

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590563

研究課題名(和文) II型糖原病のための新生児スクリーニング法ならびに化学シャペロン療法の分子基盤

研究課題名(英文) Establishment of newborn screening and molecular basis of chemical chaperone therapy for glycogen storage disease II

研究代表者

奥宮 敏可 (OKUMIYA TOSHIKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：50284435

研究成果の概要(和文)：II型糖原病[ポンペ病：酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ(A $\alpha$ Glu)欠損症]を対象とした新生児スクリーニングに、アジア人固有の遺伝子多型(c.1726A と c.2065A のホモ接合体：AA ホモ接合体)が影響することを示した。また、このAA ホモ接合体と患者の鑑別を目的とする新たな診断技術を確立した。II型糖原病由来の40種類の変異酵素に対する化学シャペロンの効果を検討し、変異酵素の多くは小胞体関連分解以外の細胞内蛋白質分解系で処理されていることを示した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the high frequency (3.3-3.9%) of acid  $\alpha$ -glucosidase pseudodeficiency, c.[1726G>A; 2065G>A] homozygote (AA homozygote), in Asian populations complicated newborn screening for glycogen storage disease type II on dried blood spots, since AA homozygotes have a considerably low enzyme activity. We have searched for a method to effectively eliminate hemoglobin in the reaction solution. Hemoglobin precipitation with barium hydroxide and zinc sulfate (Ba/Zn method) carried out after the enzyme reaction considerably enhances the fluorescence intensity. The Ba/Zn method greatly improved the separation between Japanese patients with Pompe disease and unaffected AA homozygotes in the assay on blood spots.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：臨床化学、分子生物学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：リソソーム病、ポンペ病、酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ、新生児スクリーニング、遺伝子多型、化学シャペロン、小胞体関連分解

## 1. 研究開始当初の背景

(1) II型糖原病のための酵素補充療法ならびに早期診断の必要性

リソソームに存在する酵素の1つが遺伝的に

欠損することにより、当該酵素に対応する生体内基質が過剰に蓄積し様々な症状をきたす一連の疾患をリソソーム病と称する。近年に至るまで本症に対する根本的治療法の開発は困難を極めて

いたが、1991年、ゴーシェ病に対する酵素補充療法が開始されて以来、ファブリー病、II型糖原病(ポンペ病)さらにムコ多糖症(I、VIおよびII型)等に対する酵素製剤の研究開発が行われるに至った。国内ではゴーシェ病やファブリー病、ムコ多糖症に対する組み換え酵素を用いた酵素補充療法が厚生省に承認され既に臨床に应用されている。これらの疾患に続く酵素補充療法の対象疾患としてII型糖原病が注目され、組み換え酵素製剤(Myozyme™)の使用がわが国でも平成19年4月に承認された。

II型糖原病はリソソームに存在する酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ(A $\alpha$ Glu)の遺伝的欠損に起因し、本酵素活性の低下により骨格筋や心筋、肝を中心にグリコーゲンが過剰蓄積する疾患である。したがって、他の遺伝性欠損症と同様に、患者の早期発見が効果的治療法の要件と考えられる。本症の診断は、筋生検材料や培養繊維芽細胞を用いたA $\alpha$ Glu活性の測定によって行われてきた。しかし、新生児スクリーニングの試料としてこれらの臨床材料を用いることは、患者への負担や長期におよぶ細胞培養期間の必要性等から不可能に近い。そのため、他の新生児スクリーニングと同様に、採取が容易な血液試料を用いたA $\alpha$ Glu活性測定が理想的とされるが、血液細胞(主に好中球)由来の類似酵素MG(maltase-glucoamylase)の存在により、特異的な酵素診断法は不可能であった。この問題を回避するため、A $\alpha$ Glu抗体を用いた分別測定法(Chamoles NA, et al: Clin Chem Acta 347: 97-102, 2004)による新生児スクリーニングの二重盲検試験が、欧州を中心に試みられたが実用に耐えうるだけの診断精度は得られなかった。我々は、この問題を解決するため、経口糖尿病薬として開発されたアカルボースがMG活性を特異的に阻害することを利用し、それを混合白血球に应用してA $\alpha$ Gluの特異的測定法を確立した(Okumiyama T, et al. Mol Genet Metab, 2006)。

## (2) 化学シャペロン療法の分子基盤

前述のごとく、本症を含むリソソーム病に対して酵素補充療法が積極的に行われているが、酵素補充療法は神経症状を合併した疾患には効果が期待できないこと、酵素製剤が極めて高価である

こと、酵素蛋白質に対する免疫応答による副作用等が問題となっており、新たな治療法の開発が求められている。その新規治療戦略として注目されているものが化学シャペロン療法である。最近の報告では酵素補充療法と化学シャペロン療法の併用することで、効果的な治療ができるとの報告もある。化学シャペロンは、細胞内で合成された変異酵素分子のミスフォールディングを是正することで、本来の酵素機能を回復させるものと考えられているが、その分子メカニズムは不明な点が多く、臨床応用に至るまでには安全性や有効性等の点でクリアしなければならない問題も多い。

## 2. 研究の目的

### (1) 血液濾紙によるII型糖原病の新生児スクリーニング法の開発

我々は、これまで困難とされてきた血液試料を用いたII型糖原病の酵素診断を、アカルボースを用いることで可能とした。本研究は、その基本原理を、新生児スクリーニングに使用されている乾燥血液濾紙に应用し、簡便で信頼性の高いII型糖原病のための新生児スクリーニング法を確立することを目的とする。

### (2) 化学シャペロンの作用機序に関する研究

我々は、これまでの研究から1-deoxyojirimycinとその誘導体がII型糖原病患者由来の変異酵素に対して化学シャペロンとして機能することを明らかにしてきた。特にその中でも*N-n*-butyl-1-deoxyojirimycin(BN-DNJ)が細胞内での変異酵素のプロセッシングや細胞内輸送を是正し、細胞内残存活性を上昇させることを報告した。本研究では、NB-DNJがどのようなメカニズムで変異酵素のミスフォールディングを抑制し、正常フォールディングへ導くのか、その機序を明らかにすることを目的としている。また、細胞内分解処理系として知られる粗面小胞体関連分解(ERAD)やオートファジーとの関連性についても検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血液濾紙によるII型糖原病の新生児スクリーニング法の開発

#### ①アジア人固有の遺伝子多型の影響

健常日本人 715 例およびⅡ型糖原病患者 18 例から得た乾燥血液濾紙を、専用パンチを用いて直径約 3.2mm の血液ディスクに打ち抜き、測定試料とした。測定には、人工蛍光基質 (4MU- $\alpha$ Glc) を用い、血液ディスク中に含まれる  $\alpha$ Glu により遊離した 4MU の蛍光強度を測定した。遺伝子多型の解析は活性測定に使用した後の血液ディスクをテンプレートとして用い、ARMS 法にて解析を行った。

#### ②遺伝子多型の影響を受けない酵素活性測定法の確立

酵素反応液に共存するヘモグロビンの影響を解析するとともにその回避策として、水酸化バリウムと硫酸亜鉛によるヘモグロビン除去法の効果について検討した。

#### (2) 化学シャペロンの作用機序に関する研究

①Ⅱ型糖原病患者から同定された変異  $\alpha$ Glu の発現コンストラクトを作製し、細胞内残存活性や酵素分子のプロセッシングに対する NB-DNJ の効果を解析した。また、ERAD との関連性を調べるためにプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて細胞内の活性変化を解析した。さらに、発現された変異酵素の熱安定性や基質との親和性等の酵素学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 血液濾紙によるⅡ型糖原病の新生児スクリーニング法の開発

乾燥血液濾紙を試料とする  $\alpha$ Glu 活性測定法を確立した。本法を用いて、日本人健常新生児 715 例と患者 18 の  $\alpha$ Glu 活性を測定したところ、健常者の酵素活性分布は二峰性を示し、大多数を占める高活性グループとは別に一部患者活性領域と重なる低活性グループが約 4% 存在することが明らかとなった。この低活性グループは白人には存在しないことから、この現象には遺伝的背景が関与しているものと考え、酵素活性測定後に残った血液濾紙を用いて遺伝子多型解析を行った。その結果、低活性グループは c. 1726A と c. 2065A のホモ接合体 (AA ホモ接合体) であることが判明した

(図 1 : kumamoto S, et al. Mol Genet Metab, 2009))。このことは、アジア系人種を対象とした本症の新生児スクリーニングにおいては、この遺伝子多型の存在を考慮しなければならないことを意味し、現在の方法では多くの偽陽性を出してしまうことが推察された。

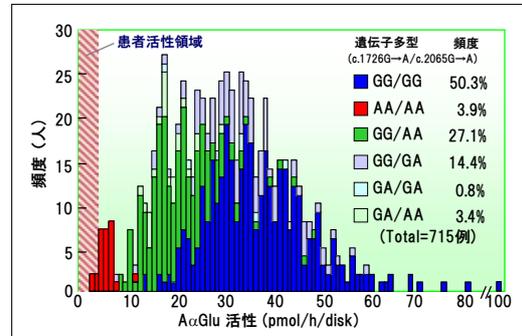


図1. 日本人における $\alpha$ Glu活性と遺伝子多型

そこで、我々は AA ホモ接合体と患者を明確に識別する分析技術を確立する目的で、反応溶液中に存在するヘモグロビンの影響とその回避策について検討した。その結果、ヘモグロビンは遊離した 4MU の蛍光強度に直接影響を与え、著しくその値を低下させることが判明した。そこで、このヘモグロビンを効率的に除去する方法について検討を行った結果、水酸化バリウムと硫酸亜鉛を用いて酵素反応後の溶液からヘモグロビンを除去することで、高感度で信頼性の高い  $\alpha$ Glu 活性測定が可能となった (Ba/Zn 法)。

日本人健常新生児 252 例 (GG ホモ接合体 112 例、GG/AA ヘテロ接合体 70 例、AA ホモ接合体 70 例) と日本人Ⅱ型糖原病患者 18 例の血液濾紙を対象として Ba/Zn 法と従来法で  $\alpha$ Glu 活性を測定し、両者の測定値を比較検討した (表 1、図 2)。従来法では AA ホモ接合体 70 例中 11 例 (約 16%) が患者群とオーバーラップしたのに対し、Ba/Zn 法では、両群でオーバーラップするものはなく、顕著な識別率の改善が認められた (Shigeto S, Mol Genet Metab, 2011)。また、GG ホモ接合体の平均活性に対する AA ホモ接合体の平均活性も、(従来法) 14% から (Ba/Zn 法) 21% に改善され、血液から分離した混合白血球を用いた場合の酵素活性測定結果 (25%) に準ずる値となった。

表1. 従来法とBa/Zn法の比較

Geno-type	N	従来法		Ba/Zn法	
		Mean±SD	Range	Mean±SD	Range
GG/GG	112	33.3±13.7	8.5-79.3	55.1±20.3	15.4-106.9
GG/AA	70	20.1±6.7	10.2-42.3	36.6±9.8	20.9-61.1
AA/AA	70	4.5±1.7	1.2-10.2	11.8±3.4	6.4-21.4
Pompe	18	0.77±0.75	0-2.8	3.4±1.3	0.9-5.9

(単位 : pmol/h/disk)

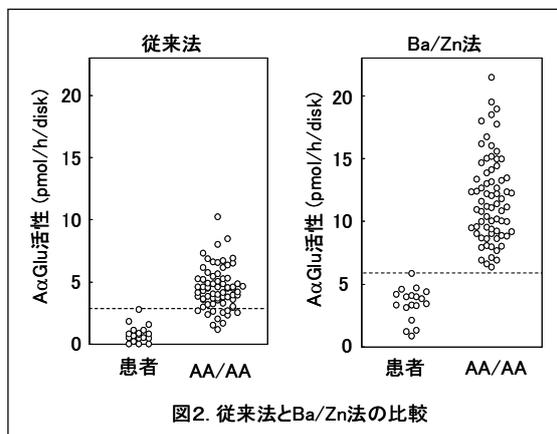


図2. 従来法とBa/Zn法の比較

(2) 化学シャペロンの作用機序に関する研究

II型糖尿病患者から同定された40種類の変異酵素cDNAが組み込まれた発現コンストラクトをCOS-7細胞に導入し、NB-DNJの存在下で3~4日間培養し、酵素活性の変化を調べたところ、40例中13例(約33%)において細胞内AaGlu活性の上昇が認められた。ウエスタンブロッティングの結果、それらの変異酵素のプロセッシングは正常化していた。プロテアソームの阻害剤であるM132の存在下で、同様にCOS-7細胞を培養したところ、40例中4例において活性上昇が認められた。この4例は何れもNB-DNJにより活性上昇するものであった。MG132のみで活性上昇を示すものは認められなかった。また、NB-DNJはin vitroにおいても変異酵素の熱安定性の低下を是正することが示された。以上のことから、NB-DNJは化学シャペロンとして複数の変異酵素に対して、細胞内プロセッシングを正常化することで細胞内残存活性を回復させることが示唆された。また、多くの変異酵素の処理にはユビキチン/プロテアソーム系(ERAD)のみならず、それ以外の細胞内蛋白質品質管理機構が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Shigeto S, Katafuchi T, Okada O, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FV, Reuser AJ, Okumiya T. Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid  $\alpha$ -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. Mol. Genet. Metab. (2011) in press(査読有).

② 重藤翔平, 片渕達也, 隈元慎吾, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可. ポンペ病新生児スクリーニングにおける日本人固有の遺伝子多型の影響とその回避策の検討. 日本臨床化学会九州支部会誌 20 (2010) 31-35(査読無).

③ Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, Kroos MA, Reuser AJ, Okumiya T. High frequency of acid  $\alpha$ -glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. Mol Genet Metab 97 (2009) 190-195(査読有).

[学会発表] (計13件)

① 岡田侑也, 重藤翔平, 奥宮敏可「ポンペ病の酵素診断に影響するアジア人固有の遺伝子多型の解析」第22回日本臨床化学会九州支部総会(福岡市:九州大学以外部百年講堂), 2011年2月12日.

② 岡田侑也, 片渕達也, 奥宮敏可「変異蛋白質に対する化学シャペロンの効果に関する解析」第22回日本臨床化学会九州支部総会(福岡市:九州大学百年講堂), 2011年2月12日.

③ 重藤翔平, 岡田侑也, 熊谷エツ子, 奥宮敏可「II型糖原病の酵素診断におけるアジア人固有の遺伝子多型の影響」第45回九州医学検査学会(別府市:別府ビーコンプラザ), 2010年9月11日.

④ 岡田侑也, 重藤翔平, 熊谷エツ子, 奥宮敏可「血液濾紙を用いたII型糖原病のための早期診断法」第45回九州医学検査学会(別府市:別府ビーコンプラザ), 2010年9月11日.

⑤ 重藤翔平, 片渕達也, 隈元慎吾, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可「ポンペ病新生児スクリーニングにおける日本人固有の遺伝子多型の影響とその回避策の検討」第21回日本臨床化学会九州支部総会(福岡市:九州大学コ

ラポステーション1), 2010年2月13日.

- ⑥ 片瀨達也, 奥宮敏可「変異酵素に対する化学シャペロンの効果と細胞内における蛋白質の品質管理機構」第49回日本臨床化学学会年次学術集会(長崎市:長崎大学大学院医歯薬総合研究科), 2009年9月18日.
- ⑦ 重藤翔平, 片瀨達也, 隈元慎吾, 遠藤文夫, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可「ポンペ病の酵素診断に影響する酸性 $\alpha$ グルコシダーゼ遺伝子多型の解析」第4回日本臨床検査学教育学会学術学会(東京都:東京医科歯科大学), 2009年8月20日.
- ⑧ 片瀨達也, 隈元慎吾, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥山虎之, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可「血液濾紙を用いたポンペ病マスキリング法の開発 第2報:日本人に固有の遺伝子多型の影響」第50回日本先天代謝異常学会総会(米子市:米子コンベンションセンター), 2008年11月6日.
- ⑨ 隈元慎吾, 片瀨達也, 中村公俊, 遠藤文夫, 奥山虎之, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可「血液濾紙を用いたポンペ病マスキリング法の開発 第1報:酵素活性測定のための基礎検討」第50回日本先天代謝異常学会総会(米子市:米子コンベンションセンター), 2008年11月6日.
- ⑩ 片瀨達也, 隈元慎吾, 中村公俊, 遠藤文夫, Arnold JJ Reuser, 奥宮敏可「ポンペ病に対する新生児マスキリング法開発のための基礎検討」第3回日本臨床検査学教育学会(福岡市:九州大学医学部百年講堂), 2008年8月21日.
- ⑪ 奥宮敏可, Otto P Van Diggelen, Arnold JJ Reuser「アカルボースによる干涉酵素阻害を基本原理とする白血球中酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の特異的測定法」第49回日本先天代謝異常学会総会(山形市:山形テルサ), 2007年11月16日.
- ⑫ 奥宮敏可, Marian A Kroos, Arnold JJ Reuser「ポンペ病に対する化学シャペロン療法分子基盤:NB-DNJは変異酵素の細胞内プロセッシングを正常化する」第49回日本先天代謝異常学会総会(山形市:山形テルサ), 2007年11月16日.
- ⑬ 奥宮敏可, Marian A Kroos, Arnold JJ Reuser「細胞内における変異蛋白質の運命を変える化学シャペロンの分子基盤:NB-DNJはポンペ病由来の変異酵素の細胞内プロセッシングを正常化する」第2回日本

臨床検査学教育学会(高松市:香川県県民ホール), 2007年8月27日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥宮 敏可 (OKUMIYA TOSHIKA)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号:50284435

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

棚瀬 純男 (TANASE SUMIO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号:20112401

桜庭 均 (SAKURABA HITOSHI)

明治薬科大学・教授  
研究者番号:60114493

### (4) 研究協力者

Arnold JJ Reuser  
オランダ王国・エラスムス大学臨床遺伝学  
講座・准教授