

Glenn Pierce: こんにちは、私は Glenn Pierce です。世界血友病連盟の副会長を務めており、血友病の遺伝子治療について長年関心を持ってきました。今日は、血友病の治療における遺伝子治療の方法と標的についてお話します。ここでの目的は、この話を通して、アデノ関連ウイルス（AAV）以外のその他のアプローチを考察し、AAV の長所と欠点を見ていくことです。

遺伝子治療の概念が生まれたのはほぼ 50 年前のことです。ヒトの疾患に対する遺伝子治療についての疑問を Ted Friedmann が「Science」に掲載した記事が発端でした。それは DNA と RNA およびそれらの機能が明らかになってから間もなくのことでした。彼は科学的かつ倫理的問題を提起しました。それは現在、私たちが提起している遺伝子編集についての疑問と一部同じものです。

早 50 年近く経った今、私たちは、血友病のための遺伝子治療になぜ AAV を使うのかと問いかけています。結論は、それが機能するからです。しかし、その進化の途中には、25 年から 30 年にわたる多くの失敗がありました。現在では、これらは第 VIII 因子あるいは第 IX 因子の欠乏による血友病患者のどちらにとってメリットをもたらす最も実行可能なアプローチになっています。

全般的に、これらは安全性に優れており、多くの異なる疾患や臨床試験で使われてきました。しかし、治療効果の強弱と持続性、また、おそらく、ほぼ半数の人々が異なる AAV 血清型に対する既存の中和抗体を有している事実など、検討すべき多くの問題が存在します。血清型は AAV の種類に相当しますが、お互いに類似しているものの、もとの AAV とは大分異なるものになっています。

野生型のウイルスは体内の様々な臓器に感染することができます。遺伝子治療には多くの AAV 血清型が使用されてきました。過去の曝露が抗体反応を誘発し、AAV に対する中和抗体が発生すると、AAV は遺伝子治療に用いることができません。この免疫反応が、AAV 投与後には、この抗体産生が惹起されて、再投与を不可能にします。

AAV による遺伝子治療によって、非常に高い AAV 抗体が生じます。AAV は、ヒトに感染できる最も小さなウイルスの一つで、AAV 遺伝子を取り除いた後には、ほとんど何も残りません。例えば、B ドメイン欠損第 VIII 因子遺伝子は、かろうじて AAV に搭載することができます。そのため、搭載サイズの制限もあります。AAV は僅かな染色体への挿入を



起こすことがあります。これについては十分に定義されておらず、十分に研究されてもいません。

それが長期安全性についての疑問を提示しています。最後に、AAV について懸念としては、私たちは数兆ものウイルスゲノムを患者に投与していますが、最終的には、それらのうちのわずかなものだけがタンパク質を生成して治療に役立つことです。これらの懸念を踏まえても、AAV は血友病に治療効果をもたらすことができる機能的なウイルスベクターです。

AAV ベクターを改良するという解決策はどうでしょうか？ AAV を取り巻くこれらの問題に対して多くの解決策が提唱されましたが、大半は未だに十分に検証されていません。この検証作業は第 III 相試験の開始に重要なだけでなく、AAV ベクターや導入効率の改良などを見出す新たな試験に重要です。これらの多くが、検討はされているものの、2020 年、2021 年の早期承認される見込みである第一世代の AAV 遺伝子治療に応用できるペースではありません。肝臓細胞への導入効率は、この動画でご覧になれるように、ナンバー 1 に示されるように、既存の自然感染による AAV に対する抗体を持っている場合、標的細胞に入り込むことさえ阻害することがわかります。そのため、遺伝子治療の効果は全く達成できません。抗体のない状況である、ナンバー 2 では、AAV が特定細胞の表面受容体に結合することができ、通常受容体を通したトランスサイトシスによって細胞内に取り込まれます。ただし、細胞はウイルス感染を防御するために、ウイルスがいったん細胞内に入っても一部の自然免疫により排除される可能性があります。

これらは AAV 遺伝子治療を行うときに生じる可能性がある問題です。しかし、十分量の AAV がこうした問題を回避し、カプシドがはずれます。細胞質内で、AAV の DNA が核に入り込み、最終的にエピソームを形成します。これは安定し閉鎖したループで、宿主細胞のメカニズムを使って分泌タンパクを転写、翻訳します。カプシド自体は、小胞体の中に入るか、または主要組織適合性抗原クラス I 抗原に遭遇します。それらの一部はカプシドのペプチドに特異的に結合する可能性があり、その場合は細胞表面に表出されて特定の抗カプシド細胞傷害性 CD8 T-細胞を刺激します。これが結果的に、導入遺伝子をもつ細胞の破壊につながる可能性があります。ですから、私たちが取り扱っているのは、細胞内で生じる、これらの複雑な全ての段階を統合して、効率性、変動制、耐久性を取り扱うわけです。既存の免疫については何ができるのでしょうか？一部のグループは動物モデルで免疫吸着を検討しています。これは、高力価の抗 AAV 抗体を持っている可能性のある患者から、免疫グロブリン、IgG を吸着できるプロテイン A、プロテイン G カラムを用いて、取り除くものです。この効果は長くは続きませんが、AAV を投与して標的遺伝子を送達



する間は力価を低下させられる可能性があります。IgG の除去効果に関する研究は継続中です。多くの患者において、肝細胞を標的にするには、かなりの量のログに値する IgG の除去が必要です。

また、AAV 投与後の細胞内毒性の懸念があります。現在認識されていることとして、一部の患者に肝臓トランスアミナーゼの上昇が見られます。それらは一過性で、大半の症例では、通常値の 1.5 倍から 2 倍程度です。しかし、肝臓トランスアミナーゼの上昇は肝細胞の死亡を示唆しますので、若干の懸念が残ります。

肝臓酵素上昇の原因として考えられることは何でしょうか？ 3 つの仮説があり、それぞれ患者に、そのうちの一つ以上が影響しているのでしょうか。まず、非常に高い AAV カプシド感染にともなう、その分解です。大量の AAV カプシドを静脈内投与しますので、それらの多くが細胞に入り込みます。細胞はそのカプシドを分解し、成分であるアミノ酸に変化させます。細胞がそれを行うには、非常に多くのエネルギーを要します。次に、先ほど説明したように、細胞傷害性 T-細胞の問題があります。三番目の可能性は、小胞体ストレス応答として知られるものです。これは第 VIII 因子の発現に、より特異的です。現在までにわかったことは、細胞にとって第 VIII 因子タンパク質を産生することは、非常に難しいということです。第 VIII 因子は複雑なタンパク質で、大きさを見ても最も大きなものの一つです。

たとえば、B-ドメインを削除した第 VIII 因子を使っても、細胞培養において、産生が非常に難しく、細胞内で毒性を引き起こす可能性があります。その毒性が細胞死を引き起こし、もちろん第 VIII 因子の発現は失われます。これら全ての分野の調査が必要ですが、こうした疑問に一部でも回答し、これらの潜在的な問題を解決に役立てるような研究すらまだ十分に行われていないのが現状です。

この左上のグラフは肝臓トランスアミナーゼ上昇の例を示しています。これは同時に発生した AAV カプシドに特異的な CD8 細胞傷害性 T-細胞を示し、細胞死を引き起こします。一番下には、遺伝子導入と遺伝子発現に反応して起こりうる多様な免疫反応が示してあります。

CD8 T-細胞は導入遺伝子を含む肝細胞を攻撃します。またヘルパー細胞である CD4 T-細胞の活性化が起こります。AAV カプシドに反応して多量の抗体が生成され、それが以降の再投与が不可能になることは重要です。カプシド、細胞傷害性 T-細胞、小胞体ストレス応答に関する 3 つの重要な疑問を調査する努力はほとんど見られません。



個々の患者と集団において、これらを定義（診断）するための、この分野での多くの研究が必要です。AAV の代わりとなれるものは何でしょうか？ AAV 以外の、ウイルス性と非ウイルス性の遺伝子治療についてこれまで多くの研究が行われてきました。血友病で使われている最も研究が進んでいるウイルスは、レンチウイルスです。

レンチウイルスは HIV に由来します。ベクターとして用いる HIV は多くの HIV 遺伝子を欠損しており、AAV ベクターのように第 VIII 因子または第 IX 因子の遺伝子を挿入することができます。造血系幹細胞を使った *ex vivo* と肝細胞を特異的に標的とした *in vivo* の両方で、大動物をもちいた前臨床モデルも含め、第 VIII 因子と第 IX 因子の両者において検討されています。

ウイルスを使用しないアプローチが理想的です。DNA のような核酸を送達する脂質ナノ粒子はこれまで 30 年以上にわたって研究されています。ここまで、AAV がいかに非効率的であるかを説明しました。遺伝子を細胞に導入するには、脂質ナノ粒子はさらに非効率です。しかし、これらの脂質ナノ粒子には免疫反応を惹起しないので、繰り返し投与が可能であるというメリットがあります。

投与後に必要な第 VIII 因子または第 IX 因子レベルが認められない場合、目的のレベルを達成するまで繰り返し投与ができる可能性があります。もう 1 つのアプローチとしては、未来の遺伝子治療ともいえる遺伝子編集です。染色体に直接遺伝子を加えて、既存の遺伝子を取り替えるという概念です。血友病の場合には取り替えることは必要でなく、単に染色体に遺伝子を追加するだけで可能です。

一部の症例では、特定の遺伝子変異がある場合、内在性遺伝子を修復することさえ可能です。お伝えしたように遺伝子編集は未来の遺伝治療で、それは永久的に治療効果が継続するからです。いったん染色体の中に挿入されると、細胞が活着している間、タンパク質を発現します。細胞分裂の際にも、分裂後の細胞にも受け継がれます。ですから非常に魅力的なアプローチです。ヒトの臨床試験には未だ準備が整っていませんが、血友病の前臨床モデルで試験中です。

最後のアプローチは細胞療法です。細胞療法では、幹細胞と肝細胞など、いくつかの異なる細胞種が第 VIII 因子または第 IX 因子を送達するために使われました。このスライドは脂質ナノ粒子が核酸を送達している様子を示しています。

ここで行われた大半の研究は、抑制型 RNA などの小さな RNA 分子を使ったものです。しかし、これらの脂質ナノ粒子の中に標的遺伝子を含ませることもできます。細胞への毒



性を軽減したり、2つの肝細胞を標的にできるようにするなど、多くの研究が行われてきました。さらに、将来の研究が待ち望まれます。臨床試験の準備はまだ整っていませんが、その方向に進んでいます。

これらを使って遺伝子発現の効率性を増加させる方法を見つけていく必要があります。これらはウイルスベクターよりもいくつかの利点があります。レンチウイルスと AAV、AAV ベクター、との重要な違いは何でしょうか？この表に、レンチウイルスと AAV ベクターの重要な違いを示します。これらは異なる種類です。例えば、レンチウイルスは脂質を含むエンベロープで覆われています。

他は、エンベロープをふくまず、細胞表面上の受容体と接続できるタンパク質のみで構成されます。レンチウイルスの詰め込み可能容量はアデノ関連ウイルスの二倍です。先程お話ししましたが、レンチウイルスは宿主の DNA に組み込まれますが、AAV の多くは組み込まれません。大半は染色体外に留まります。両者ともに、分裂細胞と非分裂細胞に遺伝子導入が可能です。

前述したように、レンチウイルスは永久的な修正をもたらし、AAV はエピソームに存在するため、細胞分裂で失われる可能性があります。レンチウイルスと AAV ベクターによる遺伝子導入を比較すると、それは非常に類似しています。両方とも、特定の受容体を通して細胞の中に入り込めるウイルスです。どちらの場合でも DNA、または、レンチウイルスの場合は RNA が核に入ることが必要です。これらの両方が宿主の機能を利用します。レンチウイルスは RNA から DNA に逆転写され DNA を染色体に組み入れます。AAV は単鎖の DNA を二重鎖 DNA に変換し、エピソームまたは環状の DNA を形成し、宿主の RNA を転写し、次いでタンパク質を生成する機能を利用します。

両方のアプローチが機能し、少なくとも動物では、AAV ではヒトでも、治療レベルの第 VIII 因子を生成します。血友病のゲノム編集は、in vivo または ex vivo でのアプローチを含みます。遺伝子編集をもっと詳しく見てみましょう。遺伝子編集は比較的新しい技術で、過去 5 年から 8 年にわたって確立されてきました。これを使って私たちは、新しい遺伝子を直接染色体に挿入することができます。それには DNA を開き、特定の細菌酵素を使って、新しい遺伝子がそこに挿入できるようにします。これにより染色体内に永久的な修正をもたらします。CRISPR-Cas9 のような特定の遺伝子編集をみてみますと、この例で見られるのは、2019 年 7 月に行われた ISTH 会議で発表された要約です。これは Alan Brooks が発表したもので、宿主、この場合は肝細胞の DNA を切断して、肝細胞の染色体内部に B-ドメインを削除した第 VIII 因子を挿入し、mRNA（メッセンジャ



– RNA) を生成させて、第 VIII 因子を分泌させました。これは動物モデルで実施され、第 VIII 因子は治療範囲のレベルを示していました。

細胞療法のアプローチに移りますと、いくつかのグループが、第 VIII 因子または第 IX 因子を送達するために、幹細胞と成熟肝細胞の両方を用いました。この動画で示されているのは、第 VIII 因子の遺伝子をレンチウイルス・ベクターに挿入したものです。そのレンチウイルス・ベクターは、宿主から採取できる間葉系幹細胞に遺伝子導入することができます。

間葉系幹細胞は、骨髄の細胞と肝細胞などの、いくつかの異なる細胞種への分化することができます。ですから、それらの異なる細胞種で第 VIII 因子が産生される可能性があります。これは自己由来の細胞で行うことができます。つまり、患者から幹細胞を採取して *ex vivo* で操作し、それを第 VIII 因子遺伝子を伴って患者に戻すと、患者の中でそれらの細胞は第 VIII 因子タンパク質を分泌できるようになるのです。

これは動物で実施済みですが、実際にはヒトでは成功はしていません。ほぼ 20 年前に Roth らが発表した論文では、皮膚生検から線維芽細胞を採取し、それらを *in vitro* で成長させ、第 VIII 因子遺伝子を遺伝子導入し腹腔内に再移植しました。彼らは、第 VIII 因子の活性が若干見られたとしています。成果が見られたのは短期間で、患者の治療メリットを見出すための検討は継続されませんでした。次に、内皮細胞は第 VIII 因子を発現可能です。内皮細胞は内在性に第 VIII 因子を発現する細胞、特に肝臓の類洞内皮細胞です。患者の循環血液から自己幹細胞を採取、または多能性幹細胞 (iPSC) を用います。

レンチウイルス・ベクターを使って第 VIII 因子遺伝子を遺伝子導入します。次にこれらの細胞を内皮細胞に分化させ、それらを患者に戻し、血友病を改善することができます。これらのメリットは、概念的には非常に明瞭でシンプルですが、実際に行うのは難しいものです。しかし、動物で検討され、これらの新しい細胞の投与を受けた動物には治療域の第 VIII 因子が産生されました。

最後の検討は、iPSC から幹細胞用の細胞を作製することです。このアプローチは、末梢血単核球を患者から採取し、転写因子によってリプログラミングし、iPS 細胞を樹立します。その後、第 IX 因子遺伝子を編集し、直接肝細胞様の細胞へ分化させて、患者に移植します。これは肝臓または腹腔内で多量の第 IX 因子を産生します。この方法はマウスですでに確立されています。細胞療法におけるこれらすべてのアプローチを使って、動物モ



デルで一部妥当な結果を得ています。ただ、これをヒトの臨床試験に外挿ことができるかは疑問です。

現時点では短期のヒトの臨床試験は現在計画されていません。もっと多くの研究が必要です。造血系幹細胞へレンチウイルスで遺伝子導入を行うヒトを対象とした臨床試験薬が開発されました。それは特に血小板の中に第 VIII 因子遺伝子を発現させるものです。レンチウイルスで、様々な血球細胞に文化しうる造血幹細胞に第 VIII 因子を導入し、成熟した血小板内でのみ第 VIII 因子を生成できるように、血小板で機能するプロモーターで発現させます。このアプローチは、いくつかの動物モデルで行われており、現在新薬として開発中です。残念ながら、この種のアプローチは、遺伝子を導入した細胞が骨髄に生着するためのスペースが必要です。

それは、ブスルファンなどの抗がん剤が、骨髄のスペースをつくるために前処置として必要とされることを意味します。リスクベネフィット比の観点からこれには懸念があり、患者の安全性のため、その提案と計画は注意深く、慎重に行う必要があります。再度 AAV の欠点について戻りますと、AAV の改良点すべき点を述べたように、効果、治療効果の変動、治療効果の持続性についての対策が必要です。これまで、遺伝子治療の代替方法として、最近台頭している脂質ナノ粒子やレンチウイルスなどについてお話ししました。少なくともレンチウイルスについては、まもなく臨床試験が実施されるはずで、次に、遺伝子治療や遺伝子編集を組み合わせた細胞治療もあります。これは、第 VIII、第 IX 因子因子を発現させるための新しいアプローチではありますが、いまだに前臨床モデルから、臨床へは移行していません。ご静聴ありがとうございました。

