

平成 30 年 9 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09600

研究課題名(和文)免疫抑制を併用したライソゾーム蓄積症の効果的酵素補充療法の開発

研究課題名(英文)Development of efficient enzyme replacement therapy for lysosomal storage disease with immune modulation

研究代表者

大橋 十也(Ohashi, Toya)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60160595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム蓄積症(LSD)は遺伝的にライソゾーム酵素が欠損し、その基質が臓器に蓄積し、多岐に渡る症状を呈する疾患群である。治療法としては欠損酵素を補充する酵素補充療法(ERT)が行なわれているが、製剤に対する中和抗体の発生、BBBが存在するためLSDの主症状である脳障害への効果がない事が問題である。今回の研究結果として陽性の結果が出たのは(1)抗Blys抗体によりファブリー病のERTにおける免疫応答を抑制でき治療効果も増大させる事(2)BBBを通過可能な大量酵素の投与はムコ多糖症II型の脳の蓄積物質を減少させ、これに抗CD3抗体を投与すると免疫応答が抑えられる事、以上2点であった。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal storage disease (LSD) are characterized by genetic deficiency of lysosomal enzyme, resulting in accumulation of its substrate in various organ.

As a treatment, enzyme replacement therapy (ERT) is available. ERT is very efficient, but immune reaction against infused enzyme was occurred. This causes development of neutralizing antibody. ERT has another limitation, which is ineffectiveness to brain disease because of presence of BBB. To overcome these two problem, we tested various approach. The positive results were obtained following two experiment. (1)Anti-Blys antibody successfully reduce immune reaction of ERT on murine model of Fabry disease and increased efficacy of ERT. (2)Huge amount of enzyme administration reduced accumulated compound in brain from mucopolysaccharidosis type II mice without immune reaction against enzyme by anti-CD3 antibody administration.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：遺伝・先天異常 先天代謝異常症 酵素補充療法 免疫寛容 ライソゾーム病 抗体

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム蓄積症 (LSD) は遺伝的にライソゾーム酵素が欠損し、その基質が脳、骨、肝臓、脾臓、腎臓、脾臓、心臓など様々な組織に蓄積し、非常に多岐に渡る症状を呈する疾患群である。現在 40 疾患以上知られている。治療法としては欠損酵素を補充する酵素補充療法 (ERT) 造血幹細胞移植、基質の合成を阻害する基質合成阻害療法などが行なわれている。その中でも ERT は 9 疾患に対して行なわれており最も多くの LSD に対して行なわれている治療法である。基本的に ERT は何処の施設でも可能で安全性も高い。しかしながら他の蛋白製剤による治療法がそうであるように製剤に対する免疫応答がおき、中和抗体の発生、アレルギー反応などの問題点が生じる。幾つかの免疫寛容導入法が行なわれているが満足の行くものはない。ERT はまた血液脳関門 (BBB) が存在するため LSD の主症状である脳障害への効果がない事が問題である。

2. 研究の目的

(1) LSD の ERT において発生する酵素製剤に対する免疫応答を抑制する方法を開発する。今回は既に欧米では承認薬である抗 Blys 抗体 (米国では SLE に対して承認薬) による免疫寛容導入をファブリー病モデルマウスへの ERT において行なう。

(2) ERT は BBB があるため LSD の脳障害への効果はない。ただ大量の酵素製剤を使用すると酵素は BBB をある程度通過し蓄積物質を減少させる事が知られている。しかしながら大量に酵素を補充した場合は当然、より強い酵素製剤に対する免疫応答がおこる。よって免疫抑制療法を併用した大

量 ERT をムコ多糖症 II 型モデルマウスに行い脳の蓄積物質の減少度合いと抗体の発生度合いを検討する。

3. 研究の方法

(1) ファブリー病 ERT における抗 Blys 抗体による免疫応答抑制療法

ファブリー病モデルマウスは米国 NIH より供与された。抗 Blys 抗体は GSK 社より供与された。またファブリー病の酵素製剤である agalsidase beta はサノフィージエンザイム社より供与された。ERT を 2 週おきに合計 10 回行い、以下に示す、様々な方法で抗 Blys 抗体を投与した (表 1)。投与中の B 細胞の数を掲示的に測定し、また ERT 後の臓器での酵素活性、蓄積物質の測定を行なった。

表 1 介入プロトコール

Group1 post (Blys 100µg*2)										
	8w	10w	12w	14w	16w	18w	20w	22w	24w	26w
ERT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blys					●●					
FACS	Pre	1	2	3	4	5				
Group2/3 pre (Blys 100µg*2)										
	8w	10w	12w	14w	16w	18w	20w	22w	24w	26w
ERT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blys	●●									
FACS	Pre	1	2	3	4	5				
Group4/5 low dose maintenance (Blys 100µg*2+15µg q2wks)										
	8w	10w	12w	14w	16w	18w	20w	22w	24w	26w
ERT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blys	●●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
FACS	Pre	1	2	3	4	5				
Group6 moderate/high dose maintenance (Blys 100µg*2+30/60µg q2wks)										
	8w	10w	12w	14w	16w	18w	20w	22w	24w	26w
ERT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blys	●●	●●	●	●	●	●	●	●	●	●
FACS	Pre	1	2	3	4	5				

* FACS : B 細胞の数を検討

* Blys: 抗 Blys 抗体投与

Group 1: ERT 開始 8 週後 2 回、抗 Blys 抗体を投与した。

Group 2: 抗 Blys 抗体をを 2 回、ERT 開始前に投与した。

Group 3: 抗 Blys 抗体を 2 回 ERT 開始前に投与し、MTX を ERT 開始 4 8 時間後に投与した。

Group 4,5: 抗 Blys 抗体を 2 回 ERT 開始前に投与し、少量 (15 μ g) の抗 Blys 抗体を 2 週に一回投与した。

Group 6: 抗 Blys 抗体を 2 回 ERT 開始前に投与し、中等量(30 μ g)および大量(60 μ g)の抗 Blys 抗体を 2 週に一回投与した。

(2)ムコ多糖症 II 型マウスの脳を標的とした大量 ERT と抗 CD3 抗体による免疫抑制併用療法

ムコ多糖症 II 型モデルマウスは米国ノースキャロライナ大の Muenzer 博士より供与された。ムコ多糖症 II 型モデルマウスの脳への効果を目指し大量の ERT(20mg/kg 通常の 40 倍)を 1 週おきに 10 回投与した。また免疫応答を抑える為に ERT 開始前に抗 CD3 抗体を 5 日連続投与した。最終の ERT 後に酵素製剤に対する抗体価と脳の蓄積物質であるグリコサミノグリカンを測定した。

4. 研究の成果:

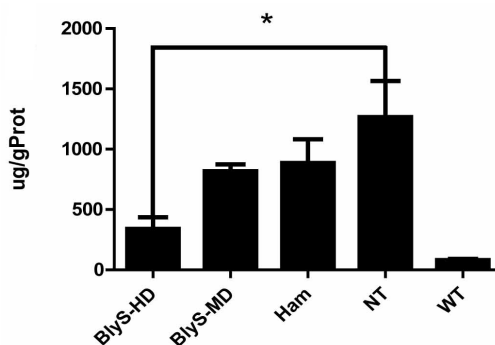
(1)ERT 中のファブリー病モデルマウスに対して、抗 Blys 抗体 100 μ g を 2 回投与したところ、一過性の B 細胞の減少および抗体価の減少が認められた。ERT 開始前に抗 Blys 抗体を投与した群では、ERT 開始後に投与した群に比較してより抗体価減少の期間がより長期間見られたが、最終的にはいずれの群でも抗体価の上昇が観察された。既存の免疫抑制剤との併用効果を検討するため、酵素補充に少量のメトトレキサート

を組み合わせたとこ、抗 Blys 抗体との併用によって長期間にわたり抗体産生を抑制することが可能であった。

さらに、抗 Blys 抗体を少量 (15 μ g) 持続投与したところ、長期間にわたり B 細胞の減少が見られたが、20%程度のマウスでは抗体価の上昇が抑えられたが、全体としての抗体価の上昇は抑制されなかった。そこで、強力な外来抗原に対して抗 Blys 抗体の作用が不足していると考え、中等量(30 μ g)および大量(60 μ g)を持続投与したところ、抗体価の上昇が抑制された。中等量および大量投与によって 50%程度のマウスで抗体価の上昇が抑制された。

抗体価の上昇が抑制されたマウスの臓器を解析したところ、腎臓での優れた酵素活性の上昇ならびに蓄積物質の減少が見られた。以上の結果より、抗 Blys 抗体の持続投与によって ERT 中の抗体価の上昇が抑制され、結果的に腎臓での ERT の効果が改善されることが示された (図 1)。

図 1 腎臓における蓄積物質

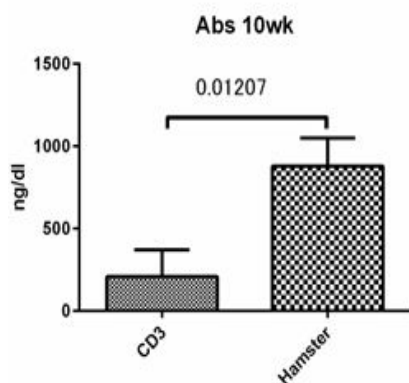


Blys-HD:抗 Blys 抗体大量継続投与
Blys-MD:抗 Blys 抗体中等量継続投与
Ham:Hamster IgG 投与
NT:免疫抑制なしファブリーマウス
WT:ワイルドタイプマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(2)大量の酵素補充療法をする事により脳のグリコサミノグリカンは減少し、また酵素製剤に対する抗体価は抗 CD3 抗体の投与により減少した(図2)。以上より大量酵素補充療法と抗 CD3 抗体併用療法はムコ多糖症 II 型の脳障害改善に有効である事が示唆された。

図2 ERT10 週後の酵素に対する抗体価



CD3:抗 CD3 抗体投与
Hamster:Hamster IgG 投与群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sato Y, Ida H, Ohashi T.

Anti-Blyx antibody reduces the immune reaction against enzyme and enhances the efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease model mice.

Clin Immunol. 2017 May;178:56-63

〔学会発表〕(計 1 件)

横井健太郎、横井貴之、嶋田洋太、樋口孝、小林博司、大橋十也、井田博幸

MPS II 型モデルマウスの脳病変における、免疫寛容導入併用大量酵素補充療法の効果
第 59 回日本先天代謝異常学会総会 川越

2017 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者 大橋 十也(OHASHI, Toya)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60160595

(2) 研究分担者 嶋田 洋太(SHIMADA, Yohta)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20560824

(3) 研究分担者 樋口 孝(HIGUCHI, Takashi)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30595327

(4) 研究分担者 小林 博司(KOBAYASHI, Hiroshi)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90266619

(5) 研究分担者 横井 健太郎(YOKOI, Kentaro)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20459655