

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

教育・研究概要

教育面として大学院生に対し共通カリキュラムの一環として遺伝子操作の基本手技をグループ別に指導，学部生に対し医学英語専門文献抄読を指導，また研究室配属として6週間にわたり研究実技を指導した。研究面として研究室全体で取り組んでいるムコ多糖症Ⅱ型（MPSⅡ）の造血幹細胞（HSC）を標的とした遺伝子治療法の実用化研究はAMEDのステップ0最終年度として予算配分され，レンチウイルスベクター（LV）を用いた遺伝子導入によりモデルマウスでの有意な効果が確認され，特許申請。更に各自の研究はMPSⅡ，GM1ガングリオシドーシス（GM1），ファブリー病（FD）といったライソゾーム病，および悪性腫瘍をテーマに実施された。

I. ヒトHSCへの遺伝子導入

MPSⅡのHSCを標的とした遺伝子治療法の実用化研究では，タカラバイオ社に外注してMPSⅡの欠損酵素iduronate-2-sulfatase（IDS）を組み込んだ第三世代LVを作製しKG1a（急性骨髄性白血病由来リンパ球株）およびヒトCD34陽性細胞にin vitroにて遺伝子導入を行った。その結果，用量依存性にIDS酵素発現およびプロウイルスコピー数の有意な増加が見られた。また前臨床試験を見据え第三世代LVの作成材料となる各プラスミドの大腸菌マスターセルバンクもGMPレベルで作製した。

II. MPSⅡに対するex vivo HSC遺伝子治療法の開発

当研究室では第三世代SIN型LVをベースに，安全性を高めさらに搭載する遺伝子を高発現するLVを新規構築し，MPSⅡに対するex vivo遺伝子

治療法のツールの開発を行っている。具体的にはMNDプロモーターの下流にIDS遺伝子配列を搭載したLVを樹立した。このLVを用いてMPSⅡモデルマウスにex vivo遺伝子治療を行なった。その結果，末梢組織のみならずIDS酵素が到達しにくい脳においてもIDS活性の上昇効果とグリコサミノグリカン（GAG）蓄積の抑制効果が観られた。以上より新たに構築したLVはMPSⅡ ex vivo遺伝子治療法のツールとなり得る。

III. ヒト細胞を用いたMPSⅡモデルマウスへのHSC遺伝子治療

今年度は，LVにてヒトIDS遺伝子を導入したヒトCD34陽性HSCをNOG/MPSⅡマウスへ移植し，その効果について解析した。その結果，骨髄におけるヒトCD45陽性細胞の割合は通常のCD34陽性細胞移植群と差がなかった一方で，遺伝子治療群では複数の臓器において酵素活性やGAG蓄積の改善が認められた。以上より，我々の開発したIDS搭載LVで遺伝子治療したヒトCD34陽性細胞は生体への生着能・分化能を保持しており，その移植は治療効果をもたらし得ると考えられた。

IV. LVを用いたGM1の遺伝子治療法の開発

GM1は， β ガラクトシダーゼ（ β gal）の遺伝子異常のため， β galの活性が低下しGM1ガングリオシドの蓄積により中枢神経症状等を呈する疾患である。現在有効な治療法は存在せず，HSCを標的とした遺伝子治療法の開発を目指した。本年度はMNDプロモーターで β galを過剰発現するLVを構築し，GM1モデルマウスで治療効果を検討した。結果，治療群では血液中の β gal活性の顕著な上昇を認めた。また脳において未治療群と比較し β gal活性の上昇を認めたが，血液中ほどの酵素活性は得られず， β galの脳内輸送方法の再検討が必要であると思われた。

V. GM1モデルマウスの病理学的，行動学的検討

GM1モデルマウスでは脳でもGM1ガングリオシドが蓄積されることが報告されていたが，詳しい病

態については明らかになっていなかった。免疫染色を行い調べてみたところ、脳での免疫担当細胞であるミクログリアの細胞数が増加し、そのほとんど全てが活性化ミクログリアであった。またアストロサイトの発現も増加していたことから、脳内で炎症が起きている状態であることが分かった。また興味深いことに、記憶を司る領域である海馬にある神経幹細胞が著しく減少していることも明らかとなった。GM1 モデルの老齢マウスでは rotarod 試験において運動機能が低下していることが報告されているが、ある程度若いマウスでも運動機能の低下が見られ、脱髄が起きていることも示唆された。

VI. FD に対する HSC を標的とした遺伝子治療の新規前処置法の開発

FD は、X 連鎖性劣性遺伝形式をとるライソゾーム病であり α -ガラクトシダーゼ A の酵素活性の低下により、グロボトリアオシルセラミドを中心とした糖脂質が蓄積する病である。HSC を標的とした遺伝子治療の際、抗がん剤投与などによる前処置が必須となる為、より安全で同等の効果を持つ新規前処置法の開発を目指す。今回免疫ノトキシン（抗体と毒素の蛋白複合体）による前処置について評価を行った。WT マウスでの 6 ヶ月後の評価で $77.2 \pm 14.3\%$ の生着率、 $33.0 \pm 7.3\%$ のベクター導入率を認め前処置として有効であった。現在 FD モデルマウスを使用し更なる研究を進めている。

VII. FD の AI 研究

FD 男性患者末梢血より RNA を抽出し、外注の Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) システム（ダナフォーム社）を用いて転写開始点を網羅的に同定することによりプロモータ活性を測定。男性患者群を求心性心肥大の有無の 2 群で分けて有意なプロモータ活性の変化が見られた遺伝子群を同定し、心筋 MRI 画像、T1 マッピングなどの画像データ、血液検査データをコンピュータに入力し深層学習させることで、病原遺伝子以外の遺伝子環境の変化と心肥大・線維化との相関を解析し、FD 診断アルゴリズム作成を目指す。現在患者 24 名、正常 5 名の採血を終え RNA 抽出作業中であり、データ化および解析を漸次開始する。

VIII. 行政的研究

小児科学講座との共同で「厚生労働省難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）ライソゾーム病（ファブリ病含む）に関する調査研究」に

参加した。本研究部からは小林博司准教授、角皆季樹大学院生、そして大橋が参加した。主に診療ガイドラインの作成、疾患レジストリーの設立を行った。疾患レジストリーに関しては FD を中心に行い 100 例以上の登録が終了した。

IX. 難治性消化器癌に対する新規遺伝子治療の検討

近年、細胞内小器官の 1 つであるライソゾームがオートファジーなどの機構を介して癌細胞の増殖や生存に関与することが報告されている。ライソゾームは糖脂質代謝に関与する加水分解酵素を内包しており、これらを制御することが癌の新規治療法になり得ると考えた。難治性消化器癌の 1 つである膵臓癌の細胞株を用い、ライソゾーム酵素を欠損させることで抗腫瘍効果を得られるか、そしてその機序についての研究を行っている。また、細胞株での研究成果を踏まえ、マウスの皮下腫瘍モデルにおいて、ウイルスベクターによりライソゾーム酵素をノックダウンさせた際の抗腫瘍効果の検討を行っている。

「点検・評価」

今年度も引き続きライソゾーム病である MPS II、GM1、FD につき研究を行った。MPS II の HSC を標的とした LV を用いた遺伝子治療開発については AMED のステップ 0 の資金を得てマウスでの POC 取得した。また、LV でヒト HSC へ IDS 遺伝子導入、NOG/MPSII マウスへの移植でも臓器での IDS 活性の上昇、蓄積物質の軽減が認められ、ヒト細胞を用いた場合でもマウス細胞と同様に有効な治療効果が得られる事が判明した。以上より臨床応用を見据えて、タカラバイオ社と共同のもと半自動遺伝子導入装置である CliniMACS Prodigy（ミルテニー社（ドイツ））を購入し、培養ヒト細胞ならびにヒト血液単核球よりの CD34 陽性細胞の分離、Lv による IDS 遺伝子の導入などの一連のプロセスの自動処理を行った。その結果ヒト培養細胞、CD34 陽性細胞でのウイルスゲノムの検出ならびに IDS 遺伝子の発現を確認できた。これは非常に有望な結果であった。以上は評価できる点である。これをもとに AMED のステップ 1（非臨床試験）に応募したが残念ながら採択に至らなかった。最初のマウスでの POC を得たデータの表示が不十分である点が指摘されており、これを充実させて再度のチャレンジをする予定である。GM1 の HSC を標的とした遺伝子治療法の開発であるが、マウスの実験において脳を含む各臓器で β gal の活性の上昇を認めた。しかしながら、まだ定量は行っていないが免疫組織化学的

には脳に於いて有意な GM1 の減少が認められた。現在、企業との連携で血液脳関門通過型酵素の開発研究を行っており、この修飾酵素を発現するウイルスベクターを構築して同様の実験をする予定である。これは MPS II にも応用できる技術であり今後 GM1 と同時並行的に研究を行う。GM1 マウスの脳病変の特徴付けでは今後、GM1 に対する遺伝子治療の脳への効果を評価する上で非常に重要な研究である。結果、今まで言われていたアストログリオーシスなどの炎症性変化に加えて、それを裏付ける活性型ミクログリアの浸潤を明らかにした。それに加えて、神経幹細胞の減少、脱髄性の変化なども起きていることも明らかにした。これは新しい知見であり、非常に評価できる点であった。また、行動学的異常も一部明らかに出来たことは将来の遺伝子治療を見据えると非常に評価できる点であった。

我々の研究部では小児科学講座と協力のもと上記、基礎研究以外に「厚生労働省難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究」にも参画しており診療ガイドラインの策定、レジストリーの構築などにも大きく貢献した。引き続き行政的研究にも積極的にかかわる予定である。FD の AI 研究は、現在は患者検体を採取し終わる段階で、RNA 抽出を段階的に行っているが、10 例ほどデータ化が終了しており、RNA 抽出の量質はおおむね良好という評価を受けているが、CAGE 解析および AI 学習はこれからであり、進捗としてはやや遅れ気味と考えられる。今年は論文数が少なかった。現在投稿中のものもあるが、開発研究の場合、特許取得と発表とのバランスがあり悩むところであるが、どうしても特許申請を優先せざるおえない。事実上記の結果は特許申請中である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nojiri A, Anan I, Morimoto S, Kawai M, Sakuma T, Kobayashi M, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Eto Y, Shibata T, Yoshimura M, Hongo K. Clinical findings of gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance in Fabry patients. *J Cardiol* 2020; 75(1): 27-33.
- 2) Narita I, Ohashi T, Sakai N, Hamazaki T, Skuban N, Castelli JP, Lagast H, Barth JA. Efficacy and safety of migalastat in a Japanese population: a subgroup analysis of the ATTRACT study. *Clin Exp Nephrol* 2020; 24(2): 157-66.
- 3) Saito N, Uwagawa T, Hamura R, Takada N, Sugano H, Shirai Y, Shiba H, Ohashi T, Yanaga K. Prevention of early liver metastasis after pancreatotomy by perioperative administration of a nuclear factor- κ B inhibitor in mice. *Surgery* 2019; 166(6): 991-6.
- 4) Kobayashi M, Ohashi T, Kaneshiro E, Higuchi T, Ida H. Mutation spectrum of α -Galactosidase gene in Japanese patients with Fabry disease. *J Hum Genet* 2019; 64(7): 695-9.

II. 総説

- 1) 大橋十也. 話題のくすり ミガーラストット塩酸塩. *日病薬師会誌* 2019; 55(5): 563-6.
- 2) 大橋十也. 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. *臨神経* 2019; 59(6): 335-8.
- 3) 大橋十也. 【ライソゾーム病-最新情報と将来展望-】基礎研究 遺伝病の遺伝子治療. *日臨* 2019; 77(8): 1271-6.
- 4) Ohashi T. Gene therapy for lysosomal storage diseases and peroxisomal diseases. *J Hum Genet* 2019; 64(2): 139-43.
- 5) 大橋十也. 【いま、本格化する遺伝子治療 遺伝性疾患・がんと戦う新たな一手】(第2章) 造血幹細胞遺伝子治療 ライソゾーム蓄積症の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の進歩. *実験医* 2020; 38(2): 193-8.
- 6) 小林博司. 【ライソゾーム病-最新情報と将来展望-】治療の最新情報 クリニカルクエスチョン (CQ) ライソゾーム病の遺伝子治療 リスクと利点. *日臨* 2019; 77(8): 1344-51.

III. 学会発表

- 1) 大橋十也. (ランチョンセミナー22: 日常診療に潜在する「ファブリー病」) ファブリー病自験例とファブリー病に類似する疾患の症例提示. 第60回日本神経学会学術大会. 大阪, 5月.
- 2) Ohashi T. Gene therapy lysosomal storage disease. International Joint Conference on Genetics and Medicine. Seoul, June.
- 3) Kobayashi H. (Workshop VII) Juvenile onset type Pompe disease in Japanese Pompe disease. 第5回国際ライソゾーム病フォーラム. 東京, 6月.
- 4) Kobayashi H. (Symposium 2: Genetic Disorders) Gene therapy for inherited error of metabolism. 第25回日本遺伝子細胞治療学会 (JSGCT2019). 東京, 7月.
- 5) 大橋十也. (特別講演1) 先天代謝異常症に対する遺伝子治療の現状. 第61回日本先天代謝異常学会総会. 秋田, 10月.
- 6) 大橋十也. (学会賞受賞講演) ムコ多糖 II 型への遺伝子治療法の開発. 第61回日本先天代謝異常学会総会.

- 秋田, 10月.
- 7) 小林博司. (スポンサーシンポジウム: ライソゾーム病の診断 up-to-date) ライソゾーム病総論. 第61回日本先天代謝異常学会総会. 秋田, 10月.
- 8) Ohashi T. Current status of Japanese gene and cell therapy. International Forum on Regulatory Science for Advanced Therapy Medicinal Products (AT-MPs). Shanghai, Nov.
- 9) 大橋十也. (特別講演) 遺伝子治療の最前線～遺伝性疾患を中心に～. 第112回東海臨床遺伝・代謝談話会. 名古屋, 2月.
- 10) 大橋十也. Fabry 病の診断と治療. 東京 Web セミナー (大日本住友製薬会社). オンライン, 2月.
- 11) 小林博司. (ランチオンセミナー) ライソゾーム病の診断・治療における現状と進歩. 第4回 日本遺伝子細胞治療学会 若手研究会セミナー. 東京, 11月.
- 12) Higuchi T, Shimada Y, Kanegae Y, Fukuda T, Watabe A, Kobayashi H, Kato F, Ida H, Ohashi T. (Poster) Treatment for Murine Mucopolysaccharidosis Type ii model by ex vivo hematopoietic stem cells gene therapy with Lentivirus vector. 第25回日本遺伝子細胞治療学会 (JSGCT2019). 東京, 7月.
- 13) Higuchi T, Shimada Y, Kanegae Y, Fukuda T, Watabe A, Kobayashi H, Kato F, Ida H, Ohashi T. (Poster) Strong promotor is necessary to improve CNS disease of murine mucopolysaccharidosis type II in hematopoietic stem cell targeted gene therapy. SSIEM 2019: Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Rotterdam, Sept.
- 14) 角皆季樹, 作間未織, 森田麻子, 大橋十也, 井田博幸. (口頭) ファブリー病における ERT 開始時尿蛋白と腎機能予後の関連に関する検討. 第61回日本先天代謝異常学会総会. 秋田, 10月.
- 15) 樋口 孝, 嶋田洋太, 鐘ヶ江裕美, 福田隆浩, 渡部文子, 小林博司, 加藤総夫, 井田博幸, 大橋十也. (口頭) MPS II モデルマウスを用いたムコ多糖症 II 型 ex vivo 遺伝子治療法の開発. 第61回先天代謝異常学会総会. 秋田, 10月.
- 16) 嶋田洋太, 石井夏実, 樋口 孝, 小林博司, 井田博幸, 大橋十也. (口頭) 新たなムコ多糖症 II 型モデルマウスにおけるヒト造血幹細胞の生着性評価. 第61回先天代謝異常学会総会. 秋田, 10月.
- 17) 角皆季樹, 作間未織, 森田麻子, 大橋十也. (口頭) 慈恵ファブリーレジストリを用いたファブリー病における ERT 開始時尿蛋白と腎機能予後の関連に関する検討. 第33回日本小児脂質研究会. 熊本, 11月.
- 18) 羽村凌雅, 矢永勝彦, 白井祥睦, 谷谷智彦, 齊藤庸博, 嶋田洋太, 堀内 堯, 菅野 宏, 高田直樹, 鐘ヶ江裕美, 大橋十也, 大木隆生. (ポスター) 抗癌剤耐性膀胱におけるライソゾーム酵素の機能解析と遺伝子制御による塩酸ゲムシタピンの抗腫瘍効果増強の試み. 第119回日本外科学会定期学術集会. 大阪, 4月.
- 19) Hamura R, Shirai Y, Saito N, Taniai T, Shimada Y, Horiuchi T, Sugano H, Takada N, Kanegae Y, Ohashi T, Yanaga K. (Oral) Down-regulation of acid- α glucosidase induce antitumor effect via mitochondrial dysfunction in pancreatic cancer cell. 第78回日本癌学会総会. 京都, 9月.
- 20) Taniai T, Shirai Y, Hamura R, Horiuchi T, Saito N, Yanagaki M, Shimada Y, Takada N, Ohashi T, Yanaga K. (Poster) Inhibition of acid ceramidase enhances antitumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells. 第78回日本癌学会総会. 京都, 9月.