

琉球大学学術リポジトリ

[症例報告] 遺伝子治療が抱える安全問題： ウイルスベクターの安全性

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): gene therapy, safety test, virus vector, replication competent virus (RCV) 作成者: 関口, 恵史, 石田, 昭彦, 新垣, 榮, 安澄, 文興, Sekiguchi, Keishi, Ishida, Akihiko, Arakaki, Sakae, Yasuzumi, Fumioki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016187

遺伝子治療が抱える安全問題 — ウイルスベクターの安全性 —

関口恵史¹⁾, 石田昭彦¹⁾, 新垣 榮²⁾, 安澄文興¹⁾

¹⁾ 琉球大学医学部解剖学第二講座

²⁾ (株) 先端医学生物科学研究所

(2000年12月1日受付, 2001年4月24日受理)

Safety problems for gene therapy — Safety issues of virus vector —

Keishi Sekiguchi¹⁾, Akihiko Ishida¹⁾, Sakae Arakaki²⁾
and Fumioki Yasuzumi¹⁾

¹⁾ Second Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

²⁾ Advanced Medical Biological Science Institute Co. Ltd.

ABSTRACT

Gene therapy has made remarkable progress in recent years with revision of its guidelines in Europe and America. These guidelines deal with an extensive range of safety issues. Viruses used in gene delivery systems make up seventy percent of vectors and play an important role in gene therapy. However these viruses cause a lot of pathological problems. These problems need to be considered and tested. Tests for replication competent virus (RCV), proteins derived from vectors, undesirable immune response, etc. are recommended to be conducted using these guidelines. The test for RCV is necessary for safety measures. A lot can still be done in the development of gene therapy. The safety issues are discussed not only for medical concerns (e.g. safety test), but also for the operations of the manufacturer. These discussions may contribute to the quality of medicines and reagents. The guidelines just guides the general concept for gene therapy, therefore, it is desired that we should have more discussions on safety issues, and organize conferences between research institutes and the government. *Ryukyu Med. J.*, 20(3)99~106, 2001

Key words: gene therapy, safety test, virus vector, replication competent virus (RCV)

はじめに

1990年米国において、世界で最初の遺伝子治療がADA (Adenosine deaminase) 欠損症に対して実施された。その後、欧米を中心に約400件のプロトコールに対して5,000例以上に遺伝子治療が行われてきた。国内では、1995年にADA欠損症に対して、北海道大学で実施されたのが最初である。現在まで、嚢胞性線維症、ゴーシェ病やファンコニー貧血などの遺伝病を始め、肺がん、腎がんや脳腫瘍などの各種癌、AIDSなどの後天性疾患まで幅広い疾患に対して応用されている。

急速に臨床応用が進む中、欧米諸国ではガイドラインの整備が進められてきた。わが国においては、1993年に米国組換えDNA諮問委員会が提案したガイドラインを基に、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」が作成された¹⁾。これらのガイドラインは遺伝子治療の安全性を充分考慮したものであるが、その安全性を完全に保証する

ものではない。一昨年、遺伝子治療先進国といわれている米国で、アデノウイルスベクターを使用した臨床試験における死亡例が報告された。これは1999年9月に米国ペンシルベニア大学で行われたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療で、ベクターに対する全身の免疫反応による多臓器不全が原因とされている。

遺伝子治療に用いられるベクターの約70%はウイルスベクターである。遺伝子治療で頻用されるウイルスベクターの安全性試験の知見を広く普及させ、それを議論することは重要である。本稿では、遺伝子導入で中心的な役割を果たすウイルスベクターについての安全性及び安全性試験項目について概説する。

ウイルスベクターの安全性の課題

各ウイルスベクターの特徴はベクターの安全性に密接に関

Table 1 Features of virus vectors in gene therapy

	Retroviruses	Adenoviruses	Adeno-associated viruses
Virus particle	Unstable	Stable	Quite stable
Range of infection	Broad	Broad	Broad
Pathogenicity	+	+	-
Virulence to cell	-	+	-
Efficiency of integration	Mean	Very high	Mean
Integration into chromosome	+	-	+
Manufacture	Simple	Complex	Complex
Efficiency of expression	High	High	High

連している。現在、ベクターとして多用されているウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス (AAV) である (Table 1)。遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは安全性を考慮して、病原性の低いウイルスを使用し、また、ゲノム上の欠損遺伝子を持つ構造に組換えることにより、自己増殖ができないように設計されている。ところが、冒頭に挙げた米国におけるアデノウイルスベクターによる死亡例は、遺伝子治療での、副作用が原因とされる初めての死亡例として話題となった。また、1996年から1998年にかけて、米国ペイラー医科大学でアデノウイルスベクターを用いた臨床試験の例では、18人の前立腺がん患者に治療が行われ、発熱、肝機能障害、静脈注射部位の腫れなどの副作用が認められた。これらの副作用はいずれも軽症であったが、患者の一人に高度の血小板減少と肝機能障害が出現したため、その時点で臨床試験は中止された。レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療においては、これまでのところ重篤な副作用は報告されていない。しかし、今後増加する傾向にある臨床試験を前にして、重篤な副作用が発生する可能性は充分にある。一般に、ウイルスベクターを人体に投与することによって引き起こされる副作用としては、以下の項目が考えられる。

(1) ウイルスベクターの病原性

安全性を考慮して、ベクターは自己増殖ができないように設計されている。しかし、人体に投与された後に再び増殖性を獲得するウイルス、すなわちRCV (Replicatin Competent Virus) が発生し、病原性を発現する可能性がある。比較的病原性の弱いウイルスが利用されているため、ウイルス本来の病原性を発現したとしても重大な病態に至る可能性は低い。しかし、患者の状態によっては重篤な症状を引き起こす可能性も考えられる。最近では、ウイルスベクターの産生するパッケージング細胞を改良することにより、RCVが発生する頻度は減少している。

(2) 導入遺伝子による副作用

ウイルスベクターが目的とした細胞以外に治療遺伝子を導入した場合、細胞や組織の機能不全や癌化を引き起こす可能性がある。レトロウイルスベクターでは、治療遺伝子はゲノムの非特定の領域に組み込まれるため、治療遺伝子が不都合な場所に導入される可能性がある。これまでの治療において、重篤な障害は生じていないが、導入遺伝子を本来の座位以外に組み込むため、何らかの障害が生じる危険性は残存する。また、導入遺伝子が過度に発現した場合、

産生される過剰なタンパク質により細胞や組織の機能不全を惹起する危険性も考えられる。しかし、これまで導入遺伝子の過剰発現による副作用は報告されていない。

(3) ベクターによる免疫反応

人為的に投与されたウイルスベクターは、人体にとって異物であり、自然感染したウイルスと同様に免疫反応に関与する。そのため発熱・炎症等のアレルギー反応の一因となる。ベクターは自己増殖機能が欠如しているため、免疫反応が生じたとしても、一過性のものであり、その症状は短時間のうちに鎮静化すると考えられる。ただし、一度免疫反応を生じた場合、同じベクターによる遺伝子治療が困難となる。例えば、アデノウイルスベクターのような染色体に組み込まれないベクターでは、治療遺伝子の効果を持続させるために反復投与が必要となる。しかし、生体内で産生されるウイルスに対する中和抗体により、二回目以降の投与では感染率の低下と免疫反応が見られる。

(4) 治療遺伝子の環境への流出

可能性は低いと考えられるが、ウイルスベクターが環境に流出し、他の生物に治療遺伝子を導入して、何らかの影響を与える可能性がある。ベクターウイルスは組換えウイルスであり、自然環境に流出することは望ましいことではない。環境への流出防止には、ベクターの生産段階から一貫して管理を徹底することが肝要である。

ウイルスベクターにおける安全性試験

厚生省による指針の中には、ウイルスベクターなどの遺伝子治療用医薬品の安全性試験についての記載があり、以下の7項目の試験が定められている。①増殖性ウイルス (RCV) の存在確認、②細胞又は組織に傷害を与える可能性、③導入遺伝子の安定性、存在状態、細胞当たりの導入数等、生体への影響、④導入遺伝子からの発現産物の安全域、⑤細胞の増殖機能の変化、腫瘍形成及びがん化の可能性、⑥製品の成分、導入遺伝子の発現産物又は遺伝子が導入された細胞による望ましくない免疫反応、⑦大量に製造される場合は、その一般毒性。以上の7項目を基調にして、実際に行われる安全性試験の一例をTable 2に示した。

現在、ウイルスベクターによる副作用の問題において、最も重要視されているのはRCVの発生である。RCVの検定はPCR法や逆転写酵素活性測定法、PG-4細胞を用いたS⁺L⁻フォーカスアッセイなどがある。RCVの存在否定が確認された場合

Table 2 General Tests for Virus Vectors

Test	Methods
General toxicity	<i>In Vivo</i> assay
Presence of viral contaminants	<i>In Vivo</i> assay
Tumor formation	<i>In Vivo</i> assay
Sterility test	Japanese standard of Pharmacopoeia
Presence of Mycoplasmas	DNA Hybridization methods
Presence of Endotoxin	Limulus test
Detection of HIV	ELISA
Detection of CMV	Fluorescent antibody technique
Detection of Human HBV	PCR Assay
Detection of HBV surface antigen	ELISA
Detection of HCV	PCR assay
Detection of EBV DNA	PCR assay
Detection of HPV	PCR assay
Detection of HTLV DNA	PCR assay
Detection of AAV DNA	PCR assay
Detection of Retrovirus	Reverse Transcriptase assay
Titre	Bioassay
Detection of RCV	Bioassay
Purity Test	Atomic absorption spectrometry
Adventitious agent test	Atomic absorption spectrometry

HIV (Human Immunodeficiency Virus); CMV (Cytomegarovirus); HBV (Hepatitis B Virus); HCV (Hepatitis C Virus); EBV (Epstein-Barr Virus); HPV (Human Parvovirus); HTLV (Human T-cell Leukemia Virus); AAV (Adeno-associated Virus).

でも、人体への投与後にRCVが発生する可能性がある。RCVの発生については、組換えや突然変異などが原因となる⁴⁾。ベクターへの組換え遺伝子の供給源として考えられるものとして、プロデュース細胞や導入細胞に存在するプロウイルス、または予め患者に感染している野生型ウイルスが考えられる。ベクターの生産段階において、プロデュース細胞由来のプロウイルスによる組換えを防ぐためには、プロデュース細胞を十分に継代した後にRCVテストを行うことが望ましい。

また、ウイルスベクターを導入する際の迷入ウイルスも問題となる。例えば、Epstein Barr Virusは、非増殖型アデノウイルスベクターが増殖型ウイルスに変化する際に、ヘルパーの役割を果たすことが報告されている⁵⁾。特に、ヒト起源のパッケージング細胞、例えばアデノウイルスベクターの産生に使われている293細胞などでは、ヒトに感染するウイルスのコンタミネーションに留意する必要がある。迷入ウイルスに対する試験は、ベクターへの増殖性を賦課する役割を果たすヘルパーウイルス等の検出の他に、病原性の強いウイルスの除去をも目的としている。試験では全ての種類の迷入ウイルスを網羅することは困難であり、特に病原性の強いウイルス、かつ感染率の高いウイルスを主な検出項目としている。

ま と め

遺伝子治療はまだ臨床研究段階の治療法であり、遺伝子治療を医療として定着させるためには、これから多くの安全性に対する議論や技術の確立が必要である。遺伝子治療における医薬品の安全性は単に医学的な安全性を考慮するのみならず、他の医療用医薬品と同様に人的操作の管理も重要となる。このような管理の基準となるものとして、GMP (Good Manufacturing Practice)⁶⁾、及びGLP (Good Laboratory

Practice)がある⁷⁾。これらの基準は安全性を目的とした臨床試験の実施に関する遵守事項を設定し、試験データの信頼性の確保を主眼としている。さらには、SOP (Standard Operation Procedures) のような操作基準を設定することにより、GLPやGMPの実施に際して中間過程をチェックし、操作する側での個人差がでないようにすることも肝要である。

Table 2にあるようなウイルスベクターに対する安全性試験はベクターによる弊害を軽減化するという役割において、RCVの発生や迷入ウイルスを防ぐことによる効果に力点を置いている。したがって、このような安全性試験は投与されたウイルスベクターそのものによる副作用について完全に対応しているものではない。また、遺伝子治療の安全性に関する問題はウイルスベクター一つをとっても様々であり、総合的な問題の把握には多くの臨床研究が必要とされているのが現状である。一般的に、組換えウイルスの病理学的な影響などを予見することは困難であり、各遺伝子治療の実施については治験別、個別別に検討しなければならない。さらに、欧米諸国におけるガイドライン、あるいはそれらのガイドラインを基調にしたわが国における指針は、あくまでガイダンス(指針)であり、基本的な概念を提示しているにとどまっている。遺伝子治療のように急速に技術や知見が進歩している分野では、試験の実施や評価に柔軟性が必要であり、また、安全性に関する知見を発展させる上で、研究成果の共有、臨床試験データにおける情報公開をも考慮していかなければならない。遺伝子治療が抱える安全性への課題は多岐多様である。今後、安全性への諸問題を解決するために、研究者、企業、そして政府による密接な協調体制、及び幅広い視野での協議が望まれる。

文 献

- 1) 厚生省. 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について. 厚生省薬務局薬発 1062, 1995.
- 2) 上田龍三: 遺伝子医療とは. 遺伝子医療, 齋藤英彦, 吉田純編, 99-100, 財団法人名古屋大学出版会, 名古屋, 2000.
- 3) Stewart M., Cameron E., Campbell M., McFarlane R., Toth S., Lang K., Onions D. and Neil J.C. Conditional expression and oncogenicity of c-myc linked to a CD2 dominant control region. *Int. J. Cancer* 53 : 1023-1030, 1993.
- 4) Smith K.T. and Lee G.M. : Viral gene delivery systems for use in gene therapy—an overview of quality assurance and safety issues—Technical Bulletin No16, pp1-31, Q-One Blotech Ltd., Glasgow, 1994.
- 5) Horvath J., Faxing C. and Weber J. : Complementati on of adenovirus early region 1a and 2a mutants by Epstein-Barr virus-immortalized cell lines. *Virology* 184 : 141-148, 1991.
- 6) Medicines Control Agency : Rules and Guidance for Pharmaceutical Manufactures. Her Majesty's Stationery Office, London, 1993.
- 7) Department of Health : Good Laboratory Practice The United Kingdom Compliance Programme. Department of Health, London, 1989.