

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 米国バ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つ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

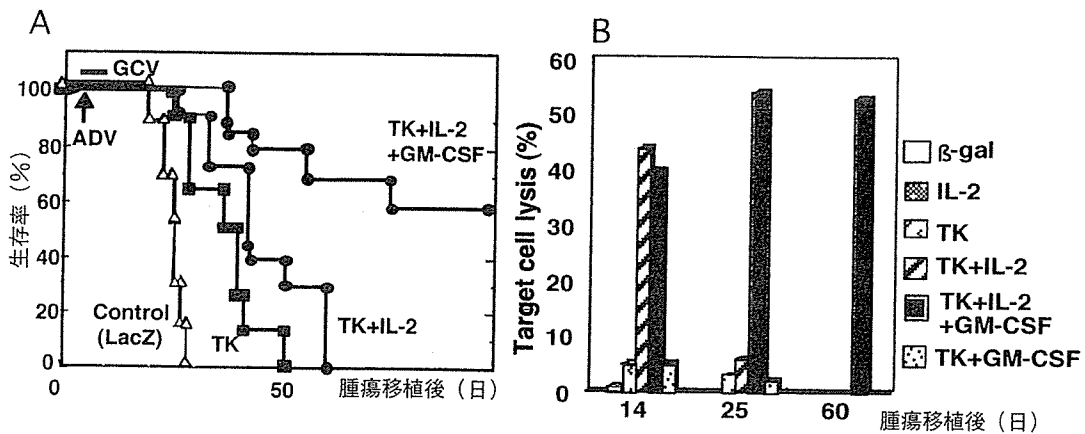


図1 ADVによる *in vivo* コンビネーション遺伝子治療 (マウス実験例)。自殺遺伝子 (HSV-tk)、サイトカイン遺伝子 (IL-2, GM-CSF; granulocyte macrophage-colony stimulating factor) のコンビネーション遺伝子治療により、原発巣の腫瘍縮小だけでなく、抗腫瘍免疫 (細胞性免疫) の効率よい長期間の誘導により (B)、転移巣も除去されることで、生存率が著明に向上する (A)。(文献1, 2より)

り、実際、近年一部の疾患では非常に有望な結果がでていいる。また現在の遺伝子治療というの、「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

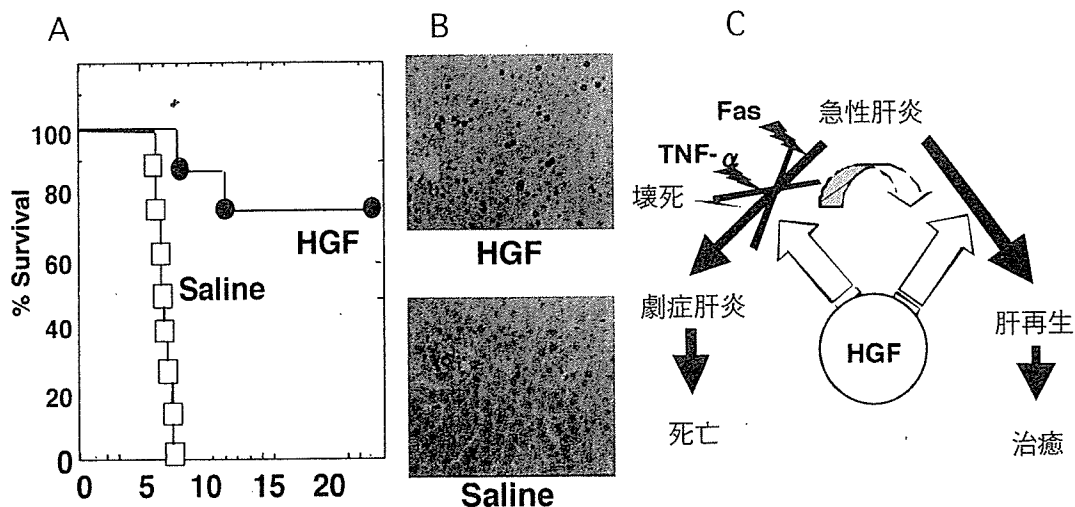


図2 HGF 投与による劇症肝炎の治療 (*in vivo* 再生療法; マウス実験例)。A. エンドトキシン投与により全肝細胞が急速に細胞死に陥り、7時間以内に全マウスが劇症肝炎で死亡する。組み替え HGF の投与により細胞死は強力に阻止され、肝再生も誘導され (B 図; BrdU により再生肝細胞が標識)、劇症肝炎の進展は阻止され効果的に治療される。C. 治療と再生をかねた理想の再生医療である。(文献 11, 12, 13)

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,

- Ushikosi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K : Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*, 2004 (in press)
- 15) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H : Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*, 109 : 2572 - 2580, 2004