

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
教 授：大橋 十也	小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子治療
講 師：鈴木 英明	小児科学, 発生, 先天異常
助 教：沈 勁松	先天代謝異常症
助 教：孟 興麗	先天代謝異常症
教 授：佐々木 敬	糖尿病の遺伝子治療
教 授：井田 博幸	小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子解析
講 師：小林 博司	小児科学, 先天代謝異常症, 遺伝子治療
講 師：岡本 愛光	産婦人科学, 卵巣癌の分子細胞生物学

教育・研究概要

始めに

我々の研究部の目的は難治性疾患の治療法の開発を行うことである。本年度も様々な難治性疾患に対する治療法の開発を行った。以下にそれぞれのプロジェクトにおける平成19年の進捗状況を概説する。

I. 遺伝病の新規治療法の開発および病態の解明

1. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討

ポンペ病, クラッペ病, ムコ多糖症 VII 型で欠損する酵素を発現するレンチウイルスベクターを作成し, それぞれ新生児期に当該モデルマウスに投与した。新生児期に投与するメリットとしてはウイルスベクターおよび発現酵素に対する免疫寛容が導入され, より長期の遺伝子発現が期待されることである。ポンペ病における検討では投与4ヶ月にわたり欠損酵素の発現, およびグリコーゲン蓄積の減少が本症の主な罹患臓器である心臓において観察された。ま

た, 他のウイルスベクターで観察される ALT の上昇, 発現酵素に対する抗体の産生なども認められず, 非常に有用な治療法であることが判明した。

2. ポンペ病のスクリーニング

ポンペ病は現在, 酵素補充療法が開発されて治療可能な疾患となっている。今年度は筋ジストロフィー症と診断された患者の中に本症が含まれている可能性があるとの仮説のもと濾紙血を用いたスクリーニングを行った。厚生労働省筋ジストロフィー班との共同で肢帯型筋ジストロフィーと診断されている130例を対象にスクリーニングを行った。現在までポンペ病と診断された症例はないが, 今後もスクリーニングを続ける予定である。

3. iPS細胞を用いたライソゾーム病の病態解析ならびに治療法の開発

iPS細胞は京都大学の山中らが開発した皮膚などより樹立可能な多機能細胞である。今年度我々はライソゾーム病の病態の解析, 治療法の開発を行う目的でファブリー病, ムコ多糖症 VII 型, クラッペ病のモデルマウスの皮膚細胞より iPS細胞の樹立を行った。今後, それらの細胞を用いてライソゾーム病の病態解析, 治療法の開発を行う予定である。

4. ファブリー病の血管内皮細胞の樹立

ファブリー病は血管の障害が主な病態である。そこで今年度はファブリー病患者の血管内皮細胞の樹立を行った。今後, 本細胞を用いてファブリー病の病態解析を行う予定である。

II. 糖尿病の遺伝子治療・再生医学研究

糖尿病における膵島傷害および再生の分子メカニズムの解明, またそれら機序に基づく再生医療の可能性など, 主に分子生物学を基盤とした成因ならびに先端治療技術に関するプロジェクトを遂行した。私たちは昨年までに細胞周期調節因子 CDK4 の活性型変異体遺伝子 (CDKR24C) を AAV ベクターによりマウス膵島へ直接導入する方法を確立したが, 今年度はこれを用いて β 細胞の複製促進, β 細胞量の増大, 血糖の改善に成功した。今後ヒトでの臨床応用も視野に入れている。

III. 肝臓悪性腫瘍に対する遺伝子免疫治療

我々は肝細胞癌と消化器悪性腫瘍の予後因子である転移性肝臓癌に対して臨床応用可能な遺伝子治療の開発を行ってきた。今までの検討で効果的な遺伝子導入法を確立できており、今回は導入遺伝子の検討を行った。免疫反応の trigger である CD40 ligand をアデノウィルスベクターに導入し、ラット肝細胞癌細胞株皮下モデルとラット大腸癌肝肺転移細胞株の皮下モデルに対して Prevention model と Treatment model (intratumoral injection) の実験系でその抗腫瘍効果を証明した。そのメカニズムにおいて、細胞性免疫・液性免疫の観点からも示すことができた。今後は orthotropic model において経動脈的にアデノウィルスベクターを導入することで臨床応用可能なことを示していく予定である。

IV. 婦人科腫瘍学

1. Mapping 250K Array-GIST 解析法を用いた卵巣癌におけるコピー数異常領域の検討

Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GIST) は機能的に重要な遺伝子の変化 (DM) を検出する方法として注目されており、卵巣癌における CGH/SNP および CGH 解析論文 18 報と比較し 30% 以上の論文で一致する領域に存在する DM 候補遺伝子は 6 遺伝子に絞り込んだ。

2. 卵巣癌における血清 IDO バイオマーカーの検討

われわれは包括的ヒトゲノム発現解析によりパクリタキセル (PTX) 耐性関連遺伝子を 8 遺伝子に絞り込み、なかでも IDO (Indoleamine-2,3-dioxygenase) は漿液性腺癌における PTX 耐性獲得能に関与するとされ漿液性卵巣癌において血清 IDO がバイオマーカーになりえる可能性があることが示唆された。

V. 周産期母子医学

1. E6/E7/hTERT 導入ヒト絨毛上皮不死化細胞株の樹立

栄養膜細胞 (Tr) の機能の解析目的で、インフォームドコンセントを得た人工妊娠中絶症例 (妊娠 7 週) の絨毛組織を培養、クローニングし、E6/E7/hTERT 遺伝子を導入して、不死化細胞株を樹立した。この細胞株を用いて低酸素状態で可逆的に発現変化する遺伝子として prostaglandin I₂ (prostacyclin) synthase を含む 32 遺伝子が抽出された。本細胞株は Tr の生理機能および病理変化の解析に有用であり、特に母児間の物質代謝と輸送の異常が原因とな

る IUGR などの病態解明、薬剤の標的分子の探索・毒性評価などへの応用が可能である。

「点検・評価」

それぞれの分野において、まだまだ基礎的な検討だが、今後ヒトへの応用可能な研究成果がでた。論文の発表、学会での発表も期待どおり出来たと思う。しかしながら実際にヒトへ臨床応用されたものではなく、臨床応用を強く進める必要があると思われた。ただポンベ病のスクリーニングはすでにヒトを対象として行っており、その結果は治療可能な疾患へと診断されることであり、その意味では臨床的意義は大きい。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kobayashi M, Ohashi T, Sakuma M, Ida H, Eto Y. Clinical manifestations and natural history of Japanese heterozygous females with Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2008 Jan 21 [Epub]
- 2) Fujimoto K, Sasaki T, Hiki Y, Nemoto M, Utsunomiya Y, Yokoo T, Nakai N, Ohashi T, Hosoya T, Eto Y, Tajima N. *In vitro* and pathological investigations of MODY5 with the R276X-HNF1beta (TCF2) mutation. *Endocrine J* 2007; 54(5): 757-64.
- 3) Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, Hiki Y, Miyashita Y, Nishioka M, Fujimoto K, Sakuma T, Ohashi T, Fukuda K, Eto Y, Tajima N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6(1): 23.
- 4) Ohashi T, Sakuma M, Kitagawa T¹⁾, Suzuki K¹⁾, Ishige N¹⁾ (1)Tokyo Healyh Service Association), Eto Y. Influence of antibody formation on reduction of globotriaosylceramide (GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta therapy. *Mol Genet Metab* 2007; 92(3): 271-3.
- 5) Shiba H, Misawa T, Iida T, Okamoto T, Futagawa Y, Sakurai M, Ohashi T, Eto Y, Yanaga K. Adenovirus vector-mediated gene therapy using iodized oil esters for hepatocellular carcinoma in rats. *Anticancer Res* 2008; 28(1a): 51-3.
- 6) Kobayashi H, Carbonaro D, Pepper K, Petersen D, Ge S, Jackson H, Shimada H, Moats R, Kohn DB. Neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector. *Mol*

Ther 2005; 11(5): 776-89.

- 7) Nemoto M, Nishimura R, Sasaki T, Hiki Y, Miyashita Y, Fujimoto K, Sakuma T, Ohashi T, Fukuda K, Eto Y, Tajima N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 23.

II. 総 説

- 1) 林 毅, 佐々木敬. インクレチン. *臨床* 2008; 112(1): 10-1.
- 2) 衛藤義勝. ムコ多糖症の概要と治療 (Q&A). *日医新報* 2008; 4371: 95-6.
- 3) 大橋十也. 【予防接種 Q&A】 要注意患者への接種代謝異常 新生児マススクリーニングで発見された病気の子どもたちへの予防接種のなかで, 避けたほうがよいものがありますか (Q&A/特集). *小児内科* 2007; 39(10): 1549-50.
- 4) 大橋十也. 【症例に学ぶ 診断に苦慮する長引く発熱疾患】 ファブリー病 (解説/症例報告/特集). *小児内科* 2007; 39(11): 2072-4.
- 5) 藤原優子, 大橋十也, 小林正久, 井田博幸, 衛藤義勝. Fabry 病の心病変に対する酵素補充療法の効果男女間での臨床経過の比較. *慈恵医大誌* 2007; 122(6): 295-304.
- 6) 大橋十也. 【大きく変わりつつある治療法】 Fabry 病の酵素補充療法 (解説/特集). *小児内科* 2007; 39(6): 880-4.
- 7) 藤原優子, 大橋十也, 小林正久, 井田博幸, 衛藤義勝. Fabry 病の心病変に対する酵素補充療法の効果男女間での臨床経過の比較. *慈恵医大誌* 2007; 122(6): 295-304.

III. 学会発表

- 1) Kobayashi H, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Experience of enzyme replacement therapy in late onset pompe disease. *International Symposium of Lysosomal Storage Diseases*. Chiba, Nov.
- 2) 小林博司, 浦島 崇, 河合利尚, 飯島正紀, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝, 船塚 真¹⁾, 穴倉啓子¹⁾, 大澤真木子¹⁾ (東京女子医科大学). 慢性呼吸不全を呈した遅発型 Pompe 病患者に対する酵素補充療法. 第 49 回日本先天代謝異常学会. 山形, 11 月.
- 3) 小林博司, 森田麻子, 大橋十也, 衛藤義勝, 福田隆浩. レンチウイルスシステムを用いた Krabbe 病の遺伝子治療. 第 13 回日本遺伝子治療学会. 名古屋, 6 月.
- 4) 小林博司, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝. ライソゾーム蓄積症に対する酵素補充療法: ムコ多糖症, ポ

ンペ病を中心に. 第 110 回日本小児科学会学術集会. 京都, 4 月.

- 5) Eto Y. Current status of enzyme replacement therapy of LSD in Japan. *International Symposium of Lysosomal Storage Diseases*. Chiba, Nov.
- 6) 衛藤義勝. ファブリー病の酵素補充療法—最近の進歩. 住友ファブリー病フォーラム. 東京, 9 月.
- 7) 衛藤義勝. ファブリー病の最近の進歩. 東日本皮膚科学会. 札幌, 9 月.
- 8) Eto Y. New strategy for the treatment of genetic disease. *The 24th International Congress of Pediatrics*. Athens, July.
- 9) 衛藤義勝. 遺伝性神経疾患の治療は可能か? 南東北講演会. 郡山, 6 月.
- 10) 佐々木敬. 糖尿病領域における投与時の注意点. 東京慈恵会医科大学付属柏病院・医薬品安全管理セミナー. 柏, 2 月.
- 11) 大橋十也. 単一遺伝子疾患における遺伝子治療の現状. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 3 月.
- 12) 大橋十也, 飯塚佐代子, 小林博司, 作間未織, 石毛信之¹⁾, 鈴木 健¹⁾, 北川照男¹⁾ (東京都予防医学協会), 井田博幸, 齊藤三郎, 衛藤義勝. ファブリー病酵素補充療法の効果に対する抗体の影響. 第 49 回日本先天代謝異常学会. 山形, 11 月.
- 13) 大橋十也. 遺伝子治療の現状. 第 49 回日本先天代謝異常学会. 山形, 11 月.
- 14) Ohashi T. Influence of antibody formation to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *International Symposium of Lysosomal Storage Diseases*. Chiba, Nov.
- 15) Ohashi T. Influence of antibody formation to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *10th Annual Asia LSD Symposium*. Kuala Lumpur, Nov.
- 16) 大橋十也, 作間未織, 北川照男¹⁾, 鈴木 健¹⁾, 石毛信之¹⁾ (東京都予防医学協会), 衛藤義勝. ファブリー病酵素補充療法における抗 aglSidase beta 抗体の尿中 GL-3 減少への影響. 第 52 回日本人類遺伝学会. 東京, 9 月.
- 17) Ohashi T, Kitagawa T¹⁾, Ishige N¹⁾, Suzuki K¹⁾ (Tokyo Healyh Service Association), Sakuma M, Kobayashi M, Eto Y. Influence of antibody formation to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. Hamburg, Sept.
- 18) 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). 第 3 回日本ファブ

- リー病フォーラム。東京，7月。
- 19) 比企能人，佐々木敬，中井 望，藤本 啓，根本昌実，大橋十也，平井幸彦，島田 隆，田嶋尚子。アデノ随伴ウイルスを用いた膵島細胞に対する新規遺伝子導入法の検討。第50回日本糖尿病学会学術集会。仙台，5月。
- 20) Hiki Y, Sasaki T, Nemoto M, Fujimoto K, Nakai N, Ohashi T, Hirai Y, Shimada T, Tajima N. *In vivo* gene delivery by pancreatic direct injection of rAAV8 vector is efficient exclusively to the injured islets. The 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association. Chicago, June.

—国内初ARB/利尿薬合剤の展望—。東葛Round Table Meeting。柏，4月。

IV. 著 書

- 1) 佐々木敬，F. 一般臨床家が知っておきたい糖尿病に関する知識 新しい治療法：GLP-1アナログ，DPP-IV阻害薬，吸入インスリン。寺内康夫編著。現場の疑問に答える糖尿病診療Q&A。東京：中外医学社，2007。p.368-71。
- 2) 佐々木敬，19. 糖尿病と膵臓・膵島移植。日本糖尿病学会編。科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン。改訂第2版。東京：南江堂，2007。p.237-40。
- 3) 佐々木敬（執筆者）。今堀和友，山川民夫監修，大島泰郎，鈴木紘一，脊山洋右，新井洋由，石浦章一，大隅良典，岸本健雄，正木春彦，山本一夫編。生化学辞典。第4版。東京：東京化学同人，2007。

V. その他

- 1) 佐々木敬，遺伝子アブレーションと分子介入により膵島傷害の抑制と再生の促進。平成17年度～19年度科学研究費補助金 研究基盤（C）研究成果報告書2008。p.1-45。
- 2) 佐々木敬，厚生労働省科学研究補助金 難治性疾患克服研究事業・難治性疾患克服研究の評価ならびに研究の方向性に関する研究・平成17年度～19年度総合研究報告書。2008。p.13-8, p.86-90。
- 3) 佐々木敬，厚生労働省科学研究補助金 難治性疾患克服研究事業・難治性疾患克服研究の評価ならびに研究の方向性に関する研究・平成19年度総括・分担研究報告書。2008。p.86-90。
- 4) 佐々木敬。インスリン療法の課題とその実際。甲府ランタスセミナー。甲府，2月。
- 5) 佐々木敬。インスリン療法の課題とその実際。糖尿病セミナー。富山，2008年3月。
- 6) 佐々木敬。糖尿病における血管障害の新規知見。第1回東葛糖尿病内分泌ミーティング。柏，2008年1月。
- 7) 佐々木敬。インスリン療法の課題とその実際。ランタス東葛セミナー。千葉，11月。
- 8) 佐々木敬。高血圧診療の糖尿病における Strategy