

## 遺伝子治療への展望

吉本勝彦\* 板倉光夫\*

### 要 旨

- 遺伝子治療は生殖系列細胞ではなく、体細胞を対象とする(体細胞遺伝子治療)。
- 理想的な遺伝子治療として「相同組換え」の方法が考えられるが、実際的には「遺伝子産物の補充療法」が主体である。
- 現実的な遺伝子の導入法として、レトロウイルスベクター系が主として用いられている。
- 最近、*in vivo* gene delivery の方法が確立

されつつある。

- 糖尿病に対する遺伝子治療の対象遺伝子として、インスリン、サイトカイン、増殖・分化因子の遺伝子などが考えられる。
- 膵ラ氏島 B 細胞の増殖分化にかかわる遺伝子、あるいはグルコース依存性インスリン分泌機構に関与する遺伝子群を単離するための方法として、cDNA ライブラリーの系統的解析が有用である。

### はじめに

サイトカイン遺伝子を用いて癌を治療する試みが、欧米を中心として行われ始めている。この遺伝子治療は、動物実験のみならず臨床の場においても進められつつあり、米国では組換え DNA 諮問委員会 (RAC) と食品医薬品庁 (FDA) による遺伝子治療の認可も、すでに 50 件を超えている。また、遺伝子治療は多くの遺伝子性疾患にその応用が期待され、遺伝子導入の方法やターゲットとする細胞の工夫、導入した遺伝子をどう制御するかなどという基礎的な研究が盛んに行われている。

本稿では、糖尿病の遺伝子治療の可能性について、著者らの基礎的データの一部を含めて概説したい。

### 遺伝子治療とは

正常な遺伝子を体内、体外の別を問わず、目的の細胞に導入してその遺伝子がコードする蛋白を発現させ、その機能を補充し正常化させることにより、疾患の治療を目指す治療法である。方法として、標的となる細胞の染色体の特定の

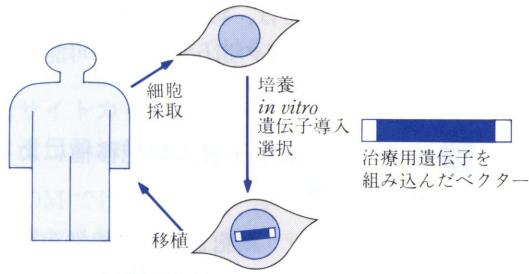
部位に特異的に遺伝子を挿入することが望ましい。これは「相同組換え」とよばれており、正常すなわち治療用遺伝子を障害のある遺伝子と正確に入れ換える方法である。この方法は、動物実験では低率ながら可能であるが、現時点では染色体の部位特異的に遺伝子を挿入すること、ましてや相同組換えを行うことは非常に困難である。そこで、多くの研究室では「遺伝子を単に追加して遺伝子産物を補充する治療法 (gene augmentation therapy)」の開発が進められている。

現在までのところ、次世代への影響を考慮して体細胞のみを対象としており、生殖細胞は遺伝子改変の影響が子孫にも受け継がれるため、現時点では検討の対象外である。米国では、アデノシンデアミナーゼ遺伝子の異常によって起こる重症複合型免疫不全症、LDL レセプター異常で起こる家族性高コレステロール血症に対する治療や、悪性腫瘍に対して TNF や IL-2 を腫瘍細胞や腫瘍部位に浸潤しているリンパ球に組み込み、抗腫瘍効果を増強させる癌治療が試みられている。

遺伝子治療の理想は 1 回の治療で何の副作用

\*Katsuhiko Yoshimoto, Mitsuo Itakura 徳島大学医学部臨床分子栄養学

## 1. 自家移植



## 2. *in vivo* gene delivery

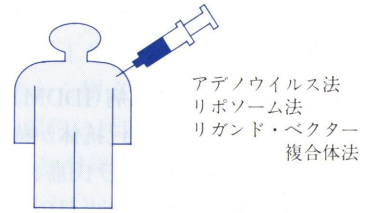


図1 遺伝子治療の方法

もなく、病気が一生治ってしまうことであり、自己再生能を有する幹細胞(たとえば骨髄幹細胞)を用いず、有限の寿命しか有さない成熟細胞を標的とする場合には、効果を永続するため何度も遺伝子導入を繰り返す必要がある。

### ● 遺伝子導入の方法

遺伝子治療の方法の概要を図1に示す。

外来遺伝子を標的細胞に導入する方法には、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法などの物理化学的方法と、ウイルスベクターを中心とした生物学的方法がある。レトロウイルスベクターは、遺伝子導入された細胞を得るまでのステップはやや複雑ではあるが、いったんウイルス産生細胞さえ作成しておけば、大量の細胞を処理する最良の導入方法であると考えられている。しかしながら、レトロウイルスは増殖している細胞にのみ感染するため、静止期にある細胞に遺伝子導入を行うことはできない。

また、目的の遺伝子をさまざまな工夫により、直接生体に投与し発現させる *in vivo* gene delivery の試みが報告されている。アジアグリコプロテイン (AGP) レセプターを介して AGP-遺伝子複合体を肝に特異的に配送したり、トランスフェリン受容体を介した方法のように、リガンドレセプターの関係を用いた細胞特異的導入法もある。導入効率を増加させるために、トランスフェリン-ポリリジン DNA 複合体とアデノウイルスの複合体形成による遺伝子導入

法も開発されている。しかし、この方法を *in vivo* に応用した場合、ポリリジンやリガンドに対する抗体が産生され、これにより連続注入の効果がなくなることが報告されている。

また、センダイウイルス (HVJ)-リポソーム法を用いた遺伝子導入が動物モデルで施行され、簡便さ、遺伝子が導入された組織分布の広さ、効率の良さ、安全性など良好な成績を示し、注目を集めている。これらの方法は遺伝子を薬物として用い、特異的に遺伝子を配送しうる可能性を有している。

アデノウイルスベクターは感染効率が高いうえに、分裂増殖期にない細胞にも感染できるという特徴がある。また、ヌクレアーゼ抵抗性を示すことにより、宿主ゲノムの中に組み込まなくても安定に核内に存在し、長期間(約1カ月)の遺伝子発現を望める。最近、本法を用いて培養豚ラ氏島に遺伝子導入を行い、実際に導入遺伝子が発現することが確認されている。欠点として、現在使用されているベクターはアデノウイルス固有の遺伝子を多く含むため、抗体産生を刺激する可能性や、またベクター作成が容易でないことがあげられる。

最近、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、癌における RAS, *c-myc*, p53 遺伝子に対して、また動脈硬化部位における増殖因子あるいは細胞周期調節遺伝子に対して、遺伝子治療が試みられている。オリゴヌクレオチドは化学構造物で、従来の医薬品と違わない面と、その標的が mRNA であるという特徴を有し、この方法は、従来の医薬品と遺伝子治療の中間



に位置するものと考えられる。

### ●どの遺伝子を糖尿病遺伝子治療の対象とするか

インスリン依存性糖尿病(IDDM)は、糖尿病発症の前や後に種々の自己抗体が検出され、膵に著明なリンパ球浸潤(膵ラ氏島炎)が認められることから、臓器特異的な自己免疫疾患の1つと考えられている。しかし、IDDMにおける膵ラ氏島炎の発症や膵ラ氏島炎から糖尿病に至るまでの機構は、いまだ明らかではない。発症後の治療としては、不足しているインスリンの遺伝子を用いた補充療法の必要性はいうまでもない。

IDDMの発症は急激であるが、膵ラ氏島病変は発症の数年以上前より始まっている場合もあると考えられており、発症前診断が可能となる場合や、発症後のいわゆるハネムーン期といわれる一過性の寛解期に、自己免疫機序に関与するとされるサイトカイン、接着因子、シグナル伝達にかかわるco-stimulatory factor、膵ラ氏島B細胞障害性因子に対し、細胞保護的に作用するとされるsuperoxide dismutaseなどを、膵ラ氏島B細胞あるいはその近傍に発現させること、およびglutamate decarboxylaseに対する自己寛容の誘導により、IDDMの発症を制御できる可能性が期待される。

わが国でのインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)では、グルコース刺激に対する選択的なインスリン分泌低下がその病態上の特徴としてあげられている。したがって、膵ラ氏島B細胞でのグルコースによるインスリン分泌機構を解明するとともに、その障害部位を同定することはきわめて重要である。また、現在までに特殊な型のNIDDMで、インスリン、インスリン受容体、グルコキナーゼ、ミトコンドリア遺伝子の変異による発症が知られているが、この発症を説明しうるのはNIDDMの1%以下と考えられる。

これらの遺伝子異常に対しては、「遺伝子導入による遺伝子産物の補充療法」のみならず、「遺伝子の置き換えによる遺伝子治療」の可

能性も考慮に入れる必要がある。一般的なNIDDMに対しては、疲弊した膵ラ氏島に対する増殖や分化因子の遺伝子治療の可能性が考えられる。

### ●インスリン遺伝子導入細胞移植による遺伝子治療

遺伝子導入を行う細胞としての線維芽細胞は、成人から容易に採取され培養可能なこと、レトロウイルスベクターに対する感受性が高いこと、自己の細胞を用いるため拒絶反応の可能性が低いという利点がある。また、この遺伝的に改造した細胞をコラーゲンをコートし、血管新生因子をしみこませたプラスチック線維の編み目上に播種して固化させることにより、neo-organを作成して移植することも可能である。

われわれはヒト・インスリン遺伝子を線維芽細胞に導入し、プロインスリン産生細胞を得、この細胞を糖尿病マウスに移植すると、速やかに血糖値の低下を認める動物モデルの開発に成功した<sup>1)</sup>。また、移植細胞を随時除去できる安全装置として同細胞表面へのCD8.2の発現と、これに対するモノクローナル抗体を組み合わせた免疫学的安全装置、あるいは細胞に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子を導入しておくことにより、抗ウイルス剤であるガンシクロビルに対する感受性を導入細胞にだけ特異的に与えておく、分子生物学的安全装置を開発した。

また、群馬大学の竹内ら<sup>2)</sup>は、導入インスリン遺伝子内にプロセッシング酵素の1つである*furin* 遺伝子産物で分解されるような変異を導入し、かつ*furin* 遺伝子を共に細胞に導入することにより、成熟したインスリンを分泌する非内分泌細胞を確立している。

遺伝子導入細胞数のコントロールによるプロインスリン分泌量の調節には、ある程度成功したものの、臨床応用を可能とするためには、血糖値の変化に伴ったインスリン遺伝子の発現レベルでのコントロールが必須であるが、現時点ではその調節は困難である。今後、グルコース依存性インスリン合成分泌機構が明らかにされ

れば、前述の neo-organ 法などを用い、直接門脈に分泌されるような、理想的な人工膵ラ氏島 B 細胞の作成も夢ではないと思われる。

### ● サイトカイン遺伝子導入による 遺伝子治療

IDDM では浸潤リンパ球やマクロファージより分泌されるサイトカインにより、膵ラ氏島 B 細胞の抗原が正所性(マクロファージ, B リンパ球)または異所性(膵ラ氏島 B 細胞)に発現し、自己抗原を認識する T 細胞の出現とサイトカインの作用により、自己免疫反応が引き起こされると考えられている。

われわれは、IDDM のモデル動物である NOD マウスにおける糖尿病発症を抑制させる目的で、膵ラ氏島 A 細胞から免疫抑制性サイトカインと考えられている IL-10 を発現させる IL-10 トランスジェニック NOD マウスを作成したところ、通常の NOD マウスでは糖尿病を発症しない早期から糖尿病を発症すること、しかも糖尿病発症率の低い雄のすべての founder mice で糖尿病発症が確認された。膵ラ氏島炎とともに、通常の NOD マウスでは認められない膵外分泌腺の炎症も認められた。以上より、IL-10 トランスジェニック NOD マウスでは、当初の予想に反して、むしろ自己免疫の病態を促進することが明らかにされた。

最近、膵ラ氏島 B 細胞より IL-10 を発現させる IL-10 トランスジェニック BALB/c マウスが作成され、膵組織に強度の炎症細胞浸潤をきたすが、ラ氏島炎および糖尿病を惹起しないことが報告された<sup>3)</sup>。これらの結果より、*in vitro* の系で明らかにされてきた IL-10 の作用は免疫抑制作用が中心であるが、トランスジェニックマウスで胎生期より局所に発現させた系では、むしろ催炎症および自己免疫促進効果を発揮することが明らかとなった。さらに、この系を用いて他の抑制性サイトカイン(TGF- $\beta$ , IL-1 receptor antagonist)の NOD マウスにおける膵ラ氏島炎、および糖尿病発症に及ぼす影響を検討中である。

さらに、得られた結果を遺伝子治療に応用す

るため、サイトカイン遺伝子を導入した膵ラ氏島 B 細胞特異的 T 細胞を NOD マウスに養子移入し、その効果についても検討し始めている。大阪大学細胞工学センター中野ら<sup>4)</sup>により NOD マウスから樹立され、膵ラ氏島に浸潤し膵ラ氏島 B 細胞に反応する自己反応性 T 細胞クローンは、放射線照射した I-E 発現 NOD マウスあるいは NOD-*scid* マウスに移入することで、膵ラ氏島炎を誘導することができる。この細胞株の膵ラ氏島炎部位に集積する性質を利用して、この細胞株に抑制性サイトカイン遺伝子を導入し、NOD マウスに養子移入を行うことにより、膵ラ氏島炎の局所でしかも高濃度に作用させることにより、膵ラ氏島炎の抑制あるいは糖尿病の予防的治療が可能か否か検討中である。

### ● 膵ラ氏島に対する増殖因子による 遺伝子治療

NIDDM では、肥満などでインスリン抵抗性になって血糖が上昇し始めたとき、ある時点になるとインスリン過分泌からインスリン分泌不全に変換する、いわゆる「膵ラ氏島 B 細胞の疲弊」の現象がみられる。またグルコース刺激に対するインスリン分泌反応の遅延、第一相反応の低下ないし欠如は、正常ラットの膵部分切除によっても認められる現象なので、膵ラ氏島 B 細胞数の量によって規制されると考えられている。そこで、膵ラ氏島に対する増殖因子を投与してやれば、膵ラ氏島 B 細胞数の増加により、疲弊の進展が阻止できる可能性が考えられる。

膵ラ氏島に対して、成長ホルモンファミリー(成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクトゲン)、EGF、PDGF 等の既知の増殖因子やガストリン、コレシストキニンなどの消化管ホルモンなどが増殖促進的に作用することが知られているが、いずれも *in vivo* でその作用を示すかどうか明らかでない。東北大学の岡本ら<sup>5)</sup>により単離された *reg* は、*reg* 蛋白を膵部分切除ラットに投与すると膵再生が促進されることより、現時点で唯一 *in vivo* で作用する膵ラ氏島



## ●糖代謝障害の治療(最近の話題)

B細胞再生因子として知られている。また、腓ラ氏島細胞株より単離されたベータセルリン<sup>6)</sup>などのような血管新生因子も、増殖に関与する可能性がある。

最近、TGF- $\alpha$ とガストリンのダブルトランスジェニックマウスを作成したところ、両者の作用により腓ラ氏島の体積が増大したとの報告があり、興味深い<sup>7)</sup>。

これらの増殖関連遺伝子を *in vivo* gene delivery 法にて、腓ラ氏島で発現させることにより、効率よく残存腓ラ氏島 B 細胞の増殖が図れば、完治の可能性も高くなると思われる。

## ●糖尿病遺伝子治療のための候補となる未知の遺伝子の検出同定法

骨髄系、リンパ球系細胞などさまざまな組織から、細胞増殖因子、分化因子などが見いだされている。腓ラ氏島 B 細胞については、auto-crine あるいは paracrine に作用する因子について、これまでに系統的な解析はなされていない。cDNA ライブラリーの解析は未知の遺伝子を検出し、その特徴を記述し、分類整理する意味で、ゲノムプロジェクトの中でも重要な位置を占めており、各国で解析研究が盛んに行われ始めている。

われわれは、腓ラ氏島 B 細胞に対する増殖因子、分化因子やグルコース依存性インスリン分泌にかかわる遺伝子群を単離する目的で、グルコース依存性インスリン分泌を示す MIN 6 細胞株から cDNA ライブラリーを作成した。この中から無作為に抽出したクローンの 3' 側の数百塩基の塩基配列決定を行った。DNA 自動シーケンサーにより読みとられた配列データを、GenBank データベースと比較することにより、既知の遺伝子配列か未知の塩基配列であるかを決定した。さらに、クローンより RNA プローブを作成し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、組織内での分布、発現量、その経時変化などをモニターする予定である。

塩基配列の決定を行った約 1,700 クローンのうち、約半数が独立した遺伝子で、このうち約 30% のクローンが既知遺伝子で、残り約 70%

が未知遺伝子であった。また、ノーザン解析によりハウスキーピング遺伝子と考えられるものが約半数を占めるが、残りのクローンは線維芽細胞には発現せず、MIN 6 細胞のみに発現していた。このうち、グルコース濃度に応じて発現が高まる未知のクローンも数個得られており、解析を進めている。

したがって、腓ラ氏島 B 細胞で発現している mRNA に対する cDNA の系統的な解析は糖尿病の遺伝子治療に役立つ細胞特異的な遺伝子産物を提供する大きな可能性を有していると考えられる。

## ●今後の展望

遺伝子治療法の確立には、目的の遺伝子を目的の細胞に特異的に効率よく導入し、至適の量で、時には人為的に、あるいは環境変化により発現調節可能な状態で発現できる方法の開発が必要である。病気や病態の遺伝子レベルにおける本質が明らかにされるにつれて、新しいアイデアや工夫が付加されて、遺伝子治療はさらに形を変えるに違いない。遺伝子治療は、ようやく夢から現実の領域に入ってきたばかりにすぎないが、他の治療法を凌駕する可能性があり、21 世紀には従来の医療にとって代わる場合があると想像される。遺伝子レベルでの疾患の治療という概念がきわめて重要で、今後積極的に推進すべき研究課題と考えられる。

## 文 献

- 1) Kawakami, Y. et al.: Somatic gene therapy for diabetes with an immunological safety system for complete removal of transplanted cells. *Diabetes* **41**: 956-961, 1992.
- 2) Yanagida, M. et al.: Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines. *Endocrinology* **133**: 639-644, 1993.
- 3) Wogensen, L. et al.: Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J. Exp. Med.* **178**: 175-185, 1993.
- 4) Nakano, N. et al.: T cell receptor V gene usage of

- islet  $\beta$  cell-reactive T cells is not restricted in non-obese diabetic mice. *J. Exp. Med.* **173**: 1091-1098, 1991.
- 5) Terazono, K. et al.: A novel gene activated in regenerating islets. *J. Biol. Chem.* **263**: 2111-2114, 1988.
- 6) Shing, Y. et al.: Betacellulin: a mitogen from pancreatic  $\beta$  cell tumors. *Science* **259**: 1604-1607, 1993.
- 7) Wang, T. C. et al.: Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor  $\alpha$ -induced ductular precursor cells. *J. Clin. Invest.* **92**: 1349-1356, 1993.