

論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 15 号	氏 名	北風 圭介
学位論文題目	プロテアーゼ抵抗性を持つ改変型ヒト β -ヘキササミニダーゼの作製と GM2 ガングリオシドーシスモデルに対する治療効果		
<p>糖脂質の一種である GM2 ガングリオシド (GM2)は、リソソーム酵素である β-Hexosaminidase A (HexA, $\alpha\beta$ ヘテロダイマー)によって代謝される。GM2 ガングリオシドーシスは、Hex 鎖をコードする遺伝子の変異により HexA が欠損し、GM2 の脳内過剰蓄積と中枢神経症状を伴って発症するリソソーム病であり、現在まで根本的な治療法は確立されていない。近年、欧米ではいくつかの中枢神経症状を伴うリソソーム病に対し、脳脊髄液中へ組換え酵素を投与する酵素補充療法の臨床試験が進められており、GM2 ガングリオシドーシスについても有効な治療法の開発が望まれている。これまでに我々は、HEXA および HEXB 遺伝子によりコードされる HexA の α 鎖と β 鎖との構造類似性に着目し、分子内部の 6 アミノ酸残基を置換した機能改変型 HexB (modified HexB; modB)を分子設計した。改変型 HexB は、HexA の性質である GM2 分解活性と、HexB の性質である高い熱安定性を併せ持つことが明らかとなっており、HEXA 遺伝子に変異を持つ患者に対してはカモフラージュ酵素として低抗原性を示すことが予想される。しかしながら、modB を GM2 ガングリオシドーシスモデルマウス (SD マウス)の脳室内へ投与しても顕著な治療効果は認められず、その原因として、modB は細胞内においてカテプシン L や B といったプロテアーゼによる分解を受け、GM2 分解活性を失うことが示唆されている。</p> <p>本研究では、HexA, HexB および modB のアミノ酸配列比較および X 線結晶構造に基づく <i>in silico</i> での構造予測から、modB に α 鎖型アミノ酸をさらに追加置換した mod2B を設計した。まず、チャイニーズハムスター卵巣細胞に組換え Hex を発現させ、培養上清を出発材料として三段階のカラムクロマトグラフィーにより、精製度の高い組換え Hex を獲得した。次に、modB および mod2B を GM2 ガングリオシドーシス患者由来培養細胞に添加し、酵素補充効果を比較した。新規プローブを用いた蛍光イメージングにより、各改変型 HexB の細胞内取込み効率に大きな違いは無いことが明らかとなった。一方、患者細胞内において mod2B は modB よりもプロテアーゼによる分解を受けづらく、有意に高い GM2 分解活性を示した。また、SD マウス側脳室に modB および mod2B を投与し、脳内の投与酵素の分子種を解析した結果、mod2B はプロテアーゼ抵抗性の成熟体として存在することが明らかとなった。また、脳切片を作製し、イメージング質量分析により、mod2B の方が蓄積 GM2 の減少効果が高いことを示した。さらに、mod2B の複数回投与により、疾患後期における体重減少の抑制、運動機能低下の遅延および寿命の延長といった症状の有意な改善が認められた。</p> <p>以上より、本研究では、プロテアーゼ抵抗性を示す改変型 HexB を作製し、その有効性を蛍光プローブやイメージング質量分析といった新規手法で評価した。改変型 HexB による低免疫原性の脳内酵素補充療法の実用化に繋がれば、中枢神経症状を示すリソソーム病、あるいは中和抗体により治療効果が低減してしまう疾患を克服できる可能性を持っている。さらに、将来的には改変型 HEXB 遺伝子を用いた単一遺伝子治療への応用も期待される。</p>			