

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32684

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659527

研究課題名(和文) GM2 ガングリオシドーシスの新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a new biomarker of GM2 gangliosidosis

研究代表者

櫻庭 均 (SAKURABA, Hitoshi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60114493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円、(間接経費) 810,000 円

研究成果の概要(和文)：ザンドホッフ病(SD)マウスの脳及び血漿中のリゾGM2ガングリオシド(リゾGM2)含量をHPLCで測定し、ヘキサミンダーゼA(HexA)活性を持つ改変型ヘキサミンダーゼB(HexB)の効果解析した。次に、テイ-サックス病(TSD)及びSD患者の血漿中のリゾGM2濃度を測定した。SDマウスの脳及び血漿中のリゾGM2含量は、対照と比べて増加しており、改変型HexBの脳室内投与により減少した。TSDやSD患者の血漿中リゾGM2レベルは、対照に比べて高く、その増加の度合いは、HexA活性の低下と相関していた。リゾGM2は、GM2ガングリオシドーシスのバイオマーカーとなり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To develop a new biomarker of GM2 gangliosidosis, we focused attention on lyso-GM2 ganglioside (lyso-GM2). We measured the lyso-GM2 levels in the brain and plasma of Sandhoff mice by means of high performance liquid chromatography, and examined the effects of a modified hexosaminidase B (HexB) exhibiting hexosaminidase A (HexA)-like activity. Then, the lyso-GM2 concentrations in plasma from patients with Tay-Sachs disease and Sandhoff disease were determined. The lyso-GM2 levels in the brain and plasma in Sandhoff mice were apparently increased compared with those in wild-type mice, and they decreased on intraventricular administration of the modified HexB. The plasma lyso-GM2 levels in the patients with Tay-Sachs disease and Sandhoff disease were increased, and their increase in lyso-GM2 was associated with a decrease in HexA activity. Considering the results, lyso-GM2 is thought to be a potential biomarker of GM2 gangliosidosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：GM2ガングリオシドーシス テイ-サックス病 ザンドホッフ病 GM2ガングリオシド リゾ-GM2ガングリオシド バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

GM2 ガングリオシドーシスは、神経系細胞内に GM2 ガングリオシド (GM2) などの糖脂質が蓄積して、進行性の脳神経障害を来たす遺伝病である。GM2 は、リソソーム性糖水解酵素の一種であるヘキササミニダーゼ A (HexA) によって分解される。この HexA は、HEXA および HEXB 遺伝子がコードする α -サブユニットと β -サブユニットから構成されるため、ふたつのサブユニットのいずれかが障害されても HexA 活性が低下して、GM2 が分解されなくなる。 α -サブユニットおよび β -サブユニットの障害に基づく GM2 ガングリオシドーシスは、夫々、テイ-サックス病 (TSD) およびザンドホッフ病 (SD) と呼ばれ、特に前者は、ユダヤ人において発生頻度が著しく高いことが知られている。

これまで、GM2 ガングリオシドーシスに対する有効な治療法はなかったが、最近、本症に対する根本的治療を目指して、基質枯渴療法や酵素補充療法の開発が始まっている。我々の研究グループも、HexA 活性を持つ改変型ヘキササミニダーゼ B (Mod. HexB: 一部のアミノ酸を置換した改変型 β -サブユニットの二量体) を遺伝子工学で生産し、酵素補充治療薬候補となり得ることを報告した (Mol. Ther., 19: 1017-1024, 2011)。それに伴い、GM2 ガングリオシドーシスの診断や治療の評価に役立つバイオマーカーの開発が緊急に必要となっている。

我々は、GM2 の誘導体であるリゾ-GM2 ガングリオシド (Lyso-GM2) に注目した。Lyso-GM2 は、プロテインキナーゼ C 阻害作用を持ち、その過剰蓄積により神経毒性を発揮するなど、本症の病態と深く係る可能性がある (Biol. Chem. Hoppe-Syler, 367: 241, 1986)。また、Lyso-GM2 は、GM2 と比べて疎水性が低いいため、脳組織に蓄積すると髄液、さらには血液に移行すると思われ、血液などの臨床試料を用いた測定が可能であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、まず Lyso-GM2 の測定法を確立し、SD マウスの脳組織や血漿中の Lyso-GM2 の含量を測定する。次に、改変型 HexB を SD マウスに投与し、血漿中 Lyso-GM2 濃度が治療の効果を反映するか否かを検討する。最後に、ヒト TSD および SD 患者の血漿中 Lyso-GM2 濃度を測定することで、Lyso-GM2 が GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカーとして有用であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による脳組織および血漿中の Lyso-GM2 測定法の開発

野生型および SD マウスの脳ホモジネートと血漿を試料として、クロロホルム/メタノール法で脂質画分を抽出した。抽出した脂質

画分を乾固し、水を加えて超音波処理した後、順次、ブタノール抽出とメタノール抽出を行った。次に、この抽出液に *o*-フタルアルデヒド溶液を加えて反応させ、Lyso-GM2 の蛍光誘導体化を行い、UK-C18 カラムを用いた HPLC 法で、蛍光誘導体化された Lyso-GM2 を定量した。その際、野生型マウス脳ホモジネートまたは血漿に対して、調整した精製 Lyso-GM2 を加えたものを標準として、その測定を行い、標準曲線を作製して、測定試料中の Lyso-GM2 定量に用いた。

(2) マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF-MS) による Lyso-GM2 の同定

上記と同じ方法で脂質を抽出した後に、その画分をメタノールに溶解し、薄層クロマトグラフィーで展開・分離した後、Lyso-GM2 画分を分取した。この Lyso-GM2 画分をブタノールで抽出し、乾固した後、DHB マトリックス溶液に溶解して、MALDI-TOF-MS 法で解析した。

(3) マウス脳組織中の GM2 含量の測定

野生型および SD マウスの脳ホモジネートを試料として、クロロホルム/メタノール/水 (4/8/3, v/v/v) 処理で糖脂質画分を抽出した。この画分を乾固した後、クロロホルム/メタノール/水 (60/30/4.5, v/v/v) に溶解した。次に、この溶解液を試料として、HPTLC-シリカゲルプレートを用いて、溶媒 (クロロホルム/メタノール/水、65/25/4, v/v/v) で展開し、オルシノール試薬で発色した。さらに、抗 GM2 モノクローナル抗体を用いた HPTLC-免疫染色により、試料中の GM2 を同定し、デンシトメトリーで定量した。

(4) SD マウスの脳組織および血漿中の Lyso-GM2 に対する Mod. HexB の影響

HexA 活性を持つ Mod. HexB (20 $\mu\text{mol/h}/25\mu\text{l}$) を生後 10 週齢の SD マウスの脳室内に注入し、1 週間後に脳と血漿を採取した。これらを試料として、脳組織中の GM2 と Lyso-GM2 および血漿中の Lyso-GM2 を測定した。

(5) TSD および SD 患者血漿中の Lyso-GM2 濃度の測定

TSD 患者 5 名および SD 患者 2 名 (乳児型および成人型 SD 各 1 名) から血漿を採取し、上記のマウス血漿を試料とした HPLC による Lyso-GM2 測定と同じ方法で、Lyso-GM2 を定量した。

(6) 酵素活性測定

TSD および SD 患者血漿中の全ヘキササミニダーゼ (Hex, HexA と HexB とを合わせたもの) 活性および HexA 活性は、夫々、4-メチルウムベリフェリル-N-アセチル- β -D-グルコサミニド (MUG) および 4-メチルウムベリ

フェリル-6-スルホ-β-D-グルコサミニド (MUGS) を基質とする蛍光法で測定した。

(7)液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) を用いた Lyso-GM2 の測定法の開発

ヒト血漿を試料として、メタノール除タンパク処理を行い、COSMOSIL HILIC ガードカラムを用いた LC-MS/MS 法で、試料中の Lyso-GM2 を測定した。

(8)統計学的解析

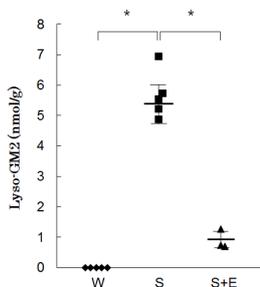
対象 2 グループ間に統計学的有意差があるか否かを Student の t 検定で解析した。P<0.05 を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1)HPLC によるマウス脳組織の Lyso-GM2 測定結果

HPLC 法による野生型マウス、SD マウスおよび Mod. HexB を投与された SD マウス由来の脳組織中の Lyso-GM2 測定結果を、図 1 に示した。SD マウス脳の Lyso-GM2 含量は、 5.6 ± 0.8 nmol/g [n=5] (平均±標準偏差 [試料数]) であり、野生型マウス (<0.02 nmol/g) に比べて、著明に増加していたが、Mod. HexB 投与により 0.9 ± 0.4 nmol/g [n=3] にまで低下した。

図1. マウス脳組織のLyso-GM2含量



野生型マウス (W)、SD マウス (S) および Mod. HexB を投与された SD マウス (S+E) を表わす。*P<0.05

(2) MALDI-TOF-MS による SD マウス脳の Lyso-GM2 の同定

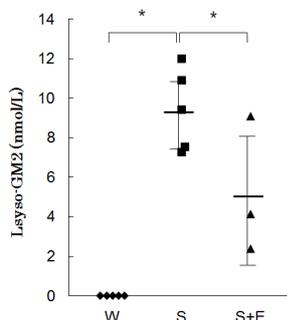
SD マウス脳を試料として、MALDI-TOF-MS 法でスペクトラム分析を行った。その結果、SD マウスの脳内で検出された蓄積物質が Lyso-GM2 であることを確認した。

(3) HPLC によるマウス血漿中の Lyso-GM2 測定結果

HPLC 法による野生型マウス、SD マウスおよび Mod. HexB を投与された SD マウス由来の血漿中の Lyso-GM2 測定結果を、図 2 に示した。野生型マウスの血漿中 Lyso-GM2 濃度は 1.0 nmol/L 未満であるのに対して、SD マウスのそれは 9.4 ± 2.1 nmol/L [n=5] と高く、Mod. HexB 投与により、 5.2 ± 3.5 nmol/L [n=3] に減少した。血漿中 Lyso-GM2 濃度は、脳組織の Lyso-GM2 含量と関連しており、治療に

よる効果が反映されると考えられた。

図2. マウス血漿中のLyso-GM2濃度

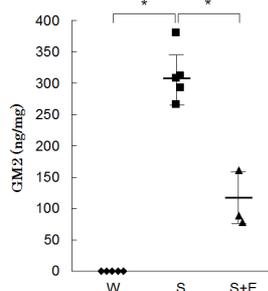


野生型マウス (W)、SD マウス (S) および Mod. HexB を投与された SD マウス (S+E) を表わす。*P<0.05

(4) HPTLC-免疫染色によるマウス脳組織の GM2 測定結果

HPTLC-免疫染色法による野生型マウス、SD マウスおよび Mod. HexB を投与された SD マウス由来の脳組織中の GM2 測定結果を図 3 に示した。野生型マウス脳における GM2 含量は 10 ng/mg 未満であったが、SD マウス脳では、 312 ± 42 ng/mg [n=5] と高く、Mod. HexB 投与により 109 ± 45 ng/mg [n=3] にまで低下した。脳組織中の GM2 含量は、Lyso-GM2 含量と関連したが、治療による改善傾向は、後者の方がより顕著に表われた。

図3. マウス脳組織のGM2含量



野生型マウス (W)、SD マウス (S) および Mod. HexB を投与された SD マウス (S+E) を表わす。*P<0.05

(5) HPLC によるヒト血漿中の全 Hex 活性、Hex A 活性および Lyso-GM2 濃度の測定結果

TSD 患者では、血漿中の HexA 活性が著明に低下し、Lyso-GM2 濃度が増加していた。また、SD 患者では、全 Hex 活性と HexA 活性の低下がみられ、乳児型および成人型患者の双方で Lyso-GM2 濃度の増加が認められたが、その増加の程度は、臨床的に重症である乳児型患者の方が強かった (表)。

表. ヒト血漿中の全 Hex 活性、HexA 活性および Lyso-GM2 濃度

疾患	症例	全 Hex 活性 (nmol/h/mL)	HexA 活性 (nmol/h/mL)	Lyso-GM2 濃度 (nmol/L)
TSD	No.1	552	2	39.9
	No.2	533	2	29.7
	No.3	382	2	26.4
	No.4	494	2	30.1
	No.5	281	1	32.6
SD ()	No.6	17	5	12.7
SD (A)	No.7	42	5	2.9
対照	n=48	709±302*	58±14*	< 2.0

SD (): 乳児 SD、SD (A): 成人型 SD.

*平均 ± 標準偏差.

(6) LC-MS/MS によるヒト血漿中 Lyso-GM2 測定法の開発

本法では、MS/MS の多重反応モニタリングを適用することで、夫々のプリカーサーイオンを選択し、衝突解離したプロダクトイオンの中のシアル酸を測定した。本法により、高い選択性で Lyso-GM2 を測定することが可能になり、血漿試料の前処理についても、メタノール除タンパク操作のみで測定に供することが出来るため、測定に必要な時間が短縮した。本法を用いて、予備的に TS および SD 患者や対照由来の血漿中 Lyso-GM2 を測定した所、HPLC による測定値とほぼ同じ値を示した。

(7) まとめ

マウスを用いた動物実験の結果、GM2 ガングリオシドーシスにおける主要な障害臓器である脳で Lyso-GM2 の増量がみられ、その治療による変化は、血漿中 Lyso-GM2 濃度に反映することが明らかになった。また、ヒト TSD および SD 患者における血漿中 Lyso-GM2 濃度は、対照に比べて明らかに高かった。これらの研究結果から、Lyso-GM2 は、GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカーになると考えられた。今後、HPLC 法に加えて、LC-MS/MS など高感度で特異的な測定法が確立されれば、GM2 ガングリオシドーシスの診断や治療評価などに役立つと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Togawa T, Takada M, Aizawa Y, Tsukimura T, Chiba Y, Sakuraba H: Comparative study on mannose 6-phosphate residue contents of recombinant lysosomal enzymes. *Mol Genet Metab*, 111: 369-373, 2014. doi: 10.1016/j.yimgme. 査読あり
Saito S, Ohno K, Maita N, Sakuraba H:

Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α -L-iduronidase: insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I. *Mol Genet Metab*, 111: 107-112, 2014. doi: 10.1016/j.yimgme. 査読あり
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*, 8: e84267, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0084267. 査読あり

Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, Suzuki T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Shibasaki F: 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.

doi: 10.1371/journal.pone.0078588. 査読あり

Doi K, Noiri E, Ishizu T, Negishi K, Suzuki Y, Hamasaki Y, Honda K, Fujita T, Tsukimura T, Togawa T, Saito S, Sakuraba H: High-throughput screening identified disease-causing mutants and functional variants of α -galactosidase A gene in Japanese male hemodialysis patients. *J Hum Genet*, 57: 575-579, 2012.

doi: 10.1038/jhg. 査読あり

Saito S, Ohno K, Sekijima M, Suzuki T, Sakuraba H: Database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant arylsulfatase B structures in mucopolysaccharidosis type VI. *J Hum Genet*, 57: 280-282, 2012.

doi: 10.1038/jhg. 査読あり

Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Matsuoka K, Kitakaze K, Tsuji D, Itoh K, Ishida Y, Suzuki M, Suzuki T, Sakuraba H: Lyso-GM2 ganglioside: a possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. *PLoS One*, 2011. 6: e29074.

doi: 10.1371/journal.pone.0029074. 査読あり

[学会発表](計20件)

Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Molecular interaction between a mutant α -galactosidase A and imino sugars. 10th Annual WORLD Symposium™ 2014, 2014. 2. 11-13, San Diego, California, USA.

Kitakaze K, Asanuma D, Kamiya M, Tsuji D, Ikuo M, Urano Y, Sakuraba H, Itoh

K: Replacement effects of human modified lysosomal β -hexosaminidase B on Tay-Sachs disease and Sandhoff disease models and imaging with novel pH-activatable fluorescent probes. 10th Annual WORLD Symposium™ 2014, 2014. 2. 11-13, San Diego, California, USA.

櫻庭 均: 早期診断・早期治療が必要な先天代謝異常症 ファブリー病. 角膜カンファランス 2014 第 38 回日本角膜学会総会 第 30 回日本角膜移植学会, 2014. 1. 31, 沖縄

Sakuraba H.: Genotype/phenotype correlation in Fabry disease. The 15th Annual Asia LSD Symposium, 2013. 11. 26, Chiba, Japan.

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, 2013. 11. 2, 横浜

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, 2013. 6. 20-23, 福岡

Sakuraba H.: High Risk Screening for Fabry Disease. Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, 2013. 5. 31 - 6. 1, Kumamoto, Japan.

Sakuraba H.: Construction of a database and development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease. The 3rd Medicinal Chemistry Seminar (2012) of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, 2012. 12. 3-5, Tokyo, Japan.

櫻庭 均: 酵素/低分子化合物複合体形成機構の熱力学的・構造学的検討. 第 1 回 日本シャペロン療法研究会, 遺伝性難病の治療を目指して, 2012. 11. 11, 東京

櫻庭 均: ファブリー病の分子病態と腎障害. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2012. 6. 29, 東京

櫻庭 均: 分子設計に基づくファブリー病新規治療戦略. 第 57 回(社)日本透析医学会 学術集会・総会, 2012. 6. 23, 札幌

櫻庭 均: 蛋白尿に潜む疾患 ファブリー病. 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 2012. 6. 1, 横浜

櫻庭 均: 神経内科医が遭遇する疾患 ファブリー病. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5. 24, 東京

児玉 敬、兎川 忠靖、川島 育夫、石田 洋一、鈴木 實、辻 大輔、伊藤 孝司、月村 考宏、鈴木 俊宏、櫻庭 均: Lyso-GM2 : GM2 ガングリオシドーシスのバイオマーカー. 第 53 回日本先天代謝異常学会総会, 第 10 回ア

ジア先天代謝異常症シンポジウム. 2011. 11. 24-26, 千葉.

Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Ishida Y, Suzuki T, Sakuraba H.: Lyso-GM2 ganglioside: A new biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. The Second Medicinal Chemistry Seminar of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, 2011. 10. 19-21, New Delhi, India.

Sakuraba H.: Development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease based on molecular designing. The 31st Naito Conference, Glycan Expression and Regulation [II]: Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond, 2011. 9. 13-16, Sapporo, Japan.

Sakuraba H.: New treatment of Fabry disease. Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) Satellite Symposium 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening, 2011. 8. 4-6, Tokyo, Japan.

櫻庭 均: Fabry 病の診断と治療. 第 37 回皮膚かたち研究会, 2011. 7. 22, 東京

櫻庭 均: ファブリー病の診断治療戦略 - 最新のスクリーニング結果報告. 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 2011. 6. 16, 横浜

Sakuraba H.: High-risk screening, database and biomarkers of Fabry disease. The 13th Annual Asia LSD Symposium, 2011. 4. 6-17, Hong Kong, China.

〔図書〕(計 8 件)

櫻庭 均, 中山書店, アスパルチルグルコサミン尿症. 先天代謝異常ハンドブック, 2013, 208-209

櫻庭 均, 中山書店, Canavan 病. 先天代謝異常ハンドブック, 2013, 116-117

櫻庭 均, 化学同人, 酵素(2) リソゾーム酵素. DOJIN BIOSCIENCE SERIES 08 バイオ医薬品 開発の基礎から次世代医薬品まで, 2013, 146-152

櫻庭 均, 診断と治療社, 分子生物学的病態生理学. ファブリー病 Up Date, 2012, 25-50

櫻庭 均, 診断と治療社, 病態生理学. ファブリー病 Up Date, 2012, 18-24

櫻庭 均, 医学書院, ゴーシェ病. 今日の小児治療指針, 第 15 版, 2012, 211

櫻庭 均, 診断と治療社, ライソゾーム酵素の立体構造とライソゾーム病. ライソゾーム病 - 病態・診断の最近の進歩, 2011, 41-50

櫻庭 均, 診断と治療社, ライソゾームの糖脂質代謝. ライソゾーム病 - 病

態・診断の最近の進歩、2011、14-18

〔その他〕

ホームページ等

<http://fabry-database.org/>

<http://mps6-database.org/>

6．研究組織

(1)研究代表者

櫻庭 均 (SAKURABA Hitoshi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：6 0 1 1 4 4 9 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし