

別添1

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

(課題番号 H14-こころ-017)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木義之

平成17(2005)年 3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 鈴木義之	1
II. 分担研究報告	
1. 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 黒澤美枝子	3
2. 神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発 松田潤一郎	5
3. G _{M1} -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 難波栄二	7
4. ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発 大野耕策	10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	14

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 国際医療福祉大学臨床医学研究センター教授

研究要旨

古典的な小児の神経遺伝病G_{M1}-ガングリオシドーシスを対象とする治療薬開発を試みた。有機合成による新しい化合物NOEV(N-オクチル-4-エピ-β-パリエナミン)が変異酵素に対して有効であることを基礎実験により確認後、ヒト変異酵素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)に対する短期の個体経口投与実験により、NOEVの脳組織への移行、酵素活性の発現、形態的・化学的効果を確認した。4ヶ月間の投与実験により、後肢の麻痺が予防できるという予備的な結果を得た。

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開発を目的とする。そのため、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)を対象とした治療法を確立する。

B. 研究方法

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(ヒト若年型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NOEVを経口投与し、組織、特に中枢神経系での反応を調べた。シャペロン濃度は3mMまでの水溶液である。異なった期間の投与後、酵素活性、蓄積脂質、NOEV濃度などを脳組織について調べた。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

短期間の投与後、形態学的には大脳脂質蓄積の減少、酵素活性の著しい上昇、NOEV濃度の上昇を認めた。

この結果は経口チューブにより定量的に薬剤を投与しても同じであった。つまり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。発症直前から4ヶ月間NOEVを投与したところ、少数例の予備データではあるが、治療群に後肢麻痺の発症予防効果がみられた。さらに長期の実験を継続中である。また8週間まで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を認めなかった。

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・臨床的に確認した。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。NOEV類似のグルコース類似化合物NOVがβ-グルコシダーゼ欠損症(ゴースェ病)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種の物質についてはすでに今年度以前に構造特許、用途特許を出願し公開中である。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、また臨床的な予防効果を示唆する結果も得られた。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. 鈴木義之. ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法. 小児科 2004; 45: 2313-2320.
2. Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y, Sawa M, Inoue T, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y. N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689: 219-228.

学会発表

1. Suzuki Y: Neurogenetic disease update. Plenary Lecture, Second International Congress of Egyptian Society of Child Neuro-psychiatry and 4th Pan Arab Child Neurology Conference, Cairo 2004. 3.31-4.1.
2. 松田潤一郎、鈴木 治、大島章弘、山本美江、野口章、滝本一広、伊藤雅之、難波栄二、檜垣克美、鈴木義之:GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデルマウスの中枢神経病変に対する新規治療法開発。第51回日本実験動物学会総会、長崎、2004.5.20-22.
3. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. 19th United Leukodystrophy Foundation Scientific Symposium. DeKalb, 2004. 7. 14-15.
4. 渡辺浩史、岩崎博之、下重里江、渡辺織江、黒澤美枝子、柴田雅祥、松田潤一郎、飯田真己、久保孝利、小川誠一郎、鈴木義之: G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床的酵素学的効果。第47回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004.11.11-13.
5. 高村歩美、檜垣克美、山本浩一、富永里香、難波

栄二、松田潤一郎、鈴木義之:GM1 ガングリオシドーシス神経変性分子メカニズムの解明とケミカルシャペロン法の研究。第47回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004.11.11-13.

6. 檜垣克美、山本浩一、富永里香、難波栄二、鈴木義之:ヒト GM1 ガングリオシドーシス変異とケミカルシャペロン法の検討。第47回先天性代謝異常学会総会、宇都宮 2004.11.11-13.
7. Suzuki Y: Recent advances in neurometabolic disorders. 8th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Delhi, 2004.10.7-10.
8. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for brain pathology in lysosomal storage diseases. International Conference: Current problems in Child Neurology, Moscow, 2004.11.7-9.
9. 山本浩一、檜垣克美、高村歩美、飯田真己、難波栄二、鈴木義之:ヒト変異 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するマウス細胞株の樹立と解析。第47回日本ライソゾーム病研究会、東京、2004.12.9-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

G_{MI} -ガングリオン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
研究協力者 柴田雅祥、一ノ宮悟史、丸山貴美子 国際医療福祉大学大学院
渡辺浩史 国際医療福祉大学リハビリテーションセンター

研究要旨

G_{MI} -ガングリオンドーシスモデルマウスの自発行動量を測定し、加齢に伴う変化を検討した。自発行動量は赤外線センサーを用いたシステムにより測定した。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、5-9ヵ月齢)、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、5-16ヵ月齢)と野生型マウス(5-17ヵ月齢)を用いた。その結果、KOマウス、Tgマウスは雌雄ともに、同月齢の野生型マウスに比べて自発行動量の指標となるカウント数が高値となった。この際、行動量のカウントには3mm程度の震えは含まれないことを確認した。ビデオトラッキングシステムによりKOマウスのオープンフィールド(0.6 x 0.6 m²)行動を観察したところ、行動の軌跡が不安定であることが明らかとなった。このような不自然な動きが自発行動量カウントの増加をもたらすと考えられた。

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_{MI} -ガングリオン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。本学では動物飼育を系統的に行っていなかったが、これまでに若年型 G_{MI} -ガングリオンドーシスのモデルマウスの繁殖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_{MI} -ガングリオンドーシスモデルマウスの自発行動量の加齢変化を検討した。疾患に伴う神経症状が自発行動量カウントとしてどのように反映されてくるかを調べることにより、今後の投薬効果実験の基礎検討を行おうとするものである。

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13匹(5-17ヵ月齢)、 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、6-16ヵ月齢)12匹、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、6-16ヵ月齢)22匹を使用した。いずれの群も雌雄のマウスを用い、雌雄差も比較した。

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。

また行動パターンを解析するために、ビデオトラッキングシステム(室町機械)を用いて、オープンフィールド(0.6 x 0.6 m²)におけるマウスの行動を観察した。

(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、連続した4日間の行動量を解析した。

1. 行動量

1) 野生型マウス:

8ヵ月齢以降のマウスでは雌雄共に、5-6ヵ月齢マウスに比べ行動量カウントが低下していた。いずれの月齢においても雄の行動量カウント数は雌に比べて低値となった。また、雌雄共にいずれの月齢においても、行動量カウント数は、夜間大きく、昼間少ないというリズムを示した。

2) KOマウス:

KOマウスの行動量カウント数は、雌雄共に、野生型に

比べて高値となった。また、5-6ヶ月齢の雄の行動量カウント数は雌に比べて低値となった。昼夜の行動リズムはKOマウスにおいても維持されていた。ビデオトラッキングシステムを用いてKOマウスのオープンフィールド行動パターンを解析したところ、行動の軌跡が野生型マウスに比べて不安定であることが確認された。

3) Tgマウス:

Tgマウスの行動量カウント数も、雌雄共に、野生型に比べて高値となった。また、6-8ヶ月齢の雄のカウント数は雌に比べて低値となった。昼夜の行動リズムはTgマウスにおいても維持されていた。

D. 考察

実験開始時にすでに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、自発行動量の指標となるカウント数は、野生型マウスに比べて減少傾向を認めず、むしろ高値を示した。Tgマウスにおいても、実験観察中に麻痺が進行していったが、自発行動量カウント数が減少することはなかった。この理由として、今回の測定では神経症状に伴う不自然な動きをもカウントしている可能性が考えられた。事実、ビデオトラッキングシステムによりオープンフィールド行動を解析したところ、KOマウスの行動軌跡は野生型マウスに比べて不安定であり、移動時の歩行が不安定であるために、自発行動量カウント数が増加して表現されることが確認された。今後は、ビデオトラッキングシステムを用いて、単位時間当たりの移動距離、歩行速度、方向転換の頻度、オープンフィールドの内側と外側の滞在時間など種々の行動パターンを解析すると共に、その結果を投薬実験で評価する必要がある。

E. 結論

GMI・ガングリオシドーシスモデルマウスの神自発行動量の加齢変化を検討した。実験期間中にKOマウス、Tgマウスに四肢の麻痺などの神経症状が出現していたが、今回の自発行動量の測定では、むしろ高値を示した。オープンフィールドにおける行動軌跡の解析により、神経症状に伴う不自然な動きがカウントされるため高値を示すと考察された。今後、神経症状に対する投薬の効果として、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、またビデオトラッキングシステムを用いたより詳細な検討の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 論文発表

1. Shimoju-Kobayashi R, Manuyama H, Yoneda M, Kurosawa M, Responses of hepatic glucose output to electro-acupuncture stimulation of the hindlimb in anesthetized rats. *Auton Neurosci Basic & Clinical*, 115:7-14, 2004.
2. Stener-Victorin E, Shimoju-Kobayashi R, Watanabe O, Lundberg T, Kurosawa M, Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anesthetised rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:16-24, 2004.
3. Kurosawa M, Taniguchi T, Yoneda M, Cholecystokinin and prostaglandins inhibit responses of vagal afferent activity to systemic administration of nicotine in anesthetized rats. *Neurosci Lett*, 362:213-215, 2004.
4. Hashimoto T, Yoneda M, Shimada T, Kurosawa M, Terano A, Intraportal nicotine infusion in rats decreases hepatic blood flow through endothelin-1 and both endothelin A and endothelin B receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196:1-10, 2004.

学会発表

1. 下重里江、丸山仁司、黒澤美枝子:ラット下腿への低強度鍼通電刺激による肝グルコース放出および血糖の反応、第81回日本生理学会大会、札幌、2004.6.3.
2. 黒澤美枝子、渡邊織江、ステナービクトリン エリザベス:鍼通電刺激によって誘発される麻酔ラットの卵巣血流反応、第81回日本生理学会大会、札幌、2004.6.3.
3. Mieko Kurosawa, Oriie Watanabe, Brian Budgell: responses of spinal blood flow to cutaneous brushing in rats. 第27回日本神経科学学会大会、大阪、2004.9.23.
4. 渡邊織江、黒澤美枝子:皮膚触刺激によるラット脊髄血流の変化、第57回日本自律神経学会総会、長崎、2004.10.29.
5. 黒澤美枝子、下重里江:皮膚刺激の肝糖代謝に及ぼす影響とその神経機序の検討、第41回日本臨床生理学学会総会、宇都宮、2004.11.19.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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の中枢神経病変をターゲットとした chemical chaperon 療法の治療薬として期待される NOEV の副作用について、GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデルマウス(ヒト変異 β -Gal 遺伝子 R201C 導入 KO-Tg マウス)を用いて、予備的検討を行ったところ、5か月令モデルマウスへの 0.5 mM NOEV の5週間飲水投与では、飲水量、体重、血液生化学値にとくに大きな影響はなく、本条件下では副作用は認められなかった。今後、高濃度、長期投与による、詳細な副作用の検討が必要であると考えられる。

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。私たちは、GM1 ガングリオシドーシス幼児型のモデルマウスを用い、 β -ガラクトシダーゼの阻害剤である低分子化合物 NOEV が脳における β -ガラクトシダーゼ活性を増大させることを示し、中枢をターゲットとした chemical chaperon 療法の可能性を明らかにした。本年度は、本化合物の副作用の有無をモデルマウスを用いて、血液生化学値の変化などを検索して検討を行った。

B. 研究方法

GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデル動物として、 β -Gal KO 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) をトランスジェーンとして持つ KO-Tg マウスを用いた。5か月令モデルマウスに、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(各群3匹)を飲水として5週間自由摂取により投与し、飲水量、体重、14項目の血液生化学値(非絶食、エーテル麻酔下心臓採血、ヘパリン処理血漿を用い、富士ドライケム 3000V により、次の項目について測定。総蛋白 TP; アルブミン ALB; クレアチニン CRE; 尿酸 UA; 血中尿素窒素 BUN; アンモニア NH₃; 総コレステロール TCHO; 中性脂肪 TG; グルコース GLU; グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ GOT; グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ GTP; クレアチンフォスフォキナーゼ CPK; 乳酸脱水素酵素 LDH; アルカリフォスファターゼ ALP)について検討した。あわせて5週令モデルマウス(3匹)に5週間 1mM NOEV 飲水投与を行った場合の体重変化も観察した。

(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

これら5週間自由摂取投与群において NOEV 濃度に比例して脳を含む各臓器の β -ガラクトシダーゼ活性が増加していた。5か月令マウスの実験群では、一日平均飲水量は 3.5ml~4.7ml であり、各濃度の投与群および非投与群で明らかな差は認められなかった。5か月令と5週令のモデルマウスにおいて体重推移を調べたが、すべての群で増加傾向を示し、投与群、非投与群で有意差は認められなかった。同じく、5か月令モデルマウスの14項目の血清生化学値において、顕著な異常は認められなかった。

D. 考察

飲水に添加した 0.5 mM NOEV は、chemical chaperon として中枢神経系に作用し変異型(乳児型 R201C) β -ガラクトシダーゼの酵素活性を有意に増大させる濃度である。この濃度の NOEV を5か月令マウスに5週間飲水投与した結果、飲水量、体重、血液生化学値にとくに大きな影響は見られなかった。さらにマウスが NOEV 溶液(最大 1 mM)を忌避したり嗜好したりすることはとくに無かった。また5週令マウスへの投与実験(1 mM, 5週間)から、成長期における体重増大に対する影響もとくに無かった。以上より今回検討した条件下では NOEV のモデルマウスへの副作用は認められなかった。本化合物が神経遺伝病である 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応用されるためには、今後、高濃度、長期投与による、モデルマウスの症状の改善、蓄積脂質の減少などの治療効果の確認が必要となるが、あわせて詳細な副作用の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

GM1 ガングリオシドーシスの中枢神経病変をターゲットとした chemical chaperon 療法の治療薬として期待される NOEV の副作用について、GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデルマウス(ヒト変異 β -Gal 遺伝子 R201C 導入 KO-Tg マウス)を用いて、予備的検討を行ったところ、

5か月令モデルマウスへの0.5 mM NOEVの5週間飲水投与では、飲水量、体重、血液生化学値にとくに大きな影響はなく、本条件下では副作用は認められなかった。今後、高濃度、長期投与による、詳細な副作用の検討が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, Suzuki O. Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp Anim*, 53: 103-111, 2004.

Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*, 279: 41114-23, 2004.

2. 学会発表

松田潤一郎、鈴木治、大島章弘、山本美江、野口章、滝本一広、伊藤雅之、難波栄二、檜垣克美、鈴木義

之：GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデルマウスの中枢神経病変に対する新規治療法開発。第51回日本実験動物学会総会、2004年5月、長崎。

野口洋子、秦朋子、竹川奈穂、野口章、小浦美奈子、高野薫、山本美江、山田一内尾こずえ、鈴木治、松田潤一郎：GM1/GA1 合成酵素遺伝子導入による早期発症型 GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス作製の試み。第51回日本実験動物学会総会、2004年5月、長崎。

渡辺浩史、岩崎博之、下重理江、渡辺織江、黒澤美枝子、松田潤一郎、飯田真己、久保孝利、小川誠一郎、鈴木義之：GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床的酵素学的効果。第47回日本先天代謝異常学会総会、2004年11月、宇都宮市。

高村歩美、檜垣克美、山本浩一、富永里香、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之：GM1 ガングリオシドーシス神経変性分子メカニズムの解明とケミカルシャペロン法の研究。第47回先天代謝異常学会、2004年11月、宇都宮市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

G_{M1}-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

G_{M1}-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロン療法開発のため、培養細胞を用いた基礎的な検討を行った。ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析を行い、8種類の新規変異を同定した。これらヒト変異遺伝子をβ-ガラクトシダーゼ欠損マウス由来繊維芽細胞に発現させ、変異型の違いによるNOEVの効果を検討した。また、マウス脳由来初代神経細胞に対してもNOEVは残存酵素活性を上昇させ、細胞内G_{M1}の蓄積を現象させることを確認した。

A. 研究目的

ケミカルシャペロン法は、細胞内で低分子量物質(ケミカルシャペロン)が変異酵素蛋白質を安定化させることにより効果を発揮するが、変異型によりその効果は異なる。そこで、ヒトG_{M1}-ガングリオシドーシス患者変異の検索を行った。また、すべての変異遺伝子を発現するマウスモデル細胞を樹立し、異なった変異型に対するNOEVの効果を比較検討した。さらに、モデルマウス脳由来神経系細胞に対するNOEVの効果の検討を行った。

B. 研究方法

1. β-galactosidase 遺伝子変異解析

ヒトG_{M1}-ガングリオシドーシス患者皮膚繊維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、β-galactosidase 遺伝子の16 exonのうちexon1, 4, 7, 9についてはSSCP法、それ以外のexonはdirect sequenceにより変異遺伝子解析を行った。

2. ヒト変異β-galactosidase 遺伝子発現細胞の樹立とNOEV効果の検討

新規同定した8種類の新規変異を含め、これまでに同定されている56種類のβ-galactosidase 遺伝子変異を導入した発現ベクターを構築した。これらをβ-galactosidase 遺伝子ノックアウトマウス由来皮膚繊維芽細胞株にリポフェクション法により導入後、0.2μM NOEV添加培養液で4日間培養した後、β-galactosidase 酵素活性を測定した。

3. 培養神経系細胞に対するNOEV効果の検討

生後4日のβ-galactosidase 遺伝子ノックアウトマウスおよびR201C、I51T ノックアウトトランスジェニックマウス大脳からアストロサイトを分離培養した。また、生後8日マウス小脳より小脳顆粒細胞の初代培養を行った。NOEVの効果の検討はβ-galactosidase 酵素活性と細胞内G_{M1}の

蓄積により検討した。

C. 研究結果

PCR-SSCP法とdirect sequencingにより新たに8種類の新規β-galactosidase 遺伝子変異を同定した(R68W, F107L, W161G, G178R, R208C, Q255H, Y333H, T500A)。変異型に対するNOEVの効果では、R201Cで3-5倍に、R457Qで3-4倍に顕著な活性上昇を示した他、R201H、R59H、V240M、モルキオB病変異Y83H、W273Lおよび臨床型の不明なV216Aで有為な活性上昇を示した。

R201Cマウス大脳由来アストロサイトでは0.2μM NOEVにより正常の70-80%程度まで活性が上昇し、リソソーム内のG_{M1}蓄積が減少した。この効果はノックアウトおよびI51Tマウス由来のアストロサイトでは見られなかった。また、小脳顆粒細胞はノックアウトマウスではβ-galactosidase 酵素活性が完全に欠損しており、細胞内リソソームにG_{M1}の蓄積を示し、R201Cでは正常の7-8%の残存活性を示し、G_{M1}の蓄積を認めた。

D. 考察

β-galactosidase 遺伝子変異は、今回の同定した8種類の新規変異を含め56種類が見つかっている。ケミカルシャペロン法の治療効果は変異蛋白質とNOEVの作用相関によるため、変異解析は将来的な本治療法のヒトへの応用を考えた上でも重要である。今後はWAVEフラグメント解析を用い、より効率的に解析を進めて行く。

変異遺伝子のマウス細胞への発現系では、R201C、R457Qを含むいくつかの変異でNOEVによる酵素活性の上昇効果を認めた。この結果はヒト患者繊維芽細胞の結果と一致している。本実験系はいわゆる強制発現系であり、内在性酵素に比べ発現酵素蛋白質の量が非常に高いなど注意すべき点も存在するが、ヒト細胞の場合多くはヘテロであり、変異蛋白質とNOEVの相関作

用を明らかにするためにはマウス細胞発現系は重要である。

マウス脳由来初代神経細胞系への NOEV の効果では、R201C 由来アストロサイトで酵素活性の還元作用と細胞内 G_{M1} 蓄積の減少を認めた。NOEVの標的は脳の病態治療であり、NOEVの in vitro での評価実験としては酵素活性とともに神経細胞での G_{M1} の蓄積解消実験は重要である。今後は R457Q など他の変異型の神経系細胞への NOEV の効果も検討して行く。

E. 結論

ヒト G_{M1} ガングリオシドーシス患者変異解析を行った。すべてのβ-galactosidase 遺伝子変異に対しマウス細胞発現系で NOEV の効果の検討を行った。また、マウス培養神経細胞に対し NOEV の効果を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y, Sawa M, Inoue T, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y: N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, 1689: 219-228, 2004

Yamamoto T, Feng JH, Higaki K, Taniguchi M, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K: Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain Dev*, 26: 245-250, 2004

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, Tomimaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady R O, Suzuki Y. Chemical Chaperone Therapy for Brain Pathology in G_{M1}-Gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15912-15917, 2003

Pipo JR, Feng J-H, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K. New GAA mutations in Japanese patient with GSDII (Pompe disease). *Pediatr Neurol* 29:284-287, 2003

Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A. Attenuation of Ganglioside GM1 Accumulation in the Brain of GM1 gangliosidosis Mice by Neonatal Intravenous Gene Gene Therapy 10:1487-1493, 2003

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, Suzuki 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 E4 homozygosity. *Ann Neurol*. 52: 351-355, 2002

2. 学会発表

高村歩美、檜垣克美、山本浩一、富永里香、松田潤一郎、難波栄二、鈴木義之:G_{M1}-ガングリオシドーシス神経変性分子メカニズムの解明とケミカルシャペロン法の研究. 第47回日本先天代謝異常学会総会、宇都宮市、2004.11.11-13.

檜垣克美、高村歩美、山本浩一、富永里香、難波栄二、鈴木義之:ヒト G_{M1}-ガングリオシドーシス変異とケミカルシャペロン法の検討. 第47回日本先天代謝異常学会総会、宇都宮市、2004.11.11-13.

井上岳彦、檜垣克美、豊島光男、岡 明、難波栄二、児島浩子、大野耕策:新規遺伝子変異による Menkes 病の1例. 第47回日本先天代謝異常学会総会、宇都宮市、2004.11.11-13.

山本浩一、檜垣克美、高村歩美、飯田真己、難波栄二、鈴木義之:ヒト変異β-ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するマウス細胞株の樹立と解析. 第10回日本ライソゾーム病研究会、東京、2004.12.10

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種類の人β-galactosidase 変異細胞株の樹立 第9回ライソゾーム研究会(東京) 2003年12月4日

田中あけみ、氷室公秀、高浦奈津子、難波栄二、橋本友美、宮田みち、山野恒一 糖原病α型に対する骨髄移植の効果についての生化学的、組織学的検討 第46回日本先天代謝異常学会(松江) 2003年11月20日-22日

檜垣克美、Dorca Almanzar、大野耕策、難波栄二、Stephen Sturley 出芽酵母を用いた Niemann-Pick 病 C 型原因蛋白 NPC1 の機能解析 第46回日本先天代謝異常学会(松江) 2003年11月20日-22日

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(松江) 2003年11月20日-22日

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(松江) 2003年11月20日-22日

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:G_{M1}-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(松江) 2003年11月20日-22日

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. G_{MI} -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

戸川雅美、大野耕策、岡明、難波栄二、山本俊至. 肝症状を契機として発見された糖原病2型の姉妹例 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. 進行性ミオクローム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. G_{MI} -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 G_{MI} -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 G_{MI} -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 日本ライゾーム研究会(東京)2002年11月21日-22日

Suzuki Y, Nanba E, Ohno K, Matsuda J, Ogawa S. (symposium) Chemical chaperon therapy for lysosomal diseases with central nerve system pathology The 9th International Child Neurology Congress and the 7th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. Beijing, China. 2002, September 20-25.

知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

実用新案登録
なし

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

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

雷珂、井上岳彦 鳥取大学・医学部・脳幹性疾患研究施設・脳神経小児科部門

二宮治明 鳥取大学・医学部・生命科学科・神経生物学講座

研究要旨

グルコース類似体によるゴーシェ病の変異酵素 β グルコシダーゼの活性化による治療法、分子シャペロン療法の樹立を目的とする。昨年までに、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 N-octyl-valienamine(NOV)を見出し、この類似体は変異 F213I 酵素のリゾソーム内濃度を高め、酵素活性を上昇させることを明らかにした【論文発表(4) Lin H. et al., *Biochem Biophys Acta* 2004】。NOV 類似の阻害剤13種類を合成し、F213I の活性を上昇させる阻害剤をスクリーニングしたが、NOV 以上に活性を上昇させる阻害剤は見いだせなかった。またゴーシェ病患者細胞をスクリーニングし、NOV で活性が上昇する変異のスクリーニングを行い、N188S/G193W を持つ患者細胞の活性が4倍に上昇することを見いだした。 β グルコシダーゼノックアウトマウスは致死的であるが、このマウスに F213I 変異を導入したマウスの作成の準備を行い、マウスでの治療実験の準備をしている。

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。

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【論文発表(4) Lin H. et al., *Biochem Biophys Acta* 2004】。この類似体(N-octyl-valienamine, NPV)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 変異酵素のリゾソーム内濃度を高め、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。NOV よりさらに有効な化合物のスクリーニング、F213I 変異以外に有効な変異 β グルコシダーゼのスクリーニングを行い、F213I 変異を導入したモデルマウスの作成を試みた。

B. 研究方法

新たに入手したゴーシェ病患者細胞を用いて、培地中に NOV を種々濃度添加し、4日間培養し、 β グルコシダーゼの活性上昇の程度をスクリーニングした。

13種類のグルコース類似体について、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 NOV と比較した。

アメリカジャクソン研究所から、 β グルコシダーゼノックアウトマウスを購入、人 β グルコシダーゼ cDNA に F213I 変異を導入 pGCCI ベクターに組み込み、F213I 変異を持つモデルマウスの作成を試みた。

C. 研究結果

新たに入手したゴーシェ病患者細胞の中で、N188S/G193W 変異を持つ細胞の β グルコシダーゼ活性が NOV 存在下で3倍に増加することを見出した。この患者は若年ミオクロニーてんかんを主症状とし、ユニ

一クな臨床症状を示す。現在のところ N188S と G913W のどちらの変異が NOV によって上昇するのか明らかではない。

13種類の新たなグルコース類似体のうち、NOV 以上に F213I 変異および N188S/G193W 変異の活性を上昇させる薬剤は見出せなかった。現時点では NOV を臨床応用するために実験計画を進めていく。

ジャクソン研究所から購入した β グルコシダーゼノックアウトマウスのペアは正常であることが明らかになり、再度マウスの発注を行った。F213I を持つヒト cDNA の作成はできた。

D. 考察

NOV によって活性が上昇する変異は F213I だけでなく、N188S/G193W があることがわかり、ゴーシェ病患者の中でどの程度この治療法が応用可能かさらに明らかにする必要がある。 β グルコシダーゼノックアウトマウス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、NOV よりもより低い濃度で酵素活性を上昇させる類似体見いだせなかった。

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 型ゴーシェ病の中樞神経障害に対しては有効ではない。F213I 変異は \square 型の臨床症状の原因遺伝子変異であり中樞神経症状を示す。また、N188S/G193W 変異を持つ患者は若年性進行性ミオクローヌスを示す特異な神経症状を示す。NOV 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 および N188S/G193W を持つ患者に有効な治療法とできる可能性がある。今後、動物モデルを用いた NOV の治療効果の判定を行う必要がある。

E. 結論

N-octyl-valienamine (NOV) は III 型ゴーシェ病の原因変異の1つである F213I 変異だけでなく、若年性神経性ミオクローヌスを示す N188S/G193W を持つ β グルコシダーゼを安定化・活性化することを見だし、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ことを動物モデルを用いて証明していく。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K. Axonal dystrophy of dorsal root ganglion sensory neurons in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Experimental Neurology* 197: 289-298, 2004
2. Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Kaidoh T, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Davies JP, Ioannou YA, Ohno K, Ninomiya H. Reduced sensitivity of Niemann-Pick C1-deficient cells to theta-toxin: sequestration of toxin to raft-enriched membrane vesicles. *Histochem Cell Biol* 121:263-272, 2004
3. Yamamoto T, Feng J-H, Higaki K, Taniguchi M, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain dev* 26: 245-250, 2004
4. Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y, Sawa M, Inoue T, Higaki K, Nanba E, Ohno K and Suzuki Y. N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 1689:219-228 2004
5. Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K. Degeneration of cholecystinin-immunoreactive afferents to the VPL thalamus in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Brain Research* 1022:244-246 2004

学会発表 なし

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	ページ
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, 8th ed, Online Version	McGraw-Hill	New York	2004	Web http://genetics.accessmedicine.com/site/

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
鈴木義之	ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法	小児科	45	2313-320	2004
Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y, Sawa M, Inoue T, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y	N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease	Biochim Biophys Acta	1689	219-28	2004
Ogawa S, Sakata Y, Ito N, Watanabe M, Kabayama K, Itoh M, Korenaga T	Convenient synthesis and evaluation of glycosidase inhibitory activity of α - and β -galactose-type valienamines, and some N-alkyl derivatives	Bioorg Med Chem	12	995-1002	2004

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
なし

健康危険情報
なし

研究成果の刊行物・別刷

鈴木 義之*

要 旨

脳の遺伝病に対する新しい治療法（ケミカルシャペロン療法）の開発の試みを行った。その考え方を解説し、疾患モデルとしての遺伝性ライソゾーム病、 G_{M1} -ガングリオシドーシスの治療実験データを提示した。ガングリオシド G_{M1} の側鎖末端にあるガラクトースに類似の低分子化合物 NOEV が、試験管内で β -ガラクトシダーゼを競合的に阻害し、細胞内で変異蛋白質を安定化し、ライソゾームの酸性環境で解離した変異分子の酵素活性を発現させた。ヒト患者やモデルマウス由来の培養細胞、モデルマウス個体で、NOEV が変異酵素活性を上昇させ、蓄積基質を分解することを確認した。この方法は、ライソゾーム病ばかりでなく、多くの脳の遺伝病に対する新しい治療法となる可能性がある。

はじめに——シャペロンとは

日本では、シャペロンという用語は一般にはあまり知られておらず、なじみのない医師も少なくないと思う。そこで、この言葉の説明から始めることにする。

広辞苑や世界大百科事典など、国内の一般的な辞書、事典類にはこの項目はない。英語圏でもっとも権威のある Oxford English Dictionary (OED) 第2版 (1989年) を見ると以下の順序で解説されている。貴族(14世紀)、後には貴婦人(16世紀)のかぶる頭巾、帽子、ガーター、勲位の装束の一部(16世紀)、棺を引く馬の前頭部につける飾り(17世紀)、などの意味を経て、若い未婚の女性が社交界に出るときの付き添い(多くは年配の既婚女性)で、主に行儀作法を指導し監督する人(18世紀)、などの意味に使われ

たとの説明がある。

そして現在の臨床医学では、医師とは異なった性の患者を診察するときに医師に付き添う人、という意味で使われる (Stedman's Medical Dictionary, 27th ed, 2000)。筆者も米空軍病院でのインターン時代、女性の診察をするのに、忙しい時間帯に看護婦さんに立ち会ってもらうために、ずいぶん待たされていららしたことを今でも覚えている。

最近になって、これらの一般的な用法に加えて、生物学では分子シャペロンという言葉が使われることが多くなった。多くの生物学辞典、理化学辞典、医学辞典には「他の蛋白質や蛋白質複合体の適正な折りたたみや構築を行う別の蛋白質」という定義が記載されている。単にシャペロンともいう。細胞内で熱変性を予防し、蛋白質が正しく働く機能を介助する熱ショック蛋

* Yoshiyuki SUZUKI 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

[連絡先] ☎ 324-8501 栃木県大田原市北金丸 2600-1 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

白質が多い。

なお、この単語は元来 chaperon という綴りであったが、原義が女性の持ち物あるいは女性自身をさすことが多かったことから、次第に cheperone という女性形単語として使われるようになった (OED)。そして現代医学辞書はほとんどすべて chaperone という見出し語になっている。筆者もこの流れに沿って、chaperone という綴りを使うことにしている。

I. ライソゾーム病の分子病態

ライソゾームはわれわれの細胞内に存在し、多くの高分子代謝産物を消化する小胞である。その内部は他のコンパートメントとは異なり、酸性である。ここで数十の加水分解酵素が一定の順序で化合物を分解してゆく。それぞれの酵素は特異的な遺伝子の情報により、細胞内で合成される。ある一つの遺伝子に構造異常(変異)が起こると、その間違った情報により産生された酵素の構造も変化し、変異蛋白質として活性を失い、細胞の機能障害を起こす。そして個体としては生後ある一定の時期に発病する。このグループの病気をまとめて(遺伝性)ライソゾーム病という。主に小児期の進行性中枢神経疾患としての病像を示す。その臨床や病理、診断法などについては、筆者のいくつかの前著や標準的な教科書を参照していただきたい^{1)~4)}。

ライソゾーム酵素は赤血球以外、すべての体細胞に活性が存在するので、脳の病気であっても、その病態解析には、ほかの組織・臓器の細胞を使うことができる。われわれは、モデル細胞として、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血由来のリンパ芽球などを用いた分析を、いくつかのライソゾーム酵素を発現する遺伝子について行ってきた。そして変異酵素の蛋白質を詳細に分析することにより、いわゆる「酵素欠損」の分子病態が一様でないことを知った。

大きく分けると次の3つに集約できる⁵⁾。第1に蛋白質分子が合成されない場合、第2に合成された蛋白質分子に酵素としての活性がない場合、第3に活性のある酵素蛋白質は合成されるが、細胞内で不安定であり、すぐ分解されてしまう場合。

第1、第2の病態では正常な酵素蛋白質あるいは遺伝子を補給しない限り、細胞の機能を正常化することは不可能である。しかしこのアプローチは現在のところ、とくに脳組織については成功例がない。第3の場合は、せっかく合成された酵素蛋白質を細胞がうまく利用できないという状況であり、何とかしてこの蛋白質に適切な細胞内環境を作ることができれば、潜在的に存在する酵素活性を復元し、細胞の機能を修復することができるはずである。

そこでわれわれはこの方向へのアプローチが可能であるかどうか、この10年余り、まず α -ガラクトシダーゼ欠損症(ファブリー病)に、ついで 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)の欠損酵素に対する実験的アプローチを行ってきた。

II. ケミカルシャペロン療法の原理

分析や実験の詳細は省略するが、ライソゾーム酵素が認識する基質の末端に存在する糖質、たとえば(α -または β -)ガラクトシダーゼであればガラクトース、(α -または β -)グルコシダーゼであればグルコースの類似化合物が、試験管内では競合的阻害剤として働く可能性がある。ライソゾーム酵素について調べたところ、一部の患者の変異蛋白質は、細胞内で合成された場所(中性)では不安定であった。

ところがこれらの細胞に試験管内阻害剤である基質類似化合物を投与すると、変異蛋白質と結合し、その立体的な折りたたみ(フォールディング)を助けることにより安定化し、そのまま

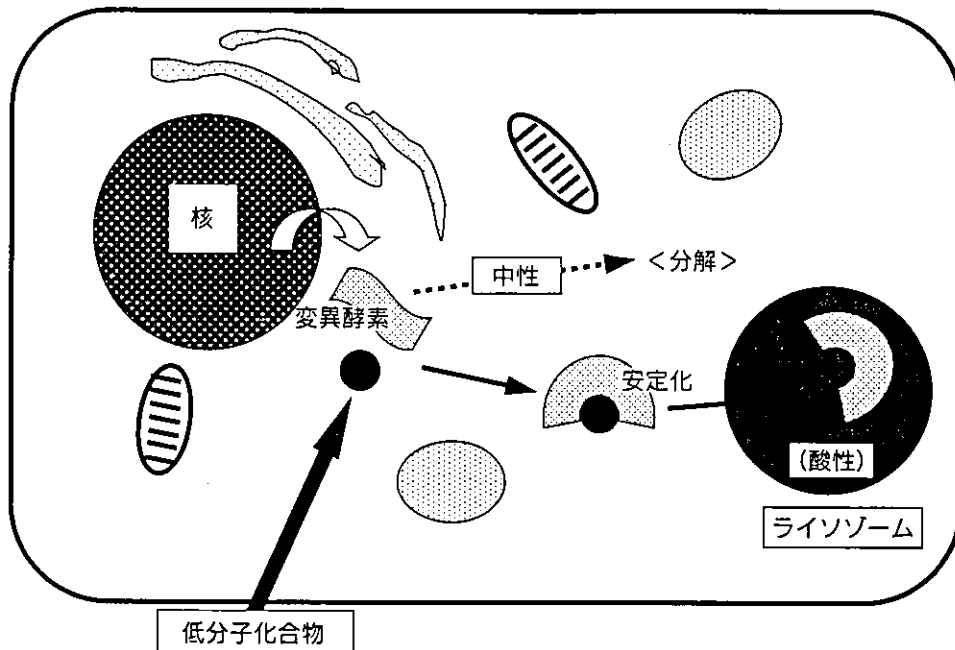


図1 ケミカルシャペロン療法の原理（遺伝性ライソゾーム病）

細胞の外から投与された低分子競合的阻害剤は細胞内に入り、標的となる変異蛋白質と結合し安定な立体構造を確立したあと、複合体がライソゾームに運ばれ、酸性の条件下で解離した変異蛋白質は酵素としての活性を発現する。

無事にライソゾームに送り届けることができた。ライソゾームの酸性条件では酵素蛋白質と投与した化合物は解離し、変異酵素は安定な状態で活性を発現する。

このような化合物は、上記の分子シャペロンと本質的に同じ働きをもつので、ケミカルシャペロン (chemical chaperone) とよぶことができる。その具体的な細胞内での分子反応のプロセスを図1の模式図に示す。

この細胞処理では、変異酵素活性を正常のレベルまで上昇させることができるとは限らない。しかし酵素の基質処理能力がある程度以上になれば、理論上は病気の発症を著しく遅らせることができることが予測できる。 β -ガラクトシダーゼ欠損症についてのデータを整理すると図2のようになる⁵⁾。正常活性の10%程度の活性が得られれば、発症年齢は無量大になる。つまり個体の生存中は発症しないということである。したがって、不十分な活性発現の細胞に対して、いくらかでも活性をあげることができ

ば、この目的が達成される可能性がある。

III. ファブリー病における欠損酵素復元の試み

変異 α -ガラクトシダーゼの詳細な分析により、ファブリー病症例の一部に、細胞内の変異蛋白質が本来の酵素活性をもっているにもかかわらず、合成された中性の環境では分子として不安定であり、速やかに分解されてしまい、ライソゾームに運ばれないこと、そしてライソゾームの酸性環境では分子が安定で、活性を発現する可能性のあることがわかった。

そこで培養細胞に酵素が認識する基質の末端にあるガラクトースを投与してみたら、実際に活性が著しく増加した⁶⁾。しかしこの実験に用いたガラクトースは高濃度であり、人体における血液の浸透圧よりも高い濃度にする必要があった。幸い、ほかの類似体のスクリーニング

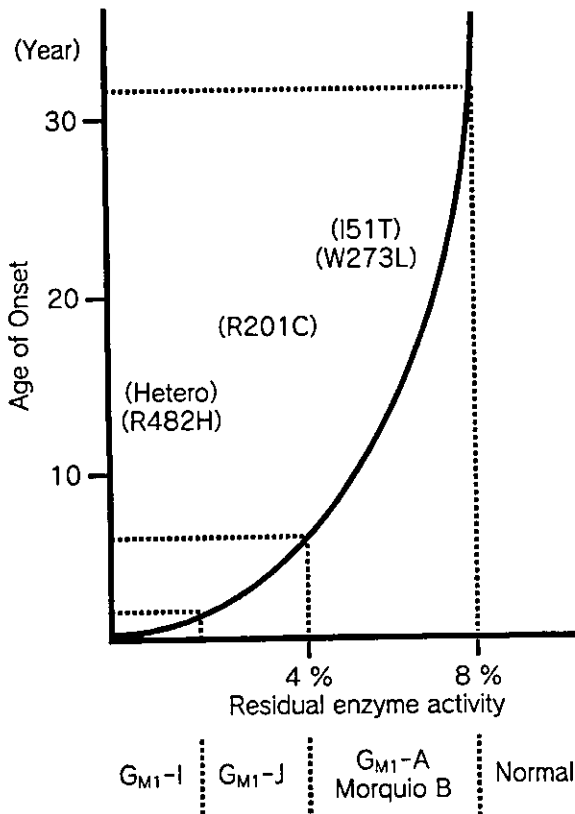


図2 β -ガラクトシダーゼ欠損症における発症年齢と線維芽細胞内残存活性との相関 (鈴木義之, 2002⁹⁾)

G_{M1}-I: 乳児型 G_{M1}-ガングリオシドーシス
 G_{M1}-J: 若年型 G_{M1}-ガングリオシドーシス
 G_{M1}-A: 成人型 G_{M1}-ガングリオシドーシス
 Morquio B: モルキオ B 病
 normal: 正常人

これは線維芽細胞の酵素活性を非生理的な合成基質で評価した結果をまとめた曲線であり、ひとつの理論モデルとして理解していただきたい。脳の細胞におけるガングリオシド分解がまったく同じ曲線を描くかどうかはわからない。もちろん患者グループ内での個体差も考慮しなければならぬ。

の結果、市販の化合物、1-デオキシガラクトノジリマイシンがより低濃度でこの酵素の変異体に働くことがわかり、培養リンパ芽球、変異遺伝子導入で実際に活性が上昇することを確認した⁷⁾。

この成果はそれ自体重要であるが、われわれにとっての最終目標は遺伝病の脳病変に対する治療的アプローチであり、全身血管病である

ファブリー病ではこの点についての分析ができないという問題があった。そこで次に β -ガラクトシダーゼ欠損症、つまり古典的な遺伝性代謝性脳変性疾患である G_{M1}-ガングリオシドーシスを対象とした研究を始めた。

IV. 新しい β -ガラクトシダーゼ阻害剤 NOEV

この酵素の欠損症は、同一の遺伝子の異なった変異により、重症脳障害を起こす全身疾患 (G_{M1}-ガングリオシドーシス) と骨系統疾患 (モルキオ B 病) として発現する⁸⁾⁹⁾。脳をはじめとして全身臓器にガングリオシド G_{M1}、そのアシアロ体 G_{A1} のほかにオリゴ糖やムコ多糖 (ケラタン硫酸) などが蓄積する。

われわれはまず、市販のガラクトース誘導体・類似体について、この酵素の阻害活性を調べてみた。 α -ガラクトシダーゼにかなり有効であった 1-デオキシガラクトノジリマイシンに対して、 β -ガラクトシダーゼに対する阻害活性はその数十分の一であった。ほかの市販類似化合物でもこれ以上の活性を検出できなかった¹⁰⁾。

そこで新しい化合物の検索を行うことにした。幸い生化学工業株式会社中央研究所のご協力により、新規合成化合物のスクリーニングを始めることができた。いくつかの化合物のなかで、N-オクチル-4-エピ- β -バリエナミン (N-octyl-4-epi- β -valianamine: NOEV) という化合物が試験管内で β -ガラクトシダーゼ活性の強力な阻害剤として働くことがわかった¹¹⁾。この物性解析の結果を図3に示す。この化合物はガラクトースの構造に似ているが、ガラクトースの C1 と C5 の間には O (酸素) 結合でなく C (炭素) 結合であり、かつ、C1 には O (酸素) でなく N (窒素) が結合しているという違いがある。現在までに、側鎖の炭素数 8 の化合物