

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

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 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  $\mu\text{g}$  について各種濃度のヘパリナーゼ 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。

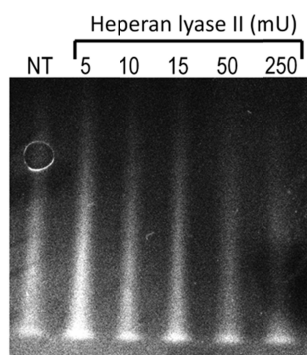


図1. ヘパランリナーゼ II による各種濃度のヘパラン硫酸の消化

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  $\mu\text{g}$  および 12.5  $\mu\text{g}$  に対して 250mU のヘパリナーゼ II による消化を行った。その結果、25  $\mu\text{g}$  及び 12.5  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  及び 12.5  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  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。

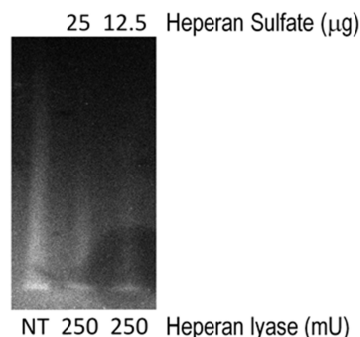


図2. ヘパランリナーゼによるヘパラン硫酸の消化条件の決定

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)。

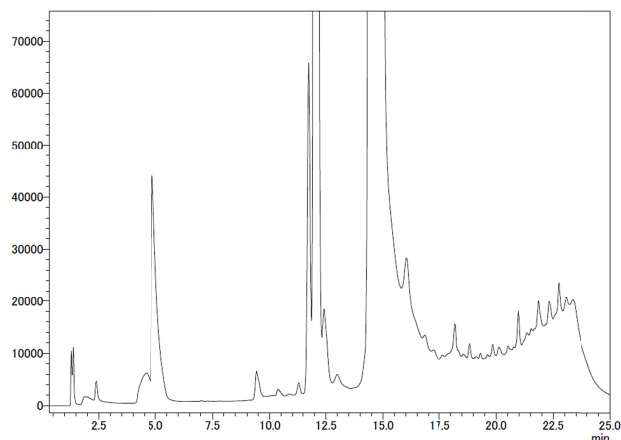


図3. ヘパラン硫酸消化産物のクロマトグラフ

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

フでは複数のピークが確認されたが、これらはヘパラン硫酸の構造多様性を反映していると考えられ、ヘパリナーゼ II を用いた限定分解が成功していることを示唆する。

本研究の最終目的は、疾患特異的 GAG 由来二糖を解析することで MPSII マウスに対する *ex vivo* 遺伝子治療の有効性を解明することである。具体的には、蓄積するヘパラン硫酸の非還元末端に存在する二糖であり、病態を強く反映すると考えられるイズロン酸-2-硫酸, N-硫酸化グルコサミン-6-硫酸 (I2S6) を指標とする。今年度の解析より、クロマトグラフ上で複数のピークが得られたことから、これらを質量解析することで I2S6 を同定することが可能だと考えられる。

今後は、今回決定した消化条件に基づいて調製したヘパラン硫酸消化産物の質量解析を進めると共に *ex vivo* 遺伝子治療を施したモデルマウス由来試料についても同様の操作を進め、その効果の解析を行う予定である。

## E. 結論

*ex vivo* 遺伝子治療の効果解析を行う上で必要となる疾患特異的 GAG 由来二糖の高率的作成条件が決定された。

## 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

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし