

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

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、型、型および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、型（成人型、慢性非神経型）、型（乳児型、急性神経型）および型（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を検討した。

B. 研究方法

1) 試料

型、型および型のゴーシェ病患者と健康者（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

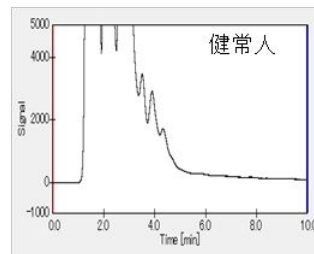
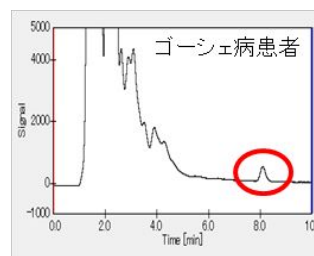


図 1b ゴーシェ病患者の血漿中 Lyso-GlcCer の HPLC クロマトグラム



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で大きかった。

図 2a 健康対照者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム

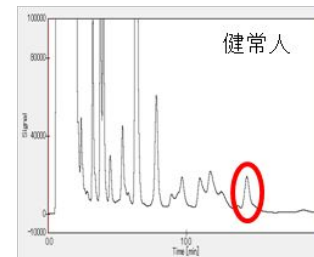
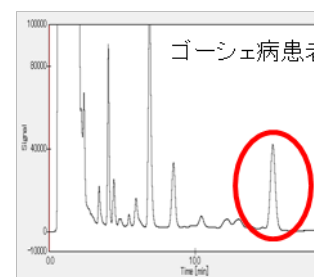


図 2b ゴーシェ病患者の血漿中 GlcCer の HPLC クロマトグラム



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	18.1
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：酵素の分子構造改変に基づく 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 α -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