

臨床遺伝学公開シンポジウム 2011

「リソソーム病の診断と治療のために」

日時 : 2011年3月11日(金) 13:00~16:00

場所 : 明治薬科大学 講義棟1階104教室

2011年3月11日
明治薬科大学 臨床遺伝学講座

目次

臨床遺伝学公開シンポジウム 2011 開催に際して	1
プログラム	2
演題 1: 臨床遺伝学講座では、このような研究をしています 櫻庭 均	3
演題 2: 慢性の心及び腎疾患の患者さんの中から多くのファブリー病を見つけました 田中利絵	4
演題 3: ファブリー病の確定診断の一つ「尿中のグロボトリアオシルセラミドの検出方法」を 紹介します 川島育夫	5
演題 4: Lyso-Gb3 はファブリー病の有用なバイオマーカーです 兔川忠靖	6
演題 5: 酵母を利用したファブリー病治療薬の開発を目指します 月村考宏	7
演題 6: 組み換え酵素薬の取り込みに関わる分子を探索しています 鈴木俊宏	8
演題 7: 酵素補充療法での酵素製剤に対する免疫反応の制御を目指します (招待講演) 東京慈恵会医科大学 大橋十也	9
演題 8: ファブリー病の新規治療薬候補である改変型 NAGA の生産と精製を目指します 森山厚子	10
演題 9: 改変型 NAGA の治療効果を評価するためのヒト化ファブリー病モデルマウスを 作製しました 田島陽一	11
演題 10: ザンドホッフ病における神経系細胞に対する酵素補充モデルを構築しました 黒田麻祐子	12
演題 11: ザンドホッフ病のモデルマウスから iPS 細胞を作りました 薬理学教室 大石一彦	13
演題 12: 酵母で作製したリソソーム酵素で GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスを 治療しました (招待講演) 徳島大学 辻 大輔	14
演題 13: 脳障害を伴うリソソーム病のバイオマーカーを探索しています 児玉 敬	15
演題 14: 酵母を使ってポンペ病に対する酵素薬を開発しています 千葉靖典	16

当日は、どうぞ発表者も含めカジュアルな服装で御出で下さい。

臨床遺伝学公開シンポジウム 2011 開催に際して

明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座
教授 櫻庭 均

大日本住友製薬株式会社およびジェンザイム・ジャパン株式会社の御好意により、明治薬科大学に臨床遺伝学講座が設立され、遺伝性難病研究を開始して2年が過ぎました。この間、多くの共同研究施設からの御協力を得て、分析化学教室と共同で、リソソーム病の診断と治療のための研究を行って来ました。そして、少しずつではありますが、ささやかな成果が上げられるようになりました。今回、その研究結果を公開シンポジウムで発表させて頂きます。御指導、ご鞭撻を頂き、難病克服のために役立てる様、頑張りたいと思いません。

臨床遺伝学

教授	櫻庭 均
客員教授	伊藤孝司
	千葉靖典
	田島陽一
	川島育夫
	有岡（川村）眞知子
研究技術員	田中利絵
	森山厚子

分析化学

教授	櫻庭 均
准教授	兎川忠靖
講師	鈴木俊宏
大学院生	月村考宏
	黒田麻祐子
	児玉 敬
秘書	田中聖恵子
会計	池田範子

臨床遺伝学 シンポジウム 2011 プログラム
「リソソーム病の診断と治療のために」

- 13:00-13:10 臨床遺伝学講座では、この様な研究をしています
櫻庭 均
- 13:10-13:20 慢性の心及び腎疾患の患者さんの中から多くのファブリー病を見つけました
田中利絵
- 13:20-13:30 ファブリー病の確定診断の一つ「尿中のグロボトリアオシルセラミドの検出方
法」を紹介します
川島育夫
- 13:30-13:40 Lyso-Gb3 はファブリー病の有用なバイオマーカーです
兎川忠靖
- 13:40-13:50 酵母を利用したファブリー病治療薬の開発を目指します
月村考宏
- 13:50-14:00 組み換え酵素薬の取り込みに関わる分子を探索しています
鈴木俊宏
- 14:00-14:10 休憩
- 14:10-14:30 酵素補充療法での酵素製剤に対する免疫反応の制御を目指します
(招待講演) 東京慈恵会医科大学 大橋十也
- 14:30-14:40 ファブリー病の新規治療薬候補である改変型 NAGA の生産と精製を目指します
森山厚子
- 14:40-14:50 改変型 NAGA の治療効果を評価するためのヒト化ファブリー病モデルマウスを
作製しました
田島陽一
- 14:50-15:00 ザンドホッフ病における神経系細胞に対する酵素補充モデルを構築しました
黒田麻祐子
- 15:00-15:10 ザンドホッフ病のモデルマウスから iPS 細胞を作りました
薬理学教室 大石一彦
- 15:10-15:30 酵母で作製したリソソーム酵素で GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスを治
療しました
(招待講演) 徳島大学 辻 大輔
- 15:30-15:40 脳障害を伴うリソソーム病のバイオマーカーを探索しています
児玉 敬
- 15:40-15:50 酵母を使ってポンペ病に対する酵素薬を開発しています
千葉靖典
- 15:50-15:55 まとめ
- 16:00-17:20 懇親会 (厚生棟 1階食堂)
開会のあいさつ 学長 久保陽徳
乾杯の言葉 理事長 住吉義通
懇談
閉会のあいさつ 櫻庭 均
- 17:20-17:30 臨床遺伝学 研究室見学ツアー

臨床遺伝学では、この様な研究をしています

明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座

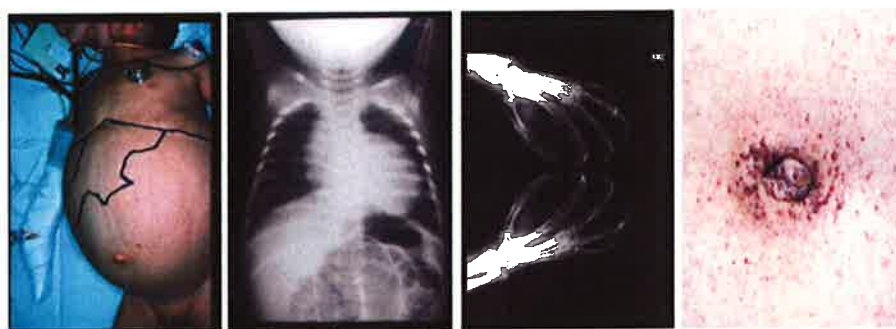
櫻庭 均

臨床遺伝学講座では、多くの研究施設と協力し、遺伝性難病、特に細胞内のリソソームで働く酵素の活性低下によって起こる一群の「リソソーム病」の研究を行っています。リソソーム病は、これまで診断が難しく、有効な治療法もない病気と考えられてきましたが、近年、遺伝子工学で生産した組み換え酵素を用いた酵素補充療法が導入されて治療が可能となり（図）、その研究が飛躍的に進んでいます。

私たちは、リソソーム病の早期診断法の確立（田中、川島）、バイオマーカーの発見（兎川、児玉）、や新しい治療法の開発（鈴木、月村、森山、田島、黒田、千葉）のための研究を行っています。また、リソソーム病の分子病態を解明して治療法をさらに改良するための共同研究（薬理学教室 大石先生、東京慈恵会医科大学 大橋先生、徳島大学 辻先生）を進めています。

こうした研究の成果の概要に関しては、臨床遺伝学のホームページに掲載しています。また、リソソーム病の中で最も発生頻度が高く、臨床的に重要な疾患であるファブリー病に関する遺伝子変異、臨床型や疾患責任酵素の立体構造変化の情報をデータベース（www.fabry-database.org）で公開していますが、今年度は更に構造変化に関する詳しい情報を追加すると共に、利用者にとってわかり易くなるように改良を加えました。

図. 酵素補充療法が可能なリソソーム病



ゴーシェ病

ポンペ病

ムコ多糖症Ⅰ型、
ムコ多糖症Ⅱ型、
ムコ多糖症Ⅵ型

ファブリー病

慢性の心及び腎疾患の患者さんの中から多くのファブリー病をみつけました

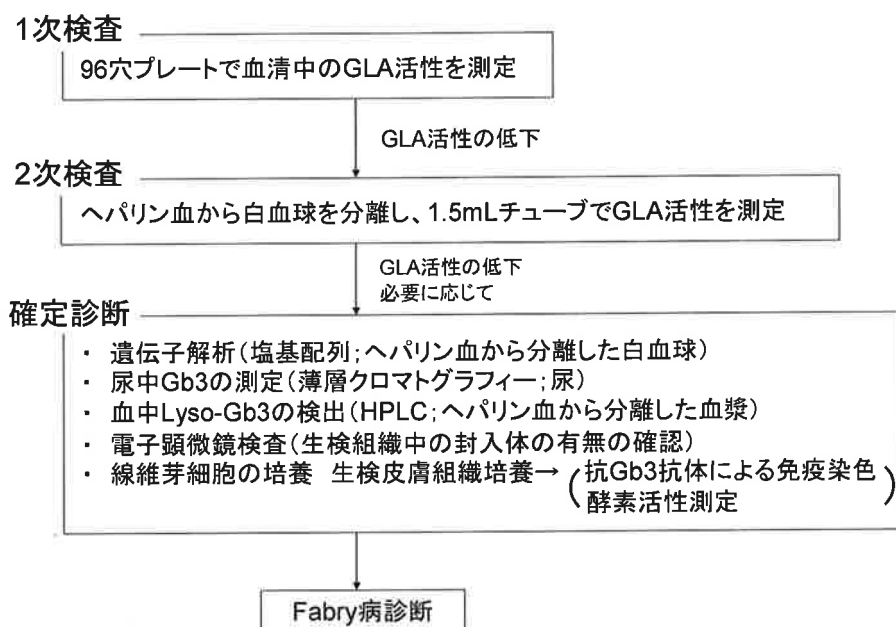
明治薬科大学 臨床遺伝学講座

田中 利絵

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性低下によって起こる X 染色体性の遺伝病で、国の特定疾患「難病」に指定されています。ファブリー病では、腎障害、心障害や脳血管障害等の症状を来すため、これらの症状を示す患者さんはファブリー病のハイリスク群と考えられます。しかし、このようなファブリー病のハイリスク群からファブリー病の患者さんを発見するためには、多数の試料を迅速に測定できる診断システムが必要になります。我々の研究室では、血清中の GLA の活性を、96 ウェルプレートを使用して測定する 1 次検査を行うことにより、多数の試料を迅速に処理できるようなハイリスク・スクリーニングのシステムを作りました。そして、1 次検査で GLA の活性がカットオフ値よりも低い場合には、2 次検査として、白血球中の GLA の酵素活性を測定しました。さらに必要に応じて、GLA 遺伝子解析を含めた確定診断を行っています。

現在までに、この診断システムを使って 1000 人以上のハイリスク群の男性患者さんを検査し、10 人以上のファブリー病患者さんを見つけています。

今後も、このシステムを使って検査をすることにより、ファブリー病の患者さんに適切な診断を行っていきます。



ファブリー病ハイリスク・スクリーニングの流れ

ファブリー病の確定診断の一つ「尿中のグロボトリアオシルセラミドの検出方法」を紹介します

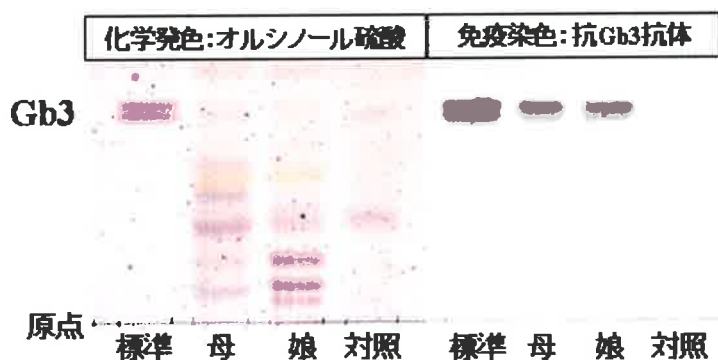
明治薬科大学・臨床遺伝学講座
川島育夫

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性の消失および低下によって起こる遺伝性の難病で、本来当該酵素により分解されるべき基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) や lyso-Gb3 が細胞内のリソソームにたまる全身性の糖脂質蓄積症です。ファブリー病の発生頻度は最近 1,250-4,000 人に 1 人と報告され、従来言われていた発生頻度より意外に高いことが判明しています。

ファブリー病のハイリスク・スクリーニングでは、血清を用いた 1 次検査と白血球を用いた 2 次検査で GLA 活性の測定を行なっています。しかしながら、GLA 活性測定のみでの診断が難しい場合 (女性患者) は更に、1) 生化学的診断として、尿中の Gb3 の検出や血中の Lyso-Gb3 の検出、2) 病理学的診断、3) 遺伝子診断を組み合わせで行います。その結果からファブリー病の診断を行います。

今回、生化学的診断として用いられている「尿中の Gb3 の検出方法」について紹介します。まず、ファブリー病が疑われる患者の尿を遠心し、沈渣を分取します。沈渣からクロロホルム/メタノール混液により総脂質を抽出します。得られた総脂質分画を薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離分析を行い、Gb3 の存在を確認します。Gb3 のバンドが確認できない場合は、抗 Gb3 抗体を用いた TLC-免疫染色で確定します。これにより、尿量数 ml から Gb3 の存在を確認できます。

TLCによる尿中Gb3の検出例



ファブリー病患者である母とその娘の診断のための Gb3 の解析

母、娘、及び対照 (非ファブリー病成人) の尿から総脂質を抽出。原点に各試料を乗せ、展開する。その後、化学発色と免疫染色を行う。

「結果」
対照には認められない Gb3 のバンドを、母と娘に確認する。

Lyso-Gb3 はファブリー病の有用なバイオマーカーです

明治薬科大学 分析化学教室

兔川忠靖

ファブリー病に対する診断や治療効果を判断するためのバイオマーカーは重要ですが有用とされるものが未だ少ないのが現状です。 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の主要な基質で、組織に蓄積するグロボトリアオシルセラミド (Gb3) はその候補としてこれまでよく用いられてきましたが、最近、Gb3 の誘導体である Lyso-Gb3 がファブリー病患者の血中で増加していること、更に Lyso-Gb3 は腎障害を惹起することが明らかになり、注目されています。昨年の本シンポジウムで、ファブリー病患者の Lyso-Gb3 血中濃度がヘミ接合体患者、ヘテロ接合体患者、健常人では明確に異なる分布を示すことをお話しました。そこで、心臓や腎臓などの臓器における Lyso-Gb3 の蓄積量を測定し、さらに臓器での蓄積量が血中のそれらの濃度と相関関係にあるのか、ファブリー病モデルマウスを用いて検討を行いました。

野生型マウスの腎臓、肝臓、心臓、脾臓や肺臓における Lyso-Gb3 の含量はすべて 0.01nmol/g 湿重量以下、さらに血漿中 Lyso-Gb3 濃度も 2 nmol/L 以下でした。これに対して、ファブリー病モデルマウスの血漿、臓器組織ではいずれも著しい Lyso-Gb3 の増加が認められました。さらに、増加した Lyso-Gb3 は組み換えヒト GLA の投与により、有意に減少しました。これらの結果から Lyso-Gb3 は、ファブリー病の治療における有用なバイオマーカーになると考えます。

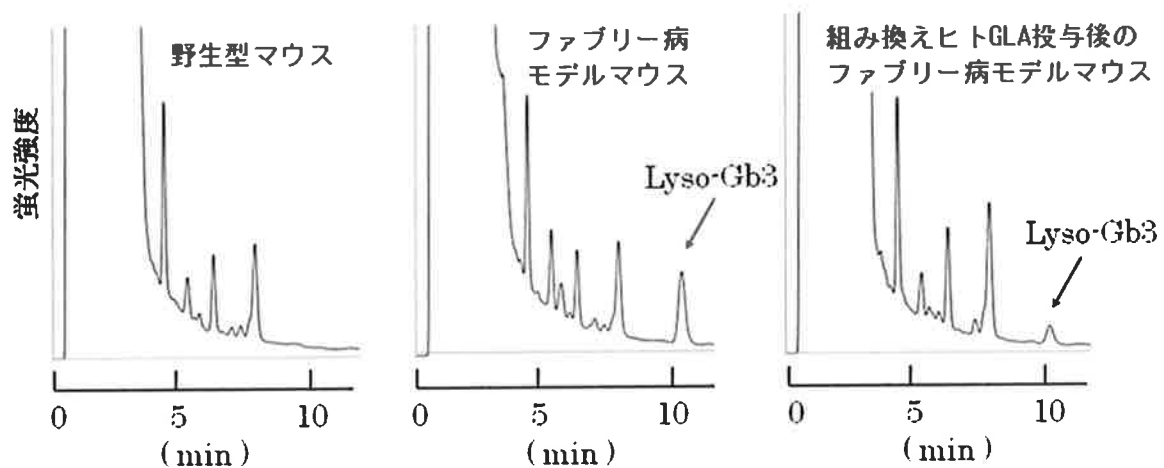


図 マウス腎臓抽出液のクロマトグラム

酵母を利用したファブリー病治療薬の開発を目指します

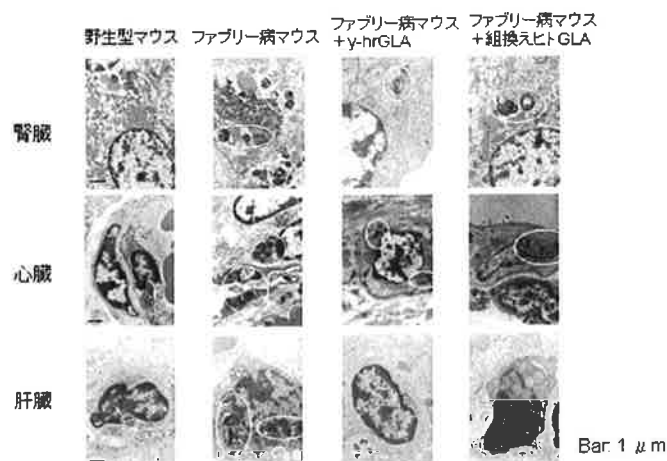
明治薬科大学 分析化学教室

月村 考宏

近年、ファブリー病の治療として、哺乳類由来の細胞で生産した組換えヒト α -ガラクトシダーゼ A (GLA) を用いた酵素補充療法が導入され、その有効性が示されています。しかし、これらの製剤は、その生産過程でウシ血清を用いるため、哺乳類間感染性微生物の混入の恐れや、高額であるといった問題点が指摘されています。そこで我々は、生産過程でウシ血清を必要とせず、生産性に優れ、遺伝子の改変が行いやすいメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いて、組み換えヒト GLA (yr-hGLA) を作製し、これをファブリー病モデルマウスへ投与して、その効果を解析しました。

GLA は糖蛋白質であり、通常、酵母を用いて生産した GLA では、酵母特有の糖鎖が結合してしまいます。また、体内に投与された GLA は、主に細胞表面にあるマンノース-6-リン酸 (M6P) 受容体を介して、細胞内に取り込まれると考えられています。そこで、我々は、ヒト型糖鎖の作製と、M6P 含量の増加を目指し、*OCHI* 遺伝子を破壊し、*MNN4* 遺伝子を強発現させた *O. minuta* 株を用いて yr-hGLA を作りました。そして、この yr-hGLA をファブリー病モデルマウスに投与したところ、yr-hGLA は既存の酵素補充療法薬よりも標的臓器である腎臓への取り込み量が増加していました。さらに、臓器に取り込まれた yr-hGLA は、各臓器に蓄積していた糖脂質 (グロボトリアオシルセラミド、グロボトリアオシルスフィンゴシン) の量を減少させると共に、病理的変化を示す封入体数を減少させました。

安価に製造でき、腎臓に取込まれ易い yr-hGLA は、ファブリー病の新たな酵素補充療法薬として有望であると考えられます。



yr-hGLA を投与したファブリー病モデルマウスにおける各臓器の電子顕微鏡像

組換え酵素薬の細胞内取り込みに関わる分子を探索しています

明治薬科大学 分析化学教室

鈴木 俊宏

リソソーム病に対する酵素補充療法（ERT）では、血中に投与された組換え酵素薬が全身に循環し、標的臓器に取り込まれ、蓄積基質を分解します。臓器および細胞への組換え酵素の取り込みは、これまでマンノース-6-リン酸レセプター（M6PR）を介した取り込みが主経路であるとされています。しかしながら、当教室の検討から、それだけでは説明がつかないこと、また最近別の分子が腎臓における取り込みに関与しているのでは？という報告があることから、私たちは「M6PR 以外の取り込み機構を見つけよう」と考え、siRNA を用いて M6PR の発現を抑制し、その状態下での α -ガラクトシダーゼ A の取り込み量を調べました。その結果、培養繊維芽細胞においては、M6PR 抑制下で、有意な酵素取り込み量の減少が認められました（図）。今後は、他の臓器由来細胞での酵素活性取り込み実験等のデータの蓄積を進め、M6PR 抑制下でもリソソーム酵素の取り込みが減少しない細胞を探索します。そして、その細胞を用いてリソソーム酵素の細胞内取り込みに関わる分子を見いだします。

特に、M6PR タンパク質発現量の少ない腎臓における M6PR 非依存的な取り込み機構の探索を中心に、酵素取り込み機構を解明していきます。

腎臓における新しい取り込みメカニズムを見つけ出すことは、腎症状を主症状とするファブリー病などの ERT に新たな展開をもたらすことが期待されます。

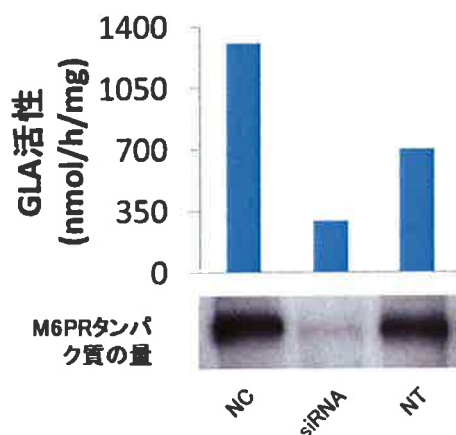


図 M6PR発現抑制時の当該タンパク質レベルと組み替え酵素の取り込み量

NC: ネガティブコントロール
NT: ノンリートコントロール

酵素補充療法での酵素製剤に対する免疫反応の制御を目指します

東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部・同大小児科 大橋十也

ライソゾーム病では、現在6疾患に対して酵素補充療法が行われていますが酵素製剤に対する抗体の出現は治療効果を減弱させる可能性があることが報告されています。私たちもファブリー病の酵素補充療法において発生する酵素に対する抗体は中和活性をもち、その抗体価が高い患者さんでは蓄積物質の減少が抑性されていることを見出しました。ポンペ病でもやはり、発生する抗体は治療効果を阻害することが報告されています。今回、ポンペ病をモデルに酵素補充療法での酵素製剤に対する抗体の発生を制御する方法を、マウスを用いて検討しました。最初に試したのが経口免疫寛容です。ヒトは異種蛋白を経口摂取していますが、それに対して免疫応答が起きることはありません。それは腸管には免疫寛容を誘導する機構が備わっているからです。それを利用して酵素製剤をマウスに経口投与し、その後、欠損酵素でマウスを免疫したところ IgG 抗体ばかりではなく IgE 抗体の発生も著しく抑制されました。しかし、この方法は非常に大量の酵素が必要なことが問題点でした。次に抗リンパ球抗体である抗 CD3 抗体を用いる免疫寛容導入を試しました。これは酵素補充療法における抗体の産生は CD4 陽性 T 細胞依存性であるためです。マウスに抗 CD3 抗体を投与して、その後、酵素補充療法を行うと有意に IgG、IgE の抗体の産生が抑えられました。その後、再度、酵素製剤をチャレンジしても抗 CD3 抗体投与群では抗体価の上昇は認められませんでした。次に既に存在している酵素製剤に対する抗体が抗 CD3 抗体により減弱するか否かも検討したところ、すでに抗体が出来ていても効果があることが判明しました。以上の実験はワイルドタイプのマウスを用いて実験しました。モデルマウスを使用すると、酵素製剤に対する強い過敏反応が起きマウスが全て死亡してしまうからです。よってこの致死性の過敏反応にも効果があるかを検討したところ酵素製剤投与前の抗 CD3 抗体の投与は過敏反応を抑制しマウスの生存期間を有意に伸ばすことが判明しました (図、 $p<0.0001$)。免疫寛容導入のメカニズムについては現在検討中ですがエフェクター細胞である CD4+細胞の減少と制御性 T 細胞の上昇がその要因と考えられました。

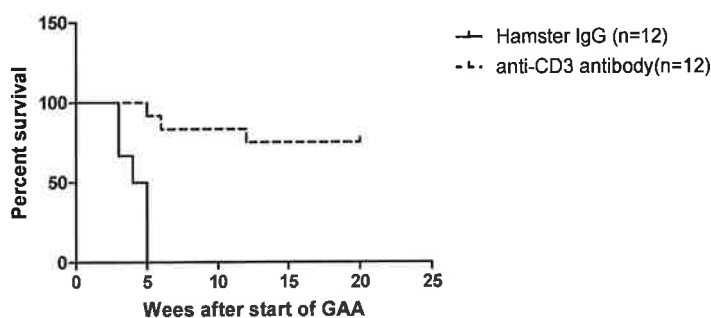


図 カプランマイヤー法で両群の生存率を比較しました。

ファブリー病の新規治療薬候補である改変型 NAGA の生産と精製を目指します

明治薬科大学 臨床遺伝学講座

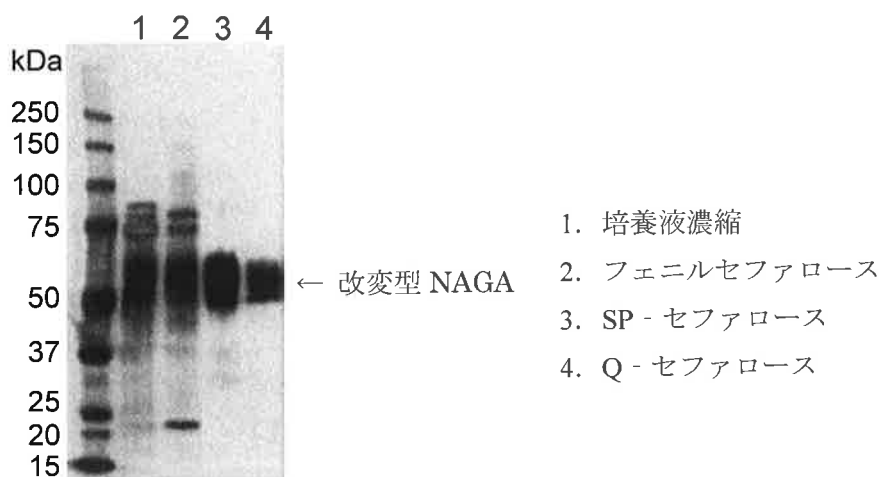
森山 厚子

現在、ファブリー病に対しては、組換えヒト α -ガラクトシダーゼ A (GLA) を 2 週間に 1 回の割合で点滴投与する酵素補充療法が行われており、その有効性が示されています。しかし、ファブリー病の男性患者さんの殆どは、GLA を生体内に持っていないため、組換えヒト GLA を繰り返し投与すると、それを異物と認識してしまい、GLA に対する抗体を作ってしまう。このため、生産された抗体により、アレルギー反応等の副作用を起こしたり、その効果が失われてしまう等の問題が生じています。

私達は、免疫反応を起こさない新しい酵素補充療法治療薬の開発を目指し、ファブリー病患者さんがもともと体内に持っていて、GLA に非常に似た立体構造をとる α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) の活性部位のアミノ酸を 2 つ換えて、GLA の活性を持つようにした改変型 NAGA を作製しました。そして、この酵素はファブリー病マウスに対して効果があることが示されています。

今後さらに薬剤開発を進めていくためには、大量の改変型 NAGA が必要となります。そこで、改変型 NAGA を高発現し培地中に分泌するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を樹立しました。さらに、その培地から改変型 NAGA を効率よく精製するため、フェニルセファロースカラム、SP-セファロースカラム、Q-セファロースカラムを用いた精製法を確立しました。これにより、100 倍に精製した改変型 NAGA を 30% の回収率で得ることができました。

今後は、この精製した改変 NAGA を用いて、創薬を目指して更なる検討を行っていきます。



精製した改変型 NAGA の銀染色像

改変型 NAGA の治療効果を評価するためのヒト化ファブリー病モデルマウスを作製しました

明治薬科大学・臨床遺伝学講座

田島陽一

ファブリー病は、X-連鎖性の遺伝形式をとる α -ガラクトシダーゼ A 欠損症です。現在、酵素補充療法が実用化されているものの、酵素タンパク質を欠損している患者では、免疫寛容がないために、補充された酵素タンパクに対して、抗体産生やアレルギー反応を起こすなどの問題点が指摘されています。さらに、十分な治療効果が得られにくいという課題があります。これらの問題点を解決するために、私たちは、 α -ガラクトシダーゼ A と構造が類似した、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) に着目し、2アミノ酸を改変することにより、 α -ガラクトシダーゼ A の基質であるグロボトリアオシルセラミド(Gb3) に対する酵素活性を持つ改変型 NAGA を作製しました。NAGA は、ファブリー病患者でも免疫寛容になっている酵素タンパクなので、改変型 NAGA を投与すると副作用が少ないことが期待できます。この改変型 NAGA を用いた酵素補充療法を実現するために、改変型 NAGA の治療効果の評価できるファブリー病モデルマウスが必要になります。そこで、ヒト NAGA を肝臓特異的に発現して免疫寛容を獲得したファブリー病モデルマウスを作製しました。今後、このモデルマウスを用いて改変型 NAGA による酵素補充療法を検討することを計画しています。

ファブリー病患者を模倣した評価マウスの作製



ザンドホッフ病における神経系細胞に対する酵素補充モデルを構築しました

明治薬科大学 分析化学教室

黒田 麻祐子

ザンドホッフ病(SD)は、リソソーム性 β -ヘキササミニダーゼ A (Hex A)を構成している β -サブユニットの遺伝子に変異が生じて Hex の活性低下が起こり、本来分解される筈の基質 GM2 ガングリオシド等の糖複合体が中枢神経系に過剰蓄積して、重篤な神経障害をもたらす遺伝病です。私たちは、SD の病態を解明し、その結果を治療法開発に応用することを目的として、SD モデルマウスと野生型(WT)マウスの胎児の終脳からニューロスフェア(NS)を樹立しました。この SD モデルマウス由来 NS および NS から分化させた培養神経系細胞は SD の生化学的特徴を有していることが確認できました。そこで、SD モデルマウス由来培養神経系細胞に組み換えヒト Hex A 酵素を添加し、Hex 活性測定および電子顕微鏡による病理学的解析を行いました。Hex A 酵素添加後の SD モデルマウス由来培養神経系細胞では、Hex A 活性の上昇および GM2 ガングリオシドの蓄積による層状封入体の減少が確認できました。今回樹立した SD モデルマウス由来 NS は、SD としての生化学的特徴を持ち、神経系細胞へ分化することから、神経系における SD の病態解析や酵素補充療法における神経系への酵素取り込み効率等の検討や新規酵素の開発に役立つと考えられます。

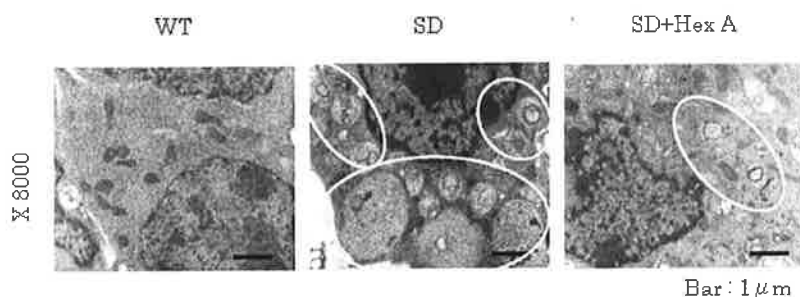


図. ヒト組み換えHex A酵素添加によるSDモデルマウス由来培養神経系細胞における病理学的所見の変化

ザンドホッフ病のモデルマウスから iPS 細胞を作りました

明治薬科大学 薬理学教室

小川 泰弘、大石 一彦

iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は、体を構成している細胞に数種類の遺伝子を導入することで誘導される幹細胞です。iPS 細胞は、ES 細胞（胚性幹細胞）と同様な性質を持ち、体を構成する臓器や組織の細胞を作ることができます。私たちは、ザンドホッフ病（SD）の病態解明と新たな治療法の開発を目的として、SD モデルマウスの細胞から iPS 細胞（SD-iPS 細胞）を樹立しました（図）。

まず、GM2 ガングリオシドの蓄積を調べたところ、SD-iPS 細胞では、野生型マウス由来の iPS 細胞と比較して細胞内の GM2 ガングリオシドの蓄積量が多いことがわかりました。次に、SD-iPS 細胞が体を構成するさまざまな細胞を作ることができるか調べたところ、SD-iPS 細胞は、神経、心臓、筋肉、肝臓などの細胞を作ることができました。また、SD-iPS 細胞をヌードマウスに移植すると、体のさまざまな組織からできている奇形腫を作ることもしかりました。

今回樹立した SD モデルマウス由来の iPS 細胞 は、SD としての生化学的特徴を持ち、体を構成する種々の細胞を作ることができることから、SD の病態解明や治療法の開発などに幅広く利用できると期待されます。

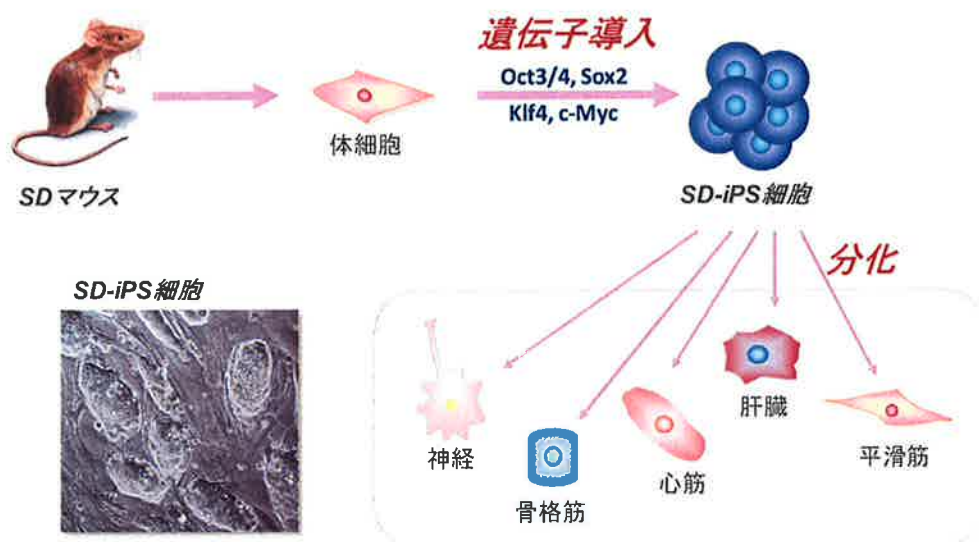


図 ザンドホッフ病モデルマウスから樹立したiPS細胞

酵母で作製したリソソーム酵素で GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスを治療しました

1 徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 創薬生命工学分野

2 明治薬科大学 臨床遺伝学講座 客員研究員

辻 大輔 1、千葉靖典 2、伊藤孝司 1,2

GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム酵素である β -ヘキササミニダーゼ (Hex) に関連する遺伝子の変異が原因で、GM2 ガングリオシドと呼ばれる糖脂質がリソソームに過剰蓄積することで発症する先天性の代謝異常症です。この疾患は、脳を含む中枢神経系の機能が低下し、重篤な神経症状をもたらしますが、現在のところ有効な治療法が存在しません。

そこで我々は、GM2 ガングリオシドーシスに対する新規の治療法を開発するために、特殊な酵母で作製した組換えリソソーム酵素を用いて、モデルマウスの脳内に補充することを試みました。

症状が現れ始める生後 10 週のモデルマウス脳室内に組換え Hex の投与を行うと、たった 1 回の投与でコントロール群 (生理食塩水を投与) と比較して、寿命が約 2 週間延長し、運動機能の改善も認められました。さらに詳細な解析を行ったところ、投与した酵素は脳全体に広がっており、実際に神経細胞に取り込まれて蓄積していた GM2 ガングリオシドを分解しておりました。特に小脳では、ケモカインと呼ばれる一種の炎症性物質の産生が抑えられており、これが寿命の延長及び運動機能の改善に大きく関与していることが明らかになりました。

今回得られた結果は、GM2 ガングリオシドーシスだけでなく、神経症状を伴うリソソーム病に対する脳内酵素補充療法の可能性を広げ、さらに酵母を用いた製剤の利用が有用であることを示しております。

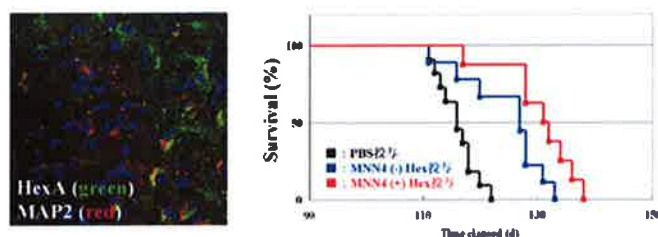


図 酵素補充後の脳における HexA 分布 (左) 及び寿命の延長 (右)

脳障害を伴うリソソーム病のバイオマーカーを探索しています

明治薬科大学 分析化学教室

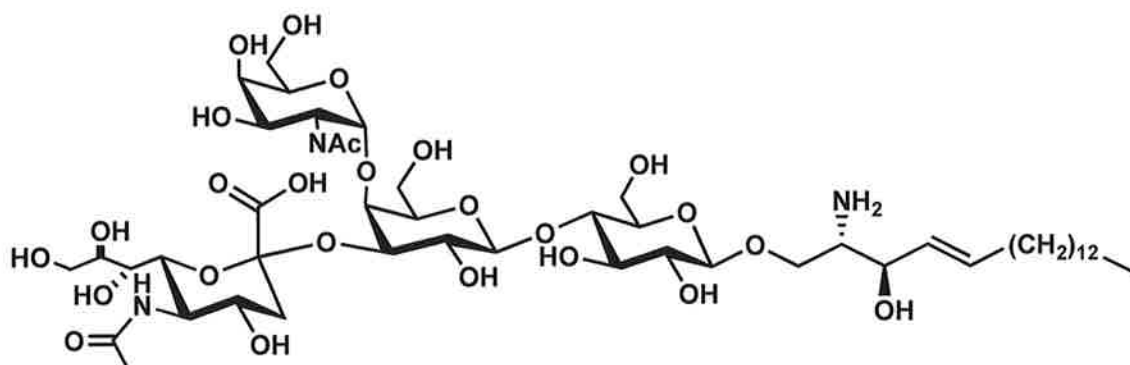
児玉 敬

GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム酵素ヘキササミニダーゼ (Hex) アイソザイムの活性低下 (テイサックス病及びザンドホッフ病) や酵素の活性化因子の欠損 (GM2 活性化因子欠損症) により、GM2 ガングリオシド等の糖複合体が蓄積し、脳障害を引き起こす遺伝性難病です。

現在、GM2 ガングリオシドーシスに対する治療薬が開発段階にあり、診断のためのバイオマーカーが重要になっています。これまで、GM2 ガングリオシドーシスの診断には、主に血清や白血球中の Hex アイソザイムの活性測定が行われてきました。しかし、Hex アイソザイムの活性測定だけでは、上手く診断を下せない例もあり、必ずしも十分とは言えませんでした。私たちは、GM2 ガングリオシドーシスの神経系に蓄積する GM2 ガングリオシドのリゾ体 (Lyso-GM2) に着目し、バイオマーカーとして役立つか否か調べるため、ザンドホッフ病モデルマウスの脳と血漿、GM2 ガングリオシドーシス患者さんたちの血漿を試料とし、Lyso-GM2 の測定を行いました。野生型マウスの脳や血漿中の Lyso-GM2 濃度は、検出限界 (各々 0.02 nmol/g, 2 nmol/l) 以下でしたが、ザンドホッフ病モデルマウスでは脳、血漿中の Lyso-GM2 濃度は増加していました。また、健常人の血漿中 Lyso-GM2 濃度は検出限界 (2 nmol/l) 以下でしたが、GM2 ガングリオシドーシス (テイサックス病、ザンドホッフ病及び GM2 活性化因子欠損症を含む) の患者さんたちの血漿中の Lyso-GM2 濃度は増加していました。

Lyso-GM2 は、GM2 ガングリオシドーシスの新規バイオマーカーとして有望であると考えられます。

Lyso-GM2 ganglioside(Lyso-GM2)



酵母を使ってポンペ病に対する酵素薬を開発しています

産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

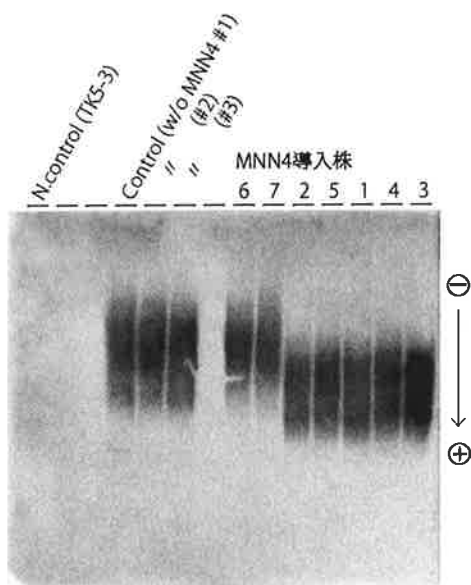
明治薬科大学 臨床遺伝学講座

千葉靖典

酵素補充療法はリソソーム病の治療においてよく使用されている治療法です。私たちは次世代の酵素生産系として期待される酵母を利用して、リソソーム病の補充療法用の酵素生産を検討しています。

これまでに私たちはタンパク質の生産能力の高いメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いたリソソーム酵素生産系を構築し、マンノース-6-リン酸型糖鎖の合成に重要な *MNN4* 遺伝子を単離し、*MNN4* 過剰発現株の構築を行ないました。そして、この株に対しヒト由来酸性 α -グルコシダーゼをコードする遺伝子を導入し、メタノール誘導によるタンパク質の発現を試みました。培養上清に酸性 α -グルコシダーゼが発現していることをウエスタンブロッティングと合成基質を用いた活性測定により確認しました。次に培養上清から酸性 α -グルコシダーゼの精製を行ない、均一な標品を得ることができました。現在、酵母から得られた組換え酸性 α -グルコシダーゼの諸性質や、細胞への取り込み能について評価を進めています。

今回のように酸性 α -グルコシダーゼを作製した酵母株は様々なリソソーム酵素の発現にも応用でき、安価かつウイルスフリーのリソソーム酵素の生産に役立つと考えます。



酸性 α -グルコシダーゼの NativePAGE での移動度変化の確認

糖鎖のマンノース-6-リン酸含量が増加していれば、リン酸基のマイナス電荷の影響で、NativePAGEにおける目的タンパク質の移動度が増加することが分かっています。

MNN4 導入株 1-5 では *MNN4* 遺伝子の発現によりマンノース-6-リン酸が増加していると考えられます。

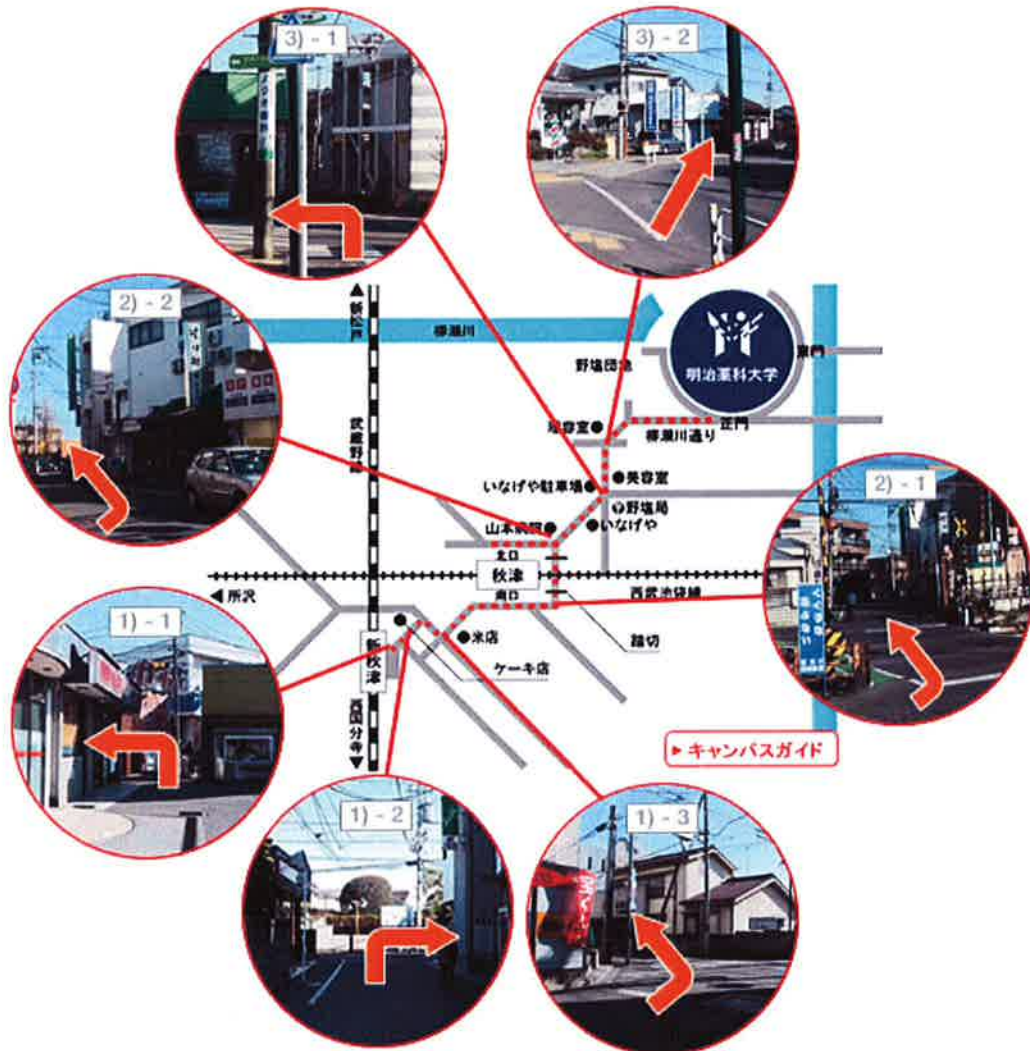
協力企業



genzyme

交通・アクセス

- ◆ 西武池袋線「秋津」駅下車・・・徒歩12分
- ◆ JR 武蔵野線「新秋津」駅下車・・・徒歩17分
- ◆ 西武池袋線「清瀬」駅からタクシー利用・・・約10分
- ◆ JR 武蔵野線「新秋津」駅からタクシー利用・・・約10分



明治薬科大学 臨床遺伝学講座

発行日 平成23年3月11日

発行元 明治薬科大学

〒204-8588

東京都清瀬市野塩 2-522-1

TEL: 042-495-8732