







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第536号	氏名	田口 惇 美
審査委員会委員	主査氏名	小野 克 重	
	副査氏名	楯原 久 司	
	副査氏名	佐藤 文 憲	
<p>論文題目  A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide Synthesis  (グロボトリアオシルセラミド合成を活性化させることにより作製したファブリー病病態モデルマウス)</p> <p>論文掲載誌名  <i>Biochemical Journal</i></p> <p>論文要旨  ファブリー病は<math>\alpha</math>-ガラクトシダーゼ A (<math>\alpha</math>-GalA)の遺伝的酵素欠損に起因する代謝異常症であり、患者組織では主に糖脂質グロボトリアオシルセラミド (Gb3)が蓄積する。本疾患のモデルとして<math>\alpha</math>-GalA ノックアウトマウス (GLAko) が確立されているが、Gb3 の蓄積を顕著に認めるものの全く症状を示さない。この理由としてマウスはヒトに比べ Gb3 合成能が低いためと考える。本研究はヒト Gb3 合成酵素遺伝子を高発現させたトランスジェニックマウス (TgG3S) を作製し、さらに GLAko マウスとの交配により G3Stg/GLAko マウスを作製することで、症状を示すモデルマウスの作製を試みた。Wild-type、TgG3S、GLAko、G3Stg/GLAko の4系統のマウスについて、生存期間、体重変化を観察し、20週齢での組織 Gb3、血清 Lyso-Gb3 量を測定した。腎機能の変化を尿量や尿浸透圧、尿タンパク量で確認した。組織の変化を見るため HE 染色と Gb3 特異的染色、電子顕微鏡観察を行った。さらに G3Stg/GLAko マウスの腎障害の経時的変化を GLAko マウスと比較した。また酵素補充療法(ERT)を行い腎機能の回復を確認した。G3Stg/GLAko マウスの組織 Gb3 量、血清 Lyso-Gb3 量は他のマウスに比べて顕著に増加していた。20週齢頃から体重減少に伴って震え、脊柱湾曲などが確認され、25週齢から35週齢で死亡した。このような体重減少や死亡は他のマウスでは見られなかった。尿量は他のマウスの 1ml/day に対して 4ml/day と多く、尿浸透圧が正常の約 30%に低下しており、尿の濃縮力低下が認められた。血中尿素窒素量 (BUN)、尿中アルブミン、尿中<math>\beta</math>2-ミクログロブリンも上昇していた。3週齢から尿中アルブミン量が増加し、5週齢から尿浸透圧が低下、10週齢から顕著な尿量の増加が認められ、BUN は 15週齢から有意に上昇した。腎臓の組織観察では髄質に多く Gb3 が蓄積していた。電顕観察では糸球体の足細胞や尿細管、集合管に Gb3 蓄積による封入体が確認された。細隙灯顕微鏡検査では G3Stg/GLAko マウスの若年期からの白内障が認められた。また G3Stg/GLAko マウスに酵素製剤アガルシダーゼ<math>\beta</math> (1mg/kg) を2週間ごと8回静脈注射したところ、非投与群と比べて腎臓の Gb3 蓄積量は約 40%と減少し、尿量を約 80%に抑えることが出来た。これまでのマウスでは見られなかった種々の症状を G3Stg/GLAko マウスで確認し、また ERT によって Gb3 蓄積量を減少させることで症状が改善したことから、Gb3 蓄積の増加がファブリー病の発症の原因であることを初めて証明した。</p> <p>本研究はヒトGb3合成酵素遺伝子を高発現させたトランスジェニックマウス (TgG3S) を作製し、さらにGLAkoマウスとの交配によりG3Stg/GLAkoマウスを作製することで、Gb3蓄積の増加がファブリー病の発症の原因であることを初めて証明した意義あるものであり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判断した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ①・論	第 536 号	氏 名	田 口 惇 美
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	小 野 克 重	
	副査氏名	楢 原 久 司	
	副査氏名	佐 藤 文 憲	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ファブリー病においてこれまで報告された治療法にはどのようなものがあるか答えよ。</li> <li>2. 実験のタイミング(マウス週令)と酵素補充療法における投与量はどのように決定したか答えよ。</li> <li>3. マウス血清クレアチニン値の測定はおこなったか答えよ。</li> <li>4. 論文中の Figure 3BとTable 1b の相違点を述べよ。</li> <li>5. アルブミン尿の増加は尿細管障害ではなく、糸球体障害を意味しているのではないかと考察せよ。</li> <li>6. 肝臓および脾臓においてGb3蓄積と酵素補充療法による除去率が高いのはなぜか答えよ。</li> <li>7. 酵素補充療法は生命予後の改善効果があったか述べよ。</li> <li>8. メスのヘテロタイプの長期観察は行ったか答えよ。</li> <li>9. この疾患モデルとしての有用性はどの程度であるかと考察せよ。</li> <li>10. ファブリー病の病態モデルとしての今後の応用の可能性はどのようなものであるか答えよ。</li> <li>11. この新たなモデルマウスは安定的に継代できるか述べよ。</li> <li>12. このモデル動物の生殖能力(産仔数)は正常マウスと差異はなかったか答えよ。</li> <li>13. Gb3 synthaseの遺伝子はどの染色体に位置しているか答えよ。</li> <li>14. 女性ではlyso-Gb3がより鋭敏なマーカーになるのはなぜか答えよ。</li> <li>15. HPTLCとTLCの違いは何か述べよ。</li> <li>16. Albumin/creatinine (Figure 6D)が10週齢から低下する理由は何か述べよ。</li> <li>17. ホモ接合体の女性の患者はあり得るか論ぜよ。</li> <li>18. ホモ接合体の女性の患者の症状はヘテロと差があるか答えよ。</li> <li>19. このモデル動物の尿浸透圧を測定するときどのような飲水環境を設定したか答えよ。</li> <li>20. このモデル動物のGb3の発現がGLA単独ノックアウト動物の同発現と発現臓器差異が認められる理由を考察せよ。</li> <li>21. G3Stg/GLAko動物の死因が何か答えよ。</li> <li>22. G3Stg/GLAko動物で心臓に機能異常が認められない理由を考察せよ。</li> <li>23. 実験動物の尿浸透圧が血清浸透圧に比べて異常に高値である理由を考察せよ。</li> <li>24. 心機能を評価した際の実験方法の妥当性を述べよ。</li> <li>25. 腎髄質にGb3が異常蓄積される場合の腎機能の異常との関連を詳しく説明せよ。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 田口 惇美

## 論 文 題 目

A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide  
synthesis

(グロボトリアオシルセラミド合成を活発化させることにより作製したファブリー病  
病態モデルマウス)

## 要 旨

【諸言】ファブリー病は $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A ( $\alpha$ -GalA)の遺伝的酵素欠損に起因する代謝異常症であり、患者組織では主に糖脂質グロボトリアオシルセラミド (Gb3)が蓄積する。本疾患のモデルとして $\alpha$ -GalA ノックアウトマウス (GLAko) が確立されているが、Gb3 の蓄積を顕著に認めるものの全く症状を示さない。この理由としてマウスはヒトに比べ Gb3 合成能が低いためと考える。そこで我々はヒト Gb3 合成酵素遺伝子を高発現させたトランスジェニックマウス (TgG3S) を作製し、さらに GLAko マウスとの交配により G3Stg/GLAko マウスを作製することで、症状を示すモデルマウスの作製を試みた。

【研究対象及び方法】 Wild-type、TgG3S、GLAko、G3Stg/GLAko の 4 系統のマウスについて、生存期間、体重変化を観察し、20 週齢での組織 Gb3、血清 Lyso-Gb3 量を測定した。腎機能の変化を尿量や尿浸透圧、尿タンパク量で確認した。組織の変化を見るため HE 染色と Gb3 特異的染色、電子顕微鏡観察を行った。さらに G3Stg/GLAko マウスの腎障害の経時的変化を GLAko マウスと比較した。

また酵素補充療法(ERT)を行い腎機能の回復を確認した。

【結果】 G3Stg/GLAko マウスの組織 Gb3 量、血清 Lyso-Gb3 量は他のマウスに比べて顕著に増加していた。20 週齢頃から体重減少に伴って震え、脊柱湾曲などが確認され、25 週齢から 35 週齢で死亡した。このような体重減少や死亡は他のマウスでは見られなかった。尿量は他のマウスの 1ml/day に対して 4ml/day と多く、尿浸透圧が正常の約 30%に低下しており、尿の濃縮力低下が認められた。血中尿素窒素量 (BUN)、尿中アルブミン、尿中 $\beta$ 2-ミクログロブリンも上昇していた。3 週齢から尿中アルブミン量が増加し、5 週齢から尿浸透圧が低下、10 週齢から顕著な尿量の増加が認められ、BUN は 15 週齢から有意に上昇した。腎臓の組織観察では髄質に多く Gb3 が蓄積していた。電顕観察では糸球体の足細胞や尿細管、集合管に Gb3 蓄積による封入体が確認された。細隙灯顕微鏡検査では G3Stg/GLAko マウスの若年期からの白内障が認められた。また G3Stg/GLAko マウスに酵素製剤アガルンダーゼ $\beta$  (1mg/kg) を 2 週間ごと 8 回静脈注射したところ、非投与群と比べて腎臓の Gb3 蓄積量は約 40%と減少し、尿量を約 80%に抑えることが出来た。

【考察】これまでのマウスでは見られなかった種々の症状を G3Stg/GLAko マウスで確認し、また ERT によって Gb3 蓄積量を減少させることで症状が改善したことから、Gb3 蓄積の増加がファブリー病の発症の原因であることを初めて証明した。G3Stg/GLAko マウスで見られた多尿やアルブミン尿は、ヒト患者で初期に見られる症状と一致する。このマウスの糸球体には異常が見られず、尿細管障害マーカーである $\beta$ 2-ミクログロブリンが上昇していることから、これらの症状は糸球体濾過障害ではなく尿細管の再吸収障害によるものと考えられる。

【結語】 Gb3 の高度蓄積により、ファブリー病患者と似た進行性の腎障害を起こす病態モデルマウスを得られた。