

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19637

研究課題名(和文) ファブリー病末梢神経症状の発症にTRPチャンネルは関与するか？

研究課題名(英文) Improvement of peripheral neuropathy by Adeno-associated virus vector expressing α -galactosidase A in murine Fabry model

研究代表者

樋口 孝 (HIGUCHI, TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30595327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ファブリー病モデルマウスを用いたファブリー病末梢神経症状解析を行った。末梢神経症状の発症はTRP類の発現増加が関与するという既報があるが、予想に反し同モデルマウスは疼痛症状を示す事はなく高温感覚に鈍麻症状を示した。後根神経節のTrp類mRNAの発現レベルは正常マウスと同程度だった。後根神経節には多数の年輪状顆粒が観察できたが、小径神経細胞の脱落は観察できなかった。ファブリー病末梢神経症状の発生はTRP類の発現異常の関与が疑われるが、モデルマウスでは末梢神経症状を忠実に再現することが難しく、TRP類と末梢神経症状の関係性は明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：Anderson-Fabry disease (FD) is a lysosomal storage disorder caused by mutation of the α -galactosidase A (GLA) gene. Many FD patients have peripheral neuropathy in the childhoods. This is caused by accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) in dorsal root ganglia (DRG). FD murine model expressed Trpv1 mRNA. The express level was same level as wild-type (WT) mice. Unexpectedly, FD mouse did not show pain symptoms in this experiment. FD mouse showed hyposensitivity to the hot-plate test compare to WT mouse. There were many myelin-like granules in the cytosol of FD DRG neuron. However there was not detected in the axon. It was difficult to observe "patient-like" peripheral neuropathy in this murine model. Our data could not clear the relationship between TRPs and peripheral nerve symptoms.

研究分野：先天性代謝異常症

キーワード：アンダーソン・ファブリー病 末梢神経症状 痛み

1. 研究開始当初の背景

【ファブリー病と末梢神経症状】

ファブリー病はライソゾーム病の一種で、ガラクトシダーゼ A (Galactosidase A alpha, GLA) 遺伝子の異常を病因とするスフィンゴ糖脂質の代謝異常症である。GLA はスフィンゴ脂質 (Globotriaosylceramide, Gb3) を分解する酵素であり、その活性低下によって全身の細胞や組織に Gb3 が過剰に蓄積し様々な臨床症状を誘発する。ファブリー病の代表的臨床症状は末梢神経症状で、強烈な灼熱痛 (Fabry pain crisis) などの症状が出現する。この症状は小児期～若年成人期のいわゆる AYA (Adolescent and Young Adult) 世代のファブリー病患者の多くに出現し、患児の学級活動や進学、患者の就業や社会生活に少なからず影響を与える。

近年ファブリー病の治療方法として、GLA 蛋白質の酵素補充療法 (Enzyme Replacement Therapy, ERT) が広く行われている。しかしファブリー病末梢神経障害に対する ERT の効果は限定的だと言われている。ファブリー病末梢神経症状を改善する目的で Na⁺チャンネルを阻害する抗てんかん薬 (カルバマゼピン、フェニトイン) や GABA 誘導體薬 (ガバペンチン) などが用いられ一定の効果を得る事が出来るが、副反応 (薬剤性過敏症候群など) の出現や妊娠・出産などで服薬できない患者さんも多く存在する。

以上の事からファブリー病末梢神経症状の発症メカニズムを明らかにし、その治療方法を確立することは急務であり、本研究分野は患者 QOL を向上させるために非常に重要であると考えられる。

【ファブリー病疾患モデルマウスを用いた末梢神経症状の解析】

ヒトファブリー病患者あるいはファブリー病疾患モデルマウスを用いてファブリー病末梢神経症状を詳細に解析した研究例は少ない。モデルマウスを用いた研究では、本疾患モデルマウスは温度感覚異常症状を示すとの報告が複数存在する。また同マウス坐骨神経等に Gb3 の蓄積と小径線維の脱落が観察されており、それらが末梢神経の感覚異常に関与するのではないかと推測されている。しかし未だその末梢神経症状の詳細な発症メカニズムは不明であり、ファブリー病末梢神経症状の治療戦略の推進のためにその解明が望まれる。

2. 研究の目的

ファブリー病は GLA 遺伝子異常を病因とす

る遺伝病である。ファブリー病の症状の一つに末梢神経症状があるが、その病態メカニズムは不明で GLA 酵素補充療法の有効性も限定的だと言われている。ファブリー病疾患モデルマウスが温度感覚異常を示すことから、温度センサー TRP (transient receptor potential cation channel) チャンネルの発現異常を疑う報告がある。モデルマウス由来のサンプルを用いて TRP 類などの遺伝子発現解析を行い、ファブリー病末梢神経症状の病態メカニズムの一端を解明することを目的とした。

我々は酸 (H⁺) や機械刺激等の感覚受容センサーであり、かつ温度センサーでもある Ca²⁺ チャンネル: Trpv1 (TRP subfamily V member 1, カプサイシン受容体) などに着目し、マウス行動学的解析、病理学的解析、遺伝子発現解析などを行った。

3. 研究の方法

Hot-plate 温度感覚試験: マウスを試験空間に馴らした後 52 ホットプレートに置き、忌避行動を起こすまでの時間 (潜時、秒) を測定した。カットオフ秒は 30 秒とした。

von Frey filament up-down 試験: マウスを試験空間に馴らした後マウス右後ろ足裏をフィラメントで刺激し圧痛覚 (グラム) を測定した。

安楽死させたファブリー病疾患モデルマウス及び正常コントロールマウス (C57BL/6J) の腰椎領域 (L1~L5) から実体顕微鏡下で後根神経節 (Dorsal Root Ganglion, DRG) を摘出した。

RNA 発現解析: RNA サンプルは PCR Arrays システムを用いて逆転写した後 qPCR 法にて解析した。

Gb3 蓄積解析: 組織ホモジネートサンプルからクロロホルム:メタノール抽出液で脂質抽出した後 HPLC-MS/MS で Gb3 を定量した。

GLA 酵素活性解析: 組織ホモジネートサンプルに 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) 蛍光人工基質 (4-Methylumbelliferyl-β-D-Galactopyranoside) を加えて 37 °C で反応させ、遊離した 4MU を蛍光光度計で測定 (励起波長_{ex}=355 nm、測定波長_{em}=460 nm) した。

4. 研究成果

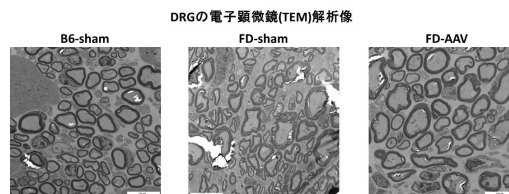
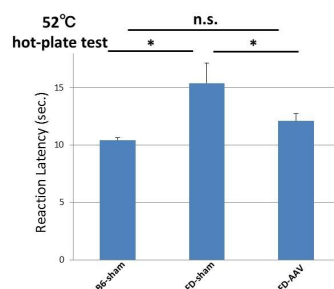
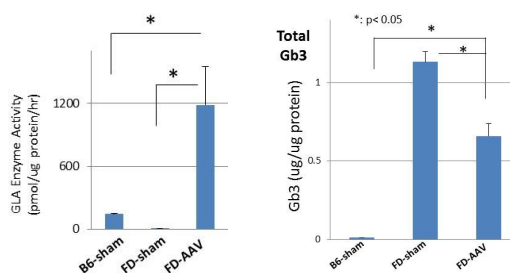
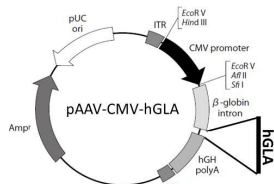
ファブリー病患者では灼熱痛症状が出現する。そこでファブリー病モデルマウスの

末梢神経症状を確認する目的で Hot-plate 温度感覚試験を行った。成獣ファブリー病疾患モデルマウスは正常マウスよりも温度感覚鈍麻症状を示した。この結果は予想に反するものであった。ファブリー病疼痛症状に対する欠質 GLA 酵素の補充療法の効果は限定的である。そこで hGLA 遺伝子を搭載した AAV ベクターを構築してファブリー病疾患モデルマウスに遺伝子治療を試みた。その結果 DRG の GLA 酵素活性値は上昇し、その結果温度感覚鈍麻症状が正常マウス群と同レベルまで回復した。

ファブリー病は学童期頃から灼熱痛が出現し 20 歳代でピークを迎え、その後痛みは減少すると言われている。このことから既に成獣ファブリー病疾患モデルマウスは疼痛症状を持たず、むしろ小径神経細胞の脱落などで感覚鈍麻症状が起きていると考えた。そこでマウス離乳後早期は疼痛症状が出現していると予測し成熟前(6 週齢)の同モデルマウスに von Frey filament up-down 試験を行った。その結果フィラメントによる圧痛覚に感覚鈍麻症状を示した。病理学的解析を行ったが小径神経細胞の脱落は明らかにできなかった。以上の結果からファブリー病疾患モデルマウスは離乳後早期から末梢神経症状を持ち、特に知覚に対して鈍麻症状を示す事が分かった。

海外研究グループによるファブリー病疾患モデルマウスの末梢神経症状を解析した報告が複数存在する。同モデルマウスは痛覚過敏症状を示し治療によってその症状が回復するという報告と、逆に痛覚鈍麻症状を示し治療によってその症状が回復するという報告があり意見が分かれていた。我々の解析結果は後者で、感覚鈍麻症状を支持するものであった。ファブリー病疾患モデルマウスの末梢神経症状において様々な知見が存在する。このモデルマウスが何らかの末梢神経症状を持つと推測できるが、その具体的な表現型の評価と発症メカニズムの解明は今後の更なる解析が必要だと考える。

DRG の電子顕微鏡解析を行ったところ、モデルマウス DRG 近傍シュワン細胞の年輪様構造に乱れが観察されたので、シュワン細胞の機能異常を考えた。同モデルマウス初代培養シュワン細胞の Ca^{2+} イオン挙動を解析したが、正常マウスと差はなかった。培養シュワン細胞を用いて RNA 発現解析を行った所、僅かに TrpV1 mRNA の遺伝子発現の低下が確認できたが有意な差は認められなかった。現在、初代培養 DRG 神経細胞を用いた遺伝子発現解析を行っている。



5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

〔雑誌論文〕
【該当なし】

〔学会発表〕(計4件)
【2015年度】
【該当なし】

【2016年度】
Treatment for Anderson-Fabry Disease Peripheral Neuropathy with Adeno-Associated Virus Vector Encoded human alpha-Galactosidase A gene in Murine Fabry Disease Model
Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), 2016, Rome, Italy

Treatment for Fabry peripheral neuropathy with Adeno-Associated Virus Vector in Murine Fabry Disease Model
Japan Society of Gene and Cell Therapy (JSGCT), 2016, Tokyo, Japan

【2017年度】
Improvement of peripheral neuropathy

in murine Fabry model by intrathecal administration of serotype 9 Adeno-associated virus vector expressing -galactosidase A
Japan Society of Gene and Cell Therapy (JSGCT), 2017, Okayama, Japan

Therapeutic strategy for Fabry disease peripheral neuropathy with rAAV vector
Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), 2017, Kawagoe, Japan

〔図書〕
【該当なし】

〔産業財産権〕
【該当なし】

〔その他〕
東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センターホームページ
<http://www.jikei.ac.jp/academic/center.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・樋口 孝 (HIGUCHI, Takashi)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：30595327

(2) 研究分担者

【該当なし】

(3) 連携研究者

【該当なし】

(4) 研究協力者

・大橋 十也 (OHASHI, Toya)
・小林 博司 (KOBAYASHI, Hiroshi)
・嶋田 洋太 (SHIMADA, Yohta)