

総合医科学研究センター

DNA 医学研究所

所長 衛藤 義勝

遺伝子治療研究部

教授： 衛藤 義勝 小児科学・先天代謝異常症・遺伝子治療
助教授： 大橋 十也 小児科学・先天代謝異常症・遺伝子治療

研究概要

I. 遺伝病の新しい治療法の開発

ファブリー病は α ガラクトシダーゼの欠損によりグロボトリアオシルセラミドと呼ばれる糖脂質が主に血管内皮細胞に蓄積し腎不全、心筋肥大、脳血管障害などを発症するライソゾーム蓄積症のひとつである。今年度はファブリー病の酵素補充療法中に発生する抗体につき検討を加えた。結果として抗体は中和活性をもち、酵素と結合し酵素の細胞内への取り込みを抑制することが *in vivo*, *in vitro* の実験で明らかとなった。ヒトにおいては抗体が発生することにより酵素補充療法による尿中グロボトリアオシルセラミドの正常化が阻害されることも明らかになった。しかしながら腎機能障害への酵素補充療法の予防効果は今回の検討では抗体陽性群、陰性群で有意差はなく、抗体の発生は腎機能の悪化に影響はしないという結論であった。最後に酵素製剤に対する免疫寛容を誘導する方法を検討した。新生児期に酵素製剤投与を行うと酵素製剤に対する免疫寛容が誘導されることが明らかとなった。

II. Aurora B による Shugoshin (Sgo) リン酸化

Sgo は M 期中期まで姉妹セントロメアの対合を維持するのに必須のタンパクとして同定された。前年度までの研究において新たに Sgo には動原体での微小管形成促進作用があることを明らかにし、この機能が動原体—紡錘系の両極性接着に必要であることを示した。

今年度は動原体—紡錘系の両極性接着に Sgo が

どのような機序で関わっているかを検討した。これまでの報告では Aurora B という M 期特異的リン酸化酵素が動原体に局在し、動原体—紡錘系の両極性接着を制御していることが分かっている。そこで Aurora B が Sgo をリン酸化しているかを検討した。その結果 Aurora B は Sgo の 2 つのセリン残基をリン酸化することが明らかとなった。この 2 つのセリン残基をグルタミン酸(擬似リン酸化型)、とアラニン(非リン酸化型)に置換した Sgo を、Tet 誘導化に安定発現する細胞を作製し解析を進めている。

III. 膵島再生を目的とした遺伝子治療法の開発

膵内分泌の再生に関する検討では、細胞周期調節能を有する CDK4 遺伝子を糖尿病マウス膵島に対し AAV ベクターによる *in vivo* 導入法を開発した。これにより膵島の増殖誘導と代謝の改善に成功した。現在ヒトでの臨床応用を目指して検正中である。一方、2 型糖尿病における冠動脈硬化症の成因に関する重要な発見を為した。マルチスイス CT で検出した冠動脈石灰化スコアを指標としたところ酸化酵素である Glutathione Peroxydase-1 (GPx-1) 遺伝子の多型が 2 型糖尿病における他の因子から独立して遺伝的関連性を認めた。この事は糖尿病における動脈硬化の発症進展に酸化ストレスが関与する事を証明すると同時にテーラーメイド医療の可能性も示唆した。

IV. 異種胎仔 organogenesis を用いたエリスロポエチン産生 organoid の作製

我々はこれまで異種胎仔の発生プログラムを用いた全く新しいアプローチによってヒト骨髄由来間葉系幹細胞からネフロンへの分化誘導に成功し、さらにこのヒト由来腎臓原器を宿主動物の大網内で腎臓への分化を誘導し尿生成能も持たせることを報告した。そこで本年度は尿以外の腎機能も獲得していることを証明するためにエリスロポエチンに着目して研究をすすめた。我々の培養法を用いてヒト間葉系幹細胞由来新生腎臓を大網内に作製し、ヒトエリスロポエチンの産生能を持つことを RIA 法、RT

-PCR法で確認した。さらにその発現量は貧血の程度と相関することを証明した。この成功は末期腎不全患者の腎性貧血の改善のみならず、エリスロポエチンの持つ腎障害進行抑制作用により透析導入患者数の減少につながるものと考えられた。

V. 卵巣癌における癌幹細胞マーカーの検索

卵巣癌における癌幹細胞マーカーの検索のために正常卵巣上皮 (OSE), 封入嚢胞 (IC), 樹立した正常卵巣上皮不死化細胞株 (IOSEC) を用いて Mesenchymal to Epithelial Transition (MET) の関与を検討した。さらに IOSEC とその primary culture (PC) 細胞間で発現が異なる遺伝子を包括的ヒトゲノム発現解析によりスクリーニングし、卵巣癌における癌幹細胞マーカーの検索を試みた。インフォームド・コンセントの下に採取した子宮体癌手術症例 9 例の OSE ($n=10$), 正常卵管上皮 ($n=4$), IC ($n=92$), および SV40 TAg で不死化した IOSEC ($n=3$) の形質を検索するために抗原マーカー (Calretinin, HBME-1, vimentin, EMA, Cytokeratin) の発現を免疫染色法で検討した。さらに SV40 TAg で不死化する前の PC と IOSEC から total RNA を抽出し、約 33,000 遺伝子の発現プロファイリングを行った。その結果、1) 種々の抗原発現より OSE は中皮細胞の性格を示し、IC は中皮細胞の性格を失いつつ、単層円柱上皮細胞の性格を獲得しつつある結果となった。2) 同様に IOSEC においても IC に類似した染色結果が得られた。3) PC と IOSEC 間で有意水準 5% で発現差が認められた遺伝子は 104 種類であった。以上より IC は MET 過程にあることが示唆され、IOSEC は IC と類似した MET 過程にあるモデルとなることが示唆された。このモデルを用いてスクリーニングされた 104 遺伝子の中に卵巣癌幹細胞マーカー候補がある可能性が示唆された。

「点検・評価」

それぞれのプロジェクトで、一定の成果が上がった。まだ動物実験の段階でヒトへの臨床応用までいたるものはなかったが、それぞれ臨床応用を視野に入れた研究がなされた点は評価できる。

当研究部の目標は難治性疾患の現行の治療法の改善および新規治療法の開発であり、これは基礎医学と臨床医学の狭間を埋めるものである。確かに現在まで本邦で開発された新規治療法は数えるほどしかなく、その道は困難を極めると予測されるが、難治性疾患で悩む患者様のためにも目標に向かい、慈恵発の治療法を開発するため今後も一層の努力が必要

であると思われた。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Shiba H, Okamoto T, Futagawa Y, Misawa T, Yanaga K, Ohashi T, Eto Y. Adenovirus vector-mediated gene transfer using degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma in rats. *J Surg Res* 2006; 133(2): 193-6.
- 2) Suzuki H, Akiyama N, Tsuji M, Ohashi T, Saito S, Eto Y. Human Shugoshin mediates kinetochore-driven formation of kinetochore microtubules. *Cell Cycle* 2006; 5(10): 1094-101.
- 3) Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, Ohtani S, Saijo Y, Nukiwa T, Yoshimura K, Sato T, Eto Y, Chada S, Nakamura H, Kato H. Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(11): 1689-99.
- 4) Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M, Kobayashi E. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4) Epub: 1026-34.
- 5) Okamoto A, Endo H, Kalionis B, Shinya M, Saito M, Nikaido T, Tanaka T. IGFBP1 and Follistatin-like 3 genes are significantly up-regulated in expression profiles of the IUGR placenta. *Placenta* 2006; 27: 317-21.
- 6) Ueda K, Okamoto A, Yamada K, Saito M, Takakura S, Tanaka T, Ochiai K. Nonpuerperal inversion of the uterus associated with endometrial cancer: a case report. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 153-5.
- 7) Yanaihara N, Caplen N¹⁾, Bowman E¹⁾, Seike M¹⁾, Kumamoto K¹⁾, Yi M¹⁾, Stephens RM¹⁾, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA¹⁾, Liu CG¹⁾, Croce CM¹⁾ (¹National Institutes of Health), Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-98.
- 8) Ueda K, Yamada K, Urashima M, Ishibashi Y, Shirai M, Nikaido T, Takahashi H, Okamoto A, Saito M, Yasuda M, Ohkawa K, Tanaka T. Association of extracellular matrix metalloproteinase inducer in endometrial carcinoma with patient outcomes and clinicopathogenesis using mono-

- clonal antibody 12C3. *Oncol Rep* 2007; 17: 731-5.
- 9) Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Saito M, Saito M, Okamoto S, Takikawa O, Sasaki H, Yasuda M, Ochiai K, Tanaka T. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 1333-9.
- 10) Kobayashi H, Watabe K, Izuka S, Tani H, Matsuura Y, Barsoum J, Kaynor C, Ohashi T, Eto Y. Successful transduction of mammalian astrocytes and oligodendrocytes by 'Pseudotyped' baculovirus vector *in vitro* and *vivo*. *Jikeikai Med J* 2006; 53(2): 55-62.

II. 総 説

- 1) 衛藤義勝. リソゾーム病に伴う内分泌異常 (Lisosomal disease with endocrine abnormality). *日臨* 2006; 別冊 (内分泌症候群 III): 579-81.
- 2) 衛藤義勝. Fabry 病. *小児診療* 2006; 69(11): 1724-34.
- 3) 衛藤義勝. Fabry 病に対する α -galactosidase. 腎と透析 2006; 61(2): 247-51.
- 4) 大橋十也. 先天性代謝異常症の遺伝子治療—リソゾーム病を中心に. *医のあゆみ* 2006; 216(10): 737-42.
- 5) 大橋十也. 【小児の治療指針】代謝 Fabry 病. *小児診療* 2006; 69(増刊): 544-5.
- 6) 大橋十也. シスチン尿症. *小児慢性疾患診療マニュアル* 2006; 392-3.
- 7) 佐々木敬. DPP-IV 阻害剤の糖尿病臨床. *BIO Clinica* 2006; 21(14): 1275-8.
- 8) 高尾美穂, 岡本愛光, 二階堂孝, 浦島充佳, 清川貴子, 高倉 聡, 落合和徳, 田中忠夫. 卵巣癌の新しい予後因子とバイオマーカー】マイクロアレイを用いた新しい予後因子やバイオマーカー探索 漿液性腺癌. *産婦の実際* 2006; 55(13): 2155-66.
- 9) 横尾 隆. 糸球体の再生は可能か? *腎臓* 2006; 28: 167-70.
- 4) 衛藤義勝. Gene therapy and cell therapy in lysosomal storage disease. 第12回日本遺伝子治療学会. 東京, 8月.
- 5) Eto Y. Female Fabry disease. The 9th Annual Asia LSD Symposium. Chiba, Dec.
- 6) Eto Y. Novel treatment of neurogenetic disorders. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba, Sept.
- 7) Eto Y. Treatment of Lysosomal Storage Disease: Cell Therapy and Gene Therapy. The 12th German Neurogenetic Meeting. Rostock, Oct.
- 8) 衛藤義勝. 先天性代謝異常症の最近の治療の進歩. 第1回香川先天代謝異常研究会. 高松, 11月.
- 9) 衛藤義勝. ポンペ病の治療の進歩. 第1回日本ポンペ病研究会. 東京, 11月.
- 10) 大橋十也. ファブリー病と遺伝. 第2回関東甲信越ファブリー病セミナー. 新潟, 5月.
- 11) 大橋十也. ライソゾーム病の診断と治療. 第48回日本小児神経学会総会. 東京, 6月.
- 12) 大橋十也. 1) ファブリー病が疑われる典型的な臨床症状, 所見について 2) 酵素補充療法の治療対象と治療開始時期について—小児科領域の立場から—. 第2回ファブリー病フォーラム. 東京, 7月.
- 13) 大橋十也. 遺伝子治療の展望. 第9回ゴーシェ病セミナー. 東京, 8月.
- 14) Ohashi T. The level of globotriaosylceramide in urine for long term monitoring of Fabry disease patients on enzyme replacement therapy. Biomarkers for the LSD with an Emphasis on Use in Screening. Hakone, Sept.
- 15) Ohashi T. Measurement of globotriaosylceramide in urine for long term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba, Sept.
- 16) Yokoo T, Fukui A, Utsunomiya Y, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T. Generation of erythropoietin-producing self organs using human mesenchymal stem cells. American Society of Nephrology 39th Annual Renal Week Meeting. San Diego, Nov.

III. 学会発表

- 1) 衛藤義勝. ファブリー病治療の最近の進歩. 第2回ファブリー病研究会. 新潟, 5月.
- 2) 衛藤義勝. (会長講演)脳治療は可能か? 遺伝性脳変性疾患の治療法の進歩. 第48回小児神経学会総会. 舞浜, 6月.
- 3) 衛藤義勝. ファブリー病に関する最近の治験. 第1回日本ファブリー病研究会. 東京, 7月.
- 17) Kobayashi H, Morita A, Ohashi, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. The 12th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. Tokyo, Aug.
- 18) Sakura K, Kaneshiro E, Iizuka S, Mori T, Umezawa A, Suzuki N, Ohashi T, Eto Y. Stem cell gene therapy for the central nervous system of mucopolysaccharidosis type VII. The 14th Annual

Meeting of the European Society of Gene Therapy.
Athens, Nov.

IV. 著 書

- 1) 佐々木敬, 田嶋尚子. 1型糖尿病. 日本臨床: 別冊: 新領域別症候群シリーズ: 内分泌症候群 III. 第2版. 東京: 日本臨床社, 2007. p.26-30.

V. その他

- 1) 佐々木敬. 期待される新たな治療法. 第11回かしわ会総会. 柏, 4月.

悪性腫瘍治療研究部

教授: 衛藤 義勝	遺伝子治療
教授: 銭谷 幹男	肝臓病学・肝疾患の細胞生物学
助教授: 本間 定	腫瘍免疫学・消化器肝臓病学
助教授: 山田 順子	血液学・分子腫瘍学
助教授: 菊池 哲郎	脳腫瘍の治療・分子生物学

研 究 概 要

樹状細胞を利用した抗腫瘍免疫反応誘導についての研究

I. プロテオーム解析技術 (LC/MS/MS) を用いた新規腫瘍抗原の探索と生体の抗腫瘍免疫反応

腫瘍細胞は特異的 T 細胞受容体に認識される腫瘍関連抗原 (tumor associated antigen: TAA) を発現するが, TAA に対してどのような免疫反応が誘導されているか不明な点が多い。われわれはプロテオーム解析技術 (LC/MS/MS) を活用してマウス肝癌細胞に発現される TAA を同定し, 宿主の抗腫瘍免疫を検討した。骨髓由来樹状細胞に C3H/HeN マウス自然発生肝癌から樹立した MIH-2 細胞を取り込ませ可溶化し, I-A^k affinity column で MHC class II 分子・抗原ペプチド複合体を精製した。酸処理後ペプチドを遊離し解析したところ, EMTK という oligopeptide が同定された。このペプチドは MIH-2 細胞に発現する Cytochrome P-450 2j subfamily (CYP2js) 分子に由来する。CYP2js の EMTK の N 末側には I-A^k (MHC class II) 結合モチーフ構造が認められ, このペプチド (DFIDAFL-KEMTKYPE) がヘルパーエпитープとして提示されていることが示唆された。ペプチドを合成しマウスに 2 回免疫すると脾細胞は IFN- γ を大量に産生し, CYP2js ペプチドが抗原性を有し抗腫瘍効果を誘導する事が示された。しかし, 8 回免疫すると脾細胞からの IFN- γ の産生は完全に抑制され, 脾細胞には免疫抑制機能を示す CD4⁺FoxP3⁺ の抑制性 T 細胞 (Treg) と CD11b⁺Gr-1⁺ の未熟ミエロイド細胞 (IMC) が増加していた。腫瘍は発生初期において TAA に対する宿主の抗腫瘍免疫反応により排除される可能性があるが, 抗原刺激過剰状態になると逆に抗腫瘍免疫が抑制され腫瘍発育が促進されると考えられる。