

総合医科学研究センター

センター長 大橋 十也

遺伝子治療研究部

教授：大橋 十也 小児科学，遺伝子治療，先天代謝異常症
准教授：小林 博司 小児科学，遺伝子治療，先天代謝異常症

教育・研究概要

I. 始めに

当研究部は例年通り、ライソゾーム蓄積症(LSD)、難治性癌など、治療法がない、もしくはあっても著しく、その効果が不十分である疾患の新規治療法の開発などを行なった。当研究部のミッションとしては動物などを用いた新規シーズの開発ならびに、その臨床応用である。

II. LSDの酵素補充療法(ERT)における免疫寛容導入

我々は以前よりLSDの中のファブリー病、ポンペ病を中心にERT中に生じる酵素製剤に対する免疫応答が治療効果を減弱すること、そしてその免疫応答を減弱させる免疫寛容導入方法を研究開発してきた。免疫寛容導入では、抗CD3抗体や酵素の経口投与が有用であることを既に報告した。今回は既に米国などで承認されているB細胞に対する抗体である、抗BLyS(B cell activating factor)抗体を投与することによりファブリー病ERTにおいて酵素製剤に対する免疫反応が抑制されることを明らかにした。

III. レンチウイルスベクターシステムなどを用いたLSDの遺伝子治療

我々はライソゾーム病の中でもムコ多糖症(MPS)とクラッペ病を中心に遺伝子治療研究に取り組んでいる。

ムコ多糖症II型(MSP II)に関しては、昨年度自己由来の造血幹細胞に欠損酵素iduronate-2-sulfatase(IDS)を発現するレンチウイルスベクターを感染させて自己に戻すex-vivo gene therapyの

モデルとして8週齢のモデルマウスから抽出した造血幹細胞にIDS発現遺伝子を組込んだ組換えレンチウイルスを感染させ、放射線照射したレシピエントマウスに静脈注射し遺伝子導入する方法で、末梢血において長期に正常の10~15倍に昇る酵素発現を実現し、中枢での酵素発現、蓄積基質の減少、行動の正常化が見られたことを報告した(Wakabayashi T, et al. Hum Gen Ther 2015; 26(6): 357-66)。また整形外科との共同研究として、8週齢のMSP II型モデルマウスの骨系統を正常群と比較解析し、病理学的に単位骨量、骨梁数の増加、間隙の減少、幅の不変が見られ、また骨強度試験では破断エネルギー、最大荷重ともに正常を上回っており、骨密度の増加も見られた。つまり正常よりも骨内部が緻密でかつ強度が高いことが示唆され、遺伝子治療介入を行うことで、これらがどう変化するかを追跡調査している。

MPS VII型に対しては新生児モデルマウスの顔静脈に組換えレンチウイルスを静脈注射することで、中枢、心、肝、脾、腎といった重要臓器での酵素発現、オートファジービルドアップの改善、中枢神経系で30週という長期にわたるレンチウイルスベクターコピーの発現が確認され、現在論文文化している。

クラッペ病に対しても同様に組換えレンチウイルス新生児モデルマウス注射により発症時期を遅らせ、生命予後の改善、中枢の基質の減少も実現している。またモデルマウス由来の神経系細胞株を用いてZinc Finger Nuclease systemによる遺伝子編集を試み、in vitro levelでの酵素活性上昇、基質蓄積の低下を確認している。これを応用しモデルマウス由来iPS細胞で遺伝子編集を試み、神経系細胞に分化させる方向で実験を進めている。

IV. ヒト造血幹細胞が移植可能なMSP IIマウスの作成

我々はMSP IIの造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の開発を行なっている。現在のマウスでの結果をヒトへトランスレーションすべくヒト造血幹細胞が移植出来るヒト化MSP IIマウスの作成を行なった。NOGマウスは、以前よりヒト造血細胞移

植に使われていた NOD/SCID マウスと IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウトマウスを掛け合わせるにより実験動物中央研究所で開発されたよりヒト造血幹細胞が移植可能なマウスである。我々は遺伝子編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いて NOG マウス受精卵の IDS 遺伝子をノックアウトした。現在、出生したマウスの解析を行っている。

V. プロテアソーム阻害剤を用いたポンペ病の新規治療法開発

これまで我々は、ポンペ病に対する新規治療薬としてプロテアソーム阻害剤の可能性を見出し、臨床で使用可能な同薬剤であるボルテゾミブを用いてその有効性の検討を行ってきた。従来の検討は、主として培養細胞を対象に行ってきたが、生体への有効性を解析するため、本年度はミスセンス変異型の新規ポンペ病モデルマウスの作成を行い、同マウスに対するボルテゾミブの有効性について検討した。新規モデルマウスについては、M519V 変異を導入したヒトの酸性 α グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成し、GAA 欠損マウスと交配することで作成した。作成したポンペ病モデルマウスにボルテゾミブを投与した結果、今回検討した濃度域では心臓において有意な GAA 活性の上昇が認められた一方で、骨格筋では有意な変化は認められなかった。以上の結果より、ボルテゾミブは生体においても GAA の安定化作用を有することが明らかとなり、心筋は骨格筋よりもボルテゾミブに対する感受性が高いことが示唆された。

VI. MSP II に治療効果を有する低分子化合物の探索

近年、複数のライソゾーム病において低分子化合物を用いたケミカルシャペロン療法の開発が進められている。しかし、本邦で最も患者数の多い MSP II に対しては、未だシャペロン作用を有する化合物が見出されていない状態である。そこで我々は、MSP II の原因遺伝子である IDS の基質の一つであるヘパリンの分解産物に着目し、同糖のシャペロン作用について解析を行った。その結果、ヘパリン由来二糖は濃度依存的に組換え IDS の熱変性を抑制することが明らかとなり、患者由来細胞に投与すると IDS 活性を改善することが判明した。以上より、ヘパリン由来二糖は IDS に対するシャペロン候補物質として機能する可能性が考えられた。

VII. ファブリー病末梢神経症状の病態メカニズムの解明と遺伝子治療法の開発

ファブリー病は α ガラクトシダーゼ A (GLA) タンパク質の機能不全によって生じる遺伝病である。GLA 酵素活性の低下によりその基質である Gb3 が細胞に蓄積し体の様々な箇所に症状が出現する。小児～青年期のファブリー病患者は末梢神経症状 (灼熱痛や感覚鈍麻症状) を発症する 경우가多く同モデルマウスも末梢神経症状を示す。ファブリー病末梢神経障害は小径神経の脱落によって発症すると考えられているがその脱落メカニズムは不明であり、GLA の ERT を行ってもこの症状への効果は限定的である。我々は hGLA 遺伝子搭載アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを開発した。ファブリー病末梢神経症状に対する遺伝子治療法の開発を目指し AAV ベクターを用いたファブリー病モデルマウスの治療を試みた。方法：マウスにウイルスを $5 \times 10 \sim 11$ vgc/Kg 静注した。投与後 3 週間飼育した後マウスの行動学的解析や各組織の酵素活性の変化を解析した。結果：大脳と小脳では AAV9 治療群は殆ど GLA 酵素活性値の上昇を示さず、AAVrh10 治療群では僅かに上昇した。DRG では AAV9, AAVrh10 治療群ともに僅かに GLA 酵素活性値が上昇した。von-Frey 試験では治療群と無治療群に大きな差はなかった。考察：AAV の静注では頭部へのウイルス感染が難しかった。AAV の静注により DRG ではモデルマウスの GLA 酵素活性値の上昇がみられたが行動学的には無処理群と変化がなかったため、行動の改善には更なる酵素活性の上昇が必要と思われる。神経系へのウイルス感染を高めるために投与ウイルスの増量や極早期にウイルス投与をする必要があるかもしれない。

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癌性疼痛の改善に関する検討

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。我々は脾炎や 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脾癌、胃癌、胆嚢癌にて示してきた。臨床の現場に於いても、切除不能脾臓癌に対する FUT175 併用塩酸ゲムシタピン (GEM)

の第2相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来た。現在は膵癌に対する放射線併用のメシル酸ナファモスタット投与の抗腫瘍効果の検討を行っており、良好な結果が得られている。現在の切除不能膵臓癌の標準治療はGEM/S-1療法またはGEM/Nab-Paclitaxel療法であるため、両者との併用療法を検討している。さらに、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やリコンビナントトロポモジュリンに着目し、膵癌に対するその抗腫瘍効果についても検討中である。また放射線療法により癌細胞の上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)が亢進することが報告されているため、直腸がん術前放射線化学療法におけるEMTの抑制法の検討している。EMTの促進因子にはNF- κ B, STAT-3が関与しているため両者をターゲットとした治療法を開発する。

癌性疼痛は癌患者のQOLを著名に低下させることがわかっているため、膵臓癌患者の痛みのメカニズム、そして治療法に関しての検討を行っている。癌細胞の神経浸潤の抑制や、神経伝達物質の分泌に関して遺伝子介入を行うことで癌性疼痛の改善法を開発している。

「点検・評価」

新規治療法の開発のための基礎シーズの検索は一部を除き大半の研究で順調に進んだ。今後はこれらのシーズをどう臨床応用して行くかが重要な課題である。レンチウイルスを静脈内投与しLSDを治療する研究は、かなり長い間行われており、そろそろ論文文化が必要であろう。また新生児時期にレンチウイルスを静脈内投与するという臨床的妥当性の検証をするべきである。疾患iPSを遺伝子編集の技術で治療することは有益な研究であるが最終的なアウトプットを明確にする必要がある。MSP IIの造血幹細胞を標的とした、遺伝子治療法の研究に関しては現在、臨床研究を行うべく準備を進めている。その一環としてヒト造血幹細胞が移植可能なMSP IIマウスの作成を行ったのは評価できる。ただ非臨床試験だけでも数億円の費用がかかるため、このあたりの資金を同捻出するのが今後の問題である。公的研究費の獲得を目指しているが獲得が出来なかった場合も製薬会社が興味を示してくれ最終的な治験への契約が開始されている。ポンベ病のボルテゾミドに治療は、癌に使用される薬であり副作用の問題が、そして注射薬であることを踏まえると酵素補充療法に対する優位性を明らかにする必要があるであ

ろう。MSP IIの低分子化合物の開発はまだ培養細胞レベルでの検討であり、今後は動物での実験が必要になる。またファブリー病の痛みに対する遺伝子治療は非常に魅力的な課題であるが、有意な結果が得られていない。益々の研究努力が必要であろう。難治性消化器癌に対する基礎研究は臨床研究も同時に進んでおり順調に経緯している。今後は承認を目指して行く戦略を立てるべきであろう。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kato S¹), Yabe H¹), Takakura H¹) (¹Tokai Univ), Mugishima H²), Ishige M²) (²Nihon Univ), Tanaka A (Osaka City Univ), Kato K³), Yoshida N³) (³Japanese Red Cross Nagoya Hosp), Adachi S (Kyoto Univ), Sakai N⁴), Hashii Y⁴) (⁴Osaka Univ), Ohashi T, Sasahara Y (Tohoku Univ), Suzuki Y (Gifu Univ), Tabuchi K (Komagome Hosp). Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: a report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Pediatr Transplant* 2016; 20(2): 203-14.
- 2) Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Hoshina H, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y (Inst Neurological Disorders), Ida H, Ohashi T. A method for measuring disease-specific iduronic acid from the non-reducing end of glycosaminoglycan in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab* 2016; 117(2): 140-3.
- 3) Shirai Y, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Dual inhibition of nuclear factor kappa-B and Mdm2 enhance the antitumor effect of radiation therapy for pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2016; 370(2): 177-84.
- 4) Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K (Kitasato Univ), Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y (Inst Neurological Disorders), Ida H, Ohashi T. Hematopoietic stem cell gene therapy corrects neuropathic phenotype in murine model of Mucopolysaccharidosis type II. *Hum Gene Ther* 2015; 26(6): 357-66.
- 5) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Era T¹), Kimura S¹) (¹Kumamoto Univ), Eto Y (Inst Neurological Disorders), Ida H, Ohashi T. Disease modeling and lentiviral gene transfer in patient-spe-

cific induced pluripotent stem cells from late-onset Pompe disease patient. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015; 2: 150-23.

- 6) Shirai Y, Shiba H, Sakamoto T, Horiuchi T, Haruki K, Fujiwara Y, Futagawa Y, Ohashi T, Yanaga K. Preoperative platelet to lymphocyte ratio predicts outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma after pancreatic resection. *Surgery* 2015; 158(2): 360-5.

II. 総 説

- 1) 大橋十也. 【遺伝子治療の臨床展開】 遺伝性白質ジストロフィーに対する造血幹細胞遺伝子治療. *血液フロンティア* 2015; 25(5): 613-23.
- 2) 大橋十也. 第6章: 先天代謝異常症 Pompe 病. 水口 雅 (東京大), 市橋 光 (自治医科大), 崎山弘 (崎山小児科) 総編集. 今日の小児治療指針. 第16版. 東京: 医学書院, 2015. p.221.
- 3) 大橋十也, 埜中征哉 (国立精神・神経医療研究センター病院), 神田 隆 (山口大). 【酵素補充療法】よくわかる酵素補充療法. *Brain Nerve* 2015; 67(9): 1081-9.

III. 学会発表

- 1) 大橋十也. (教育講演 12: 代謝性神経疾患の病態解明と Disease Modifying Therapy の開発) ファブリー病に対する酵素補充療法の現状と今後の展望. 第56回日本神経学会学術大会. 新潟, 5月.
- 2) 大橋十也. ファブリー病診断治療ハンドブック 2015 の概要. 第11回日本ファブリー病フォーラム. 東京, 7月.
- 3) 大橋十也. ファブリー病の診断と治療. 第581回八戸胸部疾患懇話会. 八戸, 10月.
- 4) 大橋十也. ファブリー病の診断と治療. 北河内遺伝性疾患セミナー. 大阪, 10月.
- 5) 大橋十也. (講演 2) いま世界で臨床応用が行われている遺伝子治療について. 第4回先天代謝異常症患者会フォーラム. 東京, 11月.
- 6) 大橋十也. 第2部: AADC 欠損症に対する遺伝子治療 代謝・神経疾患に対する遺伝子治療の現状と将来. 小児難治性疾患に対する遺伝子治療シンポジウム. 東京, 1月.
- 7) 大橋十也. ライソゾーム病遺伝子治療. 2016 若手医師育成セミナー. 東京, 1月.
- 8) 大橋十也. ライソゾーム病の新しい治療法. 第10回埼玉酵素補充療法研究会. 大宮. 3月.
- 9) Kobayashi H. Medical care and gene therapy for genetic disease, its present and future: Lysosomal Storage Disorders (LSDs). 第21回日本遺伝子治療

学会学術集会. 大阪, 7月.

- 10) 小林博司. (シンポジウム 1: 脳を標的とした先天代謝異常症の治療戦略) ウイルスベクターを用いた先天性代謝異常症の遺伝子治療. 第57回日本先天代謝異常学会総会. 大阪, 11月.
- 11) Sato Y, Kobayashi H, Shimada Y, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Direct reprogramming of fibroblast allows live-cell imaging of autophagic buildup in Pompe disease skeletal myoblast. ASGCT (American Society Gene & Cell Therapy) 18th Annual Meeting. New Orleans. May.
- 12) Sato Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Metabolomic profile of Pompe disease iPSC derived cardiomyocyte reveals oxidative stress and mitochondrial dysfunction are associated with cardiac and skeletal pathology of Pompe disease. ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 2015 Annual Meeting. Stockholm. Jun.
- 13) Shirai Y, Shiba H, Uwagawa T, Saito N, Sugano H, Horiuchi, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Ohashi T, Yanaga K. (Poster) Inhibition of nuclear factor Kappa-B enhances the antitumor effect of combination treatment with gemcitabine and Nab-Paclitaxel for pancreatic cancer cells. ISAGO (International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists) Continuing Medical Education: Advanced Post-Graduate Course in Tokyo 2015. Tokyo. Jun.
- 14) Sato Y, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. High efficiency lentiviral gene transfer to pluripotent stem cell allows disease modeling and phenotypic correction of late-onset Pompe disease iPSC. 第21回日本遺伝子治療学会学術集会. 大阪, 7月.
- 15) Shirai Y, Uwagawa T, Shiba H, Horiuchi T, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of nuclear factor Kappa-B enhances the antitumor effect of combination treatment with gemcitabine and Nab-Paclitaxel for pancreatic cancer cells. 46th World Congress of Surgery. Bangkok, Aug.
- 16) Hoshina H, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Sulfated disaccharide from heprin are chaperone candidate for treatment of mucopolysaccharidosis type II. SSIM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) 2015. Lyon. Sept.
- 17) Shimada Y, Fukuda T, Nishimura E, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Ida H, Ohashi T. Development of missense murine model of Pompe disease.

SSIM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) 2015. Lyon. Sept.

- 18) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Yokoi T, Yokoi K, Kobayashi H, Ida H, Ishii M, Ohashi T. The therapeutic efficacy of bone marrow transplantation from heterozygous donor in mucopolysaccharidosis type II mice. SSIM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) 2015. Lyon. Sept.
- 19) Shirai Y, Shiba H, Uwagawa T, Saito N, Sugano H, Horiuchi T, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Ohashi T, Yanaga K. (Integrated oral presentations session I) Recombinant thrombomodulin suppresses tumor growth of pancreatic cancer in mice by inhibition of NF- κ B. 11th Annual Academic Surgical Congress. Jacksonville, Feb.
- 20) Horiuchi T, Shiba H, Saito N, Shirai Y, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. (Integrated oral presentations session II) Nafamostat mesilate suppresses NF- κ B activation and enhances antitumor effect of gemcitabine plus nab-paclitaxel therapy for pancreatic cancer. 11th Annual Academic Surgical Congress. Jacksonville, Feb.

V. その他

- 1) 厚生労働省難治性疾患等政策研究事業ライソゾーム病（ファブリー病を含む）に関する調査研究班編. 診断の手引きに準拠したムコ多糖症診療マニュアル. 東京：診断と治療社，2016.
- 2) 厚生労働省難治性疾患等政策研究事業ライソゾーム病に関する調査研究班編. ライソゾーム病・ペルオキシゾーム病診断の手引き. 東京：診断と治療社，2015.

悪性腫瘍治療研究部

教授：本間 定 腫瘍免疫学
 准教授：小井戸薫雄 消化器病学
(内科学講座(消化器・肝臓内科)より出向中)
 講師：伊藤 正紀 分子生物学
 講師：赤崎 安晴 中枢神経悪性腫瘍
(脳神経外科学講座より出向中)

教育・研究概要

I. 膠芽腫における免疫原性変異抗原の探索

悪性腫瘍治療研究部は脳神経外科と共同で膠芽腫に対する樹状細胞/腫瘍細胞ワクチン療法を行ってきた。この治療法により生存期間の延長を認めたが、この治療法の効果を事前に予測するような因子はない。近年、腫瘍免疫療法の抗腫瘍効果には、腫瘍細胞の遺伝子変異に由来する腫瘍変異抗原が関与することがわかってきた。そこで、樹状細胞/腫瘍細胞ワクチン療法を行った患者を対象に腫瘍変異抗原の探索や遺伝子発現解析を行い、治療法の効果に関連する因子を解析した。腫瘍変異抗原の探索は、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析と全トランスクリプトーム解析で行った。発現している遺伝子の変異情報から変異型タンパク質配列を取得し、HLA との結合の強い変異型ペプチドを予測し、これを腫瘍変異抗原候補とした。腫瘍変異抗原候補は治療効果に関わらずどの症例でも40程度検出された。また、全例に共通な腫瘍変異抗原候補も複数見つかったが、治療効果が認められた群だけに共通の腫瘍変異抗原は見つからなかった。遺伝子発現解析の結果から、治療効果が認められた群ではMHCクラスII分子の発現が高いことが分かった。これらのことから、樹状細胞/腫瘍細胞ワクチン療法の効果には、コンピュータ解析で予測した腫瘍変異抗原候補の数や特定の腫瘍変異抗原の有無よりもMHCクラスII分子の発現が関与している可能性が考えられた。今後、腫瘍変異抗原候補の抗腫瘍効果の確認や樹状細胞/腫瘍細胞ワクチン療法でのMHCクラスII分子の機能などの解析を行っていく予定である。

II. Nafamostat の腫瘍細胞におけるインターフェロン- γ (IFN- γ) 誘導性 programmed cell death ligand-1 (PD-L1) の発現抑制効果の研究

腫瘍細胞に発現するPD-L1は活性化リンパ球上に発現するprogrammed death-1 (PD-1) と結合するとTリンパ球を不活化し、腫瘍細胞の免疫逃