

## 若齢ファブリー病モデルマウスの臓器に蓄積するグロボトリアオシルセラミドのアイソフォームに対する酵素補充治療による分解効果の違い

分担研究者：櫻庭 均（明治薬科大学臨床遺伝学 教授）

研究要旨 ファブリー病では、早期からの酵素補充療法が有効である。しかし、この酵素補充療法は、各々の臓器によって効果が異なり、特に腎臓に蓄積したグロボトリアオシルセラミド (Gb3) に対する分解効果が低いことが知られている。そこで、ファブリー病モデルマウスに酵素補充を行い、腎臓、心臓および肝臓の Gb3 アイソフォームの分解効果に対する違いを調べた。その結果、特に腎臓に蓄積した Gb3 (C20:0) や Gb3 (C240H) などの Gb3 アイソフォームが治療に対して抵抗性を示した。ファブリー病では、これらの Gb3 アイソフォームが徐々に蓄積して、腎臓における治療効果が減弱すると考えられた。

### 研究協力者氏名

所属機関名及び所属機関における職名

兎川忠靖 (明治薬科大学生体機能分析学 教授)

月村孝宏 (明治薬科大学生体機能分析学 助教)

児玉 敬 (明治薬科大学生体機能分析学 院生)

川島育夫 (東京都医学総合研究所 研究員)

した雄の  $gla^{-/0}$  マウスおよび野生型雄マウス ( $GLA^{+/0}$ ) を用いた。各群は4匹のマウスを含む。各マウスの臓器から、クロロホルム/メタノール法で脂質画分を抽出し、その中の Gb3 アイソフォームを液体クロマトグラフィータンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、明治薬科大学動物実験委員会の承認を得て、その規約を遵守して行われた。

### A．研究目的

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) 活性低下に基づき、体内に一群のグロボトリアオシルセラミド (Gb3) アイソフォームが蓄積する遺伝病である。本症に対しては、組換え GLA を用いた早期からの酵素補充療法 (ERT) が有効であるが、その有効性は各臓器により異なることが知られている。その原因を調べるため、若齢ファブリー病モデルマウスに ERT を行い、腎臓、心臓および肝臓に蓄積する各 Gb3 アイソフォームに対する分解効果の違いについて解析した。

### B．研究方法

生後8週齢の雄のファブリー病モデルマウス ( $gla^{-/0}$ ) に対して、アガルシダーゼベータ (商品名：ファブラザイム) 1mg/kg 体重を週2回の割合で、合計2回投与し、最終投与7日後 (10週齢時) に、腎臓、心臓や肝臓などの臓器を摘出した。比較のため、酵素の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を投与

### C．研究結果

各 Gb3 アイソフォームの量を合計した Gb3 の総量については、 $gla^{-/0}$  のすべての臓器で  $GLA^{+/0}$  よりも多く、特に腎臓で多かった。また、 $gla^{-/0}$  に対して行われた ERT において分解を免れた Gb3 の量は、腎臓、心臓、肝臓の順に多かった。各 Gb3 アイソフォームについて検討すると、 $gla^{-/0}$  では、Gb3 (C16:0)、Gb3 (C22:0)、Gb3 (C24:0) や Gb3 (C24:1) などのアイソフォームが多量に臓器に蓄積していた。これらのうち、特に、腎臓に蓄積していた Gb3 (C20:0) や Gb3 (C240H) の ERT による分解率が低いことが明らかになった。

### D．考察

ERT は、早期に施行した場合、ファブリー病に対して有効であるが、腎臓に蓄積した Gb3 の分解効率は、他の臓器のそれに比べて低く、治療に抵抗することが知られている

。その原因として、1)腎臓を構成する細胞群の構築が特殊である。2)血液から腎臓への組換えGLAの移行率が低い、などの可能性が考えられる。今回、我々は、各臓器に蓄積するGb3アイソフォーム別に、ERT による分解効率を調べた所、腎臓に蓄積したGb3(C20:0)やGb3(C24:0)などのGb3アイソフォームが治療抵抗性を示した。ファブリー病では、腎臓にこれらのGb3アイソフォームが徐々に蓄積していき、腎臓における治療効果が減弱する可能性があると考えられた。

## E . 結論

gla<sup>-0</sup>マウスの各臓器には、様々なGb3アイソフォームが大量に蓄積するが、その中で、Gb3(C20:0)やGb3 (C24OH)は、組換えGLAによる分解効率が低く、これらのアイソフォームの存在が腎臓での治療抵抗性に関係していることが考えられた。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kitakaze K, Mizutani Y, Sugiyama E, Tasaki C, Tsuji D, Maita N, Hirokawa T, Asanuma D, Kamiya M, Sato K, Setou M, Urano Y, Togawa T, Otaka A, Sakuraba H, Itoh K. Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest*, (2016) 126: 1691-1703.
- 2) Kitakaze K, Tasaki C, Tajima Y, Hirokawa T, Tsuji D, Sakuraba H, Itoh K. Combined replacement effects of human modified  $\beta$ -hexosaminidase B and GM2 activator protein on GM2 gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Reports*, (2016) 7: 157-163.
- 3) Kosuga M, Mashima R, Hirakiyama A, Fuji N, Kumagai T, Seo JH, Nikaido M, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Okuyama T. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase. *Mol Genet Metab*, (2016)118: 190-197.
- 4) Saito S, Ohno K, Okuyama T, Sakuraba H. Structural basis of mucopolysaccharidosis type II and construction of a database of mutant iduronate 2-sulfatases. *PLOS ONE*, (2016)11: e0163964.
- 5) Kodama T, Tsukimura T, Kawashima I, Sato A, Sakuraba H, Togawa T. Differences in cleavage of globotriaosylceramide and its derivatives accumulated in organs of young Fabry mice following enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab*, (2016) S1096-7192(16): 30154-30158.
- 6) Kubo T, Ochi Y, Baba Y, Hirota T, Tanioka K, Yamasaki N, Yoshimitsu M, Higuchi K, Takenaka T, Nakajima K, Togawa T, Tsukimura T, Sano S, Tei C, Sakuraba H, Kitaoka H. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol*, (2017)69: 302-307.
- 7) Ogawa Y, Kaizu K, Yanagi Y, Takada S, Sakuraba H, Oishi K. FcR $\gamma$ -dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice. *Scientific Reports*, (2017) in press.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

- 1) Sakuraba H. Fabry Disease: Focus on Protein Structure and Antibody. Chinese Medical Association-Taipei Annual

- Conference, Taipei, Taiwan. Jun. 2016
- 2) Sakuraba H, Togawa T, Tsukimura T, Saito S, Ohno K. Comparative study on  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) genetic variants with unknown clinical significance. 12th Annual WORLD Symposium™ 2016. San Diego, USA. Feb. 2016
  - 3) Togawa T, Kodama T, Tsukimura T, Kawashima I, Tanaka T, Shiga T, Sato A, Sakuraba H. Measurement of glycosphingolipids by means of tandem mass spectrometry and evaluation of them as a biomarker of Fabry disease. 12th Annual WORLD Symposium™ 2016. San Diego, USA. Feb. 2016.
  - 4) Tsukimura T, Shibasaki F, Shigenaga M, Togawa T, Sakuraba H.: Anti- $\alpha$ -galactosidase A antibodies and serum-mediated inhibition in Fabry disease. 12th Annual WORLD Symposium™ 2016. San Diego, USA. Feb. 2016.
- 国内学会招待講演
- 5) 櫻庭 均: ファブリー病の最近の知見. ファブリー病セミナー. 東京, 2016. 6
  - 6) 櫻庭 均: ファブリー病: 診断と治療の最新情報. 第 77 回北海道セミナー. 札幌, 2016. 7
  - 7) 櫻庭 均: ファブリー病の早期診断・治療の重要性 検査・診断・治療に関する最新の知見について. ファブリー病セミナー in 能代. 能代, 2016. 7
  - 8) 櫻庭 均: ファブリー病診断技術の最前線. 北摂ファブリー病カンファレンス. 吹田, 2016. 7
  - 9) 櫻庭 均: ファブリー病かな? と思ったら 診断の手引き. 豊明ファブリー病セミナー. 豊明, 2016. 9.
  - 10) 櫻庭 均: ファブリー病マネジメント 診断から治療に関する最近の知見. TOHO Fabry Network. 東京, 2016. 9
  - 11) 櫻庭 均: ファブリー病を見逃さない! 臨床症状と鑑別診断. 9月度 富岡市甘楽郡医師会学術講演会. 富岡, 2016. 9
  - 12) 櫻庭 均: 血漿 Lyso-Gb3 の測定は、ファブリー病の診断や酵素補充療法の評価に有用である. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2016. 9-10
  - 13) 櫻庭 均: 日常診療に潜在するファブリー病 病態・診断・治療に関する最新の知見. 川越ファブリー病講演会. 川越, 2016. 10
  - 14) 櫻庭 均: ライソゾーム病の分子病理学および構造生物学的研究. 第 58 回 日本先天代謝異常学会総会, 学会賞講演. 東京, 2016. 10
- 国内学会一般講演
- 15) 鶴巻舞子, 児玉 敬, 天海雄二郎, 小野夏実, 鈴木 和, 田中未来, 月村考宏, 片山昌勅, 志賀智子, 田中利絵, 櫻庭 均, 兎川忠靖: ファブリー病の診断における尿中グロボトリアオシルセラミドの測定と  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの E66Q アミノ酸置換. 日本薬学会第 136 年会. 横浜, 2016. 3
  - 16) 櫻庭 均, 兎川忠靖, 月村考宏, 若村友太郎: ファブリー病バイオマーカーとしての血漿 Lyso-Gb3: 基準値設定と患者試料の測定. 第 59 回日本腎臓学会学術総会. 横浜, 2016. 6
  - 17) 月村考宏, 佐藤温子, 澤村恵理嘉, 池田紗都, 大庭 優, 兎川忠靖, 櫻庭 均: ファブリー病新規治療薬候補 改変型 NAGA の治療効果を増強させる化合物の探索. 第 89 回 日本生化学大会. 仙台, 2016. 9
  - 18) 櫻庭 均, 兎川忠靖, 月村考宏, 若村友太郎, 加藤 浩: 血漿 Lyso-Gb3 の測定は、ファブリー病の診断や酵素補充療法の評価に有用である. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会. 東

京, 2016. 9

- 19) 真嶋隆一, 小須賀基通, 櫻庭 均, 奥山虎之: ムコ多糖症 II 型の原因遺伝子である IDS 遺伝子の日本人家系における解析例: 16 の新規変異を含む 65 例の解析結果. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会. 東京, 2016. 9
- 20) 月村考宏, 佐藤温子, 澤村恵理嘉, 池田紗都, 大庭 優, 兎川忠靖, 櫻庭 均: 改变型 -N-アセチルガラクトサミニダーゼを安定化する化合物の探索. 第 58 回日本先天代謝異常学会/第 14 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 東京, 2016. 10
- 21) 重永雅志, 月村考宏, 佐藤温子, 兎川忠靖, 櫻庭 均: 遅発型ファブリー病原因遺伝子変異と機能的多型の違い. 第 58 回日本先天代謝異常学会/第 14 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 東京, 2016. 10

( 発表誌名巻号・頁・発行年等も記入 )

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし