

—特集 [遺伝子治療 update : 日本医科大学の遺伝子治療研究 (3)]—



レンチウイルスベクターを使用した造血幹細胞の遺伝子治療

内田 直也

米国国立衛生研究所心肺血液部門細胞分子治療分野

Hematopoietic Stem Cell-Targeted Gene Therapy Using Lentiviral Vectors

Naoya Uchida

Cellular and Molecular Therapeutics Branch (CMTB), National Heart, Lung, and
Blood Institute (NHLBI), National Institutes of Health (NIH)

Abstract

Gene therapy targeting hematopoietic stem cells (HSCs) is a promising treatment for a variety of genetic disorders, including immunodeficiency, hemoglobinopathies, congenital cytopenia, and metabolic diseases. HSCs can reconstitute peripheral blood throughout life due to their capacity for self-renewal and their hematopoietic multipotency. This makes it possible to cure genetic diseases for an entire lifetime by replacing or repairing pathogenic mutations/deletions in HSCs. Autologous HSC-targeted gene therapies entailing lentiviral gene addition as well as gene editing are currently under development. These can be widely applied to most patients, as there is no requirement for a suitable donor. Current gene addition/editing therapies are based on harvesting the patient's CD34⁺ HSCs, performing gene modification *ex vivo*, and then transplanting the modified HSCs back into the patient. The efficacy of *ex vivo* lentiviral HSC gene therapy has been proved in recent trials; however, the *ex vivo* process requires a GMP-level cell processing center and is expensive, which limits its global application. It is therefore crucial to develop *in vivo* HSC gene therapies, in which a therapeutic gene or gene editing tools can be delivered directly into bone marrow HSCs via systemic administration without *ex vivo* culture. This manuscript presents an overview of the current HSC-targeted gene therapies using lentiviral vectors.

(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 205–210)

Key words: hematopoietic stem cell, lentiviral vector, gene therapy, gene editing

はじめに

遺伝子治療は体外法 (*ex vivo*) と体内法 (*in vivo*) に大別され, その主な対象疾患は先天性疾患と悪性腫瘍である (図 1)。先天性疾患に対する遺伝子治療として, レンチウイルスベクターを用いて骨髄造血幹細胞に遺伝子を付加する *ex vivo* 遺伝子治療が開発され, その有効性と安全性は臨床試験で証明されつつある。最

近, 遺伝子編集技術が開発され, 造血幹細胞の遺伝子異常を直接修復する *ex vivo* 遺伝子修復治療が研究開発されている。また, 悪性腫瘍に対する *ex vivo* 遺伝子治療として, キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞) 治療における CAR 遺伝子付加にレンチウイルスベクターが使用されている。ここでは, レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子付加治療, 造血幹細

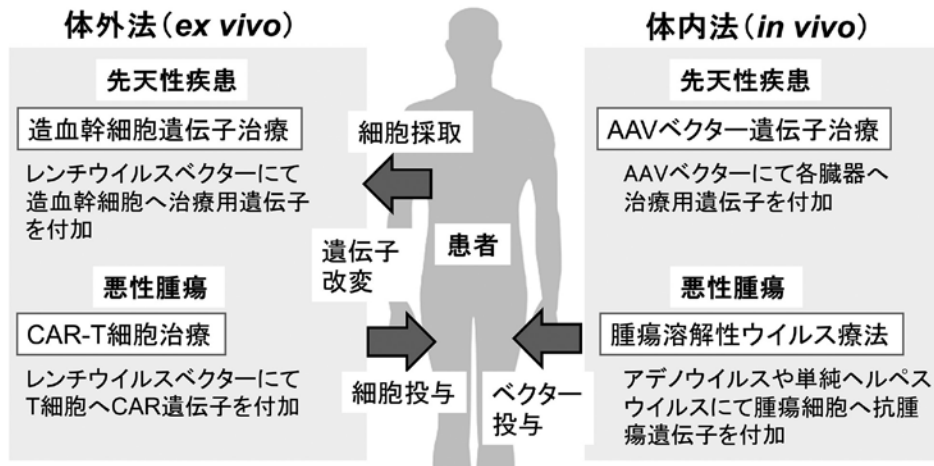


図1 体外法 (*ex vivo*) と体内法 (*in vivo*) 遺伝子治療
 遺伝子治療は体外培養の有無で *ex vivo* 法と *in vivo* 法に大別され、先天性疾患や悪性腫瘍が主な対象疾患である。AAV：アデノ随伴ウイルス、CAR：キメラ抗原受容体。

胞遺伝子編集治療についてまとめた。

1. レンチウイルスベクターによる治療用遺伝子の付加

造血幹細胞に遺伝子を付加して欠損タンパク質を置き換える *ex vivo* 遺伝子治療は、有効性が証明されつつあり、様々な先天性疾患の治療が可能となっている¹。造血幹細胞は骨髄に局在する細胞で、自己複製能と造血能を持ち、生涯を通じて血液を生産する。造血幹細胞は個体間で移植することが可能であり、造血器悪性腫瘍の治療として同種造血幹細胞移植が使用されているが、同様に先天性血液疾患の治療にも健全な造血幹細胞の移植が有効である。しかし、造血幹細胞の適合ドナーが限られていることや、前処置による臓器障害や移植片対宿主病などの合併症があることから、患者自身の造血幹細胞に欠損タンパク質（あるいは病的タンパク質）の正常遺伝子や治療用遺伝子を導入する造血幹細胞遺伝子治療が開発された。この治療法では、患者の骨髄から造血幹細胞を採取し、体外で培養しながらウイルスベクターで正常遺伝子または治療用遺伝子を付加し、患者自身に自家移植する。病気の根本原因である遺伝子異常を遺伝子付加によって修復するため、治療効果が強く、副作用が少ないのが特徴であり、1回の治療で生涯にわたって治療効果が期待できる。

先天性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子付加治療が試験的に実施された当初は、レトロウイルス属のマウス白血病ウイルス (MLV) 由来のガンマレトロウイルスベクターが治療用遺伝子導入に使用された。ガンマレトロウイルスベクターは、ベクタープラスミド、*gag/pol* プラスミド、エンベローププラスミドを同時に

培養細胞に導入することで作製することができる。ベクタープラスミドは、染色体 DNA に組み込むためのレトロウイルス由来の配列に治療用遺伝子を挿入し、他の不要な配列を削除したものである。*gag/pol* プラスミドは、ウイルス粒子を構成するタンパク質 (*gag*) と遺伝子導入に用いる酵素 (*pol*) の2つの遺伝子を発現するものであり、各々の遺伝子から複数のタンパク質が翻訳される。エンベローププラスミドは、遺伝子導入の標的細胞を規定するエンベロープを発現しており、他種のウイルス由来エンベロープを使用して細胞標的性を変更することができる。ガンマレトロウイルスベクターは、標的細胞の染色体 DNA に組み込まれることで長期間の遺伝子発現を可能とし、長鎖末端反復配列 (LTR) 中のウイルスプロモーター・エンハンサーを用いて治療用遺伝子を発現させることができるが、ベクター配列の挿入変異により造血器悪性腫瘍を誘導してしまう²。もともと白血病ウイルスとして標的細胞の増殖を促進する性質があると推定されており、また、活性化されている遺伝子の転写開始点 (プロモーター近傍) 周辺へ頻繁にベクター配列が導入されるため、ウイルス由来のエンハンサーが挿入部位周辺のがん遺伝子を刺激して白血病を誘導すると考えられている³。さらに、遺伝子導入率が低く、治療効果が不十分であったため、安全性と導入効率を高めるためにレンチウイルスベクターが開発された。レンチウイルスベクターはヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) に由来し、ベクタープラスミド、*gag/pol* プラスミド、エンベローププラスミドに加え、遺伝子発現制御因子である *rev* (または *rev/tat*) プラスミドを使用し、ガンマレト

ロウイルスベクターでは困難だった静止細胞への遺伝子導入が可能である。同様に、標的細胞の染色体に取り込まれ、長期間の発現が可能であるが、免疫不全ウイルスであるため標的細胞の増殖を抑える性質があると推定され、活性化遺伝子の構造遺伝子配列にほぼ均一にベクターが導入されるため、挿入部位周辺での遺伝子発現を刺激しづらいと考えられている。さらに、ウイルス由来のプロモーター・エンハンサーをLTRから削除し(自己不活性化)、代わりにヒト由来の組織特異的プロモーター・エンハンサーをベクター配列内に用いることで、造血器悪性腫瘍の発症リスクを最小限に抑えている⁴。

レンチウイルスベクターは、通常、各プラスミドを培養細胞に導入することで作製される。しかし、ベクター生産は一過性であり、大量生産には非効率的である。そこで、安定化ベクター産生細胞株が開発されている⁵。安定化ベクター産生細胞株は、ベクター産生に必要な遺伝子を培養細胞の染色体DNAに組み込むことで、継続的にベクターを産生できるようにしたもので、ベクター産生に必要な遺伝子は培養細胞の染色体DNAに組み込まれている。安定化ベクター産生細胞株は、前世代のガンマレトロウイルスベクターの産生に広く利用されていた。培養細胞にガンマレトロウイルスベクターを感染させるだけで、ベクターゲノムが再び発現するため、安定化ベクター産生細胞株の樹立が容易であった。しかし、新世代のレンチウイルスベクターでは、安全性を高めるためにウイルス由来のプロモーター・エンハンサーをLTRから除去(自己不活性化)しているため、安定化ベクター産生細胞株の樹立が困難になっている。現在では、遺伝子組換えや遺伝子編集により、ベクターゲノムを発現するカセットを染色体DNAへ挿入することで、レンチウイルスベクターの安定化ベクター産生細胞株の樹立が可能となっている。

近年、部位特異的DNA切断酵素の開発により、遺伝子編集治療研究は急速に進展している⁶。従来、遺伝子異常の修復は、遺伝子変異の近傍を含む正常なDNA配列(ドナーDNA)を核内に導入し、それと相同組換えを引き起こすことで行われていた。ベクター配列を標的細胞の染色体へ挿入する必要がないため、挿入変異による造血器悪性腫瘍のリスクは小さいが、相同組換えの効率が低いため、遺伝子修復の検出が困難であった。標的細胞の染色体DNAを切断し、細胞自身のDNA修復経路を刺激することで相同組換えの効率を上げることができるが、非特異的なDNA損傷による細胞障害や悪性腫瘍の発生が課題であった。しかし、

近年、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/CRISPR 関連遺伝子9 (Cas9) システムなどの部位特異的DNA切断酵素が開発され、非特異的DNA損傷を防ぐことが可能となり、遺伝子修復治療の開発におけるブレイクスルーとなっている。

2. 造血幹細胞への遺伝子付加治療

自己不活性化レンチウイルスベクターを用いた *ex vivo* 造血幹細胞遺伝子治療は、先天性免疫不全症やヘモグロビン異常症などの血液疾患や先天性代謝異常症を対象に臨床試験が行われている。多くの患者で治療効果が確認されているが、前世代のガンマレトロウイルスベクターとは異なり、ベクターの挿入変異による白血病合併は報告されていない。先天性免疫不全症に関しては、X連鎖性慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療が行われ、遺伝子導入率の高い7例中6例で活性化酸素産生が改善し、約86%の有効性が確認された⁷。また、アデノシンデアミナーゼ欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療では、50例中40例でリンパ球数が改善し、約80%の有効性が確認された⁸。代謝性疾患では、X連鎖性副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞遺伝子治療により、17例中15例(88%)で神経症状が改善した⁹。

ヘモグロビン異常症の一つである鎌状赤血球貧血症は、最も頻度の高い単一遺伝子疾患のひとつであり、治療用ベクター設計の難しさと歴史的重要性から、遺伝子治療の最初の目標になっている。鎌状赤血球貧血症は、ベータグロビン遺伝子の異常により、病的ヘモグロビンが重合して針状となり鎌状となった赤血球が血管閉塞を起こし、貧血、疼痛、臓器障害、早期死亡を引き起こす疾患である。正常な造血幹細胞を移植すれば生涯にわたって治癒させることができるが、適格なドナーが見つかるのは10%程度である。そこで、レンチウイルスベクターを用いて、患者自身の造血幹細胞に正常あるいは治療用ベータグロビン遺伝子(*HBB*^{T87Q})を導入する遺伝子治療が開発された。鎌状赤血球貧血症に対する造血幹細胞遺伝子治療の最新治療プロトコルでは、25例全員に治療用ヘモグロビンの発現と疼痛発作の改善・消失が認められ、有効性が確認された^{10,11}。しかし、初期の治療プロトコルで遺伝子治療を受けた後、造血器悪性腫瘍(骨髄形成症候群、急性骨髄性白血病)の合併が2例で報告された^{12,13}。1例目ではレンチウイルスベクターが腫瘍細胞の染色体DNAに挿入されていなかった。一方、2例目では*VAMP4*遺伝子(発がんとの関連は報告なし)にベクター配列が挿入されていたが、その遺伝子発現量

は変化していなかった。また、鎌状赤血球貧血症の自然史において白血病発症のリスクが高いことが知られており、頻度の高い染色体異常（7番モノソミー、19番短腕異常）やがん遺伝子変異（*RUNX1*、*PTPN11*）が両者の白血病細胞で検出された。さらに、同種造血幹細胞移植後に患者細胞由来の造血器悪性腫瘍を合併した鎌状赤血球貧血症患者2例において、移植前の検体から同一の遺伝子変異（*TP53*）を有するクローンが検出された。これらのデータから、レンチウイルスベクターの挿入変異に由来する悪性化ではなく、疾患関連遺伝子の変異クローンに由来する造血器悪性腫瘍であることが示唆された。鎌状赤血球貧血症に伴う造血亢進状態により徐々に遺伝子変異クローンが生成され、移植後に少数の変異クローンが選択的に残存し、最終的に白血病に進展したと推察された。

また、副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞遺伝子治療を行った3例で、骨髄異形成症候群の発症が報告された。治療用ベクターはMLV由来のプロモーター・エンハンサーから*ABCD1*遺伝子を発現させるものであった。また、アカゲザルの造血幹細胞遺伝子治療モデルにおいて、LTRにMLVプロモーター・エンハンサーを含むレンチウイルスベクターを用いた場合、白血病様のクローン性増殖が誘導されることが報告されている。したがって、副腎白質ジストロフィーの遺伝子治療では、レンチウイルスベクターシステムそのものではなく、内部プロモーターであるMLVプロモーター・エンハンサーが挿入部位周囲のがん遺伝子を刺激し、造血器悪性腫瘍を誘導していたと推測されている。レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療は、他の疾患に対するものも含めてすでに300例以上行われていると言われていたが、挿入変異以外の原因を含めても造血器悪性腫瘍の合併率は1%程度に減少しており、安全性は向上している。また、有効性は80%程度と高く、先天性血液・代謝疾患の根治治療として臨床応用が期待されている。

3. 造血幹細胞への遺伝子編集治療

近年、CRISPR/Cas9やZinc-finger nuclease (ZFN)などの遺伝子編集法が実用化され、ベクター配列を挿入せずに病因遺伝子変異を修正する遺伝子編集治療が開発された。部位特異的DNA切断酵素や正常な遺伝子配列を含むドナーDNAを電気穿孔法により細胞内に導入し、患者自身へ自家移植するのが一般的である⁶。しかし、遺伝子修復された造血幹細胞は、修復過程や電気穿孔法の毒性による長期非生存が問題になっている¹⁴。ZFNは遺伝子サイズが比較的小さいため、

毒性の低い非挿入型レンチウイルスベクターで送達するのが可能である¹⁵。また、標的細胞の染色体DNAを壊さずに遺伝子編集を行う塩基編集法も開発されている¹⁶。

造血幹細胞遺伝子編集治療は、鎌状赤血球貧血症をはじめとするヘモグロビン異常症に対する臨床試験がすでに進行中である。電気穿孔法によりCRISPR/Cas9遺伝子編集ツールを患者の造血幹細胞に導入し、*BCL11A*遺伝子の赤血球特異的エンハンサー配列を変異させることにより、胎児ヘモグロビンの発現を誘導できることが示されている¹⁷。1年以上にわたって症状の改善が認められており、新規治療法として期待されている。しかし、この遺伝子編集治療は、遺伝子配列の変異により治療効果を発揮しており、ドナーDNAとの相同組換えによる遺伝子修復は行っていない。さらに、非特異的な遺伝子配列を変異させるオフターゲット効果などの副作用が危惧されており、遺伝子修復治療の開発にはさらなる研究が必要である。

4. *In vivo* 造血幹細胞遺伝治療の開発

現在、造血幹細胞にウイルスベクターやナノ粒子などの遺伝子送達物質を直接静脈注射して治療する*in vivo*遺伝子治療が開発されている。この*in vivo*造血幹細胞遺伝子治療では、前処理による副作用や、造血幹細胞の体外培養の煩雑さやコストなど、多くの問題が回避される。さらに、*in vivo*造血幹細胞遺伝子治療は、*ex vivo*培養のための細胞調整センターを必要としないため、鎌状赤血球貧血症の頻度が高いアフリカ・サハラ以南の発展途上国でも遺伝子治療を実現できる。そのためには、CRISPR/Cas9などの遺伝子治療ツールを骨髄造血幹細胞に対して特異的に送達する必要があり、その研究開発が進んでいる。一方、課題としては、標的細胞へのデリバリーを高効率にすること、非標的細胞へのデリバリーを最小限にすること、免疫原性を低減することなどが挙げられる¹⁸。

遺伝子治療ツールを細胞内に導入する方法は、ウイルス導入法と非ウイルス導入法に分けられる。ウイルス導入法では、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが用いられ、遺伝子治療ツールがベクター粒子に封入される。一方、非ウイルス性導入法では、遺伝子治療ツールを物理的および化学的に送達する方法がある。物理的な方法としては、電気穿孔法やマイクロインジェクションがあるが、*ex vivo*で使用されることが多い。化学的手法では、脂質、ポリマー、金などのナノ粒子を用いる。これらは通常、エンドサイトーシスなどによっ

て細胞内に取り込まれ、全身的または局所的に送達することができる。近年のRNAワクチンにて、脂質ナノ粒子による核酸送達法が臨床応用されている。

レンチウイルスベクターは、約7~10 kbという比較的大きなゲノム容量を持ち、様々な遺伝性疾患の *ex vivo* 遺伝子付加治療に用いられている。レンチウイルスベクターは他のウイルスに比べて免疫原性が低いとされているが、挿入変異による発がんが依然として懸念されている。そこで、標的細胞の染色体DNAへの組み込みを防ぐために、非挿入型のレンチウイルスベクターが開発されている。非挿入型レンチウイルスベクターにより、CRISPR/Cas9やZFNなどの遺伝子編集ツールを送達することができるようになってきている^{15,19}。モデルマウスを用いた *in vivo* 遺伝子編集治療研究では、非挿入型レンチウイルスベクターによる *in vivo* 遺伝子編集治療の実現可能性が示唆されている²⁰。

また、ウイルス様粒子は、ウイルスの構造タンパク質に由来するナノ粒子であるが、ウイルスゲノムを持たないため自己複製ができない。レンチウイルスに由来するウイルス様粒子は、約8 kbまでの遺伝子を内包して送達することができ、また、標的を特定するエンベロープを持つ。レンチウイルス様粒子として、Cas9タンパク質を内包したり、Cas9と *gag* を融合させたりして、遺伝子編集ツールを送達するものが開発されている²¹。ウイルス様粒子は主にワクチンとして臨床応用されており、疱疹性間質性角膜炎に対する臨床試験が開始されている (ClinicalTrials.gov: NCT04560790)。

おわりに

造血幹細胞を用いた遺伝子細胞治療の有効性は証明されつつあり、先天性疾患の根治治療として臨床応用が期待されている。しかし、安全性の問題や治療費の高さなど、世界中で広く普及するためにはまだ課題が残っており、さらなる研究開発が望まれている。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

1. Cavazzana M, Bushman FD, Miccio A, André-Schmutz I, Six E: Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18: 447-462.
2. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwald K, et al: Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008; 118: 3143-3150.
3. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM: Transcription

- start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 300: 1749-1751.
4. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72: 8463-8471.
5. Throm RE, Ouma AA, Zhou S, et al: Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection. *Blood* 2009; 113: 5104-5110.
6. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, et al: CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* 2016; 539: 384-389.
7. Kohn DB, Booth C, Kang EM, et al: Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2020; 26: 200-206.
8. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, et al: Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *N Engl J Med* 2021; 384: 2002-2013.
9. Eichler F, Duncan C, Musolino PL, et al: Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1630-1638.
10. Kanter J, Walters MC, Krishnamurti L, et al: Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2022; 386: 617-628.
11. Kanter J, Thompson AA, Pierciey FJ, Jr., et al: Lovo-cel gene therapy for sickle cell disease: Treatment process evolution and outcomes in the initial groups of the HGB-206 study. *Am J Hematol* 2023; 98: 11-12. Epub 2022.
12. Goyal S, Tisdale J, Schmidt M, et al: Acute Myeloid Leukemia Case after Gene Therapy for Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2022; 386: 138-147.
13. Hsieh MM, Bonner M, Pierciey FJ, et al: Myelodysplastic syndrome unrelated to lentiviral vector in a patient treated with gene therapy for sickle cell disease. *Blood Adv* 2020; 4: 2058-2063.
14. Uchida N, Li L, Nassehi T, et al: Preclinical evaluation for engraftment of CD34 (+) cells gene-edited at the sickle cell disease locus in xenograft mouse and non-human primate models. *Cell Rep Med* 2021; 2: 100247.
15. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al: Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1298-1306.
16. Newby GA, Yen JS, Woodard KJ, et al: Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature* 2021; 595: 295-302.
17. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al: CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med* 2021; 384: 252-260.
18. Germino-Watnick P, Hinds M, Le A, Chu R, Liu X, Uchida N: Hematopoietic Stem Cell Gene-Addition/Editing Therapy in Sickle Cell Disease. *Cells* 2022; 11: 1843.
19. Uchida N, Drysdale CM, Nassehi T, et al: Cas9 protein delivery non-integrating lentiviral vectors for gene correction in sickle cell disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2021; 21: 121-132.
20. Blasco RB, Karaca E, Ambrogio C, et al: Simple and rapid *in vivo* generation of chromosomal

rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. Cell Rep 2014; 9 (4): 1219–1227.

21. Mangeot PE, Risson V, Fusil F, et al.: Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. Nat Commun 2019; 10: 45.

(受付：2022年11月15日)

(受理：2023年7月3日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。