

## 臨床遺伝学公開シンポジウム 2012

### 「リソソーム病研究：さらなる進歩に向けて」

日時： 2012年3月10日（土） 13:00～16:00

場所： 明治薬科大学  
総合教育研究棟 フロネシス 8111 講義室

2012年3月10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 2012 開催に際して	1
プログラム	2
演題 1: 臨床遺伝学講座での研究とリソソーム病データベースについて紹介します 櫻庭 均	3
演題 2: 超稀少疾患であるウォルマン病やコレステロールエステル蓄積症の原因酵素の 立体構造モデルを作成します (招待講演) 北海道情報科学大学 齋藤 静司	4
演題 3: 心疾患や腎疾患の男性患者さんを対象としたファブリー病のスクリーニングを 行っています 田中利絵	5
演題 4: <i>p.E66Q</i> は、遺伝的多型と考えられます 月村考宏	6
演題 5: Gb3 の測定方法を開発しています 児玉 敬	7
演題 6: 特異な生化学的所見を示すファブリー病症例群を見つけました 水戸部さゆり	8
演題 7: リゾグルコシルセラミドはゴーシェ病の良いバイオマーカーです 兔川忠靖	9
演題 8: ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞から神経系細胞を作りました 薬理学教室 小川 泰弘、大石 一彦	10
演題 9: 神経難病としてのリソソーム病の治療法開発を目指しています (招待講演) 徳島大学 伊藤 孝司	11
演題 10: リソソーム酵素はどのようにして神経系細胞に入るのでしょうか 鈴木 俊宏	12
演題 11: 神経障害を伴うスフィンゴリピドーシスのモデルマウスを作製しています (招待講演) 東海大学 松田 純子	13
演題 12: サポシン B の機能について解析しました 川島 育夫	14
演題 13: 酵母を使ってファブリー病の酵素増強薬を開発しています 千葉靖典	15



## 臨床遺伝学公開シンポジウム 2012 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

明治薬科大学臨床遺伝学講座（寄附講座）は、遺伝性難病、特にリソソーム病の病態解明と診断、治療法の開発を目指して研究を行い、ささやかではありますが、その成果を、毎年の公開シンポジウムで発表しています。昨年（2010年）のシンポジウム開催は、3月11日の東日本大震災の日にあたり、参加された皆様には大変な御迷惑をおかけしましたが、皆様のおかげで何とか終わることが出来ました。御帰宅出来なかった一部の方とは、教室で討論しながら一夜を過ごし、思い出深いシンポジウム 2011 となりました。今年は、気分を新たに、シンポジウム 2012 において、更なる研究成果を発表させて頂きたいと思っております。どうぞ、皆様の御指導、御鞭撻を宜しくお願い致します。

### 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
	大塚 智子

### 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
	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 2012 プログラム  
「リソソーム病研究：さらなる進歩に向けて」

開会のあいさつ 副学長 石井 啓太郎

13:00-13:10 臨床遺伝学講座での研究とリソソーム病データベースについて紹介します  
櫻庭 均

13:10-13:30 超希少疾患であるウォルマン病やコレステロールエステル蓄積症の原因酵素の  
立体構造モデルを作成しました  
(招待講演) 北海道情報科学大学 齋藤 静司

13:30-13:40 心疾患や腎疾患の男性患者さんを対象としたファブリー病のスクリーニングを行っています  
田中 利絵

13:40-13:50 *p.E66Q* は、遺伝的多型と考えられます  
月村 考宏

13:50-14:00 Gb3 の測定方法を開発しています  
児玉 敬

14:00-14:10 特異な生化学的所見を示すファブリー病症例群を見つけました  
水戸部 さゆり

14:10-14:20 リゾグルコシルセラミドはゴーシェ病の良いバイオマーカーです  
兎川 忠靖

14:20-14:30 休憩

14:30-14:40 ゼンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞から神経系細胞を作りました  
小川 泰弘、大石 一彦

14:40-15:00 神経難病としてのリソソーム病の治療法開発を目指しています  
(招待講演) 徳島大学 伊藤 孝司

15:00-15:10 リソソーム酵素はどのようにして神経系細胞に入るのでしょうか  
鈴木 俊宏

15:10-15:30 神経障害を伴うスフィンゴリピドーシスのモデルマウスを作製しています  
(招待講演) 東海大学 松田 純子

15:30-15:40 サポシン B の機能について解析しました  
川島 育夫

15:40-15:50 酵母を使ってファブリー病の酵素増強薬を開発しています  
千葉 靖典

15:50-15:55 まとめ

16:00-17:30 懇親会 (厚生棟 1階食堂)

開会のあいさつと乾杯の言葉  
懇談

学長・理事長 久保 陽徳

閉会のあいさつ

櫻庭 均

17:30-17:40 臨床遺伝学 研究室見学ツアー

## 臨床遺伝学講座での研究とリソソーム病データベースについて紹介します

明治薬科大学 分析化学教室・臨床遺伝学講座

櫻庭 均

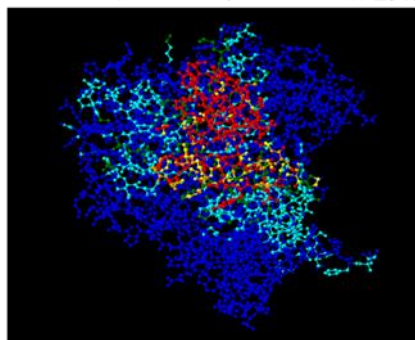
本年度、臨床遺伝学講座では、リソソーム病のデータベース構築を櫻庭らが、ファブリー病の診断や治療法開発のための研究を、田中、月村、児玉、水戸部、森山、大塚、川島、田島や千葉らが、ゴーシェ病のバイオマーカー開発を兎川らが、神経障害を伴うリソソーム病に対する酵素補充のための基礎研究を鈴木らが行いました。また、ザンドホッフ病のiPS細胞研究を薬理学教室の大石教授や小川助教らと、ウォルマン病/コレステロールエステル蓄積症の構造学的研究を北海道情報大学の齋藤准教授らと、GM2 ガングリオシドーシスに対する治療法開発研究を徳島大学の伊藤教授らと共同で行いました。

ここでは、ムコ多糖症VI型のデータベース (図) の構築を取り上げ、紹介します。

アリルスルファターゼBの立体構造



G308RによるアリルスルファターゼBの構造変化



## MPS VIデータベース

MP56 mutants list

keyword:

display items:  seq  str

display only missense mutation:  yes  no

control table:

id	locus	mtype	gtype	ptype	race	author	paper	note
1		missense mutation	GCG-GTG A33V			Karageorgos	(2007) Hum Mutat 28, 897	
2		missense mutation	cGAC-AAC D54N	Severe		Karageorgos	(2007) Hum Mutat 28, 897	
3		missense mutation	TGGa-TGC W57C			Karageorgos	(2007) Hum Mutat 28, 897	
4		missense mutation	cGAC-AAC D59N			Petry	(2005) J Inherit Metab Dis 28, 1027	
5		missense mutation	TCC-TTC S65F	Attenuated		Villani	(1999) Biochim Biophys Acta 1453, 185	
6		missense mutation	CTG-CAG L72Q			Isbrandt	(1996) Hum Mutat 7, 361	
7		missense mutation	CTG-CGG L72R	Severe		Petry	(2005) J Inherit Metab Dis 28, 1027	
8		missense mutation	CTG-CGG L82R			Garrido	(2007) Mol Genet Metab 92, 122	
9		missense mutation	gGAC-TAC D83Y	Attenuated		Karageorgos	(2007) Hum Mutat 28, 897	
10		missense mutation	CAGc-CAC Q88H			Petry	(2005) J Inherit Metab Dis 28, 1027	
11		<b>missense mutation</b>	<b>ACG-AAG T92K</b>			<b>Karageorgos</b>	<b>(2007) Hum Mutat 28, 897</b>	
12		missense mutation	ACG-ATG T92M			Litjens	(1996) Am J Hum Genet 58, 1127	
13		missense mutation	gCCG-TCG P93S			Petry	(2005) J Inherit Metab Dis 28, 1027	
14		missense mutation	CGG-CAG R95Q	Severe		Litjens	(1996) Am J Hum Genet 58, 1127	
15		missense mutation	AGCc-AGG S96R			Karageorgos	(2007) Hum Mutat 28, 897	



## 超希少疾患であるウォルマン病やコレステロールエステル蓄積症の原因酵素の立体構造モデルを作成しました

北海道情報大学 経営情報学部 医療情報学科

齋藤 静司

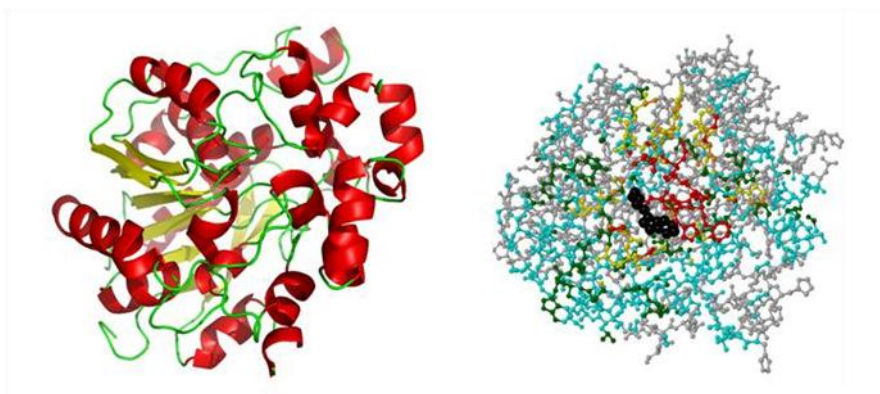
酸性リパーゼはリソソーム内でのトリグリセリドやコレステリルエステルの加水分解に必須の酵素です。酸性リパーゼの活性が遺伝的要因で低下すると、全身の臓器にトリグリセリドやコレステリルエステルが蓄積し、ウォルマン病やコレステロールエステル蓄積症が発生します。ウォルマン病は早期に発症し、重篤な症状を示します。具体的には、生後一週頃より肝脾腫、嘔吐、脂肪便性下痢、腹部膨満や貧血が生じ、通常の場合には数ヶ月で死亡します。一方、コレステロールエステル蓄積症は発症が遅く、ウォルマン病よりも軽い症状を示します。本疾患に対しては、組換え酵素を用いた酵素補充療法が開発され、臨床での使用が間近となっています。それに伴い、疾患の理解や診断に繋がる詳細な病態の解明が望まれます。

現在までに数多くのウォルマン病およびコレステロールエステル蓄積症に関連する遺伝変異が同定されております。ナンセンス変異、欠損や挿入の場合は、一部の例外を除いてウォルマン病を引き起こしますが、ミスセンス変異の場合はウォルマン病やコレステロールエステル蓄積症のどちらかを惹起する可能性があります。

本研究では、酸性リパーゼの立体構造のモデルを構築し、ミスセンス変異に伴うアミノ酸置換が、酸性リパーゼの立体構造にどのような影響を与えるかを研究しました (図)。さらに、立体構造変化の大きさと症状との関連性についても調べました。

本研究により、ウォルマン病またはコレステロールエステル蓄積症の構造生物学的な理解が深まるだけでなく、ウォルマン病およびコレステロールエステル蓄積症の診断や治療法策定等にも役立てることができればと考えています。

図は酸性リパーゼ(左は野生株、右は G321W 変異)



## 心疾患や腎疾患の男性患者さんを対象としたファブリー病のスクリーニングを行っています

明治薬科大学 臨床遺伝学教室

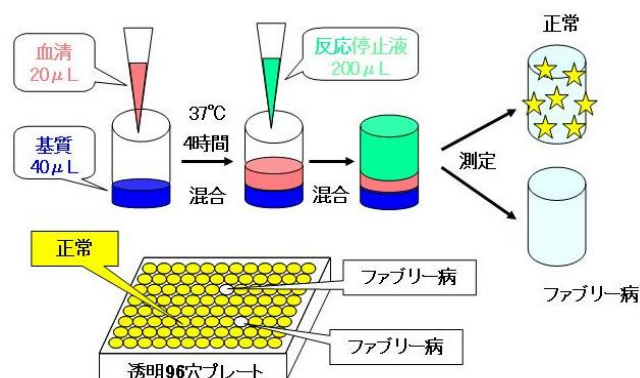
田中 利絵

ファブリー病は、リソソーム性加水分解酵素である $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の活性が顕著に低下することで、その基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) やグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が全身の細胞に蓄積してしまう X 染色体性の遺伝病です。最近、日本で行われた新生児スクリーニングでは、約 9000 人に 1 人の割合でファブリー病患者さんが発見されたと報告されています。ファブリー病の患者さんは、中年期以降に心障害、腎障害、脳血管障害などを来します。そのため、これらの症状を示す患者群の中に、ファブリー病の患者さんが隠れている可能性があります。

我々の研究室では、昨年に引き続き、このような症状を来した男性患者さんを対象としたファブリー病のハイリスクスクリーニングを実施しております。1 次検査では、凍結状態で輸送していただいた血清中の GLA 活性を、96 ウェルプレートを用いて測定します(図)。そして、1 次検査で活性が低かった場合には、2 次検査のためにヘパリン血を採血直後に冷蔵輸送していただきます。そして、ヘパリン血から白血球を分離し、その白血球中の GLA 活性を、1.5mL チューブを用いて測定します。通常は、2 次検査で活性の低下が認められた場合、ファブリー病と診断しますが、必要に応じて、GLA 遺伝子解析、血漿中 Lyso-Gb3 や尿中の Gb3 の測定等も行います。

現在までに、2500 人以上のファブリー病のハイリスク群の男性患者さんを検査して、15 人以上のファブリー病患者さんを見つけています。また、遺伝的多型と考えられる *p.E66Q* アレルを持った患者さんも 15 人以上見つかっています。

今後もこの診断システムを用いて、迅速かつ正確に検査を続けることで、ファブリー病患者さんの早期診断と早期治療に役立ちたいと思います。



1 次検査における血清中の GLA 活性の測定方法

## *p.E66Q*は、遺伝的多型と考えられます

分析化学教室

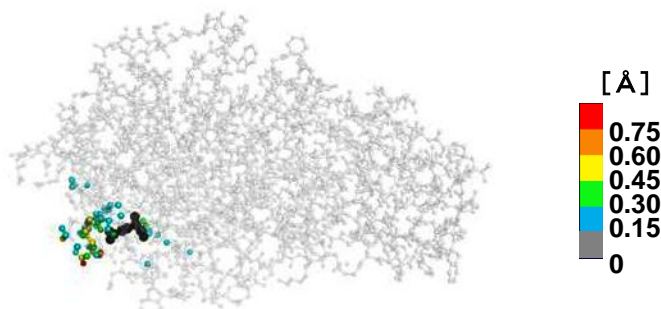
月村 考宏

近年、日本においてファブリー病に対するスクリーニングが行われるようになりました。その中で、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の 66 番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (E) がグルタミン (Q) に変わるアミノ酸置換を起こす塩基置換 (*p.E66Q*) を持つ症例が、0.5-1% と非常に高い頻度で見つかっています。

従来、*p.E66Q* は、ファブリー病を引き起こす遺伝子変異と考えられており、実際に酵素補充療法を受けていた患者さんもいらっしゃいました。しかし、*p.E66Q* を持つ患者さんの GLA 活性は、通常ファブリー病の患者さんの GLA 活性に比べて高いことと、発生頻度が非常に高いことから、*p.E66Q* は本当に病気を引き起こす遺伝子変異なのか、それとも遺伝的多型 (正常の遺伝子とは異なるが病気ではない塩基置換) なのかということが議論されるようになりました。

そこで、我々は、この *p.E66Q* を持つ男性患者さん由来の血液、尿及び皮膚の細胞を色々な方法を用いて調べることにしました。まず、白血球中の GLA 活性を調べたところ、健常な方の 20-60% 程度の活性を持っていることがわかりました。続いて、ファブリー病のバイオマーカーの一つである血漿中のグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) と、尿中のグロボトリアオシルセラミド (Gb3) の量を測定しましたが、これらは検出されませんでした。また、皮膚の細胞を Gb3 に対する抗体を用いて免疫染色しても、Gb3 が蓄積していないことがわかりました。さらに、皮膚組織を電子顕微鏡で観察しても、ファブリー病で見られる層状封入体等の病理学的変化は観察されませんでした。E66Q アミノ酸置換は、GLA の活性部位から離れた領域に小さな構造変化を起こすと考えられます (図)。

これらのことから、*p.E66Q* は、遺伝的多型である可能性が高いことが明らかになりました。しかし、今後も年齢等の他の要因が影響を与えるか等、さらに観察を続けて行くことが重要となります。



E66Q アミノ酸置換による GLA の立体構造変化の予測図

## Gb3 の測定方法を開発しています

明治薬科大学 分析化学教室

児玉 敬

ファブリー病患者さんに対する治療の市販後調査での評価には、主な蓄積物質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) の測定が求められます。現在、Gb3 の測定には、TLC や LC-MS/MS が用いられていますが、夫々、半定量であること、前処理が複雑で測定に非常に高価な機械を必要とするなどの問題点があります。そのため、生体試料中の Gb3 を簡便に測定する方法の開発が求められています。

私たちは、スフィンゴリピッドセラミド N-デアシラーゼ (SCDase) に注目しました。そして、SCDase を利用して Gb3 をグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) に分解し、それを HPLC により測定することが可能か否かを調べるため、ファブリー病患者さんたちの血漿、尿を試料として検討を行いました。まず、予備実験で LC-MS/MS による血漿中の Gb3 測定値と本法による測定値とを比較した所、相関性が認められました。次に、本法を用いて血漿中の Gb3 濃度を測定した結果、健常人、ファブリー病ヘテロ接合体および亜型ヘミ接合体の患者さんの間では、有意差は認められませんでした。次に、本法を用いて血漿中の Gb3 濃度を測定した結果、健常人、ファブリー病ヘテロ接合体および亜型ヘミ接合体の患者さんの間では、有意差は認められませんでした。次に、本法を用いて血漿中の Gb3 濃度を測定した結果、健常人、ファブリー病ヘテロ接合体および亜型ヘミ接合体の患者さんの間では、有意差は認められませんでした。次に、本法を用いて血漿中の Gb3 濃度を測定した結果、健常人、ファブリー病ヘテロ接合体および亜型ヘミ接合体の患者さんの間では、有意差は認められませんでした。

SCDase を用いた Gb3 の測定法は簡便で、通常の研究室で備えられる機器を使用出来るため、有用であると考えます。

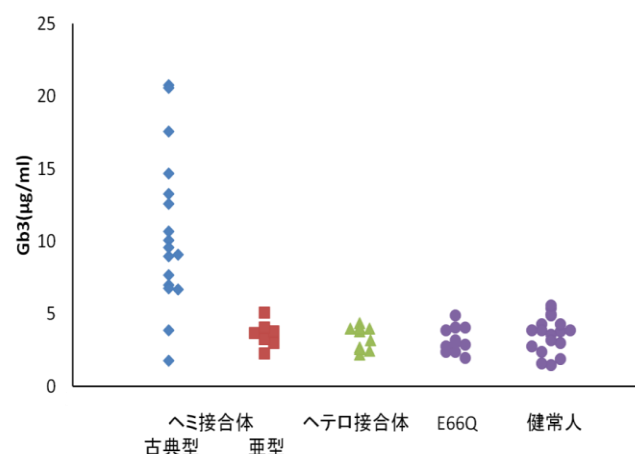


図 ヒト血漿中の Gb3 濃度

## 特異な生化学的所見を示すファブリー病症例群をみつけました

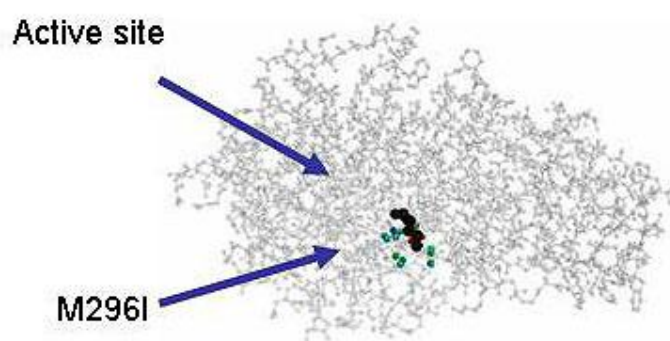
明治薬科大学 分析化学教室

水戸部 さゆり

ファブリー病のバイオマーカーの一つとして、主な蓄積物質 Globotriaosylceramide (Gb3) の誘導体である Lyso-Gb3 が注目されており、血漿中 Lyso-Gb3 はファブリー病診断においても重要であることが多くの施設から報告されています。しかし、多くのファブリー病症例を調べた所、血漿中 Lyso-Gb3 濃度は増加しないが、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性は低下している特異な日本人ファブリー病症例群を発見しました。これらの症例のすべてが亜型ファブリー病の表現型を示し、遺伝子解析で M296I ミスセンス変異が検出されました。この変異によるアミノ酸置換は、GLA 分子の活性中心とは離れた領域に小さな構造変化を来すと考えられます (図)。

この M296I 遺伝子変異を持つ患者さんに関して詳細な解析を行ったところ、血漿や白血球中の GLA 活性は健常人に比較して低下しているにも関わらず、血漿中 Lyso-Gb3 濃度は検出限界以下でした。また、生検組織を試料とした免疫化学的解析で脂質の蓄積が、電顕による解析でファブリー病に特徴的な層状封入体が観察されました。

この結果より、Lyso-Gb3 の測定のみでは診断することのできない変異型も存在することが分かりました。ファブリー病を正確に診断するためには、総合的な解析結果に基づくことが重要と考えられます。



M296I 変異による GLA の立体構造変化の予測

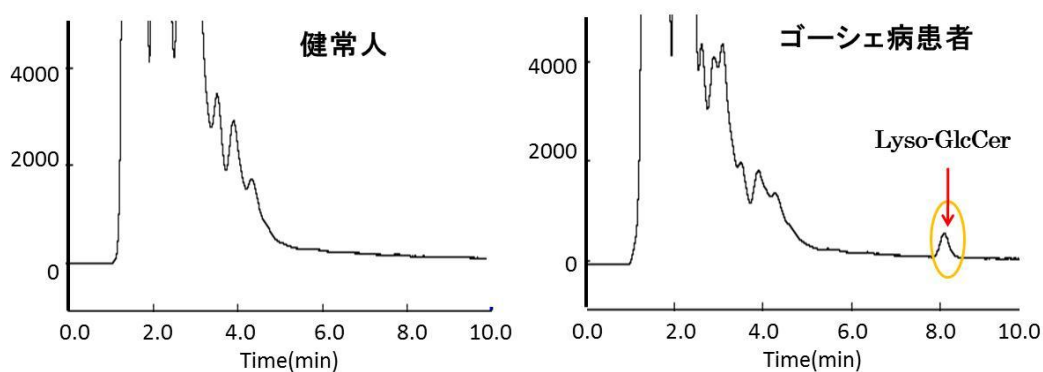
## リゾグルコシルセラミドはゴーシェ病の良いバイオマーカーです

明治薬科大学 分析化学教室

兎川 忠靖

ゴーシェ病はグルコシルセラミド(GlcCer)を分解する酵素であるグルコセレブロシダーゼの欠損により、肝臓、脾臓や脳などに GlcCer が蓄積する遺伝性の疾患です。現在、有効な治療法として、欠損しているグルコセレブロシダーゼの製剤を定期的に点滴投与する方法があります。しかし、血管内に投与した酵素は血液-脳関門に阻まれてしまうため、脳組織に届きません。そのため、脳神経系の症状を改善するために新しい治療薬の開発が待たれています。そこで、本症の診断に役立ち、治療の効果を反映するバイオマーカーの測定が重要になります。

これまでゴーシェ病の確定診断には生検組織中のグルコセレブロシドの測定が行われてきましたが、その測定は容易ではありません。我々は、ゴーシェ病患者の脳組織中で検出され、病態形成に関わっているとされてきた、GlcCer のリゾ体であるリゾグルコシルセラミド(Lyso-GlcCer)について検討を行いました。測定試料として血漿を用い、より簡便な前処理としてアセトニトリル除タンパクを行いました。その遠心上清を蛍光誘導体化後、HPLCで分離定量したところ、図に示すように健常人では観察されない Lyso-GlcCer のピークが、ゴーシェ病患者血漿中で測定されました(図)。また、1例ではありますが、酵素補充療法を行うと血漿中 Lyso-GlcCer 濃度が低下することも確認できました。Lyso-GlcCer はゴーシェ病の良いバイオマーカーと期待されます。



## ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞から神経系細胞を作りました

明治薬科大学 薬理学教室

小川 泰弘、大石 一彦

ザンドホッフ病 (SD) は、*HexB* 遺伝子の欠損により、脳や脊髄のニューロンに GM2 ガングリオシド等が過剰に蓄積し、ニューロンが障害されてしまう遺伝病です。私たちは、この病態解明や新たな治療法の開発を目的として、SD モデルマウスである *HexB* ノックアウトマウスの細胞から iPS 細胞 (SD-iPS 細胞) を樹立し、この細胞より神経系細胞集団を構築することができました。この細胞より作製された神経系細胞集団は、野生型に由来するものと比較して GM2 ガングリオシドの蓄積が多く観察され、SD としての生化学的特徴を持ちます (図)。

今までモデル動物などから初代培養細胞や神経幹細胞を得ることは可能でしたが、エピジェネティクスの影響より、標的細胞であるニューロンを安定的に且つ多数得ることは出来ませんでした。今回樹立した SD-iPS 細胞は、胚性幹細胞の性質も持つために、ほぼ無限に増やすことができます。この細胞から神経系細胞を誘導できるため、今まで困難であった標的細胞であるニューロンを多量に調整でき、治療法の開発に取って大きなメリットになります。

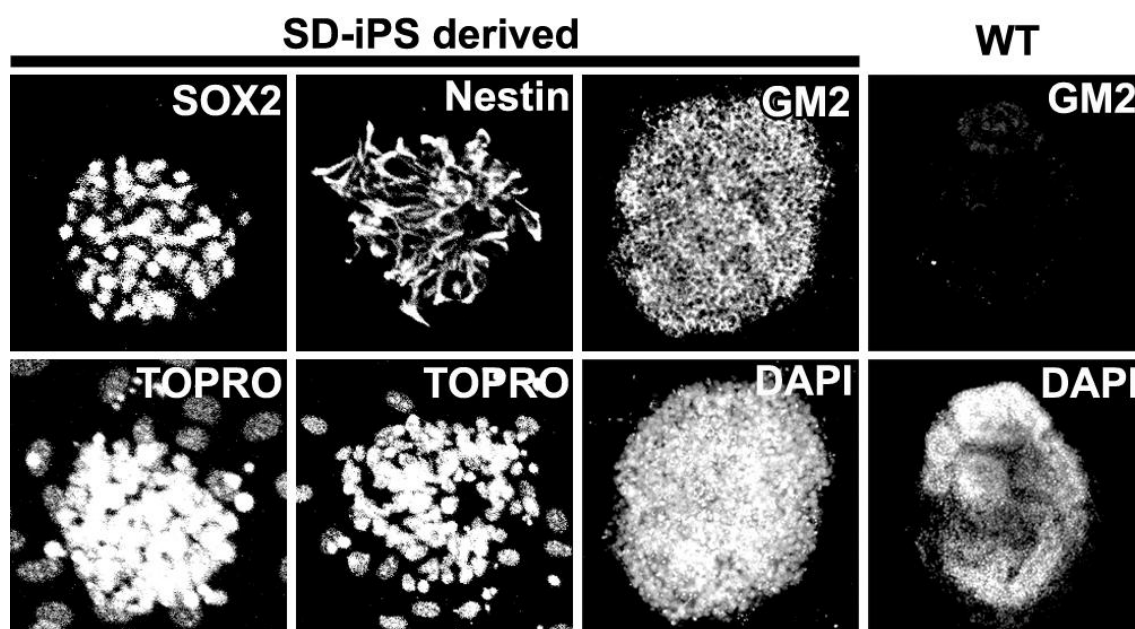


図 SD-iPS 細胞から神経幹細胞を作製した。野生型と比較して GM2 ガングリオシドの蓄積が見られる

## 神経難病としてのリソソーム病の治療法開発を目指しています

徳島大学大学院薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 創薬生命工学分野

明治薬科大学 臨床遺伝学

伊藤 孝司

リソソーム病は、リソソーム酵素及び関連因子の遺伝子変異が原因で、当該酵素活性の著しい低下と生体内基質の患者組織内での過剰蓄積を伴って発症する単一遺伝子疾患群です。約 40 種の疾患が知られており、厚生労働省では特定疾患の「難病」に指定しています。近年、これらの疾患の病因となる酵素の正常遺伝子を導入した哺乳類培養細胞株から生産される組換えヒトリソソーム酵素製剤を、末梢血流中に投与する酵素補充療法 (enzyme replacement therapy, ERT) が、根本治療の一つとして臨床応用されています。しかし、リソソーム病の半数以上で発症する中枢神経症状に対しては、ほとんど有効性が認められていません。

本講演では、脳内 GM2 ガングリオシドの蓄積症で、中枢神経症状を伴う Tay-Sachs 病および Sandhoff 病に対する脳内 ERT の開発を目指した演者らの研究について、高機能型ヒト $\beta$ -Hexosaminidase (Hex) の分子デザイン (図)、酵素高生産性細胞株の作製および補助因子である GM2 activator protein (GM2AP) との相互作用に関する成果を紹介いたします。また最近、演者らは Tay-Sachs 病および Sandhoff 病患者由来の iPS 細胞株の樹立に成功しました。これらの患者 iPS 細胞から誘導される組織細胞は、疾患の病態解明や治療薬候補の有効性や安全性に対する新しい評価システムの開発に役立てることができると考えられます。

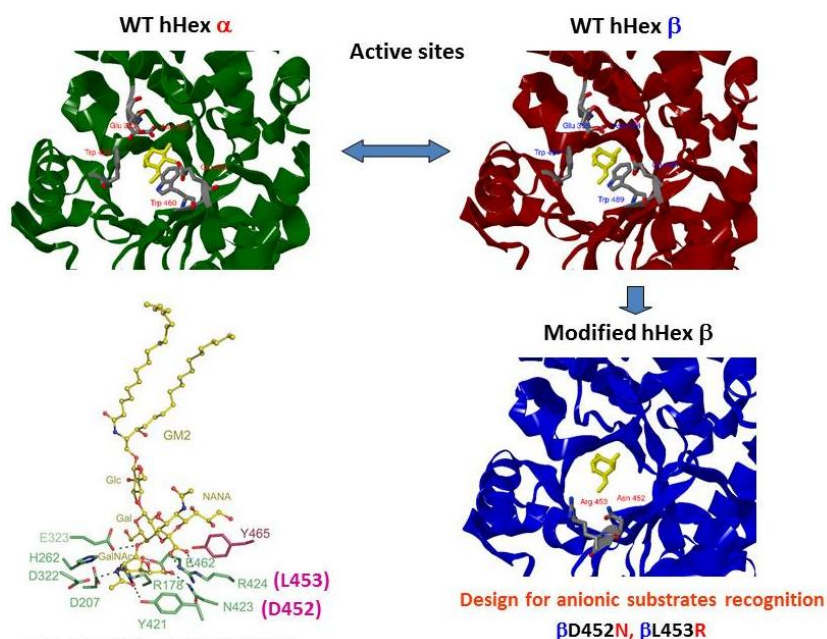


図 分子デザインに基づく Hex の GM2 ガングリオシド認識能の改変



## リソソーム酵素はどのようにして神経系細胞に入るのでしょうか

明治薬科大学 分析化学教室

鈴木 俊宏

ヒトは、大切な脳を異物から守るために血液脳関門（BBB）というバリアーを作っています。それによって、中枢神経系はあらゆる異物から守られている反面、脳に作用させるべき薬剤もしばしば排除されて効果が得られないことがあります。リソソーム病治療薬においても同様で、血管からの酵素補充療法（ERT）では、なかなか脳までたどり着けません。そこで、最近では、脊髄腔内への直接投与を行うことで、血液脳関門を回避しようとする試みがなされています。さて、直接脊髄腔内に注射された薬物は、本当に神経系の細胞に入っていくのでしょうか？これまで血中投与されたリソソーム酵素が脳に入りにくい現象は、血管から神経系への関門によるものと考えられており、その後の神経系細胞への取り込み機構については、詳細な検討がなされていません。

そこで、神経系を構成するニューロン、アストロサイトやオリゴデンドロサイトについて、ヒト由来の各細胞から RNA を抽出し、既知のリソソーム酵素取り込み因子であるマンノース-6-リン酸レセプター（M6PR）の発現について検討しました。その結果、アストロサイトでは腎臓と同程度以上の M6PR 発現が認められましたが、ニューロンやオリゴデンドロサイトでは 20%以下と低いことから、神経系細胞では M6P を介した取り込み効率が低い可能性があることがわかりました（図）。この検討結果は、今後の脳神経系を対象とした ERT 開発に向けての新しい戦略の助けとなると期待されます。

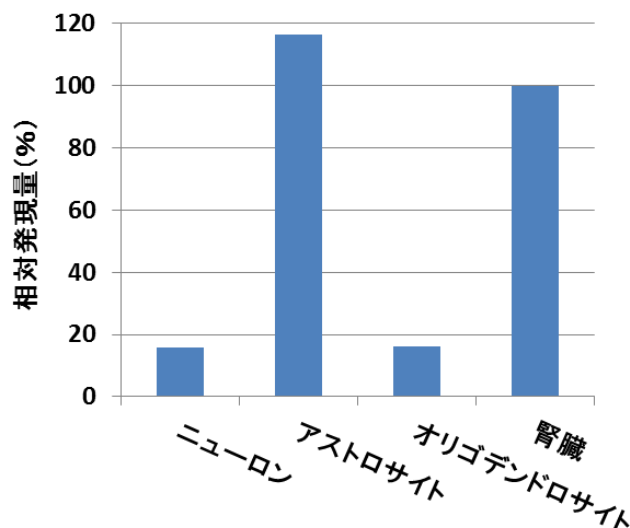


図 神経系細胞におけるM6PR相対発現量  
(腎臓組織における発現量を100%とした。)

## 神経障害を伴うスフィンゴリポドーシスのモデルマウスを作製しています

東海大学 糖鎖科学研究所

松田 純子

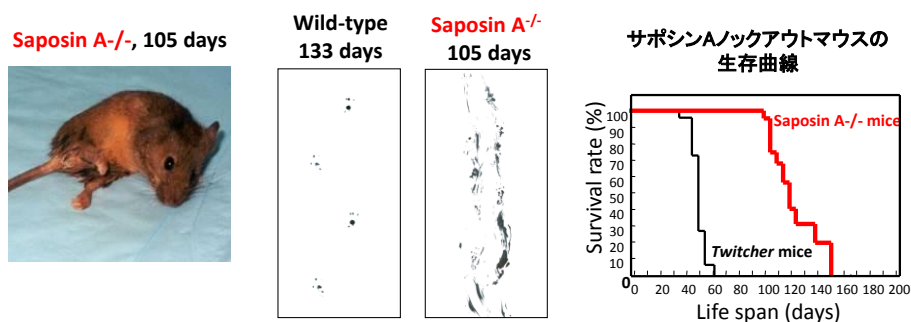
スフィンゴ糖脂質は、生体膜を構成する脂質成分の一つで、親水性の糖鎖部分と疎水性のセラミド骨格からなり、その構造や発現量には、組織や細胞、発生段階別に際立った多様性があります。それらの多様性は、生合成系と分解系のバランスによって厳格に制御されており、スフィンゴ糖脂質の代謝を司る各種酵素遺伝子のノックアウトマウスやヒトの欠損症の解析によって、その破たんが様々な病態を引き起こすことが明らかになってきています。

スフィンゴリポドーシスは、リソソームにおけるスフィンゴ糖脂質の分解障害を原因とする遺伝性疾患の総称で、その多くが重篤な神経症状を呈します。私たちは、スフィンゴ糖脂質のリソソームにおける分解において、リソソーム酵素と共に必要であるサポシン A、B、C、D と呼ばれる糖タンパク質に着目し、各サポシンのノックアウトマウスを作製して、その神経病態の解析を行っています。これまでにサポシン A ノックアウトマウスは遅発型クラッペ病の神経病態を呈すること(図)、サポシン C およびサポシン D ノックアウトマウスは小脳プルキンエ細胞の脱落を特徴とする神経細胞変性を呈することなどを明らかにしてきました。

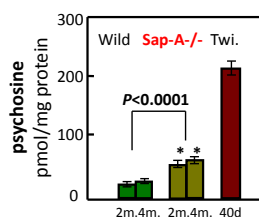
このシンポジウムでは、私たちが作製した各種サポシンノックアウトマウスを用いた、スフィンゴリポドーシスの神経病態の解明および治療法開発の試みをご紹介します。

### 図 サポシンAノックアウトマウスは遅発型クラッペ病のモデルマウスです

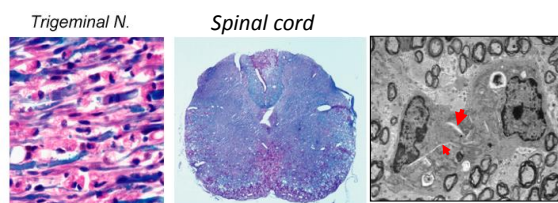
四肢麻痺を呈して生後4カ月前後で死亡する



脳にサイコシンが蓄積する



中枢および末梢神経系に脱髄病変を呈する



## サポシン B の機能について解析しました

明治薬科大学・臨床遺伝学講座

東京都医学総合研究所 分子医療プロジェクト

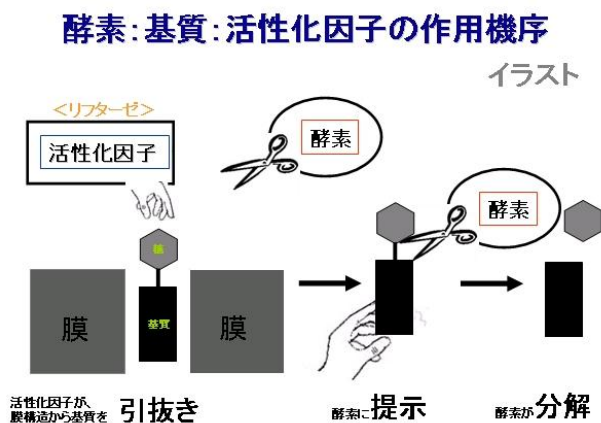
川島 育夫

サポシン B は、前駆タンパク質であるプロサポシンが限定分解を受けて産生されるスフィンゴ脂質活性化タンパク質であり、同じプロサポシンから類似のスフィンゴ脂質活性化タンパク質であるサポシン A、C や D も産生されます。これらのサポシン群は、約 80 のアミノ酸残基からなり、各々ホモロジーが高く三つのジスルフィド結合や糖鎖結合部位を有するコンパクトな糖タンパク質です。サポシン群は、リソソームにおいて、スフィンゴ糖脂質を分解酵素と反応させるための橋渡しを行う因子として知られています (図)。それぞれのサポシンは、特定のリソソーム酵素の活性化タンパク質として機能しており、サポシン B は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A、アリルスルファターゼ A や  $\beta$ -ガラクトシダーゼを活性化し、それぞれグロボトリアオシルセラミド、スルファチドや GM1 の分解を促進します。この幅広い基質特異性は、他のサポシン群 (A, C, D) とは異なっています。

ファブリー病は、グロボトリアオシルセラミドを分解する責任酵素  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A が欠損、或は活性の低下により生じる遺伝病で、分解基質であるグロボトリアオシルセラミドが細胞内に異常蓄積し、様々な臨床症状を示す遺伝性スフィンゴ脂質蓄積症の一つです。ファブリー病の治療には、組換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A を用いた酵素補充療法が行われていますが、期待される治療効果が必ずしも得られていません。

そこで、我々は、ファブリー病モデルマウスに  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A とその活性化因子であるサポシン B を同時投与し、酵素による基質分解効果をサポシン B が増強するか否かの動物実験を行っているので紹介します。サポシン B とその関連酵素との同時投与により、サポシン B の酵素活性増強作用が認められれば、今後の酵素補充療法に新たな展開が期待されます。

また、サポシン B の持つ、別の免疫学的機能についても合わせて紹介します。



## 酵母を使ってファブリー病の酵素増強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

千葉 靖典

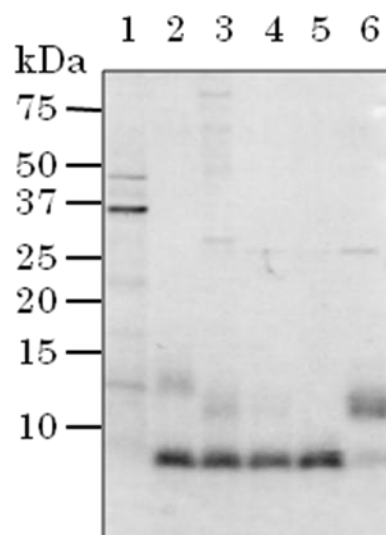
ファブリー病に対しては、既に酵素補充療法が確立されていますが、その効果を有効に発揮させるためには、基質となる糖脂質を膜から引き出し、可溶性の脂質-タンパク質の複合体を形成させ、分解酵素本体である $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A へ効率よく脂質を提示させることが必要です。この機能を行なうサポシン B は、プロサポシンと呼ばれる前駆体である 58kDa のタンパク質として翻訳された後、限定分解を受け生成されます。これらのサポシンは互いに高いアミノ酸相同性を持っていますが、その基質特異性は異なり、それぞれ特異的に糖脂質を認識し分解を促進します。私たちは、マンノース-6-リン酸型糖鎖を生産する酵母を利用してサポシン B を生産し、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A を用いた酵素補充療法に対して効果を増強させることを目的として、研究を進めています。

宿主としてはメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を利用し、マンノース-6-リン酸型糖鎖が多量に付加したサポシン B の生産系を確立しました。生産されたサポシン B は、2 種類のカラムを用いてほぼ均一に精製することができました (図)。また糖鎖の 90%以上がマンノース-6-リン酸を含有していることが確認されました。

今回生産したサポシン B を、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A と共投与を行なうことで、細胞のリソソーム内に蓄積した糖脂質をより効率よく分解する事が期待され、効果的な酵素補充療法の確立へ貢献できると考えられます。

### 図 サポシン B の精製

1, 培養上清; 2, Ni カラム溶出画分; 3,  $\alpha$ -マンノシダーゼ処理後の画分; 4, Ni カラムリクロマト溶出画分; 5, Con-A カラム素通り画分; 6, Con-A カラム溶出画分



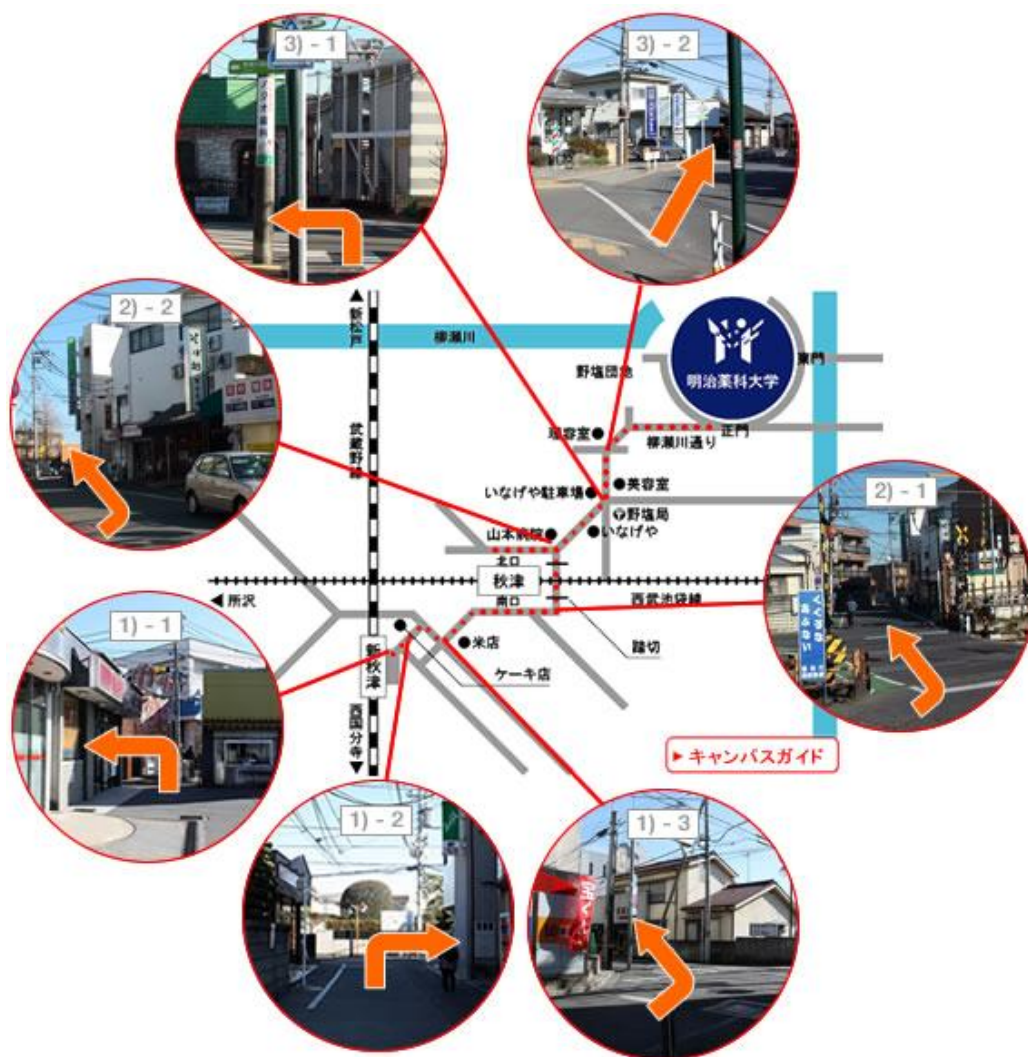
協力企業



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 24 年 3 月 10 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