

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591333

研究課題名（和文） 抗CD3抗体によるライソゾーム病酵素補充療法における抗体出現の予防法の確立

研究課題名（英文） Anti-CD3 antibody induced immune tolerance to infused enzyme in enzyme replacement therapy for lysosomal storage disease

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（和文）：

ポンペ病 (PD) はライソゾーム蓄積症のひとつであり α -glucosidase (GAA) の欠損により心筋、骨格筋にグリコーゲンが蓄積し心肥大、筋力低下を起こす疾患である。酵素補充療法が開発されているが、ヒトおよび動物での研究でGAAに対する抗体が発生し治療効果を阻害することが報告されている。今回抗CD3抗体がワイルドタイプマウスにおいて抗体発生を抑制すること、既に存在する抗体を減弱させること、PDマウスにおいて抗体発生を予防するだけでなく致死のアナフィラキシーも予防することを明らかにした。またこの抗CD3抗体の作用ではCD4⁺CD25⁺細胞が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Animal and human studies of enzyme replacement therapy for Pompe disease have indicated that antibodies (Abs) generated against infused recombinant human α -glucosidase can have a negative impact on the therapeutic outcome and cause hypersensitivity reactions. We showed that parenteral administration of anti-CD3 Abs into mice can reduce the titer of anti-human α -glucosidase Abs in wild-type mice administered the enzyme. Mice that had been treated with anti-CD3 Abs and then subjected to a secondary challenge with α -glucosidase showed a lower increase in Ab titers than control mice. Moreover, the administration of anti-CD3 Abs also reduced the levels of pre-existing Abs. Treatment with anti-CD3 Abs also prevented a lethal hypersensitivity reaction and reduced the Ab titers in a mouse model of Pompe disease. Mice treated with anti-CD3 Abs showed reduced numbers of CD4⁺ and CD8⁺ cells, and an increased ratio of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺ cells. When the CD4⁺CD25⁺ cells were depleted using anti-CD25 Abs, the observed reduction in Abs against the enzyme by anti-CD3 Abs was abrogated. This suggests that CD4⁺CD25⁺ cells are important for the immune suppressive activity of anti-CD3 Abs. In summary, anti-CD3 Abs are useful for inducing immune tolerance to enzyme replacement therapy for Pompe disease

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：ライソゾーム蓄積症、ポンペ病、酵素補充療法、抗体、抗CD3抗体

1. 研究開始当初の背景

① ライソゾーム蓄積症(LSD)とは

LSD は細胞内小器官の一つであるライソゾームに存在する水解酵素の遺伝子異常により酵素機能が障害され結果として当該酵素の基質が細胞内に蓄積し細胞機能の障害が発生する疾患である。その結果として全身の臓器に関する臨床症状を呈する。欠損酵素により現在 50 以上の疾患が知られており、大半の疾患の遺伝子異常が明らかとなっている。LSD は、その蓄積する物質により分類されており、それらには糖脂質が溜まるスフィンゴリピドーシス、ムコ多糖(グリコサミノグリカン)が溜まるムコ多糖症、糖原が溜まる糖原病 II 型(ポンペ病、PD)などがある。

② LSDの現行の治療法

治療法としては、まず骨髄移植が行われ、ムコ多糖症などでは大きな効果をあげたが、感染症、出血、GVHDなどの合併症、ドナーを得られないなどの重要な問題点があった。次にERTが開始された。本療法は欠損する酵素を血管内に投与して細胞の酵素欠損を矯正しようとするものである。多くの臨床試験の結果スフィンゴリピドーシスのゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症のハーラー症候群、ハンター症候群、マルトラミー症候群、そして糖原病の一つであるポンペ病、以上6疾患に対するERTが欧米はもとより本邦でも承認されている。LSDのERTは6疾患以外でも臨床試験が進んでおり、近年、飛躍的な進歩を遂げているが、徐々にその問題点も明らかにされている。

③ ERTの問題点

ERTの問題点としては(1)末梢血管より酵素製剤を投与するため脳血管閉塞が通過できず、ライソゾーム病の多くで合併する中枢神経症状には無効である(2)生涯にわたり治療を繰り返さなければならない(3)血管内に投与された酵素製剤に対し免疫応答が惹起され、治療効果を阻害する(4)非常に高額である、などが挙げられる。それらを解決する試みとして(1)に関しては酵素製剤を脳室内や髄腔内に直接投与する(2)に関しては遺伝子治療の開発などがある。今回申請は(3)の免疫学的な問題に焦点をあて研究を行う。

2. 研究の目的

以上のように様々なLSDのERTでの抗体の産生は、その治療効果に悪影響を及ぼしていることが明らかであり、ERTの効果を最大限に出すためにも免疫応答のコントロールは非常に重要な課題となっている。今回の申請では、抗CD3抗体を用いることに

より抗体産生の抑制を試みる。抗CD3抗体は制御性T細胞を増加させることにより免疫寛容を導入するとされており、その有用性が自己免疫性糖尿病、アレルギー性脳脊髄炎などでの有効性が報告されているばかりでなく血友病治療におけるインヒビター出現の抑制にも有効であるとの報告がなされている(Waters B et al. Blood, 2008)。今回はPDのERTにおける抗体発生を抗CD3抗体で抑制できるか否かをマウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

① 抗CD3抗体による α -glucosidaseに対する免疫寛容導入

抗CD3抗体もしくはコントロールとしてハムスターIgGを5日連続でwild typeマウス(Balb/c, C57BL/6)に投与しその後PDの欠損酵素である α -glucosidaseのヒト型組換え酵素(rhGAA)を週に1回、合計4回投与し、最終投与より1週間後にrhGAAに対する抗体価をELISA法にて測定した。また抗CD3抗体による免疫寛容導入が長期間継続するか否かを検討するため、11週後に再度両群のマウスにrhGAAを再度週1回4回投与した。やはり最終投与より1週後にrhGAAに対する抗体価を測定した。

② 既に成立しているrhGAAに対しての抗CD3抗体の効果

rhGAAをwild typeマウス(Balb/c)に週1回合計4回投与し抗体を発生させ、その後、抗CD3抗体もしくはハムスターIgGを5日連続投与した。その1週後にrhGAAに対する抗体価を測定した。

③ PDモデルマウスにおける致死のアナフィラキシーの予防効果および抗体の発生予防効果

PDモデルマウスはrhGAAを複数回投与すると重度の免疫応答を起こしアナフィラキシーショックで死亡する。抗CD3抗体によりその予防効果があるか否かを検討した。抗CD3抗体もしくはハムスターIgGを5日連続投与しその後rhGAAを2週に1回合計20回投与しマウスがアナフィラキシーショックで死亡するか否かをカプランマイヤー法で比較した。またrhGAAに対する抗体価もELISA法で比較した。

④ 抗CD3抗体のリンパ球分画に対する影響

抗CD3抗体もしくはハムスターIgGを5日連続投与しその3日後にフローサイトメトリーに様々なリンパ球サブセットを脾細胞で検討した。検討した細胞はCD4⁺細胞、CD8⁺細胞、CD4⁺CD25⁺細胞、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺細胞である。

⑤ 免疫寛容誘導における制御性T細胞の役割

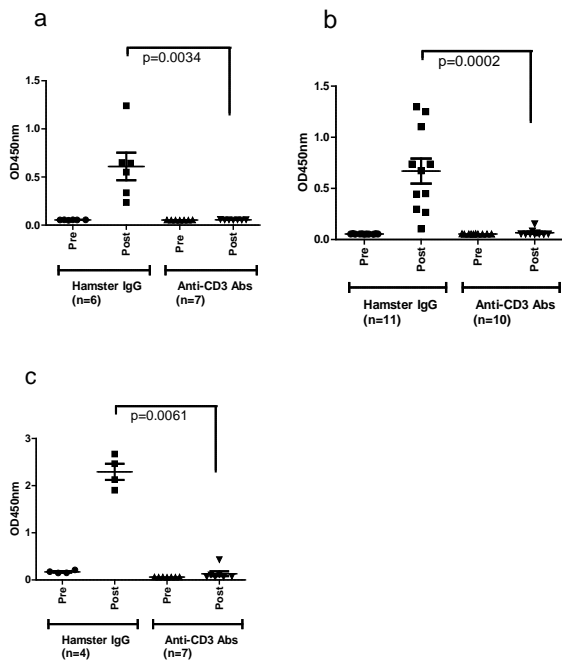
抗CD3抗体による免疫寛容導入における制御性T細胞の役割を明らかにするために抗CD25抗体にてCD4⁺CD25⁺細胞を除去し、その後抗CD3抗体もしくはコントロールとしてハムスターIgGを5日連続でwild typeマウス(Balb/c, C57BL/6)に投与しその後rhGAAを週に1回、合計4回投与し、その最終投与より1週間後にGAAに対する抗体価を測定した。

4. 研究成果

① 抗CD3抗体によるrhGAAに対する免疫寛容導入

抗CD3抗体にてwild typeのBalb/c(a), C57BL/6(b)に効率よくrhGAAに対する免疫寛容が導入出来た。またrhGAA再投与後でお抗CD3抗体投与群ではGAAに対する抗体価の上昇が抑制されていた(c)(図1)。

図1

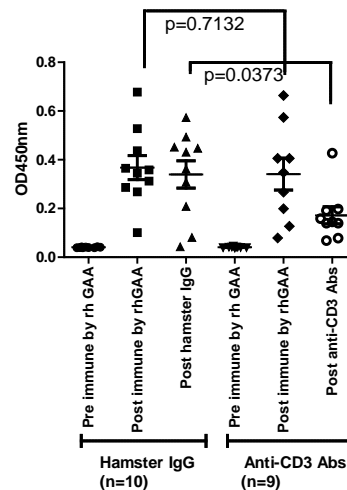


縦軸が抗体価(450nmの吸光度)aがBalb/c, bがC57BL/6. PreはrhGAA投与前、PostはrhGAA投与後.cは11週後にBalb/cにrhGAAを再度4回投与した時の前後の抗体価。

② 既に成立しているrhGAAに対しての抗CD3抗体の効果

既に成立しているGAAに対する免疫応答も抗CD3抗体にて減弱出来た(図2)。

図2

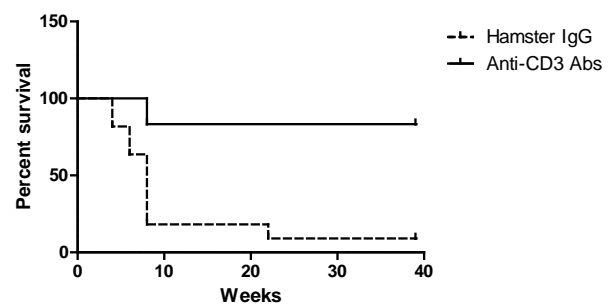


縦軸は抗体価(OD450nm)の吸光度。rhGAAによる免疫後は両群とも同様の抗体価の上昇があったが(p=0.7132)抗CD3抗体の投与によりその抗体価はコントロールのハムスターIgGを投与した時に比べ有意に低下した。

③ PDモデルマウスにおける致死のアナフィラキシーの予防効果および抗体の発生予防効果

抗CD3抗体を前もって投与することによりrhGAA投与によるPDモデルマウスの致死のアナフィラキシーを予防した(p=0.002 図3)。また抗体価の上昇も抑制した(data not shown)

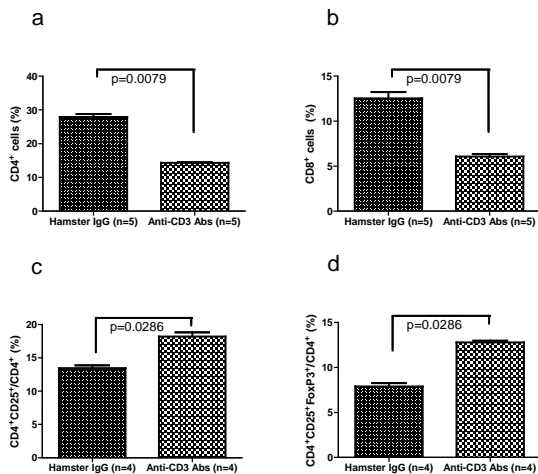
図3



④ 抗CD3抗体のリンパ球分画に対する影響

抗CD3抗体の投与により脾細胞におけるCD4⁺細胞(a)、CD8⁺細胞(b)は低下し、CD4⁺CD25⁺細胞/CD4⁺細胞比(c)、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺細胞/CD4⁺細胞比(d)は上昇した(図4)。

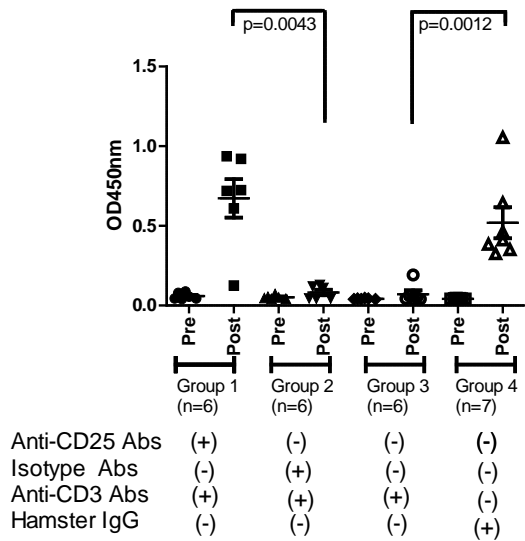
図 4



⑤ 免疫寛容誘導における制御性T細胞の役割

抗CD25 抗体にてCD4⁺CD25⁺細胞(制御性T細胞)を減少させると抗CD3 抗体による免疫寛容導入効果はキャンセルされた。以上よりCD4⁺CD25⁺細胞は抗CD3 抗体による免疫寛容誘導に必須な細胞であることが明らかになった(図5)。

図 5



Group1 は抗CD25 抗体にてCD4⁺CD25⁺細胞を減少させて抗CD3 抗体による免疫寛容を行ったもの。rhGAA投与後に抗CD25 抗体のアイソタイプコントロール抗体を投与したもの(Group 2)に比べて抗体価が上昇している。Group 3 は前処置せずに抗CD3 抗体による免疫寛容を行ったものでこれもハムスターIgG(コントロール抗体)を投与したもの(Group 4)に比べて抗体価の上昇が抑えられており抗CD3 抗体

による免疫寛容が導入されているのがわかる。PreはrhGAA投与前、Postは投与後。

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 1 件)
Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of alpha-glucosidase in mice
Toya Ohashi, Sayoko Iizuka, Yohta Shimada, Takashi Higuchi, Yoshikatsu Eto, Hiroyuki Ida, Hiroshi Kobayashi (投稿中)

[学会発表] (計 7 件)

- Ohashi T, Iizuka S, Eto Y, Ida Y. Impact of Antibody Formation for Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Diseases and Immune Tolerance Induction for Infused Enzyme. 11th International Congress on Inborn Errors of Metabolism, San Diego, USA 2009, Aug 29- Sep 2 .
- Ohashi T, Iizuka S, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ida Y. Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for Pompe disease by anti-CD3 antibody and oral enzyme administration. The 3th International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Nagoya, 2009, 9. 26-7
- Ohashi T, Iizuka S, Eto Y, Ida Y. Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for Pompe disease by anti-CD3 antibody and oral enzyme administration. 59th Annual Meeting The American Society of Human Genetics. Honolulu, Hawaii 2009, Oct.20-24 (Poster)
- 大橋十也、飯塚佐代子、嶋田洋太、小林博司、衛藤義勝、井田博幸. Pompe病の酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫寛容導入、第 51 回日本先天代謝異常学会総会 東京、2009 11.5 -7
- 大橋十也、飯塚佐代子、衛藤義勝、嶋田洋太、井田博幸、小林博司: 抗CD3抗体によるポンペ病酵素補充療法での酵素製剤に対する免疫寛容導入. 第 52 回日本先天代謝異常学会総会. 大阪, 10.21-23, 2010.
- Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Eto Y, Ida H, Kobayashi H. Anti-CD3 antibody reduces antibody formation and prevents lethal hypersensitivity reaction in enzyme replacement therapy for murinelysosomal storage

diseases. 11th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Madrid, April 1-2, 2011

7. 大橋十也、飯塚佐代子、嶋田洋太、樋口孝、井田博幸、衛藤義勝、小林博司：ライゾーム病酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫反応に関する研究. 第53回日本先天代謝異常学会. 幕張. 2011.11.24-26

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕 (計0件)

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：50056909

(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

(3) 研究分担者

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