

35. 先天性糖鎖合成異常症の新しい治療薬開発の基盤確立

北島 健

名古屋大学 生物機能開発利用研究センター 基盤育成部門

Key words : 先天性糖鎖合成異常症, デアミノノイラミン酸, マンノース, 代替治療薬, シアル酸代謝

緒言

先天性糖鎖合成異常症 (CDG) は、タンパク質のグリコシレーションに関わる 100 を越える遺伝子群の異常によって起こる症候群であり、不完全な糖鎖構造形成が原因となつて精神・運動発達遅延、肝や消化管機能異常など多岐にわたる臨床症状が引き起こされる。CDG は臨床診断が困難であるが、血中糖タンパク質の糖鎖プロファイリングや遺伝子診断など生体検査によって診断される。1980 年後半以降、欧米の研究者が中心になつて CDG の原因遺伝子の特定や診断法の開発が精力的に行われ、現在、原因遺伝子によって 100 を超えるタイプに分類されている [1]。そのほとんどは決定的な治療法がない難病であるが、その中で CDG タイプ 1b (CDG1b) は唯一治療が可能な CDG である。CDG1b はフルクトース 6-リン酸 (Fru-6-P) をマンノース 6-リン酸 (Man-6-P) に変換するホスホマンノースイソメラーゼ (PMI) の遺伝子異常が原因となつて (図 1)、糖タンパク質糖鎖の生合成に必須な Man-6-P レベルが激減することによって発症する。それに対して、マンノース (Man) を摂取すると Man-6-P が代謝的に補充されて正常化されるため、現在、治療法としてドイツで開発されたマンノース補充療法 (Man 療法) [2] が世界的に利用されている (図 1)。その治療法の原理は、米国 Freeze 博士らが CDG1b におけるマンノース動態などを詳細に調べることによって解明されている [3]。一方、日本においては研究例が少ないが、その理由は CDG 患者の殆どが別の CDG1a タイプであり、Man-6-P を Man-1-P に変換するホスホマンノムターゼ (PMM) を原因遺伝子とするためである。しかし、今後、CDG1b 患者数の増加が予測されており、依然としてその重要性は失われていない [4]。

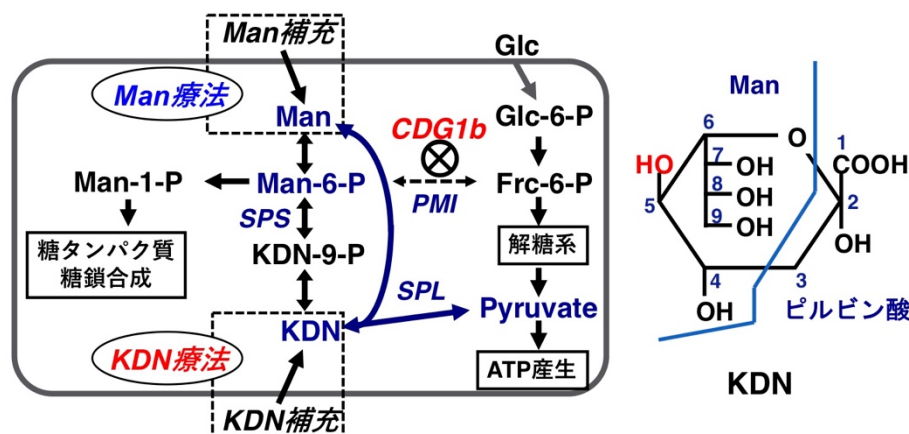


図 1. CDG1b と Man 療法および KDN 療法 (新提案) の概念図 (左) と KDN の構造 (右)

右パネルに示すように KDN は Man とピルビン酸から構成される。CDG1b の治療薬として Man が使用されているが、KDN は代謝的に Man を与える可能性があるため (左パネル)、Man の代わりに KDN も治療薬となる可能性がある。KDN と Man を比較すると、本文中に示すように KDN には種々のメリットがあるため、KDN が治療薬として実現されれば優れた代替薬になるかも知れない。

Man 療法では、一日 1 グラム/Kg 体重という大量の Man 摂取が長期間必要であり、患者の生活における負担が大きい。また、治療患者には因果関係は明確でないものの進行性肝障害や下痢や激しい腹痛症状が報告されている [4, 5]。さらに、その潜在的副作用も問題視されている。グルコース以上に糖化能が高い Man の摂取が血中タンパク質の糖化を促進して、生活習慣病の一要因である AGE (Advanced glycation end products) の集積リスクを高めるほか、Man 摂取でそのリン酸化に伴う ATP の過剰消費が起こるため細胞増殖抑制や胎児期の神経異常が危惧される。このように Man 療法には改善が期待される多くの課題がある。

一方、我々は Man が上記酵素 PMI を介してグルコース (Glc) から供給されるだけでなく、シアル酸の一種デアミノノイラミン酸 (KDN ; 図 1) から哺乳類における 2 つのハウス・キーピング酵素であるシアル酸アルドラーゼ (SPL) 反応およびシアル酸 9-リン酸化酵素 (SPS) の逆反応によっても供給されることを発見した (図 1)。しかも、KDN は Man より 10 倍程度低い濃度でも細胞に取り込まれ、同等の細胞内 Man 濃度を実現することから、Man の代わりに KDN を摂取することによって Man 療法と同等の効果が期待できる。そこで本研究では、CDG1b 患者の臨床応用が可能な治療法として Man の代わりに KDN を投与する「KDN 療法」の開発を目指している。今回、その技術基盤を確立することを目的として、細胞レベルおよび個体レベルで KDN の投与が CDG1b の症状の改善につながるかを調べることにした。しかし、残念なことに、CDG1b 細胞の樹立の段階で、PMI の sh-RNA の安定発現株が単離できないという予期せぬ結果となり、大幅に計画が遅れてしまった。ただし、Man と KDN の代謝物を正確に微量定量する方法の確立は完了しており、解析の準備状況は達成できた。また、KDN と Neu5Ac の細胞による取り込み機構が同じシアル酸であるにも関わらず異なるという新たな知見を得ることができ、今後の KDN 療法の機構解析における有用な情報になると考えている。現在、PMI 遺伝子ノックアウトマウスの線維芽細胞を入手しており、今後、その細胞を用いて、KDN 療法の有効性を検証する予定である。

方法

先天性糖鎖合成異常症 CDG1b タイプの治療法として、現行の「Man 療法」の欠点を改良する「KDN 療法」を考案し、それをヒトに適用する技術基盤を確立するために、哺乳類由来の培養細胞およびマウス個体を用いて「KDN 療法」の検証実験を行いたいと思い研究を開始した。

1. 培養細胞レベル

マウスメラノーマ由来 B16 細胞、マウス線維芽細胞 NIH-3T3 細胞は研究室で保存使用しているものを用いた。また、PMI 遺伝子欠損マウス由来の線維芽細胞は、Hudson Freeze 博士 (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute) から恵与された。培養条件は標準的な条件を用いた。

まず、細胞レベルにおいては、PMI 遺伝子の発現抑制および欠失細胞を樹立して、KDN 投与による CDG 表現型の改善効果を生化学的および細胞生物学的効果を検証することを計画した。遺伝子抑制には、siRNA および shRNA 方法、およびゲノム編集技術として CRISPR-Cas9 法を用いた。同時に、KDN および Man 代謝のクロストーク分子機構を関連酵素の遺伝子発現と代謝物の変化から解明することとした。遺伝子発現解析には、リアルタイム PCR 法を用い、代謝物の変化については、KDN および Man はそれぞれ特異的な蛍光標識 (DMB 化および PA 化) を行って、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量した [6]。

2. マウス個体レベル

次に、個体レベルにおいては、PMI 遺伝子欠損マウスが胎生致死であるためモデル動物として利用できないことから、別の方法で遺伝子抑制剤をもつマウスを作製して、KDN 投与方法の効果を調べ、CDG1b モデル個体として利用できるか否かを検証する。また、正常マウスに KDN 投与方法の副作用の可能性も調査する。

結果

1. CDG1b 細胞の確立

CDG1b 細胞は CDG1b の原因遺伝子である PMI (ホスホマンノイソメラーゼ) 遺伝子の発現抑制細胞株であり、その取得を目指した。しかし、Sh-RNA 法によって一過性発現細胞は調製できたものの、Sh-RNA 法による安定発現株の樹立ができなかった。一度は安定発現株が樹立されたと判定された細胞も、薬剤選択する過程で遺伝子発現の抑制効果が減弱してしまった。そこで合計 7 種類のノックダウン・プローブを単独および混合して遺伝子導入を試みたり、CRISPR-Cas9 法による遺伝子欠失を試みた。しかし、いずれも抑制細胞の樹立に至らなかった。これらの過程で何が起こったのかは、これまでのところ不明のままである。長期にわたる培養によって PMI 抑制細胞が淘汰されてしまうのかも知れない。CDG1b 細胞の樹立は本研究の重要なステップであるが、これまでの結果を受けて、PMI ノックアウトマウス由来の線維芽細胞を導入することとし、今後、KDN セラピーの効果の評価と条件設定を行う予定である。

2. KDN および Man 代謝産物の解析法の確立

蛍光標識したものを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離・定量する方法で、測定試料の調製法を含めて詳細に検討し、液体窒素で急速に試料を凍結する方法が重要であることをつきとめた (図 2)。特に、急速凍結法は従来の方法に比べて定量性において優れていることがわかった。とくに、遊離のシアル酸量の定量において従来法は適していないことがわかった。

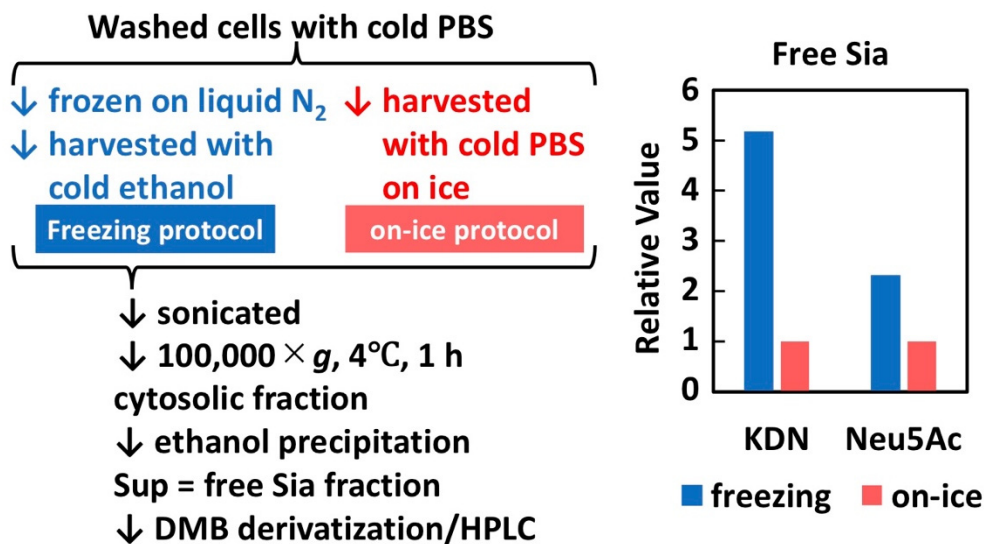


図 2. 細胞回収法による細胞内遊離シアル酸の回収量の違い

従来法では、培養細胞を on ice で剥がして回収した (左欄)。急速凍結法では液体窒素で凍結後 70%エタノール中で細胞を回収した (右欄)。その後、超音波処理して細胞を破碎、超遠心操作によって上清に細胞質画分を回収し、DMB 化-HPLC 法によってシアル酸を定量した。

3. CDG1b 細胞への KDN セラピーの効果の解析

CDG1b 細胞の樹立が達成できておらず実施できなかった。しかし、Man および KDN の添加細胞を回収して代謝物の量的変化を追跡した。KDN 添加における細胞の状態変化を調べた。20 mM Man 添加によって細胞増殖や生存活性が抑制される一方、KDN によっても細胞増殖や生存は影響をうけないことが半明した (データは示さない)。

今後、PMI ノックアウトマウス由来の線維芽細胞を導入して、Man および KDN の効果を検証する予定である。

4. CDG1b 細胞の表面糖鎖変化の解析法の樹立

哺乳類細胞にシアル酸の構造の一部にアルキンを導入した SiaNAI およびその前駆体 ManNAI を用いてクリックケミストリーの手法で確認する方法を当初導入する予定であったが、その前段階として、上記第 2 項で樹立した方法が、CDG 由来細胞表面のシアル酸量を定量する方法として適応可能であることを証明することができた（データは示さない）。

5. KDN の取り込み機構の解明

KDN の生体内挙動の理解の一環として、KDN が哺乳類細胞に取り込まれる分子機構の解析を行った。マウスとヒト細胞を KDN 存在下で培養する際に、種々の物質輸送阻害剤を共存させて、KDN の取込量を測定した。その結果、ピノサイトーシス機構とモノカルボン酸輸送体の一種が関与することが判明した（表 1）。また、Neu5Ac による輸送の競合実験において Neu5Ac は効果を持たないことから（図 3）、KDN はシアル酸の一種であるにも関わらず典型的な Neu5Ac とは異なる取込機構が働いているという興味深い結果が得られた。今後の KDN セラピーの樹立に向けて重要な知見である。

表 1. KDN の取り込みに対する各種輸送阻害剤の効果

Inhibitor	Target	B16	HEK293
amiloride	Macropinocytosis	No	No
cytochalasin D (cytoD)	Macropinocytosis	No	No
genistein	Caveolae-mediated endocytosis	No	inhibition (40 %)
nystatin	Caveolae-mediated endocytosis	inhibition (17 %)	No
chlorpromazine (CPZ)	Clathrin-mediated endocytosis	inhibition (41 %)	inhibition (39 %)
probenecid	Organic anion transporters	No	No
pyruvate	Monocarboxylic acid transporters (MCTs)	No	No
α -cyano-4-hydrozycinnamic acid (4-CIN)	Monocarboxylic acid transporters (MCTs)	inhibition (52 %)	No

B16, マウス B16 細胞 ; HEK293, ヒト HEK293 細胞

No, 効果なし ; Inhibition, 阻害効果あり (数値は阻害率を表す)

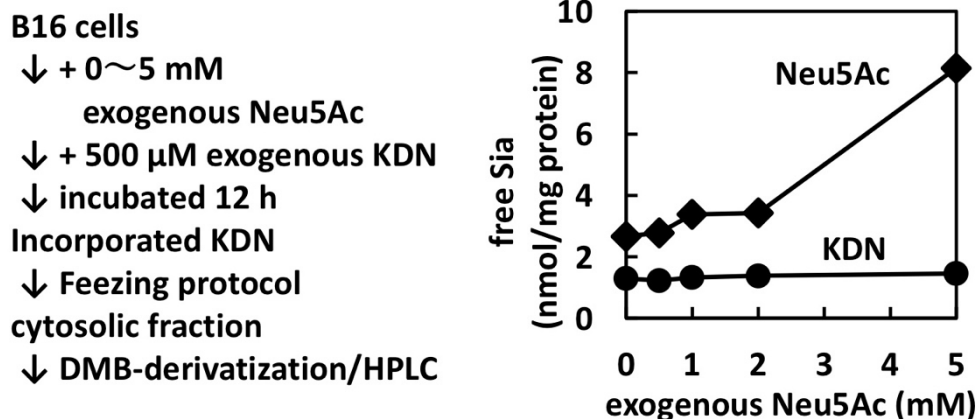


図3. KDNの取り込みに及ぼす共存 Neu5Ac の効果

B16細胞の培養培地に500 μM KDNを加えて、細胞内に取り込まれたKDNをDMB化HPLC法で定量した。グラフに示す量のNeu5Acを共存させたときに、KDNの取り込み量を測定した。KDNの取り込みがNeu5Acによって影響するかどうかを調べた。細胞を急速凍結法で回収し、超音波処理して破碎、超遠心操作によって上清に細胞質画分を回収し、そのシアル酸量をDMB化HPLC法によって定量した。

考 察

細胞内Man-6-Pの供給不足が原因となるCDG1b病の治療において、現在、高濃度のManを経口摂取する「Man療法」が採用されて、その重篤症状の改善に成功している。しかし、Man摂取が原因不明の肝障害や腹痛を引き起こすことや、グルコース以上に糖化能が高いManの摂取が血中タンパク質の糖化を促進して生活習慣病リスクを高めることが危惧されている。また、投薬量が多いため患者の日常生活における負担も小さくない。一方、KDNはManに比べて糖化反応性も毒性も低い。そしてKDNはManに比して少量の添加で同等の細胞内Man濃度を実現できる。また、KDNはサケ卵（イクラ）やドジョウ表皮に豊富に存在するため、その摂取は食品成分として既に日常化しており、経口的摂取にリスクがないことは検証済みである。本研究の結果、培養細胞およびマウス個体のCDG1bモデルにおいて、低濃度のKDN摂取によって細胞内代謝による効率的かつ持続的なMan供給が可能であることが証明されれば、CDG1b治療の「Man療法」に代わる「KDN療法」の開発実現が見通せるようになる。すなわち、血中タンパク質の糖化による合併症リスクが低く、投薬量の減少による身体的負担が軽減される治療法として、高い安全性と、大きな患者のQOL（生活の質）の改善に寄与できる。しかし、これまでの研究経過として、CDG1b細胞の準備段階で時間がかかっており、KDN療法のメリットを証明するには至らなかった。一方、現在、PMIノックアウトマウス由来の線維芽細胞を導入する手続きをしており、今後、その細胞を用いて検証できると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に当たり名古屋大学生物機能開発利用研究センターの佐藤ちひろ博士、名古屋大学大学院生命農学研究科動物細胞機能研究分野大学院生の岩木佑弥氏に感謝する。

文 献

- 1) Jaeken J, Matthijs G. From glycosylation to glycosylation diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1792(9): 823. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.003.
- 2) Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, Marquardt T. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1414-20. PMID:9525984.
- 3) Sharma V, Ichikawa M, Freeze HH. Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct 17;453(2):220-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.021. Epub 2014 Jun 12.
- 4) de Lonlay P, Seta N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1792(9):841-3. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.11.012. Epub 2008 Dec 6.
- 5) Mention K, Lacaille F, Valayannopoulos V, Romano S, Kuster A, Cretz M, Zaidan H, Galmiche L, Jaubert F, de Keyzer Y, Seta N, de Lonlay P. Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol Genet Metab*. 2008 Jan;93(1):40-3. Epub 2007 Oct 22. PMID:17945525
- 6) Go S, Sato C, Furuhata K, Kitajima K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconj J*. 2006 Jul;23(5-6):411-21. PMID:16897182