

学 位 論 文 要 旨

氏 名

秋山 和政



論 文 題 目

「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)

指 導 教 授 承 認 印

石井正浩



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)

秋山 和政

【諸言】 ムコ多糖症 II 型 (MPS II・Hunter 症候群) は、イズロン酸スルファターゼ (IDS) 酵素活性の欠損により全身にグリコサミノグリカン (GAG) が蓄積する X 関連代謝蓄積疾患である。諸臓器に蓄積した GAG は、骨格変形、弁膜症、成長障害、精神発達遅滞等様々な症状を引き起こす。近年開発された酵素補充療法 (ERT) は、早期より治療を開始することでその表現型に改善をもたらしている。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点を持つ。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。しかしながら、中枢神経症状は患者の ADL を損なう重要な問題であり、現在 ERT に代わる新規治療法が望まれている。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ている。一方 MPS II 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。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おり、本邦では、ERT 承認前多くの患者に BMT が施行されている。しかしながら BMT の中枢神経系への効果や、BMT と ERT の治療効果の差異に言及した報告は少ない。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、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。

【方法】 疾患モデルマウスは雌の Hetero と雄の Wild type の交配をもって自家繁殖した。作成したマウスの遺伝子診断には、尾組織より抽出した DNA を使用した PCR 法を用いた。BMT におけるドナーマウスには、Wild type (CD45.2+) と B6.SJL-ptprca (CD45.1+) との交配によって得られるマウス (CD45.1+CD45.2+) を使用した。生後 9 週齢の MPS II マウスに対し、BMT、ERT、BMT+ERT 併用のいずれかの治療を施行した。BMT を施行するマウスには、9Gy の放射線照射を行った後、ドナーマウスより採取した 2.0×10^6 個の骨髄細胞を移植した。ERT を施行するマウスには、ヒト IDS (エラブレース®) 0.5mg/kg を毎週計 27 回投与した。BMT+ERT を施行するマウスには、BMT 施行後 12 週よりヒト IDS 0.5mg/kg を毎週計 15 回投与した。移植におけるドナー細胞の生着は、フローサイトメトリーを用い評価した。マウスを経時的に採血、採尿し、血清の IDS 活性・抗 IDS 抗体、尿中 GAG を測定した。また MPS II に伴う過体重への治療効果を評価するため、毎週体重測定を行った。生後 35~36 週に行動解析のため Y 字迷路を施行した。生後 36 週に解剖し、諸臓器の IDS 活性、GAG を測定、病理学的評価を行った。組織 GAG 測定には、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 Total GAG (tGAG) 測定であり、これは蓄積 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Pathologic GAG(pGAG)測定である。これは二糖単位に消化したGAGをLC/MSを用い測定する方法である。

【結果】BMT後12週に移植細胞の生着率を評価したが、BMT、BMT+ERT併用のいずれの群においても、B細胞、顆粒球、マクロファージにおけるドナー細胞生着率は約90%に達した。T細胞の生着率はともに約70%とやや低い値に留まった。BMT施行後27週に再度生着率の評価を行ったが、結果に変化はなく、移植細胞の安定的な生着が確認された。血清IDS活性は、BMT施行群で、正常の約25%まで上昇した。BMT+ERT併用群でも同様の上昇と持続的な分泌が確認されたが、ERT追加後にさらなる活性の上昇は見られず、BMT群との間に統計学的有意差は認められなかった。ERT群では血清IDS活性を検出することはできなかった。これは補充酵素が1週間以内に循環より消化されることを示している。経過中ERTに対する自己抗体の産生は認めなかった。

BMT単独、ERT単独、併用いずれの治療も、MPS IIマウスの過成長を抑制したが、それぞれの治療群に統計学的有意差は認めなかった。尿中GAGは、全ての治療群においてほぼ正常レベルにまで減少したが、同様にそれぞれの治療群での統計学的有意差は認めなかった。

脳におけるIDS活性は、BMT単独、ERT単独、BMT+ERT併用いずれの治療でも上昇せず、脳に蓄積したGAGを減少させることはなかった。脳におけるGAG測定において、tGAG測定は、無治療MPS IIマウスのGAGの蓄積を検出できなかった。そのためtGAG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かった。しかしながらpGAG測定は、無治療MPS IIマウスのGAGの蓄積を鋭敏に検出し、治療評価を可能にした。Y字迷路による行動解析では、全ての治療は短期記憶障害、自発的活動量異常といったMPS IIマウスの行動異常を改善させることはなく、これは生化学的検査の結果に相容するものであった。

肝臓においては、全ての治療でtGAGないしpGAGの減少が確認されたが、それぞれの治療群における統計学的有意差は認めなかった。心臓では、全ての治療でtGAGないしpGAGの減少が確認された。tGAG減少に、治療間における統計学的有意差は見られなかったが、pGAG測定では、ERTが、BMTに比しよりGAGを減少させることが確認された。また同様に、BMT+ERT併用が、BMT単独に比しよりGAGを減少させることも確認された。脾、腎、肺においてはtGAG測定のみを施行した。脾臓では、全ての治療でtGAGの減少が確認されたが、それぞれの治療間における統計学的有意差は認めなかった。腎臓では、ERT単独、BMT+ERT併用によるtGAGの減少は観察されたが、BMTによるtGAGの減少は確認できなかった。肺では、全ての治療でtGAGの減少が確認された。そしてERTないしBMT+ERT併用が、BMTに比しよりGAGを減少させることが観察された。

まとめると、脳において蓄積したGAGはいずれの治療でも減少しなかった。そして、ERTは心、肺、腎においてBMTよりもよりGAGを減少させた。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。

【考察】1980年代初頭、ムコ多糖症I型(MPS I)に対するBMTの治療効果が報告された。以降、BMTは多くのMPS I患者に施行されており、中枢神経病変を含む諸症状の改善が報告され

ている。しかしながら MPS II に対する BMT には否定的な見解が目立ち、これは中枢神経病変への治療効果がないという複数の臨床研究に基づく。一方近年本邦より報告された臨床研究は、BMT が、軽症型 MPS II 患者の中枢神経病変を改善させることを示した。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 患者への 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 マウスに対し BMT を施行し、その治療効果について病理生化学的評価を行った。我々の研究結果では、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。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。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。

2007 年に ERT が本邦で承認される前には、多くの MPS II 患者が BMT による治療を受けていた。しかしながら、MPS II の BMT と ERT の治療効果の差異に言及した報告はない。我々の研究では、ERT は、心、肺、腎において BMT よりもより GAG を減少させた。しかしながら他のライソゾーム病においては、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、これは臨床上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。

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。これらの結果から、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示唆される。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。

この研究で用いた pGAG 測定は、MPS II マウスと Wild type における脳蓄積 GAG の差を明らかにした。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。よって pGAG 測定は、MPS II における治療効果を鋭敏に判定させうるバイオマーカーであると考ええる。この新たな定量方法は、他のムコ多糖症の診断、治療効果判定にも有効であると考えられ、今後新生児スクリーニングへの応用も期待される。

【結語】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。