

## 臨床遺伝学公開シンポジウム 2019

### 「ファブリー病の病態・診断・治療を考える」

日時： 2019年12月20日(金) 13:00～17:40

場所： 明治薬科大学  
総合教育研究棟 フロネシス 8211 講義室

2019年12月20日

明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室



## 目次

臨床遺伝学公開シンポジウム 2019 開催に際して	1
プログラム	2
<b>講演</b>	
演題 1: ファブリー病の分子病態解明から診断・治療法開発へ 明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 櫻庭 均	3
演題 2: ファブリー病診断のアップデート 明治薬科大学 生体機能分析学研究室 月村 考宏	4
演題 3: ファブリー病のバイオマーカーを知っていますか？ 明治薬科大学 生体機能分析学研究室 兎川 忠靖	5
演題 4: 酵素補充療法を行った日本人ファブリー病患者さんの血漿 Lyso-Gb3 の変化と それに影響をおよぼす因子について検討しました 明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 志賀 智子	6
演題 5: 酵素補充療法を受けている日本人ファブリー病患者の抗体産生率と その影響について解析しています 明治薬科大学 生体機能分析学研究室 田山 裕也	7
演題 6: ファブリー病女性患者さんの尿中 Gb3 を解析しました 明治薬科大学 生体機能分析学研究室 生井 友里絵	8
演題 7: 我々の研究室におけるファブリー病の遺伝子診断について報告します 明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 武井 加奈子	9
演題 8: ファブリー病の iPS 細胞移植治療を目指しています 東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト 宮岡 佑一郎	10
演題 9: ファブリー病への Ex vivo Gene Therapy Macroencapsulation と Chimeric Antigen Receptor (CAR) の応用 京都府立医科大学大学院医学研究科人工臓器・心臓移植・再生医学 上 大介	11
演題 10: 新規ファブリー病補充酵素改変型 NAGA に対する分子動力学計算をおこなっています 北海道情報大学 医療情報学部 齋藤 静司	12
演題 11: モデル動物を利用したザンドホッフ病の病態解明に挑戦しています 明治薬科大学 薬理学研究室 小川 泰弘	13
演題 12: 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法の研究開発が進んでいます 徳島大学大学院 医歯薬学研究部創薬生命工学分野 伊藤 孝司	14



## 臨床遺伝学公開シンポジウム 2019 開催に際して

明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室  
教授 櫻庭 均

明治薬科大学に臨床遺伝学研究室が設立され、遺伝性難病の研究進展を目指して、成果の発表と討論のための「臨床遺伝学公開シンポジウム」を毎年開催させて頂くようになり、今年で10回目を迎えました。これまで、ささやかながら研究を継続出来たのは、皆様の御指導、御鞭撻の御蔭と、深く感謝致します。

節目である今回のシンポジウムでは、遺伝性難病の中でも、私たちが特に重要視しているファブリー病をターゲットとして、これまでの研究成果や情報を基に、改めて「ファブリー病の病態・診断・治療を考える」ことにしました。このシンポジウムを「真に診療に役立つファブリー病研究を進めるため、何をすべきか」、考える機会とすることが出来ればと思います。

また、本研究室の運営に多大なご支援を頂いている大日本住友製薬株式会社様とサノフィ・ジェンザイム様に感謝致します。

### 寄付講座 臨床遺伝学研究室 スタッフ

#### 臨床遺伝学

教授 櫻庭 均  
客員教授 伊藤 孝司  
千葉 靖典  
川島 育夫  
川村眞智子  
研究技術員 志賀 智子  
武井加奈子  
秘書 田中聖恵子  
経理 池田 範子

#### 生体機能分析学

教授 兎川 忠靖  
助教 月村 考宏



# 臨床遺伝学公開シンポジウム 2019 プログラム

## 「ファブリー病の病態・診断・治療を考える」

- 13:00-13:10 開会の辞  
挨拶（大学） 石井啓太郎（明治薬科大学 学長）  
挨拶（法人） 佐川 賢一（明治薬科大学 理事長）
- 13:10-13:40 ファブリー病の分子病態解明から診断・治療法開発へ  
明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 櫻庭 均
- 13:40-13:50 ファブリー病診断のアップデート  
明治薬科大学 生体機能分析学研究室 月村 考宏
- 13:50-14:15 ファブリー病のバイオマーカーを知っていますか？  
明治薬科大学 生体機能分析学研究室 兎川 忠靖
- 14:15-14:30 酵素補充療法を行った日本人ファブリー病患者さんの血漿 Lyso-Gb3  
の変化とそれに影響をおよぼす因子について検討しました  
明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 志賀 智子
- 14:30-14:45 酵素補充療法を受けている日本人ファブリー病患者の抗体産生率と  
その影響について解析しています  
明治薬科大学 生体機能分析学研究室 田山 裕也
- 14:45-14:55 休憩
- 15:55-15:10 ファブリー病女性患者さんの尿中 Gb3 を解析しました  
明治薬科大学 生体機能分析学研究室 生井 友里絵
- 15:10-15:25 我々の研究室におけるファブリー病の遺伝子診断について報告します  
明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室 武井 加奈子
- 15:25-15:50 ファブリー病の iPS 細胞移植治療を目指しています  
東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト 宮岡 佑一郎
- 15:50-16:15 ファブリー病への Ex vivo Gene Therapy  
Macroencapsulation と Chimeric Antigen Receptor (CAR) の応用  
京都府立医科大学大学院 人工臓器・心臓移植・再生医学 上 大介
- 16:15-16:40 新規ファブリー病補充酵素改変型 NAGA に対する分子動力学計算を  
おこなっています  
北海道情報大学 医療情報学部 齋藤 静司
- 16:40-17:05 モデル動物を利用したザンドホッフ病の病態解明に挑戦しています  
明治薬科大学 薬理学研究室 小川 泰弘
- 17:05-17:30 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法の研究開発  
が進んでいます  
徳島大学大学院 医歯薬学研究部創薬生命工学分野 伊藤 孝司
- 17:30-17:40 閉会の辞 櫻庭 均
- 17:40-19:00 懇親会 (厚生棟 1F 食堂)

## ファブリー病の分子病態解明から診断・治療法開発へ

櫻庭 均<sup>1</sup>、兎川忠靖<sup>2</sup>、月村考宏<sup>2</sup>、志賀智子<sup>1</sup>、武井加奈子<sup>1</sup>、齋藤静司<sup>3</sup>、大野一樹<sup>4</sup>、川島育夫<sup>1,5</sup>、田島陽一<sup>6</sup>

<sup>1</sup>明治薬科大学 臨床遺伝学、<sup>2</sup>明治薬科大学 生体機能分析学、<sup>3</sup>北海道情報大学 医療情報学部、<sup>4</sup>(株)カタリスト、<sup>5</sup>(公財)東京都医学総合研究所 生体膜、<sup>6</sup>(公財)東京都医学総合研究所 分子医療プロジェクト

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異に基づき、GLA 酵素活性が低下し、体内にグロボトリアオシルセラミド (Gb3) やそのリゾ体 (Lyso-Gb3) などの糖脂質が蓄積する遺伝病です。この疾患は、四肢疼痛、低汗症、被角血管腫、腎障害、心障害や脳血管障害などの症状を来し、厚労省の指定難病のひとつになっています。Gb3 や Lyso-Gb3 の蓄積により、直接的に、更に二次的な炎症、酸化ストレスやオートファジーの調節障害などを介して、細胞の機能不全や細胞死が起こると推測されます。しかし、その病態形成機構には不明な点が多く存在し、個々の症例の臨床像もいろいろです。ファブリー病の病態を知り、迅速で正確な診断を行い、適切な治療に繋げるためには、多方面からの解析が必要です。

例えば、R301Q は、1990 年に私たちが初めて同定した遺伝子変異ですが、当該遺伝子変異を持つ患者さんは、「遅発型ファブリー病」の臨床表現型を示しました。その後の解析で、この遺伝子変異は日本人ファブリー病の症例においてしばしば見られ、古典型から遅発型まで様々な臨床表現型をとり得ることがわかりました。そこで、当該遺伝子の発現、トランスジェニックマウスの作成や構造生物学的解析を含む様々な視点から研究を行い、R301Q-GLA では、酵素分子表面に中等度の構造変化が生じ (図)、生合成された GLA 変異体は酵素活性を有するものの、熱に不安定で、細胞内で過剰に分解されることを明らかにしました。その結果、この遺伝子変異を持つファブリー病患者さんの体内には、ごく少量の GLA が存在することになり、その酵素活性、酵素タンパク量や血漿中 Lyso-Gb3 濃度の値が、古典型群と遅発型群とが示す値の中間の値をとることが示されました。R301Q による特異的な分子病態が多様な臨床像の形成に関与すると思われる。

私たちは、多くの視点からのファブリー病症例の解析結果を利用し、診断システムと治療法の開発に努めています。

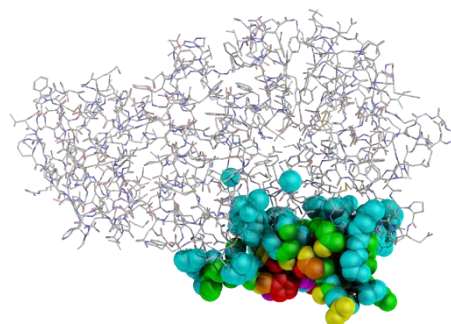


図. R301Q による分子の構造変化

GLA 分子の全体構造を「線」で、当該アミノ酸置換により、その位置が変化したアミノ酸残基の原子を变化の大きさに応じてカラーリングした「球」で示した。



## ファブリー病診断のアップデート

月村考宏<sup>1</sup>、兎川忠靖<sup>1</sup>、川島育夫<sup>2,3</sup>、池田範子<sup>3</sup>、志賀智子<sup>3</sup>、武井加奈子<sup>3</sup>、田中聖恵子<sup>3</sup>、櫻庭 均<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 明治薬科大学 生体機能分析学、<sup>2</sup> (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜、

<sup>3</sup> 明治薬科大学 臨床遺伝学

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異によって、その酵素活性が低下し、体内にグロボトリアオシルセラミド (Gb3) やグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が蓄積する X 染色体性の遺伝病です。櫻庭研究室では、2007 年より「ファブリー病診断のための解析システム」を構築し、男性のハイリスク・スクリーニング、症例の個別診断および家系診断を介したファブリー病診断研究を行ってきました。ファブリー病は多様な臨床症状をとるため、循環器内科、腎臓内科、神経内科、小児科、皮膚科、眼科といった様々な診療科から、幼児から 80 代迄と幅広い年齢の患者さんの診断や治療の評価の依頼を受けてきました。そして、今までに約 1 万人の患者さんを検査して、約 250 人(2007 年以前を含めると約 360 人)のファブリー病患者さんの解析に携わってきました。

今回は、ファブリー病の特徴である X 染色体性の遺伝病であること、臨床症状が多様なこと、遺伝子変異が多いことが診断を難しくしていることやトラブルシューティングを紹介しながら、櫻庭研究室で行っている診断システムを紹介したいと思います。また、「医療法等の一部を改正する法律」(平成 29 年法律第 57 号) の一部の施行に伴い、我々の解析結果は、ファブリー病の診断の際には「診断根拠」として利用出来なくなり、「参考」としてご利用いただくことになりましたので、その点についても皆さんと情報共有させていただきたいと思っています。

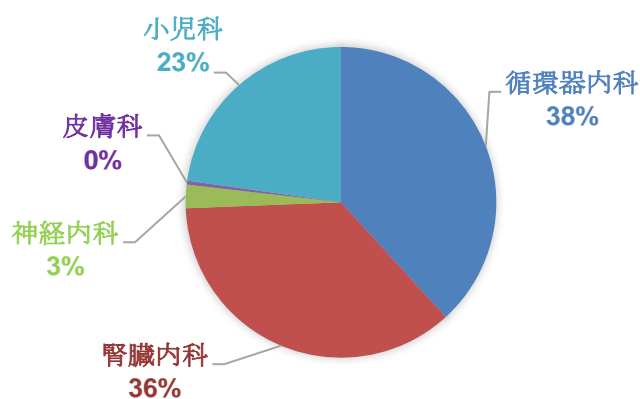


図. 2007 年以降に診断・解析を依頼してきた臨床科名

## ファブリー病のバイオマーカーを知っていますか？

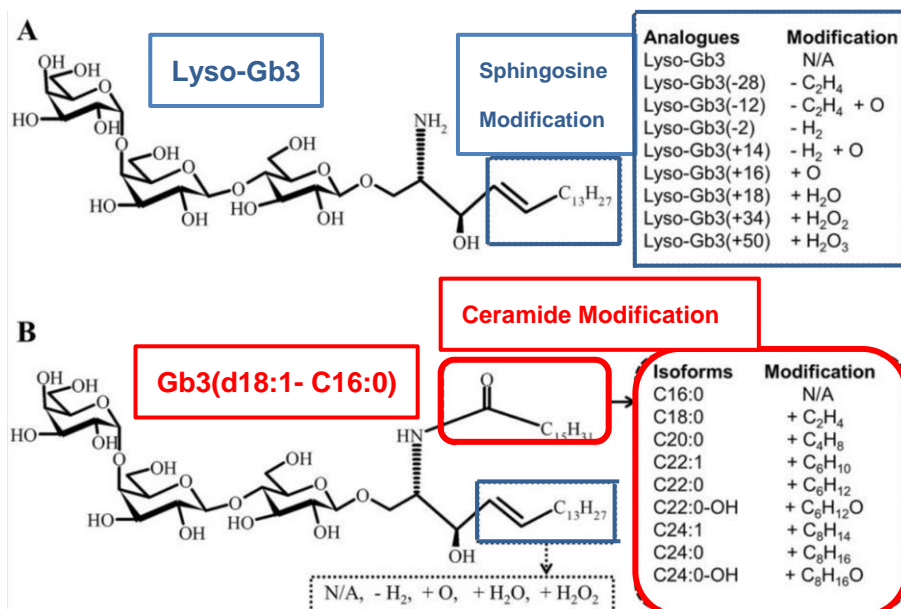
兎川忠靖<sup>1</sup>、月村考宏<sup>1</sup>、川島育夫<sup>2,3</sup>、志賀智子<sup>3</sup>、武井加奈子<sup>3</sup>、櫻庭 均<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 明治薬科大学 生体機能分析学、<sup>2</sup> (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜、

<sup>3</sup> 明治薬科大学 臨床遺伝学

希少疾患であるファブリー病にとって、蓄積した基質は診断の際の有力なバイオマーカーとなります。NIH（アメリカ国立衛生研究所）の研究グループは 1998 年に「バイオマーカーとは通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義づけています。ファブリー病の蓄積物質は古くから薄層クロマトグラフィーなどを利用して、糖や脂質の組成などについて多くのデータが集積されてきましたが、半定量的なデータである短所がありました。

蓄積物質がバイオマーカーとして広く認められるようになるのは、タンデム型質量分析計のついた LC-MS/MS が用いられ定量的な測定が出来るようになってからです。糖や糖脂質は適当な検出器がなく測定が難しかったのですが、エレクトロスプレーイオン化法が開発されて以来、高感度な定量が可能となり、用いる試料も微量化され、臨床試料への適用も容易になりました。ほぼ同時期に酵素補充療法が広がると、治療評価に適切なバイオマーカーの探索が行われました。オランダの Aerts 教授によるファブリー病患者における Lyso-Gb3 の報告以来、我々も LC-MS/MS を利用した多くの解析を行っています。



Lyso-Gb3 のアナログ (A) と Gb3 のアイソフォーム (B)

Sueoka らによる論文(PLOS ONE, DOI 10:1371, 2015)より

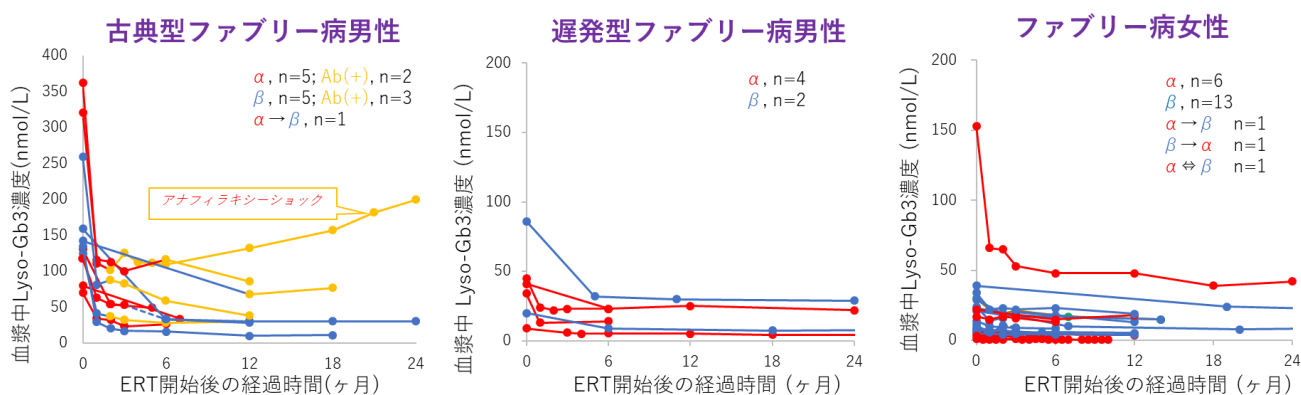
## 酵素補充療法を行った日本人ファブリー病患者さんの血漿 Lyso-Gb3 の変化と、それに影響をおよぼす因子について検討しました

志賀智子<sup>1</sup>、武井加奈子<sup>1</sup>、田山裕也<sup>2</sup>、月村考宏<sup>2</sup>、兎川忠靖<sup>2</sup>、櫻庭 均<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 明治薬科大学 臨床遺伝学、<sup>2</sup> 明治薬科大学 生体機能分析学

近年、ファブリー病の診断および治療効果判定のためのバイオマーカーとして、血漿グロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が有用であることが報告されています。今回は組換え  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) 酵素製剤を用いた酵素補充療法 (ERT) を行った日本人ファブリー病患者さんの血漿 Lyso-Gb3 濃度の変化と、それに影響を与える可能性がある因子 (臨床表現型、抗 GLA 抗体産生の有無、ERT に使用している組換え GLA 酵素製剤の種類) との関係について検討しました。

古典型男性患者さんではアガルシダーゼアルファ ( $\alpha$ ) およびアガルシダーゼベータ ( $\beta$ ) 使用群ともに治療開始前に著しく高い値を示した血漿中 Lyso-Gb3 が治療開始後には急速に低下しました。しかしこれらの患者さんのうち、 $\alpha$  使用者の 2/5 および  $\beta$  使用者の 3/5 において抗 GLA IgG 抗体が陽性になり、患者血清を用いた阻害試験では組換え GLA 酵素の活性を抑制しました。このためか、これらの患者さんでは治療開始後の血漿中 Lyso-Gb3 の減少度が抗体陰性の患者さんに比べて低かったり、治療により一旦低下した後の血漿中 Lyso-Gb3 が再上昇するなど、治療効果が減少したと考えられました。GLA 遺伝子解析の結果、これらの抗体陽性男性患者さん 5 人のうち、4 人にナンセンス変異が、1 人にスプライシング異常が同定されました。一方、遅発型男性患者さんおよび女性患者さんでは、 $\alpha$  および  $\beta$  使用群ともに、治療開始前に軽度から中等度の高値を示した血漿中 Lyso-Gb3 が治療開始後に緩やかに減少し、安定化しました。これらのグループの患者さんすべてにおいて抗体産生は見られず、患者血清による組換え GLA 酵素の活性抑制も見られませんでした。



## 酵素補充療法を受けている日本人ファブリー病患者の抗体産生率とその影響について解析しています

田山裕也<sup>1</sup>、志賀智子<sup>2</sup>、月村考宏<sup>1</sup>、兎川忠靖<sup>1</sup>、櫻庭 均<sup>2</sup>

<sup>1</sup>明治薬科大学 生体機能分析学、<sup>2</sup>明治薬科大学 臨床遺伝学

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性が欠損または機能低下することにより、体内に糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) やグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が蓄積する X 染色体性の遺伝病です。

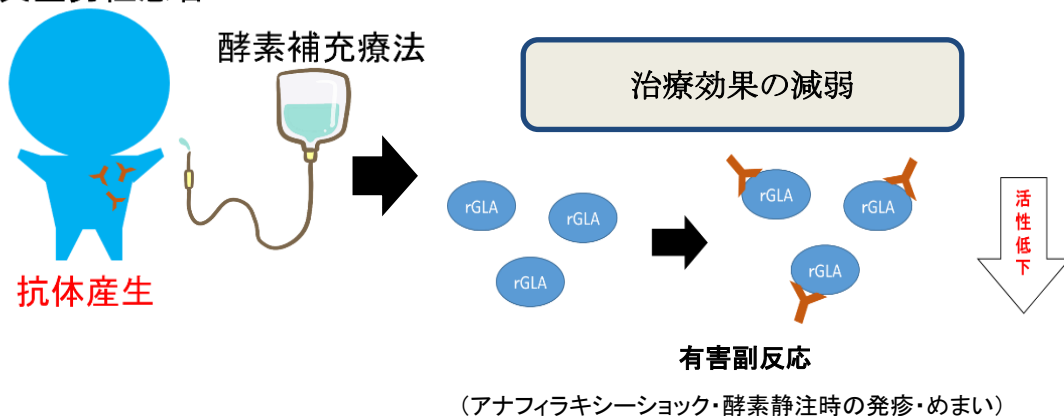
現在、酵素補充療法の有効性は認められていますが、組換え GLA の繰り返し投与により、一部の患者に GLA に対する抗体が産生され、治療効果が減弱することが報告されるようになってきました。

我々は、酵素補充療法を受けている日本人ファブリー病患者さんの抗 GLA 抗体の陽性率、抗体による GLA の活性阻害作用、血漿中 Lyso-Gb3 濃度の推移を解析しました。

抗体陽性となった患者さんは全例古典型男性患者で、古典型男性患者さんの約半数が抗体陽性を示しました。さらに抗体陽性患者さんの血清は、GLA 酵素活性を阻害することが示されたので、産生された抗体は中和抗体であることがわかりました。また、抗体陽性の患者さんでは、酵素補充療法により一度低下した血漿中 Lyso-Gb3 濃度が再上昇する、つまり治療効果が減弱されることが示唆されました。

抗体陽性となった古典型男性患者さんは、ナンセンス変異、スプライシング変異、欠失等の GLA 蛋白質を合成しない遺伝子変異を持っていたので、これらの遺伝子変異を持つ男性患者さんでは、酵素補充療法を行う上でより一層、注意が必要であると考えられます。

### 古典型男性患者



## ファブリー病女性患者さんの尿中 Gb3 を解析しました

生井友里絵<sup>1</sup>、志賀智子<sup>2</sup>、月村考宏<sup>1</sup>、兎川忠靖<sup>1</sup>、櫻庭 均<sup>2</sup>

<sup>1</sup>明治薬科大学 生体機能分析学、<sup>2</sup>明治薬科大学 臨床遺伝学

ファブリー病女性患者さんでは、X 染色体のランダムな不活化により、臨床試料中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A(GLA)活性が著しく低い方から非患者の活性値と区別出来ない方までいます。そのため、女性患者さんの診断においては、GLA 活性測定に加え、GLA 遺伝子、血漿 Lyso-Gb3 や尿中 Gb3 などの解析結果に基づく総合的判断が必要となる場合があります。

当研究室では、尿中 Gb3 の解析に、薄層クロマトグラフィー (TLC) と抗 Gb3 抗体を用いた免疫染色とを組み合わせた方法を利用してきました。TLC は特別な装置を必要とせず、測定費用も安価ですが、定量性が充分とは言えません。一方、タンデム MS は、定量性はありますが、操作が煩雑で高価な装置を必要とします。今回は、ファブリー病女性患者さんの尿中 Gb3 について、TLC 免疫染色による解析結果と、タンデム MS による測定結果とを比較検討しました。

TLC 免疫染色による解析の結果、女性患者さん 70 名中、23 名(33%)に尿中 Gb3 排泄増加 (Gb3 陽性)が認められました。TLC 免疫染色で判定した尿中 Gb3 陽性、偽陽性、および陰性の 3 グループを対象として、タンデム MS で解析した結果、尿中 Gb3 排泄量は、夫々、 $0.28 \pm 0.18$ (n=23)、 $0.06 \pm 0.07$ (n=8)および  $0.03 \pm 0.02$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  クレアチニン(n=39)と計算されました。これにより、TLC 免疫染色およびタンデム MS による尿中 Gb3 の解析結果には、相関性がみられることが示されました。

TLC 免疫染色は従来のオルシノール染色よりも特異的に Gb3 を検出することができるため診断に有用で、タンデム MS は定量性があるため治療経過を見る上で役立つと考えられました。

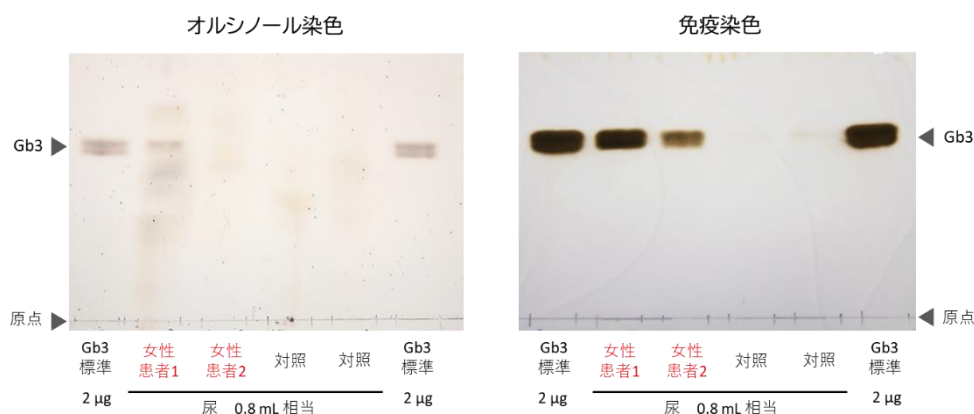


図. TLC を用いた尿中 Gb3 のクロマトグラム

## 我々の研究室におけるファブリー病の遺伝子診断について報告します

武井加奈子<sup>1</sup>、志賀智子<sup>1</sup>、月村考宏<sup>2</sup>、斉藤静司<sup>3</sup>、大野一樹<sup>4</sup>、兎川忠靖<sup>2</sup>、櫻庭 均<sup>1</sup>

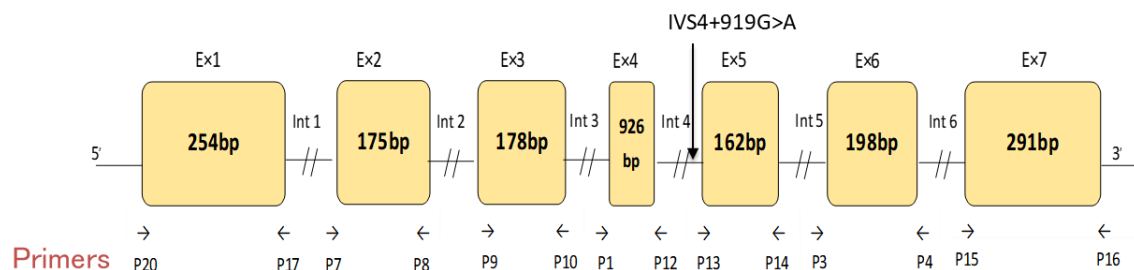
<sup>1</sup> 明治薬科大学 臨床遺伝学、<sup>2</sup> 明治薬科大学 生体機能分析学

<sup>3</sup> 北海道情報大学 医療情報学科、<sup>4</sup> (株) カタリスト

ファブリー病の疾患関連遺伝子である  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (*GLA*) 遺伝子は、約 12kb の長さで、ヒト X 染色体長腕の Xq22.1 の位置に存在することが知られています。この *GLA* 遺伝子により、31 個のアミノ酸から成るシグナルペプチド領域と 398 個のアミノ酸から成る酵素サブユニットから構成される *GLA* タンパク質が作られます。

ファブリー病の病態解明や診断においては、この *GLA* 遺伝子の解析が不可欠です。私たちの研究室では、全国の臨床施設からの依頼に応じて、これまで 200 例以上の日本人ファブリー病症例の *GLA* 遺伝子解析を行いました。方法は、*GLA* 遺伝子を構成する各イントロン/エクソン境界部分を含む 7 つのエクソン領域と特定のイントロン領域とのゲノム DNA を PCR で増幅した後に、その増幅産物の塩基配列を決定するものです。その結果、日本人ファブリー病症例の遺伝子変異の種類は多様で、ミスセンス変異が 56%、ナンセンス変異が 15%、部分欠失が 13%、スプライシング異常が 10%、遺伝子挿入が 1%、欠失/挿入が 1% を占めることが明らかになりました。また、この方法で変異が同定されなかったものが 4% ありました (いずれも、酵素活性、蓄積物質や病理所見などから、ファブリー病であることが示されています)。この解析により、日本人ファブリー病症例で多く見られる *GLA* 遺伝子変異や遺伝型/表現型の関係など、本症の臨床および基礎研究に役立つ多くの情報が得られています。これらの情報については、「ファブリー病データベース (<http://fabry-database.org/>)」で公開しています。

図. *GLA* 遺伝子の構造と PCR によるゲノム遺伝子増幅用プライマーの位置



## ファブリー病の iPS 細胞移植治療を目指しています

中島一徹、許 絲菌、宮岡佑一郎

(公財) 東京都医学総合研究所 再生医療

いかなる細胞種にも分化する能力を持つヒト iPS 細胞は、患者自身の細胞を使う自家移植や、免疫拒絶反応を起こしにくい遺伝的背景を持つ細胞を使う他家移植など、新たな細胞移植治療への道を切り拓きつつあります。さらに、近年発展しているゲノム編集技術によって、iPS 細胞のゲノム DNA 配列を改変することで、より多様かつ効率的な形での iPS 細胞移植治療が可能になると考えられます。

現在、ファブリー病の主な治療法は、精製 GLA タンパク質を投与する酵素補充療法ですが、高価な GLA タンパク質の定期的な投与を要すること、男性患者が GLA に対して免疫を形成し、しばしば治療抵抗性を生じること、という2つの問題を抱えています。これら2つの問題を同時に解決するために私達は、ゲノム編集により樹立する、改変型 NAGA を発現するヒト iPS 細胞移植治療を目指しています。改変型 NAGA は、櫻庭先生が開発された、NAGA の基質認識部位への変異導入による分子模倣を介して、NAGA の免疫原性を保ったまま、GLA 活性を有する改変型酵素です。

樹立する改変型 NAGA 発現 iPS 細胞の移植による治療効果を評価するには、ヒトの細胞を移植可能な動物モデルが必要です。そこで私達は、免疫不全マウス系統である NOD-SCID マウスの受精卵において、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を実施し、GLA 遺伝子の開始コドンを含む 28 塩基の欠失を持つマウス系統を樹立しました (左図)。この GLA 変異マウスの耳片からタンパク質を抽出し、その GLA 活性を人工蛍光基質により測定したところ、GLA 活性を欠損していることが確認できました (右図)。今後は、この NOD-SCID GLA ノックアウトマウスをファブリー病モデルとして、改変型 NAGA 発現 iPS 細胞移植の治療効果を評価していきます。患者の体内で GLA 活性を補う、改変型 NAGA 産生工場としての iPS 細胞移植が可能になれば、有効なファブリー病治療となります。

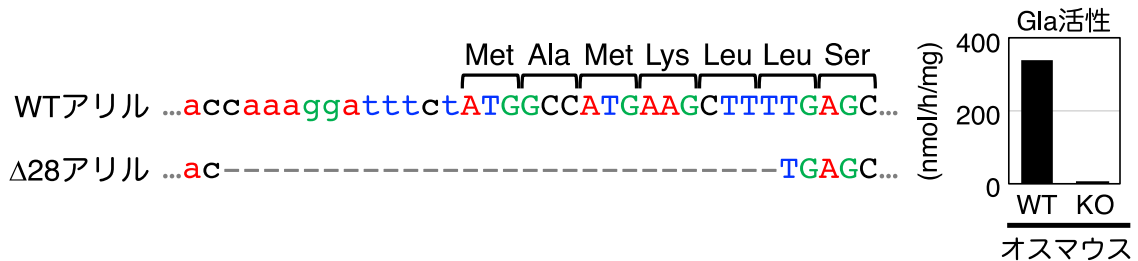


図. ゲノム編集によって作製した GLA の 28 塩基欠失アリルと変異マウス耳片の GLA 活性

## ファブリー病への Ex vivo Gene Therapy Macroencapsulation と Chimeric Antigen Receptor (CAR) の応用

上 大介、五條理志

京都府立医科大学 人工臓器・心臓移植再生医学講座

ファブリー病はライソゾーム内の  $\alpha$ -galactosidase (GLA)の酵素活性が低下し、細胞内の globotriaosylceramide (Gb3)の蓄積が原因となる病気である。現在、主な治療法は GLA 酵素製剤による酵素補充療法 (ERT) である。しかしながら、投与した酵素製剤は体外に急速に排出されるため、定期的な点滴加療が必要となる。また体内に多量の酵素を投与するため、投与した酵素製剤に対して自己中和抗体が産生され、自己免疫性疾患を引き起こす。そこで我々は Ex vivo Gene therapy による酵素補充療法の Alternative として新たな細胞移植療法と自己中和抗体を特異的に除去するキメラ受容体 (B cell Antibody Receptor: BAR) を導入した T 細胞 (BAR-T 細胞) の開発を並行して進めている。

細胞内で合成された GLA 酵素のマンノース-6-リン酸は 2 種類のマンノース-6-リン酸受容体 (MPR) が認識し、その大部分は細胞質のライソゾームへと Trafficking される。この MPR をノックアウトされた細胞はほとんどのライソゾーム酵素を細胞外に分泌する。線維芽細胞の 2 種類の MPR 遺伝子をノックアウトし、更に GLA 遺伝子を過剰発

現させたところ、細胞外に分泌される GLA 酵素量は通常の約 250 倍となった。さらにこの細胞を用いて、免疫隔離膜内に  $\mu$ -piece と細胞をミックスした CellSaic を Fabry マウスの皮下に移植したところ、細胞は 28 日後も膜内で生存しており、血液中の GLA 活性が有意に増加していた。

BAR-T 細胞は CAR-T システムを基本としており、T 細胞に抗原を認識する scFv ではなく、除去したい抗体の Ligand である抗原を TCR 細胞膜・細胞内ドメイン (CD3 $\zeta$  と 4-1BB、膜貫通ドメイン配列) を連結させ、膜表面に発現させたもの

である。GLA-BAR-T 細胞は抗 GLA Ab 産生 B 細胞によって認識され活性化し、Granzyme/Perforin を放出して抗 GLA Ab 産生 B 細胞を攻撃する。我々はこの仮説を実証するためにヒト T 細胞と抗 GLA 抗体を産出する標的細胞を作製し、*in vitro* における本システムの有効性を実証したところ、標的細胞数が減少した。今後は抗 GLA Ab 産生 Fabry マウスに対して、*in vivo* における有効性を検証していく。

以上の 2 つの結果より、Ex Vivo Gene Therapy はファブリー病を含めてライソゾーム病の現在の ERT の問題点を解決するポテンシャルは極めて大きいと考えている。

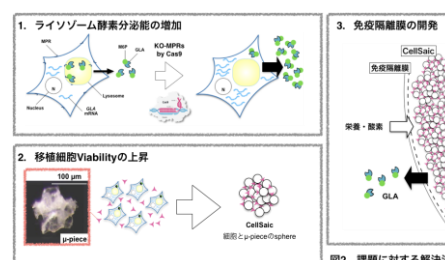
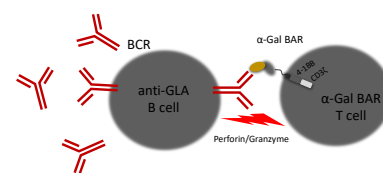


図2 課題に対する解決法





## 新規ファブリー病補充酵素改変型 NAGA に対する分子動力学計算をおこなっています

齋藤静司<sup>1</sup>、大野一樹<sup>2</sup>、櫻庭均<sup>3</sup>

<sup>1</sup>北海道情報大学 医療情報学部、<sup>2</sup>(株)カタリスト、<sup>3</sup>明治薬科大学 臨床遺伝学

Fabry 病は稀な遺伝病であり、責任遺伝子 *GLA* の変異によって引き起こされます。

この病気に対する有力な治療方法の一つとして酵素補充療法(enzyme replacement therapy ERT)という方法があります。これは、ヒトの *GLA* 遺伝子産物を直接薬として用いるものです。酵素補充療法は Fabry 病の治療法として有望なものであり、いくつかの酵素製剤が承認され利用されていますが、問題点もあることが知られています。

その一つは、繰り返し投与により一部の患者に酵素製剤に対する抗体が産生され、治療効果が阻害されることです。我々の研究グループでは、この問題に対処するため、*GLA* 類似の NAGA の変異体(改変型 NAGA)を補充酵素として用いることを提案しています。

今回の目的は、蛋白質の構造の観点から新規酵素の有用性についての知見を得ることです。そのため、NAGA 及び改変型 NAGA に *GLA* の基質を結合させ、分子動力学計算を行ってみました。

得られた MD trajectory を解析し基質との結合の様子について調べてみたところ、基質との結合様式は、改変型 NAGA のほうがより wild type (*GLA*)に近い傾向にあることがわかりました。

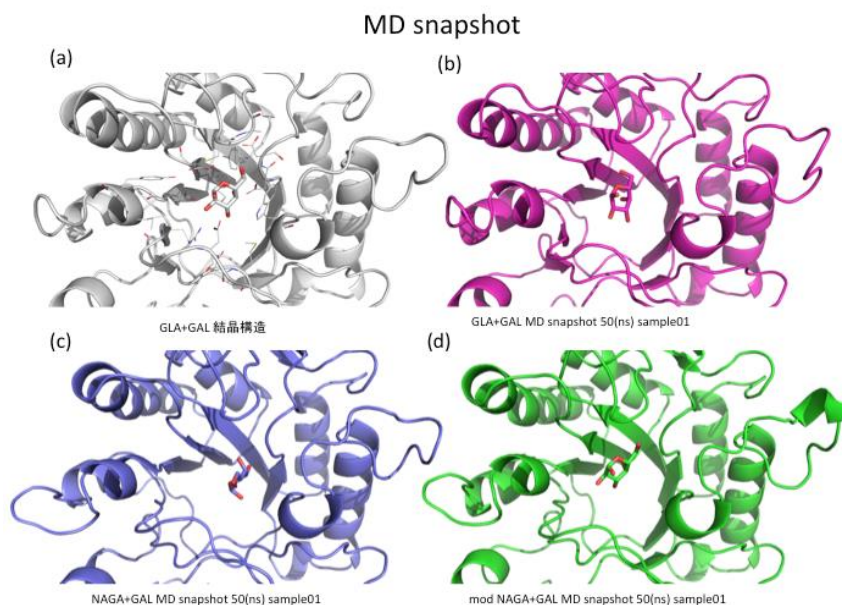


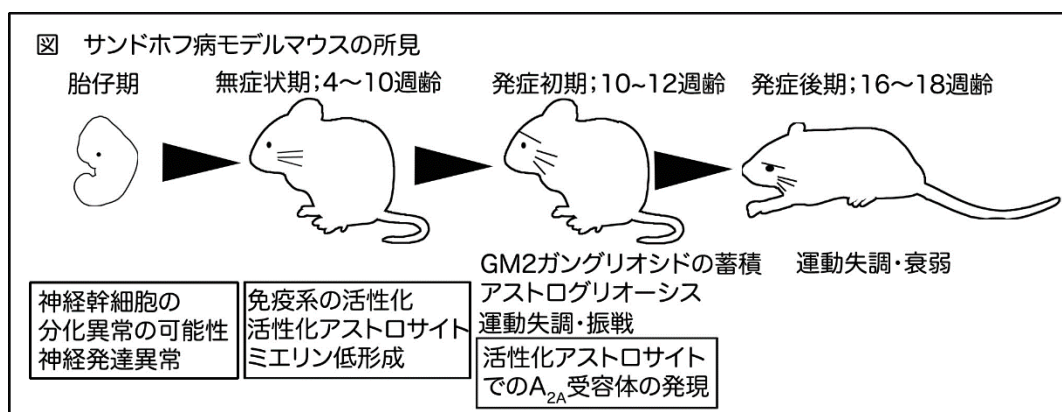
図. 分子動力学(MD)計算のスナップショット。(a) 結晶構造 (b)(マゼンタ)GLA+基質(GAL)の MD 計算 50(ns)経過後 (c)(青) NAGA+GAL MD (50ns) (d) 改変型 NAGA+GAL MD(50ns). (c) は基質の向きが結晶構造とは異なっており、この結合が不安定なことを示す。(d) は MD の間中安定して結晶構造と同様の構造を保っていることがわかる。

## モデル動物を利用したザンドホッフ病の病態解明に挑戦しています

小川泰弘<sup>1</sup>、櫻庭 均<sup>2</sup>、大石一彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>明治薬科大学 薬理学、<sup>2</sup>明治薬科大学 臨床遺伝学

ザンドホッフ病 (SD) は、*HEXB* 遺伝子の変異によりリソソーム酵素である  $\beta$ ヘキササミニダーゼの機能低下が起こり、その基質である GM2 ガングリオシドなどが分解されずに蓄積してしまう疾患です。主として神経系に GM2 ガングリオシドなどが蓄積するために、進行性の神経障害を起こします。その症状は、精神運動発達の遅延や退行、運動障害などの神経系障害の症状を呈しますが、そのメカニズムは不明な点が多く残っています。現在、SD の治療法として、*HEXB* 遺伝子を直接導入する遺伝子治療や、酵素を補充する方法が研究されています。私たちは、遺伝子治療や酵素補充療法以外の治療方法を探る目的で、SD モデル動物である *Hexb* 遺伝子欠損 (*Hexb*<sup>-/-</sup>) マウス及びそれに由来する iPS 細胞の解析を行ってきました。その結果、*Hexb* 遺伝子欠損マウス由来 iPS 細胞では、神経系への分化異常が見つかったため、*Hexb* 遺伝子欠損マウスの発生初期を詳細に解析したところ、大脳皮質神経細胞の発達の遅延が起こっていました。また、*Hexb* 遺伝子欠損マウス成獣脳において、運動機能の低下が見られる時期より、かなり早期からミクログリアやアストロサイトの活性化が観察されることが見つかりました。この早期からのミクログリアの活性化は、ミエリン低形成を誘発することを発見しました。さらに早期からの脳炎症を抑えることで運動機能の低下が改善すること、脳炎症が進行している時期においてアストロサイトにアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体が発現し、これを抑制することでも運動機能の低下が改善することを見いだしました。本発表では、私達の研究室で *Hexb* 遺伝子欠損マウスの解析により見つかった異常と新規治療標的としてのグリア細胞について紹介致します。



## 中枢神経症状を伴うライソゾーム病に対する遺伝子治療法の研究開発が進んでいます

伊藤孝司<sup>1</sup>、辻 大輔<sup>1</sup>、月本 準<sup>1</sup>、大西恭弥<sup>1</sup>、五百磐俊樹<sup>1</sup>、加守虹穂<sup>2</sup>、広川貴次<sup>3</sup>、村松慎一<sup>4</sup>

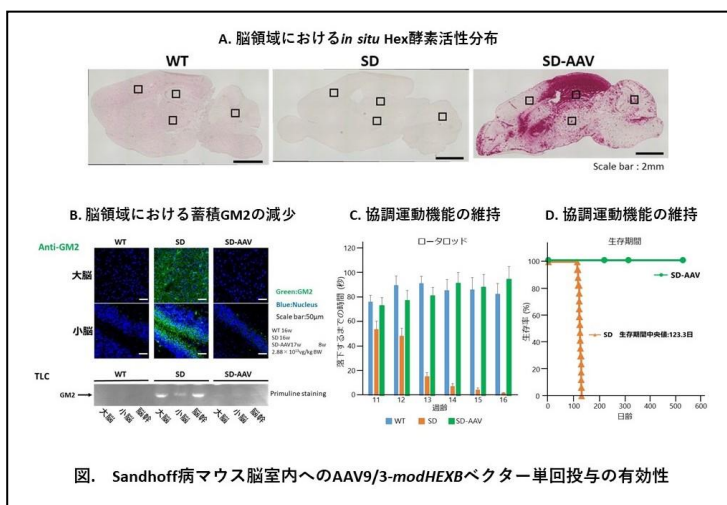
<sup>1</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）創薬生命工学分野、<sup>2</sup>徳島大学薬学部、

<sup>3</sup>産業技術総合研究所 創薬プロファイリング研究センター、<sup>4</sup>自治医科大学 神経内科

50 種を超える遺伝性ライソゾーム病症例の半数以上は中枢神経症状を発症します。しかし中枢症状を伴う疾患に対して有効な治療法は少なく、国内外では新規の治療薬や治療法の臨床応用が待望されています。テイ-サックス病 (TSD) とサンドホッフ病 (SD) は、リソゾーム酵素の  $\beta$ -ヘキササミニダーゼ A (HexA,  $\alpha\beta$ ヘテロダイマー) を構成する  $\alpha$  及び  $\beta$  鎖を各々コードする *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子の劣性変異により、基質である GM2 ガングリオシド (GM2) 分解活性の欠損、脳内 GM2 の過剰蓄積と進行性の中枢神経症状を伴って発症するライソゾーム病です。TSD は欧米のユダヤ人で多発することが知られていますが、日本でも 27 名 (2017 年時点) の TSD 患者が報告されています。しかし乳児期発症の重症例が多く、現在も根本治療法は確立されていません。

一方、近年、欧米では、神経難病に対するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いる *in vivo* 遺伝子治療法の臨床開発が急速に進んでおり、2018 年 11 月には、スイス Axovant 社と米国 UMass が共同開発した *HEXA* 及び *HEXB* を各々搭載した AAVrh8 ベクターを 1:1 の割合で、乳児型患者の脊髄腔内に単回投与するという、世界初の臨床試験が、また 2019 年 8 月から第 2 例目が開始されています。

私達は、治療用遺伝子として改変型 *HEXB* を単一で搭載した AAV9/3 ベクター (AAV9/3-*modHEXB*) を、自治医科大学との共同で開発し、SD マウスの脳室内に単回投与し、発現した改変型ヒト HexB による蓄積 GM2 の減少、運動機能の維持及び寿命 (16 週齢) の延長 (1 年以上) に成功しました。また非 GMP 基準 AAV9/3-*modHEXB* を正常カニクイザルの髄腔内への単回投与により、広範な脳脊髄領域の神経系細胞での改変型ヒト HexB の発現分布と安全性を示すことができ、現在、(株) 遺伝子治療研究所との共同で、国内初の TSD 患者に対する脊髄腔内遺伝子治療の実現に向け、非臨床安全性試験を進めています。



協力企業



## 交通・アクセス



### 徒歩の場合

- ・西武池袋線「秋津」駅下車 …… 約12分
- ・JR武蔵野線「新秋津」駅下車 …… 約17分

### タクシー利用の場合

- ・西武池袋線「清瀬」駅から …… 約10分
- ・JR武蔵野線「新秋津」駅から …… 約10分

(注)西武池袋線秋津駅には、タクシー乗り場はありません。

明治薬科大学 寄付講座 臨床遺伝学研究室

発行日 令和元年 12 月 20 日

発行元 明治薬科大学

〒204-8588

東京都清瀬市野塩 2-522-1

TEL: 042-495-8923 (ダイヤルイン)

TEL: 042-495-8611 (代表)