

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

(H14-こころ-017)

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 鈴木 義之

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総合研究報告書

鈴木義之 神経遺伝病に対するケミカルシャペロン療法の開発 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 10

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総合研究報告書

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

古典的な小児の神経遺伝病GM<sub>1</sub>-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-バリエナミン) 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ヶ月間の予備投与実験により、後肢の麻痺の予防効果を認めた。

分担研究者

黒澤美枝子・国際医療福祉大学保健学部教授  
松田潤一郎・国立感染症研究所獣医科学部長  
難波 栄二・鳥取大学生命機能研究支援センター教授  
大野 耕策・鳥取大学医学部教授

研究協力者

岩崎 博之、渡辺 浩史・国際医療福祉大学保健学部  
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  
檜垣 克美・鳥取大学生命機能研究支援センター  
大島 章弘、鈴木 治、滝本 一広・国立感染症研究所獣医科学部  
伊藤 雅之・国立精神・神経センター神経研究所  
小川誠一郎・慶應義塾大学理工学部  
飯田 真己、久保 孝利、金子 治彦・生化学工業株式会社中央研究所  
田部 美穂、藤田 薫、実方 和宏、有賀 利弥・株式会社エスアールエル医科学分析センター

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(ケミカルシャペロン療法)の開発を目的とする。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た。本研究では脳障害を伴う遺伝病のモデルとして、遺伝性ライソゾーム病を対象モデル疾患として選ん

だ。中でもβ-ガラクトシダーゼ欠損症(GM<sub>1</sub>-ガングリオシドーシス)およびβ-グルコシダーゼ欠損症(ゴーシェ病)を対象とした治療法を確立するための実験を行った。これらの疾患に対するシャペロン化合物として、N-octyl-4-epi-β-valienamine (NOEV) と N-octyl-β-valienamine (NOV)とい

う2つの新規化合物を合成し、それぞれβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼに対する効果を調べた。本研究は主にβ-ガラクトシダーゼ欠損マウスを対象とした分析をおこなった。

なお、これらのシャペロン化合物の合成、物性分析、機能解析などの基礎的分析は、文部科学省平成14年度-16年度科学費補助金（基盤研究(A)(1)）の助成を受け、同時に進行した（文部科学省科学研究（基盤研究(A)(1)）研究成果報告書、平成17年3月）。

本研究はその成果をもとにモデル動物個体への効果を検討した研究結果の報告である。

## 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、これらの変異酵素を特異的に発現するモデル動物を作成した。その中で、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 GM1-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。この動物に種々の濃度の酵素阻害剤NOEVをアドリブに経口投与し、組織、特に中枢神経系での反応を調べた。シャペロン化合物NOEVは3 mMまでの水溶液として調整した。

そして異なった期間の投与後、酵素活性、蓄積脂質、NOEV濃度などを特に脳組織について調べた。

（倫理面への配慮）

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

短期間の投薬後、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を認めた（Matsuda et al, 発表論文3）。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。酵素活性はNOEVの投与濃度に依存的であった。以下の4週間投与実験では3 mM水溶液投与がもっとも有効であった。野生型マウス脳内酵素活性の30%程まで上昇した（表1）。

さらに3ヶ月間のNOEV投与実験のあと、このシャペロン化合物の組織内濃度は脳、肝臓とも著しく上昇した。脳内濃度は肝臓内濃度の30-45%程度に到達した（表2）。

表1 NOEV投与濃度と脳内酵素活性

	酵素活性 (nmol/mg protein/h)
0 mM	3.0
3 mM	18.9
野生型	63.3

表2 NOEVの組織内濃度と酵素活性

NOEV濃度	NOEV濃度 (μg/g)		酵素活性 (nmol/mg protein/h)	
	0 mM	3 mM	0 mM	3 mM
脳	n.d.	1.3±0.3	3.5±0.3	14.1±1.4
肝	n.d.	3.5±1.6	16.3±9.5	191.0±63.1

次に発症前、生後8ヶ月から3mMのNOEV水溶液を4ヶ月間投与したマウス個体の行動観察を行った。オープンフィールドでのビデオモニタリング、金網上での平衡反応、直線歩行時の足跡解析（フットプリンティング）、自然行動の観察、動物個体のマニュアルハンドリングなどである。生後10ヵ月現在、この実験群全体について臨床症状の発症が遅いため、非治療群でも大きな神経学的異常を見出すこ

とはできなかった。しかし神経学的に微細な変化を調べたところ、治療群・非治療群の間に以下の差を認めた。

歩行肢位は、非治療群の歩行時、後肢の外後方への伸展傾向が見られることが多かった。すべての個体に明確に見られたものではないが、治療群と非治療群とを比較して、意味のある差と考えた。

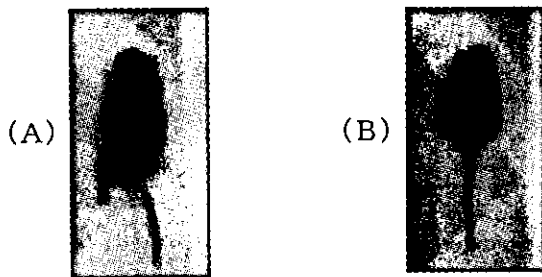


図1 4ヶ月NOEV投与後のマウス歩行肢位  
(A) 非治療マウス。後肢を外後方に伸展する頻度が高い  
(B) 治療マウス。治療マウスと同様の肢位を示すこともあるが、頻度が低い

尾をつかみ頭部を下方に固定した姿勢で保持すると、マウスは逃れようとして四肢、特に後肢を活発に動かすことが多い。時々短時間、強い震戦用の動きをくりかえす。しかし、しばらくそのままの状態

で観察すると、軽度の麻痺あるいは軽度の筋力低下のある個体は、この後肢の早い動きをする頻度が少なくなる。以下にその例を示す。

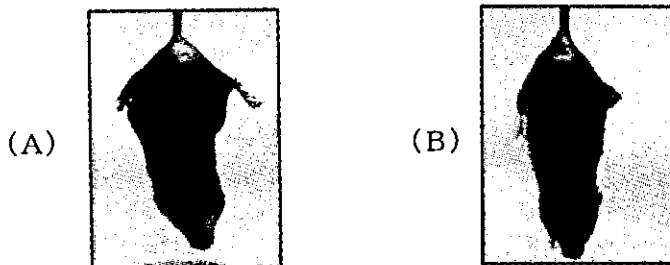


図2 4ヶ月NOEV投与後のマウス後肢の震戦様運動  
(A) 非治療マウス。後肢の動きが時々止まる(休む)ことが多い。  
(B) 治療マウス。時々激しく後肢を震わせる。

これらの観察により、微細な変化ではあるが、非治療群は麻痺の初期の段階にあると判定した。現在確認のため、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

遺伝病の変異蛋白質の中には、本来の機能を保持しているにもかかわらず、立体的折りたたみ（フォールディング）が不十分なために不安定で、速やかに分解、不活化されてしまう分子がある。基質類似化合物を細胞に投与することにより、この分子が安定化される。この種の化合物は既知の分子シャペロンと本質的に同じはたらきを持つ。そこでこれらの化合物を本研究ではケミカルシャペロン(chemical chaperone)と呼んだ。糖鎖末端を加水分解するライソゾーム酵素、たとえばガラクトシダーゼはガラクトース、グルコシダーゼはグルコースを認識する。それぞれの類似化合物が基質とともに試験管内に存在すれば、競合的阻害剤としてはたらく。ところが細胞内の中性の条件ではこれらの化合物が変異分子と結合し、安定な複合体としてライソゾームに輸送される。そしてライソゾームの酸性の条件下で、変異分子はシャペロン分子と解離し、安定な状態で酵素としての活性を示す。これまでに、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼなどに働くシャペロン化合物の基本的な物性解析、試験管内化学分析、細胞培養系での酵素活性発現実験などは、文部科学省科学研究費の助成金によっておこなった（文部科学省科学研究・基盤研究(A)(1)研究成果報告書、平成17年3月）。

そこで本研究では、以上の基礎的実験データをもとに、これら低分子ケミカルシャペロンが、ヒト遺伝病のモデルマウスに対して有効であることを確かめるための個体実験をおこなった。その結果、今回使用したNOEVが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス個体の脳に実際に効果を示すことを形態学的・分

析化学的に確認することができた。そして更に、まだ予備的な段階ではあるが、神経学的にも予防・治療に有効である可能性を見出した。これら種々の化学分析データから、経口投与されたNOEVが、マウス腸管で吸収され血行に入り、血液脳関門を通過して脳組織に入り、中枢神経細胞内で酵素活性を発現し、蓄積した基質の分解を促進するという結論が得られた。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 $\beta$ -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（発表論文8）。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NOEV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。このシャペロン化合物が実際に脳組織に到達することも確かめた。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、脳の遺伝病に対する直接の治療法はない。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. 研究発表

### 論文発表

1. 鈴木義之.  $\beta$ -ガラクトシドーシス: 新しい分子治療法の開発. 神経進歩 2002; 46: 851-858.
2. Ogawa S, Matsunaga YK, Suzuki Y. Chemical modification of the  $\beta$ -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- $\beta$ -valienamine: Synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl) derivatives. Bioorg Med Chem 2002; 10: 1967-1972.
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  $G_{M1}$ -gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 15912-15917.
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 2003; 10: 1487-1493.
5. Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Ono M, Maruyama K, Takahashi M, Mochida K, Matsuda J, Lane MD, Ezaki O. Regulatory sequence elements of mouse GLUT4 gene expression in adipose tissues. Biochem Biophys Res Commun 2003; 312: 277-284.
6. Iwakuma M, Anzai T, Kobayashi S, Ogata M, Kaneda Y, Ohno K, Saji M. Antisense in vivo knockdown of synaptotagmin I and synapsin I by HVJ-liposome mediated gene transfer modulates ischemic injury of hippocampus in opposing ways. Neurosci Res 2003; 45: 285-296.
7. 鈴木義之. ライソゾーム病に対するケミカルシヤペロン療法. 小児科 2004; 45: 2313-2320.
8. 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 2004; 1689: 219-228.
9. 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 2004; 279: 41114-41123.
10. 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 2004; 53: 103-111.
11. Ogawa S, Sakata Y, Ito N, Watanabe M, Kabayama K, Itoh M, Korenaga T. Convenient synthesis and evaluation of glycosidase inhibitory activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactose-type valienamines, and some N-alkyl derivatives. Bioorg Med Chem 2004; 12: 995-1002.
12. Ogawa S, Fujieda S, Sakata Y, Ishizaki M, Hisamatsu S, Okazaki K, Ooki Y, Mori M, Itoh M, Korenaga T. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of some N-substituted 5a-carba- $\beta$ -fuco- and  $\beta$ -galactopyranosylamines, and selected derivatives. Bioorg Med Chem 2004; 12: 6569-6579.
13. Ogawa S, Funayama S, Okazaki K, Ishizuka F, Sakata Y, Doi F. Synthesis of 5a-carba-hexopyranoses and hexopyranosylamines, as well as 5a,5a'-dicarbadisaccharides, from 3,8-dioxatricyclo[4.2.1.0<sup>2,4</sup>]nonan-9-ol: glycosidase inhibitory activity of N-substituted 5a-carba- $\beta$ -gluco- and  $\beta$ -galactopyranosylamines, and derivative thereof. Bioorg Med Chem 2004; 14: 5183-5188.
14. Ogawa S. Design and synthesis of carba-sugars of biological interest. Trends Glycosci Glycotechnol 2004; 16: 33-53.

### 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：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：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：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、侯 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.
8. 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.
9. Suzuki Y: Lysosomal storage diseases. 9th Mediterranean Meeting of Child Neurology, Dubrovnik, Croatia, 2003. 5. 29-31.
10. 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.
11. 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の検討. 第46回日本先天代謝異常学会総会、松江市、2003.11.20-22.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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樞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.
18. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for



lysosomal storage diseases. 19th United Leukodystrophy Foundation Scientific Symposium. DeKalb, 2004. 7. 14-15.

19. 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: GM<sub>1</sub>・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 of 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.
20. 高村歩美、檜垣克美、山本浩一、冨永里香、難波栄二、松田潤一郎、鈴木義之: GM<sub>1</sub> 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.
21. 檜垣克美、山本浩一、冨永里香、難波栄二、鈴木義之: ヒト GM<sub>1</sub> 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.
22. Suzuki Y: Recent advances in neurometabolic disorders. 8th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Delhi, 2004.10.7-10.
23. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for brain pathology in lysosomal storage diseases. International Conference: Current problems in Child Neurology, Moscow, 2004.11.7-9.
24. 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.

metabolism containing the same as the active ingredient

発明者 小川誠一郎、鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎、大野耕策  
出願日 2002年9月2日  
出願人 生化学工業株式会社  
出願国 米国、カナダ、オーストラリア、ヨーロッパ (全加盟国)

## 2. 実用新案登録

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 発明の名称: 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  
出願日 2002年9月5日  
出願人 生化学工業株式会社

- 2) 発明の名称: Carba-sugar amine derivatives and treatments for disorder of glycolipid

## 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	$\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): $G_{MI}$ -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: < <a href="http://genetics.accessmedicine.com/">http://genetics.accessmedicine.com/</a> >

## 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	$\beta$ -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
Ogawa S, Matsunaga YK, Suzuki Y	Chemical modification of the $\beta$ -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- $\beta$ -valienamine: Synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl) derivatives	Bioorg Med Chem	10	1967-1972	2002
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 $G_{MI}$ -gangliosidosis	Proc Natl Acad Sci USA	100	15912-15917	2003
Takaura N, Yagi T, Maeda M, Nanba E, Oshima A, Suzuki Y, Yamano T, Tanaka A	Attenuation of ganglioside GM1 in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer	Gene Ther	10	1487-1493	2003
Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Ono M, Maruyama K, Takahashi M, Mochida K, Matsuda J, Lane MD, Ezaki O	Regulatory sequence elements of mouse GLUT4 gene expression in adipose tissues	Biochem Biophys Res Commun	312	277-284	2003
Iwakuma M, Anzai T, Kobayashi S, Ogata M, Kaneda Y, Ohno K, Saji M	Antisense in vivo knockdown of synaptotagmin I and synapsin I by HVJ-liposome mediated gene transfer modulates ischemic injury of hippocampus in opposing ways	Neurosci Res	45	285-296	2003
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	2313-2320	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- $\beta$ -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
Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishio I, Ezaki O	Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type 1 (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control	J Biol Chem	279	41114-041123	2004
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
Ogawa S, Sakata Y, Ito N, Watanabe M, Kabayama K, Itoh M, Korenaga T	Convenient synthesis and evaluation of glycosidase inhibitory activity of $\alpha$ - and $\beta$ -galactose-type valienamines, and some N-alkyl derivatives	Bioorg Med Chem	12	995-1002	2004
Ogawa S, Fujita S, Sakata Y, Ishizaki M, Hisamatsu S, Okazaki K, Ooki Y, Mori M, Itoh M, Korenaga T	Synthesis and glycosidase inhibitory activity of some N-substituted 5a-carba- $\beta$ -fuco- and $\beta$ -galactopyranosylamines, and selected derivatives	Bioorg Med Chem	12	6569-6579	2004
Ogawa S, Funayama S, Okazaki K, Ishizuka F, Sakata Y, Doi F	Synthesis of 5a-carbahexopyranoses and hexopyranosylamines, as well as 5a,5a'-dicarbadisaccharides, from 3,8-dioxatricyclo[4.2.1.0 <sup>2,4</sup> ]nonan-9-ol: glycosidase inhibitory activity of N-substituted 5a-carba- $\beta$ -gluco- and $\beta$ -galactopyranosylamines, and derivative thereof	Bioorg Med Chem	14	5183-5188	2004
Ogawa S	Design and synthesis of carba-sugars of biological interest	Trends Glycosci Glycotechnol	16	33-53	2004

研究成果の刊行物・別刷

# 特集 第37回脳のシンポジウム

## 代謝性脳障害：成因解明と治療法の進歩

### β-ガラクトシドーシス：新しい分子治療法の開発\*

鈴木 義之\*\*

キーワード：β-ガラクトシダーゼ，β-ガラクトシドーシス，G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス，モルキオ B 病，ケミカルシャペロン療法

#### はじめに

遺伝性β-ガラクトシダーゼ欠損症の研究は、古典的なテイサックス病の特殊な臨床・病理的な病型（全身性ガングリオシドーシス）としての報告にはじまり、蓄積物の化学分析と欠損酵素の解明とともに、多様な臨床像を示す疾患単位として認識されるに至った（Suzuki et al, 2001）。そして遺伝子のレベルでは、同じ遺伝子の異なった変異がまったく違った病像を示すことが明らかにされた。つまり小児期の重篤な神経遺伝病（G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス）と、中枢神経障害を伴わない全身骨系統疾患（モルキオ B 病）が本質的に同じ原因による病気であり、遺伝子・蛋白質の機能と病態発生を理解するのに重要な情報を提供する疾患グループであるということである。

本稿では、この多様な病像を示す疾患のこれまでの知見と、今後の治療へ向けての新しい試みを、筆者のデータを中心としてまとめることにした。

#### I. β-ガラクトシダーゼとその遺伝性欠損

β-ガラクトシダーゼは体細胞内のライソゾームで、複合糖質の末端にあるβ-ガラクトース結合を酸性の条件で加水分解する酵素の総称である。第1の酵素は3番染色体短腕にある遺伝子によりコードされ、ガングリオシド G<sub>M1</sub>を含む多くの糖質の加水分解にかかわ

表 1 遺伝性β-ガラクトシダーゼ欠損症 (β-ガラクトシドーシス)

		G <sub>M1</sub> -ガングリオシドーシス	モルキオ B 病
表現型	中枢神経病変	軽度—重度	なし
	骨関節病変	軽度—重度	重度
	他の全身病変	軽度—重度	なし
蓄積物	G <sub>M1</sub> ケラタン硫酸オリゴ糖	中枢神経系なし？ 全身臓器	なし 骨格系 全身臓器
	酵素	β-ガラクトシダーゼ	
遺伝子		染色体 3p21-3	

る。これを一般にβ-ガラクトシダーゼ（または G<sub>M1</sub>β-ガラクトシダーゼ）と呼ぶことが多い。第2の酵素は14番染色体長腕にある遺伝子によりコードされ、生体内ではガラクトシルセラミドを分解する酵素として知られる（ガラクトシルセラミダーゼ）。

第1の酵素が本稿の対象であり、その遺伝性欠損は G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスとモルキオ B 病という二つのまったく異なった病気のグループとして発現する。第2の酵素の変異は、クラッペ病という小児の白質変性症として発現する。

β-ガラクトシダーゼ欠損の病態を簡単にまとめる。

2002年8月5日受稿

\* β-Galactosidosis : A new molecular therapeutic approach to brain pathology (chemical chaperone therapy) .

\*\* 国際医療福祉大学臨床医学研究センター (〒324-8501 大田原市北金丸 2600-1) Yoshiyuki SUZUKI : Clinical Research Center, International University of Health and Welfare, 2600-1 Kita-Kanemaru, Otawara 324-8501, Japan.

表2 変異ヒトβ-ガラクトシダーゼ蛋白質の細胞内動態

表現型		変異	多発人種	分子病態
G <sub>M1</sub> -ガングリオシドーシス	乳児型	R482H R2018C	イタリア 米国	蛋白質生成
	若年型	R201C R201H	日本 白人	高分子複合体形成
	成人型	I51T T82M	日本 白人	細胞内輸送
モルキオB病		W273L Y83H	白人 日本	基質特異性

と、表1のようになる。要するに中枢神経障害を中核症状とする疾患群と、全身骨関節の系統疾患として発現する場合があるということである。その詳細については、筆者らの最近の総説を参照されたい (Suzuki et al, 2001; Suzuki et al, 2002)。本質的には同じ遺伝子の異なった変異による単一の酵素欠損症であるという意味で、β-ガラクトシドーシスという総称名を筆者らは使っている (Suzuki and Oshima, 1993)。

## II. β-ガラクトシダーゼの遺伝子変異とその病態

現在までに、われわれが調査し得た範囲内では、β-ガラクトシダーゼ遺伝子 cDNA のクローニング (Oshima et al, 1988) 以来、51種の酵素活性の低下をもたらす変異と、少なくとも3種以上の中性多型が報告されている (Suzuki et al, 2002)。大部分は孤発的変異であるが、中には人種特異的な病型共通変異も知られている (Oshima et al, 1991; Suzuki et al, 2002; Yoshida et al, 1991) (表2)。

それぞれの変異について、変異酵素の細胞内動態を調べてみると、病型との関係が示唆された (Oshima et al, 1994) (表2)。検討した少数の共通変異に関する限り、蛋白質の生合成障害もあるが、それ以外に、蛋白質として発現するが分子の細胞質内安定性、細胞内輸送、ライソゾーム内での安定性、触媒能などの問題により適切な活性発現ができない例もある。表2には早期発症重症型の共通変異には蛋白質生合成障害があるとしたが、実際にはこのグループにも変異蛋白質が細胞内で発現していることもある。

これらの中で、変異蛋白質が合成されない症例、あるいは活性中心の構造異常のために触媒能を完全に失った症例においては、細胞内環境を整備しても分子活性を発現させることは困難であろう。しかし、本来の触媒能を持ちながら、細胞内で適切な条件が与えら

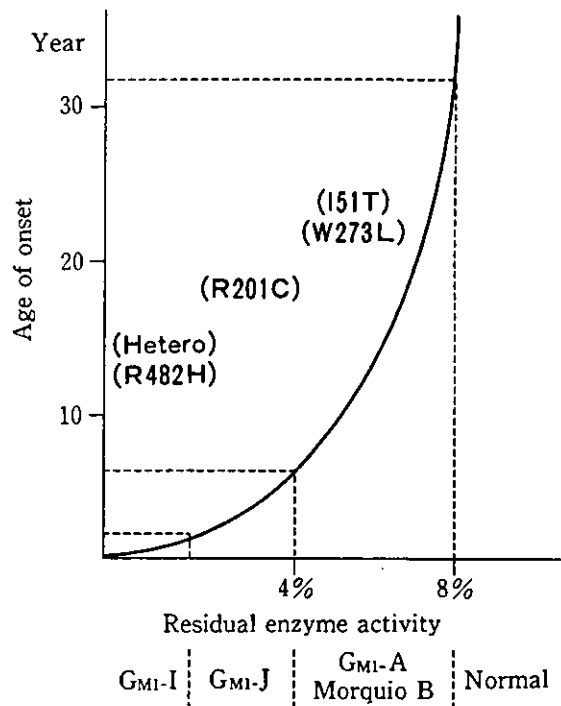


図 β-ガラクトシダーゼ欠損症における発症年齢と線維芽細胞内残存酵素活性

酵素活性が高い症例、病型ほど発症年齢が高くなる。正常人活性の8~10%の活性があれば、理論上、発症年齢は無限大となる (カッコ内の記号は変異遺伝子の種類)

G<sub>M1</sub>-I: 乳児型 G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス, G<sub>M1</sub>-J: 若年型 G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス, G<sub>M1</sub>-A: 成人型 G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス, Morquio B: モルキオB病。それぞれの病型における残存酵素活性の範囲を示す。

れないために活性発現が阻害されている症例では、適切な環境要因を設定することにより、変異酵素の活性をある程度まで発現させることができる可能性がある。

この見方とともに、病気発現に関するもう一つの新しいデータが得られている。変異遺伝子が患者由来線維芽細胞内で発現する残存活性量を調べてみると、発症年齢との間に正の相関がある (図)。酵素活性量が多いほど、発症年齢が高くなる。β-ガラクトシダーゼについては、正常酵素の8~10%の残存酵素活性量があれば、理論上は発症年齢が無限大になる。つまりヒトの寿命よりも発症が遅くなるということで、事実上発症が予防できるということである。これは Conzelmann and Sandhoff (1983) が、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、異染性白質ジストロフィーなど、いくつかのライソゾーム病について示したデータと本質的に同じ結果である。ただしこれらはすべて患者由来の培

表3 遺伝性ライソゾーム病に対する酵素保護・活性化療法の試み(鈴木ら)

- 
- 1) ガラクトシアリドーシス(保護蛋白質・カテプシンA欠損)
    - プロテアーゼ阻害剤により,二次的欠損を起こした $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を復元する。  
(Suzuki Y, et al : J Biochem 90 : 271-273, 1981)
  - 2) G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス( $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損)
    - プロテアーゼ阻害剤により,より効率のよい酵素補充効果を求める。  
(Ko Y-M, et al : Exp Cell Res 148 : 525-529, 1983)
  - 3) ファブリー病( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損)
    - 培養液への高濃度ガラクトース添加により,リンパ芽球内欠損酵素活性が著しく上昇する。  
(Okumiya T, et al : Biochem Biophys Res Commun 214 : 1219-1224, 1995)
  - 4) ファブリー病( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損)
    - 1-ガラクトデオキシノジリマイシンの培養液中添加・水溶液の経口投与により,培養細胞・トランスジェニックマウス臓器内酵素活性が著しく上昇する。  
(Fan JQ, et al : Nature Med 5 : 112-115, 1999)
  - 5)  $\beta$ -ガラクトシドーシス( $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損)
    - ガラクトノジリマイシン誘導体が,ノックアウトマウス線維芽細胞に発現させたヒト変異酵素の活性を著しく上昇させる。ただし $\alpha$ -ガラクトシダーゼの場合よりも大量の投与が必要である。  
(Tominaga L, et al : Brain Dev 23 : 284-287, 2001)
  - 6)  $\beta$ -ガラクトシドーシス( $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損)・ゴーシェ病( $\beta$ -グルコシダーゼ欠損)
    - 低分子ガラクトース誘導体(GaIX)またはグルコース誘導体(GlcX)が低濃度で培養細胞・疾患モデルマウス細胞・臓器の活性発現に有効である。  
(Matsuda J, et al : In preparation, 2002)
- 

養細胞を使って得られたデータであり,神経系の細胞を使った結果ではないという点で理論的な限界があることは承知しておかねばならない。

### Ⅲ. 遺伝性ライソゾーム病に対する治療の試み

臨床レベルですでに広く行われている治療法は酵素補充である。これは遺伝子変異により活性発現が阻害された細胞に対し,正常の酵素蛋白質を静脈内に投与するという方法である。外来性蛋白質は細胞に取り込まれると,異物としてライソゾームに運ばれる。そこで本来の活性を発現することが期待される。実際,ゴーシェ病患者に精製した $\beta$ -グルコシダーゼを投与するという酵素補充療法は,世界中ですでに広く行われ,肝脾腫,骨破壊,造血障害などの病態が著しく改善されることが確認された。しかし当然予想されるように,血液脳関門を通過して,脳組織で臨床レベルでの活性発現を期待することは,現在の知識と技術では困難である。

中枢神経病変に対する遺伝子治療は実験的試みの段階を超えていない。また最近,スフィンゴリピドーシスの蓄積を抑えるために,その合成の最初のステップ

でセラミドに対するグルコシルトランスフェラーゼを阻害する治療実験が始められているが,論理的には,多彩な生理機能を持つすべてのスフィンゴ脂質の合成を抑えることになり,このアプローチが実現可能であるかどうか,筆者は疑問を持っている。

筆者らは細胞レベルで $\beta$ -ガラクトシダーゼを活性化するために,いくつかの異なった試みを行ってきた。すでに述べたように,一般に遺伝病における変異遺伝子の発現には3つの分子機構がある。第1に蛋白質の生合成自体の障害,第2に発現した変異蛋白質の機能障害(たとえば酵素触媒能の低下・喪失),第3に機能が保持されている変異蛋白質分子の細胞内安定性の障害,である。遺伝性ライソゾーム病について調べてみると,第3の異常を示す症例が意外に多い。つまり,機能を持つ蛋白質が実際には細胞内で合成されているにもかかわらず,化学的に検出しようる機能には著しい低下があるという場合である。

われわれはこの点について,細胞内 $\beta$ -ガラクトシダーゼ, $\alpha$ -ガラクトシダーゼを中心とした検討を行ってきた。表3のように, $\beta$ -ガラクトシダーゼの細胞内安定性を保持するためにシステインプロテアーゼ阻

害剤を細胞に投与し、遺伝子変異による酵素活性発現障害 ( $\beta$ -ガラクトシドーシス)・二次的な酵素活性発現障害 (ガラクトシアリドーシス) に対する細胞・ヒト個体実験を行ったが、実用化できるレベルの効果を見るにいたらなかった (実験 1, 2)。その後ファブリー病、 $\beta$ -ガラクトシドーシスにおける変異酵素の細胞内分子動態を分析することにより、ある種の低分子化合物が高濃度・試験管内では酵素阻害剤としてはたらくが、低濃度・細胞内では逆に酵素活性発現を促進することがわかった (実験 3~6)。この方向の治療的アプローチは、これまでとはまったく違った概念の分子治療法として確立される可能性がある。その原理は、低分子化合物がいわばケミカルシャペロンとして変異蛋白質にはたらくことを利用しているという意味で、ケミカルシャペロン療法と呼んでもよいかもしれない。

ライソゾームではたらく多くの変異蛋白質は、生合成され糖鎖修飾を受ける粗面小胞体・ゴルジ体における中性の環境条件では分子として不安定であり、三次元立体構造の構築 (フォールディング) が不完全で、速やかに分解されるか細胞外に排出される。ところが、この酵素が認識する基質の糖鎖鎖末端に似た構造の低分子化合物を細胞に投与すると、変異蛋白質の触媒活性中心に結合し、その複合体は安定な状態でライソゾームに運ばれる。ライソゾームでは、酸性の条件でこの複合体が解離し、酵素蛋白質は安定に存在し、本来の触媒活性が発現する。これら一群のプロセスは特にファブリー病における  $\alpha$ -ガラクトシダーゼについての詳細な分析により明らかになった (Ishii et al, 1993; Ishii et al, 1994; Ishii et al, 1995; Ishii et al, 1996; Okumiya et al, 1995a; Okumiya et al, 1995b)。その後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼについての検討でも本質的に同じ現象が確認された (大野耕策ら, 未発表データ; 難波栄二ら, 未発表データ; 岩崎博之ら, 未発表データ)。

#### IV. 低分子基質類似化合物による新しい分子治療法

これら基礎的な検討とともに、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの生体内基質であるセラミドトリヘキソシド (CTH: あるいはグロボトリアオシルセラミド) の糖鎖鎖末端に存在するガラクトースそのものを、単体としてリンパ芽球の培養液に高濃度で添加したところ、失われていた細胞内酵素活性が著しく上昇した (Okumiya et al, 1995a)。当初は非定型的な肥大型心筋症の臨床像を示す遅発型ファブリー病に特有な現象かと思われたが、実際には小児期に発症する古典的な症例でも同じ酵素

表 4 ライソゾーム酵素競合的阻害剤の活性データ

	DGJ <sup>a)</sup>	GalX	GlcX
加水分解酵素	$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	$\beta$ -ガラクトシダーゼ	$\beta$ -グルコシダーゼ
対象疾患	ファブリー病	$\beta$ -ガラクトシドーシス	ゴーシェ病
50%阻害濃度	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	3 $\mu$ M
有効培養液濃度 <sup>b)</sup>	0.1~1 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	3 $\mu$ M

a) 1-ガラクトデオキシノジリマイシン

b) 線維芽細胞培養液

活性の上昇が起こることがわかった。しかし培養線維芽細胞では必ずしも著しい効果が見られなかった。これはガラクトースという、細胞内に生理的に存在する化合物が、代謝機能の高い線維芽細胞では速やかに代謝されるからであろうと予測した。

実際、ガラクトース類似の非生理的な化合物のスクリーニングを行ったところ、市販化合物である 1-デオキシガラクトノジリマイシンが培養細胞内で変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対し著しい効果があった (Fan et al, 1999)。その後、変異遺伝子をトランスジーンとして導入したモデル動物 (Ishii et al, 1998) についても同じ効果があることが確認された。この化合物については、現在 Fan らがニューヨークでさらに詳細な検討を進めている。

筆者にとって残念だったのは、技術的な理由から  $\alpha$ -ガラクトシダーゼについて始められたこの治療実験の対象が、ファブリー病という、本質的に中枢神経系の病態を伴わない全身血管病であるということであった。そこで筆者がしばらくかかわりを持って仕事をしてきた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症に目を向けることにした。その中核的な疾患である  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスは、著しい脳障害を乳児期から発症する、古典的な神経遺伝病だからである。

$\beta$ -結合ではあるが、やはり分子末端にガラクトースを含有するガングリオシド  $G_{M1}$  や、類似の複合糖質を加水分解する酵素であるという理由で、まず  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに有効であった 1-デオキシガラクトノジリマイシンや、その類似化合物である N-ブチルガラクトノジリマイシンを試したが、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する有効濃度の 50 倍程度の量が必要であることが、培養系の実験で確認された (Tominaga et al, 2001)。当然のことながら、同じガラクトース結合を含有する基質でも、 $\alpha$  結合と  $\beta$  結合には分子認識に大きな違いがあるという結論であった。

そこで、糖鎖鎖末端にグルコースをもつ複合糖質の分



表5 ノックアウト・トランスジェニック複合モデルマウス ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損)

導入遺伝子 cDNA	疾患モデル マウス	ヒト表現型
GP8	Wild	正常遺伝子発現
I51T	GalA	成人型 $G_{M1}$ - ガングリオシドーシス
R201C	GalB	若年型 $G_{M1}$ - ガングリオシドーシス
W273L	GalF	モルキオ B 病

解酵素である  $\alpha$ -グルコシダーゼ(ポンペ病)や  $\beta$ -グルコシダーゼ(ゴーシェ病)なども視野に入れて、市販のガラクトース・グルコース類似化合物を用いて広範なスクリーニングを行ったが、そのいずれについてもはっきりした効果が得られなかった。

次に有機合成により得られた新しい化合物の検索を開始した。幸いなことに生化学工業株式会社中央研究所のご好意により、可能性のあるいくつかの化合物を提供していただき、スクリーニングを行ったところ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼに対してきわめて有望な化合物が見出された。現時点では、その化学構造の詳細を明らかにすることができないが、とりあえず GalX と GlcX というコード名を用い、細胞、個体実験の検討を始めた。その結果のまとめを表4に示す。ここには先行して分析中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼのデータも比較のために提示してある。これまでの分析結果から、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する 1-デオキシガラクトノジリマイシンと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する GalX の効果はほぼ同じ生理活性を持つとの結論が得られた。GlcX の活性はやや低い、現在さらに効率のよい化合物の検索を行っている。

$\alpha$ -グルコシダーゼに有効な化合物はまだみつかっていない。

### V. 低分子治療剤は血液脳関門を通るか

筆者らの新しい実験の最終目標は、遺伝性ライソゾーム病における脳障害の治療・予防である。表4に示した3種の化合物の分子量は200~300程度であり、分子サイズから見て血液脳関門を通ることは十分に予測された。ただしこの点については、分子サイズのみならず、水に対する親和性も条件の一つとなると考えている。

そこで最近筆者らはモデルマウスの作成を始めた。すでに1997年に発表した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス (Matsuda et al, 1997a; Matsuda et

表6 新しい分子治療法(ケミカルシャペロン療法)が遺伝性ライソゾーム病に対して成立するための条件

- 1) 変異ライソゾーム酵素
  - a. 触媒能が存在すること
  - b. 中性で不安定、酸性で安定
- 2) 低分子阻害剤
  - a. 高濃度・試験管内で酵素の競合的活性阻害
  - b. 低濃度・細胞内で変異酵素活性復元
  - c. 血液脳関門を通過する
- 3) これまでに確認した欠損酵素と疾患
  - a.  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(ファブリー病)
  - b.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -ガラクトシドーシス)
  - c.  $\beta$ -グルコシダーゼ(ゴーシェ病)

al, 1997b) にヒト変異遺伝子 cDNA をトランスジーンとして導入し、個体における変異遺伝子の特異的な発現系を作った(表5)。現在までに野生型(正常)遺伝子を導入して正常化したマウスのほかに、ヒト成人型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス、若年型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス、モルキオ B 病に対応するモデルマウスの作成が確認された(松田潤一郎ら、未発表データ)。

現在は試薬生産量の制約のために、ひとつのマウスライン個体について投薬実験中である。細胞実験で最もよい反応を示した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ変異 R201C の発現マウスに GalX 水溶液を1週間アドリブに投与したところ、中枢神経系を含む全身臓器・組織の酵素活性が著しく上昇した(松田潤一郎ら、未発表データ)。このことは、マウス個体への経口投与により、GalX が血液脳関門を通過して中枢神経系に到達し、酵素活性を上昇させた(復元した)ことを示すものである。現在さらに詳細な分析を継続中である。

### VI. これからの課題・目標

以上の結果から、筆者が考えていた「脳の遺伝病を経口薬で治療する」という夢が、少し現実味を帯びてきたようである。このアプローチの最も重要な点は以下に集約される(表6)。

第1に、変異遺伝子が活性のある酵素蛋白質を発現すること。ライソゾーム病以外の多くの遺伝病でもこの条件を満足する変異遺伝子が存在すると予想される。第2に、酵素特異的に変異蛋白質分子の機能阻害・復元活性を持つ化合物が存在すること。第3に、細胞内で安定化された酵素・阻害剤複合体が安全に蛋白質機能発現の場所に運ばれること。そして第4に、活性発現の場所で変異蛋白質が安定に活性を発現すること、である。さらに付け加えるならば、中枢神経系を治療の対象とするならば、酵素分子を安定化する化

化合物が血液脳関門を通過することが必要条件となる。

これらの条件を満たす蛋白質として、ライソゾームではたらく酵素はモデル実験のよい対象となる。酸性の環境条件をもつ、ライソゾームという細胞内コンパートメントへの蛋白質輸送のメカニズムが、すでにかなり明らかにされているからである。生合成された場所が変異分子にとって適応しにくい中性の環境であっても、特殊なパートナー(これをケミカルシャペロンと呼んでもよいであろう)とともに環境に適応してうまく本来の活動場所に運ばれ、安定に活性が発現できれば、これまでとは違った概念の新しい分子治療法になるはずである。

さらに、ライソゾームの変異蛋白質のみならず、現在登録されている1万数千種の遺伝病にかかわる変異蛋白質についても、それぞれの分子メカニズムが明らかにされれば、筆者らのこの新しいアプローチの適用が可能になる。ただし、われわれにとってはライソゾームの病態が大きな標的であり、現在は他のカテゴリーの遺伝病に目を向ける余裕はない。当面は他の多くのライソゾーム酵素欠損症について、順次検討を進めてゆく予定である。

この治療実験を進める上に最も重要なのが、特異的な化合物を見つけること、そしてそれを大量生産システムに乗せることである。GalXの場合、この大量生産という段階にこぎつけるのにかなりの時間を要したが、今後はこの問題も順次解決されるはずである。またGalX以上に有効な薬剤のスクリーニングも継続する予定である。なお、今回の分析に使用したGalXとGlcXは、ともに構造・用途特許出願中である。その理由で本稿にはデータの一部を提示できなかったことをお断りしておく。

多様な変異遺伝子を持つヒト患者に対してこの実験的アプローチを進めるには、これまで筆者らが時間をかけて基礎的分析をやってきたのとは別に、変異同定の有無にかかわらず、患者由来の細胞培養液に化合物を添加し、活性化反応の有無をみるという、いわば細菌の抗生物質耐性を臨床のルーチン検査として行うのと同じレベルでの検索が求められる。繰り返して述べてきたように、触媒活性を持つ変異蛋白質が細胞内で発現していることが必須の条件だからである。実際に有効性のスクリーニングを行ってみると、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来の細胞の、少なくとも30%に有意の陽性反応がある(岩崎博之ら、未発表データ)。

さらに今後は個体実験により、薬剤の有効性ととともに毒性・副作用の検証も当然必要になる。モデル動物に対する長期投薬実験を開始する予定である。

これらの基礎的データを積み上げた上で、近い将来ヒト患者に対する新しい分子治療(ケミカルシャペロン療法)の治験を開始することが許される日の来ことを期待している。

謝辞 本論文は2002年3月16, 17日に松本市で開催された、第37回脳のシンポジウムでの講演内容に追加修正を行ったものである。与えられたタイトルは「ガングリオシドーシス」であったが、われわれが最近すすめている研究の流れを考慮して、本稿のタイトルにさせていただいた。またここに記したいいくつかの仕事は、以下の共同研究者に負うところが多い(カッコ内は当時の所属機関名)。柯 佑民(東京大学医学部小児科)、大島章弘(国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部)、石井 達、樊 建強(東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学)、松田潤一郎(国立感染症研究所獣医科学)、難波栄二(鳥取大学遺伝子実験施設)、大野耕策(鳥取大学医学部神経生物学)、神保雅之、松崎祐二(生化学工業株式会社中央研究所)、小川誠一郎(慶應義塾大学理工学部生命情報学科)、岩崎博之(国際医療福祉大学臨床医学研究センター)。ここに記して感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Conzelmann E, Sandhoff K: Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 6: 58-71, 1983
- 2) 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
- 3) Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y: Characterization of a mutant  $\alpha$ -galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1585-1589, 1993
- 4) Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Fujita S, Sugimoto M, Tomita K, Semba T, Suzuki Y: Human  $\alpha$ -galactosidase gene expression: significance of two peptide regions encoded by exons 1-2 and 6. *Biochim Biophys Acta* 1204: 265-270, 1994
- 5) Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y: The functional role of glutamine-280 and threonine-282 in human  $\alpha$ -galactosidase. *Biochim Biophys Acta* 1270: 163-167, 1995
- 6) Ishii S, Kase R, Okumiyama T, Sakuraba H, Suzuki Y: Aggregation of the inactive form of human  $\alpha$ -galactosidase in the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 812-815, 1996
- 7) 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
- 8) Ko Y-M, Yamanaka T, Umeda M, Suzuki Y: Effects of thiol protease inhibitors on intracellular degradation of

- exogenous  $\beta$ -galactosidase in cultured human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 148 : 525-529, 1983
- 9) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Ogura A, Naiki M, Suzuki Y : Neurological manifestations of knockout mice with  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Brain Dev* 19 : 19-20, 1997a
  - 10) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Ogura A, Noguchi Y, Yamamoto Y, Asano T, Takimoto K, Sukegawa K, Suzuki Y, Naiki M :  $\beta$ -Galactosidase-deficient mouse as an animal model for  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Glycoconjugate J* 14 : 729-736, 1997b
  - 11) Okumiya T, Ishii S, Takenaka T, Kase R, Kamei S, Sakuraba H, Suzuki Y : Galactose stabilizes various missense mutants of  $\alpha$ -galactosidase in Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 214 : 1219-1224, 1995a
  - 12) Okumiya T, Ishii S, Kase R, Kamei S, Sakuraba H, Suzuki Y :  $\alpha$ -Galactosidase gene mutations in Fabry disease : heterogeneous expressions of mutant enzyme proteins. *Hum Genet* 95 : 557-561, 1995b
  - 13) Oshima A, Tsuji A, Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y : Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human  $\beta$ -galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 238-244, 1988
  - 14) Oshima A, Yoshida K, Shimmoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki Y : Human  $\beta$ -galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet* 49 : 1091-1093, 1991
  - 15) Oshima A, Yoshida K, Itoh K, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y : Intracellular processing and maturation of mutant gene products in hereditary  $\beta$ -galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis). *Hum Genet* 93 : 109-114, 1994
  - 16) Suzuki Y, Sakuraba H, Hayashi K, Suzuki K, Imahori K :  $\beta$ -Galactosidase-neuraminidase deficiency : Restoration of  $\beta$ -galactosidase activity by protease inhibitors. *J Biochem* 90 : 271-273, 1981
  - 17) Suzuki Y, Oshima A : A  $\beta$ -galactosidase gene mutation identified in both Morquio B disease and infantile  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Hum Genet* 91 : 407, 1993
  - 18) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E :  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis) :  $G_{M1}$ -Gangliosidosis and Morquio B disease. In : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, eds by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, McGraw-Hill, New York, 2001, pp3775-3809
  - 19) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E :  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis) :  $G_{M1}$ -Gangliosidosis and Morquio B disease. In : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, Internet version, eds by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, McGraw-Hill, New York, 2002
  - 20) Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E : Galactonojirimycin derivatives restore mutant human  $\beta$ -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev* 23 : 284-287, 2001
  - 21) Yoshida K, Oshima A, Shimmoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, Suzuki Y : Human  $\beta$ -galactosidase gene mutations in  $G_{M1}$ -gangliosidosis : A common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J Hum Genet* 49 : 435-442, 1991

**Abstract**

$\beta$ -Galactosidosis :

A new molecular therapeutic approach to brain pathology (chemical chaperone therapy)

Yoshiyuki Suzuki

from

*Clinical Research Center and Nasu Institute for Developmental Disabilities ;*

*International University of Health and Welfare, 2600-1 Kita-Kanemaru, Otawara 324-8501, Japan.*

Research in genetic  $\beta$ -galactosidase deficiency disorders ( $\beta$ -galactosidosis) started with clinical and pathological analysis of atypical cases of Tay-Sachs disease ( $G_{M2}$ -gangliosidosis). Subsequent enzymatic and genetic analyses revealed that they are a group of disorders based on heterogeneous mutations of a single gene coding for lysosomal  $\beta$ -galactosidase, and expressed clinically as generalized or localized central nervous system disease ( $G_{M1}$ -gangliosidosis) or generalized skeletal dysplasias (Morquio B disease). After extensive molecular analysis we confirmed phenotype-genotype correlation and intracellular events of mutant gene expression products (mutant enzymes). We further found that some mutant enzyme proteins are labile and rapidly degraded in somatic cells from patients with  $\beta$ -galactosidosis and other lysosomal storage diseases. They are stabilized and transported to the ly-

osome by competitive inhibitors of low molecular weight (chemical chaperone), expressing catalytic activity to degrade accumulating substrates. We described this paradoxical phenomenon first for mutant  $\alpha$ -galactosidase causing Fabry disease, a non-neuronopathic disease. We extended this strategy to two other disease groups involving the central nervous system:  $\beta$ -galactosidosis and Gaucher disease ( $\beta$ -glucosidase deficiency). Two newly synthesized compounds were found to be active toward mutant enzymes in these diseases: GalX for  $\beta$ -galactosidase and GlcX for  $\beta$ -glucosidase (tentative nomenclature).

Some mutant enzyme activities were remarkably elevated after several days of culture with one of these compounds. The mutations responsive to this procedure mainly represented late onset or atypical clinical phenotypes. Furthermore we produced a few mouse lines expressing mutant human  $\beta$ -galactosidase causing specific clinical phenotypes, by introducing mutant cDNA as transgene into the  $\beta$ -galactosidase-deficient knockout mouse (KO-TG mouse). Oral administration of GalX for a week to the KO-TG mouse expressing the R201 mutation resulted in a remarkable enhancement of the enzyme activity in the brain, indicating that the compound passed through the blood-brain barrier to stabilize the mutant enzyme molecule in the central nervous system. We expect to develop a new molecular therapy of brain pathology in  $G_{M1}$ -gangliosidosis in the near future.

*(Received : August 5, 2002)*