

学位論文

「Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic  
efficacy of bone marrow transplantation in  
mucopolysaccharidosis type II mice」

(ムコ多糖症 II 型マウスにおける酵素補充療法は骨髄移植療法の効果を  
増強する)

DM10001 秋山 和政

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 小児科学  
指導教授 石井 正浩

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

# 要 目

ムコ多糖症 II 型 (MPS II・Hunter 症候群) は、イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) 酵素活性の欠損により全身にヘパラン硫酸、デルマタン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積する X 連鎖性劣性遺伝性疾患である。近年開発された酵素補充療法 (ERT) は、GAG 蓄積による諸症状を改善するが、中枢神経症状を改善しないという問題点を持つ。また MPS II に対する他の治療法として、骨髄移植療法 (BMT) も以前より施行されているが、中枢神経系への治療効果に一定の見解はない。今回の研究は (1) BMT により中枢神経障害は改善するか (2) BMT と ERT ではどちらが効果があるか (3) BMT を行った患者に対して ERT を行うべきかの 3 点につき、MPS II マウスモデルを使用し組織内 GAG の減少を指標として治療効果の検討を加えた。結果として、BMT、ERT、また BMT + ERT 併用療法いずれの治療も、脳の GAG を減少させず、マウスの行動異常を改善させなかった。また、ERT は BMT よりも心、腎、肺の GAG をより減少させた。BMT に ERT を併用すると、BMT 単独に比べより著明に組織内 GAG を減少させた。

本研究においてこれら治療の効果判定には、Total GAG 測定と Pathologic GAG 測定の 2 つの方法を用いた。Total GAG は全ての GAG であり、Pathologic GAG は、IDS が欠損することにより特異的に蓄積する GAG である。両者の比較では Pathological GAG がより鮮明に治療効果を反映していた。このことから Pathologic GAG 測定は、Total GAG に比べ MPS II における治療効果を鋭敏に反映するバイオマーカーになると考えられた。

## 目次

	頁
1. 序論 -----	2
2. 方法	
2-1. 実験動物 -----	4
2-2. 骨髄移植療法 -----	4
2-3. 酵素補充療法 -----	5
2-4. 治療計画 -----	6
2-5. 血清、組織 IDS 活性測定 -----	7
2-6. Total GAG 測定 -----	7
2-7. Pathologic GAG 測定 -----	8
2-8. 行動解析 -----	9
2-9. 病理解析 -----	9
2-10. 抗 rhIDS 抗体測定 -----	10
2-11. 統計解析 -----	10
3. 結果	
3-1. MPS II マウスへの BMT におけるドナー細胞の生着 -----	11
3-2. BMT、ERT、またその両者併用療法をうけたマウスの IDS 活性	
3-2-1. BMT による血清 IDS 活性の持続的発現 -----	12
3-2-2. 諸臓器における IDS 活性の変化 -----	13
3-3. IDS 活性増加による蓄積 GAG への影響	
3-3-1. 組織 Total GAG への影響 -----	15
3-3-2. Pathologic GAG 測定を用いた疾患特異的 GAG の検出 -----	16
3-3-3. 尿中 Total GAG への影響 -----	19
3-4. 行動解析を用いた中枢神経系への治療評価 -----	20
3-5. BMT、ERT、またその両者併用療法による過成長の抑制 -----	21
3-6 補充酵素に対する IgG 抗体の発現 -----	22

4. 考察	
4-1. 中枢神経病変に対する BMT の治療効果について -----	23
4-2. MPS II マウスに対する BMT と ERT の効果の差異について -----	24
4-3. BMT と ERT の併用効果について -----	25
4-4. ムコ多糖症における pGAG 測定の有用性 -----	25
5. 総括 -----	27
6. 謝辞 -----	28
7. 引用文献 -----	29
8. 業績目録 -----	35

本文

## 1. 序論

ムコ多糖症 II 型 (MPS II・Hunter 症候群) は、イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) 酵素活性の欠損により全身にヘパラン硫酸、デルマタン硫酸といったグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積する X 連鎖性劣性遺伝性疾患である [1]。分解されない GAG はライソゾーム内に蓄積し、骨格変形、弁膜症、心肥大、肝脾腫、顔貌異常、上気道狭窄、聴覚異常、舌肥大、網膜症、成長障害、精神発達遅滞等様々な症状を引き起こす [2]。これらの臨床症状は MPS II 患者の QOL を著しく低下させている。

現在 MPS II 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、MPS II 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 MPS II の表現型は大きく改善する [3-5]。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。中枢神経症状に対する限定的効果は、他のライソゾーム病における ERT でも観察されており、これは補充酵素が血液脳関門を通過しないことによる [6,7]。また骨病変や心弁膜病変に対する効果も乏しく [8]、補充酵素に対する抗体の産生も臨床上的大きな問題となっている。中枢神経病変や骨病変、心病変は、患者の ADL を損なう重要な問題であり、また ERT における継続的な補充酵素の注射や高額な医療費は、患者に大きな負担を生じさせることから [9]、現在 ERT に代わる新規治療法が望まれている。

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 においては、移植細胞が脳内に生着することにより、中枢神経病変を改善させうると期待されている。既報では、BMT は、MPS I, MPS VI, グロバイド細胞白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、ゴーシェ病など他の神経障害性ライソゾーム蓄積疾患における中枢神経病変を改善すると報告されている [10,11]。しかしながら MPS II に対する BMT には欧米を中心に否定的な見解が目立つ。いくつかの既報は、MPS II 患者へ



の BMT は、中枢神経病変への効果が期待できないことから、施行すべきではないと示している [12-15]。一方で近年本邦より報告された研究は、BMT が MPS II の中枢神経病変に長期的治療効果をもたらしたと示した [16]。よって、現在のところ MPS II に対する BMT 施行の可否に一定の見解はない。この見解の相違は、実際に BMT による脳蓄積 GAG への影響を示した報告がないことも一因になっていると考えられる。

BMT、ERT いずれの治療を選択するかは、中枢神経病変への治療効果の他に各種諸症状における治療効果の差異にも言及する必要がある。しかしながら、MPS II における BMT と ERT の治療効果の差異に言及した報告はない。また、いずれの治療も諸症状を完全に軽快させることは少なく、多くの臨床医は、既に BMT を施行された MPS II 患者に対し、ERT を追加するかという点に疑問を抱いている。そこでこの研究では、MPS II マウスモデルを使用し、蓄積 GAG の減少といった諸臓器の矯正を明らかにすることで、BMT の中枢神経系に対する効果、BMT と ERT の効果の差異、BMT と ERT の併用効果について検討した。なお本学位論文の一部は Akiyama らが *Molecular Genetics and Metabolism* に報告している [17]。

## 2. 方法

### 2-1. 実験動物

疾患マウスモデルの作成に関して、まず MPS II Hetero の雌マウス ( $IDS^{+/+}$ ) をノースカロライナ大学、Joseph Muenzer 博士より供与して頂いた [18]。次にこれら雌マウスと同じ遺伝的背景を持つ雄の Wild type (WT; C57BL/6) を三協ラボラトリーより購入、Hetero 雌マウスとの交配を行った。生後 7 週までに全ての出生仔より尾組織を採取し、PCR 法をもってその遺伝子型を確認した。本症は X 連鎖性性劣性遺伝性疾患であるため、交配によって得られる雄のマウスは 1/2 の確率で IDS ノックアウトマウス ( $IDS^{-/-}$ ) となる。骨髄移植に用いるドナーマウスには B6.SJL-*ptprca* マウスを使用した。この遺伝子組み換え株は、CD45.1 という独自の識別的細胞抗原を持ち、免疫寛容に優れ、現在骨髄移植研究に多く用いられている。B6.SJL-*ptprca* マウス ( $CD45.1^{+}CD45.2^{-}$ ) は三協ラボラトリーより購入、WT マウス ( $CD45.1^{+}CD45.2^{+}$ ) との交配を行い、実際ドナーマウスとして用いる  $CD45.1^{+}CD45.2^{+}$  マウスを作成した。全ての実験動物は、必要十分な栄養、感染防御等適正な環境条件下で飼育管理した。これら実験動物の繁殖、飼育、またこれら実験動物に対する全ての処置は、東京慈恵会医科大学動物実験委員会によって承認されている。

### 2-2. 骨髄移植療法

骨髄移植は、既報にやや変更加え施行した [19]。まず生後 8~12 週齢の  $CD45.1^{+}CD45.2^{+}$  マウスより大腿骨、脛骨を採取、Hanks balanced Salt Solution を用い髓腔より骨髄細胞を洗い出した。次に骨髄細胞を  $100\text{-}\mu\text{m}$  cell strainer (BD Falcon) を用いフィルトレー

ション、溶血バッファー(BD Biosciences)を用い赤血球を除去した。骨髓細胞数のカウントにはトリパンプルーを用いたセルカウンターを使用した。レシピエントマウスには移植前処置として放射線照射を行った。アクリルボックス内にレシピエントマウスを静置、照射条件は 20 mA、150 kV、2.0-mm aluminum filter とし、照射は 9Gy、単回投与とした。照射機材には Hitach-MBR1520R irradiator(Hitachi)を用いた。前処置を受けた生後 9 週の MPS II マウスに  $2.0 \times 10^6$  個の骨髓細胞を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分析を用いた CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>細胞の検出により評価した。まず移植後 12 週と 27 週に、レシピエントマウスより末梢血を採取、溶血バッファーを用い赤血球を除去した。次に得られた白血球を Fc blocker にて処理、続いて fluorescein isothiocyanate 標識の抗マウス CD45.1 抗体(eBioscience)と allophycocyanin 標識の抗マウス CD45.2 抗体(eBioscience)にて染色した。細胞系統の判別には、phycoerythrin 標識の抗体を使用、認識抗原は、B 細胞-CD45R、T 細胞-CD3e、顆粒球-Ly6G、マクロファージ-CD11b(eBioscience) と し 同 様 の 染 色 を 行 っ た 。 死 細 胞 染 色 に は 4',6-Diamidino-2-phenylindole を用いた。フローサイトメーターには MACSQuant® Analyzer(Miltenyi Biotec)を使用、分析には MACSQuantify® Software(Miltenyi Biotec)を用いた。

### 2-3. 酵素補充療法

生後 9 週齢の MPS II マウスに、ヒト IDS (Elaprase®; Shire HGT Pharmaceuticals)0.5mg/kg を経尾静脈的に投与した。投与量はヒト治療量に準じた。ヒト IDS は Genzyme Japan より供与された。

## 2-4. 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 MPS II (NT)マウス、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 併用群における採血は、毎回 ERT 施行直前に行った。すべてのマウスにおいて、治療開始後 26 週～27 週の間に Y 字迷路を行った。治療後 27 週には、組織生化学分析、病理解析のため全てのマウスを解剖、組織の採取を行った。ERT 群、BMT+ERT 併用群における解剖は、最後に ERT を施行した 1 週間後に行った。

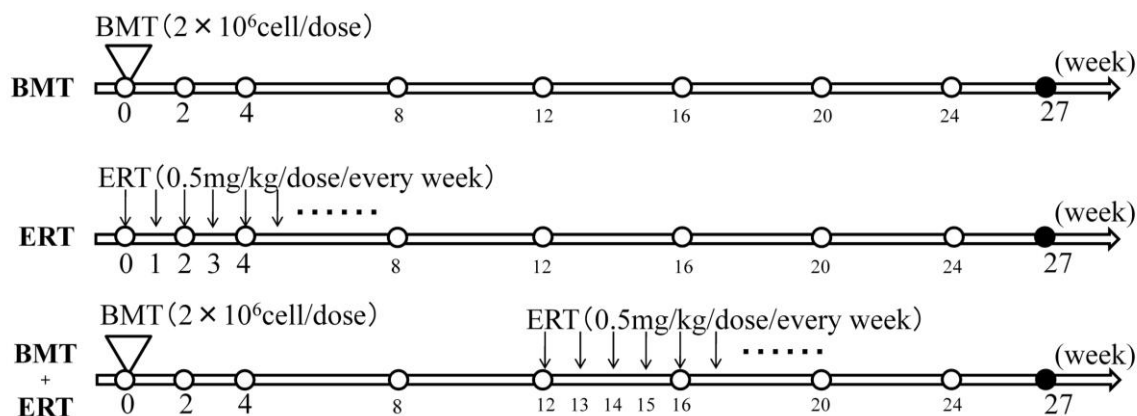


図 1. 治療計画

図は治療検査計画を継時的に示したものである。治療群は、BMT 群、ERT 群、BMT+ERT 併用群の 3 つである。▽は BMT 開始時を示している。↓は IDS 投与を示している。○は IDS 活性測定、GAG 測定、抗 IDS 抗体測定のための採血、採尿時を示している。●は解剖時を示している。全ての治療群において、生後 9 週より治療を開始した。ERT 群においては計 27 回 IDS を投与した。BMT+ERT 群においては計 15 回 IDS を投与した。

## 2-5. 血清、組織 IDS 活性測定

血清、組織における IDS 活性の測定には、人工基質である 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -iduronide-2-sulfate (4MU- $\alpha$ Idu-2S, Moscerdam Substrates) を用いた。測定方法は既報に準じた [20]。組織蛋白濃度測定には、BCA 蛋白分析キット (Thermo Fisher Scientific) を使用した。まず、 $2\mu\text{l}$  の血清ないし  $15\mu\text{g}$  の組織蛋白溶液を、それぞれ  $20\mu\text{l}$  の基質溶液 ( $1.25\text{ mM MU-}\alpha\text{Idu-2S-Na}_2$ ,  $0.1\text{ M Na-acetate}/0.1\text{ M acetic acid buffer (pH5.0)}$ ,  $10\text{ mM Pb-acetate}$ ) とともに、暗室  $37^\circ\text{C}$  で 4 時間インキュベートした。次に、 $40\mu\text{l}$  の Pi/Ci buffer ( $0.4\text{ M Na-phosphate}/0.2\text{ M citrate buffer (pH 4.5)}$ ,  $0.02\%$  Na-azide) と  $10\mu\text{g}$  の LEBT (purified Lysosomal Enzymes from Bovine Testis) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートした。酵素反応の停止には、 $200\mu\text{l}$  の stop buffer ( $0.5\text{ M NaHCO}_3/0.5\text{ M Na}_2\text{CO}_3\text{ buffer (pH 10.7)}$ ,  $0.025\%$  Triton X-100) を用いた。遊離した 4MU の蛍光測定には、RF-5300PC 分光蛍光光度計 (励起波長:  $365\text{nm}$ , 蛍光波長:  $460\text{nm}$ , 島津製作所) を用いた。検量線は、蛍光基質 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -iduronide (Sigma-Aldrich Japan) を使用し作成した。IDS 活性の単位に関して、血清 IDS 活性値は WT との相対百分率にて表記した。組織 IDS 活性値は  $\text{nmol}/4\text{h}/\text{mg protein}$  と表記した。

## 2-6. Total GAG 測定

尿ないし組織 Total GAG (tGAG) の測定には、Wieslad® sGAG quantitative Alcian blue-binding assay kit (Euro-Diagnostica) を使用した。測定方法は既報に準じた [20]。尿は遠心しその上清を用いた。組織は水でホモジナイズした。まずサンプルをプロテアーゼとともに  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートした。次にその上清  $50\mu\text{l}$  を  $50\mu\text{l}$  の  $8\text{ M}$

Guanidine-HCl とともに室温で 15 分間インキュベートした。50  $\mu$ l の SAT solution (0.3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75% Triton X-100)を加えた後、750  $\mu$ l の alcian blue working solution とともに室温で 15 分間以上インキュベートした。次に遠心後上清を廃棄、ペレットを DMSO(40% DMSO, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>)で洗浄した。最終的に 500  $\mu$ l の Gu-prop solution (4 M Guanidine-HCl, 33% 1-propanol, 0.25% Triton X-100)を加え、ペレットを完全に溶解した。吸光度は、SH-9000 分光光度計(波長 600nm, Hitachi High-Technologies)を用い測定した。組織蛋白濃度を BCA 蛋白分析キットで測定、尿中クレアチニンを LabAssay® Creatinine(和光純薬)で測定、測定単位はそれぞれ  $\mu$ g GAG/mg protein、 $\mu$ g GAG/mg creatinine とした。

## 2-7. Pathologic GAG 測定

Pathologic GAG 測定 (pGAG)には、Sensi-Pro Non-Reducing End heparan sulfate assay を使用した。測定方法は既報に準じた [21]。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(IBEX Technologies)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 [<sup>12</sup>C<sub>6</sub>]で標識、標準物質を [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]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。データには 3 回の測定結果の平均値を用いた。

## 2－8．行動解析

マウスの行動異常は、Y字迷路を用いた交替行動変化率、自発的活動量により評価した。交替行動変化率は空間作業記憶を反映する。まずそれぞれのアームをA、B、Cと標識、アームAにマウスを静置後8分間その行動を観察した。それぞれのアームへの進入は、尾全体がアーム内に入ることと定義、アームへの進入回数、順序を手的に記録した。交替行動は、3つのアームに一定の順序で進入することと定義した（例；A→B→C）。自発的活動量はアームへの総進入回数にて評価した。それぞれのマウスで、1日あたり3回測定した。同実験を3日間繰り返しデータにはその平均値を用いた。

## 2－9．病理解析

まずマウスをフェノバルビタールで麻酔、4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド(和光純薬)を使用し経心腔的に灌流固定した。次に肝、心、脾、腎、脳を摘出、同固定液に最低2時間以上浸漬させた。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。続いて切片を1  $\mu$ m に薄切、トルジンプルーを用で染色した。評価には、光学顕微鏡(BX-50, オリンパス)を使用、肥大したライソゾーム病変を検出した。

## 2-10. 抗 rhIDS 抗体測定

抗ヒト組換え IDS(rhIDS)抗体の測定には ELISA 法を使用した。まず 96 穴 Nunc-Immuno plate MaxiSorp®(Nunc)に、rhIDS を  $10\mu\text{g}$  コートし  $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。ブロッキングには PBS/1% bovine serum albumin を使用、洗浄後のプレートに  $100\mu\text{l}$ を添加し室温で 5 時間インキュベーションした。次にプレートを PBS/0.05% Tween 20 で洗浄、100 倍に希釈した血清サンプルをそれぞれのウェルに加え室温で 1 時間インキュベーションした。続いて再度プレートを PBS/0.05% Tween 20 で洗浄、全てのウェルに 5000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体(Kirkegaard & Perry Labs) $100\mu\text{l}$ を加えた。室温で 30 分間静置後プレートを再度洗浄、発色基質 3,3',5',5'-tetramethylbenzidine substrate reagent(Kirkegaard & Perry Labs)を加えた。10 分後、 $0.6\text{ N H}_2\text{SO}_4$   $100\mu\text{l}$ を加え呈色反応を停止、吸光度の測定を行った。測定には ARVOMX/Light plate reader (波長  $450\text{nm}$ , PerkinElmer)を使用した。マウス抗ヒト IDS モノクローナル抗体より検量線を作成、抗体価を算定した。マウス抗ヒト IDS モノクローナル抗体は、JCR Pharmaceutical より供与された。

## 2-11. 統計解析

データの統計解析に、Graphpad Prism software (GraphPad software, Inc)を使用した。検定には、 $t$ 検定ないし一元配置分散分析法(post test; Tukey-Kramer)を用いた。有意水準は  $p<0.05$  とした。



### 3. 結果

#### 3-1. MPS II マウスへの BMT におけるドナー細胞の生着

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(表 1)。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。

	B cell (%) <sup>a</sup>	T cell(%) <sup>a</sup>	顆粒球(%) <sup>a</sup>	マクロファージ(%) <sup>a</sup>
<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	96.41±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

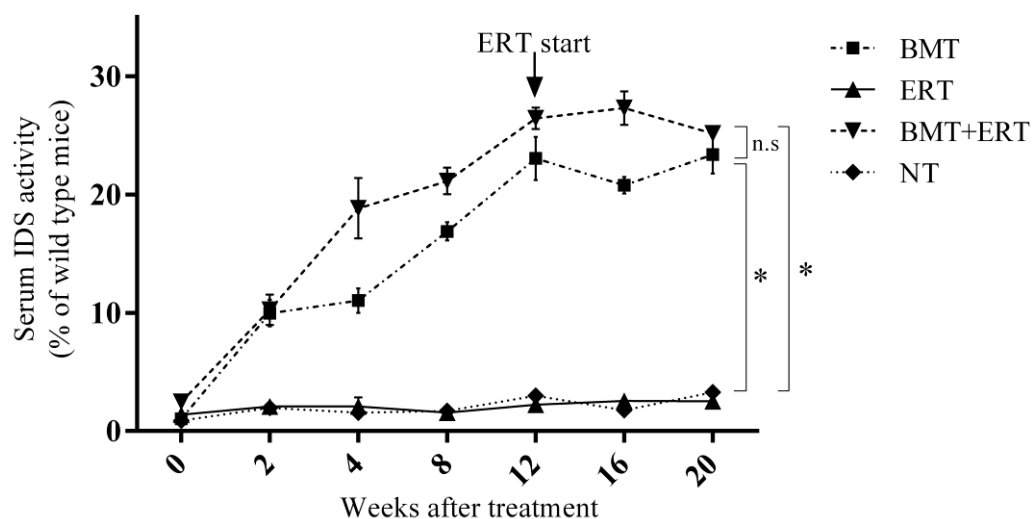
表 1. BMT ないし BMT+ERT 併用療法をうけたマウスのドナー細胞生着率

<sup>a</sup> BMT 施行後 12 週ないし 27 週での末梢血におけるドナー細胞生着率。それぞれの値を平均±SD で示した(BMT: n=5, BMT+ERT: n=5)

### 3-2. BMT、ERT、またその両者併用療法をうけたマウスの IDS 活性

#### 3-2-1. BMT による血清 IDS 活性の持続的発現

治療後の IDS 活性を経時的に評価した(図 2)。BMT 単独療法をうけたマウスの血清 IDS 活性は、移植後 2 週間の時点で上昇し、移植後 20 週には WT の約 25%に達した ( $p<0.001$ , vs. NT)。ERT 単独療法をうけたマウスの血清 IDS 活性は検出されなかった。これは投与された IDS が急速に循環血液内より排除されていることを示している。BMT +ERT 併用療法をうけたマウスの血清 IDS 活性の経時的变化は、BMT 単独療法の経過と非常に酷似した ( $p<0.001$  vs. NT,  $p>0.05$  vs. BMT)。併用療法において ERT 開始後も血清 IDS 活性に変化はなく、投与された IDS は急速に循環血液内より排除されていると考えられる。これらの所見は、BMT 後ドナー細胞が安定的に生着し、それらが IDS を持続的に発現していることを示している。



## 図 2. BMT をうけたマウスにおける血清 IDS 活性の持続的発現

BMT、ERT、BMT+ERT 併用療法をうけたマウス、さらに WT マウス、NT マウスの血清 IDS 活性を測定した。↓は併用療法群において ERT を開始した時期を示す。血清 IDS 活性値を、同週齢の WT との相対百分率にて示した(WT マウスの活性値は図に示していない)。それぞれの値を平均±SEM で示した(それぞれの群: n=5)。治療開始 20 週後の酵素活性の差異を、4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の一元配置分散分析法で評価した。アスタリスクは  $p<0.001$  を示す。“n.s.”は有意差なしを示す。

## 3-2-2. 諸臓器における IDS 活性の変化

治療開始後 27 週に、BMT、ERT、またその両者併用療法をうけたマウスの肝、心、脾、腎、肺、大脳の IDS 活性を評価した。ERT 単独群においては(図 3A)、肝を除くすべての臓器で IDS 活性は上昇しなかった。これは、最後の酵素補充から 1 週間後に臓器を採取したため、酵素が諸臓器よりすでに排除されているためだと考えられる。一方肝臓では、多量の酵素が取り込まれるため、酵素補充 1 週間後も IDS 活性を検出することが可能であったと考えられる。BMT 単独群においては(図 3B)、肝、心、脾、腎、肺において IDS 活性が上昇、大脳における活性上昇は認めなかった。BMT+ERT 併用群においては(図 3C)、BMT 単独群と同様に IDS 活性が上昇した。BMT 単独群と異なるのは、大脳において IDS 活性が有意に上昇したことであるが、その増加は極わずかである。これらの結果は、BMT をうけたマウスにおける安定的なドナー細胞の生着が、諸臓器における IDS 活性の上昇に寄与していることを示している。

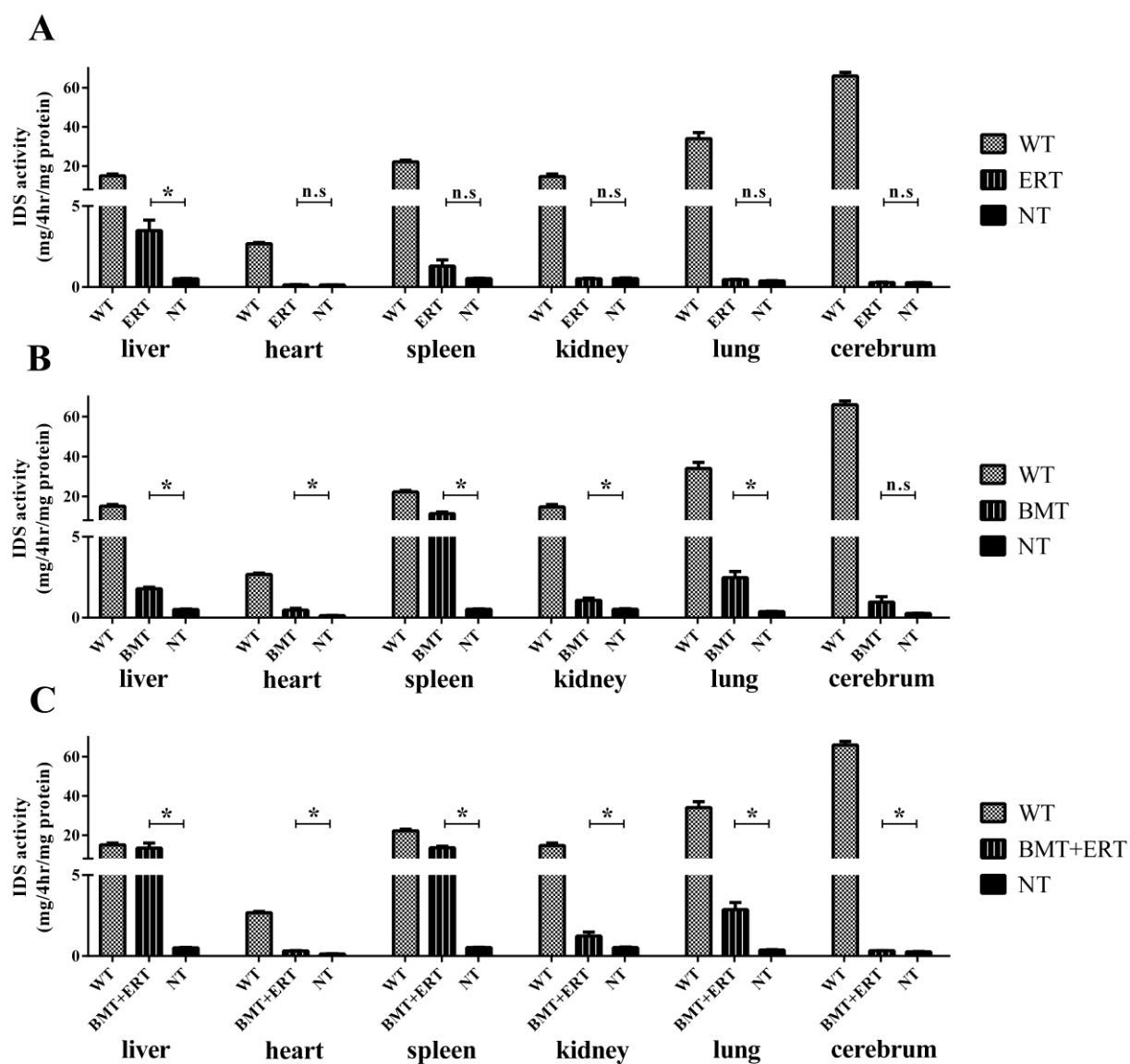


図 3. 諸臓器における IDS 活性の変化

治療開始後 27 週に、BMT、ERT、BMT+ERT 併用療法をうけたマウス、また同週齢の WT マウス、NT マウスより、肝、心、脾、腎、肺、大脳を採取した。組織 IDS 活性値を、nmol/4h/mg protein で示した。それぞれの値を平均±SEM で示した(それぞれの群: n=5)。治療群と NT 群との酵素活性の差異を、*t* 検定を用いて評価した。アスタリスクは  $p<0.05$  を示す。“n.s.”は有意差なしを示す。

### 3-3. IDS 活性増加による蓄積 GAG への影響

#### 3-3-1. 組織 Total GAG への影響

BMT の中枢神経系に対する効果、BMT と ERT の効果の差異、BMT と ERT の併用効果について検討するため、治療開始後 27 週に、BMT、ERT、またその両者併用療法をうけたマウス的大脑、肝、心、脾、腎、肺の tGAG を測定した。tGAG 測定にはアルシアンブルー法を用いた。大腦において(図 4)、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 への治療効果に言及することはできないと考えられた。肝において(図 4、図 6)、tGAG 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。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(図 4、図 6)、tGAG は全ての治療でほぼ正常レベルにまで減少した。治療群間に統計学的有意差は認めず、肝同様 BMT+ERT 併用療法が BMT 単独に比しより GAG を減少させることはなかった。腎において(図 4、図 6)、tGAG は ERT と BMT+ERT 併用療法により明らかに減少したが、BMT では減少しなかった。つまり 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(図 4)、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。まとめると、ERT は BMT に比し腎、肺においてより tGAG を減少させた。また同組織において、BMT と ERT の併用は BMT に比しより tGAG を減少させた。

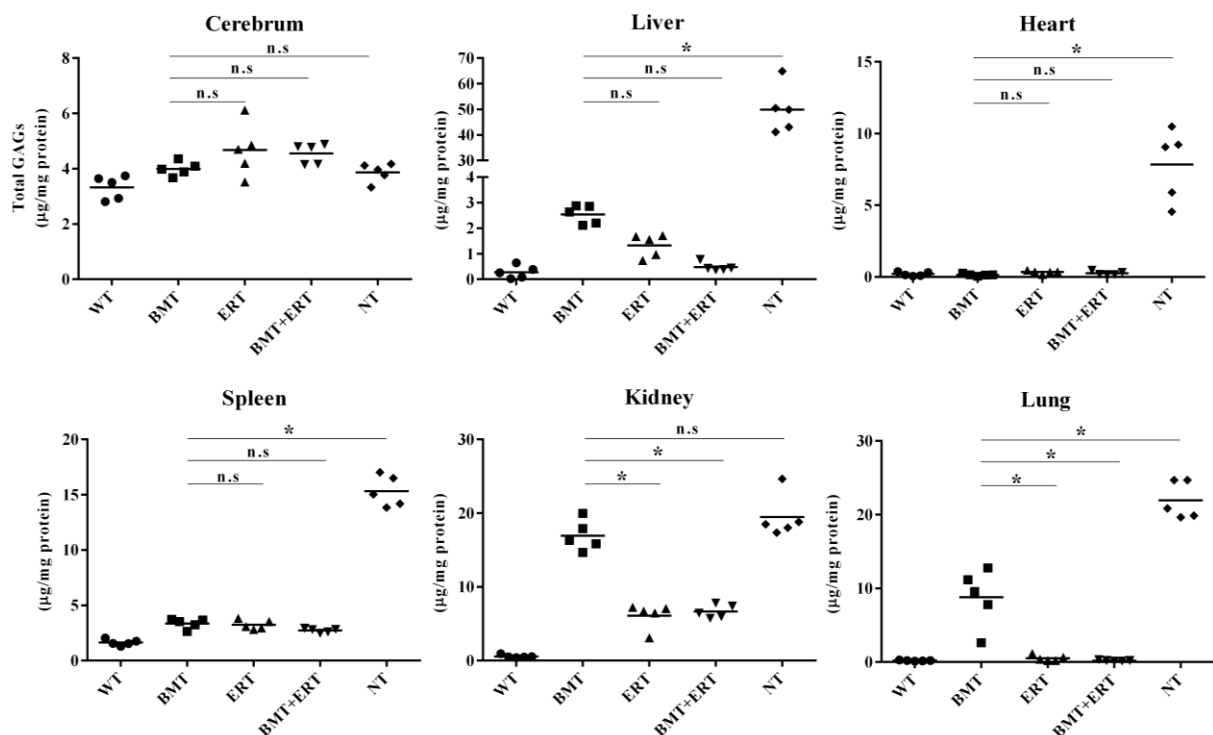


図 4 . 諸臓器における蓄積 tGAG の減少

アルシアンブルー法を用いて、大脳、肝、心、脾、腎、肺の tGAG を定量した。測定値を  $\mu\text{g GAG/mg protein}$  で示した。それぞれのシンボルは、個々のマウスのデータを示す。横棒は平均値を示す。4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の tGAG の差異を一元配置分散分析法で評価した。アスタリスクは  $p < 0.05$  を示す。“n.s.”は有意差なしを示す。

### 3-3-2. Pathologic GAG 測定を用いた疾患特異的 GAG の検出

tGAG 測定では、大脳、肝、心、脾における BMT と ERT の併用効果を観察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。pGAG 測定に用いた Sensi-Pro assay は、IDS 欠損によりライソゾーム内に蓄積する GAG を選択的に定量する方法であり、病的に蓄積した GAG のみを検出することができる。大脳では(図 5)、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(図 5)、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(図 5)、全ての治療で pGAG は減少した。また ERT ないし BMT+ERT 併用療法は、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 の結果は、tGAG 測定にて得られた結果と同じであった。心では、tGAG 測定では観察されなかった BMT と ERT の併用効果が明らかになった。これらの結果は、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。

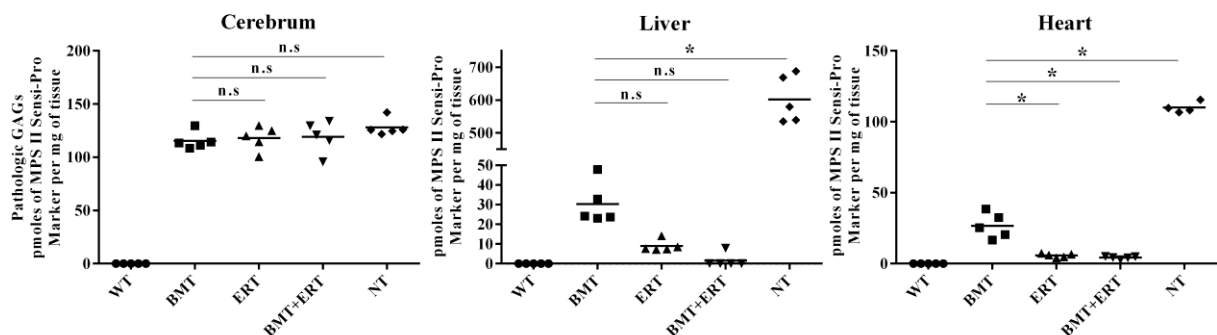


図 5. 諸臓器における蓄積 pGAG の減少

Sensi-Pro assay を用いて大脳、肝、心の pGAG を測定した。測定値を pmoles of MPS II Sensi-Pro Marker/mg tissue で示した。それぞれのシンボルは、個々のマウスのデータを示す。横棒は平均値を示す。4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の pGAG の差異を一元配置分散分析法で評価した。アスタリスクは  $p<0.05$  を示す。“n.s” は有意差なしを示す。

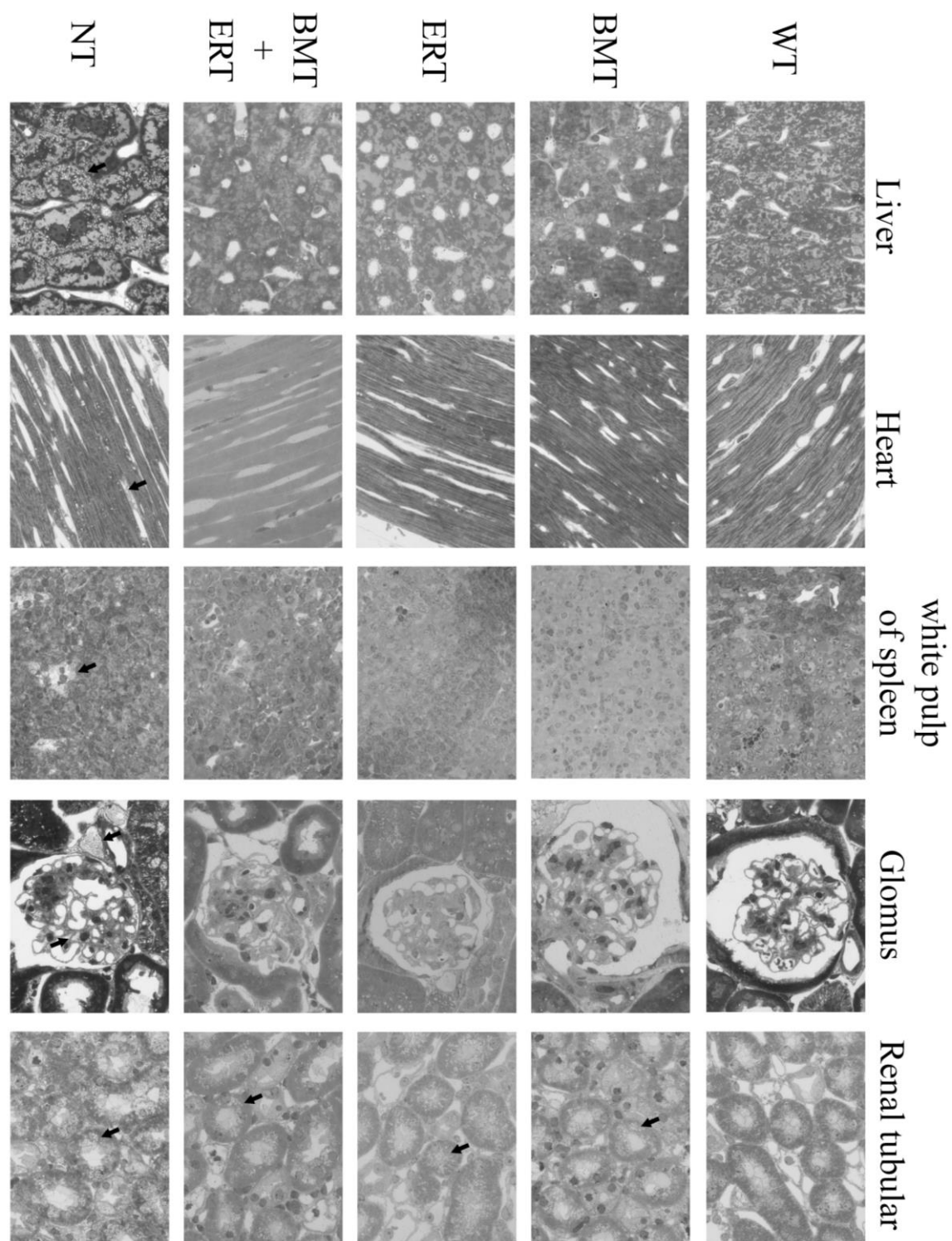


図 6. 治療による病理所見への影響

全ての写真の倍率は 1000 倍である。矢印に示す空胞形成は肥大したライソゾーム病変を示す。すべての治療により、腎臓を除くすべての臓器で空胞形成は消失している。腎臓では、空胞形成の減少はあるも残存しており、組織所見上治療間の差は明らかでない。



### 3-3-3. 尿中 Total GAG への影響

尿中 tGAG は、BMT、ERT、ないしはその両者併用療法によりほぼ正常レベルにまで減少した(図 7)。治療群間に統計学的有意差はなく、BMT と ERT の効果の差異、BMT と ERT の併用効果は認められなかった。

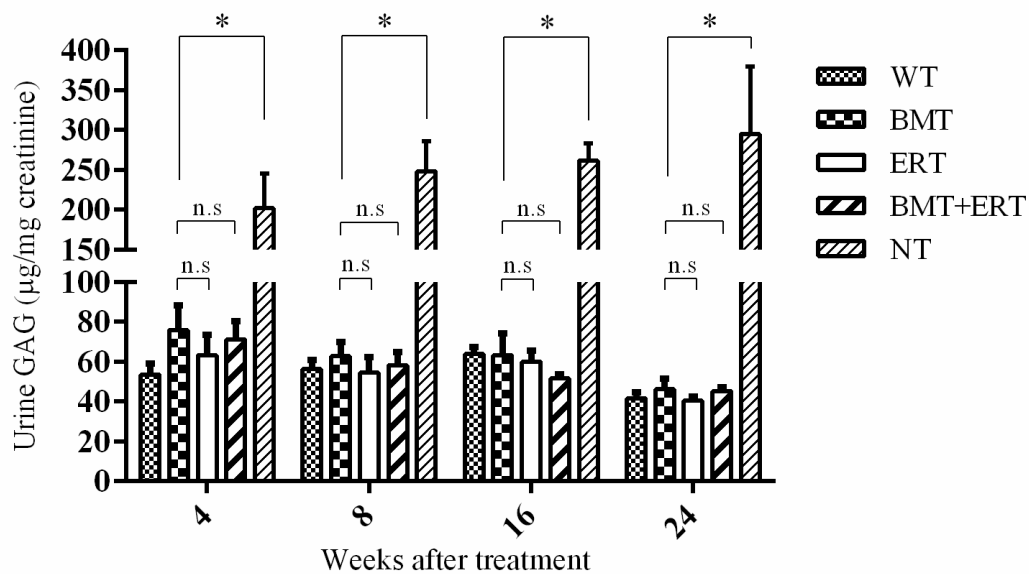


図 7. 尿中 tGAG の減少

アルシアンブルー法を用いて、尿中の tGAG を測定した。測定値を  $\mu\text{g GAG/mg creatinine}$  で示した。それぞれの値を平均 $\pm$ SEM で示した(WT: n=5, BMT: n=5, ERT: n=5, BMT+ERT: n=5, NT: n=6)。4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の tGAG の差異を一元配置分散分析法で評価した。アスタリスクは  $p<0.05$  を示す。“n.s.” は有意差なしを示す。

### 3-4. 行動解析を用いた中枢神経系への治療評価

組織 GAG 測定では、いずれの治療も脳における GAG を減少させなかった。そこで、治療による表現型への影響を評価するため、Y 字迷路を使用し、マウスの行動解析を行った。すべての治療は、MPS II マウスに見られる短期記憶障害、自発的活動量の異常といった行動障害を改善することはなかった(図 8)。

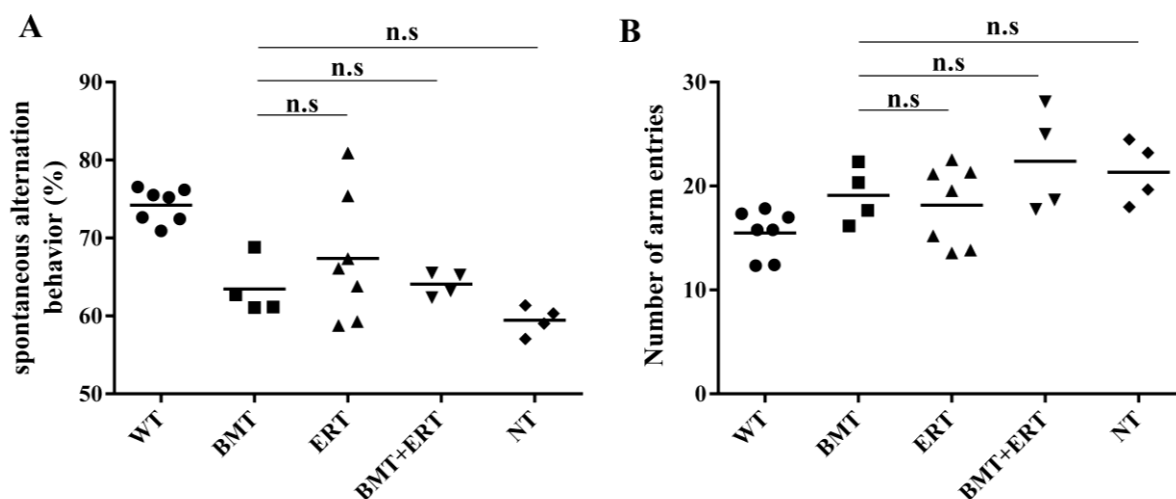


図 8. MPS II マウス行動異常への治療効果

治療開始後 26 週～27 週の間に、Y 字迷路を施行した。(A) 交替行動変化率は空間作業記憶を示す。(B) 総進入回数は自発的活動量を示す。それぞれのシンボルは、個々のマウスのデータを示す。横棒は平均値を示す。4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の測定結果の差異を一元配置分散分析法で評価した。“n.s” は有意差なしを示す。

### 3-5. BMT、ERT、またその両者併用療法による過成長の抑制

治療後のマウスの体重を経時的に測定した(図 9)。MPS II マウスの体重は、ヒトにおける MPS II 患者同様、WT に比べ増加傾向にある [22]。この過成長は、BMT、ERT、またその両者併用療法いずれの治療においても抑制された。治療開始後 27 週の時点で、治療群間に統計学的有意差はなく、過成長抑制に BMT と ERT の効果の差異、BMT と ERT の併用効果は認められなかった。

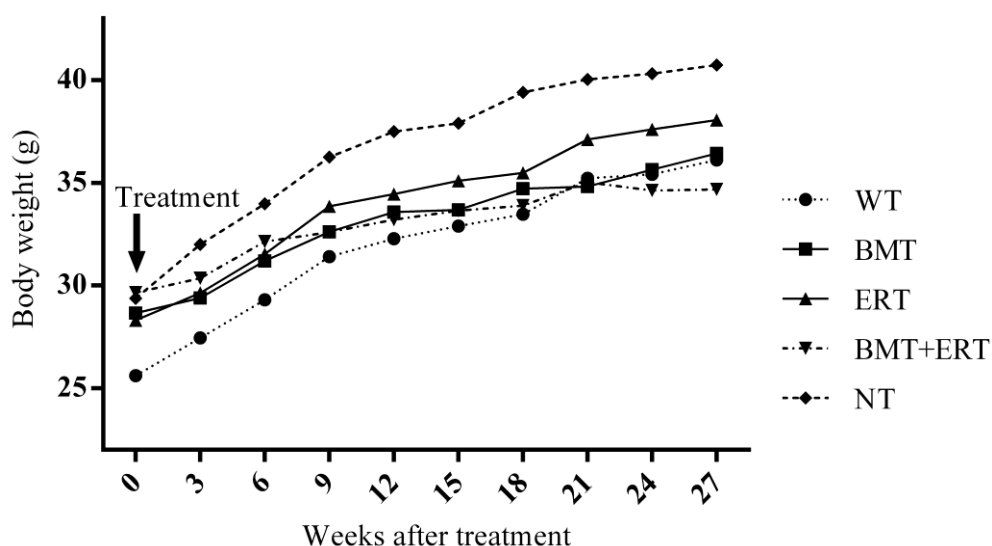


図 9. 治療による MPS II マウス過成長の抑制

治療開始後(生後 9 週)より 3 週毎に、すべてのマウスの体重測定を行った。それぞれのシンボルは、各群の平均値を示す。治療開始 27 週後の体重の差異を、4 群間(BMT, ERT, BMT+ERT, NT)の一元配置分散分析法で評価した。“n.s”は有意差なしを示す (ERT, BMT, BMT+ERT vs. NT;  $p<0.05$ , BMT vs. BMT+ERT; n.s, ERT vs. BMT; n.s)。

### 3-6. 補充酵素に対する IgG 抗体の発現

ERT において、補充酵素に対する IgG 抗体産生の有無を評価するため、治療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 10)。しかしながらこれらの抗体価は、他のライソゾーム疾患モデルマウスへの ERT において観察される発現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 [23]。一方本実験では、血清を 100 倍希釈することで、OD 450 nm 値を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る。

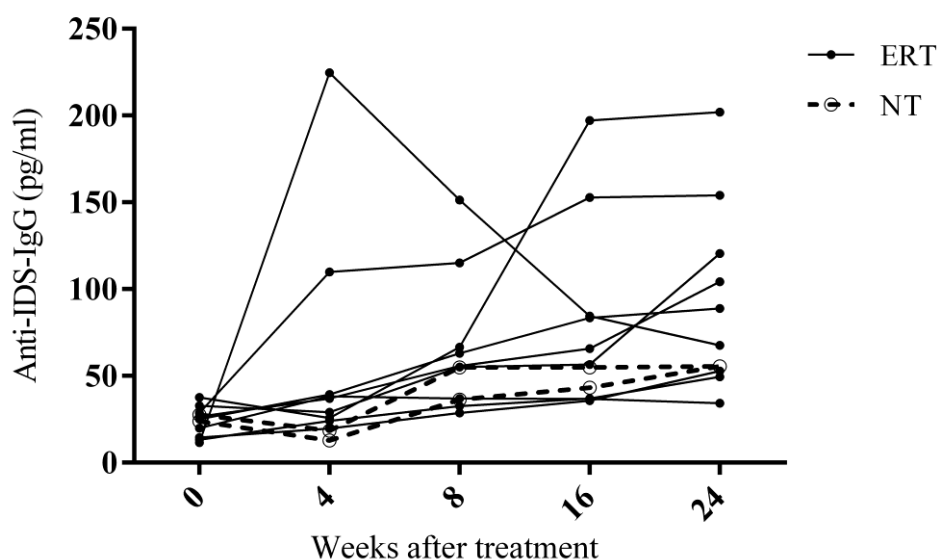


図 10. 経静脈的酵素補充に対する抗 IDS 抗体の発現

ERT 群、NT 群における抗 IDS-IgG 抗体を測定した。実線は、ERT 群における個々のマウスの結果を示す。点線は NT 群における個々のマウスの結果を示す。抗体価を pg/ml で示す。

## 4. 考察

### 4-1. 中枢神経病変に対する BMT の治療効果について

1980 年代初頭、MPS I への BMT の有効性を示した研究結果が報告された [24]。以降、BMT は多くの MPS I 患者に施行されており、推奨されるべき治療の 1 つとなっている [25]。特に、患者年齢が 2 歳未満、IQ70 以上で BMT が施行された場合、中枢神経病変の改善が強く期待される。また動物実験においても、BMT による脳蓄積 GAG の減少が確認されている [26]。一方 MPS I とは対照的に、MPS II に対する BMT には否定的な見解が目立つ [10,11]。これは、MPS II に対する BMT は中枢神経病変への治療効果を持たないという複数の臨床研究に基づくもので [12-15]、現在欧米では MPS II 患者に BMT を積極的に施行することはない。しかしながら近年、本邦より報告された後方視的臨床研究は、BMT が軽症型 MPS II 患者の中枢神経病変や心病変を改善させることを示した [16]。また MPS II に対する BMT の効果において、病理生化学的所見を示した報告はなく、現在 MPS II 患者に対する BMT 施行の可否について一定の見解は得られていない。

そこでこの研究では、MPS II マウスに BMT を施行することにより、脳を含む諸臓器の病理生化学的所見を評価した。本研究結果では、BMT によって脳における酵素活性の上昇を認めることはなく、蓄積 GAG の減少も認めることはなかった。脳における病理学的評価は、無治療マウスの病所見に乏しく評価が困難であった（データは示していない）。また行動解析では、BMT による行動異常の改善は観察されなかった。これらの結果から我々は、BMT は MPS II マウスの中枢神経症状を改善しないと考えた。この所見は同じムコ多糖症である MPS III マウスにおける実験結果にも見られる [27]。しかしながら今回我々は、病理生化学的所見の治療効果判定に蓄積 GAG のみを用いており、BMT の脳への治療効果を評価するには不十分であるかもしれない。MPS II の中枢神経病変への他の治療アプロー

チとして、*ex vivo gene therapy* が考えられる。これは遺伝子治療を行った造血幹細胞を用いることにより、酵素の過発現を期待するものであり、現在いくつかのライソゾーム病で中枢神経系への治療効果が観察されている [28]。脳以外の諸臓器においては、BMT による治療効果が確認された。

#### 4-2. MPS II マウスに対する 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 [3-5]、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注射や高額な医療費は、患者に大きな負担を生じさせている [9]。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わかっていない。そこでこの研究では、MPS II マウスに対する BMT と ERT の効果の差異について検討した。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、補充酵素に対する自己抗体の産生が 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 施行における臨床上の大きな問題となっている [29,30]。今回我々の研究では、抗 IDS 抗体が検出されなかったため、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、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。

#### 4－3．BMT と ERT の併用効果について

ERT が承認される以前、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 MPS VI 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 [31]。またある研究は、BMT 施行後の MPS VI 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身体機能を改善させることができると示した [32]。併用に関する報告として、BMT+ERT 併用療法が MPS I、MPS VI 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 [33-37]。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 単独でも強固な 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。

#### 4－4．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(図 4)。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(図 5)。また心臓における 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 [38]。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, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, 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 [39]。



## 5. 総括

本研究の結果から、MPS II マウスにおける中枢神経病変の改善には、通常の BMT ではなく、遺伝子治療などを含めた他のアプローチが必要であると思われる。またヒトにおいて ERT に対する自己免疫反応を制御することができれば、一部の臓器において ERT は、BMT に比しより効果的な治療であると考えられた。本検討で示された BMT に対する ERT の併用効果は、BMT の治療効果に乏しい患者に追加療法を検討する際の一助となろう。本研究で用いた pGAG 測定は、tGAG 測定に比し治療効果を評価するためのよりよいバイオマーカーになると考えられた。

## 6. 謝辞

本研究において終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました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、大橋十也教授、同大学小児科学講座、井田博幸教授に心より感謝申し上げます。

また、研究へのお導きとこれまでの研究過程で数々の御助言と御指導を賜りました北里大学小児科学、石井正浩教授に心より感謝申し上げます。

さらに、4 年間に渡り大学院での研究を技術的にも精神的にも支えて下さいました東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部の皆様、北里大学小児科学の皆様に深謝申し上げます。

## 7. 引用文献

- [1] Bach G, Eisenberg F, Jr, Cantz M, Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1973;70:2134-38.
- [2] Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Munoz V, et al. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics* 2008;121:e377-86.
- [3] Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet.Med* 2006;8:465-73.
- [4] Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, et al. Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol.Genet.Metab* 2010;99:18-25.
- [5] Muenzer J, Beck M, Eng CM, Giugliani R, Harmatz P, Martin R, et al. Long-term, open-labeled extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genet.Med* 2011;13:95-101.
- [6] Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur.J.Pediatr* 2008;167:267-77.
- [7] Al Sawaf S, Mayatepek E, Hoffmann B. Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed. *J.Inherit.Metab.Dis* 2008;31:473-80.

- [8] Sato Y, Fujiwara M, Kobayashi H, Ida H. Massive Accumulation of Glycosaminoglycans in the Aortic Valve of a Patient With Hunter Syndrome During Enzyme Replacement Therapy. *Pediatr.Cardiol.* 2013;34:2077-9.
- [9] Wyatt K, Henley W, Anderson L, Anderson R, Nikolaou V, Stein K, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: a longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. *Health Technol.Assess* 2012;16:1-543.
- [10] Peters C, Steward CG, National Marrow Donor Program, International Bone Marrow Transplant Registry, Working Party on Inborn Errors, European Bone Marrow Transplant Group. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:229-39.
- [11] Boelens JJ. Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn errors of metabolism. *J.Inherit.Metab.Dis* 2006;29:413-20.
- [12] Shapiro EG, Lockman LA, Balthazor M, Krivit W. Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation. *J.Inherit.Metab.Dis* 1995;18:413-29.
- [13] McKinnis EJ, Sulzbacher S, Rutledge JC, Sanders J, Scott CR. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *J.Pediatr* 1996;129:145-8.
- [14] Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J.Inherit.Metab.Dis* 1999;22:638-48.
- [15] Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: outcome after 7 to 17 years.

J.Pediatr 2009;154:733-7.

- [16] Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, et al. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: a nationwide survey in Japan. Mol.Genet.Metab 2012;107:513-20.
- [17] Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, et al. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. Mol.Genet.Metab 2013;in press
- [18] Garcia AR, Pan J, Lamsa JC, Muenzer J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). J.Inherit.Metab.Dis 2007;30:924-34.
- [19] Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T et al. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. J.Gene Med 2011;13:262-8.
- [20] Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, et al. Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. Mol.Genet.Metab 2012;107:122-8.
- [21] Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, et al. Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. Nat.Chem.Biol 2012;8:197-204.
- [22] Rozdzynska A, Tylki-Szymanska A, Jurecka A, Cieslik J. Growth pattern and growth prediction of body height in children with mucopolysaccharidosis type II.

- Acta Paediatr. 2011;100:456-60.
- [23] Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H et al. Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of alpha-glucosidase in mice. *Mol.Ther* 2012;20:1924-31.
- [24] Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ, Byrom N, Chambers D, Henry K, et al. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1981;2:709-12.
- [25] Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA, International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 2009;123:19-29.
- [26] Wolf DA, Lenander AW, Nan Z, Braunlin EA, Podetz-Pedersen KM, Whitley CB, et al. Increased longevity and metabolic correction following syngeneic BMT in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1235-40.
- [27] Lau AA, Hannouche H, Rozaklis T, Hassiotis S, Hopwood JJ, Hemsley KM. Allogeneic stem cell transplantation does not improve neurological deficits in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Exp.Neurol* 2010;225:445-54.
- [28] Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ, et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol.Ther* 2012;20:1610-21.
- [29] Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArme SL, Heller J, Benjamin D, Young S, et al. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol.Genet.Metab* 2010;99:26-33.

- [30] Banugaria SG, Prater SN, Ng YK, Kobori JA, Finkel RS, Ladda RL, et al. The impact of antibodies on clinical outcomes in diseases treated with therapeutic protein: lessons learned from infantile Pompe disease. *Genet.Med* 2011;13:729-36.
- [31] Whitley CB, Utz JR. Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI): a single dose of galsulfase further reduces urine glycosaminoglycans after hematopoietic stem cell transplantation. *Mol.Genet.Metab* 2010;101:346-8.
- [32] Sohn YB, Park SW, Kim SH, Cho SY, Ji ST, Kwon EK. Enzyme replacement therapy improves joint motion and outcome of the 12-min walk test in a mucopolysaccharidosis type VI patient previously treated with bone marrow transplantation. *Am.J.Med.Genet.A* 2012;158A:1158-63.
- [33] Grewal SS, Wynn R, Abdenur JE, Burton BK, Gharib M, Haase C, et al. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in combination with hematopoietic stem cell transplantation in Hurler syndrome. *Genet.Med* 2005;7:143-6.
- [34] Cox-Brinkman J, Boelens JJ, Wraith JE, O'meara A, Veys P, Wijburg FA, et al. Haematopoietic cell transplantation (HCT) in combination with enzyme replacement therapy (ERT) in patients with Hurler syndrome, *Bone Marrow Transplant* 2006;38:17-21.
- [35] Tolar J, Grewal SS, Bjoraker KJ, Whitley CB, Shapiro EG, Charnas L, et al. Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:531-5.
- [36] Wynn RF, Mercer J, Page J, Carr TF, Jones S, Wraith JE. Use of enzyme replacement therapy (Laronidase) before hematopoietic stem cell transplantation for mucopolysaccharidosis I: experience in 18 patients. *J.Pediatr* 2009;154:135-9.
- [37] Sillence D, Waters K, Donaldson S, Shaw PJ, Ellaway C. Combined Enzyme

Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Mucopolysaccharidosis Type VI. JIMD Rep 2012;2:103-6.

[38] Dickson PI, Ellinwood NM, Brown JR, Witt RG, Le SQ, Passage MB, et al. Specific antibody titer alters the effectiveness of intrathecal enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. Mol.Genet.Metab 2012;106:68-72.

[39] Lawrence R, Brown J.R, Lorey F, Dickson P.I, Crawford B.E, Esko J.D. Glycan-based biomarkers for mucopolysaccharidoses. Mol.Genet.Metab 2013;in press



## 8. 業績目録

### 学術論文

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 2013;in press

### 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(MPS II)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 (日本先天代謝異常学会雑誌 28, p.173) .2012.11.15-17[発表形式: 一般講演 (ポスター発表)]
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).2013.3.15-18[発表形式: 一般講演 (ポスター発表)]
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.2013.7.4-6 [発表形式: 一般講演 (口頭発表)]
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).2013.9.3-6[発表形式: 一般講演 (ポスター発表)]

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 東京.2013.11.27-29[発表形式：一般講演（ポスター発表）]