

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

本研究部では引き続きライソゾーム病, 癌などを対象に遺伝子治療を中心とした新規治療法の開発を行った。今年度は特にムコ多糖症 II 型 (MPS II) に対する治療法の開発は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 実用化事業の資金を 2 つ獲得できたので, 非臨床の POC を獲得するための事業が開始された。以下その成果を記載する。

I. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

MPS II は Iduronate 2-sulfatase (IDS) の欠損によりグリコサミノグリカンが脳, 骨, 心臓などの組織に蓄積する疾患である。現在欠損酵素を補充する酵素補充療法が行なわれているが, 脳への効果がない, 骨への効果が限定的である, 永続的な繰り返しの投与が必要など問題点も多い。自己由来の造血幹細胞に IDS 遺伝子を組込んだレンチウイルスベクターを感染導入し患者自身に戻す ex-vivo gene therapy のモデルとしてモデルマウスを用いた研究で, 中枢神経機能の改善効果を示したが (Wakabayashi T, et al. Hum Gene Ther 2015) 同じ方法で骨系統組織の改善度を整形外科と共同研究している。モデルマウスの未治療群と治療群で骨密度, 海綿骨病理における骨梁数, 破断エネルギーに差があることに加え, 放射線前処置の影響因子も検討した。また非悪性疾患である MPS II に遺伝治療の際に抗癌剤, 致死量放射線性照射などを行なう事は, 本治療法の欠点ともいえる。そのため抗 c-Kit 抗体による前処置法なども検討し, 現在その有用性を検討している。

また, 最初に述べた様に, AMED の資金を得て上記遺伝子治療法の実用化研究を行っている。初年

度はまず幾つかのレンチウイルスベクターを作成し, ベクターの最適化を行なった。

クラッペ病では欠損酵素 galactosylceramidase (GALC) を組込んだレンチウイルスを新生児マウスに投与し, 発症時期, 末梢・中枢神経における病理, 寿命, 基質蓄積, 酵素活性において改善効果を見ている。更に基質合成阻害剤の皮下注射を併用することで相乗効果が確認されている。

II. ヒト由来細胞が移植可能な新規 MPS モデルマウスの作製

前述のように, これまで我々は, 造血幹細胞を標的とした MPS II の遺伝子治療研究を進めてきたが, 同治療の臨床応用を実現するためにはヒト由来造血幹細胞を用いた検討が必須となる。しかしながら, ヒト細胞が移植可能な MPS II モデル動物は現在のところ存在しない。そこで本年度は, AMED の資金により, ヒト細胞の高い生着率が知られる重度の免疫不全マウス (NOG マウス) の IDS を欠損させた新たな MPS II モデルマウスの作製に取り組んだ。マウス IDS 遺伝子に対してガイド RNA を設計し CRISPR/Cas9 を用いて変異の導入を行ったところ, IDS 酵素活性の低下した NOG マウスが得られた。得られたマウスのゲノム DNA を解析した結果, IDS 遺伝子に欠失変異が導入されていることが確認された。また, 今回作製したマウスでは, IDS の基質であるグリコサミノグリカンの蓄積も認められた。以上から, ヒト造血幹細胞が移植可能な新たな MPS II モデルマウスが樹立された。

III. AAV ベクターを用いたファブリー病末梢神経症状の治療

ファブリー病は α ガラクトシダーゼ A (GLA) 遺伝子の変異によって生じる単一遺伝子病である。この酵素の欠質により細胞内にグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が蓄積して症状が発現する。我々はファブリー病の代表的な症状である末梢神経障害 (灼熱痛) に着目して解析した。ファブリー病患者の後根神経節 (DRG) には Gb3 が過剰蓄積する事が知られているが末梢神経症状の発症メカニズムは

不明であり、GLA 酵素補充療法が確立しているが末梢神経症状への効果は限定的である。

今回 GLA 遺伝子搭載 AAV ベクターをファブリー病マウス脊髄液内に投与し、ファブリー病末梢神経症状の治療を試みた。DRG の GLA 酵素活性は遺伝子治療群 ($1,185 \pm 366 \text{ nmol/mg/h}$) で上昇した (未治療群: $2.5 \pm 0.2 \sim 15.2 \pm 0.2 \text{ nmol/mg/h}$, 正常マウス群: $145 \pm 7.0 \sim 171 \pm 4.5 \text{ nmol/mg/h}$)。Gb3 を測定すると遺伝子治療群は未治療群と比べ蓄積 Gb3 が約 40% 減少した。ホットプレート試験を行うと予想に反しモデルマウスは高温感覚に鈍麻症状 (未治療群潜時: $15.40 \pm 1.74 \text{ sec}$, 正常マウス群潜時: $10.45 \pm 0.20 \text{ sec}$) を示したが、遺伝子治療すると回復した ($12.12 \pm 0.64 \text{ sec}$)。

ファブリー病マウス脊髄液内への GLA 遺伝子搭載 AAV ベクター投与により DRG の GLA 活性が上昇し Gb3 の蓄積が抑制されたことで、温度感覚鈍麻症状が回復したと考えられた。今回このモデルマウスではファブリー病患者の灼熱痛症状を再現できなかったが、GLA 遺伝子搭載 AAV ベクターの髄液内投与法はファブリー病末梢神経症状の治療法として期待できる。

VI. AAV9 型ベクターを用いた MPSII 型の遺伝子治療

他の AMED の資金を得て、IDS を発現する組換え AAV9 型ベクターを開発し、MPSII 型のモデルマウスに経静脈的に投与した。血清中の IDS 酵素活性はワイルドタイプマウスの 100 倍以上の上昇していた。この活性の上昇は脳の蓄積物質を低下させるのに充分な量であり、また AAV9 型はもともと神経向性があるため脳への治療効果が期待出来る。現在、脳の蓄積物質の解析を行なっている。結果が良好であれば、特許申請、非臨床安全性試験に進む予定である。

V. 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ライソソーム酵素制御による新規遺伝子治療の検討

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、抗腫瘍剤耐性に NF- κ B の活性化が関与している事が報告されており、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、単剤または塩酸ゲムシタピン

(GEM)、GEM/S-1 療法、GEM/Nab-Paclitaxel 療法との併用療法、放射線療法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。さらに、サリドマイドの誘導体であるボマリドマイドや、DIC 治療薬であるリコンビナントトロンボモジュリンの NF- κ B の活性化阻害作用に着目し、膵臓癌において抗腫瘍剤と併用することで抗腫瘍効果を増強することを報告した。臨床の現場に於いても、切除不能膵臓癌に対する FUT175 併用 GEM の第 II 相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来た。

近年は、放射線療法により亢進する癌細胞の上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) において NF- κ B, STAT-3 の関与が知られており、直腸癌の術前化学放射線療法に NF- κ B 阻害剤を併用することで EMT 抑制作用を示すことを検討している。また、膵臓癌においてはオートファジーが亢進し、抗腫瘍剤抵抗性に関与していることが知られている。中でもライソソーム酵素遺伝子を抑制することで抗腫瘍剤の抗腫瘍効果を増強させることを検討し、新規遺伝子治療の開発を行っている

「点検・評価」

今年度は 2 つの AMED の資金を得て、MPSII のモデルマウスを用いて 2 つのベクターシステムを用いた非臨床 POC 獲得のための実験を行った。1 つは造血幹細胞を標的としたレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療であり、もう 1 つは AAV ベクターを用いての *in vivo* 遺伝子治療法である。両者とも AMED の遺伝子治療実用化事業であるため人への応用をめざしている。またレンチウイルスベクターに関しては実用化の目指すため特許申請も行った。以上は人への応用へのステップを確実に歩み始めたものであり、評価出来る。ただ特許などの関係で論文化を早期にする事は困難である点が問題であった。2 年後に本プロジェクトを終了し成果を挙げた場合には、非臨床安全性試験臨床試験を行う予定である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Saito N, Shirai Y, Uwagawa T, Horiuchi T, Sugano H, Haruki K, Shiba H, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide enhanced gemcitabine and nab-paclitaxel on pancreatic cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* 2018; 9(21): 15780-91.
- 2) Shirai Y, Saito N, Uwagawa T, Shiba H, Horiuchi T,

Iwase R, Haruki K, Ohashi T, Yanaga K. Pomalidomide promotes chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of NF- κ B. *Oncotarget* 2018; 9(20): 15292-301.

- 3) Hoshina H, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T. Chaperone effect of sulfated disaccharide from heparin on mutant iduronate-2-sulfatase in mucopolysaccharidosis type II. *Mol Genet Metab* 2018; 123(2): 118-22.
- 4) Sato Y, Ida H, Ohashi T. Anti-BlyS antibody reduces the immune reaction against enzyme and enhances the efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease model mice. *Clin Immunol* 2017; 178: 56-63.
- 5) Haruki K, Shiba H, Shimada Y, Shirai Y, Iwase R, Fujiwara Y, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Glycogen synthase kinase-3 β activity plays a key role in the antitumor effect of nafamostat mesilate in pancreatic cancer cells. *Ann Gastroenterol Surg* 2017; 2(1): 65-71.
- 6) 秋元智史¹⁾, 山田啓彦¹⁾, 高橋里奈¹⁾, 原 聡¹⁾, 中沢友幸¹⁾, 大日方薫¹⁾, 新井田要 (金沢医科大学), 大橋十也, 清水利明¹⁾ (¹ 順天堂大). A型インフルエンザ罹患後の急激な退行を契機に異染性白質ジストロフィー症の診断に至った2例. *小児科* 2017; 58(2): 203-7.

II. 総 説

- 1) 大橋十也. 【ゲノム情報と遺伝子治療- 遺伝子治療の最新動向-】 遺伝子治療の現状と課題 遺伝子治療の主な対象疾患 先天性代謝異常症. *日臨* 2017; 75(5): 705-11.
- 2) 大橋十也. 文学, 映画のなかの子どもの病気【第8回】エレファント・マン. *小児内科* 2017; 49(5): 759-61.
- 3) 大橋十也. 【実り始めた再生医療・遺伝子治療】序- 実り始めた再生医療と遺伝子治療. *小児内科* 2017; 49(7): 912-3.
- 4) 大橋十也. 【診療の「コツ」を伝える-先輩からのアドバイス】 コミュニケーションのコツ 家族歴の問診. *小児内科* 2017; 49(9): 1231-4.
- 5) 大橋十也. 【知って役立つ心筋症診療のポイント: 二次性心筋疾患のすべて】 ポンペ病. *成人病と生活習慣病*. 2017; 47(10): 1297-300.
- 6) 大橋十也. 【ライソゾーム病のすべて】 ライソゾーム病の最新治療の現状と展望 ライソゾーム病の遺伝子治療. *医のあゆみ* 2018; 264(9): 793-8.
- 7) 小林博司. 【ライソゾーム病のすべて】 白質ジストロフィーを呈するライソゾーム病 MLDとGLD. *医*

のあゆみ 2018; 264(9): 833-40.

III. 学会発表

- 1) 大橋十也. (シンポジウム: バーチャルファブリークリニック チーム医療とは) ファブリー病におけるチーム医療 “本学の取り組み”. 全国ファブリー病患者と家族の会 (ふくろうの会) 関東甲信越静岡ブロック会設立15周年特別企画 第19回東京シンポジウム 2017. 東京, 5月.
- 2) 大橋十也. ファブリー病の診断と治療. 大阪皮膚科セミナー~知っておきたい皮膚疾患~. 大阪, 6月.
- 3) 大橋十也. (特別講演) ライソゾーム病の新しい治療法. ファブリー病学術講演会. 新潟, 6月.
- 4) 大橋十也. (遺伝子治療シンポジウム: 遺伝子治療開発 (4) Metachromatic Leukodystrophy (MLD). 第2回神経代謝病研究会: 新しい神経代謝病の治療に向けて. 東京, 7月.
- 5) 大橋十也. MLD 遺伝子治療最前線. 異染性白質ジストロフィー患者家族の会 (MLD患者家族会). 東京, 8月.
- 6) 大橋十也. (シンポジウム2: 先天代謝異常症への遺伝子治療) 本邦における遺伝子治療の現状. 第59回日本先天代謝異常学会. 川越, 10月.
- 7) 大橋十也. (シンポジウム13: 遺伝子治療の進歩とゲノム編集) ライソゾーム蓄積症への遺伝子治療. 日本人類遺伝学会第62回大会. 神戸, 11月.
- 8) 大橋十也. (ランチョンセミナー8) ライソゾーム病の新しい治療法. 日本人類遺伝学会第62回大会. 神戸, 11月.
- 9) 大橋十也. I. ライソゾーム病の治療の進歩 3) ライソゾーム病遺伝子治療の進歩. 第4回市民公開フォーラム (厚生労働省難治性疾患等政策研究事業ライソゾーム病 (ファブリー病含む) に関する調査研究班主催). 東京, 1月.
- 10) Ohashi T. (Symposium 4: Gene Therapy for Inherited Metabolic Disease) Current status of gene therapy for inborn error of metabolism. The 8th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease. Tokyo, Jan.
- 11) Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Fukuda T, Kaburagi H¹⁾, Enomoto M¹⁾ (¹ Tokyo Med Dent Univ), Kato F, Ida H, Ohashi T. (Poster) Improvement of peripheral neuropathy in murine Fabry model by intrathecal administration of serotype 9 Adeno-associated virus vector expressing α -galactosidase A. The 23rd Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (JSGCT2017). Okayama, July.
- 12) Ohashi T, Narita I, Sakai N, Hamazaki T, Barth J, Lagast H, Skuban N, Yu J, Castelli J, Viereck C. Evi-

dence of mechanism of action of migalastat in the Japanese subgroup of the Phase 3 ATTRACT trial. 第59回日本先天代謝異常学会, 川越, 10月.

- 13) 嶋田洋太, 石井夏実, 保科宙生, 樋口 孝, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也. 広範なライソゾーム病に対する治療薬としてのテブレノンの可能性. 第59回日本先天代謝異常学会, 川越, 10月.
- 14) 櫻井 謙, 大橋十也, 徐 朱玟, 奥山虎之, 下澤信行, 井田博幸. 患者登録制度から判明した副腎白質ジストロフィーの臨床像とその課題. 第59回日本先天代謝異常学会, 川越, 10月.
- 15) 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. ムコ多糖症II型モデルマウスの骨病変に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の検討. 第59回日本先天代謝異常学会, 川越, 10月.
- 16) 樋口 孝, 嶋田洋太, 小林博司, 福田隆浩, 加藤総夫, 大橋十也. rAAVベクター脊髄液内投与によるファブリー病モデルマウス末梢神経症状の遺伝子治療. 第59回日本先天代謝異常学会, 川越, 10月.
- 17) 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. ムコ多糖症II型モデルマウスの骨病変に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の検討. 第22回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 10月.
- 18) 樋口 孝. hGLA cDNA 搭載 AAV ベクターを用いたファブリー病の遺伝子治療. 第2回 JSGCT (日本遺伝子細胞治療学会) 若手研究会セミナー. 東京, 12月.
- 19) Saito N, Uwagawa T, Shiba H, Hamura R, Takada N, Sugano H, Horiuchi T, Shirai Y, Ohashi T, Yanaga K. Prevention of early liver metastasis after pancreatectomy by NF- κ B inhibitor. 13th Annual Academic Surgical Congress (ASC) 2018. Jacksonville, Jan.

IV. 著 書

- 1) 大橋十也. VII. 最近のトピックス. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン作成委員会編. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 診療ガイドライン 2017. 東京: 診断と治療社, 2017. p.34-7.

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, 特に膵癌の診断と治療
(内科学講座(消化器・肝臓内科)より出向中)
 准教授: 赤崎 安晴 悪性脳腫瘍の診断と治療
(脳神経外科学講座より出向中)
 講師: 伊藤 正紀 分子生物学

教育・研究概要

I. 悪性神経膠腫に対する樹状細胞療法 of 標的抗原となる変異抗原 (neo-antigen) の探索と同定

悪性神経膠腫をはじめとする悪性脳腫瘍に対してはがんワクチンの客観的な有効性が示されている。その理論的裏付として、悪性脳腫瘍が2次リンパ組織のない頭蓋内で発生・進展し、頭蓋外への転移も希であることから、腫瘍の抗原性が生体の免疫系に認識されていない、または、されにくいという脳腫瘍独特の免疫的特性が関与していると考えられる。悪性脳腫瘍患者に対して頭蓋外で腫瘍抗原の vaccination がなされると、腫瘍抗原に感作されていないナイーブ T 細胞は活発な反応を呈し、脳腫瘍組織内に浸潤して腫瘍細胞に対する障害活性を發揮する。一方、頭蓋外で発生・進展する一般的な癌のような悪性腫瘍は、その抗原性が早期に免疫系に認識されるため、その後、免疫抑制機構が作動して、がんワクチンは有効となりにくい。

近年の免疫チェックポイント阻害療法から得られた多くの知見により、悪性腫瘍を退縮に導く T 細胞標的抗原は腫瘍細胞の遺伝子変異により発現する neo-antigen であることが強く示唆されている。われわれは、樹状細胞療法を受けた多形性膠芽腫 (GBM) 症例の腫瘍細胞の遺伝子発現を次世代シーケンサー (NGS) を用いて網羅的に解析した。また、無効群は有効群と比較して好中球の recruitment に関与するサイトカイン、ケモカイン遺伝子が高発現していることが明らかとなり、好中球は抗腫瘍免疫における中心的な効果細胞である細胞障害性 T 細胞の活性を抑制する事から、樹状細胞療法により neo-antigen に対する免疫が誘導されても、その後、腫瘍微小環境において好中球によりその活性が阻害されている可能性が示された。この点を考慮して、樹状細胞療法により neo-antigen に対する T 細胞免疫反応が誘導されたか否かを確認する目的で、治療前後の患者末梢血単核球の neo-antigen peptide