目的は自家骨髄移植で再発のメカニズムを見ようというマーカーに使うという事だった訳ですけども、しかし、白血病の再発というのは、1個の白血病細胞が再発するのではなくて、polyclonal に、かなり一斉に再発するというのが最近言われているようですけれども、一体、何%位まで導入効率を上げれば十分だというふうにお考えでしょうか。

森山 マーキングに関しては、アメリカの成績では、実際にマーキングは1%あれば十分に追求できるというふうに言われております。

司会 去年の新潟で倫理委員会で、私が丁度あの頃倫理委員長だったのですが、倫理委員の先生方から、マーキングをしても、数%のマーキングではどちらから再発したか分からないではないかというかなり厳しい御指摘があった訳です。しかし、よくよく調べてみますと、白血病の再発というのは、1個の白血病細胞が再発するのではなくて、ほとんど同時に、polyclonal に増殖してくるという事であれば、数%の導入効率でも良いという事が後になって分かった訳であります。そういうことで、20%~30%あれば十分だろうというふうに考えられます。

それから、古川先生のお話で thalassemia です。ね。

これは最後の里方先生もお仰いましたけれども、複雑な調節を受けていないという事が大事な条件の1つに挙げられておりましたけれども、hemoglobinの合成というのは、かなり複雑な調節を受けている。きちんとした1対1の、 α とか β とかですね、それが例えば、 γ を入れた場合にその辺は大丈夫なのでしょうか。

古川 transgenic mouseの実験からは、mouse自身のadult typeのglobin鎖の発現が、humanのを入れることによってある程度抑えられるようだという事が分かってまいりまして、Evolutionalに同じ、 β 鎖なら β 鎖同士はどうも抑制が働くという事がありますので、どうもその問題は克服できるのではないかという事が言われております。

司会 里方先生のお話で、究極の目的はhomologous recombinationによるreplacementが一番良いだろうというお話だった訳ですが、これは新潟大学でもこのhomologous recombinationをやっている高橋先生、里方先生はまだまだ現状では無理だと。1万個~100万個に1個位という事なので、将来の問題だというお話ですけども、先生の経験からはどうでしょう。

高橋 やっぱり、かなり難しいと思います。それは1つには、里方先生がお話になったように、homologous recombinationの頻度が非常に低いというのがあるんですけども、先生先程仰った中で、大腸菌のrecAと言いますか、homologous recombinationを起こさせるような、そういう酵素、そういう遺伝子を動物細胞でもcloningしていく必要があるというような、そういうお話でしたけれども、例えばヒトを含めた動物細胞の場合、recAに相当するものとして、RAD 51というのが既にcloningされておまして、そのRAD 51というのは大阪大学でcloningされたのですけども、RAD 51とco-activateする、RAD 52というのがアメリカだったと思いますけれども、cloningされて、そういう、いろいろなrecAに相当するものがかなりcloningされてきておりますので、導入効率の問題は将来的には、ある程度は頻度の高い導入効率を得られるような形の対応というのは出来るのではないかと思います。

司会 里方先生、いかがですか。

里方 非常にbasicなですね、メカニズムと言いますか、相同組み替えのメカニズムを、遺伝子治療を先に急ぐのではなくて、そういう非常に基本的なところをはっきりさせて、その中でいろんな解決策が出てくると思いますので、より臨床に直結したものでなくても、非常に地味な基礎研究をですね、私は、急がば回れでこれから

やっていく必要があるのではないかと思います。

司会 ありがとうございます。

今日のシンポジウムでは、最初に申し上げましたように、省略した点というのが、倫理的な問題であります。これは社会的には先程も申し上げたvectorの安全性という問題と共に、非常にむづかしい問題でございますけれども、遺伝子治療の将来という問題を含めて、演者の方々から御一人ずつ、倫理的な問題についてどうお考えかを仰って頂きましょう。斉藤先生からお願いします。

斉藤 私自身は、倫理的な問題というのは、vector開発の立場からは、一応基本的には棚上げて、効果と副作用の間をどこまでやるかという問題に集中している訳ですけども、しかしやはり、最終的には、我々、vector開発をしている者としてですね、これが実際どういうふうに使われて、どういう形で患者さんに投与されるかというのは、常に頭においております。これは、vector開発者だけが考える問題ではなくて、本当に、実際に使われる先生方、それから患者さんも含めて、これからみんなで考えていかないといけない問題だと思います。その責任というのは開発する側にもあるというのは、はっきり感じてやっていこうと思っております。

森山 本日のような研究会、或いは、今年の5月21日に、高久先生が会長で、第1回日本遺伝子治療学会が東京で行われた訳ですけど、そういう学会で公開していくという事が重要ではないかと。やはり、一般の社会の人達に、「ああ、ここは危険なんだな」とか、「ああ、ここは大丈夫だな」というようなことを、肌で感じてもらうことが、まず、重要ではないかというふうに考えています。

田中 倫理の面から申し上げますとですね、1つは遺伝子治療そのもののですね、有効性が今、問われつつあるのではないかと。それは、過去、米国を中心にして、ヨーロッパにおいても、数百件の申請がされてですね、その中でも本当に、自他供に認めてですね、良いというやつはあまりない訳で、まあ中にはある訳ですけども、そうしますと、日本においてこれから多分、治療の審査会が行われる時に、例えばメディアなんか当然知っている訳ですから、欧米において良かったもの、そういうものが日本でもやられるべきだろうし、また日本において、独自なものが必要なんでしょうけども、欧米において、やられたのだけれどもパッとしないんだと、ただ、欧米のものを持ってきて、日本で臨床治療をやると、こういうふうなやつはメディア或いは、一般の人々のインフォームドコンセントと言うのですか、それは、得るの

は難しいのではないかと、その様に思っております。

古川 私の考えとしましては、遺伝子治療ということで、いろいろな対象疾患を一包めにして頂きたくないとか、実際の疾患を選んだ場合は、これは遺伝子治療が本当に必要なんだというコンセンサスをまず得てから、取り組んでいきたいという、ターゲットを先に決めた方が進むのではないかという考えを持って、現在、勉強しているところであります。

里方 germ-line trapping を含めまして、技術的な、倫理を離れて、技術的な研究はですね、制限を設けるべきではないと私は考えております。但し、実際に人にそういう治療を施す事態になった場合はですね、私達研究者だけでは非常にまずいことになりますので、その時に、社会の監視と言いますか、或いは合意と言いますか、そういうものを得た上で行なうと。但し、研究に関しては、とにかく、行けるところまで突き進むというのが、私は正しい道ではないかと思っております。

司会 ありがとうございます。御一人ずつからそれぞれ、御発言を頂きましたが、今の御発言の中で、田中先生が非常に重要な指摘を1つされたのは、今、遺伝子治療というのは非常に注目を浴びている、或いは期待をされているけども、本当に有効性があるのかどうかという問題、これはやっぱり検討を要することだろうと思います。勿論、里方先生が最後に言われたように、研究をとことん進めていくことによって、いろんなバリアーをクリアしていこうと思いますけれども、現在でも、米国でも、やはりこの遺伝子治療に関しては optimist と pessimist に分かれているということを聞いておりますけども、過大な期待は出来ない、しかし、やるべきことはきちんとやっていくということが現状ではないかというふうに感じた次第であります。

以上を持ちまして、このシンポジウムを終わらせていただきます。長時間どうも御静聴ありがとうございました。