

200500801A

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

ライソゾーム酵素欠損症の病態解析と新しい経口治療薬の開発

(H17-こころ-019)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木義之

平成18(2006)年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
ライソゾーム酵素欠損症の病態解析と新しい経口治療薬の開発	.....	1
鈴木義之		
II. 分担研究報告		
1. ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析	.....	5
松田潤一郎		
2. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とモデルマウス神経変性機構に関する研究	.....	9
難波栄二		
3. $\beta$ -ガラクトシダーゼ変異マウスの NOEV 治療の神経病理学的解析	.....	1 1
伊藤雅之		
4. 遺伝子組み換え $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価	.....	1 3
黒澤美枝子		
5. ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発	.....	1 7
大野耕策		
6. 日本人ゴーシェ病の臨床型と遺伝子相関	.....	2 1
衛藤義勝		
7. クラッペ病モデルマウスの病態解析	.....	2 5
酒井規夫		
8. ファブリー病患者由来変異酵素の特徴とシャペロン治療に関する研究	.....	2 7
石井 達		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....	2 9
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	.....	3 1
V. 健康危険情報	.....	3 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷	.....	3 3

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

ライソゾーム酵素欠損症の病態解析と新しい経口治療薬の開発

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
研究協力者	飯田真己	生化学工業株式会社中央研究所研究員
	岩崎博之	国際医療福祉大学臨床医学研究センター講師
	大久保真人	国際医療福祉大学保基礎医学研究センター教授
	小川誠一郎	慶應義塾大学工学部名誉教授
	榊原康文	慶應義塾大学工学部教授
	滝本一広	国立感染症研究所動物管理室研究員
	田部美穂	株式会社エスアールエル医化学分析センター
	水口 雅	東京大学医学部助教授

研究要旨

古典的な小児の神経遺伝病G<sub>M1</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。本年度は、すでに有効性を確認した化合物NOEV (N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン)の大量合成法を確立した。そしてヒト患者由来変異細胞に対するスクリーニングをおこない、NOEVが変異特異的に働くシャペロンであることを確認した。同時にモデル動物個体への経口投与実験により、形態的・化学的有効性を確認し、投与量の検討を行った。臨床的評価のためにマウス個体の神経学的評価法を開発し、長期実験を開始し、その形態学的化学的病態解析ならびに臨床検査データを集積中である。さらにシャペロン化合物の有効性予測のために、分子モデリングの手法により酵素分子の構造予測をおこなった。またクラッペ病、ゴーシェ病、ファブリー病など類似疾患の治療に向けた基礎実験を開始し、モデル動物個体を作成中である。

A. 研究目的

ライソゾーム病をモデル疾患として、研究期間中にわれわれが開発中のケミカルシャペロン療法を確立することを目的とする。特にスクリーニングと有機合成により開発したN-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン(NOEV)を用い、β-ガラクトシドーシス(β-ガラクトシダーゼ欠損症：G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス、モルキオB病)患者由来の培養細胞、酵素欠損モデル動物についてその有効性と毒性を検討して、ヒト患者に対する治療実験を開始する。同時に他の類似疾患(クラッペ病：ガラクトシルセラミドβ-ガラクトシダーゼ欠損症、ゴーシェ病：β-グルコシダーゼ欠損症、ファブリー病：α-グルコシダーゼ欠損症)についての病態解析とシャペロン化合物の探索により、同じ手法による新しい治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

NOEVの効果を調べるため、野生型マウスにヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子をトランスジーンとして導入し、酵素活性を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成した。この個体にすでに確立した酵素欠損ノックアウトマウスを交配し、マウス酵素を発現せずヒト変異酵素のみを発現するいくつかのマウス種を作成した。そのなかで酵素活性の発現が高いR201C変異を持つヒト若年型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスを治療実験に用い、この動物の臨床経過を多数の検査項目の組み合わせとして評価・スコア化し、定量性のある検査法を開発することを試みた。そしてほかの遺伝子導入マウス作成の試みも開始した。

一方、シャペロン化合物NOEVの大量生産法の検討とともに、分子モデリングの手法を用いたβ-ガラク

トシダーゼ分子の立体構造予測を開始し、その変異が構造に与える変化を予測した。

予備的な短期実験により、マウスへの1 mM 濃度の NOEV 水溶液投与は、より高濃度の溶液の効果と変わらないことがわかったため、今後はすべてこの濃度で実験を行うことにした。

同時にこの化合物の毒性の有無についての検討も開始した。投薬実験中のマウス血液、尿を採取し、血液性化学分析、一般検尿を行うとともに、少数ではあるが剖検臓器の病理学的検査を開始した。

動物実験は国際医療福祉大学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

### 1. NOEV 合成法

研究協力者（生化学工業・飯田真己研究員）の努力により、マウスに対する投与実験としては十分な合成法が確立された。

### 2. モデルマウスの神経学的検査とスコア化

ヒト乳幼児の神経学的検査法の考え方をもち、マウスの自発運動・姿勢観察、原始反射・姿勢反射など14項目の検査で、それぞれの項目について0（正常）から3（高度異常）までの4段階評価を行い、個別検査の経過、合計点の時間的変化を分析した。正常マウスでは1歳ごろまでは総計点8以下であったが、ノックアウトマウスでは生後4ヶ月からこの閾値を越え、徐々にスコア点が高くなった。遅発遷延型モデルのトランスジェニックマウスの神経学的異常はその2倍の時間的経過を示した。この成果を、以下の治療実験に適用し、正確に評価することが可能となった。

### 3. NOEV 経口投与実験

繰り返し実験を行った結果をもち、投与水溶液の濃度は今後1 mM とすることにした。経口投与により、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が、脳組織の NOEV 分析により確認できた。さらに酵素活性の上昇、蓄積脂質の現象が再確認された。臨床解析はまだ十分でないが、発症直前から4ヶ月間の NOEV 投与により、後肢麻痺の発症予防効果を確認した。

### 4. NOEV の毒性・副作用

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。16週までの投与実験中、マウス血液、尿検査を行った。一部の個体で、血漿 GOT、GPT の上昇を示した例があったが、これは非投与群にも見られたため、この現象の特異性については今後の問題と考えた。剖検組織でも肝組織に異常を見た例があったが、同様、今後慎重に検討する予定である。

### 5. $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子モデリング

3D-ID 法により、既知のアオカビ構造をもとに、ヒト酵素の構造予測を行った。そして変異蛋白質の構造を大まかに予測し分類することが可能であることが分かった。現在さらに詳細を検討中である。

### 6. 他の類似疾患に対するシャペロン療法

NOEV がクラッペ病の欠損酵素ガラクトシルセラミド $\beta$ -ガラクトシダーゼの強い競合阻害剤であることが分かった。そこでクラッペ病患者由来の線維芽細胞培養液に NOEV を添加し、酵素活性の変動を検討したが、酵素活性化効果はまったく見られなかった。また生理的酵素活性化蛋白質であるサポシン A を添加しても効果に変わりはない。

ゴーシェ病については、NOEV の類似化合物 NOV（N-オクチル- $\beta$ -バリエナミン）が F213I に有効であることが分かっていたが、新たに N188S 変異に対しても有効であることを見出した。現在これらの変異を導入したモデルマウスを作成中である。

ファブリー病の多くの変異が1-デオキシガラクトノジリマイシン（DGJ）により活性化されることが知られており、さらにその分子機構を解明するとともに、モデルマウスによる個体実験を計画中である。

### 7. 新しいモデルマウスの開発

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスおよびファブリー病の治療実験に用いる目的で、新しい遺伝子導入によるモデルマウスの開発を試み、進行中である。

## D. 考察

われわれの提唱するケミカルシャペロン療法が、マウス個体実験により、ヒトの神経遺伝病に有効である可能性を示した。現在のところわれわれのオリジナル化合物である NOEV、NOV、そして市販薬 DGJ の有効性を確認した。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。

この新しい治療法にはシャペロン化合物の安定供給

が必須である。そこで、有機合成法の改善努力を重ね、NOEVについては大量生産の見通しを立てることができた。薬剤の大量供給が可能になったので、今年度から多数のマウス個体への長期投与を開始することができた。

現在、本研究第1年度末から第2年度にかけて実験が進行中である。定期的に中枢神経系をはじめとするマウス個体の臨床像を詳細に解析するとともに、組織病変の改善度を分析中である。最近、NOEVの短期投与とそのチェイス実験により、数日以内に臓器内化合物濃度が飽和状態になり、投与中止後数日以内に処理・排泄されることが明らかになった。これが酵素活性や基質分解の持続とどのようにつながるか、現在検討中である。

ケミカルシャペロン療法のもっとも大きな利点は、経口投与した低分子化合物が血液脳関門を容易に通過し、必要な量の化合物が脳組織に入り、病態を矯正することができるという事実である。この点は、化合物自体の組織内濃度測定が簡易化された結果、少なくともマウス個体の実験では繰り返し確かめることができた。

5週間の経口投与実験では体重、飲水量、血液生化学分析データに異常を認めず、マウスの嗜好性変化・忌避はみられなかった。その後多数の正常・疾患マウスの自然経過、投薬に対する反応を血液、尿、体組織（特に肝、腎）の化学・形態分析により検討中である。経年とともにマウスの肝機能に変化が認められることがある一方、投薬群の一部にも同様の変化が認められた。しかし最終結論を下すには十分なデータがないので、第2年度以降、この点も慎重に検討する予定である。

#### E. 結論

ケミカルシャペロン療法を実施するための基本的な情報・データを集積した。

第1に化合物と変異蛋白質分子についての情報集積である。分子モデリングや化合物大量合成などの成果が得られた。今後ほかの疾患への拡大適用においても重要な情報となる。

第2に遺伝子組換え動物の作成である。特にG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスのモデルマウス作成に成功し、その治療実験を系統的に行うことが可能となった。この遺伝子組換え技術の確立も、類似疾患への応用に重要な情報を提供するであろう。

第3に本研究の中核となる対象疾患であるG<sub>M1</sub>-ガ

ングリオシドーシスの脳病変に対する新しい治療コンセプトの確立である。これまで行われてきた診療レベルの分子治療あるいは治療実験は、脳腫瘍など特殊な疾患群を除けば、中枢神経系以外の病変を標的としてきた。中枢神経系には血液脳関門が存在するため、神経遺伝病一般を対象とする治療実験は極めて困難であった。その問題をクリアすることにより、ケミカルシャペロン療法が今後多くの病気に適用されるようになることを期待している。対象疾患を拡大することにより、現在社会的、経済的にも大きな問題である、多数の心身障害児・者への対応が可能になると期待したい。

本年度の大きな成果の一つは、マウスの神経学的評価法開発であった。国内外でいくつかの検査法が報告され、遺伝病モデルマウスの評価に試みられているが、定量性のあるスコアシステムは存在しない。われわれは多数の検査項目を数値化することにより、マウスの神経学的進行度をかなり正確に評価することに成功した。この方法も多くの他の遺伝病マウスに対する新しい神経学的検査法として使われることを期待している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 鈴木義之：薬物療法（遺伝病に対する新しい治療法）. 小児科の新しい流れ：先端医療シリーズ 34: pp104-108, 2005.
2. 鈴木義之：ライソゾーム病の酵素補充療法. *Brain Medical* 17: 253-258, 2005.
3. Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, Fujiwara M, Mizuno A, Inui K, Sakai N, Kitagawa T, Suzuki Y, Mochizuki S, Kawakami M, Hosoya T, Owada M, Sakuraba H, Saito H: Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients: the results of a phase 2 bridging study. *J Inherit Metab Dis* 28: 575-583, 2005.
4. Suzuki Y:  $\beta$ -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inherit Metab Dis*, in press, 2006.
5. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy in  $\beta$ -galactosidosis. *Brain*

Dev, in press, 2006.

学会発表

1. Suzuki Y: Child neurology: many patients and many diseases. What next? 3rd International Conference on Child Neurology of Central Asian Countries. Almaty, Kazakhstan, 6.2-3, 2005.
  2. Suzuki Y:  $\beta$ -Galactosidase deficiency: An approach to chaperone therapy. 42nd Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Paris, France, 9. 6-9, 2005.
  3. Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M: A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. European Paediatric Neurology Society Congress 2005, Goteborg, Sweden, 9. 14-17, 2005.
  4. 鈴木義之: ケミカルシヤペロン療法: 遺伝性ライソゾーム病に対する新しい分子治療. 第50回人類遺伝学会大会, 倉敷, 9. 19-22, 2005.
  5. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling in  $G_{MI}$ -gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10. 19-22, 2005.
  6. Suzuki Y: New therapies for neurogenetic disorders. XVIII World Congress of Neurology, Sydney, Australia, 11. 5-11, 2005.
  7. 一ノ宮悟史, 渡辺浩史, 松田潤一郎, 丸山貴美子, 戸田寛子, 岩崎裕之, 黒澤美枝子, 飯田真己, 小川誠一郎, 鈴木義之: 遺伝子組換え  $G_{MI}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48回日本先天代謝異常学会, 熊本, 11. 16-18, 2005.
  8. 大橋英美子, 檜垣克己, 山本浩一, 高村歩美, 飯田真己, 小川誠一郎, 岩崎博之, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト  $G_{MI}$ -ガングリオシドーシス遺伝子変異解析とケミカルシヤペロン療法. 第48回日本先天代謝異常学会, 熊本, 11. 16-18, 2005.
  9. 鈴木義之, 渡辺浩, 岩崎博之, 一ノ宮悟史, 丸山貴美子, 戸田寛子, 黒澤美枝子, 松田潤一郎, 飯田真己:  $G_{MI}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発. 第22回日本疾患モデル学会, 伊香保, 11. 24-25, 2005.
  10. 高村歩美, 檜垣克己, 山本浩一, 飯田真己, 岩崎博之, 鈴木義之, 難波栄二: マウスモデル細胞を用いた  $G_{MI}$ -ガングリオシドーシスの解析.
- 第11回ライソゾーム病研究会, 東京, 12. 2, 2005.
11. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered  $G_{MI}$ -gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol, England, 1.18-20, 2006.
- 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

ライソゾーム酵素欠損症の病態解析と新しい経口治療薬の開発  
分担項目：ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

#### 研究要旨

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物となることを期待し、ファブリー病での蓄積脂質 globotriaosylceramide (Gb3)の合成能を高めるため Gb3 合成酵素遺伝子導入マウスを作製し、6匹のファウンダーを得た。今後、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスのバックグラウンドに Gb3 合成酵素遺伝子を導入したマウスを作製することで、Gb3 の蓄積とともに臨床症状を発症するファブリー病モデルマウスとなることが期待される。

#### A. 研究目的

リソゾームは酸性で作用する加水分解酵素を多数含んでおり、高分子化合物を低分子物質に順次分解するが、これらの酵素に異常が起きると基質が蓄積し、多様な病態を示し、多くのライソゾーム酵素欠損症として知られている。発症時期や重症度はさまざまであるが、典型的には乳幼児期に発症し、多くは重症の中枢神経症状を伴い、有効な治療法がない。最近、ケミカルシャペロン療法が開発され、経口治療薬が変異酵素分子を安定化し活性を高めることが示され、中枢神経系をもターゲットとした治療法として注目されている。本研究では、ケミカルシャペロン療法の *in vivo* 治療実験モデルとして、ヒト患者の変異酵素遺伝子を導入するなどによって、 $G_{M1}$  ガングリオシドーシス、ファブリー病およびゴーシェ病のモデルマウスの作製を目指した。本年度はファブリー病モデルマウスの作製を開始した。

#### B. 研究方法

ファブリー病はライソゾーム酵素の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ ( $\alpha$ -Gal) が欠損し globotriaosylceramide (Gb3) などが全身に蓄積し四肢末端の疼痛や被角血管腫などの障害を引き起こす疾患である。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスが作出されているが脂質蓄積が無く、全く症状を示さない。そこで、本研究では、Gb3 合成酵素を強発現するトランスジェニックマウスを作製し、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスに導入し、脂質の蓄積と臨床症状を示すモデルマウスとなることを期待して実験を進めた。

ヒト Gb3 合成酵素( $\alpha$ -1,4galactosyltransferase) cDNA と強発現用プロモーターとしてニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーター (CAG プロモーター) との融合遺伝子を構築し必要なトランスジーン DNA 断片を精製した。トランスジーン DNA を C57BL/6J マウスの受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウスを作製した。(帯広畜産大学 石井達先生との共同研究)

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

#### C. 研究結果

Gb3 合成酵素強発現用トランスジーン DNA を、合計 719 個の C57BL/6J マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、510 個(70.9%)の胚が生存し、このうち 445 個を偽妊娠マウスに胚移植したところ 40 匹の産仔が得られ 36 匹が離乳した。36 匹のうち PCR にて導入遺伝子を検索したところ 6 匹(6/36, 16.7%)が陽性であり、現在、この 6 匹をファウンダーとして、C57BL/6J マウスとの交配により F1 世代の作出を開始した。

#### D. 考察

Gb3 合成酵素遺伝子導入ファウンダーマウスが 6 匹得られ、現在 F1 世代の作出による系統化中であるが、今後、各ラインについて発現解析を行う予定である。Gb3 合成酵素高発現ラインが得られれば、 $\alpha$ -Gal ノックアウトマウスとの交配を行い、Gb3 合

成酵素高発現のノックアウトマウスが得られ、Gb3の蓄積とともに臨床症状を発症するモデルマウスとなることが期待される。さらにファブリー病患者由来の残存酵素活性を示すヒト変異酵素遺伝子をこのファブリー病モデルマウス (Gb3TG/ $\alpha$ -Gal KO) に導入することで、症状を指標としたケミカルシャペロン療法の治療効果評価系としての応用が期待される。

#### E. 結論

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物となることを期待し、ファブリー病での蓄積脂質 globotriaosylceramide (Gb3)の合成能を高めるため Gb3 合成酵素遺伝子導入マウスを作製し、6匹のファウンダーを得た。今後、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスのバックグラウンドに Gb3 合成酵素遺伝子を導入したマウスを作製することで、Gb3の蓄積とともに臨床症状を発症するファブリー病モデルマウスとなることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Aguil T. Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. *Mammalian Genome*, in press, 2006.
2. Okada T, Ishii Y, Masujin K, Yasoshima A, Matsuda J, Ogura A, Nakayama H, Kunieda T, Doi K. The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology. *American Journal of Pathology*, in press, 2006.
3. Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone beta-subunit precursor protein. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press, 2006.
4. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine*, in press, 2006.
5. Suzuki O, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line. *Exp Anim*, 55: 65-69, 2006.
6. Mochida K, Wakayama T, Takano, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Matsuda J, Ogura A. Birth of Offspring after Transfer of Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Embryos Cryopreserved by Vitrification. *Mol Reprod Dev*, 70:464-70, 2005.

##### 学会発表

1. 鈴木治、秦朋子、竹川奈穂、小浦美奈子、高野薫、山本美江、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎. ゲノムウォーキングによる遺伝子導入動物の導入遺伝子挿入形式の解析. 第52回日本実験動物学会総会、2005年5月、東京.
2. Ayumi Takamura, Katsumi Higaki, Junichiro Matsuda, Yoshiyuki Suzuki and Eiji Nanba. Impairment of Trk receptor-mediated signaling in  $G_{M1}$ -gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会、2005年10月、神戸.
3. 一ノ宮悟史、渡辺浩史、松田潤一郎、丸山貴美子、戸田寛子、岩崎博之、黒澤美枝子、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之: 遺伝子組換え  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48回日本先天代謝異常学会総会、2005年11月、熊本.
4. 鈴木義之、渡辺浩史、一ノ宮悟史、松田潤一郎、飯田真己.  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発 (シンポジウム「神経疾患モデル動物—神経疾患解析・治療法開発の重要性と現状—」). 第22回日本疾患モデル学会総会、2005年11月、伊香保.
5. Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M. A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. 6th European Pediatric Neurology Society Congress, Gothenburg, Sweden, September 2005.
6. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J. Neurological examination of genetically engineered  $G_{M1}$ -gangliosidosis model mice. The 32nd Annual



Conference British Paediatric Neurology  
Association, Bristol, UK, January 2006.

7. Schümann J, Facciotti F, Matsuda J, Lobel P, Mori L, De Libero G. Lysosomal  $\beta$ -galactosidase and the lipid transfer protein Niemann-Pick C2 independently contribute to the development of invariant V $\alpha$ 14 NKT cells by different

mechzanisms. the Annual Congress of the Swiss  
Society for Allergology and Immunology, Zurich,  
Switzerland, March 2006.

- G. 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

β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とモデルマウス神経変性機構に関する研究

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: DHPLC 解析を用いた迅速かつ正確なヒト β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系を新たに確立した。新規変異を含む 40 種類の遺伝子変異について、ノックアウトマウス繊維芽細胞への発現系を用いたケミカルシャペロン (NOEV) の効果を調べた結果 8 種類の変異で有為な活性還元効果を認めた。β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス脳において細胞膜ラフトに局在する G<sub>M1</sub> と神経栄養因子受容体シグナル異常が神経細胞障害を引き起こしている可能性を示した。

A. 研究目的

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス脳障害に対するケミカルシャペロン療法の開発を行う目的。1. DHPLC 解析による迅速、正確かつ安価なβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系の確立、2. 変異酵素蛋白質に対する NOEV 効果を発現実験系でスクリーニングした。また、β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス新生児脳における神経変性機構について検討を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子変異解析と NOEV 効果のスクリーニング

ヒト G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞から抽出したゲノム DNA に対し、WAVE fragment 解析システム (Transgenomic 社) を用いた DHPLCdenaturing high performance liquid chromatography) 解析を行った。DHPLC で検出された変異部位について direct sequencing により遺伝子変異を同定した。

ヒトβ-ガラクトシダーゼ cDNA を pCMV-Script ベクターに組み込んだ発現ベクターを鋳型とし、site-directed mutagenesis により変異導入した。発現ベクターをβ-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス由来繊維芽細胞株にリポフェクション法により導入した。導入後、0.2μM の NOEV (N-actyl-4-epi-β-

valienamine) を含む培養液で 48 時間培養後、β-ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用いて測定した。

2. モデルマウス脳神経変性の解析

β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス新生児脳より初代小脳顆粒細胞とアストロサイト培養を行った。細胞膜の流動性試験は蛍光脂質 DiI を用いた FLAP 法により行った。免疫蛍光染色、ウエスタンブロット法及び免疫沈降法には抗 GM1、抗 Trk、抗リン酸化 Trk 抗体を用いた。

C. 研究結果

DHPLC 解析にはヒト β-ガラクトシダーゼ遺伝子 16 エクソンに対し 15 セットのプライマーを新たに設計した。今回解析を行った 13 人のヒト G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者に対し、11 人について 20 種類の遺伝子変異を同定した。そのうち 9 種類 (S53I、R59C、I181K、R148C、D332E、T420K、M480V、P549L、276-277 insG) の新規変異を同定した。これら新規変異を含む 40 種類のミスセンス変異について、NOEV の酵素活性に対する効果を調べた結果、8 種類の変異 (R201C、R201H、R201Y、V216A、Q255H、D332N、D332E、R457Q) に対し、3 倍以上でかつ正常の 10% 以上の酵素活性還元

効果を認めた。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス脳由来アストロサイトにおいて、細胞膜流動性の低下が認められた。また、脳組織および小脳顆粒神経細胞において、細胞膜ラフトで神経栄養因子受容体 Trk に結合している  $G_{MI}$ -ガングリオシドの量が低下し、Trk 受容体のリン酸化の顕著な低下が見られた。

#### D. 考察

DHPLC による迅速かつ正確なヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系を確立した。これまでの解析では 77%の検出効率で、従来の PCR-SSCP 法に比べ高効率である。マウスモデル細胞発現系によるケミカルシャペロン NOEV 効果の検討では 8 種類の変異に対して有為な酵素活性還元効果を認め、変異特異的な効果を示した。今後、変異酵素蛋白質と NOEV の結合について構造学的な解析を行うことが必要と考える。

$G_{MI}$ -ガングリオシドは神経細胞膜ラフトに豊富に存在し、細胞生存、分化に重要な糖脂質である。武藤らは  $G_{MI}$ -ガングリオシドと Trk 受容体の結合が神経分化に重要であることを示した (Muto et al., PNAS 1995)。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス脳においてこの Trk 受容体と結合している  $G_{MI}$ -ガングリオシドが有為に低下し、Trk のリン酸化に異常が認められた。神経栄養因子シグナルは神経細胞の増殖・分化・維持において必須であり、このシグナル異常がマウス神経変性に関わっている可能性を示唆する。今後は下流シグナルの解析および神経栄養因子付加による神経細胞障害に対する保護効果の検討を行う。

#### E. 結論

DHPLC を用いたヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系からマウスモデル細胞を用いた NOEV 効果試験まで、ケミカルシャペロン療法の解析系が確立できた。モデルマウス神経変性と Trk 受容体シグナル異常の関与が示唆された。

#### F. 研究発表

論文発表

1. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanbe E, Suzuki Y. Fibroblast screening for chaperone therapy in  $\beta$ galactosidosis. Brain Dev, in press.

学会発表

1. 高村歩美、檜垣克美、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二：  $G_{MI}$ -ガングリオシド系モデルマウス脳における Trk 受容体シグナルの異常. 第 78 回日本生化学会大会、神戸市、2005.10.19-22
2. 大橋英美子、檜垣克美、山本浩一、高村歩美、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、鈴木義之、難波栄二：ヒト  $G_{MI}$ -ガングリオシド系遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法. 第 48 回日本先天代謝異常学会、熊本市、2005.11.16-18
3. 高村歩美、檜垣克美、山本浩一、飯田真巳、岩崎浩之、鈴木義之、難波栄二：マウスモデル細胞を用いた  $G_{MI}$ -ガングリオシド系の解析. 第 11 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2005.12.2

#### G. 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

$\beta$ -ガラクトシダーゼ変異マウスの NOEV 治療の神経病理学的解析  
分担研究者 伊藤 雅之 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 2 部 室長

研究要旨

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス (KO マウス) にヒト変異型 R201C を遺伝子導入したマウス (KO/Tg マウス) の N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン (NOEV) 治療による神経病理学的解析を行った。その結果、11 ヶ月齢と 14 ヶ月齢 KO/Tg マウスでは、治療群と非治療群間で神経細胞の脂質蓄積と変性に明らかな差がなかった。電子顕微鏡学的には、laminar or zebra-body like structures が観察された。

A. 研究目的

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス (KO マウス) にヒト変異型 R201C を遺伝子導入したマウス (KO/Tg マウス) における、さまざまな N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン (NOEV) 投与方法による神経病理学的解析での治療効果を検討し、最適な投与方法をみつける。

B. 研究方法

KO/Tg マウス 11 ヶ月齢と 14 ヶ月齢、および野生型 5 ヶ月齢と 17 ヶ月齢、KO マウス 10 ヶ月齢の固定後脳半切組織を冠状断し、パラフィン包埋薄切組織を作製した。薄切切片は HE 染色、KB (ルクソールファストブルー・クレシルバイオレット) 染色、ボディアン銀染色および抗 GFAP 抗体による免疫組織化学を行った。さらに、電子顕微鏡学的観察を行った。

治療は NOEV 濃度を 1.0mM で 22 週間および 4 ヶ月間の飲水投与によって行った。

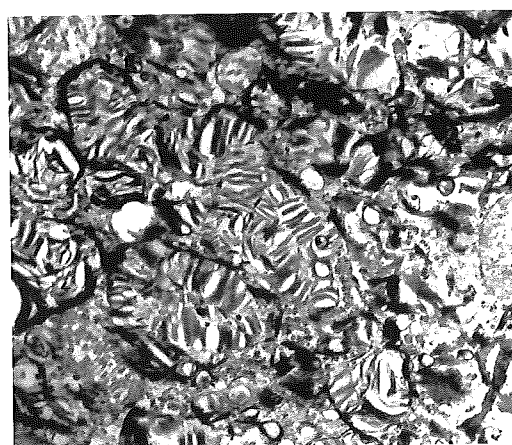
評価は細胞内に蓄積されているルクソールファストブルー (LFB) 陽性顆粒の程度と変性細胞の程度によって行った。

(倫理面への配慮) 当施設実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) KO/Tg マウスの神経病理学的変化。

今回観察した 11 ヶ月齢と 14 ヶ月齢では、すでに大脳皮質、海馬、視床、脳幹三叉神経核など広範に LFB 陽性顆粒の蓄積が観察された。しかし、KO マウスに比して程度は軽かった。電子顕微鏡学的には、laminar or zebra-body like structures が三叉神経核の神経細胞内に観察された。



KO/Tg マウス三叉神経細胞の電子顕微鏡像

(2) NOEV 治療の KO/Tg マウスの神経病理学的変化。

LFB 陽性顆粒を有する細胞の数と変性細胞の数は無治療 KO/Tg マウスと明らかな変化はなかった。

#### D. 考察

KO/Tg マウスの神経病理変化は、ヒト幼児型 G<sub>M1</sub> ガングリオシドーシスの変異である R201C を持ち、乳児型よりも軽症なことを反映していた。

電子顕微鏡で観察された構造物は、報告があるものの、ヒト G<sub>M1</sub> ガングリオシドーシスでよく観察される membranous cytoplasmic body とは異なっていた。マウスにはよく見られるものなのかどうか、今後数を増やして観察する必要がある。

今回の NOEV 治療の有効性は明らかではなかった。すでに病変が完成された後の治療の試みであることから、今後投与量と期間、投与時期の検討が求められる。

#### E. 結論

KO/Tg マウスの神経病理学的解析と NOEV による治療効果を検討した。KO/Tg マウスの電子顕微鏡像では、ヒト G<sub>M1</sub> ガングリオシドーシスでは稀な laminar or zebra-body like structures が観察された。また、11 ヶ月齢や 14 ヶ月齢では、NOEV 1.0mM の治療効果を得るのは難しいと考えられた。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 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

遺伝子組み換え G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価

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 一ノ宮悟史、丸山貴美子、戸田寛子 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  
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

ヒトの遺伝性脂質蓄積症 G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスの病態モデルを解析する目的で、この酵素の遺伝子組み換えにより作成されたモデルマウスの神経学的評価を行った。現在臨床的に用いられているヒト新生児・乳幼児神経学的検査法をもとにして、マウスにおける神経学的検査法を作成し、評価した。モデルマウスとしては、遺伝子ノックアウトによる重症型マウス、この個体にヒト変異遺伝子を導入した軽症型マウスを用い、これらのマウスの神経学的症状を正常野生型マウスと比較した。それぞれの個体の姿勢、肢位、自発運動観察、徒手操作に対する反応、簡易器具を用いた反応様式、行動観察装置を用いた計測値をスコア化した。その結果、この検査法は G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスにおける脳神経障害の進行を客観的に評価できる方法として有用であることが示された。

A. 研究目的

神経遺伝病に対する新しい治療薬の開発にあたり、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<sub>MI</sub>-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。

本研究は、G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスのモデルマウスを使用して神経学的解析を行い、ヒトの病気の病態解明、他の疾患モデルマウスに対する本神経学的解析の応用性の検討、そして現在開発中の新しい治療薬剤の効果モニタリングに用いる可能性を探ることを目的としている。

マウスについてはこれまで系統的な神経学的評価法が存在していない。そこで本年度はヒトの新生児や乳幼児に行われている神経学的検査、特に原始反射や姿勢反射をもとにマウスにおいて検査法を工夫し、G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスのモデルマウスにおいて評価した。

B. 研究方法

1. 動物

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℃、12時間明暗条件下で飼育した。測定には、野生型マウス5匹(C57BL/6Cr系、3-5ヶ月齢、以下、WT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、2-9ヶ月齢)30匹、ヒト患者変異cDNAをKOマウスにトランスジェ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、2-9ヶ月齢)41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。

2. 神経学的評価法

個体肉眼検査、徒手検査、簡単な道具による検査、行動観察装置による検査を含む合計15項目の計測を行った。個体肉眼検査として、1. 自由歩行、2. 軀幹部振戦、3. 前肢位運動、4. 後肢位運動、5. 背部・脊椎の形態、6. 尾の挙上、を観察・評価した。徒手検査として、1. 寝返り、2. 立ち直り反射、3. パラシュート反射、4. 後肢振戦運動、を観察・評価した。簡単な道具を用いた検査としては、1. 踏み抜き(水平金網上での歩行)、2. しがみつ運動(垂直金網でのし

がみつ)、3. 逃避反応(尾根部へのつまみ刺激に対する tail flick テスト)、を観察・評価した。行動観察装置による検査として、1. 歩行時左右動揺度(ビデオモニタリングシステムを使用)、2. 協調平衡運動(ロータロッドを使用)を観察・評価した。以上すべての項目をスコア化し、0(正常)から3(高度異常)までの数値により、重症度を判定した。各群のマウスの神経学的評価は、上記15項目のスコア値の合計点(0-45点)を用いて行った。

(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. 検査法の再現性検討

同一マウスにおいて上記の神経学的検査を連続3日間測定した。その結果、評価スコアに大きな変動はなく、検査の再現性が証明された。

#### 2. WT、TG、KO各マウスにおける雌雄差検討

各遺伝子型グループにおいて検査結果に雌雄差がないかどうかを検討した。生後3ヶ月齢のWTマウス4匹(オス2、メス2)、生後2ヶ月齢のTGマウス4匹(オス2、メス2)、生後3ヶ月齢のKOマウス12匹(オス6、メス6)について調べたところ、それぞれのグループにおいて雌雄差はなかった。この結果をもとに、以後のデータ処理はすべてオス、メスの検査データをまとめて処理した。

#### 3. 加齢に伴う検査スコアの変化

##### (1) WTマウス

検査例は少数であったが、生後3-5ヶ月齢のWTマウスにおいて、全検査15項目のスコア値合計の平均点は2.4-3.2の範囲となった。

##### (2) TGマウス

生後2-4ヶ月齢のTGマウスでのスコア合計の平均点は3.0-4.9であったが、月齢が進むにつれて増加し、平均合計スコアが生後6ヶ月で10.6、生後9ヶ月で14.1、生後12ヶ月で18.4となった。特に生後4-6ヶ月で歩行障害、尾の挙上形態、協

調平衡運動、後肢振戦が増加した。その後、7-9ヶ月で躯幹部振戦、踏み抜き、立ち直り反射、パラシュート反射の異常が大きくなった。

##### (3) KOマウス

生後2-4ヶ月齢のKOマウスでのスコア合計の平均点は4.0-6.6であった。合計点は月齢が進むにつれて顕著に増加し、6ヶ月齢で18.8、7ヶ月齢で23.0、9ヶ月齢では27.8となった。特に初期から歩行時動揺度が大きく、尾の挙上形態、逃避反応に異常を示した。また、4-6ヶ月で歩行、踏み抜き、しがみつ、協調平衡運動でのスコア値増加が目立った。

##### (4) WTマウス、TGマウス、KOマウスでのスコア値の比較

WTマウスでは3-5ヶ月齢の2ヶ月間においてスコア値にほとんど変化を認めなかった。TG、KO2群間で比較すると、生後4ヶ月齢では2群間に大きな差は認めなかったが、6ヶ月齢のKOマウスのスコア値は12ヶ月齢TGマウスのスコア値とほぼ同じになった。

### D. 考察

今回の研究では、検査対象としてのWTマウスの観察月齢期間が短かったので、生理的な変動については、今後さらに長期間の検討が必要である。特に視覚・迷路機能に依存する検査項目は老化との関係が問題となる。

2種の遺伝子操作モデルマウスの中で、軽症型のTGマウスは2-12ヶ月の期間で検討した。その間、生後6-7ヶ月頃に自発運動機能がピークとなり、いわゆる発症時期以降、姿勢制御関連の項目に異常が目立つようになった。自発性も徐々に低下するようである。身体や四肢の振戦、前肢後肢や脊髄の形態、姿勢肢位は生後12ヶ月でも重症化の傾向は示さなかった。12ヶ月以降の検討が今後必要である。重症型のKOマウスもいわゆる発症時期を境にして著しいスコア値の上昇を示した。ふらつきながらも生後6ヶ月で自発運動は可能であった。KOマウス、TGマウスの2群を比較すると、生後4ヶ月齢では2群間に大きな差は認めなかったが、6ヶ月齢のKOマウスのスコア値は12ヶ月

齢 TG マウスのスコア値とほぼ同じになった。TG マウスの臨床経過が KO マウスの経過のほぼ2倍というこれまでの観察結果とよく一致する結果となった。

#### E. 結論

G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスにおいて神経学的評価を行った。予備的な分析段階ではあるが、個別的項目と総合スコア値から各マウス個体の中枢神経障害の程度をかなり正確に評価しうることが示された。

#### F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 一ノ宮悟史, 渡辺浩史, 松田潤一郎, 丸山貴美子, 戸田寛子, 岩崎裕之, 黒澤美枝子, 飯田真己, 小川誠一郎, 鈴木義之: 遺伝子組換え G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48

回日本先天代謝異常学会, 熊本, 11. 16-18, 2005.

2. 鈴木義之, 渡辺浩, 岩崎博之, 一ノ宮悟史, 丸山貴美子, 戸田寛子, 黒澤美枝子, 松田潤一郎, 飯田真己: G<sub>MI</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発. 第22回日本疾患モデル学会, 伊香保, 11. 24-25, 2005.
3. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered G<sub>MI</sub>-gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol, England, 1.18-20, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 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  $\beta$  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。平成 16 年度、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【Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004】。昨年度はゴーシェ病患者細胞をスクリーニングし、F213I 以外にも 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。培養細胞レベルで複数の変異  $\beta$  グルコシダーゼを活性化することが明らかになり、個体での有効性の検討が緊急の課題である。この目的のため米国ジャクソン研究所から  $\beta$  グルコシダーゼノックアウトマウス( $\beta$ -GluKO)を購入して維持している。このマウスのホモは 48 時間で死亡する。F213I 変異を持つ  $\beta$  グルコシダーゼを導入したトランスジェニックマウスを作成し、 $\beta$ -GluKO マウスに F213I 変異を持つマウスを作成することを課題として、F213I 変異を pGCC1 ベクターに組み込み、COS 細胞での発現を検討し、 $\beta$ -GluKO w / human F213I $\beta$ -Glu マウスの作成を準備している。

## 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  $\alpha$  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  $\alpha$  及び  $\beta$  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  $\beta$  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【Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004】。この類似体 (N-octyl- $\beta$ -valienamine, NOV) 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ドの蓄積の減少を確認した。NOV が個体での治療に有効かどうか検討するため、F213I 変異を導入したモデルマウスの作成が必須である。

## B. 研究方法

さらに NOV 添加により活性化される F213I と N188S 変異を持つヒト cDNA の 3' に Flag を標識し、pGCC1 ベクターに組み込み、COS 細胞に導入後、Flag を抗体とした免疫沈降で酵素蛋白を抽出し、NOV 存在下での細胞内局在の変動、酵素活性および蛋白量について検討した。

## C. 研究結果

これまで検討したゴーシェ病患者細胞の中で、最初に報告した F213I 変異を持つ患者細胞以外に、 $\beta$  グルコシダーゼ活性の上昇をみた患者細胞は N188S を持つ細胞であった。F213I および N188S 変異に Flag 標識した cDNA を導入した COS 細胞の細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降し、NOV 存在下で  $\beta$  グルコシダーゼ活性をみたところ、リコンビナントの酵素も活性が上昇することを確認した (図 1)。

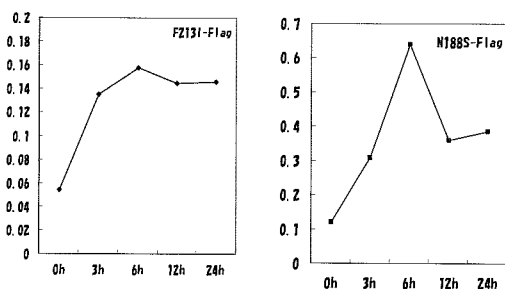


図 1 NOV 存在下での  $\beta$  グルコシダーゼ活性(nM/h) F213I (6 $\mu$ M NOV), N188S (3 $\mu$ M NOV)

ついで、導入した cDNA が作る蛋白質がライソゾームに局在するかどうか検討するため、COS 細胞に導入した変異  $\beta$  グルコシダーゼの局在を抗 Flag 抗体で検討した。

その結果、正常 cDNA 導入した場合も、変異 cDNA を導入した場合も、導入した蛋白質はライソゾームに移行しないことが明らかになった。

COS 細胞へ導入したヒト  $\beta$  グルコシダーゼ cDNA の作る蛋白は NOV 添加でもその局在は変わらなかった。また、宿主細胞を Hek293 に変えてもその局在は小胞体で、また cDNA の標識を Flag から Myc に変えてもその局在は変わらなかった。

## D. 考察

NOV によって活性が上昇する変異は F213I および

N188S 変異を持つ cDNA を培養細胞に導入し、発現した酵素蛋白質を免疫沈降法で分離して、酵素活性を見たところ、リコンビナントが作る変異蛋白質も NOV で活性化されることを明らかにした。

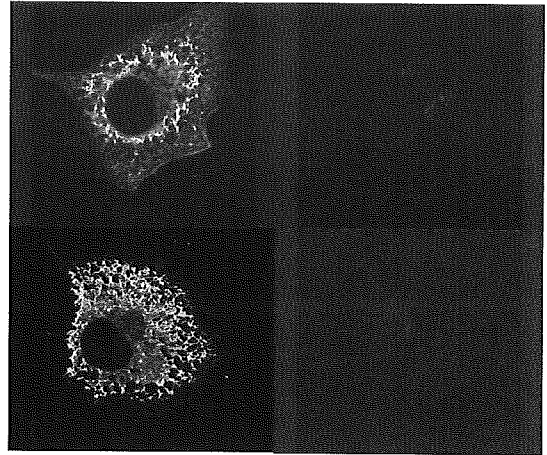


図 2 F213I-Flag- $\beta$ -glucosidase cDNA(上)と正常-Flag- $\beta$ -glucosidase cDNA 導入した COS 細胞の抗 Flag 抗体での染色(左)とライソトラッカー赤での染色(導入した Flag 標識酵素はライソゾーム以外に存在する)

しかし、そのリコンビナントが作る蛋白質はホストの細胞を変えても、小胞体にとどまり、ライソゾームへ移行しなかった。

このことは NOV が小胞体レベルで作用することを明らかにできたが、このリコンビナントを用いてトランスジェニックマウスを作成した場合うまく目的のマウスが作成できるかどうか疑問が残るが、いろいろ検討したにもかかわらず、この問題を解消することができず、このままのリコンビナントでトランスジェニックマウスを作成することとした。

## E. 結論

N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV) は F213I および N188S 変異を持つ患者細胞だけでなく、COS 細胞に導入した変異 cDNA も活性を上昇させることを明らかにした。また、NOV は小胞体レベルで作用することを明らかにした。

今後、これらの cDNA を導入、発現するマウスを作成する

**F. 研究発表**

論文発表

なし

学会発表

1. 雷 珂、侯 琳、井上岳彦、大野耕策：ゴーシェ病の分子シャペロン療法. 第 47 回日本小児神経学会総会、2005 年 5 月 19-21 日、熊本

**G. 知的所有権の取得状況**

なし

厚生労働科学研究費補助金  
分担研究報告書

## 日本人ゴーシェ病の臨床型と遺伝子相関

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科学教授

## 研究要旨

日本人ゴーシェ病の臨床表現型、遺伝子型、臨床型／遺伝子型相関及び酵素補充療法の効果を検討した。その結果、日本人ゴーシェ病では欧米人では認められない臨床表現型を有しており、特有な臨床型／遺伝子型相関を示していた。シャペロン療法が *in vitro* で有効とされている F213I 変異のホモ接合体において酵素補充療法は臓器症状及び血液学的所見に対しては有効であったが、神経症状に対しては効果がなかった。

## A. 研究目的

ゴーシェ病はグルコセレブロシダーゼ遺伝子変異に基づく酵素活性低下のため、グルコセレブロシドがマクロファージに蓄積することにより、肝脾腫、骨症状、貧血、血小板減少などを呈するリポドーシスである。神経症状の有無及びその重症度から 1 型(非神経型)、2 型(急性神経型)、3 型(亜急性神経型)に分類されている。この臨床的異質性は遺伝子変異により異なると考えられている。我々のグループは日本人ゴーシェ病の遺伝子変異分布が欧米とは異なることを明らかにし、また臨床症状も異なることを明らかにした。日本人ゴーシェ病の臨床症状の特徴、そして遺伝子型／臨床型の相関を明らかにすることは治療法を構築する上で極めて重要と考えられる。我々は今回の研究で日本人ゴーシェ病の臨床症状の特徴、代表的遺伝子型の臨床表現型、さらにシャペロン療法が *in vitro* で有効とされている F213I のホモ接合体の酵素補充療法の効果について検討したので報告する。

## B. 研究方法

臨床症状、グルコセレブロシダーゼ活性低下によりゴーシェ病と診断された日本人 105 例を対象とした。臨床症状の解析は各主治医へのアンケート調査に基づき、遺伝子変異解析は PCR 法と制限酵素切断法により行った。臨床症状のアンケート調査は個人情報保護法に従い、また遺伝子解析は本人の同意のもと(患者さんが小児の場合には両親の同意)を行い、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従った。

## C. 研究結果

## 1) 日本人ゴーシェ病の臨床型

初診時の病型分析では 1 型は 69 例 (65.7%)、2 型は 19 例 (18.1%)、3 型は 17 例 (16.2%) であった。ユダヤ人 177 例の検討では 1 型が 173 例 (98%) を占めると報告されており、我が国では神経型ゴーシェ病の頻度が高かった。

## 2) 経過フォローアップによる臨床型の変化

平均 16 年 9 ヶ月 (最短: 2 年 1 ヶ月、最長: 40 年) の経過フォローアップにより 1 型は 54 例 (51.4%) に減少したのに対して、3 型は 31 例 (29.5%) に増加していた。すなわち 1 型→3 型の移行例が 14 例存在した。

## 3) 日本人ゴーシェ病の代表的な遺伝子型の病型

日本人ゴーシェ病 192 アレルの分析で頻度の高い変異は L444P (36.5%)、F213I (17.2%)、D409H (5.2%) であった。従って日本人の代表的な遺伝子型は L444P/L444P 15 例、F213I/F213I 4 例、L444P/F213I 10 例、D409H/× 8 例であった。L444P のホモ接合体では骨合併症と著明な脾腫を示す例がそれぞれ 60% と 53% と高値であった。神経型の頻度は 73% で全例 1 型→3 型の移行例であった。F213I のホモ接合体では全例神経型であり、著明な脾腫、痙攣、眼球運動失行を高率に呈していた。L444P/F213I の複合ヘテロ接合体では神経型の頻度は 70% で、骨合併症、著明な脾腫、眼球運動失行を高率に呈していた。また、成人例 2 例においてパーキンソン病を合併していた。D409H/× では全例、初診時より神経型