

1. 遺伝子治療テクノロジーの開発とその応用

小澤 敬也

自治医科大学内科学講座血液学部門, 輸血・細胞移植部
分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

遺伝子治療臨床研究の停滞を打ち破ったのが X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞遺伝子治療で, 明瞭な治療効果が得られたことから大きな脚光を浴びた。しかしその後, この遺伝子治療を受けた患者 2 名が白血病を発症し, レトロウイルスベクターによる遺伝子導入が引き金となったことから深刻な問題となった。すなわち, 挿入変異による LMO2 遺伝子の活性化が白血病発症の一因となったことが明らかにされた。今後の対策としては, レトロウイルスベクターの安全性を高めること, 部位特異的遺伝子組込み法の開発などの基盤研究が重要となる。また, より多くの疾患で造血幹細胞遺伝子治療の効果を上げるには, 選択的増幅遺伝子 (SAG) などの細胞制御技術の開発も必要である。その他, 安全性の観点からは非病原性ウイルスに由来する AAV ベクターの臨床応用が期待される。このベクターは神経細胞・筋細胞・肝細胞などへの遺伝子導入に適しており, 例えば, パーキンソン病の遺伝子治療などへの応用が検討されている。遺伝子操作技術は再生医療の領域でも必須であり, さらなる開発研究の推進が望まれる。

はじめに

これからの先端医療として, ゲノム医療/再生医療の発展が期待されているが, その中で遺伝子治療がしばらくの間, 先導的役割を担ってきた。特に1990年代は遺伝子治療臨床研究が活発に実施されたが, 後半はやや停滞感を伴ったものとなった。状況をさらに悪化させたのが, 遺伝子治療自体による最初の死亡事故で, ペンシルバニア大で実施されたオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC: ornithine transcarbamylase) 欠損症に対する遺伝子治療臨床研究において1999年に起こったものである。肝動脈内に注入されたアデノウイルスベクターが惹起した全身性の炎症反応が誘因になったものと考えられている。プロトコル自体に問題があったが, 安全性に対する過信が研究者のサイドにあったと思われる。さらにその後, フランスで実施された X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID: X-linked severe combined immunodeficiency) に対する造血幹細胞遺

伝子治療は際だった成功例として脚光を浴びたが, この遺伝子治療を受けた患者の 2 名が約 2 年半後に白血病を発症し (2002年), 深刻な問題となっている。原因究明に向けた研究が進むと共に, 今後の対策が大きな課題となっている。このような状況を背景に, ウイルスベクターの安全性が改めて大きな問題としてクローズアップしてきており, そのような観点からは, 非病原性ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターに対する期待が一層高まっている。

本稿では, レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入に起因する白血病の副作用と今後の対策を前半でまとめ, 後半では AAV ベクターを用いた遺伝子治療を取り上げる。但し, AAV ベクターの詳細については既に本誌で紹介してある¹⁾ため, ここではパーキンソン病遺伝子治療への応用について紹介することとする。

造血幹細胞遺伝子治療と白血病の発生

アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症・慢性肉芽腫症・ファンconi貧血・ゴージェ病などに対して, 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が米国を中心に90年代に実施された。しかしながら, 造血幹細胞への遺伝子導入効率が不十分であることや, 遺伝性疾患では抗癌剤を用いた移植前処置が一般に避けられること (したがって移植細胞が生着

連絡先

〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1
TEL: 0285-58-7353
FAX: 0285-44-5258
E-mail: kozawa@ms2.jichi.ac.jp

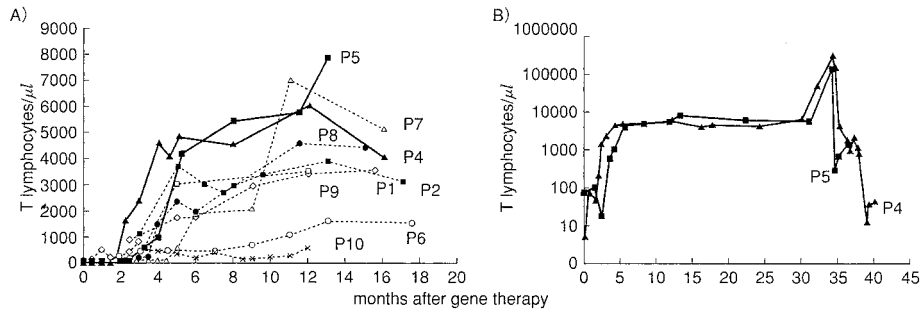


図1 造血幹細胞遺伝子治療を受けた X-SCID 患者における CD3 陽性 T リンパ球数の推移⁶⁾
 A) 症例 4 (P4), 症例 5 (P5) を含む 9 症例の T リンパ球の回復過程.
 B) 症例 4 (▲), 症例 5 (■) が白血病発症に至るまでの T リンパ球数の推移 (片対数表示).

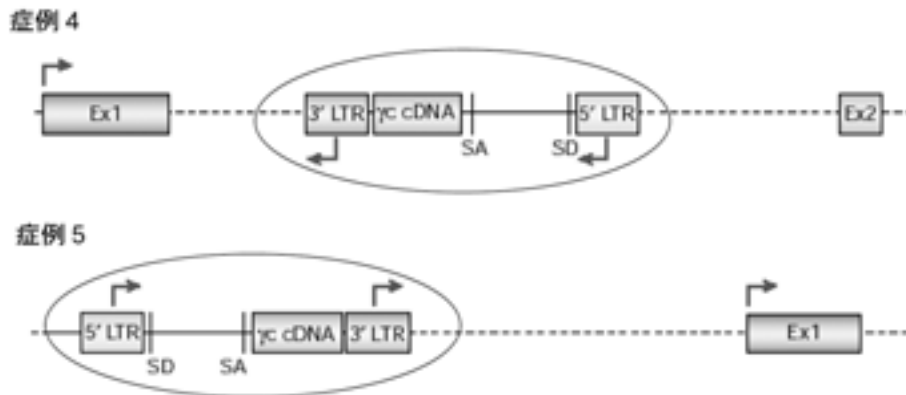


図2 ベクターゲノムの LMO2 遺伝子への組み込み
 症例 4 では, 第 1 イントロンに逆向きに組み込まれており, 症例 5 では, 第 1 エクソンの上流に組み込まれている. その結果, いずれのケースでも, LMO2 遺伝子の活性化が生じている.

しにくい) など, 様々な理由により, いずれも不成功に終わっていた.

そのような低迷状況の中で, X-SCID に対する造血幹細胞遺伝子治療の劇的な治療効果が 2000 年に報告された²⁾. X-SCID は, インターロイキン-2 (IL-2)・IL-4・IL-7・IL-9・IL-15・IL-21 などの各受容体に共通するサブユニット=コモンガンマ鎖 (γc) の遺伝子の異常に基づく疾患である. 細胞性免疫と液性免疫の両者が先天的に障害され, 患者は生後まもなくから反復する重症の細菌真菌・ウイルス感染症のため, そのままでは予後不良である. HLA 一致血縁者間骨髄移植が可能場合はそれが治療の第一選択であるが, 非血縁者間骨髄移植では良い治療成績が得られていない. そこで, 遺伝子治療法の開発が進められ, マウスの疾患モデル (γc 遺伝子のノックアウトマウス) を用いた造血幹細胞遺伝子治療実験で, その有効性が認められていた. 1999 年に入って, フランスの A. Fischer 博士らのグループは, X-SCID 患者の CD34 陽性細胞にレ

トロウイルスベクターを用いて正常 γc 遺伝子を導入し, 特に前処置を施すことなく自家移植した. その結果, それまで著減していた T リンパ球と NK 細胞が順調に増加し, 免疫能の回復も認められた^{2,3)}. この成功が発表された当時, 遺伝子治療関連では久しぶりの明るい話題となった. 患者末梢血細胞の導入遺伝子陽性率は, T リンパ球・NK 細胞がほぼ 100%, B リンパ球が 1~数%, 単球・顆粒球が 0.1% であった. また, CD34 陽性細胞の導入遺伝子陽性率も低かったことから, X-SCID では正常遺伝子の導入により修復されたリンパ球が体内で選択的増殖優位性を示すために治療効果が出やすかったものと考えられた. 但し, T リンパ球が高値を続けているのに対し, 理由は不明であるが, NK 細胞の数が経過と共に低下してきていた.

この臨床研究はその後もしばらくは順調に実施され, 英国とオーストラリアの症例を合わせると既に十数例に達していた. ところが, 1999 年 10 月に生後 1 ヶ月でこの遺伝子治療を受けた第 4 例目の男子が, 2002 年になって白血病

($\gamma\delta$ T 細胞白血病) を発症し (遺伝子治療後30ヶ月), 大問題となった (図1)^{4,5)}. 白血病細胞はモノクローナル (V γ 9 V δ 1) に増殖しており, 導入した γ c 遺伝子が第11番染色体短腕に位置する LMO 2 (LIM domain only-2) 遺伝子の第1イントロンに逆向きに組み込まれ (図2), この遺伝子を活性化したことが判明した⁶⁾. LMO 2 遺伝子は本来正常造血に必須の働きをしている転写因子をコードしているが, 染色体転座 [t(11;14)(p13;p11) など] による活性化を通じて小児 T-ALL の発症に関与していることが元々知られており, そのような癌関連遺伝子を人為的に活性化してしまったわけである⁷⁾. LM02遺伝子トランスジェニックマウスでは, T-ALL が発症することも知られている⁸⁾. 尚, この症例では, 病気が進行した時点で, partial trisomy 6 と t(6;13) の染色体異常が認められている. さらにその後, 生後3ヶ月で造血幹細胞遺伝子治療を受けた5例目の X-SCID 患者も, 2002年12月に T-ALL (TCR $\alpha\beta$ タイプ) を発症した (遺伝子治療後34ヶ月). このケースも, 不思議なことに, やはり LMO 2 遺伝子の活性化が挿入変異の結果生じている (図2). この症例では, TCR $\alpha\beta$ の解析からは3種類のクローン (V β 1, V β 2, V β 23) が検出されているが, γ c 遺伝子の組込み部位 (LMO 2 遺伝子の第1エクソンの上流) からはモノクローナルな集団であった⁶⁾. さらに, このケースでは, SIL-TAL 1 融合遺伝子や trisomy 10 が認められている. 尚, いずれの症例でも, ベクターゲノムが LMO 2 遺伝子に組み込まれたクローンは, 白血病が発症するかなり前から僅かに検出され, その後拡大してきたことが, 高感度 LAM-PCR (linear amplification-mediated polymerase chain reaction) 法⁹⁾ によりレトロスペクティブに明らかにされている⁶⁾. 因みに, 遺伝子治療の直後では, 多数の組込み部位が検出されている (ポリクローナル). 一方, これらの患者に認められた染色体異常は, secondary event として後から加わってきたものと理解されている.

最初の症例では癌家系などの特殊な事情もあったが, 次のケースではそのような背景はなく, 連続して白血病が発症したことから, より一層深刻な事態と受けとめられた. 尚, 白血病を発症した2症例は, その後, T-ALL に対する化学療法を受け, さらに最初のケースでは HLA 適合非血縁者間骨髄移植が実施されている.

さて, 遺伝子導入に用いられたレトロウイルスベクターは, 標的細胞の染色体 DNA にランダムに組み込まれる性質があることから, 挿入変異の問題は以前より指摘されていた¹⁰⁾. すなわち, 発癌に関わるような遺伝子の近傍にレトロウイルスベクターが組み込まれ, その遺伝子を活性化してしまう危険性である. しかし, そのようなことが実際に起こる確率は極めて低いと予想されたこと, また, 癌の発症に至るには複数の癌化のステップを必要とすること (多段階発癌), などの理由により, 実際に白血病を発症

することはほとんどないだろうと専門家も楽観視していた. 今回の残念な副作用は, 1) 挿入変異による癌関連遺伝子の活性化に加えて, 2) 遺伝子導入に成功したリンパ球系の細胞は体内で活発に増殖するようになったために, 癌化のステップが進みやすかったこと, また, 3) ベースに免疫不全があったために, 体内で発生した異常細胞を免疫学的に排除できなかったこと (癌の免疫学的監視機構の欠陥) などを原因として挙げることができる. 最後の点については, NK 細胞の再建が不完全であったことが関係しているかもしれない. その他, 遺伝子治療を受けた時点が生後間もなくであったこと, また, いずれのケースも比較的大量の遺伝子導入 CD34細胞の移植を受けており, 修復された T リンパ球の増殖速度が早かったことなども, 何らかの関係があるのではないかと議論されている. 尚, 複製可能レトロウイルス (RCR: replication competent retrovirus) の問題については, 上述の2症例では関与が否定されている.

造血幹細胞遺伝子治療の今後の安全対策

造血幹細胞への遺伝子導入法は, 依然としてレトロウイルスベクターがスタンダードであり, この状況は当面は変わらないと思われる. したがって, 実際に白血病の副作用が出現するかどうかは, X-SCID のような免疫抑制状態の有無に左右される部分が大きいものと予想されるが, この点に関しては動物実験での検証作業が必要と思われる. また, 今回の白血病発生で注目すべき点は, いずれのケースも LMO 2 遺伝子が活性化されたことである. レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いた場合, ランダムな遺伝子組込みが起こるとされているが, クロマチン構造などとの関連で, アクティブな遺伝子の近傍に導入遺伝子が組み込まれやすいことが最近明らかにされてきている¹¹⁻¹³⁾. 幹細胞/前駆細胞でアクティブな遺伝子 (LMO 2 遺伝子はまさにその例) は, 恒常的に活性化された場合, 今回のような問題を引き起こしやすいものと推定される. もちろん, その他にもいろいろな遺伝子が活性化された可能性があるが, 正常 γ c の発現で T リンパ球系の増殖が活発になったため, その系統で癌化のトラブルを起こしやすい LMO 2 の活性化されたクローンが結果的に選択されてきたものと推定される.

幹細胞遺伝子治療における今後の対策としては, より安全性の高いベクターの開発 (図3) と, ランダムな遺伝子組込みによる挿入変異を防ぐアプローチの二つが基盤研究として重要である¹⁴⁾. 前者のレトロウイルスベクターの改良については, SIN (self-inactivating) ベクターと組織特異的プロモーターの組合せを利用した導入遺伝子の発現制御が重要である. LTR のプロモーター活性を取り除くこと (SIN ベクター) により, 遺伝子組込み部位近傍の遺伝子の活性化が起こりにくくなるものと予想される. また,

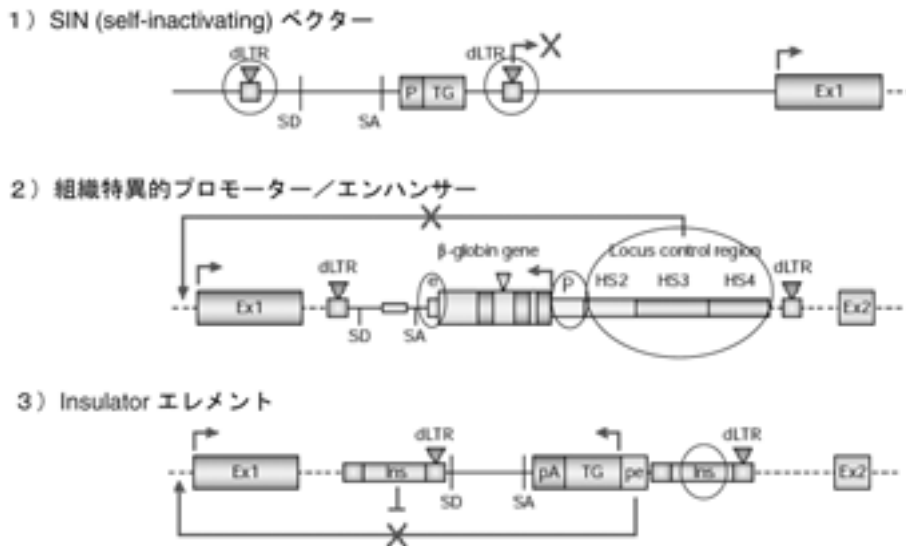


図3 安全性の高いレトロウイルスベクターの開発¹⁴⁾

遺伝子発現を特定の細胞集団に限定し、その発現レベルを厳格に制御することにより、癌化のリスクの低減化を図ることが可能になると思われる。さらに、insulator エレメントを利用することにより、エンハンサーが組み込み部位近傍の遺伝子へ影響することを阻止しようというアイデアも出されている。また、遺伝子導入した細胞が悪性化した場合にそれを排除するための自殺遺伝子（ガンシクロビルと組み合わせる HSV-TK 遺伝子など）を安全装置として組み込んでおくような対策も検討されている。後者の挿入変異への対策としては、相同組換えによる病因遺伝子自体の修復が理想的であるが、実用化には相当な時間がかかるものと予想される。より現実的なアプローチとしては、標的細胞のゲノムの中の安全な領域に遺伝子を部位特異的に組み込ませるといった方法である。例えば、AAV の二つのコンポーネント（ITR と Rep 蛋白質）を利用した第19番染色体長腕 AAVS1 領域への部位特異的遺伝子組み込み法¹⁵⁻¹⁸⁾が知られている。現状はコンセプトの証明の段階であるが、このような研究は今後益々活発になるものと予想される。

造血幹細胞遺伝子治療の有効性を高めるためのテクノロジー開発

X-SCID, ADA 欠損症¹⁹⁾では、修復されたリンパ球系細胞がそれぞれ選択的増殖優位性、選択的生存優位性を獲得するために、造血幹細胞への遺伝子導入効率が低くても治療効果が出やすい。しかしながら、慢性肉芽腫症、ゴージェ病、ファンconi貧血などのように、修復細胞の体内での選択的優位性を認めない疾患では、何らかの工夫が必要となる。そこで我々は、遺伝子導入細胞を体内で選択的に増やす新しい細胞制御システムの開発に取り組んでいる²⁰⁻²⁶⁾。この新規テクノロジーを選択的増幅遺伝子(SAG:

selective amplifier gene)と呼んでいるが、これは造血因子受容体の増殖シグナルを利用するもので、その活性を制御する分子スイッチとしては、ステロイドホルモン受容体のホルモン結合領域(HBD)やエリスロポエチン受容体細胞外領域などを検討している。その他、造血因子受容体の増殖シグナルを利用する同様の試みとして、FKBP12ドメイン(FK506と結合する)と造血因子受容体とのキメラ蛋白質の遺伝子を導入しておき、FK1012(FK506の二量体)あるいはその誘導体(AP20187など)により標的細胞の増殖を誘導するシステムがシアトルの研究グループにより開発されている^{27,28)}。いずれのシステムでも造血因子受容体部分の二量体化誘導が増殖シグナルのスイッチをオンにする役目を果たす。安全性の観点からは、遺伝子導入細胞の増殖が恒常的に刺激され続けることのないように、増殖シグナルを厳格に制御することが重要である。

我々の研究グループは臨床応用の第一段階としては、安全性を重視し、造血前駆細胞レベルでの増幅誘導システムを試みる計画である。増幅効果が一時的であっても、顆粒球・単球など食細胞の先天性機能異常症の一つである慢性肉芽腫症の場合には、感染症などの必要時にのみ正常化した顆粒球を増幅させるだけでも臨床的には充分価値があると考えている²⁵⁾。

遺伝子治療用 AAV ベクターの開発

AAV は直線状一本鎖 DNA ウイルスで、それ自身は非病原性であることから、このウイルスに由来するベクターは安全性が高い。また、非分裂細胞への遺伝子導入が可能であること、さらに非分裂細胞が標的の場合には一回の遺伝子導入で長期間に亘る遺伝子発現が期待できることなどの特徴があり、AAV ベクターは神経細胞や筋細胞、肝細

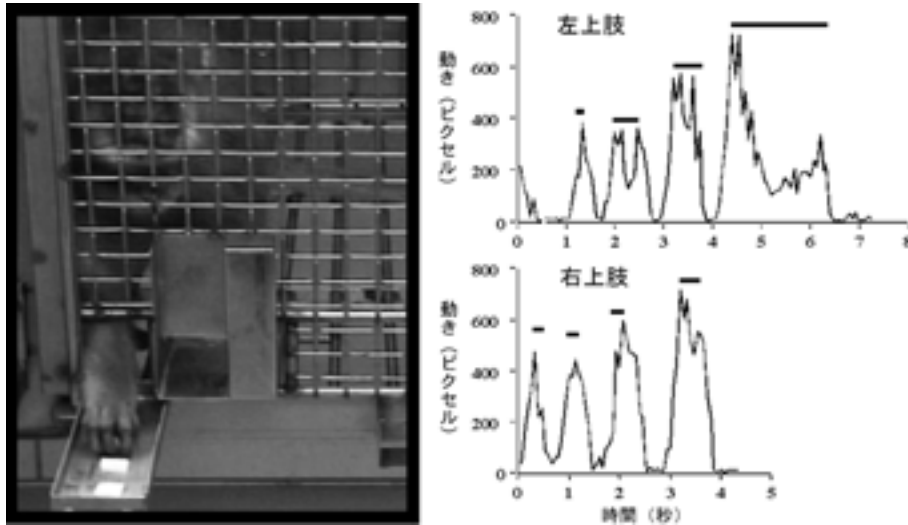


図4 パーキンソン病モデルサルにおける遺伝子治療の効果⁴⁰⁾

MPTP 慢性投与によりパーキンソン病を発症させたサルにおいて、片側（このサルでは左側）の被殻に AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH を注入した。エサを取らせる動作をさせると（左図）、右上肢の動きに改善がみられた。上肢の動きをビデオ解析した結果を右図に示す。グラフ上のバーはエサを取るのに要する時間を示す。また、左上肢では震えが認められる。

胞などを標的とした遺伝子治療に適している^{29,30)}。尚、小型ウイルスに由来するため、大きな遺伝子を挿入することはできないが、AAV は重複感染が可能なために、複数の遺伝子を別々のベクターを用いて同一の標的細胞に導入することができる^{31,32)}。

従来、AAV 2 に由来するベクターが用いられてきたが、最近、AAV の血清型と組織特異性の関係が注目されている。例えば、神経系³³⁾や気道系³⁴⁾では遺伝子導入効率が AAV 5 ベクターの方が優れていると報告されており、さらに、AAV 5 ベクターを用いると神経細胞だけでなくグリア細胞への遺伝子導入も可能であるとされている（神経細胞へ特異的に遺伝子導入するには AAV 2 ベクターが適している）。また、筋肉を標的とする場合には、AAV 1 ベクターが最も効率が良く、AAV 2 ベクターはあまり適していない^{35,36)}。肝臓には AAV 8 ベクターが優れている³⁷⁾。このように標的組織の種類に応じて種々の血清型の AAV ベクターを使い分ける必要がある。

最近、AAV ベクターを用いた肝臓への遺伝子導入実験で、特定の遺伝子領域に組込みが起りやすことが報告され、安全性が高いことで知られていた AAV ベクターでも注意が喚起された³⁸⁾。しかしながら、非分裂細胞の場合は、secondary event の起こる確率が低いことから、実際に癌化が起こることは考えにくい。肝臓の場合は再生を起こしやすい臓器であることから若干問題があるが、神経細胞や筋細胞を標的とする場合はほとんど心配する必要はないと思われる。さらに、AAV ベクターの場合は、遺伝子組込みが起こる頻度は予想以上に低いことが判明してきて

いる。骨格筋への遺伝子導入では、筋細胞のゲノムへの組込みは長期間の観察でもほとんど検出されず³⁹⁾、AAV ベクターはむしろ non-integrating vector として扱われるようになってきている。野生型 AAV との大きな違いは、Rep 遺伝子を取り外してあることで、その結果、AAV ベクターゲノムのほとんどは標的細胞の核内でエピソームとして存在していることが実験的に示されている。

パーキンソン病に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療

パーキンソン病は黒質-線条体系ドパミンニューロンの選択的変性により線条体におけるドパミン含量の低下を生ずる原因不明の神経変性疾患である。遺伝子治療法としては、ドパミン合成系酵素の遺伝子を線条体に導入するアプローチが動物実験で検討されてきている^{4,5)}。ドパミン合成の律速酵素はチロシン水酸化酵素（TH: tyrosine hydroxylase）であり、L-ドーパ合成を触媒する。L-ドーパは芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase）によりドパミンに変換される。また、TH の補酵素として働くテトラヒドロピオプテリンの合成経路の律速酵素として GTP シクロヒドロラーゼ I（GCH: GTP cyclohydrolase I）が知られる。パーキンソン病患者ではこれらの酵素活性がいずれも低下しており、効率よくドパミンを産生させるには三種類の酵素全てを補充する必要がある。なお、AADC 活性の著しい低下のために L-ドーパが効きにくくなってきた患者では、AADC 遺伝子を補充すれば L-ドーパが再び効くようになると考えられる。

我々の研究グループ（自治医大神経内科との共同研究）では、疾患モデル動物として、黒質-線条体系ドーパミンニューロンを神経毒の6-OHDA（6-hydroxydopamine）で片側だけ破壊したパーキンソン病モデルラットを作製した。このラットでは、破壊側の線条体でドーパミン含量が低下し、パーキンソン病類似の病態が出現する。遺伝子治療実験では、TH, AADC, GCHの各遺伝子を搭載したAAVベクター（AAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCH）を作製し、それをモデルラットの黒質破壊側の線条体に定位脳手術により注入した。その結果、一回の遺伝子治療で異常運動が改善され、その効果は18カ月以上持続した^{31,32}。次に、大型動物で同様の結果が得られるかどうか懸念されたため、霊長類のカニクイザルを用いて遺伝子治療前臨床研究を行った（自治医大神経内科、筑波霊長類センターとの共同研究⁴⁰）。まず、ドーパミンニューロンを選択的に破壊する神経毒のMPTP（1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine）を慢性投与することにより薬剤性パーキンソニズムを発症させた。次に、このパーキンソン病モデルサルの一側の被殻に、定位脳手術によりAAV-TH, AAV-AADC, AAV-GCHのベクター混合液を注入した。その結果、対側上下肢の運動障害の明らかな改善が認められ、レーズン取りなどの動作が素早くなり、筋強剛、振戦も消失した（図4）。副作用は特に認められなかった。また、マイクロダイアリシス法により、注入側被殻でドーパミン分泌量の増加が確認された。この実験で、L-ドーパを静脈注射するとドーパミン分泌量が著しく増加した。このことは遺伝子導入により発現させたAADCがよく働いたことを示している。

臨床応用の第一段階では、AADC活性の低下のためにL-ドーパ療法が効きにくくなってきた患者を対象とし、L-ドーパ内服にAAV-AADCだけを組み合わせる方法が妥当であると思われる^{41,42}。この方法では、線条体におけるドーパミン産生をL-ドーパ投与量でコントロールできることから安全性が高い。また、AAVベクターの安全性評価という点でも、最初は一種類のベクターからスタートするのが望ましいと考えられる。この治療戦略についても、モデルサルを用いた前臨床研究を行っており、明らかな治療効果を確認している。

おわりに

X-SCIDでみられた白血病発生の副作用に関しては、もともと白血病を発症しやすいマウスでの遺伝子治療実験でも観察されなかったような高頻度であり、免疫不全状態など、かなり特殊な状況下で生じたものと思われる。しかし、レトロウイルスベクターを用いた幹細胞遺伝子治療に対する深刻な警鐘として、従来に増して安全性に配慮し、慎重に取り組んでいくことが大切である。オンコウイルス由来のレトロウイルスベクター以外のウイルスベクターに関し

ては、具体的な問題が発生しているわけではないが、それぞれの特徴に応じた注意を払っていく必要がある。例えば、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、標的細胞あたりのコピー数が通常のレトロウイルスベクターの場合より多いと言われており、挿入変異による癌遺伝子活性化のリスクもそれだけ高くなる可能性を考えておく必要がある。

一方、遺伝子治療が行われた1例目、2例目のX-SCID患者は、既に4年以上に亘って治療効果が持続しており、遺伝子治療のポジティブな面を評価することも忘れてはならない。最初から完璧な治療法であることを望むのは臨床の現場では困難である。有用性と限界を充分わきまえた上で前に進めていくべきであろう⁴³⁻⁴⁵。

重篤な副作用の発生と有効性が今一つといった最近の厳しい状況のために遺伝子治療臨床研究が全体的にスローダウンする中で、AAVベクターの臨床展開も遅れ気味であるが、前臨床研究での成果は大いに期待を抱かせるものである。

企業の立場からは、現状では非ウイルス性ベクターに向かう傾向があるが、遺伝子導入効率と遺伝子発現効率、ならびに効果の持続期間などを考えると、やはりウイルスベクターに代わり得るものではない。また、遺伝子操作を取り入れた新しい治療テクノロジーは再生医療の領域でも必須のものであり、現在直面している課題を克服しつつ、開発研究をさらに推進していくことが重要である。

文 献

- 1) 小澤敬也：アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによる遺伝子治療。ウイルス53：163-170, 2003.
- 2) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 288 : 669-672, 2000.
- 3) Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M : Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. N Engl J Med 346 : 1185-1193, 2002.
- 4) European Society of Gene Therapy : French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). J Gene Med 5 : 82-84, 2003.
- 5) Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A : A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 348 : 255-256, 2003.

- 6) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M : LMO 2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X 1. *Science* **302** : 415–419, 2003.
- 7) McCormack MP, Rabbitts TH : Activation of the T-cell oncogene LMO 2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **350** : 913–922, 2004.
- 8) Larson RC, Lavenir I, Larson TA, Baer R, Warren AJ, Wadman I, Nottage K, Rabbitts TH : Protein dimerization between Lmo 2 (Rbtn 2) and Tal 1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15** : 1021–1027, 1996.
- 9) Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Haas S, Wissler M, Muessig A, Tisdale JF, Kuramoto K, Andrews RG, Wu T, Kiem HP, Dunbar CE, von Kalle C : Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood* **100** : 2737–2743, 2002.
- 10) Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C : Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **101** : 2099–2114, 2003.
- 11) Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM : Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300** : 1749–1751, 2003.
- 12) Trono D. : Picking the right spot. *Science* **300** : 1670–1671, 2003.
- 13) Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F : HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110** : 521–529, 2002.
- 14) Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC : Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* **3** : 477–488, 2003.
- 15) Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, McQuinston SA, Kurtzman GJ, Ozawa K, Natsoulis G : Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* **71** : 7951–7959, 1997.
- 16) Urabe M, Hasumi Y, Kume A, Surosky RT, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K : Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep 78 protein. *J Virol* **73** : 2682–2693, 1999.
- 17) Kogure K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Sato Y, Monahan J, Ozawa K : Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K 562 cells using AAV-derived components. *Int J Hematol* **73** : 469–475, 2001.
- 18) Urabe M, Kogure K, Kume A, Sato Y, Tobita K, Ozawa K : Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS 1-targeted integration. *J Gen Virol* **84** : 2127–2132, 2003.
- 19) Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortelaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C : Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with non-myeloablative conditioning. *Science* **296** : 2410–2413, 2002.
- 20) Ito K, Ueda Y, Kokubun M, Urabe M, Inaba T, Mano H, Hamada H, Kitamura T, Mizoguchi H, Sakata T, Hasegawa M, Ozawa K : Development of a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic cells. *Blood* **90** : 3884–3892, 1997.
- 21) Matsuda KM, Kume A, Ueda Y, Urabe M, Hasegawa M, Ozawa K : Development of a modified selective amplifier gene for hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther* **6** : 1038–1044, 1999.
- 22) Xu R, Kume A, Matsuda KM, Ueda Y, Kodaira H, Ogasawara Y, Urabe M, Kato I, Hasegawa M, Ozawa K : A selective amplifier gene for tamoxifen-inducible expansion of hematopoietic cells. *J Gene Med* **1** : 236–244, 1999.
- 23) Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K : In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* **5** : 175–181, 2003.
- 24) Hanazono Y, Nagashima T, Takatoku M, Shibata H, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Dunbar CE, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K : In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther* **9** : 1055–1064, 2002.
- 25) Hara T, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Tsurumi H, Moriwaki H, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K : Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by co-transferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther* (in press)
- 26) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M : In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med* **6** : 22–31, 2004.
- 27) Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE, Emery DW, Blau CA : In vivo selection using a cell-growth switch. *Nat Genet* **26** : 64–66, 2000.
- 28) Neff T, Horn PA, Valli VE, Gown AM, Wardwell S, Wood BL, von Kalle C, Schmidt M, Peterson LJ, Morris JC, Richard RE, Clackson T, Kiem HP, Blau CA : Pharmacologically regulated in vivo selection in a large animal. *Blood* **100** : 2026–2031, 2002.
- 29) Russell DW, Kay MA : Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* **94** : 864–874, 1999.
- 30) Flotte TR : Gene therapy progress and prospects : recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors.

- Gene Ther **11** : 805–810, 2004.
- 31) Fan D, Ogawa M, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogasawara Y, Urabe M, Nishizawa M, Nakano I, Yoshida M, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Ozawa K : Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno associated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9** : 2527–2535, 1998.
 - 32) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano N, Ozawa K : Triple transduction with adeno associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* **11** : 1509–1519, 2000.
 - 33) Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA : Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors : transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 3428–3432, 2000.
 - 34) Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA : Adeno-associated virus type 5 (AAV 5) but not AAV 2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* **74** : 3852–3858, 2000.
 - 35) Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ : Cross-packaging of a single adeno associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76** : 791–801, 2002.
 - 36) Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE : Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* **2** : 619–623, 2000.
 - 37) Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM : Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 11854–11859, 2002.
 - 38) Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA : AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* **34** : 297–302, 2003.
 - 39) Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR : Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* **77** : 3495–3504, 2003.
 - 40) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume K, Matsumura M, Nagatsu N, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao T, Nakano I, Ozawa K : Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* **13** : 345–354, 2002.
 - 41) Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF, Harvey-White J : Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys ; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* **164** : 2–14, 2000.
 - 42) Sanchez-Pernaute R, Harvey-White J, Cunningham J, Bankiewicz KS : Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Mol Ther* **4** : 324–330, 2001.
 - 43) Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem HP, Candotti F, Tisdale J, Riviere I, Blau CA, Richard RE, Sorrentino B, Nolte J, Malech H, Brenner M, Cornetta K, Cavagnaro J, High K, Glorioso J : American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther* **8** : 180–187, 2003.
 - 44) Williams DA, Baum C : Gene therapy—new challenges ahead. *Science* **302** : 400–401, 2003.
 - 45) Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F : The future of gene therapy. *Nature* **427** : 779–781, 2004.

Development and Application of Gene Therapy Technologies

Keiya Ozawa, M. D., Ph. D.

Division of Hematology, Department of Medicine
Division of Cell Transplantation and Transfusion
Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine
Jichi Medical School
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan
E-mail : kozawa@ms2.jichi.ac.jp

The success of hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) was a major breakthrough in the field of gene therapy. However, two patients treated with this gene therapy developed leukemia at a later time, and retroviral vector-mediated gene transfer was considered to trigger leukemogenesis ; i.e. insertional mutagenesis caused activation of LMO 2 gene, which was one step toward leukemia development. To cope with this serious problem, basic studies are required to improve the safety of retroviral vectors and to develop the method for site-specific integration of transgenes. In addition, we have to develop technologies such as selective amplifier genes (SAGs), the system for selective expansion of transduced cells, in order to obtain therapeutic efficacy of hematopoietic stem cell gene therapy in many other disorders. Moreover, clinical applications of AAV vector are promising from the standpoint of safety issue, because this vector is derived from non-pathogenic virus. AAV vector is appropriate for gene transfer into neurons, muscles, and hepatocytes. For example, gene therapy for Parkinson's disease is investigated using AAV vectors. Genetic manipulation is also one of the indispensable technologies in the field of regeneration medicine, and further promotion of basic research is important.