

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

AMEDの資金によるムコ多糖症Ⅱ型(MPSⅡ)の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法では最適なベクターの選択が出来た。別のAMEDの資金によるアデノ随伴ウイルスベクターを用いたMPSⅡの遺伝子治療法でも脳の蓄積物質が減少した。また新たな科研費によりGM1ガングリオシドーシスの遺伝子治療法やファブリー病のAIを用いた研究も開始された。

I. MPSⅡへの造血幹細胞遺伝子治療開発のまとめ

MPSⅡの遺伝子治療研究開発のため、ex-vivo gene therapyのモデルとして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レシピエントマウスに静注し遺伝子導入する方法で、末梢血で長期の酵素発現を実現し中枢の基質減少が見られたことを既に報告した(Wakabayashi T, et al. Hum Gene Ther 2015)。この成果をもとにAMEDステップ0としてベクターを第三世代に改変し、より臨床試験に近い形でモデルマウスに遺伝子治療を施し、中枢や骨など重要臓器のIDS活性の上昇と基質の低下、病理像の改善、さらに行動試験でも有意な効果が得られた。これらの成果に関して特許申請を行った。現在非臨床試験に移行するための準備が進んでおり、これらの結果を踏まえて治験を目指していく。

II. MPSⅡに対するex vivo造血幹細胞遺伝子治療法の開発

当研究室では第三世代SIN型レンチウイルスベクター(LV)を独自改良して安全性を高めたLVを構築し、MPSⅡに対するex vivo遺伝子治療法の

ツール開発を行った。プロモーター配列が異なる3種類のIDS搭載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、MNDプロモーター搭載LVは、末梢組織のみならず脳においても最もIDS活性上昇効果とGAGs蓄積抑制効果が高かった。以上より新たに構築したMNDプロモーター搭載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モデルマウスへの造血幹細胞遺伝子治療

今年度は、ヒトCD34⁺細胞へのLVによる遺伝子導入条件の検討、NOG-MPSⅡマウスへの同細胞の移植、細胞送達能を高めたIDSの開発を行った。CD34⁺細胞への遺伝子導入は、条件の最適化により従来法よりも約2.5倍高い導入効率を得られた。CD34⁺細胞を移植したマウスではヒトCD45⁺細胞の出現を確認しており、現在詳細な解析を進めている。IDSの改変については、トランスフェリン受容体に対する抗体を1本鎖化しIDSに融合させることで、高い細胞移行性を持つと共に遺伝子治療に応用可能なTfR-IDSの開発に成功した。

IV. MPSⅡ型の造血幹細胞を標的としたex vivo遺伝子治療法における前処置の検討

我々は既に、LVを用いたex vivo遺伝子治療がMPSⅡの中枢神経病変に対して一定の効果があることを報告した。その際に行われる前処置を、侵襲性の観点から3つの方法に分け(致死量放射線群/低線量放射線群/低線量放射線と抗cKit抗体の組み合わせ群)、中枢神経を含む臓器病変への効果を検討した。その結果、致死量放射線群のみが、中枢神経を含む各臓器の酵素活性、蓄積物質、ウイルスコピー数および認知機能全てにおいて有意な改善を認めた。よって、中枢神経病変の改善には強力な前処置による高い生着率が必要であると考えられた。

V. ファブリー病末梢神経症状の遺伝子治療

ファブリー病はGLA遺伝子の変異によって生じ

る遺伝子病で、細胞内に Gb3 が蓄積して症状が発現する。Gla 遺伝子搭載 AAV ベクターをファブリー病モデルマウスの脊髄液内に単回投与し、ファブリー病末梢神経症状の治療を試みた。治療 7 ヶ月後、遺伝子治療群後根神経節の Gla 活性値は正常群の 88% まで上昇した。52°C ホットプレート試験では、遺伝子治療群は末梢神経症状の改善が見られた（正常群 8.6 秒、未治療群 26.0 秒、遺伝子治療群 16.8 秒）。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. GM1 ガングリオシドーシスの遺伝子治療法の開発

GM1 ガングリオシドーシス (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、GM1 には治療法は存在しないため、造血幹細胞を標的とした遺伝治療法の開発をめざした。本年度は PGK プロモーターで β gal をド発現するレンチウイルスベクターを構築し、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療をモデルマウスで行った。結果、脳以外の臓器では活性の顕著な上昇と高いベクターコピー数が確認出来た。脳ではベクターコピーは検出されたが、末梢臓器ほど高い酵素活性は得られず、ベクターの再検討が必要と思われた。

VII. AAV9 型ベクターを用いた MPS II 型の遺伝子治療

AAV9 ベクターを用いた、より低侵襲で中枢神経病変に有効な遺伝子治療法の開発が望まれている。我々は IDS を発現する組み換え AAV9 ベクター 1.0×10^{11} vg/匹を、8 週齢の MPS II モデルマウスに経静脈的に投与した。血清中の IDS 酵素活性は治療後 4 週よりワイルドタイプの約 100 倍への上昇を認めた。治療後 16 週後には、各末梢臓器に加え大脳・小脳の細胞組織液においても、治療群は無治療群に比較し有意な IDS 活性の上昇と GAG 蓄積量の減少を認めた。現在、治療後の行動試験の解析を進めている。

VIII. MPS II 骨系統の遺伝子治療効果、クラッペ病の遺伝子治療、AI を用いたファブリー病のデータベース構築

整形外科科学講座との共同研究として MPS II マウスでの骨合併症を解析し、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、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療でそれらがより正常に近い状況を呈する効果が得られ、論文準備中である。

クラッペ病に対して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。

ファブリー病患者の血液を解析することで遺伝子変異以外の二次的な遺伝子変化の網羅的検索と血液生化学・脳 MRI などの画像解析結果との関連性を AI に深層学習させることによる新しい診断システムを目指したデータベースの構築を目指し倫理委員会に申請中である。

IX. 抗癌剤耐性消化器癌に対する新規遺伝子治療の検討

近年、細胞内小器官の一つであるライソソームの機能亢進が癌細胞において抗癌剤耐性に関与していることが示され注目されている。ライソソームはミトコンドリアなどの細胞内オルガネラを取り込み、これらを酸性条件下に酵素処理する重要な役割を担っている。抗癌剤に耐性を示す癌細胞においてはライソソーム機能が亢進していることが確認され、新たな治療標的として着目されている。我々はこのライソソームに含まれる加水分解酵素のうち種類の発現を抑制することで癌細胞のライソソーム機能不全を誘導し、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強する新たな治療戦略の検討を行っている。

「点検・評価」

メインテーマの MPS II の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の開発は順調に進み、ベクターの選択、特許申請が完了した。この結果により AMED より追加資金が獲得出来、非臨床試験用のウイルスベクターの作成が開始された。今年度は AMED より非臨床試験のための研究費公募があると予測されるため、これを獲得するのを目的する。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kobayashi H, Ariga M, Sato Y, Fujiwara M, Fukasawa N, Fukuda T, Takahashi H, Ikegami M, Kosuga M¹, Okuyama T¹ (1 Natl Ctr Child Health Development), Eto Y, Ida H. P-tau and subunit c mitochondrial ATP synthase accumulation in the central nervous system of a woman with Hurler-Scheie syndrome treated with enzyme replacement therapy for 12 years. JIMD Rep 2018; 41: 101-7.

- 2) Sakurai K, Ohashi T, Shimozawa N (Gifu Univ), Joo-hyun S¹⁾, Okuyama T¹⁾ (Natl Ctr Child Health Development), Ida H. Characteristics of Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy and concerns of their families from the 1st registry system. *Brain Dev* 2019 ; 4(1) : 50-6.
- 3) 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.
- 4) Hongo K, Ito K, Date T, Anan I, Inoue Y, Morimoto S, Ogawa K, Kawai M, Kobayashi H, Kobayashi M, Ida H, Ohashi T, Taniguchi I, Yoshimura M, Eto Y. The beneficial effects of long-term enzyme replacement therapy on cardiac involvement in Japanese Fabry patients. *Mol Genet Metab* 2018 ; 124(2) : 143-51.
- 5) Sugano H, Shirai Y, Horiuchi T, Saito N, Shimada Y, Eto K, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Nafamostat mesilate enhances the radiosensitivity and reduces the radiation-induced invasive ability of colorectal cancer cells. *Cancers (Basel)* 2018 ; 10(10) : E386.

II. 総 説

- 1) 大橋十也. 【小児の治療指針】代謝 ライソゾーム病 Anderson-Fabry 病. *小児診療* 2018 ; 81(増刊) : 550-2.
- 2) 大橋十也. 【小児診療ガイドラインの読み解き方ガイドラインの背景, 使い方を中心に】序-今回の企画について. *小児内科* 2018 ; 50(5) : 745.
- 3) 大橋十也. 【先端医療の現状と腎疾患への応用】先端医療の各論 遺伝子治療の現状. 腎と透析 2018 ; 85(1) : 31-5.
- 4) 大橋十也. ノーベル賞と小児疾患 (第6回) 1974年ノーベル生理学・医学賞 リソソーム, ベルオキシソームの発見 そしてオートファジーの名づけの親. *小児内科* 2018 ; 50(7) : 1167-70.
- 5) 大橋十也. ファブリー病. *ドクターサロン* 2018 ; 62(9月号) : 10-3.
- 6) Kobayashi H. Recent trends in mucopolysaccharidosis research. *J Hum Genet* 2019 ; 64(2) : 127-37.

III. 学会発表

- 1) 大橋十也. (教育セミナー3 : ファブリー病診療の実際と課題) ファブリー病の診断と治療. 第121回日本小児科学会学術集会. 福岡, 4月.
- 2) 大橋十也. (シンポジウム23 : 神経代謝疾患に対する治療戦略の展望) 白質ジストロフィーの治療戦略, 第60回日本小児神経学会学術集会. 千葉, 5月.
- 3) 大橋十也. 神経代謝病-遺伝子治療の最近のトピックス. 第3回神経代謝病研究会. 東京, 7月.
- 4) 大橋十也. ライソゾーム病の新規治療法の開発に向けて. 第4回慈恵医大・東京理科大学合同シンポジウム. 東京, 9月.
- 5) 大橋十也. (会長特別企画 ケースに学ぶ40 : キーワードで疑うファブリー病 (二次性心筋症)) ファブリー病とは. 第66回日本心臓病学会学術集会. 大阪, 9月.
- 6) Ohashi T. (Educational Session 2: Therapy of Genetic Disorders) Cell therapy for lysosomal storage disease. *International Joint Conference on Genetics and Medicine (IJCGM 2018)*. Seoul, Nov.
- 7) 大橋十也. (領域1 : 先端医療研究開発共同研究領域) ムコ多糖症II型の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療法の前臨床試験. 東京大学医科学研究所-千葉大学心筋医学研究センター国際共同利用・共同研究拠点事業平成30年度成果報告会. 東京, 3月.
- 8) 小林博司. 顔で疑う先天代謝異常症. 第14回日本先天代謝異常学会セミナー. 東京, 7月.
- 9) 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の検討. 第121回日本小児科学会学術集会. 福岡, 4月.
- 10) 斉藤庸博, 矢永勝彦, 宇和川匡, 羽村凌雅, 高田直樹, 菅野 宏, 柴 浩明, 大橋十也, 大木隆生. 脾臓癌術後早期の肝転移予防に関する研究. 第118回日本外科学会定期学術集会. 東京, 4月.
- 11) Miwa S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ohashi T. (Poster) Non-myeloablative conditioning regimen using an anti-c-kit Antibody for hematopoietic stem cell targeted gene therapy for a murine model of mucopolysaccharidosis Type II. *ASGCT 2018 (American Society of Gene and Cell Therapy 21st Annual Meeting)*. Chicago, May.
- 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の検討. 第4回日本骨免疫学会. 名護, 6月.
- 13) Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Fukuda T, Kato F, Ida H, Ohashi T. (Poster) Improvement of peripheral neuropathy by intrathecal administration of Adeno-associated virus vector expressing α -galactosidase A in murine Fabry model. 第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 東京, 7月.
- 14) Miwa S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ohashi T. Development of HSC mediated gene thera-

py using ACK2 as preconditioning. 第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京, 7月.

- 15) Miwa S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Muramatsu S¹⁾, Yamagata T¹⁾(¹Jichi Med Univ), Ohashi T. (Poster) Intravenous AAV9-mediated gene therapy ameliorates neuronal disease of mucopolysaccharidosis type II (MPS II). 26th Annual Congress of ESGCT (European Society of Gene and Cell Therapy). Lausanne, Oct.
- 16) 角皆季樹, 作間未織, 森田麻子, 大橋十也, 井田博幸. 慈恵ファブリー病レジストリを用いた日本人ファブリー病患者の5年間の追跡結果. 第60回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 11月.
- 17) 嶋田洋太, 石井夏美, 後藤元人, 樋口 孝, 小林博司, 大橋十也. ヒト造血幹細胞の移植が可能な新たなムコ多糖症II型モデルマウスの樹立. 第60回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 11月.
- 18) 樋口 孝. AAVベクターを用いたファブリー病末梢神経症状の遺伝子治療. 第3回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) Hamura R, Shirai Y, Saito N, Taniai T, Shimada Y, Horiuchi T, Sugano H, Takada N, Kanegae Y, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of lysosomal enzyme activity enhances antitumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells. 14th Annual Academic Surgical Congress (ASC). Houston, Feb.
- 20) Takada N, Sugano H, Shirai Y, Saito N, Hamura R, Taniai T, Shiba H, Eto K, Uwagawa T, Ohashi T, Yanaga K. Combination radiotherapy with NF- κ B inhibitor enhances the antitumor effect of gallbladder cancer. 14th Annual Academic Surgical Congress (ASC). Houston, Feb.

悪性腫瘍治療研究部

教授: 本間 定 腫瘍免疫学
 准教授: 赤崎 安晴 悪性脳腫瘍の診断と治療,
 樹状細胞ワクチン
(脳神経外科学講座より出向中)
 准教授: 小井戸薫雄 消化器病学, 膵癌, がんワクチン
(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: 鎌田 裕子 分子生物学

教育・研究概要

I. 大腸がんの予後予測因子としての血中可溶性OX40 (sOX40) の意義

OX40はT細胞表面に発現する共刺激分子の一種であり, 抗原提示細胞に発現するOX40 ligand (OX40L) と結合するとT細胞に活性化シグナルを送ることから, T細胞を介した抗腫瘍免疫の制御には極めて重要な分子である。また, OX40はT細胞表面からsheddingにより放出されることが知られており (sOX40), 腫瘍免疫を含む広範な免疫反応を修飾する可能性があり注目されている。sOX40測定のためのELISA系が確立されたことから, 大腸がん患者血中sOX40値を測定し, その臨床的特徴との相関を検討した。22例の進行大腸がん患者で検討すると, 血中sOX40は健常者に比較して有意に高値であり, CEA, CA19-9, CRP, sPD-L1とは正の相関関係を, 血中アルブミン値, 生存期間とは負の相関関係を示した。血中sOX40値は患者末梢血単核球(PBMC)の各種サイトカイン(インターフェロン- γ , IL-4, IL-6, IL-10)のmRNA発現量とは相関がなく, また, PD-1発現CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺細胞の頻度とも関連しなかった。しかし, 大腸がん患者の全生存期間とsOX40の関連を単変量解析, ならびに多変量解析を用いて検討すると, sOX40が150pg/mlより高値の症例は150pg/mlより低値の症例に比較して有意に全生存期間は短縮していた。sOX40は元来のOX40/OX40Lの反応を阻害することによりT細胞の活性化と抗腫瘍免疫反応を抑制し, その結果, sOX40高値は大腸がん患者の予後の不良に関連することが示唆された。

II. 人工抗原ワクチンを用いたWilms tumor 1 (WT1) 特異的細胞傷害性T細胞の誘導

ワクチンにはアジュバントが必須である。機能的な観点から, アジュバントは二つのカテゴリーに分