

Tada T, Nguyen JB, Hitoshi Y, Watson NP, Dunn JF, Ohara S, Nagano S, Kosai K, Israel MA	Diffuse Encephaloventriculitis and Substantial Leukoencephalopathy after Intraventricular Administration of Recombinant Adenovirus (共同研究の出版中の論文のため今回製本には加えず参考として記載)	<i>Neurol Res</i>		<i>In press</i>	2005
Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H	Postinfarction gene therapy against transforming growth factor- β signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure (共同研究の出版中の論文のため今回製本には加えず参考として記載)	<i>Circulation</i>		<i>In press</i>	2005

研究成果の刊行物・別冊

(収載論文 13冊)

①

特集◎骨転移の診断と最新治療

遺伝子治療

Gene therapy

永野 聡
Satoshi Nagano

小宮 節郎
Setsuro Komiya

小財健一郎
Ken-ichiro Kosai

「骨・関節・靭帯」第17巻第4号 別刷

(2004年4月)

アークメディア

遺伝子治療

Gene therapy

永野 聡*** 小宮 節郎* 小財健一郎**
Satoshi Nagano Setsuro Komiya Ken-ichiro Kosai

はじめに

近年、集学的治療の進歩により、多くの種類の癌患者において生存率の向上がみられている。他方、多臓器への遠隔転移をきたした症例においては、効果的な治療はいまだ困難であるため、予後不良な場合が多い。中でも骨は多くの癌において、最も転移が起こりやすい臓器である。また一方、骨転移をきたす癌で最も多いのは乳癌、前立腺癌などであるが、これらの癌の原発巣自体に対しては根治的な治療が得られることが多い。つまり、いかに骨転移を治療するかが患者の予後およびQOLを左右することになる。また、多発性の骨転移を併発した症例では、手術や化学療

法などでの根治が困難である場合が多く、画期的な新しい治療法の開発が切望されている。遺伝子治療はその最有力候補の1つであり、筆者らは他の種々の癌に対する遺伝子治療研究の経験をもとにして、最近、遠隔転移を伴う骨腫瘍に対する遺伝子治療の研究を行っている。さらに、骨組織を含む臓器・腫瘍特異的遺伝子治療を目指し、増殖制御型アデノウイルスベクター (Conditionally-replicative adenoviral vector; CRA) の開発に取り組んでいる。本稿では、現在までの遺伝子治療研究の成果・問題点を踏まえて、筆者らの研究成果を示しながら、転移性骨腫瘍に対する遺伝子治療の戦略について述べる。

I. 遺伝子治療研究の歴史

1980年代に、レトロウイルスベクター (RV) をはじめとした種々のベクターの開発、遺伝子導入技術に伴い、遺伝子治療研究が急速に進歩した。さらに遺伝子導入技術の基盤が整った1990年代には米国を中心に臨床研究が飛躍的に進み、現在ではすでに600を超える臨床試験プロトコルが登録されており、延べ4,000人以上の患者が遺伝子治療の臨床試験を受けている¹⁾。特徴的なのは、その中の63%が悪性腫瘍に対する遺伝子治療

Key words ▶

- 遺伝子治療 (gene therapy)
- アデノウイルスベクター (adenoviral vector)
- 免疫遺伝子治療 (immunological gene therapy)
- コンビネーション遺伝子治療 (combination gene therapy)
- 増殖制御型アデノウイルスベクター (conditionally-replicative adenoviral vector)

*鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学
専攻運動機能修復学講座 整形外科学
(〒890-0215 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1)

**久留米大学高次脳疾患研究所, 遺伝子治療再生医学部門

という点である。これは、高い遺伝子導入効率に加え、導入遺伝子の長期の発現が要求される先天疾患への遺伝子治療とは異なり、癌への遺伝子治療に最低限必要なのは「*in vivo*投与で高率な遺伝子導入」という条件であるため、アデノウイルスベクター(ADV)などの開発により一応はその条件が満たされたということが、その一因であろう。次項では、現在使われている主なベクターについてその概略を述べる。

II. 遺伝子導入法

遺伝子導入に用いるベクターは、安全性のためにベクターが増殖しないように改変された非増殖型ベクターと、目的とする細胞のみで増殖するように改変した増殖型ベクターに大別できる。現時点ですべての条件を備えたベクターは存在せず、表1に示したようなそれぞれの長所と短所を理解したうえで目的に応じて使い分ける必要がある。

現存する非増殖型ベクターの中で、多くの癌に最も高い*in vivo*での遺伝子導入効率を持ち、有用であるのはADVであり、ADVは骨組織においても十分な遺伝子導入を可能とすることが報告されている²⁾。また唯一問題となる免疫原性に関しても癌細胞死を誘導するという目的にはさほど不利とならないため、癌一般および骨腫瘍に対する遺伝子治療研究において最も有用なベクターであると考えられる。

III. 転移性骨腫瘍に対する遺伝子治療

種々の癌に対してさまざまなアプローチによる遺伝子治療法が報告されているが、純粹に転移性骨腫瘍のみを標的とした遺伝子治療の研究報告はほとんどないのが現状である。

よって現時点で転移性骨腫瘍に対して応用できるのは、原発性の癌に対する治療法を発展させたものが中心となる(表2)。主な戦略としては、癌細胞死を誘導する遺伝子を導入する方法、浸潤・転移能にかかわる遺伝子を抑制する方法、宿主の腫瘍に対する免疫を活性化・増強する方法、薬剤耐性遺伝子を用いて正常細胞を保護する方法などがあげられる。以下、筆者らの研究結果も交えながら、転移性骨腫瘍に対する遺伝子治療の主な戦略についてその特徴を述べていく。

1. 癌細胞死を誘導する遺伝子を導入する方法

この戦略に含まれるのは、骨転移を起こした乳癌や前立腺癌の癌細胞にアポトーシスや細胞周期関連の遺伝子を直接導入する方法であり、種々の癌に応用可能な戦略である。しかしこれらの戦略において認識しておくべき最も重要な問題は、治療遺伝子が細胞内分子である場合は、注入されたベクターが物理的に到達しうる領域の癌にしか治療遺伝子が導入されず、そのため遺伝子が導入されない癌細胞が必ず存在するということである。現時点で最も遺伝子導入効率のよいADVを使っても、これらのベクターが安全性のために感染後に増殖しないように組み換えられたものである以上、物理的にベクターが到達しえない領域には当然遺伝子が導入されない(表1)。つまり、この群の方法はこうして生じる遺伝子非導入の癌細胞からの再発という問題に対して、何らかの対抗策が必要となる。

この群のアプローチの中でこの問題へ対応可能なのは、強力なバイスタンダー効果を持つ自殺遺伝子治療である。代表的なHSV-tk/GCV療法は、癌細胞にHSV-tk遺伝子を導入した後、ガンシクロビル(GCV)を投与す

表1 主なベクターの種類と特徴

	長 所	短 所 (問題点)	
非増殖型ベクター	アデノウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・非分裂細胞にも遺伝子導入可能 ・高い in vivo 遺伝子導入効率 	<ul style="list-style-type: none"> ・抗原性が高い
	レトロウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・導入遺伝子は染色体に組み込まれるため発現が長期持続する 	<ul style="list-style-type: none"> ・非分裂細胞には遺伝子導入できない ・ランダムな染色体への組み込みによる副作用 (?)
	アデノ随伴ウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒトに対する病原性がない (?) 	<ul style="list-style-type: none"> ・4.5kb以上の遺伝子は挿入できない ・ベクターの調製が煩雑
	ヘルペスウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・最大50kbの遺伝子を組み込める ・神経細胞への親和性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞毒性がある ・導入遺伝子は染色体外にあり長期の遺伝子発現は困難
	レンチウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・非分裂細胞にも遺伝子導入可能 ・導入遺伝子は染色体に組み込まれるため発現が長期持続する 	<ul style="list-style-type: none"> ・HIV自体の安全性への不安 ・ランダムな染色体への組み込みによる副作用 (?)
	非ウイルスベクター (HVJリポソームなど)	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞毒性が低い (?) 	<ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子導入効率・発現の持続性ともに不十分
	アデノウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・癌細胞で優位に増殖して、より多くの癌細胞に遺伝子を導入する 	<ul style="list-style-type: none"> ・癌細胞のみを特異的に標的化する戦略が確立していない
	レトロウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・分裂細胞に感染・増殖して、より多くの癌細胞に遺伝子を導入する 	<ul style="list-style-type: none"> ・増殖したベクターの導入遺伝子が染色体に組み込まれることによる副作用 (?) ・発癌の危険性
	ヘルペスウイルスベクター	<ul style="list-style-type: none"> ・GCVなどの抗ウイルス剤で増殖するウイルスをコントロールできる 	<ul style="list-style-type: none"> ・癌細胞のみを特異的に標的化する戦略が確立していない
	増殖型ベクター		

表2 骨転移(および骨転移を起こす原発性の癌)に対する遺伝子治療の基礎研究の現在までの戦略

(1) 癌細胞死を誘導する遺伝子を導入する方法	
細胞周期関連遺伝子	p27, p16, p21
アポトーシス誘導遺伝子	p53, Caspase, Fas
癌細胞シグナル遺伝子	アンチセンス c-myc, c-fos
自殺遺伝子	HSV-tk, cytosine deaminase
(2) 免疫遺伝子治療	
サイトカイン遺伝子	IL-2, IL-12, Interferon- β , GM-CSF
costimulatory molecule 遺伝子	B7-1
(3) 骨髄細胞に抗癌剤耐性遺伝子を導入して効果的な化学療法を行う方法	
薬剤耐性遺伝子	MDR-1
(4) 増殖型ウイルスベクターを用いた方法	
ベクターの増殖による細胞融解	増殖型アデノウイルスベクター

ると、癌細胞内で発現したHSV-tkが元来は無毒のGCVを細胞毒性のあるリン酸化型にして癌細胞の“自殺”を誘導するという方法である。筆者らは当初より種々の癌でその有効性を示しており³⁻⁶⁾、骨芽細胞由来の腫瘍にも著明な治療効果を認めた(筆者ら未発表データ)。この方法の最大の利点は、非遺伝子導入癌細胞にも細胞死を誘導できるというバイスタンダー効果が強力(癌によっては数%の癌細胞に遺伝子導入できれば結節内の多くの癌細胞が細胞死に陥る)なことであり、このため、前述した問題がある程度克服できることが示されている。筆者らも種々の癌の動物モデルでの検討で、強力な腫瘍縮小効果を認めており^{3,4)}、最近、自殺遺伝子治療における臨床像を反映した同所性癌モデル動物における真の臨床的有用性や問題点⁵⁾、また最大の治療効果を得るための「自殺遺伝子の至適発現レベルの必要性」⁶⁾を発見し、報告している。また、骨組織を標的として自殺遺伝子を発現させることを目的としたオステオカルシン(OC)プロモーターを用いた自殺遺

伝子治療の報告もあり、米国では前立腺癌患者に対する臨床試験も行われている⁷⁾。しかし多発性に転移した癌の根治を目指すには、他の戦略とのコンビネーションが必要であろう。

2. 免疫遺伝子治療

この戦略では、サイトカイン遺伝子治療と、腫瘍細胞上にB7-1などのco-stimulatory moleculeを発現させる方法がある。サイトカイン遺伝子治療は、腫瘍局所でサイトカイン遺伝子を発現させることにより抗腫瘍免疫を誘導し、賦活化された免疫細胞が、遺伝子が導入されていない癌細胞も含めて殺すため、これらの遺伝子非導入癌細胞にも治療効果が期待できる方法である。

筆者らは、Interleukin-2(IL-2)やIL-12を用いた遺伝子治療が、T細胞をはじめ、NK細胞、Lymphokine-activated killer(LAK)細胞の増殖・活性化などを介して抗腫瘍免疫を誘導し治療効果を示すことを報告している^{8,9)}。しかし一方、リコンビナントIL-2蛋白の全身投与療法では、骨腫瘍を含む多くの

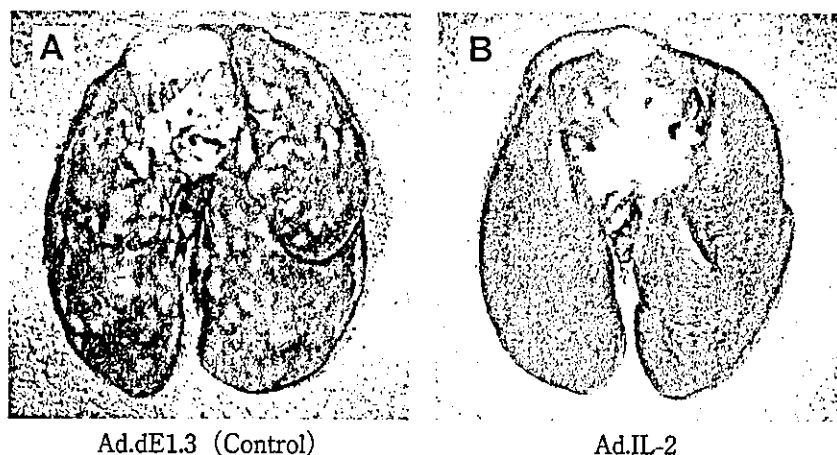


図1 IL-2遺伝子治療による骨肉腫肺転移の抑制

癌への臨床応用で期待した成果を示さなかった¹⁰⁾。この理由として、IL-2蛋白は半減期が短いこと(生体内で数分)、多量に投与しても全身の副作用をもたらす一方で、肝心の腫瘍局所では治療有効濃度が得られなかったことがあげられる。これに対して遺伝子治療は、腫瘍局所での持続的なサイトカイン分泌により、腫瘍局所での有効濃度が獲得され、しかも全身へ循環するサイトカイン(副作用)が抑制されるというメリットを持つため、リコンビナント蛋白療法の問題が解決できるわけである。

筆者らは最近、さらに臨床的に有用な方法を開発する目的で、以下のような実験系で、骨肉腫の遠隔転移に対するIL-2遺伝子治療の検討を行った¹¹⁾。まず敢えてADVでの遺伝子導入効率が極端に低いマウス骨肉腫(*in vivo*投与で腫瘍細胞自体には1%前後にしか遺伝子導入できず、また自殺遺伝子治療では全く治療効果を示さなかった)を用いて皮下原発巣および肺転移巣をもつモデルマウスを作製し、「原発腫瘍部にのみ」種々の量のIL-2発現ADVを1回だけ注入した。この結果、至適量を用いた場合には、原発腫瘍に著明な増殖抑制効果がみられただけでなく、直接治

療しなかった肺の多発性転移巣も肉眼的に認識できないほど強力に抑制された(図1)。つまり筆者らは「サイトカイン遺伝子の至適発現レベル」の必要性を発見するとともに、以下の3つの大きな利点を持つ遺伝子治療法を確立した。①原発巣のみへの1回のADV注入という簡便かつ非侵襲的な方法で、原発巣の縮小だけでなく、既存の治療法では対処できず、真の治療ターゲットである遠隔転移の抑制が可能である。②細胞内分子の遺伝子導入で問題となった、腫瘍自身への高い遺伝子導入効率は全く必要としない(結果として腫瘍周囲の結合組織へ遺伝子導入されることよい)ので、臨床的により一般化できるものである。③IL-2の血中濃度を測定することで、最大効果を示す至適な発現量をモニターでき、また副作用も防止できる。このように非常に簡便で非侵襲的、低コストながら転移抑制にも強力な治療効果を示す本法のコンセプトは、種々の癌の骨転移へも一般化できる治療法であり、その臨床応用が期待されるものである。

3. コンビネーション遺伝子治療

前述した方法はそれぞれ利点を持つ一方、自殺遺伝子治療のみでは遠隔転移巣の治療は

難しく、また大きな腫瘍塊をサイトカイン遺伝子治療により誘導された免疫細胞だけで殺すというのは非効率的であろう。これをさらに解決するため、筆者らは、自殺遺伝子とサイトカイン遺伝子を *in vivo* で同時に導入するコンビネーション遺伝子治療法を開発している^{12,13)}。これは単に異なる2つの遺伝子を導入したというのではなく、HSV-tkにより大部分の癌細胞を細胞死に陥らせることで同時にマクロファージに癌抗原を貪食・提示させることが可能となり、さらにその状態でサイトカインを分泌させることで細胞性免疫を中心とした特異的な抗腫瘍免疫を効率よく相乗的に誘導することができた。そして全身性の特異的抗腫瘍免疫により、遺伝子非導入の癌細胞も含めて残った微小癌をほぼ殺してしまうというものである。種々の癌でその効果を実証し、一部の癌では米国で臨床応用も行われている。多発性の骨転移巣を持つ種々の癌に対しても、前述した自殺遺伝子治療、サイトカイン遺伝子治療をさらに発展させた本法は、より高い治療効果が期待できるものと思われる。

4. 癌の浸潤・転移能にかかわる遺伝子を抑制する方法

Matrix metalloproteinase (MMP) は骨転移を含む癌の浸潤・転移に重要な役割を果たしており、MMP活性の阻害は癌に対する治療法として期待された。しかし、種々のMMPのinhibitorの臨床試験では期待したほどの結果が得られなかった^{14,15)}。これは、研究デザインや対象とした癌の進行度が不適切であったこと、阻害の選択性が不十分だったことなどが原因とされている¹⁵⁾。

筆者らは最近、細胞の遊走能にかかわるsmall GTPaseであるRhoCの強発現が転移を

促進し、さらにRhoCを阻害する遺伝子治療により、転移の抑制が可能であることを臨床を反映するモデルにおいて示した¹⁶⁾。また興味深いことにRhoCの強発現は原発巣の細胞増殖や細胞死には何ら影響を与えず、細胞の運動性と浸潤能のみを亢進した。特にその分子メカニズムとして従来いわれていたアクチンを介する運動能の亢進だけでなく、RhoCがMMPの発現も、活性も上昇させることを初めて明らかにした。RhoCは種々の癌で強く発現していることが報告されているため、骨転移においてもRhoCをターゲットとした新しい遺伝子治療法の開発も期待できると思われる。

5. 腫瘍特異的遺伝子治療を目指した増殖制御型ADVの開発

前述のような非増殖型ADVを用いた骨腫瘍に対する遺伝子治療は、臨床応用でも治療効果が期待できるものと思われる。しかし一方、癌の根治を目指す真の癌遺伝子治療の開発には、現在の癌遺伝子治療の根幹の問題である「*in vivo* 投与ですべての癌細胞に遺伝子をもれなく導入するベクターが現在は存在しない」ということを克服する、新たなベクターの開発が必要である。その1つの戦略が、癌特異的に増殖するCRAの開発である。これまでに骨腫瘍を標的とした、OCプロモーターを用いたCRA¹⁷⁾を含め、種々のCRAが報告されているが、それらには根本的な問題点もある。それは、今までは1つのCRAの組み換え、作製にかなりの時間と労力を要し、ある1つの因子で癌を特異化して増殖するベクターを作製しては、そのつど解析するという研究がなされているため、いまだ決定的な増殖型ベクターが確立されていない点である。筆者らは、このように癌を特異標的化す

るためには系統的な解析が必要と考え、腫瘍特異的なCRAを迅速、確実かつ簡便に作製できるオリジナルの作製システムを開発した(投稿準備中)。この新規CRA作製法を用いれば多種の腫瘍・組織特異的因子をスクリーニング的に増殖制御型ADVに組み込むことができ、作製・解析にかかる時間が大幅に短縮される。つまり種々のADVを比較検討して正常細胞では全く増殖せず、対象とする癌で最も特異的に増殖するADVを決定することが可能となる。

すでに筆者らは種々の組織・癌特異的プロモーターや、アデノウイルス遺伝子(E1A, E1B)の改変など多数の因子によってウイルス増殖を制御されたCRA(m-CRA)を作製した。これらのm-CRAの癌細胞特異的な増殖能、細胞死誘導能を、簡便で迅速な機能解析法を用いて評価している(投稿準備中)。骨転移に対しては、骨組織をターゲットとした因子と、癌をターゲットした因子を組み合わせたm-CRAを作製すれば、正常骨組織ではウイルス増殖が起こらず、骨転移巣の癌細胞でのみウイルス増殖が起こると期待される。将来的にこれらのベクターを1回腫瘍内に投与するだけで、全身の骨に多発転移した微小癌細胞をベクター自身が認識して、そのすべてにもれなく遺伝子を導入していくことが可能となれば、遺伝子治療による多発性の転移性骨腫瘍に対して大きな治療効果が期待できると考えられる。

IV. 今後の展望

遺伝子治療研究は、日本でもいくつかの臨床試験が開始されているように、創成期から発展期ともいべき第2段階に入ったともいえよう。しかし現在の癌遺伝子治療の臨床試

験における最大の問題というよりこのような基礎研究一般の成果がトランスレーショナルリサーチとして実際に臨床で評価されるようになって初めて分かったことは、単純な動物実験で示された劇的な治療効果が実際の臨床試験では再現できず、当初期待された成果が実際には得られていないことである。これは、このような重要な本質的な問題を認識することなく、安直な動物モデル、実験系で劇的な現象のみを示した基礎研究結果をもとに、臨床応用が拙速に進められた例が少なくないからかもしれない。転移性骨腫瘍に対する遺伝子治療も他の癌と同様、新たなベクターの開発を中心とした基礎研究が基盤となるのはいうまでもないが、常に臨床応用を念頭に置き、疾患の臨床像を反映する動物モデルによる詳細な解析も同時に行っていくことが、今後さらに重要になっていくものと考えられる。

文 献

- 1) <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
- 2) Mehrara BJ, Saadeh PB, Steinbrech DS et al : Adenovirus-mediated gene therapy of osteoblasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 14 : 1290-1301, 1999
- 3) Kwong YL, Chen SH, Kosai K et al : Adenoviral-mediated suicide gene therapy for hepatic metastases of breast cancer. *Cancer Gene Ther* 3 : 339-344, 1996
- 4) Block A, Chen SH, Kosai K et al : Adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer: regression of hepatic metastasis of pancreatic tumors. *Pancreas* 15 : 25-34, 1997
- 5) Fukunaga M, Takamori S, Hayashi A et al : Adenoviral herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in an orthotopic lung cancer model. *Ann Thorac Surg* 73 : 1740-1746, 2002
- 6) Terazaki Y, Yano S, Yuge K et al : An optimal therapeutic expression level is crucial for suicide gene therapy for hepatic metastatic cancer in mice. *Hepatology* 37 : 155-163, 2003
- 7) Koeneman KS, Hsieh JT : The prospect of gene

- therapy for prostate cancer: update on theory and status. *Curr Opin Urol* 11 : 489-494, 2001
- 8) Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL et al : Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 11302-11306, 1996
 - 9) Huang H, Chen SH, Kosai K et al : Gene therapy for hepatocellular carcinoma: long-term remission of primary and metastatic tumors in mice by interleukin-2 gene therapy in vivo. *Gene Ther* 3 : 980-987, 1996
 - 10) Bauer M, Reaman GH, Hank JA et al : A phase II trial of human recombinant interleukin-2 administered as a 4-day continuous infusion for children with refractory neuroblastoma, non-Hodgkin's lymphoma, sarcoma, renal cell carcinoma, and malignant melanoma. A Childrens Cancer Group study. *Cancer* 75 : 2959-2965, 1995
 - 11) Nagano S, Yuge K, Fukunaga M et al : Gene therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only: Novel concepts for successful cytokine gene therapy. *Int J Oncol* 24 : 549-558, 2004
 - 12) Chen SH, Chen XH, Wang Y et al : Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 2577-2581, 1995
 - 13) Chen SH, Kosai K, Xu B et al : Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 56 : 3758-3762, 1996
 - 14) Freije JM, Balbin M, Pendas AM et al : Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 532 : 91-107, 2003
 - 15) Ramnath N, Creaven PJ : Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep* 6 : 96-102, 2004
 - 16) Ikoma T, Takahashi T, Nagano S et al : A Definitive Role of RhoC in Metastasis of Orthotopic Lung Cancer in Mice. *Clin Cancer Res* 10 : 1192-1200, 2004
 - 17) Matsubara S, Wada Y, Gardner TA et al : A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 61 : 6012-6019, 2001

*

*

*

2

遺伝子治療と再生医学

久留米大学高次脳疾患研究所

小 財 健 一 郎

久留米医学会雑誌 第67巻 第5・6号 別冊

平成16年6月25日発行

The Journal of the Kurume Medical Association

Vol. 67 No. 5・6, P.175~180, June 2004

—教授就任講演—

第58回久留米医学会総会・平成16年4月23日・筑水会館において

遺伝子治療と再生医学

久留米大学教授

小 財 健 一 郎



略 歴

昭和37年9月14日 熊本県球磨郡に生まれる
昭和63年3月 久留米大学医学部卒業
昭和63年4月 久留米大学医学部小児科学講座入局
平成2年4月 久留米大学医学部病理学第一講座入局
平成4年3月 久留米大学大学院医学研究科博士課程（病理系専攻）
修了，医学博士号取得
平成4年4月 久留米大学医学部病理学第一講座助手
平成5年3月 米国ペイラー医科大学病理学教室へ留学
Visiting Assistant Professor
平成8年7月 大阪大学医学部バイオメディカルセンター腫瘍生化学教室
平成9年11月 久留米大学先端癌治療研究センター細胞発生工学部門
平成12年11月 岐阜大学医学部循環器再生医科学講座（平成14年5月
より遺伝子治療再生医科学講座へ講座名称変更）助教授
平成15年5月 久留米大学高次脳疾患研究所（遺伝子治療再生医学部門）
教授（同大小児科学講座，ならびに岐阜大学医学部特別
協力研究員を兼任）
現在に至る

研究分野

- 遺伝子治療（ベクター開発，癌ならびに難治性疾患への応用技術開発）
- 再生医学（特にES細胞を用いた発生・再生医学研究）
- ニューロサイエンス

遺伝子治療と再生医学

久留米大学高次脳疾患研究所

小 財 健 一 郎

はじめに

21世紀の先端医療として、遺伝子治療と再生医療の開発が期待されている。本稿では、我々のこれまでの遺伝子治療研究、最近の再生医学研究での成果を中心に、これらの研究開発と臨床応用の現状、ならびに将来への展望を述べる。

1. 遺伝子治療

1) コンビネーション癌遺伝子治療

近年の診断技術、治療技術の進歩により多くの癌で治療成績の向上がみられる一方、癌は依然として我が国ならびに先進諸国の三大死因の一つである。特に、浸潤や転移を併発した癌症例では既存の治療法では完全には対処できない場合が多く、画期的な新しい治療法の開発が切望されており、遺伝子治療はその最有力候補の一つである。アデノウイルスベクター (ADV) の開発が一部の施設でのみ可能となり、遺伝子治療の本格的な研究が世界的に始まり出した1990年代初頭に、我々は世界に先駆けADVを用いたコンビネーション遺伝子治療法を開発した¹⁾²⁾ (図1)。これは、強力な癌細胞死誘導効果を持つ自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子と、種々のサイトカイン遺伝子を同時にADVで *in vivo* 遺伝子導入 (癌結節に直接注射) するという画期的な治療法である。

まず、HSV-tk/GCV 遺伝子治療の原理は、癌細胞に HSV-tk 遺伝子を導入した後、ガンシクロビル (GCV; 抗ヘルペスウイルス剤として臨床でも安全に使用されているゾビラックスなど) を全身投与 (人の臨床応用では静脈投与でいい) すると、癌細胞内で発現した HSV-tk が元来は

無毒のGCVを細胞毒性のあるリン酸化型にして癌細胞の“自殺”を誘導するという方法である。この方法の最大の利点は、遺伝子未導入の癌細胞にも細胞死を誘導できるというバイスタンダー効果が強力 (癌によっては数%の癌細胞に遺伝子導入できれば結節内の多くの癌細胞が細胞死に陥る) なこと、その一方で癌細胞に比較的特異的に作用するため安全性が高いこと (細胞死誘導メカニズムがDNA複製阻害であるため、細胞分裂が盛んな癌細胞を優位に殺し、細胞分裂をしていない正常組織へ間違っても遺伝子導入されても副作用は少ない) である。我々は種々の癌動物モデルで強力な腫瘍縮小効果を示すとともに³⁾⁴⁾、さらに臨床応用での成功のためにはHSV-tk 遺伝子の至適発現レベルの必要なことも発見している⁵⁾⁶⁾。

一方、サイトカイン遺伝子治療というのは、腫瘍局所でサイトカイン遺伝子を持続的に発現、分泌させることにより抗腫瘍免疫を誘導するというものである。Interleukin-2 (IL-2) や IL-12 を用いた遺伝子治療は、T細胞をはじめ、NK細胞、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の増殖・活性化が可能であり、抗腫瘍免疫を効率良く誘導できる⁷⁾⁸⁾。また我々は最近、サイトカイン遺伝子治療が最大の治療効果 (副作用抑制という意味だけでなく最大の抗腫瘍免疫誘導効果を得るという点で新事実) を示すには、サイトカイン至適治療濃度が必要で (多量では脾への副作用が生じる)、その有効域は比較的小さいという、臨床応用を成功させるために重要な新事実を発見している⁹⁾。

そしてさらに前述のように、HSV-tk 自殺遺伝子とサイトカイン遺伝子を *in vivo* で同時に導入

するコンビネーション遺伝子治療法を開発したものである¹⁾²⁾ (図1)。これは単に異なる2つの遺伝子を導入したというのではなく、HSV-tkにより大部分の癌細胞を細胞死に陥らせ、同時にマクロファージに癌抗原を貪食・提示させ、その状態でサイトカインを分泌させることで細胞性免疫を中心とした特異的な抗腫瘍免疫を効率よく相乗的に誘導することが可能となり、遺伝子未導入の癌細胞も含めて残った微少癌の大部分を殺してしまうというものである。種々の癌でその効果を実証し、一部の癌では米国で共同開発者らにより臨床応用も行われている。

2) 癌特異的増殖制御型 ADV の開発

我々は近年、さらなる癌の根治を目指す真の癌遺伝子治療の開発には、現在の癌遺伝子治療の根幹の問題である「遺伝子非導入癌細胞からの再発」ということを克服する、新たなベクターの開発が必要と考え、基礎研究面より独自のベクター開発に取り組んできた。その一つの戦略は癌細胞特異的増殖型ウイルスベクターの開発である。つまり現在の遺伝子導入ベクターは安全性の確保のために、遺伝子を導入する能力は保持する一方、ウイルスの増殖自体はおこらない非増殖型の組み換えウイルスである。これは確かに安全である反面、液体が到達しえない癌細胞には当然遺伝子が導入されないため、遺伝子未導入癌細胞からの癌の再

発の可能性が最大の問題である。この克服のために我々は前述のようなコンビネーション遺伝子治療法を開発したのだが、さらに癌細胞「特異的」に「全て」の癌細胞に遺伝子が導入できれば、全身性の転移、浸潤癌まで治療できる可能性もでてくる。つまり正常細胞に感染した場合にはウイルスは増殖しないが、癌細胞に感染した場合には癌細胞内で旺盛にウイルスが増殖して癌細胞を殺しては次の癌細胞に感染していく、そして最終的には体中の隠れた癌細胞をみつけてこのウイルスが殺していくてくれることを目指すものである。この研究領域は、現在の癌遺伝子治療戦略において最も有望なものと考えられ、世界中で激しい基礎研究、開発競争が進められているが、現在までの方法では一つの増殖型ADVの組み替え、作製にかなりの時間と労力を要するため、未だ決定的な増殖型ベクターは確立されていない。最近我々は、腫瘍特異的な増殖制御型ADVを迅速、確実かつ簡便に作製できるオリジナルの作製システムを開発することに成功し、現在この方法を用い種々の増殖制御型ADVを作成し、解析し、その可能性を調べているところである。

3) その他の遺伝子治療

本稿ではスペースの関係上、癌への遺伝子治療に関してのみ述べたが、先天性疾患には遺伝子治療が唯一の根治療法となる可能性があるものであ

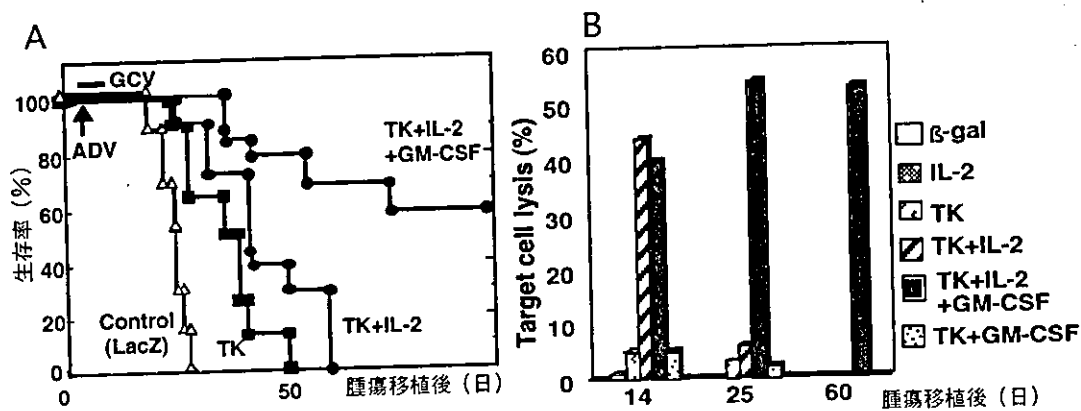


図1 ADVによる *in vivo* コンビネーション遺伝子治療 (マウス実験例)。自殺遺伝子 (HSV-tk)、サイトカイン遺伝子 (IL-2, GM-CSF; granulocyte macrophage-colony stimulating factor) のコンビネーション遺伝子治療により、原発巣の腫瘍縮小だけでなく、抗腫瘍免疫 (細胞性免疫) の効率よい長期間の誘導により (B)、転移巣も除去されることで、生存率が著明に向上する (A)。 (文献1, 2より)

り、実際、近年一部の疾患では非常に有望な結果がでている。また現在の遺伝子治療というのは、「遺伝子を治療する」のではなく、「遺伝子を道具として使う治療法」であるため、癌や先天性疾患にかぎらずそのアイデア次第でほとんどの疾患へ応用できる可能性を持つものであり、実際我々も種々の難治性疾患への独自の遺伝子治療法を開発している¹⁰⁾。

いずれに應用するにせよ、遺伝子治療研究の根幹となる基盤技術は、遺伝子導入ベクターの開発である。我々も、前述の癌治療のための癌特異的増殖制御型 ADV だけでなく、他の疾患へも、レトロウイルス、ADV、キメラウイルス、レンチウイルス、非ウイルスベクターなど、種々の遺伝子導入ベクター、そして遺伝子導入法の開発も合わせて行っている¹¹⁾。

2. 再生医学

1) *in vivo* 再生療法

遺伝子治療は、1990年代に新しい治療法として本格的な研究が始まったわけであるが、再生医学はこの数年前より本格的な研究が始まったものであり、将来の先端医療として、遺伝子治療と同様にその開発に多大な期待がよせられている。

再生医学といっても様々なアプローチがあるが、大きく二つに分類されるものである。第一の再生医療は、ある物質や遺伝子を体内に投与することにより、元来持っている生体の再生能力を劇的に賦活化し、病気を治療するというものであり、このような戦略を本稿では *in vivo* 再生療法と呼ぶことにする。我々が開発した HGF (肝細胞増殖因子) による劇症肝炎の治療は、この *in vivo* 再生療法の代表的なものである¹²⁾¹³⁾ (図2)。これは、ヒトよりはるかに激烈な (エンドトキシン投与して6-7時以内に全ての肝細胞がアポトーシスに陥り全マウスが死亡する) 劇症肝炎のマウスモデルで、肝再生の本体の因子である HGF の組み替え蛋白を投与するだけで、強力に肝細胞死は抑制され劇的に (Fas モデルで 20% から 100% へ、エンドトキシンモデルで 0% から約 80% へ) 生存率が上昇し、さらに肝臓は急速に治っていく (再生していく) という治療法である¹¹⁾⁻¹³⁾。このように、何らかの再生誘導因子を投与することで、病気が治り同時に臓器が再生していくような *in vivo* 再生療法は臨床への応用という観点からも理想的であるが、ただこれが最大に有効となるのは、生後もある程度再生能力を保持している血球、皮膚、肝臓などの臓器である。すなわち、生後は

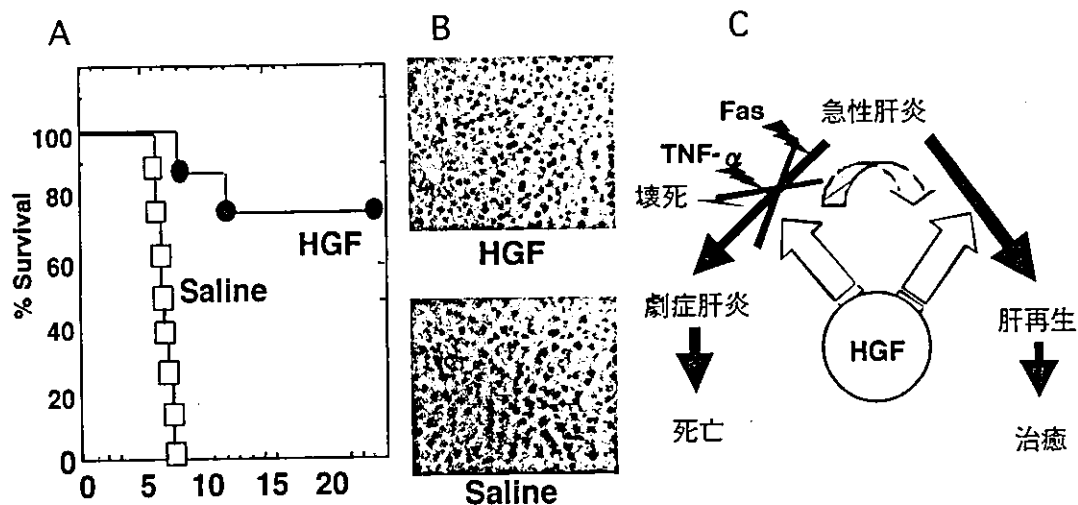


図2 HGF 投与による劇症肝炎の治療 (*in vivo* 再生療法; マウス実験例)。A. エンドトキシン投与により全肝細胞が急速に細胞死に陥り、7時間以内に全マウスが劇症肝炎で死亡する。組み替え HGF の投与により細胞死は強力に阻止され、肝再生も誘導され (B 図; BrdU により再生肝細胞が標識)、劇症肝炎の進展は阻止され効果的に治療される。C. 治療と再生をかねた理想の再生医療である。(文献 11, 12, 13)

旺盛な再生能力が失われている心臓、脳神経などの臓器では、なかなかこのような再生療法のみで治療することは難しいと想像される。実際我々は最近、HGF 遺伝子治療で心筋梗塞のリモデリングが著明に改善できることも示しており、これは確かに有効な治療法であるのだが、ただこれのみで心筋梗塞が根治できるわけではない¹⁰⁾。つまり、心疾患や脳神経疾患、あるいはその他多くの臓器の疾患には、第二の再生医療の開発も必要と考えられるわけである。

2) 再建療法

第二の再生療法は、第一の再生療法と区別するために、本稿では「再建療法」と呼ぶことにする。これはつまり体外で何らかの細胞から目的の細胞や組織を誘導して創造し、それを細胞(組織)移植して、障害部位を新たに再建するというものである。その源となる細胞として幾つか候補があるわけだが、我々は最も根源的なES(胚性幹)細胞を用いており、ES細胞による発生学的基礎研究と再生医学研究を中心にすすめている。まず心筋細胞の研究に取り組み、胚様体形成法(三葉形成を体外で模倣する方法)にFibroblast growth factor-2, Bone morphogenetic protein-2を至適濃度で至適のタイミングで加えることで、マウスES細胞から心筋細胞を効率良く創ることに成功した¹⁴⁾。また最近、ある細胞と共培養することで胚様体形成法を用いずに効率よく心筋細胞をES細胞から創れることを見いだしている(胚様体法以外での心筋細胞誘導法の報告はない)。また一方、これらの技術を将来の細胞移植療法へ応用するためにさらに重要となるのは、ES細胞から分化した目的細胞のみを生存下で確実に識別し高純度で単離、精製する技術の開発である。我々もこの研究に取り組み、今まで培ってきた遺伝子導入、発現調節技術を基盤とした非常に有用な新しいバイオテクノロジーを開発した。さらに我々は、このようなマウスES細胞での成果を踏まえ、ヒトES細胞を使用する研究を2年前に計画した。そしてこれは昨年の文部科学省の専門委員会でも認可を受け、現在はヒトES細胞を使った研究も精力的に進めている。ES細胞による再生(再建)医学が臨床の現場に応用できるようになるためには、まだまだ解決すべき課題が数多くあるが、将来この方法が確立できれば、移植医療におけるド

ナー不足の問題が解消され、画期的な治療法となる可能性が大きいと、さらなる研究の発展が期待されるものである。

3) 臨床で応用されている再生医療

既に臨床の現場で応用されている再生医療として、骨髄細胞移植療法がある。これは骨髄細胞が他の臓器に分化しているのか(つまり骨髄細胞が心筋細胞になるなど)、あるいは融合しているのか、その科学的メカニズムには議論が多いものであるが、現象論としては一部の疾患では臨床応用でも明らかに有効な作用が確認されているようである。さらなる臨床面での有用性という観点から、より発展させた以下のような方法も、我々の共同研究者が開発している¹⁵⁾。つまり、Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF; この組み替え蛋白は血液疾患の治療には臨床でも既に用いられている実績がある)を投与することにより、体内の骨髄幹細胞が増えて自動的に患部に集まり、失われた組織に置き換わるという治療法であり、「骨髄採取→患部への移植」という医療行為すら必要としないものである。もちろんこの治療法のみで病気が完治するというのは難しいであろうし、科学的には不明な点が多いながらも、心筋梗塞などでは既に臨床でも応用されているものであり、「薬で心筋梗塞が(幾らかでも)治る」というのは臨床的な観点からは大きな意義があろう。今後このように再生医学は、基礎、臨床の両面でより多くの研究がなされ、益々発展していくものと思われる。

最後に; 今後のニューロサイエンス研究

我々はこのように、遺伝子治療と再生医学、そしてその技術を用いて、現在の部署では、脳神経領域の難病治療、そして脳機能の解明にも新たに取り組んでいる。特に我々は現在、遺伝子の発現消失に関わる MeCP2 遺伝子の変異がその原因と最近解明されたばかりの Rett 症候群を中心として、遺伝子治療、再生医学の研究、そして MeCP2 からみた神経の発生、病態のメカニズム解明の研究を進めている。21 世紀にはこのような脳神経の難病が少しでも治療でき、また高次脳機能の解明が進むよう、微力ながら我々も努力していきたいと思っている。

文 献

- 1) Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL : Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 : 2577 - 2581, 1995
- 2) Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SL : Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res*, 56 : 3758 - 3762, 1996
- 3) Kwong YL, Chen SH, Kosai K, Finegold MJ, Woo SL : Adenoviral-mediated suicide gene therapy for hepatic metastases of breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 3 : 339 - 344, 1996
- 4) Block A, Chen SH, Kosai K, Finegold M, Woo SL : Adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer: regression of hepatic metastasis of pancreatic tumors. *Pancreas*, 15 : 25 - 34, 1997
- 5) Terazaki Y, Yano S, Yuge K, Nagano S, Fukunaga M, Guo ZS, Komiya S, Shirouzu K, Kosai K : An optimal therapeutic expression level is crucial for suicide gene therapy for hepatic metastatic cancer in mice. *Hepatology*, 37 : 155 - 163, 2003
- 6) Fukunaga M, Takamori S, Hayashi A, Shirouzu K, Kosai K : Adenoviral herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in an orthotopic lung cancer model. *Ann Thorac Surg*, 73 : 1740 - 1746, 2002
- 7) Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, Xu B, Kosai KI, Finegold M, Woo SL, Chen SH : Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 : 11302 - 11306, 1996
- 8) Huang H, Chen SH, Kosai K, Finegold MJ, Woo SL : Gene therapy for hepatocellular carcinoma: long-term remission of primary and metastatic tumors in mice by interleukin-2 gene therapy in vivo. *Gene Ther*, 3 : 980 - 987, 1996
- 9) Nagano S, Yuge K, Fukunaga M, Terazaki Y, Fujiwara H, Komiya S, Kosai K : Gene therapy eradicating distant disseminated micro-metastases by optimal cytokine expression in the primary lesion only: novel concepts for successful cytokine gene therapy. *Int J Oncol*, 24 : 549 - 558, 2004
- 10) Li Y, Takemura G, Kosai K, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Goto K, Takahashi T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Mizuguchi H, Fujiwara T, Fujiwara H : Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation*, 107 : 2499 - 2506, 2003
- 11) Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT, Tewson M, Ou CN, Bowles N, Woo SL, Schwall RH, Darlington GJ : Retrovirus-mediated in vivo gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther*, 9 : 1293 - 1301, 1998
- 12) Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T : Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology*, 30 : 151 - 159, 1999
- 13) Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T : Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 244 : 683 - 690, 1998
- 14) Kawai T, Takahashi T, Esaki M,