

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

教育・研究概要

I. はじめに

本年もライソゾーム蓄積症 (LSDs), 消化器癌を中心に研究を進めた。LSDs の研究では遺伝子治療法の開発, 現行の治療法である酵素補充療法, 骨髄移植療法の問題点の克服法の開発, iPS 細胞を用いた病態解析, 患者さんの遺伝子解析を行った。消化器癌では引き続きプロテアーゼ阻害剤を用いた治療法の開発を行った。

II. LSDs 酵素補充療法における抗体発生に関する研究

LSDs の一つであるポンペ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て治療効果を阻害する。我々は以前, 抗 CD3 抗体を投与することにより酵素製剤に対して免疫寛容が誘導されることを報告した (Ohashi T, et al. Mol Ther 2012)。これはモデルマウスに抗マウス CD3 抗体を投与したものであり, 本抗体はヒトの CD3 は認識しない。ヒトへの応用を考慮し抗ヒト CD3 抗体 (Otelixizumab) によりポンペ病の酵素補充療法で酵素製剤に対する免疫寛容導入が出来るか否かを, ヒト CD3 発現マウスを用いて検討した。結果として抗マウス CD3 抗体を用いた場合と同様のプロトコルで免疫寛容が導入出来る事が明らかとなった。

III. LSDs における骨髄移植と酵素補充療法併用の効果に関する研究

ムコ多糖症 II 型モデルマウスを用いて, 骨髄移植療法, 酵素補充療法, 両者の併用を行いその治療効果を臓器におけるグリコサミノグリカンの減少度を指標に比較検討した。結果として骨髄移植より酵素補充療法の方が各臓器のグリコサミノグリカンをより減少させた。また骨髄移植に酵素補充療法を併用する事により, 骨髄移植単独に比べ, よりグリコサミノグリカンが減少する事が明らかとなった。以上より, 既に骨髄移植を受けているムコ多糖症 II 型の患者さんにも酵素補充療法を追加する事は, より治療効果を上げる可能性がある事が示唆された。ただ, どの治療群でも中枢神経系に対する効果は認められなかった。

IV. ポンペ病 iPS を用いた疾患モデリング

ポンペ病では乳児型で心肥大などの特徴的な心合併症が見られるが, 遅発型でも軽度の心肥大や不整脈などの心合併症がみられることが近年報告されている。しかしながら, そのメカニズムに関してはほとんど明らかになっていない。そこで, 遅発型ポンペ病における心合併症のメカニズム解明のため, iPS 細胞を用いて *in vitro* で心合併症の疾患モデリングを行った。結果として遅発型ポンペ病 iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞でも, 高度のライソゾームの腫大とグリコーゲンの蓄積が見られた。

V. 酵素安定化に着目したポンペ病の新規治療法開発

現在, ポンペ病に対しては欠損酵素である酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) を体外から補充する酵素補充療法が唯一の根治療法として行われている。しかし, 患者や臓器により治療感受性が異なる点や抗 GAA 抗体が産生される点など様々な問題が明らかとなってきており, 新たな観点からの治療法開発が求められている。昨年度我々は, プロテアソーム阻害剤が一部のポンペ病患者の変異 GAA 機能を改善することを明らかにし, 現在臨床で用いられている同薬剤であるボルテゾミブがポンペ病の治療薬とな

り得る可能性を見出した。そこで今年度は、ボルテゾミブの新規治療薬としての可能性をさらに検討するために、同薬剤が有効性を示す GAA の遺伝子変異を探索した。各種 GAA 変異を有する患者細胞にボルテゾミブを投与したところ、M519V 変異および C647W 変異を有する患者細胞で GAA 活性の改善が認められ、投与後 24 時間で 1.3 倍および 1.9 倍に増加した。また、これらの細胞では、ボルテゾミブの投与により酵素タンパク質の安定化が認められ、ライソゾームのマーカー分子である LAMP2 と GAA が共局在していることも確認された。さらに、これらの変異を導入した GAA を発現する HEK293T 細胞にボルテゾミブを投与した結果、患者細胞と同じく酵素活性の改善が認められた (M519V 約 1.3 倍, C647W 5.9 倍)。以上の結果より、M519V や C647W はボルテゾミブ応答性変異であることが明らかとなった。

VI. ファブリー病の責任遺伝子 α -galactosidase A 遺伝子の遺伝子変異解析

ファブリー病は α -galactosidase A (GLA) の遺伝的機能不全に起因するライソゾーム病である。今回 exon 領域に遺伝子変異を認めない遺伝子変異不明ファブリー病患者 (5 家系) 検体を用いて、MLPA 法並びに GLA cDNA 解析法を用いて詳細な GLA 遺伝子解析を行なった。【結果】GLA cDNA 解析を行った所 1) intron3 の一部が^a exon3-4 間に挿入 (1 家系), 2) intron4 の一部が^a exon4-5 間に挿入 (2 家系), 3) exon4 の exon-skipping (1 家系), 4) exon2~5 領域の exon-skipping (1 家系) を同定した。DNA 解析を行った所 1) intron3 に点変異 (IVS3+395 (G>C)), 2) intron4 に挿入変異 (IVS4+330 (113b)), 3) exon4 (#745) に L1 配列の挿入変異, 4) intron1~exon5 の欠失変異 (Del5.5kb (Int1-Ex5)) を同定した。【考察】1) IVS3+395 (G>C) 変異により選択的 splicing が誘発されたと考えられる。2) 113bp の挿入配列は splicing enhancer としての機能を持つと推測された。3) exon4 の 3' 末近傍には L1 endonuclease 認識配列が存在していた。L1 が exon-skipping を誘発しハンター病などの遺伝病を発症させるという報告が複数存在する。4) 欠失 DNA 領域両端の直ぐ内側には逆向き反復配列が存在しており、この配列の存在が欠失変異に関与しているのかもしれない。MPLA 法ならびに cDNA 解析を用いることによって、大きな欠失変異ならびに intron 上に存在する機能的遺伝子変異を解析・同定できる可能性がある。

VII. 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ライソゾーム病の遺伝子治療

我々は従来よりムコ多糖症 VII 型およびクラッペ病の遺伝子治療に取り組んできた。ムコ多糖症 VII 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グリコサミノグリカンの減少、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 MPS II 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、蓄積するグリコサミノグリカン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。更に免疫染色で海馬付近で骨髄由来のミクログリアが証明されている。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。

VIII. 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遺伝子治療への応用

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。我々は膵炎や 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膵臓癌、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療法第 2 相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来た。今後の切除不能膵臓癌に対する標準治療法は塩酸ゲムシタピン/Nab-Paclitaxel 療法となることが予想されるため、現在では塩酸ゲムシタピン/Nab-Paclitaxel にフサンを併用した 3 剤併用療法も検討を行っている。また、切除

不能臓臓癌に対するメシル酸ナファモスタット併用放射線療法の抗腫瘍効果の検討を行っており、メシル酸ナファモスタットが放射線療法によるアポトーシス誘導を増強することに加え、細胞周期停止効果を誘導することも解明した。更には、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臓臓癌に対するその抗腫瘍効果についても検討中である。一方で、我々は消化器癌に対するアデノウイルスベクターを用いた腫瘍内へのTNF- α 遺伝子導入の抗腫瘍効果の検討も行ってきた。TNF- α の遺伝子導入は抗腫瘍効果を認める一方でNF- κ Bを活性化し、抗アポトーシスに作用する一面を持つ。そこで我々はメシル酸ナファモスタットとの併用投与により抗腫瘍効果が増強する事を臓臓癌、肝細胞癌にて示してきた。現在はCD40Lの腫瘍内遺伝子導入による抗腫瘍効果の検討をメシル酸ナファモスタット併用投与 *in vivo*, *in vitro*にて検討中であり、良好な結果が得られている。

〔点検・評価〕

本年度も主に動物を用いた前臨床試験が行われた。いくつかのものはヒトへの応用が可能と思われた。特に造血幹細胞を標的としたムコ多糖症II型の遺伝子治療で、骨髄移植では認められなかった中枢神経系における蓄積物質の減少が認められた事は大きな発見であった。現在、臨床応用に向けて基礎データを蓄積させるとともに、臨床用ベクターの作成を開始した。5年以内に臨床試験を開始する事を目指して研究を継続している。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Furujo M¹⁾, Kubo T¹⁾ (¹Okayama Medical Center), Kobayashi M, Ohashi T. Enzyme replacement therapy in two Japanese siblings with Fabry disease, and its effectiveness on angiokeratoma and neuropathic pain. *Mol Genet Metab* 2013; 110(3): 405-10.
- 2) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M¹⁾, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano H, Nakanishi M¹⁾ (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab* 2013; 109(4): 386-9.
- 3) Sato T¹⁾²⁾ (²CREST), Ikeda M¹⁾, Yotsumoto S¹⁾ (¹Tokyo Medical and Dental Univ), Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T (Keio Univ), Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood* 2013; 121(16): 3267-73.
- 4) Haruki K, Shiba H, Fujiwara Y, Furukawa K, Iwase R, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the antitumor effect of tumor necrosis factor- α gene therapy for hepatocellular carcinoma in mice. *Surgery* 2013; 154(3): 468-78.
- 5) Akiyama K, Shimada Y¹⁾, Higuchi T¹⁾ (¹Kitasato Univ), Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE²⁾, Brown JR²⁾ (²BioMarin Pharmaceutical), Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab* 2014; 111(2): 139-46.
- 6) Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Shiba H, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Combination chemotherapy of nafamostat mesylate with gemcitabine for gallbladder cancer targeting nuclear factor- κ B activation. *J Surg Res* 2013; 184(1): 605-12.

II. 総説

- 1) 大橋十也. ライソゾーム蓄積症への酵素補充療法. *Pediatric Endocrinology Reviews 抄訳シリーズ* 2013; 37: 2-3.
- 2) 大橋十也. ライソゾーム病の治療法の問題点の克服細胞・遺伝子治療法の開発に向けて. *日産婦新生児血会誌* 2013; 22(2): 55-62.
- 3) 大橋十也. 【遺伝子検査による早期診断】疾患 尿素サイクル酵素異常症. *周産期医* 2014; 44(2): 229-31.
- 4) 大橋十也. 【クローズアップ“目・耳・鼻・口”の診かたと初期対応-臨床決断の醍醐味】口舌が大きい. *小児内科* 2013; 45(10): 1843-4.

III. 学会発表

- 1) Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M¹⁾, Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K (Kyoto Univ), Ida H, Ohashi T, Nakauchi H¹⁾ (¹Univ of Tokyo), Eto Y. Pathological features of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from skin fibroblasts of various lysosomal storage disease. *ICIEM 2013 (12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism)*. Barcelona, Sept.
- 2) Wakabayashi T, Sakuma M (Hyogo College of

- Medicine), Morita A, Ohashi T, Eto Y, Ida H. The effect of switching treatment from agalsidase- β to agalsidase- α on renal function in 18 adults with Fabry disease. ICIEM 2013 (12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism). Barcelona, Sept.
- 3) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Ohashi T, Minamisawa S, Ida H. Cardiomyocyte differentiation of Pompe disease-specific iPSCs following lentiviral gene therapy. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Urayasu, Nov.
 - 4) Shimada Y, Nishida H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Bortezomib enhances the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant alpha-glucosidase identified in Pompe disease. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Urayasu, Nov.
 - 5) Higuchi T, Kaneshiro E, Kobayashi M, Shimada Y, Akiyama K, Wakabayashi T, Sato Y, Kobayashi H, Ohashi T, Ida H. MLPA method is useful tool for genetic diagnosis of female Fabry disease with deletion mutation. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Urayasu, Nov.
 - 6) Kobayashi H, Shimada Y, Iwamoto T, Fukuda T, Ariga M, Sato Y, Wakabayashi T, Iizuka S, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Gene therapy for Krabbe disease. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Urayasu, Nov.
 - 7) Iwase R, Shiba H, Shirai Y, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Iida T, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Combination treatment using adenovirus-mediated CD40 ligand gene delivery and NF- κ B inhibitor for pancreatic cancer. 9th Annual Academic Surgical Congress. San Diego, Feb.
 - 8) Shirai Y, Shiba H, Uwagawa T, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Iida T, Futagawa Y, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibitor of nuclear factor κ B activation enhances the antitumor effect of radiation therapy for pancreatic cancer. 9th Annual Academic Surgical Congress. San Diego, Feb.
 - 9) Shirai Y, Uwagawa T, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Futagawa Y, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of nuclear factor kappa-B enhances the antitumor effect of combination treatment with gemcitabine and S1 for pancreatic cancer cells. 11th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. Seoul, Mar.
 - 10) Nishida H, Shimada Y, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Proteasome inhibitor improves the function of mutant beta-glucuronidase in fibroblasts from Mucopolysaccharidosis type VII patient. ICIEM 2013 (12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism). Barcelona, Sept.
 - 11) Shimada Y, Nishida H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Proteasome inhibitor improves the function and subcellular localization of mutant lysosomal alpha-glucosidase in fibroblasts from patients with Pompe disease. ICIEM 2013 (12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism). Barcelona, Sept.
 - 12) Yokoi T, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Eto Y, Otsu M, Nakauchi H, Nishikawa S, Ida H, Ohashi T. (Poster Session 11 : Genetic Disease II & Basic Science III) Non-myeloablative preconditioning with ACK2 for cell therapy for Hunter disease. 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. Okayama, July.
 - 13) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Iizuka S, Otsu M, Nakauchi H, Brown JR, Crawford BE, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. (Oral Session 1 : Genetic Diseases I) Enzyme replacement therapy enhanced a therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in MPS II mouse. 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. Okayama, July.
 - 14) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Iizuka S, Otsu M, Nakauchi H, Brown JR, Crawford BE, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Enzyme replacement therapy enhanced a therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in MPS II mouse. American Society of Gene & Cell Therapy 16th Annual Meeting. Salt Lake City, May.
 - 15) Kobayashi H, Ariga M, Fukuda T, Iwamoto T, Iizuka S, Shimada Y, Eto Y, Ohashi T. Gene therapy for mouse model of Krabbe disease. American Society of Gene & Cell Therapy 16th Annual Meeting. Salt Lake City, May.
 - 16) 大橋十也. (ランチョンセミナー2) ライソゾーム病の治療について. 日本人類遺伝学会第58回大会. 仙台, 11月.
 - 17) 大橋十也. ファブリー病の診断と治療. 第65回日本皮膚科学会西部支部学術集会. 鹿児島, 11月.
 - 18) Ohashi T. Challenges dealing with atypical Fabry patients (Japan). Fabry Disease Expert Committee Japan-Asia Pacific. Tokyo, July.

- 19) 大橋十也. ファブリー病の診断と治療. 第54回日本神経学会学術大会. 東京, 5月.
- 20) Ohashi T. Gene therapy for lysosomal storage disease. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. Urayasu, 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：小井戸薫雄	消化器病学
(消化器・肝臓内科)	
講師：赤崎 安晴	脳腫瘍の診断と治療
(脳神経外科学)	

教育・研究概要

I. 進行膵がんに対する WT1 class I/II ペプチドパルス樹状細胞療法の第1相臨床試験

Wilms' Tumor 1 (WT1) 蛋白は悪性腫瘍に広範に発現するがん遺伝子産物であり、強い抗原性を示すことから抗腫瘍免疫の標的抗原として研究が進められてきた。本研究は膵がんを発現する WT1 に対する免疫反応を誘導・活性化して治療効果を上げる試みであり、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識する WT1 class I ペプチドに加えて、WT1 特異的ヘルパー T 細胞も活性化する WT1 class II ペプチドを併用使用する新規性がある。アフエレーシスにより樹状細胞前駆細胞を採取し、大学1号館 GMP 対応細胞産生施設において樹状細胞を大量培養後凍結保存、2週に1回の頻度で WT1 class I/II ペプチドをパルスした樹状細胞を患者に皮内接種した。この方法に加えて定法に則ったゲムシタビン (GEM) 治療を併用した。2012年から2013年度にかけて、3例の患者に WT1 class I ペプチドパルス樹状細胞投与、1例の患者に WT1 class II ペプチドパルス樹状細胞投与を行い、安全性を確認後、WT1 class I/II の両方のペプチドをパルスした樹状細胞の投与を開始した。2013年度末までに治療クライテリアを満たす7例の進行膵がん症例が登録され治療を受けた。35才、男性例は治療開始後約3か月目に間質性肺炎を発症し、効果安全委員会により本治療との関連性 (GEM による間質性肺炎発症が知られている) ありと判断されたため、本症例は臨床試験を中止、ステロイドパルス療法により軽快した。また、49才、女性例は治療開始後約3か月目に脳梗塞を発症して死亡したが、効果安全委員会の審査では治療関連性はなしと判定された。残りの5例は治療関連有害事象を認めず、良好な状態で外来治療を継続した。5例中4例は WT1 に対する皮膚皮内反応 (DTH) が経過中に陽性化し、それぞれの2013年度末までの生存期間は18か月 (死亡)、19か月 (生存中)、16か月 (生存中)、10か月 (死亡)、であった。