

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590373

研究課題名（和文）免疫寛容を導入したヒト化ファブリー病マウスに対する改変型酵素の治療効果

研究課題名（英文）Immune tolerant Fabry mouse by liver restricted expression become the inevitable material to study efficacy in enzyme replacement therapy with a modified α -N-acetylgalactosaminidase

研究代表者

田島 陽一（TAJIMA YOUICHI）

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：00300955

研究成果の概要（和文）：

ファブリー病患者に対してヒト α -ガラクトシダーゼA (GLA) を用いた酵素補充療法が導入されたが、アレルギーなど克服すべき課題が残されている。我々はGLAと立体構造が似ている α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) にアミノ酸2残基の遺伝子変異を導入してGLA活性を持つ改変型NAGAを作製した。しかし、この改変型NAGAをファブリー病モデルマウスに投与するとアナフィラキシーが起こり、治療効果を評価することが難しい。そこで、免疫寛容を導入したヒト化ファブリー病マウスを作製し、改変型NAGA投与による免疫反応と治療効果について検討した。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies have shown that modified human α -N-acetylgalactosaminidase (NAGA) with human α -galactosidase A (GLA)-like substrate specificity prevents globotriaosylceramide (Gb3) storage in Fabry model mouse. Furthermore, this modified NAGA is hardly expected to cause an allergic reaction in Fabry disease patients, it is highly promising as a new and safe enzyme for enzyme replacement therapy (ERT) for Fabry disease. Surprisingly, a modified NAGA intravenously injected into Fabry model mice was associated with a high rate of fatal anaphylaxis. Here, we reported that suppression of allergic reaction can be achieved *in vivo* by taking advantage of ability of the liver to promote immune tolerance. Expression of NAGA in the liver was accomplished stably in liver-specific NAGA transgenic (NAGA-Tg) Fabry model mice. Therefore, immune tolerant NAGA-Tg Fabry model mice could become the inevitable materials to study evaded immunity and enhanced efficacy in ERT with a modified NAGA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：ファブリー病、酵素補充療法、免疫寛容、アナフィラキシー

1. 研究開始当初の背景

| ファブリー病は、細胞内のリソソームにある

α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の活性損失あるいは低下が引き起こす遺伝病である。これまでファブリー病患者に対する根本的治療法は無かったが、近年になり、ヒト組換え GLA を定期的に静脈内投与する「酵素補充療法」が導入され、効果を上げている。

しかし、既存の治療薬であるヒト組換え GLA は、血中で不安定で、標的臓器への取込が十分とは言えず、酵素が欠損したファブリー病患者への繰り返し投与によりアレルギー反応が生じ、効果が減じる等の問題点が指摘されている。申請者は、これらの問題点を解決するために、ファブリー病患者でも保持している α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) に着目した。NAGA は GLA と蛋白質立体構造が類似しており、ホモロジーモデリング法により NAGA の活性中心を構成するアミノ酸 2 残基を GLA 型に置換して GLA 活性を持たせた改変型 NAGA を設計した。この改変型 NAGA をチャイニーズハムスター卵巣細胞で発現・精製し、ヒト組換え改変型 NAGA を作製した。この改変型 NAGA をファブリー病モデルマウスに連続投与し、治療効果を検討したところ、改変型 NAGA は、GLA 製剤に比べ標的臓器への取込に優れ、同程度の治療効果を持つことが判明した。しかし、改変型 NAGA はヒト由来の蛋白質であるためにファブリー病モデルマウスに連続投与するとアナフィラキシーを起こし、死亡してしまう。そのため改変型 NAGA の長期投与による治療効果を検討できないので、免疫寛容を導入したヒト化ファブリー病マウスを作製し、改変型 NAGA の長期投与による治療効果の検討を試みた。

2. 研究の目的

改変型 NAGA を長期継続投与してもアナフィラキシーを起こさない遺伝子改変マウスを作製するために、アルブミンプロモーター・エンハンサーによりヒト NAGA 遺伝子を肝細胞特異的に発現するトランスジェニックファブリー病モデルマウスを作製する。遺伝子導入により肝細胞特異的に外来性蛋白質を発現させると、発現した蛋白質は抗原として認識されづらくなる事が多く報告されている。このトランスジェニック・ファブリー病モデルマウスを用いて改変型 NAGA 投与による免疫応答 (アナフィラキシー) と治療効果を解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスの作製

ヒト NAGA 遺伝子とウシグロースファクターのポリ A シグナルをマウスアルブミンエンハンサー・プロモーター発現ベクター (p2335A-1) にクローニングし、このアルブ

ミンプロモーター・ヒト NAGA 発現遺伝子をファブリー病モデルマウスの受精卵にマイクロインジェクションして、ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスを作製した。

(2) 改変型 NAGA の生産と精製

ヒト野生型 NAGA cDNA を鋳型にして、*in vitro mutagenesis* により、改変型 NAGA cDNA を作製した。作製した改変型 NAGA cDNA を発現ベクターに組み込み、チャイニーズハムスター卵巣細胞に遺伝子導入し、培地中に分泌された当該酵素を大量に回収した。回収した培地は、カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した当該酵素は、4-メチルウムベリフェリル- α -D-ガラクトピラノシドを基質として α -ガラクトシダーゼ活性を蛍光法で測定した。蛋白質濃度は、Micro BCA Protein Assay Reagent Kit を用いて行った。

(3) 改変型 NAGA 投与による副作用の検討

精製した改変型 NAGA を 2mg/kg 体重で、週 2 回の割合でマウスの尾静脈から継続投与し、生存率を検討した。さらに、当該酵素投与前に眼窩から採血した。採取した血清を用いて、改変型 NAGA に特異的に反応するイムノグロブリン (Ig) アイソタイプを ELISA 法により測定した。

(4) 改変型 NAGA 投与による能動的アナフィラキシーの検討

アナフィラキシーはアレルギー暴露により起きる全身性のアレルギー反応である。アナフィラキシーの主な症状としては血管透過性上昇による血圧低下、体温低下などである。アナフィラキシーの解析方法は、改変型 NAGA 投与 4 回目直後から直腸温度計により体温を測定する。急激な体温低下が起こればアナフィラキシー症状が起きていることが示唆される。さらに、アナフィラキシーの誘導には肥満細胞等から分泌されるヒスタミン等の化学伝達物質が血管内皮細胞、平滑筋に作用することで引き起こされる。そこで、5 回目の改変型 NAGA 投与後 30 分に採血し、血清中に含まれるヒスタミン量を ELISA 法により測定した。

(5) 改変型 NAGA 投与による蓄積基質の測定

ファブリー病モデルマウスおよびヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは、標的臓器 (肝臓、腎臓、心臓) に糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が蓄積する。改変型 NAGA 長期継続投与による Gb3 の量的変化を検討するた

めに、9回投与（投与開始 28 日目）のマウスから腎臓、肝臓、心臓を採取し、凍結切片作製した後、抗-Gb3 抗体による Gb3 の病理学的変化を解析した。さらに、臓器中に含まれる Gb3 を抽出し、TLC で展開したのち、定量的に測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト NAGA に対して免疫寛容なヒト化ファブリーマウスの作製

改変型 NAGA はヒト由来の蛋白質であるために、ファブリー病モデルマウスに投与するとアナフィラキシーにより死亡する事が判明した。そこで、改変型 NAGA に対して免疫寛容なファブリー病モデルマウスを作製するために、ヒト NAGA 遺伝子をマウスアルブミン遺伝子エンハンサー・プロモーターにより肝細胞特異的に発現させたヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウス（ヒト化ファブリー病マウス）を作製した。このトランスジェニック・ファブリー病モデルマウスでの肝臓におけるヒト NAGA の発現は、リアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング、および免疫染色法で確認した。さらに、このトランスジェニック・ファブリーマウスの血清中の NAGA 活性が、野生型マウスおよびファブリーマウスより有意に増加していることが確認された。

(2) 改変型 NAGA 投与による副作用の検討

改変型 NAGA をファブリー病モデルマウスとヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスに週 2 回の割合で静脈内投与を行った。その結果、ファブリー病モデルマウスは、投与 7 回目の 21 日に全て死亡した。一方、ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは、大量の改変型 NAGA を 60 日以上投与しても、死亡しなかった。このトランスジェニックマウスは、ヒト NAGA を継続的に発現するため、ヒト NAGA に対する免疫応答が低いと予想される。

(3) 改変型 NAGA 投与による免疫応答の検討

マウスに対する改変型 NAGA の免疫応答を調べるために、改変型 NAGA 投与による抗-改変型 NAGA 抗体産生を ELISA 法により測定した。その結果、このヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスに改変型 NAGA を投与してもファブリー病モデルマウスとは異なり、抗-改変型 NAGA-IgG1 が検出されず、IgG2a も低値を示した。このヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは、ヒト NAGA の類似体である改変型 NAGA に対す

る免疫反応性が低く、改変型 NAGA の長期投与に耐えられると期待され、今後の改変型 NAGA の効果判定に有用であると考えられる。

(4) 改変型 NAGA 投与によるアナフィラキシーの検討

ファブリー病モデルマウス及び野生型マウス (C57BL/6N) は、改変型 NAGA を投与 4 回目の投与後 20 分に体温低下を起し、アナフィラキシー症状を示した。一方、ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは改変型 NAGA を投与しても体温低下は示さず、アナフィラキシーを起こさないことが確かめられた。投与後改変型 NAGA 投与 30 分後に血液を採取し、血液に含まれるヒスタミンを測定したところ、ファブリー病モデルマウスと野生型マウスは血中ヒスタミン量が上昇しており、肥満細胞の脱顆粒が誘導されアナフィラキシーが起きていることが示唆された。一方、ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは、改変型 NAGA を投与しても血液中のヒスタミンは検出できず、アナフィラキシーは誘導されないことが分かった。

(5) ヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスを用いた改変型 NAGA の治療効果

このようにヒト NAGA トランスジェニック・ファブリー病モデルマウスは改変型 NAGA を投与してもアナフィラキシーが起きないので、長期継続投与により、蓄積基質の分解効果を検討できる。そこで、改変型 NAGA を 9 回投与し、蓄積基質の量を検討を行った。その結果、長期投与により明らかに蓄積基質が減少することが判明した。

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. Y. Tajima, S. Saito, K. Ohno, T. Tsukimura, S. Tsujino, H. Sakuraba : Biochemical and structural study on a S529V mutant acid α -glucosidase responsive to pharmacological chaperones. **J. Hum. Genet.**, **56**, 440-446, 査読有り, doi: 10.1038/jhg.2011.36.
2. T. Tsukimura, Y. Chiba, K. Ohno, S. Saito, Y. Tajima, H. Sakuraba: Molecular mechanism for stabilization of a mutant α -galactosidase A involving M51I amino acid substitution by iminosugars. **Mol.**

Genet. Metab., 103, 26-32, 査読有り,
doi: 10.1016/j.ymgme. 2011. 01.013.

〔学会発表〕(計4件)

1. 田島陽一: 治療用ヒト組み換えタンパク質によるマウスでのアナフィラキシーとサイトカインの解析. 第6回感染症サイトカイン研究会 2012. 11. 10 神戸
2. 田島陽一, 横山清司, 川島育夫, 貞任大地, 設楽浩志, 多屋長治, 月村考宏, 櫻庭均, 廣井隆親, 芝崎太: 新規ファブリー病治療薬であるヒト改変型 NAGA による免疫応答を軽減させた免疫寛容ファブリーマウスの開発. 第34回日本分子生物学会年会 2011. 12. 13~16. 横浜
3. 田島陽一, 横山清司, 川島育夫, 貞任大地, 設楽浩志, 多屋長治, 月村考宏, 廣井隆親, 芝崎太, 櫻庭均: 免疫寛容ファブリー病モデルマウスを用いた新規ファブリー病酵素補充療法の検討. 第84回日本生化学会大会 2011. 9. 21~24. 京都
4. 田島陽一, 川島育夫, 月村考宏, 千葉靖典, 芝崎太, 櫻庭均: 分子設計によるファブリー病に対する新しい酵素薬の開発. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会・合同年会 2010. 12. 7~10. 神戸

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Youichi_Tajima/?ev=hdr_xprf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島陽一 (TAJIMA YOUICHI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学分野・研究員
研究者番号: 00300955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川島育夫 (KAWASHIMA IKUO)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学分野・研究員
研究者番号: 40146824