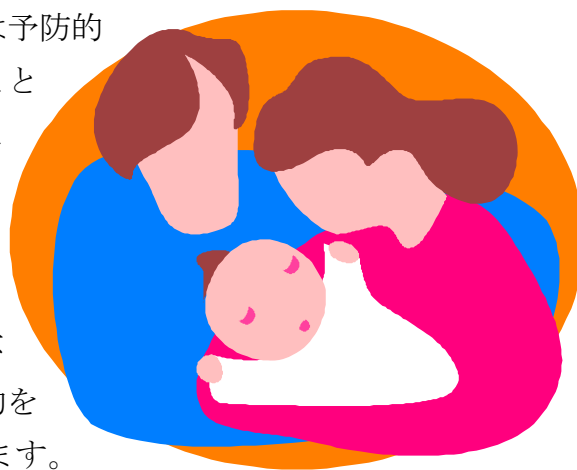


血友病の治療は、これまで、出血時、或いは予防的に血友病因子を濃縮製剤の形で補充することが中心でした。紆余曲折しながらも、確かに製剤の質と利便性は著しく向上しました。しかし、それでも不慮の頭蓋内出血等の致死性出血を防ぐことは出来ません。常時、数%の正常因子活性が血中に存在すれば、不慮の出血は基本的に抑制できます。この目的を果たすには遺伝子治療が理にかなっています。



数%の因子発現で臨床効果が期待できることから、血友病は遺伝子治療の対象疾患としても恵まれています。

本稿では、血友病遺伝子治療全般ではなく、具体的に、日本の厚労省研究班で進めている血友病遺伝子治療研究の一端をご紹介します。

I. 遺伝子治療とは

遺伝子治療と聞くと、異常遺伝子を完全に修復するというように理解されている方も多いと思います。図1（※次ページ）を参照ください。患者さんの細胞の遺伝子を体外で部位特異的相同組み替えという方法で修復し、それを体内に戻すことは理論的には可能です。しかし、極めて効率が悪い上に患者さんの血友病遺伝子異常は一様ではなく、その全てに対応することは現時点では困難です。

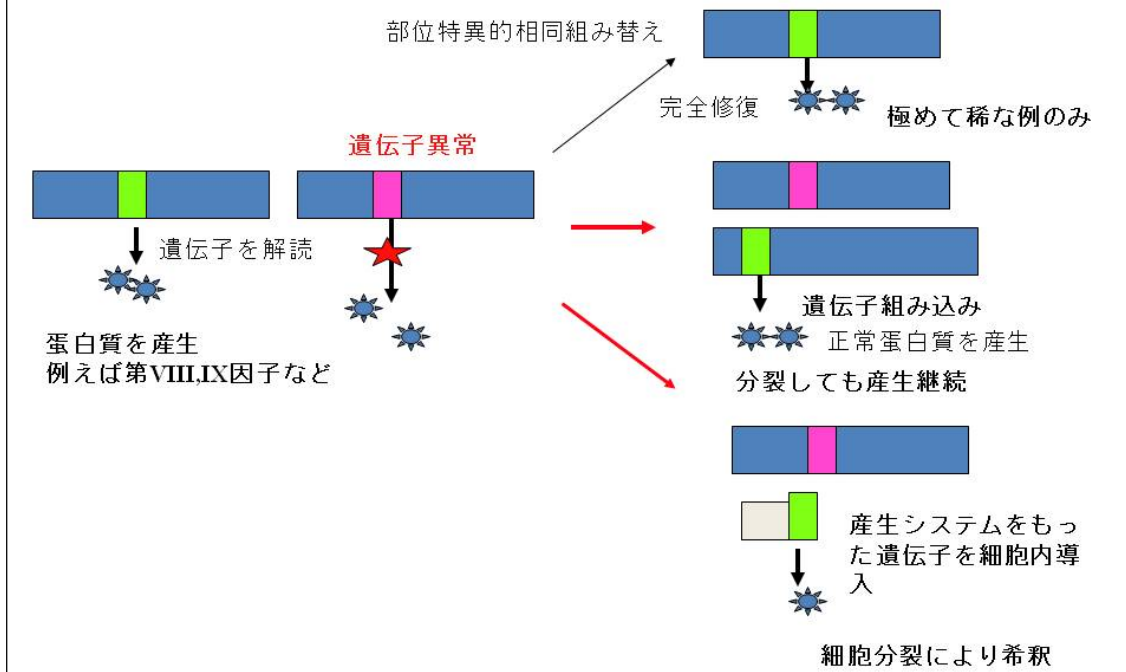
現在、可能な遺伝子治療は、次の二通りです：

- 1) 外で患者さんの細胞の染色体内に、正常血友病遺伝子を組み込み、これを患者さん体内に移植し正常血友病因子を発現させる。

この場合は、情報は染色体に組み込まれて複製されますから、遺伝子導入した細胞が分裂しても効果が減弱することはありません。但し、現時点では遺伝子

図 1

遺伝子治療の概念



を染色体の特定部位に導入することは不可能です。その為、導入した遺伝子が万に一つも腫瘍化を刺激したりしないように世界中の研究者が知恵を絞っております。

2) 血友病因子を産生しうる遺伝子を肝臓や、筋肉など、特定臓器細胞内（核内、或いは細胞質内）に導入し、正常因子を産生する。

この場合は染色体内に殆ど組み込まれませんから、腫瘍化刺激などではなく安全です。しかし、導入した細胞が分裂すると、そのたびに希釈され、細胞寿命がつかれば効果は減弱します。

ところで、1)、2) のいずれにおいても、血友病遺伝子を細胞内、もしくは染色体内に運び込むには、運び屋、“**ベクター**”が必要になります。超音波や電気的力など物理的な力を利用して細胞膜に可逆的な穴を開けて遺伝子を押し込む方法も実験レベルでは利用されていますが、臨床効果を期待するには効率の面で現実的ではありません。現在利用可能で効果の期待できるベクターとしてはウイルス由来ベクターがあります。勿論、いかなる条件下でもウイルスの複製

が起きないように設計されたものを利用します。我々の研究班では、1)の方法には HIV と系統樹上最も離れており、宿主であるアフリカミドリサルにも他のサルにも全く病原性を示さない、サルレンチウイルス由来ベクター（日本版 SIVagm ベクター）の利用を検討してきました。2)の方法には、サルとヒトに感染するが、全く病原性を持たないアデノ随伴ウイルス(AAV)由来ベクターの利用を図ってきました。AAV ベクターは、世界中で現在最も安全なウイルス由来ベクターであるという定評があります。

II. 遺伝子治療研究の進捗状況

A. 血友病マウスを利用

欧米より、10年遅れで、まさにゼロからの出発でしたが、安全性向上と治療レベル因子長期発現持続を目的に、遺伝子治療基礎研究を展開してまいりました。AAV ベクターを用いた方法については数年前に技術を確立しました。AAV は、血清型によりさらに十数種類に分類されますが、それぞれ体内に投与すると、肝臓や筋肉の細胞などへかなり選択的に入る“臓器特異性”に差が見られます。我々は、数多くの実験を繰り返した結果、肝臓に特異性を持つ AAV8 ベクターを選択いたしました。以前に欧米で実施された AAV2 ベクターを利用した血友病遺伝子治療研究は、マウスでの効果を基盤に一足飛びに臨床研究へ歩を進め、ことごとく失敗いたしました。元来、AAV がヒト・サル感染ウイルスであることを鑑みて、我々は、ヒト臨床研究へ歩を進める前にサルで検討いたしました。

B. サルを利用

サルでは血友病は確認されていません。クローン技術を用いて血友病サルを作製することは倫理的問題が立ちばかり不可能です。健常サルにヒト血友病遺伝子を導入し、その発現を観察するには、サル由来血友病因子とヒトのそれを識別して定量出来る測定系が必要になります。第 IX 因子も第 VIII 因子もそれぞれサルとヒトでは 97%以上の相同性があり、識別は極めて困難です。幸い、第 IX 因子に関しては、ヒトとサルを区別できる日本製モノクロナル抗体（世界唯一）を入手できました。そこで、まず血友病 B 遺伝子治療研究を先行して進めました。また、サルで検討したことは、非ヒト霊長類で検討したと言うだけではなく、大きな意味がありました。症状がありませんから、知らないうちにヒト

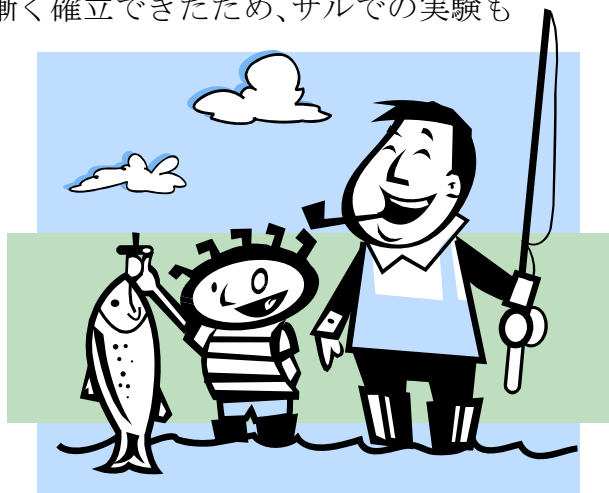
サルは AAV に感染する可能性があります。すると、これに対する抗 AAV 抗体がヒトの体内で産生されます。これがまさに水際で AAV ベクターに結合して、遺伝子導入を阻害するために、ヒト臨床研究がマウスで期待したようには進まなかったことが示唆されました。これまでも抗 AAV 中和抗体を測定する系は存在していましたが、感度が低く、特に抗 AAV8 抗体測定系は殆ど使用に耐えない状態でした。我々は、種々の工夫を凝らし、測定系の感度を数百倍高めて（世界一）、実用可能なものに改善しました。この系を用いて測定し、陰性であるサルには、製剤を投与するのと同じように末梢静脈から第 IX 因子遺伝子搭載 AAV8(AAV8 FLX)ベクターを静注するだけで、サル肝臓にベクターが導入され、数年にわたり、5-15%の第 IX 因子の持続発現が確認されました。肝障害も殆ど見られず経過し、数年後にサルの組織を確認しますと、殆どのベクター遺伝子は肝臓内に十分量が残存しており、生殖器官である精巣への移行も全く見られませんでした。次に、抗 AAV8 抗体陽性はヒトではどれくらいの頻度で見られるものかを検討しました。健常人、血友病患者さんのいずれも約 50%の頻度でこの抗体を有していることが明らかになりました。そこで、抗体陽性の患者さんにも治療できる技術開発が次の目標になりました。特殊なカテーテルを利用し、血液を洗浄して、抗体を含む血液と接しない形でベクターを投与することで十分な発現を得る技術を確認いたしました。5-10%の因子発現がこの方法でも年余にわたり持続しています。この場合は患者さん血管にカテーテルを挿入するために皮膚に小さな穴を開ける必要があります。

サルでは抗 AAV 抗体の存在の有無にかかわらず、繰り返し、血友病 B 遺伝子治療可能な技術を確認し得たといえます。

血友病 A に関しましても、基本技術は同様と考えています。しかし、サル血中で、発現したヒト FVIII を測定しうる系も漸く確立できたため、サルでの実験も開始しております。

C ヒト臨床研究へ向けて

サルでは血友病 B 遺伝子治療技術を確認できたと判断し、ヒト投与可能レベル(GMP レベル)の AAV8 FLX ベクターの作製を計画しました。しかし、欧米企業に依頼しますと、一回の臨床

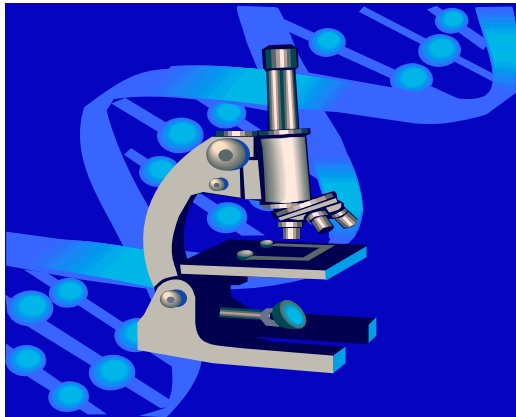


研究計画用に数億円が必要になります。これまでも、日本企業の何社かが積極的に臨床研究協力を計画してくれました。しかし、日本での厚労省研究が開始する以前に AAV ベクターの特許が欧米に押さえられており、企業ベースでは金銭的面でうまくいきませんでした。そこで、厚労省予算内で検討の結果、日本のディナベック関連企業である中国 VGT 社を候補とし、訪中し、設備視察と技術者面談をへて選択しました。2000-3000 万の予算で、自治医科大学とディナベックの班員が複数回訪中し、技術指導しながら、1 回の臨床研究に必要な量の GMP レベル AAV8/FLX ベクターを入手いたしました。途中、尖閣列島問題などが起きてまさにハラハラドキドキでした。精製度は十分に高く、血友病マウスではベクター投与により十分量の第 IX 因子発現も確認できました。原発事故による節電のため、サル実験が足踏みしていますが、本年度中にはサルでの検討も終了する予定です。

サルの血友病 B 遺伝子治療研究では我々のグループが世界最先端グループの一つと自負しておりましたが、昨年、アメリカでユダヤ系の医療機関が豊富な資金力をバックにサル実験を適当にすませ、GMP レベル AAV8/FLX ベクターを欧米で作製し、一足先にヒト臨床研究を開始しています。投与ベクター量に見合う治療レベル第 IX 因子の発現が 1 年以上持続しています。高容量例で、プレドニンで治療可能な肝障害が一時期みられましたが、特に重篤な副作用もなく経過していることが本年 5 月開催米国遺伝子治療学会で報告されました。

臨床研究開始は一步後れを取りましたが、抗 AAV 抗体を有する患者さんへの治療技術は我々が一步先んじています。我が国で具体的な臨床研究を開始するには、厚労省と相談しながら、倫理面を含めて十分な事務的手続きが必要になります。大学での倫理審査も必要になります。そのために数年が必要と言われております。出来るだけ短縮するために、患者さん代表のご協力を得ながら、既に、厚労省の担当の方ともミーティングを持ちました。ベクターの量と質を確保するために、さらに十分な研究費が必要になります。厚労省サイドからは、力強い支援のお話しも頂いております。厚労省へのお願いも含めて、歩みの速度を速めるには患者さんの強い後押しが不可欠であります。同時に、我々は安全性が最優先と考えています。必要な事務的手続きを迅速に進めるとともにさらなる安全性の確保と、そして血友病 A 遺伝子治療へ向けた研究を進めていく予定です。

III 将来展望-SIV ベクターの利用



AAV ベクターを利用した遺伝子治療は、あまり分裂しない細胞に導入しても、5-10 年くらい経過すると効果が減弱してしまう可能性があります。一度の治療でかなりの量の AAV ベクターが体内に入り抗 AAV 抗体ができるために、繰り返し治療は不可能であろうと、これまで概念的に考えられてきました。我々の技術開発によりこの問題は克服できたと考えてい

ます。しかし、一度の治療で効果が生涯持続すれば、より患者さんの負担は少なくなります。100%安全といえる SIV ベクターを利用した血友病遺伝子治療技術の確立が夢であります。我々はその為の検討も並行して進めてきました。

幾つか我々の成果を紹介します。

- 1) 血友病 A マウス骨髓幹細胞に体外で SIV *FVIII* ベクターを導入し、同じ血友病マウス個体に細胞を移植し、血小板に発現誘導します。血小板に第 VIII 因子を運搬させ、出血部位で血小板から放出させ、止血部位へ第 VIII 因子を濃縮することで、十分な止血効果が得られることを報告しました。
- 2) 血友病 A マウス間葉系幹細胞に SIV *FVIII* を導入し、この細胞を用いて“ナノシート”と呼ばれる第 VIII 因子を発現する細胞のシートを作製し、皮下や腹腔内など、問題が生じたら除去可能な体内部位に貼り付け、第 VIII 因子を発現させるという実験も進めています。
- 3) 最も臨床に近い成果としては、体外で第 VIII 因子を導入した間葉系幹細胞を、細胞を採取した血友病 A マウス関節内に移植すれば、長期間にわたり、関節出血とその修復に極めて効果のあることを明らかにしています。本人細胞が関節内に限局されますので、安全面から考えても臨床応用可能と考えています。
- 4) 種々の安全面の検討も進めています。例えば、染色体へランダムに組み込んだ SIV ベクターが悪さをしないように、インシュレータ遺伝子（インシュレータというのは例えばオーディオで振動が直接伝わらないようにスピーカと床の間に挟む緩衝物）を検討するなどの安全性向上のための検討も進めています。

最後に

今回は、現在の日本における血友病遺伝子治療研究の現況を簡単にご紹介しました。血友病 B 遺伝子治療臨床研究は、さらなる安全確認と、事務手続きが終了すれば開始できる段階に来ています。血友病 A も時間の問題と考えています。SIV ベクターを利用した遺伝子治療は、海外では既に眼科領域や、免疫不全の治療などには臨床応用が計画、もしくは進められていますが、我々は、更に安全性と効率改善を進めるために研究を展開しております。

臨床研究開始が現実のものとして近づいて参りました。これからは、随時、成果を患者さんにご紹介します。皆様のご支援とご協力を願います。

e-mail 情報 : yoisaka@jichi.ac.jp