

ライソゾーム蓄積症の治療法の心大血管病変に対する
効果の比較検討

《研究の概要》

ムコ多糖症Ⅱ型（MPSⅡ・Hunter 症候群）は、ライソゾーム蓄積症の1つであり、イズロン酸スルファターゼ酵素（IDS）の欠損が原因である。その結果、GAG（グリコサミノグリカン）が臓器に蓄積し心筋症、弁膜症を発症、著明な心機能障害を呈することでも知られており、これら心臓の障害は、患者の生命予後を左右する重篤な合併症である。その他の症状として骨症状、神経症状、難聴などを呈する。近年、酵素補充療法（ERT）の開発により、早期より治療を開始することでその臨床症状に改善がもたらされている。しかしERTの効果は限定的であり、神経病変、進行例を改善できないという問題点も残っている。また継続的な点滴や医療費は、患者に大きな負担を生じさせている。

MPSⅡに対する他の治療法として、骨髄移植療法（BMT）も施行されているがその有効性を示した報告は少ない。しかしながら、ムコ多糖症Ⅰ型においては、積極的にBMTが施行されており、その臨床症状の改善が報告されている。そのためBMTは、同じムコ多糖症であるMPSⅡにおいてもERT同様有効な治療法となりえることが予想される。また、高額な医療費や臨床症状の多様性に富む本疾患においては、社会的背景や患者の重症度を考慮した治療の選択が重要であり、特に生命予後を左右する心合併症に対する治療法の比較検討は、治療法を選択する場合に患者に対し非常に有益な情報を提供すると思われる。本研究の目的は、MPSⅡの心病変に対するERT、BMTその併用療法の比較検討である。治療群は3つもうけ、BMT群、ERT群、BMT+ERT群の心病変を中心とした治療効果の比較検討を行った。

本研究により我々は、BMT、ERT、BMT+ERTいずれの治療も心臓に蓄積したGAGを減少させることを見出した。さらに同治療効果を病理学的所見からも明らかにすることができた。また、ERTないしBMT+ERTが、心を含むいくつかの臓器でBMTに比しGAGをより減少させることを見出した。特に心臓においては、通常用いられるGAG測定ではなく、より鋭敏に蓄積GAGを測定しうるSensi-pro Assayを用いERTないしBMT+ERTの優位性を明らかにすることができた。

臨床上ERTは、自己抗体の発現により治療効果の減弱が指摘されている。本研究では、ERT後に抗IDS抗体の出現がほぼなかったため、ERTの効果を経過評価している可能性はある。しかしもし補充酵素に対する免疫応答をコントロールできるならば、ERTはBMTに比し心においてより効果的な治療法であるかもしれない。またERT+BMTがBMTよりGAG減少させたので、すでにBMTを受けている患者さんでもERTを加える事の意義はあると思われる。

心に蓄積したGAGの減少が、いかに臨床的表現型を改善させるかは今後の検討課題となるが、ERT、ERT+BMTの優位性を明らかにした本研究結果は、心病変も持つMPSⅡ患者の治療選択に有益な情報を与えると考えられる。

| | | |
|--------|---|----------------|
| 大橋 十也 | 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 遺伝子治療研究部 センター長・教授 | 研究の統括 |
| 飯塚 佐代子 | 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 遺伝子治療研究部 研究補助員 | 検体・データ解析 |
| 秋山 和政 | 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 遺伝子治療研究部 研究実習生 | 検体・データ解析 (生化学) |
| 福田 隆浩 | 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 神経病理学 講師 | 検体・データ解析 (病理学) |

研究報告

I 研究目的

ムコ多糖症Ⅱ型 (MPSⅡ・Hunter 症候群) は、ライソゾーム蓄積症の 1 つであり、イズロン酸スルファターゼ酵素 (IDS) の欠損が原因である。GAG (グルコサミノグリカン) が蓄積することにより心筋症、弁膜症を発症し、著明な心機能障害を呈することでも知られており、これら心臓の障害は、患者の生命予後を左右する重篤な合併症である。

現在 MPSⅡ の治療には、酵素補充療法 (ERT)、骨髄移植療法 (BMT) の 2 つの方法が用いられている。ERT は、MPSⅡ 患者にヒト組換え、IDS を毎週、経静脈的に投与するという治療法であり、病初期よりこの治療を開始することで MPSⅡ の表現型は大きく改善する。しかし ERT の効果は限定的であり、進行例や中枢神経症状を改善しないという問題を持つ。もう 1 つの治療である BMT は、移植された正常細胞から発現される IDS によって症状の改善を期待する治療法である。BMT は、ERT 承認前本邦で多くの患者に施行されたが、その有効性を示した報告が少なく、欧米では施行に否定的な見解が目立っている。

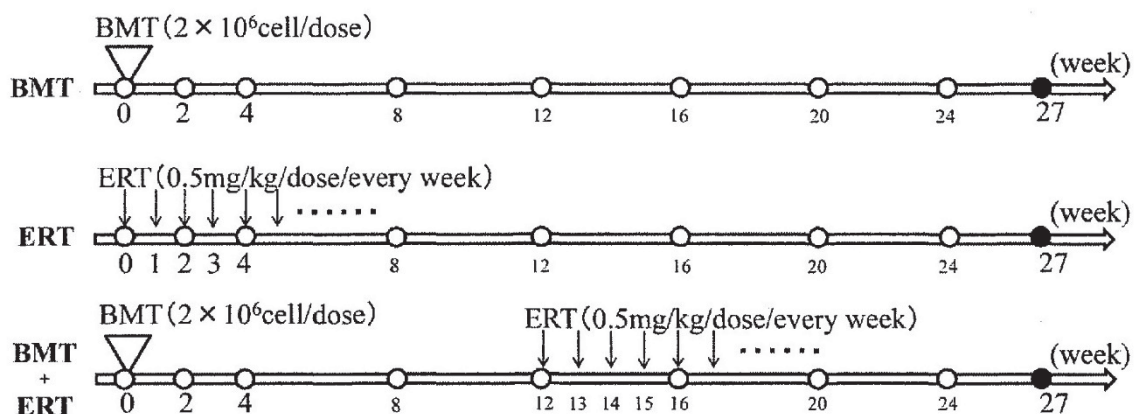
いずれの治療も生命予後を左右する心合併症に対する治療効果の詳細は不明であり、現在治療の選択に一定の見解はない。そこで、我々は MPSⅡ の心病変に対する各種治療法の比較検討を行った。治療群を 3 つもうけ、BMT 群、ERT 群、BMT+ERT 群の心を含む諸臓器への治療効果を評価した。

II 研究計画および材料と方法

1. 治療計画

治療計画を図-1 に示す。治療群は BMT 群、ERT 群、BMT+ERT 併用群とした。コントロールには無治療 MPSⅡ (NT) マウス、Wild type (WT) マウスを用いた。ERT 群においては、生後 9 週より ERT を開始、計 27 回の IDS 投与を行った。BMT 群においては、生後 9 週に BMT を施行した。BMT+ERT 併用群においては、生後 9 週に BMT を施行、その 12 週後に ERT を開始し計 15 回の IDS 投与を行った。経時的に全てのマウスの体重測定、採血、採尿を行った。ERT 群、BMT+ERT 併用群におうける採血は、毎回 ERT 施行直前に行った。治療後 27 週に、組織生化学分析、病理解析のため全てのマウスより組織の採取を行った。ERT 群、BMT+ERT 併用群における組織採取は、最後に ERT を施行した 1 週間後に行った。

図-1



2. 実験動物

疾患マウスモデルには、MPS II Hunter の雌 (IDS+/-) と雄の WT との交配により得られる仔を使用した。生後 7 週に PCR 法で遺伝子診断を行った。骨髄移植のドナーマウスには、B6、SJL-ptprca マウス ($CD45.1^+CD45.2^-$) と WT ($CD45.1^-CD45.2^+$) との交配により得られる F1 ($CD45.1^+CD45.2^+$) マウスを使用した。

3. 骨髄移植療法

生後 8~12 週齢の $CD45.1^+CD45.2^+$ マウスの大腿骨、脛骨より、 2.0×10^6 個の骨髄細胞を採取、移植前処置として 9Gy の放射線照射を行った MPS II マウスに経静脈的に投与した。移植細胞の生着は、フローサイトメーターを用い、 $CD45.1^+CD45.2^+$ 細胞の検出により評価した。

4. 酵素補充療法

生後 9 週齢の MPS II マウスに、ヒト IDS 0.5mg/kg を経静脈瘤に投与した。投与量はヒト治療量に準じた。

5. 血清、組織 IDS 活性の測定

IDS 活性の測定には、人工基質である 4-methylumbelliferyl-alpha-iduronide-2-sulfate を用いた。組織蛋白濃度測定には、BCA 蛋白分析キットを使用した。

6. Total GAG 測定

尿ないし組織 Total GAG (tGAG) の測定には、Wieslad® s GAG quantitative Alcian blue-binding assay kit を使用した。

7. Pathologic GAG 測定

Pathologic GAG 測定 (pGAG) には、Sensi-Pro Non-Reducing End heparan sulfate assay を使用した。Sensi-Pro assay は、2-O sulfated Non-Reducing End を定量することにより、IDS 欠損によってのみ生じる GAG 蓄積を明らかにするものである。まず組織をホモジナイズし、イオン交換クロマトグラフィーにより GAG を分離した。次に、ヘパランリアーゼを用いて GAG を 2 糖単位に分解した。酵素処理により得た 2-sulfo-iduronic linked to N-sulfoglucosamine-6-sulfate (I2S6) を安定同位体 [$^{12}C_6$] で標識、標準物質を [$^{13}C_6$] で標識、検量線をもとに I2S6 を定量した。測定には液体クロマトグラフィー/質量分析を用いた。

8. 病理解析

マウスを4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒドで灌流固定した。次に肝、心、脾、腎、脳を摘出、同固定液に浸漬させた。後固定には1%osmium tetroxideを使用、サンプルをエポキシ樹脂で包埋した。切片を薄切後、トルジンプルーで染色した。

9. 抗 rhIDS 抗体測定

抗ヒト組換えIDS (rhIDS) 抗体はELISA法で測定した。

III 研究成果

1. BMTによるドナー細胞の生着 (表-1)

BMTないしBMT+ERT併用療法を施行したすべてのマウスのドナー細胞の生着を評価した。ドナー細胞の生着率は、BMT施行後12週、27週いずれにおいてもおよそ90%に達した。T細胞の生着率は他の細胞系統に比しやや低く留まったが、これはT細胞の半減期が長い故にレシピエント細胞が残存したためと考えられる。

表-1

| | B cell (%) | T cell (%) | 顆粒球 (%) | マクロファージ (%) |
|---------------------|------------|------------|------------|-------------|
| <i>BMT 施行後 12 週</i> | | | | |
| BMT | 95.72±4.51 | 78.99±5.39 | 87.39±4.64 | 89.6±7.88 |
| BMT+ERT | 95.41±1.64 | 79.95±4.19 | 89.8±3.84 | 92.89±3.8 |
| <i>BMT 施行後 27 週</i> | | | | |
| BMT | 93.9±8.41 | 78.34±5.8 | 92.36±6.58 | 91.28±9.44 |
| BMT+ERT | 95.46±3.04 | 85.48±4.3 | 94.82±3.05 | 89.1±4.174 |

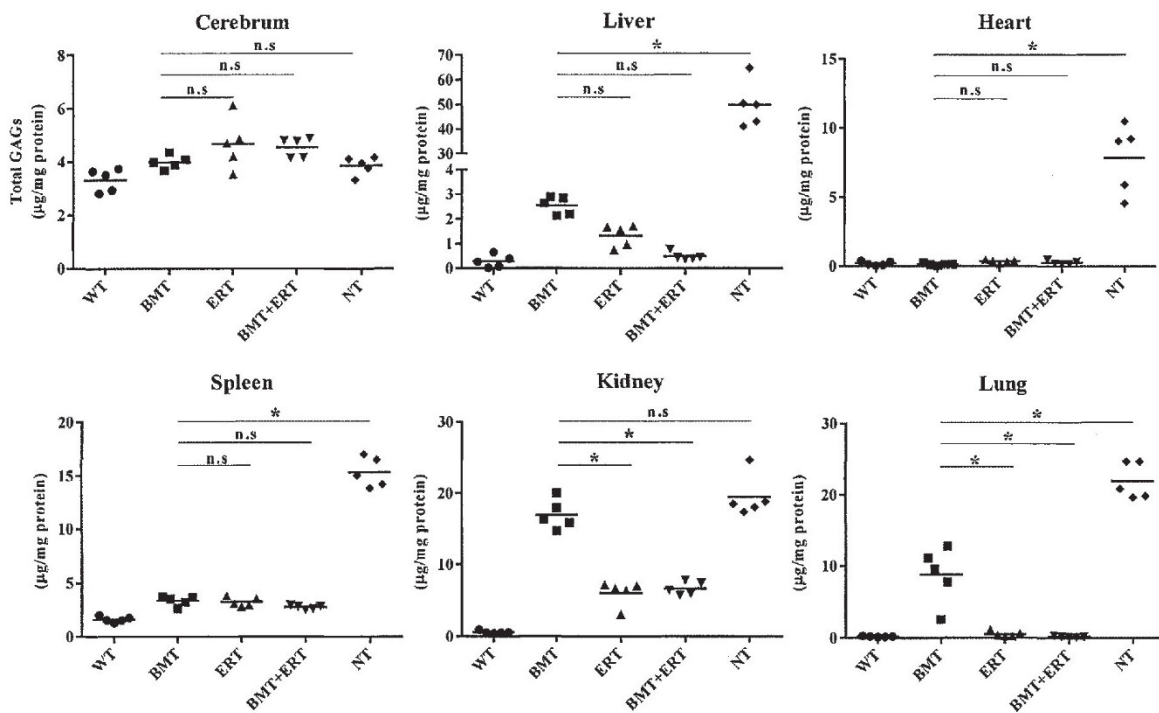
2. 諸臓器における蓄積 GAG の減少 (図-2、3)

GAGの測定には2つの方法を用いた。1つはアルシアンブルー法によるtGAGの測定である。これは病的に蓄積したGAGに加えもともと生体に存在するGAGをも含めて測定する方法である。もう1つは、Sensi-Pro assayを用いたpGAGの測定である。これはLC/MSを用い非還元末端がIduronate-2-sulfateであるヘパラン硫酸のみを測定する方法で、IDSの欠損によって蓄積したヘパラン硫酸のみを測定できる。

まずtGAGの結果を示す(図-2)。脳において、tGAGはいずれの治療でも減少しなかった。しかしながらWTとNTのGAGの蓄積に差がなく、本測定においては、脳蓄積GAGへの治療結果に言及することはできないと考えられた。肝において、tGAGはBMT、ERT、BMT+ERT併用療法によりNT群に比べ明らかに減少した。しかしながら治療群間に統計学的有意差は認めなかった。図は、BMT+ERT併用療法がBMT単独に比しよりGAGを減少させる傾向を示唆するが、この傾向に統計学的有意差はなかった。心、脾において、tGAGは全ての治療でほぼ正常レベルにまで減少した。肝同様治療群間に統計学的有意差は認めなかった。腎において、tGAGはERTとBMT+ERT併用療法によりNT群に比し明らかに減少したが、BMTでは減少しなかった。そしてERTないしBMT+ERT併用療法は、BMTに比しよりtGAGを減少させた。肺においては、全ての治療でtGAGは減少した。またERTないしBMT+ERT併用療法

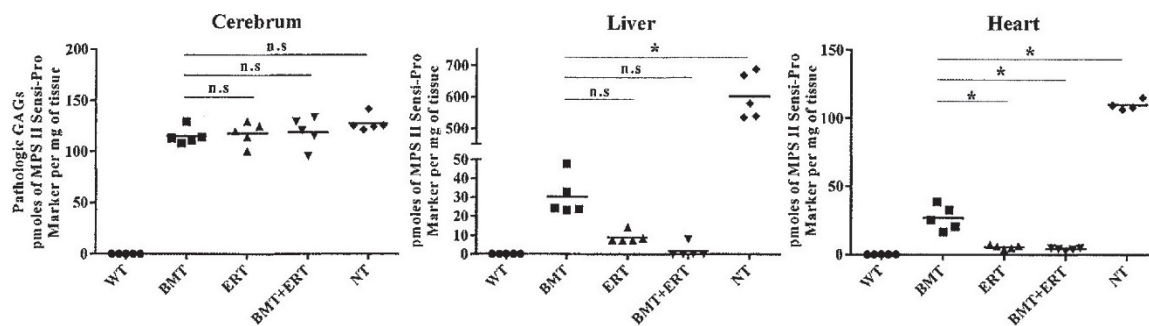
は、BMT に比しより tGAG を減少させた。

図-2



tGAG 測定では、脳、肝、心、脾に対する治療効果の差を明らかにすることはできなかった。そこで、同組織における治療効果をより詳細に評価するため、pGAG を測定した (図-3)。脳では、tGAG 同様いずれの治療でも pGAG は減少しなかった。しかしながら、pGAG 測定は WT と NT の GAG 蓄積の差を明らかし、tGAG に比しより鋭敏に GAG を検出することができた、肝において、pGAG は BMT、ERT、BMT+ERT 併用療法により明らかに減少した。治療群間に統計学的有意差は認めなかった。tGAG 同様、図からは、BMT+ERT 併用療法には、BMT 単独に比しより GAG を減少させる傾向が示唆されるが、この傾向に統計学的有意差はなかった。心においては、全ての治療で pGAG は減少した。また ERT ないし BMT+ERT は、BMT に比しより pGAG を減少させた。まとめると、脳に蓄積した pGAG はいずれの治療でも減少しなかった。肝における pGAG 測定にて得られた結果と同じであった。心では、ERT と BMT+ERT の優位性が明らかになった。これは、pGAG が脳、心における治療効果を評価するためのよりよい指標になるということを示している。

図-3



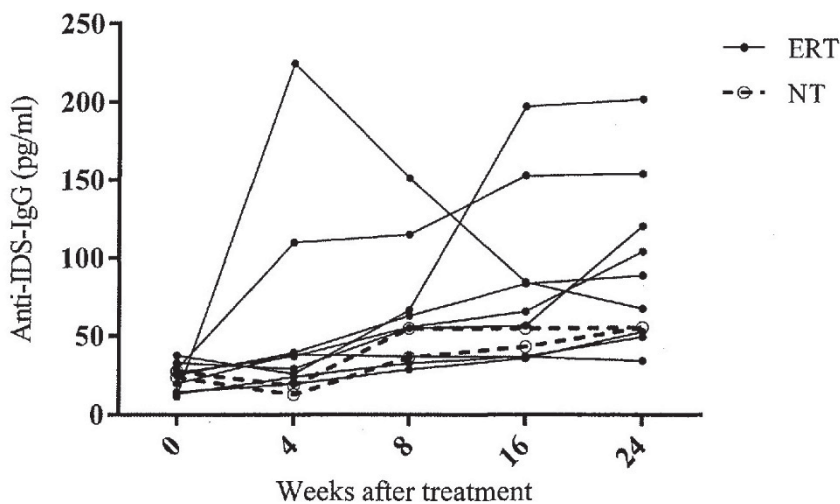
3. 治療による心病理所見への影響

NT 群では、心筋線維内、ないし毛細血管内皮に肥大したライソゾーム病変を示唆する無数の空胞形成を認めた。一方、WT、BMT、ERT、BMT+ERT 群には明らかな空胞形成を認めなかった。これは、全ての治療群で蓄積 GAG が減少したという生化学的検査の結果と矛盾しないが、病理学的に治療間での効果の差を明らかにすることはできなかった。

4. 補充酵素に対する IgG 抗体の発現 (図-4)

補充酵素に対する IgG 抗体産生の有無を評価するため、ERT 後のマウスの血清中抗 rhIDS 抗体を測定した。数匹のマウスで抗 IDS 抗体の発現が見られた (図-4)。しかしながらこれらの抗体価は、他のライソゾーム疾患マウスモデルへの ERT において観察される抗体価と比べると著しく低い。例えば、本実験と同じ測定方法を用いてポンペ病マウスモデルへの補充酵素に対する抗体価を測定した場合、OD=450nm 値を検量線内に入れるには、血清を 20000 倍以上に希釈する必要がある。一方本実験では、血清を 100 倍希釈することで、OD450nm 値を検量線内で測定することができ、それ以上に希釈した場合は、抗体価を検出することができなかった。よって、ERT により抗 IDS 抗体の発現は見られたが、それは極軽微なものであると考えられた。

図-4



IV. 考察

1. BMT と ERT の効果の差異について

MPS II に対する ERT は、患者の 6 分間歩行や肺呼吸機能などの改善に有効であり、2006 年にアメリカと EU で、2007 年に本邦で承認された。以降 ERT は多くの患者に施行され、MPS II への治療効果は明らかになっている。しかし ERT における継続的な補充酵素の投与や高額な医療費は、患者に大きな負担を生じさせている。BMT はこれらの諸問題を解決する可能性を持つが、BMT と ERT どちらがより高い治療効果を持つかは明らかにされていない。本研究では、ERT は、心、肺、腎において BMT よりも GAG を減少させた。この結果から、ERT は同組織において BMT に比しより高い治療効果を持つと考えられる。しかしながら、他のライソゾーム病においては、補充酵素に対する抗体の産生が ERT の治療効果を大きく減ずることがわかっており、これは ERT 施行におうける臨床上的大きな問題となって

いる。今回我々の研究では、抗 IDS 抗体が低値であったため、ERT の効果を過大評価している可能性がある。もし補充酵素に対する免疫応答がコントロールされるならば、ERT は BMT に比し、心を含む一部の臓器においてより効果的な治療であるかもしれない。

2. BMT と ERT の併用効果について

ERT は承認される以前、本邦では多くの MPS II 患者が BMT をうけた。しかしその治療効果は限定的であり、多くの患者はその症状を完全に軽快させるに至っていない。MPS II に伴う諸症状をより緩和するため、既に BMT を施行された患者に ERT を追加するかは多くの臨床医が疑問に抱く点であり、他のライソゾーム病においては BMT と ERT の併用に関するいくつかの研究報告も散見される。ある研究は、既に移植をうけた MPSVI 患者に単回 ERT を施行すると、尿中 GAG を減少させることができると示した (Mol. Genet. Metab. 2010;101:346-8)。またある研究は、BMT 施行後の MPSVI 患者への ERT の追加は、12 分間歩行や 3 分間階段駆け上がりテストといったいくつかの身体機能を改善させることができると示した (Am. J. Med. Genet. A 2012;158A:1158-63)。併用に関する報告として、BMT+ERT 併用療法が MPS I、MPSVI 患児の移植関連合併症率や死亡率を減少させたという報告も散見するが、これは BMT の安全性に着目したものであり、併用による治療効果には言及されていなかった (Genet. Med 2005;7:143-6、Bone Marrow Transplant 2006;38:17-21、Bone Marrow Transplant 2008;41:531-5、J. Pediatr 2009;154:135-9、JIMD Rep 2012;2:103-6)。この研究では、MPS II マウスに対する BMT と ERT の併用は、心、肺、腎において BMT よりもより GAG を減少させた。同組織では、ERT 単独でも著明な GAG の減少を認めている。これらの結果は、BMT を施行された患者に対する ERT の追加投与は、同組織における GAG をさらに減らすことができるということを示唆する。しかしながら、さらなる GAG の減少が、いかに表現型を改善させるは不明であり、追加治療の決定にはこの点を勘案した治療の選択が必要であると思われる。

3. ムコ多糖症における pGAG 測定の有用性

この研究では、組織 GAG 測定に 2 つの測定方法を用いた。1 つはアルシアンブルー法による tGAG 測定であり、これは疾患によって蓄積する GAG 以外にもともと正常生体に存在する GAG をも含めて検出する方法である。もう 1 つは IDS 活性欠損によって蓄積した GAG のみを検出する pGAG 測定である。tGAG 測定では、WT と NT における脳蓄積 GAG に明らかな差は認められなかった。一方 pGAG 測定は、WT と NT における脳蓄積 GAG の差を明らかにした。また心における BMT と ERT の併用効果についても明らかにした。pGAG 測定によるこの感度の高い GAG の検出は、同じムコ多糖症である MPS I に関する既報でも報告されている。以上のことから、pGAG 測定は、MPS II に対する治療効果を鋭敏に判定させうるバイオマーカーになると考える。この新たな定量方法は、ERT や BMT のみならず、基質抑制療法や他の新規治療法の治療効果判定にも使用することができる。また尿や血清、濾紙血を使用することにより、MPS I、II、III A、III B、III C、III D、VI、VII といった他のムコ多糖症の診断にも有効であると考えられ、今後新生児スクリーニングや、ムコ多糖症新規病型の発見への応用も期待される。

V. 研究成果の発表

論文掲載

- 1 **Akiyama K**, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T, Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice **Mol. Genet. Metab** 111 (2) : 139-46, 2014.

学会発表

- 1 **秋山 和政**、飯塚 佐代子、嶋田 洋太、樋口 孝、福田 隆浩、小林 博司、井田 博幸、衛藤 義勝、大橋 十也 : ムコ多糖症 II 型 (MPSII) マウスにおける酵素補充療法と骨髄移植療法の比較検討 第 54 回日本先天代謝異常学会学術集会岐阜. 2012
- 2 **Akiyama K**, Shimada Y, Higuchi T, Iizuka S, Ohtsu M, Nakauchi H, Crawford BE, Brown JR, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Enzyme Replacement Therapy enhanced a therapeutic efficacy of Bone Marrow Transplantation in MPS II mouse 16th Annual Meeting American Society of Gene & Cell Therapy(Salt Lake City US). 2013
- 3 **Akiyama K**, Shimada Y, Higuchi T, Iizuka S, Ohtsu M, Nakauchi H, Crawford BE, Brown JR, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Enzyme Replacement Therapy enhanced a therapeutic efficacy of Bone Marrow Transplantation in MPS II mouse 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会岡山. 2013
- 4 **Akiyama K**, Shimada Y, Higuchi T, Iizuka S, Ohtsu M, Nakauchi H, Crawford BE, Brown JR, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T : Enzyme Replacement Therapy enhanced a therapeutic efficacy of Bone Marrow Transplantation in MPS II mouse International Congress of Inborn Errors of Metabolism(Barcelona Spain). 2013
- 5 **Akiyama K**, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T : Enzyme Replacement Therapy enhanced a therapeutic efficacy of Bone Marrow Transplantation in MPS II mouse The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD 東京. 2013