

200730015A

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 - 一般 - 019)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木義之

平成20(2008)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	.....	7
難波栄二		
3. 遺伝子組み換えG <sub>M1</sub> -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	.....	11
黒澤美枝子		
4. ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発	.....	13
大野耕策		
5. クラッペ病の欠損酵素galactocerebrosidaseの生化学的特性について	.....	15
酒井規夫		
6. ファブリー病患者由来変異酵素の小胞体関連分解とシャペロン効果に関する研究	.....	17
石井 達		
7. 立体構造予測と分子シミュレーションによるヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼの機能解析	.....	19
榑原康文		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....	22
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	.....	24
V. 健康危険情報	.....	24
VI. 研究成果の刊行物・別刷	.....	25

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
研究協力者	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
	大野 耕策	鳥取大学医学部・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
	飯田 真己	生化学工業株式会社中央研究所・マネージャー
	井田 博幸	東京慈恵会医科大学・教授
	一ノ宮悟史	国際医療福祉大学大学院
	伊藤 雅之	国立精神・神経センター神経研究所・室長
	衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学・教授
	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
楢垣 克美	鳥取大学生命機能研究支援センター・助教授	

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主要対象とするケミカルシャペロン治療薬の開発研究を行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症（ $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス）と $\beta$ -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- $\beta$ -パリエナミン）とNOV（N-オクチル- $\beta$ -パリエナミン）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し、脳障害の進行を軽減するという結果を得た。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、シャペロンと変異酵素の分子反応を分析した。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。そしてF213I変異発現トランスジェニックマウスの作成に成功し、現在交配により変異マウス株を確立中である。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た新しい分子治療法（ケミカルシャペロン療法）確立を目的とする。有機合成により開発したNOEV（N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -パリエナミン）を $\beta$ -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）細胞、モデル動物に、NOV（N-オクチル- $\beta$ -パリエナミン）

を $\beta$ -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投与し、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 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症、ファブリー病： $\alpha$ -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<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス

$\beta$ -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を導入し、軽症型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスを作成した。同時に、昨年度確立した疾患モデル動物の神経学的評価法を用い、NOEVの臨床効果を判定した。

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、臨床神経学的検査をおこなった。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。またF213I変異を発現するモデルマウスの作成を試みた。

### 3. クラッペ病

NOEVによる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ポシン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。そして日本人患者細胞のスクリーニングにより、シャペロン効果の頻度を調べた。

## C. 研究結果

### 1. G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス

軽症型モデルマウスに対するNOEV投与実験において、早期治療（生後2ヶ月開始）により、神経症状の進行が速やかに軽減することが分かった（図1）。

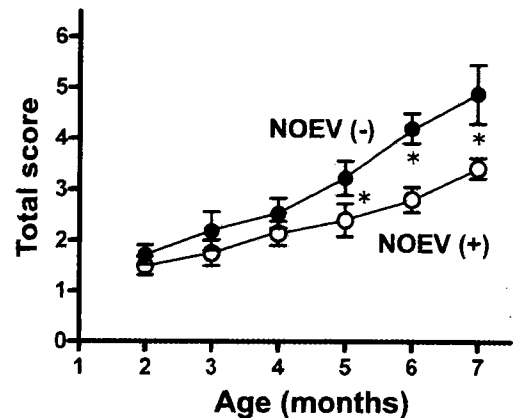


図1 NOEV投与後の神経学的スコア値の推移 (Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007)

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、基質の定量分析により改めて確認した。脳・肝・腎組織内のNOEV濃度は、実験期間中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G<sub>M1</sub>濃度は減少した（図2）。

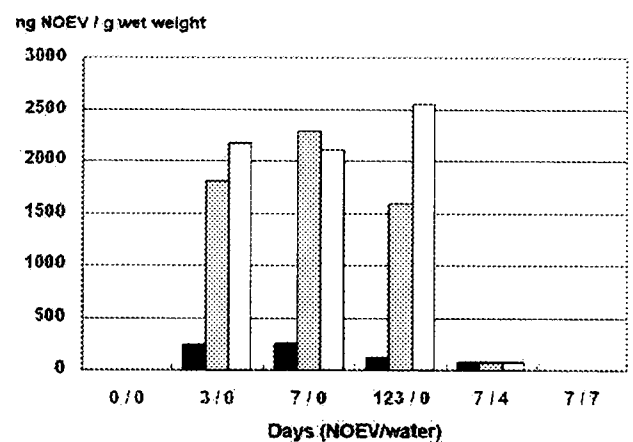


図2 シャペロン化合物NOEV経口投与後の組織内濃度の推移 (Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007)

この治療実験中、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。

変異遺伝子解析により新たに3種類の新規変異を同定した。マイクロアレイ解析により、R201C変異線維芽細胞（ヒト、マウス）、脳組織（マウス）

で多数の遺伝子に有意な発現変動があり、NOEV投与により正常化した。

これら動物個体へのシャペロン投与実験と共に、分子病態解析を行った。生後10ヶ月齢 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳で正常に比べオートファジー亢進があり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳および初代培養アストロサイトではチトクロームCオキシダーゼ活性が有意に低下し、ミトコンドリア形態異常と膜電位低下が見られた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損アストログリアはミトコンドリア酸化ストレスに対する感受性が高かった。

またNOEVを含む10種のバリエナミン化合物とヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子反応を検討した結果、NOEVが最も高い酵素に対する結合強度を示した。環境条件を変えてみると、pH7とpH5においてNOEVの結合強度に差があることが分かった。この結果からライソゾームの酸性条件で、酵素に対するNOEVの結合強度が弱くなる、したがって複合体が解離しやすくなると予測された。

## 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のシャペロン効果を調べ、F213I以外にN188S、N370S、G202Rに対して有効であること、G193W、L444P、D409Hに対して無効であることを明らかにした。またF213I変異発現マウスの作成に成功し、現在交配により系統化を進めている。

## 3. クラッペ病

培養細胞系で、NOEVによる欠損酵素ガラクトシルセラミド $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性還元実験を行った。酵素活性化蛋白質サポシンAを培養液に添加することにより、その効果発現に対する影響を調べた。しかし再現性のある確実なシャペロン効果を示す実験条件は得られていない。

## 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。日本人患者の培養細胞を用いたスクリーニングを行い、40-45%にシャペロン効果を認めた。

## 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 $\beta$ -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。この疾患に対して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高いということである。遺伝性 $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）については、現在のところ動物実験に至っておらず、細胞レベルでの実験分析であるが、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の長期投与実験を行い、臨床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けるNOEV1mM水溶液の投与実験では、見るべき副反応・副作用は観察されなかった。この点は、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、マウス以外の大動物に対する投与毒性試験を実施予定であり、最終的にヒト患者への臨床試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、 $\beta$ -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モデル動物治療実験、その病態解析を行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウスへのNOEV長期投与実験により、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、中枢神経系における形態的・化学的・臨床的評価を行うことにより、シャペロン効果の発現を再確認した。

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・治療の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. 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.
2. Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y: Development and medical application of unsaturated carbamoyl glycosylamine glycosidase inhibitors. *Mini-Rev Med Chem* 7: 679-691, 2007.
3. 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- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 587-596, 2007.
4. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO: Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Ann Neurol* 62: 671-675, 2007.
5. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Cell Molec Life Sci* 10: 351-353, 2008.
6. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka Susumu, Ninomiya, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 616-622, 2008.
7. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A:  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis):  $G_{M1}$ -Gangliosidosis and Morquio B disease. Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A (eds): *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* <<http://www.ommbid.com/>>, McGraw-Hill, New York, 2008.
2. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy: molecular mechanism and possible clinical application. International Symposium of Child Neurology, Ljubljana, Slovenia, June 1, 2007.
3. García-Moreno MI, Aguilar M, Ortiz Mellet C, Iwasaki H, Ohno K, Suzuki Y, García Fernández JM:  $sp^2$ -Azasugar glycosidase inhibitors as chemical chaperons for the treatment of lysosomal storage disorders. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Saint Petersburg, Russia, August 27-31, 2007.
4. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E: Dysregulation of Trk receptor signaling in  $\beta$ -galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会、横浜、9.10-12, 2007.
5. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Matsuda J, Iida M, Kubo T, Ogawa S: Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. 7th European Paediatric Neurology Society Congress, Kusadasi, Turkey; September 26-29, 2007.
6. 一ノ宮悟史、黒澤美枝子、飯田真己、檜垣克美、鈴木義之:  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床効果。第49回日本先天代謝異常学会、山形、10.15-17, 2007.
7. 檜垣克美、高村歩美、梶巻賢哉、飯田真己、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マウスモデル細胞を用いた解析、山形、10.15-17, 2007.
8. Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E: Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk receptors in the neurons of  $G_{M1}$ -gangliosidosis mouse brain. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Maihama, Japan, November 29-December 1, 2007.
9. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy: a new molecular therapeutic approach to lysosomal diseases. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases., Maihama, Japan, November 29-December 1, 2007.

### 学会発表

1. Suzuki Y: Molecular approaches to neurogenetic diseases:  $G_{M1}$ -gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt, January 25-26, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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、ライソゾーム病モデルマウスの作出と病態解析を行った。（1）ファブリー病モデルマウスとしてGb3（グロボトリアオシルセラミド）合成酵素遺伝子導入マウス1ラインを樹立し、全身的な細胞障害があることを明らかにした。

（2）ゴーシェ病モデルマウスとしてヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213I遺伝子導入マウス1ラインを系統化した。（3）G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスとしてヒト変異型 $\beta$ -ガラクトシダーゼR457Q遺伝子導入マウス4ラインを作出し、系統化を開始した。

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、これらの酵素異常により基質が蓄積し、多様な病態を示す（ライソゾーム酵素欠損症）。典型的には乳幼児期に発症し、多くは重症の中樞神経症状を伴い、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、中樞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導入により、G<sub>M1</sub>-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病態解析、ゴーシェ病モデルマウスの系統化、およびG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスの作出を行った。

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、昨年度までにGb3合成酵素を強発現するトランスジェニック(Tg)マウス1系統を作製した。今年度は、Gb3合成酵素Tgマウスの糖脂質分析（HPTLC）、血液生化学検査（心血液から血漿を分離、富士ドライケム3000使用）、および病理組織学的検査を行った。（帯広畜産大学 石井達先生と

の共同研究）

2) ゴーシェ病モデルマウス

ヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213Iを強発現するTgマウス2ラインを昨年度までに作製しており、RT-PCRによる発現解析を行い、系統化を進めた。（鳥取大学 大野耕策先生との共同研究）

3) G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウス

強発現用トランスジーンである、CAGプロモーターとヒト変異型 $\beta$ -ガラクトシダーゼR457QのcDNAとの融合遺伝子をC57BL/6Jマウスの受精卵前核に注入し、Tgマウスを作製した。（鳥取大学 難波栄二先生との共同研究）

（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

1) ファブリー病モデルマウス

Gb3合成酵素Tgマウスの心臓、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、肺、脳でGb3の増加を確認し、特に心臓において顕著であった。血液生化学検査ではGPT、GOT、LDH、CPK、BUNが増加しており、病理学的には膵臓の腺房細胞変性と炎症細胞浸潤、腺胃の腺細胞変性、肝細胞変性、心筋変性、間質性肺炎などが認められた。

2) ゴーシェ病モデルマウス

ヒト変異型 $\beta$ -グルコシダーゼF213I遺伝子の発現をRT-PCRにて1ラインで確認し、C57BL/6Jマウス

との交配により継代維持し系統化を行った。

### 3) G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウス

ヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q 強発現用トランスジーンDNAを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、360個の胚を偽妊娠マウス12匹に胚移植したところ26匹の産仔が得られ21匹が離乳した。21匹のうちPCRにて導入遺伝子を検索したところ8匹(8/21, 38.1%)が陽性であり、そのうち4匹について次世代にトランスジーンが伝達され、4ラインの系統化を開始した。

### D. 考察

Gb3合成酵素Tgマウスの生化学的、病理学的な病態解析を行ったところ、Gb3の過剰発現による全身的な細胞障害が起きているものと推察された。現在、α-Gal KOマウスとの交配を行っており、Gb3蓄積が増大し臨床症状を呈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。

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2匹のうち、遺伝子発現の確認された1匹について系統化を行った。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<sub>M1</sub>-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、4ラインのTgマウスを作出した。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。

### 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<sub>M1</sub>-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. Takamura A, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba, E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 616-622, 2008.
2. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady R O. Chemical chaperone therapy: Clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Ann Neurol* 62: 671-675, 2007.
3. Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and reflex testing in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis model mice. *Brain Dev* 29: 210-216, 2007.

#### 学会発表

1. Takamura A, Higaki K, Iida M, Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J. Dysregulation of Trk receptor signaling in β-galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会 (2007年9月)
2. 野口洋子、國枝孝典、山田-内尾こずえ、高野薫、小浦美奈子、鈴木治、塩塚力、石井達、松田潤一郎、「Gb3合成酵素遺伝子導入によるファブリー病モデルマウス作出の試み」第24回日本疾患モデル学会総会 (2007年8月)
3. 松田潤一郎、「遺伝子改変マウスを用いたライソゾーム病の新規治療法開発」臨床分科会シンポジウム、第143回日本獣医学会 (2007年4月)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



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

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス遺伝子変異解析を行い、3種類の新規変異を同定した。そのうちG190D変異はケミカルシャペロンNOEV (N-オクチル-4-エピ-β-β-パリエナミン) により酵素活性還元効果を示した。ヒト・マウス線維芽細胞およびモデルマウス脳組織を用い、DNAマイクロアレイ解析を行った。モデルマウス脳神経変性とオートファジーの異常について解析を行った。

A. 研究目的

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの遺伝子診断を行うとともに、マウスモデル実験系を用いた神経変性機構の分子解明とケミカルシャペロン療法の開発研究を行う。

B. 研究方法

1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とNOEV効果

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者末梢血または皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、WAVE fragment解析 (Transgenomic社) によるDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 解析を行った。遺伝子変異はdirect sequencingにより同定した。NOEV効果の検討は、培養皮膚線維芽細胞培養液中に0.2、2 μM NOEVを4日間添加後、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。

2. マイクロアレイ発現解析

培養正常ヒト、マウス線維芽細胞、R201C発現および0.2 μM NOEVを4日間投与したR201C細胞よりそれぞれRNAを抽出した。また、マウス大脳皮質（正常、β-ガラクトシダーゼ欠損、R201C、1 mM NOEVを16週間飲水投与したR201Cマウス）からそれぞれRNAを抽出した。マイクロアレイはイルミナSentrix human / mouse-6 expression beadchipを用い、発現結果の解析はGenespring GXおよびIngenuity Pathway Analysisソフトウェアを用いた。

3. オートファジー解析

オートファジー形成に関して抗LC3、抗Beclin-1抗体

を用い、Akt-mTORシグナルは抗Akt、Erk、mTOR、S6抗体およびリン酸化抗体を用い、ウェスタンプロット法により発現定量を行った。免疫蛍光染色はマウス脳凍結切片を用い行った。マウスアストロサイト初代培養は生後4日齢のマウス大脳組織より採取した。ミトコンドリアの解析はCytochrome C oxidase活性測定および、MitoTracker-JC-1を用いた。

C. 研究結果

6人のG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者について遺伝子変異解析を行った結果、それぞれR59H/L608P、L146del/?, R59H/R59H、G190D/G190D、W92ter/W92ter、Ins20bp;ex1/2/Ins2020bp;ex1/2変異 (L146del、G190D、W92terの3種類は新規変異) を同定した。また、4検体の皮膚線維芽細胞についてNOEV効果の検討を行った結果、G190D/G190Dで3-4倍の酵素活性還元効果を認め、R59H/R59H、W92ter/W92terおよびG438E/G438E変異はNOEV効果を認めなかった。

マイクロアレイ解析の結果は、正常に比べR201Cで有意な発現変動を示し、かつNOEVにより正常化した遺伝子として、ヒト線維芽細胞で6,684遺伝子、マウス線維芽細胞で4,889遺伝子、マウス脳で867遺伝子を同定した。

生後10ヶ月齢β-ガラクトシダーゼ欠損マウス脳で正常に比べオートファゴソーム形成蛋白質LC3-IIとBeclin-1の発現が上昇していた。それに伴い、リン酸化Akt、Erk、mTORの発現上昇も見られた。β-ガラクトシダーゼ欠損マウス脳および初代培養アストロサ

イトではCytochrome C oxidase活性が有意に低下し、ミトコンドリアの形態異常と膜電位の低下が見られた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損アストロサイトはミトコンドリア酸化ストレスに高感受性を示し、ATP、オートファジー抑制剤3-methyladenine、カスパーゼ阻害剤z-VAD-fmkにより抑制された。

#### D. 考察

今回新たに4検体の線維芽細胞についてNOEV効果の検討を行った結果、G190D変異蛋白質に対しNOEVの有為な効果が認められた。この効果は0.2  $\mu$ Mで2.4倍、2  $\mu$ Mで4.1倍の還元効果であった。R59HとG438E変異についてはこれまでマウス発現系において得られていた結果と同一のものであった。また、W92ter変異については部分蛋白質もしくは蛋白質欠失のため、全長構造を持つ蛋白質が生成されていないため、NOEVの効果は見られなかったと考えた。

マイクロアレイ解析はマウス神経変性分子機構とそれに対するNOEV効果の解析を目的として行った。これまでの解析からヒト、マウス線維芽細胞、マウス脳組織の発現結果の間にはあまり相関が見られない。今後はヒト、マウス線維芽細胞とマウス脳組織を分けて詳細な機能解析を行う予定である。また、疾患に伴い発現変動した遺伝子のうちNOEVにより発現が正常化しなかった遺伝子群についても解析を行う予定である。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳におけるオートファゴソーム形成蛋白質の上昇はライソソーム内 $G_{M1}$ 蓄積によるオートファゴソームとライソソームの融合不全による。培養 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損アストロサイトのミトコンドリア機能異常は、ATP添加またはオートファジー阻害剤により抑制されることから、オートファジー異常と細胞死の関連性が示された。最近、ニーマン・ピック病、ポンベ病などの疾患でも同様の所見が得られており、オートファジー機能不全はライソソーム病一般に共通する病態の可能性が示唆されている。

#### E. 結論

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析により3種類の新規変異を同定し、そのうちG190DはNOEV効果を認めた。マイクロアレイによる網羅的な発現解析に

よりNOEV効果の分子機構の解明を行った。 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウス脳神経変性とオートファジーの異常・ミトコンドリア機能不全との関連性を示した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO. Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Ann Neurol* 62, 671-675, 2007.
2. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 616-622, 2008.

##### 学会発表

1. 難波栄二、檜垣克美：DNAマイクロアレイを用いた $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス神経変性機構の解明。第49回日本小児神経学会総会、大阪、2007.7.
2. 澤田智、田中あけみ、瀬戸俊之、松田潤一郎、難波栄二、山野恒一：ライソソーム病の脳内病変に対する細胞治療。第49回日本小児神経学総会、大阪、2007.7.
3. 高村歩美、檜垣克美、松田潤一郎、飯田真巳、鈴木義之、難波栄二： $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の神経変性におけるTrk受容体の機能異常。第30回神経科学大会、横浜、9.2007.
4. 檜垣克美、高村歩美、梶巻賢哉、飯田真巳、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マウスモデル細胞を用いた解析。第49回日本先天代謝異常学会総会、山形、11.2007.
5. 澤田智、田中あけみ、瀬戸俊之、前田光代、高村歩美、檜垣克美、難波栄二、松田潤一郎、山口悦子、山野恒一：細胞移植によるライソソーム病脳病変の長期治療の可能性についての検討。

第49回日本先天代謝異常学会総会、山形、11.  
2007.

6. 一ノ宮悟史、黒澤美枝子、飯田真巳、檜垣克美、  
鈴木義之：G<sub>M1</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の臨床効  
果.第49回日本先天代謝異常学会総会、山形、11.  
2007.

7. Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E:

Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk  
receptors in the neurons of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis mouse  
brain. International Symposium of Lysosomal Storage  
Diseases. Tokyo, 12. 2007.

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

遺伝子組み換えG<sub>M1</sub>-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、山下敦子 国際医療福祉大学大学院

## 研究要旨

遺伝性脂質蓄積症G<sub>M1</sub>-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を用いて、シャペロン化合物NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine)の経口持続投与の効果を検討した。その結果、神経症状の発症前（生後2ヶ月齢）からNOEVの経口持続投与を開始すると、発症初期（生後5ヶ月齢）から投与を開始するより、神経症状の発現を遅らせる効果が大きいことがわかった。また、投与するNOEVの濃度を0.1mM、1mM、3mM、10mMに変えて効果を検討したところ、10mMでは顕著な毒作用が認められたが、1mMまでのNOEV投与においては、実験中に特異的な毒性及び副反応は認められないことが明らかとなった。

## A. 研究目的

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスを対象としてこれまで開発・確立してきた神経学的検査法を用いて、ケミカルシャペロン療法の効果を検討することを目的とした。

具体的には、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスにガラクトース類似誘導体NOEVを経口投与し、神経学的に検査して得られたスコア値に対する影響を調べた。そして、そのスコア値に対するNOEVの投与量、投与時期、投与間隔（持続投与あるいは間歇投与）が与える影響を検討した。

## B. 研究方法

## 1. 動物

既に確立したG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウス(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。それぞれの個別的検査項目スコア値ならびにその総スコア値を算出した。

## 3. シャペロン治療薬投与

シャペロン化合物NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine)を水溶液としてアドリブ経口投与した。

## ①NOEVの投与開始時期の検討

神経症状発症前の生後2ヶ月からのNOEV投与群と、発症初期の生後5ヶ月からNOEV投与を開始した群とを比較した。NOEVは1mMを持続経口投与した。

## ②NOEV濃度の検討

0.1、1、10mMの濃度のNOEVを生後1か月齢から少数のモデルマウスに持続経口投与し、効果を比較した。

## ③持続投与と間歇投与の比較

3mMの濃度のNOEVを持続投与群と各3日間の間歇投与群とにわけ、効果を比較した。

## 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

## ①NOEVの投与開始時期

生後2ヶ月（発症前）からNOEVの経口投与を開始した群では生後5ヶ月齢以降、同月齢の非投与群に比べ、神経学的総スコア値の上昇が有意に抑制された。一方、生後5ヶ月（発症初期）からNOEVの経口投与を開始した群での神経学的総スコア値に与える効果は弱く、神経症状が著しくなる死亡直前のスコア

上昇を抑制するのにとどまった。

#### ②NOEVの用量依存性の効果

少数例ではあるが、神経学的総スコア値に対する効果がNOEV1mMと0.1mMの投与でほぼ同じであった。NOEV10mMの投与は体重の減少を引き起こし、投与開始後2ヶ月で死亡に至った。

#### ③NOEV持続投与と間歇投与の比較

3mMNOEVの間歇投与は、神経学的総スコア値に対して持続投与ほど明確な抑制効果を示さなかった。

### D. 考察

NOEVの持続経口投与により、 $G_{M1}$ -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遅らせる可能性が示唆された。

特にNOEVは症状が発症する前から投与を開始することにより、治療効果が向上する可能性が示された。また、NOEVを0.1mM、1mM、10mMの濃度で持続投与の影響を検討したところ、1mMまでのNOEV投与においては、神経学上は、治療実験中に特異的な毒性、および副反応は認められなかった。一方、10mMのNOEV投与では、急激な飲水量、体重減少に続いてマウスが死亡した。副作用、毒作用が起こるメカニズムについても今後検討が必要である。

また、3mMのNOEVにて間歇投与と持続投与とを行ったところ、間歇投与では持続投与に認められるほどの効果が見られないことが示された。今後例数を増やして検討を進める必要がある。

### 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用いて、ケミカルシャペロン療法の効果を検討したところ、シャペロン化合物のNOEVの持続投与により、 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的症状が抑制されることが明らかとなった。今後、引き続き同モデルマウスにおいて、NOEV投与の効果・毒性を詳細に検討する必要がある。また、ヒト治療応用といった臨床に向けてのアプローチも今後の実験方針とする。

### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO: Chemical chaperone therapy : Clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. Ann Neurol 62 : 671-675, 2007.

#### 学会発表

1. 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真己, 檜垣克美, 鈴木義之:  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床効果. 第49回日本先天代謝異常学会・第6回アジア先天代謝異常学会, 山形, 11.15-17.2007.

### 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・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  
松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所

研究要旨

Fabry 病の原因酵素である  $\alpha$ -ガラクトシダーゼのある種の変異は、ガラクトースおよびその類似体の添加によって活性化されることが鈴木らによって明らかにされ、ケミカルシャペロン療法と命名された。この原理はすべてのリソゾーム酵素にも応用可能であり、我々は、 $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ( $\beta$ -Glu)の遺伝子変異によるライソゾーム病である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を分担した。グルコース類似体 N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV) が、 $\beta$ -Glu F213I 変異体に酵素活性増強効果 (enzyme enhancement activity: EEA)を示すことを報告し (Lin H, et al., Biochim Biophys Acta 2004)、17-19 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 は F213I 以外に N188S、N370S、G202R に対して有効であることを明らかにした (Lei K, et al. Biochim Biophys Acta 2007)。これらの試験管内実験の成果に基づき、個体での治療効果を検討するために、F213I 変異を持つ Gaucher 病モデルマウスを作成中である。

A. 研究目的

我々は、鈴木義之博士と共同で  $\beta$ -グルコシダーゼ ( $\beta$ -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- $\beta$ -valienamine, NOV) が F213I 変異  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -Glu (wild-type および 6 種類の変異体: N188S, G193W, G202R, F213I, N370S, L444P) を pCAGGS-MCS vector に組み込み一過性に発現させ、抗 Flag 抗体免疫沈降産物中の酵素活性を測定した。

3. F213I 変異を持つヒト  $\beta$ -Glu cDNA を組み込んだ pCAGGS-MCS vector をマウスに導入し、トランスゲニックマウスを作成した。ヒト  $\beta$ -Glu cDNA が導入されているかどうかをマウスの尾を用いて、ヒト  $\beta$ -Glu cDNA 断片および CAG プロモーター領域の PCR による検出、およびヒト  $\beta$ -Glu 蛋白および活性の検出によって検討した。

$\beta$ -Glu ノックアウトマウスと交配し、ヒト F213I 変異  $\beta$ -Glu を発現するマウスの作成をしている。

## 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。

### 2. COS 細胞発現系での NOV の効果

COS 細胞に Flag-標識 $\beta$ -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。

### 3. F213I $\beta$ -Glu トランスゲニックマウス、ワイルドタイプ $\beta$ -Glu トランスゲニックマウスの作成

F213I $\beta$ -Glu cDNA を導入した 97 匹中ヒト $\beta$ -Glu cDNA 断片が検出されたものは 25 匹で、その 25 匹中 CAG プロモーター領域が検出されたものは 5 匹であった。このうち $\beta$ -Glu 活性の上昇を認めたものは 1 匹であったが、 $\beta$ -Glu の蛋白は確認出来なかった。

ワイルドタイプ $\beta$ -Glu cDNA を導入した 70 匹のマウス中、ヒト $\beta$ -Glu cDNA 断片が検出されたものは 26 匹で、その 26 匹中 CAG プロモーター領域が検出されたものは 3 匹であった。このうち $\beta$ -Glu 活性の上昇と $\beta$ -Glu の蛋白が確認出来たものはなかった。

現在、F213I $\beta$ -Glu 遺伝子とプロモーターが確認され、 $\beta$ -Glu 活性の上昇を認めたものは 1 匹由来の子孫と $\beta$ -Glu ノックアウトマウスを交配中である。

## 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。

$\beta$ -Glu ノックアウトマウス( $\beta$ -GluKO)は生後 48 時間以内に死亡する。現在、 $\beta$ -Glu ノックアウトマウスに F213I $\beta$ -Glu を導入したマウスを作成中である。F213I を発現するマウスも早期に死亡する可能性が

あり、妊娠中に NOV を服用させ、F213I の活性化を行ったマウスの作成も考慮に入れ、モデルマウスの作成に全力を尽くしている。

## E. 結論

NOV は $\beta$ -Glu 変異体に対する分子シャペロンとして働く。個体レベルでの有効性、毒性の検討を緊急に行う必要がある。

## 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, Suzuki Y. Enzyme enhancement activity of N-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772:587-96, 2007.
2. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO. Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Ann Neurol.* 62:671-5, 2007.
3. Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators of transcription in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J Neurosci.* 27:1879-91, 2007.
4. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 367: 616-622, 2008.

## 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（こころの健康科学研究事業）  
 分担研究報告書

クラッペ病の欠損酵素galactocerebrosidaseの生化学的特性について

分担研究者 酒井規夫 大阪大学大学院医学系研究科 小児発達医学講座 講師

研究要旨

リソソーム病の1つであるクラッペ病は根本的な治療法のない遺伝性脱髄疾患である。分子シャペロン法の応用の可能性を調べるために、欠損酵素galactocerebrosidaseの生化学的な特徴について解析し、酵素阻害活性のあるNOEVの影響について解析した。

A. 研究目的

変異蛋白の特徴について患者細胞を用いて調べる。シャペロン物質 NOEV の患者皮膚線維芽細胞における酵素活性に対する効果を調べ、有効な細胞株を検索する。

B. 研究方法

変異蛋白の残存酵素活性は低値であり、感度よく測定するための酵素測定条件の検討を行った。変異蛋白の活性は正常の10%以下であり、熱などに対する安定性にも問題がある可能性があるため、その酵素活性の測定条件について解析した。

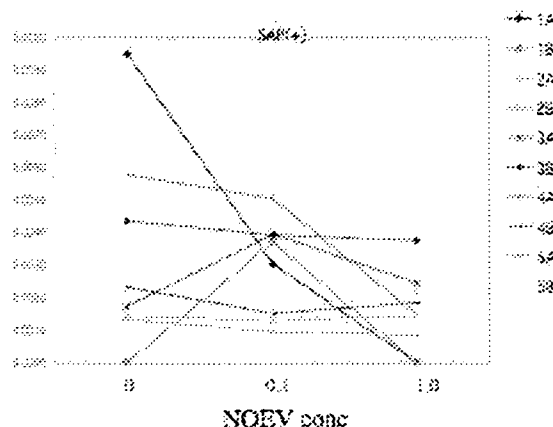
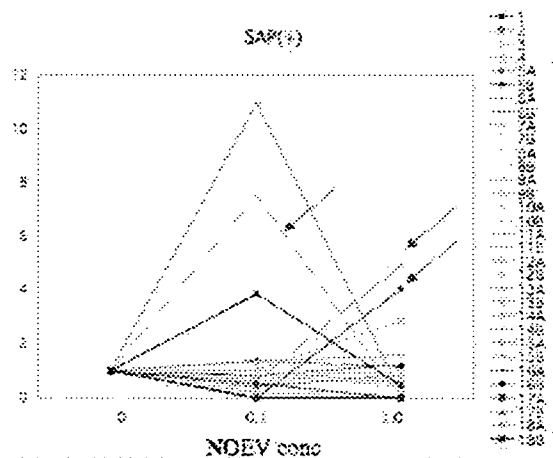
シャペロン物質 NOEV の患者皮膚線維芽細胞における酵素活性に対する効果；患者皮膚線維芽細胞の培養上清にシャペロン物質 NOEV を添加し、4日間培養後、細胞を回収し細胞内酵素活性を測定した。昨年度9名について行なったが、今年度は新たな線維芽細胞について乳児型13名、若年型5名の計18名の細胞を用いて解析を行なった。付加実験は6穴デッシュを用いて1細胞株あたり2枚ずつ同じ条件で付加を行なった。2回目のスクリーニングも2デッシュずつ実験を行なった。また遺伝子変異についても確認した。また、galactocerebrosidaseの活性化因子として知られるSAP蛋白質の添加による効果についても検討した。

なお、患者細胞の遺伝子解析、細胞利用に関しては、患者から書面による説明と同意を得ている。

C. 研究結果

酵素活性の測定条件について解析し、37度のインキュベーション時間に関して1時間から24時間

まで比較を行なったところ、2時間を過ぎると却って活性低下があり、これは反応中の酵素の失活を反映していると考えられた。またサンプルのタンパク量については、0.5, 5, 50 ngで比較したところ、50 ngが測定値が安定しており、測定はこれ以上が望ましいと考えられた。





シャペロン物質NOEVの患者皮膚線維芽細胞における酵素活性に対する効果；18名の患者皮膚線維芽細胞においてNOEVを0.5, 2.0, 6.0 $\mu$ Mの濃度において付加し、またサポシンAの付加の有無による影響に関しても検討した。1回目のスクリーニング検査にて反応があると考えられた細胞株は5つあったが、2回目の実験にて再現性のある活性増加が確認できた細胞は見いだせなかった。

#### D. 考察

NOEVのガラクトセレブロシダーゼに対する阻害効果は大変強いものであったが、今年度調べた18種類の細胞株での残存活性が確実に上昇するものは見いだせなかった。本物質が阻害活性はあるが、シャペロンとしての活性はガラクトセレブロシダーゼに対してはあまりないのか、それとも、活性測定に関して病因となるサイコシンに対する活性を指標にするべきか、今後の課題である。

#### E. 結論

NOEVの効果について現在使用可能な18種の細胞に関して付加実験を行なったが、再現性のある明らかな活性増加を認める細胞は見いだせなかった。NOEVの活性の確認には別の測定系を検討することが必要と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, Suyama T, Sakamoto F, Itoh M, Miyabayashi S, Ohnishi T, Sakai N, Wataya-Kaneda M, Kubota M, Takahashi T, Mori T, Tamura K, Kageyama S, Shio N, Maeba T, Yahagi H, Tanaka M, Oka M, Sugiyama H, Sugawara T, Mori N, Tsukamoto H, Tamagaki K, Tanda S, Suzuki Y, Shinonaga C, Miyazaki J, Ishii S, Gejyo F: Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone., Hum Mutat. 29:331, 2008.

##### 学会発表

1. 日中先天性代謝異常症研究会 2007、北京、5.25-27, 2007. 招待講演、酒井規夫；

- 1) Methods for enzyme determination required for clinical diagnosis of lysosomal storage diseases and glycogen storage diseases,
- 2) Recent advance of diagnosis and treatment for lysosomal diseases.
2. 大阪新生児研究会、教育講演、酒井規夫；周産期医療における遺伝カウンセリング。大阪、6.16, 2007.
3. Urayasu, Araya K, Shimono K, Okinaga T, Mohri I, Ohta H, Sakai N, Taniike M, Ozono K, Histological evaluation of mucopolysaccharidosis II patient brain treated with hematopoietic stem cell transplantation. International symposium of lysosomal storage disease, 11.29-12.1, 2007.
4. Urayasu, Otomo T, Muramatsu T, Inui K, Yorifuji T, Nakabayashi H, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okuyama T, Ozono K, Sakai N, Mutation analysis of GNPTAB gene in 36 Japanese mucopolysaccharidosis II and III patients: genotype phenotype correlation. International symposium of lysosomal storage disease, 11.29-12.1, 2007.

厚生労働科学研究補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ファブリー病患者由来変異酵素の小胞体関連分解とシャペロン効果に関する研究

分担研究者 石井 達 帯広畜産大学 教授

研究要旨

ファブリー病患者由来変異酵素の多くは、小胞体関連分解 (ERAD) 阻害剤の影響を受けること、また試験管内合成した変異酵素は小胞体膜内で速やかに分解されたことから ERAD により除去されると考えられる。さらに変異酵素は平常状態では小胞体に局在するが、DGJ 投与によりリソソームに移行することが免疫電顕により確認された。

日本人ファブリー病患者の遺伝子解析により新たに同定された24種の変異遺伝子を発現させ DGJ の影響を調べたところ11種において有意な活性上昇が認められた。

A. 研究目的

先に我々は残存活性を有するファブリー病患者由来変異酵素の多くは熱安定性が低いフォールディング異常酵素であり、これらの変異酵素に対し活性部位特異的シャペロンである1-デオキシガラクトノジリマイシン(DGJ)は、顕著な酵素活性の上昇と細胞内局在性の正常化に寄与することを見出した。そこで今回こうした変異酵素が受ける細胞内分解機構について調べるため小胞体関連分解(ERAD)阻害剤の影響と免疫電顕による細胞内局在性を検討し、DGJが影響する変異酵素の特徴を明らかにする。

また、日本人ファブリー病患者の遺伝子解析とそこで認められた遺伝子変異に対するシャペロン療法適応可能な変異の割合についても検討する。

B. 研究方法

残存活性を有する18種の変異酵素をCOS-7細胞で一過性に発現させ、ERAD阻害剤である小胞体マンノシダーゼ阻害剤（キフネンシン）とプロテアソーム阻害剤（ラクタシスチン）の添加効果を検討した。

試験管内タンパク質合成と小胞体膜を用いた小胞体内酵素安定性について正常酵素と変異酵素で比較した。また変異酵素の細胞内局在を、金コロイド結合2次抗体を用いた免疫電顕により解析した。

31家系の日本人ファブリー病患者で認められた24種の遺伝子変異についてCOS-7細胞で発現しDGJ

の添加効果を検討した。

C. 研究結果

18種の変異酵素のうち、E59K変異を除く17種でキフネンシン添加による酵素量の増加が確認され、またラクタシスチン添加では5種の変異で顕著な増加が確認された。今回初めてファブリー病患者由来変異酵素を試験管内タンパク質合成と小胞体膜内への取り込み及びそこでの安定性を検討する実験系の構築に成功し、正常酵素と比較したところ変異酵素は速やかに分解され、小胞体内で処理されていることが証明された。

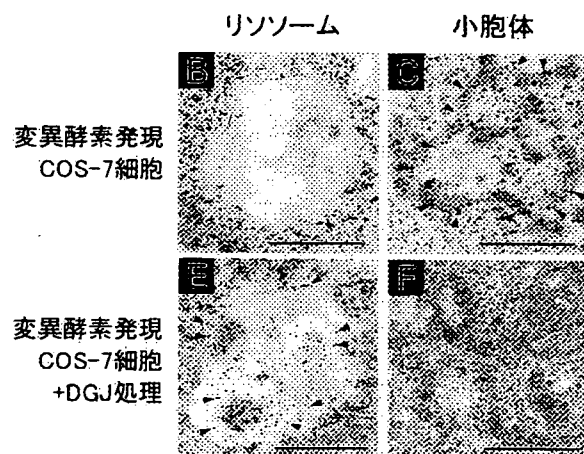


図1 抗 $\alpha$ -Gal A抗体を用いた免疫電顕像  
(矢印で示す粒子が変異酵素の存在を表わす)

また、図1に示すように免疫電顕により変異酵素は小胞体に局在するが、DGJ添加によりリソソームへ移行することが確認された。

今回新たに日本人のファブリー病患者より同定された24種の変異には18種のミスセンス変異の他、3種のノンセンス変異と3種の部分欠失・挿入が含まれていた。これらをCOS-7細胞で発現させDGJの添加効果を検討したところ、11種の変異において顕著な活性上昇が認められた。

#### D. 考察

E59Kは以前の細胞内挙動においても特殊な変異であり、正常酵素と同様に小胞体を抜けてリソソームへ移行する変異であることを認めている酵素である。それ以外の変異酵素についてはすべてキフネンシンで顕著に酵素量が増加したことからこれら変異酵素はERADでの分解を受ける構造異常タンパク質であることが確認された。

昨年までの検討で、DGJ処理により酵素量の増加のみならず、細胞内局在が変化することを認めていたが、今回免疫電顕により、小胞体に局在していた変異酵素が、DGJ処理によりリソソームへ移行することが証明された。

#### E. 結論

残存活性を有する変異酵素は主に小胞体で分解されており、DGJのシャペロン効果は小胞体内で変異酵素のフォールディングを正常化することにあると考えられる。こうして矯正された変異酵素は小胞体を抜け、リソソームに局在することが確認された。

また約半数の変異に対してDGJが有効であることが確認され、日本人のファブリー病治療においてはシャペロン療法が有用であると結論した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Ishii S, Chang H-H, Kawasaki K, Yasuda K, Wu H-L, Garman SC, Fan J-Q: Mutant  $\alpha$ -galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 406: 285-295, 2007.
2. Fan J-Q, Ishii S: Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease: Yin and Yang of enzyme inhibitors. *FEBS J* 274: 4962-4971, 2007.
3. Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, Suyama T, Sakamoto F, Itoh M, Miyabayashi S, Ohnishi T, Sakai N, Wataya-Kaneda M, Kubota M, Takahashi T, Mori T, Tamura K, Kageyama S, Shio N, Maeba T, Yahagi H, Tanaka M, Oka M, Sugiyama H, Sugawara T, Mori N, Tsukamoto H, Tamagaki K, Tanda S, Suzuki Y, Shinonaga C, Miyazaki J, Ishii S, Gejyo F: Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. *Hum Mut* 29: 331, 2008.

##### 学会発表

1. 濱中良志、矢野信次、川・邦人、中村三紀、渡邊誠、石井 達：ファブリー病における DGJ (deoxygalactonojirimycin) の作用機序。第 80 回日本生化学会大会、横浜、12, 2007.

#### 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

## 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

分担研究者 榊原康文 慶應義塾大学 教授

## 研究要旨

ケミカルシャペロン療法は、ライソゾーム酵素の阻害剤を与えることによってその酵素の変異体を救済する療法である。変異体酵素が救済され、ライソゾーム内に輸送されると阻害剤の結合強度が弱くなり、また本来の基質が過剰に存在するので変異体酵素が正常に働くと考えられている。結合強度が弱くなる要因はライソゾーム内における低pHの影響ではないかと予想されている。本研究ではAUTODOCK4、AMBER9等を用いてヒトβ-ガラクトシダーゼと化合物のドッキングシミュレーションを行い、NOEVより結合強度の強い阻害剤の探索と低pHにおけるヒトβ-ガラクトシダーゼとNOEVの結合強度の変化を予測した。

## A. 研究目的

ケミカルシャペロン療法は、ライソゾーム酵素の阻害剤を与えることによってその酵素の変異体を救済する療法である。変異体が救済され、酵素の細胞内活性が復活するまでの分子メカニズムは、(i) 変異体酵素に阻害剤が結合し安定化する、(ii) 変異体酵素が分解されずにライソゾームに輸送される、(iii) ライソゾーム内においては変異体酵素と阻害剤の結合強度が弱くなり、また本来の基質が過剰に存在するので変異体酵素が正常に働く、と考えられている。ここで(i)、(ii)の段階は実験的に確かめられているが、(iii)はまだ仮説の段階であり、結合強度が弱くなる要因はライソゾーム内における低pHの影響ではないかと考えられている。

本研究はヒトβ-ガラクトシダーゼに作用する阻害剤の探索と低pH条件化における阻害剤と酵素の結合強度の低下について、分子動力学シミュレーションを用いて解析した。

## B. 研究方法

まず、ヒトβ-ガラクトシダーゼの立体構造予測を行った。ホモロジーモデリングにより構造を予測したのち、分子動力学法を用いて最適化した。テンプレートにはアオカビβ-ガラクトシダーゼを選択した。ホモロジーモデリングには3D-JURY、分子動力学法の実行にはAMBER9を用いた。

次に結合強度を予測する化合物を設計した。既にケミカルシャペロン療法の候補となっているNOEVとその類似化合物10種（図1）を用意した。

それら11種の阻害剤および阻害剤候補について、AUTODOCK4を用いてヒトβ-ガラクトシダーゼとドッキングさせた。その際にはアオカビβ-ガラクトシダーゼとガラクトース複合体の構造を参考にAUTODOCK4の出力結果の中から1<sup>st</sup>2配座を選出した。その後、AMBER9によって400psの分子動力学シミュレーションを行った。

結合強度は結合自由エネルギーで評価した。シミュレーションで得られた結果よりMMPBSAを用いて結合自由エネルギーを計算した。

また、中性条件下との変化を見るため、低pH条件で同様の実験を行った。低pH状態は酵素のイオン性残基の水素化状態を調節することで実現し、化合物はNOEVのみを用いた。イオン性残基の水素化状態を判断する際にはPROPKAを用いた。PROPKAはタンパク質のイオン性残基についてプロトンの解離定数pKaを予測するツールである。条件として考えるpHよりpKaが高ければその残基は水素付加状態、低ければイオン状態と判断した。水素化状態を判断したのち、ドッキング、シミュレーション、結合自由エネルギー予測を行った。