

Gaucher 환자의 효소 대체요법에 따른 Chitotriosidase 활성도 변화

유한욱¹, 임대성², 양송현²

울산대학교 의과대학 소아과¹, 녹십자의료재단 대사의학연구소²

≡ Abstract ≡

Change of Chitotriosidase activity in Gaucher Patients by Enzyme Replacement Therapy

Han Wook YOO, M.D., Ph.D.¹, Dae Seong IM², Song Hyun YANG, Ph.D.².

Department of Pediatrics, Medical Genetics Clinic and Laboratory, College of Medicine, University of Ulsan¹,
Institute of Metabolism, Green Cross Reference Laboratory²

Gaucher disease is an inherited disorder due to a deficiency in the activity of glucocerebrosidase (EC. 3.2.1.45) by genetic mutation which resulted from missense, nonsense, frameshift, deletion in long arm 21 of chromosome 1 (1q21)^{1),2)}. Gaucher disease is classified into the main three types as type 1 (nonneuronopathic), type 2 (acute neuronopathic) and type 3 (subacute neuronopathic) according to the progressive phase of manifestations and nervous system involvement. Gaucher disease patients had been treated by using the method as splenectomy and bone marrow transplantation. But enzyme replacement therapy as a more effective treatment has been available since the early 1990's. In order to treat Gaucher disease efficiently by using ERT, it is necessary to chase the progress of the therapy. In this study, therefore, we tried to chase the progress of the ERT by using the measurement of chitotriosidase activity

in Gaucher disease patients.

Key words: Gaucher disease, glucocerebrosidase, genetic mutation, enzyme replacement therapy, chitotriosidase.

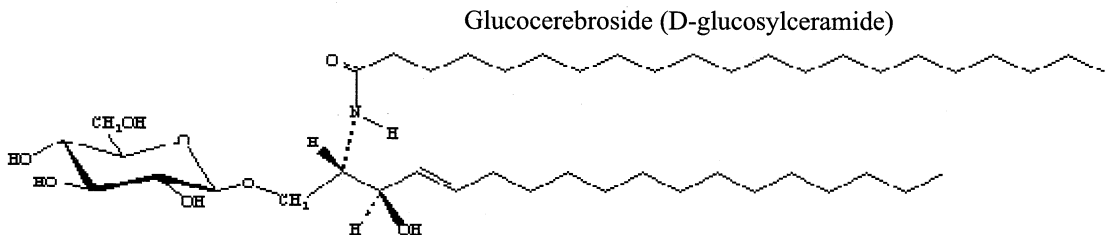
서론

Gaucher 병은 glucocerebrosidase (또는 β -glucosidase)의 결핍으로 인해 lysosome에 glucocerebrosidase가 축적되어 발병하는 상염색체 열성 유전성 질환으로 1번 염색체 장완 21(1q21)에서 missense, nonsense, frameshift, 그리고 deletion으로 인한 돌연변이가 일어나서 발병하는 질환이다¹²⁾. Gaucher 병은 1882년 Philippe C.E. Gaucher가 간장과 비장이 비대해진 환자의 병에 대해서 처음 기록하게 되어 Gaucher 병이라고 불리게 되었다. 1924년에는 Gaucher 병에 걸린 환자의 비장으로부터 지방조직의 화합물이 분리되

었고, 10년 후에 이 화합물이 백혈구와 적혈구의 벽에서 발견된 성분인 glucocerebrosidase라는 것이 확인되었다(Fig. 1).

1965년에는 Brady와 그의 동료들이 Glucocerebrosidase의 결핍으로 인해서 Glucocerebrosidase가 축적된다는 것을 밝혀냈다. 일반적으로 40,000 ~ 60,000명 중에 한 명 정도가 Gaucher 병을 앓고 있으며, 증상의 진행 정도와 신경계 침투 여부에 따라 1형 (비 신경 장애성), 2형 (급성 신경 장애성) 그리고 3형 (아급성 신경 장애성)과 같이 크게 세가지 유형으로 나뉜다. Gaucher 병 환자의 치료는 비장절제술, 골수 이식 등과 같은 방법이 많이 쓰였으나 약 10여년 전부터는 효소대체요법 (enzyme replacement therapy, ERT)이 유용하게 이용되고 있다^{8,9)}.

Fig. 1. Structure of Glucocerebrosidase.



Gaucher 병의 치료 중 경과 추적을 위해서는 Chitotriosidase의 정량이 필요하다. 이에 본 연구에서는 Gaucher 병 환자에서 Chitotriosidase 측정을 이용한 치료 경과 추적을 시도하였다.

대상 및 방법

1) Gaucher 병 환자의 임상증상

Gaucher 병으로 확진되어 2004년11월까지 효소치료를 받았던 4가계 5명의 환자를 대상으로 하였다. 신경계의 침범이 없는 유형인 1형 환자는 4명이며, 심한 중추 신경계 침범을 보이며, 조기에 사망에 이를 수 있는 2형 환자는 없었고, 경한 중추 신경계의 침범을 보이며 빠른 진행을 보이는 3형 환자는 1명 이었다. 위의 환자들은 Gaucher 병의 특징적 증상인 빈혈, 혈소판 감소, 백혈구 감소로 인한 혈액학적 질환과 비장비대와 간비대증 및 골격계 침범으로 진행되는 성장지연 그리고 골절, 골괴사 등의 골격계 합병증 등을 나타내었다.

2) ERT 과정

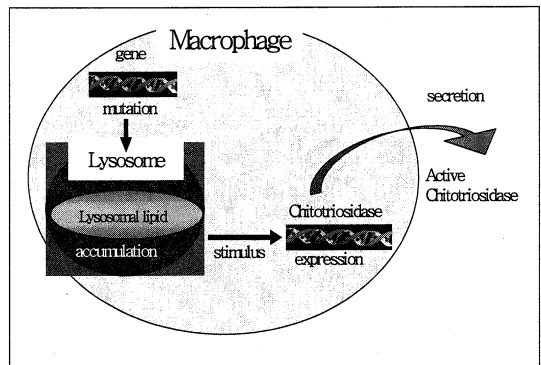
이들 환자에 대한 효소치료는 Cerezyme (Genzyme Co.)을 사용하였으며, 효소 치료 용량은 1형의 경우 2주간 30 U/kg, 2형과 3형은 2주간 50~60 U/kg이었다. 치료기간은 1~9년으로 각각 상이하였으나, 효소치료 후 3~12 개월 이내에 혈액학적 소견, 간비대증 감소 소견 등이 모든 형에서 관찰되었으며, 신경학적 증상은 호전됨이 없었다.

3) Chitotriosidase (EC 3.2.1.14)의 mechanism

Chitotriosidase는 chitin을 가수분해하는

chitinase 과에 속하며 chitinase 중에서 첫 번째로 사람에게서 발견된 효소이다¹¹⁾. Chitotriosidase는 Gaucher 병 환자의 다양한 조직 내에서 다량의 glucocerebroside가 축적된 활성화된 대식세포에서 선택적으로 발현된다¹⁰⁾. Glucocerebroside같은 복합지방물질이 축적되어 비대화된 세포인 대식세포를 "Gaucher cell"이라고 하며 chitotriosidase 활성도의 주요 원천 이라고 할 수 있다. Gaucher 병 환자의 대식세포 내에서 glucocerebroside의 축적과 같은 적정 자극이 수반되면 대식세포는 다량의 chitotriosidase를 합성할 수 있다. 이렇게 새로 합성된 chitotriosidase는 C-말단 chitin 결합 부위를 지닌 50kDa 활성효소로서 세포 밖으로 분비된다³⁾ (Fig. 2).

Fig. 2. Diagram of Secretion Procedure of Chitotriosidase from Activated Macrophage

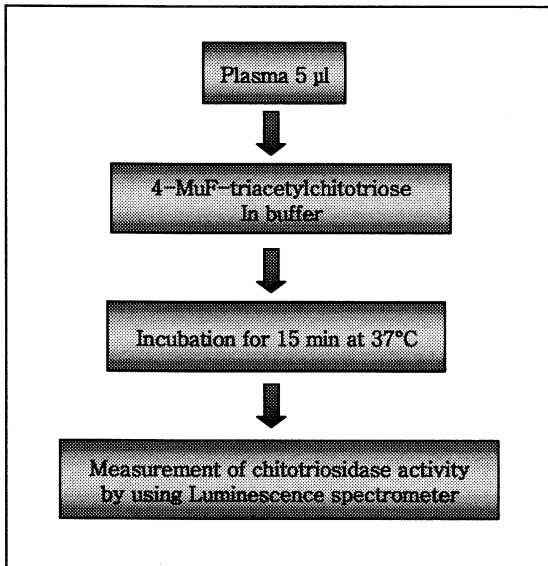


4) Chitotriosidase 활성도 측정방법

혈액에서 혈장을 분리하여 chitotriosidase의 기질인 4-MuF-triacetylchitotrioside 을 첨가하고 37°C에서 15 분 동안 반응시킨다. 해당 시간 경과 후, stopping buffer (1 M Na2CO3 buffer pH 10.7)로 반응을 정지시킨다. 반응 시 4-MuF-triacetylchitotrioside가 chitotriosidase에 의

하여 가수분해 될 때 방출되는 4-MuF를 Luminescence spectrometer로 계측하여 chitotriosidase 활성도를 측정한다 (Fig. 3).

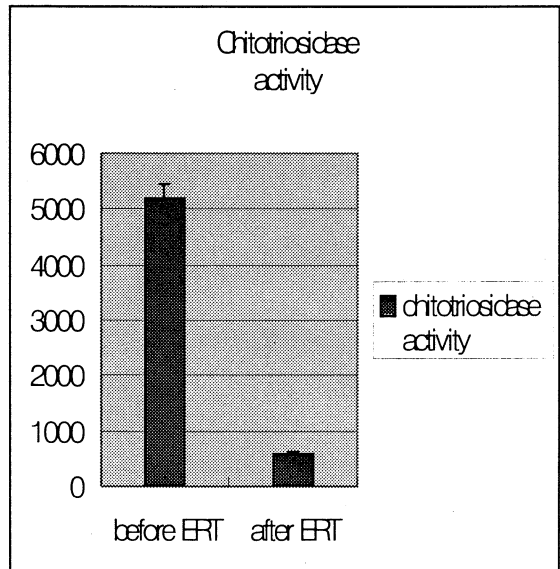
Fig. 3. Procedure of Chitotriosidase Activity in Plasma



결 과

Gaucher 병의 임상증상은 혈장 내의 chitotriosidase 활성도의 증가와 관련되어 나타난다. 이 효소의 활성도는 정상인의 경우 4~76 nmol/mL/hr을 나타내며 환자의 경우 3,000~60,000 nmol/mL/hr로 수백 배 이상의 차이를 나타낸다⁴⁾ (Fig. 4). 본 연구에서 chitotriosidase의 활성도의 측정은 4-MuF-triacetylchitotriose (Sigma chemical co.)를 이용하여 Fluorometry (Perkin Elmer, UK) 법으로 측정하였다.

Fig. 4. Change of Chitotriosidase Activity in Plasma by ERT



고 찰

효소치료를 받은 Gaucher 병 환자의 chitotriosidase 활성도를 측정한 결과 550~660 nmol/mL/hr을 나타내었다 (Table. 1). 이는 치료 이전의 활성도에 비하여 현저히 감소된 상태로서 치료가 효과적임을 나타내고 있으나, 치료기간과 chitotriosidase 활성도 감소와의 관계는 명확하지 않았다. 그러나 향후 효소대체치료를 맞추어 chitotriosidase의 활성도 측정을 병행하여 효소치료의 용량과 기간을 결정한다면 chitotriosidase의 활성도가 Gaucher 병 환자의 치료 결과 추적을 위한 효율적인 표지자로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

- 1) S.S.Raghavan, J.Topol, E.H.Kolodny: Leukocyte β -Glucosidase in Homozygotes and Heterozygotes for Gaucher Disease. *Am J Hum Genet* 1980;32:158-173.
- 2) Marie E, Grace, Karen M, Newman, Vladimir Scheinker, et al.: Analysis of Human Acid β -Glucosidase by Site-directed Mutagenesis and Heterologous Expression. *J. Biol. Chem.* 1994;269:2283-2291.
- 3) Cara E, M. Hollak, Sonja van Weely, et al.: Marked Elevation of Chitotriosidase Activity. *J. Clin. Invest.* 1994;93:1288-1292.
- 4) Rolf G, Boot, Edward F, C. Blommaar, Erwin Swart, et al.: Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *J. Biol. Chem.* 2001;276:6770-6778.
- 5) Kattlove HE, Williams JC, Gaynor E, Spivack M, Bradley RM, Brady RO: Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: An acquired abnormality. *Blood* 1969;33:379.
- 6) Nilsson O, Svennerholm L: Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem* 1982;39:709.
- 7) Hultberg B, Sjoblad S, Ockerman PA: 4-Methylumbelliferyl- β -glucosidase in cultured human fibroblasts from controls and patients with Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1973;49:93-97.
- 8) Zimran A, Hollak CE, Abrahamov A, van Oers MH, Kelly M, Beutler E: Home treatment with intravenous enzyme replacement therapy for Gaucher disease: an international collaborative study of 33 patients. *Blood* 1993;82:1107-1109.
- 9) Rosenthal DL, Dopplelt SH, Mankin HJ, et al.: Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: skeletal responses to macrophage-targeted glucocerebrosidase. *Pediatrics* 1997;96:629-637.
- 10) Young E, Chatterton C, Vellodi A, Winchester B: Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase. *J Inher Metab Dis* 1997;20:595-602.
- 11) Rolf G, Boot, Edward FC, Blommaart, Erwin Swart, et al.: Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *JBC* 2001;276:6770-6778.
- 12) Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BR, et al.: A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher disease. *N Engl J Med* 1987;316:570.