

総合医科学研究センター

センター長 大橋 十也

平成 26 年に総合医科学研究センター（センター）は本学の研究を推進するために大きく改組され、これで組織的にも、また場所的にも混在していた様々な機能が研究支援部門と研究部、研究所の 3 つに明確に分かれ、大学 1 号館にはほぼ集約されました。研究支援部門は 5 つより成り、それらは基盤研究施設（分子細胞生物学）、基盤研究施設（分子遺伝学）、実験動物研究施設、アイソトープ実験研究施設そして GMP 対応細胞・ベクター産生施設であります。研究部門としては、遺伝子治療研究部、悪性腫瘍治療研究部、分子免疫学研究部、医用エンジニアリング研究部、神経科学研究部、薬物治療研究部、分子疫学研究部、臨床疫学研究部、再生医学研究部の 9 部門あり、それぞれ独自の研究を進めています。センター内には、高次元医用画像工学研究所と臨床医学研究所、2 つの研究があります。

それぞれの部門の教育、研究内容は以下に詳しく述べられていますが、これで学内の研究を下支えしかつ自らの研究を推進する体制が整ったといえます。

遺伝子治療研究部

教授：大橋 十也 遺伝子治療，先天代謝異常症，小児科学
准教授：小林 博司 遺伝子治療，先天代謝異常症，小児科学

教育・研究概要

I. はじめに

本年度もライソゾーム蓄積症（LSDs）、消化器癌を対象に研究を進めた。LSDs の研究では遺伝子治療法の開発、低分子薬の開発などの治療法の開発や、iPS を用いた病態解析、遺伝子診断法の開発などを行った。癌治療ではプロテアーゼ阻害剤を用いた治療法の開発を引き続き行った。

II. LSDs 酵素補充療法における抗体発生に関する研究

LSDs の一つであるポンベ病では酵素補充療法が効果を挙げているが酵素製剤に対する抗体が出現し治療効果を阻害する。我々は以前、酵素を経口投与することにより抗体価の上昇が抑制されることをワイルドタイプのマウスを用いて明らかにした。今年度はワイルドタイプマウスではなくてポンベ病モデルマウスを用いて臨床に近いプロトコルで研究を行った。結果として、ポンベ病モデルマウスにおいても酵素に対する抗体価上昇の抑制ならびに致死的なアレルギー反応を抑制出来ることが判明した。

III. LSDs 骨髄移植におけるキメリズムの検討

LSDs の一つであるムコ多糖症（MPS）II 型は近年骨髄移植が有効であることが本邦より報告された。効果を表すためにどの程度のドナーキメリズムが必要かは不明である。そこで様々な比率でドナー細胞とレシビエント細胞が混在する MPS II 型モデルマウスを作成し、蓄積物質であるグリコサミノグリカン（GAG）を測定した。結果としてドナー細胞の比率が高まれば高まるほど GAG の減少が多かったが、低いキメリズムでも GAG の蓄積減少が認めら

れた。以上より MPSⅡ型の骨髄移植では、より高いキメラズムを目指すべきであることが判明した。ただ GAG の減少度合いと臨床症状の改善度合いがどれくらい関連しているかは今後の課題であった。

Ⅳ. レンチウイルスベクターもしくはジンクフィンガーを用いた相同組換えによる LSDs の遺伝子治療, MPS の骨代謝系解析

我々は従来より MPSⅦ型およびクラッペ病の遺伝子治療に取り組んできた。MPSⅦ型に関してはモデルマウス新生児期に静脈注射し、脳や心臓などの重要臓器での酵素発現および蓄積する GAG の減少、中枢でのオートファジービルドアップの改善、更に 30 週令の長期間にわたるベクターコピーの脳組織での確認が得られた。更に MPSⅡ型のモデルマウスに対し、8 週令で骨髄を採取し欠損酵素を組込んだ組換えレンチウイルスを感染させて遺伝子導入し、ドナーモデルに投与（造血幹細胞移植）し、末梢血中の酵素発現、中枢系での酵素発現、蓄積する GAG の有意な減少が病理学的イブロン酸測定法によって見られた (Wakabayashi T, et al. Hum Gene Ther 2015)。更に今年度から同じモデルマウスの骨系統代謝を調べるため、新生児および 8 週令のマウスの骨芽細胞培養、および骨代謝系シグナル伝達物質を調査し、有意差が出れば遺伝子治療で介入し解析する予定である。またクラッペ病でも同様に新生児遺伝子治療を施し、脳や肝臓での酵素活性の亢進、蓄積するサイコシンの減少、病理学的改善、および発症延長、寿命の改善が得られた。更にジンクフィンガーを用いた方法でマウス由来の細胞株で部位特異的な相同組換え、および酵素活性の改善に成功した。これらの結果からレンチウイルスを用いた遺伝子治療、ジンクフィンガーを用いた部位特異的な相同組換え法は中枢症状を伴うライソゾーム病の治療に有効である可能性が示唆された。

Ⅴ. MPSⅡ型に蓄積する疾患特異的グリコサミングリカン測定法の開発

MPSⅡは、iduronate-2-sulfatase (IDS) の欠損により生じる X 連鎖性劣性遺伝病であり、本邦では最も発症頻度の高い MPS である。本疾患は、ヘパラン硫酸やデルマトン硫酸といったイブロン酸を含む GAG の蓄積を特徴とし、診断や治療効果を評価する際にバイオマーカーとしてその測定が行われている。しかし、現在主流の測定法は、多様な GAG の総量を評価する方法であり、疾患に伴う GAG の蓄積を正確に評価することが困難な場合が

ある。そこで我々は、IDS 欠損に伴い蓄積する GAG の非還元末端が硫酸化されたイブロン酸である点に着目し、同糖を指標とした疾患特異的 GAG の測定法の開発を行った。本研究では、野生型及び MPSⅡモデルマウスの各種臓器由来のホモジェネートを材料とし、これらから精製した GAG を組換え IDS 及び iduronidase で消化し、産生されたイブロン酸を HPLC で分析した。その結果、野生型マウス由来の肝臓や脳においてはイブロン酸が検出限界以下であった一方で、MPSⅡマウス由来の試料では顕著なイブロン酸の増加が認められた。この結果より、非還元末端由来の硫酸化イブロン酸の測定は、疾患特異的な GAG の評価として有用であると考えられる。

Ⅵ. ファブリー病の原因遺伝子 GLA の遺伝子変異解析とファブリー病モデルマウスの病態解析

ファブリー病は、細胞内ライソソーム酵素の一つである「 α ガラクトシダーゼ A (GLA)」タンパク質の機能不全によって生じる X 染色体連鎖性の先天性スフィンゴ脂質代謝異常症である。GLA 酵素活性の低下によりその基質である「グロボトリアオシルスフィンゴシン (Gb3)」が細胞内に過剰蓄積することによって全身の細胞の機能を阻害し、体の様々な箇所に症状が出現する。

男性ファブリー病患者の場合、白血球中 GLA 酵素活性値の劇的な低下を示すことから、その確定診断は容易である。しかし女性ヘテロ・ファブリー病保因者の場合、白血球中 GLA 酵素活性値は健常人と同程度の値を示すケースがあることから、女性ヘテロ・ファブリー病保因者の確定診断は GLA 遺伝子の遺伝子変異解析が必須となる。我々は GLA 遺伝子変異が未同定であった患者らの遺伝子解析を詳細に行った所、GLA イントロン上に変異を持つ患者家系、複数の GLA エキソン領域を欠損した患者家系、GLA エキソン領域にレトロトランスポゾンの挿入がある患者の変異配列を明らかにした。

ファブリー病モデルマウスは GLA 遺伝子を欠損しており GLA 酵素活性を持たないマウスである。本マウスはヒト患者と同様に全身の細胞に Gb3 を過剰蓄積するが、全身症状は患者ほど強くなく寿命も正常マウスと同程度であるといわれている。我々は本マウスの行動解析や病理組織学的解析を行っている。

Ⅶ. 難治性消化器癌に対する NF- κ B 阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討及び癌性疼痛の改善に関する検討

我々はこれまで難治性消化器癌に対する NF- κ B の活性化抑制をターゲットとした抗腫瘍効果の検討を様々な消化器癌に対して行っている。以前より、様々な悪性腫瘍の増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性に NF- κ B の活性化が関与している事が報告されている。我々は脾炎や DIC の治療で広く汎用されているメシル酸ナファモスタット（フサン[®]）が NF- κ B の活性化を抑制し、単剤または抗癌剤との併用にて抗腫瘍効果をもたらす事を脾癌、胃癌、胆嚢癌にて示してきた。臨床の現場に於いても、切除不能脾臓癌に対する FUT175 併用塩酸ゲムシタピン（GEM）の第 2 相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来た。現在は脾癌に対する放射線併用のメシル酸ナファモスタット投与の抗腫瘍効果の検討を行っており、良好な結果が得られている。現在の切除不能脾臓癌の標準治療は塩酸ゲムシタピン/S-1 療法または塩酸ゲムシタピン/Nab-Paclitaxel 療法であるため、両者との併用療法を検討している。さらに、新たな NF- κ B 阻害薬として、サリドマイドの誘導体であるボマリドマイド着目し、脾癌に対するその抗腫瘍効果についても検討中である。また放射線療法により癌細胞の上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT）が亢進することが報告されているため、直腸がん術前放射線化学療法における EMT の抑制法の検討している。EMT の促進因子には NF- κ B、STAT-3 が関与しているため両者をターゲットとした治療法を開発する。

癌性疼痛は癌患者の QOL を著名に低下させることがわかっているため、脾臓癌患者の痛みのメカニズム、そして治療法に関しての検討を行っている。癌細胞の神経浸潤の抑制や、神経伝達物質の分泌に関して遺伝子介入を行うことで癌性疼痛の改善法を開発している。

Ⅷ. ポンベ病 iPS 細胞に対する遺伝子導入およびメタボローム解析

遅発型ポンベ病における心合併症の病態メカニズムの解明を目指して研究を行った。心筋の分化誘導系を確立し、レンチウイルスを用いた遺伝子導入による表現型の改善およびメタボローム解析を用いた代謝動態の評価を行った。まず、欠損遺伝子を発現する第 3 世代レンチウイルスベクターをクローニングし、高力価ウイルスを作成した。ポンベ病 iPS 細胞に導入したところ、容量依存性に酵素活性の上昇、

グリコーゲンの低下が見られた。さらに、心筋細胞に分化誘導したところ治療効果の改善が維持されていることが示された。さらに、ポンベ病 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の代謝産物を、“メタボローム解析”という手法を用いて網羅的に解析を行った。ポンベ病 iPS 細胞由来心筋細胞では酸化グルタチオンが上昇しており、酸化ストレスの存在が明らかになった。また、酸化ストレスが存在することをモデルマウスの心筋・骨格筋でも確認し、病態と関連していることが裏付けられた。今後、抗酸化剤などの酸化ストレスに対する治療法に可能かどうかを実証する予定となっている。

「点検・評価」

各研究において一定の成果が上がり、学会発表、論文発表が出来たことは評価できる。しかしながら、ヒトへの応用がまだ出来ていないことが問題点として挙げられる。ヒトへの応用のロードマップを明確に示せる研究を行う必要がある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Katagiri S, Gekka T, Hayashi T, Ida H, Ohashi T, Eto Y (Institute of Neurological Disorders), Tsuneko H. OAT mutations and clinical features in two Japanese brothers with gyrate atrophy of the choroid and retina. *Doc Ophthalmol* 2014; 128(2): 137-48.
- 2) Shimada Y, Nishimura E, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y (Institute of Neurological Disorders), Ida H, Ohashi T. Proteasome inhibitor Bortezomib enhances the activity of multiple mutant forms of lysosomal α -glucosidase in Pompe disease. *JIMD Rep* 2015; 18: 33-9. Epub 2014 Sep 26.
- 3) Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuohara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One* 2014; 9(7): e102311.
- 4) Sato Y, Kobayashi H, Sato S, Shimada Y, Fukuda T, Eto Y, Ohashi T, Ida H. Systemic accumulation of undigested lysosomal metabolites in an autopsy case of mucopolipidosis type II; autophagic dysfunction in cardiomyocyte. *Mol Genet Metab* 2014; 112(3): 224-8.
- 5) Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Akiyama M, Otsu M¹⁾, Nakauchi H¹⁾ (¹Univ of Tokyo), Ohashi T, Ida H. Effect of donor chimerism to reduce the level of

- glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. *J Inherit Metab Dis* 2015 ; 38(2) : 333-40.
- 6) Kobayashi M, Ohashi T, Iizuka S, Kaneshiro E, Higuchi T, Eto Y, Ohashi T, Ida H. Frequency of de novo mutations in Japanese patients with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 2014 ; 1 : 283-7.
- 7) Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M (Univ of Tokyo), Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K (Kyoto Univ), Ida H, Ohashi T, Nakauchi H, Eto Y. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid-alpha-glucosidase in Pompe's iPSCs. *Mol Genet Metab* 2014 ; 112(1) : 44-8.
- 8) Yamada A, Yokoo T, Yokote S, Yamanaka S, Izuhara L, Katsuoka Y, Shimada Y, Shukuya A, Okano HJ, Ohashi T, Ida H. Comparison of multipotency and molecular profile of MSCs between CKD and healthy rats. *Hum Cell* 2014 ; 27(2) : 59-67.

II. 総 説

- 1) 大橋十也. 遺伝子の塩基配列. *医事新報* 2014 ; 4728 : 71.
- 2) 大橋十也. 【iPS細胞を用いた難病研究－臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見】(第5章) 内分泌・代謝疾患 ムコ多糖症. *遺伝子医 MOOK* 2014 ; 27 : 186-9.
- 3) 佐藤洋平, 大橋十也. 【iPS細胞を用いた難病研究－臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見】(第5章) 内分泌・代謝疾患 Pompe病. *遺伝子医 MOOK* 2014 ; 27 : 181-5.
- 4) 大橋十也. オーフアンドラッグの開発. *Pediatric Endocrinology Reviews*.抄訳シリーズ 2014 ; 42 : 6-7.
- 5) 大橋十也. 2015年1月21日放送 広がるライソゾーム病の酵素補充療法. *小児科診療 UP-to-DATE ラジオ NIKKEI 放送内容集* 2015 ; 11 : 38-41.

III. 学会発表

- 1) Shirai Y, Shiba H, Iwase R, Haryki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibitor of nuclear factor NF- κ B activation enhances the antitumor effect of radiation therapy for pancreatic cancer. ACS 2014 (100th Annual American College of Surgeons Clinical Congress). San Francisco, Oct.
- 2) Wakabayashi T, Kobayashi H, Akiyama K, Higuchi T, Shimada Y, Izuka S, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Lenti-

viral ex vivo gene therapy to the murine model of Mucopolysaccharidosis type 2. 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT 2014). Tokyo, Aug.

- 3) Kobayashi H, Ariga M, Sato Y, Wakabayashi T, Shimada Y, Higuchi T, Izuka S, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Gene therapy for Krabbe disease using the system of lentiviral vector and Zinc Finger nuclease. 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGT 2014). Tokyo, Aug.
- 4) 白井祥睦, 宇和川匡, 柴 浩明, 岩瀬亮太, 春木孝一郎, 藤原祐樹, 古川賢英, 飯田智則, 大橋十也, 矢永勝彦. 膵臓癌に対するNF-kappa B活性抑制剤併用塩酸ゲムシタビン, S1療法の抗腫瘍効果の検討. 第69回日本消化器外科学会総会. 郡山, 7月.
- 5) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Disease modeling of late-onset Pompe disease-specific iPS cells. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting. Vancouver, June.
- 6) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Disease modeling of late-onset Pompe disease-specific iPS cells. 17th Annual Meeting of the American Society Gene & Cell Therapy. Washington D.C., May.
- 7) Wakabayashi T, Kobayashi H, Akiyama K, Higuchi T, Shimada Y, Izuka S, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Lentiviral ex vivo gene therapy to the murine model of mucopolysaccharidosis type II. ESGCT (European Society of Gene and Cell Therapy) and NVGCT (Netherlands Society of Gene and Cell Therapy) Collaborative Congress. The Hague, Oct.
- 8) 樋口 孝, 小林正久, 金城栄子, 嶋田洋太, 安藤理恵 (大分大), 小林博司, 大竹 明 (埼玉医科大), 黒柳秀人 (東京医科歯科大), 井田博幸, 大橋十也. フェブリー病患者 α ガラクトシダーゼA遺伝子の遺伝子変異解析. 第28回日本小児脂質研究会. 千葉, 11月.
- 9) 佐藤洋平, 小林博司, 樋口 孝, 衛藤義勝, 井田博幸, 江良拓実, 大橋十也. iPS細胞を用いた遅発型Pompe病における心合併症の疾患モデリング. 第56回日本先天代謝異常学会総会. 仙台, 11月.
- 10) 樋口 孝, 小林正久, 金城栄子, 嶋田洋太, 安藤理恵, 小林博司, 大竹 明, 黒柳秀人, 井田博幸, 大橋十也. MLPAならびにGLA cDNAを用いたAnderson-Fabry病の α -galactosidase A遺伝子の変異解析. 第56回日本先天代謝異常学会総会. 仙台, 11月.
- 11) 横井健太郎, 秋山和政, 金城栄子, 樋口 孝, 嶋田洋太, 小林博司, 大津 真, 中内啓光, 大橋十也, 井田博幸. MPS II型マウスの骨髄移植における, 必要最低骨髄細胞生着率の検討. 第56回日本先天代謝異常

学会総会. 仙台, 11月.

- 12) 若林太一, 小林博司, 嶋田洋太, 樋口 孝, 井田博幸, 大橋十也. Hunter 病モデルマウスに対するレンチウイルスを用いた ex vivo gene therapy. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会. 仙台, 11月.
- 13) 大橋十也, 嶋田洋太, 樋口 孝, 飯塚佐代子, 井田博幸, 衛藤義勝, 小林博司. 免疫寛容導入による効果的ボンベ病酵素補充療法の開発. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会. 仙台, 11月.
- 14) 嶋田洋太, 若林太一, 保科宙生, 樋口 孝, 小林博司, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也. ムコ多糖症 II 型における疾患特異的グリコサミノグリカン測定法の開発. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会. 仙台, 11月.
- 15) Wakabayashi T, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T. Ex vivo gene therapy improves the accumulation of glycosaminoglycans in brain from murine model of mucopolysaccharidosis type II. Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting. Honolulu, Nov.
- 16) 白井祥睦, 矢永勝彦, 岩瀬亮太, 春木考一郎, 藤原佑樹, 古川賢英, 飯田智憲, 柴 浩明, 宇和川匡, 大橋十也, 大木隆生. 膵臓癌に対する NF- κ B 阻害剤併用放射線照射療法の抗腫瘍効果の検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会. 千葉, 4月.
- 17) Horiuchi T, Shiba H, Shirai Y, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Nafamostat mesilate suppresses NF- κ B activation and enhances antitumor effect of gemcitabine plus nab-paclitaxel therapy for pancreatic cancer. 10th Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas, Feb.
- 18) Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Hoshina H, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Non-reducing terminal 2-sulfofudronic acid of glycosaminoglycans is disease-specific biomarker in mucopolysaccharidosis type II. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Taipei, Mar.
- 19) Ohashi T. (Japan-Taiwan Fabry Disease Exchange Workshop) Prospective of Fabry disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Taipei, Mar.
- 20) Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Development of novel method for analysis of disease-specific glycosaminoglycans in mucopolysaccharidosis type II. Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting. Honolulu, Nov.

悪性腫瘍治療研究部

- 教授: 本間 定 腫瘍免疫学
 教授: 銭谷 幹男 肝臓病学
(消化器・肝臓内科)
 准教授: 赤崎 安晴 脳腫瘍の診断と治療
(脳神経外科学)
 准教授: 小井戸薫雄 消化器病学
(消化器・肝臓内科)

教育・研究概要

I. セリンプロテアーゼ阻害剤によるがん細胞の programmed cell death ligand-1 の発現制御と治療への応用

がん細胞上に発現する programmed cell death ligand-1 (PD-L1) 分子は代表的ながん細胞の免疫チェックポイント分子であり, がん細胞を攻撃する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 上に発現する programmed cell death-1 (PD-1) と結合することにより CTL のアポトーシスを誘導する。その結果, がん細胞は免疫から逃れて増殖するが, 近年, 抗 PD-1 抗体, 抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が報告され注目された。がん細胞上の PD-L1 は多くが CTL から産生されるインターフェロングamma (IFN-gamma) により誘導されたものであり, この反応を抑制できればがん細胞の免疫逃避機構を抑制することが可能となるかもしれない。われわれは, 合成セリンプロテアーゼ阻害剤である nafamostat mesylate (NM) が IFN-gamma によるがん細胞の PD-L1 発現誘導を強く抑制することを発見した。NM は抗 PD-L1 抗体との併用によりがんの免疫チェックポイント抑制療法に寄与する可能性がある。

II. 悪性膠芽腫に対する樹状細胞ワクチン療法の臨床成績の解析

悪性膠芽腫 (グリオブラストーマ, 以下 GBM) に対する樹状細胞ワクチン療法の臨床試験の治療成績の評価を行った。Temozolomide (TMZ) 治療後再発 9 例と初発 20 例の GBM を対象として検討すると, いずれの群においても既存療法プラス樹状細胞ワクチン療法併用例の方が既存療法単独治療例に比較して無増悪生存期間, 全生存期間とも有意な延長が認められた。TMZ 治療後再発例においては腫瘍組織における chemoresistance-associated peptide (CAP; WT1, gp-100, MAGE) の発現増強が認められ再発への関与が示唆されたが, 樹状細胞ワクチン治療後はこれらの CAP に対する T 細胞免疫反応の誘導が tetramer 法により確認された。