

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析に関する研究

分担研究者：難波 栄二（鳥取大学生命機能研究支援センター教授）

研究要旨

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者 4 検体（GM1-ガングリオシドーシス 2 検体、モルキオ B 病 2 検体）について遺伝子変異解析を行った。患者由来の皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン化合物 NOEV と 6S-NBI-DGJ の残存酵素活性に対する上昇効果を検討した。

A. 研究目的

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、患者由来培養皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロンの効果の有無を判定し、変異型との相関を明らかにすることで、新規シャペロン療法開発のための基礎的な知見を得る目的で研究を行った。

B. 研究方法

1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシーケンス解析を行った。

2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2 μM の NOEV（N-octyl-4-epi-β-valienamine）または 20、80 μM の 6S-NBI-DGJ を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 2 検体について遺伝子変異解析を行い、M1C/R49G および R59H/R59H 変異を同定した。モルキオ B 病 2 検体においては、R482H/T500A、R68Q/T500A 変異をそれぞれ同定した。

GM1-ガングリオシドーシス患者（R59H/R59H）由来培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討の結果、NOEV と 6S-NBI-DGJ いずれも有効性を示さなかった。

D. 考察

今回同定した変異のうち、GM1-ガングリオシドーシス 2 検体で同定された R59H は Inf GM1 の変異として既に報告された変異であったが、M1C と R49G 変異は報告のない変異型であった。また、モルキオ B 病 2 検体においては、R482H と T500A はモルキオ B 病の変異として報告のある変異で、R68Q は Inf GM1 の変異として報告されている。モルキオ B と GM1 の変異をヘテロで持つ患者においては、骨格異常と中枢神経症状を示す症例の報告もあるが、今回の R68Q/T500A 変異の症例では、現時点で中枢症状は示しておらず、今後の経

過観察が必要と考えられる。

シャペロン化合物 NOEV, 6S-NBI-DGJ とともに R59H 変異細胞に対する有効性を認めなかったが、これは以前の我々の変異 cDNA 発現細胞系の結果と一致する。今後はこのような既存の化合物が有効性を示さない変異型に有効な新規化合物の探索が必要と考える。

E. 結論

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。患者由来皮膚線維芽細胞に対する 2 つのシャペロン化合物の有効性を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Luan Z, Li L, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on GD cells and normal mice. *Brain Dev*, 2013 35: 317-322.
- 2) Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis. *Mol Ther*, 2013 21: 526-532.
- 3) Higaki K, Ninomiya H, Suzuki Y, Nanba E. Two candidate molecules for chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Future Med Chem*.

2013 5(13): 1551-1558.

2. 学会発表

- 1) 難波栄二. ライソゾーム病に対するシャペロン療法. 第 2 回先天代謝異常症患者会フォーラム. 東京, 2013. 8
- 2) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, 由良敬, 榊原康文, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之. □-ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン治療薬の開発. 第 58 回日本人類遺伝学会. 仙台, 2013. 11
- 3) Nanba E. Chaperone therapy for lysosomal storage diseases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 4) Takai T, Higaki K, Suzuki Y, Nanba E. Comparison of two Chaperone candidates for treatment of GM1-gangliosidosis. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 5) Hossain MA, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N. NOEV treatment option for Japanese late-onset Krabbe disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし