

臨床遺伝学公開シンポジウム 2014

「リソソーム病研究の更なる展開へ」

日時： 2014年3月14日(金)13:00~16:45

場所： 明治薬科大学
総合教育研究棟 フロネシス 8111 講義室

2014年3月14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 2014 開催に際して	1
プログラム	2
演題 1: ファブリー病の分子病態の解析をしています 月村 考宏	3
演題 2: タンデム MS でガングリオシドを測定しました 児玉 敬	4
演題 3: ファブリー病患者さんの診断を行っています 田中 利絵	5
演題 4: GLA 遺伝子上の変異とファブリー病の臨床症状について、立体構造モデルを 使って解析しています 北海道情報大学 齋藤 静司	6
演題 5: 抗 α -ガラクトシダーゼ A 抗体 (IgG) 測定用イムノクロマトを開発しています シンセラ・テクノロジーズ株式会社 中野 早知栄	7
演題 6: 「ファブリー病」病理診断の落とし穴について検討しました 櫻庭 均	8
演題 7: 組換え酵素製剤中のマンノース-6-リン酸含量を定量、比較しました 兎川 忠靖	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 の大量生産法を 開発しています 佐藤 温子	10
演題 9: ファブリー病に対する新たな酵素補充療法用酵素製剤・改変型 NAGA の 有用性について検討しています 臨床遺伝学客員教授、東京都医学総合研究所 川島 育夫	11
演題 10: ザンドホッフ病モデルマウス脳の早期異常を見つけました 小川 泰弘	12
演題 11: 改良型 β -ヘキササミニダーゼの開発と機能評価を行いました 臨床遺伝学客員教授、徳島大学大学院 伊藤 孝司	13
演題 12: 糖鎖を改変したリソソーム酵素を生産するシステムを開発しています 臨床遺伝学客員教授、産業技術総合研究所 千葉 靖典	14
演題 13: 難治性急性リンパ性白血病の病態解明に関して研究しています 臨床遺伝学客員教授、駒込病院 川村 眞智子	15
演題 14: 糖脂質を質量分析で分析します 東海大学 糖鎖科学研究所 鈴木 明身	16
演題 15: ムコ多糖症 I 型における α -L-イズロニダーゼの構造変化を解析しました 櫻庭 均	17

臨床遺伝学公開シンポジウム 2014 開催に際して

明治薬科大学 臨床遺伝学講座
教授 櫻庭 均

今年度、臨床遺伝学講座では、今まで分析化学教室教授を併任していた私が、当講座専任となり、新しい講座メンバーも加わり、「リソソーム病研究の更なる展開」を目指して、新たな気持ちで再出発しました。そして、皆様の御陰で、リソソーム病の病態解明や診断・治療法開発について、ささやかながら研究成果を上げることが出来ました。本シンポジウムでは、私たち講座メンバーやその共同研究者の方々の研究発表を聴いて頂き、御指導・御鞭撻を賜われれば幸いです。また、本講座の運営に多大なご支援を頂きました大日本住友製薬株式会社様とジェンザイム・ジャパン様に感謝致します。

臨床遺伝学講座研究スタッフ

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 川村眞智子
研究技術員	田中 利絵 大塚 智子 佐藤 温子
秘書	田中聖恵子
経理	池田 範子

生体機能分析学

教授	兔川 忠靖
助教	月村 考宏

臨床遺伝学シンポジウム 2014 プログラム

「リソソーム病研究の更なる展開へ」

- 13:00-13:10 開会の辞
挨拶 (大学) 石井啓太郎 (明治薬科大学 学長)
挨拶 (法人) 久保 陽徳 (明治薬科大学 理事長)
進行説明 櫻庭 均
- 13:10-13:25 ファブリー病の分子病態の解析をしています
明治薬科大学 生体機能分析学教室 月村 考宏
- 13:25-13:35 タンデム MS でガングリオシドを測定しました
明治薬科大学 生体機能分析学教室 児玉 敬
- 13:35-13:45 ファブリー病患者さんの診断を行っています
明治薬科大学 臨床遺伝学講座 田中 利絵
- 13:45-14:00 GLA 遺伝子上の変異とファブリー病の臨床症状について、立体構造モデルを使って解析しています
北海道情報大学 医療情報学科 齋藤 静司
- 14:00-14:10 抗 α -ガラクトシダーゼ A 抗体 (IgG) 測定用イムノクロマトを開発しています
シンセラ・テクノロジーズ株式会社 中野 早知栄
- 14:10-14:20 「ファブリー病」病理診断の落とし穴について検討しました
明治薬科大学 臨床遺伝学講座 櫻庭 均
- 14:20-14:30 組換え酵素製剤中のマンノース-6-リン酸含量を定量、比較しました
明治薬科大学 生体機能分析学教室 兎川 忠靖
- 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 の大量生産法を開発しています
明治薬科大学 臨床遺伝学講座 佐藤 温子
- 14:40-14:50 ファブリー病に対する新たな酵素補充療法用酵素製剤・改変型 NAGA の有用性について検討しています
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、東京都医学総合研究所 川島 育夫
- 14:50-15:00 休憩
- 15:00-15:15 ザンドホッフ病モデルマウス脳の早期異常を見つけました
明治薬科大学 薬理学教室 小川 泰弘
- 15:15-15:35 改良型 β -ヘキソサミニダーゼの開発と機能評価を行いました
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、徳島大学大学院 伊藤 孝司
- 15:35-15:50 糖鎖を改変したリソソーム酵素を生産するシステムを開発しています
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、産業技術総合研究所 千葉 靖典
- 15:50-16:00 難治性急性リンパ性白血病の病態解明に関して研究しています
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、駒込病院 川村 眞智子
- 16:00-16:30 糖脂質を質量分析で分析します
東海大学糖鎖科学研究所 鈴木明身
- 16:30-16:40 ムコ多糖症 I 型における α -L-イズロニダーゼの構造変化を解析しました
明治薬科大学 臨床遺伝学講座 櫻庭 均&構造研究グループ
- 16:40-16:45 閉会の辞
- 16:50-18:00 懇親会 (厚生棟 1F 食堂)

ファブリー病の分子病態の解析をしています

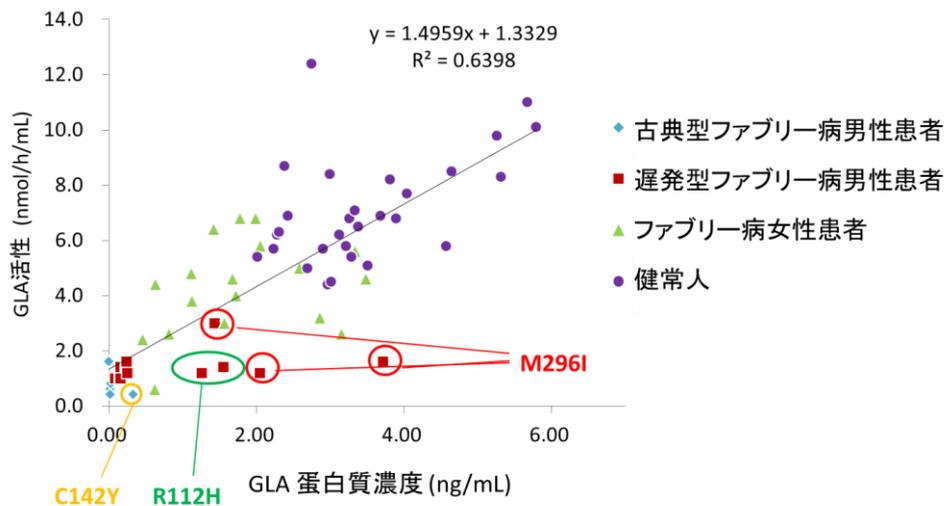
明治薬科大学 生体機能分析学教室

月村 考宏

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異に基づく活性低下により、糖脂質グロボトリアオシルセラミドやグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が蓄積する X 染色体性の遺伝病です。ファブリー病は、若年期から発症する古典型と壮年期以降に発症する遅発型とに分類されますが、それらの分子病態の違いに関しては不明な点が多くあります。我々は、免疫 PCR をベースとした MUSTag 法を開発し、血漿中の GLA 蛋白質を高感度に検出することを可能にしました。今回、私たちは、ファブリー病の分子病態を解明するために、ファブリー病患者さんの血漿中の GLA 活性、蛋白質濃度及び Lyso-Gb3 濃度について、遺伝子変異や臨床型との関係を調べました。

血漿中の GLA 蛋白質濃度と GLA 活性とは、殆どの症例で相関しており、遅発型男性患者さんの血漿中 GLA 蛋白質濃度は、古典型男性患者さんに比べて高い値を示しました。また、遅発型男性患者のうち R112H 変異と M296I 変異を持つ患者さんは、血漿中 GLA 活性が低いにも拘らず GLA 蛋白質濃度が保たれていました。多くの患者さんでは、血漿中 Lyso-Gb3 濃度が著しく増加していましたが、これらの男性患者ではあまり増加していませんでした。

今回の研究から、血漿中 Lyso-Gb3 濃度が殆ど増加しない R112H 変異や M296I 変異を持つ患者さんでは、ごく軽度の活性を持つ GLA が、変性した状態で血中に存在している可能性が示されました。このように血漿中の GLA 蛋白質の量を測定することで、ファブリー病の分子病態がさらに解明されることが期待されます。



血漿中の GLA 蛋白質濃度と GLA 活性の相関

タンデム MS でガングリオシドを測定しました

明治薬科大学 生体機能分析学教室

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ミンダーゼ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 ガングリオシドなどの糖脂質複合体が蓄積し、脳障害を引き起こす遺伝性難病です。

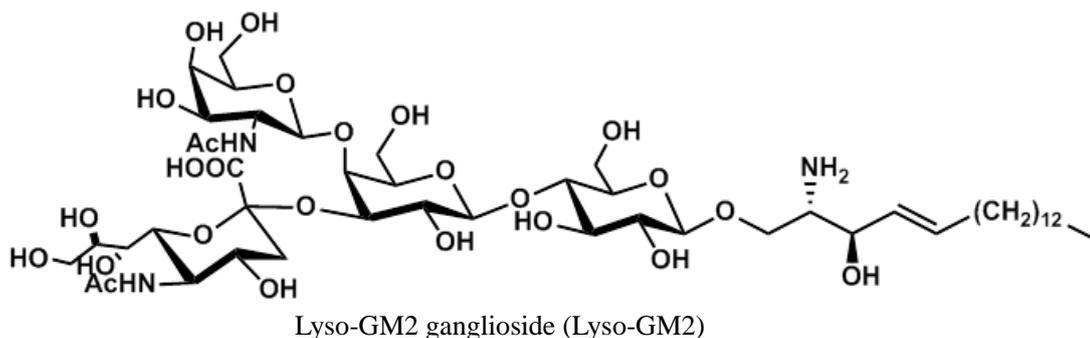
GM2 ガングリオシドーシスの治療薬を開発するためには、その効果を判定するために、蓄積物質である GM2 ガングリオシド（GM2）や Lyso-GM2 ガングリオシド（Lyso-GM2）の測定が必要です。

これまで当教室では、半定量ではあるものの、多検体をこなせる TLC や、選択性ではやや劣るものの簡便な装置で定量できる蛍光ラベル化 HPLC を用いて、生体試料中ガングリオシドを測定してきました。一方、最近の組換え酵素開発の進展により、GM2 ガングリオシドーシスにも治療の可能性が示され、GM2 や Lyso-GM2 を、迅速に、一斉測定する方法の開発が望まれています。そこで、今回、より高い選択性を持ち、多検体処理に適したタンデム MS を検出器とした、LC-MS/MS による GM2 および Lyso-GM2 の測定法を確立しました。

私たちは、LC-MS/MS の特性を生かし、簡単な除タンパクのみで GM2 ガングリオシドを測定できないか、ザンドホッフ病モデルマウスの脳組織や GM2 ガングリオシドーシス患者さんの血漿を試料として検討を行いました。

私たちが確立した LC-MS/MS による測定法を用いて、マウス脳組織中 GM2 濃度を測定した結果、TLC で測定した結果と同様に、ザンドホッフ病ヘテロ接合体のマウスと比べ、ホモ接合体のマウスでは顕著に GM2 が増加していました。また、マウス脳組織およびヒト血漿中の Lyso-GM2 濃度を測定した結果、HPLC で測定した結果と同様に、ホモ接合体のマウス脳組織およびテイ - サックス病やザンドホッフ病の患者さんの血漿中で増加していました。

本法は、GM2 や Lyso-GM2 の簡便な測定法として有望であると考えます。



ファブリー病患者さんの診断を行っています

明治薬科大学 臨床遺伝学講座

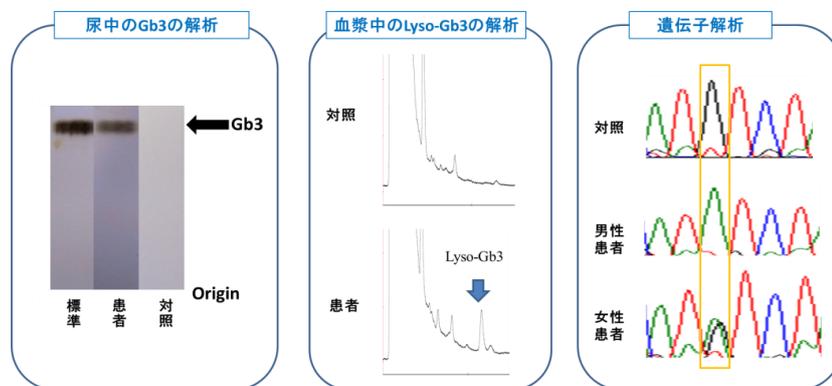
田中 利絵・大塚 智子

ファブリー病は、リソソームで働く α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性が低下することにより、本来 GLA が分解す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) 等の糖脂質が分解されず、全身の臓器に蓄積してしまう X 染色体性の遺伝病です。ファブリー病の患者さんは、心障害、腎障害や脳血管障害等の症状を示しますが、このような症状を示す患者さんの中には、ファブリー病と診断されず、適切な治療を受けられていない患者さんがいると考えられます。そこで我々のグループでは、全国の医療施設からの依頼に答えて、これらの症状を示す患者さんの中から、ファブリー病患者さんを探す試みを行っています。

X 染色体性の遺伝病であるファブリー病では、男性の場合、GLA 活性が顕著に低下しているため、GLA 活性を測定することで診断することができます。私たちの施設では、まず 1 次検査で血清を試料とし、2 次検査では白血球を試料として、その GLA 活性を測定するハイリスク・スクリーニングを実施しています。現在までに、4700 人以上の患者さんを調べ、約 30 人のファブリー病患者さんが見つかりました。

一方、女性の場合は、X 染色体のランダムな不活化により、GLA 活性だけで診断することが難しいため、遺伝子解析、尿中の Gb3 や血漿中の Lyso-Gb3 の定量を含めた複数の検査を行い、それらの結果を基に、総合的に診断しています。これらの検査は、GLA 活性測定に比べ複雑で、多検体を処理することが難しいため、臨床症状からファブリー病の可能性が特に高い患者さんを対象として解析しています。現在までに約 70 人を調べ、約 30 人のファブリー病患者さんを診断しています。

今後も、この診断システムを用いて、ファブリー病患者さんの早期診断・早期治療に貢献していきたいと思っております。



ファブリー病の診断

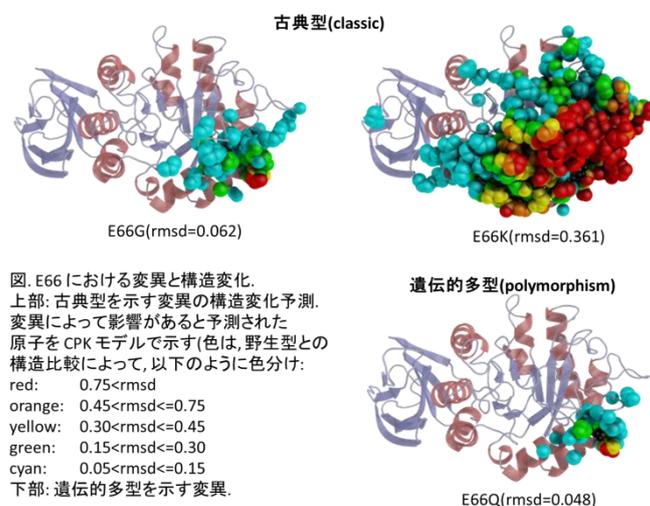
GLA 遺伝子上の変異とファブリー病の臨床症状について、立体構造モデルを使って解析しています

北海道情報大学 経営情報学部 医療情報学科

齋藤 静司

α -ガラクトシダーゼ A(GLA)遺伝子上の変異により、ファブリー病が引き起こされます。この遺伝子に関しては現在、600種類以上の変異が報告されており、変異を起こした場所や種類によって臨床症状が様々に異なることが知られています。我々は、こうした GLA 遺伝子上の変異と臨床表現型、及び立体構造モデルによる構造変化の特徴に関するデータをまとめ、Web 上で公開しています(<http://fabry-database.org>)。今回、ミスセンス変異を中心に、最近までに報告された変異を含め、全部で 637 種類の変異について構造モデルを作成し、臨床表現型等の情報をまとめました。

変異と臨床症状の情報が集まってくるに従い、構造の観点からも、今まで出来なかった解析が出来るようになってきました。その中の一つが、同じ部位の変異でありながら臨床表現型が異なる変異群の解析です。例えば、GLA 遺伝子産物の 66 番目のアミノ酸(E66)については、3つの異なるアミノ酸置換、E66G、E66K および E66Q が知られていますが、同じ部位でのアミノ酸置換でありながら、この3つでは臨床表現型が異なります。E66G、E66K は古典型ファブリー病(classic)の、E66Q は遺伝的多型(polymorphism)の原因となります。我々は、同じ部位に複数のミスセンス変異を持つ変異群を上記データベースから収集し(66 部位、157 変異)、その構造的特徴について調べてみました。その結果、同じ部位に複数のアミノ酸置換を示す集団内においては、構造変化の大きさや影響を受ける原子数が、臨床表現型と有意な関係を持つことが分かりました。一例として、E66 における構造変化の様子を図に示します。こうした構造計算的研究が、診断やファブリー病を始めとする希少疾患に対する診断や病態解明に対して何らかの貢献ができればと考えております。



抗 α -ガラクトシダーゼ A 抗体 (IgG) 測定用イムノクロマトを開発しています

中野 早知栄^{1,2}、兎川 忠靖⁴、月村 考宏⁴、櫻庭 均³、芝崎 太¹

¹ (公財) 東京都医学総合研究所 分子医療プロジェクト、² シンセラ・テクノロジーズ株式会社、³ 明治薬科大学 臨床遺伝学、⁴ 明治薬科大学 生体機能分析学

ファブリー病に対する治療として酵素補充療法が行われていますが、組換え α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の繰り返し投与によって血液中に抗 GLA 抗体が産生され、有害な免疫反応を起こす場合があることが報告されています。その為、抗 GLA 抗体検査を迅速・簡便に行うための測定法の開発が、臨床サイドから強く望まれています。そこで私達は、これまでに簡便且つ短時間で、血清中の抗 GLA 抗体(IgG)量を測定できる「GLA-IgG イムノクロマト」を開発してきました (下図参照)。

ファブリー病の酵素補充療法に使用する薬剤として、アガルシダーゼ アルファ (Agalsidase Alfa) とアガルシダーゼ ベータ (Agalsidase Beta) の 2 種類の組換えタンパク質があり、今回私達は、(1) Agalsidase Alfa のみを投与している患者群、(2) Agalsidase Beta のみを投与している患者群、(3) Agalsidase Alfa と Beta の 2 種類の組換えタンパク質の投与を行った患者群の血清を用いて、血清中の抗 GLA 抗体量を、今回開発した「GLA-IgG イムノクロマト」および従来の ELISA (サンドイッチ法) で測定しました。その結果、両者の測定においてほぼ同等な測定値が得られたため、血清中の抗 GLA 抗体量は、開発した「GLA-IgG イムノクロマト」でも十分に測定可能であることが明らかになりました。

酵素補充療法を行う際には、本「GLA-IgG イムノクロマト」を用いることによって、抗 GLA 抗体を簡便且つ 20 分程度の短時間で測定できることから、的確なコンパニオン診断が可能となり、病態の異なるファブリー病患者の治療に非常に有用であると思われます。



図 GLA-IgG イムノクロマト測定方法

「ファブリー病」病理診断の落とし穴について検討しました

明治薬科大学 臨床遺伝学

櫻庭 均 & ファブリー病診断グループ

臨床症例の最終診断において、病理学的解析の結果は、極めて大きな意味を持ちます。剖検や生検による病理診断の結果、臨床診断の間違いが指摘されて、診断が覆る場合があることは、よく知られています。ファブリー病の場合においても同様で、病理所見の大切さは言うまでもありません。しかし、最近、病理診断にのみ頼り過ぎると、ファブリー病の正確な診断が出来ない場合があることがわかりました。ファブリー病患者さんの腎臓や心臓などの臓器組織標本を電子顕微鏡で調べると、細胞内に「層状封入体」、「ゼブラ体」や「高電子密度封入体」などが観察されるため、これらの特異的病理所見が見られると、それだけで、「ファブリー病」であると診断される方がおられます。しかし、ここに「ファブリー病」病理診断の落とし穴があります。

私たちが、最初に所謂「偽ファブリー病」の存在に気づいたのは、健診で心肥大が見つかり、その後、心不全を起こして死亡した48歳の男性症例がきっかけです。この方は、剖検の病理検査で心筋内に多数の層状封入体が認められ、「心型ファブリー病」と病理診断されました。しかし、私たちが詳細な解析を行ってみると、臓器の α -ガラクトシダーゼA活性は正常で、同酵素タンパク質も充分量存在し、その遺伝子解析でも変異は認められませんでした。さらに、心筋内には、グロボトリアオシルセラミドの蓄積はみられず、リン脂質が大量に蓄積していることがわかり、この症例は、「ファブリー病ではない」ということが明らかになりました (Clin Chim Acta 372: 154-7, 2006)。

その後、タンパク尿などの腎障害を来した患者さんで、層状封入体などファブリー病に酷似した病理所見を示す「偽ファブリー病」の症例が相次いで見つかりました (図を参照)。近年、「薬剤により、封入体などの異常な病理所見を示した」という動物実験の結果が報告されています。こうした症例の診断においては、酵素活性や蓄積物質の測定および遺伝子解析などを行うと共に、薬歴などの聴取を充分にして、誤診を防ぐ必要があると思います。

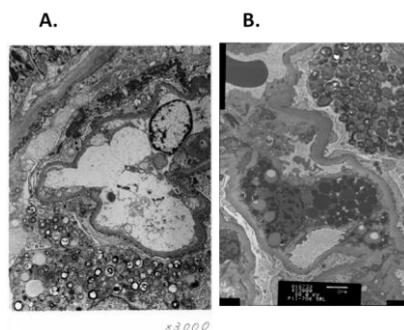


図. 生検腎組織の電子顕微鏡所見—どちらがファブリー病でしょうか？ (正答B、病理学的に、区別が付きません。)

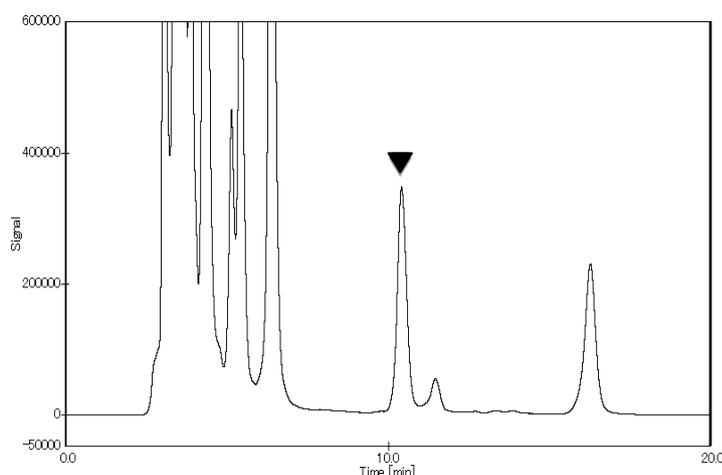
組換え酵素製剤中のマンノース-6-リン酸含量を定量、比較しました

明治薬科大学 生体機能分析学教室

兔川忠靖

リソソーム病に対する根本的治療法の中で、最も汎用されているものが酵素補充療法ですが、その組換え酵素製剤は、より効率的にターゲット臓器に取り込まれるよう開発が進められています。酵素補充療法において、血管内に投与された組換え酵素は、主に細胞膜に存在するマンノース-6-リン酸 (M6P) 受容体を介して細胞内に取り込まれ、リソソームに運ばれると考えられています。従って、酵素タンパク質に結合した糖鎖の非還元末端にある M6P 残基数が多い程、細胞内取り込みに有利と考えられ、酵素の取り込み機構や新たな組換え酵素製剤の検討に、M6P の定量は重要な項目の一つです。

昨年の本シンポジウムで、我々は、酵素製剤中の糖鎖をトリフルオロ酢酸により加水分解し、さらに2-アミノピリジンにより蛍光標識化後、HPLC を用いて M6P 残基数を定量する、特異的で高感度な方法を報告しました (図)。今回、ポンペ病の治療で用いられる酸性 α -グルコシダーゼ、ファブリー病の治療で用いられる α -ガラクトシダーゼ A (GLA)、そして新たに開発された改変型 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA)、ムコ多糖症 I 型および II 型に対する α -イブロンダーゼ、イブロン酸-2-スルファターゼおよびゴーシェ病に対する β -グルコセレブロシダーゼの M6P 残基数を定量、比較しました。さらに、各酵素製剤の M6P 含量が、酵素製剤の M6P 受容体に対する親和性と比例関係にあるか否かを、レセプター結合アッセイで調べてみました。その結果、M6P 含量が多い酵素ほど M6P 受容体に対する親和性が高いことが示唆されました。例えば、ファブリー病の新規酵素として開発している改変型 NAGA は、従来の酵素に倍する M6P 含量と、M6P 受容体に対する高い親和性を示しました。本法は、新規酵素製剤の開発に有用であると考えます。



蛍光ラベル化 M6P のクロマトグラム

試料：GLA 酵素製剤。 矢印は M6P。

ファブリー病の新規治療薬候補である改変型 NAGA の大量生産法を開発しています

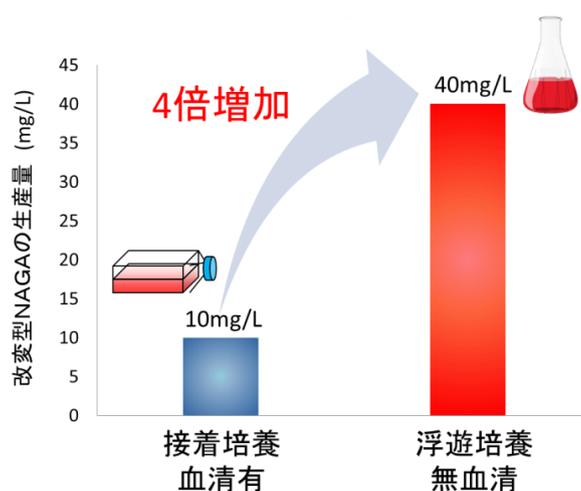
明治薬科大学 臨床遺伝学講座

佐藤 温子

現在のファブリー病に対する酵素補充療法では、もともと患者さんで欠損している α -ガラクトシダーゼ A (GLA) を繰り返し投与することになるため、GLA に対する抗体が作られることがあります。そして、抗体が作られることにより、アレルギー反応等の副作用が現れたり、投与した GLA の働きを阻害してしまうことがあります。我々は、この問題を解決するため、ファブリー病患者さんも持っている α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) を改変して、GLA 活性を獲得させた改変型 NAGA を開発しました。この酵素をファブリー病のマウスに投与すると、各臓器に取り込まれ、蓄積していた糖脂質を分解することが確認されました。

私達は、これまで改変型 NAGA を分泌するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を培養器に接着させたまま、ウシ血清が含まれた培地で培養する方法で、改変型 NAGA を得ていました。しかし、実際に工業化するためには、①生産効率を向上させるため、細胞を浮遊化する、②ウシ血清を使用すると哺乳類間感染微生物の導入の恐れがあるため、無血清条件で細胞を培養するなどの改良を行う必要があります。そこで、今回、私達は、細胞の浮遊化と無血清培地で培養を目指し、検討しました。その結果、細胞の浮遊化と無血清培地での培養に成功し、従来の約 4 倍の生産量 (40mg/L) を得ることが出来るようになりました。

今後は、この培養液からの精製法を確立していきます。



培養条件の変更により、改変型 NAGA の生産量が増加しました

ファブリー病に対する新たな酵素補充療法用酵素製剤・改変型 NAGA の有用性について検討しています

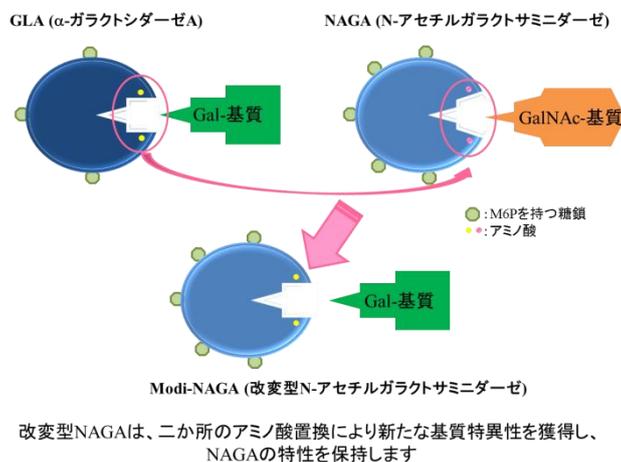
明治薬科大学 臨床遺伝学客員教授、東京医学総合研究所
川島 育夫

ファブリー病は、糖脂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) を分解する責任酵素・ α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の欠損、或いは活性の低下により生じる病気で、上記糖脂質が細胞内に異常蓄積するため、様々な臨床症状を示す難治性遺伝病です。ファブリー病患者に対し行われている根本的な治療法は、組換えヒト GLA を外から投与する酵素補充療法で、多くの患者に有効であることが実証されています。しかしながら、当該酵素の長期投与は、生体の免疫応答等による抗体産生やそれに伴うアレルギー等副作用を起こすことがあり、治療効果の減弱を来たす場合があることも問題となっています。

我々は、この問題の解決を目指し、ファブリー病患者でも発現している α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) に注目しました。NAGA は、GLA と構造が非常に似ています。

NAGA の活性中心のアミノ酸を二箇所換えるだけで、GLA と同様の基質特異性を持つ新たな改変型 NAGA を作製することに成功しました。この改変型 NAGA は、NAGA 本来の特徴である熱安定性を保ち、マンノース 6 リン酸を含む多くの糖鎖を多く持っているので、標的臓器に取込まれ易い性質を保持しています。実験の結果、改変型 NAGA は、短期間投与により、ファブリー病培養細胞やファブリー病マウスに蓄積した糖脂質を分解することが判明しました。

本シンポジウムでは、これまで得られた改変型 NAGA の有用性について、更に、現在行っている、少量の改変型 NAGA の早期投与による基質蓄積予防効果の実験結果も合わせて紹介します。



ザンドホッフ病モデルマウス脳の早期異常を見つけました

小川 泰弘¹、佐野 貴文¹、入佐 真寛¹、児玉 敬²、月村 考宏²、
兎川 忠靖²、山中 正二³、櫻庭 均⁴、大石 一彦¹

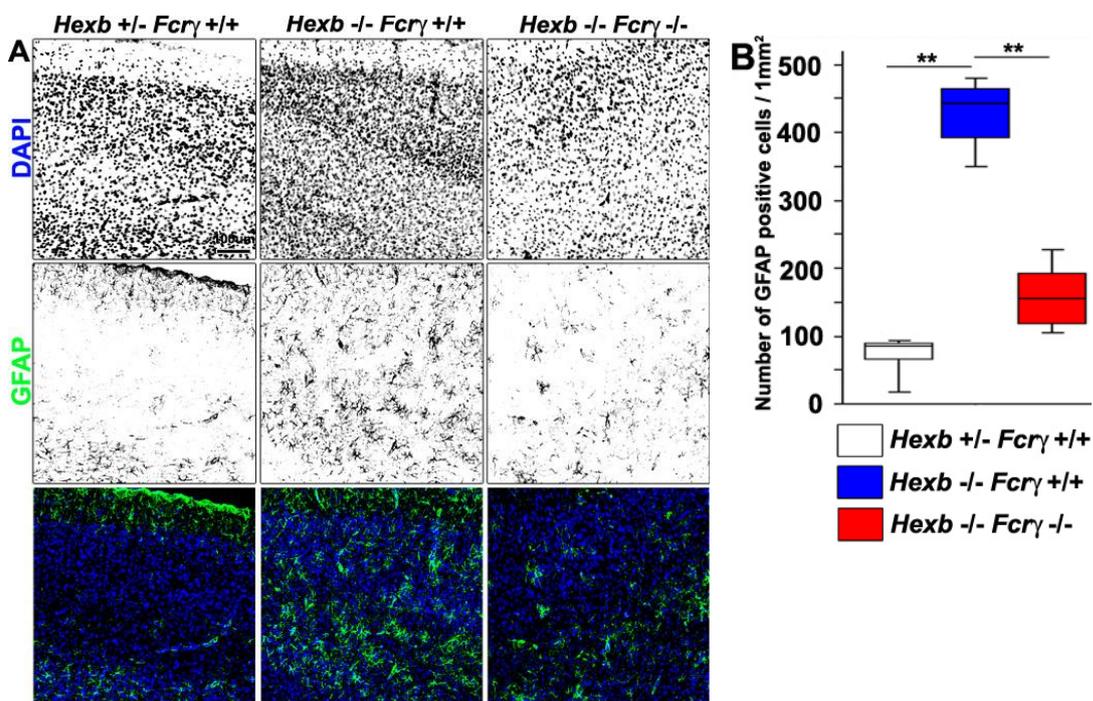
¹明治薬科大学 薬理学、²明治薬科大学 生体機能分析学、³横浜市立大学、

⁴明治薬科大学 臨床遺伝学

ザンドホッフ病 (SD) は、*Hexb* 遺伝子の変異により GM2 ガングリオシドなどが主としてニューロンに蓄積し、進行性の神経障害を起こす遺伝病です。SD モデルマウスの症状は、運動障害が観察される生後およそ 10 週齢以降の解析は行われておりますが、発症期以前の解析例は稀でした。

私たちは、SD のモデルマウスより iPS 細胞を樹立し、これを解析したところ神経系への分化能の異常を見つけました。そこで、生体においても発症前に未知の異常があるのではないかと予想し、SD モデルマウスを詳細に解析致しました。その結果、GFAP 強陽性の活性化アストロサイトが、非常に早期の生後 4 週齢において観察されました。そこで、これが免疫系の活性化による炎症応答によるものかを検討する目的で、*Fcγ* 遺伝子との二重欠損マウスにより獲得免疫系を抑制したところ、活性化アストロサイトが減少しました。

このことから、発症前の早期治療開始の必要性和、免疫応答抑制が治療戦略の一つとなることが明らかになりました。



改良型β-ヘキソサミニダーゼの開発と機能評価を行いました

徳島大学大学院 薬科学教育部 医薬創製教育研究センター長

伊藤 孝司

テイ-サックス病とザンドホッフ病は、β-ヘキソサミニダーゼ A (HexA; αβ ヘテロダイマー) を構成する α および β 鎖を各々コードする HEXA および HEXB 遺伝子の変異が原因で、HexA 活性低下と GM2 の脳内過剰蓄積および中枢神経症状を伴って発症するリソソーム病です。Hexα および β 鎖は相互に 56% 程度のアミノ酸配列の相同性と、X 線結晶構造における類似性を示します。既に演者らは、Hexβ 鎖における基質認識アミノ酸残基を α 型に、また α 鎖のみに存在する GM2 活性化タンパク (GM2A) との結合ループを β 鎖に導入することにより、in vivo で GM2 分解能をもち、また in vitro で野生型 HexB (ββ ホモダイマー) と同等の熱安定性を示す機能改変型 HexB (modB) の作製に成功しています。

今回、新たに GM2A との結合ループ近傍の配列を改変することにより、modB の機能に加え、マウス Hexβ 鎖遺伝子 (Hexb) の KO マウス (ザンドホッフ病モデルマウス, SD マウス) の脳内でプロテアーゼ耐性を示す、改良型 HexB (mod2B) を開発しました。Phos-tag カラムを用いて末端マンノース 6 リン酸 (M6P) 型糖鎖含有 mod2B を精製し、SD マウスの脳室内に単回投与すると、人工蛍光基質を分解する酵素活性は脳領域全体に分布し (図 1)、脳内に蓄積する GM2 および GA2 を減少させました (図 2)。また modB に比べ、mod2B の脳室内投与により、SD マウス運動機能低下を有意に遅延させるとともに、寿命も延長させることが分かりました。

これらの結果から、改良型 HexB (mod2B) は、modB よりも脳内での安定性に優れており、神経細胞表面に存在するマンノース-6-リン酸受容体 (CI-M6PR) をデリバリーターゲットとする有効性の高い脳内補充療法用酵素として、テイ-サックス病およびザンドホッフ病患者の治療に応用できる可能性が考えられます。さらに β 鎖を母体とする改良型 mod2B は、生来正常な β 鎖をもつテイ-サックス病 (α 鎖欠損症) 患者に対する抗原性は低いことが期待されます。

図 1 MUGS分解活性の回復

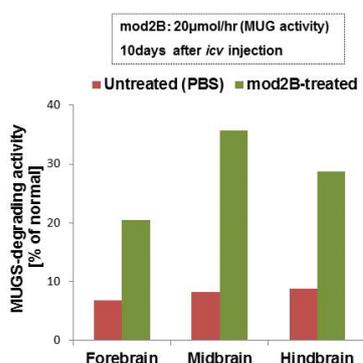
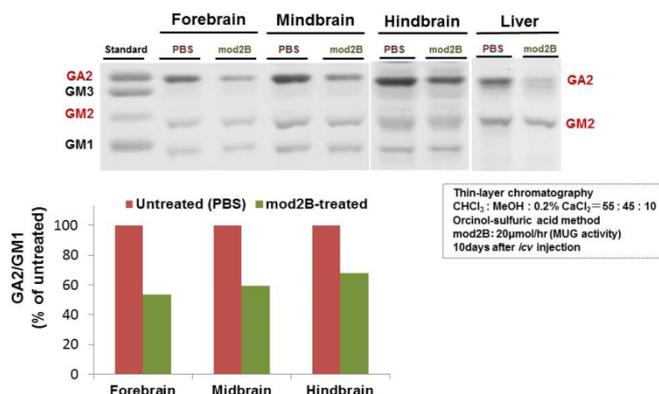


図 2 蓄積GA2およびGM2の減少



糖鎖を改変したリソソーム酵素を生産するシステムを開発しています

明治薬科大学 臨床遺伝学講座

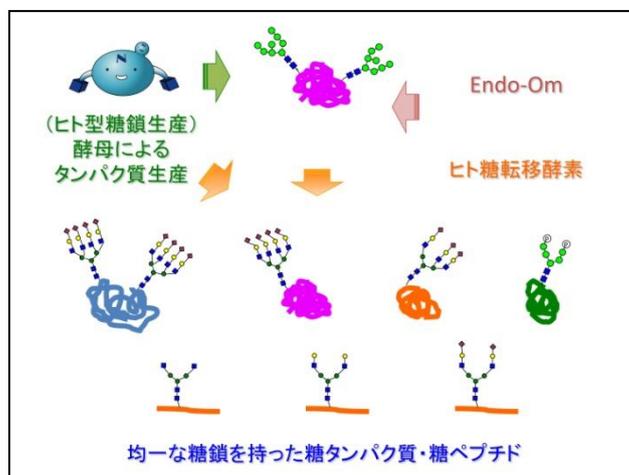
産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

千葉 靖典

リソソーム病の酵素補充療法で使用される酵素においては、その糖鎖構造が細胞内への取り込みに重要です。私たちはこれまでにメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* 株を用いて、様々なリソソーム酵素や関連タンパク質（サポシン B）を発現し、その糖鎖をマンノース-6-リン酸（M6P）型に変換するべく開発を行ってきました。またマウスを使った実験で、酵母で発現した α -ガラクトシダーゼ A は腎臓に効率よく取り込まれることを明らかにしました(1)。さらにリソソーム酵素へ M6P 型糖鎖を結合させるため、タンパク質に付加するアスパラギン型糖鎖を切断する加水分解酵素（Endo- β -N-acetylglucosaminidase）を利用し、この糖鎖転移反応を利用して M6P 型を増やすことを考えました。そのために必要な酵素として、我々は偶然に *O. minuta* 株からその活性を見だし、遺伝子(Endo-Om)を単離することができました(2)。この酵素は、アスパラギン結合型糖鎖の還元末端のキトビオース結合の間を切断します。この際に、適切な構造のドナー基質が存在するとアクセプターに転移されます。私たちはこの反応を加速させるため、Endo-Om に変異を導入し、加水分解反応が抑制された改変酵素を作製しました。また基質となる糖鎖をオキサゾリン化することで、効率よく糖鎖を転移できることを確認しました。M6P 型糖鎖は酵母の細胞壁から比較的容易に調製できるため、現在これらの組み合わせにより糖鎖を効率よく転移する技術の開発を進めています。また M6P 型以外の糖鎖については、さらにヒト糖転移酵素を利用することで様々な糖鎖を持つペプチドやタンパク質を合成することが可能となりました。

(1) Tsukimura, T. *et al.*, *Mol Med.*, **18**:76-82 (2012)

(2) Murakami, S. *et al.*, *Glycobiology*, **23**:736-44 (2013)



難治性急性リンパ性白血病の病態解明に関して研究しています

明治薬科大学・臨床遺伝学講座，東京都医学総合研究所・ゲノム医科学分野、
がん・感染症センター都立駒込病院・小児科 川村眞智子

小児の急性リンパ性白血病(ALL)は、過去 40 年の研究による分子生物学的リスク分類による治療強化で治癒可能となりました。しかし、一部には救命し得ない症例も存在します。当院の予後不良の B-ALL 患者さんの遺伝子を解析すると、t(9;17)(p24;q23)が見られました。9p24 には非受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 JAK2 が存在し、t(9;12)(p24;p13) T-ALL 患者さんでは TEL-JAK2 が報告されていることから(Science, 1997)、JAK2 遺伝子の研究を開始しました。

まず、FISH により、JAK2 遺伝子の分断の有無を確認しました。相手遺伝子同定には、次世代シーケンサーNGS による pair-end RNA-sequencing 法を、他の遺伝子異常の分析のためにはゲノムアレイおよび MLPA 法を用いました。

その結果、FISH で JAK2 遺伝子の分裂を確認しました。RNA-sequencing については、deFuse 法で解析し、JAK2 遺伝子と 17q21 の新規遺伝子の融合を見出しました。また、RT-PCR 法で融合遺伝子の増幅を確認しました。ゲノムアレイと MPLA 法により予後不良因子 IKZF1 の欠失、B-ALL で重要な CDKN2A, CDKN2B のヘミ欠失、PAX5 のホモ欠失も確認しました。

本研究で、過去に報告のない JAK2 の新しい 7 番目の転座相手を同定しました。この種の ALL では JAK2 阻害剤による治療が治療成績を向上させる可能性があり、今後機能解析を行いたいと考えています。年長児の白血病は難治性ですが、これは胎児期にその 1st hit を持つ幼小児期発症の予後のよい ALL と、思春期・若年成人期に増えてくる、BCR-ABL 陽性 ALL を代表とするチロシンキナーゼに関与する ALL との biology の違いと考えられます。

表：過去に報告のある JAK2 遺伝子関連 ALL

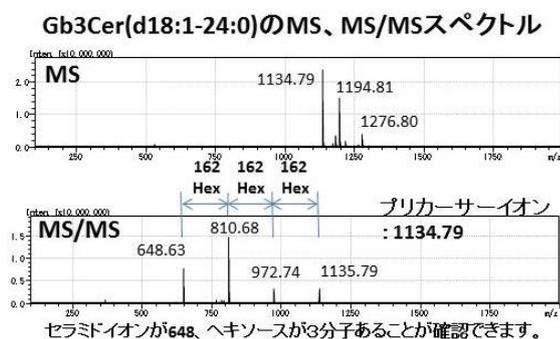
Fusion gene	location	Translocation	type	Age	Ref/Year
ETV6(TEL)-JAK2	12q13	del(6),t(9;12)(p24;p13)	pre-B	19mo/ M	Blood 1997
		t(9;12)(p24;p13)	T	1.6/M	Science 1997
PCM1-JAK2	8p22-21.3	t(8;9)(p22;p24)	pre-B	50/M	Cancer Res 2005
SSBP2-JAK2	5q14.1	t(5;9)(q14.1;p24.1)	Pre-B	39/M	GCC 2008
PAX5-JAK2	9p13	N/A		children /NA	Leukemia 2009
		47,XX,r(7)(p12q31), +9[14/20]	B	12.9/F	Cancer Cell 2012
STRN3-JAK2	14q13-q21	N/A	B	12.2/F	Cancer Cell 2012
BCR-JAK2	22q11.23	47,XY,+2,del(2)(p23), t(3;22;9)(p12;q11.2;p24)	B	2.7/M	Cancer Cell 2012
present case	17q23?	t(9;17)(p24;q23)	B	15/M	

糖脂質を質量分析で分析します

東海大学糖鎖科学研究所

鈴木明身

糖脂質の構造を液体クロマト-質量分析法(LC-MS)で分析する方法の開発を行っています。分析するサンプルの調製をできるだけ簡単にし、混合物のまま、分析できるようにします。糖脂質の糖鎖と脂質構造の両者を明らかにする方法です。これを行うには、LCで分離し、さらに、質量で分離選別した特定の糖脂質分子イオンを捉えて、この分子イオンを壊し、生成されるイオン（フラグメントイオン）の質量を測定して、構造を推定するという方法をとります。特定の糖脂質分子イオンを捉えるために、イオントラップ (IT) という装置が組み込まれています。LC-IT-MS 装置と呼ばれ、下左図に装置と概念図を示しました。下右図に、ファブリー病で蓄積するグロボトリアオシルセラミド (Gb3Cer) のセラミドが d18:1-24:0 である分子の MS/MS スペクトルを示しました。脂質混合物を LC で分離し、さらに MS スペクトルで検出される分子イオン 1134.79 のみを IT に閉じこめて、壊し、生成されたフラグメントイオンを MS/MS で検出します。1134 からヘキソースが脱離した 972、さらにヘキソースが脱離した 820、もう一分子ヘキソースが脱離した 648 イオンが検出されています。648 のセラミドに由来するイオンを捕捉し、さらに壊し、MS/MS/MS 分析でフラグメントイオンを検出することで、セラミド構造が d18:1-24:0 であることが確認できます。これまで、糖鎖の構造は問題にされても、脂質部分の構造は微量で分析できる簡便な方法がなく、脂質部分の持つ機能が十分解析されてきませんでした。今後、LC-IT-MS 法を応用して、糖脂質の機能解析が新たな段階に進むものと期待されます。



ムコ多糖症 I 型における α - L - イズロニダーゼの構造変化を解析しました

明治薬科大学 臨床遺伝学

櫻庭 均 & 構造研究グループ

ムコ多糖症 I 型 (MPS I) は、 α - L - イズロニダーゼ (IDUA) の活性低下により、ヘパラン硫酸やデルマタン硫酸を含むグルコサミノグリカンの部分的分解産物が蓄積して、骨や軟骨などの障害を起こす遺伝病です。本症は、臨床的に、早期発症で重症の「ハーラー症候群 (MPS IH)」、晩期発症で軽症の「シャイエ症候群 (MPS IS)」およびこれらの中間型である「ハーラー・シャイエ症候群 (MPS IH/S)」に分類されます。

昨年、私たちは、徳島大学疾患酵素学研究センターとの共同研究で、本症の疾患責任酵素である IDUA の X 線結晶構造解析を行いました。その結果、酵素の立体構造を明らかにし、IDUA は、 $(\beta/\alpha)_8$ TIM バレルドメイン、 β - サンドウィッチドメインおよびイムノグロブリン (Ig) 様ドメインから構成されることを示しました。そこで、その構造情報を利用して、今年度は、*in silico* で、MPS I における IDUA の構造変化を解析しました。二乗平均平方根距離 (root-mean-square distance, RMSD) の値やアミノ酸置換により影響を受ける原子の数を計算すると、IDUA の構造変化の程度と疾患の臨床型 (重症度) との間に、関連性があることがわかりました。また、これまで不明であった IDUA の Ig 様ドメイン部分での異常に注目すると、この領域でみられたアミノ酸置換は、酵素の活性部位には影響せず、タンパク質のフォールディング障害を来すと考えられました。この様に、構造解析の成果は、MPS I の病態研究に大いに役立っています。

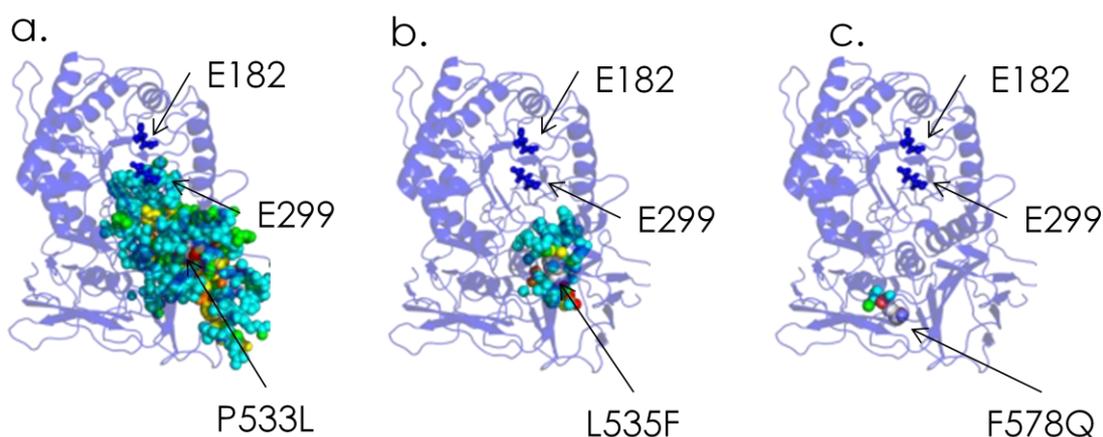


図. MPS I における、IDUA の Ig 様ドメインにおける構造変化

IDUA の基本骨格は「リボンモデル」で示した。各アミノ酸置換により、影響を受けた原子は、「球」で示し、その色は、変異 IDUA の原子とそれに対応する野生型 IDUA の原子との原子間距離で表わした (青 $< 0.15 \text{ \AA}$ 、 $0.15 \text{ \AA} \leq$ 薄い青 $\leq 0.30 \text{ \AA}$ 、 $0.30 \text{ \AA} \leq$ 緑 $< 0.45 \text{ \AA}$ 、 $0.45 \text{ \AA} \leq$ 黄 $< 0.60 \text{ \AA}$ 、 $0.60 \text{ \AA} \leq$ 橙 $< 0.75 \text{ \AA}$ 、赤 $\geq 0.75 \text{ \AA}$)。触媒残基 (E188 および E299) は黒い「小球」で示した。a. P533L (MPS IH)、b. L535F (MPS IH/S)、c. L578Q (MPS IS)。

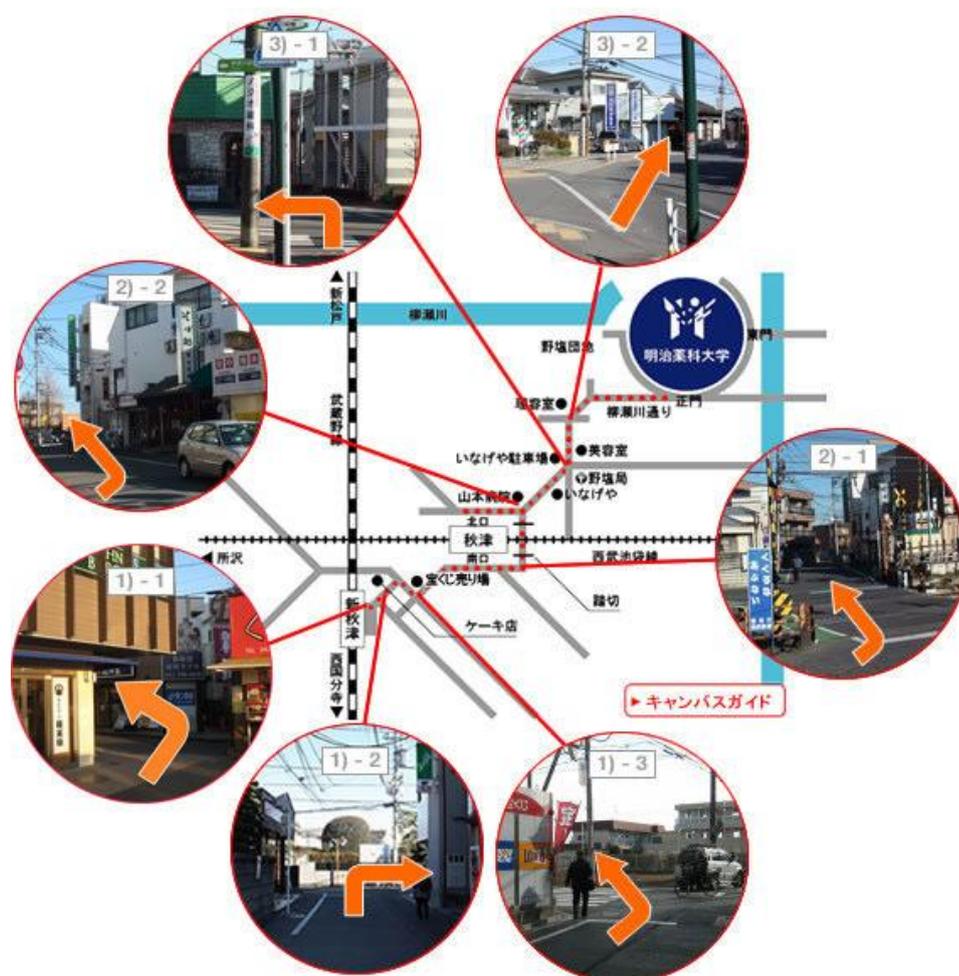
協力企業



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 26 年 3 月 14 日

発行元 明治薬科大学

〒204-8588

東京都清瀬市野塩 2-522-1

TEL: 042-495-8923 (ダイヤルイン)

TEL: 042-495-8611 (代表)