

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09514

研究課題名(和文) Fabry病の新規 ガラクトシダーゼ遺伝子変異による酵素の生体内動態に関する研究

研究課題名(英文) The biokinetics of the enzyme by a novel alpha-galactosidase gene mutation in Fabry disease

研究代表者

樋口 公嗣 (Higuchi, Koji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：90448580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血漿中酵素活性は正常で、白血球中酵素活性は低下しているファブリー病症例で、-gal A遺伝子変異はミスセンス変異であった。この変異をレンチウイルスベクターを用いて、HeLa細胞で過剰発現させ、培養上清中では -gal A酵素活性が上昇したが、白血球中つまり細胞内の酵素活性は上昇せず、臨床上の事象を再現することができた。この変異は、アミノ酸は中性から酸性アミノ酸へ置換されている。このアミノ酸置換が塩基性アミノ酸に置換された場合では同様の事象は認めず、この変異とは異なる酸性アミノ酸への変異では同様の現象が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファブリー病の原因となる ガラクトシダーゼ酵素活性の低下は、ガラクトシダーゼ酵素の遺伝的変異によっておこることが知られている。本症例で認められた ガラクトシダーゼ酵素の遺伝子変異では、血漿酵素活性は正常であるが、白血球中の酵素活性が低下していることが分かった。ガラクトシダーゼ酵素の生体内動態を解明することにより、この酵素活性の乖離が説明できれば、病態解明や新規治療法の開発につながる事が予想される。

研究成果の概要(英文)：In a case of Fabry disease with normal enzyme activity in plasma and decreased enzyme activity in leukocytes, the -gal A gene mutation was a missense mutation. This mutation was overexpressed in HeLa cells using lentiviral vectors. -gal A enzyme activity was increased in the culture supernatant, but not in the leukocytes or intracellular enzyme activity, reproducing the clinical event. In this mutation, the amino acid was substituted from neutral to acidic amino acid. When this amino acid substitution was replaced with a basic amino acid, the same event was not observed, but when the amino acid was replaced with an acidic amino acid, which is different from this mutation, the same phenomenon was confirmed.

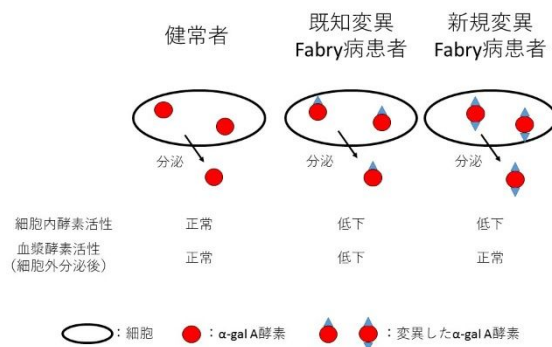
研究分野：循環器内科

キーワード：ファブリー病

1. 研究開始当初の背景

当講座には、左室肥大や左室機能障害を認め心 Fabry 病が疑われる症例が紹介され、 α -gal A 酵素活性の測定や α -gal A 遺伝子解析を行っている。その中で、Fabry 病が疑われた症例の血漿中酵素活性は正常であったが、白血球中酵素活性は低下している症例に遭遇した。確定診断のために α -gal A 遺伝子解析を行い、いまだに報告のない遺伝子変異を認め Fabry 病の診断に至った。図 1 のように健常者では細胞内で作られた α -gal A 酵素は細胞外に分泌され血漿中でも酵素活性を持つ。一方、これまで知られている Fabry 病患者では、遺伝子変異によりつくられた α -gal A 酵素は遺伝子変異による蛋白構造変化などにより細胞内での酵素活性の低下を認め、分泌後も酵素活性の低下が認められる。しかし、本症例では、細胞内で作られた α -gal A 酵素活性は低下しているが、細胞外へ分泌後は α -gal A 酵素活性は正常となる。このため、現在行われている診断のための血漿 α -gal A 酵素活性では本症を見逃すこととなる。この現象を解明することにより本症の診断漏れをなくすとともに、本遺伝子変異に対する新規治療法の開発となることが期待されるため本研究を立案した。

図 1. 酵素活性イメージ図



2. 研究の目的

本研究の目的は、ある遺伝子変異の Fabry 病では、血漿中酵素活性は正常であるが細胞内の酵素活性は低下している機序を解明することを目的とする。Fabry 病は α -galactosidase A (α -gal A) 酵素活性の欠損・低下によって全身への基質の蓄積により引き起こされる。これまで、Fabry 病の診断には血漿中または白血球中の α -gal A 酵素活性を測定し診断していたが、この変異では血漿中酵素活性が正常となり、血漿中酵素活性では誤診する可能性がある。この変異による酵素の生体内動態を解明することにより、Fabry 病のみならず、他のリソソーム病の酵素の生体内動態の解明につながる可能性がある。

3. 研究の方法

先に述べた血漿中 α -gal A 酵素活性は正常であったが、白血球中 α -gal A 酵素活性は低下している症例の α -gal A 遺伝子変異は一塩基置換されたもので、この置換により異なるアミノ酸となるミスセンス変異であった。この変異を α -gal A-mut と名付けた。

さらに、この現象に対して細胞内である蛋白が α -gal A に結合することで、酵素活性の低下が起きていると仮説をたてた。この未知の蛋白の同定のために His-Tag を付加した α -gal A および α -gal A-mut をレンチウイルスベクターで作製し HeLa 細胞に感染させ、クロマトグラフィーにて His-Tag の付加された α -gal A および α -gal A-mut 蛋白を回収した。回収物中に α -gal A と α -gal A-mut で異なるバンドが存在しており、これが未知の蛋白であり α -gal A に結合し酵素活性を低下させる可能性があると考えた。質量分析法にてこの未知の蛋白を GRP78 と同定することができた。CRISPR-Cas9 システムを利用して完全に GRP78 をノックアウトした線維芽細胞に α -gal A-mut 遺伝子を導入し、遺伝子導入された細胞内および培養上清中の α -gal A 活性を測定する。この方法により細胞内 α -gal A 活性の改善が期待される。 α -gal A-mut での変異はアミノ酸の置換が起こるミスセンス変異であったが、アミノ酸は中性から酸性アミノ酸へ置換されている。このアミノ酸置換が塩基性アミノ酸に置換された場合 (α -gal A-mut2) や α -gal A-mut とは違う酸性アミノ酸への置換 (α -gal A-mut3) では、血漿中や細胞内での α -gal A 酵素活性はどうなるか不明であり、 α -gal A 酵素の動態を確認するためにも本研究内で確認する。つまり、血漿中と細胞内の酵素活性の乖離がアミノ酸の極性に起因するのかを解明する。

さらに、この変異 (α -gal A-mut) を持ったマウス (α -gal A-mut マウス) を作製することにより、生体内の α -gal A 酵素の生体内分布の評価が容易となる。 α -gal A-mut マウスの血漿

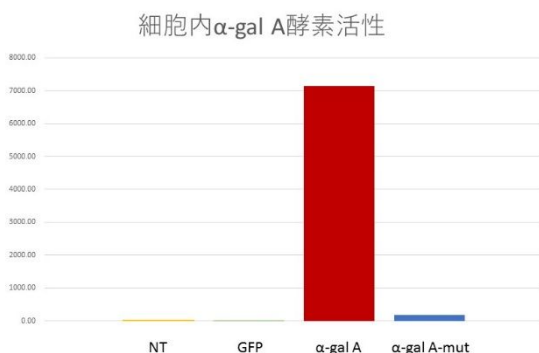
や Fabry 病での生命予後にかかわる心臓・腎臓・脳などの諸臓器での α -gal A 酵素活性を分析して *in vivo* でも細胞内と細胞外での酵素活性の乖離を認められるか確認する。

4. 研究成果

レンチウイルスベクターを用いて α -gal A と α -gal A-mut を HeLa 細胞で過剰発現させ、*in vitro* で同様の現象が観察されるか確認した。その結果、培養上清中では、 α -gal A 酵素活性は α -gal A および α -gal A-mut とともに上昇していたが、白血球中つまり細胞内の α -gal A 酵素活性は α -gal A では上昇していたが、 α -gal A-mut では上昇せず、臨床的に起きている事象を再現することができた (図 2)。 α -gal A-mut での変異は先述したようにアミノ酸の置換が起こるミスセンス変異であったが、アミノ酸は中性から酸性アミノ酸へ置換されている。このアミノ酸置換が塩基性アミノ酸に置換された場合 (α -gal A-mut2) や α -gal A-mut とは違う酸性アミノ酸への置換 (α -gal A-mut3) では、血漿中や細胞内での α -gal A 酵素活性はどうか不明であり、 α -gal A 酵素の動態を確認するため、 α -gal A-mut2 および α -gal A-mut3 変異体のレンチウイルスベクターの作製を行った。このベクターでの *in vitro* 実験では、酸性アミノ酸への変異では同様の現象が確認されたが、塩基性アミノ酸への置換では認められなかった。

In vivo 実験までは今回進むことができそのほかの阻害蛋白の同定などの研究を引き続き行い α -gal A 酵素の動態を解明していきたい。

図 2 細胞内酵素活性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉満 誠 (Yoshimitsu Makoto) (70404530)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関