

様式A-1(4)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 16 年 4 月 10 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住所 152-0022 東京都目黒区柿の木坂 1-27-10

フリカ ナ スズキヨシユ

研究者 氏名 鈴木 義之

(所属機関 国際医療福祉大学臨床医学研究センター)

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発 (H14-こころ-017)
国庫補助金精算所要額 : 金 10,000,000 円也

1. 厚生労働科学研究費補助金研究総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
8. 健康危険情報

別添 2

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 義之

平成 16(2004)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	
II.	分担研究報告	
	1. GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経機能評価	4
	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	7
	松田潤一郎	
	3. GM1-ガングリオシドーシスに対する神経変性メカニズムとケミカル	9
	シャペロン法の研究	
	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	11
	大野耕策	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV.	研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	15
V.	健康危険情報	16
VI.	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

新しく合成した2種の化合物 NOEV、NOV を β -ガラクトシダーゼ欠損症、 β -グルコシダーゼ欠損症の治療薬として検討し、NOEV はモデル動物に有効であることを確認した。ノックアウト・トランスジェニック操作により作成した β -ガラクトシダーゼ欠損モデルマウスに大量生産が可能になった NOEV 水溶液を1週間経口投与し、中枢神経系を含む全組織における酵素活性発現と、蓄積脂質の分解を確認した。この種の低分子ケミカルシャペロンがヒトの神経遺伝病に有効である可能性が、マウス個体で確認できたということである。ゴーシェ病に対する候補薬剤として得られた NOV の効果は、 β -ガラクトシダーゼ欠損症に対する NOEV ほど活性が高くないが、患者由来線維芽細胞に対する変異特異的効果を確認した。

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・鳥取大学教授
大野耕策・鳥取大学教授
研究協力者
飯田真己・生化学工業株式会社研究員
小川誠一郎・慶應義塾大学名誉教授
伊藤雅之・国立精神・神経センター室長

A. 研究目的

遺伝子変異による神経遺伝病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、 β -ガラクトシダーゼ欠損症(G_{M1} -ガングリオシドーシス、モルキオ B 病)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。その結果、新しく合成により得られた2種の化合物、NOEV (N-オクチル-4-エピ- β -バリエナミン) と NOV (N-オクチル- β -バリエナミン) がそれぞれ変異 β -ガラクトシダーゼ、変異 β -グルコシダーゼの活性還元の有効であることが分かったので、本研究の実験に用いた。

そして、種々のヒト β -ガラクトシダーゼ変異遺伝子をノックアウトマウスに導入し、特異的に発現するモデル動物を作成した。これらの動物の中で、 β -ガラクトシダーゼの R201C 変異遺伝子を発現するマウス(ヒト若年形 G_{M1} -ガングリオシドーシスのモデル動物)が薬剤に対して最もよい反応を示したので、今回の実験に用いた。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。

動物実験は国際医療福祉大学、国立感染症研究所それぞれの研究倫理委員会の指針に従い、承認を受けた。苦痛除去のためにペントバルビタールを腹腔内に投与したが、行動観察は無麻酔で行った。組織の化学分析における薬剤の影響を避けるため、動物実験終了時には、頸椎脱臼により速やかな処理を行った。

C. 研究結果

本年度は大量生産により得られた化合物を使い、マウス個体への投与実験を行なった。短期間の投薬後、形態学的に最も脂質蓄積が強く認められた大脳前頭側頭葉に著しい蓄積の減少を認め、酵素活性が強く染色された。経口チューブにより定量的に薬剤を投与しても結果はほぼ同じであった。この結果は、腸管から吸収された化合物が血流に入り、血液脳関門を通過して神経細胞に到達したことを示すものである。さらにこの薬剤の血中濃度、組織内濃度の測定を試みた。その結果、脳組織に実際に到達したという予備的な結果が得られた。今回の NOEV 投与はこのモデルマウスの発症前(生後3ヶ月)であり、中枢神経症状には変化がなかった。またこの短期間の投与では動物の全身状態、体重、飲水量、血液生化学などに異常がなかった。

D. 考察

われわれの提唱する低分子ケミカルシャペロンが、マウス個体実験で、ヒトの神経遺伝病に有効である可能性を示した。そして、今回使用したNOEVが、 β -ガラクトシダーゼ欠損個体の脳に実際に効果を示すことを形態学的・分析化学的に確認した。このことはこの方向のアプローチが、現在は治療法のない神経遺伝病に有効である可能性を示すものである。さらに、もうひとつの類似体NOVが β -グルコシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）症例に、変異特異的に有効であることも分かった。これら2種の物質の構造特許、用途特許出願は公開中である。今後、ほかの類似疾患についても順次検索を広げる予定である。

E. 結論

新しい治療薬の開発を目指して、低分子化合物を酵素欠損モデル動物に経口投与したところ、短期間に中枢神経系の病変が形態的・化学的に著しく改善された。このアプローチは脳の遺伝病の新しい治療法となる可能性がある。この研究はこれまでの遺伝病に対する治療的アプローチとはまったく異なる新しい発想に基づき国内ではじめられた独創的研究である。現在、脳の遺伝病には治療法がない。オーファンドラッグを用いた治療が行われているまれな病気、ゴーシェ病の治療薬にかかる費用は巨額であるにもかかわらず、脳障害の治療効果は明らかでない。この種の病気を持った患者の一部にでもこの新しい経口薬によるより安価な治療法が適用されれば、社会的経済的効果はきわめて大きく、その成果は基礎的研究のみならず脳障害児・者の医療・看護・介護にかかる社会的経済的負担を軽減するのに著しく貢献するであろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A: Attenuation of ganglioside GM₁ accumulation in the brain of GM₁ gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer. *Gene Ther* 10: 1487-1493, 2003.
2. Suzuki Y: Lysosomal storage diseases. *Paediatrica Croatica* 47: 111, 2003.
3. Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y:

Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM₁-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15912-15917, 2003.

4. 衛藤義勝、大橋十也、宇都宮保典、藤原優子、水野愛子、乾 幸治、酒井規夫、北川照男、鈴木義之、望月正武、河上牧夫、細谷龍男、大和田 操、桜庭 均、斎藤博久：日本人ファブリー病患者における酵素補充療法：第II相オープン試験の結果。小児科診療 66: 1435-1444, 2003.

学会発表

1. Suzuki Y: Future of Child Neurology: from molecule to patient. The First Joint Conference of Scandinavian Neuropediatric Society and Baltic Child Neurology Association and The 7th International Conference of Baltic Child Neurology Association in cooperation with 4th Conference of Estonian Society of Human Genetics, Tallinn, Estonia, 2003.5.27-31.
2. Suzuki Y: Lysosomal storage diseases. 9th Mediterranean Meeting of Child Neurology, Dubrovnik, Croatia, 2003.5.29-31.
3. Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Ito M, Matsuzaki Y, Ogawa S, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y: A new compound NOEV for chemical chaperone therapy of GM₁-gangliosidosis. 32nd Annual Meeting of the Child Neurology Society, Miami Beach, FL, USA, 2003.10.1-4
4. 岩崎博之、一ノ宮悟史、渡辺浩史、富永里香、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を用いたケミカルシャペロン療法を検討。第46回日本先天代謝異常学会総会、松江市、2003.11.20-22
5. 富永里香、難波栄二、岩崎博之、鈴木義之： β -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子解析。第46回日本先天代謝異常学会総会、松江市、2003.11.20-22
6. 高村歩美、小川由美、富永里香、難波栄二、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：ケミカルシャペロン法を用いた治療法研究：GM₁-ガングリオシドーシス R201C 変異に対する効果。第46回日本先天代謝異常学会総会、松江市、2003.11.20-22
7. 鈴木義之：遺伝性ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法。第46回日本先天代謝異常学会総会シンポジウム「先天代謝異常の新しい治療戦略」、松江市、2003.11.20-22

8. 山本浩一、高村歩美、富永里香、檜垣克美、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之：27種類のヒト β -galactosidase変異細胞株の樹立. 第9回日本ライソゾーム病研究会、東京、2003.12.4-5

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）
特願2001-272775号、平成13年9月7日出願、公開中。
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）、特願2002-260534号、平成14年9月5日出願、公開中。
3. 糖脂質代謝異常症の治療薬（鈴木義之、大野耕策）、特願2001-272777号、平成13年9月7日出願、公開

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

G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経機能評価

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、疾患モデル動物を用い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。本研究は、G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経機能評価に、自発行動量が指標として使えるかどうかを検討することを目的に行った。実験には雌雄のβガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス (KO マウス)、ヒト患者変異 cDNA を KO マウスにトランスジーンとして導入したトランスジェニックマウス (Tg マウス)、野生型マウスを用いた。その結果、KO マウスで神経症状が出現する 30-40 週齢において、KO マウス、Tg マウス、野生型マウスはいずれも、夜間に行動量が増加する明確な昼夜リズムを示した。また、行動量は野生型雄マウスでのみ顕著な低下を認めたが、他のマウス群間では有意な差は認められなかった。本結果より、今回の自発行動量の測定では、神経症状そのものの不自然な動きもカウントしてしまうことが示唆された。しかし逆に将来の投薬実験において、行動量カウント数の減少が投薬効果の指標となりうる可能性も考えられた。

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 G_{M1}-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を確立し、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いなかったが、昨年度、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ができた。本年度は G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経機能評価に、自発行動量が指標として使えるかどうかを検討した。また、投薬を飲水に混ぜて行う計画であるため、飲水量についても同時に検討した。

B. 研究方法

正常およびモデルマウスをポリカーボネイトの飼育ケージに入れ、自由摂餌、24±1°C、12 時間明暗条件下で飼育した。測定には、野生型マウス、βガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス（以下 KO マウス）、ヒト患者変異 cDNA を KO マウスにトランスジーンとして導入したトランスジェニックマウス（以下 Tg マウス）を使用した。いずれの群も雌雄のマウスを用い、雌雄差も比較した。今回の測定には、KO マウスに神経症状が

現れる後の、30-40 週齢のマウスを使用した。

自発行動量は、飼育ケージの上にスーパーメックスセンサー（室町機械、東京）を取り付けて測定した。スーパーメックスセンサーは焦電型赤外線センサーをフレネルレンズにより複数分割したもので、動物が動くことにより分割された区画間に遠赤外線の放射量に変化が生じた場合に、カウント出力する。

飲水量もまた自発行動量と同様、経時的に測定した。すなわち、マウスが飲水口をなめると水が滴下し、その 1 滴 1 滴を電気的にカウントすることにより飲水量を測定した。

（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

げっ歯類の性周期は通常 4 日であることが知られているので、まず連続した 4 日間の行動量を解析した。その結果、30-40 週齢のマウスには明確な 4 日間周期の行動量変化がないことがわかった。ただし、若齢のマウスでは性周期に伴って行動量変動がある可能性も想定し、将来の実験との整合性も考慮して連続 4 日間の平均行動量を算出し、各群の行動量とした。

1. 行動量

1) 野生型マウス:

雌雄ともに夜間に行動量が増加する明確な昼夜リズムを示した。ただし、昼夜ともに雄マウスは雌マウスの30-50%の行動量を示すにとどまった。

2) KOマウス:

KOマウスも雌雄ともに夜間に行動量が増加する明確な昼夜リズムを示していた。KOマウスは外見的には神経症状が現れていたが、昼夜の行動量は雌雄共に野生型の雌マウスとほぼ等しい結果となった。

3) Tgマウス:

Tgマウスも雌雄ともに夜間に行動量が増加する明確な昼夜リズムを示した。昼夜の行動量は雌雄共に野生型雌マウスの行動量よりやや多い傾向を示した。

2. 飲水量

外見的に神経症状のないTgの雄マウスと顕著な行動量低下を示した野生型の雄マウスで飲水量を検討した。その結果、飲水量には両群間に差を認めなかった。

D. 考察

本研究より、神経症状が出現しても、行動量の昼夜リズムは維持されることが明らかとなった。また、野生型では自発行動量に顕著な雌雄差が認められるにも関わらず、KOマウス、Tgマウスでは雌雄差がないことも明らかとなった。換言すれば、野生型の雄マウスを除き、他の群の雌雄マウスの行動量は同程度であった。本理由の一つとして、野生型雄マウスの体重増加が考えられた。今後は体重を加味した検討が必要であると考えられる。

一方、KOマウスでは外見的に明白な神経症状が出ており、動きも遅くなっているのにも関わらず、今回の「自発行動量」測定では、野生型マウス、Tgマウスに比べて減少傾向を認めなかった。この理由として、今回の測定ではKOマウスの不自然な動きをもカウントしてしまっている可能性が考えられた。今後は行動量測定の感度を検討する必要がある。現在、受光赤外線量を減弱させるフィルターをスーパーメックスセンサーに装着してその効果を検討中である。また、行動パターンそのものを解析する実験の必要性もあると考えている。

行動量低下を認めた野生型の雄マウスも、飲水

量に関してはTg雄マウスとほぼ等しかった。飲水量についての今回のデータは、投薬を飲水中に混ぜて行うことの妥当性を支持している。

E. 結論

GMI-ガングリオンドーンズモデルマウスの神経機能評価に、自発行動量が指標となりうるかどうかを検討した。今回の自発行動量の測定では、神経症状そのものの不自然な動きもカウントしてしまう問題点も明らかとなったが、投薬の効果として、行動量カウント数の減少が指標となりうる可能性が示唆された。

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, Terano A. Lafutidine increases hepatic blood flow via potentiating the action of central thyrotropin-releasing hormone in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 18:177-84, 2003.
- 2) Stener-Victorin E, Kobayashi R, Kurosawa M. Ovarian blood flow responses to electro-acupuncture stimulation at different frequencies and intensities in anaesthetized rats. *Auton Neurosci*, 108:50-56, 2003.
- 3) Stener-Victorin E, Shimokuji-Kobayashi R, Watanabe O, Lundberg T, Kurosawa M. Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anaesthetised rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004 (in press)
- 4) Sato N, Kanai S, Takano S, Kurosawa M, Funakoshi A, Miyasaka K. Central administration of ghrelin stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus in conscious rats. *Jpn J Physiol*, 53:443-449, 2003.

2. 学会発表

- 1) 小林里江、丸山仁司、黒澤美枝子: 骨格筋刺激による肝グルコース放出反応とその自律神経性機序、第80回日本生理学会大会、福岡、2003.3.25.

- 2) Kurosawa M, Kobayashi R, Maruyama H:
Reflex regulation of hepatic glucose output via
the autonomic nerves by electrical stimulation
of the muscle in anesthetized rats, 3rd
Congress of International Society of
Autonomic Neuroscience, Calgary, 2003.7.6.
- 3) 小林立江、丸山仁司、黒澤美枝子：骨格筋刺激
による反射性肝グルコース放出反応、第26回日
本神経科学会大会、名古屋、2003.7.24.
- 4) 黒澤美枝子、下重里江：ラット卵巣血流におよ
ぼす鍼通電刺激の影響、第56回日本自律神経
学会総会、新潟、2003.10.31.
- 5) 黒澤美枝子、渡邊織江、下重里江：鍼通電刺激
によるラット卵巣血流の反応、第31回自律神経
生理研究会、東京、2003.12.6.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し。

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

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 マウスに低分子化合物 NOEV を投与したところ、chemical chaperon として中枢で作用し、脳における β -ガラクトシダーゼ活性を濃度依存的に増大させた。今回の条件 (0.5mM、5 週間) においては脳全体の蓄積物質の減少は検出できずなかった。NOEV は 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が、投与量、投与期間などの更なる検討が必要だと考えられた。

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、低分子化合物の効果を検討したところ、昨年度までに酵素活性増大効果を認めた。本年度は、化合物の濃度や投与方法の検討、さらに蓄積物質の生化学的検討を行った。

B. 研究方法

モデル動物として、 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 マウスを用いた。このマウス (5 か月令または 4 か月令) に、ガラクトース誘導体 NOEV(N-octyl-4-epi- β -valienamine) の 0.5 mM, 0.1 mM, 0.02 mM 及び 0 mM 水溶液を飲水として 5 週間自由摂取により投与し、また、ステンレス製胃ゾンデを用いて 1mM NOEV 水溶液 0.5ml を一日一回、1 週間、マウスに強制投与した。投与終了後マウスの各臓器の β -Gal 活性を測定するとともに、常法により脂質を抽出し生化学的検索

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

5 週間自由摂取投与群において NOEV 濃度に比例して各臓器の β -Gal 活性が増加した。大脳においては、投与群では非投与群に比べ約 1.4 倍 (0.02mM)、約 4.8 倍 (0.1mM) から最大約 8 倍 (0.5mM) の β -Gal 活性増大が認められた。しかし脳全体を用いた生化学的検索では個体差が大きく明確な蓄積物質の減少は検出できなかった。経口強制投与群では各臓器の酵素活性増大は、0.1mM NOEV 自由摂取投与群と同程度であった。

D. 考察

経口投与により低分子化合物 NOEV は chemical chaperon として中枢で作用し、濃度依存的に変異酵素の活性増大をもたらすものと考えられた。但し、今回用いた濃度(0.5mM)と期間(5 週間)においては脳全体を用いた生化学的検索では明確な蓄積物質の減少は検出できず、高濃度で長期投与が必要だと考えられた。自由摂取では必ずしも動物が摂取する薬物量が一定ではないことが懸念されたが、胃ゾンデによる NOEV 強制投与と同等の活性増大効果が得られていることが判明し、自由摂取が充分有効であると考えられた。NOEV の投与量、投与期間などさらに検討する必要があるが、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

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 マウスに低分子化合物 NOEV を投与したところ、chemical chaperon として中枢で作用し、脳における β -ガラクトシダーゼ活性を濃度依存的に増大させた。今回の条件 (0.5mM、5 週間) においては脳全体の蓄積物質の減少は検出できずなかった。NOEV は 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が、投与量、投与期間などの更なる検討が必要だと考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y, Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis.

Proc Natl Acad Sci USA, 100: 15912-15917, 2003.

2. 学会発表

滝本一広、山本美江、野口章、竹川奈穂、鈴木治、野口洋子、高野薫、小浦美奈子、伊藤雅之、松田潤一郎：GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒト β -ガラクトシダーゼ変異酵素を発現するモデルマウスの病態解析。第 50 回日本実験動物学会総会、2003 年 5 月、さいたま市。

高村歩美、小川由美、富永里香、難波栄二、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：ケミカルシャペロン法による GM1-ガングリオシドーシス R201C 変異細胞のガングリオシド蓄積減少効果。第 46 回日本先天代謝異常学会、2003 年 11 月、松江市。

山本浩一、高村歩美、富永里香、檜垣克美、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、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之：27 種類のヒト β -galactosidase 変異細胞株の樹立。第 9 回日本ライソゾーム病研究会、2003 年 12 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

GM1-ガングリオシドーシスに対する神経変性メカニズムと
ケミカルシャペロン法の研究

分担研究者 難波栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

研究要旨

GM1-ガングリオシドーシスの神経変性メカニズムの解明を目的としてマウス脳由来神経細胞初代培養系を用い解析を行った。ロ-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス小脳由来培養小脳顆粒細胞はアポトーシスのマーカーであるアネキシンVに陽性を示した。I51T変異マウス由来培養顆粒細胞は低カリウム誘導のアポトーシスに陽性を示した。また、ノックアウトマウス大脳由来培養アストロサイトはライソゾーム内にGM1の蓄積を示し、R201C変異マウス由来培養アストロサイトはガラクトース類似誘導体 NOEV により変異酵素活性の上昇を認めた。

A. 研究目的

GM1-ガングリオシドーシスは中枢神経障害を呈するライソゾーム蓄積病であり、遺伝子治療など治療法の研究も進められているが、神経細胞の変性機構は不明である。我々はモデルマウス脳由来神経細胞初代培養系を用い、GM1-ガングリオシドーシスの神経変性メカニズムを解明することを目的として研究を行った。また、我々が進めている脳を標的としたケミカルシャペロン療法の検討も行った。

B. 研究方法

神経細胞初代培養にはロ-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス、およびヒト変異ロ-ガラクトシダーゼ遺伝子を導入したノックインマウス(R201C、I51T)を用いた。顆粒細胞の初代培養は生後8日目のマウス小脳より10%胎児牛血清、25mM KClを含むDMEM/F12(1:1)培地で行った。アストロサイト初代培養は、生後4日目の大脳より15%または10%胎児牛血清を含むDMEM/F12(1:1)培地で行った。細胞種の同定は顆粒細胞は抗MAP2抗体、アストロサイトは抗GFAP抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。アネキシンV染色はアポトーシス細胞の標識として用いた。GM1ガングリオシドの蓄積は抗GM1抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。ライソゾームの染色はライソトラッカーを用いた。ロ-ガラクトシダーゼ酵素活性の測定には4MU人工基質を用いた。

C. 研究結果

β-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス由来培養小脳顆粒細胞は培養6日目でアネキシンV陽性を示した。また、ヘテロマウスは低カリウム培地2時間で顆粒細胞がアネキシンV陽性を示すのに対し、I51Tマウス顆粒細胞はそれより早く低カリウム0.5時間ですでにアネキシンV陽性を示した。一方、ノックアウト由来培養アストロサイトは正常マウス由来アストロサイトでは見られないライソゾーム内に顆粒状のGM1蓄積が認められた。R201Cマウス由来アストロサイトはノックアウト程ではないが、軽度のGM1が蓄積していた。またR201Cマウス由来アストロサイトはNOEV投与により有意なロ-ガラクトシダーゼ酵素活性の上昇を示した。ところが、同じ条件で、正常マウス由来アストロサイトでは20-30%の酵素活性が抑制された。ノックアウトマウス由来アストロサイトではNOEV投与による酵素活性の変化は見られなかった。

D. 考察

小脳培養顆粒細胞のアポトーシスはGM1-ガングリオシドーシス神経細胞の脆弱性を示すだけでなく、細胞膜構造の何らかの変化を示唆する。顆粒細胞でのGM1蓄積の有無は現在検討中である。R201Cマウス由来培養アストロサイトはヒトおよびマウス由来繊維芽細胞同様、NOEVによる残存酵素活性の上昇を示した。しかし、正常マウス由来アストロサイトでは酵素活性の抑制効果が見られたことは、繊維芽細胞とは異なり、今後NOEVの個体への投与を考える上で、特に脳と他の組織との効果の違いを示

唆する重要な知見である。

E. 結論

GM1-ガングリオシドーシスマウスにおける小脳神経細胞の脆弱性を培養細胞系で示した。NOEVは神経系細胞へも残存酵素活性からの復元効果があることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA 100(26): 15912-15917, 2003
- 2) Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A: Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal intervenous gene transfer. Gene Ther 10: 1487-1493, 2003

2. 学会発表

- 1) 岩崎博之、一ノ宮悟史、渡辺浩史、富永里香、難波栄二、松崎裕二、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を用いたケミカルシャペロン療法の検討
第46回日本先天代謝異常学会総会（松江）2003年11月20-22日
- 2) 富永里香、難波栄二、岩崎博之、鈴木義之
β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子解析
第46回日本先天代謝異常学会総会（松江）2003年11月20-22日
- 3) 高村歩美、小川由美、富永里香、難波栄二、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之
ケミカルシャペロン法を用いた治療法研究：GM1-ガングリオシドーシス R201C 変異に対する効果
第46回日本先天代謝異常学会総会（松江）2003年11月20-22日
- 4) 山本浩一、高村歩美、富永里香、檜垣克美、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之
27種類のヒト b-galactosidase 変異細胞株の樹立
第9回日本ライソゾーム病研究会（東京）2003年12月4-5日

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

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
研究協力者 井上岳彦、雷珂

【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。現在さらに低濃度で変異酵素を活性化する新たな類似体のスクリーニングを行い、いくつか使用可能な化合物を見出しつつある。またこの治療法が適応できる変異のスクリーニングも行っている。

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、この治療法理論のパ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β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。この類似体（GlcX）は酵素蛋白質を安定化しpH7の中性域における酵素活性の失活を防ぎ、F213I変異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。さらにこの類似体の存在下において、分解されるべき基質であるグルコシルセラミッドの蓄積の減少を確認した。

将来目標とする人への投与を行う上で、阻害剤は

少しでも少量で有効性を示す薬剤であることが望ましい。そのため今年度、新たに合成された13種類のグルコース類似体について、ゴーシェ病変異βグルコシダーゼに対する作用を検討した。

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、新たに合成された13種類のグルコース類似体が正常βグルコシダーゼの活性を試験管内で阻害するかを調べ、その阻害作用をGlcXのそれと比較した。

13種類のグルコース類似体のうち、上記の試験管内での阻害作用がGlcXより強かった類似体を、培養中の正常細胞およびF213I変異をホモに持つ細胞へ添加し、酵素活性の上昇作用を調べ、その程度をGlcXと比較した。

C. 研究結果

13種類の新たなグルコース類似体のうち、正常のβグルコシダーゼ活性に対するIC50がGlcXよりも低かった類似体は、6種類であった。

上記6種類のグルコース類似体を正常人由来の培養皮膚線維芽細胞に添加したところ、GlcXを含めいずれのグルコース類似体も0.3nMの濃度で酵素活性の上昇が最大であった。酵素活性の上昇の程度はGlcXが約1.4倍であったのに対し、3種類の類似体がGlcXと同程度の上昇作用を示し、1種類の類似体はそれらを上回る2倍の上昇を示した。

先の6種類のグルコース類似体をゴーシェ病培養皮膚線維芽細胞に添加するとF213I変異をホモに持つ細胞では、GlcXが3μMの濃度で約4倍の酵素活性の上昇を示したのに対し、1種類の類似体は0.3

μM の濃度で最大約 2.5 倍の活性上昇を示した。また別の 1 種類の類似体は $0.03\mu\text{M}$ の濃度で最大約 1.4 倍の活性上昇を示した。その他の類似体においては酵素活性の上昇は軽微であった。

D. 考察

GlcX 以外の新しく合成されたグルコース類似体のうち、F213I 変異細胞への添加において、GlcX よりもより低い濃度で酵素活性を上昇させる 2 種類の類似体を発見した。それら 2 種類の類似体の酵素活性の上昇度の最大値は、GlcX には及ばなかったが、1 種類の類似体は GlcX ではわずかな酵素活性の上昇しか示さない低濃度において明らかな上昇を示しており、GlcX と比べてより少量で有効性を示す治療薬となり得る可能性が示唆された。なお現在 F213I 以外の変異をもつ細胞に対しても同様の実験を進行中である。

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 型ゴーシェ病の中樞神経障害に対しては有効ではない。F213I 変異は・型の臨床症状の原因遺伝子変異である。GlcX を含めたグルコース類似体は低分子で、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、GlcX を含む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・活性化する新たなグルコース類似体を見出した。ゴーシェ病の中樞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. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuda J, Suzuki O, Oshima M, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y.
Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA 100 : 15912-7,2003
2. Ono H, Sakura N, Yamashita K, Yuasa I, Ohno K.
Novel nonsense mutation (R194X) in the

PMM2 gene in a Japanese patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. Brain Dev 25(7):525-8,2003

3. Matsuzawa F, Aikawa SI, Sakuraba H, Lan HT, Tanaka A, Ohno K, Sugimoto Y, Ninomiya H, Doi H.
Structural basis of the GM2 gangliosidosis B variant. J Hum Genet. 48:582-589,2003
4. Pipo JR, Feng JH, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K.
New GAA mutations in Japanese patients with GSDII (Pompe disease). Pediatr Neurol 29(4):284-7,2003
5. 大野耕策. 神経回路網障害を中心とした脳発達障害研究の進歩—ニーマン・ピック病C型の神経変性機構の分子機構. 脳科学研究の現状と課題. 杉田・高橋 (編). じほう、東京、2003、pp188-200
6. 大野耕策、二宮治明. ニーマン・ピック病C型の分子病態. 遺伝子医学 7:86-92,2003

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

別添6

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A	Attenuation of ganglioside GM ₁ accumulation in the brain of GM ₁ gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer.	Gene Ther	10	1487-1493	2003
Suzuki Y	Lysosomal storage diseases.	Paediatrica Croatica	47	111	2003
衛藤義勝、 大橋十也、 宇都宮保典、 藤原優子、 水野愛子、 乾幸治、 酒井規夫、 北川照男、 鈴木義之、 望月正武、 河上牧夫、 細谷龍男、 大和田操、 桜庭均、 斎藤博久	日本人ファミリー病患者における酵素補充療法：第Ⅱ相オープン試験の結果	小児科診療	66	1435-1444	2003
Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y	Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM ₁ gangliosidosis.	Proc Natl Acad Sci USA	100	15912-15917	2003

Pipo JR, Feng JH, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba A, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K	New GAA mutations in Japanese patients with GSDII (Pompe disease).	Pediatr Neurol		284- 287	2003
---	---	-------------------	--	-------------	------

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

1) ガラクトース誘導体NOEVの構造

名称	カルバ糖アミン誘導体
発明者	小川誠一郎、鈴木義之
権利者	生化学工業株式会社
種類・番号	特願2001-272775号
出願年月日	平成13年9月7日

2) ガラクトース誘導体NOEVの機能

名称	糖脂質代謝異常症治療剤
発明者	鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎
権利者	生化学工業株式会社
種類・番号	特願2002-260534号
出願年月日	平成14年9月5日

3) グルコース誘導体NOVの機能

名称	糖脂質代謝異常症の治療薬
発明者	鈴木義之、大野耕策
権利者	生化学工業株式会社
種類・番号	特願2001-272777号
出願年月日	平成13年9月7日

20030734

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。