

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 義之

平成 15(2003)年 4 月

目 次

I.	総括研究報告	
	神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発に関する研究	1
	鈴木義之	
I I.	分担研究報告	
1.	神経遺伝病モデル動物飼育の確立に関する研究	3
	黒澤美枝子	
2.	神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発に関する研究	6
	松田潤一郎	
3.	GM1-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロンを用いた 新しい治療法の開発に関する研究	7
	難波栄二	
4.	ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発に関する研究	15
	大野耕策	
I I I.	研究成果の刊行に関する一覧表	17
I V.	研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	20
V.	健康危険情報	21
V I.	研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総括研究報告書

神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発に関する研究
主任研究者 鈴木 義之 国際医療福祉大学教授

研究要旨

重篤な脳障害を伴う遺伝病の新しい治療法開発を試みた。β-ガラクトシドーシス、特にG_{M1}-ガングリオシドーシス患者由来の培養細胞にケミカルシャペロンとなる新しい物質N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン (NOEV) の酵素活性還元効果を調べた。その反応には病型特異性があり、特に幼児型G_{M1}-ガングリオシドーシス症例で著しい効果を示した。またβ-ガラクトシダーゼの病型特異的変異を持つモデルマウスを作成し、NOEVを経口投与したところ、脳を含むすべての組織に酵素活性の著しい上昇を認めた。

分担研究者

黒澤美枝子・国際医療福祉大学教授
松田潤一郎・国立感染症研究所室長
難波栄二・鳥取大学助教授
大野耕策・鳥取大学教授

研究協力者

松崎祐二・生化学工業株式会社研究員
小川誠一郎・慶應義塾大学教授

A. 研究目的

遺伝子変異による脳の病気の新しい治療法を開発することを目的とする。ライソゾーム病を対象モデル疾患として選び、われわれが提唱しているケミカルシャペロン療法を確立する。この理論はすでに試験管内と細胞内実験により確認されており、本研究では脳障害を伴う遺伝病のモデルとして、G_{M1}-ガングリオシドーシスを対象とした治療法を確立する。

B. 研究方法

まず試験管内での酵素活性阻害を起こす物質のスクリーニングを行い、β-ガラクトシダーゼに有効な化合物を検索した。次にこの物質の培養細胞における変異酵素活性還元効果を、培養液中への添加により確認した。そして、モデル動物として、ヒト変異遺伝子の特異的に発現するノックアウトマウスを作成し、この動物に酵素阻害剤を経口投与し、組織、特に中枢神経系での酵素活性化を試みた。実験動物に対する倫理面への配慮はそれぞれの研究施設の倫理委員会の規定により行った。

C. 研究結果

市販のガラクトース誘導体には変異β-ガラクトシダーゼ活性に影響を与える化合物がなかった。新しい合成化合物のなかで、N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン (NOEV) が特異的に変異酵素を安定化することがわかった。そして、1-デオキシガラクトノジリマイシンのβ-ガラクトシダーゼに対する効果の2000倍ほどの活性を示した。培養細胞実験では、この化合物がいくつかの遺伝子変異に有効であった。患者群の少なくとも30%に活性還元が期待できるであろう。変異の中で、特に反応のよいR201C変異を発現するモデルマウス(ノックアウト・トランスジェニックマウス)に1週間、この化合物の経口投与をおこない、脳を含むすべての組織に著しい酵素活性上昇を認めた。

D. 考察

この結果から、NOEVが腸管から吸収され、血液脳関門を通過して、神経系の細胞で酵素活性を還元、上昇させたという結論が得られた。今後この薬剤の長期投与効果を観察するとともに、毒性の有無についても慎重に検討する。

E. 結論

NOEVをモデル動物に短期間経口投与したところ、中枢神経系のβ-ガラクトシダーゼ活性上昇を認めた。蓄積脂質の大きな変化はなかったが、組織化学的には蓄積細胞の数の減少を認めた。このことは、NOEVを用いたケミカルシャペロン療法がヒト患者に対する新しい治療法となる可能性を示すものである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ogawa S, Matsunaga YK, Suzuki Y: Chemical modification of the β -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- β -valienamine: Synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-(β -D-galactopyranosyl) derivatives. *Bioorg MedChem* 10: 1967-1972, 2002.
2. 鈴木義之: β -ガラクトシドーシス: 新しい分子治療法の開発. *神経進歩* 46: 851-858, 2002.
3. Suzuki Y, Oshima A, Nanba E: β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1} -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, Internet Version, McGraw-Hill, New York, 2002. Website: <http://genetics.accessmedicine.com/>
4. Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A: Attenuation of ganglioside G_{M1} accumulation in the brain of G_{M1} gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer. *Gene Ther*, in press, 2003.

学会発表

1. Suzuki Y: New therapeutic approach for lysosomal storage disorders (Symposium). Joint Congress of ICNA and AOCNA 2002; The 9th International Child Neurology Congress and the 7th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Beijing, 2002.9.20-25.
2. Suzuki Y, Nanba E, Ohno K, Matsuda J, Ogawa S: Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases with central nervous system pathology. Thirty-first National Meeting of the Child Neurology Society, Washington, DC, 2002.10.9-12.
3. 小川由美, 高村歩美, 富永里香, 難波栄二, 高浦奈津子, 田中あけみ, 大野耕策, 松田潤一郎, 大島章弘, 松崎祐二, 小川誠一郎, 鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシスに対する治療法の開発-新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法- 第45回日本先天代謝異常学会総会, 神戸, 2002.11.7-9.
4. 岩崎博之, 一ノ宮悟史, 難波栄二, 松崎祐二, 小川誠一郎, 鈴木義之: β -ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞に対する新しいガラクトース誘導体による細胞内活性還元効果のスクリーニング.

第45回日本先天代謝異常学会総会、神戸、2002.11.7-9.

5. 大島章弘, 山本美江, 野口 章, 鈴木 治, 松田潤一郎, 富永里香, 難波栄二, 松崎祐二, 小川誠一郎, 鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシス-疾患モデルマウスへの低分子化合物投与による治療効果の検討- 第45回日本先天代謝異常学会総会, 神戸, 2002.11.7-9.
6. 高村歩美, 小川由美, 富永里香, 難波栄二, 高浦奈津子, 田中あけみ, 大野耕策, 松田潤一郎, 大島章弘, 松崎祐二, 小川誠一郎, 鈴木義之: G_{M1} -ガングリオシドーシスに対する治療法の開発: 新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法. 第8回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2002.11.21-22.
7. 大野耕策, 候 淋, 杉本優子, 二宮治明, 井上岳彦, 岡 明, 難波栄二, 井田博幸, 衛藤義勝, 小川誠一郎, 鈴木義之: ケミカルシャペロン法による Gaucher 病治療法の開発. 第8回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2002.11.21-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

1. カルバ糖アミン誘導体(小川誠一郎, 鈴木義之)
2. 糖脂質代謝異常症治療剤(鈴木義之, 難波栄二, 松田潤一郎)
3. 糖脂質代謝異常症の治療薬(鈴木義之, 大野耕策)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

神経遺伝病モデル動物飼育の確立

分担研究者 黒澤美枝子 国際医療福祉大学・基礎医学研究センター教授

研究要旨

神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発には、疾患モデル動物における研究が重要である。近年、小児期の代表的神経遺伝病であるライゾゾーム病のモデルマウスが本学の鈴木らによって作成された。それに伴い、本学でそのモデル動物の飼育確立並びにその系統維持をすることが望ましい状況となった。本研究では、本学動物飼育室の換気、温度、湿度調節を見直し、それらを改善することによりモデル動物の飼育を本学の施設において可能にすることを目的とした。これらを見直し改善した結果、本学動物飼育施設においても50-100匹のマウス・ラットの飼育が可能な状況になった。今後は神経遺伝病モデル動物の繁殖を確立していくことが課題である。

A. 研究目的

神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発にあたり、モデル実験動物での研究が必要である。近年、小児期の代表的神経遺伝病である若年型GM1-ガングリオシドーシスのモデルマウスが本学の鈴木らによって作成された。そのため、本学でそのモデル動物の飼育確立並びにその系統維持をすることが望ましい。本学ではこれまで動物飼育を系統的に行っておらず、本年度はモデル実験動物の飼育維持を本学実験動物施設で確立することを目的とした。さらに、正常動物において自発行動量並びに痛覚閾値を測定し、それらを神経遺伝病モデル動物の機能評価に応用する可能性を検討した。

B. 研究方法

正常マウスおよびラットをポリカーボネイトの飼育ケージに入れ、長期間飼育した。

個体レベルでの神経機能評価として自発行動量と痛覚閾値を測定した。自発行動量は受動赤

外線センサーを利用したもの（スーパーメックス、室町機械）を使用した。痛覚閾値はランダルセリット法により、後肢への侵害性機械的刺激に対する屈曲反射の潜時から痛覚閾値を測定した。

（倫理面への配慮）動物飼育に当たっては、NIHの動物飼育基準に準じて行い、実験は国際医療福祉大学の実験動物倫理審査委員会の承諾を得て行った。

C. 研究結果

1. 飼育条件の検討

動物臭の少ない条件下で、飼育温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間明暗照明調節下で飼育できるよう、以下の環境整備を行った。

a. 換気

本学の動物実験設備では、マウス4匹の飼育でも不快な動物の臭気が立ち込め、動物飼育室の換気が不十分であることが明らかとなった。動物飼育棚に特注の換気システムを設置したと

ころ、不快な臭気は消失し、50-100匹のマウス・ラットの飼育が可能になった。

b. 温度

これまで本学動物飼育室の温度制御装置は中央の管理施設で制御されていたが、原因が不明のままその制御装置が停止してしまう事故が3ヶ月間に数回発生した。そこで各動物飼育室に空調を設置したところ、飼育上の温度トラブルは解消した。

c. 湿度

冬期に飼育室の湿度が20%以下になってしまっていたので、業務用の特注加湿器を設置し、常時 $50 \pm 10\%$ で維持するようにした。

2. 個体レベルでの機能評価法の検討

a. 行動量の測定

受動型赤外線センサーを用いて、動物の自発行動量を測定したところ、飼育室室内灯の on/off (朝8時 on、夜20時 off) に依存する行動量変化リズムが観察された。すなわち、行動量は消灯直後の1時間(20-21時)並びに点灯直前の1時間(7-8時)に2相性のピークを認めた。

b. 痛覚閾値の測定

ランダルセリット式痛覚測定装置を用いて、機械的侵害刺激に対する後肢の屈曲反射の潜時を測定したところ、ある程度の範囲内にその潜時が収まることを確認した。

D. 考察

本学動物飼育設備を換気、温度、湿度の面から見直し改善した結果、本学実験動物飼育施設においても神経遺伝病のモデル動物の飼育が充分可能になったと考えられる。今後は、そのモデル動物の系統維持のために繁殖を如何に成功させていくかが課題となる。

また、神経系の個体レベルでの機能評価として、自発行動量と痛覚閾値の測定を試みた。そ

の結果、いずれの場合も信頼できる範囲に測定値が収まったため、今後はモデル動物への応用が可能であると思われる。このような機能評価により、神経遺伝病の発症、ケミカルシャペロン療法の効果を客観的に評価できる可能性がある。

E. 結論

動物飼育環境の改善により、モデル実験動物の飼育が本学においても可能となった。さらに、神経遺伝病モデル動物の神経機能を個体レベルで評価するために、自発行動量、痛覚閾値を測定することが可能あると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoneda M, Kurosawa M, Watanobe H, Shimada T, Terano A: Brain-gut axis of the liver: the role of central neuropeptides. *J Gastroenterol.* 2002 Nov;37 Suppl 14:151-6.
- 2) Sugimoto A, Aikawa Y, Kobayashi R, Kurosawa M: Responses of hepatic glucose output to noxious mechanical stimulation of the skin in anaesthetised rats. *Auton Neurosci.* 2002 Nov 29;102(1-2):45-53.
- 3) Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Sato N, Kurosawa M, Funakoshi A: Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas.* 2002 Nov;25(4):400-4.
- 4) Kurosawa M, Enomoto K, Aikawa Y, Yoneda M: Hepatic blood flow responses to mechanical stimulation of the skin in anaesthetised rats. *Auton Neurosci.* 2002 Jul 31;99(1):40-6.
- 5) Lund I, Yu LC, Uvnas-Moberg K, Wang

J, Yu C, Kurosawa M, Agren G, Rosen A, Lekman M, Lundeberg T: Repeated massage-like stimulation induces long-term effects on nociception: contribution of oxytocinergic mechanisms. Eur J Neurosci. 2002 Jul;16(2):330-8.

- 6) Unno T, Hashimoto M, Arai S, Kurosawa M: Reduction of food intake following X-ray irradiation of rats--involvement of visceral afferent nerves. Auton Neurosci. 2002 Mar 18;96(2):119-25.
- 7) Kurosawa M, Unno T, Aikawa Y, Yoneda M: Neural regulation of hepatic blood flow in rats: an in vivo study. Neurosci Lett. 2002 Mar 22;321(3):145-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し。

2. 学会発表

- 1) 今井樹、丸山仁司、黒澤美枝子：ストレス下でのラット成長におよぼす触圧刺激の影響、第79回日本生理学会大会、広島、2002.3.28.
- 2) 黒澤美枝子、杉本あゆみ、會川義寛：皮膚刺激によって誘発される反射性グルコース放出反応、第79回日本生理学会大会、広島、2002.3.29.
- 3) 海野達也、橋本光康、新井正一、黒澤美枝子：放射線照射時の体温上昇における求心性神経の関与、第79回日本生理学会大会、広島、2002.3.29.
- 4) 今井樹、海野達也、丸山仁司、黒澤美枝子：ストレス下の仔ラット成長におよぼす触圧刺激の影響、第37回日本理学療法学会大会、静岡、2002.7.4.
- 5) 小林里江、丸山仁司、黒澤美枝子：骨格筋刺激がラット肝グルコース放出におよぼす影響、第55回日本自律神経学会総会、大宮、2002.11.1.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究要旨

新規に合成したガラクトース誘導体を、GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒト変異β-ガラクトシダーゼ遺伝子(R201C)導入 KO-Tg マウスに投与したところ、中枢神経系においてβ-ガラクトシダーゼ活性が増大し、新たな chemical chaperon 療法としての可能性が示された。

A. 研究目的

GM1 ガングリオシドーシスは、酸性β-ガラクトシダーゼ(β-Gal) 遺伝子の変異によるリソソーム性蓄積症であり、進行性の中中枢神経症状を呈し、有効な治療法はない。最近、酵素阻害剤である低分子化合物が変異型酵素の活性増大をもたらすことが示され、chemical chaperon による新たな治療法として提唱されている。私たちは、この方法を応用した GM1 ガングリオシドーシスの新たな治療法開発を目的として、β-Gal ノックアウトマウスに GM1 ガングリオシドーシス幼児型に対応するヒト変異型β-Gal 遺伝子を導入したトランスジェニック(KO-Tg) マウスによる検定系を用い、低分子化合物による治療効果を検討した。

B. 研究方法

β-GalKO マウスの遺伝的背景に GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒト変異β-Gal 遺伝子

(R201C) をトランスジーンとして持つ KO-Tg マウスを作製した。このマウスに、新規に合成したガラクトース誘導体 GalX (仮に命名) の 1 mM 水溶液を飲水として 1 週間および 5 週間投与し、各臓器のβ-Gal 活性を測定するとともに、X-gal による活性染色を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

GalX 投与により、調べた全ての臓器でβ-Gal 活性の顕著な増加が認められ、大脳において、投与群では非投与群に比べ、5~7 倍程度のβ-Gal 活性増大が認められた。X-Gal 染色では、大脳皮質、脳幹など中枢神経系の広範な部位の神経細胞とグリア細胞のβ-Gal 活性増大が確認された。

D. 考察

低分子化合物 GalX はβ-Gal の強力な阻害剤であり、今回の結果は GalX が経口投与により血液に入り、血液脳関門を通過して中枢神経系に到達し、chemical chaperon として作用し、変異酵素の活性増大をもたらしたと考えられた。本化合物は神経遺伝病である GM1 ガングリオシドーシスの中枢神経系をターゲットとした新たな治療薬として期待される。

E. 結論

新規に合成したガラクトース誘導体を、GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒト変異β-Gal 遺伝子

(R201C)導入 KO-Tg マウスに投与したところ、中枢神経系においてβ-Gal 活性が増大し、新たな chemical chaperon 療法としての可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

山本美江、野口章、長瀬裕美、鈴木治、持田慶司、中平美穂、高野薫、野口洋子、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎：GM1 ガングリオシドーシス幼児型、成人型モデルとしてのヒト型 KO/Tg マウスの作製、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

Suzuki Y, Nanba E, Ohno K, Matsuda J, Jinbo M: A New Molecular Therapy for Lysosomal Storage Diseases. 31st Annual Meeting of Child Neurology Society, October 9-12, 2002; Washington, DC.

小川由美、高村歩美、富永里香、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：GM1-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法の開発：新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法、第 45 回日本先天代謝異常学会、2002 年 11 月、神戸。

大島章弘、松田潤一郎、鈴木治、山本美江、野口章、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：GM1 ガングリオシドーシス：疾患モデルマウスへの低分子化合物投与による治療効果の検討、第 45 回日本先天代謝異常学会、2002 年 11 月、神戸。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

「糖脂質代謝異常症治療薬」

(特願 2002-260534)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

GMI-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロンを用いた新しい治療法の開発

分担研究者 難波栄二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

私は中枢神経障害を呈するライソゾーム病であるGMI-ガングリオシドーシスに対する主に治療の研究を進めている。本年度は、ヒト細胞の遺伝子解析と新しい治療法（ケミカルシャペロン法）の研究を進めた。遺伝子解析は、24名の患者の細胞から19種類の変異を同定した。そのうち8種類は新規変異、残り11種類は既知の変異であった。治療法の研究では、特に日本人の代表的な変異であるR201C異常をもつ細胞株について、より低濃度で効果のある新しい化合物（GalX）の効果の検討を詳細に行った。その結果、GalXは0.4 μ Mの濃度で最も有効であり、投与4日から8日でもっとも大きな酵素活性の上昇が見られた。投与中止後、4日で効果が半減し、8日で効果がみられなくなった。この細胞株にガングリオシドを負荷した条件下で、GalXの効果を検討したところ、ガングリオシドの蓄積が減少する傾向がみられた。GalXはR201C変異患者に有効な治療薬になると考えられた。

A. 研究目的

我々は、中枢神経障害を呈するGMI-ガングリオシドーシスの治療法の開発を進めている。昨年までに、低分子物質1-deoxygalactonojirimycin、N-(n-butyl)-deoxygalactonojirimycinが中枢神経障害を伴う遺伝子変異に有効であることを明らかにしてきている（L. Tominaga, et al. Brain Dev. 23, 284(2001)）。しかしながら、これらの物質は比較的高濃度が必要であり、副作用などを考えるとより低濃度の物質の開発が必須であった。このために、低濃度で有効であるGalXが開発されてきた。本年度はこの新しいGalXの効果、特に日本人の若年型で多い遺伝子変

異R201C変異を中心に検討した。

また、この治療法は変異の種類によって効果が異なることが明らかになってきている。そのために、患者のすべての遺伝子変異を明らかにしておく必要がある。本年度は、24名の患者の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

(1) 遺伝子解析

材料：培養皮膚線維芽細胞より抽出したDNAを用いた。

方法

1. β -ガラクトシダーゼ遺伝子は16全エクソンをカバーするプライマーをそれぞれ設計し（表1）、

解析した。ゲノムDNA200ngをバッファ、250 μ M dNTPs、各プライマー1 μ M、Taq gold 1 μ lを含む10 μ lの溶液を作成し、PCRを行った。PCRの反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分間初期酵素活性化を行い、変性95 $^{\circ}$ C 1分、アニーリング55 $^{\circ}$ C 1分、伸長72 $^{\circ}$ C 5分の35サイクルとした。増幅したエクソンのうち、エクソン1、4、7、9はSSCP (single strand conformation polymorphism) を行い、差を検出したものはT-ベクター (Promega) へサブクローニングし、シーケンシングを行った。その他のエクソンについては、ダイレクトシーケンシングを行った。

2. SSCP : PCR産物5 μ lと変性剤1 μ lを混合し泳動サンプルとした。ゲルは18%ポリアクリルアミドゲル、あるいは5%グリセロール入り18%ポリアクリルアミドゲルを用いた。泳動条件は150V、15 $^{\circ}$ C 18時間あるいは4 $^{\circ}$ C 24時間とし、1サンプルあたり合計4条件で検討した。

3. サブクローニング : PCR産物5 μ lとT-ベクター25ngを混合し、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水5 μ lに溶解し、バッファ、T4 DNA ligase 1 μ lを含む10 μ lの溶液を作成した。4 $^{\circ}$ C、overnightでライゲーション反応を行った。そのライゲーション溶液2 μ lとコンピテント細胞 (ニッポンジーン) 25 μ lを混合、トランスフォーメーションを行った。

4. シーケンシング : PCR産物、あるいはプラスミドを精製し、

ABI 3100 Genetic Analyzer (ABI) を用い解析した。

(2) GalXの検討

材料 : 低分子化合物

酵素活性を上昇させると期待される、ガラクトース類似体は次の3種類、1-deoxy-galactonojirimycin(DGJ)、N-(n-butyl)-deoxy-galactonojirimycin(NB-DGJ)、 β -galactosidase inhibitor (NOEV) (通称GalX) を用いた。

細胞株 : ノックアウトマウス由来の細胞をもとに、ヒトの12種類の変異 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、確立した細胞株を用いた。

方法

1. 細胞株 β -galactosidaseに対する阻害活性の測定 : 6種類の細胞培養上清を透析、濃縮して、DGJ、GalXに対する試験管内50%阻害濃度 (IC_{50}) の測定を行った。酵素活性の測定は4MU人工基質を用いた。

2. 細胞株に対する低分子化合物の効果 : 6種類の細胞を用い、0.2 μ M GalXをそれぞれ4日間負荷し、細胞内 β -galactosidaseを測定した。

3. 細胞株に対するGalX至適濃度の測定 : 4、8、16 μ M GalXを4日間細胞に負荷し、細胞内 β -galactosidaseを測定した。

4. 若年型R201C細胞株におけるGalX投与期間における効果 : 0.2 μ M GalXを若年型R201C細胞株に8日間

投与し、その後、培養液中からGalXを除きさらに8日間の間の酵素活性を4日ごとに、合計16日間検討した。

5. GM1-ガングリオシドの蓄積の検討：細胞株R201Cを用い、2日間0.1mg/mlのガングリオシドをローディングし、その後4日間0.2 μ M GalXを負荷し、FITCラベルコレラ毒素Bサブユニット (CTB) を用いて染色した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子解析

24名の患者より19種類の変異を同定した(表2)。そのうち、8種類は新規変異、残り11種類は既知変異であった。24名の患者の48アレルのうち、6アレルについては、変異を同定することができなかった。

(2) GalXの検討

GalXのベータガラクトシダーゼ酵素に対するIC₅₀を検討した結果、正常酵素0.21 μ M、若年型R201C変異0.24 μ M、成人型R457Q変異0.15 μ M、成人型I51T変異0.71 μ M、に対してモルキオBY83HとW273L変異では4 μ M以上と高いIC₅₀であった。つまり中枢神経障害を伴わない、モルキオB病の変異酵素よりも、若年型、成人型GM1-ガングリオシドーシスの変異酵素に対してより低濃度で阻害活性を示した。次に、培養細胞株におけるGalXの至適濃度を検討したところ、R201変異0.4 μ M、R457Q変異1.6 μ M、に対して、W273L変異では16 μ M以上となった。細胞株6種類に対す

る3種類の低分子化合物を用いた検討では、GalXは0.2 μ Mと最も低濃度で効果を示した(表3)。さらに、細胞株R201CのGalXの投与期間における検討では、投与4日目で最大の効果得られ、その後8日まで同じ効果が持続した。GalXを除くと4日目で効果が半減し、8日で効果がなくなり、酵素活性が低下した。細胞株R201Cを用いたGM1-ガングリオシド蓄積の検討ではGalXの負荷により蓄積が減少する傾向がみられた。

D. 考察

遺伝子解析では、エクソン1、4、7、9は直接シーケンスが困難なためにSSCP法を利用した。最終的にはすべて塩基配列を決定することにより遺伝子異常を検討した。その結果、新たに8種類の異常を明らかにすることができた。変異が同定できなかった6アレルは、イントロンあるいは遺伝子の調節領域に異常、あるいは比較的大きな欠失の可能性が残された。今後、これらも検出が可能な解析システムを構築を目指したい。

また、今回検討を行ったGalXは、特にR201C変異において低濃度で効果を示し、新しい治療薬として有望であると考えられた。最大の効果を得るのに、投与後4日間が必要であった。ガングリオシドの蓄積が減少する効果が確認でき、GalXで上昇した酵素活性は細胞で有効に働いていると考えられた。今後さらに神経細胞を含め細胞レベルでの研究に加えて、マウス個体での研究を行い、臨床応用をめざす予定である。

E. 結論

1. 24名のG_{M1}-ガングリオシドーシスの患者の遺伝子解析を行い19種類の変異を同定した。このうち8種類は新規変異であった。

2. G_{M1}-ガングリオシドーシスの中枢神経障害に対する新しい治療法の検討を行った。0.2 μM GalXを用いて若年型R201C変異の酵素活性を細胞レベルで5倍上昇させることができた。さらに、蓄積物質G_{M1}-ガングリオシドの減少がみられ、治療薬として、有効であると考えられた。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S. Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology* 58:811-813, 2002

Saito Y, Suuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E ε4 homozygosity. *Ann Neurol*. 52:351-355. 2002

2. 学会発表

高浦奈津子、田中あけみ、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之、山野

恒一. GM1-ガングリオシドーシスモデル新生仔を用いた経静脈的遺伝子導入による中枢神経への治療効果 第44回 日本小児神経学会総会 (仙台) 2002年6月27日-29日

小倉加恵子、前垣義弘、赤星進二郎、岡明、難波栄二、大野耕策 進行性ミオクローヌスてんかんを呈したGaucher病の1例 第45回 日本先天代謝異常学界総会 (神戸) 2002年11月7日-9日

小川由美、高村歩美、富永里香、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之

GM1-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法の開発—新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法— 第45回 日本先天代謝異常学界総会 (神戸) 2002年11月7日-9日

岩崎博之、一ノ宮悟史、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之 β-ガラクトシドーシス患者由来繊維芽細胞に対する新しいガラクトース誘導体による細胞内活性還元効果のスクリーニング 第45回 日本先天代謝異常学界総会 (神戸) 2002年11月7日-9日

大島章弘、山本美江、野口章、鈴木治、松田潤一郎、富永里香、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之

GM1-ガングリオシドーシス—疾患モデルマウスへの低分子化合物投

与による治療効果の検討— 第45
回 日本先天代謝異常学界総会
(神戸) 2002年11月7日-9日

高村歩美、小川由美、富永里香、
難波栄二、高浦奈津子、田中あけ
み、大野耕策、松田潤一郎、大島

章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴
木義之

GM1-ガングリオシドーシスに対す
る治療法の開発：新しい化合物を
用いたいケミカルシャペロン法
第8回 日本ライソソーム研究会（東
京）2002年11月21日-22日

表 1 β -ガラクトシダーゼ遺伝子解析のためのプライマー

exon1F: GAGGCTGGTGGTCATGCCGGG
exon1R: CGCAGACTTACGGCAAGCC
exon2F: GTTGCTCTGTAGAATGCCACCC
exon2R: CTCCTACTTACGTCTGGATG
exon3F: GTGTCTTGGCAGGTATGTGCC
exon3R: GCCCACTCACCATTTCCTC
exon4F: CCCTGAACTAGGGAGGATT
exon4R: TAACAACCTACCTGGGTCCG
exon5F: GTTTTCCAGATTACCTGGCAGC
exon5R: CAACTCCAGGGTTACCTGCAC
exon6F: CACTCACAGGTTGAAAATG
exon6R: CAAACACCAACCTGTTCC
exon7F: CAATTTTCAGGCAGCAACATC
exon7R: CGATTCTTACCAAGGGTCC
exon8F: TAGATCAATTCTGAATTCTATACTGG
exon8R: CAATGAACACTCACAAGTTCAC
exon9F: GTTTCCTTGTAGGTACATGTTT
exon9R: GTGCTCTTACCATTCCAAT
exon10F: CATTTTTGTCTTCTAGGGGCCAACT
exon10R: CAAAGCACCCACCTTCTGGAT
exon11F: GGTATATAGTTTAAAAAGTACCAG
exon11R: CTTACCTTTTCAAAGTGAC
exon12F: GTTCTTTTCAGTTAAAGACAGTGGG
exon12R: CTTTGAAGGCCTACCTGTTTCAC
exon13F: CCTTTTCTAACCAGCATTATGGG
exon13R: GACGATTCTTACCCCATCCAC
exon14F: GAACCCACAGATCCCCCAG
exon14R: GTGTGGTTTGCCTACCTTAAAATC
exon15F: CTGCTTTCAGGGTTTGG
exon15R: GAAGACACGTACCTTGGTCC
exon16F: CTCTCTCAGGGCCAGGTC
exon16R: GGCTTTCATCATCATACA

表2 β-ガラクトシダーゼ遺伝子解析のまとめ

Sample No.	Mutation	base	Amino acid	
355	R201C/R201C	601c→t/601c→t	201Arg→Cys/201Arg→Cys	reported
19	Y333H/?	996t→c/?	333Tyr→His/?	new
111	I51T/I51T	152t→c/152t→c	51Ile→Thr/51Ile→Thr	reported
351	W273L/W509C	818g→t/1527g→t	273Trp→Leu/509Trp→Cys	reported
603	W161G/?	481t→g/?	161Tyr→Gly/?	new
604	Q255H/?	765g→c/?	255Gln→His/?	new
606	R351X/S532G	1051c→t/1594a→g	351Arg→Ter/532Ser→Gly	reported/new
607	R148S/S532G	442c→a/1594a→g	148Arg→Ser/532Ser→Gly	reported/new
609	W273L/R482H	818g→t/1445g→a	273Trp→Leu/482Arg→His	reported
610	W273L/R482H	818g→t/1445g→a	273Trp→Leu/482Arg→His	reported
611	W273L/W509C	818g→t/1527g→t	273Trp→Leu/509Trp→Cys	reported
34	R457Q/R457Q	1370g→a/1370g→a	457Arg→Gln/457Arg→Gln	reported
112	I51T/I51T	152t→c/152t→c	51Ile→Thr/51Ile→Thr	reported
302	G178R/R208C	532g→a/622c→t	178Gly→Arg/208Arg→Cys	new/reported
363	I51T/I51T	152t→c/152t→c	51Ile→Thr/51Ile→Thr	reported
576	F107L/?	319t→c/?	107Phe→Leu/?	new
602	R201C/R201C	601c→t/601c→t	201Arg→Cys/201Arg→Cys	reported
614	R201C/R457Q	601c→t/1370g→a	201Arg→Cys/457Arg→Gln	reported
615	R201C/?	601c→t/?	201Arg→Cys/?	reported
617	R59H/R457Q	176g→a/1370g→a	59Arg→His/457Arg→Gln	reported
618	I51T/I51T	152t→c/152t→c	51Ile→Thr/51Ile→Thr	reported
619	I51T/R457Q	152t→c/1370g→a	51Ile→Thr/457Arg→Gln	reported
621	Dup254/?	#254-276/?	Duplication/?	reported
622	R68W/T500A	202c→t/1498a→g	68Arg→Trp/500Thr→Ala	new/new

表 3 低分子物質のそれぞれの細胞株の酵素に対する効果

Phenotype	Cell line	Addition			
		None	DGJ (Increase)	NB-DGJ (Increase)	NOEV (Increase)
Normal	GP8	67.6	112.9 (1.7)	94.5 (1.4)	78.9 (1.2)
Juvenile G _{M1}	R201C	22.9	131.9 (5.8)	113.5 (5.0)	116.3 (5.1)
Adult G _{M1}	R201H	19.1	34.2 (1.8)	52.7 (2.8)	86.0 (4.5)
	R457Q	19.1	34.2 (1.8)	52.7 (2.8)	86.0 (4.5)
Morquio B	W273L	8.1	11.3 (1.4)	11.0 (1.4)	17.7 (2.2)
	Y83H	10.1	17.1 (1.7)	12.4 (1.2)	20.2 (2.0)

ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発

分担研究者 大野耕策 鳥取大学・医学部・脳幹性疾患研究施設・脳神経小児科部門・教授

【研究要旨】 遺伝性ライソゾーム病の治療には酵素補充療法が開発され応用されているが、神経障害には必ずしも有効ではない。ライソゾーム病の神経障害の治療法の確立が望まれている。本研究ではグルコース類似体を用いて、ゴーシェ病の変異酵素βグルコシダーゼの活性化を目的とする。ゴーシェ病の変異酵素のうち、F213I 変異を活性化するグルコース類似体を見出し、この類似体は変異 F213I 酵素のリソゾーム内濃度を高め、酵素活性を上昇させることを明らかにした。この化合物は低分子で血液脳関門を通過する可能性があり、脳内の残存酵素活性の上昇と蓄積の減少が期待でき、神経障害にたいする有望な治療法となる可能性がある。

A. 研究目的

ライソゾーム病の多くはライソゾーム内の糖脂質加水分解酵素の欠損によっておこる。Suzuki らは、Fabry 病の変異酵素 α ガラクトシダーゼが、ガラクトースおよびその類似体によって活性化されることを見いだした。これはある種の変異を持つ酵素蛋白質は中性の条件では不安定であるが、ガラクトース類似体を添加すると酵素蛋白質が 中性の条件でも安定化する。このことはある種の変異を持つ酵素蛋白質は、酵素蛋白質が合成される中性の環境である小胞体やゴルジ装置で極めて不安定で、酸性の環境であるライソゾームに運ばれるまでに分解されてしまう可能性を示し、ガラクトース類似体を用いると、中性の環境で分解される酵素蛋白質を安定化し、酸性のオルガネラであるライソゾームに運ばれる可能性を示している。Suzuki らはこの理論を分子シャペロン療法と命名している。

この理論にたてば、適切な阻害剤が見いだせれば、糖脂質の糖鎖分解酵素の欠損による多くのライソゾーム病へ応用可能な治療薬が見いだせる可能性がある。我々は、この治療法理論のバイオニアである鈴木義之博士との共同で、変異型α及びβグルコシダーゼを活性化できる阻害剤のスクリーニングを行い、ゴーシェ病の欠損酵素αグルコシダーゼの一つの変異酵素を活性化する阻害剤を見いだした。

B. 研究方法

正常人由来の皮膚線維芽細胞のホモジネートを酵素蛋白質液として、グルコース類似体である GlcX が正常βグルコシダーゼの活性を試験管内で阻害することを見出した。

培養中の細胞へ GlcX を添加し、酵素活性が上昇する変異細胞株をスクリーニングした。

酵素蛋白質のレベルをウエスタンブロットにより検討した。

変異酵素蛋白質の各種 pH での安定性を検討し、GlcX 存在下での安定性を検討した。

酵素蛋白質の抗体を用いて、細胞内の酵素蛋白質の分布を免疫染色および細胞小器官分画とその分画の酵素蛋白質量をウエスタンブロットで比較検討した。

さらに、分解されるべき基質が増加する条件下で、GlcX 存在下で、基質の蓄積が減少するかどうか検討した。

C. 研究結果

GlcX は正常のβグルコシダーゼ活性に対する IC50 が 3μM と極めて低濃度で阻害した。

GlcX を Gaucher 病培養線維芽細胞に添加すると F213I 変異をホモまたはヘテロに持つ細胞では、βグルコシダーゼ活性が 5 - 6 倍に増加し、正常の 80% 近くまで上昇することを見いだした。L444P 変異、N370S/88GG 変異ではこのような上昇は認められなかった。

F213I 変異を持つ細胞を GlcX 存在下で培養し、ホモジネートを 37°C, pH7, 6, 5 におき、酵素活性の変動をみた。この結果 F213I 変異は pH7 では急速に失活し、pH5, pH6 では比較的安定であった。一方ホモジネートとともに、GlcX を添加すると、pH7 でも pH5 と同程度の安定化が見られ、GlcX は変異酵素と結合して安定化させることが明らかになった。

βグルコシダーゼの抗体を用いて、正常および F213I 変異を持つ細胞のβグルコシダーゼの局在を

検討した。正常ではライソトラッカーと一致するライソソームに点状に染色像を認めたが、F213I 変異を持つ細胞では、細胞質全体に淡い染色を認めたのみであった。一方、GlcX を添加して培養すると F213I 細胞でも、ライソソーム内に強い染色性を認めた。さらに F213I 変異を持つ細胞を GlcX 存在下、非存在下に培養し、細胞小器官を分画したところ、GlcX 存在下でリソゾーム分画の蛋白量が増加した。GlcX によって酵素蛋白質が安定化し、ライソソーム内の酵素蛋白量が増加することが明らかになった。

発現が増加し、ライソソームに集まった酵素が、基質を分解する活性を持つかどうか検討した。14C セリンを標識し、正常細胞と比較し、F213I 細胞でグルコシルセラミッドの量が増加している条件を作成し、この条件下で GluX を添加した所、F213I 細胞のグルコシルセラミッドの蓄積が正常レベルとなった。GluX によって増加し、ライソソームに集まったβグルコシダーゼが実際に蓄積基質を減少させることが明らかになった。

D. 考察

ゴーシェ病の原因酵素であるβグルコシダーゼの1つの変異 F213I のリソソーム内蛋白量を安定化させ、正常のレベルにまで活性を上昇させ、蓄積するグルコシルセラミッドを減少させるグルコース類似体を見いだした。ゴーシェ病の治療法として、酵素補充療法が行われている。II型やIII型ゴーシェ病の中枢神経障害に対しては有効ではない。F213I 変異はIII型の臨床症状の原因遺伝子変異である。GluX は低分子で、血液脳関門を通過できると考えており、F213I を持つ患者の有効な治療法とできる可能性がある。今後、GluX の毒性試験とともに動物モデルを用いた治療効果の判定を行う必要がある。

E. 結論

III型ゴーシェ病の原因変異の1つである F213I 変異を持つβグルコシダーゼを安定化・活性化するグルコース類似体を見いだした。ゴーシェ病の中枢神経障害に対する新しい治療薬となる可能性が高い。

F. 健康危険情報 なし

G. 論文発表

1) 学会発表

大野耕策、侯 琳、杉本優子、二宮治明、井上岳彦、岡 明、難波栄二、井田博幸、衛藤義勝、小川誠一郎、鈴木義之。ケミカルシャペロン法による Gaucher 病治療法の開発。第8回日本ライソゾー

ム病研究会、平成14年11月21-22日、東京

2) 論文発表

- 1) Sakuraba H, Matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Kotani M, Lin H, Ohno K, Tanaka A, Yamada H, Uyama E. Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis O variants. *J Hum Genet* 47: 176-183, 2002
- 2) Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Maruyama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid β deposition associated with APOE ϵ 4 homozygosity. *Ann Neurol* 52: 351-355, 2002.

H. 知的所有権の取得状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
Suzuki Y, Oshima A, Nanba E	β -Galactosidase deficiency:(β -galactosidosis):G _{M1} . Gangliosidosis and Morquio B disease	Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B	The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease	McGraw-Hill	New York	2002	Internet Ver.
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	The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease	McGraw-Hill	New York	2001	3669-3694
Suzuki Y, Oshima A, Nanba E	β -Galactosidase deficiency:(β -galactosidosis):G _{M1} . Gangliosidosis and Morquio B disease	Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B	The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease	McGraw-Hill	New York	2001	3775-3809

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Ogawa S, Matsunaga YK, Suzuki Y	Chemical modification of the β -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- β -valienamine:Synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-(β -D-galactopyranosyl)derivatives.	Bioorg Med Chem	10	1967-1972	2002
鈴木義之	β -ガラクトシドーシス:新しい分子治療法の開発	神経進歩	46	851-858	2002
Itoh M, Matsuda J, Suzuki O, Ogura A, Oshima A, Tai T, Suzuki Y, Takashima S	Development of lysosomal storage in mice with targeted disruption of the β -galactosidase gene :a model of human G _{M1} -gangliosidosis.	Brain Dev	23	379-384	2001
YonedaM, KurosawaM, WatanobeH, ShimadaT, Terano A	Brain-gut axis of the liver: the role of central neuropeptides.	J Gastroenterol	37 Suppl 14	151-156	2002

SugimotoA, AikawaY, KobayashiR, Kurosawa M	Responses of hepatic glucose output to noxious mechanical stimulation of the skin in anaesthetised rats.	Auton Neurosci	102	45-53	2002
MiyasakaK, MasudaM, Kanai S, SatoN, KurosawaM, Funakoshi A	Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus.	Pancreas	25	400 -404	2002
KurosawaM, EnomotoK, AikawaY, Yoneda M	Hepatic blood flow responses to mechanical stimulation of the skin in anaesthetised rats.	Auton Neurosci	99	40-46	2002
Lund I, Yu LC, Uvnas-Moberg K, Wang J, Yu C, KurosawaM, Agren G, RosenA, LekmanM, Lundeberg T	Repeated massage-like stimulation induces long-term effects on nociception: contribution of oxytocinergic mechanisms.	Eur J Neurosci	16	330 -338	2002
UnnoT, HashimotoM, AraiS, Kurosawa M	Reduction of food intake following X-ray irradiation of rats--involvement of visceral afferent nerves.	Auton Neurosci	96	119 -125	2002
KurosawaM, Unno T, AikawaY, Yoneda M	Neural regulation of hepatic blood flow in rats: an in vivo study.	Neurosci Lett	321	145 -148	2002
Saito Y, Geyer A, SasakiR, KuzuharaS, NanbaE, MiyasakaT, SuzukiK, Murayama S	Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation.	Neurology	58	811 -813	2002
Saito Y, Suuki K, NanbaE, YamamotoT, OhnoK, Murayama S	Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E ε4 homozygosity.	Ann Neurol	52	351 -355	2002