

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施をした。検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

コントロール 369 例の解析が完了。

ペルオキシソームで機能する遺伝子群で検出された variants の中で、既知の病因変異, Nonsense, frameshift, splice sites

mutations, 新規 non-synonymous variants

(SNV)を有する検体は、コントロール 369 例中、194 例(52.5%)であった。

新規 SNV の中で, Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP の 5 つの SNV 機能予想アルゴリズムの合計点が 4 点以上(5 点が最も機能変化が大きい)の SNV (deleterious SNV)に絞った場合は、コントロール 369 例中、133 例(36.0%)が有していた。

D. 考察

ペルオキシソームで機能する遺伝子群において、アミノ酸置換を伴う新規の non-synonymous variants は、多数同定され、coding region の non-synonymous variants は未知のものが依然として存在すると考えられ、網羅的な塩基配列解析は重要と考える。

E. 結論

今後 ALD 症例における解析も進め、検出された variants における ALD の各表現型及び Control における頻度の比較 (関連解析)を行う予定である。併せて、ALD 症例 DNA 検体のさらなる集積を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ライソゾーム病の iPS 細胞の作成と病態、治療への応用に関する研究

研究代表者：衛藤 義勝（東京慈恵会医科大学）

研究要旨

ライソゾーム病、特にヒトファブリ病、ポンペ病、ゴーシェ病患者皮膚繊維芽細胞よりレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いて山中 3 因子或いは 4 因子を導入し、iPS 細胞を作成し、生化学的並びに電顕による超微形態分析並びにポンペ病に対する酵素補充療法による病態解析を行った。

共同研究者：

樋口 孝¹⁾、河越しほ²⁾、小林博司^{1,3)}、井田博幸³⁾、大橋十也^{1,3)}

研究協力者：

高村歩美⁴⁾、藤崎美和⁴⁾、大樂武範⁴⁾、岩本武夫⁵⁾

1. 東京慈恵会医科大学遺伝子治療部
2. 東京慈恵会医科大学皮膚科学講座
3. 東京慈恵会医科大学小児科学講座
4. 財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究センター
5. 東京慈恵会医科大学共用研究施設

A) センダイウイルス或いはレトロウイルスベクターを用いたヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病由来 iPS 様細胞の樹立

Generation of iPS like cells from human Pompe, Gaucher, Fabry disease, using Sendai virus or retrovirus vectors.

【目的】ライソゾーム病の内ヒトポンペ病、ゴーシェ病、ファブリ病の患者皮膚繊維芽細胞を用いて山中 3 又は 4 因子をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターに組み込み高橋、或いは西村らの方法に従い各々 iPS 細胞を作成、これらの iPS 細胞が ES 細胞の 15 因子を発現し且つ iPS 細胞に SASP など特有の発現を認め、iPS 細胞を確認し又各疾患特有の性質、酵素欠損、蓄積物質が確認されている。

センダイウイルスはゲノムに組み込まれず理論的に遺伝的毒性がないため感染細胞内で初期化因子を安定的に発現させる事が出来るという特徴を持つ。そのため、レトロウイルスベクターを用いて作成した iPS 細胞と比べてセンダイウイルスベクターでは高品質の iPS 細胞を作成でき、iPS 様細胞を心筋細胞に分化誘導させ、ファブリ病心筋細胞の病態解析を更に進めていく。

B) ゴーシェ病及びポンペ病患者皮膚細胞由来 iPS 様細胞の樹立

Patients-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Lysosomal Storage Diseases

【目的】ゴーシェ並びにポンペ病はライソゾームの代表的疾患であり、細胞内にグルコセレブロシド或いはグリコーゲンが大量に蓄積する。細胞内でのこれら蓄積物質の蓄積による病態の機序並びに治療の効果を検討するために iPS 細胞は患者皮膚細胞などの体細胞を初期化することによって樹立できる iPS 細胞は、遺伝的背景が同じ幹細胞を樹立できる。これまでに当講座では各種のライソゾーム病モデルマウス由来 iPS 細胞を樹立し、そのライソゾーム病の病態解析を行ってきた。我々は今回ヒトライソゾーム病、特にポンペ病とゴーシェ病の病態解析並びに治療効果の解

析を目指し患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターを用いての iPS 細胞樹立を試みた。

【方法】ヒト初期化因子 (*SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, *c-MYC*) を組み込んだ pMXs レトロウイルスベクターを皮膚細胞に感染させることによって iPS 様細胞を樹立した。又ポンペ病患者皮膚線維芽細胞からはセンダイウイルスベクターを用いて西村らの方法に従い作成した。iPS 様細胞は透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいて細胞の内部構造を解析した。

【結果】ゴーシェ病では II 型 (神経型) の iPS 様細胞は樹立できたが、I 型 (非神経型) の iPS 様細胞は作成出来なかった。ポンペ病では乳児型 (心臓型) も遅発型 (筋肉型) も iPS 様細胞が樹立した。ポンペ病 iPS 細胞ではマイオザイムを 10-1000ug/ml medium の濃度で加え細胞内ライソゾームに蓄積している封入体の減少程度を電子顕微鏡下で観察した。電顕上は乳児型ポンペ病で遅発型に比較して可なり多く蓄積し、マイオザイム 1000ug/ml をメジウム内に投与して完全に蓄積物質の消失が見られた。ゴーシェ病 II 型 iPS 様細胞の細胞質には大きな空胞が確認でき又蓄積物質であるサイコシンが tandem MS で正常の 5 倍程度増加していた。

【考察】ゴーシェ病 II 型の iPS 様細胞は、幹細胞の段階から多量の脂質の蓄積物が電顕上細胞質内に蓄積していた。又ゴーシェ病 iPS 細胞からの神経細胞への分化効率が対象と比較して効率が悪く、セルソーターによる分離でも病的細胞での分化効率の低さを示し、蓄積物の影響と考えられた。又ポンペ病 iPS 細胞への酵素補充療法はマイオザイムの酵素量が多ければ完全に細胞を正常化できることを証明した。

【研究発表】

1. 原著論文

1) ○Takamura A, Sakai N, Shinpo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S,

Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. : The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. *Mol Genet Metab.* 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.

- 2) ○Takenori D, Takeo I, Minami M, Masahiro E, Toya O, Yoshikatu E. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab.* Available online 16 November 2013
- 3) ○Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab.* 2013 Aug;109(4):386-9.
- 4) ○Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood.* 2013;121(16):3267-73.
- 5) ○Y. Sato, M. Fujiwara, H. Kobayashi, H. Ida: Massive Accumulation of Glycosaminoglycans in the Aortic Valve of a Patient With Hunter Syndrome During Enzyme Replacement Therapy. *Pediatric Cardiology* 2013;DOI10.1007/s00246-013-0653-0
- 6) ○Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. *Mol Genet Metab.* 2013 in press
- 7) ○J. Ito, T. Saito, C. Numakura, A. Iwaba, S.

Sugahara, R. Ishii, C. Sato, H. Haga, K. Okumoto, Y. Nishise, H. Watanabe, H. Ida, K. Hayasaka, H. Togashi, S. Kawata, Y. Ueno: A Case of Adult Type1 Gaucher Disease Complicated by Temporal Intestinal Hemorrhage. Case Rep Gastroenterol 2013;7:340-346

2. 和論文・総説・書籍

- 1) 衛藤義勝：ライソゾーム病最近の進歩，内分泌・糖尿病・代謝内科 502-511, 科学評論社, 2013.

【学会発表】

- 1) M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MPVI) in dried Blood Spots on Filter Paper
The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th
- 2) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th
- 3) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) The

55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Chiba, Japan, 2013 November 27th – 29th

- 4) Ayumi Takamura, Miwa Fujisaki, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi, Yoshikatsu Eto Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neural Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases.3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) and the 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), November 27-29, 2013, Chiba, Japan
- 5) 高村歩美, 藤崎美和, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝 PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年
- 6) Ayumi Takamura, Norio Sakai, Michiko Shinpo, Masanari Yamamoto, Aya Narita, Kosaku Ohno, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto. : The Useful Preliminary Diagnosis of Niemann-Pick Disease type C by Filipin Test in Blood Smear 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM), September 3-6, 2013, Barcelona, Spain
- 7) 高村歩美, 酒井規夫, 新寶理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕作, 井田博幸, 衛藤義勝 The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick disease type C – Filipin test in blood smear – ニーマン・ピック病 C 型シンポジウム – 診断と治療 –, 2013 年 4 月 27 日, 東京
- 8) 高村歩美, 衛藤義勝, 藤崎美和, 若林太一, 井田博幸, 萩野谷和裕, 山本真也, 成田綾, 大野耕作 若年型ニーマン・ピック病 C 型 (NPC1) 3 例に対する Miglustat の治療効果. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会, 2012 年 11 月

- 15-17日, 岐阜
- 9) 衛藤義勝：ファブリ病の最近の進歩、ファブリ病患者会、大阪 2013, 2,18
 - 10) 衛藤義勝、Niemann-Pick C 病の診断、治療に関して、NPC 病シンポジウム、東京、2013.4.27
 - 11) 衛藤義勝：ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 日本小児科学会講演, 広島 2013. 4.18
 - 12) 衛藤義勝：Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10
 - 13) 衛藤義勝：ニーマン・ピック C 病の診断と治療に関して、第 55 回日本小児神経学会 大分 2013.5.31
 - 14) 衛藤義勝：Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD、International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
 - 15) 衛藤義勝：ファブリ病最新の進歩、ファブリ病研究会、札幌, 2013.10.5
 - 16) 衛藤義勝；先天性ムコ多糖症の進歩、久留米小児科医会、2013.10.11
 - 17) 衛藤義勝：ゴーシェ病最近の進歩、中国小児内分泌代謝学会アモイ市、福建省 2013.10.23-24
 - 18) 衛藤義勝：Lysosomal acid lipase deficiency, アジア小児肝臓消化器学会一ツ橋会館, 東京, 2013.11.1
 - 19) 衛藤義勝：ファブリ病 UpDate, 東北ファブリ病患者会 仙台, 2013.11.3
 - 20) 衛藤義勝、Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 韓国, 2013, 11,14-16
 - 21) 衛藤義勝：New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov.26, 2013
 - 22) 衛藤義勝：Future of clinical and research

prospects in inborn error of metabolism, 第 3 回アジア先天代謝学会、舞浜、東京、2013.11.27-29

【知的財産権の出願・登録状況】

特になし。

ゴーシェ病のバイオマーカーに関する研究

研究分担者：櫻庭 均（明治薬科大学臨床遺伝学 教授）

研究要旨

ゴーシェ病のバイオマーカー候補として、グルコシルスフィンゴシン (Lyso-GlcCer) とグルコシルセラミド (GlcCer) を考慮し、それらの血漿中濃度の測定法を確立した。前者は、血中糖脂質を抽出して、それに含まれる Lyso-GlcCer をフタルアルデヒド誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。後者は、血中糖脂質に含まれる GlcCer を酵素で脱アシル化した後に、フタルアルデヒド誘導体化して、HPLC で測定した。どちらの場合も、HPLC クロマトグラム上、目的物質に該当する特異的なピークが検出された。本法で、I 型、II 型および III 型のゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度を測定した所、いずれの症例においても、その濃度は対照に比べて高値を示した。特に Lyso-GlcCer に関しては、対照の値が検出限界以下であるのに対して、ゴーシェ病患者では、明らかな高値を示すことから、本症のバイオマーカーとして有用と考えられた。

研究協力者：

兎川忠靖（明治薬科大学生体機能分析学 教授）
月村考宏（明治薬科大学生体機能分析学 助教）

A. 研究目的

ゴーシェ病 (Gaucher disease) は、グルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase) の活性低下により、グルコセレブロシド (glucocerebroside、GlcCer) などの糖脂質が細胞内のライソゾームに蓄積し、肝脾腫、貧血、血小板減少や骨障害などの症状を来す常染色体劣性遺伝病である。本症は、臨床的に、神経症状の有無や発症年齢の違いにより、I 型（成人型、慢性非神経型）、II 型（乳児型、急性神経型）および III 型（若年型、亜急性神経型）に分類される。本症に対しては、哺乳類由来の培養細胞で生産した組換えグルコセレブロシダーゼを用いた酵素補充療法が有効である。そのため、本症の早期診断や治療評価に役立つバイオマーカーが求められている。これまで、ゴーシェ病のバイオマーカー候補として、酸性ホスファターゼ、アンギオテンシン変換酵素やキトトリオシダーゼなどが知られているが、最近、本

症の病態形成に関係すると考えられる GlcCer やそのリゾ体であるグルコシルスフィンゴシン (glucosylsphingosine, Lyso-GlcCer) が注目されている。本研究では、GlcCer および Lyso-GlcCer 測定法を確立し、ゴーシェ病患者由来の血漿を試料として、その濃度を測定し、これらがゴーシェ病のバイオマーカーとなり得るか否かを検討した。

B. 研究方法

1) 試料

I 型、II 型および III 型のゴーシェ病患者と健常者（対照）から採取した血漿を測定試料とした。（倫理面への配慮）

本研究は、明治薬科大学倫理委員会の承認を得て、その規則を遵守して行われた。

2) 血漿中 Lyso-GlcCer の測定

試験管に、血漿 50 μ l と 150 μ l の 1% Triton X-100/CH₃CN 液とを加えて振盪した後、14,000 \times g で 5 分間の遠心分離を行った。遠心分離により得られた上清画分に 25 μ l の *o*-フタルアルデヒド試薬 (pH 9.5) を加えて 15 分間反応させた後、

フタルアルデヒド誘導体化された Lyso-GlcCer を高速液体クロマトグラフィー (HPLC, Union UK-C18 カラム, 75mm×46mm) で分離し、測定した。血漿中の Lyso-GlcCer の定量に際しては、健康者由来の血漿に一定量の Lyso-GlcCer を添加したものを標準として用いた。

3) 血漿中 GlcCer の測定

試験管に、CHCl₃/MeOH(v/v, 1:2)液 450 μl と水 55 μl とを加えた後に、血漿 20 μl を加えて激しく振盪し、14,000×g で 10 分間の遠心分離を行った。遠心分離により得られた上清画分を別の試験管に移し、CHCl₃ 150 μl と水 225 μl とを加えて 40 回激しく振盪した後、2,000×g で 5 分間の遠心分離を行った。分離後に上層画分を除き、下層画分に MeOH/水(v/v, 1:1)600 μl を加えて、40 回激しく振盪した後、9,000×g で 5 分間の遠心分離を行った。分離後に下層画分を分取し、スフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ (Sphingolipid ceramide N-deacylase) を加えて脱アシル化反応を行った。反応終了後に、当該反応液を乾固し、NaOH 200 μl を加えて超音波で溶解させた。そのうちの 50 μl を別の試験管に移し、25 μl の o-フタルアルデヒド試薬 (pH 9.5) を加えて 15 分間反応させた後、HPLC で解析した。定量に際しては、健康者由来の血漿に一定量の GlcCer を添加したものを標準として用いた。

C. 研究結果

1) 血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム

健康対照者およびゴーシェ病患者由来の血漿中 Lyso-GlcCer を解析した HPLC クロマトグラムを、それぞれ図 1a および図 1b に示した。対照においては、Lyso-GlcCer を示すピークが見られなかったが、ゴーシェ病患者では明瞭なピークが認められた。

図 1a 健康対照者の血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム

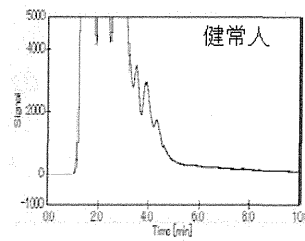
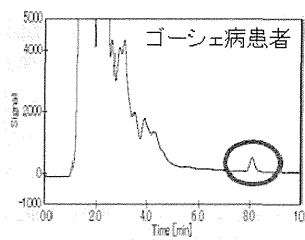


図 1b ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム



2) 血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム

健康対照者およびゴーシェ病患者由来の血漿中 GlcCer を解析した HPLC クロマトグラムを、それぞれ図 2a および図 2b に示した。対照およびゴーシェ病患者ともに、GlcCer を示すピークが認められたが、そのピーク面積は明らかに後者が大きかった。

図 2a 健康対照者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム

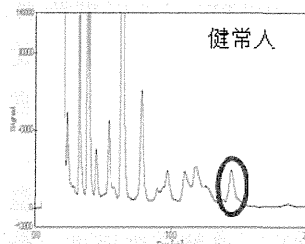
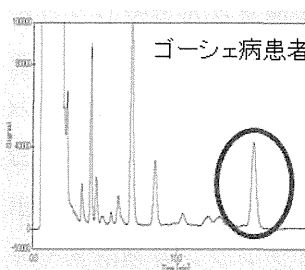


図 2b ゴーシェ病患者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム



3) ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度

I 型、II 型および III 型のゴーシェ病患者由来の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度の測定結果を表にまとめた。いずれの臨床型を持つゴーシェ病患者においても、対照に比べて、Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度の増加が認められた。

表 ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度

症例	年齢	性	表現型	Lyso-GlcCer (μmol/l)	GlcCer (μmol/l)
1	33y	男	I 型	0.19	13.1
2	6m	女	II 型	0.16	25.3
3	1y10m	女	III 型	0.16	31.8
対照(n=10)	21-52 y	男・女	健常	< 0.01	7.9±3.0*

*平均値±標準偏差

D. 考察

本法を用いた解析では、HPLC クロマトグラムで血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer を示す明瞭なピークが観察され、本法は、両者の特異的定量法として有用であると考えられた。ゴーシェ病患者においては、その全ての症例で血漿中 Lyso-GlcCer および GlcCer 濃度が対照に比べて高値を示した。血漿中 Lyso-GlcCer 濃度は、GlcCer のそれに比べて低いが、本法で測定した健常者の Lyso-GlcCer 測定値が、すべて測定限界以下(0.01 μmol/l 未満)であるのに対して、ゴーシェ病患者では、その年齢や臨床表現型の違いに拘わらず、明らかな増加を示しており、バイオマーカーとして有用であると考えられた。

E. 結論

Lyso-GlcCer および GlcCer はゴーシェ病のバイオマーカーとして有望であり、特に前者は対照との差が明らかなことから有用と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, et al : Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α-galactosidase A protein levels in serum and plasma. PLoS ONE 8: e78588, 2013
- 2) Saito S, Ohno K, Maita N, et al : Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α-L-iduronidase : Insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I. Mol Genet Metab, in press.
- 3) Saito S, Ohno K, Sakuraba H : Comparative study of structural changes caused by different substitutions at the same residue on α-galactosidase A. PLoS ONE, in press.

2. 学会発表

- 1) Sakuraba H : High risk screening for Fabry disease. Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, Kumamoto, Japan, May. 2013
- 2) Sakuraba H : E66Q: Biochemical, pathological and structural studies. 3rd Update on Fabry Nephropathy: Biomarkers, Progression and Treatment Opportunities, Hong Kong, China, Jun. 2013
- 3) Sakuraba H : Genotype/Phenotype correlation in Fabry disease. The 15th Annual Asia LSD Symposium, Chiba, Japan, Nov. 2013
- 4) Kawashima I, Mitobe S, Kodama T, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Development of enzyme replacement therapy with a modified enzyme and an activator for Fabry disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013

- 5) Shibasaki F, Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H.: Development of a highly sensitive immuno-PCR measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 6) Nakano S, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Futoshi S.: Rapid Immunochromatographic measurement of anti- α -galactosidase A antibodies in Fabry patients Treated with enzyme replacement therapy. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 7) Togawa T, Tsukimura T, Katayama M, Mitobe S, Sakuraba H.: Fabry patients exhibiting no elevation in plasma globotriaosylsphingosine level. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 8) Tsukimura T, Takada M, Aizawa Y, Suzuki T, Katayama M, Sakuraba H, Togawa T.: Comparative study on the content of mannose 6-phosphate residues of recombinant lysosomal enzymes. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 9) Itoh K, Tsuji D, Namba K, Yamaguchi S, Imataki I, Ishimaru N, Sakuraba H.: Establishment of human neural cell culture systems induced from ips cells derived from Tay-Sachs disease patient for drug discovery. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 10) Kitakaze K, Kawano K, Tsuji D, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Sakuraba H, Itoh K.: Imaging of enzyme replacement with a novel fluorescent probe and purified lysosomal β -hexosaminidase carrying M6P-type glycans. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Japan, Nov. 2013
- 11) 櫻庭 均：ファブリー病を疑うとき 診断・治療について，ファブリー病セミナー in 新潟，新潟，2013. 5
- 12) 櫻庭 均：ファブリー病の治療戦略. 熊本ファブリー病フォーラム，熊本，2013. 5
- 13) 櫻庭 均：ファブリー病の新しい治療薬開発に向かって. ふくろうの会 東京シンポジウム 2013，東京，2013. 6
- 14) 櫻庭 均：よくわかるシリーズ ファブリー病：ファブリー病の診断法，第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会，福岡，2013. 6
- 15) 櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. ファブリー病セミナー 腎臓 Special Lecture，福岡，2013. 6
- 16) 櫻庭 均：心疾患の中に潜在するファブリー病 ファブリー病の病態・診断について. 第 23 回 Educational Seminar in Cardiology，東京，2013. 7
- 17) 櫻庭 均：日常診療に潜在するファブリー病：病態・診断・治療. 福井ファブリー病セミナー，福井，2013. 7

- 18)櫻庭 均：ファブリー病の最近の話題. 川口
ファブリー病セミナー, 川口 2013. 7
- 19)櫻庭 均：ファブリー病の診断方法と最近
の話題. 秋田ファブリー病セミナー, 秋田,
2013. 8
- 20)櫻庭 均：ファブリー病へのアプローチ
診断・治療可能な希少疾患を見逃さないため
に. 西湘ファブリー病セミナー, 神奈川,
2013. 10
- 21)櫻庭 均：ファブリー病を知ろう 病態・診
断・治療. 函館ファブリー病セミナー, 函館,
2013. 10
- 22)櫻庭 均：ファブリー病 その診断, 治療
の核心に迫る. 弘前ファブリー病セミナー,
青森, 2013. 10
- 23)櫻庭 均：治療可能な希少疾病ファブリー
病～酵素補充療法の実際～. 第 40 回 日本小
児臨床薬理学会 学術集会, 横浜, 2013. 11
- 24)北風圭介, 辻 大輔, 浅沼大祐, 神谷真子, 浦
野泰照, 櫻庭 均, 伊藤孝司：酵素の分子構
造変化に基づく Tay-Sachs 病治療薬の開発.
日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013. 3
- 25)水戸部さゆり, 兎川忠靖, 月村考宏, 齋藤静
司, 鈴木俊宏, 櫻庭 均：血漿中 Lyso-Gb3
濃度の増加を伴わない特異なファブリー病患
者群に関する研究. 日本薬学会第 133 年会.
横浜, 2013. 3
- 26)月村考宏, 高澤かおり, 山下翔悟, 水戸部さ
ゆり, 鈴木俊宏, 片山昌勅, 兎川忠靖, 櫻庭
均：グロボトリアオシルセラミドの新規測
定法の開発: ファブリー病バイオマーカーへ
の応用. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013.
3
- 27)高田 大, 相澤良明, 月村考宏, 兎川忠靖, 鈴
木俊宏, 櫻庭 均：リソソーム酵素中のマン
ノース-6-リン酸残基の測定. 日本薬学会第
133 年会. 横浜, 2013. 3
- 28)月村考宏, 高田 大, 相澤良明, 鈴木俊宏, 片
山昌勅, 櫻庭 均, 兎川忠靖：マンノース-6-
リン酸残基の新規定量法の開発：組換えヒ
トリソソーム酵素解析への応用. 第 86 回日本
生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 29)北風圭介, 河野加菜子, 田島陽一, 櫻庭 均,
伊藤孝司：テイ-サックス病の新規治療薬
開発を目指した機能改変型ヒト β -ヘキソサ
ミニダーゼ B の精製および評価. 第 86 回日本
生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 30)田島陽一, 芝崎 太, 櫻庭 均：ポンペマウ
ス骨格筋における p62 と Parkin の蓄積.
第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013.
12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ムコ多糖症 II 型の中樞神経症状の病態解明に関する研究

分担研究者：田中 あけみ（大阪市立大学大学院医学研究科・准教授）

研究要旨

ムコ多糖症 II 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse (IDS-KO) の脳組織について形態学的検索を行った。20 週齢および 25 週齢の IDS-KO の脳組織の電子顕微鏡による観察より、IDS-KO の脳ではミクログリアの空胞化病変が最初に認められ、その後に神経細胞に異常な封入体が現れることが分かった。しかし、SCMAS (Subunit C of Mitochondrial ATP Synthetase) の免疫染色では、早期より神経細胞に強い染色性を認めた。このことから、IDS-KO の神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、このことが神経細胞障害の主たる要因となっていると推測された。

研究協力者

前田光代（大阪歯科大学・助教）
門野千穂・坂口知子・工藤聡志
（大阪市立大学大学院医学研究科・技術職員）
森本秀人（JCR ファーマ研究所）
濱崎考史（大阪市立大学大学院医学研究科・講師）

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型は、iduronate 2-sulfatase の活性低下によっておこるライソゾーム病のひとつである。X-連鎖性劣性遺伝形式を示し、日本人においてはムコ多糖症全体の約 60% を占める。ムコ多糖症 II 型は、軽症型においては知的障害が認められないが重症型においては認められ、ムコ多糖症 II 型の 70% が重症型である。重症型の神経症状は、初期は発達の遅れとして認められるが、次第に不穏、興奮の状態が起り、末期には寝たきりとなる。ムコ多糖症 II 型重症型の神経障害の機序を検討するため、iduronate 2-sulfatase knock-out mouse (IDS-KO) の脳組織について形態学的検索を行った。

B. 研究方法

Iduronate 2-sulfatase knock-out mouse は 5 か月頃から頭蓋顔面骨をはじめ全身の骨変形が明らかになり、動きも鈍くなっていく。寿命は、12 か月程度である。

20 週齢および 25 週齢の IDS-KO の脳組織につき電子顕微鏡による形態学的検索を行った。さらに、オートファジーを形態学的に検索するため SCMAS (Subunit C of Mitochondrial ATP Synthetase) の抗体による免疫染色を行った。

C. 研究結果

20 週齢の脳は、細胞質内に多くの空胞を有したミクログリアが灰白質を中心に多数存在した。空胞の内容は、微細顆粒状であった。これに対し神経細胞には変化が無く、正常の形態所見を呈していた。神経細胞の変化は 25 週齢のマウスにおいてようやく認められ、神経細胞の細胞質内に淡い層をなす渦巻き状の封入体が多数存在した（図 1）。他方、ミクログリアの空胞は大きさを増していた。

SCMAS 染色では、神経細胞は早期に強く染色された（図 2）のに対し、ミクログリアはごく淡く染色されるのみであった。正常コントロールマウスの脳組織ではいずれも染色されなかった（図 3）。また、肝臓においては、IDS-KO および正常コントロールマウスともに染色されなかった。

D. 考察

IDS-KO の脳組織の電子顕微鏡所見において、ミクログリアの空胞化病変が最初に認められ、その後に神経細胞に異常な封入体が現れた。しかし、SCMAS 染色では、早期より神経細胞に強い染色性を認めた。SCMAS はミトコンドリアがオートファジーなどで破壊された状態になると染色される。従って、IDS-KO の神経細胞では早期からオートファジーが異常亢進しており、障害の主たる要因となっていると推測された。

E. 研究発表

学会発表

- 1) Tanaka A, Maeda M, Kadono C, Morimoto H, Efficacy of oral administration of

chloroquine on the neuronal cells of
iduronate 2-sulfatase gene knock-out
mouse 第 55 回日本先天代謝異常学会 2013
年 11 月 27-29 日 千葉

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

図 1、IDS-KO 神経細胞の電子顕微鏡

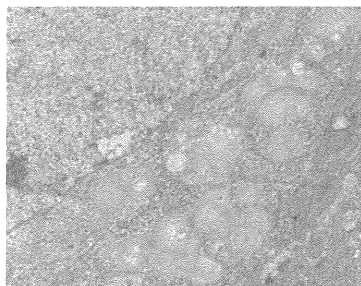


図 2、IDS-KO 脳の SCMAS 免疫染色

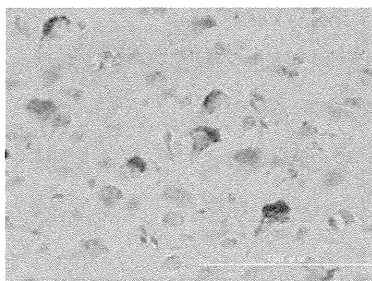
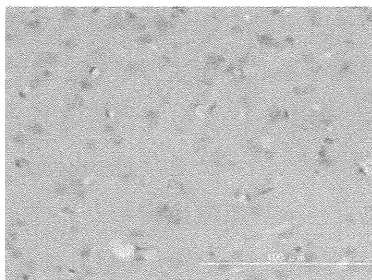


図 3、正常マウス脳の SCMAS 免疫染色



スフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発に関する研究

分担研究者：松田 純子（川崎医科大学 特任教授）

研究要旨

スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解にはライソゾーム酵素に加えてサポシンと呼ばれる糖タンパク質が必要である。プロサポシンは4種類のサポシンA、B、C、Dの前駆体タンパク質であるとともに細胞外にも分泌されることから独自の生物機能が示唆されている。我々はプロサポシンの新規機能を探索する目的でプロサポシン強発現マウス（*PSAP^{Tg}*）の表現型解析を行った。*PSAP^{Tg}*マウスは正常に出生し寿命は1年以上であったが、組織病理学的解析の結果、*PSAP^{Tg}*マウスの網膜では視細胞が生後3週齢ころから脱落し、生後5週齢には完全に消失することが明らかになった。網膜におけるプロサポシン/サポシンの発現をイムノブロットと免疫組織染色で検討したところ、プロサポシン/サポシンは網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強い発現が認められた。一方、プロサポシンノックアウトマウスおよびサポシンA、C、Dの各欠損マウスには網膜変性の所見を認めなかった。神経セロイドリポフスチノーシスのモデル動物であるカテプシンD欠損マウスも*PSAP^{Tg}*マウスに類似した網膜変性を呈することから、*PSAP^{Tg}*マウスは神経セロイドリポフスチノーシスおよび網膜色素変性症の病態解明において有用なモデル動物となることが期待される。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は哺乳動物の生体膜を構成する重要な脂質成分である。スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解には疎水性のスフィンゴ糖脂質と親水性の加水分解酵素を相互作用させるためにサポシン（SAPs）と呼ばれる疎水性の糖タンパク質が必要である。SAP-A、-B、-C、-Dは前駆体タンパク質であるプロサポシン（PSAP）がライソゾームに運ばれ、プロテアーゼによる分解を受けて生成される。一方、PSAPは脳脊髄液や母乳、精液などの体液中に豊富に存在し、細胞外に分泌されることから、SAPsの前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能を有することが示唆されている（Sandhoff K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 554-582, 2012.）（図1）。

ヒトPSAP欠損症はこれまでに世界で4家系

の報告があるが、いずれの報告例も重篤な神経症状と著明な肝脾腫を呈し、新生児早期に死亡している。1996年に藤田らによって作製されたプロサポシンノックアウトマウス（*Psap-KO*）は全SAPsの欠損により全身組織に多彩なスフィンゴ糖脂質が蓄積し、重篤な神経症状を呈して生後30日前後で死亡する（Fujita N. et al. *Hum. Mol. Genet.* 5, 711-725, 1996.）。

我々は、これまでの研究でSAP-A、SAP-C、SAP-Dの特異的欠損マウスを世界に先駆けて作製し、スフィンゴ脂質蓄積症（スフィンゴリピドーシス）の病態解明に取り組んできた。本研究では、いまだ不明な点が多いPSAPの新規機能を探索する目的でPSAPトランスジェニックマウス（*PSAP^{Tg}*）の表現型解析を行った。

B. 研究方法と結果

1) PSAP トランスジェニックマウスの作製

東海大学医学部分子生命科学の吉村真一博士らとの共同研究によって、マウス ROSA26 遺伝子座位に CAG-ヒト *PSAP* cDNA-PolyA カセットを挿入し、プロサポシントランスジェニックマウス (*PSAP*Tg) を製作した (Otsuka M. et al. *Nucleic Acids Res.*38 (22) e198, 2010.) (図 2)。出生した *PSAP*Tg マウスから各臓器を採取し、抗ヒト SAP-B 抗体を用いたイムノブロット解析を行った結果、脳を含む全身組織で PSAP を強く発現していることが確認できた。また、*Psap* KO マウスとの交配実験の結果、トランスジーンを持つ *Psap* KO マウスでは *Psap* KO マウスの致死性やスフィンゴ脂質の蓄積がレスキューされ、トランスジーン由来のヒト PSAP はマウス体内において正常に機能することが確認できた (図 2)。これらの結果から、*PSAP*Tg マウスは PSAP を全身で安定的に過剰発現するマウスであることがわかった。

2) *PSAP*Tg マウスの表現型解析

*PSAP*Tg マウスは正常に出生し、寿命は 1 年以上であった。組織病理学的解析の結果、5 週齢の *PSAP*Tg マウスでは網膜の視細胞が完全に消失することが明らかになった。そこで、*PSAP*Tg マウスの網膜変性が、いつ、どこで始まるのかを明らかにする目的で、日齢 5 から 5 日間隔で経時的に網膜の組織標本作製し、組織学的解析 (一般組織染色、免疫組織化学染色並びに電子顕微鏡による超微形態観察) を行った。その結果、*PSAP*Tg マウスの網膜は正常に形成され、2 週齢頃までは野生型マウスと差異を認めないが、3 週齢頃から視細胞の変性が始まり、5 週齢ではほぼ完全に視細胞が脱落することがわかった (図 3)。アストログリアのマーカ

る GFAP (Glia Fibrillary Acidic Protein) とマイクログリア・マクロファージのマーカである Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) で免疫組織染色を行ったところ、*PSAP*Tg マウスの網膜では視細胞の変性・脱落に伴って、著明なグリオシスとマイクログリア・マクロファージ様細胞の浸潤が認められた。また、*PSAP*Tg マウスの網膜には視細胞層を中心に自己蛍光物質が認められた。

次に網膜組織の電顕観察を行ったところ、日齢 30 の *PSAP*Tg マウスの網膜では、視細胞の外節が変性し、内節部分には膜様封入体を含むファゴゾーム様構造が観察された。視細胞の核からなる外顆粒層には、核質が濃縮した核が多数認められ、視細胞が細胞死に陥っていることが推定された。日齢 44 では視細胞が完全に消失し、多数のファゴゾーム様構造を含むマイクログリア・マクロファージ様細胞が浸潤していた。網膜色素上皮細胞には、ファゴゾーム様構造の増加は認められなかったが、電子密度の高い一層の膜に囲まれたライソゾーム様構造物が増加傾向にあった。

一方、*Psap*KO マウスおよび *Sap*A、C、D の各欠損マウスには病末期においても網膜変性の所見を認めなかった。これらの結果から、*PSAP*Tg マウスにおける網膜変性は PSAP の過剰発現によって引き起こされていると推測された。

3) 網膜における PSAP、SAPs の発現解析

眼球における PSAP/SAPs の発現をイムノブロットで、検討したところ、マウス PSAP、ヒト PSAP ともに強く発現していた。次に網膜の免疫組織染色で局在を検討したところ、野生型マウス、*PSAP*Tg マウスともに PSAP/ SAPs は網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強く発現していた。*PSAP*Tg マウスでは活性化アストログリアにも強い発現が認められた。

C. 考察と展望

PSAP には SAPs の前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が示唆されているがいまだ不明な点が多い。本研究によって *PSAP*Tg マウスの網膜では網膜色素上皮細胞に隣接する錐体、桿体からなる視細胞層が 3 週齢頃から進行性に変性・脱落することが明らかになった。

これまでに PSAP の SAPs への分解にかかわるカテプシン D の欠損マウスが網膜変性を呈することが報告されている (Koike M. et al. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 146-161, 2003.)。カテプシン D は神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs) の原因遺伝子の一つである。NCLs は網膜病変による視力障害、てんかん、精神退行を特徴とする進行性神経変性疾患で、現在 14 の原因遺伝子 (CLN1-CLN14) が知られており、カテプシン D 欠損症を含むいくつかの病型では SAP-A および D の細胞内蓄積を認める。

一方、セマフォリン研究を行っている豊福らは、網膜色素変性症の原因遺伝子の 1 つであるセマフォリン 4A (Sema4A) のノックアウトマウス (Sema4A-KO) が網膜視細胞の変性を呈することを見出し、その分子メカニズム解析から、網膜色素上皮細胞に発現する Sema4A は PSAP と相互作用し、細胞外への PSAP のエキソサイトーシスに必須であることを発見した (Toyofuku T. et al. *Genes Dev.* 26, 816-829, 2012.)。豊福らは、培養網膜色素上皮細胞が酸化ストレス下で細胞外に PSAP を分泌すること、Sema4A-KO マウスではそれが阻害されていることを示し、PSAP の視細胞保護作用が欠失するために視細胞が脱落すると推論している。しかし、我々の解析では、*Psap*-KO マウスは病末期においても網膜変性を呈さないことから Sema4 欠損による視細胞脱落の原因は、PSAP が網膜色素上皮細胞内にとどまることが原因であると考えられる。

*PSAP*Tg マウスの解析結果に加え、上述の報告は PSAP/SAPs の細胞内蓄積と網膜変性の関連を示唆している。今後はその分子メカニズムを明らかにする必要がある。そのため、我々は、網膜色素上皮細胞あるいは視細胞において PSAP と相互作用する分子の同定を試みている。PSAP は脂質結合能をもつ疎水性タンパク質であることから、レチノイドやレチノイド関連タンパク質と相互作用する可能性がある。視細胞では、外節部の細胞膜に存在するオプシンが 11-cis-retinal と結合してロドプシンを構成し、光刺激による 11-cis-retinal から all-trans-retinal への異性化で膜電位変化が起こり視覚が形成される。All-trans-retinal は網膜色素上皮細胞へ輸送され、visual cycle により再生されて、再び視細胞へ供給される。一方、網膜色素上皮細胞は視細胞の外節をファゴサイトーシスにより取り込み、ライソゾームで分解してレチノイドとして再利用している。*PSAP*Tg マウスの網膜におけるレチノイド代謝産物量の測定や色素上皮細胞におけるオートファジーフラックスの解析によって、*PSAP*Tg マウスの網膜における病態機構の一端が明らかにできるだろう。

網膜色素変性症は失明の主要原因であり、神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs)をはじめ多くのライソゾーム病では網膜色素変性症を合併する。*PSAP*Tg マウスの解析により、網膜における PSAP の機能と視細胞変性の分子メカニズムを明らかにすることは、ライソゾーム病態解明に加え、網膜色素変性症の病態メカニズムの解明、予防や治療方法の開発にもつながることが期待される。

D. 結論

*PSAP*Tg マウスの網膜では色素上皮細胞に隣接する視細胞層が進行性に変性・脱落することを発見した。プロサポシンにはサポシンの前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が

示唆されていたが不明な点が多かった。今回の研究によって網膜におけるプロサポシンの新たな機能が示された。これが契機となりプロサポシン、サポシン研究の新しい展開がなされると予想される。

PSAPTg マウスを用いた動物実験計画書は東海大学の「遺伝子組換え実験安全委員会」および「動物実験委員会」、川崎医科大学の「組換え DNA 実験安全委員会」および「動物実験委員会」から承認を得て施行された。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Murakami, I, Mitsutake, S, Kobayashi, N, Matsuda, J, Suzuki, A, Shigyo, T, Igarashi, Y.: Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 194-197. 2013.
- 2) 松田純子：シアリドーシス。先天代謝異常ハンドブック。中山書店。p.212-213, 2013.

2. 学会発表

- 1) Matsuda J, Ono K, Muto M, Yoneshige A, Yoshimura S.: Overexpression of prosaposin causes severe retinal degeneration in mouse. 第 55 回日本先天代謝異常学会 2013 年 11 月 27-29 日 舞浜.
- 2) 久樹晴美、只野一有富桂子、宮川誠、内田俊也、松田純子、戸田年総、岡崎具樹。 : Saposin D 欠損マウスの 2D-DIGE タンパク質発現解析 - 炭酸脱水酵素(CA2)との関連. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11-13 日 横浜.

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1 プロサポシンとサポシンの構造

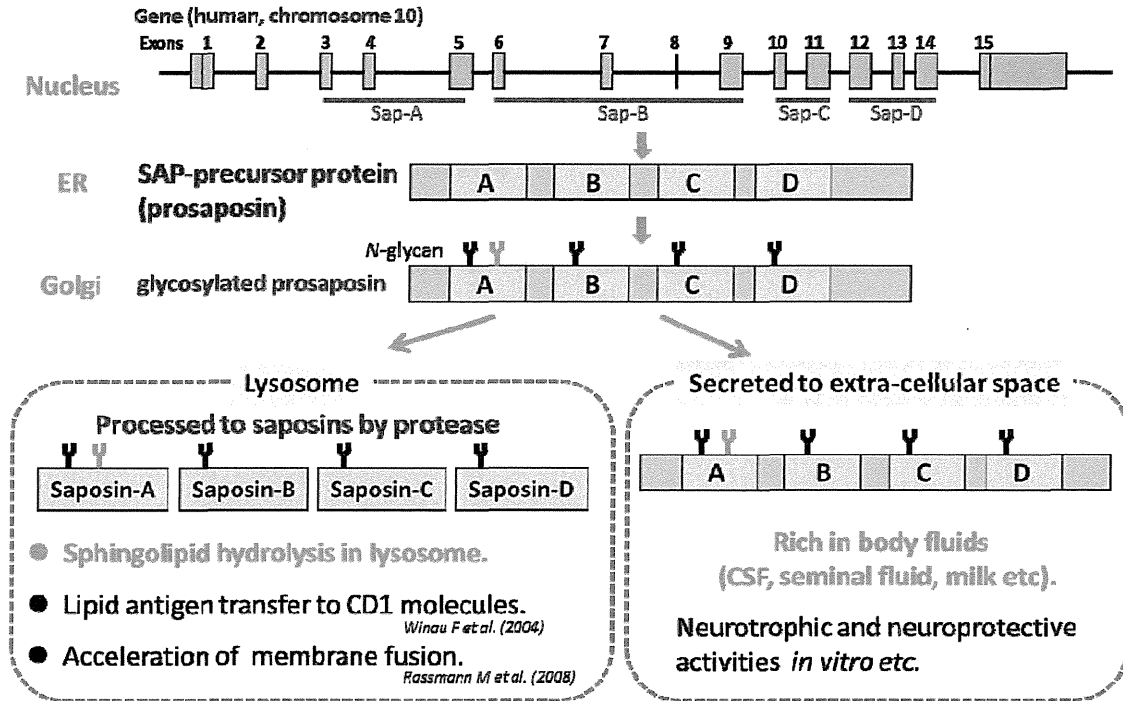
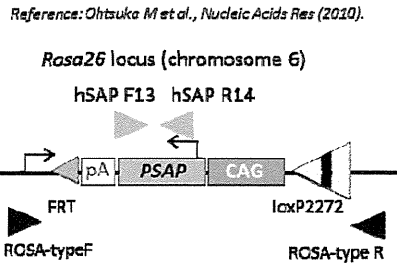
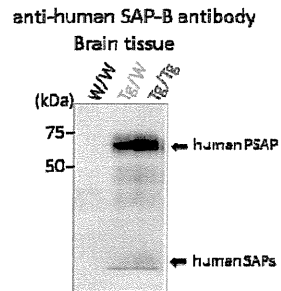


図2 プロサポシントランスジェニックマウスの作製

Targeted insertion of human PSAP cDNA into Rosa26 locus



Western blot of human PSAP



Lethal phenotypes of *Psap* KO mice were rescued by the expression of human PSAP

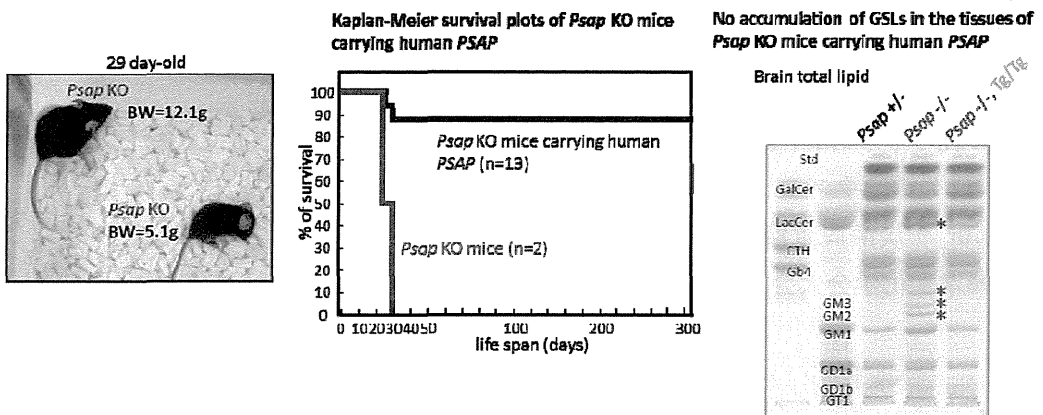
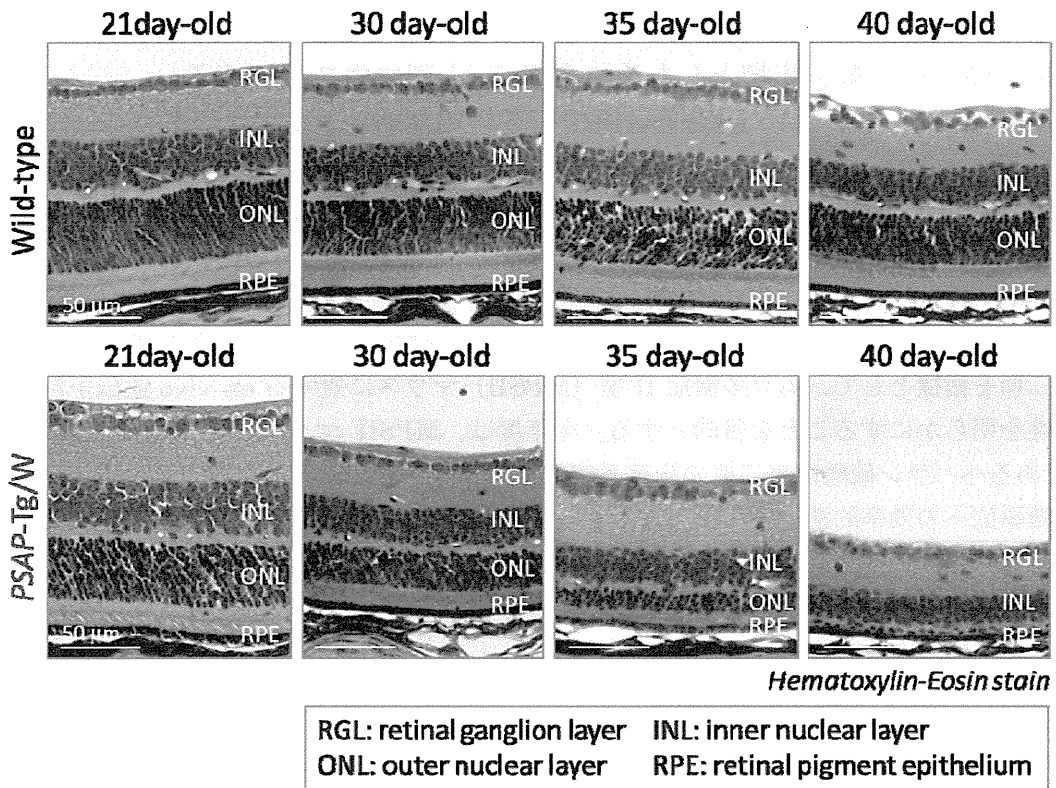


図3 プロサポシントランスジェニックマウスの網膜組織所見



疾患特異的二糖を指標としたムコ多糖症 II 型マウスに対する
ex vivo 遺伝子治療の有効性の解析

分担研究者：大橋 十也（東京慈恵会医科大学遺伝子治療研究部教授）

研究要旨

本研究は、グリコサミノグリカン（GAG）を構成する二糖単位に着目し、疾患特異的に蓄積する二糖を指標として、ムコ多糖症 II 型（MPSII）マウスに対する ex vivo 遺伝子治療の有効性を明らかにすることを目的とする。今年度は、MPSII マウスに蓄積する GAG の 1 つであるヘパラン硫酸由来二糖の測定系確立を試み、ヘパリナーゼを用いたヘパラン硫酸の二糖単位への効率的消化条件を決定した。

研究協力者

嶋田 洋太

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
遺伝子治療研究部 助教

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型（MPSII）は、イズロン酸-2-スルファターゼの異常により生じる X 連鎖性劣性遺伝形式のライソゾーム病であり、酵素欠損に伴うグリコサミノグリカン（GAG）の蓄積を特徴とする。本疾患に対する治療法として酵素補充療法及び骨髄移植療法が存在しているが、主要な病変部位の 1 つである中枢神経に対しては両者とも効果は認められず、新たな治療法が求められている。そこで我々は、造血幹細胞に欠損酵素を遺伝子導入し移植するという ex vivo 遺伝子治療法を着想した。

従来、MPSII に対する治療効果の判定には欠損酵素の基質である GAG の定量が有効であり、主として GAG の総量の測定が行われている。しかし最近、従来の測定法では、疾患モデルマウスの中枢神経への GAG の蓄積を詳細に評価することが困難であることが明らかとなり、ex vivo 遺伝子治療法の有効性を評価するためには、より疾患特異的な GAG の測定法の開発が急務である。そこで我々は、GAG を構

成する二糖単位のうち、欠損酵素の基質であるイズロン酸-2-硫酸を含む二糖の測定に着目した。

以上より本研究では、MPSII モデルマウスを用いて ex vivo 遺伝子治療の有効性を解明することを目標とし、本年度はその解析に必要な疾患特異的 GAG 由来二糖の測定系構築を試みた。

B. 研究方法

MPSII で蓄積する GAG の 1 つであるヘパラン硫酸を Sigma 社より購入し、3.3 mM 酢酸カルシウム含有 40mM 酢酸アンモニウム緩衝液にて溶解した各種濃度のヘパリナーゼ II（5, 10, 15, 250 mU）を添加した後に、37°C で 16 時間酵素消化を行った。その後、各試料をポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、Tris(bipyridine)ruthenium(II) により染色することでヘパラン硫酸の消化条件を決定した。

消化条件の決定後、その条件に従い作成したヘパラン硫酸由来二糖についてアニリン標識を行い、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）へ展開し、消化産物のピークパターンの検出を行った。

(倫理面への配慮)
倫理的問題はない。

C. 研究結果

ヘパラン硫酸 50 μg について各種濃度のヘパリーナーゼ II (5, 10, 15, 50, 250mU) を用いて酵素消化を行ったところ、酵素量依存的な染色強度の低下が認められた (図 1)。この結果は、ヘパラン硫酸がヘパリーナーゼ II の濃度依存的に分解されていることを示す。その一方で、高分子領域に検出される長鎖ヘパラン硫酸が 250mU においても認められたことから、これらの条件では酵素消化は未だ不十分であることが示唆された。

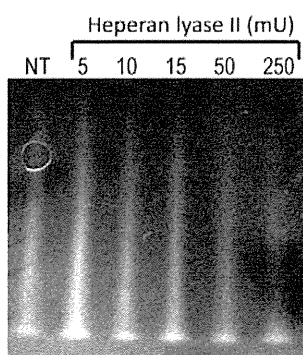


図 1. ヘパリーナーゼ II による各種濃度のヘパラン硫酸の消化

そこで、より適切な消化条件を決定するために、ヘパラン硫酸 25 μg および 12.5 μg に対して 250mU のヘパリーナーゼ II による消化を行った。その結果、25 μg 及び 12.5 μg とともに高分子領域に広がる長鎖のヘパラン硫酸が消失し、短鎖化成分のみとなることが確認された (図 2)。この際、25 μg 及び 12.5 μg とともに消化像に差は認められず、250mU の酵素を使用した場合は 25 μg 以下のヘパラン硫酸を十分に消化し得る事が示唆された。

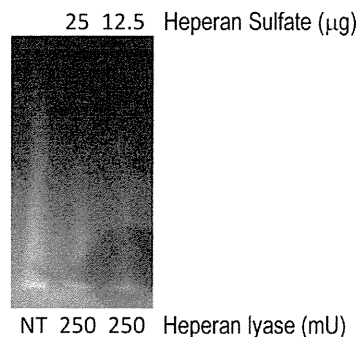


図 2. ヘパリーナーゼによるヘパラン硫酸の消化条件の決定

さらに、ヘパラン硫酸の消化産物にアニリン標識を施し、逆相 HPLC へ展開したところ、主要なピークが複数認められた (図 3)。

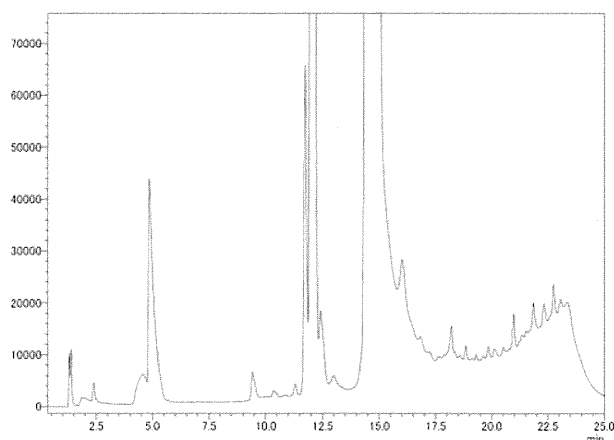


図 3. ヘパラン硫酸消化産物のクロマトグラフ

以上の結果より、ヘパラン硫酸の消化により複数種の二糖が切り出されていることが示唆された。

D. 考察

ヘパラン硫酸は、イズロン酸と硫酸基に富んだ高硫酸化クラスター領域と、グルクロン酸ならびに N アセチルグルコサミンからなるほとんど硫酸基を含まないドメインから構成されており、多様な糖鎖構造を有することが知られる。そのため、ヘパラン硫酸を二糖単位で消化した場合、その構造多様性に伴って様々な二糖が生成される。本研究で得られたクロマトグラ