

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591223
 研究課題名（和文） ライソゾーム病の酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫寛容誘導法の開発
 研究課題名（英文） Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases
 研究代表者
 衛藤 義勝 (ETO YOSHIKATSU)
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号：50056909

研究成果の概要：

ファブリー病は α -galactosidase A(GalA)の欠損により糖脂質などが蓄積する疾患である。酵素補充療法が行われているが、輸注された酵素に対する抗体が発生する。今回の検討で酵素補充療法を受けている FD 患者で発生する抗体は治療効果も阻害することが明らかとなった。そこで免疫寛容を導入するために組織特異的プロモーターにより Gal A を発現するレンチウイルスベクターを作成し FD モデルマウスに経静脈的に投与したところ、少なくとも肝臓、脾臓において Gal A の発現が長期間持続し免疫寛容が導入された可能性があると思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ファブリー病、酵素補充療法、遺伝子治療、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

現在、6つのライソゾーム病蓄積症に対して酵素補充療法が行われているが、輸注された酵素に対する抗体が発生し治療効果を阻害することが問題になっている。またライソゾーム病の遺伝子治療の場合も発現する酵素に対する抗体が発生したり遺伝子導入細胞に対して細胞障害性T細胞が発生したり、や

はり効果を阻害することが明らかとなっている。酵素補充療法、遺伝子治療法の効果を最大限発揮させるためにも免疫寛容の導入が重要な課題である。ファブリー病(FD)は α -galactosidase A(Gal A)が欠損するライソゾーム病で酵素補充療法が行われており、酵素補充療法中に発生する中和抗体が治療効果を阻害する可能性がある疾患の一つである。

2. 研究の目的

今回の研究はFDの酵素補充療法、ならびに遺伝子治療法において発生する酵素に対する免疫応答を抑制する治療法を開発することが目的であった。FDをそのモデルとして酵素補充療法中に生じる抗体の性状を検討すると共に組織特異性プロモーターを用いた遺伝子治療を行い免疫寛容の導入を試みた。組織特異的プロモーターとしてはクラスII陽性細胞で特異的に遺伝子を発現できるMHCIIプロモーターを用いた。これは先行する研究でMHCIIプロモーターを用いると発現蛋白に対する免疫寛容を導入できた事を示唆する実験結果があったためである。

3. 研究の方法

- 1) 抗体の性状ならびに臨床効果に対する影響に関する検討: FD酵素補充療法で出現するGal Aに対する抗体価(IgG)をELISA法にて測定した。またGal Aと血清を混ぜ酵素活性を測定することにより中和活性を測定した。次にGal Aと抗体陽性ならびに陰性患者血清を混和後、FD患者より樹立した培養皮膚線維芽細胞、ならびにFDモデルマウスに投与して細胞へのGal Aの取り込みに抗体が影響するか否かを検討した。
- 2) 抗体の臨床効果への影響: 実際に抗体が臨床効果に影響を与えるか否かを蓄積物質であるglobotriaosylceramide (GL-3)の尿中濃度を継時的にタンデムマスで測定した。
- 3) 組織特異的プロモーターを有する組換えレンチウイルスの作成ならびに特異性に関する検討: 組織特異的プロモーターを使用することにより発現蛋白に対して免疫寛容が導入されるか否かを検討した。今回は研究協力者が免疫寛容を導入できるプロモーターとして報告したMHCIIプロモーターを用いた(Kimura T et al. Mol Ther. 2007 Jul;15(7):1390-9)。本プロモーターはクラスII陽性細胞で特異的に蛋白質を発現させ、なおかつ発現蛋白に対する免疫寛容を導入すると報告されている。まずそれを確認するためMHCIIプロモーターでGFPを発現する組換えレンチウイルスとコントロールとしてCMVプロモータ

ーでGFPを発現する組換えレンチウイルスを作成した。特異性を検討するために2つの組換えレンチウイルスベクターをマウス(Balb/c)の骨髄細胞、クラスII陽性ならびに陰性細胞株に感染させその特異性をクラスII特異抗体を用いFACSにて検討した。

- 4) 組織特異的プロモーターを有する組換えレンチウイルスベクターのマウスへの投与: MHCIIプロモーターでGal Aを発現する組換えレンチウイルスとコントロールとしてCMVプロモーターでGal Aを発現する組換えレンチウイルスを作成した。同じタイターの上記2つの組換えレンチウイルスをFDモデルマウスに経静脈的に投与し、6,12,24週後にマウスより肝臓、脾臓、腎臓、心臓を採取、各臓器におけるGal A活性、およびPCR法,qPCR法にてウイルスゲノムの存在の有無を検討した。またTLC法にてGL-3の蓄積の度合いも検討した。

4. 研究成果

- 1) 抗体の性状ならびに臨床効果に対する影響に関する検討: ELISA法にてGal Aに対するIgG陽性患者の血清にはGal Aの活性を抑制する活性が認められ、この抑制活性は抗Gal A IgGの量と正の相関を示した。よって、このIgGには中和活性があることが判明した。また抗体価の高い患者血清とGal Aを混和後、培養細胞に加えると、抗体価の低い患者血清と混和した場合に比べ著明に細胞内へのGal Aの取り込みが抑制された。同様に抗体価の高い患者血清とGal Aを混和後、FDマウスモデルに静脈内投与すると抗体価の低い患者血清と混和した場合に比べ著明に組織内へのGal A取り込みが抑制された。以上より患者血清中に生じる抗体は酵素の細胞内への取り込みを著しく阻害することが判明した。
- 2) 抗体の臨床効果への影響: 合計14名のFD患者(抗体陽性7名、陰性7名)の尿中GL-3は抗体陽性者でその減少が抑制されていた。以上より抗体は臨床効果に影響を及ぼす可能性が示唆され

- た。
- 3) 組織特異的プロモーターを有する組換えレンチウイルスの作成ならびに特異性に関する検討: マウス骨髄細胞、クラスII陽性、陰性細胞株にMHCIIプロモーターを用いてGFPを発現させるとクラスII陽性細胞に特異的にGFPが発現しており、一方CMVプロモーターを用いた場合は、その様な特異性は認められなかった。よってMHCIIプロモーターはクラスII陽性細胞に特異的に遺伝子を発現させるプロモーターであることが判明した。
- 4) 組織特異的プロモーターを有する組換えレンチウイルスベクターのマウスへの投与: クラスII陽性細胞でGal Aを発現させた場合のみ肝臓ならびに脾臓で24週までGal Aの発現が認められた。一方CMVプロモーターを用いて発現させた場合は6週の時点で、どの臓器にも発現は認められなかった。PCR, qPCRによるウイルスゲノムの存在を検討したが酵素活性の結果と同様にMHCIIプロモーターを用いたときのみ肝臓、脾臓にウイルスゲノムが認められた。GL-3もMHCIIプロモーターを用いたときのみ肝臓、脾臓で低下していた。MHCIIプロモーターによる遺伝子の長期発現が得られたのが免疫寛容によるものか否かは研究期間中には明らかにできなかった。今後の課題であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ohashi T, Sakuma M, Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Eto Y. Influence of antibody formation on reduction of globotriaosylceramide (GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta therapy. Mol Genet Metab 2007;92:271-273
- ② Ohashi T, Iizuka S, Ida H, Eto Y. Reduced alpha-gal enzyme activity in Fabry fibroblast cells and Fabry mice tissues induced by serum from

antibody positive patients with Fabry disease. Mol Genet Metab 2008;94:313-31

[学会発表] (計 6 件)

- ① 衛藤義勝: New Strategy for the Treatment of Genetic Disease, The 24th International Congress of Pediatrics, 2007年9月1日, Athens, Greece,
- ② 衛藤義勝: ファブリ病の酵素治療の進歩, 第52回 日本人類遺伝学会, 2007年9月14日, 東京
- ③ 衛藤義勝: ファブリ病の最近の進歩, 東日本皮膚科学会, 2007年9月23日, 札幌
- ④ 衛藤義勝: ファブリ病の酵素補充療法—最近の進歩, 住友ファブリ病フォーラム, 2007年9月30日, 東京
- ⑤ 衛藤義勝: Current Status of Enzyme Replacement Therapy of LSD in Japan, International Symposium of LSD, 2007年11月29日, 舞浜
- ⑥ 衛藤義勝: ファブリ病の酵素補充療法—最近の進歩, 第28回 日本小児脂質研究会, 2007年12月8日, 東京

[図書] (計 1 件)

- ① 衛藤義勝: EBM神経疾患の治療, 2007-2008 中外医学社, 2007. 279-83

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

- 1) 研究代表者
衛藤 義勝 (ETO YOSHIKATSU)
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 5 0 0 5 6 9 0 9
- 2) 研究分担者
 小林 博司 (KOBAYASHI HIROSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・
講師
研究者番号：90266619

小林正久 (KOBAYASHI MASAHISA)
東京慈恵会医科大学・医学部・
助教
研究者番号：20312019

田嶋 朝子 (TAJIMA ASAKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・
助教
研究者番号：00328337

- 3) 連携研究者
なし