

については  $\beta 3\text{GalT}$  遺伝子群がガラクトースの転移を担うが、IgA 腎症患者でその活性が低下している例を報告している。しかし、明確な遺伝子変異や一塩基多型 (SNP) は見つかっていない。家族性が疑われる IgA 腎症も存在するが、このような糖転移酵素の遺伝子変異が主な原因である可能性は非常に低い。一方、臨床の現場では扁桃摘出を行うと IgA 腎症が緩解した例が数多く報告されている。IgA 腎症患者の扁桃由来の IgA は、O 型糖鎖不全で多量体を形成していることが報告されている<sup>15)</sup>。感染等の刺激で扁桃での IgA への糖鎖付加に異常をきたし、血中に分泌された一部の糖鎖不全 IgA が核となって凝集体が形成されて、それが糸球体へ沈着する説が提唱されている。今後、扁桃における糖転移酵素の発現や IgA への糖鎖付加について研究を進めて行く必要がある。

## 7. おわりに

このミニレビューでは、IgA 腎症患者の IgA1 に O 型糖鎖不全が検出されることと、IgA の N 型糖鎖不全を示す  $\beta 4\text{GalT-I KO}$  マウスが IgA 腎症様病態を発症したことから、IgA の糖鎖不全に焦点を絞った話題を紹介したが、メサンギウムにおける IgA 受容体の異常発現や自己免疫説等もさらに検討を必要とする。IgA 腎症の原因が一つである必要もないので、今後もあらゆる方面からの検討を重ねてこの疾患の発症機構の解明と治療法の開発に貢献できればと考えている。

最後に  $\beta 4\text{GalT-I KO}$  マウスの IgA 腎症様病態の解析は、宮石理 (中部労災病院)、東治人 (大阪医科大学泌尿器科)、亀山昭彦、成松久 (産業技術総合研究所糖鎖工学センター)、和田隆志 (金沢大学第一内科)、横山仁 (金沢医科大学腎臓内科)、成瀬智恵、橋本憲佳 (当研究室) の諸先生方との共同研究である。この場を借りて感謝いたします。

- 1) Odani, H., Hiki, Y., Takahashi, M., Nishimoto, A., Yasuda, Y., Iwase, H., Shinzato, T., & Maeda, K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271, 268–274.
- 2) Allen, A.C., Bailey, E.M., Brenchley, P.E., Buck, K.S., Barratt, J., & Feehally, J. (2001) *Kidney Int.*, 60, 969–973.
- 3) Kokubo, T., Hiki, Y., Iwase, H., Tanaka, A., Toma, K., Hotta, K., & Kobayashi, Y. (1998) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9, 2048–2054.
- 4) Sano, T., Hiki, Y., Kokubo, T., Iwase, H., Shigematsu, H., & Kobayashi, Y. (2002) *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17, 50–56.
- 5) Tomana, M., Novak, J., Julian, B.A., Matousovic, K., Konecny,

- K., & Mestecky, J. (1999) *J. Clin. Invest.*, 104, 73–81.
- 6) Miyawaki, S., Muso, E., Takeuchi, E., Matsushima, H., Shibata, Y., Sasayama, S., & Yoshida, H. (1997) *Nephron*, 76, 201–207.
- 7) Zheng, F., Kundu, G.C., Zhang, Z., Ward, J., DeMayo, F., & Mukherjee, A.B. (1999) *Nat. Med.*, 5, 1018–1025.
- 8) Launay, P., Grossetete, B., Arcos-Fajardo, M., Gaudin, E., Torres, S.P., Beaudoin, L., Patey-Mariaud de Serre, N., Lehuen, A., & Monteiro, R.C. (2000) *J. Exp. Med.*, 191, 1999–2009.
- 9) Wang, J., Anders, R.A., Wu, Q., Peng, D., Cho, J.H., Sun, Y., Karaliukas, R., Kang, H.S., Turner, J.R., & Fu, Y.X. (2004) *J. Clin. Invest.*, 113, 826–835.
- 10) Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., & Iwakura, Y. (1997) *EMBO J.*, 16, 1850–1857.
- 11) Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., & Iwakura, Y. (2003) *Blood*, 102, 1678–1685.
- 12) Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Ohshima, T., & Asano, M. (2004) *Am. J. Pathol.*, 164, 1303–1314.
- 13) Lu, Q., Hasty, P., & Shur, B.D. (1997) *Dev. Biol.*, 181, 257–267.
- 14) Nishie, T., Miyaishi, O., Azuma, H., Kameyama, A., Naruse, C., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Narimatsu, H., Wada, T., & Asano, M. (2007) *Am. J. Pathol.* 170, 447–456.
- 15) Horie, A., Hiki, Y., Odani, H., Yasuda, Y., Takahashi, M., Kato, M., Iwase, H., Kobayashi, Y., Nakashima, I., & Maeda, K. (2003) *Am. J. Kidney Dis.*, 42, 486–496.

浅野 雅秀, 西江 敏和

(金沢大学学際科学実験センター・遺伝子改変動物分野)

Aberrant glycosylation of IgA and IgA nephropathy  
Masahide Asano and Toshikazu Nishie (Division of Transgenic Animal Science, Kanazawa University Advanced Science Research Center, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8640, Japan)

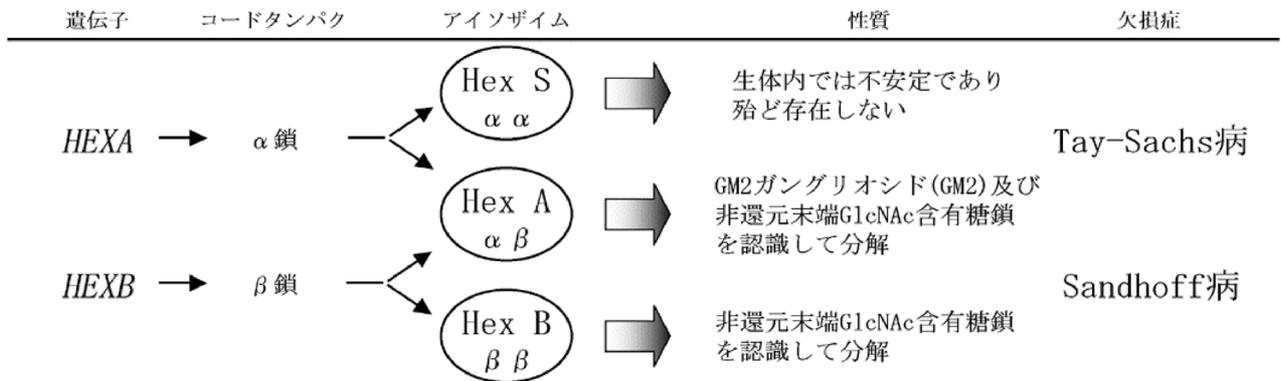
## リソソーム病の分子病理と治療ターゲット

### 1. はじめに

リソソーム病は、リソソームに存在する酸性加水分解酵素及び関連因子の遺伝子変異が原因で、酵素活性低下とその基質のリソソームへの過剰蓄積を伴って、全身性に細胞・臓器障害を惹起する単一遺伝子病群である。リソソーム病は、障害を受ける酵素や蓄積する代謝産物により分類され、現在 40 種類以上存在する。

GM2 ガングリオシドーシスは、リソソーム中の加水分解

A



B

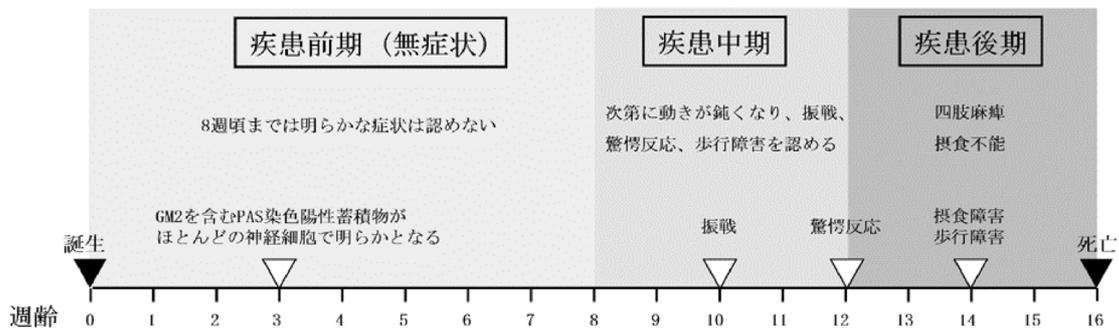


図1 (A)Hex の遺伝子及びアイソザイムの性質。(B)SD マウスの発症過程.

解酵素の一種であるβ-ヘキササミニダーゼ(Hex)の遺伝的欠損により、糖脂質のGM2ガングリオシド(GM2)が主に神経細胞に過剰に蓄積し、それに伴って中枢神経症状などを呈する代表的なリソソーム病である<sup>1)</sup>。GM2の分解に関与する遺伝子には、HEXA、HEXB、及びGM2Aの3種があり、それぞれがHexのα鎖、β鎖及びGM2アクチベータータンパク質をコードしている。Hexのα鎖とβ鎖はそれぞれ会合してダイマーを形成するが、αβヘテロダイマーであるHexAのみがGM2アクチベータータンパク質と協同してGM2を分解することができる。これによりα鎖、β鎖、及びGM2アクチベータータンパク質のいずれが欠損してもGM2ガングリオシドーシスとなり、それぞれHEXA、HEXB及びGM2A遺伝子の変異に基づく常染色体劣性遺伝病であるTay-Sachs病、Sandhoff病及びAB variantが発症する(図1A)。

1995年にマウスHexβ鎖遺伝子(Hexb)のKOマウス(Sandhoff病モデルマウス;SDマウス)が作製され、極めてヒトと類似した病態を示すことが明らかにされ、病態解

析や治療モデルとして利用されている<sup>2)</sup>。発達に伴い、脳ではGM2を含む生体内基質が進行性に蓄積する。生後2ヶ月頃までは明らかな症状は認めないが、次第に動きが鈍くなり、振戦、驚愕反応、歩行障害を認め、4ヶ月で死亡する(図1B)。生体内基質の蓄積と神経変性等との関係については依然として不明の点が多く、SDマウスを用いた研究はSandhoff病の病態解明・治療法開発にとって重要である。

本稿では、最近のSDマウスを用いた病態解析及び治療に関する研究を紹介し、中枢神経症状を惹起するリソソーム病を理解するための一助としたい。

## 2. SDマウスを用いた病態解析

GM2ガングリオシドーシスにおいてGM2蓄積に伴う脳障害の分子病態メカニズムは依然として不明であるが、①リソソーム内への基質蓄積による細胞内構造の破綻、②異常な神経突起伸長を伴う興奮性神経伝達物質の増大、③細胞毒性をもつ代謝産物の蓄積、さらに最近では④ミクログ

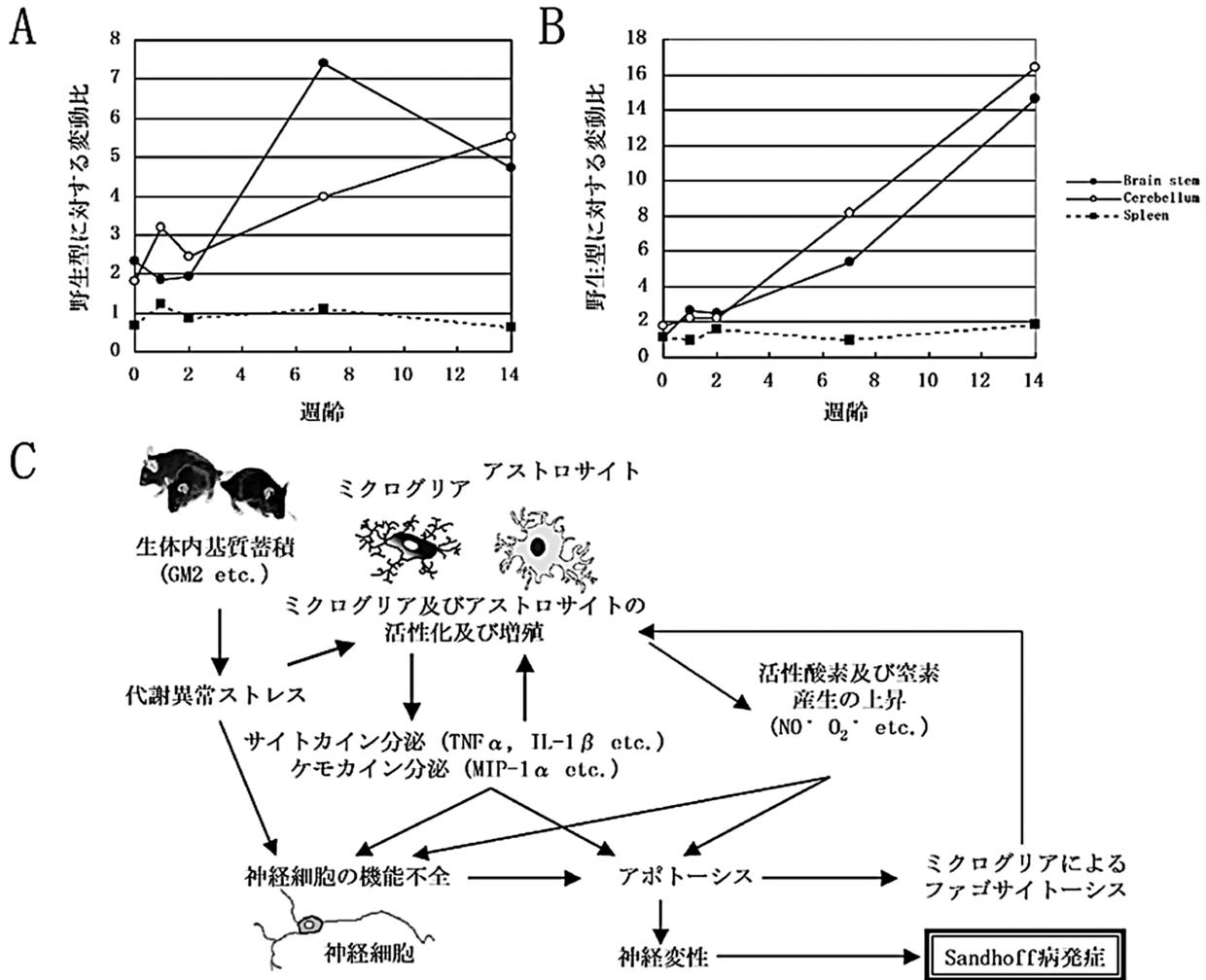


図2 (A)SD マウス脳組織における MIP-1 $\alpha$  mRNA の発現増大. (B)SD マウス脳組織における MIP-1 $\alpha$  タンパク質の発現増大. (C)Sandhoff 病の発症メカニズムに関する仮説.

リアやマクロファージが関与した炎症反応や自己抗体による免疫異常が可能性として考えられており、これらが複合して発症しているのかもしれない。WadaらはSDマウスの中樞神経系においてマイクロアレイ解析を行い、CD68やMac-1 $\alpha$ などミクログリア/マクロファージに関連する遺伝子の発現が顕著に増大することを明らかにし、さらに炎症性サイトカインである tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )が症状の進行と共に増大することを報告した<sup>3)</sup>。またJe-yakumarらはMHCクラスII陽性細胞の増大及びiNOSやラジカルを増大を報告しており、これらの結果はミクログリアの活性化を示唆している<sup>4)</sup>。ミクログリア細胞は脳内における免疫担当細胞であり、近年アルツハイマーなどの神経変性疾患の発症過程において重要な役割を演じている

ことが明らかとなっている。我々はミクログリアをはじめとするグリア細胞の活性化による神経炎症に着目して研究を行っている。特に炎症や病原体感染時に産生され、白血球などの浸潤を惹起する機能をもつケモカインについて、SDマウスの発症過程における各組織での発現解析を行い、脳疾患で変動が報告されているケモカインのうち、macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )のみが症状の進行と共にSDマウスの脳に選択的に増大していることを明らかにした(図2A及びB)。さらにMIP-1 $\alpha$ を発現している細胞ではGM2が殆ど蓄積しておらず、GlcNAc含有糖鎖が主に蓄積しているミクログリア及びアストロサイトにおいてMIP-1 $\alpha$ が発現していることが明らかになっている<sup>5)</sup>。最近Wuらにより、SDマウスのアストロサイトに

における MIP-1 $\alpha$  の発現上昇が、末梢からの活性化マクロファージの浸潤を増大させることが証明された<sup>6)</sup>。

### 3. 治療

現在のところ、GM2 ガングリオシドーシスをはじめとする中枢神経症状を惹起するリソソームに対する有効な治療法は確立されていないが、次に示す治療法が SD マウスを用いて試みられている。

#### 3-1) 骨髄移植

Norflus らは、野生型マウスから単離した骨髄を SD マウスの尾静脈内に移植を行い、寿命が約 8 ヶ月まで延長したことを報告している<sup>7)</sup>。骨髄移植により末梢臓器での酵素活性の回復、尿中へのオリゴ糖排出の減少が認められたが、脳内における GM2 の蓄積は解消されなかった。ただし、移植マウスの脳切片において X-GlcNAc を用いた活性染色を行うとミクログリアが陽性を示し、これは移植した骨髄から派生したマクロファージが脳内まで移行したためと考えられる。また脳内に移行したマクロファージが Hex

を分泌し、周囲の細胞へ供給すること（クロスコレクション）でミクログリアの活性化を抑え、症状の緩和及び寿命の延長が起こったのかもしれない。

#### 3-2) 基質枯渇療法

Jeyakumar らはセラミド特異的な糖転移酵素の阻害剤である *N*-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) を SD マウスに投与して糖脂質の生合成を阻害することで治療をはかる基質枯渇療法を試みた<sup>8)</sup>。NB-DNJ 投与マウスでは脳及び末梢臓器での GM2 及び GA2 の蓄積が同週齢のマウスと比較して減少しており、症状の進行の遅滞と寿命の延長が起こった。しかしながら、最終的には未処理と同様の病態となり死亡し、症状の進行を遅らせるのみであった。そこで Jeyakumar らは骨髄移植と基質枯渇療法を組み合わせた治療を行い、約 9.5 ヶ月まで寿命が延長することを報告した<sup>9)</sup>。

#### 3-3) 抗炎症療法

前述したように SD マウスの脳では炎症及びラジカルの発生が起こっており、症状の増悪に関わっていることが明

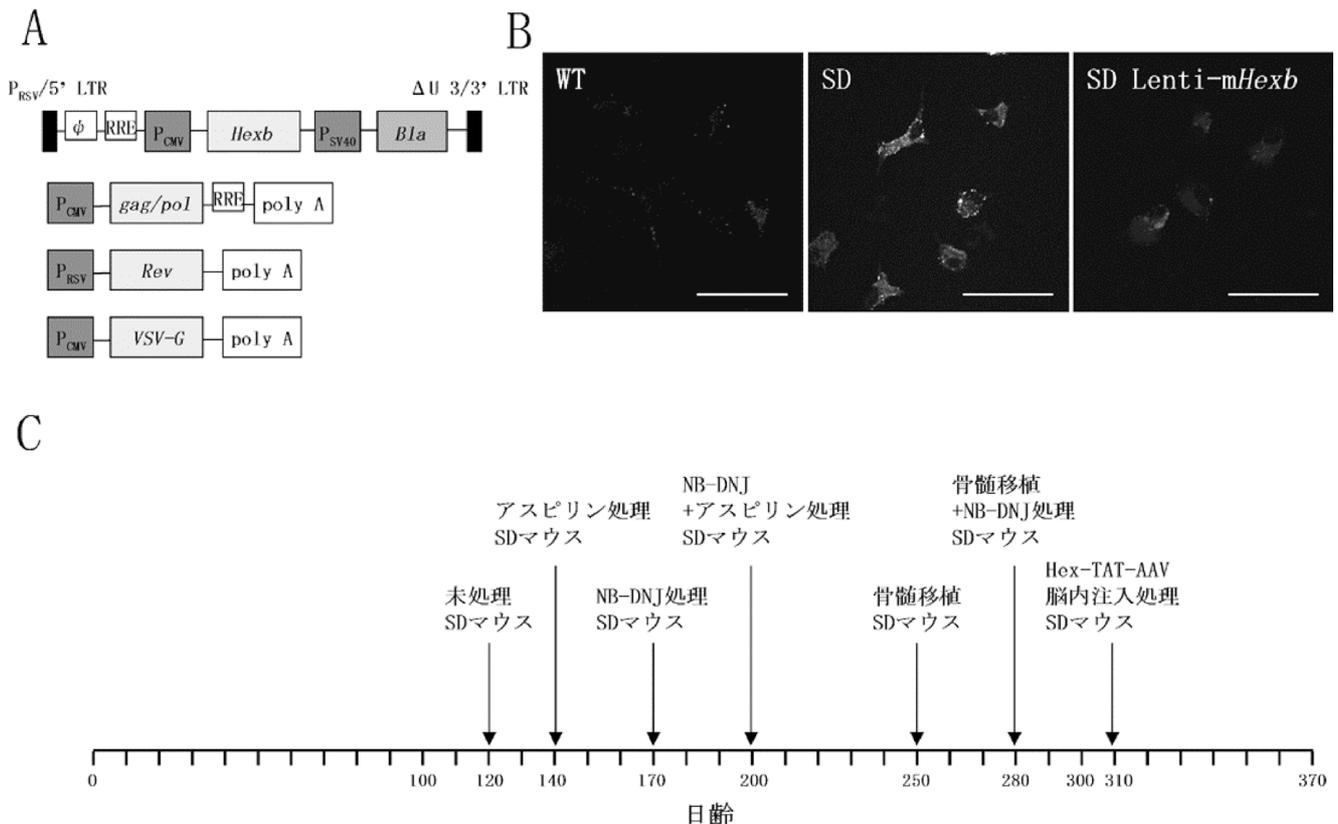


図3 (A) マウス Hex  $\beta$  鎖発現レンチウイルスベクター作製の遺伝子カセット. (B) レンチウイルスによる SD マウス由来ミクログリア初代培養に対する遺伝子導入効果. (C) 各治療法による SD マウスの寿命延長の比較.

らかとなっている。Jeyakumarらはアスピリンなどの抗炎症剤やL-アスコルビン酸のようなラジカル捕捉剤をSDマウスに投与すると、12%–23%程度寿命が延長することを報告した<sup>10)</sup>。

### 3-4) 遺伝子治療

ウイルスベクターなどを用いて正常な遺伝子を導入する遺伝子治療はSDマウスに対しても試みられている。Bourgoinらはアデノウイルスをマンニトールと同時に大脳半球に投与し、正常レベルまで酵素活性を回復させることに成功している<sup>11)</sup>。アデノウイルスベクターを用いる場合は高効率で遺伝子導入を行うことができるが、発現が持続しないという難点をもっている。そこで我々は神経細胞などの非増殖性細胞に導入でき、長期に遺伝子発現が行えるレンチウイルスベクターを作製し、SDマウスから単離したミクログリア初代培養に感染を行った<sup>12)</sup>。その結果、ミクログリア内で酵素が発現し、蓄積していた生体内基質が減少すること、また野生型と同様、発現した酵素が細胞外に分泌されることが明らかになった(図3A及びB)。最近ではCachon-Gonzalezらが、Hexの $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖にprotein transduction domain (PTD)を融合させたアデノ随伴ウイルスベクターを構築し、SDマウスの脳内にマンニトールと同時に投与を行い、約12ヶ月まで寿命が延長したことを報告している<sup>13)</sup>。これは高い効率で正常遺伝子が導入され、分泌された融合酵素が広範囲に分布し、酵素欠損細胞内への取り込みが起こったためである。

## 4. おわりに

最近のSandhoff病の分子病理に関する研究知見は、GM2ガングリオシドーシスの治療法を考案する上で、神経細胞におけるGM2蓄積のみならず、ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞の活性化による神経炎症にも注目する必要があることを示している。特にケモカインレセプターの阻害剤などケモカインを介した炎症をターゲットとした抗炎症療法は興味深く、現行の治療法と組み合わせた新規治療法として今後の開発が期待される。

- 1) Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R.L., Sandhoff, K., & Suzuki, K. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W. S., & Valle, D. ed.), pp. 3827–3876, McGraw-Hill, New York.
- 2) Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., & Proia, R.L. (1995) *Nat. Genet.*, **11**, 170–176.
- 3) Wada, R., Tiffit, C.J., & Proia, R.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10954.

- 4) Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., van der Spoel, A.C., d'Azzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., & Platt, F.M. (2003) *Brain*, **126**, 974–987.
- 5) Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., Kuwahara, J., Yamanaka, S., & Itoh, K. (2005) *J. Neurochem.*, **92**, 1497–1507.
- 6) Wu, Y.P. & Proia, R.L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8425–8430.
- 7) Norflus, F., Tiffit, C.J., McDonald, M.P., Glodstein, G., Crawley, J.N., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., & Proia, R.L. (1998) *J. Clin. Invest.*, **101**, 1881–1888.
- 8) Jeyakumar, M., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., & Platt, F.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6388–6393.
- 9) Jeyakumar, M., Norflus, F., Tiffit, C.J., Cortina-Borja, M., Butters, T.D., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., & Platt, F.M. (2001) *Blood*, **97**, 327–329.
- 10) Jeyakumar, M., Smith, D.A., Willims, I.M., Borja, M.C., Neville, D.C.A., Butters, T.D., Dwek, R.A., & Platt, F.M. (2004) *Ann. Neurol.*, **56**, 642–649.
- 11) Bourgoin, C., Emiliani, C., Kremer, E.J., Gelot, A., Tancini, B., Gravel, R.A., Drugan, C., Orlacchio, A., Poenaru, L., & Caillaud, C. (2003) *Gene Ther.*, **10**, 1841–1849.
- 12) Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., & Itoh, K. (2005) *J. Neurochem.*, **94**, 1631–1638.
- 13) Cachon-Gonzalez, M.B., Wang, S.Z., Lynch, A., Ziegler, R., Cheng, S.H., & Cox, T.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10373–10378.

辻 大輔, 伊藤 孝司

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
創薬生命工学分野)

Molecular pathogenesis and therapeutic targets of lysosomal diseases

Daisuke Tsuji and Kohji Itoh (Department of Medicinal Biotechnology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan)

## 抗腫瘍性酵素 L-メチオニン $\gamma$ -リアーゼの構造機能解析

### 1. はじめに

土壌細菌 *Pseudomonas putida* 由来の L-メチオニン  $\gamma$ -リアーゼ (EC 4.4.1.11) はビタミン B<sub>6</sub> 関与酵素群の中でも特に  $\gamma$ -ファミリーに属する酵素である。疎水性アミノ酸である L-メチオニンの脱離および置換反応を触媒する。本