

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15071

研究課題名（和文）ファブリー病のミスセンス変異と機能的多型の分子病態の解析と診断への応用

研究課題名（英文）Comparison of GLA variants of unknown significance and the specific mutations causing moderate Fabry disease

研究代表者

月村 考宏 (Tsukimura, Takahiro)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50632783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ファブリー病は、酵素 -ガラクトシダーゼA (GLA) をコードする遺伝子に異常があることにより発症する遺伝病です。しかし、GLA遺伝子に異常があるにもかかわらずファブリー病にならない遺伝子変異があるため、病気になる遺伝子変異と何が違うのか蛋白質レベルで比べることで、その原因の解明を目指しました。その結果、病気になる遺伝子変異によって作られるGLA蛋白質は病気になる遺伝子変異によって作られるGLA蛋白質に比べて、細胞の中で安定であることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファブリー病の診断において、新しいGLA遺伝子変異が見つかった場合、それが病気を引き起こす遺伝子変異であるか否かの判断が難しいことがあり、臨床現場で問題となっています。今回の研究成果は、ファブリー病のメカニズムの一部を明らかにしたとともに、新しい遺伝子変異が見つかった場合に病気を引き起こす遺伝子変異であるか判断するための有益な参考情報になると考えられます。

研究成果の概要（英文）：Fabry disease is caused by mutation of GLA gene, leading to deficiency of -galactosidase A activity. In this study, we compared functional polymorphisms with mutations leading to later-onset Fabry disease. The stability of GLA proteins of functional polymorphism was more stable than those of mutation with later-onset at neutral pH condition.

研究分野：生化学

キーワード：ライソゾーム病 遺伝子変異 臨床表現型

## 1. 研究開始当初の背景

ファブリー病は、リソソーム性加水分解酵素である  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異により GLA 活性が顕著に低下し、その基質である糖脂質が蓄積する X 染色体性の遺伝病で、難病に指定されている。ファブリー病患者は、臨床症状から古典型男性患者、遅発型男性患者、ヘテロ接合体女性患者の 3 つに分類される。古典型男性患者は、少年期から低汗症や四肢疼痛等を、壮年期以降に心障害、腎障害や脳血管障害を起こす。遅発型男性患者は、少年期の症状が無く、壮年期以降に心障害、腎障害や脳血管障害を起こす。ヘテロ接合体女性患者は、X 染色体のランダムな不活化により、古典型男性患者と同様の症状を示す患者からほとんど臨床症状を示さない患者までおり、臨床症状は多様である。このように、ファブリー病患者は特徴的な臨床症状を示さないため、臨床症状から診断することが非常に難しく、診断の際はファブリー病特異の検査 (GLA 活性、GLA 遺伝子解析、蓄積物質の解析等) を行うことが必要である。ファブリー病の治療薬が承認されたことにより、近年、新生児スクリーニングやハイリスクスクリーニングなどが日本を含めた世界中で実施されるようになり、ファブリー病の頻度は従来考えられていたよりも高い (日本では約 1 万人に 1 人) ことや新規の GLA 遺伝子変異が次々に見つかり合計で 1,000 種類を超えることがわかってきた。

我々は、日本人で比較的多く見つかる p.E66Q アミノ酸置換が、GLA 活性の低下を示すにもかかわらずファブリー病を発症しない機能的多型であることを報告しており、海外でも p.R118C, p.A143T, p.D313Y アミノ酸置換が機能的多型である可能性が高いと報告されており、新規にこのような機能的多型が見つかった場合、ファブリー病と誤診されてしまう可能性がある。また、一方、我々は日本人で比較的多い p.R112H, p.N215S, p.M296I 変異を持つ患者では、ファブリー病を引き起こすが臨床症状は特に軽度であり、男性患者においても残存 GLA 活性があり蓄積物質の量も著しく低く、特に女性患者では対照と区別できないことがあるため、機能的多型と誤診されてしまう可能性があることを報告している。このように臨床では、新生児のような臨床症状がまだ見られない時期や女性患者で新規アミノ酸置換が見つかった場合、その新規アミノ酸置換が病因変異であるか機能的多型であるかを判断することが非常に困難であるため問題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、遅発型の中でも特に軽度な臨床症状を引き起こすミスセンス変異 3 種類 (p.R112H, p.N215S, p.M296I) と機能的多型と考えられる 4 種類 (p.E66Q, p.A143T, p.R118C, p.D313Y) を蛋白質レベルで比較し、病気と非病気の境界の解明を目指す。これにより、ファブリー病の遺伝子変異と臨床症状の相関性が蛋白質レベルで解明されるとともに、診断で新規アミノ酸置換がどちらであるか判断するための基礎データが得られることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) COS-7 細胞に発現させた変異 GLA 蛋白質の比較

哺乳類細胞発現用ベクターに挿入された 9 種類 (野生型、古典型ミスセンス変異 1 種類、遅発型ミスセンス変異 3 種類、機能的多型 4 種類) の GLA 遺伝子を COS-7 細胞にリポフェクション法により導入する。そして、発現させた変異 GLA 蛋白質の酵素活性と蛋白質量を解析する。

### (2) 酵母を用いて精製変異 GLA 蛋白質を作製し、性状 (活性・安定性) を比較

初めに各変異 GLA 蛋白質を培養液中に分泌する安定発現酵母株を樹立する。そして、培養液からカラムクロマトグラフィーを用いて CBB 染色でシングルバンドになる程度まで精製する。次に精製変異 GLA 蛋白質の性状を比較するために、酵素学的パラメータの算出と熱安定性の解析を行う。熱安定性の解析は、リソソームの pH である酸性条件とその他の細胞小器官の pH である中性条件において、37℃ 熱処理した後の残存酵素活性の測定により機能低下を、サーマルシフトアッセイによる熱変性温度 ( $T_m$ ) の測定により立体構造の崩壊を解析することで行う。

### (3) *In silico* で変異 GLA 蛋白質の立体構造モデルを構築し、立体構造変化を比較

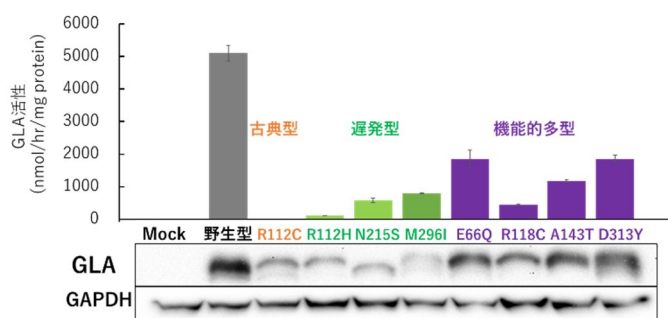
野生型 GLA の立体構造を鋳型として、分子モデルソフト TINKER を用いて、各アミノ酸置換が起きた際にエネルギー的に最も安定となる立体構造モデルを構築する。これを野生型と重ね合わせ、GLA 分子内の影響を受けた原子の数とその移動距離 (Root-mean-square distance)、活性部位への影響の程度、及び置換したアミノ酸の位置 (Accessible surface area) を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) COS-7 細胞に発現させた変異 GLA 蛋白質の比較

COS-7 細胞に対照である野生型と代表的な古典型ミスセンス変異 1 種類 (p.R112C) とともに、遅発型ミスセンス変異 3 種類と機能的多型 4 種類を一過性過剰発現させ、72 時間後に GLA 活性と GLA 蛋白質量を解析した (図 1)。機能的多型の方が遅発型ミスセンス変異に比べて GLA 活性が高く、GLA 蛋白質量も多い傾向がみられたが、機能的多型のなかでも p.R118C と p.A143T は p.E66Q と p.D313Y に比べて低く、遅発型ミスセンス変異に近い値を示すことが確認された。また、p.N215S の分子量が他に比べて小さかったが、これは N-結合型糖鎖が結合するアスパラギンに変異が起きているため、糖鎖が 1 本結合しなかったためと考えられた。

図1. COS-7細胞を用いた変異GLAの一過性過剰発現



##### (2) 酵母を用いて精製変異 GLA 蛋白質を作製し、性状(活性・安定性)を比較

###### 精製変異 GLA の酵素活性

各変異 GLA 蛋白質を培養液中に分泌するメタノール資化性酵母株を樹立し、その培養液約 10L から変異 GLA 蛋白質を 0.5-2mg 精製した。

p.N215S 変異 GLA は、COS-7 細胞での発現同様、分子量が小さかったが、糖鎖除去処理することで他と同じ分子量になったため、哺乳類細胞で作製した GLA 蛋白質と同様であることが確認され、本研究の目的に適した精製酵素であることが確認された (図 2)。

これらの変異 GLA の酵素学的パラメータ ( $K_m$ 、 $V_{max}$ ) は野生型

GLA とほとんど同じであることから (表 1)、全ての変異において酵素の機能低下は起きていないことが確認された。

###### 精製変異 GLA の安定性

37 °C 熱処理した後の残存酵素活性の測定により機能の低下を解析したところ (図 2-A) リソソームの pH である酸性条件下では野生型よりもやや低いものの、全ての変異 GLA は極めて高い安定性を保持していることが確認された。一方、リソソーム以外の細胞内 pH である中性条件では、p.N215S、p.E66Q、p.R118C、p.D313Y は野生型よりも低い安定性が保持されるものの、p.R112H、p.M296I、p.A143T はほとんど失活した。このことから、遅発型ミスセンス変異は機能的多型に比べて中性での安定性が低い傾向にあることが確認された。

立体構造が崩壊する熱変性温度 ( $T_m$ ) を解析したところ (図 2-B) リソソームの pH である酸性条件下では、全ての変異 GLA が野生型よりもやや低いものの極めて高い安定性を保持していることが確認された。一方、リソソーム以外の細胞内 pH である中性条件下では、p.M296I は野生型と同程度の安定性を、p.N215S、p.E66Q、p.R118C 及び p.D313Y は野生型よりもやや低い安定性を、p.R112H と p.A143T は野生型よりも大きく低下した安定性を示した。

図2. 精製GLAのCBB染色

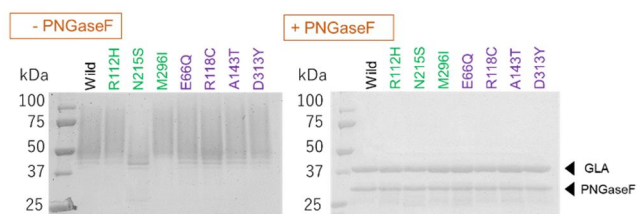
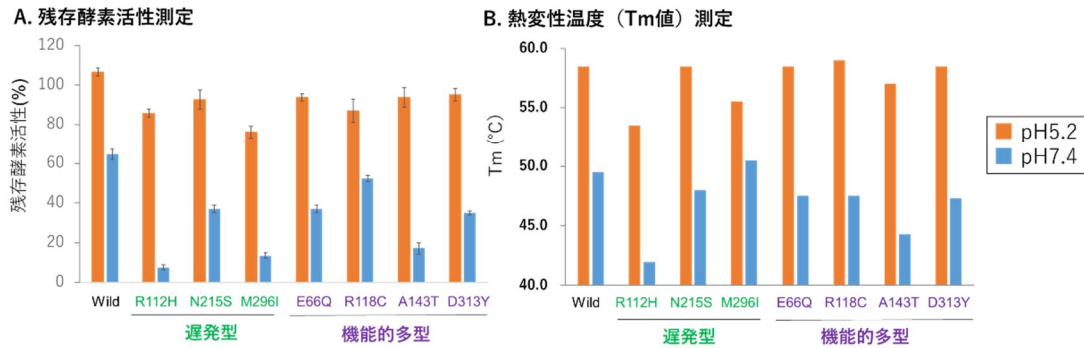


表1. 酵素学的パラメータ

	野生型	遅発型			機能的多型			
		R112H	N215S	M296I	E66Q	R118C	A143T	D313Y
$K_m$ (mM)	3.3	7.3	3.5	5.8	4.1	3.4	3.9	3.8
$V_{max}$ (mmol/h/mg protein)	4.6	5.3	3.3	5.6	5.1	3.8	3.4	4.8

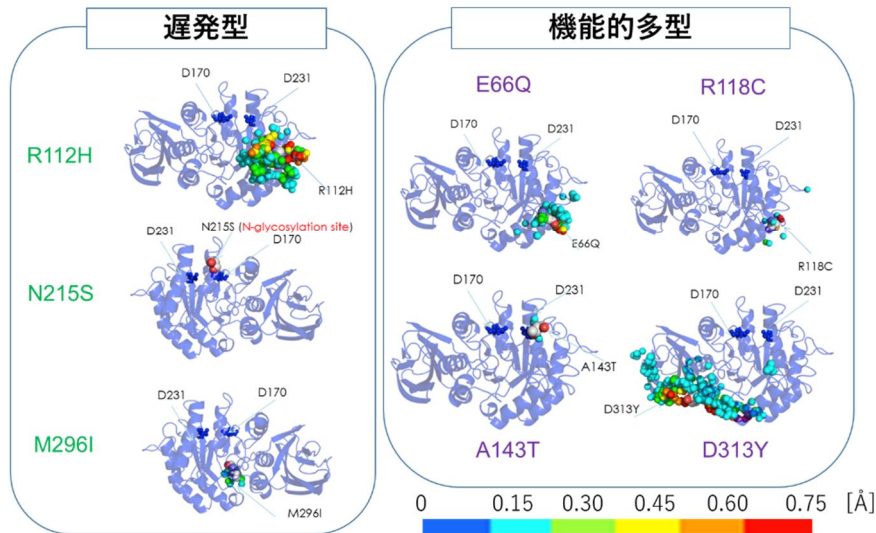
図2. pH安定性の解析



(3) *In silico*で変異 GLA 蛋白質の立体構造モデルを構築し、立体構造変化を比較

コンピューターを用いて変異 GLA 蛋白質の立体構造モデルを構築し、各アミノ酸置換により GLA 蛋白質にどのような立体構造変化が起きるかを予測し、野生型と比べて位置が移動した原子を CPK モデルで示すとともに、その移動距離に応じてカラーリングした(図 3)。その結果、p.R112H, p.E66Q, p.D313Y は分子表面に小さな構造変化が起きていること、その他は極めて小さな構造変化しか起きていないことが予測された。しかし、p.N215S は糖鎖結合部位のアミノ酸に変異が起きていること、p.M296I は分子内部に構造変化が起きていることが、予測された。

図3. 変異GLAの立体構造変化予測



結論

機能的多型 4 種類は分子表面に小さな構造変化しか起こしていないが、遅発型ミスセンス変異 3 種類については p.R112H は中程度の構造変化を起こすこと、p.N215S は糖鎖結合部位に変異が起きていること、p.M296I は分子内部に変異が起きていることにより、中性である小胞体で安定性が低下し、小胞体関連分解により大部分が分解されるため、ファブリー病を引き起こしていると予測された。

本研究の生化学的、構造学的解析結果は、ファブリー病の分子病態の解明につながる結果であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tsukimura Takahiro, Shiga Tomoko, Saito Koki, Ogawa Yasuhiro, Sakuraba Hitoshi, Togawa Tadayasu	4. 巻 28
2. 論文標題 Does administration of hydroxychloroquine/amiodarone accelerate accumulation of globotriaosylceramide and globotriaosylsphingosine in Fabry mice?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100773 ~ 100773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2021.100773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiga Tomoko, Tsukimura Takahiro, Namai Yurie, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Comparative urinary globotriaosylceramide analysis by thin-layer chromatography-immunostaining and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients with Fabry disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100804 ~ 100804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2021.100804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagata Akiko, Nasu Makoto, Kaida Yusuke, Nakayama Yosuke, Kurokawa Yuka, Nakamura Nao, Shibata Ryo, Hazama Takuma, Tsukimura Takahiro, Togawa Tadayasu, Saito Seiji, Sakuraba Hitoshi, Fukami Kei	4. 巻 37
2. 論文標題 Screening of Fabry disease in patients with chronic kidney disease in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 115 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfaa324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kami Daisuke, Suzuki Yosuke, Yamanami Masashi, Tsukimura Takahiro, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi, Gojo Satoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Genetically Modified Cell Transplantation Through Macroencapsulated Spheroids with Scaffolds to Treat Fabry Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/09636897211060269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Minori, Tsukimura Takahiro, Chiba Yasunori, Sakuraba Hitoshi, Togawa Tadayasu	4. 巻 25
2. 論文標題 Surface plasmon resonance analysis of complex formation of therapeutic recombinant lysosomal enzymes with domain 9 of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100639 ~ 100639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2020.100639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Masatoki, Kaneko Satoru, Tsukimura Takahiro, Takamatsu Kiyoshi, Togawa Tadayasu	4. 巻 604
2. 論文標題 The study investigating the determination of protamine in seminal plasma from azoospermic donors: Suggestion of new methods to diagnose obstructive azoospermia, and to capture childbearing sperm for testicular sperm extraction (TESE) and insemination sperm injection (ICSI)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113792 ~ 113792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukimura Takahiro, Tayama Yuya, Shiga Tomoko, Hirai Kanako, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Anti-drug antibody formation in Japanese Fabry patients following enzyme replacement therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100650 ~ 100650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2020.100650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kami Daisuke, Yamanami Masashi, Tsukimura Takahiro, Maeda Hideki, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi, Gojo Satoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Cell Transplantation Combined with Recombinant Collagen Peptides for the Treatment of Fabry Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 9.6369E+14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0963689720976362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Hironobu, Nakayama Yosuke, Nakao Shoichiro, Yamamoto Ryo, Kurokawa Yuka, Nakamura Nao, Nagata Akiko, Tsukimura Takahiro, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi, Fukami Kei	4. 巻 20
2. 論文標題 Effectiveness of immunosuppressive therapy for nephrotic syndrome in a patient with late-onset Fabry disease: a case report and literature review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-019-1657-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakuraba Hitoshi, Tsukimura Takahiro, Togawa Tadayasu, Tanaka Toshie, Ohtsuka Tomoko, Sato Atsuko, Shiga Tomoko, Saito Seiji, Ohno Kazuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Fabry disease in a Japanese population-molecular and biochemical characteristics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 73~79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2018.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 月村考宏、久保田孝雄、志賀智子、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 酵素補充療法を受けたファブリー病1家系のバイオマーカーの解析
3. 学会等名 第26回日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 月村考宏、齋藤静司、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 ファブリー病のデータベースの構築と分子病態の解析
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤光希、月村考宏、志賀智子、中村茜、小川泰弘、櫻庭均、兎川忠靖
2. 発表標題 カチオン性両親媒性薬物によるファブリー病モデルマウスの糖脂質代謝への影響
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小泉舞奈、志賀智子、月村考宏、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 ファブリー病患者尿中Gb3の解析におけるTLC免疫染色法とLC-MS/MS法の比較
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本拓也、島久登、土井俊夫、月村考宏、兎川忠靖、櫻庭均、池田ゆか、正木千晶、井上朋子、田代学、高松典通、川原和彦、岡田一義、水口潤
2. 発表標題 Fabry病の一家系の治療経過
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山昌勅、月村考宏、高松潔、兼子智、兎川忠靖
2. 発表標題 不妊治療を目的としたヒト精漿中プロタミンの測定
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 生井友里絵、志賀智子、武井加奈子、月村考宏、櫻庭均、兎川忠靖
2. 発表標題 ファブリー病女性患者尿中Gb3 の測定
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田山裕也、志賀智子、月村考宏、櫻庭均、兎川忠靖
2. 発表標題 日本人ファブリー病患者に対する酵素補充療法での抗GLA 抗体の産生とそのバイオマーカーへの影響
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻庭均、兎川忠靖、月村考宏、志賀智子、武井加奈子、齋藤静司、川島育夫、田島陽一
2. 発表標題 改変型NAGA を用いた新規ファブリー病酵素補充療法の開発
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀智子、武井加奈子、田山裕也、月村考宏、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 日本人ファブリー病患者の血漿Lyso-Gb3濃度：治療に伴う変化とそれに影響する因子
3. 学会等名 第24回日本ライソゾーム病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田山裕也、志賀智子、月村考宏、兎川忠靖、鈴木雄貴、片山昌勅、櫻庭均
2. 発表標題 酵素補充療法中のファブリー病患者における抗GLA 抗体と血漿中Lyso-Gb3 の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山昌勅、月村考宏、高松潔、兼子智、兎川忠靖
2. 発表標題 顕微授精 ( ICSI ) による男性不妊治療への応用を目的とした健常精子選択および精子マーカーとの関連性解析
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田山裕也、志賀智子、月村考宏、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 酵素補充療法を受けて抗体陽性となったファブリー病患者の抗GLA抗体と血漿中Lyso-Gb3の解析
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会総会/第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神崎美慶、生井友里恵、千葉靖典、片山昌勅、月村考宏、兎川忠靖、櫻庭均
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴法によるリソソーム酵素と万ノース6-リン酸受容体との親和性の解析
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会総会/第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻庭均、月村考宏、兔川忠靖、志賀智子、齋藤静司、大野一樹、田中利絵、佐藤温子、大塚智子
2. 発表標題 日本人ファブリー病患者における分子遺伝学的および生化学的基盤
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会総会/第16回アジア先天代謝異常症シンポジウム
4. 発表年 2018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

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