

199900358A

# 神経遺伝病の新しい治療法の開発に関する研究

(課題番号 H10-脳-006)

平成10年度厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

総括研究報告書・分担研究報告書

平成11年3月

主任研究者 鈴木 義之

(東京都臨床医学総合研究所)

## 目 次

1. 総括研究報告書 . . . . . 鈴木 義之
2. 分担研究報告書 . . . . . 大野 耕策
3. 分担研究報告書 . . . . . 衛藤 義勝
4. 分担研究報告書 . . . . . 樊 建強
5. 分担研究報告書 . . . . . 松田 潤一郎

## 神経遺伝病の新しい治療法の開発に関する研究

主任研究者 鈴木義之 東京都臨床医学総合研究所・副所長

### 研究要旨

現在、多くの神経遺伝病の代謝異常が明らかにされ、診断法が確立された。大部分は酵素欠損症である。しかし重篤な脳障害に対する本質的な治療法はまだない。そこで中枢神経系を直接のターゲットとする新しい治療法を開発するために、病態矯正、酵素あるいは遺伝子導入、発現した変異蛋白質の活性化などの方法による治療法の開発のための基礎的実験を行った。G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス、ファブリー病、C型ニーマン・ピック病、スライ病、セロイドリポフスチノーシスなどの遺伝性ライソゾーム病を対象として、ヒト患者並びにモデル動物の細胞、組織、個体のレベルでの解析をすすめた。特に標的破壊によるノックアウトマウス、遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス、その組み合わせによる特殊な遺伝子組換え動物個体を用いることにより、病態の過剰発現、酵素蛋白質や遺伝子ベクターの中枢神経系へのターゲティングを試みた。そして更にファブリー病については、特定の変異遺伝子産物の細胞内安定化・活性化による新しい治療法の可能性を示した。また多くの変異個体のシナプス形成障害や神経細胞死の発生機序の解明により、新しい治療法の可能性も検討した。

### 分担研究者

大野耕策・鳥取大学医学部・教授  
衛藤義勝・東京慈恵会医科大学・教授  
樊建強・東京都臨床医学総合研究所・研究員  
松田潤一郎・国立感染症研究所・主任研究官

### 研究協力者

大島章弘・国立感染症研究所・客員研究員  
岡明・鳥取大学医学部・助教授  
岡戸信男・筑波大学基礎医学系・教授  
難波栄二・鳥取大学遺伝子実験施設・助教授

### A. 研究目的

現在10,000種ほどの遺伝病が記載されており、その多くは小児期に発生する重篤な神経疾患である。しかしフェニルケトン尿症など、一部の病気に対する食事療法をのぞけば、脳障害の予防法はない。特に脳の病変を直接のターゲットとする本質的な治療法はまだ開発されていない。本研究は酵素欠損による代謝異常が明らかにされた神経遺伝病を対象として、2つの異なった戦略により脳病変の予防・治療法を開発することを目的とする。第1は疾患特異的な分子治療である。ここで扱う分子種は蛋白質と遺伝子である。これらの機能分子を

いかに効率よく中枢神経系に到達させるか、あるいは病気を持つ患者の細胞が発現する変異蛋白質の機能をいかに細胞内で活性化させるかという問題を解決するために分子生物学的・細胞生物学的な解析を進めた。第2は神経系の病態を矯正するための研究である。発達脳の機能障害に特有なシナプス形成・可塑性という現象に伴う病態の矯正を視野に入れた神経薬理学的研究、ならびに遺伝子変異の結果として生ずる神経細胞死の発生機構を解明し、治療法を開発するための細胞生物学的研究を行った。

これらの目的のために、本研究では主に遺伝性ライソゾーム病を対象として、その分子病態、細胞・組織病態、そして罹患個体の疾病病態をそれぞれの専門家の共同作業により解明し、その成果をもとに新しい治療法を開発することを目指した。具体的にはG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス、ファブリー病、C型ニーマン・ピック病、スライ病、セロイドリポフスチノーシスなど、多様な病態を発現する疾患群について、その基本的な組織病態を分析し、特異的な分子病態に迫るために遺伝子導入、酵素補充、酵素活性化などのアプローチを試みた。

近年、小児期の病気の性質が変化し、慢性疾患特に遺伝性疾患の割合が飛躍的に増加している。その中核症状としての中枢神経系病変の予防治療への社会的要請が強い。現在のところ、この種の

病気に対しては上記のような対症療法以外、医学的な対応は不可能であり、その成果は直ちに大きな医学的社会的なインパクトを与えるであろう。

## B. 研究方法

### 1. 材料

正常または疾患をもったヒト・ラット・マウスなどの個体から得られた培養線維芽細胞、培養リンパ球、骨髄細胞、脳組織、体液などをそれぞれの条件で採取・保存あるいは培養し、形態観察、化学分析、遺伝子分析などに用いた。

モデル動物は自然発生のスライ病マウス、C型ニューマン・ピック病マウスのほかに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子導入トランスジェニックマウス、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子導入トランスジェニックマウスを人工的に作成し、それぞれ $G_{MI}$ -ガングリオシドーシス ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症)、ファブリー病 ( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症) の病態解析や治療実験の材料とした。

### 2. 病態解析

これらの疾患の脳病態発生の1つの要因であるシナプスに対するセロトニンの役割を解析するために、セロトニン受容体のラット脳内分布を、特異的な抗5-HT<sub>2A</sub>受容体蛋白質抗体を作成して、免疫組織科学・免疫電顕的な観察により調べた。

また神経遺伝病における神経細胞死の発生機序を調べるために、セロイドリポフスチノーシス幼児型 (ジャンスキー・ビルショウスキー型) 症例脳組織におけるCLN2遺伝子の発現様式をウェスタンブロットにより検索した。また免疫組織化学的観察もあわせて行った。同様にC型ニューマン・ピック病マウス脳組織のコレステロール・ガングリオシド染色により、神経細胞死との時間的な関係を解析した。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスの病態はこれまでに報告したが、来年度以降に開始するモデル動物個体レベルでの治療実験の基礎データとする目的で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子導入トランスジェニックマウスの個体における酵素活性発現分布を解析した。

### 3. 遺伝子治療

マウス・ラットに対するアデノウイルスベクターによる遺伝子治療実験を行った。正常妊娠ラットの子宮内にLacZを発現するアデノウイルスベクターを投与後、胎児臓器での発現を検討した。また $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスの新生児期にこの酵素を発現するアデノウイルスベクターを大量に静脈内投与し、組織・体液中の酵素活性・基質量を分析した。

### 4. 酵素補充療法

中枢神経系をターゲットとするため、酵素蛋白

質自体ではなく、マクロファージをキャリアーとして中枢神経系への遺伝子・酵素蛋白質導入の試みを行った。スライ病マウスの骨髄細胞をCSF-1を含む培地で培養し、欠損酵素 $\beta$ -グルクロニダーゼを発現するレトロウイルスベクターを感染させた。12日後にマウスに移植し、以後の組織内活性発現を検討した。

### 5. 酵素活性化療法

ファブリー病患者由来の線維芽細胞、リンパ球を培養し、その発現蛋白質の分子特性を詳細に調べたあと、特定の変異蛋白質について、酵素反応産物であるガラクトース類似の構造を持つ低分子化合物による活性化実験を行った。本年度は一次スクリーニングにより効果が確認された1-デオキシガラクトノジリマイシンを使用し、正常遺伝子ならびに心筋型ファブリー病患者の変異遺伝子R301Q発現産物を対象として細胞・個体レベルでの検討を行った。培養系では $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子を導入したCOS-1細胞に対する効果を調べ、個体レベルでは $\alpha$ -ガラクトシダーゼトランスジェニックマウスへの経口投与により、酵素活性の変動を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 病態解析

#### a) ラット脳セロトニン・シナプス分析

成体ラット大脳皮質のほぼすべてのニューロンの、特に胞体と先端樹状突起で、5-HT<sub>2A</sub>受容体が発現していた。そしてグルタミン酸作動性シナプスと考えられるシナプスの後シナプス膜肥厚部直下に5-HT<sub>2A</sub>受容体構造が観察された。セロトニンが5-HT<sub>2A</sub>受容体を介してグルタミン酸神経伝達機構を調節すると予想された。そこでセロトニン除去ラットの大脳皮質を調べたところ、NMDA受容体は変化せず、AMPA受容体が増加していた。そして各受容体サブタイプに対する抗体を用いた定量的免疫沈降により、セロトニンがシナプス数と興奮性を通じて脳の可塑性に関与することを示唆するデータが得られた。また5-HT<sub>2A</sub>受容体が小脳プルキンエ細胞、脊髄前角細胞・神経節細胞に発現していた。しかし脊髄神経節にはセロトニン線維はなく、ミスマッチの所見であった。

ダウン症候群、フェニルケトン尿症などの神経遺伝病やストレスなどの環境要因により脳内生体アミン濃度、そして脳内シナプス密度が低下し、小児期の発達脳障害に至ることを予想し、妊娠ラットを過密環境で飼育するとともに疼痛ストレスを与えたところ、生後35日で仔ラット海馬のセロトニン濃度、シナプス密度とも低下していた。Morris水迷路試験による記憶学習は正常であったが、学習訓練後に新しい状況に対応する能力が低下していた。

#### b) セロイドリポフスチノーシス

ウェスタンブロットで正常対照脳に存在する49 kDaのバンドはCLN2遺伝子と考えられ、実際、セ

ロイドリポフスチノーシス患者脳ではこのバンドが消失していた。この蛋白質の免疫化学染色により、病気のない成人大脳皮質の神経細胞・グリアの細胞質内に顆粒状のシグナルが認められた。ライソゾームへの局在を示す所見であった。

c) C型ニーマン・ピック病

モデルマウスの大脳皮質神経細胞には細胞数の減少がなかったが、小脳プルキンエ細胞は生後6週から8週の間速やかに脱落し、引き続き視床VPL/VPMの神経細胞が死亡直前の13週までにほぼ脱落した。小脳顆粒細胞は進行性の細胞密度低下はあったが末期までかなりの細胞が残っていた。また生後3週に大脳皮質・視床・扁桃体・脳幹の神経細胞、小脳プルキンエ細胞・顆粒細胞にPAS陽性物質が出現した。これらは以後9週まで

に減少したが、小脳分子層・視床にPAS陽性マクロファージが出現した。

ガングリオシドG<sub>M2</sub>の免疫染色により、生後6週の疾患マウス大脳皮質、視床、扁桃体、小脳顆粒細胞層・分子層、脳幹、三叉神経核、大脳白質に陽性細胞があった。ただし大脳白質、視床、小脳分子層の細胞はリゾチーム陽性で、マクロファージと考えられた。また通常のコレステロール染色操作では疾患マウス脳に異常はなかったが、0.5%ノニデットP処理により間質のコレステロールを除去後に染色すると、大脳皮質・海馬の大型錐体神経細胞、プルキンエ細胞、顆粒細胞などの神経細胞内にもコレステロールが蓄積していることが分った。

表1 トランスジェニックマウス臓器のβ-ガラクトシダーゼ活性

	脳	肝臓	脾臓	腎臓	筋	心臓	肺	尾
野生型	80.3	84.7	153.8	150.6	10.5	13.0	71.6	161.4
トランスジェニック	337.7	448.6	640.1	699.9	662.0	411.9	264.7	1391.2

野生型：ヒト遺伝子を持たない野生型マウス (-/-)、トランスジェニック：ヒト遺伝子導入によりヒト酵素活性を過剰発現する遺伝子組替えマウス (+/-)

酵素活性：4メチルウンベリフェロン誘導体に対する活性 (nモル/mg蛋白質/時間)

d) β-ガラクトシダーゼ発現トランスジェニックマウス

トランスジーンを導入後誕生したマウス36頭中7頭にヒトβ-ガラクトシダーゼcDNAの挿入を確認した。うち2頭にβ-ガラクトシダーゼの強い活性上昇を認めた(表1)。

2. 遺伝子治療

妊娠ラットの子宮内への遺伝子導入は、投与時期により胎児組織の発現分布が異なることが分った。E9では肝臓、食道、胃に、E10では心臓に、E11では皮膚に感染した。E12で中枢神経系に感染したが、尾粘膜の神経末端より逆行性軸索流を通過して神経細胞に到達したものと考えた。

β-ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスには、この酵素の遺伝子を発現するアデノウイルスベクターの投与実験を行った。培養系では、疾患マウス由来の線維芽細胞に酵素活性が高度に発現した。マウスの一側後肢への筋注を試みたところ、反対側筋肉にも活性が発現した。そして大脳皮質への直接投与により多くの組織・体液ならびに刺入部周囲と大脳表面に活性を認めたが、脳実質の活性発現は確認できなかった。次にこのウイルスベクターを新生児ノックアウトマウスに静注したところ、2週間後に脳組織でβ-ガラクトシ

ダーゼ活性が正常の10%程度に上昇した(図1)。ほとんどの神経外組織でも活性が上昇していた。そして脳内G<sub>M1</sub>量は未治療マウスの半分程度に減少し、G<sub>A1</sub>の蓄積も軽度であった。しかし遺伝子投与5週後には未治療マウスとの間に蓄積量の差はなくなった。この間、尿中オリゴ糖の排泄量も減少していた。成熟マウスにアデノウイルスベクターを静注した場合には、肝臓と脾臓に強い酵素活性の発現が見られたが、他の臓器の発現は軽度であり、中枢神経系には活性発現を認めなかった。

3. 酵素補充療法

上記のノックアウトマウスへのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子治療実験における臓器内酵素活性発現は、臓器への直接投与の場合、過剰発現した酵素蛋白質が血流を通過して他の組織・細胞に運ばれたと考えるべきであり、間接的な酵素補充療法と言ってよい。

β-ガラクトシダーゼを過剰発現するトランスジェニックマウスについては、培養細胞を用いた酵素補充実験を行った。この遺伝子組替えマウス胎児から線維芽細胞を培養し、培養液へのβ-ガラクトシダーゼ分泌を調べたところ、トランスジェニックマウス由来の細胞は正常細胞に比べ、

10倍程度の酵素分泌増加があった。培養液に塩化アンモニウムを添加すると、正常細胞では10倍程度に分泌が促進されたが、逆にトランスジェニック細胞では変化がなかった。この過剰発現したトランスジェニック細胞培養液をノックアウトマウ

ス細胞の培養液に添加したところ、細胞内活性が著しく上昇した。このことから、トランスジェニックマウスは酵素補充あるいは骨髄移植などの治療実験のよいモデル動物として用いられる可能性があることが分った。

図1  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス新生児に対する遺伝子治療。アデノウイルスベクターに組込んだヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をノックアウトマウス新生児静脈内に注入し、2週間後に臓器内酵素活性を測定した。脳を含む全身臓器に酵素活性が発現していた。酵素活性：4メチルウンベリフェロン誘導体に対する活性（nモル/mg蛋白質/時間）  
□：非実験群、■：実験群

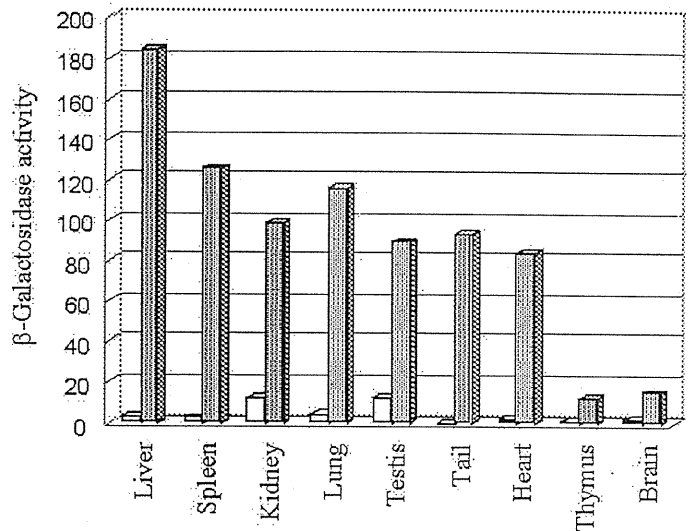
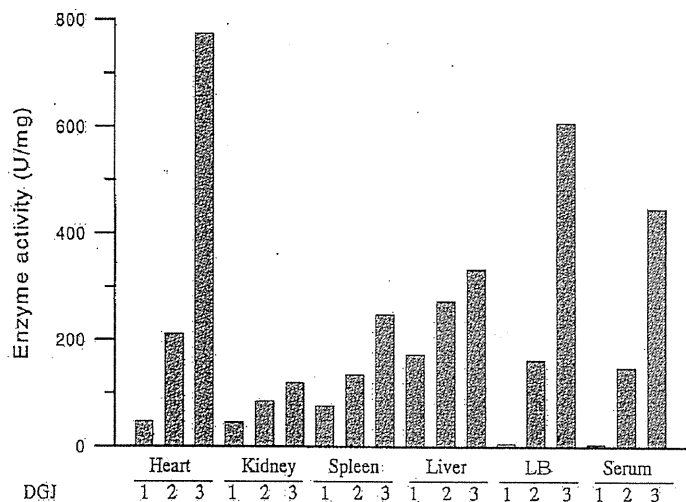


図2 R301Q 変異トランスジェニックマウスに対する1-デオキシガラクトノジリマイシン経口投与の効果。DJG：1-デオキシガラクトノジリマイシン、LB：リンパ芽球。投与量：なし(1)、0.05 mM水溶液(2)、または0.5 mM水溶液(3)。Fan JQ, et al: Nature Med 5: 112-115, 1999を改変。



細胞投与はスライブマウスを用いて行った。正常マクロファージを罹患マウスに移植したところ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は肝臓、脾臓で上昇した。移植後5週間は細胞が組織内に存在していた。5週後のムコ多糖蓄積も改善していた。ほかの臓器では明らかな活性上昇を認めなかった。レトロウイルスベクター処理後のマクロファージの投与でさらに著しい効果を認めた。

#### 4. 酵素活性化療法

Fabry病患者由来のR301Q変異遺伝子を持つリンパ球培養液に1-デオキシガラクトノジリマイシン(20  $\mu$ M)を添加し4日間培養した。培養細胞中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性は8倍に上昇し、正常人の50%まで回復した。この化合物は変異遺伝子を過剰に発現するCOS-1細胞、トランスジェニックマウスの線維芽細胞にも有効であった。その効果は0.2 - 20  $\mu$ Mの間で1-デオキシガラクト

ノジリマイシン濃度に比例して上昇し、最低5日間は安定であった。高濃度では酵素活性を阻害した。この実験条件下では、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA前駆体と成熟型酵素蛋白質の量が添加化合物の濃度に比例して増加し、酵素はライソゾームまで輸送された。

変異遺伝子 R301Qを導入して変異酵素を過剰発現するトランスジェニックマウス個体に1-デオキシガラクトノジリマイシンを1週間経口投与したところ、マウスの心臓、腎臓、肝臓、脾臓及び血清中の酵素活性が著しく上昇した(図2)。経口投与の140日間継続後、マウスの体重、臓器重量などに変化は見とめられなかった。

#### D. 考 察

この研究は小児期に発生する重篤な遺伝性神経疾患の新しい治療予防法を開発することを目的とし、異なった立場からの共同研究として多角的な治療へのアプローチを開始した。遺伝性疾患における脳障害の病態発生には2つの根本的に異なった分子細胞組織機構が存在する。ニューロン、グリアなど、脳組織を構成する細胞あるいは細胞ネットワーク機能自体に直接の障害をもたらす遺伝子異常がある場合と、本来神経系の機能統合には問題なく、他の細胞・組織の代謝障害が中枢神経系の機能障害を二次的に引き起こす場合である。

この研究は第1の分子機構を解明し、修復することが主要な目的であるが、第2のアプローチも十分に考慮した基礎的研究も開始した。その意味で研究内容を病態解析、遺伝子治療、酵素補充、酵素活性化の4つの側面に分けて整理した。それぞれの側面を1つの疾患について検討することは、技術的に必ずしも可能ではないし、研究効率が必ずしもよいとは限らないので、それぞれの側面をこれまですすめられてきた疾患について検討することからスタートした。最終的には少数の疾患に成果を適用して目的を達成するための努力をすることになる。

脳組織への治療的アプローチにはいくつかの技術的難点がある。フェニルケトン尿症やクレチン症のように、肝臓や甲状腺など、神経外組織で発生した分子病変の二次的な結果としての脳障害の予防治療をのぞいて、神経組織病変の治療はできていない。遺伝性ライソゾーム病は神経組織自体の病変による小児期の神経遺伝病として、もっともよく病態が理解されている疾患群の一つである。ライソゾームというきわめて特殊な環境を持つ細胞内オルガネラで発生する病態は、矯正や治療を考えるのによいモデル実験系である。現在では、すでに診療レベルで、その成果の一部は神経系以外の臓器治療を目的とした酵素補充療法として試みられているが、神経組織への効果は確認されていない。

そこで本研究ではいくつかの遺伝性ライソゾーム病の分子病態、細胞・組織病態、そして個体の疾患病態の基本的な解析と治療法の開発研究を開

始した。具体的にはそれぞれの研究者のこれまでの成果をさらに発展させるべく、 $G_{MI}$ -ガングリオシドーシス、ファブリー病、C型ニーマン・ピック病、スライ病、セロイドリポフスチノーシスなどを取りあげた。これらはいずれも単一遺伝子変異に基づく病気であり、ファブリー病以外の病気にはすべて脳組織の病態が存在し、分子治療を考えるのに適当な対象であると予想した。ファブリー病の罹患細胞は血管系・心筋その他の一般臓器であるが、自律神経障害や脳血管障害などの脳病変を起こす全身病であり、分子操作の技術的な理由もあって今回の研究対象の1つとした。

治療法開発の前提としての病態解析にはいくつかのアプローチを用いた。すでに脳内セロトニン濃度とシナプス形成には密接な関係があることを示したが、本年度の研究により、セロトニンレセプターの脳内分布が明らかになり、セロトニンがシナプス密度を促進する可能性についてさらに積極的なデータが得られた。この成果は、すでにセロトニン脳内濃度が低下していることが確認されているフェニルケトン尿症やダウン症候群ばかりでなく、遺伝性ライソゾーム病でも類似の病態が存在することが予想されている。現在 $G_{MI}$ -ガングリオシドーシスモデル動物の脳について検討を開始したところである。この遺伝性ライソゾーム病においてシナプス形成異常が報告されているからである。もしこの方向からのアプローチが可能であれば、本質的な脳の病態ではないにしても、発症を遅らせ症状を軽減させることができるであろうし、特に年長児や成人発症の遅発遷延例に対して、発症予防という一つの臨床応用に結びつく可能性がある。

遺伝子変異と神経細胞死は、詳細な機構が明らかになれば、脳の機能を守り、治療予防に結びつく可能性がある。C型ニーマン・ピック病はコレステロール輸送障害を伴う遺伝性脳変性疾患であるが、その病態は全く分っていない。今回の研究により、神経系におけるニューロン変性の分布とコレステロール蓄積の関係がある程度まで明らかになった。またセロイドリポフスチノーシス症例の変異遺伝子が機能蛋白質を発現しないという結果は、細胞死とのつながりを今後調べる上で貴重な情報を提供した。同時にこの抗血清を用いた診断の可能性も考えられた。 $G_{MI}$ -ガングリオシドーシスにおける神経細胞死とともに、さらに詳細な分析をすすめる予定である。

ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの作製という発生工学的手法による材料の作成は、現在遺伝疾患の解析に不可欠である。研究統括者らは $\alpha$ -ガラクトシダーゼと $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のベクター作成により、これらの遺伝子組換え動物を作成し、病態の解明や治療法の開発に利用している。その個体レベルでの遺伝子発現とその修飾は、今後の研究に基本的な情報を提供するし、全く新しい展開を見せる可能性がある。ヒト個体に遺伝子を過剰発現させることは現在は達成されていないが、類似のモデルシステムの作成の可能性は十分に考慮できるであろう。そ

の意味で特に今回作成した2種の遺伝子のトランスジェニック動物の作成は、単に正常遺伝子の導入のみならず、任意の変異を持った個体を作成することができ、自然発生の変異個体の表現型をいろいろなレベルで増強発現できるという利点があるので、今後の治療開発に大きな意味を持つと考える。

遺伝子治療には2つの意味がある。一つはある特定の細胞種に標的蛋白質を大量に発現させ、周囲のあるいは遠隔の臓器組織の細胞に供給することによって、代謝障害を矯正するものであり、これは本質的には酵素補充療法と変わらない。本研究の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するベクターの個体の組織への直接投与により、全身の組織の酵素活性が上昇したのはこの意味の酵素補充であった。モデル動物を用いたレベルの実験であり、非神経組織への蛋白質補給という意味はあるが、この研究の最終目標である脳組織の酵素活性化につながることは難しいようである。しかしながら、マクロファージなど、中枢神経系に到達する可能性のある細胞に蛋白質機能を発現させることにはまだ希望があり、今後も研究を続ける予定である。

個体発生の早期に遺伝子を全身臓器に投与して、脳を含む多くの細胞や組織に発現させようとする試みは、ヒト個体での実現はまだしばらく先の話であろうが、モデル動物胎児あるいは新生児への遺伝子投与の結果を見ると、この発達段階では機能高分子が神経組織・ニューロンに到達する可能性を示している。今後技術的側面の開発により、ヒト患者の治療に向けて詳細に検討する価値のあるアプローチ法であると考えた。ただし、脳組織全体での酵素活性発現は、必ずしもニューロンでの活性発現を意味するものではなく、今後神経系の細胞種別の遺伝子発現様式を検討する予定である。

遺伝子病の詳細な病態分析が近い将来の治療の可能性に結びついたのが、今回の研究成果の一つであるファブリー病に対する酵素活性化療法である。この病気の原因となる変異酵素蛋白質の中には、正常な酵素に比べ酵素学的な性質に大きな差はないが細胞内安定性が著しく劣る分子があることが、我々の研究で明らかになっていた。その結果、細胞内合成はおそらく正常に行われるにもかかわらず、速やかに不活性化され分解されてしまうのであろう。そして実際、特定の変異遺伝子を持つ患者由来の培養リンパ球の培養液に、酵素の反応生成物であるガラクトースを高濃度で添加することにより、酵素活性が著しく回復することが分った。つまりこれらの症例では、患者由来の酵素活性の減少や消失が、その活性中心の機能障害によるのではなく、おそらく蛋白質高次構造の異常により細胞内安定性が変化する結果であると解釈してよいようである。

そこで、酵素分子の正常な立体構造を維持するために、よりよい安定化効率を持つガラクトース類似の化合物を探索した。ガラクトースの場合、培養細胞系では培養液中200 mMという高濃度の添

加が必要であり、これはヒト患者に投与する量・濃度を明らかに超えているからである。その結果、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの競合的阻害剤の1つである1-デオキシガラクトノジリマイシンが、探索した化合物の中では、この目的に最も有効であることが分った。これまでの分析データによると、この化合物は酵素の生合成自体には影響がなく、変異酵素の輸送・成熟化に関与しているようである。この活性化は変異遺伝子を導入したトランスジェニック個体でも観察され、数ヶ月の期間内では見るべき副作用は見られなかった。今後さらにノックアウト・トランスジェニック合併の個体系での有効性、そして長期投与の毒性などを詳細に検討し、薬剤開発の努力を続けることにした。

## E. 結論

現在、遺伝性ライソゾーム病に対しては、欠損酵素を個体に投与する酵素補充療法という対症療法がすでに開始され、その有効性は広く確認されている。しかしながら、もっとも大きな問題である脳障害という臨床症状の改善、予防にはつながっていない。本研究ではこの側面の見直しを含め、病態を改善し、欠損酵素を新しい立場から細胞内で守るという研究を開始した。ファブリー病に対する新しい分子治療法は、他の類似疾患にも適用が可能であり、疾患あるいは酵素特異的な化合物のスクリーニング、その有効性の確認を続けることにより、全く新しい概念の治療法が生まれるであろう。ただしこのアプローチはすべての変異遺伝子・蛋白質に適用できるものではないことは銘記すべきであり、ほかの方法による本質的な治療法も同時に検討しなければならない。

その意味でシナプス形成や細胞死という基本的な病的減少をもでる疾患の解析を通じて明らかにすることは、さらに新しい発達脳障害の治療や予防につながるであろう。その意味でこのグループ研究がこの数年以内に極めて大きな成果を上げる可能性があることを強調しておきたい。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1) Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y: Accelerating transport and maturation of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Med* 5: 112-115, 1999.
- 2) Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Tabuchi K, Yamamoto H, Yamamoto T, Yoshikawa S, Okano H, Okado N: Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol Brain Res* 54: 199-211, 1998.
- 3) Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N: Maternal stress induces synaptic loss and



- developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci* 16:209-216, 1998.
- 4) Ichisaka S, Ohno K, Yuasa I, Nanba E, Sakuraba H, Suzuki Y: Increased expression of  $\beta$ -hexosaminidase a chain in cultured skin fibroblasts from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Brain Dev* 20:302-306, 1998.
  - 5) Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Taya C, Yonekawa H, Okumiyama T, Matsuda Y, Mannen K, Takeshita M, Suzuki Y:  $\alpha$ -Galactosidase transgenic mouse: heterogeneous gene expression and posttranslational glycosylation in tissues. *Glycoconjugate J* 15: 591-594, 1998.
  - 6) Koike T, Ishida G, Taniguchi M, Higaki K, Ayaki Y, Saito M, Sakakihara Y, Iwamori M, Ohno K: Decreased membrane fluidity and unsaturated fatty acids in Niemann-Pick disease type C fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1406: 327-335, 1998.
  - 7) Kubota N, Akagi T, Kueda k, Saito S, Nanba E, Brewster BS, Strong PN, Hashimoto E: Studies on a  $Ca^{2+}$ - and cyclic nucleotide-independent H1 histone kinase purified from rabbit skeletal muscle. *Yonago Acta Med* 41: 31-44, 1998.
  - 8) Maeshima T, Ito R, Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Shutoh F, Okado N: The cellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. *Brain Res* 797:118-124, 1998.
  - 9) Maeshima T, Shutoh F, Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Ito R, Okado N: Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* 252:72-74, 1998.
  - 10) Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O, Ogura A: Birth of pups by transfer of mastomys embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod* 1:180, 1998.
  - 11) Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O, Ogura A: Birth of pups by transfer of Mastomys (*Praomys coucha*) embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod*, 51 Suppl 1:180-181, 1998.
  - 12) Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A, Matsuda J: Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999.
  - 13) Murakami F, Shimomura T, Kotani K, Ikawa S, Nanba E, Adachi K: Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese. *J Hum Genet* 44:15-17, 1999.
  - 14) Ogura A, Inoue K, Matsuda J: Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum Reprod*, in press.
  - 15) Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y, Matsuda J: Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5611-5615, 1998.
  - 16) Ohashi T, Iizuka S, Sly WS, Machiki K, Eto Y: Efficient and persistent expression of  $\beta$ -glucuronidase gene in CD34+ cells from human umbilical cord blood by retroviral vector. *Eur J Haematol* 61: 235-239, 1998.
  - 17) Oka A, Kurachi Y, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S: The expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neurosci Lett* 257:113-115, 1998.
  - 18) Oka A, Takashima S: Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neurosci Lett* 252:195-198, 1998.
  - 19) Saji M, Kimura M, Maki H, Nakayama K, Nomura T, Nanba E, Ohno K: Tuberous sclerosis 2 gene is expressed at high levels in specific types of neurons in the mouse brain. *Yonago Acta Med* 41: 55-63, 1998.
  - 20) Sato M, Akaboshi S, Katsumoto T, Tai T, Sakuraba H, Ohno K: Accumulation of cholesterol and G<sub>M2</sub> ganglioside in cells cultured in the presence of progesterone: an implication for the basic defect in Niemann-Pick disease type C. *Brain Dev* 20: 50-52, 1998.
  - 21) Suzuki Y: Hereditary  $\beta$ -galactosidase deficiency: Genotype-phenotype correlation and molecular diagnosis. Kurstak E (ed): *Genes in Medical Diagnosis and Therapy*, Springer-Verlag, Vienna, in press.
  - 22) Suzuki Y: Inheritance and genetic factors in early brain damage. Velickovic Perat M, Neville B (eds): *Cerebral Palsy*, Elsevier, Amsterdam, in press.
  - 23) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E:  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis and Morquio B disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, McGraw-Hill, New York, in press.
  - 24) Tomie Y, Horie Y, Tajima F, Kitaoka S, Nanba E, Yuasa I, Kawasaki H: Mutation in the exon10 (R173W) of the hydroxymethylbilane synthase gene in two unrelated Japanese families with acute intermittent porphyria. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 99:5-15, 1998.
  - 25) Toyoshima M, Hara T, Zhang H, Yamamoto T, Akaboshi S, Nanba E, Ohno K, Hori N, Sato K, Takeshita K: Ataxia-telangiectasia without immunodeficiency: Novel point mutations within and adjacent to the phosphatidylinositol 3-kinase-like domain. *Am J Med Genet* 75: 141-144, 1998.
  - 26) Watanabe Y, Akaboshi S, Ishida G, Takeshima T, Yano T, Taniguchi M, Ohno K, Nakashima K: Increased levels of G<sub>M2</sub> ganglioside in fibroblasts from a patients with juvenile Niemann-Pick disease type C. *Brain Dev* 20: 95-97, 1998.
  - 27) Wenger DA, Suzuki K, Suzuki Y, Suzuki K: Galactosylceramide lipidosis: globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, McGraw-Hill, New York, in press.
  - 28) Yamamoto T, Nanba E, Zhang H, Sasaki M, Komaki H, Takeshita K: The jimpy/msd mouse mutation and connatal Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 75: 439-440, 1998.

29) Zhang H, Yamamoto T, Nanba E, Kitamura Y, Terada T, Akaboshi S, Yuasa I, Ohtani K, Nakamoto S, Takeshita K, Ohno K: A novel TSC2 Mutation in a patient with pulmonary tuberous sclerosis: Lack of LOH in a lung cyst. *Am J Med Genet* 82: 368-370, 1999.

#### 学会発表

1) Fan J-Q, Ishii S, Asano N, Suzuki Y: Inhibitors enhance lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts: a possible molecular therapy for a genetic disorder. Third Annual Conference of the Society for Glycobiology, 1998.11.11-14, Baltimore, MD, USA.

2) Ohno K: Recent molecular and cellular studies in Niemann-Pick disease type C. International Symposium of Lipidosis and Allied Disorders, 1998.7.9-10, Tokyo.

3) Oshima A, Matsuda J, Kitamura Y, Takimoto H, Itoh M, Fan J-Q, Suzuki Y: Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human  $\beta$ -galactosidase gene in  $G_{M1}$ -gangliosidosis mice. The 4th Annual Meeting of The Japan Society of Gene Therapy, 1998.7.4-5, Tokyo, Japan.

4) Suzuki Y: Convulsive seizures in neurogenetic diseases. Eastern European School of Epilepsy in Childhood and Adolescence, 1998.4.25-27, Moscow, Russia

5) Suzuki Y: Molecular genetic techniques for diagnosis in neurodegenerative diseases. Symposium: Diagnostic Procedures and Techniques in Child Neurology, 1998.9.11-12, San Sevelo, Venice, Italy.

6) Suzuki Y, Matsuda J, Oshima A: Murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis: comparison with human counterpart. Niemann-Pick disease type C and allied disorders, 1998.11.16, Yonago, Japan.

7) Suzuki Y, Matsuda J, Oshima A, Takimoto K: Targeted disruption of murine  $\beta$ -galactosidase gene: an animal model of human  $G_{M1}$ -gangliosidosis. International Symposium of Lipidosis and Allied Disorders, 1998.7.10, Tokyo, Japan

8) Suzuki Y, Percy AK: Neurogenetics: General principle and its clinical application. 25th International Child Neurology Congress, 1998.9.13-17, Ljubljana, Slovenia.

9) Taniguchi M: Not only cholesterol but also glycolipids metabolism are affected in NP-C. International Symposium of Niemann-Pick disease type C and Allied Disorders. 1998.11.16, Yonago.

10) Yamada A: Thalamus (VPL and VPM nuclei) is a vulnerable site in the model mice of NP-C: transsynaptic neuronal cell death? International Symposium of Niemann-Pick disease type C and Allied Disorders, 1998.11.16, Yonago.

11) 松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之:  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み。第45回日本実験動物学会総会、1998.5.28-30, 松本。

12) 大橋十也、小林博司、衛藤義勝: マクロファージ移植によるムコ多糖症VII型 (Sly病) の治療。日本先天代謝異常学会、東京、1998.10.11-12。

13) 大島章弘、松田潤一郎、鈴木義之: ヒト酸性 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子導入マウス。第41回日本先天代謝異常学会、1998.11.12-13, 東京。

14) 滝本一広、松田潤一郎、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、高野薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之:  $G_{M1}$ ガングリオシドーシスマウスの病態解析—蓄積物質の加齢変化— 第15回日本疾患モデル動物学会、1998.11.27-28, 東京。

15) 谷口美也子、Vanier MT: 檜垣克美二宮治明、大野耕策Niemann-Pick病C型に欠損する機能は細胞内コレステロールとガングリオシドの輸送に関与する。第71回日本生化学会・シンポジウム「膜脂質の細胞内輸送とアッセムブリー」 1998.10.14-17, 名古屋。

16) 富永里香、難波栄二、稲田亜美、山本俊至、竹島多賀夫、北村幸郷、谷口美也子、大野耕策、大島章弘、松田潤一郎、鈴木義之:  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス: 細胞培養を用いた神経変性メカニズム。第41回日本先天代謝異常学会、1998.11.12-13, 東京。

17) 山田敦子、佐治真理、二宮治明、大野耕策: ニーマンピック病C型モデルマウス脳における領域特異的神経細胞死第21回日本神経科学会・第41回日本神経化学会合同大会、1998.9.21-23, 東京。

18) 山本重則、大塚里子、金澤正樹、阿部博紀、新美仁男、高柳正樹、大竹明、黒木陽子、桜庭均、鈴木義之: ヒト肝型carnitine palmitoyltransferase I (CPT1-A) cDNAのクローニングと全身型CPT1欠損症日本人患者3家系の遺伝子解析。日本人類遺伝学会第43回大会、1998.10.14-16。

19) 山本重則、大塚里子、新美仁男、向後利昭、金澤正樹、高柳正樹、大竹明、黒木陽子、鈴木義之: ヒト肝型carnitine palmitoyltransferase I (CPT1-A) 遺伝子の解析。第41回日本先天代謝異常学会、1998.11.12-13, 東京。

20) 山本俊至、難波栄二、赤星進二郎、小枝達也、大野耕策、乾幸治、岡田伸太郎、田中あけみ: 日本人Niemann-Pick病C型患者の遺伝子解析-臨床症状と遺伝子異常。第40回日本小児神経学会、1998.6.4, 横浜。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（分担）研究報告書

リソソーム病モデルマウス脳内への蛋白質・遺伝子ターゲティング法の開発

分担研究者 大野耕策 鳥取大学医学部教授

研究要旨 リソソームからの遊離型コレステロールの輸送に欠陥のあるニーマン・ピック病C型の原因遺伝子の1つNPC1が1997年に単離されたが、遺伝子機能は明らかではない。この疾患のモデルマウスと考えられてきたC57BL/KsJ系の変異マウスもnpc1に欠陥を持つことが明らかになり、この疾患の治療法開発に有効なモデルである。今年度、神経系治療の標的とすべき分子を明らかにする目的で、このモデルマウスの脳内蓄積物質の検討を行い、コレステロールの蓄積ではなく、ガングリオシッド蓄積が神経変性に大きい役割を持っている可能性を見いだした。今後、このガングリオシッド蓄積を標的とした治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

リソソームからの遊離型コレステロールの輸送に欠陥があると考えられるニーマン・ピック病C型の原因遺伝子の1つNPC1は1997年に単離されたがその遺伝子機能はまだ十分明らかではない。この疾患は進行性痴呆、ジストニア、垂直眼球運動障害などの神経症状を主症状とする。日本で発見されたC57BL/KsJ系の突然変異マウスは相補試験からこの疾患遺伝的モデルと考えられてきたが、同じ遺伝子npc1に欠陥を持つことが明らかになった。この疾患では、培養細胞レベルではリソソームからのコレステロール輸送に欠陥があると考えられてきたが、脳ではコレステロール量の増加はなく、ラクトシルセラミド、ガングリオシッドGM2やGM3などの増加が知られていた。我々は、1996年患者培養細胞には、ガングリオシッドGM2がリソソームに蓄積し、この蓄積はコレステロール蓄積による二次的なものではなく、本疾患に欠損する機能は、コレステロールとGM2を中心とするガングリオシッドの輸送にも関与すると考えてきた。このモデルマウスの治療に当たって、これらのどの蓄積物またはどのような生化学的異常が神経変性と関与しているかを明らかにする必要があった。今年度は脳内蓄積物質と神経変性との関係

を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

C57BL/KsJ系モデルマウス(SPMマウスと略す)をホモの卵巣を正常マウスに移植し、ヘテロ雄と交配することで、コロニーを維持した。出生10日目に尾の培養と培養細胞内のコレステロール蓄積からホモを診断し、3週齢、6週齢、9週齢で麻酔後、還流固定し、凍結切片を作成した後、Nissl染色、PAS染色、ガングリオシッドGM2、フィリピン染色によるコレステロール染色に加え、リゾチーム抗体によるマクロファージ染色を行った。

C. 研究結果

*Nissl* 染色

Nissl染色で脱落神経細胞について検討した。プルキンエ細胞はこれまで報告されたように、6週頃より脱落し8週にはほぼ脱落した。また、視床VPL/VPm神経細胞がこれに引き続いて死亡直前の13週までにほぼ脱落することを見いだした。小脳顆粒細胞も進行性に細胞密度は低下したが、末期までかなりの細胞が残った。大脳皮質の神経細胞は明らかな細胞数

の減少は認めなかった。

#### PAS 染色

PAS 染色は正常でも白質は染色するが、大脳皮質などの神経細胞は染色されなかった。一方、3 週齢のホモでは、大脳皮質 3, 5, 6 層, 視床, 扁桃核, 脳幹の神経細胞, 小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞の胞体に PAS 陽性物質を認めた。6 週齢, 9 週齢と成長するにつれ、小脳ではプルキンエ細胞, 顆粒細胞で PAS 陽性が急速に減少し、PAS 陽性細胞は分子層に見られようになった。分子層の細胞は形態的にマクロファージであった。同様に視床でも、PAS 陽性神経細胞は年齢とともに減少し、マクロファージと考えられる細胞に交代した。また、大脳皮質では 5, 6 層の PAS 陽性細胞は減少し、3 層のみに PAS 陽性細胞を認めた。

#### ガングリオシッド GM2 染色

正常マウス脳では、脳内にはガングリオシッド GM2 が染色される部位は認めなかった。6 週齢のホモマウスでは、大脳皮質, 視床, 扁桃核, 小脳顆粒細胞層・分子層, 脳幹三叉神経核, 大脳白質の細胞胞体に蓄積が見られた。大脳白質, 視床および小脳分子層の細胞はリゾチーム陽性でマクロファージと考えられた。

#### コレステロールの蓄積

還流固定後クリオスタットで作成した脳切片を無処置でフィリピン染色しても、明らかな差を認めなかったが、0.5% ノニデット P で処理後、染色すると、脳間質のコレステロールが除去され、ホモでは、大脳皮質や海馬の大型錐体神経細胞, プルキンエ細胞, 顆粒細胞にコレステロールの蓄積を認め、神経細胞内にもコレステロールが蓄積していることが明らかになった。

#### D. 考察

発病する 6 週齢頃から 8 週齢にかけ、プルキンエ細胞が脱落し、その後死亡する 13 週齢までに視床 VPL/VPM 神経細胞が脱落することが明らかになった。

また小脳顆粒細胞も細胞数を減少させる可能性が示された。

この背景に興味のあることとして、PAS 陽性細胞の変化であった。3 週齢では PAS 陽性物質は小脳プルキンエ層, 顆粒細胞, 視床, 大脳皮質の神経細胞に存在するのに、6 週齢・9 週齢ではプルキンエ層, 顆粒細胞層には存在せず、また視床も神経細胞ではなくマクロファージに蓄積する様になった。PAS 陽性物質が小脳, 視床の変性と関与している可能性がある。この PAS 陽性物質としてガングリオシッド GM2 の可能性を考え、6 週齢で検討した結果では、PAS 陽性物質がガングリオシッド GM2 である可能性は高かった。

また、大脳皮質や海馬の錐体細胞にコレステロールが蓄積していたが、大脳皮質や海馬の神経細胞は明らかな細胞数の減少はなかった。しかし、生化学的にこれまで、コレステロール蓄積はないと考えられており、コレステロール蓄積も神経細胞変性に関与している可能性が示された。

#### E. 結論と今後の治療に向けての戦略

以上の結果から、ガングリオシッド蓄積とコレステロール蓄積のどちらも蓄積し神経変性に関与する可能性が示された。今後どちらの蓄積が神経変性に重要な役割を持つかを明らかにすると同時に、変性を起こす細胞に正常 npc1 遺伝子を導入した時の脳全体に及ぼす影響を明らかにするため、以下の 3 つの治療に向けた実験を計画中である。

① セラミドからグルコシルセラミドの過程を特異的に阻害する N-butyldeoxynojirimycin を投与し、ガングリオシッド蓄積を軽減させた場合の変化を追跡する。

② ホモマウス (spm/spm) と LDL 受容体欠損マウスと Ldlr<sup>tm1her</sup>/Ldlr<sup>tm1her</sup> を交配し、脳でのコレステロール取り込みをブロックしたマウスを作成し、外因性コレステロールを取り込ませなかった時の治療効果を検討する。

③ 小脳プルキンエ細胞特異的な遺伝子 pcp-2 (L7) のプロモーターを持つ NPC1 遺伝子をトランスジーンしたマウスを作成し、プルキンエ細胞の PAS 陽性物質とコレステロール蓄積を追跡し、臨床症状の変化

を明らかにする。

F. 研究発表 (本研究課題と関係のあるもの)

1. 論文発表

1) Masahiro Sato, Shinjiro Akaboshi, Tetsuo Katsumoto, Tadashi Tai, Hitoshi Sakuraba and Kousaku Ohno. Accumulation of cholesterol and GM2 ganglioside in cells cultured in the presence of progesterone: an implication for the basic defect in Niemann-Pick disease type C.

**Brain and Development 20: 50-52, 1998**

2) Yasuhiro Watanabe, Shinjiro Akaboshi, Gen Ishida, Takao Takeshima, Tamami Yano, Miyako, Taniguchi, Kousaku Ohno and Kenji Nakashima. Increased levels of GM2 ganglioside in fibroblasts from a patients with juvenile Niemann-Pick disease type C.

**Brain and Development 20: 95-97, 1998**

3) Tomohiro Koike, Gen Ishida, Miyako Taniguchi, Katsumi Higaki, Yoshikazu Ayaki, Makiko Saito, Yoichi Sakakihara, Masao Iwamori, Kousaku Ohno.

Decreased membrane fluidity and unsaturated fatty acids in Niemann-Pick disease type C fibroblasts.

**Biochim Biophys Acta 1406: 327-335, 1998**

4) 檜垣克美、大野耕策

ニーマン・ピック病 C 型原因遺伝子—細胞内コレステロール輸送関連蛋白

**実験医学 16: 145-147, 1998**

5) 檜垣克美、大野耕策

Niemann-Pick 病 [A 型, B 型] (酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症) 日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ 19

先天代謝異常症候群 下巻 360-362, 1998

6) 谷口美也子、大野耕策

Niemann-Pick 病 [C 型] 日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ 19

先天代謝異常症候群 下巻 363-366, 1998

2. 学会発表

1) K. Ohno Recent molecular and cellular studies in Niemann-Pick disease type C.

*International Symposium of Lipidosis and Allied Disorders*. July 9-10, 1998 · Tokyo

2) M. Taniguchi Not only cholesterol but also glycolipids metabolism are affected in NP-C.

*International Symposium of Niemann-Pick disease type C and Allied Disorders*. November 16, 1998, Yonago

3) A. Yamada Thalamus (VPL and VPM nuclei) is a vulnerable site in the model mice of NP-C: transsynaptic neuronal cell death ·

*International Symposium of Niemann-Pick disease type C and Allied Disorders*. November 16, 1998, Yonago

4) 谷口美也子、Marie T. VANIER、檜垣克美、二宮治明、大野耕策 Niemann-Pick 病 C 型に欠損する機能は細胞内コレステロールとガングリオシドの輸送に関与する

第 71 回日本生化学会・シンポジウム「膜脂質の細胞内輸送とアッセムブリー」平成 10 年 10 月 14-17 日、名古屋

5) 山田敦子、佐治真理、二宮治明、大野耕策 ニーマンピック病 C 型モデルマウス脳における領域特異的神経細胞死。第 21 回日本神経科学会・第 41 回日本神経化学会合同大会、平成 10 年 9 月 21 日・23 日、東京

6) 山本俊至、難波栄二、赤星進二郎、小枝達也、大野耕策、乾幸治、岡田伸太郎、田中あけみ 日本人 Niemann-Pick 病 C 型患者の遺伝子解析—臨床症状と遺伝子異常—第 40 回 日本小児神経学会、平成 10 年 6 月 4 日、横浜

厚生科学研究費補助金（厚生科学脳研究事業）  
分担研究報告書  
神経遺伝病の新しい治療法の開発に関する研究

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科教授

研究要旨：マクロファージ移植により少なくともリソゾーム蓄積症の肝臓、脾臓の病理所見は改善すること、また遺伝子導入細胞としても使用可能なことが判明した。アデノウイルスベクターを用いることにより脳を含む各臓器に出生前遺伝子導入が可能なのも判明した。

A.研究目的

リソゾーム蓄積症に対するマクロファージ移植の有効性およびマクロファージの遺伝子導入標的細胞としての有効性の検討をモデルマウスを用いて行った。またリソゾーム蓄積症の出生後治療を検討も行った。

B.研究方法

1) Sly 病モデルマウスへのマクロファージ移植：ムコ多糖症の1つである Sly 病のモデルマウスの骨髄を採取し CSF-1 を含む培地で培養した。培養と同時に CSF-1 を含む培地にて培養した。培養開始日より連続5 Sly 病の欠損酵素である beta-glucuronidase (HBG) を発現するレトロウイルスベクターを感染させた。培養開始より12日後に Sly 病モデルマウスに移植した。移植後1週目と5週目にマウスを殺し各臓器の生化学的、および病理学的検討を行った。

2) 出生前治療の試み：正常妊娠ラットの子宮内に LacZ を発現するアデノウイルスベクターを投与した。投与時期は現在までの報告より早期に行った（在胎8より12日）。投与2-3日後に胎児の各臓器での LacZ の発現を検討した。

C.研究結果

正常マクロファージを Sly 病モデルマウスに移植したところ HBG の酵素活性は肝臓、脾臓において Sly 病マウスより上昇していたが、その他の組織では明らかな活性上昇は認められなかった。活性染色により少なくとも5週まで移植細胞が存在していることが確認された。ムコ多糖の蓄積は5週後で著名に改善していた。次に、レトロウイルスベクターで

transduction した細胞を Sly 病モデルマウスに移植した。5週後まで酵素活性は上昇しており組織の活性染色では陽性細胞が散見され、病理学的改善度は著名であった。出生前治療の検討では子宮内にベクターを投与する時期により大きく、その組織分布が異なることが判明した。すなわち E9 では肝臓、食堂、胃に、E10 では心臓に、E11 では皮膚に感染した。E12 に投与した場合は中枢神経細胞に感染した。これは尾粘膜の神経末端より逆行性軸索流により感染したものと思われた。

D.考案および結論

マクロファージ移植では（1）培養マクロファージは肝臓、脾臓に定着することが可能であること（2）Sly 病の病理学的な改善も得られること（3）本細胞はレトロウイルスベクターにより遺伝子導入が可能であること（4）遺伝子導入された細胞を移植することにより少なくとも肝臓、脾臓の病理学的改善が得られること、などが判明した。出生前治療の試みでは標的臓器によって時期を選ぶことが重要であること、そして時期によっては中枢神経細胞へも遺伝子が導入可能であることが判明した。

F.研究発表

1.論文発表

T. Ohashi et al. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:1287-1292.

T. Ohashi et al. Eur. J. Haematol. 1998;61:235-239.

2.学会発表

大橋十也ら。日本先天代謝異常学会、1998年東京

## Fabry病の分子治療法の開発に関する研究

分担研究者 樊 建強 東京都臨床医学総合研究所・研究員

**研究要旨** ヒトFabry病患者の細胞が発現する変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ Aの安定化・活性化に有効な化合物のスクリーニングを行った。その中で特に1-デオキシガラクトノジリマイシンが、細胞内酵素活性を阻害しないレベルの低濃度で変異酵素分子を細胞内で安定化し、触媒活性を発現させることが分った。この化合物は変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウス個体への経口投与でも有効であった。本研究は欠損酵素の分子病態を修正するという全く新しい観点からの治療法開発の可能性を示唆するものである。

### A. 研究目的

Fabry病はリソゾームに存在する  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ Aの遺伝性欠損によるスフィンゴ糖脂質代謝異常症である。この酵素は糖脂質や糖タンパク質の糖鎖の非還元末端にあるa1→4又はa1→3結合ガラクトース残基を酸性の条件で加水分解する。その活性欠損や活性低下によって、生体内基質であるグロボトリアオシルセラミド（セラミドトリヘキソシド）やガラビオシルセラミドなどの中性糖脂質が多く組織や体液に蓄積し、皮膚、腎臓、心臓などの一般臓器の障害や、自律神経系の強い障害（血管運動障害、発汗障害）、脳卒中などの多様な症状を引き起こす。

現在、この病気に対する根本的な治療法はないが、遺伝子治療と酵素補充療法の研究が進められている。しかし、何れも臨床レベルでの治療に用いる段階には至っていない。そこで発想を変えて、変異酵素の機能を発現させ、疾患の治療に結びつけるための新しい研究を開始した。

### B. 研究方法

ヒトFabry病患者由来の線維芽細胞、リンパ球を培養し、多くの化合物を用いたスクリーニングによる変異酵素の発現、活性化実験を行った。この研究では化合物として1-デオキシガラクトノジリマイシンを使用し、正常遺伝子ならびに特殊な臨床像（中年期以後の肥大型心筋症）を呈する患者の原因となる変異遺伝子R301Qについて検討した。

培養細胞の発現実験として、COS-1細胞に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A遺伝子を導入し、この化合物の効果調べた。また個体レベルではマウスにトランスジェニックとして遺伝子を導入した個体（トランスジェニックマウス）への経口投与により、酵素活性の変動を検討した。

### C. 研究結果

Fabry病患者由来の R301Q 変異遺伝子を持つリンパ球培養液に、20  $\mu$ Mの1-デオキシガラクトノジリマイシンを添加し、4日間培養した。培養細胞中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A活性は8倍に上昇し、正常人の50%まで回復した。この現象はこの患者の変異遺伝子をトランスフェクトした COS-1細胞、及び同じ変異遺伝子を持つトランスジェニックマウスの線維芽細胞においても確認できた。

酵素活性は0.2-20  $\mu$ Mの間で1-デオキシガラクトノジリマイシン濃度に比例して上昇し、それ以上高い濃度では逆に酵素活性が阻害された。また、一旦上昇した酵素活性は、この化合物が培養液中に存在しない条件下でも、リソゾーム内で最低5日間は安定であった。培養液中に20  $\mu$ Mの1-デオキシガラクトノジリマイシンを添加しても、細胞内酵素活性を阻害しなかった。

1-デオキシガラクトノジリマイシンが存在する条件下で培養したトランスジェニックマウスの線維芽細胞において、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A前駆体タンパク質と共に、成熟型酵素タンパク質の量が、添加した化合物の濃度に比例して増加した。そしてこの条件で発現した酵素蛋白質はリソゾームまで輸送された。

この患者の変異遺伝子 R301Qを導入して変異酵素を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、その個体に1-デオキシガラクトノジリマイシンを1週間経口投与することによって、マウスの心臓、腎臓、肝臓、脾臓及び血清中の酵素活性が著しく上昇した。酵素活性を亢進できる量の経口投与を140日間継続しても、マウスの体重、臓器重量などに変化は見とめられなかった。

### D. 考察

Fabry病の欠損酵素  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ Aの一部には、正常な酵素に比べ酵素学的な性質に大きな差はないが、安定性が著しく劣り、細胞内での

生合成のあと、不活性化され分解されてしまうタンパク質がある。また、患者由来の培養リンパ球を、酵素の反応生成物であるガラクトースを高濃度で添加・培養すると、酵素活性が著しく回復することも報告された。

このような現象は、患者由来の酵素の活性消失がその活性中心の機能障害によるものではなく、タンパク質の高次構造の異常により生ずると解釈される。一部の変異タンパク質は、アミノ酸配列の変化により正しい高次構造を維持することができず、正常な細胞内輸送経路から外れ、分子成熟も進まないために、細胞内で過剰に分解され活性発現が抑制されるのであろう。

そこで、酵素分子の正常な立体構造を維持しリソゾームへの輸送を達成させれば、その細胞内分解を予防し、Fabry病の分子治療に結びつくという論理に基づき、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の安定化・活性化を導く化合物のスクリーニングを開始した。その結果、この酵素の特異的な競合的阻害剤である 1-デオキシガラクトノジリマイシンが、細胞内酵素活性を阻害しないレベルの低濃度で、Fabry病患者由来のリンパ球の培養液に添加すると、酵素活性を上昇させることを見出した。

この化合物は酵素の生合成自体には関与せず、変異酵素の輸送及び成熟化に関与しているようである。このような役割を果たす低分子化合物をケミカルシャペロンと提唱したい。そしてこの活性化はトランスジェニック個体でも観察されたことから、今後はノックアウト・トランスジェニックの系での有効性、そして長期投与の毒性などを詳細に検討し、薬剤開発の努力を続けたい。

## E. 結論

現在、Gaucher病をはじめ一部の遺伝性リソゾーム病に対して、欠損酵素を個体に投与する酵素補充療法という対症療法が行われており、一般臓器症状の改善が認められている。しかしながら、脳障害というもっとも問題のある臨床症状の改善、予防にはつながっていない。本研究は欠損酵素の分子病態を修正するという全く新しい観点からの治療法開発の可能性を示唆するものであり、遺伝病に対する新たな治療法になりうると考える。

酵素の反応生成物の添加によってリソゾーム病酵素の活性が回復するという現象は他のリソゾーム病でも知られている。その意味で、本研究の成果は単にFabry病のみならず、他のリソゾーム病治療法の開発にもつながるであろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fan J-Q, Ishii S, Asano N, Suzuki Y: Accelerating transport and maturation of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Med.* 5, 112-115, 1999.

### 2. 学会発表

Fan J-Q, Ishii S, Asano N, Suzuki Y: Inhibitors enhance lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts: a possible molecular therapy for a genetic disorder. *Third Annual Conference of the Society for Glycobiology*, Baltimore, MD, USA, November 11-14, 1998.



厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

神経遺伝病の新しい治療法の開発に関する研究

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨

典型的な神経遺伝病であるGM1ガングリオシドーシスのモデルである $\beta$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスについて病態解析を行い、脂質蓄積が新生児期から進行していることを明らかにした。さらにトランスジェニックの手法を用い本症の治療法開発および新たな病態モデルマウスの開発を進め、ヒト正常 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウスを2系統作成した。一方、多様な臨床型に対応するモデル動物となることを期待し、GM1ガングリオシドーシス成人型変異遺伝子を持つトランスジェニックマウス2ラインを、幼児型変異遺伝子については1ラインを作出した。

A. 研究目的

リソゾーム性蓄積症の一つである GM1 ガングリオシドーシスは、酸性 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) の遺伝子変異に起因し、進行性の中脳神経症状を呈する典型的な神経遺伝病である。私たちは、 $\beta$ -Gal 遺伝子ノックアウトマウスを作出し、このマウスが神経症状を示すとともに、病理、蓄積物質などの解析からも GM1 ガングリオシドーシスの有用なモデルであることを明らかにしている。本研究では、 $\beta$ -Gal ノックアウトマウスの病態解析をさらに進めるとともに、コンジェニック化による遺伝的背景の均一化を目指した。また多様な臨床型、すなわち GM1 ガングリオシドーシスの幼児型、成人型に対応した残存酵素活性の認められるヒト変異 $\beta$ -Gal 遺伝子をノックアウトマウスに導入することにより、発症時期、重症度の異なる新たな疾患モデルの作出を行い、変異酵素に対応した治療法開発に利用することを目指した。さらに、トランスジーンによる遺伝子治療の試みとして、また細胞移植用のドナー細胞としての有用性を検討するために、ヒト正常 $\beta$ -Gal 遺伝子をマウスに導入し、 $\beta$ -Gal 高発現トランスジェニックマウスの作出を試みた。

B. 研究方法

1)  $\beta$ -Gal ノックアウトマウスの蓄積物質の解

析

脂質分析は、常法により脳、肝臓より中性糖脂質およびガングリオシド画分を得、HPTLC (展開溶媒、クロロホルム-メタノール-0.2%CaCl<sub>2</sub>, 60:35:8) による解析を行った。オリゴ糖は Wolfeらの方法に従って肝臓より抽出し、高分子画分と低分子画分に分け、TLC (n-ブタノール-酢酸-水 (2:1:1) で一晩展開後、さらにニトロメタン-n-プロパノール-水 (4:5:3) で4時間展開) により解析した。

2)  $\beta$ -Gal ノックアウトマウスのコンジェニック化

$\beta$ -Gal ノックアウトマウスをC57BL/6と戻し交配し、マイクロサテライトマーカーによる遺伝的背景の確認を行いつつ、コンジェニック化を進めた。

3) トランスジェニックマウス作成

強発現用プロモーターとして pCAGGS を用い、ヒト正常 $\beta$ -Gal 遺伝子 cDNA および2種類のヒト変異型 (成人型 I51T、幼児型 R201C)  $\beta$ -Gal 遺伝子 cDNA との融合遺伝子をそれぞれ構築し、必要なトランスジーン DNA 断片を精製し、C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウスを作成した。マウスゲノムにトランスジーンが挿入されたかは、ヒト $\beta$ -Gal 遺伝子に特異的な配列を PCR 法にて増幅し確認した。

## C. 研究結果

### 1) 蓄積物質

ノックアウトマウス脳内 GM1 およびアジアロ GM1 の加齢による蓄積変化を調べたところ、両者とも 1～2 週齢より急速な蓄積を示し始め、6ヶ月齢まで直線的な増加傾向を示した。これに対し、肝臓では GM1、アジアロ GM1 の蓄積は認められたが、加齢による増加傾向は明らかではなかった。ノックアウトマウスの肝臓オリゴ糖については、高分子画分に異常な 2 本のバンドを認めた。

### 2) コンジェニックマウス

戻し交配第 5 世代(N5)では、マイクロサテライトマーカー検索した 3 1 遺伝子座中 1 遺伝子座のみ C57BL/6 と多型を示す個体が得られ、その個体をさらに戻し交配に用い、現在 N7 まで進んでいる。

### 3) トランスジェニックマウス

正常  $\beta$ -Gal トランスジェニックマウスについては、誕生した 36 匹中 7 匹が PCR にてトランスジェン陽性であり、そのうち 2 匹で  $\beta$ -Gal 活性が増大しており、脳を含む調べたすべての臓器で正常マウスの 5～50 倍程度の活性上昇があった。ヒト成人型変異  $\beta$ -Gal トランスジェニックマウスについては、44 匹中 2 匹でトランスジェンを認め、次世代への伝達を確認している。ヒト幼児型  $\beta$ -Gal トランスジェニックマウスについては、現在までに生まれた 84 匹中 1 匹にトランスジェンを検出した。

## D. 考察

$\beta$ -Gal ノックアウトマウスでは、脳内 GM1、アジアロ GM1 の急速な蓄積が 1～2 週齢より見られ、これは病理所見とほぼ一致していた。一方、このマウスは 4 か月齢以降に明らかな進行性の中樞神経症状を示すようになるが、脂質の蓄積を伴う病変はもっと早くから進行しており、新生児期での治療の必要性が示唆された。肝臓における脂質蓄積は明らかであるが、加齢による蓄積の進行は明瞭ではなかった。肝臓における GM1 合成については、マウスの系統間に差があること

が知られており、今回用いたマウスは 3 系統の交雑系であるため、その遺伝的背景の違いが GM1 の蓄積に影響したことも考えられた。肝臓オリゴ糖の解析では、異常バンドが認められたことから、肝臓における糖タンパク質糖鎖の分解異常があることが示唆された。

ノックアウトマウスの C57BL/6 コンジェニック化は、マイクロサテライトマーカーを利用することにより効率的に N 7 世代まで進めることが出来、ほぼ実用的な程度にまで達したと考えられる。

治療実験への応用をめざし、ヒト正常  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウスを 2 系統作成した。これらのマウスでは顕著な酵素活性の増大がみられ、今後、細胞移植による治療実験のための細胞の供給源として利用できるものと期待される。また、トランスジェンによる個体レベルでの治療効果を検討するため、トランスジェニックマウスとノックアウトマウスとの交配を開始した。一方、ヒト変異型  $\beta$ -Gal トランスジェニックマウスについては、成人型変異遺伝子について 2 ラインを、幼児型変異遺伝子については、1 ラインを得た。今後、変異酵素遺伝子の発現解析を行うとともに、 $\beta$ -Gal ノックアウトマウスとの交配を進め、マウスの  $\beta$ -Gal 遺伝子は発現せず、ヒト異常遺伝子のみを発現させることにより、多様な病態モデルとなることが期待される。

## E. 結論

神経遺伝病の治療法開発に資することを目的に、GM1 ガングリオシドーシスの有用なモデルである  $\beta$ -Gal ノックアウトマウスについて病態解析を行うとともに、トランスジェニックの手法を用い本症の治療法開発および新たな病態モデルマウスの開発を進めた。ノックアウトマウスの病態解析では、脂質蓄積が新生児期から進行していることを明らかにした。またこのマウスの遺伝的背景の均一化をめざし、C57BL/6 コンジェニック化が N7 世代まで進んだ。細胞移植による治療実験用細胞の供給源として、またトラ

ンスジーンによる個体レベルでの治療効果を検討するため、ヒト正常 $\beta$ -Gal遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウスを2系統作成した。一方、多様な臨床型に対応するモデル動物となることを期待し、GM1ガングリオシドーシス成人型変異遺伝子を持つトランスジェニックマウス2ラインを、幼児型変異遺伝子については1ラインを作出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ogura A, Inoue K and Matsuda J, Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum Reprod*, in press.

Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A and Matsuda J, Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999.

Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O and Ogura A, Birth of pups by transfer of *Mastomys (Praomys coucha)* embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod*, 51 Suppl 1:180-181,1998.

Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y and Matsuda J, Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5611-5615, 1998.

### 2. 学会発表

松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之： GM1-ガングリオシドーシスマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。

滝本一広、松田潤一郎、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、高野薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之： GM1ガングリオシドーシスマウスの病態解析－蓄積物質の加齢変化－、第15回日本疾患モデル学会総会、1998年11月、東京。

## G. 知的所有権の取得状況

該当無し。