遺伝子治療を目的とする DDS の開発動向

特集 遺伝子治療と DDS

鈴木 要 介*

A trend of development of DDS for gene therapy

Since the first gene therapy started in USA in 1990, more than 300 clinical trials have been performed. The bases of gene therapy are to transfer a therapeutic gene into target cells by using a gene transfer system (vector) and to treat the disease with physiological activities of gene products for the treatment. The vector used in these processes consists of a gene transfer system and a gene used for the treatment of diseases. This system is associated with the relation of a delivery system and a drug in the Drug Delivery System (DDS) that has hitherto been studied. In fact, many findings obtained in the research and development on DDS have been applied to the recent studies on vectors. At the beginning, gene therapy was expected as "a dream therapy" to give rise to therapeutic effects on any kind of diseases. Nevertheless, only very limited cases in gene therapy gave results indicating overt efficacy in clinical practices, although such studies have been made actively until now. It should be noted that one of the characteristics in protocols of studies in which positive results are obtained is a topical application of vectors. These facts suggest that active targeting at the aimed sites can not be accomplished by systemic administrations of most vectors developed until now, and topical applications have been selected as the most effective procedure to ensure an expression of the gene for treatment at the target sites. It is considered that the key for success in the gene therapy in the future is a further improvement of vectors.

Yosuke Suzuki*

key words : gene therapy, viral vector, plasmid DNA

1990年に米国で最初の遺伝子治療が実施されて以来、すでに300以上の臨床研究が行われ、3,000人以上の患者に遺伝子治療が行われてきた。

遺伝子治療は、遺伝子導入システム(ベクター)を用い、目的とする細胞に治療用遺伝子を導入し、その治療用遺伝子産物の生理活性により疾患の治療を行うことが基本となっている。このとき用いられるベクターは、遺伝子導入システムと治療用遺伝子とから構成されている。これは、従来研究されてきたDDSにおけるデリバリーシステムと薬物との関係を連想させるものであり、事実、現在研究が進められているベクターにおいては、DDSの開発研究で得られた知見が多く用いられている。以降、現在の遺伝子治療におけるベクター開発の現状を、DDS的な

観点から概観してみたい。

現在の遺伝子治療の現状

当初、遺伝子治療はすべての疾患に効果を示す“夢の治療法”となることが期待された。現在まで活発な研究が行われてきているが、実際の臨床において明らかな効果につながる結果が示された例は限られているといえよう。たとえば、p53を搭載したアデノウイルスベクターによる癌遺伝子治療、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を用いた虚血性疾患への遺伝子治療、最近では、第9因子を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる血友病Bの遺伝子治療¹⁾などが代表的な例としてあげられる。

以上の臨床例をみると、効果が得られているプロトコルには共通して、ベクターの局所投与という特徴があることに気が付く。これは、現在までに開

* New Technology Development Department, Central Research Center, Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc. 久光製薬株式会社 中央研究所新規事業部

発されたベクターにおいては、高度なアクティブターゲティングが達成されていないため、目的とする部位で確実に治療用遺伝子を発現させるための最も確実な方法として局所投与が選択されたと考えることができる。

癌の遺伝子治療を例にとると、位置が固定できる腫瘍(見える癌)に対してベクターを局所投与することで高い効果が期待できる。しかしながら、今後はベクター自身のターゲティング性や標的細胞特異的な発現プロモーターを併用することにより、診断不能な微細な癌(見えない癌)の遠隔転移や播種性の癌に対しても効果を有するベクターが開発目標となると考えられる。

このような状況を踏まえ、遺伝子治療用ベクター開発における遺伝子導入システムの開発と、治療用遺伝子探索の現状に関して以下に示すこととする。

遺伝子導入システム開発の現状

遺伝子治療用ベクターとして用いられる遺伝子導入システムは、組換えウイルスを用いたウイルスベクターと、ウイルスを用いない非ウイルスベクターに大きく分類することが可能である。

1. ウイルスベクター

ウイルスベクターは、ウイルス自身のもつ感染性および遺伝子導入能を利用しているため、高い遺伝子発現が期待されており、現在までに数多くの種類のベクターが開発されてきた。以下にその代表的な例を示す。

① レトロウイルスベクター

遺伝子治療用のベクターとして最も多く用いられてきており、製造法もほぼ確立されている。導入された遺伝子は染色体へ組み込まれるため、持続的な発現が期待される。

② アデノウイルスベクター

現在最も多く利用されている遺伝子治療用のベクターであり、製造法もほぼ確立されつつある。多くの細胞に遺伝子導入が可能であるが、高い効率で遺伝子導入が達成されるためには、標的細胞にレセプター(CAR:コクサッキーウイルスアデノウイルス

レセプター)が発現している必要がある。導入された遺伝子は染色体へ組み込まれないため、持続的な発現は期待できない。

③ アデノ随伴ウイルスベクター

最近多く利用されている遺伝子治療用のベクターであり、製造法もほぼ確立されつつある。このベクターの特徴としては、非分裂細胞に遺伝子導入できる可能性があることと、19番染色体の特定の位置に遺伝子を組み込むことができる可能性があることがあげられる。

④ レンチウイルスベクター

最近注目を集めている遺伝子治療用のベクターであり、非分裂細胞に遺伝子導入できることを特徴としている。

⑤ ヘルペスウイルスベクター

野生株が神経細胞で特異的な潜伏感染を起こすことを利用し、神経細胞特異的なベクターとして開発がなされている。

⑥ その他、ワクシニアウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、センダイウイルスベクターが遺伝子治療用のベクターとしての利用を目指し開発が進められている。

以上、個々のウイルスベクターの現状について示したが、最近では単独のウイルスベクターの特性だけではなく、複数のウイルスもしくは非ウイルスベクターの特徴を同時に合わせもつことにより、高機能化を達成したハイブリッド型ウイルスベクターの研究も盛んに行われている。以下にそれらの具体例を示す(図1)。

① (レトロウイルス+VSV)ハイブリッドベクター

レトロウイルス単独では実際に臨床研究で使用する程度の高タイターなベクターを製造することは容易ではない。そのためレトロウイルスベクターのエンベロープ蛋白をVSVのエンベロープ蛋白であるG蛋白と入れ替えたシュードタイプウイルスベクターの研究が盛んに行われている。

② (ヘルペスウイルス+アデノ随伴ウイルス)ハイブリッドベクター

先に述べたように、ヘルペスウイルスは神経細胞特異的な感染指向性を有している。そこで、染色体

図 1 ウイルスベクターのハイブリッド化

組み込み能を有するアデノ随伴ウイルスの配列を、ヘルペスウイルスベクター中にハイブリッドすることにより、神経細胞特異的で持続的な遺伝子発現が期待されるシステムが構築される²⁾。

③ (アデノウイルス+アデノ随伴ウイルス)ハイブリッドベクター

アデノウイルスベクターは、多くの細胞に遺伝子導入が可能であり、容易に高タイターなベクターを製造することも可能である。そこで、染色体組み込み能を有するアデノ随伴ウイルスの配列を、アデノウイルスベクター中にハイブリッドすることにより、高タイターで持続的な遺伝子発現が期待されるシステムが構築される^{3,4)}。

④ (アデノウイルス+レトロウイルス)ハイブリッドベクター

上記のシステムと同様に、レトロウイルスの配列を、アデノウイルスベクター中にハイブリッドすることにより、高タイターで持続的な遺伝子発現が期待されるシステムが構築される。

⑤ (アデノウイルス+カチオン性リポソーム)ハイブリッドベクター

先に述べたように、アデノウイルスは多くの細胞に感染が可能であるが、CARが発現していない細胞に対しては効率が低下する。そこでカチオン性リポソームとハイブリッドすることにより、非特異的

な電荷の作用によって、CARの有無によらずに遺伝子導入が可能なシステムが構築される⁵⁾。

⑥ (アデノウイルス+カチオン性高分子)ハイブリッドベクター

従来、各種カチオン性高分子とプラスミドDNAを用いた遺伝子導入においては、遺伝子の細胞質内への放出過程の効率が低いため、高い遺伝子発現が観察されなかった。しかしながら、pH依存的にエンドソームから細胞質へ移行するアデノウイルスとハイブリッドすることにより、高い遺伝子発現が達成された⁶⁾。

⑦ (アデノウイルス+ポリエチレングリコール)ハイブリッドベクター

アデノウイルスベクターは、多くの人が中和抗体を有しており、免疫反応による遺伝子導入効率の低下や副作用の可能性が示唆されている。そこで、すでにDDS分野において確立されている技術を利用し、水溶性の高分子であるポリエチレングリコールとハイブリッドさせることにより、免疫反応を低下させることが可能となっている。しかしながら、遺伝子導入効率は低下することが欠点の一つとしてあげられる⁷⁾。

以上、個々のウイルスベクターシステムに関して現状を示したが、従来、生体におけるウイルス野生

株の感染は、標的細胞上のレセプター分子とウイルス表面蛋白との結合だけによって成立するのではなく、細胞内でのウイルス複製効率、生体内への感染経路、生体側の免疫反応など多くの要因が重なって成立しているものである。そのため、特定の組織においてウイルス野生株の感染が成立しても、遺伝子組換えで得られたウイルスベクターが野生株と同様な感染分布をする保証はない。また、ハイブリッド化などによる高性能化により、生体内での分布が大きく変化する可能性もあり、本来考えられなかった副作用が発生する可能性も考えられるため、その臨床応用においては十分な安全性を確認する必要がある。

2. 非ウイルスベクター

非ウイルスベクターはウイルスの感染能を利用せず、基本的には人工の遺伝子キャリアシステムを利用するため、従来の DDS とかなり類似した方法論が用いられている場合が多い。しかしながら、ベクターの場合には薬物に相当する遺伝子を細胞質に導入するだけでなく、核内へも移行させることが必要であり、新たな“細胞内ターゲティング”概念の確立が必要となってきている⁸⁻¹⁰⁾。

高分子である遺伝子を核内へ移行させる具体的なシステムとしては、核移行シグナル(NLS)の利用が最も有望であると考えられる^{11,12)}。このような遺伝子への NLS の導入に関しては、DDS におけるプロドラッグ化との共通点を見いだすことができ興味深い。また、それ以外のアプローチとしては、遺伝子であるプラスミド DNA 自体のサイズを小さくする試み¹³⁾や人工染色体を用いた例¹⁴⁾が報告されており、今後の進展が期待される。

しかし、実際に細胞内ターゲティングの評価を行ううえでの問題点として、培養細胞の細胞周期があげられる¹⁵⁾。すなわち、細胞分裂の際に細胞膜が消失することにより、分裂後の核内への遺伝子の移行が容易になる可能性が高いことが想定される。実際の遺伝子治療においては、分裂していない細胞を標的とする場合も多く、今後は評価系のさらなる進歩が期待される。また、従来の DDS においては、体内動態に関して詳細な検討がなされてきたが、現在の非

ウイルスベクターにおいては方法論の確立が遅れている部分がある¹⁶⁾。臨床への応用を推進するためにも、ベクターの体内動態に関する研究の進展が望まれる。

治療用遺伝子探索の現状

ヒトゲノム研究の進展により、数多くの疾患関連遺伝子が明らかにされつつある。また、2000 年前半に予定されているヒトゲノムのアブストラクト公開により、基本的な遺伝子配列は公知のものとなるため、全世界的に研究の中心はポストゲノムへと移行しているといえる。つまり、遺伝子を読む時代は終焉し、遺伝子を利用する時代が本格的に訪れたわけである。わが国でも、ミレニアム計画として大量の予算が投入されることが示されているものの、先行する有力ゲノムベンチャーは、株式公開などによりすでにインサイト社が 400 億円以上、セラ社が 800 億円以上の資金を手に入れてポストゲノム研究を精力的に行っており、ポストゲノム分野においても日本の立場は苦しくなりつつある。遺伝子治療は、遺伝子を利用する治療法であり、ある意味でポストゲノム研究の一角を担うものであるが、本当の意味で治療効果が得られる遺伝子を選択するのは容易ではなく、今後は実際の病態を反映した遺伝子治療の評価モデルの確立が望まれる。

また最近では、ゲノム関連からの情報以外にも遺伝子治療への応用が期待される報告がなされている。RNA interference(RNAi)といわれる技術は、遺伝子のエクソン部分に対応する 2 本鎖 RNA により、その遺伝子の機能が特異的に阻害されるものである¹⁷⁾。この RNAi の遺伝子治療の応用の可能性としては、分節型 2 本鎖 RNA ゲノムをもつレオウイルス、ロタウイルスなどのベクターとしての利用が考えられる。しかしながら、それらウイルスのベクター化に関しては報告例が少なく、今後の進展が期待される。

一方、従来のアンチセンスなどのオリゴヌクレオチド薬物の延長上に位置するものとして、RNA/DNA キメラ構造オリゴヌクレオチドがあげられる¹⁸⁾。これは、生体内の遺伝子修復系を利用すること

図 2 遺伝子治療における特許関連状況の例

によって染色体上の点変異を直接修復できる技術であり、遺伝子の点変異に起因する遺伝病などに対する遺伝子治療へ積極的な応用が期待される。

さらに、免疫系を活性化する共通配列として CpG が報告¹⁹⁾されており、癌に対する遺伝子治療において応用が検討されている。この系は、従来の“見える癌”に対する効果に加え“見えない癌”に対しても効果が期待されている。

おわりに

以上示してきたように、遺伝子治療分野の研究は臨床応用に向けて大きく前進しつつあるが、わが国の企業がそれを推進するためには、クリアすべき問題点が多く残されているのも事実である。まず使用するベクターの安全性を事前に確認する必要がある。わが国においても、“遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針(薬発第 1062 号)”が公開されているが、現在までにベクターの安全性確認はすべて外国、特に米国の検査機関で実施されてきた。しかし、今後の日本での展開を考えると新規なベクター開発の進展に伴い、安全性検査機関の設立が必要となることも考えられる。

また、ベクターを含む遺伝子治療技術は、ベンチャー企業を中心として発展してきた関係上、その特許関係はきわめて複雑である(図 2)。治療用の遺伝子をはじめ、プロモーター、ベクター、およびその製造法など、関連する特許は数えきれない。これも遺伝子治療の臨床応用に企業が参入しにくい要因の一つとなっている。

昨年、米国ペンシルベニア大における遺伝子治療臨床試験において、患者の死亡事故が報告された²⁰⁾。また、それ以外のいくつかの施設での遺伝子治療臨床試験においてもプロトコル違反が明らかとなり、試験の凍結がなされている。そのような現状から、米国においては遺伝子治療に関して慎重論が示される傾向がある。わが国においては、米国と同じ道を歩まないよう、しっかりとコントロールされた遺伝子治療臨床研究の推進が望まれる。

また、すでに述べたように、時代はポストゲノムへと移行している。ポストゲノム時代は遺伝子機能を解析する時代であり、ベクターはその強力な手段の一つとなりうる。*in vivo* で高い遺伝子導入能を示すベクターの利用は、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスにかわる新規遺伝子の機能解析ツールとして期待を集めており、今後のさらなる展

開が期待される。

文 献

- 1) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB 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) Costantini LC, Jacoby DR, Wang S, Fraefel C, Breakefield XO et al. : Gene transfer to the nigrostriatal system by hybrid herpes simplex virus/adeno-associated virus amplicon vectors. *Hum Gene Ther* 10 : 2481-2494, 1999.
- 3) Recchia A, Parks RJ, Lamartina S, Toniatti C, Pieroni L et al. : Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 2615-2620, 1999.
- 4) Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA : Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol* 73 : 9314-9324, 1999.
- 5) Dunphy EJ, Redman RA, Herweijer H, Cripe TP : Reciprocal enhancement of gene transfer by combinatorial adenovirus transduction and plasmid DNA transfection *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 10 : 2407-2417, 1999.
- 6) Diebold SS, Lehrmann H, Kursu M, Wagner E, Cotten M et al. : Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther* 10 : 775-786, 1999.
- 7) O'riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, Parkes V, Wadsworth SC et al. : PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralization antibody *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 10 : 1349-1358, 1999.
- 8) Wagner E : Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Advan Drug Deliv Rev* 38 : 279-289, 1999.
- 9) Bally MB, Harvie P, Wong FMP, Kong S, Wasan EK et al. : Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Advan Drug Deliv Rev* 38 : 291-315, 1999.
- 10) Gerasimov OV, Boomer JA, Qualls MM, Thompson DH : Cytosolic drug delivery using pH- and Light-sensitive liposomes. *Advan Drug Deliv Rev* 38 : 317-338, 1999.
- 11) Zanta MA, Belguise VP, Behr JP : Gene delivery : a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 91-96, 1999.
- 12) Neves C, Byk G, Scherman D, Wils P : Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. *FEBS Let* 453 : 41-45, 1999.
- 13) Darquet AM, Rangara R, Kreiss P, Schwartz B, Naimi S et al. : Minicircle : an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther* 6 : 209-218, 1999.
- 14) Compton ST, Henning KA, Chen M, Mansoura MK, Ashlock MA : An improved method for routine preparation of intact artificial chromosome DNA (340-1000 kb) for transfection into human cells. *Nucl Acids Res* 27 : 1762-1765, 1999.
- 15) Helin V, Gottikh M, Mishal Z, Subra F, Malvy C et al. : Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotide in cell culture. *Biochem Pharma* 58 : 95-107, 1999.
- 16) Becker K, Pan D, Whitley CB : Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther* 10 : 2559-2566, 1999.
- 17) Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE et al. : Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 : 806-811, 1998.
- 18) Bandyopadhyay P, Ma X, Stieers CL, Kren BT, Steer CJ : Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. *J Biol Chem* 274 : 10163-10172, 1999.
- 19) Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang L : The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression *in vivo*. *Hum Gene Ther* 10 : 2153-2161, 1999.
- 20) Marshall E : Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286 : 2244-2245, 1999.