

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08394

研究課題名(和文) Werner症候群におけるアデノシンデアミナーゼアイソザイム –炎症の視点から

研究課題名(英文) Adenosine deaminase isoenzymes in Werner syndrome

研究代表者

江川 祥子(岩城祥子)(Iwaki-Egawa, Sachiko)

北海道科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40192504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な遺伝性早老症であるWerner症候群(WS)の病態は、慢性炎症を基盤とすることが示唆されている。一方、プリンヌクレオチドの代謝酵素であるアデノシンデアミナーゼ(ADA)にはADA1とADA2の2つのアイソザイムが存在し、特にADA2は炎症性疾患と関与することが知られている。血中ADAアイソザイム活性を測定したところ、健常者ではADA2活性が加齢とともに上昇し、WS患者は高齢者と同じ傾向を示した。これは、炎症マーカーである高感度CRPと同じ挙動を示すものであった。また、ADA2の糖鎖解析を行い、細胞内合成過程で糖鎖が二量体形成および活性発現に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では共に炎症に関与するWSとADA2関連疾患の病態解明に寄与することを目的として、健常人とWS患者の血中ADA活性について比較検討するとともに、ADA2のタンパク質としての機能解析を行った。今回我々が用いた幅広い年齢層(0から100歳)での健常人のADA活性に関する報告はこれまでなされておらず、老化とともにADA2活性が上昇していたことは、inflammaging(炎症性老化)という観点からも新しい知見である。また、ADA2の細胞内での酵素活性発現等に糖鎖が関与することが明らかになったことは、今後のADA2関連疾患の解明にもつながる基礎的データとして意義がある。

研究成果の概要(英文)： The pathophysiology of Werner syndrome (WS), the representative hereditary progeroid syndrome, has been suggested to be based on chronic inflammation. On the other hand, adenosine deaminase (ADA), which is a purine nucleotide metabolizing enzyme, has two isozymes, ADA1 and ADA2, and it is known that ADA2 is particularly involved in inflammatory diseases.

When serum ADA isozymes activities were measured, ADA2 activity increased with aging in healthy subjects, and WS patients showed the same tendency as elderly patients. This showed the same behavior as high-sensitivity CRP, which is an inflammatory marker. In addition, sugar chain analysis of ADA2 revealed that sugar chains are important for dimer formation and activity expression during the intracellular synthesis process.

研究分野：生命科学

キーワード：Werner症候群 アデノシンデアミナーゼ アイソザイム ADA1 ADA2 炎症 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) Werner 症候群と炎症

Werner 症候群 (以下 WS) は、常染色体劣性遺伝形式の代表的な遺伝性早老症であり、これまで世界で約 1,200 症例が報告されているが、その約 8 割が日本人である。第 8 染色体短腕上に存在する RecQ 型の DNA ヘリカーゼ (WRN ヘリカーゼ) のホモ接合体変異が原因とされ、20 歳代以降に早老性毛髪変化、両側性白内障、皮膚の萎縮・硬化、高調性の嚔声、鳥様願望などの老化徴候が出現し、合併症として糖・脂質代謝異常、動脈硬化症、悪性腫瘍などを発症し、平均余命が短いとされている。生化学的な解析により、血中の TNF- α 、アディポネクチン、自己抗体、CRP など、幅広い炎症性タンパク質の異常が報告され、WS の疾患像は、WRN ヘリカーゼ欠損を基盤にした慢性炎症を背景に形成されることが推定されている。

(2) アデノシンデアミナーゼと炎症

アデノシンデアミナーゼ (以下 ADA) はプリンヌクレオチドの分解経路に属する酵素の一つであり、アデノシンをイノシンへ非可逆的に脱アミノ化させる。ADA には二つの主要なアイソザイム ADA1 と ADA2 が存在し、ADA1 の性質は分子・遺伝子レベルで詳細に研究され、本邦初の遺伝子治療が行われている。一般にいう ADA 欠損症は ADA1 の欠損が原因であり、重症複合免疫不全症 (SCID) となることがよく知られている。一方、ヒト血中の全 ADA 酵素活性の約 6~7 割を占める ADA2 については、その酵素活性が HIV 感染症、結核、急性白血病、敗血症、各種肝疾患患者などの血中で上昇することが報告されているが、現象論に終始しその実態については何ら明らかになっていなかった。しかし、2014 年に Zhou Q らと、Elkan PN らのグループが同時に *N Eng J Med* に ADA2 の劣性機能喪失変異が結節性多発動脈炎の原因である可能性を報告し、現在では、ADA2 欠損症は遺伝性自己炎症疾患として難病指定 (No. 325) された。

(3) 本研究立案の背景となる研究実績

代表者らは、ADA2 を世界ではじめて精製することに成功し (ニワトリ)、ADA2 酵素活性測定法を改良するとともに本酵素がダイマーとして機能することを明らかにしている。さらに近年、代表者らはわが国における ADA2 欠損症患者について得られた知見を報告している。またこれとは別に、inflammaging<炎症 (inflammation) +老化 (aging)>という炎症と老化がきわめて密接な関係にあるという考えの基に、WS 患者と健常人の血中に存在する炎症性タンパク質について研究を行い、WS の病態が慢性炎症を基盤にして形成されていることを報告してきた (*Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004, *BioSci Trends* 2012 など原著 12 報)。

以上の背景のもと、代表者らは WS 患者血中の ADA 動態に興味を抱き、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

これまで WS 患者においては核酸代謝という視点で ADA が調べられたことはあるものの、その当時は ADA のアイソザイム研究が進んでいなかった。本研究では、WS 患者の血中 ADA に関してアイソザイムという視点を加えて解析するとともに、糖鎖修飾が ADA2 の機能 (酵素活性や分泌) に及ぼす影響を研究することで、共に炎症に関与する WS と ADA2 欠損症の病態解明、および老化機構解明への一助とすることを目的とした。

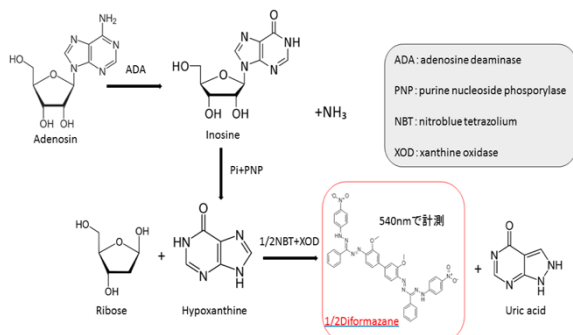
3. 研究の方法

(1) 対象

特別な既往歴がなく、薬物投与されていない 0~100 歳 157 名 (男性: 68 人、女性: 89 人) を健常者とした。また、WS 患者は、WS として確定診断を受けている 32~70 歳までの 24 名 (男性: 16 人、女性: 8 人) を対象とし、健常者、WS 患者の血漿はともに共同研究者である後藤眞博士の後藤コレクションから分与された。いずれの検体も (未成年者は家族から) インフォームドコンセントを得て採取されたものであり、本研究は倫理委員会の認可を得ている。血漿は使用まで -80°C または -30°C で保存した。

(2) ADA 活性測定

ADA の反応経路であるサルベージ経路に従い、96 穴マイクロプレートを用いて ADA 活性を測定した。血漿 10 μ L を、0.1U/mL XOD、0.24U/mL PNP、0.1mM NBT、20mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 緩衝液（以下 KPB）（pH6.5）を含む反応液に加え、37 $^{\circ}C$ 、5 分間プレインキュベーションした後、終濃度 3mM となるようにアデノシンを加え反応を開始した（反応液全量:200 μ L）。37 $^{\circ}C$ 、1 時間反応後、50%酢酸 50 μ L を加え反応を停止させ、生じた diformazan の吸光度を 540nm



の波長で、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad、model 680）により測定した（図 1）。Diformazan の吸光係数として 36 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ を使用し、1U=1 diformazan μ mole/min/mL と規定した。

ADA2 活性と全 ADA 活性は、各々 ADA1 の特異的阻害剤である EHNA の添加と非添加時の活性を測定し求めた。また ADA1 活性は、全 ADA 活性から ADA2 活性を差し引いて算出した。

図 1 ADA 活性測定原理

(3) ADA2 の糖鎖修飾阻害

HEK293 細胞に、WT-ADA2 と、ADA2 欠損症に関連する一部の mut-ADA2 をクローニングして C 末端に 3xFLAG tag を付加した発現ベクターをトランスフェクションし、cell lysate を調整するとともに、培養上清から分泌型 ADA2-3xFLAG を単離精製した。糖鎖修飾部位の確認は、PNGaseF、EndoH で糖鎖を切断し、Western blotting で解析した。また、小胞体ストレスを誘導し N 型糖鎖の付加を阻害するツニカマイシン (TM) を用いて、糖鎖修飾阻害の影響の有無を解析した。なお Western blotting に用いた抗 ADA2 抗体は、代表者らの研究室で作成したものである。

(4) ADA2 の二量体形成解析

正常 ADA2 (TM 処理 +/-)、および変異体を発現させた HEK293 細胞の cell lysate をゲルろ過クロマトグラフィーで分画した後、各フラクションでの ADA2 の分布を Western blotting で解析し、また ADA2 酵素活性も測定した。

4. 研究成果

(1) 健常人の ADA 活性

0~100 歳までの健常人 157 名の全 ADA 活性、ADA1 活性、ADA2 活性を測定した。その結果、健常人を年齢ごとに若年層 (0~29 歳)、中年層 (30 歳~69 歳)、老年層 (70 歳~100 歳) の 3 群に分け、マン・ホイットニー検定 (信頼区間 95%) を用いた群間比較した。なお、いずれの活性も男女間では年代にかかわらず有意差はなかった。

全 ADA 活性は、全年齢層間で有意差が見られた。ただ若年層の中では、0 歳代 (0~9 歳) の活性が低値傾向だった (図 2)。一方、ADA1 活性は全年齢層間で有意差はなく、年代によって活性の差は見られなかった (data not shown)。ADA2 活性は、全年齢層間で有意差が見られ、若年層と老年層が中年層よりも活性が高く、特に老年層では年齢上昇に伴い、ADA2 活性も上昇した。ただ若年層の中では、0 歳代 (0~9 歳) の活性が低値であった (図 3)。

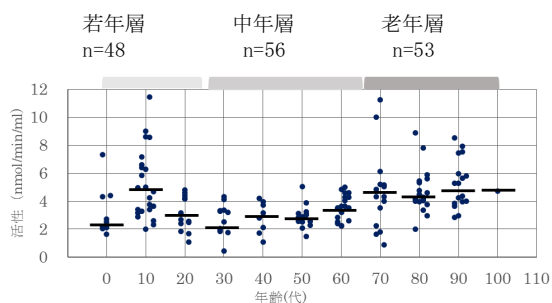


図 2 健常人の全 ADA 活性

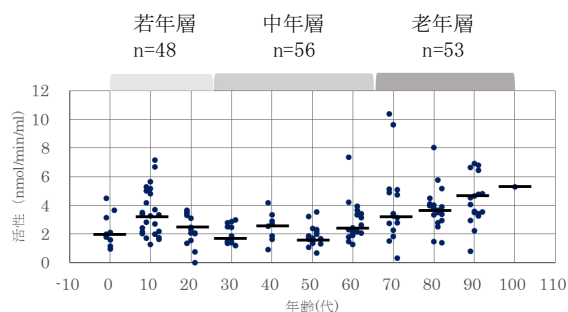


図 3 健常人の ADA2 活性

(2) WS 患者の ADA 活性

WS 患者は 70 歳の 1 名を例外として、すべて健常人の中年層と同じ年齢層であった。しかし、全 ADA 活性と ADA2 活性は、健常人と比較したところ、中年層とは有意差が見られ、逆に老年層とは有意差が見られなかった。これはすでに我々が報告しているように、WS 患者では炎症マーカーである高感度 CRP 値と同じような挙動を示すことと一致する。

また、今回の研究に用いた幅広い年齢層での健常人の ADA 活性に関する報告はこれまでなされておらず、老化とともに ADA2 活性が上昇することは興味深い知見である。今後、すでに測定してある炎症性マーカーや各種サイトカインも含めて、ADA との相関性等などについて解析し、WS や ADA 関連疾患、老化と炎症について明らかにしていく予定である。

(3) ADA2 の糖鎖修飾阻害

HEK293 細胞に ADA2-3xFLAG 発現ベクターをトランスフェクションし、cell lysate を調製し、培養上清から分泌 ADA2-3xFLAG を単離精製した。それぞれ PNGase F、Endo H で糖鎖を切断し、Western blotting で解析すると、PNGase F 処理ではいずれも 55 kDa 付近にシングルバンドが観察されたが、Endo H 処理では異なるバンドパターンが観察された。この結果から、分泌 ADA2 は Endo H 耐性の成熟型糖鎖で修飾されていることが示唆された。

一方、TM 処理では細胞外の ADA2 が観察されなかった。また、TM 処理により細胞内 ADA2 活性は顕著に低下した。N 型糖鎖結合部位の変異体 (4 種類) についても、分泌が正常 ADA2 に比べて減少した。細胞内 ADA2 活性は正常に比べて低い傾向が見られたが、完全に活性を消失した変異体はなかった。

(4) 糖鎖修飾阻害時の細胞内 ADA2 の二量体形成

正常 ADA2 (TM 処理 +/-)、変異体 (4 種類) を発現させた HEK293 細胞の cell lysate をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、Western blotting で各フラクションでの ADA2 の分布を調べた。正常 ADA2 は二量体相当の分子量を示すフラクションでバンド強度が最も強かったが、変異体および TM 処理後の cell lysate では、大部分が高分子量側 (凝集体) で観察された。これらの結果から、N 型糖鎖修飾が細胞内における ADA2 の二量体形成に必要であることが示唆された。また、ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した cell lysate の ADA2 活性を測定した結果、二量体相当の分子量を示すフラクションで最も活性が高く、このフラクションでは変異体でも活性が検出された。しかし、正常 (TM +/-)、変異体いずれも、凝集体では活性が消失していた。

なお、培養上清から単離精製した分泌型 ADA2 は、グリコシダーゼにより完全に糖鎖を分解した後も酵素活性には変化がなく、二量体構造を保持していた。

以上より、ADA2 の細胞内合成過程で糖鎖は二量体形成および活性発現に重要である一方、分泌後はいずれにも影響しないことが明らかになった。これらの結果は、今後、ADA2 の機能を解明していく上での重要な基礎データとなりうる。

(5) ADA2 定量法の開発

海外で一部 ADA2 定量キット (ELISA) が販売されてはいるものの、測定結果には再現性がなく実用化には適さず、ADA2 は遺伝学的検査以外ではもっぱら酵素活性を測定して解析されている。代表者らはすでにヒト ADA2 のペプチド抗体を 3 種類作成し、Western blotting で本抗体はヒト血中より精製した ADA2 やリコンビナント ADA2 とともに反応することを確認している。しかし、本抗体を用いたサンドイッチ型 ELISA 法では原因は不明であるが、全く反応しなかった。そこで当初の実験計画では、ADA2 がヘパリンに結合する性質をもちいて、低分子ヘパリンを結合させたマイクロプレートを作成し、ADA2 の ELISA 法による定量法を開発する予定であった。しかしながら、各種実験条件を検討したものの、未だ開発には至っておらず、また新型コロナウイルス感染症蔓延の影響により 2020 年度は研究に著しい遅れが生じた。本件については、今後も引き続き検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江川（岩城）祥子、富所 拓、伊藤 萌子、後藤 眞、渡辺 泰裕
2. 発表標題 Werner症候群におけるアデノシンデアミナーゼアイソザイム
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 萌生、白井 瑠奈、伊藤 萌子、渡辺 泰裕、江川（岩城）祥子
2. 発表標題 疾患原性変異型ADA2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤萌子, 中江雄星, 大野彩美, 渡辺泰裕, 江川(岩城)祥子
2. 発表標題 アデノシンデアミナーゼ2の活性発現における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前島優子, 西村知貴, 伊藤萌子, 江川（岩城）祥子
2. 発表標題 アデノシンデアミナーゼ2の二量体形成における糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第148回日本薬学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

〔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	伊藤 萌子 (Ito Moeko) (60711827)	北海道科学大学・薬学部・講師 (30108)	

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
---------	---------