

ゲノム医学の現状と将来 - 5

関節リウマチの遺伝子治療



あべ とおる
安倍 達
Toru ABE
埼玉医科大学総合医療センター

1. はじめに

遺伝子治療が初めて臨床的に応用されたのは1990年のADA（アデノシンデアミナーゼ）欠損症の患者の治療である。それ以来この治療法は有望な治療法として注目されるようになった。アメリカでは2002年8月までに3,000人以上の患者が遺伝子治療を受けている。しかし、その効果に関しては当初の予測に反し必ずしも良好な成績が得られていない。今後遺伝子治療が医療の分野で高く評価され、治療として定着するにはいくつかのハードルをクリアしなければならない。

2. 遺伝子治療の適応疾患

遺伝子治療のコンセプトは正常な遺伝子を導入するという点で、単一遺伝子の変異がある疾患がその最も良い適法と考えられる。しかし実際にはそれら疾患に対する遺伝子治療は非常に困難である。その理由として現在の遺伝子導入技術では遺伝子導入効率が悪いこと、遺伝子発現レベルが低いことなどがある。最近では単一遺伝子の変異で発症するx連鎖性重症複合免疫不全症や血友病Bに対する遺伝子治療の成功例が報告され、現在の遺伝子操作技術でも実施できる疾患があることが明らかとなった。こ

れをさらに推進するためには適応疾患の病態生理を分子レベルで解明しなければならない。日本でこれまで遺伝子治療が計画され、倫理委員会にプロトコールが提出された疾患はその多くが癌に対するものであるが、その効果が確実に良かったと評価されるものは余り多くない。最近では遺伝子治療が癌だけではなく、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、血管再狭窄などの循環器疾患に施行され、その有効性が報告されている。

それら疾患の遺伝子治療戦略はVEGF (vascular endothelial growth factor) やHGF (hepatocyte growth factor) のnaked plasmid DNAを動脈閉塞部周辺の筋肉に注射するものである。この操作はベクターを使わないので発現効率は悪いが安全性の高い方法である。VEGFやHGFを直接注射しても効果はあるがその持続期間が短い。将来的にはベクターを使用する方法が開発されるが、その問題点は生体にとって安全性の高いベクターの開発である。

3. 遺伝子治療の成功の鍵を握るベクターの開発

これまで使用されたベクターを表1に示した。それを大別するとウイルスベクターと非ウイルスベクターで、前者はウイルスゲノムの一部に発現させた

表1. ベクターの種類と特性

| | ウイルスベクター | | | 非ウイルスベクター |
|---------|----------|---------|---------|-----------|
| | アデノウイルス | レトロウイルス | レンチウイルス | リボゾーム |
| 遺伝子導入効率 | 高い | 高い | 高い | 低い |
| 遺伝子発現量 | 多い | 少ない | 少ない | 無制限 |
| ゲノムへの挿入 | 不可能 | 可能 | 可能 | 低頻度 |
| 発現期間 | 短い | 長い | 長い | 短い |
| 導入細胞 | 可能 | 不可能 | 可能 | なし |
| 免疫原性 | 高い | 低い | 低い | なし |
| 製造保存性 | 安定 | 不安定 | 不安定 | 安定 |

ゲノム医学の現状と将来 - 5

い外来遺伝子を導入した組み換えウイルスである。

それぞれのベクターには長所と短所があるが、一般的にはウイルスベクターは導入効率が高いが安全性に問題がある。非ウイルスベクターは安全性が高い。最近ではそれらの長所を持ち合わせるハイブリッド型ベクターが開発されている。

4. 関節リウマチに対する遺伝子治療

遺伝子治療は表2のような病態に適応となる。そのうち関節リウマチに使用されるものは2と3である。

表2. 遺伝子治療

1. 欠損する遺伝子の補充
2. 免疫を抑制したり調節する細胞外分子の導入
3. 細胞内シグナル伝達を修飾する分子の導入
4. 細胞を形質転換させる分子の導入

すなわち関節リウマチの遺伝子療法は関節滑膜の繊維芽様細胞 (B型細胞, II型細胞) にベクターを使ってサイトカイン抑制物質, Ras, Raf, MAPK (mitogen-activated protein kinase), MMP 蛋白などをコードする遺伝子を組み込み, 局所でそれらを持続的に産生させ, 効果を期待する方法である。関節リウマチの遺伝子療法は写真1のように *in vivo* と *ex vivo* で行うことができる。*in vivo* の方法は目的とする分子をコードする遺伝子をウイルスベクターに組み込み, それを直接関節に注射する方法である。*ex vivo* の場合は予め採取した滑膜に遺伝子操作をしたウイルスを感染させ, 再び関節に戻す方法である。

(1) IRAP (IL-1Ra 蛋白) の遺伝子導入

1994年に Hung らが行った実験は, RA に遺伝子治療が可能であることを示した最初の報告である。家兎の膝関節に IL-1 β を注射するとそこに好中球, 単球などの細胞が浸潤し滑膜は増殖する。その生体

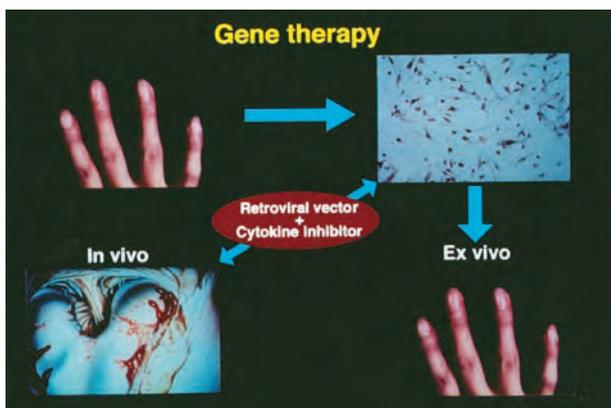


写真1. 関節リウマチの遺伝子療法

反応に対し IRAP の効果をみた実験である。ヒト IRAP をコードする cDNA をレトロウイルスに導入し, そのウイルスを滑膜細胞に感染させ, 再び関節にもどした。注射された膝関節滑膜には4日後に IRAP の遺伝子が発現し, IRAP が産生され細胞浸潤は抑制された。Otani (1996) らが報告した遺伝子治療は家兎をアルブミンで感作し, その後アルブミンを膝に注射して起こした関節炎の治療である。関節滑膜にヒト IRAP をコードする遺伝子の cDNA を組み込んだレトロウイルス (MGF-IRAP) を *ex vivo* で感染させ, 再び関節炎を起こしている膝に注射した。膝滑膜で持続的に産生された IRAP が効果を発揮した。

Muller-Lander (1997) の実験はさらにヒトの RA の病態にちかい系を用いた実験である。それは RA, OA, 外傷者の滑膜 fibroblast を採取し, ヒト IRAP cDNA を導入したウイルスに感染させ, それを SCID マウスの腎臓皮膜に埋め, スポンジに検査しようとする軟骨と一緒に入れ効果をみる実験であるが, 軟骨の変性が持続的に産生される IRAP で抑制された。

(2) IL-4 の遺伝子導入

IL-4 は IL-1, TNF α といった炎症性サイトカイン産生を抑制する。Roessler (1993) らは大腸菌 β ガラクトシダーゼの cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを家兎の膝関節に注射し, それが滑膜細胞に高力価で8週間持続発現したことから, アデノウイルスにサイトカインやその抑制物質をコードする遺伝子を組み込んで滑膜に導入するという治療が可能であることを示した。その成果を受けて Woods (1994) はアデノウイルスに IL-4 をコードする遺伝子の cDNA を組み込みプレートで培養したヒト RA 滑膜組織や細胞に加え細胞増殖抑制効果をみた。アデノウイルスに組み込まれた遺伝子は IL-4 を持続的に産生し IL-1, TNF α , CXC, IL-8, GRO α の産生を抑制した。Roessler (1993) らは大腸菌 β ガラクトシダーゼの cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを家兎の膝関節に注射し, それが滑膜細胞に高力価で8週間持続発現したことから, アデノウイルスにサイトカインやその抑制物質をコードする遺伝子を組み込んで滑膜に導入するという治療が可能であることを示した。

Morita (2001) らはそれとは異なった機序を介する治療法を報告した。それは IL-4 蛋白をコードする遺伝子を樹状細胞に入れて関節炎を治療した。樹状細胞は MHC-II, CD40, CD54, CD80, CD86 など costimulatory molecule を発現しているが, それに IL-4 蛋白をコードする遺伝子を挿入した。この

方法は、樹状細胞を使ってT細胞反応を調節することで関節炎を治療する、という最初の論文である。IL-4 蛋白をコードする遺伝子を組み込んだ樹状細胞を注射して、2, 4, 7日後に血清IL-4を測定しても検出されない。これは細胞量を10倍にしても検出されず、関節炎の治療効果がIL-4などの炎症に関与するサイトカインを介する効果でないことが分かる。細胞投与を腹腔内、静脈内、皮下で投与した場合、腹腔内投与が一番効果的であった。IL-4 transduced dendritic cellは、リンパ腺に集まるが脾臓にもみられる。そこで脾臓T細胞と相互に反応し、Th1/Th2バランスをTh2に傾け、それがTh-1反応を抑制することが作用機序であると考えている。

(3) IL-10 の遺伝子導入

IL-10 に関しては Lechmann (1999) の報告がある。IL-10 は 35KD のホモダイマーとして発見され、免疫反応に抑制的に作用する。しかし標的細胞によっては刺激的に作用することがある。IL-10 の免疫抑制効果はマクロファージに IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-8 MHC II, ICAM-1, B-7-1, B7-2 の発現を抑制するためである。その反面 IL-10 は B 細胞増殖分化を誘導し、リウマチ因子の産生に働く。また CD4, CD8 細胞のアポトーシスを抑制する。EBV の IL-10 は viral IL-10 と呼ばれるが、これには免疫系に刺激作用がなく抑制作用のみである。v IL-10 をコードする遺伝子 cDNA をアデノウイルスに入れ、アルブミン感作家兎関節炎を治療した実験を Ma (1998) が報告している。v IL-10 をコードする遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注射した家兎の関節液には v IL-10 が検出され、関節液中のリンパ球浸潤は減少していた。またプロテオグリカンでみた軟骨障害も抑制された。この論文で注目されることは、アデノ-IL10 を注射しなかった反対側の関節炎も治ったことと使用したアデノウイルスによる関節炎の誘発がなかったことである。

(4) TNFRp75 の遺伝子導入

Chenajavsky (1998) は DBA/1 マウスに native bovine II 型コラーゲンを注射し、発症する関節炎をモデルとしてその効果を検討している。関節炎発症マウスの脾細胞を SCID マウスの腹腔に打つと関節炎を移すことができる。その関節炎発症 SCID マウスに DBA/1 マウスの脾細胞に可溶性ヒト TNFR-p75 をコードする遺伝子 cDNA を組み込み、腹腔内に注射した。IL-1Ra の遺伝子を導入した ex vivo の実験では滑膜細胞中での半減期が短く問題があったが、この実験では遺伝子をリンパ球に組み込

み入れてあるのでそのリンパ球は全身に移行し、そこで TNF-Rp75 を産生していた。

(5) Fas-L の遺伝子導入

Fas はレセプター分子で滑膜細胞、滑膜浸潤細胞に構成的に発現している。RA 滑膜は Fas を発現しているが Fas-L を発現する細胞は少ない。したがって滑膜のアポトーシスは起きない。Zhang (1997) は DBA/1 マウスのコラーゲン誘発関節炎モデルで Fas-L 遺伝子の効果を報告している。Fas-L をコードする遺伝子 cDNA をアデノウイルスに組み込み関節周囲に注射した。その結果、滑膜細胞増殖と炎症細胞はアポトーシスとなり関節炎は軽快した。この局所効果の他に II 型コラーゲン感作 T 細胞による INF γ 産生も抑制した。アデノウイルス -Fas-L は病変部に 2~4 週間とどまり効果を発揮する。一般的にアデノウイルスを使った遺伝子治療ではウイルス粒子が発現され、それに対する免疫反応を起したり、それ自体関節炎を起こすことがあり、その対策が必要とされている。

(6) p21^{Clip} の遺伝子導入

RA 滑膜の増殖を抑制すると p16^{INK} と p21^{Clip-1} が発現するが、これは RA の滑膜に特徴的である。これを利用して滑膜に p16^{INK} p21^{Clip-1} を発現させ、CDK を抑制して滑膜増殖を抑制できる。両者はいずれも細胞周期を止め、G1 アレストを起こす。p16^{INK} p21^{Clip-1} という CDK inhibitor (cycline-dependent kinase) の作用を図示した。図 1 から明らかなように p21^{Clip-1} は p16^{INK} より作用範囲は広い。p21^{Clip-1} の作用は① CDK2 を抑制する② CDK と cyclin E, A との複合体形成を抑制する③アポトーシスを亢進させるなどであり、p21^{Clip-1} 蛋白をコードする遺伝子の cDNA をアデノウイルスに組み込んで、関節に in vitro で注射し関節滑膜増殖を抑制することができる。p21^{Clip-1} は細胞周期を G1 に止める。滑膜細胞にその遺伝子を強制発現させると細胞増殖が抑制できる。

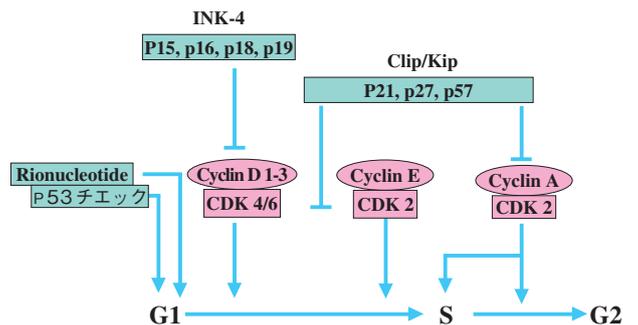


図 1. 細胞周期の進展調節

その作用に加え野々村はそれが滑膜細胞上の IL-1 の発現を低下させることを報告した。その fibroblast を IL-1 で刺激しても receptor の発現低下があるため、IL-1 の産生はない。さらに IL-1, MMP-1, MMP-3 の産生も抑制された。これは TNF で細胞を刺激しても起きないし、NF- κ B の発現も抑制された。この作用は p16 にはなかった。結局 p21 には滑膜細胞の増殖を止める作用と IL-1 を介する IL-1, MMP-1, MMP-3 産生抑制が期待できる。

(7) 抗原特異的 CD4+T 細胞を担体とした遺伝子治療

RA の遺伝子治療はこれまで説明したように炎症性サイトカイン例えば IL-1, IL-6, TNF α などをブロックする蛋白分子をコードする遺伝子の mRNA をレトロウイルスなどに組み込み、それを用いる方法である。しかし、この方法は時に非特異的な免疫異常を引き起こす。これまでの自己免疫性疾患の研究から抗原特異的 T 細胞には組織特異性があり、特定臓器に集まる。したがって、そのような細胞に目的とする蛋白の mRNA を組み込んだウイルスを感染させれば臓器特異的な遺伝子治療が可能となる。この治療法が Alessander (1992) によって CII 感作関節炎モデルで示された。

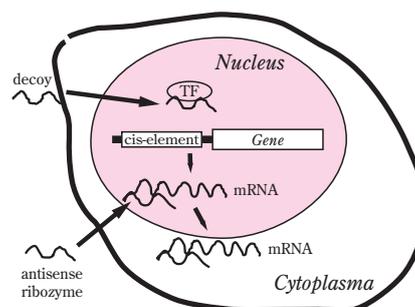
それは DBA/1 マウスに CII 注射し、その 21 日後にブースターし関節炎を起こす。そのマウスから CII 特異的 CD4+T 細胞を脾臓細胞から採り、それを融合細胞とつける。その抗原特異 T 細胞に目的とする蛋白たとえば IL-12-p40 をコードする mRNA を組み込んだウイルスを感染させ、その細胞を関節炎発症したマウスに 20 日目から注射すると関節炎発症が抑制される。またその細胞は関節に集まり臓器特異性を発揮した。さらにマウスの脾臓細胞を培養し CII で刺激すると細胞は増殖し、IL-4 や TNF α の産生をその上清で測定すると変化がないことから、この治療には非特異的免疫抑制がないことを示している。

抗原特異的 TG マウス T 4 細胞を使ってウイルスに組み込んだ蛋白遺伝子を導入する基本的研究が Costa ら (2000) によって検討されている。Zhang らは最近興味ある成績を報告している。それは I κ B の dominant negative なものを組み込んだ人 fibroblast が NF- κ B の核内移行を止めるという成績であ

り、fibroblast はアポトーシスをおこす。その fibroblast のアポトーシスは TNF 依存性であり、これはリウマチ活動期にみられる TNF 依存性アポトーシスである。これに対し TNF 刺激で活性化された IKK は I κ B をリン酸化し I κ B を分解して NF- κ B が核内に移行するのを防ぐので IKK がリウマチ治療に使える可能性がある。さらに IKK (I κ B kinase) は細胞周期を G0/G1 から S 期に移行させない。B/W マウスに対しヌクレオゾームを使って特異 T, B 細胞に対しトランスを作ることを kaliyaperumal らが報告している。

5. その他の遺伝子治療

遺伝子治療として 1 つの方法として核酸合成で作成されるアンチセンスオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴ)、デコイ型核医学やリボゾームが開発されている。その原理は図 2 にあるようにアンチセンスオリゴ核酸やデコイ型核酸によって遺伝子発現を抑制したり、遺伝子の活性化を抑制するものである。これら技術は心臓冠動脈の再狭窄の治療などに使用されている。デコイ型治療の次の目標は増殖性糸球体腎炎の治療であり、NF- κ B デコイが考えられている。これにより TNF α で刺激されるサイトカインおよび接着因子の発現、蛋白合成を抑制できる。さらに細胞増殖と関連する E2F を標的とするデコイ療法も森下 (1995) により考えられている。



- ◆アンチセンスオリゴ核酸医療
標的遺伝子とハイブリダイズする短い配列の核酸を合成し遺伝子発現を抑制
- ◆デコイ型核酸
特定な転写調節因子の結合部位を阻害しその遺伝子群の活性化抑制

図 2. アンチセンスとデコイ型核酸医療