

遺伝子治療用ベクターの定義と 適用範囲

国立医薬品食品衛生研究所 内田 恵理子

第3回遺伝子治療臨床研究に関する
指針の見直しに関する専門委員会

2013.8.30

本日の内容

- 遺伝子治療の定義

- 遺伝子治療用ベクターの種類と特徴

- 遺伝子治療の適用範囲

- 海外の指針との比較
- 遺伝子治療用プラスミドとDNAワクチンの違い
- 遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い
- 遺伝子治療薬と核酸医薬の違い

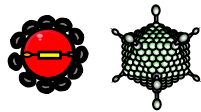
遺伝子治療とは

疾病の治療を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること（遺伝子治療臨床研究指針の定義）

遺伝子治療薬の直接投与 (in vivo遺伝子治療)

遺伝子治療薬
(目的遺伝子をベクターに搭載したもの)

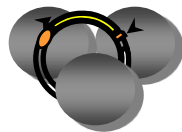
ウイルスベクター



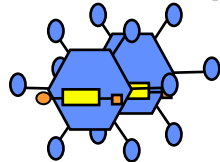
プラスミド
(Naked DNA)



プラスミド/リポソーム



増殖性組換えウイルス・細菌



ベクター：細胞へ遺伝子を導入する際の運び屋

遺伝子導入細胞の投与 (ex vivo遺伝子治療)

目的細胞の単離
(自己、同種)

目的細胞

体外培養(増幅も)
遺伝子導入

投与

遺伝子導入細胞

本日の内容

- 遺伝子治療の定義
- 遺伝子治療用ベクターの種類と特徴
- 遺伝子治療の適用範囲
 - 海外の指針との比較
 - 遺伝子治療用プラスミドとDNAワクチンの違い
 - 遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い
 - 遺伝子治療薬と核酸医薬の違い

遺伝子治療用ベクターの種類

– ウイルスベクター: ウイルスが細胞に感染する機構を利用した遺伝子導入法

特異的受容体を介して細胞へ感染することができる(特異的受容体を発現していない細胞には感染しない)

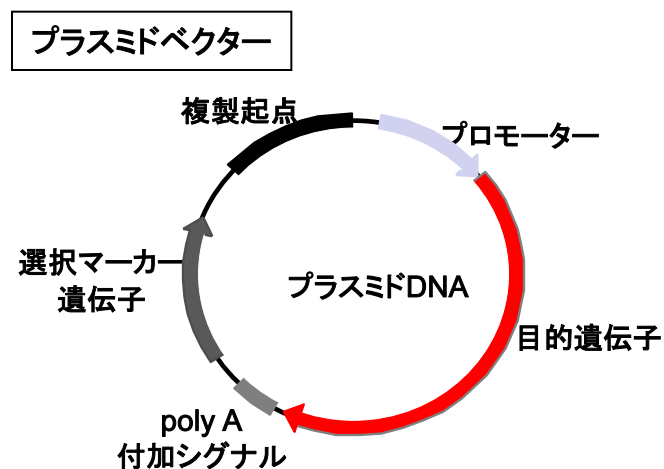
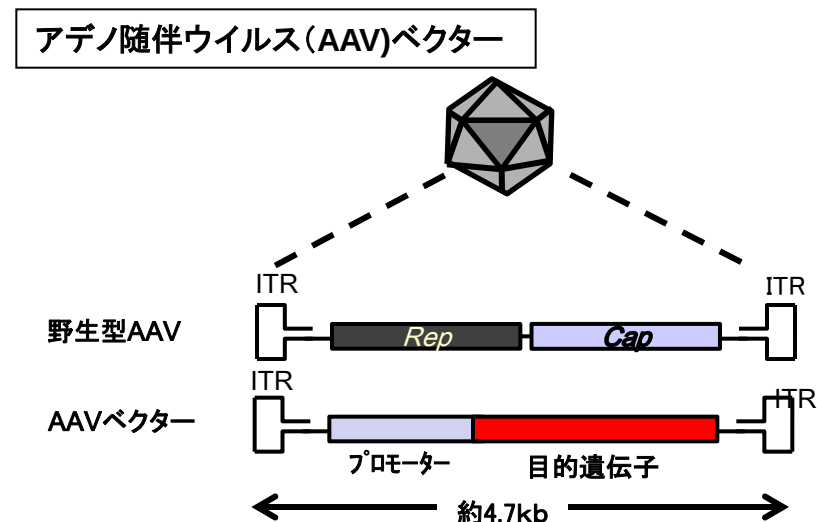
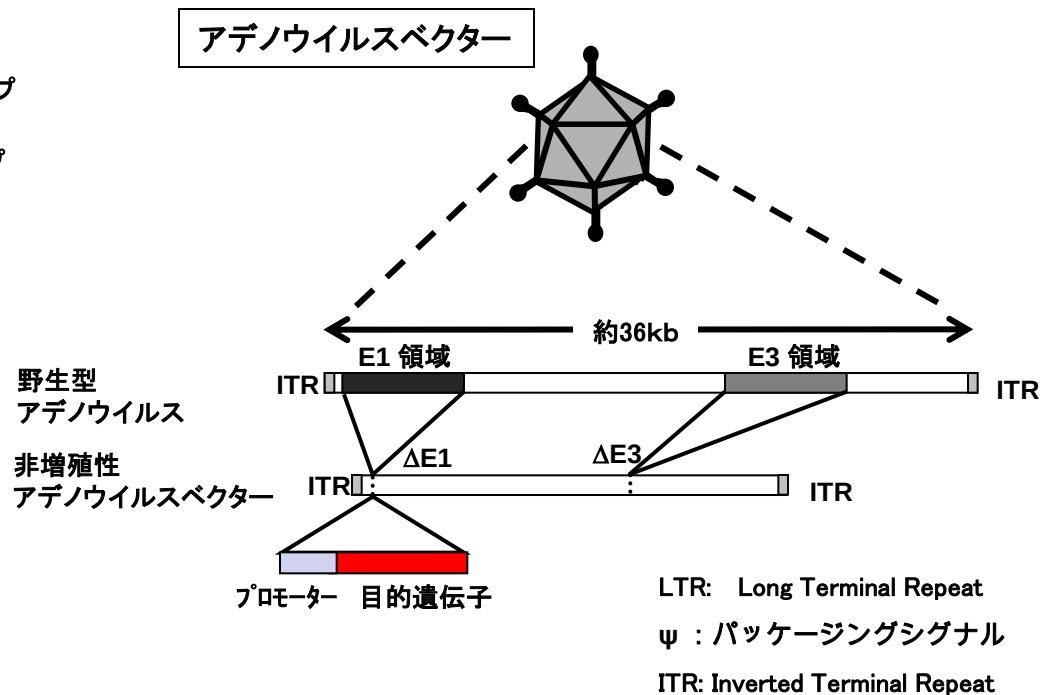
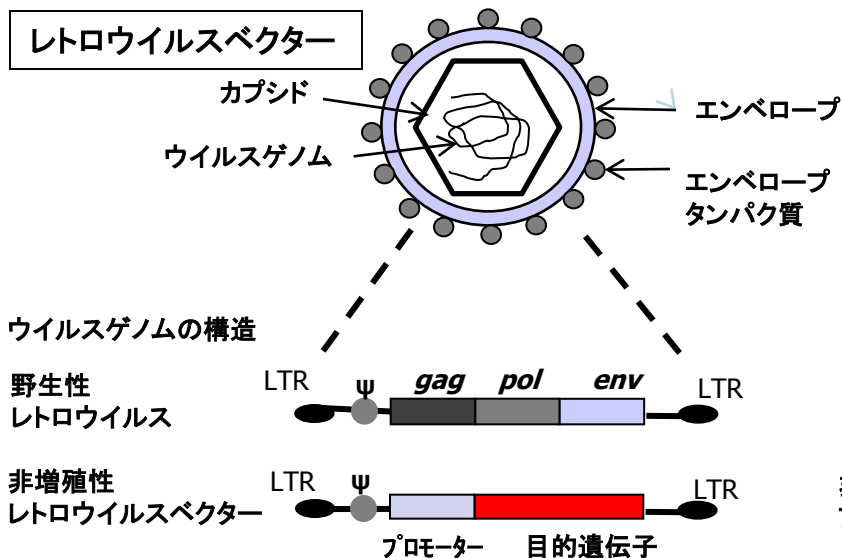
- 非増殖性ウイルスベクター: レトロ、アデノ、レンチ、アデノ随伴ウイルス(AAV)、センダイウイルス等
- 増殖性ウイルスベクター: 腫瘍溶解性ウイルス等

– 非ウイルスベクター

- プラスミド: Naked DNA(裸のDNA)、リポソームやポリマーとの複合体
- バクテリアベクター: 遺伝子改変した細菌

プラスミド: 大腸菌などの細菌で染色体DNAとは独立して複製する環状の2本鎖DNA。この性質を利用して目的遺伝子を組み込んだものが、種々の細胞で遺伝子発現を起こさせるために利用される(プラスミドベクターともいう)。

主な遺伝子治療用ベクターの構造(例)



主な遺伝子治療用ベクターの特徴

ベクターの種類	染色体組込み	導入可能細胞		遺伝子発現期間	主な投与法	主な対象疾患	安全性	その他
		分裂細胞	非分裂細胞					
レトロウイルス	○	○	×	長期	ex vivo 造血幹細胞、T細胞	遺伝性疾患（免疫不全症等）、がん	挿入変異	
レンチウイルス	○	○	○	長期	ex vivo 造血幹細胞、T細胞	遺伝性疾患（免疫不全症、ALD等）、がん	挿入変異の可能性 野生型HIVの病原性	
アデノウイルス	低頻度	○	○	短期	in vivo 腫瘍内	がん	抗原性	
AAV	低頻度	○	○	長期 （非分裂細胞）	in vivo 脳内、眼内、筋肉内	遺伝性疾患、神経疾患（パーキンソン病）、眼疾患、血友病等	野生型は病原性がない	導入可能な遺伝子サイズが小さい
センダイウイルス	×	○	○	短期	in vivo		抗原性	細胞質での発現
プラスミド	低頻度	△	△	短期	in vivo 筋肉内、腫瘍内	末梢血管疾患、がん	ウイルスを使用しない	導入効率が低い

遺伝子治療用ベクターの特徴

- ・ ベクターの細胞内での存在状態
 - 染色体への挿入(染色体挿入のための酵素をもつ:レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター)
 - 核内での遺伝子発現(アデノウイルスベクター、AAV、プラスミド)
 - 細胞質での遺伝子発現(センダイウイルスベクター)
- ・ ウイルスベクターが遺伝子導入可能な細胞
 - 増殖細胞:レトロウイルスベクター(染色体挿入による長期の発現;免疫不全症等への適用)
 - 増殖性・非増殖性細胞
 - ・ レンチウイルスベクター(染色体挿入による長期の発現;免疫不全症等)
 - ・ アデノ随伴ウイルスベクター(非分裂細胞では長期発現;血友病治療等)
 - ・ アデノウイルスベクター(一過性の発現での治療;がん治療等への適用)
- ・ ウイルスベクターの細胞指向性
 - ウイルスベクターは特異的受容体を介して細胞へ感染することができる(特異的受容体を発現していない細胞には感染しない)
- ・ Ex vivo遺伝子治療とIn vivo遺伝子治療の使い分け

レトロウイルスベクターの挿入変異リスク

現状

- レトロウイルスベクターはこれまで300以上の臨床プロトコルで使用
 - 先天性免疫不全症に対して行われた**造血幹細胞を標的とする遺伝子治療では、有効性が確認されている一方、82人中9人が白血病などの造血型異常を発症**
 - 染色体に組み込まれたベクターによる近傍の癌原遺伝子の活性化が主な原因
 - 挿入変異による白血病発症は**造血幹細胞**を標的とした場合に限られる
 - **特定の対象疾患**(X-SCID, Wiscott-Aldrich症候群)、またはレトロウイルスの中でも**発現効率の高いウイルス**(SFFV由来)を使用した場合に限られる
 - 白血病を発症した患者は1名を除き白血病も免疫不全も治療されている
- 欧米では、**骨髄移植が実施できない重篤な先天性免疫不全症に対しては、リスク・ベネフィットを考慮すると造血幹細胞遺伝子治療のベネフィットが勝ると考えられている**

安全性確保策

- 投与細胞数の低減
- 細胞あたりの遺伝子導入数の低減(細胞あたり1コピー以下)
- より安全性の高いベクターの使用
 - ウイルスのプロモーターを除去した自己不活化ベクターの利用(挿入部位近傍の遺伝子発現に影響を与えない)
 - レンチウイルスベクターの利用(レトロウイルスとは挿入部位が異なりこれまで挿入変異によるがん化は認められていない)
- 遺伝子治療後の患者の長期フォローアップの実施(15年):がん化の早期診断・治療

遺伝子治療薬開発の動向

● 遺伝性疾患、難病の遺伝子治療

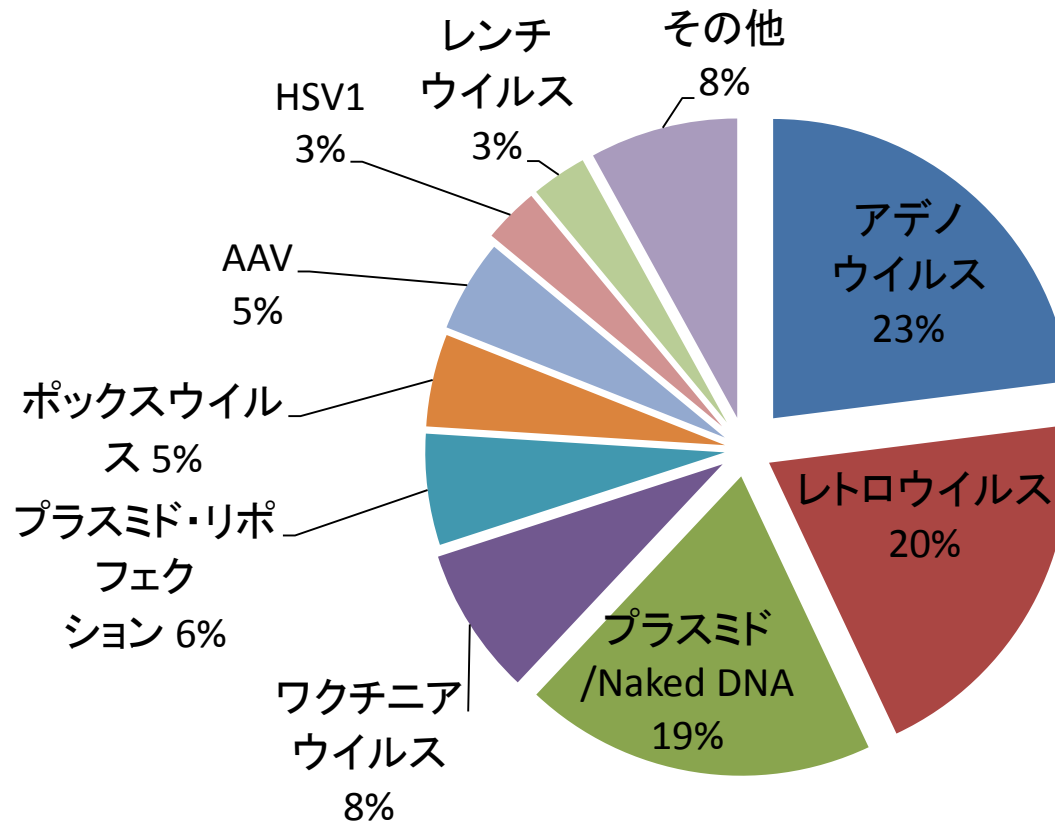
- ベクターの主流はレトロ、アデノからレンチ、AAVに移行
遺伝性疾患を中心に多くの成功例が報告されている
 - レンチウイルスベクター: ex vivo遺伝子治療(ALD、サラセミア等の遺伝性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療)
 - AAVベクター: in vivo遺伝子治療(血友病、レーバー先天性黒内障、パーキンソン病など)

● がんの遺伝子治療

- 非増殖性ウイルスベクターから増殖性を持つウイルスベクターや腫瘍溶解性ウイルス、細菌ベクターの利用が拡大
 - ヘルペスウイルス
 - アデノウイルス
 - ワクシニアウイルス
 - ビフィズス菌
- 遺伝子改変T細胞療法で有効例が報告されている(レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター)

遺伝子治療薬開発の現状

ベクターの種類



リポフェクション: リポソームトランスフェクション
リポソームを用いたプラスミドの導入法

本日の内容

- 遺伝子治療の定義
- 遺伝子治療用ベクターの種類と特徴
- 遺伝子治療の適用範囲
 - 海外の指針との比較
 - 遺伝子治療用プラスミドとDNAワクチンの違い
 - 遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い
 - 遺伝子治療薬と核酸医薬の違い

海外規制当局の遺伝子治療指針の比較

	米国食品医薬品局(FDA) 遺伝子治療・細胞治療指針	米国国立衛生研究所(NIH) 組換えDNA研究指針	欧州医薬品庁(EMA) 遺伝子導入用医薬品指針	日本 遺伝子治療臨床研究に関する指針
定義	遺伝子治療とは、生細胞の遺伝物質(genetic material)の改変に基づく医療行為である	遺伝子導入とは、組換えDNA分子や組換えDNA分子に由来するDNA又はRNAを患者に意図的に導入すること (組換えDNA分子の定義:①細胞外で天然又は合成DNA断片を結合して作製されたDNA分子で、細胞内で複製可能なもの、または①を細胞内で複製することによりできたもの)	遺伝子導入(gene transfer)とは治療、予防、診断の目的で遺伝物質(genetic material)を意図的に体細胞に導入すること がんワクチンやDNAワクチン、内在性遺伝子機能を改変したり発現させる目的での核酸の導入を含む	遺伝子治療とは、疾病の治療を目的として遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること及び二に定める遺伝子標識
目的	治療、予防、細胞標識		治療、予防、診断、身体機能の回復・修正・改変	疾病の治療、遺伝子標識
対象疾患	特に規定なし		特に規定なし	次のすべての要件に適合 1. 重篤な遺伝性疾患、がん、後天性免疫不全症候群その他の生命を脅かす疾患又は身体の機能を著しく損なう疾患であること。 2 遺伝子治療臨床研究による治療効果が、現在可能な他の方法と比較して優れていることが十分に予測されるものであること。 3 被験者にとって遺伝子治療臨床研究により得られる利益が、不利益を上回ることが十分予測されるものであること。
除外規定等	予防用ワクチンとして用いるウイルスやDNA調製品は除外 (感染症予防用プラスミドには別のガイダンスあり)	微生物抗原を体内で一時的に発現させることにより生体の免疫機能を誘導・増強することを主な目的とする臨床研究は除外	化学合成オリゴヌクレオチド(アンチセンスオリゴ、RNA/DNAキメラ)は除外	臨床研究指針では予防について明確に記載されていない (遺伝子治療薬指針の解釈ではDNAワクチンを含められている)

遺伝子治療用プラスミドとDNAワクチンの違い

プラスミド

遺伝子導入・発現効率は低く発現は一過性だが、挿入変異による発がんリスクは極めて低く、安全性の高いベクターと考えられている

(癌遺伝子や染色体組込が起こるような機構が搭載された特殊なプラスミドを除く)

・遺伝子治療用プラスミド

- 目的遺伝子を搭載したプラスミドで、患者体内での遺伝子発現により産生された目的タンパク質により疾患の治療を行う。国内での開発例として、下肢動脈閉塞性疾患を対象としたHGFプラスミドなどがある。

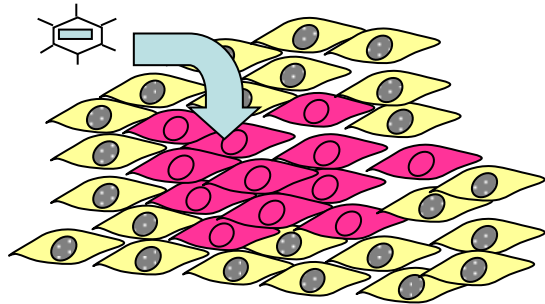
・DNAワクチン

- 抗原タンパク質をコードする「遺伝子」をプラスミドに搭載して生体に投与する免疫法。一定期間、患者体内で抗原が発現し続けることにより、従来のワクチンより高い免疫応答の誘導が期待されている。また通常のワクチンに比較して製法が簡単で、保存・備蓄も容易というメリットがある。
- B型肝炎DNAワクチン、インフルエンザDNAワクチン等の予防用ワクチンが開発されている。(がんDNAワクチンも開発されているが、予防ではなく治療・再発防止用)
- 国内でも造血細胞移植後のサイトメガロウイルス感染予防用DNAワクチンの治験が遺伝子治療として開始されている。

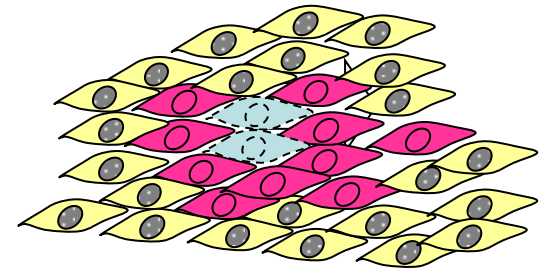
遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスの違い

- 腫瘍溶解性ウイルスとは正常細胞内では増殖できず、がん細胞内でのみ選択的に増殖するウイルス
- 従来の遺伝子治療用ベクターと比べて高いがん治療効果が期待されている

従来の遺伝子治療用ウイルスベクター
(非増殖性ウイルス)

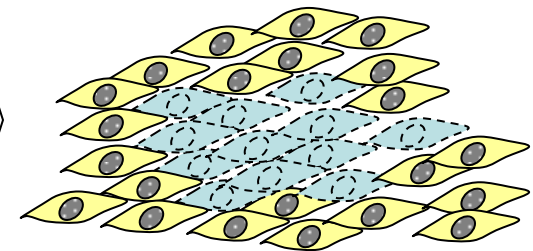
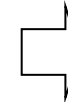
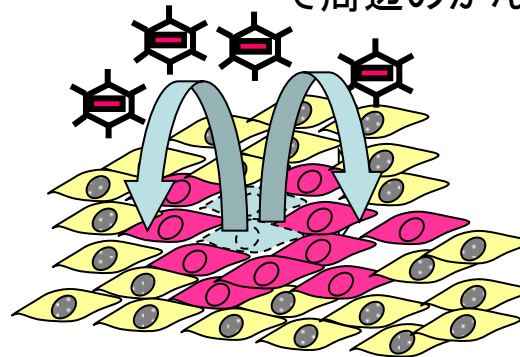
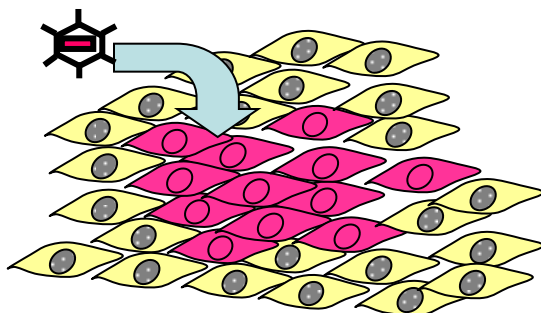


感染した細胞でのみ遺伝子発現
(作用が限局的)



腫瘍溶解性(制限増殖性)ウイルス

感染したがん細胞でウイルスが増殖し、細胞を破壊して
周辺のがん細胞にも感染拡大(作用が広範囲)



正常細胞



がん細胞



感染細胞

腫瘍溶解性(制限増殖性)ウイルスの種類

天然型ウイルス

例:レオウイルス、Vesicular stomatitis virus等

自然弱毒化ウイルス

国内開発事例: 自然変異単純ヘルペスウイルス

臨床研究が実施されている
が、遺伝子治療ではないと
の判断

遺伝子組換えウイルス

がん細胞のみで増殖するように遺伝子改変(遺伝子の除去、挿入)したウイルス

治療用遺伝子を導入したものは増殖性ウイルスベクター

国内開発事例: 遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス

遺伝子組換えアデノウイルス

遺伝子治療臨床研究
として実施

遺伝子治療薬と核酸医薬の違い

遺伝子治療薬

- 組換えDNA技術により製造(最低、数千個のDNA/RNA分子から構成)
- 遺伝子導入による目的タンパク質の遺伝子発現を介して作用

核酸医薬

- 遺伝子発現を介さずに直接作用するオリゴ核酸(DNA/RNA分子が十数個～数十個つながったもの)
- アンチセンス核酸、siRNA、デコイ核酸、アプタマー等、様々な種類があり、標的タンパク質の発現阻害や機能を阻害
- 化学合成により製造(修飾核酸)

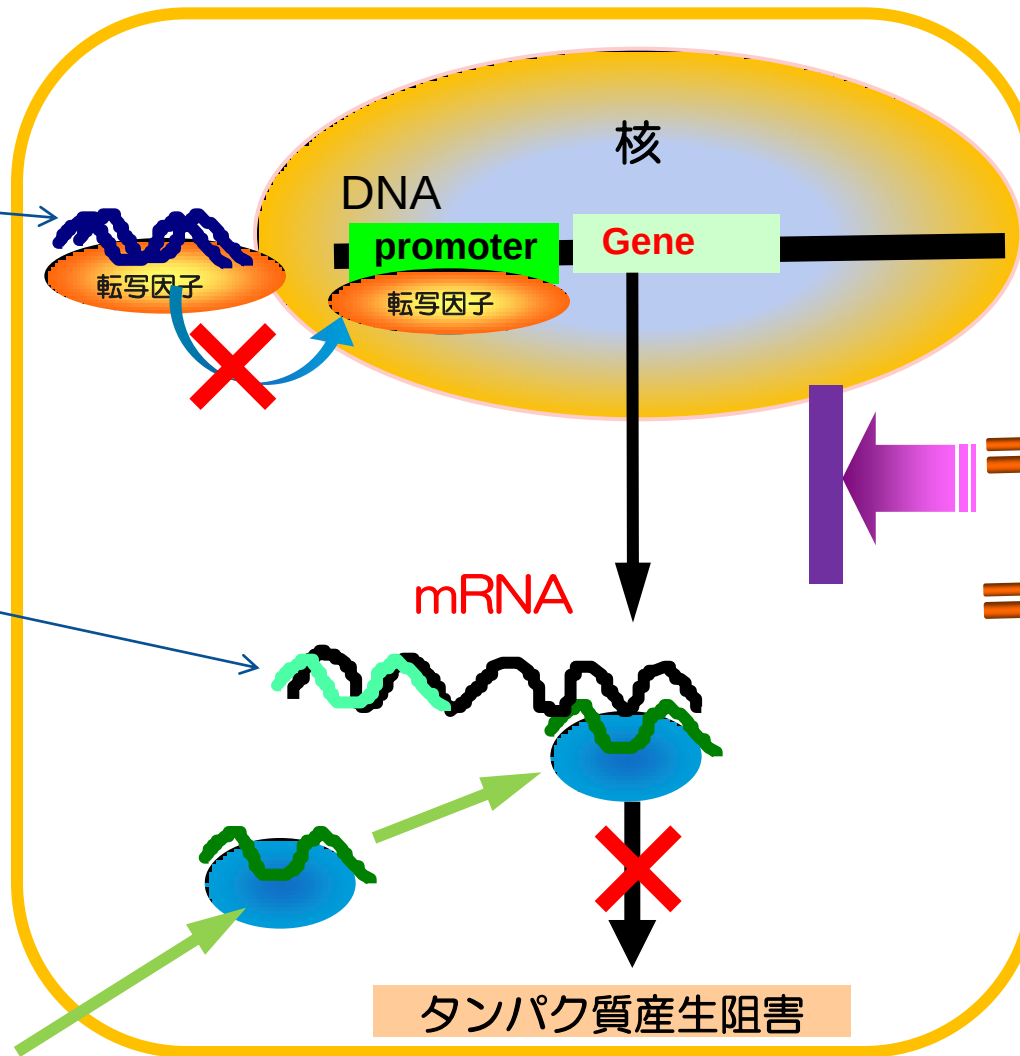
* 遺伝子治療用ベクターを用いて核酸医薬を発現する場合、規制上は遺伝子治療薬

核酸医薬の種類と作用機構

デコイ核酸:
標的タンパク質の転写因子結合配列と同じ配列を持つ二本鎖DNA。転写因子の機能を阻害することで遺伝子発現阻害。

アンチセンス核酸:
標的タンパク質のmRNAと相補的な1本鎖DNA/RNA。mRNAに特異的に結合し、遺伝子発現阻害。

siRNA:
標的タンパク質のmRNAと相補的配列を持つ2本鎖RNA。RNA干渉の原理を利用してmRNAからの遺伝子発現を阻害。



アプタマー:
人工的配列からなる一本鎖のRNA/DNA。立体構造により標的タンパク質と特異的に結合して機能を阻害。