

臨床遺伝学公開シンポジウム 2016

「リソソーム病 基礎から臨床へ」

日時： 2016年3月15日(火) 13:00～16:30

場所： 明治薬科大学
総合教育研究棟 フロネシス 8111 講義室

2016年3月15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 2016 開催に際して	1
プログラム	2
演題 1: ザンドホッフ病モデルマウスの早期ミエリン形成異常を発見しました 明治薬科大学 薬理学 入佐真寛	3
演題 2: 糖脂質に対するマウス・モノクローナル抗体作製について (公財)東京都医学総合研究所 細胞膜 川島育夫	4
演題 3: テイ-サックス病に対する治療用候補酵素の分子特性と有効性を評価しました 徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野 伊藤孝司	5
演題 4: 酵母を利用してバイオ医薬品生産をサポートする技術を開発しています 産業技術総合研究所 生命工学領域 創薬基盤研究部門 千葉靖典	6
演題 5: 次世代迅速簡易診断法の開発と各疾患への応用を目指します (公財) 東京都医学総合研究所 分子医療 芝崎 太	7
演題 6: ムコ多糖症 II 型(MPS II) 原因酵素の構造解析を行っています 北海道情報大学 医療情報学部 医療情報学科 齋藤静司	8
演題 7: リソソーム病に関する統合的なデータベースを構築しています 株式会社 カタリスト 大野一樹	9
演題 8: 臨床遺伝学講座でのファブリー病の診断システムを紹介します 明治薬科大学 臨床遺伝学 大塚智子	10
演題 9: 遅発型ファブリー病原因遺伝子変異と機能的多型との違いについて研究しています 明治薬科大学 臨床遺伝学 佐藤温子	11
演題 10: タンデム MS で何が出来る? マウス臓器中の糖脂質を測定しました 明治薬科大学 生体機能分析学 兎川忠靖	12
演題 11: タンデム MS で血漿中 Lyso-Gb3 を測定しました 明治薬科大学 臨床遺伝学 田中利絵	13
演題 12: タンデム MS で尿中の Gb3 を測定しました 明治薬科大学 臨床遺伝学 志賀智子	14
演題 13: 酵素補充治療を受けているファブリー病患者さんの血清中抗 GLA 抗体を測定する ことは重要です 明治薬科大学 生体機能分析学 月村考宏	15
演題 14: 有害免疫反応を起こし難いファブリー病酵素補充治療薬の開発を目指しています 明治薬科大学 臨床遺伝学 櫻庭 均	16

臨床遺伝学公開シンポジウム 2016 開催に際して

明治薬科大学 臨床遺伝学講座
教授 櫻庭 均

2009年に遺伝病の研究を目的として、明治薬科大学に臨床遺伝学講座が開設されて7年になります。この間、私たちは遺伝性難病のひとつであるリソソーム病（ライソゾーム病）の病態解明に向けて努力して来ました。そして、今、得られた基礎医学的情報を基に、リソソーム病の診断システムを確立し、新たな治療法の開発や疾患データベースの充実を目指して、更に前進を続けています。このシンポジウムでは、私たちの研究の歩みについて、「基礎から臨床へ」というテーマで発表させて頂き、皆様の益々のご指導とご鞭撻をお願いしたいと思います。

本講座の運営に変わらぬ多大なご支援を頂いている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 川島 育夫 川村真智子
研究技術員	田中 利絵 大塚 智子 佐藤 温子 志賀 智子
秘書	田中聖恵子
経理	池田 範子

生体機能分析学

教授	兎川 忠靖
助教	月村 考宏

臨床遺伝学シンポジウム 2016 プログラム

「リソソーム病 基礎から臨床へ」

- 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) 奥山 徹 (明治薬科大学 理事長)
進行説明 櫻庭 均
- 13:10-13:25 ゼンドホッフ病モデルマウスの早期ミエリン形成異常を発見しました
明治薬科大学 薬理学 入佐真寛
- 13:25-13:35 糖脂質に対するマウス・モノクローナル抗体作製について
(公財)東京都医学総合研究所 細胞膜 川島育夫
- 13:35-13:55 テイ-サックス病に対する治療候補酵素の分子特性と有効性を
評価しました 徳島大学大学院 創薬生命工学 伊藤孝司
- 13:55-14:10 酵母を利用してバイオ医薬品生産をサポートする技術を開発しています
産業技術総合研究所 生命工学領域 創薬基盤研究部門 千葉靖典
- 14:10-14:30 次世代迅速簡易診断法の開発と各疾患への応用を目指します
(公財) 東京都医学総合研究所 分子医療 芝崎 太
- 14:30-14:40 ムコ多糖症 II 型(MPS II) 原因酵素の構造解析を行っています
北海道情報大学 医療情報学部 医療情報学科 齋藤静司
- 14:40-14:50 リソソーム病に関する統合的なデータベースを構築しています
株式会社 カタリスト 大野一樹
- 14:50-15:00 休 憩
- 15:00-15:10 臨床遺伝学講座でのファブリー病の診断システムを紹介します
明治薬科大学 臨床遺伝学 大塚智子
- 15:10-15:20 遅発型ファブリー病原因遺伝子変異と機能的多型との違いについて研究して
います 明治薬科大学 臨床遺伝学 佐藤温子
- 15:20-15:35 タンデム MS で何が出来る? マウス臓器中の糖脂質を測定しました
明治薬科大学 生体機能分析学 兎川忠靖
- 15:35-15:45 タンデム MS で血漿中 Lyso-Gb3 を測定しました
明治薬科大学 臨床遺伝学 田中利絵
- 15:45-15:55 タンデム MS で尿中の Gb3 を測定しました
明治薬科大学 臨床遺伝学 志賀智子
- 15:55-16:10 酵素補充治療を受けているファブリー病患者さんの血清中抗 GLA 抗体
を測定することは重要です 明治薬科大学 生体機能分析学 月村考宏
- 16:10-16:25 有害免疫反応を起こし難いファブリー病酵素補充治療薬の開発を目指して
います 明治薬科大学 臨床遺伝学 櫻庭 均
- 16:25-16:30 閉会の辞
- 16:30-18:30 懇親会 (厚生棟 1F 食堂)

ザンドホッフ病モデルマウスの早期ミエリン形成異常を発見しました

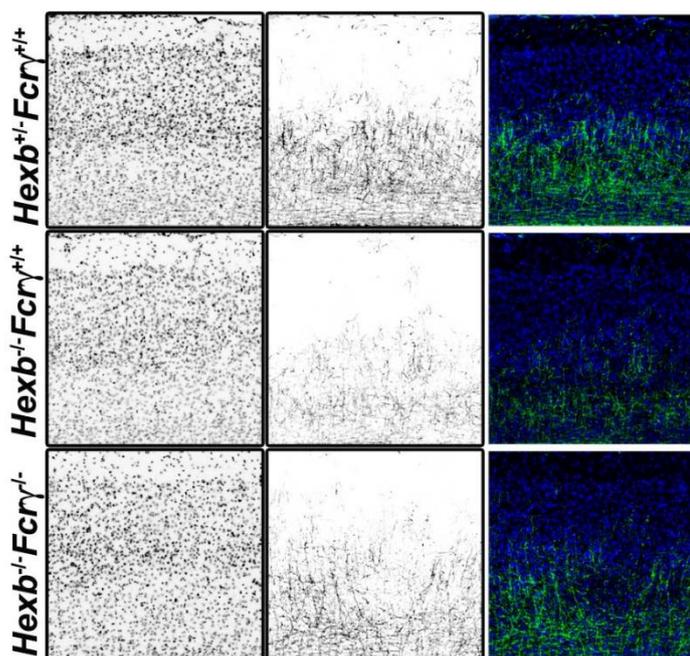
入佐真寛¹、齊藤貴洋¹、古澤栄梨¹、小川泰弘¹、月村考宏²、兎川忠靖²、山中正二³、
櫻庭 均⁴、大石一彦¹

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 病理部、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。その症状は、精神運動発達の遅延や退行、運動障害などの神経系の障害を主体としますが、そのメカニズムには不明な点が多く残っています。そのため、私たちは、SD モデルマウスである *Hexb* 遺伝子欠損マウスを用いて発症期以前からの解析を行ってきました。その結果、私たちは SD モデルマウスの早期異常として、発症に先駆けて GFAP 強陽性の活性化アストロサイトが観察されること、さらに *FcRγ* 遺伝子との二重欠損マウスや FTY720 による免疫系の抑制により、これが減少したことを報告してきました。今回、私たちは、脳の発達に関して詳細に解析し、ミエリン低形成を起こしていることを発見しました。これが、早期からの免疫系の活性化によるものかを検討する目的で、*Hexb* 遺伝子と *FcRγ* 遺伝子の二重欠損マウスを用いて解析したところ、MBP の発現が回復しました。すなわち、ミエリン低形成の原因は、早期からの免疫系の活性化によるものであることを明らかにしました。さらに、免疫系の活性化を FTY720 によって抑制することで、動物個体の運動機能を改善させることができるかを解析しましたので報告致します。

4 週齢ザンドホッフ病マウス脳の MBP 染色像



糖脂質に対するマウス・モノクローナル抗体作製について

川島育夫 ^{1,2}

¹(公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜、² 明治薬科大学 臨床遺伝学

糖脂質は、全ての哺乳類の細胞に普遍的に存在する細胞膜の構成成分であり、糖鎖には 1) 細胞-細胞間認識現象関連分子、2) 多くの活性物質やトキシンの受容体、3) 免疫抑制物質、4) がん・胎児性抗原としての多様な機能を持つことが報告されています。

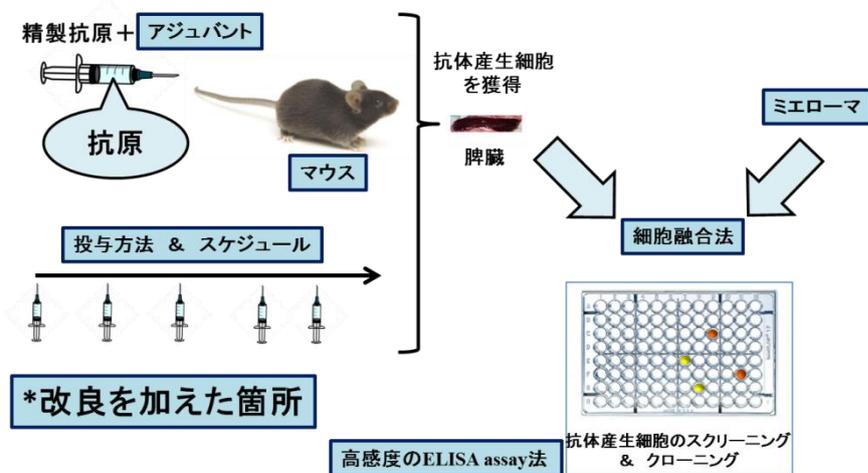
1975年にミリスティンとケラーによりモノクローナル抗体作製法（1985年にノーベル賞を受賞）が報告され、現在までに非常に多くのモノクローナル抗体が樹立され、多くの研究分野で無くてはならない有用なツール（試薬）として汎用されています。

演者らは、糖脂質、特に神経系由来細胞に豊富に存在する、シアル酸含有スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの構造と機能を解析するため、糖脂質の持つ糖鎖に特異的に反応するマウス・モノクローナル抗体の開発に取り組みました。

ガングリオシド GD3 に対する抗体が 1982 年に報告され、その後、幾つかの抗体が報告されましたが、全てマウスに癌細胞等を免疫して得られたもので、半ば偶然に樹立されたものでした。そこで演者らは、目的とする糖脂質-糖鎖に対する抗体を樹立するため、既存の方法を見直し、いくつかの点を改良することで、狙って、且つ効率よくモノクローナル抗体を作製する方法の開発に成功しました。

本講演では、抗糖脂質-抗体樹立の為に、1) 改良した部分と 2) 樹立した抗体を紹介します。尚、本講座が研究に取り組んでいるファブリー病や GM2 ガングリオシドーシスで蓄積する糖脂質、Gb3 や GM2 を検出するために用いるモノクローナル抗体も演者らが樹立したものです。

目的とする抗糖脂質-糖鎖抗体を樹立する -- 精製糖脂質を抗原とする抗体作製法の開発 --



テイ-サックス病に対する治療用候補酵素の分子特性と有効性を評価しました

伊藤孝司¹、北風圭介¹、辻 大輔¹、田崎智佳子¹、水谷安通¹、杉山栄二²、神谷真子³、
瀬藤光利²、浦野泰照³、兎川忠靖⁴、櫻庭 均⁵

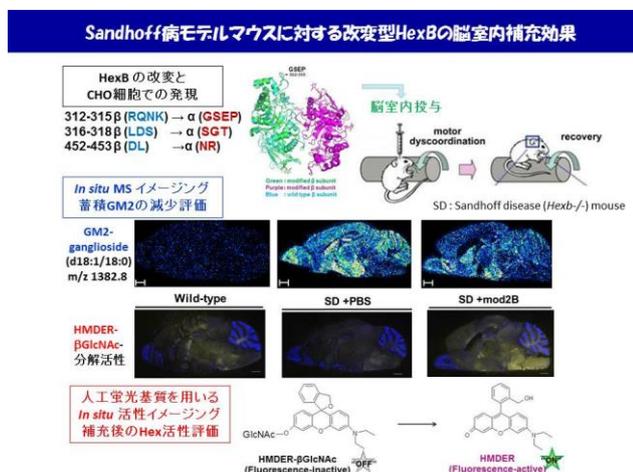
¹徳島大院・薬・創薬生命工学、²浜松医大・細胞生物学、³東大院・医・生体情報学、⁴明治薬大・生体機能分析学、⁵明治薬大・臨床遺伝学

スフィンゴ糖脂質のひとつであるGM2ガングリオシド(GM2)の分解代謝は、リソソーム酵素のβ-ヘキササミニダーゼA (HexA, αβヘテロダイマー)とその補助因子であるGM2活性化タンパク質 (GM2A) との協調作用により営まれています。テイ-サックス病 (TSD) は、そのα鎖をコードするHEXA遺伝子変異が原因で、酵素活性欠損と脳内GM2の過剰蓄積および中枢症状を伴って発症するリソソーム病です。1881年の発見以来、本疾患に対する根本治療法は未だ確立されておらず、近年の先端医療技術に基づく治療法の開発が期待されています。

これまで演者らは、HexAのβ鎖の一部のアミノ酸をα鎖型に置換することにより、GM2認識・分解能を持つ機能改変型HexB (modB, modified β鎖ホモダイマー)の作製に成功しました。本研究では、modBにおけるGM2Aとの結合ループ近傍アミノ酸配列をさらにα鎖型に置換したβ鎖遺伝子を高発現するCHO細胞株の培養上清から精製したmod2B の分子特性を評価しました。またHex β鎖遺伝子ノックアウトにより、HexA欠損と脳内GM2過剰蓄積を伴うSandhoff病モデルマウス(SDマウス)に対する脳室内酵素補充効果を検討しました。

精製mod2BをTSDまたはSD患者由来皮膚線維芽細胞の培養液に補充した結果、細胞内Hex活性の回復と蓄積GM2の減少が観察されました。また10週齢のSDマウスの脳室内に投与すると、脳実質中の人工蛍光Hex基質分解活性が回復し、またイメージングMS解析により、海馬、小脳を含む各脳領域でのGM2およびasialoGM2 (GA2) が顕著に減少することを見出しました。補充後の脳内分子種を解析したところ、mod2BはGM2分解能を持つ成熟体として存在し、modBに比べ、プロテアーゼ抵抗性を示しました。さらに、mod2Bの複数回脳室内投与により、発症後期における有意な運動機能低下の遅延と寿命の延長が認められました。

以上の知見から、改良型 mod2B は、特に正常 Hexβ 鎖をもつ TSD 患者に対する新規の脳室内酵素補充用治療薬シーズの候補になることが期待されます。



酵母を利用してバイオ医薬品生産をサポートする技術を開発しています

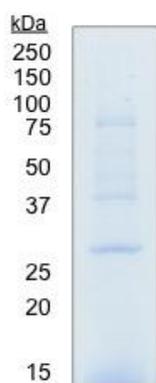
千葉靖典^{1,3}、清水 明¹、高橋佳江¹、伊藤理恵¹、喜多島敏彦^{1,2}

¹産業技術総合研究所 生命工学領域 創薬基盤研究部門

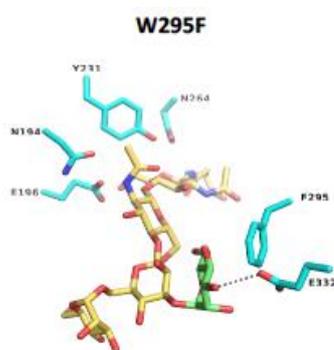
²江南大学 生物工程学院、³明治薬科大学 臨床遺伝学

リソソーム酵素などの生体を構成するタンパク質の多くには糖鎖修飾があり、タンパク質の血中安定性や細胞内小器官への輸送などに関与しています。このため、糖タンパク質であるバイオ医薬品についても、その糖鎖構造を適切な構造にする必要があります。私たちは、酵母を用いてリソソーム酵素や抗体などのバイオ医薬品の生産を検討してきましたが、その際に糖鎖構造が異なると免疫反応が起きてしまいます。そこでこれらの糖鎖をヒトと同じ形に変換する技術開発を行ってきました。加えて、これらをできるだけ安く提供するため、発現する酵母の生産能力を向上する研究を進めています。

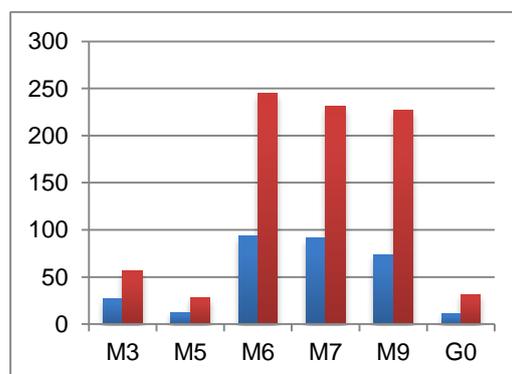
酵母での発現においては、株の改良、培養条件の検討を行うとともに、より安全に生産ができるような株の育種も行ないました。また糖鎖をヒト型化するために宿主の改良を行うとともに、培地成分が糖鎖構造に大きく影響を与えることも明らかにしました。これまでにリソソーム酵素や抗体をはじめ、糖鎖バイオマーカー検出のために必要となるレクチンの生産も行ない、一部は産業利用を目指して検証が進められています。またアスパラギン結合型の糖鎖を切断するエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) のアミノ酸置換体を作製し、従来の2倍以上の高い加水分解活性を有する酵素を開発しました。またアミノ酸置換体を利用して、糖鎖のリモデリングを行う技術を開発しました。現在、糖鎖分析方法の適合性を支援する体制を作るため、これらを用いた糖タンパク質の校正品開発を進めています。



レクチン W の発現



ENGaseW295F 置換体の構造と活性



次世代迅速簡易診断法の開発と各疾患への応用を目指します

芝崎 太¹、大保木啓介¹、梶原直樹¹、野村奈美¹、遠藤典子¹、中野早知栄^{1,2}、小林行治²、
兎川忠靖³、月村考宏³、櫻庭 均⁴、小出 徹⁵

¹ (公財) 東京都医学総合研究所 分子医療、² シンセラ・テクノロジーズ(株)、

³ 明治薬科大学 生体機能分析学、⁴ 明治薬科大学 臨床遺伝学、

⁵ 東京バイオマーカー イノベーション技術研究組合 (TOBIRA)

基礎・医療分野における新しい蛋白質・遺伝子バイオマーカーの発見により、これまで困難だったごく初期の病変を発見したり、疾患の発症や、予後を個人毎に予測する試みが活発化しています。さらに IT や ICT (Information & Communication Technology) 技術の進歩により、医療電子情報のビッグデータとしての活用から、スマホを利用した診断等に加え、使用するサンプルも微量になり、測定機器の小型化・簡易化が進んでおり、今後の医療に大きな変革をもたらす事が予想されています。

これらの背景の中で、私達は、東京都の病院群 (7,800 床) や TOBIRA 関連企業との産官学医連携にて次世代の診断法の開発を行っています。これまでに新しい蛋白質や遺伝子バイオマーカーを用いた高感度、簡易、迅速診断法を、各種の癌、季節性や高病原性インフルエンザ、加齢性筋萎縮症、尿路感染症、Fabry 病等に対して開発し、一部のキットは、研究試薬として、あるいは PMDA の認可を得て診断薬として販売されています。

これらの中で、特に Fabry 病に関しては、櫻庭先生を中心とした明治薬科大学との共同研究で、(1) 血液濾紙を試料とした MUSTag 法を利用し、血清および血漿の GLA 蛋白質の定量測定で、各亜型を含む Fabry 病患者の高感度診断法を開発しました、また、(2) ファブリー病の酵素補充療法の際に問題となる、血清中の抗 GLA 抗体(IgG)量を、簡便、且つ短時間で測定できる「GLA-IgG イムノクロマト」を開発してきました。

現在、これらの蛋白質バイオマーカーの測定や診断法に加え、将来の遺伝子診断の普及につながる、高速遺伝子診断装置の開発を行っています。従来では数時間必要であった遺伝子診断が、サンプル処理を含めイムノクロマトと同様の 15-20 分程度で完了できる高速で簡易、安価な機器が実現できれば、様々な疾患への遺伝子診断・検査が普及することが予想されます。現在、すでに様々な改良を加えた第三世代の超高速遺伝子増幅装置の開発が進んでおります。本発表では、その開発状況に関してもご報告し、今後の本機器の活用による各遺伝病の初期診断や病態予測、治療に貢献できればと考えています。

ムコ多糖症 II 型 (MPS II) 原因酵素の構造解析を行っています

齋藤静司¹、大野一樹^{2,3}、櫻庭 均⁴

¹北海道情報大学 医療情報学部 医療情報学科、²株式会社 カタリスト、

³東京工業大学 情報生命博士教育院、⁴明治薬科大学 臨床遺伝学

我々はこれまで、ファブリー病をはじめとする、リソソーム病に関わるいくつかの遺伝子産物について、変異体構造モデルの特徴と臨床症状との関係に関する研究を進めてきました。

MPS II はリソソーム病の一種で、疾患責任酵素イズロネート-2-スルファターゼ (IDS) をコードする *IDS* 遺伝子の変異により引き起こされます。

今回、500 種類以上の MPS II に関連する既知の変異データをまとめた新たなデータベースを作成するにあたり、IDS 変異体の構造モデルを作成し、臨床症状との比較を行いました。

これまでの解析と異なる点は、IDS タンパク質の結晶構造が明らかにされていないため、まず野生型 IDS タンパク質のモデル構造を作成しなければならない点です。この様な場合、タンパク質モデルの構造にはいくつか曖昧な点ができるため、そこから推測する変異体の構造モデルはさらに曖昧性を増すこととなります。当初の計算ではいくつかの変異体構造が非常に歪んだ形になったため、野生型のモデル構造に対して短い MD 計算と simulated annealing と呼ばれる最適化手法で構造を最適化しました。これを元に変異体構造モデルを作成したところ、作成した IDS 変異体構造モデル(野生型構造からのずれの指標)と臨床型との間に関連性が見出されました。

この様に、モデル構造の適切な処理により、結晶構造データ(PDB データ)が得られていない場合でも、我々の方法論が使える可能性があることがわかり、より様々な疾患に対して適用の可能性が広がるのではと考えています。

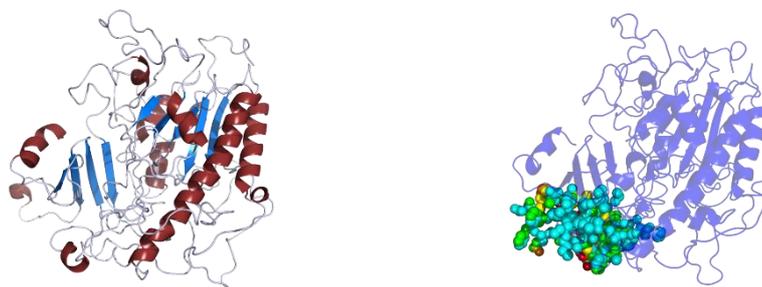


図. ムコ多糖症 II 型 (MPS II) 原因酵素とその変異体の構造モデル.

左は野生型 Idulonate 2-sulfatase の構造モデルで MD 計算を 10(ns) 温度 300K 行った後、徐々に温度を下げて最も安定な構造にしたものです。右は、左の野生型構造モデルに基づいて作成したある変異体モデル(P480R)で変異による構造変化の情報を表示したものです: アミノ酸置換により影響を受けた原子を「球」で示し、構造変化の大きさを色の違いで表現しています (青 < 0.15 Å, 0.15 Å ≤ 薄い青 ≤ 0.30 Å, 0.30 Å ≤ 緑 < 0.45 Å, 0.45 Å ≤ 黄 < 0.60 Å, 0.60 Å ≤ 橙 < 0.75 Å, 赤 ≥ 0.75 Å) .

リソソーム病に関する統合的なデータベースを構築しています

大野一樹^{1,2}、齋藤静司³、櫻庭 均⁴

¹株式会社 カタリスト、²東京工業大学 情報生命博士教育院、

³北海道情報大学 医療情報学部 医療情報学科、⁴明治薬科大学 臨床遺伝学

リソソーム病に対する治療方法に関しては、酵素補充療法以外にも基質合成阻害療法やシャペロン療法等の様々な治療方法が開発されるなど、年々進歩しております。しかし、患者毎に最適な治療方法や治療開始時期を決定する手法は未だに確立されておらず、臨床における重要な課題のひとつとなっております。

この課題を解決するために、私たちはリソソーム病の臨床情報、疾患責任酵素蛋白質分子の立体構造情報に関わる情報を収集し、統合的なデータベースを作成しています。現在までにファブリー病、ムコ多糖症 VI 型 (MPS VI)、ムコ多糖症 I 型 (MPS I) の 3 つのリソソーム病についてデータベースを構築・公開しております。最近、ファブリー病のデータベースに新たな機能を追加しました。また、ムコ多糖症 II 型 (MPS II) のデータベースを新たに構築・公開しました。

私たちは、これらのデータベースはリソソーム病の研究者が病態を解明する際に役立つと考えています。また、これらのデータベースを活用することで、リソソーム病の治療にあたる医師は、患者毎に適切な治療方法や治療開始時期を決定する際の参考情報を効率的に検索することができます。私たちの研究が、リソソーム病の治療の質の向上や医療費の適切な使用に繋がることを期待しています。

The image shows two screenshots of the Fabry database website. The left screenshot displays a table of Fabry mutants with columns for ID, locus, base, aa, and phenotype. The right screenshot shows a detailed view of a mutant, including a table of properties and two microscopy images (A and B).

id	locus	base	aa	phenotype
1	Exon 2	c.335G>A	p.R112H	later-onset
2	Exon 5	c.644A>G	p.N215S	later-onset
3	Exon 6	c.888G>A	p.M296I	later-onset
4	Exon 2	c.196G>C	p.E66Q	polymorphism
5	Exon 3	c.427G>A	p.A143T	polymorphism
6	Exon 6	c.937G>T	p.D313Y	polymorphism

図. ファブリー病のデータベース (fabry-database.org) の新規機能について

左図は、E66Q、A143T、D313Y (functional polymorphism と考えられているアミノ酸置換) と R112H、N215S、M296I (遅発型 Fabry 病の原因と考えられているアミノ酸置換) についてのリストを示す。

右図は、両群の変異に関する酵素活性、酵素量、lyso-Gb3 の蓄積量やアミノ酸変異による酵素分子の構造変化の比較表を示す。

臨床遺伝学講座でのファブリー病の診断システムを紹介します

大塚智子¹、志賀智子¹、田中利絵¹、月村考宏²、兎川忠靖²、櫻庭 均¹

¹明治薬科大学 臨床遺伝学、²明治薬科大学 生体機能分析学

ファブリー病は、リソソーム性加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異により GLA 活性が低下し、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) が全身の組織に蓄積する X 染色体性の遺伝病です。ファブリー病の患者さんは、主に心障害、腎障害や脳血管障害等の症状を示しますが、これらは一般的な症状なため、直ちにファブリー病を疑うことは困難です。そのため、これらの症状をきたす原因不明の疾患患者さん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。当講座では、男性に対しては上記の障害を示す症例を対象としたハイリスク・スクリーニングを、女性に対しては家系や病理像等からファブリー病が強く疑われる症例を対象にした個別診断を行っています。

男性の場合には、GLA 活性を測定することでファブリー病を診断することが可能です。1次検査では血清中 GLA 活性を測定し、2次検査では白血球中の GLA 活性を測定します。そして、確定診断のため、GLA 遺伝子解析、血漿中 Lyso-Gb3 の測定、尿中 Gb3 の測定を行います。1次検査での血清中 GLA 活性の測定は簡便なため、今までに 8,300 人以上を検査し、40 人以上のファブリー病患者さんを診断しました。

女性の場合は、白血球中の GLA 活性測定、GLA 遺伝子解析、血漿中 Lyso-Gb3 の測定、尿中 Gb3 の測定等を行い、それらの結果を基に、総合的に診断をする必要があります。現在までに 120 人以上を検査し、50 人以上のファブリー病患者さんを診断してきました。

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に貢献していきたいと思います。

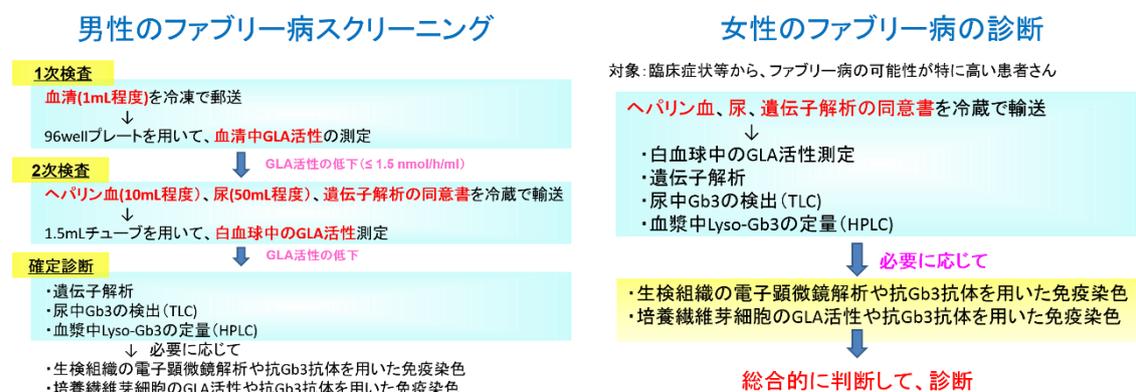


図. 男性患者と女性患者の診断の流れ

遅発型ファブリー病原因遺伝子変異と機能的多型との違いについて研究しています

佐藤温子¹、重永雅志²、月村考宏²、兎川忠靖²、櫻庭 均¹

¹ 明治薬科大学 臨床遺伝学、² 明治薬科大学 生体機能分析学

近年、世界中でファブリー病のスクリーニングが行われるようになりました。そして、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) のアミノ酸置換を起こす塩基置換が次々と発見されており、現在 450 種類以上 (全遺伝子変異は 750 種類以上) 報告されています。このようなスクリーニングの中で、E66Q、A143T、D313Y が、それぞれ、日本人や韓国人、アフリカ系アメリカ人、白人で高い頻度で見つかりました。これらは、アミノ酸置換を起こすにもかかわらず、ファブリー病患者さんよりも比較的高い GLA 活性を示すことから、ファブリー病を引き起こすアミノ酸置換ではなく、機能的多型であると考えられています。このような機能的多型と病気を引き起こすミスセンス変異の違いを明らかにすることで、ファブリー病の分子病態の解明が進むことが期待されます。そこで我々は、機能的多型と考えられる 3 種類 (E66Q、A143T、D313Y) と遅発型ファブリー病の原因と考えられるミスセンス変異 3 種類 (R112H、N215S、M296I)、古典型ファブリー病の原因となるミスセンス変異 1 種類 (R112C) および野生型の GLA 遺伝子について発現実験を行い、比較してみました。

これらの遺伝子を導入したプラスミドベクターを COS-7 細胞に遺伝子導入し、一過性過剰発現させ、その細胞内の GLA 活性と GLA 蛋白質の量を解析しました。その結果、機能的多型は、ミスセンス変異に比べて、細胞内の GLA 活性が高く、また GLA 蛋白質量も多いことが確認されました (図)。これは、ミスセンス変異 GLA は細胞の品質管理によりほとんどが分解されてしまうにもかかわらず、機能的多型では分解されずに、細胞内に GLA が多く存在していることを示していると考えられます。

このように、機能的多型とミスセンス変異の違いを解明していくことは、pathogenic なのか、non-pathogenic なのかを判断する必要があるアミノ酸置換が新たに発見された場合、役立つ可能性があります。

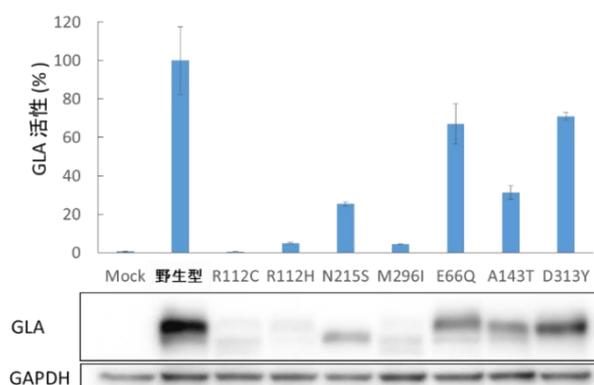


図. COS-7 細胞に GLA 遺伝子を導入し発現させました

タンデム MS で何ができる？ マウス臓器中の糖脂質を測定しました

兎川忠靖¹、児玉 敬¹、月村考宏¹、川島育夫^{2,3}、櫻庭 均³

¹ 明治薬科大学 生体機能分析学、² (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜、

³ 明治薬科大学 臨床遺伝学

これまで我々が糖脂質の測定法として診断に用いた HPLC 蛍光測定法は、多くのファブリー病の患者さんを見出すことに貢献してきました。その HPLC 蛍光測定法ですが、弱点がないとは言えません。定量限界付近の測定に於いて認められる小さなピークは「本当に lyso-Gb3 なのか？」という問題です。血漿中 lyso-Gb3 の定量限界が 2nmol/L 程度であり、健常人や E66Q 置換などの検体については、すべて 2nmol/L 以下と報告してきました。意味のない数値を診断に用いないために、我々は 2nmol/L という確実なラインを設けてきたわけです。また、Gb3 については、直接には検出できず、酵素反応により lyso-Gb3 に変換後、HPLC で定量していました。一方、糖脂質の測定にもタンデム MS が普及しはじめ、我々もタンデム MS を用いて、血漿中 lyso-Gb3 や尿中 Gb3 を測定することを開始しました。新規の診断にも用いていますが、これまでの検体を再測定することでタンデム MS による測定データを蓄積し、lyso-Gb3 や Gb3 のマーカーとしての有用性を再評価することも行っています。タンデム MS は、その利点として、特定のイオンを選択後、そのイオンを分解させることで得られるフラグメント情報により、ピークの定性が確実であることが挙げられます(図)。我々は、この利点を生かして、血漿中 lyso-Gb3 や尿中 Gb3 の新たな知見を報告しました。さらに、このタンデム MS 測定法を利用して、ファブリー病モデルマウスの腎臓に蓄積する Gb3 や lyso-Gb3 の isoform や analogue の特異性に焦点を当て、遺伝子組換え酵素の投与による、それらの分解効果に関して解析しました。その結果、腎臓には、遺伝子組換え酵素の投与時に、肝臓や心臓に比べて分解率の低い Gb3 の isoform があることがわかりました。

ファブリー病患者に対する酵素補充療法は、早期に治療が開始された場合、特にその有効性が報告されていますが、進行した腎障害に対しては、治療効果はあまり有効ではなく、Gb3 isoform の分解率の差は、その原因を探る一つの手段になることが期待されます。

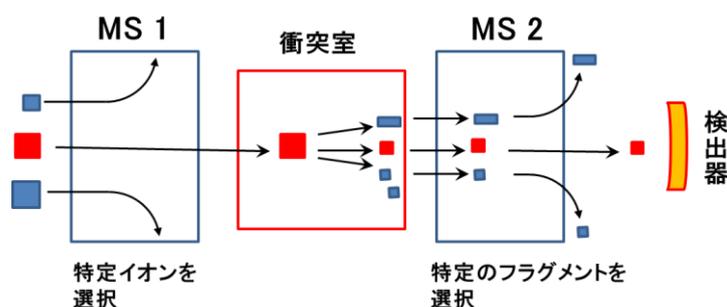


図. タンデムMSにおけるMultiple Reaction Monitoring

タンデム MS で血漿中 Lyso-Gb3 を測定しました

田中利絵¹、児玉 敬²、月村考宏²、兎川忠靖²、川島育夫^{1,3}、志賀智子¹、櫻庭 均¹

¹ 明治薬科大学 臨床遺伝学、² 明治薬科大学 生体機能分析学、

³ (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜

近年、ファブリー病の診断と治療効果判定のためのバイオマーカーとして、血漿中のグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が有用であると報告されています。当講座でも、これまで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、ファブリー病患者さんやその疑いのある患者さんを対象として血漿中 Lyso-Gb3 を測定してきました。HPLC を用いた測定の利点として、簡易な装置で定量できることが挙げられますが、機器の特性上、Lyso-Gb3 としての同定が保持時間のみで行われる点が問題となっていました。そのため、M296I や R112H 等の特殊な遺伝子変異を持つ患者さんや健常人を対象とした場合、血漿中 Lyso-Gb3 濃度が測定感度以下の値を示し、鑑別ができませんでした。そこで、当研究室では、HPLC に比べて高感度で選択性の高いタンデム型質量分析法 (タンデム MS) を用いた血漿中 Lyso-Gb3 の定量を検討しました。その結果、HPLC では検出できなかった特殊な遺伝子変異を持つファブリー病患者さんや健常人の血漿中 Lyso-Gb3 濃度を確実に定量することができるようになりました。そして、HPLC では定量限界付近であった M296I や R112H 等の変異を有する患者血漿中の Lyso-Gb3 濃度が、健常人に比べ高いことを確認しました。

今後は、タンデム MS による測定データを積み重ね、ファブリー病の診断や治療に有用な知見を得たいと思っています。

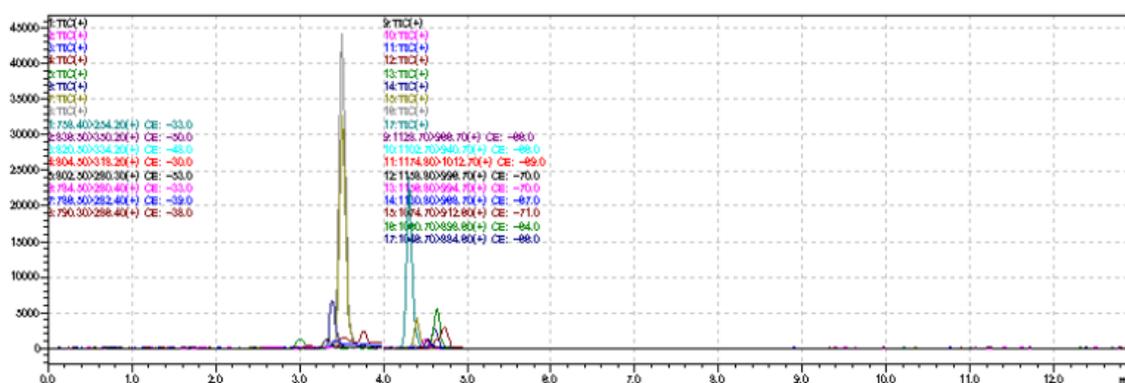


図. 古典型男性患者の血漿中 Lyso-Gb3 のマススペクトル

タンデム MS で尿中の Gb3 を測定しました

志賀智子¹、児玉 敬²、月村考宏²、兎川忠靖²、川島育夫^{1,3}、田中利絵¹、櫻庭 均¹

¹ 明治薬科大学 臨床遺伝学、² 明治薬科大学 生体機能分析学、

³ (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜

グロボトリアオシルセラミド (Gb3) は、図に示すような構造を持つ糖脂質です。正常組織では腎臓、肝臓、大動脈や脾臓などに存在しますが、通常はリソソームに存在する α -ガラクトシダーゼ A (GLA) により分解されます。ファブリー病患者さんの場合、GLA 活性が低下するため、Gb3 が分解されず臓器に蓄積すると共に、尿中に過剰排泄されます。そのため尿中の Gb3 測定は、ファブリー病の診断、特に女性の患者さんの診断や治療効果判定のための有用な手段となっています。

当講座では、これまで薄層クロマトグラフィー (TLC) 法で尿中 Gb3 の分離分析を行ってきました。この方法は、尿から抽出した Gb3 画分を TLC で分離後、Gb3 に対する抗体で免疫染色し、Gb3 標準品と同じ位置のバンドの強さと比較対照して判定します。本法は半定量法ではありますが、多検体を同時に比較し、判定できる利点があります。しかし、免疫染色の結果は、実験毎にバンドの濃淡が微妙に変化するため、判定に悩むこともあります。

そこで、当研究室では、タンデム型質量分析法 (タンデム MS) による尿中 Gb3 の定量を検討しました。Gb3 にはセラミド部分の脂肪酸の炭素数が異なるアイソフォームが存在するため、それぞれのアイソフォームを測定し、内部標準法により、アイソフォームの総量を尿中総 Gb3 として定量しました。そして、TLC 用のサンプルにも内部標準を添加してタンデム MS で定量し、TLC とタンデム MS の相関性を求めました。いずれの場合も測定値はクレアチニンで補正することで、良好な相関性が得られました。

タンデム MS を用いて測定を行うことで、尿の濃さに左右されず尿中 Gb3 の判定ができるようになりました。今後はさらに検討を重ね、ファブリー病の診断、治療の効果判定に貢献したいと思います。

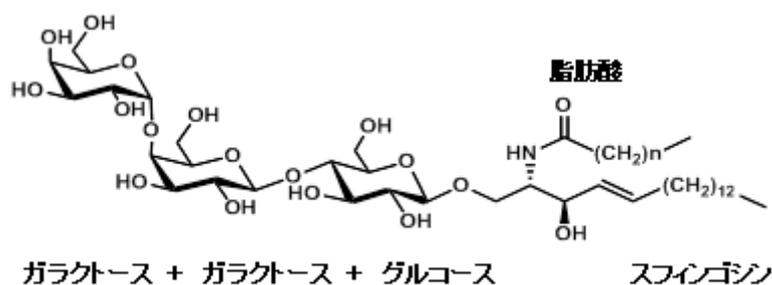


図. Gb3 の構造

酵素補充治療を受けているファブリー病患者さんの血清中抗 GLA 抗体を測定することは重要です

月村考宏¹、芝崎 太²、重永雅志¹、兎川忠靖¹、櫻庭 均³

¹ 明治薬科大学 生体機能分析学、² (公財) 東京都医学総合研究所 分子医療、

³ 明治薬科大学 臨床遺伝学

現在、ファブリー病患者さんに対して組換え α -ガラクトシダーゼ A (GLA) を投与する酵素補充治療 (ERT) が行われており、Agalsidase alfa と Agalsidase beta が使用されています。近年、治療を進めていると抗 GLA 抗体が産生され、それにより有害免疫反応や治療効果が減弱されることが報告されており、抗 GLA 抗体の有無や量をモニターしていくことが重要と考えられます。現在、抗 GLA 抗体の量を測定する場合、病院から外部検査会社に依頼する必要があるため、結果を得るまでに時間がかかってしまいます。そこで私達は、ERT を受けている患者さんに抗体が作られてしまっているか否かを病院で迅速に検査する方法として、イムノクロマトグラフィーを開発しました。この方法を使用すると、僅かな血液を使って約 20 分で結果を得ることができます。また、作られた抗 GLA 抗体の量と治療薬に対する阻害効果の相関性を調べたところ、抗 GLA 抗体の量が多い方が治療薬の働きを強く阻害する傾向がみられました。しかし、抗 GLA 抗体の量が多いにもかかわらず、治療薬への阻害作用が弱い症例も存在しました (図)。これらの結果から、どのような患者さんに抗 GLA 抗体ができる可能性が高いかを治療前に知ることができれば、治療を進める上で助けになると考えられました。そのため、患者さんの遺伝子変異と抗 GLA 抗体の有無を調べたところ、抗 GAL 抗体陽性の患者さんは、遺伝子欠失やナンセンス変異など GLA 蛋白質の生合成に異常をきたす古典型男性患者に多く、抗 GLA 抗体陰性の患者さんは、ミスセンス変異を持つ遅発型男性患者やヘテロ女性患者に多いことがわかりました。

抗 GLA 抗体陽性患者さんにおいては、特に抗体の量が高い場合、治療薬の作用が阻害される可能性があるため、ERT を行う際、注意が必要と考えられます。

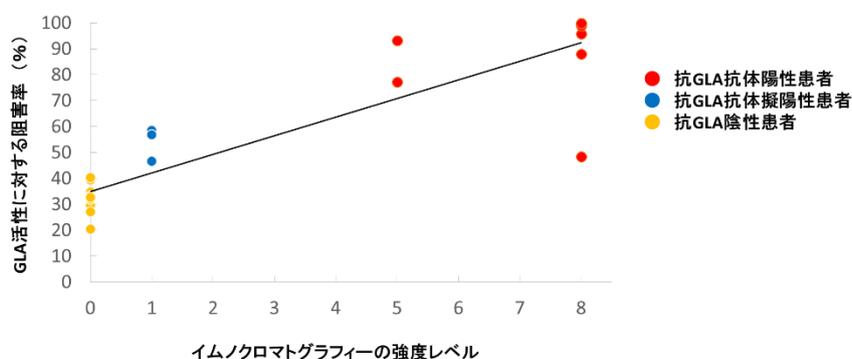


図. ERT を受けた患者由来血清中の抗 GLA 抗体の量と GLA 酵素活性に対する阻害率

有害免疫反応を起こし難いファブリー病酵素補充治療薬の開発を目指しています

櫻庭 均¹、兎川忠靖²、月村考宏²、川島育夫^{1,3}、佐藤温子¹、児玉 敬²、福重智子⁴、
金蔵拓郎⁴、齋藤静司⁵、大野一樹^{6,7}

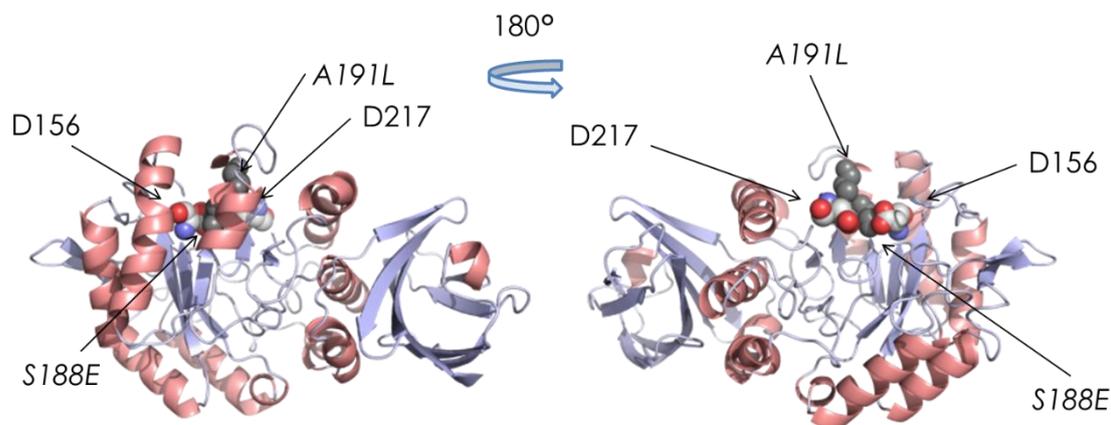
¹ 明治薬科大学 臨床遺伝学、² 明治薬科大学 生体機能分析学、³ (公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜、⁴ 鹿児島大学 皮膚科学、⁵ 北海道情報大学 医療情報学科、

⁶ 株式会社 カタリスト、⁷ 東京工業大学 情報生命博士教育院

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) 酵素タンパクの欠損や著しい活性低下が原因で、体内の臓器に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) が蓄積して、腎不全や心不全を来す遺伝性難病です。ファブリー病に対しては、患者さんの体内で欠乏している活性型の GLA を定期的に血管内に投与する酵素補充療法が有効です。しかし、この治療を継続していると、一部の患者さんでは GLA に対する抗体が産生されて、有害免疫反応や酵素薬に対する阻害が起こることが、近年、臨床で問題となっています。

私たちは、ファブリー病患者さんが、もともと体内に保有している α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA、別名： α -ガラクトシダーゼ B) を構成するアミノ酸残基のうちの 2 つを別のアミノ酸に置換した改変型 NAGA (Mod. NAGA) を創りました (図)。そしてこの新しい酵素を若齢のヒト NAGA トランスジェニック/GLA ノックアウトマウスに繰り返し投与して、その効果と抗体産生について調べました。その結果、このファブリー病モデルマウスでは、有害な抗体産生はみられず、肝臓、腎臓や心臓での Gb3 や Lyso-Gb3 の蓄積が抑えられ、病理変化の改善が認められることが示されました。Mod. NAGA は、有害免疫反応に苦しむファブリー病患者さんの治療に役立つことが期待されます。

図. Mod. NAGA の立体構造



Mod. NAGA の基本構造をリボンモデルで、酵素触媒アミノ酸残基 (D156 と D217) を CPK モデルで、置換アミノ酸残基 (S188E と A191L) を黒い球モデルで表しています。

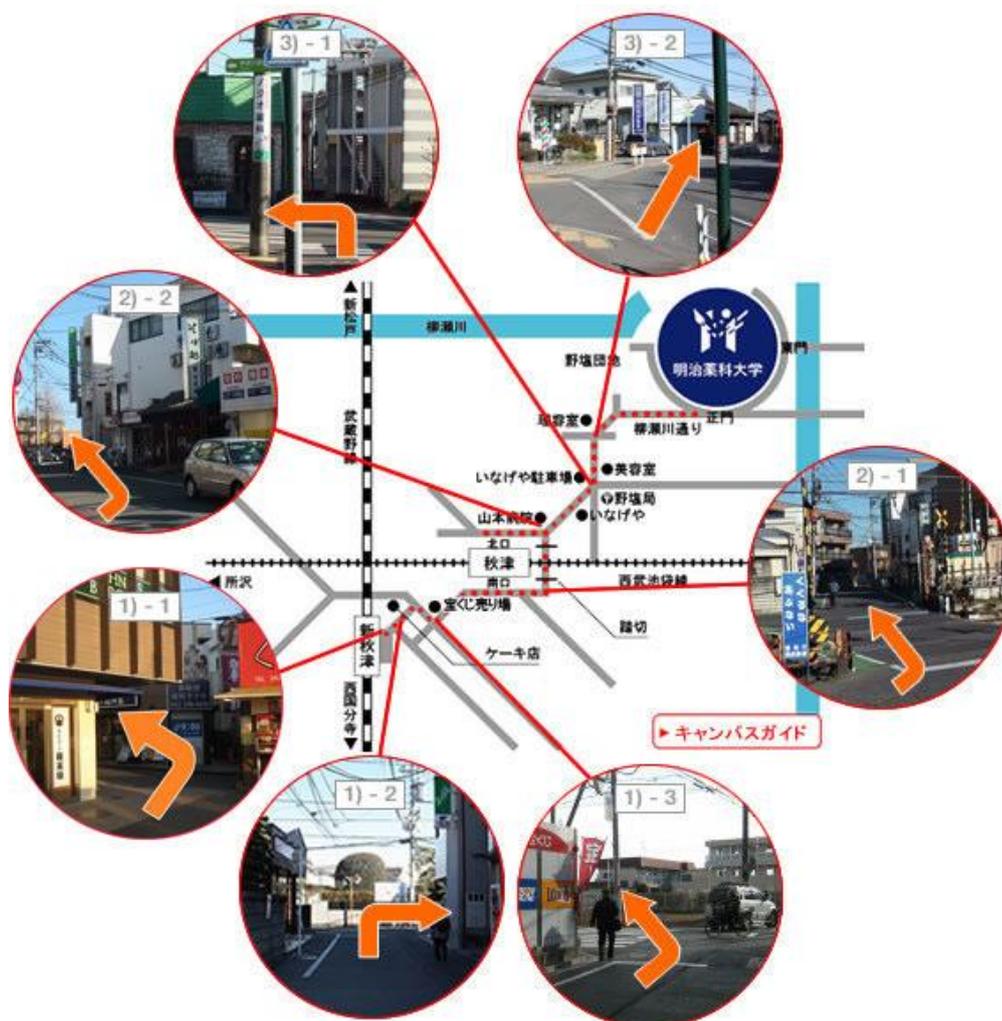
協力企業



genzyme

交通・アクセスを

- ◆ 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 28 年 3 月 15 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)