

機関番号：17501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590300

研究課題名 (和文) ファブリー病に対するシャペロン療法研究用モデルマウスの作成と応用

研究課題名 (英文) Preparation and application of mouse model for the study on chaperone therapy for Fabry disease

研究代表者

石井 達 (ISHII SATOSHI)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00222935

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的はファブリー病に対する新規治療法であるシャペロン療法を研究するためのモデルマウスを作製することにある。ファブリー病は α -ガラクトシダーゼAの遺伝的活性低下により細胞内に糖脂質、主にグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が蓄積し障害を引き起こす遺伝病である。これまでのモデルマウスは薬物投与の影響を組織での酵素活性の上昇により観察できたものの、ファブリー病の直接の病因であるGb3量の変動を評価するには不適當であった。そこで、本研究において私は、ヒトGb3合成酵素遺伝子を導入することで組織でのGb3合成を活発化したマウスを作製し、Gb3量の変化によって薬物の影響を評価できるモデルマウスの作製に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of our study is to establish a mouse model for the chaperone therapy for Fabry disease. Fabry disease is an inherited disease caused by the deficient activity of α -galactosidase A and resulted to accumulation of glycosphingolipid, predominantly globotriaosylceramide (Gb3). The mouse model established previously was good for the determination of enzyme activity but not for the accumulation of Gb3 on the effect of drug candidates. In our present study, we prepared the transgenic mouse expressing human Gb3 synthase gene, and we succeeded a mouse model in which we can determine the effect of compounds on both enzyme activity and Gb3 content.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ファブリー病、シャペロン療法、応用動物

1. 研究開始当初の背景

(1) ファブリー病は α -ガラクトシダーゼ A (α -Gal A) の遺伝子異常により生じる活性

低下によりリソソームに糖脂質、主にグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が蓄積し障害を引き起こす疾患である。ファブリー病の遺

伝子異常は家族ごとに様々で変異の種類も多岐にわたる。これまで報告されている遺伝子異常の約6割は一アミノ酸の置換による変異であり、タンパク質は合成されるものの、フォールディングが不完全なため小胞体での品質管理機構により分解される。これら変異酵素の中には正常な酵素活性を持つものも多いことから、我々はフォールディングを矯正することで活性上昇すると予想し、患者細胞を用いた実験で活性部位に結合する低分子化合物の添加により活性が上昇することを証明した。この方法を用いる治療法はシャペロン療法と呼ばれ、ファブリー病を中心にその応用が進められている。

(2) これまで私はシャペロン療法を研究するためのモデルマウスとして、ヒト変異 α -Gal A 遺伝子をホモに持ち、マウス α -Gal A 遺伝子を欠損させた(TgM/KOマウス)を作製し、このマウスを用いて薬物投与の影響を組織での酵素活性の上昇により判定してきた。しかしこのマウスはファブリー病の直接の病因であるGb3の蓄積が少なく、酵素活性の上昇がGb3量の減少に繋がるかを評価するには不相当であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでのマウスを改良し、薬物投与の影響を酵素活性の上昇と糖脂質の減少の両方で評価できるモデルマウスを作製することにある。すなわちヒトGb3合成酵素を高発現するトランスジェニックマウス(TgG3Sマウス)を樹立し、これまでに確立しているTgM/KOマウスと交配させることで、患者由来変異酵素を恒常的に発現し、しかもGb3の蓄積があるTgM/G3S/KOマウスを確立し、ファブリー病のシャペロン療法研究用モデルマウスとして応用する。

3. 研究の方法

(1) TgG3Sマウスの作製：C57BL/6Jマウスの受精卵にDNAフラグメント{ヒトGb3合成酵素cDNA(名古屋大学・医学部の古川鉦一教授提供)を発現ベクターpCXN2(大阪大学・医学部の宮崎純一教授提供)に組み込み、精製したプラスミドDNAを制限酵素HindIII、SalI及びApaI処理後、発現ユニットのみを分取した3.3kbのDNAフラグメント}をマイクロインジェクションし、仮親(ICRマウス)の子宮に入れて産仔を得た。トランスジェンの有無は、マウス耳片より調製したDNAについて、プライマーセット(5'-ATTGTTCTCAAGAACCCTGCG-3'と5'-ATTTGTGAGCCAGGCCATTG-3)を用いてPCRにより識別した。

(2) TgM/G3S/KOマウスの作製：TgG3Sマウスをライン化した後、まずKOマウスと交配させることで α -Gal A活性を持たないTgG3Sマウス(TgG3S/KOマウス)を作製した。次に

TgM/KOマウスと交配させることで、変異 α -Gal A 遺伝子とG3S遺伝子の両遺伝子をヘテロで持つ{TgM(+/-)/G3S(+/-)/KOマウス}を作製した。

(3) 低分子シャペロン{1-デオキシガラクトノジリマイシン(DGJ)}投与：DGJはToronto Research Chemicalsから購入した。

TgM/G3S/KOマウスへのDGJ投与は、0.05 mM濃度に調整した水溶液を給水ビンに入れ、4週間経口自由摂取により行った。マウスの水分摂取量と体重からこの濃度の投与により1日当たり3 mg/kg体重を投与したことになる。また、阻害効果の有無を調べるため25倍高濃度のDGJを投与した。

(4) Gb3合成酵素発現レベルの解析：Gb3合成酵素遺伝子の発現レベルをRT-PCRにより野生型マウスと比較した。各組織よりRNAiso(TaKaRa)を用いてtotal RNAを抽出し、TaKaRa RNA PCRTM Kit (TaKaRa)を用いて行った。プライマーはヒトとマウスのGb3合成酵素遺伝子を同時に増幅できる5'-GGCATCTC(T/A)CTTCTGAGCTG-3'と5'-GGATGGAACCACTTCTTG-3'を用いて増幅した。

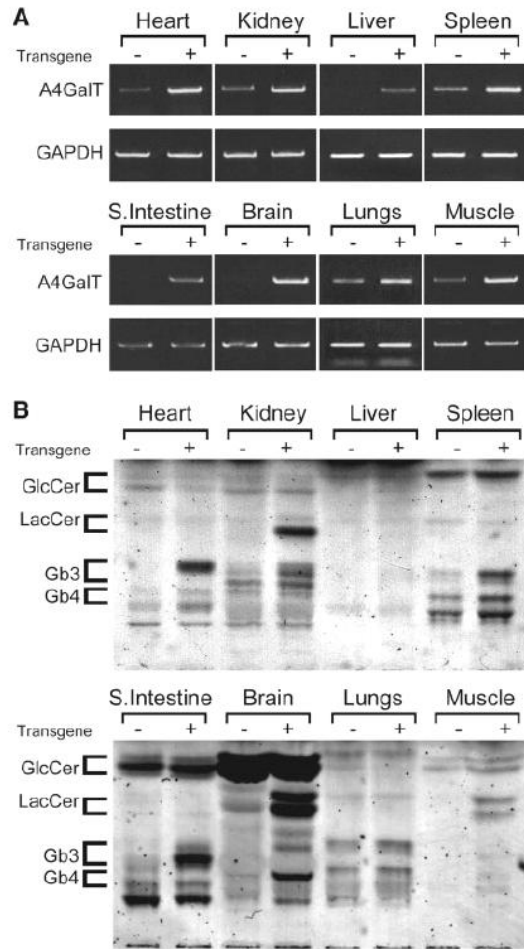
(5) 組織Gb3量の測定：Gb3量の定量はTLC-オルシノール硫酸法により行った。組織を水でホモジナイズした後、タンパク質量を測定し、20倍量のクロロホルム・メタノール(2:1)により抽出し、DEAE-Toyopearlカラムにより酸性糖脂質を除去した後、アルカリ性メタノール溶液で加水分解後、Folch分配下層を分取した。タンパク質量で揃えた上で薄層板上にスポットし、クロロホルム・メタノール・水(60:35:8)で展開後、オルシノール硫酸試薬を噴霧し、加熱により発色させた。検出されたバンドの濃さをソフトウェアScion Imageを用いて数値化し、標準品との比較により定量した。

(6) 酵素活性測定： α -Gal A活性の測定は蛍光基質4-メチルウンベリフェリル α -D-ガラクトシドを用いて行い、Lowry法により測定したタンパク質量で補正し比較した。

4. 研究成果

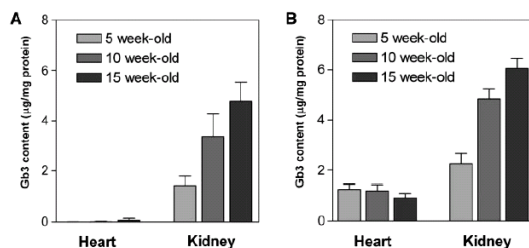
(1) 分担研究者の松田らによりC57BL/6Jマウスの受精卵にDNAフラグメントをマイクロインジェクションし、36頭の産仔を得、PCRにより遺伝子導入の確認されたマウスからTgG3Sマウスラインを1系統確立した。TgG3Sマウスの心臓、腎臓、肝臓、脾臓、小腸、肺、脳、筋肉についてG3S遺伝子(A4GalT)の発現レベルをRT-PCRにより野生型マウスと比較したところ、すべての臓器において顕著なG3S遺伝子発現レベルの上昇が確認された(図1)。また、各組織のGb3量も野生型マウスに比べ顕著に高く、導入された遺伝子の発現上昇が酵素量の増加を導き、Gb3合成の増加に寄与することが確認された。Gb3量の増

加は特に心臓、脾臓、小腸で顕著であった。



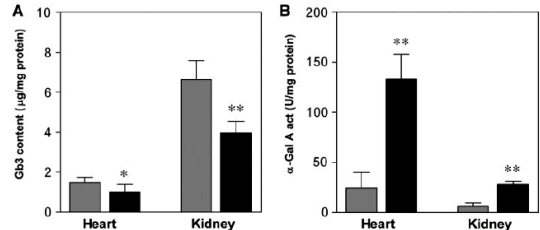
(図 1) (A) Gb3 合成酵素遺伝子 (A4GalT) 発現を RT-PCR により解析、(B) 中性糖脂質の TLC-オルシノール硫酸法による解析、(Transgene+は TgG3S マウスで、-は野生型マウス)

(2) ヒト Gb3 合成酵素をマウス組織で高発現させることで Gb3 量が顕著に増加したことから、このマウスを用いて TgM/G3S/KO マウスを作製した。TgM/G3S/KO マウスの組織 Gb3 量を、マウスの週齢を合わせて TgM/KO マウスと比較した。図 2 では特にファブリー病で障害の現れる心臓と腎臓について Gb3 量を調べた。これまでの TgM/KO マウスでは腎臓には Gb3 が検出されるもの、心臓ではほとんど認められなかった。これに対し、G3S 遺伝子を導入したマウスでは両臓器において Gb3 の蓄積が認められた。



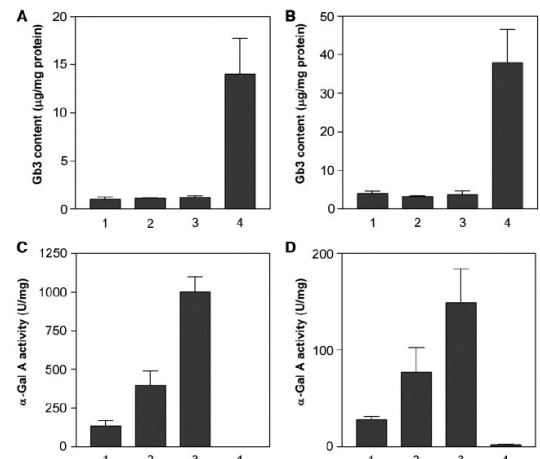
(図 2) TgM/KO (A) と TgM/G3S/KO (B) マウスの組織 Gb3 量

(3) そこで次に DGJ 投与の影響を今回作製した TgM/G3S/KO マウスを用いて検討した。図 3 に示すように酵素活性の顕著な上昇に伴って、Gb3 量の顕著な減少が、心臓と腎臓で認められ、酵素活性と糖脂質の両者について検討可能なシャペロン療法モデルマウスの作製に成功した。



(図 3) DGJ 投与の影響、TgM/G3S/KO マウスに 0.05 mM DGJ を 4 週間投与 (濃いカラム) と無処置マウス (薄いカラム) の組織 Gb3 量 (A) と α -Gal A 活性 (B)

(4) 酵素活性と糖脂質量の変動で薬物の影響を評価できるマウスができたことから、このマウスを用いて高濃度の DGJ 投与の影響を検討した。低分子シャペロンである DGJ は酵素のフォールディングを矯正して酵素活性を上昇させるが、同時に酵素の阻害剤でもあり、高濃度の投与により、組織内で酵素が阻害され、Gb3 が蓄積してくる可能性が考えられる。そこでこの点を明らかにするため通常投与濃度の 5 倍と 25 倍高濃度の DGJ をマウスに経口投与し、その影響を検討した。DGJ の濃度に従って、酵素活性の上昇が認められたが、Gb3 量にはほとんど変化が見られなかった (図 4)。この Gb3 量は α -Gal A 活性を全く持たない TgG3S/KO マウスに比べ、顕著に低く、マウスに存在する変異酵素が Gb3 の分解に十分関与し、25 倍量でも阻害が起きていないことが確認された。



(図 4) 高濃度 DGJ 投与の影響、TgM/G3S/KO マウスに通常濃度 0.05 mM DGJ (カラム 1) とその 5 倍 (カラム 2) と 25 倍 (カラム 3) 濃度を投与し、4 週間後の心臓 (A と C) と腎臓 (B と D) の Gb3 量と α -Gal A 活性。カラム 4 は TgG3S/KO マウス

変異酵素の活性低下をタンパク質の合成段階で矯正し、酵素活性を上昇させ、糖脂質の分解を正常化して治療に結び付けようとする試みは現在米国においてファブリー病に対する新しい治療法として臨床実験が進められている。今回、我々が作製したモデルマウスはシャペロン療法の安全性と有効性を検証する上で有用な情報を提供できると考えている。

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

- ① Shiozuka C.、(14名中3番目) Mastuda J.、(14名中14番目) Ishii S.、Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human α 1,4-galactosyltransferase and a mouse model for Fabry disease、Journal of Biochemistry、査読有、2011、149、161-170
- ② Ishii S. et al.、Preclinical efficacy and safety of 1-deoxygalactonojirimycin in mice for Fabry disease、The journal of pharmacology and experimental therapeutics、査読有、2009、328、723-731

[学会発表] (計 2 件)

- ① 田口 惇美、Gb3 の高度蓄積により発症するファブリー病病態モデルマウス、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ② 田口 惇美、1-デオキシガラクトノジリマイシンはファブリー病モデルマウス組織において糖脂質の蓄積を低下させる、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

[図書] (計 1 件)

- ① Fan J.Q. and Ishii S.、Springer Science+Business Media、Fabry Disease、Chapter 29: Pharmacological chaperone therapy for Fabry disease、2010、455-468

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 達 (ISHII SATOSHI)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号：00222935

(2) 研究分担者

松田 潤一郎 (MATSUDA JUNICHIRO)
(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部・
研究リーダー
研究者番号：60181731