

David Lillicrap: こんにちは、David Lillicrap です。私はカナダにある Queen's University の Department of Pathology and Molecular Medicine（病理分子医学部）の教授です。今日は、血友病の遺伝子治療を取り扱う一連のスライドをご覧にいます。これらのスライドの学習目的は、基本的な用語と概念を含む、遺伝子治療を正しく説明することです。

この物語は 65 年以上前に始まりました。このスライドに示されている写真は、右側が Francis Crick で、左側が James Watson です。彼らがケンブリッジで 1953 年に記述した DNA 二重らせんの高尚なモデルを指し示しています。

1980 年代に、最初の血液凝固因子の遺伝子が同定されました。これは、私の指導者である Arthur Bloom が Nature に発表した記事のニュースと見解です。血液凝固障害の病因の理解が深まり、診断法が発展し、表題である遺伝子治療につながった、遺伝子同定（クローニング）実験の利点を説明しています。

遺伝子治療の原理は比較的単純です。治療に使える導入遺伝子の採取、その遺伝子の細胞への送達、その細胞内での DNA の核への取り込みが関与します。DNA は次いで mRNA を発現し、それがタンパク質に翻訳されます。その治療用タンパク質は細胞内に止まるか、または細胞から分泌されて体内を循環して治療効果を発揮します。

遺伝子治療のプロセスを詳しく説明する前に、現在は、体細胞遺伝子治療に限定されているという点が重要です。すなわち、正常な遺伝子を送達するか、個人の細胞内の遺伝子を修復するものであり、その後の世代のためではありません。体細胞遺伝子治療は個人に限定されており、生殖細胞の DNA の変更や改造を意図していません。

このスライドには、常に遺伝子治療の候補であった病気のリストが示されています。それらは単一遺伝子疾患で、すなわち、臨床的表現型が主として単一遺伝子の欠陥によるものです。ご覧のように、血友病もリストに含まれています。血友病がそこにある理由は、凝固因子タンパク質のわずかな増加が有意な臨床的利点をもたらすからです。そのタンパク質は細胞から分泌されます。そのため、必要なのは循環されることだけです。そのタンパク質の発現を厳密にする必要はありません。非常に優れた動物モデルがあり、マウスと大型の動物で、これらの遺伝子治療をテストすることができます。



体細胞遺伝子治療について、このスライドで 4 つのオプションがご覧になれます。最初のものは変異の修復です。これについては、次のスライドで少し詳細を説明します。次は、非ウイルス遺伝子導入を通して導入遺伝子を送達する可能性です。これらは未だに理論的な可能性に過ぎず、臨床には程遠いものです。さらに、細胞ベースの遺伝子治療があり、これについては以降のスライドで詳細を説明します。最後が究極的なウイルスベクターによる遺伝子導入で、現在、血友病のヒト遺伝子治療試験に継続的に使われている全てがこの方法によるものです。

このスライドでは、ゲノム編集を通して遺伝子を置換する、または修復する可能性の問題について説明しています。このスライドの左側には、遺伝子を修復する方法としての、相同性組み換えの可能性が示されています。これは理論的には可能ですが、非常に効率の悪いプロセスです。このスライドの右側では、遺伝子切断の異なるアプローチをいくつかご覧になれます。左から右に読んで行きますと、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN または CRISPR を使った方法があり、これはタンパク質または核酸ベースのヌクレアーゼ（遺伝子切断酵素）を二重鎖切断が行われる場所である特定のゲノムへ送達します。次にスライドの一番下を見ますと、二重鎖切断が異なる方法で置換または修復されています。これらの試験は実用化の可能性を示しており、これから臨床試験が開始されるところです。ただし、血友病については、in vitro と動物モデルでは可能でも、臨床適用には程遠いと私は思っています。

遺伝子治療戦略の要素は何でしょうか？それらがこのスライドに挙げられています。治療に使える導入遺伝子、送達システム、適切な宿主細胞、さらには導入タンパク質の発現についての測定値と転帰メトリクスについてお話しします。

導入遺伝子カセットとはどのようなものでしょうか？通常、それは、イントロンのない成熟 mRNA となるコーディング DNA（cDNA）シーケンスを含みます。それらの cDNA の大半はサイズが 2~7 キロダルトン (kDa) です。これから、以降のスライドで、cDNA を改良する 2 つの方法についてお話しします。

このスライドではコドン最適化について説明されています。それはヌクレオチド・シーケンスの変更です。すなわち、アミノ酸をコードする 3 つ組のヌクレオチドですが、アミノ酸のシーケ



ンスには変更がありません。この方法の目的は、mRNA の転写率を強化すること、残りのイントロン要素全てを切り出して mRNA の処理を最適化すること、そして最後に mRNA 翻訳を標的宿主細胞に存在する多量の転移 RNA (tRNA) に一致させることです。

その他の導入遺伝子に必要な 2 つの要素群は、導入遺伝子の”5'”末端にある発現制御部位の一部です。これらはプロモーターに相当し、遺伝子発現を特定の細胞種や発生に限定し、また、薬物によって誘導されることもあります。もっと遠隔部位である、いわゆるエンハンサー要素は、遺伝子発現強化に必要です。これもまた特定の宿主細胞で働きます。

導入遺伝子カセットの他の末端は 3'配列で、これは通常 cDNA シークエンスでコードされているメッセンジャー RNA を安定化するために存在します。

次の 2 つのスライドは、導入遺伝子伝達の一般的な方法を説明しています。最初の方法は、直接的な in vivo 遺伝子導入で、導入遺伝子はしばしば静脈内注入か、筋肉内注射などの方法で送達されます。この利点は、実質的に簡単であり、臨床医と患者にとって必要時間が最小限で済むことです。欠点は、宿主の免疫応答に対するベクター送達システムの in vivo 暴露があり、後ほど議論しますが、一部の問題を起こす可能性があります。2 つめは、標的効率に変動があり、実際には導入遺伝子を、目的でない一部の細胞に送達する可能性があることです。

スライドに導入遺伝子送達の 二番目の方法がこの示されています。これは間接的または ex-vivo 遺伝子導入と呼ばれ、導入遺伝子は体外で細胞へ送達されます。スライドの左側でご覧になれる様に、やるべき最初のことは、患者から自己の長期前駆細胞または幹細胞を採取、または分離することです。これらの細胞を分離したら、次に患者の体内で変異した遺伝子の正常コピーを送達します。または患者の細胞内に存在する変異遺伝子を編集することもできます。それらの遺伝的に変化した細胞を次に体外で増幅させ、その後患者の体内に再度導入されます。その場所に細胞を生着させ、患者細胞内で欠損している正常凝固因子を産生させます。

この送達システムには、いくつかの長所と短所があります。良い点は、in vivo でのベクターに対する曝露がないことで、これは免疫学的に重要な利点です。細胞を直接標的にする



ことで、ベクターが新しく遺伝子が導入した細胞のみを採取し、体外でこれにアクセスすることができます。短所は、作業に手間がかかることです。特別な設備を必要とします。また重要なことは、遺伝的に修飾された細胞が生着するために、患者の前処置が必要なことです

現在の血友病遺伝子治療の全試験は、ウイルスベクターの遺伝子移植により行われ、これまでにアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスという3種類のウイルスが使用されてきました。

アデノウイルスについて説明するスライドが一枚だけあります。このウイルスベクター系で治療された患者は一人でした。増殖細胞と非増殖細胞に効率的に遺伝子導入でき、このベクターを多量に作製することは、比較的容易です。アデノウイルスによる遺伝子移植の大きな欠点は、これらのベクターに対して明らかな自然免疫反応が起こることです。そのため、炎症性サイトカインの上昇、肝臓毒性、血小板減少症、それに極端な症例では全身性炎症反応症候群が発生し、それは時には致死的になることがあります。これは、現在の状況では、血友病患者に対する遺伝子送達システムにはなりません。

二番目のウイルスベースの送達システムは、レンチウイルス介在性の遺伝子移植で、これは将来血友病に臨床応用するために、いくつかのグループによって研究中です。レンチウイルス性ベクターは分裂中および非分裂中の細胞の両方に形質導入します。ベクターの能力、すなわち、挿入する導入遺伝子のサイズはかなり理にかなっており、最大約8キロベース(kb)です。わずかな自然免疫反応があります。レンチウイルス・システムの利点は、遺伝子を安定してゲノムへ挿入ができることです。少なくともこれまで実施された試験によれば、無作為で非発がん性であり、動物モデルでは広範囲に行われています。

最後に説明するのは三番目のウイルス性ベクターシステムはアデノ随伴ウイルス(AAV)です。これは、多くの小さなAAV粒子を示している電子顕微鏡写真です。スライドの中心に、大きなアデノウイルス粒子が見られます。これは現在の血友病遺伝子治療の全試験に使われているウイルスベクターです。

ここからはAAVと呼びますが、このウイルスは、非病原性のヒトパルボウイルスです。単鎖DNAゲノムを持ち、それがこのスライドの上部に示されています。サイズは4.7キロベースで



す。コード領域が二箇所あり、rep 遺伝子と cap 遺伝子で、ゲノムは逆方向末端反復配列によって両端でキャップされます。このウイルスベクター系が誘発する自然免疫性は最小限です。多くの異なる血清型があり、それらは capsid タンパク質の相違で示されます。組み替えベクターの非常に小さな部分が宿主ゲノムに挿入され、ベクターの大半は安定した染色体外の環状のコンカテマーとして存在します。

このスライドは、野生型 AAV ゲノムを AAV 治療用ベクターゲノムに変換する方法を示しています。rep と cap の両方の遺伝子を取り除きます。二番目の図の下で、AAV ベクターゲノムが治療用遺伝子を持つようになったことが右側に示されています。そして特定の臓器または細胞の種類で発現を促進するプロモーターまたは制御シーケンスを見ることができます。このスライドに示されているのは肝臓に特異的なプロモーターで、これが肝細胞内でこの導入遺伝子の発現を促進します。血友病については現在、これが全ベクターの標的部位です。このスライドの一番下を見ると、導入遺伝子の挿入は第 IX 因子の間で異なり、cDNA シーケンスのサイズは約 1.3 キロベースで、B ドメインを欠失した第 VIII 因子では、B ドメインのコード化シーケンスが除去されると約 4.7 キロベースです。

AAV ベクターの粒子をどのように作製するのでしょうか？それがこのスライドで説明されています。スライドの一番上で、導入遺伝子の「5'」と「3'」末端に ITR シーケンスを持った導入核酸シーケンスがご覧になれます。プロモーターシーケンスと導入遺伝子が真ん中にあり、次にこれが AAV ベクター capsid に挿入されて AAV ベクター粒子が作られます。これらの粒子が治療薬として患者に投与され、肝臓へ遺伝子を送達します。

ここで、さらに詳細を説明しますと、宿主細胞の膜とウイルス粒子が相互作用を起こします。一定の形態の受容体と AAV の相互作用は、ある程度解明されていますが、いまだに未知の部分もあります。粒子は細胞内のエンドソームの中に取り込まれます。最終的にこの粒子はエンドソームから放出され、capsid タンパク質は分解されて導入された細胞の表面上で発現します。導入遺伝子の核酸は核の中に残り、染色体外のコンカテマーとして存在するか、また一部の場合は、特に AAV の場合この頻度は少ないですが、宿主細胞の DNA に挿入されます。



血友病についてまとめると、治療用の導入遺伝子に関与する遺伝子導入戦略の成分は、野生型または改変した第 IX 因子の cDNA シークエンス、B ドメインを欠失した第 VIII 因子となります。送達方法が必要となりますが、現在はアデノ随伴ウイルスです。先ほど述べたように、レンチウイルスが関与した試験がありますが、それはまだ開発段階です。それを受け取る宿主細胞に送達することが必要ですが、現時点ではそれは肝臓です。実施した試験の成功を指標が裏付けているかどうかを調べる必要があります。そのためには血漿中の凝固因子レベル、年間出血率と患者による外因系第 VIII 因子の消費量の測定を行います。もちろん安全注意事項の観察が必要です。

このスライドは、遺伝子治療のハイプ・サイクル（テクノロジーの成熟度）が示されています。このスライドを左から右に説明していきます。1970 年に技術的誘因が発生し、このピークの一番上で見られるように、1990～1995 年あたりまでには遺伝子治療は素晴らしいものとなる可能性があると思われていました。事実、ADA 欠乏症などの一部の形態の遺伝性免疫不全症は遺伝子治療で治療されてきました。しかし、1999 年以前に大惨事がありました。アデノウイルス遺伝子治療で治療されていた患者である Jesse Gelsinger が全身性炎症状態で死亡したのです。これは遺伝子治療の開発を失意のどん底に落としました。

それにも関わらず、その後 2000～2010 年にわたってベクターに関する基礎的科学研究開発と遺伝子治療送達に対する免疫応答についての理解が非常に深まったため、現在の生産性の安定につながりました。血友病治療に関するこの進展はほぼ 2010/2011 年から見られ始め、血友病ベースの遺伝子治療の最初の長期臨床的成功が得られました。また、遺伝子治療に対するバイオ医薬品業界の大きな取り組みもありました。そのため、2019 年現在では、血友病 A と血友病 B の両方にたいする第 III 相臨床試験を実施する寸前になっています。

最後のページとなりますが、これは血友病に対する遺伝子治療の将来性を説明しています。このスライドの一番上は、標準型製剤、半減期延長型製剤による凝固因子の補充、非凝固因子製剤の効果を説明し、スライドの右側は、遺伝子治療の効果を説明しています。スライドの一番下は、循環中で測定可能な凝固因子のレベルです。このスライ



ドの左側には、止血効果の改善と低下に関連する凝固因子レベルの間欠的なピークとト  
ラフ（最低値）が見られます。これは循環中のタンパク質の半減期のために起こります。

これらは、半減期延長型製剤（EHL）によって改善しました。2番目のデータセットで  
は、止血の結果と凝固因子レベルの結果が見られます。次に、さらに右側に進むと非凝  
固因子治療があります。これらの製剤は凝固因子レベルを改善させません。それらは循  
環中の従来の凝固因子を使っていないからです。しかし、全体的な止血レベルを改善さ  
せ、その効果はそのグラフの上部に示されています。

次に、このスライドの右側には、遺伝子治療で達成できることが示されています。遺伝子  
治療は、第 IX 因子と第 VIII 因子の個別凝固因子のレベルを治療的に意義のあるレベ  
ルまで上昇させる見込みがあり、また持続性もあります。送達した治療用の導入遺伝子  
から第 IX 因子または第 VIII 因子が継続的に発現するからです。これらは、稀に間欠的  
な凝固因子補充の必要性があるだけで、長期持続性がある予防をもたらすのに十二分  
なはずです。

