

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	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
准教授：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

はじめに

我々の研究部の目的は難治性疾患の治療法開発にあり、本年度も様々な難治性疾患に対する治療法開発研究を行なった。以下、各プロジェクトにおける平成 20 年度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. レンチウイルスシステムを用いた遺伝子治療の基礎的研究

ライソゾーム蓄積症のポンペ病, クラッペ病, ムコ多糖症 VII 型 (スライ病) 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, それぞれ新生児期の当該モデルマウスに投与し効果を調べた。新生児に投与するメリットはベクターおよび発現酵素に対する免疫寛容が誘導され, より長期の遺伝子発現が期待されることである。ポンペ病の検討では投与後 4ヶ月に渡り欠損酵素の発現, グリコーゲン蓄積の減少が主に心臓において観察された。また肝機能障害, 抗体産生などは認められなかった。クラッペ病では一時的な体重増加はみられたものの症状発現や寿命において明らかな改善はみられていない。ムコ多糖症 VII 型では体重増加, 症候発現, 寿命において効果が見られつつある。

2. ポンペ病スクリーニング

ポンペ病は酵素補充療法も保険承認され治療可能な疾患である。昨年度に引き続き, 筋ジストロフィーと診断された患者の中に含まれ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なった。厚生労働省筋ジストロフィー研究班との共同で肢帯型筋ジストロフィーと診断された例を対象にスクリーニングを行い, 現在のところ pseudo-deficiency とされる中等度酵素活性低下例が 2 名, ポンペ病 1 名が診断され, 後者は酵素補充療法が開始されている。

3. 遺伝子治療に関連した免疫システムに関する研究

ファブリー病などにおける酵素補充療法や遺伝子治療実験において抗体産生によりその酵素活性の発現が抑制され臨床効果が低下することが問題になるが, この抗体による抑制効果が抗体価および酵素投与量によって影響されることが, 患者由来の線維芽細胞およびマウスの実験で明らかになった。更に抗体陽性患者の酵素補充において何が治療効果に悪影響を与えるのか, 検討中である。

4. iPS 細胞を用いたライソゾーム病の病態解析・治療法開発

iPS 細胞は京大の山中らが開発した皮膚細胞などにより樹立可能な多機能細胞である。昨年度我々はライソゾーム病の病態解析, 治療を行な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より iPS 細胞の樹立を行なった。今年度は更にこれらを分化誘導させ, 心筋細胞への誘導に成功し, 今後, 神経系幹細胞, 更には造血幹細胞への分化誘導を目指して実験中である。

5. ライソゾーム病の病態・機能解析

ファブリー病は血管障害が病態の主体を呈する。昨年我々は血管内皮細胞の樹立を行ったが今年度はこれらを用いて病態解析を施行した。またケモカインの一種で炎症形成要因のひとつとなる MCP1 遺伝子を欠損したマウスとクラッペ病マウスを交配させることで, クラッペ病における MCP1 発現の役割を検討した。

II. 糖尿病

昨年度に引き続き、マウス膵島細胞、特に 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。今年度はまずセロタイプ8型アデノ随伴ウイルス (rAAV vector) において transgene を発現させるための遺伝子プロモーターについて、従来のCMVプロモーターからヒトインスリンプロモーターの一部へと変換した。これにより、発現細胞は β 細胞だけに特異的になり、他の臓器、細胞への発現がないので格段に安全性が高まった。また遺伝子発現効率も β 細胞内での特異的なプロモーターのため強力であることが分かった。今後は 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 からの保護に役立つ遺伝子の分子介入を計画している。

III. 肝・胆・膵悪性腫瘍学

1. 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。今までの検討で免疫反応の trigger である CD40 ligand 遺伝子をアデノウイルスベクターに導入し、ラット肝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て抗腫瘍効果を証明した。今後は臨床応用を考慮して naked plasmid による CD40 ligand の遺伝子導入を示していく予定である。

2. 膵臓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

我々は、多くの悪性腫瘍の増殖、転移、抗癌剤耐性に関与する NF- κ B に着目して、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の抗腫瘍効果について検討を行ってきた。今までの検討で、ヒト膵臓癌細胞株皮下モデルに対してメシル酸ナファモスタット単独、抗癌剤であるジェムシタビン併用による抗腫瘍効果を証明した。今後は、ヒト膵臓癌細胞株腹膜播種モデルにてパクリタキセル併用による抗腫瘍効果を検討していく予定である。

IV. 婦人科腫瘍学

1. 日本人・白人卵巣漿液性腺がん臨床検体を用いた包括的アレイ CGH/GISTIC/cDNA マイクロアレイ併用解析による化学療法耐性関連遺伝子の検討

われわれは卵巣癌 78 例に対し包括的アレイ CGH を行い、機能的に重要な遺伝子を選別する

GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) 解析を用いコピー数変化 (CNV) を検討し、CCNE1 遺伝子を含む 6 領域に絞り込んだ。今回日本人・白人卵巣漿液性腺がん臨床検体を用いた包括的アレイ CGH/GISTIC/cDNA マイクロアレイ発現解析により化学療法耐性関連遺伝子を選別・検討した。国際的な IC を得てプラチナムをベースとした化学療法に臨床的に耐性を示した 33 例および感受性を示した 52 例の日本人・白人臨床進行期 III/IV 期漿液性腺がん計 85 例を用い包括的アレイ CGH 解析を行った。GISTIC 解析により CNV を検索し、さらに cDNA マイクロアレイも同時に行い、耐性群と感受性群で発現が異なりかつ CNV の結果と相関する遺伝子を選別した。選別された遺伝子の発現を Real time RT-PCR により検索し、無病再発期間および全生存期間との相関を統計解析した。包括的アレイ CGH 解析の結果、耐性群に CCNE1 および NCOA3 遺伝子増幅が認められた。cDNA マイクロアレイ解析の結果と共通する遺伝子は CCNE1 であり、Real time RT-PCR でも再現性が得られた。さらに CCNE1 発現は病再発期間および全生存期間と負の相関が認められた。日本人・白人に共通して CCNE1 遺伝子の増幅・発現の増強は化学療法の抵抗性の指標になり、新規分子標的治療薬のターゲットになる可能性が示唆された。

2. 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, Cytokertin) 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 IOSE 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、IOSE 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。

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) の機能の解析には不死化細胞株を用いた *in vitro* の実験系が有用であるが、絨毛外 Tr あるいは絨毛性 Tr の細胞での報告はあるものの、合胞体 Tr を用いた報告はない。そこで、インフォームドコンセントを得た人工妊娠中絶症例の絨毛組織を培養液内でリンスし、遠心、洗浄 (妊娠 7 週) の絨毛組織を培養液内でリンスし、遠心、洗浄を行った後、コラーゲンコートディッシュで培養、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。樹立した細胞株は、hCG 陽性、サイトケラチン 8, 18 陽性、インヒビン α 陽性の合胞体 Tr 細胞の特徴を有し、現在 90 継代以上安定して増殖を続けている。また正常核型を示し、ヌードマウス皮下接種後 3ヶ月以上腫瘍形成は認められていない。またこの細胞株を用いて低酸素状態 (1%) 1 時間培養し、その後正常酸素状態 (20%) に戻し、可逆的に発現変化する遺伝子を 4,7000 トランスクリプトからスクリーニングした。低酸素状態で可逆的に発現変化する遺伝子は prostaglandin I₂ (prostacyclin) synthase を含む 32 遺伝子が抽出された。Tr の最終的な分化形態である合胞体 Tr のヒト不死化細胞株を初めて樹立した。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〕

それぞれの分野で基礎的な検討が中心であるが、将来的にヒトへの臨床応用可能な研究も含まれる。各研究とも論文執筆、学会発表を通して検討を加え、近い将来の臨床応用に向けて更なる発展が期待される。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sakurai M, Misawa T, Shiba H, Iida T, Ohashi T, Yanaga K. A novel approach for gene transduction with adenovirus vector and the fibrin glue system. *Anticancer Res* 2008; 28(6A): 3809-13.
- 2) Sakurai Y, Kojima H, Shiwa M, Ohashi T, Eto Y, Moriyama H. The hearing status in 12 female and 15 male Japanese Fabry patients. *Auris Nasus Larynx* 2009 Mar 2. [Epub ahead of print]
- 3) Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Odaka H, Owada M. Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes. *Pediatr Nephrol* 2008; 23(9): 1461-71.
- 4) Iida T, Shiba H, Misawa T, Ohashi T, Eto Y, Yanaga K. Adenovirus-mediated CD40L gene therapy induced both humoral and cellular immunity against rat model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(10): 2097-103.
- 5) Hanyu K, Iida T, Shiba H, Ohashi T, Eto Y, Yanaga K. Immunogene therapy by adenovirus vector expressing CD40 ligand for metastatic liver cancer in rats. *Anticancer Res* 2008; 28(5A): 2785-9.
- 6) Ohashi T, Iizuka S, Ida H, Eto Y. Reduced alpha-Gal A enzyme activity in Fabry fibroblast cells and Fabry mice tissues induced by serum from antibody positive patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2008; 94(3): 313-8.
- 7) Nemoto M, Sasaki T, Fujimoto K, Hiki Y, Nakai N, Ohashi T, Eto Y, Tajima N. Epistatic interaction of LPL and PPAR γ genes in adipocytes by exposure to dioxin. *Jikeikai Med J* 2008; 55(2): 19-24.
- 8) 中井 望, 根本昌実, 佐々木敬, 田嶋尚子. Tissue engineering により作製したインスリン産生細胞におけるインスリン分泌調節性に関する研究. *慈恵医大誌* 2008; 123(3): 151-61.

II. 総 説

- 1) 池脇克則(防衛医科大学校), 佐々木敬, 山田 尚. 【生活習慣病は遺伝するか? 家族性生活習慣病?】遺伝学の知見を日常診療に生かすために. 成人病と生活習慣病. 2008; 38(10): 1109-17.
- 2) 大橋十也. 先天代謝異常症における治療の進歩 遺伝子治療の現状. *日先代謝異常会誌* 2008; 24(1): 31-8.

- 3) 曾根博仁(お茶の水女子大学), 山田信博. 【糖尿病に伴う血管病に迫る 各種病因と主要血管の病像まで】病因から迫る メタボリックシンドロームと血管病はどのようにかわるか? *Vascular Med* 2008; 4(1): 8-15.
- 4) 曾根博仁(お茶の水女子大学), 山田信博, JDCSグループ. 【大規模臨床試験 循環・代謝系を中心に】糖尿病 大規模臨床試験 二次予防 JDCS. *日臨* 2008; 66(増刊8大規模臨床試験): 642-51.
- 5) 佐々木敬. 【インクレチンの基礎と臨床】DPP-IVの基礎. *Prog Med* 2008; 28(8): 1879-81.
- 6) 佐々木敬. 総論: 糖尿病の予防と治療における新たな展開. *遙か* 2008; 4D: 3-5.
- 7) 佐々木敬. 【医師として知っておきたい Travel Medicine】安全な海外旅行のために 糖尿病を有する人. *臨と研* 2008; 85(9): 1281-4.
- 8) 根本昌実, 佐々木敬. 【糖尿病治療の Up-to-Date】インクレチン関連薬 インクレチンミメティクスとインクレチンエンハンサーの臨床成績. *最新医* 2009; 64(2): 176-84.
- 9) 佐野浩斎, 佐々木敬. 【チアゾリジンとフィブラート 生活習慣病の PPAR 分子標的薬】チアゾリジンが臨床で期待される作用とそのエビデンス 糖尿病発症抑制作用. *薬局* 2009; 60(2): 221-4.
- 6) 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, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝. Hunter 症候群に対する酵素補充療法の経過報告. 第50回日本先天代謝異常症学会. 米子, 11月.
- 7) Fujiwara M, Ohashi T, Ida H, Eto Y. The cardiac effects of enzyme replacement therapy for Japanese Fabry disease: Comparison between female and male patients. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Lisboa, Sept.
- 8) Kobayashi M, Ohashi T, Fukuda T, Eto Y, Ida H. The clinical, genetic and pathological studies of 5 Japanese patients with perinatal lethal Gaucher disease. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Lisboa, Sept.
- 9) Kimura T, Hiraoka K, Haga K, Kiyota H, Ohashi T, Eto Y, Egawa S, Kasahara N. Improvement of transduction efficiency of PCR vector by complexation of polybrene and chondroitin sulfatec. Japan Society of Gene Therapy the 14th Annual Meeting. Sapporo, June.
- 10) Iida T, Shiba H, Misawa T, Ohashi T, Eto Y, Yanaga K. Immunogene therapy for hepatocellular carcinoma by adenovirus vector expressing CD40 ligand. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting. Boston, May.

III. 学会発表

- 1) Matsumoto K, Yokoo T, Fukui A, Kawamura T, Ohashi T, Hosoya T. Physiological renin production from xeno-metanephri transplanted in the paraaortic area. American Society of Nephrology Renal Week 2009. Philadelphia, Nov.
- 2) Matsumoto K, Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, Kawamura T, Hosoya T, Kobayashi E(Jichi Medical School). Paraaortic area is better location for express renin to transplantation of rat metanephroi. KIDSTEM Annual Conference. Liverpool, Sept.
- 3) 孟 興麗, 沈 勁松, 河越しほ, 衛藤義勝, 大橋十也. 人工多能性幹細胞を用いたライソゾーム病の細胞療法の開発(Induced pluripoten stem (iPS)cells-mediated cell therapy for lysosomal storage disorders). 第13回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 11月.
- 4) 小林正久, 大橋十也, 福田隆浩, 衛藤義勝, 井田博幸. 日本人新生児致死性 Gaucher 病 6 例についての臨床的, 分子生物学的, 病理学的検討. 第50回日本先天代謝異常症学会. 米子, 11月.
- 5) 小林博司, 大橋十也, 井田博幸, 衛藤義勝. ムコリピドーシス III 型の病理学的検討. 第50回日本先天代謝異常症学会. 米子, 11月.
- 11) Kyosen SO, Iizuka S, Morita A, Kimura T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Lentivirus mediated gene therapy for murine model of Pompe disease. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Lisboa, Sept.
- 12) 比企能人, 佐々木敬, 根本昌実, 大橋十也, 平井幸彦, 田嶋尚子. Cyclin 依存性キナーゼ(CDK4)遺伝子の導入による膵β細胞の in vivo 再生促進と耐糖能の改善. 第8回日本再生医療学会総会. 東京, 3月.
- 13) Hiki Y, Sasaki T, Nemoto M, Hirai Y, Ohashi T, Tajima N. Reversal in beta cell mass and glucose tolerance of diabetic mice by reactivation of Cyclin-dependent kinases with in vivo gene transfer. The 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Rome, Sept.
- 14) Sasaki T. Recent advance in molecular and cellular therapy. The 8th Japan-China Friendship Symposium on Diabetes Mellitus. Wakayama, Apr.
- 15) Kyosen SO, Iizuka S, Morita A, Kimura T, Kobayashi H, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for Pompe disease. Japan Soci-

ety of Gene Therapy the 14th Annual Meeting. Sapporo, June.

- 16) Kyosen SO, Iizuka S, Morita A, Kimura T, Kobayashi H, Ohashi T, Eto Y. Lentivirus mediated gene therapy for murine Pompe disease. The 50th Annual Meeting of the Japan Society of Inborn Errors of Metabolism. Yonago, Nov.
- 17) 大橋十也. ライソゾーム病の新規遺伝子・細胞治療法の開発. 第7回遺伝子治療シンポジウム. 大阪, 1月.
- 18) Ohashi T. Clinical and molecular aspects of Fabry disease and Pompe disease. The 7th Korean MPS Symposium. Korea, May.

IV. 著 書

- 1) 佐々木敬. 混合型インスリン. 田嶋尚子, 及川眞一, 春日雅人, 岡 芳知 編. 糖尿病カレントライブラリー 9: 糖尿病治療のエビデンス: 薬物療法の光と影. 東京: 文光堂, 2008. p.20-2.

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. 抗腫瘍免疫療法と化学療法の併用モデルでの殺細胞メカニズム

樹状細胞 (DC) ワクチンと 5-fluorouracil (5-FU) の併用療法の抗腫瘍効果の機序をマウス大腸癌細胞 MC38 で検討した。DC 接種マウス脾細胞は 5-FU 処理後 MC38 細胞に強い殺細胞効果を発揮するが、この効果は NK 細胞除去や抗 TNF- α 抗体処理で消失した。DC 接種は脾臓 NK 細胞数を増加させ、NK 細胞上の TNF- α の発現を増強させた。一方、5-FU 処理 MC-38 細胞は procaspase-8 発現が増強し TNF- α 処理により caspase-8 経路でアポトーシスに陥った。このように DC ワクチンと 5-FU の併用により強い殺細胞効果を得られることが分かった。

2. 膵臓癌での塩酸ゲムシタピンと WT1 ペプチドワクチン抗腫瘍免疫効果の検討

臨床試験と平行して WT1 (Wilms' tumor gene 産物) ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの相乗的抗腫瘍効果機序について検討した。ヒト膵臓癌細胞株 PaCa2 はゲムシタピン処理で WT1 mRNA を強く発現する。HLA-A24 陽性健常人末梢血単核球を WT1 ペプチドパルス樹状細胞で刺激し特異的 CD8 + 細胞傷害性 T 細胞を誘導して細胞障害試験を行うと、ゲムシタピン処理後 PaCa2 がより強く傷害された。これらの結果はゲムシタピン処理で膵臓癌細胞の WT1 発現が増強し、より効率的に傷害される可能性を示唆している。

3. 家族性大腸腺腫症モデルマウスを用いた新規癌関連抗原の同定

家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウスから樹立した腫瘍細胞と DC を融合し免疫すると腫瘍内のパネート様細胞と正常パネート細胞に反応する抗体が出現する。この抗体はウエスタンブロット解析で正常腸管および腫瘍組織の 270kD 蛋白を認識し、