

Fig 4. Globotriaosylceramide (GL-3) concentration in urine from healthy controls, and hemizygotes and heterozygotes with classic, cardiac variant and renal variant Fabry disease.

n: Number of samples in each group.

Bars inside boxes indicate the median values for each group.

Shaded areas indicate the 25 th and 75 th percentiles of each group.

Error bars indicate the limits of the range.

● indicate the mean values.

----- indicate the 95 th percentile value of the control group.

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特異抗体を利用したファブリー病の診断法開発

分担研究者 桜庭 均 (財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所
参事研究員
研究協力者 小谷政晴 奥羽大学薬学部・助教授

研究要旨

組み換え α -ガラクトシダーゼを抗原として、そのポリペプチド部分を認識するモノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay 法により、培養リンパ芽球中の α -ガラクトシダーゼ蛋白質を解析した所、正常者由来の細胞中の同酵素蛋白質は検出されたが、ファブリー病男性患者由来の細胞中の同酵素蛋白質は検出感度以下であった。本抗体は、ファブリー病の診断や病態研究のための免疫学的プローブとして有用と考えられる。

A. 研究目的

ファブリー病は、リソソーム酵素のひとつである α -ガラクトシダーゼの活性低下により、その基質であるグロボトリアシルセラミドが腎臓や心臓および血管系に蓄積する遺伝病である。本症においては、遺伝形式が X 染色体性であることから、主にファブリー病ヘミ接合体である男性で症状が顕現し、その発生頻度は男性 4 万人に 1 人程度であると考えられて来た。しかし、典型的な臨床像を示す早期発症で重症の「古典型」ファブリー病患者群の他に、晩期発症で軽症の「亜型」ファブリー病患者群が存在することが明らかになり、治療が必要なファブリー病患者の数は、これまでに推測されていたよりも、かなり多いと考えられる。

2004 年から、ファブリー病に対する組み換え α -ガラクトシダーゼ薬が承認され、これを用いた酵素補充療法が導入された。本治療法は、フ

ャブリー病に対して有効であるが、すでに重度の腎障害や心障害を起こしたファブリー病患者に対しては明らかな臨床効果を示さないため、早期に正確な診断を下して、患者が腎不全や心不全に至る前に治療を開始することが重要となる。

今年度は、ファブリー病の診断や病態解明のための研究に役立てるため、 α -ガラクトシダーゼを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、その評価を行った。

B. 研究方法

a) α -ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体の作製

組み換えヒト α -ガラクトシダーゼを抗原として、Balb/c マウスに免疫した。その後、免疫マウスの膝下リンパ節を採取してリンパ球浮遊液を調整し、そのリンパ球とマウスミエローマ

細胞とを融合した。このハイブリドーマの培養液を試料として、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で抗体産生の有無の確認を行った。抗体のイムノグロブリン (Ig) クラスの同定は、マウスイムノグロブリン・アイソタイプキット (Amersham) を用いて行った。抗 α -ガラクトシダーゼ抗体が、 α -ガラクトシダーゼ分子のうち、ポリペプチド部分と糖鎖部分のうちのいずれを認識するかを調べるため、未処理 α -ガラクトシダーゼまたは NaIO_4 処理 α -ガラクトシダーゼと抗体との反応性について解析を行った。

b) 抗 α -ガラクトシダーゼを用いたヒトリンパ芽球中の α -ガラクトシダーゼ蛋白質の検出

正常者および既に行った解析により α -ガラクトシダーゼ蛋白質の量が減少していると考えられるファブリー病男性患者由来の培養リンパ芽球の細胞破碎液を調整して、これを試料とした。この試料を、ELISA プレート (Immulon 2HB, Thermo Labosystem) に対して $25 \mu\text{g}/\text{well}$ の濃度で入れて、 4°C で一晚静置した。その後、プレートを 1%ウシ血清アルブミン/リン酸緩衝液 (BSA/PBS) で 5 回洗浄し、1%BSA/PBS を $200 \mu\text{l}/\text{well}$ 加えて、30 分間静置した。1%BSA/PBS を除去した後に、抗 α -ガラクトシダーゼ抗体 (ハイブリドーマ培養上清) を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 加えて、室温で 45 分間静置した。その後、1%BSA/PBS で 5 回洗浄し、1%BSA/PBS で 2,500 倍に希釈した Peroxidase conjugated anti-mouse IgG F(ab')₂ (Jackson Immuno Research) を $150 \mu\text{l}/\text{well}$ 加えて、室温で 45 分間反応させた。反応終了後に、プレートを 1%BSA/PBS で 5 回洗浄した。その後、Peroxidase 基質液を $150 \mu\text{l}/\text{well}$ 加えて、暗所で 15 分間反応させた。反応終了後、波長 405nm

に設定した ELISA リーダーで吸光度を測定した。(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、当研究所の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

a) 抗 α -ガラクトシダーゼ抗体の性状

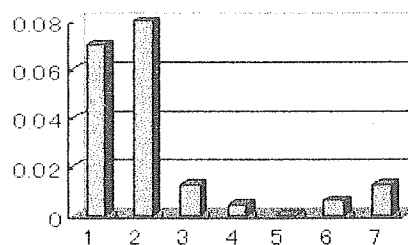
本研究で作製した α -ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体のアイソフォームは、IgG2b であった。また、本抗体は、 NaIO_4 処理の α -ガラクトシダーゼと NaIO_4 未処理の α -ガラクトシダーゼの両方と反応することから、糖鎖部分ではなく、ポリペプチド部分を認識すると考えられた。

b) 抗 α -ガラクトシダーゼ抗体を用いた ELISA 法による培養リンパ芽球中の α -ガラクトシダーゼ蛋白質の検出

α -ガラクトシダーゼ抗体を用いた ELISA 法により、正常者およびファブリー病男性患者由来の培養リンパ芽球中の α -ガラクトシダーゼの解析を行った。正常者由来の細胞においては α -ガラクトシダーゼが検出されたが、ファブリー病男性患者由来の細胞では検出限界以下であり、両者間の区別が可能であった (図)。

ELISA法による培養リンパ芽球中の α -galactosidase蛋白質の測定

405 nmでの吸収率



No. 1, 2: 正常対照、No. 3-7: Fabry病ヘミ接合体男性患者

D. 考察

本研究において作製した抗 α -ガラクトシダーゼ抗体は、 α -ガラクトシダーゼを認識し、正常者由来の培養リンパ芽球中の本酵素蛋白質をELISA法で検出した。一方、ファブリー病男性患者由来の細胞中の酵素蛋白質は検出されず、両者を区別することが可能であった。これまでの研究によると、ファブリー病の病因となる遺伝子変異の種類は多様であるが、酵素蛋白質の量に関しては、多くのファブリー病患者において減少していると考えられ、今後、検出感度を増すことによって、臨床試料を用いたファブリー病の早期診断法が開発できる可能性がある。本抗体は、そのための免疫学的プローブとして有用と考えられた。

E. 結論

α -ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体を作製した。この抗体は、 α -ガラクトシダーゼのポリペプチド部分を認識すると考えられた。この抗体を用いたELISA法で培養リンパ芽球中の α -ガラクトシダーゼを解析した所、正常者由来の細胞では本酵素蛋白質が検出されたが、この蛋白質が減少していると考えられるファブリー病男性患者由来の細胞では検出感度以下であり、両群を区別することが可能であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Okumiya, T., and Sakuraba, H. : Fabry

disease : Correlation between structural changes in alpha-galactosidase and clinical and biochemical phenotypes. *Hum. Genet.*, 117, 317-328, 2005

- 2) Kanekura, T., Fukushige, T., Kanda, A., Tsuyama, S., Murata, F., Sakuraba, H., and Kanzaki, T. : Immunoelectron microscopic detection of globotriaosylceramide accumulated in the skin of patients with Fabry disease. *Br. J. Dermatol.*, 153, 544-548, 2005
- 3) Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., Tajima, Y., Kotani, M., Ohshima, T., Chiba, Y., Takashiba, M., Jigami, Y., Fukushige, T., Kanzaki, T., and Itoh, K. : Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J. Hum. Genet.*, in press

2. 学会発表

- 1) 桜庭 均 : 遺伝病の分子病態解明と治療法開発に向かって-ファブリー病をモデルとして. 2005年トップフォーラム「生命科学・ゲノム科学からみた医学とオーダーメイド医療」、2005, 3. 5, 東京
- 2) 桜庭 均 : ファブリー病の病態と治療. 第41回東京腎生検カンファランス、2005, 3. 11, 東京
- 3) 桜庭 均 : ファブリー病の分子病態解明と治療法開発. Cell Biology Summer Meeting、2005, 7. 15, 熱海
- 4) 桜庭 均 : ファブリー病の病態解明そして治療へ. 順天堂大学附属順天堂医院腎・高

血圧内科セミナー、2005, 7. 21, 東京

- 5) 桜庭 均 : 先天代謝異常症の分子病態解明と治療法開発. 神奈川技術アカデミー、2005, 11. 1, 東京
- 6) 桜庭 均、村田真以、川島育夫、田島陽一、小谷政晴、千葉靖典、高柴みな子、地神芳文、福重智子、神崎 保 : ファブリー病患者線維芽細胞及びファブリー病マウスに対するアガルシダーゼ・アルファとベータの効果の比較. 第48回日本先天代謝異常学会, 2005, 11. 16-18, 熊本

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 (難治性疾患克服研究事業)

(分担) 研究報告書

DNAマイクロアレイを応用したリシークエンシングを用いたglucocerebrosidase遺伝子解析システムに関する研究

(分担) 研究者 辻 省次 東京大学医学部附属病院 神経内科

(共同研究者) 高橋 祐二, 後藤 順 東京大学医学部附属病院 神経内科

研究要旨

Gaucher病の原因遺伝子であるglucocerebrosidase遺伝子(GBA)の変異が, 日本人においてパーキンソン病の発症リスクとなりうるかどうかを検討するために, DNAマイクロアレイを応用したリシークエンシングシステムを用いて, GBAの変異解析をハイスループットに行うシステムを開発した. GBAと, 配列の類似する偽遺伝子との配列を比較して, GBA特異的なプライマーをデザインし, GBAの全エクソンの特異的増幅を行った. 実際にゲノムDNAを解析し, 塩基配列の判定精度は, 1930塩基中1929塩基 (99.9%以上) であった. 本システムはGBAのハイスループットな遺伝子解析に有用なシステムである. 今後パーキンソン病におけるGBA遺伝子の包括的な解析により, 疾患との関連を解明する研究を推進していく.

A.研究目的

Gaucher病の原因遺伝子であるglucocerebrosidase遺伝子(GBA)の変異が, パーキンソン病の発症リスクとなっていることが示唆されている. 日本人においてもこれがパーキンソン病の発症リスクとなっているかどうかを明らかにするためには, パーキンソン病におけるGBA変異キャリアの頻度を明らかにする必要があると考えられる. このような背景から, 我々はDNAマイクロアレイを応用したリシークエンシングシステムを用いて, GBAの変異解析をハイスループットに行うシステムを構築した.

B.研究方法

GBAには構造, 配列の極めて類似した偽遺伝子が存在する. GBAと偽遺伝子の配列を比較して, GBA特異的な増幅が可能なPCRプライマーをデザインした. また, GBAの全エクソン及び周辺のイントロン配列を含んだDNAマイクロアレイをデザインした. 実際にゲノムDNAを増幅してマイクロアレイに対してハイブリダイゼーションを行い, 塩基配列の精度を検証した. なお, 本研究は, 本学の倫理委員会において承認を得ている.

C.研究成果

デザインしたプライマーを用いて, GBA全エクソンの特異的増幅が可能であった. ま

た、実際のマイクロアレイの解析は実働3
日で終了し、塩基配列の判定精度に関して
は、1930塩基中1929塩基（99.9%以上）の
配列の判定が可能であった

Academy of Neurology

H.知的財産権の出願，登録状況
なし。

D.考察

DNAマイクロアレイを用いたリシーケン
シングシステムは、変異及び多型の検出に
も極めて有用であることがこれまでの検討
にて示されている。今後本システムを用い
て、パーキンソン病患者における変異を探
索し、発症リスクに関連するかどうかを明
らかにする研究を推進する。

E.結論

DNAマイクロアレイを応用したリシーケン
シングシステムは、GBAのハイスループ
ットな遺伝子解析に有用なシステムである。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi, Y. Goto, J. Tsuji, S.

Application of DNA microarray-based high
throughput gene analysis system for molecular
diagnosis.

Tanpakushitsu Kakusan Koso (50(16 Suppl))
pp 2115-2121, 2005

2. 学会発表

1. Development of DNA microarray-based
high throughput gene analysis system for
neurodegenerative diseases.

57th Annual Meeting of the American

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ライソゾーム病（ファブリー病含む）研究班

分担研究報告書

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者	島田 隆	日本医科大学生化学第二講座教授
研究協力者	久安 早苗	日本医科大学生化学第二講座
	倉井 年幸	日本医科大学生化学第二講座

研究要旨

ArylsulfataseA(ASA)欠損症である異染性白質ジストロフィー（**MLD**）をモデルとして、遺伝性神経変性疾患の細胞遺伝子治療の可能性について検討している。リソゾーム酵素は、その一部が細胞外に分泌され、他の細胞に取り込まれる **Cross-correction** という現象が知られており、この特性を利用した治療法の開発を目指している。これまでの研究で、培養細胞やマウス肝臓での **ASA** の発現には **sulfatase** の活性化酵素である **FGE(Formyl-glycin generating enzyme)**の同時発現が重要であることを報告してきた。今回は **ASA** と **FGE** を発現する **AAV** タイプ1ベクターを作製し、ウイルスベクターの直接脳内投与法の有用性を検討した。生後 8 ヶ月の **MLD** マウスの脳に定位脳手術により **AAV** 1ベクターを海馬 **CA3** 領域に導入した。導入 5 ヶ月後の解析では注入部位を中心に、**CA3** 領域や反対側の海馬においても **ASA** の発現が確認された。また、明らかなスルファチドの減少が導入側のみならず反対側でも認められた。**FGE** の共発現により更なる **ASA** の上昇、スルファチドの減少が確認された。ロタロッド試験においても有意な運動機能の改善が示された。

A. 研究目的

MLD のモデルマウス（**ASA** ノックアウトマウス）を対象として、**AAV** ベクターの脳内直接投与による遺伝子治療による神経変性疾患の治療法の開発を目指す。また、**ASA** と **FGE** の共発現による治療効果の増強効果を動物実験により確認する。

B. 研究方法

AAV ベクターはベクタープラスミド、**AAV1** パッケージングプラスミド、ヘルパープラスミドの **HEK293** 細胞にたいするトリプルトランスフェクションにより作製した。細胞ライセートに含まれるベクターを、硫酸分画及び **Iodexanol** 連続勾配遠心法、**Microcon** により精製濃縮した。感染力価は抽出した **DNA** スロット

プロットにより測定した。

AAV ベクターはハミルトンシリンジを使って麻酔下の **MLD** マウスの海馬部位に定位脳手術手技により注入した。

ASA 酵素活性は **p-nitrocatechol** 法により測定した。スルファチドの定量は **Folch** 法により抽出した脂質を **TLC** により分離同定して行った。脳内でのスルファチドの分布は **Alcian blue** 染色により解析した。行動機能はロタロッドテストにより評価した。

C. 研究結果

作製した **AAV** ベクター **AAV1-ASA** の有効性を調べるため、**in vitro** において **HeLa** 細胞にトランスダクションし、酵素活性を測定した。細胞内、細胞外共に酵素活性の上昇を認め、さらに **AAV1-FGE** を同時に投与したものでは単独投与に比べ細胞内では約 2、3 倍、細胞外では約

5 倍の酵素活性の上昇を認め FGE の活性化効果を確認した。

次に *in vivo* の実験において、AAV1-ASA 単独、または、AAV1-ASA+AAV1-FGE を、生後 8 ヶ月の MLD マウスの右の海馬 CA3 領域に注入した。注入後 7 ヶ月に ASA 酵素活性、組織染色、スルファチドの定量、行動実験などで分析した。AAV1-ASA 単独の注入では導入側における酵素活性を増加と非導入側において ASA のわずかな酵素活性の増加を示した。AAV1-ASA 及び AAV1-FGE の同時導入では、導入側および非導入側においても酵素活性を著しく増加した。ASA 蛋白の広範囲にわたる分布は、抗 ASA 抗体を用いて免疫組織学分析によって確認された。スルファチドを特異的に染色する Alcian Blue 染色、及び TLC 分析によりスルファチドの定量を行った。注入された半球におけるスルファチドが AAV1-ASA 注入後導入側では減少することを確認した。AAV1-ASA と AAV1-FGE を同時に導入したとき、導入側のみならず脳全体におけるスルファチドの減少が観察された。ロタロッドテスト、及び、歩行パターンによる行動機能の評価では、治療マウスでの有意な改善が認められた。これらの結果は AAV1 ベクターにより脳内で ASA が長期に発現分泌し、広い範囲のスルファチドの蓄積を減少させたことを示している。これらの治療効果は FGE の同時発現により顕著に増強されており、FGE の MLD 遺伝子治療での重要性が確認された。

D. 考察

リゾゾーム酵素は M6P レセプターを介して細胞外に分泌されたり、細胞内へ取り込まれたりすることが知られている。この現象は **cross-correction** と呼ばれ、リゾゾーム病の酵素補充療法や遺伝子治療の理論的根拠となっている。我々は、この性質を利用して筋肉内で発現させた α -galactosidase によりファブリー病モデルマウスの脳以外の全身に蓄積した糖脂質を取り除くことに成功した。しかし、糖脂質が脳神経系に蓄積するある種のリゾゾーム病では脳血液関門に阻まれて

cross-correction による全身性の治療は困難である。欠損酵素を脳内で発現させるためには①ウイルスベクターの直接脳内投与、②遺伝子導入した組織幹細胞の脳内移植③造血幹細胞遺伝子治療等の方法が必要であると考えられる。本実験では AAV ベクターを使って、①の直接ベクター投与方法の有用性を検証した。

ベクターの脳内直接投与方法の問題点の一つは、脳全体にベクターを導入することが困難な点であると考えられている。ところが我々の実験では片側の海馬に一カ所ベクターを注入しただけなのに 7 ヶ月後の脳組織では注入部位の周囲のみならず、反対側の対側半球や小脳にまで酵素活性が認められている。この実験結果及び GFP 遺伝子を使った予備実験の結果からは海馬に注入された AAV1 ベクターは反対側の海馬も含めた幅広い領域に分布していることが明らかになった。また、ASA 活性及びスルファチドの Alcian blue 染色の結果は、ASA 酵素が極めて広い範囲にまで分布し、スルファチドの減少に着よしていることを示している。この結果はヒトの治療においても比較的少ない部位へのベクター注入により効果が認められる可能性を示唆している。

この実験では MLD の遺伝子治療での FGE の共発現の重要性が確認された。FGE(formylglycine generating enzyme)とその遺伝子 SUMF1 (sulfatase modifying factor)は最近、2つのグループの異なるアプローチによって同定された。FGE は ASA を含む多くのスルファターゼの活性化に必須の修飾を担当する小胞体局在酵素である。正常下ではスルファターゼを活性化するのに十分量の FGE が恒常的に発現しているはずである。しかし、組換えスルファターゼを過剰発現させる時、しかるべき量の FGE もまた発現させる必要があると考えられる。我々は以前に培養細胞の実験及び肝臓での発現実験により FGE の重要性を報告した。本実験では MLD モデルマウスの脳内でも FGE の共発現が有効性の影響することを初めて明らかにした。

E. 結論

AAV 1 ベクターは MLD などの神経変性を伴う先天性代謝異常症の遺伝子治療に有用である。スルファターゼの活性化酵素 FGE の共発現は、ASA の大量発現を必要とする MLD の遺伝子治療のための重要な因子である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. Inagaki, S., Migita, M., Hayakawa, M., Yoshida, J., Ishizaki, M., Kotani, M., Sakuraba, H., Shimada, T., Murakami, M., Fukunaga, Y. (2005) An asymptomatic heterozygous female with Fabry disease: implications for enzyme replacement therapy. *J. Nippon Med. Sch.* 72: 387-390
2. Kato, K., Miyake, K., Igarashi, T., Yoshino, S., Shimada, T. (2005) HIV vector mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* 25: 522-529
3. Takakusaki, Y., Hisayasu, S., Hirai, Y., Shimada, T. (2005) Co-expression of FGE is essential for synthesis and secretion of functional arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Gene Ther.* 16: 1-8
4. Hayakawa, M., Ishizaki, M., Hayakawa, J., Migita, M., Murakami, M., Shimada, T., Fukunaga, Y. (2005) Role of bone marrow cells in the healing process of mouse experimental glomerulonephritis. *Ped. Research* 58:323-328
5. Miyake, K., Inokuchi, K., Miyake, N., Dan, K., Shimada, T., (2005) Antiangiogenic gene therapy of myeloproliferative disease developed in transgenic mice expressing P230 ber/abl. *Gene Ther.* 12: 541-545
6. Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Kusumi, N., Tamayose, K., Nasu, Y.,

Nagai, A., Shimada, T., Daida, H., Kumon, H. (2005) Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12: 1126-1132

7. Takahashi, H., Kato, K., Miyake, K., Yoshino, S., Shimada, T. (2005) Adeno-associated virus vector-mediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23:7-12

ムコ多糖症の診断と治療の改良に関する研究

分担研究者 国立成育医療センター 遺伝診療科 奥山 虎之

研究要旨：ニューロスフェア法にて作成した神経幹細胞を、生後早期の MPSVII マウスの脳室内に同系移植し、組織学的、機能的治療効果を評価し、将来のムコ多糖症中枢神経系合併症に対する細胞治療の可能性を検討した。神経幹細胞は受精後 14.5 日目の胎仔マウス線状体からニューロスフェア法を用いて作成し、生直後の MPSVII マウスの脳室内に 1×10^5 移植した。移植後 24 時間時に正常マウス脳の 12.5～42.3%、3 週間時には 5.5～6.3% の GUSB 活性を認めた。これは文献上脳の病理所見を改善させるに足る酵素量であった。2 ヶ月時に、海馬、大脳皮質、上衣細胞において、細胞質内の著名な空胞（ライソゾームの腫大）の減少を観察した (n=2)。同じく移植後 2 ヶ月時の非空間的海馬機能評価法である novel object test (n=3) において、治療後マウスの探索時間、探索嗜好の両方において有意な海馬機能の改善が示された。ムコ多糖症の中枢神経病変に対する治療法は、今なお重要なテーマである。今回我々は、同系胎仔マウス脳から作成した神経幹細胞を生直後のマウスの脳室内に移植することにより、移植後 2 ヶ月時における脳の病理所見、海馬機能の改善を示すことに成功した。

A. 研究目的

ムコ多糖症 VII 型 (Mucopolysaccharidosis type VII: 以下、MPSVII と略す) はライソゾーム酵素の β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase: 以下、GUSB と略す) が欠損しているため、全身のライソゾーム内に GUSB の基質であるムコ多糖が過剰蓄積し、中枢神経系を含む多臓器に障害をきたす疾患である。本研究の目的は、ニューロスフェア法で作成した神経幹細胞を、生後早期の MPSVII マウスの脳室内に同系移植する実験を通し、組織学的、機能的な治療効果の検討を行い、将来のムコ多糖症の中枢神経系合併症への細胞治療の可能性を探ることである。

B. 研究方法

1. 神経幹細胞の作成

神経幹細胞はニューロスフェア法で作成した。受精後 14.5 日目の胎仔 GFP マウス線状体を EGF、FGF を加えた無血清培地で培養し、第 2 継代から第 5 継代までのものを実験に使用した。

2. GUSB の定量、GUSB 染色

GUSB は、 4μ 法で測定した。GUSB 染色すなわち、組織切片中の GUSB の検出には、ナフトール AS-BI-D-グルクロナイドを器質として使用した。

3. 組織学的検討

脳の切片は、2 ヶ月時にトルイジンブルー染色

を行い、海馬、皮質、上衣細胞中の空胞（ライソゾームの腫大）の程度を評価した。皮質に関しては、電子顕微鏡においても評価を行った (n=2)。

4. 脳機能評価

移植後 2 ヶ月時に、聴性脳幹反応 (auditory brain stem responses: 以下、ABR と略す) (n=3) と novel object test を行った。novel object test は、非空間的海馬機能の評価法で、マウスを黒い箱の中の環境に慣れさせた後、第 4 日目に玩具 (A、B) を入れた箱にマウスを入れ、玩具への鼻でつつく等の探索行動の時間を計測する。第 5 日目に玩具 (B) を別の玩具に取替え (C)、同様の実験を行う。治療後、非治療 MPSVII マウス、正常 C57Bl/6 マウス (各 n=3) に関し、総探索時間と探索嗜好 (=第 5 日目の C の探索割合/第 4 日目の B の探索割合) を算出した。

C. 研究結果および D. 考察

1. 神経幹細胞の GUSB 活性

神経幹細胞の GUSB 活性は 840.3 U/mg protein と高いことが明らかとなった (正常 C57Bl/6 マウス脳 28.1 U/mg protein)。神経幹細胞は分化後、GUSB 活性値が 8 分の 1 程度に減少するが、それでも骨髄由来細胞の GUSB 活性と同程度であった。一方、培養上清でも同様の傾向が認められた。

2. クロスコレクション

細胞外の GUSB は、主に細胞膜に表出するマ

ンノース 6・リン酸受容体（以下、M6P 受容体と略す）を介して細胞内に取り込まれる（クロソコレーション）。そこで、*in vitro* 神経細胞において、GUSB の輸送に M6P 受容体が関与するかを検討するため、C57Bl/6 マウス由来の GUSB（熱安定 GUSB）と C3H マウス由来の GUSB（熱不安定 GUSB）は熱安定性に相違があることに着目し、以下の実験を行った。C3H マウス神経細胞の培養液を、神経幹細胞（C57Bl/6 マウス由来）の培養に用いたもの（培養後 1 週）に入れ替え、10mM の M6P 存在下、非存在下で培養を継続し、12 時間後に回収し、C3H マウス神経細胞に取り込まれた神経幹細胞由来の GUSB 活性を測定し、その取り込み率（=神経細胞に取り込まれた熱安定 GUSB/培養上清中の全熱安定 GUSB）を両者で比較した。M6P 非存在下では全培養上清中の GUSB の 21.9%、存在下では 11.8%が神経細胞に取り込まれ、M6P によって細胞内への GUSB の取り込みが阻害されたことが明らかとなり、神経系の細胞においても、GUSB の輸送に M6P 受容体が関与することが示された。

3. 移植

GFP マウスから作成した神経幹細胞 1×10^5 を、生直後の MPSVII マウスの脳室内に移植し、移植後 24 時間時・3 週間時に、脳の GUSB 活性値を定量した (Figure 2)。移植後 24 時間時には正常 C57Bl/6 マウス脳の 12.5~42.3%、3 週間時には 5.5~6.3%であった。これは文献上脳の病理所見を改善させるに足る酵素量であった。

4. 組織学的検討

移植後 2 ヶ月時に、移植後、非移植マウスの各々の脳(n=2)をトルイジンブルー染色し、海馬、脳実質、上衣細胞を、光学顕微鏡 (Figure 3) と電子顕微鏡（皮質のみ, Figure 4）で比較したところ、これら 3 領域で、著名な空胞（ライソゾームの腫大）の減少を観察した。さらに定量的に評価するため、各々の部位で（各 300 細胞）、ライソゾーム腫大が著しい細胞の数を算出し、移植、非移植マウス間で比較したところ (Table 2)、未治療マウスでは、海馬と皮質の 89.3%、42%の細胞に著しい空胞が観察されたのに対し、治療後マウスでは 17.3%、15.3%にまで減少していた。

5. 機能評価

ABR では、治療、非治療マウス間で有意な差を認めなかった。若年期には伝音性難聴の比重が大きいためと判断した。novel object test においては、治療後マウスの探索時間、探索嗜好の両方において有意な海馬機能の改善が示された。

E. 結論

今回我々は、ニューロスフェア法で作成した神経幹細胞を生直後の MPSVII マウスの脳室内に移植し、移植後 2 ヶ月時に、脳の病理所見、海馬機能の改善を示すことに成功した。本治療の長期的治療効果の評価、倫理面での是非の問題など実際の臨床応用には解決すべき問題が多いが、神経幹細胞を移植しムコ多糖症の脳機能の改善を示した世界で最初の報告であり、ムコ多糖症の中核神経病変の治療の開発の第一歩となったと思われる。

F. 健康危険情報

C. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, and Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells. *Molecular Therapy*. (in press)

2. 学会発表

(1) 福原康之, 李小康, 小須賀基通, 小崎里華, 島崎琢也, 岡野栄之, 奥山虎之
ムコ多糖症 VII 型マウスに対する神経幹細胞脳室内投与治療

ドナー細胞の脳内分布と組織所見の考察

第 4 回日本再生医療学会、平成 17 年 3 月 1 日、大阪国際会議場

(2) 福原康之, 李小康, 小須賀基通, 小崎里華, 島崎琢也, 岡野栄之, 奥山虎之

神経幹細胞脳内移植による MPSVII マウスの脳組織所見・行動の改善

第 11 回日本ライソゾーム病研究会、平成 17 年 12 月 2 日、東京

D. 知的財産権の出願・登録

本年度は特に予定していない。

平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

（分担）研究報告書

レンチウイルスベクターを用いた Krabbe 病に対する遺伝子治療の基礎的研究

分担研究者：衛藤義勝（東京慈恵会医科大学小児科学教授）

研究協力者：小林博司（東京慈恵会医科大学小児科学助手）

森田麻子（東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所）

研究要旨

Krabbe 病は galactocerebrosidase (GALC) 欠損により中枢・末梢神経系に代謝産物が蓄積し進行性に神経症状を呈する致死的疾患であるが、今回組換えレンチウイルスベクターシステムを利用して欠損酵素を遺伝子導入し、*in vitro* では細胞株において MOI 依存性の発現を見た。また *in vivo* としてモデルマウス (Twitcher mouse) を用いて新生児静脈注射したところ、注射後 1 週間で肝臓の有意な酵素活性の上昇は見られたが、脳での十分な上昇は見られなかった。

A. 研究目的

本研究では脳をはじめとする多臓器の広範な病変を有する疾患、特に遺伝性酵素欠損症の一つであるライソゾーム蓄積症を研究対象とする。この疾患群では細胞内小器官であるライソゾームに存在する酵素の遺伝的欠損により様々な細胞にその基質が蓄積し細胞機能障害を引き起こし、多くの場合神経系にも異常蓄積が存在する。理論的には欠損酵素をコードする遺伝子を中枢神経を含む各臓器に導入することが重要な治療戦略となるが、特に中枢神経系への導入は血液脳関門の存在により大循環系

からのアプローチは困難とされる。このため最近ではマウスモデル脳への直接注射、マンニトールなどの前処置などの工夫が為されているが、広範な部位への遺伝子導入やその発現の持続においては解決すべき課題も多い。今回我々はライソゾーム蓄積症に対する遺伝子治療を含む治療法研究においてこれまで十分に解決されていないこれらの諸問題を検討し、我々の研究室で従来扱ってきた Twitcher (Krabbe disease) マウスモデルを用いて有効な遺伝子治療法を研究開発することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. ウイルスベクターの作製：

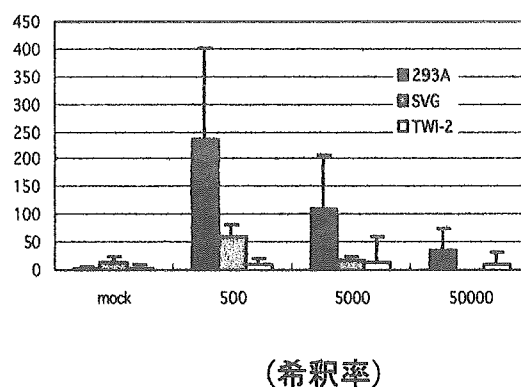
レンチウイルスベクター作製に必要なパッケージングプラスミド、エンベローププラスミド、ベクタープラスミドはロサンゼルス小児病院 Donald B. Kohn教授より供与を受けている。このうちベクタープラスミドはマーカー遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) 発現遺伝子が既に組み込まれており、他の一部を遺伝子組み換えにより、Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) の欠損酵素 galactocerebrosidase (GALC) をコードする遺伝子を挿入する。パッケージングプラスミド(8, 9) はHIV由来の副蛋白を大部分除去済みであり、安全性は高いと思われる。エンベローププラスミドは水疱性口内炎ウイルスG蛋白をコードしこれを発現させること(シュードタイプ化)で本来CD4陽性リンパ球にしか感染しないウイルスを体内のあらゆる臓器にユビキタスに感染させることが出来る。この3種類のプラスミドを293T細胞株を用いて co-transfection させることで相同組み換えを起こしプロウイルスを作製し、更に高速遠心、超遠心により濃縮精製する。次項図に今回作製するウイルスベクターのプロウイルスマップを示す。レトロウイルス由来のMNDプロモータ下流のXで示した領域に欠損酵素発現遺伝子を挿入する。また力価(タイトル)はマーカー遺伝子GFPの発現をFACSにて算出する。現在約 1.2×10^8 titration unit /mlの力価が得られている。

2. 細胞培養実験：

作製したベクターの機能発現を見

るため数種類の培養細胞株(293A, SVG, TWI-2)に希釈したウイルスベクターを感染させ、酵素活性(GALC)とマーカー遺伝子(GFP)の発現をチェックしたところ、MOI依存性に発現量の増加が見られた。

GALC活性(nmol/h/mg)

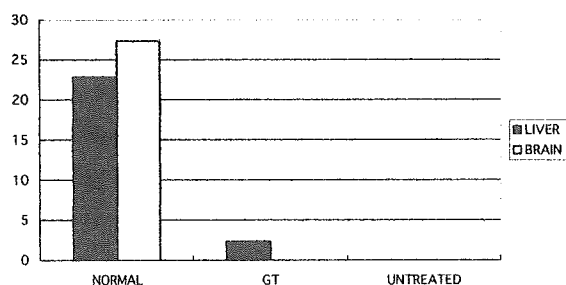


3. 動物実験

欠損酵素GALCを発現するレンチウイルスベクターは17年度に作製し*in vitro*で最も効率よく導入発現したクローンを用い、精製したウイルスを新生時期、日齢1-2に投与した。Twitcher マウスは常染色体劣性の遺伝形式をとるため25%のマウスが疾患モデル(homozygote)となるが、新生時期にはマーキングが困難なため全てのマウスに注射し、マーキングが容易な4週以降にマウス尾より抽出したDNAより遺伝子診断を行った。

新生児期に投与したマウスを1週齢でsacrificeし脳、肝における発現を見たところ肝臓では酵素活性の上昇が見られたが、脳(fullbrain)では十分な上昇は見られなかった。またTWITCHINGなどの症状発現時期および生存期間については投与・非投与群間で有意差は見られなかった。

GALC enzyme activity (nmol/h/mg)



C. 考案

我々は新生時期マウスにおいて出生直後の数日間血液脳関門が未熟であること、また新生時期は progenitor cell や hematopoietic stem cell への遺伝子導入機会が増えることに着目し出生直後のモデルマウスを対象に遺伝子治療を行った。ベクターは静止期細胞への導入効率もよく、長期持続発現が期待できるレンチウイルス(HIV由来)を用いる。懸念される安全性に関しては病原性の発現に必須とされる副蛋白の除去、Self Inactivating system の採用で理論的には病原性の発現はほぼないと考えられる。またKrabbe病はマウスの場合生後数週で急激に発症し死亡するため、新生児遺伝子治療モデルとして最適と思われる。レンチウイルスベクターの高い遺伝子導入効率、発現持続性を考えると新生児遺伝子治療との組み合わせで高い治療効果を期待できる研究と考えられるが、今回十分な効果は得られなかった。今後より高い力価の獲得と共に、生化学的には脳の各部位における酵素活性の測定、本症の脱髓の原因物質とされているサイコシンの定量、病理学的にはグロボイド細胞の数、脱髓の程度、臨床的には寿命、振戦の開始時期、体重増加などを検討していく予定である。(Shen et al. Gene

Ther. 2001 8:1081)

E. 結論

クラッペ病の欠損酵素である galactocerebrosidase を発現する HIV ベクターを作成した。このベクターは培養細胞に効率よく感染した。またクラッペ病モデルマウスに生直後に静脈内投与することにより肝臓に感染した。脳での発現は認められず今後の課題であった。

F. 研究発表

- 1) Kobayashi H., Carbonaro H., Pepper K, Petersen D, Ge S., Jackson H., Shimada H., Moats R, and Kohn DB. Neonatal Gene Therapy of MPS I Mice by Intravenous Injection of a Lentiviral Vector. Mol Ther. 2005 May;11(5): 776-789

G. 学会発表

- 1) Hiroshi Kobayashi, Asako Morita, Jin-Song Shen, Xing-Li Meng, Toya Ohashi, Donald B Kohn, Yoshikatsu Eto. Retrovirus and Lentivirus mediated gene therapy for Krabbe disease. 第 11 回日本遺伝子治療学会. 8 月、東京、2005 年
- 2) 小林博司、森田麻子、沈 勁松、孟 興麗、大橋十也、衛藤義勝. レトロウイルス・レンチウイルスを用いた Krabbe 病に対する遺伝子治療 熊本 第 48 回日本先天代謝異常学会. 2005. 11

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究

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 解析によるヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損症の遺伝子変異解析系を確立し新たに 13 人の患者について解析を行った結果、9 種類の新規遺伝子変異を同定した。また、この新規変異を含む 40 種類の遺伝子変異に対しマウスモデル細胞実験系で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。

A. 研究目的

G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法ケミカルシャペロン療法の開発を行うことを目的とした基礎研究を行った。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を試みた。マウスモデル細胞を用いた変異酵素蛋白質発現系によりケミカルシャペロンの効果の検討を行った。

B. 研究方法

1. DHPLC 解析

ヒト G_{M1}-ガングリオシドーシス患者由来皮膚繊維芽細胞よりゲノム DNA を抽出し、WAVE fragment 解析システム（Transgenomic 社）を用い DHPLC（denaturing high performance liquid chromatography）解析を行った。プライマーはヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 16 エクソンに対し新たに 15 セットを DHPLC

解析用に設計し、用いた。見つかった変異部位については direct sequencing により遺伝子変異を同定した。

2. ケミカルシャペロン NOEV 効果のスクリーニング

CMV プロモーター下流にヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を組込んだ発現ベクターを構築した。また、このベクターに site-directed mutagenesis により変異導入した、変異ヒトβ-ガラクトシダーゼ遺伝子発現ベクターを構築し、それぞれβ-ガラクトシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス繊維芽細胞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 人工基質を用い測定した。

C. 研究結果

13 人のヒト G_{M1} -ガングリオシドーシス患者に対し、DHPLC による変異解析を行った結果、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) は新規変異であり、酵素活性の欠損をマウス細胞発現系により確認した。これら新規変異を含む (ただし 276-277 insG は除く) 40 種類の変異について、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 (図 1)。

D. 考察

DHPLC によるヒト β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析系により、今回 13 人の患者に対し 20 種類の変異を同定、77% の検出効率が得られた。これは、これまでの PCR-SSCP 法に比べはるかに迅速、簡便でしかも高効率であると考えられる。また、マウスモデル細胞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。この中には R201C、R201H、R201Y または D332N、D332E のように同一箇所のアミノ酸変異が NOEV に反法制を示したことから、NOEV 効果のホットスポットと考えられる。今後、ヒト β -ガラクトシダーゼ酵

素蛋白質の及び変異酵素蛋白質の構造解析などを行うことにより詳細な NOEV 効果の解析を行うことが可能となると考える。

E. 結論

DHPLC を用いたヒト β -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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 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 β -galactosidosis. Brain Dev in press.

2. 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_{M1} -ガングリオシドーシス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_{M1} -ガングリオシドーシス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

ソゾーム病研究会、東京、2005. 12. 2

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_{M1}-ガングリ

オシドーシスの解析. 第 11 回日本ライ

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

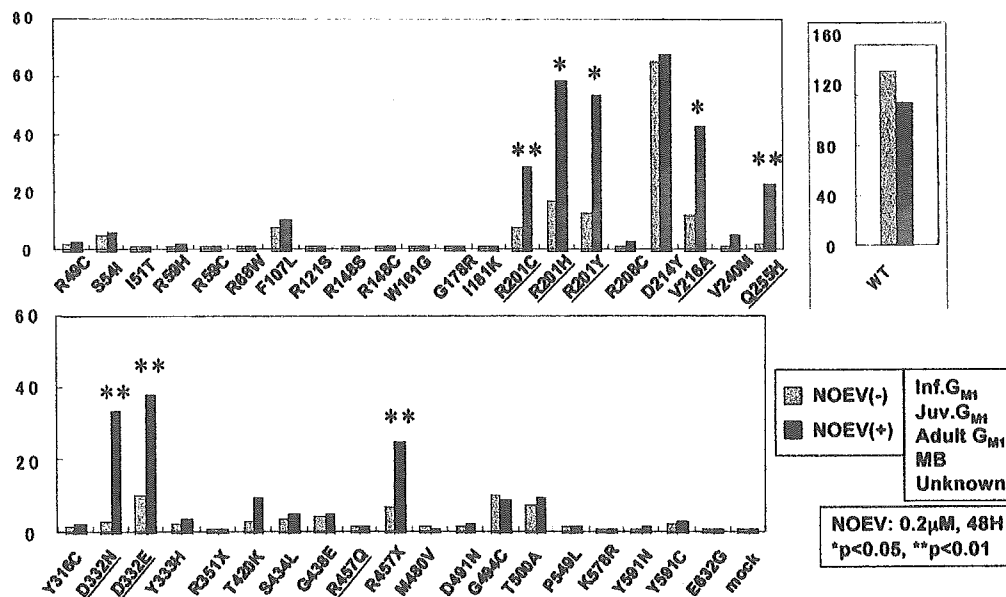


図1 変異β-ガラクトシダーゼに対するNOEVの効果

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究推進事業)
分担研究報告書

ゴーシェ病の中枢神経障害に対する治療法の開発

分担研究者 大野 耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科教授

研究要旨：①ゴーシェ病の原因酵素 β グルコシダーゼについて変異酵素(F213I)の酵素活性を上昇させる化合物(NOV)を見いだした。この化合物によって、培養細胞内の β グルコシダーゼ酵素蛋白量と活性が上昇し、酵素蛋白の局在が小胞体からライソゾームに移行し、グルコセレブロシッドのクリアランスが改善することを明らかにした。今年度はこの化合物がどの程度の患者変異に有効かを明らかにする目的で、培養患者細胞への投与によって活性が上昇する変異をスクリーニングした。この結果、進行性ミオクローヌステんかんを示す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。N188S変異を持つ日本人患者は3例あったが、培養線維芽細胞はなく、リンパ芽球での確認は出来なかった。そこで、N188SおよびG193W変異をFlag標識したpGCCI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存在下での活性をみたところ、N188S変異が活性化されることを明らかにした。このNOVによる治療がどの程度の頻度の患者に応用可能かさらに検討していく。

A. 研究目的

酵素補充療法による治療法が確立し、ファブリ病、ゴーシェ病では治療が開始され、今後、ポンペ病、ハンター病への適応が広がろうとしている。しかし、酵素補充療法の限界は中枢神経症状への効果が明らかでない点にある。ライソゾーム病のほとんどは進行性の神経症状を合併し、神経症状への治療法の開発が望まれている。

ニーマン・ピック病C型は、多くのライソゾーム病がライソゾーム内水解酵素の異常であるのに対し、細胞小胞間の脂質輸送に関係する分子の欠陥でおこる疾患で、中枢神経症状を主体とする。昨年度、我々はニーマン・ピック病C型(NPC)の神経変性にIL-6の過剰産生が関係し、この産生は細菌内毒素などによって増強されることを明らかにした。IL-6ノックアウトマウスとNPCモデルマウスへIL6ノックアウトの導入で生存が延長することを確かめた。現在NPCモデルマウスでIL-6産生亢進の背景をさらに明らかにする目的で、NPCマウスへ細菌内毒素受容体であるTOR-4ノックアウトを導入しているが、現在までに

IL-6の過剰産生の背景は明らかに出来ていない。

一方、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疾患のなかで、1999年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、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【Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004】。この類似体 (N-octyl- β -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ッドの蓄積の減少を確認した。今年度、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った。

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。

さらに NOV 添加により活性化される N188S と G193W 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質を抽出し、NOV 存在下での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、 β グルコシダーゼ活性の上昇をみた患者細胞は N188S/G193W 変異を持つ細胞であった (表1)。しかし、N188S と G193W 変異のどちらが NOV によって上昇するのか明らかではない。

私どもの N188S/G193W 変異を持つ患者以外は N188S の変異を有する患者は日本人のみで報告され、若年ミオクロトーてんかんを主症状とし、ユニークな臨床症状を示す。これらの患者の培養線維芽細胞はなく、芽球化リンパ球をもちいて検討したが、芽球化リンパ球では酵素の活性化を確認できなかった。

表1 NOVで活性化されるゴーシェ病患者細胞の β グルコシダーゼ変異

NOV の効果	患者細胞の遺伝子型
(+)	F213I/F213I F213I/L444P F213I/? N188S/G193W
(-)	L444P/L444P N370S/84GG L444P/RecNcil L444P/del 20 ins TG nt1447 (del 20) & (ins TG) L444P/? del20 ins TG/? D409H/?

N188S と G193W 変異のどちらが NOV によって活性化されるのかを明らかにする目的で、N188S と G193W 変異を持つヒト cDNA を COS 細胞に発現させ、変異蛋白質を抗 Flag 抗体で導入酵素蛋白質を抽出し、その酵素活性と蛋白量を NOV 存在下で見たところ、G193W ではなく N188S が NOV により活性化された (図1)。

図1 NOVによる N188S の活性化

