

氏名	霜鳥 正明
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第224号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Novel Mutations of the GLA Gene in Japanese Patients with Fabry Disease and Their Functional Characterization by Active Site Specific Chaperone (日本人 Fabry 病患者の新規発見した変異 GLA 遺伝子と、活性部位特異的シャペロンによるそれら変異遺伝子の機能特性)
論文審査委員	主査 教授 木南 凌 副査 教授 下條 文武 副査 教授 伊藤 雅章

博士論文の要旨

【緒言】

ファブリー病は、ライソゾーム酵素のアルファーガラクトシダーゼ A, α -galactosidase A (GLA) の酵素活性低下もしくは失活によって引き起こされる、X染色体連鎖劣性遺伝の先天性代謝異常疾患である。

GLA 遺伝子はエクソン 1 から 7 まであり、原因となる突然変異は、7 つのエクソン全体に渡って存在する。遺伝子変異は一塩基置換によるミスセンス変異からナンセンス変異、欠損、挿入等の大きい変化まで多様であり、ファブリー病の遺伝子変異にはホットスポットが存在しない。

今回我々は、日本人の 62 人のファブリー患者の遺伝子解析を行い、24 の変異 GLA 遺伝子 (ミスセンス変異 17、ナンセンス変異 3、欠損 2、挿入 1、二重のミスセンス変異 1) を確認した。24 変異のうち、11 変異は新規変異であった。

細胞内で発現した変異 GLA は、折りたたみ異常を起こして凝集し、小胞体に存在する品質管理機構で異常分子とみなされ、小胞体-関連分解機構で分解されライソゾーム内へ到達することができない。変異 GLA の中には、ライソゾームへ到達できると、正常 GLA に近い機能を果たすものがあることが知られている。そこで、蛋白の折りたたみ構造を維持するシャペロンを用いて変異 GLA をライソゾーム内へ到達させ、酵素活性増強の有無を確認することとした。

1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) は本来 GLA 阻害剤として知られているが、酵素活性を阻害しない程度の低濃度で用いると、DGJ がシャペロンとして機能し、変異 GLA の折りたたみ構造を維持する。その結果、小胞体-関連分解機構での分解を低減させライソゾーム内への到達を増加させ細胞内での GLA 酵素活性を上昇させることが出来る。

【方法】

我々は、COS-7 (アフリカングリーンモンキーの腎上皮細胞を腫瘍化) を用いて、24 変異の GLA 遺伝子を COS-7 に導入し遺伝子発現実験を行った。発現させた変異 GLA の酵素活性を測定し、また DGJ 存在下で発現させた変異 GLA の酵素活性を測定し、変異 GLA に対する DGJ の効果を検討した。

【結果】

24 変異中 11 変異で、DGJ によって酵素活性が有意に増加した。それらの 11 変異は全て一塩基置換のミスセンス変異であった。ナンセンス変異では酵素活性の上昇はなかった。シャペロン効果が認められる変異は全てのエクソンにわたって存在し、同一のエクソン上でも効果のあるものと無いものがあつた。また原因は不明だが、正常 GLA に対しても DGJ による酵素活性増強効果が有意差をもって認められた。

Fabry 病患者の臨床症状を調べた結果、正常酵素活性の 1/7 の活性があれば、幼少時の臨床症状(四肢末端痛、低汗症、被角血管腫、角膜混濁)を抑えるのに十分なことが分かった。そして 24 変異のうち 8 変異で、DGJ により 1/7 以上の酵素活性増強を得られた。

【考察】

現在、日本人患者の変異 GLA 遺伝子は 20 以上報告されている。今回我々の解析した変異 GLA 遺伝子のうち 20 変異は、日本人患者での報告はされていなかった。今回、日本人の変異 GLA 遺伝子の半数以上を解析したことになる。日本人患者に対して、DGJ による酵素活性増強効果が見込める患者が一定数は存在すると考えられる。マウスへの DGJ 使用にて毒性は認められず、この DGJ を活性部位特異的シャペロン、Active Site Specific Chaperone (ASSC) として用いて、Fabry 病患者の変異 GLA の酵素活性を上昇させることでファブリー病治療への応用が期待される。

現在、Fabry 病に対して酵素補充療法が行われているが、投与された酵素の大部分、70% 以上が肝臓で代謝されてしまい、予後を決する臓器、心臓や腎臓等には到達しにくく、1%以下しか到達しないことが知られている。DGJ を使用した ASSC 療法では、DGJ による活性上昇を見込める変異遺伝子や、ヘテロの場合は生体内の正常酵素の活性上昇を期待できることとなり、酵素補充療法の問題点の解決が期待できる。

DGJ を臨床応用するときに、遺伝子変異に対するシャペロン効果の基礎的検討は、シャペロン治療の適応を決める上で重要であると考えられる。

(論文審査の要旨)

本研究は日本人のファブリー患者 (62 例) の α -galactosidase A (GLA) 遺伝子の変異解析を行い、その変異遺伝子をもつ酵素活性とシャペロン療法による酵素活性の回復を検討したものである。

結果は以下のものであつた。変異解析により、24 の変異 GLA 遺伝子 (ミスセンス変異 17、ナンセンス変異 3、欠損 2、挿入 1、二重のミスセンス変異 1) を確認した。これらの変異をもつ GLA-DNA を発現ベクターに組み込み、COS7 細胞に導入し、酵素を発現させた。一方、1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) は本来 GLA 阻害剤として知られているが、低濃度で用いると、活性部位特異的シャペロン、Active Site Specific Chaperone (ASSC) として機能する。この DGJ 添加群と非添加群を設定し、両群の酵素活性を比較した。その結果、24 変異中 11 変異で、DGJ により酵素活性が有意に増加した。ファブリー病患者の臨床症状を調べると、正常酵素活性の 1/7 の活性があれば、幼少時の臨床症状(四肢末端痛、低汗症、被角血管腫、角膜混濁)を抑えるのに十分なことが分かった。興味深いことに、上記のアッセイ系で、DGJ により 1/7 以上の酵素活性増強を示したのは、24 変異のうち 8 変異であつた。

申請者はファブリー病の GLA 遺伝子解析により新知見をもたらし、DGJ の有効性の範囲を推定した。また、日本人のファブリー病患者へ臨床応用できる可能性を示した。これらの点に、本研究の学位論文としての価値を認める。