

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591526

研究課題名(和文) 免疫応答抑制を併用した効果的ライソゾーム病酵素補充療法の開発

研究課題名(英文) Development of effective treatment by immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム蓄積症はライソゾーム酵素の遺伝的欠損により、その基質が細胞内に蓄積し様々な臨床症状を呈する疾患群であり、約40種類が知られている。その治療法として現在、欠損する酵素を補充する、酵素補充療法が7つの疾患に対して承認されている。しかしながら補充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知られている。今回の研究ではそのメカニズムの検討と免疫寛容療法の開発を行った。結果として発生する抗体は酵素の活性を阻害するばかりでなく細胞への取り込みも阻害することが明らかとなった。また、免疫寛容導入療法としては酵素製剤の経口投与が有効である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal storage diseases are characterized by genetically deficient activity of lysosomal enzyme, resulting in intracellular accumulation of various compounds. This causes various clinical symptoms. So far, about 40 lysosomal storage disease are known. As a treatment, enzyme replacement therapy is approved for 7 lysosomal storage diseases. However, development of antibody against infused enzyme negatively impact on therapeutic efficacy. From our study, antibody not only inhibit the enzyme activity but also cellular uptake of enzyme. Oral administration of enzyme prevent the antibody formation in enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases.

研究分野：小児科学、先天代謝異常症、遺伝子治療

キーワード：ライソゾーム病蓄積症 ファブリー病 ポンペ病 酵素補充療法 抗体 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム蓄積症(LSD)はライソゾームに存在する水解酵素の遺伝的欠損により、水解酵素の基質が細胞内に蓄積し様々な臨床症状を呈する疾患群である。欠損する酵素の種類により約 40 の疾患が知られている。ライソゾーム酵素は、ほぼ全身の組織で発現しているため、症状は多岐に渡る。治療法としては、当初は造血幹細胞移植が幾つかの LSD で行われていたが、1990 年頃より、欠損酵素を経静脈的に投与する、いわゆる酵素補充療法が開発され、現在は7疾患に対して承認されている。しかしながら、脳に効果がないこと、そして投与された酵素製剤に対する免疫反応が惹起され中和抗体が発生し治療効果を阻害することなどが大きな問題点である。特に LSD のなかでもポンペ病、ファブリー病、ムコ多糖症などの酵素補充療法では大きな問題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酵素補充療法で発生する酵素製剤に対する抗体の正常の検討、ならびに発生を抑える免疫寛容療法の会開発を、それぞれ、ファブリー病患者、ポンペ病モデルマウスを用いて行う事である。

3. 研究の方法

1)ファブリー病の酵素補充療法中に発生する欠損酵素(GLA)に対する抗体は GLA の細胞への取り込みを阻害するか? :ファブリー病の患者さんで発生する酵素製剤に対する抗体が酵素活性ばかりでなくて細胞への取り込みも阻害するか否かを検討した。蛍光色素で GLA をラベルし、抗体陽性、陰性の患者血清と混和後ファブリー病患者より樹立した細胞に添加し、培養後、フローサイトメトリにより取り込まれた GLA 量を測定した。

2)酵素による経口免疫寛容は可能か? :酵素製剤の経口投与が酵素製剤に対する免疫寛容を導入できるか否かを、ポンペ病モデルマウスを使用して検討した。様々な量の欠損酵素(MZ)を隔日5回経口投与しその後20mg/kgのMZを隔週で10回、経静脈的に投与した。アナフィラキシーによる死亡と、MZに対するIgG抗体をELISAにより測定した。また、免疫寛容導入で、どの細胞が主な役割を果たしたかを明らかにするため以下の実験を行った。免疫寛容が成立したマウスのCD4陽性細胞を磁気ビーズにて単離し、ナイーブなポンペ病マウスに養子免疫しその後その後10mg/kgのMZを毎週4回投与し最終投与より1週後にMZに対するIgG抗体をELISAで測定した。

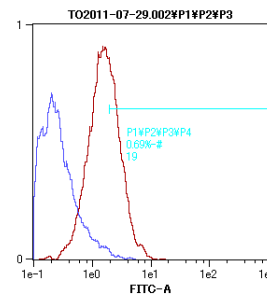
3)抗ヒトCD3抗体も抗マウスCD3抗体同様に免疫寛容導入可能か?我々はすでに抗マウス抗体はポンペ病モデルマウスでMZに対する免疫寛容を導入出来ることを報告している。今回は抗ヒトCD3抗体でも免疫寛容導入が可能か検討した。抗ヒトCD3抗体をヒトCD3発現マウス(ワイルドタイプマウス)に10µg/5日連続投与し、その後10mg/kgのMZを毎週4回投与し最終投与より1週後にMZに対するIgG抗体をELISAで測定した。

4)酵素の経鼻投与は経口投与同様免疫寛容導入は可能か?様々な量のMZをポンペ病モデルマウスに隔日で5回経鼻投与した。その後10mg/kgのMZを毎週4回投与し最終投与より1週後にMZに対するIgG抗体をELISAで測定した。

4. 研究成果

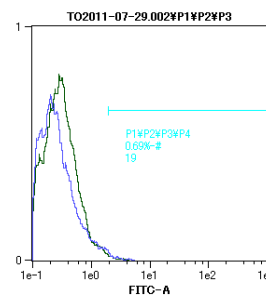
1)ファブリー病の酵素補充療法中に発生するGLAに対する抗体はGLAの細胞への取り込みを阻害するか?

① 蛍光標識したGLAを抗体陰性のヒトの血清と混和し、培養細胞へ添加した場合。



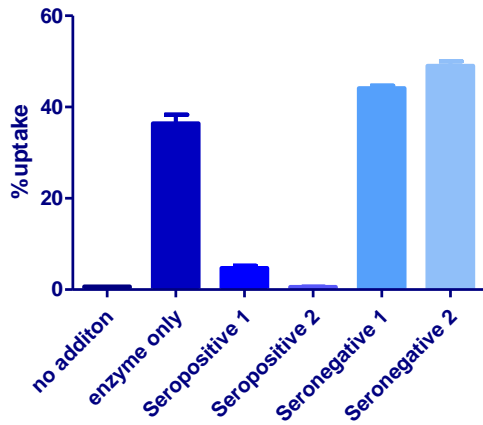
⇒結果として、多くの蛍光標識されたGLAが細胞に取り込まれている。

② 蛍光標識したGLAを抗体陽性のヒトの血清と混和し、培養細胞へ添加した場合。



⇒結果として蛍光標識されたGLAは細胞に殆ど取り込まれていない。

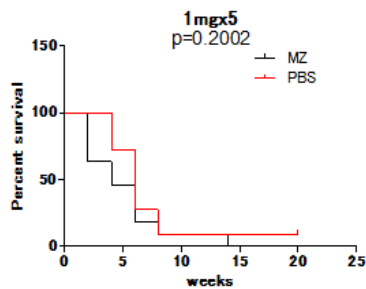
以上を抗体陽性者 (seropositive) 2名、陰性者 (seronegative) 2名について行った細胞への取り込み率(%uptake)結果を以下に示す。



結論：ファブリー病酵素補充療法中に発生する GLA に対する抗体は活性を阻害するばかりでなく、細胞への酵素の取り込みも阻害する事が判明した。

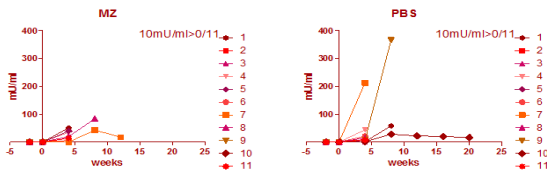
## 2) 酵素による経口免疫寛容は可能か？

① 毎回 1mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合のアナフィラキシーによるマウスの死亡の生存曲線を以下に示す。



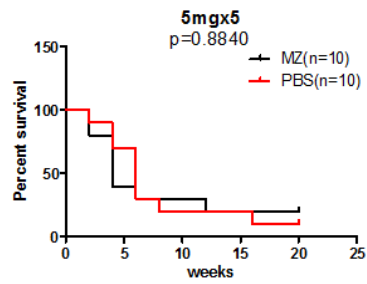
アナフィラキシーによる累積死亡率は MZ 群とコントロールの PBS 群で差がない。

② 毎回 1mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合の MZ に対する IgG 抗体の推移を以下に示す。免疫寛容成立の定義は観察期間で死亡せず、抗体価も 10mU/ml 以上に上がらなかったマウスを免疫寛容が成立したと定義し、免疫寛容が成立したマウスの割合を計算した。



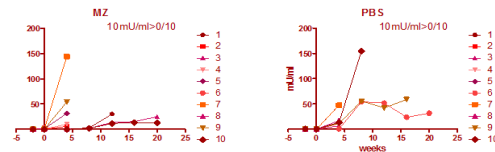
MZ 群、PBS 群とも免疫寛容が導入されたマウスは、それぞれ 0/11, 0/11 であった。つまり免疫寛容は導入できなかった。

③ 毎回 5mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合のアナフィラキシーによるマウスの死亡の生存曲線を以下に示す。



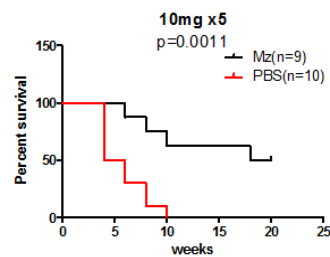
アナフィラキシーによる累積死亡率は MZ 群とコントロールの PBS 群で差がない。

④ 毎回 5mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合の MZ に対する IgG 抗体の推移を以下に示す。免疫寛容成立の定義は同様である。



MZ 群、PBS 群とも免疫寛容が導入されたマウスは、それぞれ 0/10, 0/10 であった。つまり免疫寛容は導入できなかった。

⑤ 毎回 10mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合のアナフィラキシーによるマウスの死亡の生存曲線を以下に示す。

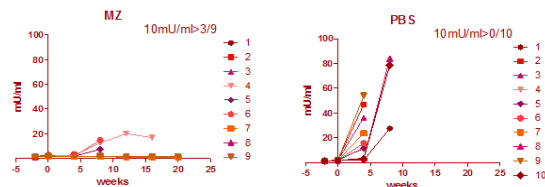


アナフィラキシーによる累積死亡率は MZ 群で優位にコントロールの PBS 群に

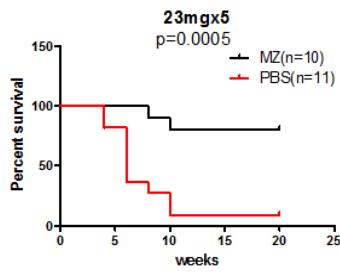
比べ死亡率が低い。(p=0.001)

⑥ 毎回 10mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合の MZ に対する IgG 抗体の推移を以下に示す。免疫寛容成立の定義は同様である。

MZ 群での免疫寛容導入率は 3/9, PBS 群は 0/10 で免疫寛容導入率が高い傾向にあった (p=0.08 Fischer exact test)。



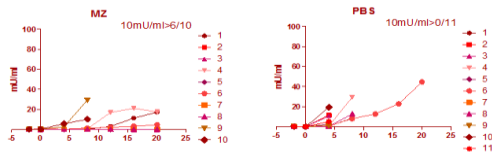
⑦ 毎回 23mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合のアナフィラキシーによるマウスの死亡の生存曲線を以下に示す。



アナフィラキシーによる累積死亡率はMZ群で優位にコントロールの

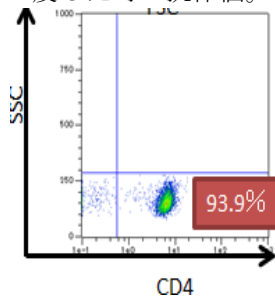
PBS群に比べ死亡率が低い。(p=0.0005)

- ⑧ 毎回 23mg の MZ を経口投与した後に、MZ を合計 10 回経静脈的に投与した場合の MZ に対する IgG 抗体の推移を以下に示す。免疫寛容成立の定義は同様である。



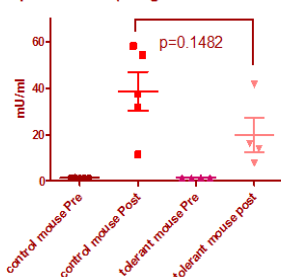
MZ 群での免疫寛容導入率は 6/10、PBS 群は 0/11 で免疫寛容導入率が優位に高かった (p=0.039 Fischer exact test)。

- ⑨ 免疫寛容が導入された、マウスの脾細胞由来の CD4 陽性細胞純度と、それをナイーブなポンペ病マウスに移植後、MZ で免疫した時の抗体価。



移植した CD4 陽性細胞の純度は 93.9% であった。

adaptive transfer (10mgx5 tolerant mouse)



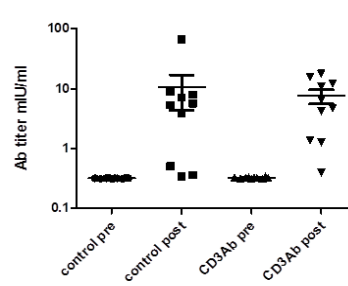
コントロールマウス (寛容 tolerant) よりの脾細胞を移植した場合に比べ寛容が成立した (tolerant) マウスの脾細胞よりの CD4 細胞を移植した場合の方が MZ に対する抗体の上昇は低い傾向にあった (p=0.148)。以上より CD4 陽性の制御性 T 細胞が免疫寛容導入に主な役割を果たしている可能性があると思われた。

結論：ポンペ病モデルマウスでは MZ を大量に投与した場合のみ免疫寛容が導入される。

### 3) 抗ヒト CD3 抗体も抗マウス CD3 抗体同様に免疫寛容導入可能か？

抗ヒト CD3 抗体を投与後に MZ で免疫後の抗

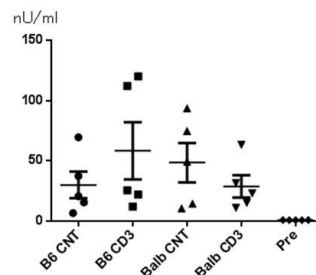
体価



コントロール群と抗ヒト CD3 抗体投与群で抗体価の上昇に差が認められなかった。

結論：抗ヒト CD3 抗体では抗マウス CD3 抗体と異なり、ポンペ病酵素補充療法で MZ に対する免疫寛容は導入出来なかった。

### 4) 酵素の経鼻投与は経口投与同様免疫寛容導入は可能か？



B6 CNT:C57BL/6に生食投与、B6 CD3:C57BL/6に抗CD3抗体投与  
Balb CNT:BALB/cに生食投与、Balb CD3:BALB/cに抗CD3抗体投与  
Pre:MZ投与前

結論として酵素の経鼻投与は経口投与と異なり、ポンペ病酵素補充療法で酵素製剤に対して免疫寛容は導入出来ない。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 大橋十也 嶋田洋太 樋口孝 飯塚佐代子 井田博幸 衛藤義勝 小林博司 免疫寛容導入による効果的ポンペ病酵素補充療法の開発 第 56 回日本先天代謝異常学会 2014 年 11 月 13 日-15 日 仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 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