

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 - 一般 - 019)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木義之

平成19（2007）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 鈴木義之	1
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 松田潤一郎	7
2. 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 難波栄二	11
3. β -galactosidase変異マウスのNOEV治療の神経病理学的解析 伊藤雅之	13
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における神経学的検査法の開発 黒澤美枝子	15
5. 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	17
6. 日本人ゴーシェ病の治療成績と予後に関する研究 衛藤義勝	21
7. クラッベ病の欠損酵素galactocerebrosidaseの生化学的特性について 酒井規夫	23
8. ファブリー病患者由来変異酵素の細胞内局在とシャペロン治療に関する研究 石井 達	25
9. 立体構造予測と分子シミュレーションによるヒト β -ガラクトシダーゼの機能解析 榊原康文	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
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	31
V. 健康危険情報	31
VI. 研究成果の刊行物・別刷	33

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	国際医療福祉大学大学院・教授
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
	難波 栄二	鳥取大学生命機能研究支援センター・教授
	伊藤 雅之	国立精神・神経センター神経研究所・室長
	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
	大野 耕策	鳥取大学医学部・教授
	衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学・教授
	酒井 規夫	大阪大学大学院医学系研究科・講師
	石井 達	帯広畜産大学畜産学部・教授
	榊原 康文	慶應義塾大学理工学部・教授
研究協力	飯田 真己	生化学工業株式会社中央研究所・マネージャー
	一ノ宮悟史	国際医療福祉大学大学院
	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	国際医療福祉大学基礎医学研究センター・教授
	小川誠一郎	慶應義塾大学理工学部・名誉教授
	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免疫化学部・研究員
	中村 紘一	国際医療福祉大学薬学部・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ケミカルシャペロン治療薬開発を試みた。β-ガラクトシダーゼ欠損症（G_{M1}-ガングリオシドーシス）とβ-グルコシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）に、それぞれ新規合成化合物NOEV（N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン）とNOV（N-オクチル-β-バリエナミン）が変異特異的に働くケミカルシャペロンであることを確認した。モデル動物個体への経口投与実験により、NOEVが血液脳関門を通過し、脳組織に入り、形態的・化学的に脳病変を改善するという結論を得た。さらに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、モデル動物の脳病変の進行、重症度との関係を解析した。NOEVの長期投与により、神経学的異常の進行が予防できることが分かった。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い、変異と触媒活性の相関を検討した。またゴーシェ病における特定の変異に対してNOVが有効であることを示した。現在モデル動物を作成中である。さらにファブリー病、クラッペ病など類似疾患の治療に向けた基礎実験が進行中である。

A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病をモデル疾患として、新しい分子治療法（ケミカルシャペロン療法）を確立す

る。これまでに有機合成により開発したNOEV（N-オクチル-4-エピ-β-バリエナミン）をβ-ガラクトシダーゼ欠損症（特にG_{M1}-ガングリオシドーシス）患者

由来の培養細胞、酵素欠損モデル動物、NOV (N-オクチルβ-バリエナミン) をβ-グルコシダーゼ欠損症(ゴーシェ病)患者由来の培養細胞にそれぞれ投与した。その有効性と毒性を検討後、ヒト患者に対する治療薬として開発することを最終目標とする。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、ファブリー病:α-ガラクトシダーゼA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薬の開発を試みる。

B. 研究方法

1. G_{M1}-ガングリオシドーシス

β-ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウスにヒト幼児型特異的変異遺伝子R201Cをトランスジェンとして導入し、軽症型G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスを開発した。この動物の神経学的臨床経過を運動・反射機能を中心とした11項目の検査法にまとめ、それぞれの項目について正常(0)から高度異常(3)までのスコア値を設定し、脳障害の重症度を判定した。

シャペロン化合物NOEVは1 mM水溶液として疾患モデルマウスに経口投与し、中枢神経系をはじめとする諸臓器の組織形態観察、組織化学分析、臨床生化学検査、上記の臨床神経学的検査などをおこなった。投与実験期間中、組織採取、採血、採尿により、副反応・毒性の有無を調べた。

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。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、短時間のエーテル麻酔のあと、頸椎脱臼により速やかな処理を行った。

2. ゴーシェ病

ヒト患者由来の線維芽細胞を用い、シャペロン化合物NOVの試験管内阻害実験、培養系負荷試験を行った。多くの細胞のスクリーニングの結果、この化合物に著しい反応を示した変異細胞には、細胞学的生化学的分子生物学的分析を行った。

3. クラッペ病

予備的な検査により、その欠損酵素ガラクトシルセラミダーゼがNOEVにより著しい試験管内活性阻害を受けることが分かり、培養細胞系での酵素活性還元実験を行った。一部の実験には酵素活性化蛋白質サボシンAを培養液に添加した。

4. ファブリー病

すでに1-ガラクトデオキシノジリマイシンのシャペロン効果を確認しているが、さらにより有効な化合物の探索を行うと同時に、シャペロン療法の分子機序を追及した。

C. 研究結果

1. G_{M1}-ガングリオシドーシス

ヒト乳幼児の神経学的検査法の考え方をもとに開発したマウスの神経学的検査法を、疾患モデル動物と野生型正常動物に適用し、その加齢・病気の進行による変化を分析した(図1)。

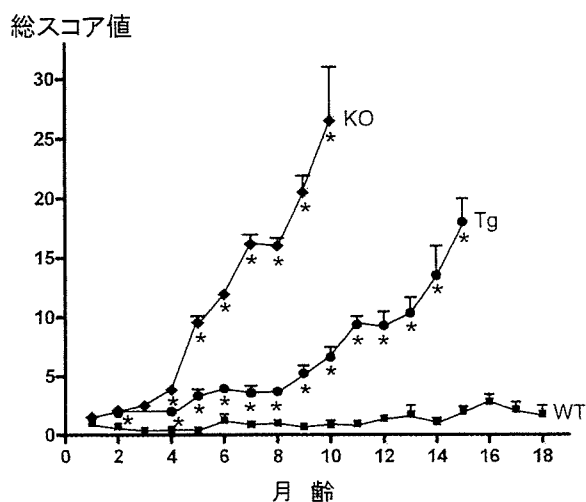


図1 マウス遺伝子型と神経学的スコア値
WT=wild type (正常), Tg=transgenic (軽症型),
KO=knockout (重症型)

正常および疾患モデルマウスは生後2-4ヶ月で総スコア値に差が出現し、加齢とともに著明となった。正常マウスでは、生後18ヶ月まで総スコア値が常に5未満であった。軽症型マウスは生後5ヶ月よりスコア値の異常が著しくなり、生後15ヶ月で15-20まで上昇した。重症型マウスのスコア値は生後2ヶ月以後異常となり、生後半年以後は20-30まで上昇した。

NOEVの長期投与実験により、これまでの予備的なデータ、すなわちこのシャペロン化合物が、経口投与により消化されずに腸管から吸収され、血流に入り、血液脳関門を通過して神経組織に到達したことを、脳組織のNOEV分析、酵素活性測定、基質の定量分析などにより、改めて確認した。脳・肝・腎組織内のNOEV濃度は経口投与18週までの間、同じレベルを維持し、投与終了後速やかに消失した。脳組織の脂質濃度は分析時期により多少の変動があったが、蓄積脂質G_{M1}、G_{A1}の減少が見られた。そし

て上記の臨床神経学的観察により、発症後（生後5-6ヵ月）に投与を始めたマウスのグループでは、投与数ヶ月以後の脳障害モニタリングにおける総スコア値の上昇が停止した。予備実験ではあるが、臨床的にも有効であると判定した（図2）。

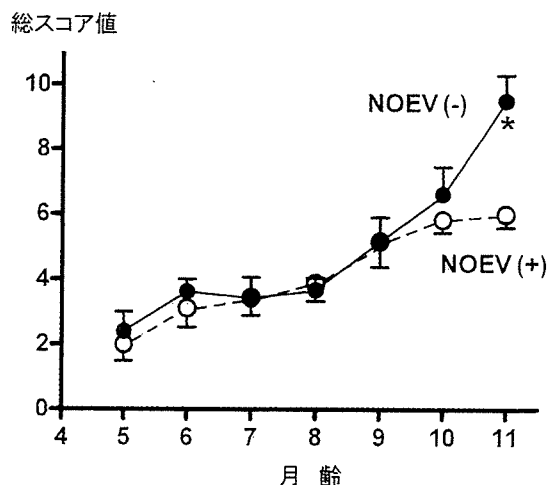


図2 軽症型モデルマウスに対するNOEV経口投与の効果

この治療実験中、毒性・副作用の検討も行ったが、体重、飲水量、嗜好変化、血液生化学、検尿、病理組織学所見などに特異的な異常を認めなかった。そして上記のように、NOEVの組織内蓄積傾向はないという結論を得た。

基礎実験として、新しい分析法による変異遺伝子解析により新たに4種類の新規変異を同定した。そして β -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損モデルマウス脳において、神経栄養因子受容体Trkのリン酸化異常および小胞体ストレス応答の異常を発見した。これらのシグナル異常はNOEV投与マウスでは抑制されていた。さらに酵素変異体の立体構造予測と分子シミュレーションを試み、TIMバレルが保存されていることを明らかにした。そしてラクトースとの複合体モデル作成に成功し、 K_m 値を予測した。

2. ゴーシェ病

ゴーシェ病患者細胞およびCOS細胞での発現系を用いて、NOVに反応する β -グルコシダーゼ変異のスクリーニングを行った。その結果、NOVはF213I以外にN188S、N370S、G202Rに対して有効であること、G193W、L444P、D409Hに対しては無効であることを明らかにした。つまりこの化合物が β -グルコシダーゼの種々の変異体に対してシャペロンとして働く可能性を示した。

3. クラッペ病

NOEVがクラッペ病の欠損酵素ガラクトシルセラミド β -ガラクトシダーゼ（ガラクトシルセラミダーゼ）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を添加したが、酵素の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ボシンAを添加しても効果に変わりはない。来年度以後の検討課題として残された。

4. ファブリー病

ファブリー病細胞内でシャペロン化合物がライソゾームに移行することを確認した。そしてファブリー病の蓄積脂質を簡便に測定するための新しい分析法を開発した。

D. 考察

われわれの提唱するケミカルシャペロン療法が、遺伝性 β -ガラクトシダーゼ欠損症、特に G_{M1} -ガングリオシドーシスに有効であることを、形態学的、生化学的、臨床的な分析により明らかにした。この疾患にはわれわれのオリジナル化合物であるNOEVが特異的な分子治療薬になる可能性がある。遺伝性 β -グルコシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）については、現在のところ細胞実験のレベルでの分析であるが、NOEV類似体であるNOVが有効であることが分かった。

予備実験によりNOEVの効果が著しい変異を発現するモデルマウスに対し、長期投与実験を開始し、定期的な臨床評価、病理・生化学分析により、効果ならびに副反応の有無を検討した。すべての検査パラメーターについて有効性が確認された一方、少なくともマウスにおいては見るべき副反応・副作用は観察されなかった。今後、より長期の投与に対する反応の有無を慎重に検討する予定である。

今後、シャペロン療法の開発研究には、薬剤候補化合物の大量合成・供給、ならびに実験動物の確保が必要である。化合物供給については、来年度中に大動物に対する投与実験を実施するための大量合成を行う予定である。マウスに対する臨床効果の最終確認後、イヌまたはサルを対象とする投与実験を行い、最終的にヒト患者への治療実験の準備を進めたい。

また新しいシャペロン化合物の開発を最終目標として、 β -ガラクトシダーゼ分子、その変異による分子構造の変化を、分子モデリングの手法を使って解析した。この方向の分析は新しい化合物の開発に

必須であり、更に発展させる予定である。

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。特に今年度は新しい研究方向として、 β -ガラクトシダーゼ欠損マウスへのNOEV長期投与実験と、その臨床評価システムの開発を重点的に行った。実験期間中、系統的な解析により、経口投与の妥当性、化合物の血液脳関門通過の検証を行い、中枢神経系での形態的・化学的シャペロン効果発現を再確認した。そしてマウス個体の神経学的評価法を確立することにより、新しい研究アプローチ法を開発した。

これらの多次元分析法により、来年度はマウスについてのシャペロン効果、投与方法、投与量などを決定し、更にイヌまたはサルなど、異なった動物種についての検討、そして最終的にはヒト患者治療実験の準備を始める。

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これまで極めて困難であった。低分子化合物によるケミカルシャペロン療法は、この問題の解決に大きな意味を持つ。本研究によりシャペロン療法の概念を確立し、多くの遺伝病に適用されるようになることを期待する。対象疾患の拡大により、心身障害児・者への予防・治療的対応が可能になるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki Y: β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inherit Metab Dis* 29: 471-476, 2006.
2. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. *Brain Dev* 28: 482-486, 2006.
3. 鈴木義之: ケミカルシャペロン. *小児科診療* 69: 1710-1715, 2006.
4. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A: β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1} -Gangliosidosis and Morquio B disease. Sriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler

KW, Vogelstein B (eds): *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, <<http://genetics.accessmedicine.com/>>, McGraw-Hill, New York, 2006.

5. Ogawa S, Tezuka Y: Convenient synthesis of 3- and 6-deoxy-D-*myo*-inositol phosphate analogues from (+)-*epi*- and (-)-*vibo*-quercitols. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 5238-5243, 2006.
6. Ogawa S, Senba Y: Preparation of building blocks for carba-oligosaccharaides: some protected 5a -carba-D-hexopyranosyl-1,5-anhydro-2-deoxy-D-*arabino*-hex-1-enitols, and 5a,5a -dicarba congeners thereof. *J Carbohydrate Chem* 25: 69-93, 2006.
7. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and reflex testing in G_{M1} -gangliosidosis model mice. *Brain Dev* 29: 210-216, 2007.
8. Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y: Development and medical application of unsaturated carboglycosyl-amine glycosidase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*, in press.
9. Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Kaneski C, Brady RO, Suzuki Y: Enzyme enhancement activity of *N*-octyl- β -valienamine on β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, in press.

学会発表

1. Ohno K, Lei K, Zhuo L, Inoue T, Ninomiya H, Nanba E, Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for Gaucher disease: *N*-octyl- β -valienamine increases the cellular activity of not only F213I but also N188S β -glucocerebrosidases. 10th International Child Neurology Congress, Montreal, 6.12-17, 2006.
2. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling causes neuronal death in G_{M1} -gangliosidosis. 第29回日本神経科学大会、京都、7.19-21, 2006.
3. 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 (特別講演). 第25回分子病理学研究会東京シンポジウム、東京、8.4-5, 2006.
4. Higaki K, Takamura A, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E: Analysis of the

- effect of chemical chaperone on human mutant β -galactosidase expressing mouse cells. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, 9.12-16, 2006.
5. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk signaling in G_{M1} -gangliosidosis mice brains. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, 9.12-16, 2006.
 6. 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎博之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二： β -ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異とケミカルシャペロン療法の検討。第29回日本人類遺伝学会大会、米子、10.17-20, 2006.
 7. 鈴木義之：モデルマウスを用いた G_{M1} -ガンゲリオシドーシスの新しい治療法開発（シンポジウム）。第29回日本人類遺伝学会大会、米子、10.17-20, 2006.
 8. Suzuki Y, Ichinomiya, S, Maruyama K, Toda H, Watanabe H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J: Mouse neurology: neurological assessment of G_{M1} -gangliosidosis model mice. 35th Annual Meeting of the Child Neurology Society Meeting, Pittsburgh, 10.18-21, 2006.
 9. 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：シャペロン療法モニタリングのためのマウス神経学的評価法の開発。第12回ライソゾーム病研究会、東京、11.24-25, 2006.
 10. Suzuki Y: Molecular approaches to neurogenetic diseases: G_{M1} -gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt, 1. 25-26, 2007.

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して遺伝子改変により、次のライソゾーム病モデルマウスの作出を行った。（1）ファブリー病モデルマウスとして蓄積脂質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、遺伝子発現陽性系統を1ライン樹立した。（2）ゴーシェ病モデルマウスとしてヒト変異型β-グルコシダーゼF213I遺伝子導入マウスのファウンダーを2匹作製し、系統化を開始した。（3）新規のG_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウスとしてヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子導入マウスの作出を開始した。

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系統化を進めるとともに、新たにゴーシェ病モデルマウスとG_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウスの作製を開始した。

B. 研究方法

1. ファブリー病モデルマウス

本症で蓄積する脂質globotriaosylceramide (Gb3)の合成を促進し、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、Gb3合成酵素を強発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。昨年度得られたファウンダーTgマウス6ラインからトランスジーンが発現ラインの系統化を進めた。

（帯広畜産大学・石井達氏との共同研究）

2. ゴーシェ病モデルマウス

β-グルコシダーゼのF213I変異は、日本人ゴーシェ病患者の約15%に認められ比較的頻度が高く、中枢神経症状を呈する患者に見いだされている。本変異は、in vitro実験でケミカルシャペロンの有効性が示されており、治療実験用のモデル動物としてこの変異酵素を発現するマウスを作製することとした。ヒト変異型β-グルコシダーゼF213IのcDNA（Flag-tag付き）と強発現用プロモーターとしてニワトリβ-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。なお、ヒト正常β-グルコシダーゼについても同様のトランスジーンを作製した。それぞれのトランスジーン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。（鳥取大学・大野耕策氏との共同研究）

3. G_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウス

G_{M1}ガングリオシドーシスで認められるβ-ガラクトシダーゼのR457Q変異は、in vitro実験でケミカルシャペロンが有効であることが示されており、ゴーシェ病マウスと同様にこの変異酵素を発現するモデルマウスを作製することとした。CAGプロモーターとヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457QのcDNAとの融合遺伝子を構築し、同様にC57BL/6Jマウスの受精卵をもちいて、Tgマウスの作製を開始した。（鳥取大学・難波栄二氏との共同研究）

(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

1. ファブリー病モデルマウス

Gb3合成酵素強発現用トランスジーンDNAが導入されたTgファウンダーマウス6匹のうち、交配により4ラインで子孫が得られたが、そのうち3ラインでトランスジーンが子孫に伝達された。RT-PCRによる発現解析により、3ラインのうち1ラインのみがトランスジーン発現陽性と判定され、この1ラインを系統化した。

2. ゴーシェ病モデルマウス

ヒト変異型β-グルコシダーゼF213Iおよびヒト正常型β-グルコシダーゼ発現用のそれぞれのトランスジーンをマイクロインジェクションし、それぞれ97匹、70匹の産仔が得られ、PCR判定により、各々2匹と1匹が現在までにTg陽性ファウンダーと判定された。これらのファウンダーとC57BL/6Jマウスとの交配によりF1世代の作出を開始した。

3. G_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウス

CAGプロモーターとヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457QのcDNAとの融合遺伝子の構築を行い、必要な遺伝子断片を精製し、マウス受精卵へのインジェクションを開始した。

D. 考察

ファブリー病モデルマウスとしてのGb3合成酵素Tgマウスについては、遺伝子発現陽性が確認された1ラインを系統化することが出来た。今後、詳細な病理学的生化学的検索を進めるとともに、α-Galノックアウトマウスとの交配を行い、Gb3の高度な蓄積を示し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。ゴーシェ病モデルマウスについては、ヒト変異型β-グルコシダーゼF213Iを導入したTgマウスファウンダーが2匹得られ、系統化と発現解析を進める予定である。ゴーシェ病モデルであるβ-グルコシダーゼノックアウトマウスは生後すぐに死亡するため、病態解析などには利用できないが、今後、交配によりヒト変異型β-グルコシダーゼF213Iトランスジーンをノックアウトマウスに導入することで、残存酵素活性があり臨床症状を呈するモデルとなることが期待される。新規のG_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウスを作製する目的でヒト

変異型β-ガラクトシダーゼR457Qを発現するTgマウスの作出を開始した。今後ノックアウトマウスとの交配により、現在用いているR201Cマウスと比較して発症時期の早いモデルマウスとなることが期待される。以上、これらのモデルマウスは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して遺伝子改変により、次のライソゾーム病モデルマウスの作出を行った。(1) ファブリー病モデルマウスとして蓄積脂質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、遺伝子発現陽性系統を1ライン樹立した。(2) ゴーシェ病モデルマウスとしてヒト変異型β-グルコシダーゼF213I遺伝子導入マウスのファウンダーを2匹作製し、系統化を開始した。(3) 新規のG_{M1}ガングリオシドーシスモデルマウスとしてヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子導入マウスの作出を開始した。

F. 研究発表

論文発表

1. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A. β-Galactosidase Deficiency (β-Galactosidosis): G_{M1}-Gangliosidosis and Morquio B Disease. In The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. eds. Scriver et al. Chapter 151 McGraw-Hill <http://genetics.accessmedicine.com/mmbid/public/co_contents/toc_part16.html>, 2006.
2. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and Reflex Testing in G_{M1}-Gangliosidosis Model Mice. Brain Dev 29: 210-216, 2007.

学会発表

1. A Takamura, K Higaki, J Matsuda, Y Suzuki, E Nanba. Impairment of Trk Receptor-Mediated Signaling Causes Neuronal Death in G_{M1}-gangliosidosis. 第29回日本神経科学大会、京都、7. 2006.
2. Sawada T, Tanaka A, Seto T, Maeda M, Jikihara I, Yamaguchi E, Matsuda J, Nanba E, Yamano T. Cell therapy for the brain involvement in lysosomal

- storage disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, Makuhari, 9, 2006.
3. Higaki K, Takamura A, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Analysis of the effect of chemical chaperone on human mutant β -galactosidase expressing mouse cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, Makuhari, 9, 2006.
 4. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E. Impairment of Trk signaling in G_{M1} -gangliosidosis mice brains. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolis, Makuhari, 9, 2006.
 5. 澤田智、田中あけみ、前田光代、直原育久代、瀬戸俊之、松田潤一郎、國枝孝典、高野薫、難波栄二、檜垣克美、高村歩美、山口悦子、山野恒一、ライソゾーム病の脳病変に対する細胞治療。日本人類遺伝学会第 51 回大会、米子、10, 2006.
 6. 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二。 β -ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異とケミカルシャペロン療法の検討。日本人類遺伝学会第 51 回大会、米子、10, 2006.
 7. 檜垣克美、高村歩美、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神経変性機構の解析。第 12 回日本ライソゾーム研究会、東京、11. 2006.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

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変異遺伝子解析により新たに4種類の新規変異を同定した。β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損モデルマウス脳において、神経栄養因子受容体Trkのリン酸化異常および小胞体ストレス応答の異常を見いだした。これらのシグナル異常はケミカルシャペロンNOEV（N-オクチル-4-エピ-β-パリエナミン）投与したR201Cマウスにおいて抑制されていた。詳細な分子機構は現在検討中である。

A. 研究目的

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の基礎的研究として、DHPLC法によるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析およびモデルマウス神経変性機構とケミカルシャペロン効果について検討した。

B. 研究方法

1. DHPLC法によるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

4人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来皮膚線維芽細胞およびリンパ球から抽出したゲノムDNAを用い、WAVE fragment解析システム(Transgenomic社)を用いたDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 解析を行った。変異同定部位はdirect sequencingにより遺伝子変異を確定した。

2. マイクロアレイ発現解析

正常、β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損、R201C発現マウス大脳皮質よりRNAを抽出し、マイクロアレイ発現解析はイルミナSentrix mouse-6 expression beadchipを用いた。Ingenuityパスウェイ解析ソフトウェア (ver.3.0) を用い解析を行った。

3. 免疫蛍光染色

クリオスタットによりマウス凍結切片を作製した。抗G_{M1}、抗Trk、抗リン酸化Trk、抗Bip/Grp78抗体を用い免疫蛍光染色を行った。

C. 研究結果

WAVE fragment解析システムを用いたDHPLC法により変異解析を行い、4種類の新規遺伝子変異（E131K、W273R、D448V、W582X）および既知変異（R49C、Y270D、H281Y）を同定した。

正常マウスとβ-ガラクトシダーゼ欠損マウス大脳皮質より抽出したRNAを用いマイクロアレイ発現解析を行った結果、蛋白質分解系、小胞体ストレス応答、アポトーシス、酸化ストレス、炎症に関連する遺伝子群の発現が有為に発現していた。パスウェイ解析の結果、欠損マウスにおいてBip/Grp78、PERK、IRE1、CHOPの発現上昇、TRAF2、JNK-1、Bcl-2の発現低下など小胞体ストレス応答シグナルの異常が確かめられた。さらに、脳組織の免疫染色の結果、小胞体シャペロン分子Bip/Grp78蛋白質の発現が欠損マウス神経細胞内で異常に亢進し、またR201C発現マウス脳のBip/Grp78の発現がケミカルシャペロンNOEVにより抑制されていた。一方、9月齢β-ガラクトシダーゼ欠損マウス大脳皮質において正常マウスに比べリン酸化Trk蛋白質の顕著な発現亢進が見られた。このリン酸化Trkの発現もNOEV投与R201Cマウス脳で抑制されていた。

D. 考察

昨年度確立したDHPLC法によるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析により新たに4種類の新規遺伝子変異を同定した。この新規変異型に対するNOEV効果は現在検討中である。また、報告されているβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異のうちNOEV効果判定

を行っていない変異型についても引き続き検討している。

これまでG_{M1}-ガングリオシドーシス神経変性に関連する分子機構として、神経栄養因子受容体シグナルの異常を見いだしてきた。今年度は、マイクロアレイ発現解析により網羅的な解析を行った。結果、小胞体ストレス応答の亢進がβ-ガラクトシダーゼ欠損マウス脳において認められた。免疫蛍光染色の結果、小胞体ストレス応答関連分子シャペロンであるBip/Grp89蛋白質の発現が欠損マウス脳神経細胞で上昇していることが分かった。また、R201CマウスのBip/Grp78の発現はNOEV投与により抑制された。これらの結果は小胞体ストレス応答シグナルが神経変性機構に関連することを示唆する。今後、G_{M1}蓄積が引き起こす神経細胞内のシグナル異常についてより詳細な解析を行うことにより、G_{M1}-ガングリオシドーシス神経変性の分子機構の解明とそれに対するケミカルシャペロンの効果が明らかにすることを考えている。

E. 結論

新規β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異を同定した。G_{M1}-ガングリオシドーシス神経変性とTrkシグナル異常および小胞体ストレス応答の異常亢進の関連性を示した。

F. 研究発表

論文発表

1. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy in β-galactosidosis. *Brain Dev* 28: 482-486, 2006.
2. 難波栄二、檜垣克美、Bahrudin U: 遺伝子診断の実際、小児科診断 69: 1621-1626, 2006.

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神経変性

におけるTrk受容体の機能異常. 第29回日本神経科学大会、京都、7, 2006.

2. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E. Impairment of Trk signaling in G_{M1}-gangliosidosis mice brains. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 9, 2006.
3. Higaki K, Takamura A, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Analysis of the effect of chemical chaperone on human mutant β-galactosidase expressing mouse cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 9, 2006.
4. Sawada T, Tanaka A, Seto T, Maeda M, Jikihara I, Yamaguchi E, Matsuda J, Nanba E, Yamano T. Cell therapy for the brain involvement in lysosomal storage disease. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 9, 2006.
5. 檜垣克美、高村歩美、山本浩一、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、松田潤一郎、鈴木義之、難波栄二: β-ガラクトシダーゼ欠損症遺伝子変異とケミカルシャペロン療法の検討. 第51回日本人類遺伝学会大会、米子、10, 2006.
6. 澤田智、田中あけみ、前田光代、直原育久代、瀬戸俊之、松田潤一郎、國枝孝典、高野薫、難波栄二、檜垣克美、高村歩美、山口悦子、山野恒一: ライソゾーム病の脳病変に対する細胞治療. 第51回日本人類遺伝学会大会、米子、10, 2006.
7. 野中和香子、檜垣克美、高村歩美、飯田真巳、小川誠一郎、岩崎浩之、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に対するケミカルシャペロン療法の分子解析. 第12回日本ライソゾーム病研究会、東京、11, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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 -galactosidase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・室長

研究要旨

β -galactosidase欠損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-octyl-4-epi- β -valienamine (NOEV)治療による神経病理学的解析を行った。その結果、32週齢から69週齢のKO/Tgマウスでは、治療群で神経細胞の脂質蓄積と変性が観察され、明らかな病理学的改善はなかったが、病変の進行は抑えている傾向にあった。神経細胞の不可逆的変化の改善よりも神経細胞の変性過程を抑制しているものと考えられた。NOEV投与による副作用と考えられる病理学的変化は無かった。

A. 研究目的

β -galactosidase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N-octyl-4-epi- β -valienamine (NOEV)を投与し、その治療効果と副作用を神経病理学的に検討し、最適な投与方法をみつける。

B. 研究方法

KO/Tgマウス32週齢から69週齢の6匹、および野生型38週齢と47週齢の2匹、KOマウス31週齢から39週の3匹を用いた。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（luxor fast blue and cresyl violet）染色、PAS染色、Bodian銀染色および抗GFAP抗体、抗ユビキチン抗体、抗COX-2抗体による免疫組織化学を行った。

治療は1.0mM NOEV飲水、で8週間および16週間、24週間を行った。

評価は細胞内に蓄積されているluxor fast blue

（LFB）陽性顆粒の程度と変性細胞の程度、各種抗体による免疫反応性によって行った。

（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30週齢では、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。69週齢と31週齢では、69週齢の方がLFB蓄積細胞が多く、加齢に伴って進行しているが、KOに比べて緩徐である。

2. NOEV治療のKO/Tgマウスの神経病理学的変化

luxor fast blue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。

3. NOEV投与による病理変化

野生型マウスでは、抗GFAP抗体、抗ユビキチン抗体、抗COX-2抗体による発現は観察できなかった。また、脳、肝臓、腎臓に明らかな病理学的変化は無かった。

D. 考察

KO/Tgマウスの神経病理変化は、ヒト幼児型G_{M1} 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。NOEV治療の病理学的改善は見られなかったが、進行は無かった。すでに病変が完成された後の治療であり、変性神経細胞の不可逆的変化の改善よりも神経細胞の変性過程を抑制しているものと考えられた。今後投与時期の検討が必要である。

また、NOEVによる病理学的副作用は無いものと考え

えられた。

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NOEV 1.0mMでは、神経病理学的改善得るのは難しいが、進行を抑えることは可能であると考えられた。また、副作用としての病理学的変化は来さないものと考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産の出願・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_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスにおける神経学的検査法の開発

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、戸田寛子 国際医療福祉大学大学院

下重里江 国際医療福祉大学基礎医学研究センター

研究要旨

ヒトの遺伝性脂質蓄積症G_{M1}-ガングリオシドーシスの病態モデルマウスに対する神経学的検査法の開発を試み、病気の進行、重症度との相関を解析した。2種のモデルマウス、すなわち重症型ノックアウトマウスと、軽症型R201C変異発現トランスジェニックマウスを正常野生型マウスと比較した。その結果、いずれのモデルマウスも脳障害の進行と共に評価スコア値が上昇することを確認した。次に、シャペロン化合物NOEVを軽症型マウスに経口投与したところ、この病型の脳障害発生に予防効果を示すことがわかった。

A. 研究目的

第一に、小児期の代表的神経遺伝病である若年型G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスを対象とした神経学的検査法を開発すること、第二に、この方法を用いてこれまで基礎的検討を重ねてきたケミカルシャペロン療法の疾患モデルマウスにおける臨床効果を検討すること、の2点である。

B. 研究方法

1. 動物

すでに確立した2種のG_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウス（重症型ノックアウトマウス、軽症型R201C変異発現トランスジェニックマウス）を用い、正常野生型マウスと比較検討した。

2. 神経学的検査法

姿勢・肢位、自発運動、反射運動など11の検査項目の異常度を0（正常）から3（高度異常）の4段階スコアに分類した。それぞれのマウスの個別的検査項目スコアならびにその合計スコアを算出した。

3. シャペロン治療実験

シャペロン化合物NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine) を軽症型モデルマウスにアドリブ経口投与し、その臨床経過を上記の神経学的評価法により判定した。

4. 倫理面への配慮

動物飼育はNIHの動物飼育基準に準じて行い、治療実験は国際医療福祉大学実験動物倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

本研究では主に神経学的総スコア値をもとに判定した。正常マウスの総スコアは生後18ヶ月まで常に5未満であったのに対し、2種の疾患モデルマウスは、すでに生後2-4ヶ月で正常マウスと比べ、僅かではあるがスコアが有意に高くなっていった。以後、軽症型マウスは生後5ヶ月から値の上昇が著しく、生後15ヶ月には15-20となった。重症型マウスは生後7-10ヶ月には20-30まで上昇した。

発症初期から開始したNOEV経口投与により、数ヶ月以内に投与群と非投与群との間に総スコア値の差が出現した。NOEV非投与マウスでは値が上昇せず、シャペロン効果があると判定した。

D. 考察

今回新しく開発した神経学的検査法により、G_{M1}-ガングリオシドーシスモデルマウスに発生する脳障害の重症度や進行性を客観的定量的に評価できることが分かった。この検査法はこれまで試みられてきた反復検査による学習・記憶などの大脳機能評価ではなく、運動・反射という個体発生初期の変化を評

価する方法であるところに意義がある。しかも方法は簡便であり、特殊な検査装置を使わず、短時間に検査を終了できる。今後他の多くの疾患モデルマウスの検査・評価に用いられることを期待する。

これまでケミカルシャペロン療法の開発研究に形態的、化学的、細胞学的方法により効果を判定してきたが、今後はこの検査法により、動物レベルでの臨床効果を正確に把握することができるであろう。実際、今回の予備実験ではマウスに経口投与したNOEVが脳病変の発生、進行を予防することが分かった。今後投与量、投与方法などの確認後、ヒト患者の治療に向けた実験を継続したい。

E. 結論

神経遺伝病モデルマウスの新しい神経学的評価法を開発した。G_{M1}-ガングリオシドーシスにおけるモデル実験によりその妥当性を確認した。今後多くの遺伝病モデルマウスに適用が可能である。更に、現在開発中のケミカルシャペロン療法の動物実験におけるモニタリング法として有用であることを示した。

F. 研究発表

論文発表

1. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Neurological assessment of G_{M1}-gangliosidosis model mice. Brain Dev 29: 210-216, 2007.

学会発表

1. Suzuki Y, Ichinomiya, S, Maruyama K, Toda H,
2. Watanabe H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J: Mouse neurology: neurological assessment of G_{M1}-gangliosidosis model mice. 35th Annual Meeting of the Child Neurology Society Meeting, Pittsburgh, 10. 18-21. 2006.
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: シャペロン療法モニタリングのためのマウス神経学的評価法の開発. 第12回ライソゾーム病研究会, 東京, 11. 24-25. 2006.

G. 知的財産権の出願・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・教授

研究協力者 二宮治明、雷珂、井上岳彦 鳥取大学医学部

研究要旨

ゴーシェ病は β -グルコセレブロシダーゼ(β -Glu)の遺伝子変異によるライソゾーム病である。我々の研究の目的は、ゴーシェ病に対する分子シャペロン療法を樹立することである。平成16年度、グルコース類似体 N-octyl- β -valienamine (NOV) が、 β -Glu F213I 変異体に対して酵素活性増強効果(enzyme enhancement activity: EEA)を示すことから、この分子が変異 β -Glu に対してシャペロンとして働く可能性を報告した (Lin H, et al., Biochim Biophys Acta 2004)。17-18年度にかけ、ゴーシェ病患者由来皮膚繊維芽細胞および COS 細胞での発現系を用いて、NOV に反応する β -Glu 変異をスクリーニングした。その結果、NOV は F213I 以外に N188S、N370S、G202R に対して有効であること、G193W、L444P、D409H に対しては無効であることを明らかにした (Lei K, et al. Biochim Biophys Acta 2007 in press)。これら培養細胞レベルでの実験結果は、NOV が β -Glu の種々の変異体に対してシャペロンとして働く可能性を示している。

A. 研究目的

ライソゾーム病の多くは糖脂質加水分解酵素の欠損によっておこる。鈴木義之博士らは、Fabry 病の原因酵素 α -ガラクトシダーゼのある種の変異体が、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。この変異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の存在下ではそれがシャペロンとして働き、蛋白質を安定化するものと予想された。このことは、ある種の変異酵素蛋白質は、中性の環境である小胞体やゴルジ装置では不安定で、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こと、さらに、分子シャペロンを用いて不安定な蛋白質を安定化し、ライソゾームの酵素活性を回復させる可能性を示している。鈴木義之博士はこの理論を分子シャペロン療法と命名している。分子シャペロンの酵素活性増強効果(enzyme enhancement activity: EEA)とは、試験管内ではなく、生きている細胞に薬物を投与したときに酵素活性を増加させる効果と定義される。

我々は、鈴木義之氏と共同で β -グルコシダーゼ(β -Glu)に対する阻害剤の EEA をスクリーニングし、

グルコース類似体 (N-octyl- β -valienamine, NOV) が F213I 変異 β -Glu に対して EEA を持つことを見出した (Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004)。本研究の目的は F213I 以外に NOV が有効である β -Glu 変異体が存在するかどうかを明らかにする事である。この目的のため、種々の変異を持つゴーシェ病患者由来皮膚繊維芽細胞および COS 細胞での発現系を用いて、NOV の EEA をスクリーニングした。

B. 研究方法

1. ヒト皮膚繊維芽細胞での NOV の効果の検討

正常人由来細胞及びゴーシェ病患者由来細胞 9 種類 (F213I/F213I, N370S/84GG, G202R/L444P, N188S/G193W, N370S/N370S [DMN00.41, DMN87.30], nt1447del20insTG/L444P, nt1447del20insTG/?, D409H/?) を用いて、NOV の EEA を検討した。

2. COS 細胞発現系での NOV の効果の検討

COS 細胞に Flag-標識 β -Glu (wild-type および 6 種類の変異体 N188S, G193W, G202R, F213I, N370S, L444P) を一過性に発現させ、抗 Flag 抗体免疫沈降産物中の酵素活性を測定した。

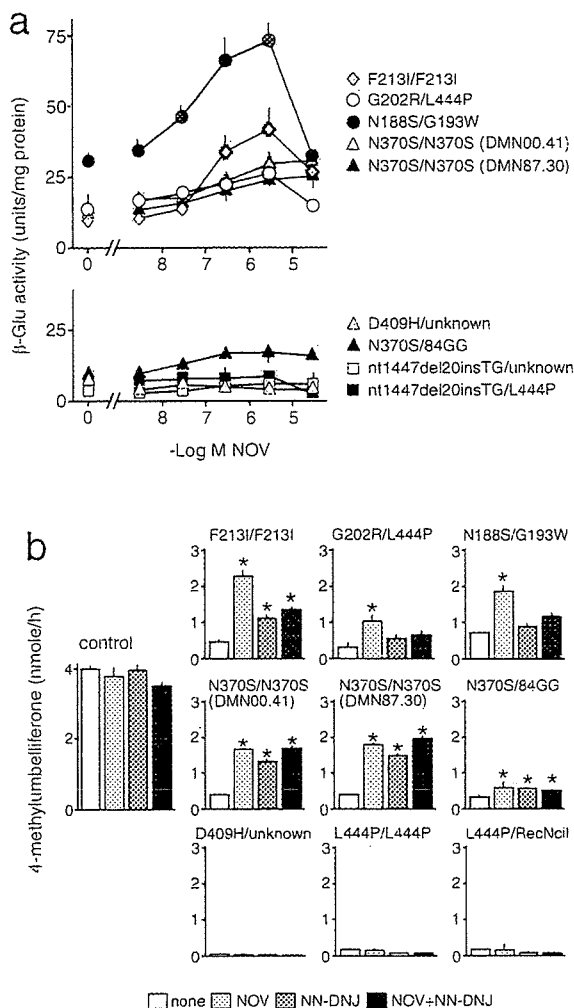


図1 ヒト皮膚繊維芽細胞での NOV の効果 a. 各細胞を NOV 存在下で 4 日間培養し、ライセート中の酵素活性を測定した。上段は NOV が有効であったもの、下段は無効であったものを示す。b. 各細胞を NOV または NN-DNJ 存在下で培養し、培養液中に基質を加えてβ-Glu 活性を測定した。

C. 研究結果

1. ヒト皮膚繊維芽細胞での NOV の効果

各細胞を NOV 存在下で 4 日間培養し、ライセート中の酵素活性を測定したところ、NOV は F213I/F213I, G202R/L444P, N188S/G193W, N370S/N370S の変異を持つ細胞に対して有効であったのに対し、N370S/84GG, nt1447del20insTG/L444P, nt1447del20insTG/?, D409H/? の変異を持つ細胞に対しては無効だった (図 1 a)。Scripps Institute の Dr. Kelly のグループ

は、N370S, G202R 変異体に対して NN-DNJ (N-nonyl-deoxynojirimycin) がシャペロンとして有効であることを報告しているため、NOV を NN-DNJ の EEA を比較したところ、同じ濃度で NOV は NN-DNJ よりも高い効果を示した (図 1 b)。

2. COS 細胞発現系での NOV の効果

COS 細胞に Flag-標識β-Glu を一過性に発現させ、NOV で処理した。N188S, N370S, G202R 変異体では、NOV は抗 Flag 抗体免疫沈降産物中の酵素活性を増加させたが、G193W, L444P, D409H に対しては無効だった。酵素活性の増加は蛋白質量の増加を伴っていた (図 2)。

D. 考察

ヒト皮膚繊維芽細胞と COS 細胞発現系での NOV の効果の選択性はおおむね一致しており、NOV は N188S, F213I, N370S, G202R の各変異に対してはシャペロンとして有効であるが、G193W, L444P, D409H に対しては無効である。N188S, F213I, N370S, G202R は触媒活性をもつドメイン III に位置するのに対して、G193W, L444P, D409H はその他のドメインに位置する。この結果は従って、アミノ酸変異がドメイン III に位置することが NOV による変異酵素安定化の必要条件であることを示唆する。NOV は少なくとも培養細胞レベルでは NN-DNJ よりも強い EEA を有しており、ゴーシェ病に対する分子シャペロンとしてより有望である。

β-Glu ノックアウトマウス (β-GluKO) は生後 48 時間以内に死亡する。現在、F213I β-Glu を導入したトランスジェニックマウスを作製中で、これができ次第 β-GluKO/F213I β-Glu TG マウスを作製し、NOV の in vivo での効果を検証する予定である。

E. 結論

NOV はβ-Glu 変異体に対する分子シャペロンとして働くが、その効果には選択性があり、N188S, F213I, N370S, G202R の各変異に対しては有効であるが、G193W, L444P, D409H には無効である。

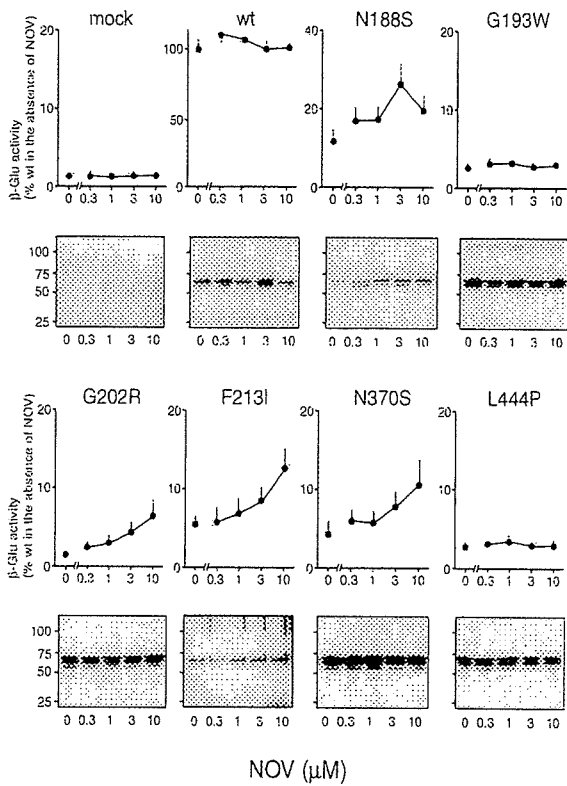


図2 COS細胞発現系でのNOVの効果。COS細胞にFlag-標識 β -Gluを一過性に発現させ、NOVで処理した後、Flag抗体免疫沈降産物中の酵素活性を測定し、Flag- β -Gluの発現量を解析した。

F. 研究発表

論文発表

1. Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K. and Suzuki Y. (2007) Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta.* in press.

学会発表

1. Ohno K, Lei K, Luan Z, Inoue T, Ninomiya H, Nanba E, Suzuki Y. Activity of N-octyl-beta-valienamine for β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. 10th International Child Neurology Congress, Montreal (Canada). 6. 11-16, 2006.

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（こころの健康研究事業）
分担研究報告書

日本人ゴーシェ病の治療成績と予後に関する研究

分担研究者 衛藤義勝 東京慈恵会医科大学・教授

研究要旨

日本人ゴーシェ病106例の治療成績と予後について検討した。86例が治療を受けており、うち68例が生存していた。未治療例20例は全例死亡していた。この点で治療効果は認められると考えられるが急性神経型では28%、亜急性神経型では76%の生存率であり、神経型ゴーシェ病に対する治療成績は十分とはいえなかった。今後シャペロン療法を含めた新しい治療法の開発が必要と考えられる。

A. 研究目的

ゴーシェ病は臨床表現型において異質性の強い疾患である。すなわち、1型（非神経型）2型（急性神経型）、3型（亜急性神経型）の3つの臨床型に分類されている。しかも同一臨床型においてもその重症度は各症例毎に異なっている。現在、日本では酵素補充療法（ERT）と骨髄移植（BMT）が、臨床上用いられているが、その治療成績についてまとまった報告はない。そこで、今回は日本人ゴーシェ病106例（1型：39例、2型：25例、3型：42例）の治療成績を検討したので報告する。

B. 研究方法

臨床症状及び酵素活性測定により診断された日本人ゴーシェ病106例について検討した。それぞれについて現在の状況（ADL,生存/死亡）についてアンケート調査を行った。遺伝子解析についてはPCR法と制限酵素切断法を用いて、L444P,F213I,D409H変異の有無を同定した。

C. 研究結果

1型39例においては、34例が治療を受けていた。（ERT:33例、BMT:1例）。非治療群5例は全例死亡していた。治療群34例は全例生存していた。2型25例においては14例が治療を受けていた。（ERT:13例、BMT:1例）。非治療群11例は全例死亡していた。治療群14例のうち、10例は死亡しており、生存例は4名にすぎなかった。こ

の4例についても全例復たきり状態だった。3型42例においては38例が治療を受けていた。（ERT：36例、BMT:1例、ERT→BMT:1例）。非治療群は4例は全例死亡していた。治療群38例のうち、生存例は30名、死亡例は8名だった。3型42例においては、16例が診断時1型であり後に神経症状を呈したため、3型に分類された（A群）。残り26例においては診断時、すでに神経症状を呈している症例であった（B群）。A群の遺伝子型はL444P/L444P11例、F213I/F213I2例、F213I/L444P2例、その他1例であった。B群の遺伝子型はF213I/F213I2例、F213/L444P5例、D409H/?8例、その他11例であった。A群のADLは移動、食事、排泄はほとんどの例で自立していた。逆にB群のADLはほとんどの例で全介助だった。

D. 考察

日本人ゴーシェ病106例の検討では86例が治療を受けていた。治療群86例中、68例が生存しており、生存率は79%であった。これに対して、未治療群20例は全例死亡していた。病型別の治療群生存率については1型100%、2型28%、3型76%であった。以上の結果は治療は一定の効果があるが、神経症状が重篤な症例には効果がないことを示していると考えられた。ほとんどの例（99%）ではERTで治療されており、この事実はERTが神経症状に効果がないことを示唆している。ADLについても同様に診断時から神経症状を呈してい