

タイトル：遺伝子治療で変わる人生

著者： Wendy Haines

(Pharmaceutical Engineering, 2021, Vol. 41, No. 6, 34–39)

翻訳： 京都大学大学院医学研究科薬剤疫学分野 大学院生 稲山 嘉英 (Yoshihide INAYAMA)

はじめに

新薬や新製品を市場に送り出す過程においては、創造性、既成概念にとらわれない発想、そして一つの発見をするまでに幾度も失敗する勇気が必要とされる。産業界は現在、COVID-19の大流行に直面しており、ワクチンや治療薬が記録的な速さで市場に出て人々の健康を改善していることに疑問を感じていることは事実である。本稿では、遺伝子治療を深く掘り下げ、1940年代から1950年代にかけてのワクチン開発から遺伝子治療に至る過程、そしてこれらの開発の過程が現代医学の展望をいかに不可逆的に変えてきたかを紹介する。

ワクチン開発を振り返ってみると、産業界が歩んできた過程がよくわかる。1940年代から1950年代にかけて、ポリオウイルスが世界を席卷した。1940年代のワクチン開発のパラダイムは、生きているが弱毒化された微生物を分離することであった。そして、弱毒化したウイルスを被験者に投与して、軽度の無害な感染を起こさせ、長期的な免疫を獲得するというものであった。ジョナス・ソーク博士のアプローチはユニークで、彼と同僚は抗原性を維持したまま（ホルムアルデヒドを使用することで）非感染性不活化ポリオウイルスを開発した [1]。アルバート・サビン博士とヒラリー・コプロウスキー博士も1950年代にポリオウイルスの研究に取り組み、ポリオウイルスの3つの株すべてを含む3価の経口ワクチンである弱毒生ポリオワクチンを開発した。

遺伝子治療への過程

次に、遺伝性疾患の修正遺伝子を届けるために、研究者たちがウイルスに注目した時代へと話を進める（図1）。当初、多くの人がこれは実現不可能で突飛なアイデアだと考えていた。しかし、1970年代後半、ジュード・サムルスキー博士が博士課程での研究でアデノ随伴ウイルス（*adeno-associated virus*; AAV）のクローン作成法を発見し、この発見は多くの難病に遺伝子治療の道を開ききっかけとなった [2]。1988年、米国科学アカデミーはヒトゲノム・プロジェクトの目標を初めて宣言した。このプロジェクトは発展を遂げ、すべてのヒトの遺伝子をマッピングし、理解するための国際的な共同プログラムとなった [3]。私は幸運にも、国立衛生研究所のヒトゲノム・プロジェクトの、脳の発達に関与する遺伝子を特定する研究チームの一員になることができた [4]。2001年2月にゲノムの大部分が公開さ

れた後、当時国立ヒトゲノム研究所の所長であったフランシス・コリンズは次のように述べている。「ヒトゲノムは歴史書であり、人類が時間をかけて歩んできた道のりを物語っている。それは店舗のマニュアルであり、ヒトの細胞一つ一つを作るための信じ難いほど詳細な設計図が載っている。そしてそれは、医療従事者に病気の治療、予防、治癒のための膨大な新しい力を与える洞察に満ちた、斬新な医学の教科書でもある。」

アデノウイルス (AdVs) は、多様性に富むアデノウイルス科に属する、ビリオンのサイズが 70~90 nm の非エンベロープ型の正 20 面体 DNA ウイルスである [5, 6]。AdVs は 1953 年にヒトのアデノイド組織から初めて分離された。AdVs は通常、ヒトおよび動物において無症状の呼吸器感染症を引き起こすが、免疫不全の個体では生命を脅かす感染症となる可能性がある [7, 8]。さらに、AdVs は多くの種類の細胞に感染することができるため、遺伝子導入用ベクターとしての利用が促進され、がんや循環器疾患などの重要な疾患の革新的治療のための新しいツールを生み出すこととなった [9-12]。

AAV

AAV は、パルボウイルス科に属する、直鎖状の一本鎖 DNA ゲノムを持つ 25-nm の小型非エンベロープウイルスである [13, 14]。現在までに 13 種類の異なる血清型 (AAV1-AAV13) が存在し、100 種類以上の変異体がヒト/非ヒト霊長類から分離されているが、AAV 感染に関連した疾患は報告されていない [14-17]。AAV の血清型は、そのカプシド配列により、組織ごとに異なる遺伝子導入効率を持つ [16, 18]。この AAV 血清型の遺伝子導入効率を利用して、特定の組織や細胞の種類をターゲットにした遺伝子治療が行われてきた。AAV ベクターを用いた最初の臨床試験は 20 年以上前に実施された。その試験では、軽度の肺疾患を持つ成人の嚢胞性線維症患者において、組み換え AAV ベクター (rAAV) を介し嚢胞性線維症膜貫通調節因子 (cystic fibrosis transmembrane regulator; CFTR) の導入遺伝子が用いられた [19]。2012 年、リポタンパク質リパーゼをコードする rAAV1 ベクターは、この酵素欠損症の患者に対する治療処置として欧州委員会に承認された [20]。

AAV は、野生型ウイルスに関連する疾患がないこと、非分裂細胞に対して遺伝子導入できること、長期間にわたって強固に導入遺伝子を発現できることから、遺伝子治療のための好ましいベクターである。AAV ベクターは、血管系を介して全身に送達され、非病原性であり、広範な分裂細胞および非分裂細胞に感染でき、血清型により組織向性が異なることから、*in vivo* 応用に好ましい遺伝子送達システムである [14, 21, 22]。AAV ベクターは、遺伝子導入においてアデノウイルスにほぼ取って代わっており、多くの臨床試験が開始されている。米国では 100 以上の試験が募集中、または継続中であるが募集は終了している状態である [23]。遺伝子治療研究で使用されるアデノウイルスベクターとは対照的に、AAVs では自然免疫反応の経過が穏やかであり、これは良好な安全性プロファイルおよび低毒性の重要な要素である [24]。

ゲノム編集と CRISPR

細胞の DNA 配列を正確に改変する「ゲノム編集」は、研究ツールとして広く利用されており、現在では遺伝子治療の開発にも利用されている。遺伝子編集技術の進歩に伴い、CRISPR-Cas9 システム（または CRISPR、clustered regular interspaced short palindromic repeats の略）が登場した。

2011 年、エマニュエル・シャルパンティエ博士とジェニファー・A・ダウドナ博士は、Cas9 という酵素を使って侵入したウイルスの遺伝子を「切断」する細菌の免疫系に興味を抱いた。シャルパンティエ博士は、一对のバクテリア RNA 分子が、どのようにこのプロセスを制御しているかについての研究結果を発表した [25]。そして彼らは、ウイルスの防御システムをプログラム可能な遺伝子編集ツールに変える方法を開発し、新しい分子、シングルガイド RNA を合成した。このシングルガイド RNA は2つのバクテリア RNA の主要な特徴を併せ持ち、Cas9 が DNA の特定の部位を切断するように指令するものである [26]。

2020 年、シャルパンティエ博士とダウドナ博士は「ゲノム編集のための手法の開発」によりノーベル化学賞を受賞した [27]。カリフォルニア大学バークレー校の遺伝子編集科学者であるフォードル・ウルノフは以下のように述べている。「ジェニファーとエマニュエルの発見のようなインパクトを持つ生物学の発見は、組み換え DNA、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、DNA 配列決定、そして今回の CRISPR と、片手の指で数えることができるほどである。CRISPR によるゲノム編集ほど、強力で汎用性の高い技術は今までになかった。」

CRISPR-Cas9 システムは、使用が簡単で、部位特異的活性を示し、オフターゲット効果が限定的であることから、ゲノム編集の強力なツールである [28]。CRISPR-Cas9 システムは、Cas9ヌクレアーゼから構成されており、短鎖ガイド RNA と複合体を形成すると、様々な DNA 配列に二本鎖切断を生じさせることができ、これは真核生物のゲノムでも原核生物のゲノムでも起こる [26, 27]。CRISPR-Cas9 システムは、細胞の *ex vivo* 編集とそれに続く患者への移植、あるいはウイルスベクター (AAV) やナノ粒子を用いた CRISPR-Cas9 システムの導入による患者細胞の *in vivo* 編集といった、新しい細胞治療の創出に応用されている [29–34]。

CRISPR-Cas9 システムは、ヒト細胞において標的遺伝子の改変を効率的に行うため、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Neisseria meningitidis* などの複数の細菌種から取り入れられた。CRISPR-Cas9 システムはシングルガイド RNA 分子と、共発現する Cas9ヌクレアーゼから構成されている [26, 28, 35–37]。Cas9 はシングルガイド RNA の 3' 末端と複合体を形成する。シングルガイド RNA 配列の 5'末端と、プロトスペーサーとして知られる 20 塩基対の予め定義された DNA 配列の間に相補的塩基対が形成され、このタンパク質-RNA ペアは、ゲノム標的を認識する [38]。発現したシングルガイド RNA の 20 塩基対の認識配列を交換するだけで、Cas9ヌクレアーゼを新しいゲノム標的に誘導することができる [39]。

事例紹介

ウイルスベクターと CRISPR が現代医学の展望をどのように変えたかを理解した上で、致命的な遺伝性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD) の治療法を提供するため、これら 2 つの技術が用いられた例を検討しよう。

DMD は、希少な X 連鎖性の致死的神経筋変性疾患で、全世界の男児出生 5,000 人に 1 人が罹患すると推定されている [40–42]。DMD は単一の遺伝子、DMD 遺伝子の変異によって引き起こされ、機能的ジストロフィンタンパク質の欠損をきたす [43]。ジストロフィンとは、細胞骨格の F-アクチンと β -ジストログリカンおよび細胞外マトリックスを、それぞれ N 末端および C 末端ドメインを介して結合させている [44]。ジストロフィンの翻訳の早期中断を引き起こす遺伝子変異の結果として非機能的で不安定なジストロフィンタンパク質が合成される [45]。このジストロフィンタンパク質は一般的な診断技術では通常検出不可能である [45]。ジストロフィンとは、筋細胞におけるジストロフィン関連タンパク質複合体の極めて重要な構成要素であり、筋繊維の剛性の維持だけでなく、筋収縮時の機械的ストレスからの保護にも必須である [46–49]。

骨格筋や心筋の細胞を機械的ストレスから守るジストロフィンの重要な役割を考えると、DMD 患者では、筋組織の進行性的変性により運動症状が出現し、重要な機能が失われることになる [50, 51]。DMD と診断された若年男性では、運動遅延に続いて機能低下が起こり、10 代前半で歩行機能が喪失、車椅子に依存することとなり、食事などの日常動作を行うことができなくなる [23]。さらに、横隔膜の機能低下により、10 代から 20 代にかけて呼吸障害、心機能障害及び人工呼吸器の使用が増加し、疾患の進行により心筋症、呼吸不全、若年での死亡に至る [52]。DMD に治癒はなく、対症療法（基本的には理学療法、補助換気、グルココルチコイド）が可能であるが、ほとんどの患者にとっては満足な症状緩和や疾患修飾治療はない [42]。

DMD 患者には 7,000 以上の異なる遺伝子変異が報告されている [53]。これらの遺伝子変異の共通点はジストロフィンが機能しないことである。しかし、多くの DMD 患者は意外にもベッカー型筋ジストロフィー (Becker muscular dystrophy; BMD) タイプのジストロフィンを微量に産生することができる [54]。エクソン 45 の欠失は DMD 患者に最も多く見られる欠失の一つであるが、エクソン 44 と 45 の欠失は、一般に BMD として知られる進行性の低い筋ジストロフィーの対立形質と関連している [43]。したがって、DMD 患者のプレメッセンジャー RNA (mRNA) 転写物においてエクソン 44 をバイパスすることができれば、リーディングフレームを復元し、部分的に機能する BMD 様ジストロフィンの産生が可能になる [44]。エクソン 44 と 45 の欠失は非常に軽度のベッカー表現型と関連しており、無症候性の個体にさえ見られる [55]。エクソン 44 に隣接する欠失を持つ患者は、非常に低い程度ではあるが、エクソン 44 を自発的にスキップする。この結果、他の欠失を持つ DMD 患者と比較してジストロフィンのレベルがわずかに上昇し、これが、これらの患者では観察される疾患の進行が他の欠失を持つ DMD 患者と比較してより軽微であることの最も大きな原因

となっていると考えられる [43, 56, 57]。DMD の遺伝子治療は、変異または欠失したジストロフィン遺伝子を補う機能的遺伝子を導入することにより、横隔膜や心臓を含む骨格筋の主要な標的組織において機能的ジストロフィンを特異的に回復させ、この疾患の根本的な遺伝的要因を解決するはずである。

新しい遺伝子治療のアプローチ

DMD の治療に AAV ウイルスベクターを使用しているのは、Astellas Gene Therapies 社 (旧 Audentes Therapeutics) と Regenxbio 社の 2 社である。Astellas Gene Therapies 社は、AAV ベクターアプローチを用いている。このベクターはアンチセンス配列を運ぶ改変 U7 核内低分子 RNA (small nuclear RNA; snRNA) をコードしており、ジストロフィン遺伝子の遺伝配列の欠陥部分をスキップするように細胞を誘導し、機能的ジストロフィンタンパク質の産生レベルを回復する [58]。Astellas Gene Therapies 社は Nationwide Children's Hospital と共同で、DMD 遺伝子のエクソン 2 の重複を持つ DMD 患者を対象に、この遺伝子治療による初のヒト臨床試験を実施中である [58]。将来の AAV-U7 snRNA ベースのエクソン・スキップ療法による DMD 治療の実現にむけて、前臨床試験と臨床試験が共に行われている。さらに、ジストロフィン遺伝子のエクソン 2 の重複及びエクソン 1-5 の変異を有する DMD 患者の治療目的に、エクソン 2 スキップを誘導する AAV アンチセンス療法である AT702 が開発されている [58]。Astellas Gene Therapies 社では、さらに 2 つの製品、AT751 と AT753 を開発中であり、これらはエクソン 51 とエクソン 53 のスキップ療法の効果が見込まれる遺伝子型を持つ DMD 患者の治療を目的としたエクソン・スキップ療法である [58]。AT702 と同様のベクターの基盤が、AT751 と AT753 の双方に使用されており、これにより臨床使用に向けて開発を加速させることが可能となっている。これら 3 つの製品またはプログラムを通じて、DMD 患者の 25% を治療することができ、さらに将来治療候補となるものも加えると、DMD 患者の 80% までがターゲットとなることとなる [58]。

Regenxbio 社のアプローチは、Astellas Gene Therapies 社とは異なるが、同じく AAV ベクターを用いた、筋細胞を標的とした治療である。RGX-202 は、特許の新規 AAV (NAV) ベクターである、マイクロジストロフィンをコードする血清型 8 のカプシド (AAV8) により、筋細胞へと運ばれる [59]。NAV テクノロジープラットフォームは、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10 の独占的権利と 100 以上の新規 AAV ベクターからなり、NAV ベクターに関する特許および特許出願は全世界で 100 件以上に及んでいる [60]。NAV ベクターの使用には初期の AAV ベクターの使用と比較して、多くの利点がある。複数の病態に幅広く使用できること、免疫応答を誘発する可能性が低いこと、遺伝子発現の向上により、少ない投与量で長期間治療が可能となったこと、製造工程がより複雑でないことなどである [60]。RGX-202 は、機能向上に寄与する独自の C 末端ドメイン、骨格筋および心筋におけるマイクロジストロフィンの発現を誘導する筋特異的プロモーター (Sp5-12)、および免疫原性の低下と遺伝子発現の改善に関わる追加機構から成る [59]。RGX-202 は単回投与療法で、前臨床段階

での開発が進んでおり、2021年半ばにヒトでの最初の臨床試験が予定されている。

我々体内の細胞に DNA や RNA を届けるのに使われるいくつかの方法があり、これらは改変して CRISPR の構成要素の運搬に利用することができる。その方法はウイルス性のもの及び非ウイルス性のものの 2 つに分類される。非ウイルス性の方法としては、脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticles; LPNs) と mRNA を利用する方法がある。LPNs には、肝臓への送達の枠を超えて発展した、効能が増大した、および忍容性が改善したといった長所がある。LPN プラットフォームでは、Cas9 をコードする mRNA とガイド RNA がカプセルに内封されており、また、必要に応じてドナー DNA テンプレートが、これらの構成要素を肝臓へ送達するために使用される。CRISPR Therapeutics 社は、マサチューセッツ工科大学と提携し、肝臓を標的とした LPN 技術と CRISPR を用いた薬物療法の開発を行っている [60, 61]。CRISPR と共に mRNA を薬物治療に用いる利点は、組織特異性、発現期間制御、効能の向上である。さらに、CRISPR Therapeutics 社は肝臓のアライメントを標的とした mRNA/CRISPR プログラムについて CureVac 社と提携した [61]。

ウイルスベクターは、多数の臓器を標的として、Cas9 をコードする DNA とガイド RNA を体内の特定の組織に送達することができる [61]。ウイルスベクター/CRISPR 技術製品の標的となる臓器系の例としては、筋肉、肺、中枢神経系が挙げられる。AAV ベクターは、CRISPR 技術と組み合わされる主要なベクターである。In vivo 送達に関わるウイルスベクターとしての AAV の利点には、免疫原性が低減されたこと、自己不活性化、組織特異性の向上などが挙げられる。

前述したように、DMD の原因となりうる遺伝子変異は数多く存在するため、Vertex Pharmaceutical 社と CRISPR Therapeutics 社は、疾患の原因となる多くの変異を標的とした、いくつかの異なる遺伝子編集プログラムを持っている。Vertex Pharmaceuticals 社は CRISPR Therapeutics 社と提携し、AAV ベクターと CRISPR 技術を組み合わせて DMD の治療を行っている [61, 62]。この治療法は、AAV ベクターを用いて、例えば筋組織などの体内の特定の組織に、ガイド RNA に対する Cas9 をコードする DNA を送達し、DMD の遺伝子治療を行うものである [61, 62]。DMD 治療のため、Vertex Pharmaceuticals 社と CRISPR Therapeutics 社は、CRISPR 遺伝子編集技術と AAV9 ウイルスを用いて、変異した DMD 遺伝子をリフレーミングしてジストロフィンタンパク質の発現を回復させている [62]。

結論

DMD の遺伝的原因はわかっているが、多くの遺伝性疾患と同様、遺伝子編集による治療が可能性として挙がるまで治療法は存在しなかった。遺伝性疾患を根本原因から治療できるようになれば、我々の世界は一変し、これまでなかった希望が生まれる。我々は現在、エキサイティングな時代に生きているといえよう。これまで遺伝性疾患の治療法がなかった人々に治療を提供することができ、彼らは疾患の多様な症状をコントロールするための治療を受ける機会を得ることができるのである。遺伝性、後天性を問わず、人間のさまざま

まな病気がうまく治癒できるようになると、私は信じている。

本文以上

<図表の説明>

図1 遺伝子治療の開発年表