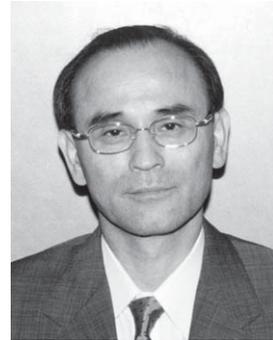


インターフェロンと遺伝子治療

名古屋大学大学院医学系研究科教授 吉田 純



今日は私と岡野先生の講演会に、たくさんの皆様方においでいただきましてありがとうございます。また、この科学講演会を企画し、私どもに講演をする機会を与えていただきました東レ科学振興会に感謝申し上げます。

私の本職は脳神経外科医であります。脳卒中あるいは脳腫瘍の外科手術を専門にしております。また同時に、昨年名古屋大学にトランスレーショナルリサーチセンターとして遺伝子・再生医療センターが発足し、私はそのセンター長をしています。その関係で、先端医療の開発にも積極的に取り組んでおります。本日の講演会のテーマは、遺伝子あるいは細胞そのものを使った新しい医療、遺伝子治療と再生医療がテーマです。そこで私からは、インターフェロンと遺伝子治療をテーマにお話をさせていただきます。

では講演を始めるにあたりまして、短いビデオをまずお見せします。

(ビデオ開始)

20世紀後半は生命科学の時代といわれ、1953年のワトソンとクリックのDNA二重らせん構造の解明に始まり、遺伝子組換え技術の確立、臨床応用可能な遺伝子導入用ベクターの開発など、次々に新しい技術が誕生してきました。その後ヒトゲノムプロジェクトにより30億塩基対からなるヒトゲノムが解明され、神経幹細胞の分離、同定、さらにはその分化誘導技術の開発など、加速度的に技術の向上が続いています。

一方ではコンピュータ工学や情報工学の革

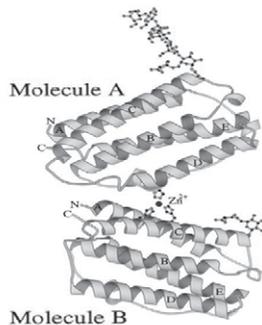
命的進歩が加わり、21世紀の生命科学はバイオテクノロジーとコンピュータテクノロジーの上に開発される高度先端医療の時代といわれています。遺伝子診断、遺伝子治療を中心とする遺伝子医療、細胞、組織、臓器再生を目指す再生医療、ロボテックサージャリー、モレキュラーサージャリー、ナノサージャリーなど、医療情報工学医療が次々と登場し、実践されていくものと思われま

す。最近の研究により、癌に代表される悪性腫瘍は、遺伝子の異常によって発生することがわかってきました。これにより発生原因となっている異常遺伝子を修復することで、悪性腫瘍を根本から治すことができる可能性が出てきました。これを実現しようとする治療が遺伝子治療です。

(ビデオ終了)

図1はインターフェロン蛋白とその遺伝子を構成しているDNAの立体構造を示しています。インターフェロンとDNAは20世紀の半ば、いまから約50年前に発見されました。その後、多くの研究者によりインターフェロンとDNAの働き、生命の神秘に迫る働きが次々に明らかにされ、同時にこうした研究成果を臨床に応用するための橋渡的研究、トランスレーショナルリサーチが進められました。その結果、インターフェロン蛋白は今から約20年前に、また、遺伝子は今から約10年前にそれぞれ臨床で使われるようになりました。私は本日このインターフェロン蛋白を使った医療の現状と、遺伝子治療の基礎研究、

インターフェロン蛋白



Karpusas M, et al.

PNAS USA. 1997;94(22):11813-8.

遺伝子 (DNA)

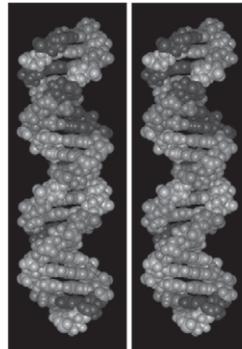


図1 蛋白から遺伝子へ

そして臨床研究、将来展望について、私が現在開発を進めていますインターフェロン遺伝子治療を中心にお話をさせていただきます。

ヒトの体は約60兆個の細胞からなっています。その一つひとつの細胞は全く別々に働いているわけではなく、生命を維持するため、お互いに情報交換を行っています。そして病気がかかった場合、これらの細胞は鋭敏に反応します。感染症あるいは外傷などでは外部から、癌や高血圧、糖尿病などの生活習慣病では内部から異常シグナルが発生します。その異常シグナルに対してまずは炎症細胞、免疫細胞が動員され、また場合によっては血管内皮細胞が反応し、これらの細胞からたくさんの生理活性物質、生体防御を担う物質、われわれはこれをサイトカインと呼んでいます

が、そうしたサイトカインが産生、分泌され、臓器細胞の防御あるいは修復を促し、そして臓器あるいは個体のホメオスタシス、生命機能が守られています。

こうした生体防御を担うサイトカインはこれまで数多く発見され、その一部は分離・精製され治療に用いられています。サイトカインは図2に示

しますように機能と分泌する細胞によりリンフォカイン、モノカイン、ケモカイン、増殖因子、コロニー刺激因子、抗ウイルス物質に分類されています。この中で最も古く発見されたのが抗ウイルス物質であるインターフェロンです。

インターフェロンを世界に先駆けて発見したのは日本人であります。当時の伝染病研究所、いまの東大医科研で研究されていた長野泰一博士(図3)が1954年に、ウイルス感染から生体を守る、ウイルス抑制因子virus inhibitive factorを発見いたしました。同じような研究は海外でも行われています。イギリスではIsaacs、Lindenmanのお2人が抗体ではなくウイルスの増殖を抑制する、ウイルス干渉物質を1957年に発見しました。それ

以後、世界中でこれらの物質がインターフェロンという名前と呼ばれるようになりました。

インターフェロンは主に3種類に分類されています。一つは白血球にウイルスを感染した時に産生される α 型、線維芽細胞にウイルス、あるいはpoly I:Cで刺激したときに産生される β 型、そしてリンパ球や血管内皮細胞に抗原を結合させた場合

<p>A. リンフォカイン,モノカイン</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ インターロイキン(IL)1~30 ・ インターフェロン(IFN)-γ ・ 腫瘍壊死因子(TNFまたはTNF-α)、リンフォトキシン(LTまたはTNF-β) 	<p>D. コロニー刺激因子(CSF)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ M-CSF ・ G-CSF ・ GM-CSF
<p>B. ケモカイン</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ IL-8 ・ RANTES ・ I-309/TCA-3 ・ γIP-10 ・ MIP-1α, MIP-1β, MIP-2 ・ MCP-1, 2, 3 	<p>E. 抗ウイルス物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ インターフェロン(IFN)-α ・ インターフェロン(IFN)-β ・ インターフェロン(IFN)-γ
<p>C. 造血因子</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ エリスロポエチン(EPO) ・ トロンボポエチン(TPO) ・ ステムセルファクター(SCF) ・ 白血病阻害因子(LIF) 	<p>F. 増殖因子</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 上皮増殖因子(EGF) ・ トランスフォーミング増殖因子(TGF) ・ 血小板由来増殖因子(PDGF) ・ ケラチノサイト増殖因子(KGF) ・ インスリン様増殖因子(IGF) ・ 神経増殖因子ファミリー(NGF) ・ brain-derived neurotrophic factor(BDNF) ・ ciliary neurotrophic factor(CNTF) ・ oncostatin M(OSM) ・ 肝細胞増殖因子(HGF)

今西二郎著 医学のあゆみ「サイトカインと疾患」より

図2 サイトカインの分類



長野泰一博士

図3 インターフェロンの発見者

1954年 ウィルス抑制因子 (virus inhibiting factor)

に産生される γ 型です。インターフェロンの生物活性はこれまでたくさん知られていますが、代表的な活性はまず抗ウイルス作用、そして細胞増殖抑制作用、つまり抗癌剤としての作用、またリンパ球、白血球、マクロファージ、血管内皮などを介する免疫調整作用、大きく分けてこの三つがあります。

インターフェロンはいまから20年前に臨床応用がされ、これまで多くの難治性疾患の治療でその有効性が確立されてきました。代表的な疾患を図4に挙げています。癌の中では慢性骨髄性白血病、腎細胞癌、悪性黒色腫、私が専門にしています脳腫瘍の治療、そして肝癌の予防治療にも有効であることがわかってきました。さらに、インターフェロン治療で最も注目を集め、その有効性が確認されているのは肝炎であります。B型肝炎、C型肝炎

● 癌

- ・慢性骨髄性白血病
- ・肝癌(予防)
- ・腎細胞癌
- ・脳腫瘍(膠芽腫、髄芽腫、星細胞腫)
- ・悪性黒色腫

● 感染症

- ・B型肝炎
- ・C型肝炎

● 自己免疫疾患

- ・多発性硬化症

図4 インターフェロンの臨床応用

炎ではたくさんの患者さんがインターフェロン治療の恩恵に預かっています。また最近自己免疫疾患であり、脳の難病のひとつである多発性硬化症にもインターフェロンが効くことがわかり、臨床に応用されてきました。

たとえば慢性骨髄性白血病に対するインターフェロン治療は10年前に開始されています。インターフェロンを使うことによって患者の白血球数、血小板数、あるいは脾臓の肥大が正常化します。こうした血液学的な寛解が、インターフェロン治療を行った患者さんの80%ないし90%に得られています。また同時に慢性骨髄性白血病の場合には原因遺伝子が解明されています。9番の染色体と22番の染色体が転座し形成されますフィラデルフィア染色体です。このフィラデルフィア染色体が慢性骨髄性白血病に関与することは古くからわかっていましたが、実際の原因遺伝子は22番染色体のBCR遺伝子と9番染色体のABL遺伝子です。この二つの遺伝子が融合することによって形成されるキメラ遺伝子が、白血病の原因であることがわかってきました。そしてこの異常遺伝子をインターフェロン治療によって完全に消失させたり、あるいは減少させる効果、これを細胞遺伝学的寛解と呼びますが、治療した患者さんの30%ないし50%に得られることもわかってきました。

このことは临床上、非常に重要な反応で、遺伝学的寛解の有無は予後に大きく関与します。インターフェロン治療によってフィラデルフィア染色体陽性細胞が消失した場合には10年生存率が70%、反応がない場合には22%と、この間に格段の差があると報告されています(図5)。インターフェロン治療が慢性骨髄性白血病に非常によく効くことは、このデータからもわかると思います。

C型肝炎の病態はウイルス感染による急性炎症、そしてウイルスの持続感染により肝臓の線維化が進行し、慢性肝炎に移行します。さらに慢性肝炎が20年、30年たつて肝硬変になり、肝硬変になりますと、今度は毎年7%ぐらいの割合で肝癌が発症するといわれ

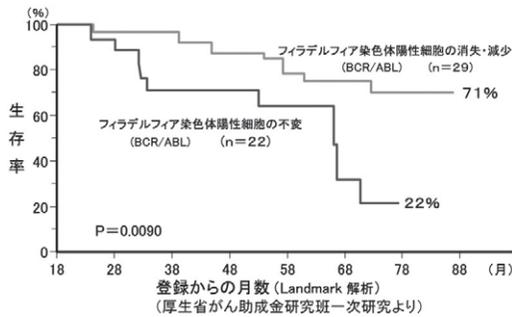


図5 慢性骨髄性白血病 (CML) に対するIFN α 療法
-細胞遺伝学的効果別生存率-

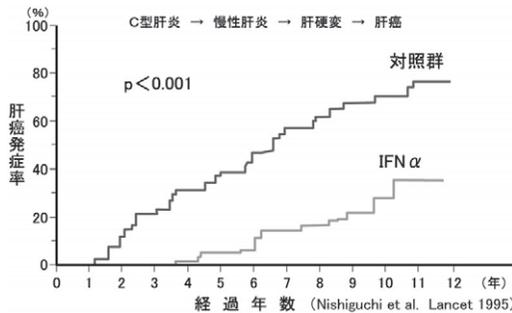


図6 肝癌発症に関するIFN α 療法の効果

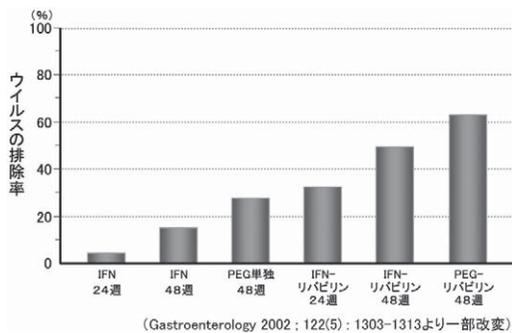


図7 インターフェロンによるC型肝炎ウイルスの
排除率

ています。今から10年前にC型肝炎に対するインターフェロン治療が始まりました。その後の肝癌の発生率を調べているデータがあります(図6)。インターフェロン治療をした患者さんの肝癌発生率は、治療していない患者さんに比べて約半数、明らかにインターフェロン治療が肝炎に有効であり、かつ肝癌の発生を抑制しています。

図7は海外のデータです。インターフェロン治療を48週間連続して行う場合、あるいは

長期発現型インターフェロン製剤、インターフェロンをポリエチレングリコールで包んだ、PEGインターフェロンを使うことによって、あるいはリバビリンという薬剤と併用することによってウイルスを排除する率が格段に上がっています。60%の患者でC型肝炎ウイルスを排除できることが報告されています。

さて、これまで用いられてきたインターフェロンの治療薬は、すべて蛋白製剤です。ヒトの細胞から抽出したインターフェロンと、インターフェロン遺伝子を大腸菌に組み込んで、大腸菌に作らせた遺伝子組換え製剤、この二つが臨床に用いられています。最近になって生命科学、特に分子生物学と遺伝子工学の進歩により20世紀末より遺伝子製剤を使った新しい医療が登場してきました。治療遺伝子をヒトの細胞に安全かつ効率よく導入発現させる遺伝子導入用ベクターが開発されました。すなわち生体内に遺伝子導入ベクターを直接注入することによって、治療薬を自らの細胞内で合成し、病気を治す医療が遺伝子治療であります。

ここで遺伝子治療の歴史を少し振り返ってみたいと思います(図8)。病気の治療を目的とした遺伝子治療は今から十数年前の1990年にアメリカのNIHで始まりました。ADA、アデノシンデアミナーゼという酵素の遺伝子異常があり、そのために重症複合性免疫不全症をきたす遺伝病に初めて遺伝子治療が実施されました。治療遺伝子の発現が生体内で確認され、臨床的にも遺伝子治療が安全かつ有効であると報告されました。この情報が世界中に広がったのを契機に、多くの国で遺伝子治療の基礎研究、臨床研究が開始されました。

日本におきましても1994年に厚生省、文部省より遺伝子治療臨床研究に関するガイドラインあるいは指針が発表され、その翌年には北海道大学で、アメリカと同じアデノシンデアミナーゼ欠損症の患者に我が国第1例目の遺伝子治療が行われました。また、それに続き癌に対する遺伝子治療が始まっております。

- 1989年 アメリカで遺伝子標識の臨床研究を実施。
- 1990年 アメリカNIHでADA (アデノシンデアミナーゼ) 欠損症への初の遺伝子治療を実施。
- 1994年 厚生省・文部省より「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
- 1995年 北海道大学付属病院でADA欠損症の遺伝子治療開始 (国内初)。
国内で、肺癌 (p53遺伝子導入)、腎臓癌 (GM-CSF遺伝子)、脳腫瘍 (インターフェロン遺伝子)、閉塞性動脈硬化症 (HGF遺伝子)、食道癌 (p53遺伝子)、乳癌 (抗癌剤耐性遺伝子MDR1)、肝癌 (p53遺伝子)、前立腺癌 (チミジンキナーゼ遺伝子、GM-CSF遺伝子) などの研究計画が実施または申請。
- 1999年 米ペンシルベニア大で遺伝子治療を受けた18歳の男性患者が4日後に死亡 (アデノウイルス・ベクターの規定量以上の投与が原因で、人為的ミス)。
- 2002年 フランスで遺伝子治療を受けた2名の患者に白血病が発症 (導入遺伝子によるガン化と特定)。国内の遺伝子治療計画の一部が延期となる。
- 2003年 全世界で600以上のプロトコールのもと、4,000人以上の患者に遺伝子治療が行われている。

図8 遺伝子治療の歴史

ます。GM-CSF遺伝子を腎臓癌、p53遺伝子を肺癌、そして私どもは2000年にインターフェロン遺伝子を脳腫瘍の治療に用いています。その後さらに、食道癌や乳癌、あるいは肝癌、前立腺癌など、あらゆる癌腫に対する遺伝子治療が始まっています。最近では癌以外の疾患、特に血管性病変、末梢性の閉塞性血管障害に対してHGFという遺伝子を使って治す臨床研究も始まっています。

ただ、遺伝子治療の安全面では、いろいろと問題点が指摘されています。1999年にアメリカのペンシルバニア大学で、誤ってアデノウイルスベクターを大量に投与したことで死亡例が出ました。また、昨年にはフランスでレトロウイルスベクターを用い骨髄幹細胞に治療遺伝子を導入する遺伝子治療で、2人の患者に白血病が発生しました。その後の調査で遺伝子が骨髄幹細胞の癌遺伝子を活性化させることによる癌化であると報告されています。重篤な合併症の頻度は多くないですが、遺伝子治療も全く安全ではなく、たえずその科学的、倫理的妥当性を検証しながら慎重に開発する必要があります。

ただ、今年になりまして世界中で600以上のプロトコール、4,000人以上の患者さんに

遺伝子治療が行われています。国別、疾患別の遺伝子治療の現状を見ますと、ほとんどがアメリカで行われています。プロトコール数にして約80%、患者数にして60%がアメリカです。ヨーロッパでも多くの遺伝子治療開発が行われています。イギリス、フランスをはじめ、たくさんのヨーロッパの国で遺伝子治療が精力的に行われています。日本では明らかに欧米と比べ遅れていますが、それでも現在までには17のプロトコールが実施され、約100人の患者さんが遺伝子治療を受けています。

その対象疾患の3分の2は癌です。それ以外に単一遺伝子性疾患、先ほどお話ししたようなADA欠損症や難治性の代謝性遺伝病などの疾患に対して行われています。また感染症ではエイズに対する遺伝子治療、最近では閉塞性動脈硬化症、あるいは心臓病に対する遺伝子治療も始まっています。

こうした遺伝子治療ができるようになったのは、遺伝子を細胞の中に効率よく入れるベクターを開発できたことによります。遺伝子を導入するベクターにはウイルスベクターと非ウイルスベクターがあります (図9)。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、

ウイルスベクター	非ウイルスベクター
 レトロウイルスベクター  アデノウイルスベクター  アデノ随伴ウイルスベクター  ヘルペスウイルスベクター  センダイウイルスベクター	 DNA/リポソームベクター  裸のDNAベクター

図9 遺伝子治療用ベクターの種類

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルス等に治療遺伝子を組み入れたベクターが臨床研究に使われています。一方、私どもはウイルスベクターではなく、非ウイルスベクターのリポソームを使った遺伝子治療を行いました。また、ベクターを使わない、プラスミドだけの裸の遺伝子を用いる方法も考えられています。私どもは直径約1,000nmのリポソーム（脂質の二重層膜にて構成されるマイクロカプセル）の表面に遺伝子をつけたり、あるいはカプセルの中に遺伝子を包埋したりして、これを生体の中に投与する方法をとっています。

私どもが癌治療に最初に選んだ治療遺伝子はβ型インターフェロン遺伝子です。β型インターフェロン遺伝子は東京大学の谷口維紹先生がクローニングした、日本発の遺伝子です。この遺伝子にRSVプロモーターを組み込んだプラスミドを構築し、これをリポソームに包埋した製剤を臨床に用いています。

ここで私どもの基礎研究を少しご紹介したいと思います。まず最初に行いましたのは遺伝子導入効率の高いリポソームを開発することです。約15年前になりますが、それまでのリポソームでは、遺伝子を細胞内に導入することはほとんどできませんでした。ところが

リポソームの表面にポジティブチャージ（正電荷）を付加することによって導入率は有意に上昇しました。

N-(α -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride (TMAG) はポジティブなチャージを持った脂質で、これと dilanroyl phosphatidyl-choline (DLPC)、dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE) をそれぞれモル比1:2:2で構成したリポソームは細胞毒性が低く、かつ導入効率が高いことがわかりました。直径1 μ m多重膜リポソーム（図10）を用いていますが、DNAの包埋率が90%、多くはエンドサイトーシスで細胞内に入り、発現効率は試験管内では10%ないし60%です。図11は、DNA/リポソーム、すなわち、プラスミドを包埋したリポソームによる遺伝子導入および遺伝子発現を見たものです。リポソームの表面をR18という色素でラベルし、試験管内にこのリポソームを添加しています。そうしますとリポソームは100%細胞の表面にくっつきます。細胞表面がネガティブチャージ（負電荷）を有

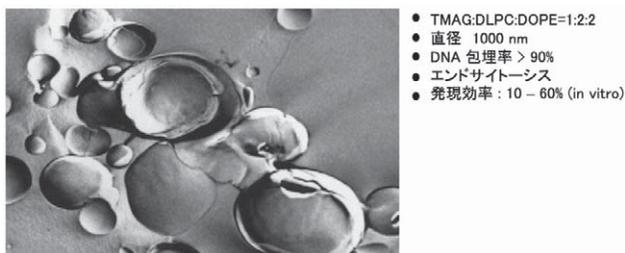


図10 DNA/リポソーム

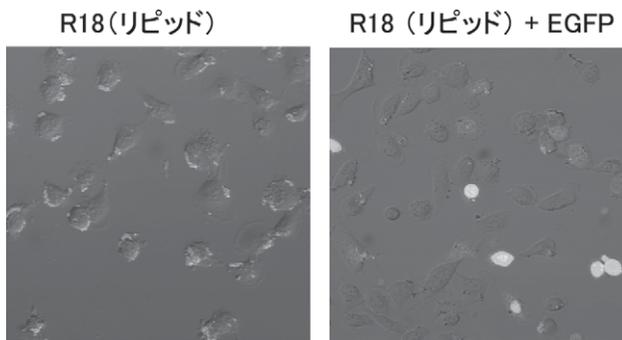


図11 DNA/リポソームによる遺伝子導入及び発現効率

しているからです。このリボソームは続いて細胞内に主としてエンドサイトーシスにて取り込まれ、次第に核の周辺に移動します。グリーンに発色する遺伝子、EGFPというマーカー遺伝子をリボソームに包み、発現効率を見てみますと、約30%の細胞が陽性になっています。次にDNAがどのようなかたちで核内に移行するかを調べて

います。その結果、分裂細胞ではリボソームにDNAが包埋されたまま染色体に結合します。非分裂細胞では、核周辺でリボソームよりDNAが分離され、フリーになったDNAが核内に移行すると思われます。癌細胞は分裂、増殖しますので、主として分裂細胞で発現されます。一部、非分裂細胞でも発現すると思われませんが、この発現メカニズムが明らかになると、もっと導入効率のいい、DNA/リボソームが作れるのではないかと研究を進めています。

次に、動物実験をしました。ヒトの脳腫瘍細胞をヌードマウス脳内に移植し、実験的脳腫瘍を造ります。この実験モデルでは移植約1週間後、腫瘍は直径2mm大の大きさに成長します。この時点で、インターフェロン遺

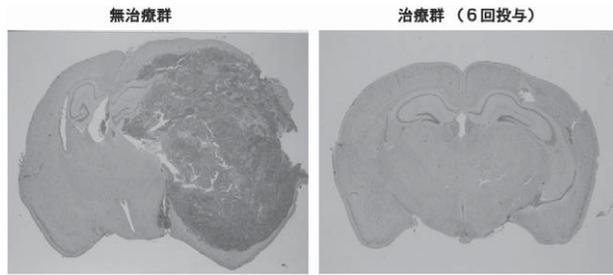


図12 IFN-β 遺伝子包埋リボソームで治療されたヌードマウスの脳腫瘍

伝子が入ったリボソームを腫瘍内に打ち込みます。そして4週間後にマウスを解剖し、脳腫瘍を観察します。

無処置群では腫瘍は直径5mm以上に増大し、ヌードマウスは100%腫瘍死します。ところがインターフェロン遺伝子で治療したヌードマウスは、腫瘍が完全に消失、100%完治しました(図12)。動物実験では予想以上に強い抗腫瘍効果が得られています。その作用機序を調べてみました。少なくとも三つの作用機序があることがわかりました(図13)。

第1は、遺伝子が導入された腫瘍細胞がアポトーシスで死にます。第2は、そのアポトーシスを起こす前に遺伝子が導入された細胞から多種類のサイトカイン(IFN-β、TNF-α、IL-1β、IL-6)が産生・分泌されます。

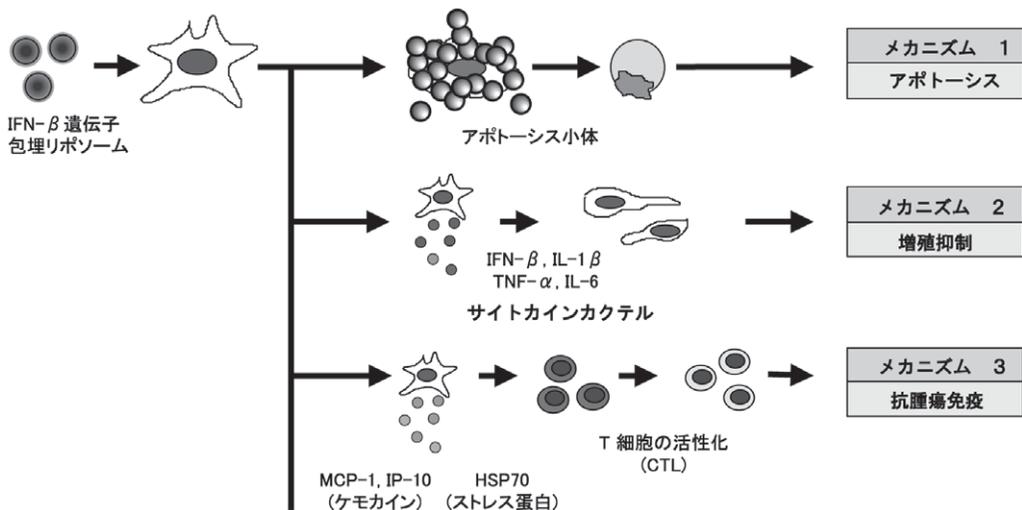


図13 IFN-β 遺伝子治療の抗腫瘍メカニズム

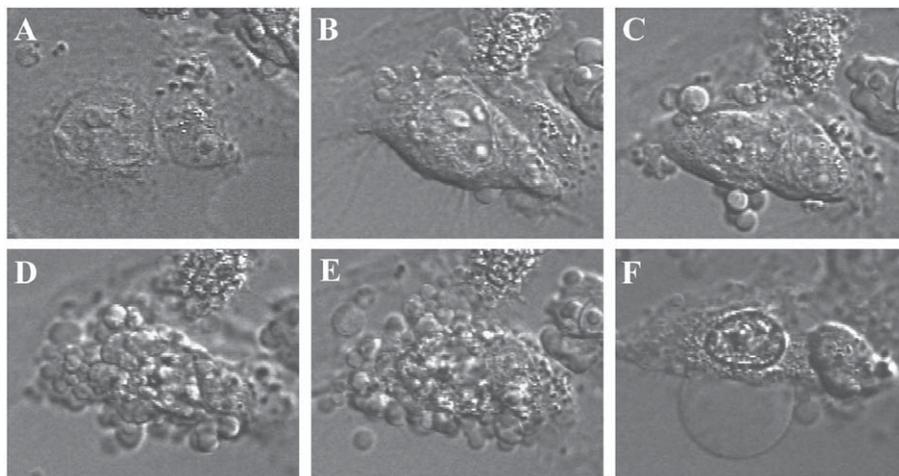


図14

これらのサイトカインカクテルが細胞増殖を強く抑制します。第3は、 β 型インターフェロンの遺伝子治療で最も重要な作用機序です。抗腫瘍免疫、特に細胞障害性T細胞（CTL）が誘導されます。

次に、この三つの作用機序についてさらに詳細に説明します。最初にアポトーシスですが、ヒトの脳腫瘍の細胞を試験管内で培養します。その中に空のリボソームを加えてみた場合、あるいは1 mLあたり2,000単位のインターフェロン蛋白を加えてみた場合、いずれも細胞増殖には変化はありません。ところがインターフェロン遺伝子が入ったリボソームを加えますと、遺伝子が導入された細胞はアポトーシスで死にます。

アポトーシスをビデオ強化型微分干渉型顕微鏡で生きたまま観察しますと（図14）、遺伝子導入細胞が6～12時間後突然以下の変化を示します。核が凝集し（B）、それに続いて細胞表面での小胞形成（プレビング）（D）、その後にアポトーティックボディ（断片化した核）を含む細胞小片形成（E）へと変化します。アポトーシスに典型的な形態学的変化が観察されます。すなわち癌細胞にインター

フェロン遺伝子が導入され、遺伝子が発現すると、その細胞はアポトーシスで死ぬことが証明されました。これは腎癌細胞で同じ実験を行いました。やはり核、細胞質の凝集からアポトーティックボディの形成までの同様の変化を観察しました。膵臓細胞、悪性黒色腫細胞でも同じように遺伝子が導入された細胞がアポトーシスで死ぬことがわかってきました。

どうしてアポトーシスを起こすか、さらに詳しく調べてみました。そうしますとアポトーシスに関するメカニズムも少なくとも三つあることがわかってきました（図15）。

第一はインターフェロン β の抗腫瘍効果に

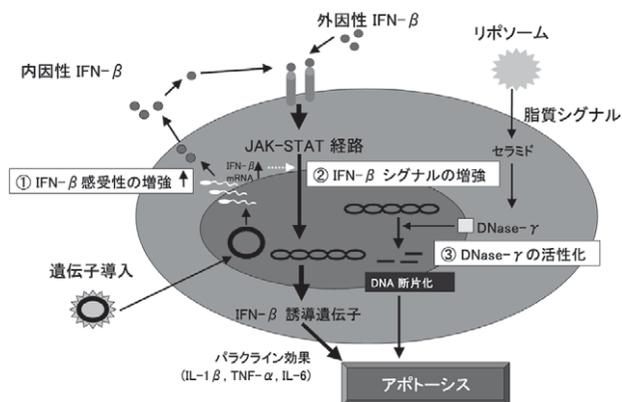


図15 メカニズム1 アポトーシス

対する感受性の増強です。インターフェロン β 蛋白に対する感受性を腫瘍細胞株間で比較しますと、インターフェロン β のmRNAの量が多いほどインターフェロン β による抗腫瘍効果が高いことがわかりました。インターフェロンのmRNAの量が多く、インターフェロン β にアポトーシスが誘導される感受性株で、インターフェロン β のmRNAに特異的に反応するsiRNAを加えインターフェロン β のmRNAを減少させます。その後インターフェロン β 蛋白を加えてみますと、今度はアポトーシスが起こらない。これらの現象により遺伝子の導入でインターフェロン β のmRNAを増加することで、インターフェロン β 蛋白に対する感受性が高くなることが推察されます。

二つ目の作用機序は、細胞内でのシグナル伝達の増強です。インターフェロン β の細胞内シグナルはJAK-STAT系伝達経路がメインパスウェイです。このJAK-STAT経路のシグナルの増強が見られました。細胞培養液中にインターフェロン蛋白を加えますと、この場合はSTAT-1に注目して調べたのですが、投与してから10分ないし30分後にSTAT-1のリン酸化、活性化が起こってきます。ただ、これは一過性です。ところがインターフェロンの遺伝子を培養液中に加えてみますと、STAT-1の活性が、蛋白に比べて数倍高くなります。またその活性化が長期持続、3日あるいは4日後にもSTAT-1のリン酸化が観察されます。さらにSTAT-1のリン酸化を促進する、脱リン酸化酵素阻害剤 (DMHV) を加えてみます。DMHVを加えないと、細胞は何ら変化がありませんが、DMHVを加え、STAT-1のリン酸化を増強、延長いたしますと、フローサイトメトリー上で、サブG1が増え、いわゆるアポトーシスが誘導されます。すなわち遺伝子導入により誘導されるSTAT-1のリン酸化の増強、延長がアポトーシスの誘導に関与していると推察されます。

もう一つ、DNase γ の活性化があります。リボソームが細胞表面のリセプターと結合す

ることにより、脂質シグナルがセラミドを介してDNase γ を活性化することがわかりました。私共の基礎研究の結果よりDNAあるいはリボソーム複合体が細胞表面のToll-like receptorに結合することで、NF κ -B、IRF-3が活性化され、同時にIRF-3とCREB binding proteinの複合体ができます。この複合体がインターフェロン遺伝子の転写を活性化し、インターフェロンが産生し、分泌される。その分泌されたインターフェロンがオートクリンあるいはパラクリンにインターフェロンのレセプターと結合、ISGF-3、IRF-1を介してインターフェロン遺伝子の転写を活性化する。こういうオートクリンサーキットは谷口維紹先生が報告していますようにreviving状態 (車のエンジンのアイドル状態) で細胞にはほとんど変化はありません。ところが、インターフェロンの遺伝子を導入し、強制的にインターフェロンのmRNAの量を上げますと、このパスウェイが数倍にも活性化され、その結果p53パスウェイが活性化され、アポトーシスを誘導することが推察されました。さらに、リボソームはおそらく他のToll-like receptorを介し、XIAP (X linked inhibitor apoptotic protein) を抑制します。XIAPは脳腫瘍細胞にたくさん発現されていますが、これがアポトーシスを誘導するパスウェイのcaspase経路を抑制しています。リボソームを介してこのXIAPを抑制することによってcaspase伝達系が活性化されPARPそしてDNase γ が活性化され、そしてアポトーシスが誘導されます。以上、インターフェロン遺伝子とリボソームが組み合わさって腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するメカニズムが、いくつかの研究の成果から少しずつ明らかにされつつあります (図16)。

二つ目が遺伝子非導入細胞の増殖抑制効果です。腫瘍組織内にリボソーム製剤を直接注入しますと、遺伝子が導入されるのは構成細胞の5%以下です。ところが動物実験で腫瘍は完全に消失します。そのメカニズムはアポトーシスが引き金になりますが、それ以外の

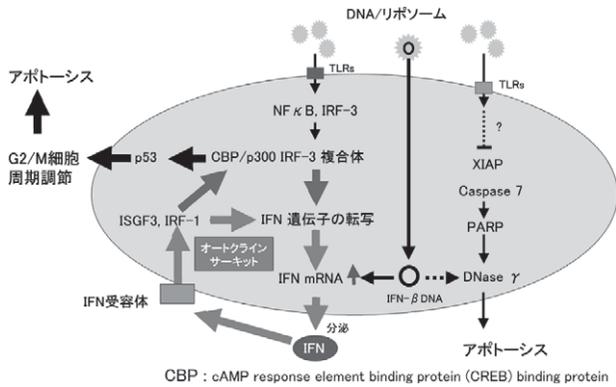


図16 IFN-β 遺伝子導入による感受性の増強メカニズム

作用機序が大きく働きます。その一つがサイトカインカクテルです。腫瘍細胞に遺伝子が導入され、アポトーシスが誘導される前に各種のProinflammatoryサイトカイン (IFN β、IL-1 β、TNF-α、IL-6) が産生され、このサイトカインのカクテルが腫瘍細胞の増殖抑制に働くことがわかりました。腫瘍の培養細胞の増殖がインターフェロン単独では60%、4種類のサイトカインカクテルでは10%まで抑制されます。

三番目の作用機序、これがインターフェロン遺伝子治療の作用機序としては最も重要だと思われまます。これまでお話いたしましたアポトーシスあるいはサイトカインカクテルの増殖抑制と同時に、遺伝子が導入された腫瘍細胞からは多量のMCP-1、IP-10等のケモカインが産生分泌されます。また同時にheat shock proteinのストレス蛋白が発現し、こうした反応がT細胞の活性化、CTLの誘導に関与することがわかってきました。

動物実験です。マウスの脳腫瘍、GL261細胞を同系のマウスの脳内に移植しますと腫瘍が形成されます。その脳内腫瘍に対して空のリボソーム、裸のプラスミドあるいはマウスインターフェロンβを局注しても未処理の脳腫瘍と比べ、大きな変化を認めません。ところがマウスの

インターフェロンの遺伝子をリボソームに包んで注入しますと、腫瘍の増殖は完全に抑制され、これを長期間観察しますと治療したマウスの40%で、腫瘍は消失し、1回の投与で40%の完全寛解が得られています。

このモデルでどのようなことが起こっているか。特に免疫がどのように誘導されているか検討してみました。マウスの脳腫瘍内にマウスインターフェロン遺伝子製剤

を導入して7日後の脳腫瘍組織内にはCD3、CD8、CD4のT細胞の浸潤が確認されています。さらにこの浸潤したリンパ球を取り出し、各種の癌種に対する細胞障害活性を見ております。そうしますと、もともとマウスに植えつけたGL261細胞だけに対して特異的な細胞障害活性が見られました。すなわちインターフェロンの遺伝子治療により、腫瘍特異的な細胞障害性Tリンパ球、CTLが誘導されたことが証明されました。

以上をまとめますと、マウスの脳腫瘍モデルの実験系ではインターフェロン遺伝子を包埋したリボソームを脳腫瘍の中に直接注入しますと、この脳腫瘍細胞の一部はアポトーシスを誘導します。あるいは炎症性のサイトカインを産生します。ケモカインを産生します。マクロファージが浸潤します。同時に細胞障

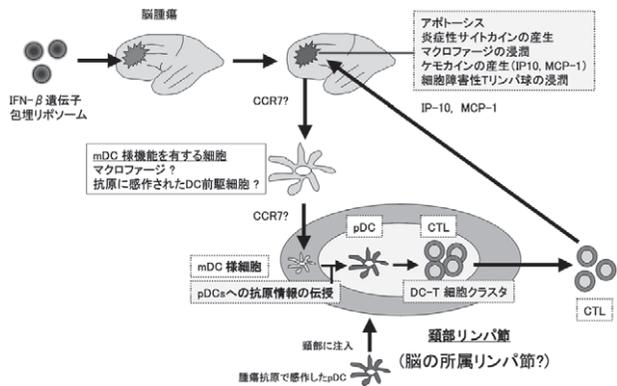


図17 IFN-β 遺伝子治療による抗腫瘍免疫の賦活化

害性リンパ球が浸潤してきます。一般に脳というのはほかの臓器に比べて免疫学的に隔絶された特殊な臓器です。免疫が誘導できにくい場所と報告されていますが、今回の動物実験では脳の中にCTLが誘導されました。そこでこのCTL誘導メカニズムを検討するためさらに動物実験を進め、その結果、以下の推論を考えています。

私どもは腫瘍組織で感作にしたリンパ球を色素でマーキングし頸部皮下に注入いたしました。すると感作リンパ球は脳の中、脳腫瘍組織内に移行するというを観察しています。逆に脳の中に、マーキングした樹状細胞を注入いたしますと、この樹状細胞が頸部のリンパ節に移行することも確認しました。

インターフェロンの遺伝子治療によって抗腫瘍性細胞性免疫が誘導できるメカニズムとして、私どもは図17のように考えています。インターフェロン遺伝子で脳腫瘍を治療いたしますと、ミエロイドDC様の機能を有する細胞が産生される。これはまだ同定はされていませんが、マクロファージであるか、あるいは抗原に感作されたDC前駆細胞か、何らかのミエロイドDC様の細胞が脳の中から頸部リンパ節のほうに移行し、抗原の情報を plasmacytoid DC に伝える。ここで Plasmacytoid DC が Tリンパ球とクラスターを作り、CTLを誘導する。そのCTLがMCP-1、IP-10等のケモカインに誘導され、脳の中に移行する。こういうメカニズムが起きているのではないかと考えています。ヒトで同じようなことが起こるかどうかは、今後臨床サンプルを用い検討していきたいと思っています。

次に臨床研究について話を進めます。私どもは純国産技術を用いた日本独自の遺伝子治療、DNA／リボソームを用いる悪性脳腫瘍に対するインターフェロンβ 遺伝子治療臨床研究を2000年4月より開始しています（図18）。この臨床研究を進めるにあたり臨床用遺伝子治療薬を調製するため、私どもは名古屋大学内に製薬メーカーと同じような製剤調

✕ 名大病院 独自技術で遺伝子治療
脳腫瘍患者に国内初の手術終了

図18 平成12年4月4日の読売新聞の記事

製室を整備しました。この調製室はGMP対応の施設でありまして、WHOグレードC、清潔度クラス1000を満足し、最終生産物はGMPの品質保証をされるものとなっています。図19は私どもの遺伝子治療薬と製剤調製室です。無菌着を着てリボソーム製剤、遺伝子治療製剤を造っています。さらに、私どもは製薬企業と共同にて治療薬の改良も進めました。最初に造った遺伝子治療薬は液剤であります。この製剤により確かにインターフ



図19 臨床研究用 DNA/リポソームの大量調製

ェロンの遺伝子が腫瘍細胞内に導入されて発現しますが、液剤では安定性が良くない。約1カ月後には活性が落ちて臨床に使えない状態になります。そこで私どもは液剤から長期安定型凍結剤、凍結乾燥剤へと改良しています。現在は凍結乾燥剤を使った治療を行っていますが、凍結乾燥剤では1年以上、おそらく数年は活性を安定に保つことができます。現在大学の調製室内に大型の凍結乾燥機が設置してあります。この装置では、現在は50バイアルぐらいですが、将来は100バイアル以上を一度に調製することが出来ると考えています。

最初に私どもが選んだ遺伝子治療の対象疾患は、最も治療に難渋している悪性神経膠腫です。特にその中でも膠芽腫は最も予後が悪い脳腫瘍です。平均生存期間が、発症してから1年です。2年になりますと約80%の患者さんが死亡し、5年生存率が10%以下で最も

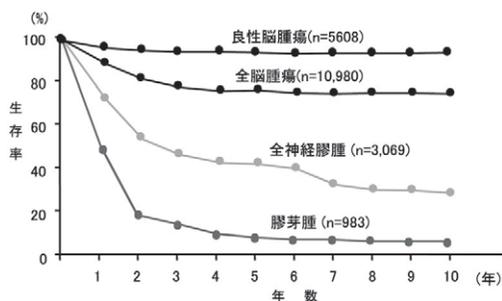


図20 原発性脳腫瘍の平均生存率 (全国脳腫瘍登録委員会による)

予後が悪い (図20)。悪性星細胞腫の場合でも腫瘍摘出手術と術後の放射線療法、化学療法をしても再発した症例では確立した治療法が全くないのが現状です。これまでも新しい治療法の開発を検討しました。放射線外科治療法、各種サイトカイン療法等、いろいろ新しい治療法を試みましたが、結果はほとんど半年以内で患者は死亡いたしました。そうした悪性の神経膠腫の再発例に対して今回、遺

伝子治療を試みました。図21は手術室の顕微鏡手術の様子を示しています。まず、重篤な後遺症をきたしうる部位に位置する腫瘍を残し、安全に摘出可能な部位の腫瘍を切除します。残存腫瘍に顕微鏡下で遺伝子治療製剤を注入します。そして治療の安全性を確認し、2週間後に、今度は追加治療として定位脳手術で残存腫瘍に遺伝子治療製剤を注入いたします。この治療は通常計4回行います。実際に遺伝子治療を行っている現場の様子をビデオで皆様にお見せします。

(ビデオ開始)

第1回目の遺伝子治療は全身麻酔下で開頭手術が行われ、画像上腫瘍と考えられた部分が本当に腫瘍であるか否かを確認し、手術で摘出可能な部分は顕微鏡下で摘出します。その後、残存腫瘍部位に遺伝子治療製剤の注入が行われます。

開頭術から2週間後、第2回目の遺伝子治療製剤の投与が行われます。投与は局所麻酔下で定位脳手術装置を用いて行われます。患者の頭に定位脳手術用のフレームが取り付けられます。その後、残存腫瘍の位置を正確に評価するために1ないし2mm間隔でMRIが撮影されます。このデータを遺伝子治療管理室内のサーバーに院内LANを介して伝送し、3次元的に再構築し、手術をプランニングします。一方、手術室では定位脳手術の準備が並行して行われます。遺伝子治療管理室で立てられた手術プランはリアルタイムに手術室

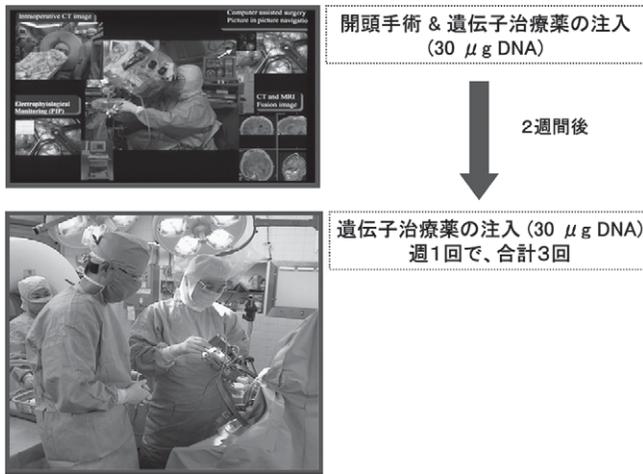


図21 IFN- β 遺伝子治療のプロトコール

に伝送され、双方向的に意見交換を行います。

手術室では移動型CTスキャンで再度頭蓋内病変をスキャンし、得られたデータをすぐに遺伝子治療管理室に伝送します。遺伝子治療管理室では先ほど3次元構築したMRイメージに伝送されてきたCTイメージを融合させ、脳のずれなどを補正します。そして最終プランを手術室に伝送し、手術が開始されます。遺伝子治療製剤が注入されたあと、もう一度移動型CTスキャンで頭蓋内をスキャンし、異常がないか否かをチェックし、手術を終了します。患者から摘出された検体は、遺伝子治療支援研究室で解析され、安全性と有効性の評価を行うためにデータを作ります。

(ビデオ終了)

これまで5例の患者に遺伝子治療を行いました。第1例目の初の治療は2000年4月3日に施行いたしました。このときには製剤が液剤で、1カ月しか保存がきかないということで、遺伝子治療をするX日をまず決めて患者さんを選びました。最も遺伝子治療をする必要があるという患者を選んで第1例目を行いました。31歳の女性ですが、左の頭頂葉に腫瘍がありました。治療直前に腫瘍は急激に増大し、右半身麻痺と、失語症が急速に進行しました。腫瘍は左頭頂葉に主座を持ち、運動野にも浸潤していました。そこで運動野

の腫瘍を残して頭頂葉を腫瘍を含めてロベクトミーしました。そして約1cmの残存する腫瘍内に針を刺し遺伝子治療薬総量1mlを数箇所に分けゆっくりと注入しました。術後のMRIにて注入した部位に一致し腫瘍の壊死が観察されます。治療終了後、患者の一般状態は非常によくなりました。自立歩行可能、失語症も改善し通常の会話が可能になり、治療開始後3カ月で退院しました。ところが退院1カ月して、この患者の腫瘍は再増殖しました。製剤の再調製が間に

合わず、再治療ができないまま腫瘍が増殖して6カ月で亡くなりました。

この症例で多くの臨床データが得られました。腫瘍を摘出した腔内にチューブを入れ、そこから内溶液を取りまして、その中に含まれているインターフェロン β あるいはTNF- α 、IL-1 β の活性を調べています。有意のインターフェロン β の他、TNF- α 、IL-1 β が基礎実験データと同様に検出されました。また、腫瘍の病理像を詳細に観察いたしますと、動物実験と同じように腫瘍細胞の一部はアポトーシスを起こしていました。また、腫瘍の中心部、遺伝子を注入した部位に一致して大きな壊死を認めました。そして腫瘍の中心部および壊死周辺部にはCTLと思われるCD8陽性の細胞が治療開始後2週目をピークに豊富に浸潤していました。マクロファージも同様に2週目をピークに腫瘍内の浸潤が観察されました。この反応は、動物実験と全く同じです。その後、遺伝子治療を施行した5症例の患者さんを最長2年以上経過観察し、安全性と有効性を確認しています(図22)。治療例5例の3カ月目のMRIでの治療効果判定では、部分寛解が2例、不変が3例でした。寛解例の2例の患者では1年半、非常にいい状態で、1例は家庭内に、1例は職場に復帰しています。

症例	遺伝子治療 (pDRSV-IFN-β)	結 果			
		腫瘍サイズ (MRI)	組織学的検討	TTP(M)	D/A(M)
1	30 μg x 1 15 μg x 5	不変/進行	細胞死 抗腫瘍免疫反応	3	D(6)
2	30 μg x 4	寛解	細胞死 抗腫瘍免疫反応	19	A(>24)
3	30 μg x 1	寛解	細胞死 抗腫瘍免疫反応	19	A(>24)
4	30 μg x 2	不変/進行	細胞死 抗腫瘍免疫反応	6	D(12)
5	30 μg x 4	不変/進行	細胞死 抗腫瘍免疫反応	5	D(12)

TTP : time to progression, D : 死亡, A : 生存

図22 IFN-β 遺伝子治療の評価結果

こうした5例の臨床実績を踏まえて、私ども名古屋大学では今後の展開として次のことを考えています。一つは適用拡大、医師主導型の臨床試験、新規ベクターの開発、遺伝子治療ベクターの供給センター、産学連携による実用化医療への展開です(図23)。今回は脳腫瘍を対象に遺伝子治療を行いました。他の癌種、悪性黒色腫、腎細胞癌、肺癌、膵臓癌に関しては動物実験を含め腫瘍細胞にアポトーシスを起こし、強い抗腫瘍効果が観察され、今後順次こうした癌腫に対しても臨床研究を進めていきたいと考えています。

すでに、悪性黒色腫、腎細胞癌に対しては基礎研究、前臨床研究が終了し、そして悪性黒色腫の臨床研究を信州大学の皮膚科と名古屋

屋大学との共同で厚生労働省に申請をし、今年の7月1日付けで厚生労働省、文部科学省より承認を受けています。名古屋大学で調製した製剤を信州大学に提供し遺伝子治療を実施する予定です。さらにこれまでの実績を踏まえ、プラスミドDNA、DNA/リボソームを中心に他の大学からの依頼を受け、共同研究として各種の臨床用遺伝子治療製剤を調製し、品質及び安全性の評価を加え、治療薬を他施設に提供するマテリアルセンターへと展開させていきたいと考えています。また現行のベクターに比べ、さらに効率のいいベクター、新規ベクターの開発を行っています。細胞選択性のあるベクター、正常の細胞には影響を及ぼさない、腫瘍細胞のみあるいは標的細胞だけに遺伝子導入できるもの。また遺伝子導入効率、発現効率がよいベクター。しかも発現期間を自由に調節できるようなもの。安全性の高い、大量調製が容易なベクターを開発したいと基礎研究を進めています。

プラスミドの周囲にフラレンを結合させ、長期に発現する長期発現型の遺伝子治療製剤の開発。また、リボソームの表面に各種のリガンドを結合し、組織・細胞特異性を有するリボソームの開発。また、安全性が高く、し

IFN-β 遺伝子治療の今後の展開

- ・ 適応拡大
- ・ 医師主導型臨床試験
- ・ 新規ベクターの開発
- ・ 遺伝子治療用ベクター供給センター
- ・ 産学官連携による実用化医療への展開

図23

かも効率の良いベクターとして、アデノ随伴ウイルスのベクタープラスミドを包埋したリポソーム、リポソームにウイルスベクターを取り込んだハイブリッドベクターの開発を進めています。

また、名古屋大学ではプラスミド、リポソーム製剤、ウイルス製剤の遺伝子製剤調製室を現有している他、昨年にはトラスンスレーショナルリサーチセンターとして遺伝子・再生医療センターが大学附属病院内に新設され、さらに2年後には大学中央診療棟内に細胞プロセッシングセンターを含めたマテリアルセンターが新設される予定です。こうした施設を中心に遺伝子治療の他、細胞療法、再生医療、特に分化誘導遺伝子を導入した幹細胞を利用した再生医療を開発していきたいと考えています。また、こうした開発型医療は、今後医師主導型治験を介し、実用化医療へと発展させていく必要があります。そのためには産官学の連携が最も重要であります。マテリアルセンターを中心にトラスンスレーショナルリサーチ、医師主導型の治験を支援し、さらにベンチャーの育成を介し、大手製薬企業での医薬品開発へとつながる高度先端医療開発体制を確立していきたい。そして将来はウイルス肝炎に対するインターフェロン治療を蛋白製剤から、遺伝子治療製剤に切り替えるような開発研究を進めたいと思っています。

本研究は名古屋大学の脳神経外科学分野が中心となり遺伝子治療学分野、バイオ医療学講座、あるいは遺伝子・再生医療センター、中央検査部の学内施設の協力の下、また愛知県がんセンターの高橋利忠研究所長、東京理科大学のゲノム創薬研究センター長の田沼靖一教授、信州大学皮膚科の斉田俊明教授、京都府立医科大学泌尿器科三木桓治教授はじめ多くの共同研究者と共に開発を進めています。これで私の講演を終わります。ご静聴ありがとうございました。