

総合医科学研究センター

DNA 医学研究所

所長 山田 尚

遺伝子治療研究部

| | |
|-------------------|----------------------|
| 教授：大橋 十也 | 小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子治療 |
| 講師：小林 博司 | 小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子治療 |
| 教授：佐々木 敬 (兼任) | 糖尿病の遺伝子治療 |
| 教授：井田 博幸 (兼任) | 小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子解析 |
| 准教授：岡本 愛光 (兼任) | 産婦人科学, 卵巣癌の分子細胞生物学 |

教育・研究概要

はじめに

我々の目的は遺伝病, 癌, 糖尿病などの難治性疾患の治療法開発にあり, 本年度も様々な開発研究を行なった。以下, 各プロジェクトにおける進捗状況を概説する。

I. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の基礎的

昨年に引き続きライソゾーム蓄積症 (LSD) である, クラッペ病, ムコ多糖症Ⅶ型で欠損する酵素を発現する遺伝子を組込んだレンチウイルスベクターを作製し, モデルマウスの子生児に静脈注射して効果を調べた。新生児期の遺伝子治療では, 投与したベクターが血液脳関門の未熟性のため容易に脳に到達しやすいこと, ベクターおよび発現酵素に対する免疫寛容のため長期の酵素発現が期待されること, 発症前からの治療になるため病原物質の蓄積予防効果もあると考えられること, などの点において有利といえる。結果としてマウスを追加して検討したところクラッペ病は治療により有意な体重増加, 寿命の延長はみられた。一方ムコ多糖症Ⅶ型では体重増加, 症候発現, 寿命延長において著明な効果が見ら

れ, 30 週齢という長期においても投与したレンチウイルスベクターがマウスの臓器に確認され, 非常に有効な治療手段と考えられた。また昨年度検討したポンペ病での同様の検討は Gene Therapy 誌に発表した。

II. ポンペ病の病態解析・新規治療法開発

ポンペ病では細胞内タンパク分解系の 1 つであるオートファジーの異常が認められ, 酵素補充療法抵抗性に関与することが知られる。我々はその抵抗性改善法開発を目標に患者由来線維芽細胞の解析を行った。変異酵素を発現している患者細胞では, 小胞体ストレスの活性化と共にオートファジーの亢進が認められた。さらに, グルコシダーゼの阻害剤である NB-DNJ を投与することで変異酵素の安定化と共にオートファジーを抑制できることを見出した。

III. LSD 酵素補充療法の免疫学的検討

現在 LSD6 疾患に対して酵素補充療法が行われている。昨年度はファブリー病の酵素補充療法において酵素製剤に対する抗体が発生し治療効果を妨げることを報告した。本年度は免疫寛容導入法を検討した。モデルとしてはやはり LSD の一つであるポンペ病を用いた。モデルマウスに酵素製剤を経口投与すると免疫寛容が導入されることを明らかにした。また抗体発生は T 細胞依存性のため抗 CD3 抗体の投与による免疫寛容導入を試みた。抗 CD3 抗体の投与により免疫寛容が導入され, その効果はその後酵素補充療法を続けていても長期間持続することが判明した。今後, そのメカニズムにつき検討を加える予定である。

IV. LSD の骨髄移植法の検討

LSD では骨髄移植が効果のあることは以前より判明していた。一方, 骨髄移植では必ずしも 100% ドナータイプとはならないことも臨床上経験する。ではどれくらいドナータイプになれば治療効果があるかをファブリー病モデルマウスを用いて検討した。ファブリー病モデルマウスの骨髄細胞と正常マウス

の骨髄細胞を様々な比率で混合し致死量の放射線照射をしたファブリー病モデルマウスに移植したところ心臓では50%、肺では30%のドナー細胞の生着があれば100%ドナータイプの時と同等の効果があることが判明した。以上の結果は骨髄移植の前処置を軽減できるばかりでなく、造血幹細胞を標的としたLSDの遺伝子治療にも有用な情報となると思われる。

V. 難治性消化器癌に対するプロテアーゼインヒビターの抗腫瘍効果の検討および遺伝子治療への応用

近年、anti-apoptotic な働きを有する (nuclear factor κ B: NF- κ B) という転写因子が種々の悪性腫瘍において活性化され、腫瘍の増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性に関与し、この活性化を抑制することで抗腫瘍効果が得られると報告されている。

我々は、本邦で膀胱・DICの治療薬として広く使われているプロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタットが膵臓癌のNF- κ Bを抑制することで抗腫瘍効果および塩酸ゲムシタピンの増強効果を有することを証明してきた。そして、現在切除不能膵臓癌に対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ゲムシタピンの第2相臨床試験を進行中である。

また、膵臓癌の腹膜播種モデルを用いてメシル酸ナファモスタット併用でのパクリタキセルの抗腫瘍効果の増強を確認した。今後は腹膜播種が臨床で多い胃癌においても同様の検討を行っていく予定である。

一方、米国では、新規膵臓癌治療としてアデノウイルスベクターを用いた腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α : TNF- α) 腫瘍内導入による遺伝子治療の第3相臨床試験が行われ、その有効性が報告されている。しかしながら、TNF- α の apoptosis 誘導効果は同時に活性化されるNF- κ Bによって制限される。そこで、TNF- α の抗腫瘍効果の増強を期待し、アデノウイルスベクターを用いたTNF- α 腫瘍内導入およびNF- κ B 阻害剤であるメシル酸ナファモスタット併用における抗腫瘍効果を検討している。

VI. ビタミンD受容体FokI C/C多型は卵巣癌の予後良好因子である

ビタミンD受容体 (VDR) FokI T/Tが進行性非小細胞肺癌の有意な予後不良因子であることがJ Clin Oncolに掲載され、ビタミンD (VD) が急

速に注目されている。日光照射と卵巣癌の発生頻度・予後と相関関係があることも以前より報告されており、VDRを介した卵巣上皮細胞の分化・増殖、癌細胞のアポトーシス・血管新生制御が推測されている。今回われわれは卵巣癌においてVDRのFokI多型と臨床病理病態を検討した。ICを得た卵巣癌101症例(漿液性38例、明細胞35例、類内膜21例、粘液性6例、混合型1例、I期41例、II期6例、III期44例、IV期10例)の血清、腫瘍組織からDNAを抽出後、シーケンシングによりFokI多型を決定し、Kaplan-Meier解析、多変量解析を行った。FokI多型はC/C 35%、C/T 55%、T/T 10%であった。Kaplan-Meier解析により術後30ヶ月においてC/C群は90%、C/T、T/T群では66%生存している結果となり、前者は後者に比較して有意に予後が良好であった (P=0.01)。I期に限定するとFokI多型と全生存期間に有意な差は認められなかったが、II-IV期では術後30ヶ月においてC/C群は84%、C/T、T/T群では50%生存している結果となり、C/C群はC/T、T/T群に比較して有意に予後が良好であった (P=0.025)。年齢、進行期、組織型、残存腫瘍径で多変量解析してもC/C群は有意な予後良好因子であった (Adjusted Hazard Ratio, 0.16; 95% CI 0.05 to 0.61; P=0.006)。以上よりFokI C/C多型が卵巣癌の予後良好因子であることが初めて確認された。C/C多型はVDR活性が高いことより、今後卵巣癌のconsolidation療法としてVDが臨床応用される可能性が示唆された。

VII. 糖尿病の分子介入療法

1. これまでに引き続きマウス膵島細胞、特にインスリンを産生分泌する分化した β 細胞への遺伝子移入による糖尿病の分子介入療法に関する実験的研究を進めた。セロタイプ8型アデノ随伴ウイルス (rAAV vector) により導入・発現させる遺伝子として、従来検討してきた β 細胞の増殖に必要な遺伝子の導入だけでなく、 β 細胞の脱落の細胞レベルでの傷害機序であるapoptosisやautophagyなどに焦点を当て、 β 細胞保護に役立つ介入遺伝子を計画した。

2. 膵島の保護や傷害のメカニズムを探るため、膵島の発生、分化についての研究を解剖学岡部正隆教授との共同で開始した。マウスを用いて膵島の各構成細胞の相互作用、特に非内分泌細胞である傍膵島シュワン細胞の由来と内分泌細胞との関わりにつき、検討を開始した。

3. インスリンやGLP-1など糖尿病治療薬の新

規デリバリーシステムにつき検討し、欧文誌へ投稿した。特に経肺デリバリーに用いる新規デバイスによる物理化学的、生化学的な薬物の変化、生物学的な影響につき、動物実験を行った。

〔点検・評価〕

それぞれの分野で将来的にヒトへの臨床応用を目指した研究も含まれる。各研究とも、学会発表や論文執筆を通してより深い検討を加えることにより、将来の臨床応用に向けた発展が期待される。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Tajima Y, Kawashima I, Tsukimura T, Sugawara K, Kuroda M, Suzuki T, Togawa T, Chiba Y, Jigami Y, Ohno K, Fukushige T, Kanekura T, Itoh K, Ohashi T, Sakuraba H. Use of a modified alpha-N-acetylgalactosaminidase in the development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet* 2009; 85(5): 569-80.
- 2) Sakurai Y, Suzuki R, Yoshida R, Kojima H, Watanabe M, Manome Y, Ohashi T, Eto Y, Moriyama H. Inner ear pathology of alpha-galactosidase A deficient mice, a model of Fabry disease. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37(3): 274-80. Epub 2009 Nov 8.
- 3) Sakamoto N, Isaka T, Ebisawa T, Saito T, Ikeda K, Sasaki T, Tojo K, Tajima N. Persistent pituitary hyperplasia in primary hypothyroidism despite levothyroxine therapy. *Jikeikai Med J* 2009; 56(4): 63-8.

II. 総説

- 1) 小林博司。【小児疾患診療のための病態生理】先天性代謝異常症 糖原病 肝型糖原病を中心に。小児内科 2009; 41 (増刊): 401-6.
- 2) 大橋十也。【小児疾患診療のための病態生理】先天性代謝異常症 Fabry 病。小児内科 2009; 41 (増刊): 449-53.

III. 学会発表

- 1) Kobayashi H, Shimada Y, Ariga M, Sakurai K, Ohashi T, Ida H, Eto Y, Fujigasaki J, Fukuda T. The pathological case study of a man with Mucopolipidosis Type III. The 11th International Congress on Inborn Errors of Metabolism, San Diego, Aug.
- 2) 小林博司, 嶋田洋太, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝. ムコリピドーシスⅢ型病理像におけるオートファジー機能不全との関連性. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 11 月.

- 3) 横井貴之, 小野英利奈, 飯島正紀, 菊池健二郎, 湯坐有希, 小林博司, 衛藤義勝, 大橋十也, 井田博幸. Hunter 症候群に対する酵素補充療法の経過報告. 第 112 回日本小児科学会学術集会. 奈良, 4 月.
- 4) Shimada Y, Fukuda T, Ohashi T, Sunahara K, Ohkawa K, Takada K. Purification and identification of SDS-solubilized ubiquitin-conjugates accumulated in brains of Niemann-Pick C disease mouse. 第 32 回日本神経科学大会. 名古屋, 9 月. [*Neurosci Res* 2009; 65 (Suppl. 1): S247]
- 5) Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Eto Y, Ohashi T. Characterization of endoplasmic reticulum stress response in Pompe disease. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Nagoya, Sept.
- 6) 嶋田洋太, 小林博司, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也. 成人型ポンペ病における小胞体ストレスの解析. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 11 月.
- 7) Shimada Y, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Induction mechanism of autophagy in fibroblasts from Pompe disease patients. The 1st Asian Congress for International Metabolic Disease. Fukuoka, Mar.
- 8) 比企能人, 五條 淳, 斎藤隆俊, 佐野浩斎, 佐々木敬, 田嶋尚子. Fournier 壊疽を呈し外科的アプローチメントにて救命しえた 2 型糖尿病の一例. 第 47 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 大宮, 1 月.
- 9) 佐々木敬, 比企能人, 根本昌実, 田嶋尚子. (公募シンポジウム: 膝 β 細胞の分化増殖と臨床展開) 細胞周期調節因子のリセッティングを介した β 細胞増殖促進療法. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 前橋, 4 月. [*日内分泌会誌* 2009; 85(1): 221]
- 10) 大橋十也, 飯塚佐代子, 衛藤義勝, 井田博幸. Pompe 病酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫寛容導入法の開発. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. 東京, 9 月.
- 11) Ohashi T, Iizuka S, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ida H. Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for Pompe disease by anti-CD3 antibody and oral enzyme administration. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Nagoya, Sept.
- 12) Meng XL, Shen JS, Kawagoe S, Ohashi T, Eto Y. Implications of induced Pluripotent Stem (iPS) cells on mechanistic study for Lysosomal storage diseases. 11th International Congress on Inborn Errors of Metabolism. San Diego, Aug.
- 13) 大橋十也. ライソゾーム秒酵素補充療法の効果と限界. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 11 月.
- 14) 大橋十也, 飯塚佐代子, 嶋田洋太, 小林博司, 衛藤

義勝, 井田博幸. Pompe 病の酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫寛容導入. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 11 月.

- 15) Ohashi T, Iizuka S, Eto Y, Ida H. Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for Pompe disease by anti-CD3 antibody and oral enzyme administration. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, Honolulu, Oct.
- 16) Ohashi T. Impact of antibody formation on enzyme replacement therapy for Lysosomal storage diseases and immune tolerance induction for infused enzyme. The 12th Annual Asia LSD Symposium, Taiwan, Oct.
- 17) Ohashi T. Immune response against therapeutic enzyme. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, Sept.
- 18) 大橋十也. iPS 細胞の可能性について. 第 13 回日本ムコ多糖症研究会. 大阪, 8 月.
- 19) 大橋十也. ライソゾーム病の遺伝子治療と再生医療. 第 112 回日本小児科学会学術集会. 奈良, 4 月.
- 20) Ohashi T. Immunological aspect of enzyme replacement therapy for Lysosomal storage diseases. The 9th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Frankfurt, Apr.

IV. 著 書

- 1) 佐々木敬. 第 1 部: 分子細胞生物学 5. ゲノム科学. 花岡炳雄, 永倉俊和編. 臨床分子細胞生物学. 東京: メディカルレビュー社, 2009. p.75-87.
- 2) 佐々木敬. III. 症例に見るメトホルミンの効果的な使い方 他の糖尿病薬と併用した方がよい場合 チアゾリジン誘導体. 河盛隆造編. 見直されたビグアナイド: メトホルミン. 改訂版. 大阪: フジメディカル出版, 2009. p.160-4.
- 3) 大橋十也. N. ライソゾーム病 2 症例 40: 原因不明の発熱, 足趾の疼痛, 低汗症を主訴に来院した 12 歳男児. 日本先天代謝異常症学会編. 遠藤文夫, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸編集委員. 症例から学ぶ先天代謝異常症: 日常診療からのアプローチ. 東京: 診断と治療社, 2009. p.175-7.
- 4) 大橋十也. 第 1 章: 小児科研修医へのアドバイス E. 小児科医と社会 (地域) との結びつき 2. 小児の先進医療. 永井良三シリーズ総監修, 五十嵐隆責任編集, 金子一成, 田原卓浩, 渡辺 博編. 小児科研修ノート. 東京: 診断と治療社, 2009. p.78-82.
- 5) 大橋十也. 体細胞遺伝検査 その他の遺伝病的検査 ファブリ病. 高久史磨監修. 黒川 清, 春日雅人, 北村聖編. 臨床検査データブック 2009-2010. 東京: 医学書院, 2009. p.633.

悪性腫瘍治療研究部

- 教授: 銭谷 幹男 (兼任) 肝臓病学・肝疾患の細胞生物学
- 准教授: 本間 定 腫瘍免疫学・消化器肝臓病学
- 准教授: 山田 順子 血液学・分子腫瘍学
- 講師: 小井戸薫雄 (兼任) 消化器病学

教育・研究概要

I. 抗腫瘍免疫療法についての基礎および臨床研究

1. 進行膀胱癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム

WT1 (Wilms' tumor gene) は膀胱癌を含む広範な悪性腫瘍に発現し, WT1 ペプチドワクチン (WT1 PV) は白血病, 悪性脳腫瘍などに有効例が認められている。我々は進行膀胱癌を対象として WT1 PV と塩酸ゲムシタピン (GEM) の併用療法の臨床試験を行い, GEM 単独療法に比し良好な治療成績と複数の著効例を得た。この WT1 PV と GEM 治療でみられる相乗効果のメカニズムについて検討した。ヒト膀胱癌細胞 MIAPaCa-2 を GEM (30-100ng/ml) で処理すると NF- κ B のシグナル伝達を介して WT1 mRNA・蛋白の発現が有意に増加した。MIA PaCa-2 移植 SCID マウスに臨床使用量の GEM を投与しても腫瘍組織の WT1 mRNA 発現が増加した。WT1 蛋白は転写因子として核内に局在するが, GEM 処理により細胞質へ移行しプロテアソームによる抗原ペプチド産生が促進されることが示唆された。実際, GEM 処理膀胱癌細胞の MHC class I 結合ペプチドを酸抽出により回収し質量解析を行うと HLA-A*2402 拘束性の WT1 抗原ペプチドの提示量が増加していた。WT1 特異的 T 細胞受容体遺伝子導入リンパ球は GEM 処理 MIAPaCa-2 細胞をより強く傷害した。以上より, GEM はヒト膀胱癌細胞の WT1 発現を増強させ, この GEM 処理膀胱癌細胞を WT1 特異的 CTL が効率的に認識し傷害することが相乗効果を生む機序と考えられた。

2. 悪性神経膠腫に対する免疫療法臨床研究

悪性神経膠腫症例に対して腫瘍細胞/樹状細胞の融合細胞を用いた免疫療法の臨床研究を継続した。融合細胞は GMP 対応細胞治療用細胞生産室において GMP 作業に準拠して生産している。化学療法剤テモゾロミドとの併用で長期生存を得ており臨床研究の完遂に向け継続している。