

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 鈴木 義之

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
研究要旨・研究組織	1
本文	
A. 研究目的	2
B. 研究方法	2
C. 研究結果	3
D. 考察	7
E. 結論	8
F. 研究発表	8
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
III. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	
A. 知的財産権の出願・登録状況	16
B. 実用新案登録	16
C. その他	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	17

## 総合研究報告

## 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

主任研究者 鈴木 義之 国際医療福祉大学大学院教授

## 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- $\beta$ -バリエナミン)とNOV(N-オクチル- $\beta$ -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。 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス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。そしてこの病気について、他の側面から蛋白質機能、遺伝子発現の変化を探索し、シャペロンによる病態矯正効果を確認した。ゴーシェ病については、特定の $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子変異に対して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。

## 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

## 研究協力者

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生
大久保眞人	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
奥宮 敏可	熊本大学医学部・助教授
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
檜垣 克美	鳥取大学生命機能研究支援センター・助教授

## A. 研究目的

小児期の代表的な疾患、ライソゾーム病を対象モデル疾患として選び、遺伝子変異による脳の病気に対する新しい経口薬治療法を開発することを目的とする。現在、単一遺伝子病に対して遺伝子治療、蛋白質補充療法などが試みられているが、脳障害に対する効果は確認されていない。われわれが最近提唱してきたケミカルシャペロン療法の理論は1993年以来試験管実験と細胞実験により十分に確認し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症に対して、モデル動物を用いた実験成果を発表した。本研究ではこれまでの15年間にわれわれが研究し発表してきた新しいアプローチを、脳組織そのものに対する経口薬剤治療法として確立するという形で完成させようとするものである。ヒト患者に対する治療実験開始を最終目標とする。

## B. 研究方法

### 1. シャペロン化合物

$\beta$ -ガラクトシダーゼ阻害剤・N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン (NOEV) と  $\beta$ -グルコシダーゼ阻害剤・N-オクチル- $\beta$ -バリエナミン (NOV) は研究協力者である飯田真己氏 (生化学工業株式会社) による大量合成法の確立により、細胞実験、マウス個体実験のために定期的な供与を受けた。これらのシャペロン化合物は、 $\beta$ -ガラクトシドーシス ( $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス、モルキオB病) とゴーシェ病について、ヒト患者由来線維芽細胞、モデルマウス由来の線維芽細胞、酵素欠損モデルマウス個体の実験に、水溶液として投与した。

### 2. 実験材料の作成

遺伝子標的破壊により、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ完全欠損ノックアウトマウスを作成した。この変異マウス系統にヒト病型特異的  $\beta$ -ガラクトシダーゼ変異遺伝子をトランスジーンとして導入し、種々の軽症型モデルマウスを作成した。その中でシャペロン化合物 NOEV に対する反応の良好な変異 R201C を発現する系統のマウス (軽症型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス) を選び、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性発現、病態改善のための実験を行った。

同様に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性欠損マウスの作成を試みた。すでに作成されている完全欠損ノックアウトマウスは新生児期に死亡する重症型であり、この種の実験に使うことができないので、同様の手法により F213I 変異を発現する軽症型マウスを作成した。

ファブリー病モデル動物として、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A 遺伝子ノックアウトマウスが作成されているが、症状発現が明らかでない。そこでその蓄積物質グロボトリアオシルセラミド (Gb3) を過剰発現する個体との組み合わせにより、過剰な基質蓄積を示す動物が作成できると期待される。この脂質の合成酵素遺伝子をトランスジーンとして導入し、その個体特性を調べた。

### 3. 細胞内病態解析

$G_{M1}$ -ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、ファブリー病、クラッペ病、ポンペ病について細胞実験を行った。ヒト患者由来の線維芽細胞、疾患モデルマウス由来の線維芽細胞、ノックアウトマウス由来の線維芽細胞にヒト変異 cDNA を導入した安定発現細胞株、一過性に変異遺伝子を発現した COS-7 細胞を使用した。

変異解析を継続し新しい変異遺伝子の探索、シャペロン投与後の酵素活性化 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ) の分子機構の検討、電子顕微鏡による細胞内動態の形態観察、化学分析などを行った。さらに培養細胞やマウス大脳組織を対象とするマイクロアレイ発現解析、疾患モデルマウスの神経変性機構へのアプローチとして、Trk 解析、小胞体ストレス解析、オートファジー解析を行った。

### 4. マウス個体実験

マウスの病理学的解析は、ヘマトキシリン・エオシン染色、クリューバー・パレラ染色、クレシルバイオレット染色、PAS 染色、ポディアン銀染色などによる光顕観察、抗 GFAP 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 COX-2 抗体などによる免疫組織化学観察、電子顕微鏡観察などを併用し、疾患モデルマウスの自然経過、シャペロン投与の効果などを評価した。蓄積した脂質はすでに確立した糖脂質抽出・薄層クロマトグラフィー分離のあと、スキャナーによる定量を行った。また脳組織の  $G_{M1}$  を免疫染色後、共焦点蛍光比色法による定量を試みた。

マウスの神経学的評価法を新しく開発した。すでにヒト乳幼児に広く用いられている神経学的検査法をもとに、マウスの運動機能を姿勢、肢位、反射機能などの側面から観察し、それぞれの検査項目の半定量的なスコア化を行い、神経学的病態の進行を数量化した。この方法を正常マウス、重症型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスマウス (酵素完全欠損ノックアウトマウス)、軽症型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスマウス (R201C 変異発現トランスジェニックマウス) の発達・老化に伴う経

過について検討した。

次いでNOEV投与による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、上記の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。

## 5. $\beta$ -ガラクトシダーゼ分子の構造予測と機能解析

ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子構造についての情報は無い。そこで3D-JURYを用いたホモロジーモデリングによる構造予測を行い、AMBER9による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 $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた。さらに変異挿入後の変動を調べた。

次に活性部位の認識にかかわる化合物としてガラクトースを選び、野生型あるいは変異酵素との複合体の $K_m$ 値予測を行った。そしてNOEVをはじめとするシャペロン化合物との結合強度を計算し、環境pHの影響を調べた。

## 6. 倫理面への配慮

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。

## C. 研究結果

### 1. 疾患モデル動物の作成 (松田潤一郎)

これまでに以下の3種の新しいモデルマウス作出に成功した。

#### a) $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス

すでに数種の $\beta$ -ガラクトシダーゼ変異遺伝子発現マウス系統を確立したが、本研究では、乳児型 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス症例に発見され、NOEV反応性の高いR457Q変異を発現するトランスジェニックマウス4ラインを作出し、系統化を開始した。このマウスを用いることにより、今後の動物実験の期間短縮が可能になると期待する。

#### b) ゴーシェ病

日本人患者に多いF213I変異のトランスジェニック(Tg)マウスのラインを確立し、系統化した。現在そ

の継代維持が進行中である。

#### c) ファブリー病

Gb3合成酵素を過剰発現するTgマウス1系統を確立し、その病態を調べた。脳を含む多くの臓器、特に心臓にこの脂質が過剰に蓄積していた。脾臓、腺胃、肝臓、心筋、肺など、多くの組織に変性炎症所見を認めた。

## 2. $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス

### a) NOEV分析 (飯田真己)

NOEV分析法を確立し、R201C発現モデルマウスへの経口投与後の組織・体液内濃度の変化を追及した。6ヵ月投与後の組織内の濃度は、腎臓、肝臓、脳の順に高く、尿に大量の排泄を認めた。NOEV投与開始後1週間以内に飽和し、3ヶ月間その濃度が維持され、投与を中止すると速やかに消失した(図1)。

野生型マウスに短期間の経口投与を行った。1週間で血漿中濃度が最高となり、以後4日以内にほとんど消失した。尿中排泄は著しく高く、NOEV投与を中止後4-7日以内にほとんど消失した。

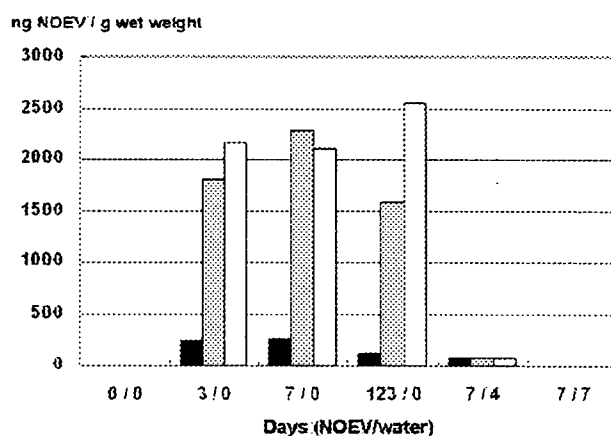


図1 R201Cマウスに対するNOEV投与後の臓器内濃度の変化

■: 脳, ▨: 肝臓, □: 腎臓.

0/0: 水のみ投与, 3/0: NOEV投与3日直後, 7/0: NOEV投与7日直後, 123/0: NOEV投与123日直後, 7/4: NOEV投与7日続いて4日間水投与, 7/7: NOEV投与7日続いて7日間水投与. Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007.

#### b) 病理学的観察 (伊藤雅之)

R201C発現モデルマウスに対するNOEV治療中の神経病理学的観察では、明らかな病理学的改善を認めなかったが、病変の進行を抑えている傾向があった。神

経細胞の非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なかった。

#### c) R201Cマウスの組織内酵素活性 (田部美穂)

モデルマウスへのNOEV治療中、NOEVの組織内濃度に比例してβ-ガラクトシダーゼ活性が上昇した。脳組織中にも有意の活性が検出された (図2)。

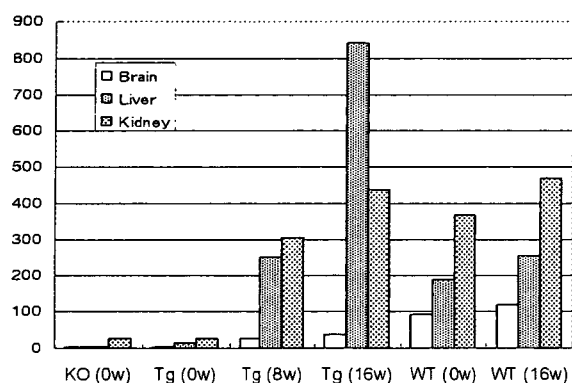


図2 NOEV治療中のR201Cマウス組織内酵素活性  
NOEV治療中、脳、肝、腎の酵素活性が著しく上昇した。Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007.

#### d) 脂質分析 (滝本一広、檜垣克美)

古典的な脂質抽出・定量法では、早期からの治療例は非治療例と比べて、大脳、基底核、小脳脳幹のG<sub>M1</sub>、G<sub>A1</sub>の蓄積傾向の著しい減少を認めた。この傾向は共焦点蛍光光度定量法によっても確認された (図3)。

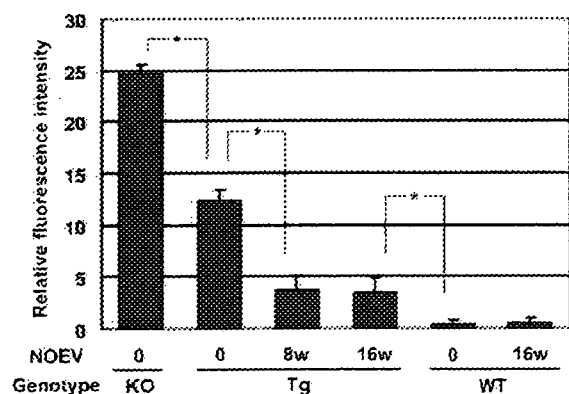


図3 R201Cマウスに対するNOEV投与の脳内G<sub>M1</sub>濃度に対する効果

Tg (R201C) マウスの脳内G<sub>M1</sub>濃度は、非投与時に比べ、治療後著しく低かった。Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007.

#### e) 病態解析 (難波栄二、檜垣克美)

23人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者 (G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス:22人、モルキオB病:1人) の遺伝子変異解析を行い、21人に32種類の遺伝子変異を同定した。そのうち新規変異は16種類 (S53I、R59C、W92ter、276-277 insG、I181K、E131K、L146del、R148C、G190D、W273R、D332E、T420K、D448V、M480V、P549L、W582X) であった。患者由来皮膚線維芽細胞とヒト変異β-ガラクトシダーゼ発現マウス細胞系を用いNOEVの効果を検討した。これまでに、44種類の変異型のうち9種類 (G190D、R201C、R201H、R201Y、V216A、Q255H、D332N、D332E、R457Q) に残存酵素活性の3倍以上かつ正常活性の10%以上という有意な酵素活性還元効果を認めた。この中には多数患者に見られる共通変異があり、患者数の割合はこの変異データの有効率よりも高くなると予想した。

予備的なマイクロアレイ発現解析により以下の結果を得た。病気の発症とともに、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遺伝子の発現が変動し、NOEV投与により正常化した。

生後10ヶ月のβ-ガラクトシダーゼ欠損マウス脳において、Trk受容体チロシンリン酸化、リン酸化PLCγ蛋白質の亢進、小胞体ストレス応答シャペロン分子Bip/GRP-78、およびオートファゴソーム形成蛋白質LC3、Beclin-1の神経細胞内蓄積を認めた。また、R201Cマウス脳におけるリン酸化Trkの亢進とBip/GRP-78の蓄積はNOEV投与により有意に抑制された。

#### f) R201Cマウスに対するNOEV治療の臨床効果 (黒澤美枝子、一ノ宮悟史)

マウスにNOEVの1mM水溶液をアドリブ経口投与し、新しく開発した運動評価の総スコア値により臨床効果を判定した。

まず野生型、軽症型 (R201C発現Tg) マウス、重症型 (ノックアウト) マウス3系統の加齢変化を調べた。野生型の正常マウスは2歳過ぎまでスコア値に大きな変動を示さなかったが、重症型マウスは生後3-4ヶ月から徐々にスコア値の上昇が始まり、5ヶ月以後、急速に上昇傾向を示した。軽症型マウスは5ヶ月以後も緩やかな上昇が続いた (図4)。

次いで軽症型モデルマウスに対するNOEV投与実験を行った。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した (図5)。ただしこの実験条件では、神経学的進行を完全に停止させること

はできなかった。

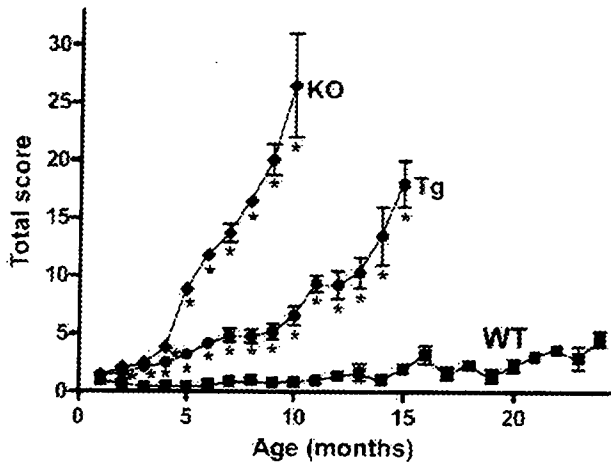


図4 3種のマウス系統における神経学的進行度  
WT: 野生型(正常)、Tg: R201Cトランスジェニック(軽症型)、KO: ノックアウト(重症型)  
検査項目: 歩行、前肢肢位、後肢肢位、躯幹形態、尾形態、逃避反応、寝返り、頭部に対する立直り、パラシュート反射、水平金網平衡反応、垂直金網掴まり反応。Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007,

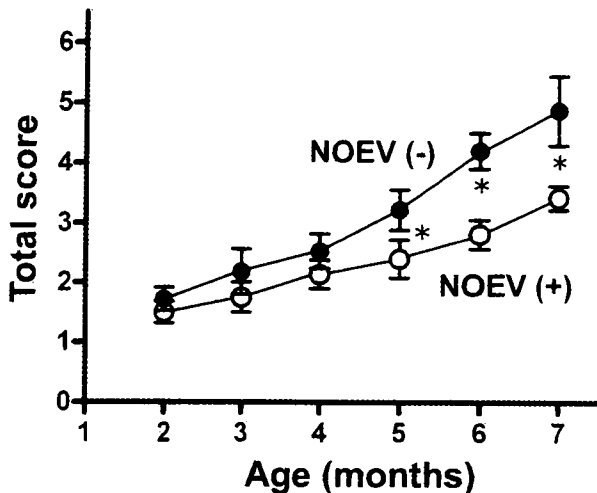


図5 NOEV投与後の神経学的スコア値の推移  
Suzuki et al: Ann Neurol 62: 671, 2007.

生後5ヶ月から開始した治療実験の効果は数ヶ月間明確でなく、6ヵ月後に初めて効果が見られたが、この時期(生後11ヶ月)はすでに病気の末期であり、死亡例が多く、以後の経過観察ができなかった。

これらの治療実験中、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。

#### g) 酵素分子構造解析(榊原康文)

バイオインフォマティクス的手法を用い、ヒトβ-ガラクトシダーゼの構造解析を行い、図6の予想構造を得た。

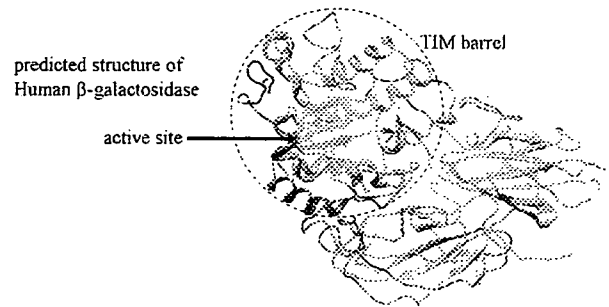


図6 ヒトβ-ガラクトシダーゼの予測構造

アオカビと比べ、特にアミノ酸鎖の前半により高い相同性を示し、活性残基も一致していた。糖質分解酵素に共通のTIMバレルを構成していた。この予測構造をもとに44種類の変異型酵素の立体構造を予測した。それぞれについて、もとの構造からの変動を見ると、いくつかの共通なパターンとしてまとめることができた(表1)。

表1 病型と立体構造変動タイプの相関

		変動タイプ				他
		前半変動型		後半変動型		
疾患型		type1	type2	type1	type2	
GM1 ガングリオ シドロー シス	乳児	5	5	8	2	0
	若年	2	0	4	0	0
	成人	1	0	3	0	1
モルキオB病		1	1	6	2	0
不明		0	0	1	1	0

他の病型と比べ、乳児型には前半変動型が多く、変異の半分がこのグループに属していた。これは酵素活性部位の構造変化が多いことを示す。また、96Tyr、473Leuなど、複数の構造変動タイプに共通に、大きな特異的変動を示す残基があった。

野生型ヒト酵素とラクトースの結合した複合体の生成に成功し、変異体との結合を調べた。Y83Hはラクトースが活性部位にとどまらず、複合体を形成しなかった。それに対してR201Cは複合体を形成したが、野生型分子よりも複合体を形成しにくかった。

さらにNOEVと酵素とのドッキングを調べた(図7)。

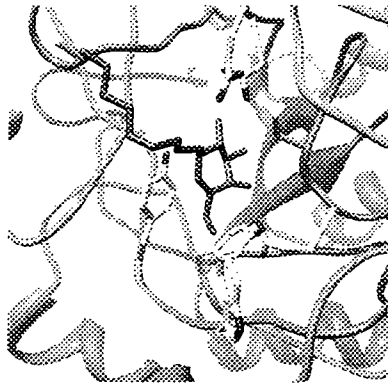


図7 ヒトβ-ガラクトシダーゼとNOEVのドッキング

NOEVを含む10種のバリエナミン化合物とヒトβ-ガラクトシダーゼの分子反応を検討したところ、NOEVが酵素に対する最も高い結合強度を示した。そして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。この結合強度にはGlu131とGlu188という2つのグルタミン酸の水素付加状態が重要であると予測した。これらの水素化により、結合自由エネルギーが高くなる。このことから、ライソゾームの酸性環境条件下、酵素に対するNOEVの結合強度が弱くなる、つまり複合体が解離しやすくなると予測した。

### 3. ゴーシェ病

#### a) 表現型と遺伝子型 (衛藤義勝、井田博幸)

日本人ゴーシェ病症例112家系の遺伝子変異解析を行った。L444P (34%)、F213I (15%)、D409H (5%)、RecNcil (5%)、del20insTG (4%)、その他 (15%)、未同定 (21%) という結果であった。臨床的には診断時1型と診断された65例中、18例が経過観察中に神経症状を呈し、最終的に3型と分類された。106例の予後および治療成績を調べたところ、酵素補充療法を受けている1型症例はすべて生存中であり、無治療症例はすべて死亡していた。2型、3型症例に対する酵素補充療法の効果は必ずしもはっきりしなかった。

#### b) シャペロン治療実験 (大野耕策)

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。

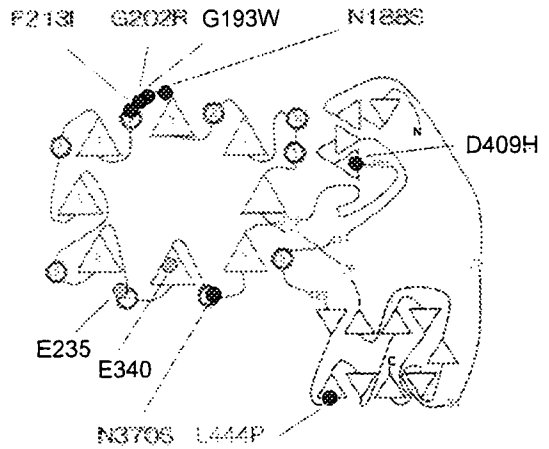


図8 β-グルコシダーゼの構造と変異

図8に示したように、NOVにより活性が上昇するN188S、F213I、N370S、G202Rが触媒活性を持つドメインIIIに位置するのに対し、シャペロン効果のない変異は、G193Wを除くL444P、D409Hはその他のドメインに位置する。この結果は、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。この仮説に基づき、ドメインIIIとその他の場所の変異を持つヒト変異β-Glu cDNAをCOS細胞に導入して、仮説を検証するとともに、酵素蛋白質の構造変化とNOVの相互作用を明らかにする予定である。

正常8週齢のマウスに0.3 mMのNOVを1週間飲ませたところ、肺、脾臓、腎臓で酵素活性の増加を認めた。これまでNOVの供給量に限界があったことからこれ以上の濃度を投与できなかったが、今後、0.3mM、1mM、3mM、10mM投与後の組織のβ-Glu酵素活性とNOV濃度の測定により、NOVの経口での有効投与量を決定し、大量投与による毒性実験に移る。

更に、ヒトF213I変異を持つTgマウスを作成した。現在、NIHで作成されたβ-Gluノックアウトマウスと交配中である。β-Gluノックアウトマウスは、生後24時間で死亡する。ヒトF213I変異を持つモデルマウスも早期に死亡する可能性があるが、妊娠末期から母親の胎盤およびミルクを介してNOVを投与して、生存させる可能性を検討していく。

### 4. クラッペ病 (酒井規夫)

培養細胞系で、NOEVによる欠損酵素ガラクトシルセラミドβ-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。しかしこれまでのところ、再現性のあるシャペロン効果を認



めていない。

## 5. ファブリー病 (石井 達)

すでに1-ガラクトデオキシノジリマイシン (DGJ) 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。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を認めた。

残存活性を有する18種のアミノ酸置換型変異酵素 (A20P, E59K, E66Q, M72V, I91T, A97V, R112H, F113L, A156V, L166V, N215S, Q279E, M296I, M296V, R301Q, R356W, G373D, G373S) をCOS-7細胞で一過性に発現させ、20  $\mu$ M DGJ添加の影響を検討した。酵素活性は合成基質を用いて測定し、酵素量は抗 $\alpha$ -Gal A 抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した。分解機構の検討には小胞体関連分解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) とプロテアゾーム阻害剤 (ラクタシスチン) の影響を観察し、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。

すべての変異酵素においてDGJによる顕著な活性上昇(1.5-10倍)を認めた。またE59Kで $K_m$ の増大を認めた以外、精製酵素の $K_m$ ,  $V_{max}$ に変化はなく、機能的に正常であった。一方、熱安定性は顕著に低く、正常酵素の安定領域がpH3-7.5であったのに対し、変異酵素ではpH3.5-6.5と狭く、特に中性pHでの熱安定性の低下が顕著であった。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種の変異で顕著に増加した。今回初めてファブリー病患者由来変異酵素の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。

さらにパーコール密度勾配遠心による細胞分画と免疫電顕により細胞内局在性の解析を行った。正常酵素は高密度画分と低密度画分の2相性分布を示したが、患者由来変異酵素(L166V, R301Q)はいずれも低密度画分のみを検出され、小胞体のマーカー蛋白質であるBiPを含む画分と一致した。ところが、DGJ存在下で培

養した細胞では、これら変異酵素は高密度画分でも認められるようになり、ライソゾームのマーカー酵素である $\alpha$ -ヘキササミニダーゼの分布と一致した。また、小胞体に局在した変異酵素が、DGJ添加によりライソゾームへ移行することを免疫電顕により確認した。

## 6. ポンペ病 (奥宮敏可)

ポンペ病 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損症) 患者由来の線維芽細胞を用い、デオキシノジリマイシン (DNJ) およびその誘導体のシャペロン効果を調べた。N-ブチルデオキシノジリマイシン (NB-DNJ)、N-(7-オキサデシル)デオキシノジリマイシン (NO-DNJ) がDNJとともに $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の還元効果を示した。またNB-DNJが患者細胞内で変異酵素分子の輸送ならびに成熟化を促進し、ライソゾームでの安定性を増すことが分かった。

## D. 考察

本研究の主要な対象疾患は $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症 ( $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス、モルキオB病) であるが、そのほかに $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症 (ゴーシェ病)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA欠損症 (ファブリー病)、 $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損症 (ポンペ病) にも有効なシャペロン化合物の存在を確認した。予備実験により、NOEVが $G_{M1}$ 分解酵素 ( $G_{M1}\beta$ -ガラクトシダーゼ) だけでなくガラクトシルセラミド分解酵素 (ガラクトシルセラミダーゼ) にも阻害剤としてはたらくことが明らかになったが、この酵素の欠損症 (クラッペ病) に対するシャペロン効果を確認することはできなかった。今後実験条件を検討することにより、クラッペ病に対するNOEVのシャペロン効果を確認できることを期待している。

$G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスに対する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中枢神経系に到達することを、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濃度は経口投与開始後速やかに上昇し、長期の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。この結果から、シャペロン化合物NOEVに組織内蓄積傾向はないという結論が得られた。シャペロンの細胞内濃度上昇とともに、検査したすべての組織の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇し、この病気でもっとも問

題となる脳組織のG<sub>M1</sub>濃度が減少（あるいは蓄積の進行が停止）した。

モデルマウスにおける臨床症状進行のモニタリングのため、ヒト乳幼児の神経学的検査法を改変し、新しい運動・反射機能検査法を開発した。11項目の個別検査データそれぞれを4段階のスコアで表示し、その総計を総スコア値として評価した。加齢とともに、正常マウス、軽症型疾患マウス、重症型疾患マウスそれぞれが特異的な経過を示した。そしてNOEV治療数ヶ月以内に、NOEVによく反応する変異を発現する軽症型マウスにおいて、有意に神経学的進行が停止する傾向を示した。治療開始が早いほど、臨床効果の発現が早かった。この結果から、進行性中枢神経系の治療には早期診断、早期治療が重要であるという当然の結論が得られた。ただし今回の実験条件では症状進行を完全に抑制あるいは改善することはできなかった。投与量、投与方法について一層の工夫が必要であろう。

このように、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、臨床症状、臨床生化学、病理所見に特異的な副反応・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。

シャペロン効果の分子機構の探索と、より効果的な治療法の開発に向けて、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの病態解析を、細胞内分子動態、遺伝子発現の側面から検討した。いくつかの生理学的パラメーターの病的変動が見出され、NOEV投与によりこれらの変化が矯正された。特にマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの変化は、病態とともに、さらに新しい治療的アプローチを考える上に参考になるものと期待する。

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、更なる発展を期待している。

遺伝性β-グルコシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）については、細胞実験により、NOVの多くの遺伝子変異に対するシャペロン効果を見出した。最近、変異発現マウスの作出にも成功した。その系統化とともに、個体特性の分析をすすめ、治療実験に進む予定である。その他の関連疾患も、単なる基礎データだけでなく、臨床試験に向けた実験を進めたい。

## E. 結論

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<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの脳病変に有効であることを明らかにした。すなわちβ-ガラクトシダーゼ欠損マウスの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、中枢神経系での形態的・化学的臨床的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・治療的対応が可能になるであろう。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A: β-Galactosidase deficiency (β-galactosidosis): G<sub>M1</sub>-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 for G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. Cell Molec Life Sci 10: 351-353, 2008.
3. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka Susumu, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. Biochem Biophys Res Commun 367: 616-622, 2008.
4. 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.
5. 井田博幸: 小児中枢神経疾患の画像診断 -Gaucher病 - 小児内科 39増刊号: 497-8, 2007.
6. 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.
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 carboglycosylamine glycosidase inhibitors. *Mini-Rev Med Chem* 7: 679-691, 2007.
  9. Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Kaneshi 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.
  10. Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y: Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci* 252: 181-184, 2007.
  11. 井田博幸: 先天代謝異常症における酵素補充療法はどの程度有効か? 五十嵐隆・石井正浩・滝田順子編、EBM小児疾患の治療 2007-2008, 中外医学社 275-280, 2007.
  12. Saito T, Usui N, Asai, O Dobashi N, Ida H, Kawakami M, Yano S, Osawa H, Takei Y, Takahara S, Ogasawara Y, Yamaguchi Y, Minami J, Aiba K: Pseudo-Gaucher Cell proliferation associated with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 85: 350-353, 2007.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4. *J Cell Sci* 119: 2643-53, 2006.
  17. Shin I-S, Nishikawa K, Maruyama H, Ishii S. Histidine-tagged Shiga toxin B subunit binding assay: simple and specific determination of Gb3 content in mammalian cells. *Chem Pharm Bull* 54: 522-527, 2006.
  18. Suzuki Y:  $\beta$ -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inherit Metab Dis* 29: 471-476, 2006.
  19. 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* 28: 482-486, 2006.
  20. 井田博幸: ライソゾーム病のスクリーニング. 小児科臨床 59: 667-76. 2006.
  21. 難波栄二, 檜垣克美, Udin Bahrudin: 遺伝子診断の実際. 小児科診療 69: 1621-1626, 2006.
  22. 鈴木義之: ケミカルシャペロン. 小児科診療 69: 1710-1715, 2006.
  23. Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui, Ozono K., Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation., *J Hum Genet* 51: 548-554. 2006.
  24. 井田博幸: 先天代謝異常症 日常診療で必須の知識. Gaucher病の酵素補充療法. 小児科診療 69: 1717-1723, 2006.
  25. 鈴木義之: 薬物療法 (遺伝病に対する新しい治療法). 柳沢正義, 衛藤義勝, 五十嵐隆 (編): 小児科の新しい流れ (先端医療シリーズ34), 先端医療技術研究所 104-108, 2005.
  26. 鈴木義之: ライソゾーム病の酵素補充療法. *Brain Medical* 17: 253-258, 2005.
  27. 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.
  28. 井田博幸: 酵素補充療法の現状と未来. 日本先天代謝異常学会雑誌 21:62-66. 2005.

## 学会発表

1. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy: a new molecular therapeutic approach to lysosomal diseases. International symposium of lysosomal storage disease, Maihama, Japan 11.29-12.1, 2007.
2. 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. Maihama, Japan, 11.29-12.1, 2007.
3. 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, 2007.
4. 井田博幸: 酵素補充療法の進歩 —ゴーシェ病, ファブリ病, ボンベ病— 国際ライソゾーム病シンポジウム. 浦安 11.29-12.1, 2007.
5. 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, Maihama, Japan 11.29-12.1, 2007.
6. 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.
7. Ida H: Long-term efficacy of enzyme replacement therapy in reducing bone involvement in Gaucher disease. Kuala Lumpur, Malaysia 11.10, 2007.
8. Ida H: Lysosomal storage disease and enzyme replacement therapy in Japan. Bangkok, Thailand 11.7, 2007.
9. 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10.15-17, 2007.
10. 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ゾ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 10.15-17, 2007.
11. 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真巳, 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総会, 山形 10.15-17, 2007.
12. 井田博幸: 酵素補充療法の効果と問題点. 第49回日本先天代謝異常学会ワークショップ. 山形 10.15-17, 2007.
13. 井田博幸: 内科医が知っておきたいリソゾーム病. 日常診断のピットフォール, 第69回日本血液学会教育講演. 横浜 10.13, 2007.
14. 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 9.26-29, 2007.
15. 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.
16. 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 8, 2007.
17. 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 8.27-31, 2007.
18. 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回日本小児神経学総会, 大阪 7, 2007.
19. 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: ライソゾ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 7, 2007.
20. 酒井規夫: 周産期医療における遺伝カウンセリング. 大阪新生児研究会 6.16, 2007.
21. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy: molecular mechanism and possible clinical application. International Symposium of Child Neurology, Ljubljana, Slovenia 6.1, 2007.
22. 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. 日中先天性代謝異常症研究会招待講演,

- active-site specific chaperone therapy. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto 6.18-23, 2006.
45. Ohno K, Lei K, Zhuo L, Inoue T, Ninomiya H, Nanba E, Suzuki Y: Chemical chaperone therapy for Gaucher disease: N-octyl- $\beta$ -valienamine increases the cellular activity of not only F213I but also N188S  $\beta$ -glucocerebrosidases. 10th International Child Neurology Congress, Montreal 6.12-17, 2006.
  46. 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 mechanisms. the Annual Congress of the Swiss Society for Allergology and Immunology, Zurich, Switzerland 3, 2006.
  47. Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J: Neurological examination of genetically engineered G<sub>M1</sub>-gangliosidosis model mice. British Paediatric Neurology Association XXXII Annual Conference, Bristol 1.18-20, 2006.
  48. 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<sub>M1</sub>-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.
  49. 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>M1</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.
  50. 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>M1</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.
  51. 許成哲, 酒井規夫, 谷池雅子, 赤木幹弘, 乾幸治, 大藪恵一: Krabbe病の遺伝子解析; 表現型遺伝子型相関. 第48回日本先天代謝異常学会, 熊本 11.16-18, 2005.
  52. 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<sub>M1</sub>-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 11.16-18, 2005.
  53. Ida H: Enzyme replacement therapy: Experience in Japan. The 8th Asia LSD Meeting. 12, 2005.
  54. Suzuki Y: New Therapies for Neurogenetic Disorders. XVIII World Congress of Neurology, Sydney, Australia 11. 5-11, 2005.
  55. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会, 神戸 10.19-22, 2005.
  56. 井田博幸: リソゾーム病の治療とスクリーニング. 現状と課題. 第33回日本マススクリーニング学会, 久留米 10.8, 2005.
  57. 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, Goteborg, Sweden 9.14-17, 2005.
  58. 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 9.6-9, 2005.
  59. 鈴木義之: ケミカルシャペロン療法: 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.
  60. 井田博幸: 酵素補充療法. 第1回日本先天代謝異常学会セミナー, 東京 8.27, 2005.
  61. 井田博幸: リソゾーム病治療の現状と未来. 第2回九州先天代謝異常研究会, 熊本 7.9, 2005.
  62. 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.
  63. 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, 東京 5, 2005.
  64. 井田博幸: 先天代謝異常症, 特にリソゾーム病における遺伝子治療の治療への応用. 第108回日本小児科学会総会, 東京 4.23, 2005.

- 北京 5.25-27, 2007.
23. Ida H: Genetic and clinical characteristics of Japanese patients with Gaucher disease. The 1<sup>st</sup> China-Japan LSD meeting, Shanghai, China 5. 23, 2007.
  24. 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 4, 2007.
  25. Suzuki Y: Molecular approaches to neurogenetic diseases: G<sub>M1</sub>-gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt 1.25-26, 2007.
  26. 徐広幸, 柚木克之, 榎原康文: Molecular simulations toward predicting free energy change of Human Beta-Galactosidase-NOEV complex, 生物物理学会第45回年会, ポスター番号 1P044, パシフィコ横浜, 2007.
  27. 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<sub>M1</sub>-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 11.24-25, 2006.
  28. 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, 飯田真巳, 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.
  29. Suzuki Y, Ichinomiya, S, Maruyama K, Toda H, Watanabe H, Iwasaki H, Kurosawa, M, Matsuda J: Mouse Neurology: neurological assessment of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis model mice. 35th Annual Meeting of the Child Neurology Society Meeting, Pittsburgh 10.18-21, 2006.
  30. 鈴木義之: モデルマウスを用いたG<sub>M1</sub>-ガング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.
  31. 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:  $\beta$ -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 10.17.20, 2006.
  32. 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29回日本人類遺伝学会大会, 米子 10, 2006.
  33. Sakai N, Xu C, Taniike M, Inui K, Ozono K: Six novel mutations detected in the GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari. 9.12-16, 2006.
  34. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk signaling in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis mice brains. 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 9.12-16, 2006.
  35. Otomo T, Sakai N, Nabatame S, Okinaga T, Takizawa S, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Taniike M, Ozono K: Neurological improvement of hematopoietic stem cell transplantation on late-onset Krabbe disease; two years clinical course of siblings. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 9.12-16, 2006.
  36. Ida H: Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: 10years experience. The 9th Asia LSD Meeting. Chiba 9, 2006.
  37. 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 9.12-16, 2006.
  38. 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  $\beta$ -galactosidase expressing mouse cells. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 9.12-16, 2006.
  39. Tanaka A, Okuyama T, Ozono K, Sakai N, Mutation analysis of GNPTAB gene in 36 Japanese mucopolysaccharidosis II and III patients: genotype phenotype correlation. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari 9.12-16, 2006.
  40. 酒井規夫, 小児の白質変性症 その診断と治療 第33回大阪大学阪神地区小児科勉強会 9.7, 2006.
  41. 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.
  42. 高村歩美, 檜垣克美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: G<sub>M1</sub>-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 7.19-21, 2006.
  43. Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Impairment of Trk receptor-mediated signaling causes neuronal death in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. 第29回日本神経科学大会, 京都 7.19-21, 2006.
  44. Ishii S, Fan J-Q: Fabry disease: Characteristics of mutant  $\alpha$ -galactosidase A and broad application of

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Suzuki Y, 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	The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease	McGraw-Hill	New York	2008	<a href="http://www.ommbid.com/">http://www.ommbid.com/</a>
井田博幸	先天代謝異常症における酵素補充療法はどの程度有効か？	五十嵐隆、石井正浩、滝田順子	E B M小児疾患の治療 2007-2008	中外医学社	東京	2007	275-280
鈴木義之	薬物療法（遺伝病に対する新しい治療法）	柳澤正義、衛藤義勝、五十嵐隆	小児科の新しい流れ：先端医療シリーズ34	先端医療技術研究所	東京	2005	104-108

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki Y	Chemical chaperone therapy for $G_{M1}$ -gangliosidosis	Cell Molec Life Sci	10	351-353	2008
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
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
井田博幸	小児中枢神経疾患の画像診断 - Gaucher病	小児内科	39 増刊号	497-498	2007
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

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
Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y	Development and medical application of unsaturated carbamylglycosylamine glycosidase inhibitors	Mini-Rev Med Chem	7	679-691	2007
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 <i>N</i> -octyl- $\beta$ -valienamine on $\beta$ -glucosidase mutants associated with Gaucher disease	Biochim Biophys Acta	1772	587-596	2007
Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y	Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier	J Neurol Sci	252	181-184	2007
Saito T, Usui N, Asai O, Dobashi N, Ida H, Kawakami M, Yano S, Osawa H, Takei Y, Takahara S, Ogasawara Y, Yamaguchi Y, Minami J, Aiba K	Pseudo-Gaucher cell proliferation associated with myelodysplastic syndrome	Int J Hematol	85	350-353	2007
Fan J-Q, Ishii S	Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease: Yin and Yang of enzyme inhibitors	FEBS J	274	4962-71	2007
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
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
Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H	Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4	J Cell Sci	119	2643-53	2006
Shin I-S, Nishikawa K, Maruyama H, Ishii S	Histidine-tagged Shiga toxin B subunit binding assay: simple and specific determination of Gb3 content in mammalian cells	Chem Pharm Bull	54	522-527	2006
Suzuki Y	$\beta$ -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy	J Inherit Metab Dis	29	471-476	2006
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	28	482-486	2006



井田博幸	ライソゾーム病のスクリーニング	小児科臨床	59	667-676	2006
難波栄二、檜垣克美、 Bahrudin U	遺伝子診断の実際	小児科診療	69	1621-1626	2006
鈴木義之	ケミカルシャペロン	小児科診療	69	1710-1715	2006
Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui K, Ozono K	Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation	J Hum Genet	51	548-554	2006
井田博幸	先天代謝異常症 日常診療で必須の知識. Gaucher病の酵素補充療法	小児科診療	69	1717-1723	2006
Gordillo M, Vega H, Sakai N, Tsukamoto H, Ozono K, Inui K	Characterization of the sensitivity of lymphoblastoid cell lines to various stress agents in Roberts syndrome	Med J Osaka Univ	49	29-41	2006
鈴木義之	ライソゾーム病の酵素補充療法	Brain Medical	17	253-258	2005
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
井田博幸	酵素補充療法の現状と未来	日本先天代謝異常学会雑誌	21	62-66	2005

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

A. 特許出願

B. 実用新案登録 なし

1) 発明の名称：カルバ糖アミン誘導体

(特願2001-272775号)

発明者 小川誠一郎、鈴木義之  
出願日 2001年9月7日  
出願人 生化学工業株式会社  
公開中

C. その他 なし

2) 発明の名称：糖脂質代謝異常症の治療薬

(特願2001-272777号)

発明者 鈴木義之、大野耕策  
出願日 2001年9月7日  
出願人 生化学工業株式会社  
公開中

3) 発明の名称：糖脂質代謝異常症治療剤

(特願2002-260534号)

発明者 鈴木義之、難波栄二、  
松田潤一郎  
出願日 2002年9月5日  
出願人 生化学工業株式会社  
公開中

4) 発明の名称：Carba-sugar amine derivatives and treatments for disorder of glycolipid metabolism containing the same as the active ingredient (PCT/JP02/08882)

発明者 小川誠一郎、鈴木義之、難波栄二  
出願日 2002年9月2日  
出願人 生化学工業株式会社  
出願国 米国(10/793857)、カナダ(2459887)、オーストラリア(2002328402)、ヨーロッパ(全加盟国)(02762961.7)

公開中

## 研究成果の刊行物・別刷

Scriver's

**OMMBID**

The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease

Editors: Valle • Beaudet • Vogelstein • Kinzler • Antonarakis • Ballabio

Editors Emeritus: Scriver • Chitids • Sly

## PART 4: LYSOSOMAL DISORDERS

### Chapter 151: $\beta$ -Galactosidase Deficiency ( $\beta$ -Galactosidosis): GM<sub>1</sub>

M<sub>1</sub> Yoshiyuki Suzuki, Eiji Nanba, Junichiro Matsuda, Akihiro Oshima

#### Abstract

1. Hereditary deficiency of lysosomal acid  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -galactosidosis) is expressed clinically as two different diseases, GM<sub>1</sub> gangliosidosis and Morquio B disease. The mode of inheritance is autosomal recessive. GM<sub>1</sub> gangliosidosis is a neurosomatic disease occurring mainly in early infancy (infantile form; type 1). Developmental arrest is observed a few months after birth, followed by progressive neurologic deterioration and generalized rigospasticity with sensorimotor and psychointellectual dysfunctions. Macular cherry-red spots, facial dysmorphism, hepatosplenomegaly, and generalized skeletal dysplasia are usually present in infantile cases. Cases of later onset have been described as late infantile/juvenile form (type 2) or adult/chronic form (type 3). They are observed as progressive neurologic diseases in childhood or in young adults. Dysmorphic changes are less prominent or absent in these clinical forms, although vertebral dysplasia is often detected by radiographic studies. No specific neurologic manifestations are known for late infantile/juvenile patients with GM<sub>1</sub> gangliosidosis. Extrapyramidal signs of protracted course, mainly presenting as dystonia, are the major neurologic manifestation in adults with GM<sub>1</sub> gangliosidosis.
2. Morquio B disease is clinically a mild phenotype of Morquio A disease. It is expressed as generalized skeletal dysplasia with corneal clouding, resulting in short stature, pectus carinatum (sternal protrusion), platyspondylia, odontoid hypoplasia, kyphoscoliosis, and genu valgum. There is no central nervous system involvement, although spinal cord compression may occur at the late stage of the disease. Intelligence is normal, and hepatosplenomegaly is not present. X-ray changes are of pathognomonic significance.
3. There is diffuse atrophy of the brain in patients with early onset GM<sub>1</sub> gangliosidosis. Neurons are filled with numerous membranous cytoplasmic bodies (MCB), and inclusions of other types are observed in glial cells: pleomorphic lipid bodies, membranovesicular bodies, or large compact oval deposits. There are histiocytes with distended cytoplasm in visceral organs. Cytoplasmic inclusions observed under electron microscopy are different from MCB in neurons. They are vacuoles filled with fine granular, tubular, or amorphous osmiophilic material. These changes are less prominent in cases of mild phenotypic expression.
4. Glycoconjugates with terminal  $\beta$ -galactose are increased in tissues and urine from patients with GM<sub>1</sub> gangliosidosis and Morquio B disease. Ganglioside GM<sub>1</sub> and its asialo derivative GA<sub>1</sub> accumulate in the GM<sub>1</sub> gangliosidosis brain. High amounts of oligosaccharides derived from keratan sulfate or glycoproteins have been reported in visceral organs and urine from GM<sub>1</sub> gangliosidosis or Morquio B disease patients. Undersulfated keratan sulfate has also been described.
5. Two lysosomal enzymes are known for hydrolysis of terminal  $\beta$ -linked galactose at acidic pH in various glycoconjugates. One is an enzyme usually called  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), catabolizing ganglioside GM<sub>1</sub>, galactose-containing oligosaccharides, keratan sulfate, and other  $\beta$ -galactose-containing glycoconjugates (GM<sub>1</sub>  $\beta$ -galactosidase). The enzyme activity is markedly reduced or almost completely deficient in cells and body fluids from patients with  $\beta$ -galactosidosis. Heterogeneous kinetic or physicochemical properties have been found in the mutant enzymes. The