

平成 22 年 4 月 5 日現在

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) 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 type 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

研究代表者の専門分野：臨床化学、分子生物学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

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

1. 研究計画の概要

型糖原病は細胞内のリソソームに存在する酸性 α -グルコシダーゼ(α Glu)の遺伝的欠損に起因し、生体内にグリコーゲンが過剰蓄積する遺伝性代謝病である。現在、本症の治療法として酵素補充療法が積極的に行われているが、効果的治療のためには患児の早期発見が必要である。本症の診断は、筋生検材料や培養繊維芽細胞を用いた α Glu活性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できない。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酵素診断法が求められている。我々は、好中球に存在する干涉酵素(maltase-glucoamylase)をアカルボースで阻害することにより、混合白血球中の α Glu活性を特異的に測定する方法を確立した(Mol Genet Metab 88: 22-28, 2006)。本研究の第1の目的は、この基本原理を乾燥血液濾紙に応用し、型糖原病のための新生児スクリーニング法を開発すること、ならびにその診断精度の評価を行うことである。

一方、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、新たな治療法が開発が求められている。本研究の第2の目的は、新規治療戦略として注目されている化学シャペロン療法の作用機序を分子レベルで解析することである。

2. 研究の進捗状況

人工蛍光基質にアカルボースを共存させ、乾燥血液濾紙による α Glu活性測定法を確立した。本法を用いて、日本人健常新生児と患者の α 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、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。乾燥血液濾紙を用いた遺伝子解析の結果、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、この遺伝子多型がアジア人を対象とした本症の新生児スクリーニングに影響を与えることが示された。そこで、AAホモ接合体と患者を明確に識別することを目的として、天然基質の一つであるグリコーゲンを用いた血液濾紙中の α Glu活性測定法の開発を試みた。この開発に際しては、血液試料中に大量に存在する遊離グルコース(内因性グルコース)の干渉が問題となるが、我々はユニークな方法で内因性グルコースを95%以上除去する方法を考案し、血液濾紙を試料とするグリコーゲンの分解活性測定法を開発した。この方法により、AAホモ接合体と患者の識別率は有意に改善された。

変異酸性 - グルコシダーゼの発現系を用いて、細胞内における変異酵素蛋白質に対する化学シャペロンの効果ならびに細胞内蛋白質分解系の一つである小胞体関連分解(ERAD)との関連性を検討した。40種の変異酵素の内、13種の変異酵素が*N*-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ)に反応し、細胞内酵素活性が上昇し

た。これらは細胞内でのプロセッシングが正常化しており、NB-DNJ濃度依存性に成熟体酵素の増加が認められた。一方、NB-DNJで活性上昇を示した変異酵素は、NB-DNJ非存在下では細胞内で分解処理されているが、その多くはプロテアソームを介したERADが関与していないことが示唆された。また、NB-DNJとAαGlu酵素蛋白質の結合親和性は、酸性pHよりも中性pHの法が高いこと、NB-DNJが変異酵素の安定性を改善することが示された。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究は、型糖原病の診断と治療に関わる問題点を包括的に解決することを目的として計画されたものである。4年間の研究期間を通してこの課題に取り組む予定であるが、特に前半の平成19~20年度は、急務とされる新生児スクリーニング法の開発を中心に研究を進めた。その結果、日本人を含むアジア系人種に存在する遺伝子多型が本症の診断に直接影響を与えることを明らかにした。このことは診断上で極めて重要な知見である。そこで、更に当該遺伝子多型に影響されない酵素診断法の開発を試み、従来から不可能とされてきた天然基質による血液濾紙中のAαGlu活性測定法を確立した。本法は、従来からの人工蛍光基質に比べ、AAホモ接合体と患者の識別率を有意に改善したが完全ではなかった。次年度で更なる改良を計画している。型糖原病に対する化学シャペロンの候補としてNB-DNJを用いて、細胞内における変異AαGluの酵素活性や酵素蛋白質のプロセッシング、invitroでの結合親和性や酵素の安定性、さらにERADとの関連性を解析し、NB-DNJの化学シャペロンとしての分子メカニズムの一端を明らかにした。これまで遺伝病で認められる変異蛋白質の多くはERADにより分解処理されているものと考えられてきたが、今回の研究により、化学シャペロンは、ERAD以外の細胞内分解処理系で分解されている変異酵素に対しても作用し、その分解を抑制し細胞内活性を上昇させることが示された。これらの研究成果は、当初立案された計画に沿って実施されたものであり、その研究目的に充分対応したものと考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

血液濾紙を試料とするグリコーゲン基質による酵素診断法は、マルトオリゴ糖などの他の天然基質を用いた測定法の開発に応用することが可能である。次年度は、様々な天然基質やその誘導体を用いて、その分解活性を測定し、AAホモ接合体と患者を完全に識別できる酵素診断法の開発を計画している。また、人工蛍光基質を用いた際に問題となるヘモグロ

ビンのクエンチングについても検討し、ヘモグロビンの影響を受けない人工蛍光基質による高感度測定法の開発も計画している。

化学シャペロンの分子メカニズムに関する実験成果として、NB-DNJで活性上昇を示した変異酵素は、NB-DNJ非存在下では細胞内で分解処理されているが、その多くにはプロテアソームを介したERADが関与していないことが示された。このことから、今後は、ERストレス応答やオートファジー等も含め、細胞内分解処理系と化学シャペロンの効果について更に詳細な解析を行う予定である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

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 in the Japanese population(査読有り). Mol Genet Metab 97 (2009) 190-195.

[学会発表](計5件)

片淵達也: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回日本臨床化学会年次学術集会、平成21年9月18日(長崎市)。

隈元慎吾:血液濾紙を用いたポンペ病マスキューリング法の開発 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、平成20年11月6日(米子市)。

片淵達也:血液濾紙を用いたポンペ病マスキューリング法の開発 第1報:酵素活性測定のための基礎的検討。第50回日本先天代謝異常学会総会、平成20年11月6日(米子市)。

奥宮敏可:アカルボースによる干渉酵素阻害を基本原理とする白血球中酸性 - 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、平成19年11月16日(山形市)。

奥宮敏可:ポンペ病に対する化学シャペロン療法の分子基盤: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、平成19年11月16日(山形市)。