遺伝子導入法

— AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発 —

水野正明・吉田 純*

Gene therapy using AAV vectors

Adeno-associated virus (AAV) is a human parvovirus with a single-strand DNA genome of approximately 4.6 kb encapsulated in an icosahedral virion 20 to 26 nm in diameter. Recombinant AAV vectors have promising features as a vector for gene therapy, such as the lack of any apparent pathogenicity, low immunogenicity, and relatively high stability of transgene expression. Preclinical studies have been performed for the treatment of cystic fibrosis, Fanconi anemia, β -thalassemia, hemophilia, AIDS, Parkinson disease, and many kinds of neoplastic diseases such as malignant brain tumors. Here, we introduced gene therapy using AAV vectors containing herpes simplex virus-thymidine kinase (HS-tk) gene or cytokine genes. To produce glioma in the brain of nude mice, we injected the cells suspended in PBS into the brain. Then we injected AAV-tk (9.6×10^9 particles in $2 \mu\text{l}$) was injected into the brain where glioma cells had been transplanted on day 7 (single injection) or on day 7, 10, and 13 (multiple injections). In the case of a single injection, 100 mg/kg ganciclovir (GCV) was administered ip, twice daily, in 0.5 ml saline, for 6 days after vector injection. Following multiple injections, the same volume of GCV was administered ip, twice daily, in 0.5 ml saline, for 2 days after vector injection and the procedure was repeated three times. When we injected AAV-tk three times, the tumors disappeared completely. Even when we injected the AAV vector once, the tumor size was much smaller than that of control. In the case of interferon- β gene, we got almost same antitumor effect.

From these results, AAV vectors could be more efficiently transduced to congenital and acquired diseases than ordinary gene transfer techniques.

Masaaki Mizuno・Jun Yoshida*

key words : AAV, gene therapy, HS-tk, interferon, brain tumors

1990年9月に、重症免疫不全症の一つであるADA欠損症の患児に対し、世界で最初の遺伝子治療が行われてからはや8年が経過している。この間、米国を中心に、2,500例以上の患者に遺伝子治療が行われており、その治療効果についての報告も増えてきている。1995年12月にNIHのOrkinらが発表した“Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in

research on gene therapy”と題する報告書では、残念ながら既存の治療法をはるかにしのぐ治療成績はいまだ得られていないとしていた。一方で彼らは、高度先進医療の一つとして推し進められている遺伝子治療が、期待されたほどの効果をあげていない理由として、ヒトにおける遺伝子導入効率の低さを指摘している。さらに、彼らはこの分析結果をもとに、今後遺伝子治療を有効な治療法にするためには、遺伝子導入効率の高いベクターの開発が不可欠であると提案している。

そもそも遺伝子治療を成功させるための理想的な遺伝子導入法とは、高い安全性と導入効率をも

* Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550 名古屋大学医学部脳神経外科学教室
Offprint requests to : Jun Yoshida, M.D., Ph.D.

ち、導入遺伝子の発現が安定で、しかもその調節が可能であること、さらに分裂細胞、非分裂細胞を問わず、対象となっている細胞に特異的に遺伝子導入のできるものが望まれる。現在、遺伝子治療で使われている代表的なベクター、すなわちレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、リボソームは残念ながら理想的なベクターの条件をすべて満たしているわけではない。それぞれ一長一短があり、対象となる疾患にもっとも適していると考えられるものを選択せざるを得ない。

さて、筆者らは日々脳神経外科医として診療に従事しているが、臨床医という立場からすれば、さまざまな条件のなかでやはり安全性がもっとも重要視されるべきと考えている。DNA ウイルスの一つであるアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) は元来病原性がないことから、この条件を満たす。さらに、AAV は自ら増殖能をもたず(増殖にはアデノウイルスなどのヘルパーウイルスの共感染が必要である)、物理化学的にも安定で、しかも第 19 番染色体の特定の位置に遺伝子が組み込まれることが明らかになった。このことから、一躍注目を集めるようになった。ここでは、この AAV を遺伝子組換えして作成される AAV ベクターの特徴と、これを用いた遺伝子治療法の開発について解説したい。

AAV ベクターの特徴

AAV は、アデノウイルスに混在している小型の DNA ウイルスとして、1965 年に発見された。AAV は正 20 面体を呈する直径 20~26 nm の小型の一本鎖 DNA ウイルスで、パルボウイルス(パルボとはラテン語で小さいを意味する)に属する。その表面は 32 個のカプソメアから構成されたカプシドで覆われ、エンベロープはもたない。また、自ら増殖能をもたない dependovirus で、増殖にはアデノウイルスやヘルペスウイルスの存在が必要である。ウイルス粒子は温度、pH、プロテアーゼなどに強い抵抗性を示し、物理化学的にきわめて安定である。また、ウイルス遺伝子は 4680 bp の一本鎖 DNA で、その両端に 145 bp の ITR (in-

図 1 アデノ随伴ウイルス

verted terminal repeat) とよばれる特異的な配列をもっている。この ITR は、ウイルスの複製やパッケージング、さらに宿主染色体への挿入に不可欠な配列とされている。ITR に挟まれた領域には、主に AAV の複製や転写を制御する Rep 蛋白をコードする Rep 遺伝子と、カプシド蛋白をコードする Cap 遺伝子が乗っている(図 1)。

AAV ベクターは、この Rep および Cap 遺伝子を、プロモータをもった目的遺伝子で置換して作成される。当初期待されていた AAV ベクターの利点には、病原性がなく物理化学的にきわめて安定であること、特定の染色体(第 19 番染色体長腕にある AAVS1 部位)に遺伝子導入されること、非分裂細胞でも発現が可能であること、さらには ITR にプロモータ活性がないことから発現調節可能なベクターをつくれる可能性があることなどがあげられていた。しかしその後の研究で、特定の染色体に組み込まれるためには、Rep 遺伝子がコードする Rep 蛋白の存在が必要であることが証明されたことから、AAV ベクターは特定の染色体に組み込まれるという性質を失っていることが明らかになった(図 2)^{1,2)}。

現在、AAV ベクターの多くは、非分裂細胞では一本鎖 DNA のままでエピソーム的に存在してい

図 2 部位特異的遺伝子導入のメカニズム¹⁾

19 番染色体の AAVS1 領域にある Rep 蛋白質結合部位と AAV の ITR が Rep 68/78 蛋白質を介して複合体を形成し、Rep 68/78 蛋白質がもつエンドヌクレアーゼ活性により TRS に切れ込みが入り、AAV ゲノムが組み込まれる。

ITR : inverted terminal repeat, TRS : terminal resolution site, RBS : rep binding site

ること、分裂細胞では一部の AAV ベクターが分裂時に染色体にランダムに組み込まれると考えられている。いずれにしても、臨床応用を考えた際にもっとも大きな利点となるのは病原性がないという性質であり、この性質が AAV ベクターの魅力を高めていることには変わりない。

AAV ベクターの調製

AAV ベクターの調製は、野生型 AAV の ITR の間に発現を期待する遺伝子を組み込んで作成された AAV ベクタープラスミドと、AAV ベクターの形成に必要なウイルス蛋白質(Rep と Cap)を産生するヘルパープラスミドを、293 細胞(ヒト腎細胞由来の細胞で、アデノウイルス由来の E1A と E1B 遺伝子が導入されている)にリン酸カルシウム共沈殿法などを用いて遺伝子導入する。これにアデノウイルスを感染させると、非増殖型の組換え型 AAV(AAV ベクター)が産生される(図 3 上段)。しかしながら、この方法では調整された AAV ベクターにアデノウイルスが混入することを避けられない。このため、混入したアデノウイルスを加熱処理(56°C, 60 分)によって不活化し、用いることとなっている。しかしながら、この加熱処理によりアデノウイルスは不活化されるものの、その抗原性は残ることから、これが大きな問題になっている。一方、AAV ベクターの産生に必要なアデノウイルス遺伝子はすでに同定さ

れている(E1A, E1B, E2A, E4, VA)ことから、これらの遺伝子を発現するプラスミドをアデノウイルスのかわりに遺伝子導入し、AAV ベクターを調整しようとするアデノウイルスフリーシステムが開発されている(図 3 下段)。筆者らの教室では、米国 Avigen 社の協力を得て、このアデノウイルスフリーシステムで AAV ベクターの調整を行っている。調整された AAV ベクターの問題点としては、調整されたウイルス粒子のうち 1/1,000 から 1/10,000 しか実際に機能するウイルス粒子がない点である。これには、非感染性のウイルス粒子の存在や、細胞内に入ったウイルスのうち 50% 程度しか核内へ移行できないこと、AAV は本来一本鎖 DNA をもつウイルスであるので、遺伝子を発現するためには二本鎖 DNA になる必要があるが、この効率が悪いなどが関与していると考えられている。

また、レトロウイルスベクターの調整時に用いられるパッケージング細胞に相当する細胞が樹立されていないことが、調整法を複雑にしている要因の一つである。これに対しては日本医科大学の Tamayose らは、パッケージング細胞を樹立し、硫酸セルロースカラムにより濃縮することで、高力価の AAV ベクターを調整することに成功したと報告している³⁾。AAV ベクターを遺伝子治療用ベクターとして使用していくためには、これらの問題点を解決する必要がある。

図 3 AAV ベクターの調製法

AAV ベクターの遺伝子発現効率

AAV ベクターの遺伝子発現効率を、AAV-LacZ (CMV プロモータでドライブされる β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだ AAV ベクター) を種々の培養細胞に感染させ、X-gal 染色を行うことで評価してみた。その結果、ヒトグリオーマ細胞のほか、ヒトメラノーマ細胞、ヒト扁平上皮癌細胞やヒト肝癌細胞など、多くのヒト癌細胞で遺伝子発現が可能であった。ヒト以外にもマウス、ラットで遺伝子発現が可能であったが、マウスメラノーマやラットグリオーマの一部など、きわめて遺伝子発現効率が低い細胞株もあった。ヒト血液系培養細胞株のような浮遊細胞株でも遺伝子発現は可能であった。遺伝子導入された細胞のうち約 1 割は stable な transformant になることが、ヒトグリオーマ細胞株で確認されている。以上、示してきた増殖 (分裂) 細胞以外に、筋細胞、神経細胞、グリア細胞などの非分裂細胞でも遺伝子発現が可能であった。筋組織では、導入された遺伝子がエピソードにあるにもかかわらず、3 か月以上発現が持続することが確認されている。このように、AAV ベクターは多くの種を越えて効率よく遺伝子導入・発現が可能であることが確認された。最近筆者らは、tet-repressor system を用いて発現調節可能なベクターを調整し、検討している。AAV ベクターは異なった遺伝子をもつ 2 種類以上のベクターを同時に、しかも何回も繰り返し投与できることから、遺伝子発現調節用ベク

ターとして期待されている。

AAV ベクターを用いた遺伝子治療の開発

AAV ベクターを用いた世界最初の臨床試験 (Phase I) は、Flotte らによって 1994 年に申請され、1995 年の秋からはじめられている。対象は嚢胞性線維症である。彼らのプロトコールは、AAV ベクターに嚢胞性線維症の原因遺伝子である CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) を組み込んで、経気道的に気道粘膜細胞に遺伝子を導入しようとするものである。

AAV ベクターは、筋細胞や神経細胞などに効率よく遺伝子を導入できることから、先天あるいは後天的蛋白質欠損症に対する補充療法の開発が数多く検討されている。血液系疾患に対して Kessler らは、エリスロポイエチン遺伝子を組み込んだ AAV ベクターをマウスの骨格筋に注射したところ、40 週以上にわたってヘマトクリット値が上昇した実験結果を報告し、AAV ベクターの有用性を示した⁴⁾。また、血友病 B の患者を対象に、Factor IX 遺伝子を AAV ベクターに組み込んで肝細胞や筋肉細胞に導入しようとする試みが進められている^{5,6)}。血友病 B に対しては、アデノウイルスベクターによる検討が先に行われているが、アデノウイルスベクターによる臨床研究では、一時的な治療効果は認められたものの、アデノウイルス由来の遺伝子がつくり出すウイルス蛋白に

に対する免疫反応が惹起され、導入後の遺伝子発現が制限される事実が報告されている。このため、抗原性がきわめて低い AAV ベクターが期待されている。Walsh らは、Fanconi 貧血患者の末梢血幹細胞(CD34⁺細胞)に Fanconi 貧血 C 群の責任遺伝子(FAC 遺伝子)を AAV ベクターを用いて導入したところ、形成されたコロニーの約 60% でその遺伝子発現を認めたと報告している⁷⁾。その他の血液系疾患として β -サラセミア、鎌状赤血球症、慢性肉芽腫症、ゴーシャ病などが臨床前研究として行われている。

神経系疾患を対象としたものとして、パーキンソン病の遺伝子治療が検討されている。Kaplit らは、パーキンソン病のモデルラットの脳内へ、定位脳手術的にドーパミン産生に関わる律速酵素の一つであるチロシン水酸化酵素の遺伝子を、AAV ベクターを用いて導入し、ラットの行動異常が改善したと報告している⁸⁾。また、脳梗塞や外傷などによって生じた脳や脊髄損傷に対して、*bcl-2* や NGF の遺伝子を用いて損傷部位を最小化したり、神経再生を促すなどの試みが検討されている。

悪性脳腫瘍(グリオーマ)に対する遺伝子治療の開発

脳腫瘍は病理学的に 50 以上に細分されるが、現在、遺伝子治療の対象疾患として考えられているものは神経膠腫(グリオーマ)、特に悪性グリオーマとよばれる腫瘍である。その予後は、現行治療で平均生存期間がわずか 2 年である。このため、少しでも治療成績の向上につながる新しい治療法の開発が望まれている。遺伝子治療はその候補の一つと考えられている。ここでは、悪性グリオーマに対する遺伝子治療の現状と、AAV ベクターを用いた遺伝子治療の開発につき解説する。

(1) 悪性グリオーマに対する遺伝子治療の現状

脳腫瘍、特に悪性グリオーマに対する遺伝子治療は、1992 年に NIH の Oldfield らが世界で最初に臨床に応用したのを皮切りに、現在までに 16 のプロトコールが行われている。そのうち八つはレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター

を用いて、単純ヘルペスウイルス-チミジンキナーゼ(HS-tk)遺伝子を腫瘍細胞に導入し、その後抗ウイルス剤であるガンシクロビル(GCV)を点滴静注し、抗腫瘍効果を導こうとするものである。この抗腫瘍効果は、主に分裂細胞で導かれるため、ほとんどが非分裂細胞で構成される脳組織に発生母地をもつ脳腫瘍は最も適した標的疾患の一つと考えられた。しかしながら、初期の臨床研究においては、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が予想以上に低く、期待された治療効果は得られなかった。原因は、*in vivo* におけるレトロウイルスベクターの不安定性(レトロウイルスベクターは生体内では 2~4 時間で失活してしまう)と、腫瘍組織内分布の狭さにあった。これは、レトロウイルスベクターを直接投与した場合のみならず、マウス線維芽細胞由来のレトロウイルスベクター産生細胞を直接腫瘍内に移植した場合も、同様の結果であった。その理由として、ヒトの腫瘍では動物の腫瘍モデルに比して休止期の腫瘍細胞の割合が高いこと、動物実験では使用されなかったステロイドホルモン剤などの併用により、抗腫瘍免疫の果たす役割が弱められていることなどが問題として考えられた。

このような流れのなかで、University of Pennsylvania の Eck らや Baylor College の Grossman らは、HS-tk 遺伝子をレトロウイルスベクターより高い遺伝子発現効率を示す組換え型アデノウイルスベクターに導入し、定位脳手術的に局所注入することにより高い抗腫瘍効果を導こうとするプロトコールを提出した^{10,11)}。アデノウイルスベクターはレトロウイルスベクターより感染効率が高く、また非分裂細胞に対しても感染し、発現するが、その発現はレトロウイルスベクターと異なり、一過性である。このアデノウイルスベクターの場合、先に記した血友病 B の場合と同様、ウイルス由来の遺伝子の発現に伴う強い抗原性が問題として採り上げられている⁶⁾。

現在、米国ではアデノウイルスベクターの抗原性を低くするためのウイルス改変に関する研究が盛んに行われており、1998 年 1 月に開催された Keystone Symposium でも多くの発表がみられ

図 4 実験プロトコル

図 5 AAV-tk と GCV による抗腫瘍効果¹²⁾

た。一方で、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターにかわる新たなベクターの開発も検討されている。その一つとして注目を集めているのが AAV ベクターである。以下に、AAV ベクターを用いた悪性グリオーマに対する遺伝子治療の開発にかかわる、筆者らの基礎的研究の一部を紹介させていただく。

(2) HS-tk 遺伝子を用いた遺伝子治療

HS-tk 遺伝子を組み込んだ AAV ベクター (AAV-tk) は、GCV の投与により多種の腫瘍細胞で強い抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で導く。筆者らは米国 Avigen 社との共同研究のなかで、これを脳腫瘍に応用した基礎的実験を行って

きた。 *in vivo* 実験としては、ヌードマウスの脳内へヒトグリオーマ細胞 (2×10^5 cells/ $2 \mu\text{l}$) を移植し、作成された脳腫瘍モデルに対しグリオーマ細胞移植後 7 日目に 9.6×10^9 particles の AAV-tk を 1 回投与する群と、移植後 7, 10, 13 日の計 3 回 AAV-tk を投与する群を作成し、抗腫瘍効果を評価した(図 4)。なお、GCV は 100 mg/kg を AAV-tk 投与後 2 日間マウス腹腔内に投与した。その結果、移植後 31 日目には、1 回投与群では移植マウス全例に腫瘍の形成は認められたが、その平均腫瘍径は 3 mm 以下と、無処置群の 6 mm にくらべて有意に小さかった。一方、3 回投与群では 6 例中 1 例で非常に小さな腫瘍(腫瘍径 1.3 mm)を認め

たものの、他の5例では完全寛解が得られた(図5)¹²⁾。また、GCVの濃度を25 mg/kgまで落としても同様の効果が認められた。

(3) ヒト β 型インターフェロン(IFN- β)遺伝子を用いた遺伝子治療

上記した脳腫瘍モデルに対して、グリオーマ細胞移植後7日目よりIFN- β 遺伝子を組み込んだAAVベクター(AAV-IFN- β)を 3.8×10^{10} particles, 隔日6回投与すると、テストされた5例全例において腫瘍の形成が認められず、死亡例もなかった(治癒率100%)。また、1回投与群においては移植マウス全例に腫瘍の形成は認められたが、その平均腫瘍径は3 mm以下と、無処置群の6 mmにくらべて有意に小さかった。病理組織学的検索では、腫瘍の内外にnatural killer(NK)細胞の浸潤を認めた。これは、以前筆者らがIFN- β 遺伝子包埋リポソームの抗腫瘍効果と同じ脳腫瘍モデルを用いて評価したときと同様の結果であった。IFN- β 遺伝子包埋リポソームを投与した実験では、抗asialo-GM1抗体と放射線照射によりNK細胞の活性を落としてみると抗腫瘍効果が減弱したことから、IFN- β 遺伝子を導入して導かれる抗腫瘍効果には、宿主の免疫の賦活化が強く関与していると考えられている。

今後の展望

AAVは病原性が低く、かつ非増殖性のウイルスベクターであるうえ、ほかのウイルスベクターにくらべ物理化学的にきわめて高い安定性を示すといった特徴を有している。さらに分裂細胞、非分裂細胞を問わず感染できるうえ、感染可能な動物細胞も多種にわたる。このように、ほかのウイルスベクターにはない多くの利点を有している。一方で、その調製には効率の良いパッケージング細胞が作成されていないことから、やや手間がかかるという欠点がある。しかしながら、将来重要な遺伝子治療用ベクターになる可能性はきわめて高いと考えられる。遺伝子治療は、21世紀には大きな医療分野の一つとなることが期待されている

が、この治療の成功には、安全でしかも遺伝子導入効率の高いベクターの開発が不可欠である。AAVベクターに残されている問題点はまだ多いものの、今後の研究に期待したい。

文 献

- 1) Linden RM et al.: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11288-11294, 1996.
- 2) Rivadeneira ED et al.: Sites of recombinant adeno-associated virus integration. *Int. J. Oncol.* 12: 805-810, 1998.
- 3) Tamayose K et al.: A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Human Gene Therapy* 7: 507-513, 1996.
- 4) Kessler PD et al.: Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14082-14087, 1996.
- 5) Snyder RO et al.: Persistent and therapeutic concentration of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genet.* 16: 270-276, 1997.
- 6) Monahan PE et al.: Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther.* 5: 40-49, 1998.
- 7) Walsh CE et al.: Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J. Clin. Invest.* 94: 1440-1448, 1994.
- 8) Kaplitt MG et al.: Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genet.* 8: 148-154, 1994.
- 9) Ram Z et al.: Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nature Medicine* 3: 1354-1361, 1997.
- 10) Chen SH et al.: Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057, 1994.
- 11) Perez-Cruet MJ et al.: Adenovirus-mediated gene therapy of experimental gliomas. *J. Neurosci. Res.* 39: 506-511, 1994.
- 12) Mizuno M et al.: Adeno-associated virus vectors containing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene cause complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 76-80, 1998.