

# 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遺伝子治療を含む新規治療法の開発などを行った。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 のレンチウイルスベクターならびに遺伝子編集技術を用いた遺伝子治療

我々はムコ多糖症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 (MPS II) (Hunter 病) に関しては, 自己由来の造血幹細胞に欠損酵素 iduronate-2-sulfatase 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 のモデルとして中枢神経系を含む治療効果を発表したが, 同じ方法でモデルマウスの骨組織の改善度を整形外科のチームとの共同研究にて検討した。今年は, モデルマウス未治療群と疾患群で骨密度, 海綿骨病理における骨梁数, 剛性・破断エネルギーにおいて有意に差が見らるることを明らかにした。

クラッペ病では新生児に対し, 欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスを投与し発病時期, 末梢・中枢神経系における病理, 寿命において改善効果がみられている。更に基質合成阻害剤である L-CS 皮下注射を併用した群との比較でその相乗効果も明らかにした。またモデルマウス由来の神経系細胞株を用いて遺伝子編集を試み, 培養細胞での酵素活性上昇, 基質蓄積の低下を見ている。

#### III. 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であるボルテゾミブが有用である可能性を見出し, その効果について検討を進めてきた。本年度は, ミスセンス変異型ポンペ病モデルマウスを対象に治療効果のさらなる解析に加えて副作用の検討に取り組んだ。ボルテゾミブを投与したマウスの心臓では, 原因遺伝子産物である酸性 $\alpha$ グルコシダーゼ (GAA) の酵素活性上昇や基質蓄積の軽減といった生化学的改善が認められた。この際, マウスの白血球数や血小板数に有意な変化は認められず, 今回検討した条件では, ボルテゾミブは血液毒性を伴うことなくモデルマウスの心臓における GAA 機能を改善することが示唆された。

#### IV. 硫酸化二糖により安定化される MPS II 原因遺伝子変異の探索

昨年度我々は, ヘパリンに由来する硫酸化二糖が MPS II の原因遺伝子産物であるイズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) に対してシャペロン作用を有する可能性を見出した。本年度は, 同二糖が有効性を示す IDS 変異の特徴付けを行った。培養細胞を用いて検討した結果, 活性中心の近傍に変異を有する IDS を中心に複数の変異型酵素で活性の改善が認められた。

#### V. ファブリー病 (FD) 末梢神経症状の遺伝子治療

FD は遺伝子病であり原因遺伝子は $\alpha$ -galactosidase A (GLA) である。この遺伝子の異常によって細胞に Gb3 が蓄積する。FD では幼少期から感覚神経症状が発生するが, この症状は後根神経節 (DRG) での Gb3 の蓄積が関与すると考えられている。FD には酵素補充療法が存在するが神経症状の改善効果は弱い。そこで hGLA 搭載アデノ随伴ウイルス rAAV2/9-hGLA を開発し FD マウス腰椎領域の脊髄液内に投与した。治療 12 週間後に Hot-Plate 試験, 15 週間後に腰椎 DRG を摘出した。Hot-Plate 試験では治療群に末梢神経症状の改善効果がみられた。また治療群 DRG の GLA 酵素活性値が

優位に上昇した。以上の結果から脊髄液内に投与された rAAV2/9-hGLA は DRG に感染し hGLA を発現させたと考えられた。またこのことにより DRG 機能が保護され神経症状進行が抑制できたと考えられる。

## VI. 消化器癌に対する NF- $\kappa$ B 活性化抑制を標的とした抗腫瘍効果増強作用の検討および癌性疼痛の改善に関する検討

我々は現在まで、NF- $\kappa$ B の活性化抑制を介し種々の消化器癌において増殖、浸潤、転移が抑制されることを報告した。特にメシル酸ナファモスタット(フサン<sup>®</sup>: FUT175) による NF- $\kappa$ B の活性化抑制と抗腫瘍効果増強作用を膵癌、胃癌、胆嚢癌に対して示した。臨床においても、切除不能膵臓癌に対する FUT175 併用塩酸ゲムシタピン (Gem) の第2相臨床試験で良好な成績を得た。現在は放射線併用 FUT175 投与による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。一方、骨髄腫に用いられる免疫調節薬 (IMiDs) は、細胞周期停止、血管新生抑制、そしてアポトーシス増強作用を示す。Thalidomide は消化器癌に対する NF- $\kappa$ B 活性化抑制作用が過去に報告されており、今回我々は第2世代 IMiDs を用い現在の標準治療 (Gem/S-1 または Gem/nab-paclitaxel 療法) に対する相乗効果を確認した。また、癌患者数増加に伴い、癌性疼痛は社会問題となっている。癌性疼痛のメカニズム、治療法の検討を行い、癌細胞の神経浸潤の抑制、神経伝達物質の抑制を目的とした遺伝子治療を検討している。

### 「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、そろそろ論文化が必要であろう。MPS 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。その一環として本治療法が骨にも有効である事が判明したのは有意義であった。このプロジェクトに関しては AMED の資金が獲得できたため臨床試験に一步近づいた。ボンベ病のボルテゾミブに治療は、安全性が確認できたが今後はどう臨床展開をするかが課題である。MPS 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 FD

の痛みに対する遺伝子治療は非常に魅力的な課題であり有意な結果が出てきた。今後は基礎研究でのデータを積み重ねる必要がある。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) Shirai Y, Uwagawa T, Shiba H, Shimada Y, Horiuchi T, Saito N, Furukawa K, Ohashi T, Yanaga K. Recombinant thrombomodulin suppresses tumor growth of pancreatic cancer by blocking thrombin-induced PAR1 and NF- $\kappa$ B activation. *Surgery* 2017; 161(6): 1675-82. Epub 2017 Jan 13.
- 2) Matsui M, Inoue K, Sakoda S, Matsumura T, Hamazaki T, Kosuga M, Okuyama T, Shimada Y, Ohashi T, Nishino I. Screening for late-onset Pompe disease in undiagnosed myopathies. *Neurol Clin Neurosci* 2017; 5(2): 60-4.
- 3) Horiuchi T, Uwagawa T, Shirai Y, Saito N, Iwase R, Haruki K, Shiba H, Ohashi T, Yanaga K. New treatment strategy with nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor for pancreatic cancer. *J Surg Res* 2016; 206(1): 1-8.
- 4) Kono Y, Wakabayashi T, Kobayashi M, Ohashi T, Eto Y, Ida H, Iguchi Y. Characteristics of cerebral microbleeds in patients with Fabry disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2016; 25(6): 1320-5.
- 5) Yokoi T, Yokoi K, Akiyama K, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Sato T, Ohteki T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T. Non-myeloablative preconditioning with ACK2 (anti-c-kit antibody) is efficient in bone marrow transplantation for murine models of mucopolysaccharidosis type II. 2016; 119(3): 232-8.
- 6) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Ida H, Ohashi T. TFEB overexpression promotes glycogen clearance of Pompe disease iPSC-derived skeletal muscle. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016; 3: 16054.
- 7) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Ida H, Ohashi T. Metabolomic profiling of Pompe disease-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals that oxidative stress is associated with cardiac and skeletal muscle pathology. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(1): 31-9.
- 8) Limkul J, Iizuka S, Sato Y, Masaki R, Ohashi T, Ohashi T, Fujiyama K. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnol J* 2016; 14(8): 1682-94.

- 9) Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, Sunder-Plassmann G, Koeller D, Koeller K, Vockley G, Hamazaki T, Lachmann R, Ohashi T, Olivetto I, Sakai, N, Deegan P, Dimmock D, Eyskens F, Germain DP, Goker-Alpan O, Hachulla E, Jovanovic, A, Lourenco CM, Narita I, Thomas M, Wilcox WR, Bichet DG, Schiffmann R, Ludington E, Viereck C, Kirk J, Yu J, Johnson F, Boudes P, Benjamin ER, Lockhart DJ, Barlow, C, Skuban N, Castelli JP, Barth J, Feldt-Rasmussen U. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III AT-TRACT study. *J Med Genet* 2017; 54(4): 288-96. Epub 2016 Nov 10.
- 10) Kopajtich R, Murayama K, Janecke AR, Haack TB, Breuer M, Knisely AS, Harting I, Ohashi T, Okazaki Y, Watanabe D, Tokuzawa Y, Kotzaeridou U, Kölker S, Sauer S, Carl M, Straub S, Entenmann A, Gizewski E, Feichtinger RG, Mayr JA, Lackner K, Strom TM, Meitinger T, Müller T, Ohtake A, Hoffmann GF, Prokisch H, Stauffer C. Biallelic IARS mutations cause growth retardation with prenatal onset, intellectual disability, muscular hypotonia, and infantile hepatopathy. *Am J Hum Genet* 2016; 99(2): 414-22.
- 11) Higuchi T, Kobayashi M, Ogata J, Kaneshiro E, Shimada Y, Kobayashi H, Eto Y, Maeda S, Ohtake A, Ida H, Ohashi T. Identification of cryptic novel  $\alpha$ -galactosidase a gene mutations: abnormal mRNA splicing and large deletions. *JIMD Rep* 2016; 30: 63-72.

## II. 総 説

- 1) 大橋十也。【専門外来とクリニックの連携（非在宅医療分野）】ライソゾーム蓄積症に対する酵素補充療法。東京小児医会報 2016; 35(1)28-32.
- 2) 大橋十也。【慢性疾患児の一生を診る】先天代謝異常症 ライソゾーム蓄積症 Fabry 病を中心に。小児内科 2016; 48(10): 1427-30.
- 3) 大橋十也。【Fabry 病診断・治療の進歩と今後】Fabry 病の診断の進歩と今後。腎高血圧の最新治療 2016; 5(4): 155-60.
- 4) 大橋十也。【小児疾患診療のための病態生理 3 改訂第 5 版】先天代謝異常 シアリドーシスとガラクトシアリドーシス。小児内科 2016; 48(増刊): 165-9.
- 5) 大橋十也。【今、着実に実り始めた遺伝子治療—最新研究と今後の展開】(第 3 章) 単一遺伝子の異常による遺伝性疾患と遺伝子治療 ライソゾーム蓄積症とペルオキシゾーム病。遺伝子医 MOOK 2016; 30: 134-40.

## III. 学会発表

- 1) 大橋十也。ライソゾーム病の治療の進歩—シャペロン、遺伝子治療の進歩—ライソゾーム病遺伝子治療—海外情勢。第 3 回市民公開フォーラム（厚生労働省難治性疾患克服研究事業ライソゾーム病（ファブリ病含む）に関する調査研究班）。東京、1 月。
- 2) 大橋十也。（シンポジウム 14：小児神経疾患に対する遺伝子治療の幕開け—AACD 欠損症を中心に—）神経疾患に対する遺伝子治療の現状。第 58 回日本小児学会学術集会。東京、6 月。
- 3) 大橋十也、佐藤洋平。（シンポジウム 3：疾患 iPS 細胞と創薬）ヒトボンベ病 iPS 細胞を用いた病態解明。第 37 回日本炎症性・再生医学会。京都、6 月。
- 4) Ohashi T.: Current treatment and gene therapy for lysosomal storage disease. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会。東京、7 月。
- 5) 大橋十也。（一般公開フォーラム）第 1 部：わかりやすい遺伝子治療の解説—遺伝性疾患の遺伝子治療—。第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会。東京、7 月。
- 6) Kobayashi H, Izuka S, Fukuda T, Iwamoto T, Morita A, Ariga M, Shimada Y, Higuchi T, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Lentiviral mediated gene therapy & zinc finger nuclease mediated gene editing for Krabbe disease. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会。東京、7 月。
- 7) Sato Y, Wada M, Wakabayashi T, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T. Ex vivo lentiviral gene therapy outperforms other conventional therapeutic strategies in murine model of mucopolysaccharidosis type II. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会。東京、7 月。
- 8) Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Ohashi T. (Poster) Treatment for Fabry peripheral neuropathy with adeno-associated virus vector in murine Fabry disease model. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会。東京、7 月。
- 9) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Yokoi T, Yokoi K, Fukuda T, Izuka S, Kobayashi H, Ishii M, Ida H, Ohashi T. (Poster) Bone marrow transplantation from heterozygous donor improve IDS deficiency in mucopolysaccharidosis type II mice. 2016 SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium. Rome, Sept.
- 10) Hoshina H, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T. (Poster) Sulfated disaccharides improve iduronate-2-sulfatase function in fibroblasts from patients with mucopolysaccharidosis type II. 2016 SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium. Rome, Sept.

- 11) Shimada Y, Fukuda T, Ishii N, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Ida H, Ohashi T. (Poster) Impact of bortezomib treatment on GAA function in missense murine model of Pompe disease. 2016 SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium. Rome, Sept.
- 12) 和田美穂, 嶋田洋太, 樋口 孝, 前田和洋, 齋藤 充, 井田博幸, 大橋十也, 小林博司. ムコ多糖Ⅱ型モデルマウスの骨病変の病理・分子生物学的検討. 第58回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 10月.
- 13) 保科宙生, 嶋田洋太, 樋口 孝, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也. (ポスター) ムコ多糖Ⅱ型患者細胞に対する硫酸化二糖類の治療効果の解析. 第58回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 10月.
- 14) 西村英理香, 嶋田洋太, 石井夏実, 樋口 孝, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也. (ポスター) ポンペ病に対する酵素安定化薬としてのゲラニルゲラニルアセトンの有効性の検討. 第58回日本先天代謝異常学会総会. 東京, 10月.
- 15) Shirai Y, Shiba H, Uwagawa T, Shimada Y, Horiuchi T, Saito N, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Ohashi T, and Yanaga K. Recombinant thrombomodulin suppresses tumor growth of pancreatic cancer by blocking thrombin-induced NF- $\kappa$ B activation. American College of Surgeons Clinical Congress 2016. Washington, D.C., Oct.
- 16) Saito N, Shirai Y, Horiuchi T, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. (Poster) Pomalidomide enhanced antitumor effect of gemcitabine and nab-paclitaxel for pancreatic cancer cells. American College of Surgeons Clinical Congress 2016. Washington, D.C., Oct.
- 17) Horiuchi T, Shiba H, Saito N, Sugano H, Shirai Y, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Mimoto R, Furukawa K, Uwagawa T, Yoshida K, Ohashi T, Yanaga K. (Quick shot presentation) Over expression of DYRK2 reduces viability of pancreatic cancer cells by activation of GSK3 signaling. 12th Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas, Feb.
- 18) Saito N, Shirai Y, Horiuchi T, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide enhanced antitumor effects of gemcitabine and nab-paclitaxel in pancreatic cancer cells. 12th Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas, Feb.
- 19) Saito N, Shirai Y, Horiuchi T, Sugano H, Iwase R, Haruki K, Fujiwara Y, Shiba H, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. (Quick shot presentation) Preoperative platelet-to-albumin ratio predicts outcome of patients with bile duct carcinoma. 12th Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas, Feb.
- 20) Sugano H, Shirai Y, Saito N, Horiuchi T, Shiba H, Eto K, Uwagawa T, Ohashi T, and Yanaga K. (Quick shot presentation) Inhibitor of NF- $\kappa$ B enhances the antitumor effect of radiation therapy in colorectal cancer. 12th Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas, Feb.

#### IV. 著 書

- 1) 大橋十也. B. 病因と病態 4. 分子生物学的病態. 衛藤義勝, 井田博幸責任編集, 大橋十也, 奥山虎之(国立成育医療研究センター), 酒井規夫(大阪大), 高柳正樹(帝京大), 成田 綾<sup>1)</sup>, 難波栄二<sup>1)</sup>(<sup>1</sup>鳥取大)編. ゴーシェ病 Up Date. 東京: 診断と治療社, 2016. p.23-4.
- 2) 大橋十也. E. 治療 5. 遺伝子治療. 衛藤義勝, 井田博幸責任編集, 大橋十也, 奥山虎之(国立成育医療研究センター), 酒井規夫(大阪大), 高柳正樹(帝京大), 成田 綾<sup>1)</sup>, 難波栄二<sup>1)</sup>(<sup>1</sup>鳥取大)編. ゴーシェ病 Up Date. 東京: 診断と治療社, 2016. p.116-9.

#### V. その他

- 1) 大橋十也. シリーズ遺伝相談: 総論編⑫ 遺伝子治療の最前線. 家族と健康 2016; 744: 6.
- 2) 大橋十也. 第8回慈恵医大・上智大学ジョイントシンポジウム, The JIKEI 2016; 27: 33.
- 3) 大橋十也. 希少・難治性疾患特集 テーマ1: 早期発見・治療の最前線 ライソゾーム病(ファブリー病). Med Tribune 2016; 49(9): 18.