

degree of substrate storage and residual enzyme activity is correlated with the severity of each clinical phenotype; infantile G_{M1} gangliosidosis shows the highest substrate storage and the lowest residual enzyme activity as compared with other milder phenotypes. The second genetically different β -galactosidase is galactosylceramidase (galactocerebrosidase; EC 3.2.1.46), catabolizing galactosylceramide, galactosylsphingosine, and other lipid compounds. Genetic deficiency of this enzyme results in globoid cell leukodystrophy, which is another neurometabolic disease.

6. The human β -galactosidase gene has been mapped on chromosome 3 (3p21.33). The cDNA codes for a protein of 677 amino acids, including a putative signal sequence of 23 amino acids and 7 potential asparagine-linked glycosylation sites. The gene spans more than 60 kb, and contains 16 exons. The promoter has the characteristics of a housekeeping gene, with GC-rich stretches and 5 SP1 transcription elements on the two strands. Molecular genetic analysis revealed heterogeneous gene mutations in all clinical forms of β -galactosidosis, such as missense/nonsense mutation, insertion/duplication, and insertion causing splicing defect. Neither the type nor location of mutation in the gene is correlated to the clinical phenotype. Five common mutations have been known: R482H in Italian patients with infantile G_{M1} gangliosidosis; R208C in American patients with infantile G_{M1} gangliosidosis, R201C in Japanese patients with juvenile G_{M1} gangliosidosis; I51T in Japanese patients with adult G_{M1} gangliosidosis; and W273L in Caucasian patients with Morquio B disease. Restriction analysis has been successfully performed for the diagnosis of the common mutations in new patients.
7. Morphologic, pharmacologic, and biochemical aberrations have been found in the brain of G_{M1} gangliosidosis patients and animals. Meganeurites and ectopic dendrogenesis are observed in G_{M1} gangliosidosis, and the extent of meganeurite development is related to the onset, severity, and clinical course of the disease. Various pharmacologic abnormalities have been observed in feline G_{M1} gangliosidosis, such as cholinergic dysfunction, neuroaxonal dystrophy in GABAergic neurons, and alteration of phospholipase C and adenyl cyclase activities. These data suggest that morphologic and metabolic effects occur in the presence of excessive storage of ganglioside G_{M1} .
8. G_{M1} gangliosidosis has been recorded in cats, dogs, sheep, and calves. These animals showed various central nervous system manifestations. β -Galactosidase is deficient, and storage of G_{M1} and oligosaccharides has been confirmed. Furthermore, mouse models have been generated by disruption of the β -galactosidase gene. The β -galactosidase-deficient knockout mouse presented with progressive neurologic manifestations a few months after birth. Clinical, pathologic, and biochemical analysis indicated that this also is an authentic model of human G_{M1} gangliosidosis. In addition, phenotype-specific model mice have been produced by introducing human mutant genes, resulting in various clinical forms of β -galactosidosis (knockout-transgenic mice). These mice models are used for new therapeutic approaches to human β -galactosidosis patients.
9. The mouse model of juvenile G_{M1} -gangliosidosis expressing the R201C mutation was used for a new molecular therapy using a low-molecular-weight compound, N-octyle-4-epi- β -valienamine (NOEV). Orally fed NOEV passed through the blood-brain barrier, enhanced the deficient β -galactosidase activity, and induced degradation of G_{M1} and G_{A1} in the central nervous system. This new molecular therapy (chemical chaperone therapy) will be useful for certain patients with β -galactosidosis and potentially other lysosomal storage diseases with central nervous system involvement.

HISTORY

In 1959, Norman et al.¹ reported a patient with a specific form of amaurotic idiocy—"Tay-Sachs disease with visceral involvement." Clinical and pathologic findings resembled those of Tay-Sachs disease, but

9. 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？

1

序論

先天性代謝異常症，特にリソゾーム病は遺伝子変異により酵素活性が低下し，その結果，基質が蓄積することによって主要症状が出現する．この基本概念を基礎において考案された根治療法が欠損酵素を経静脈的に投与してリソゾーム病を治療する酵素補充療法である．現在，国際的には Gaucher 病，Fabry 病，ムコ多糖症 (MPS) I 型，MPS VI 型においては酵素製剤が医薬品として認可されている．MPS II 型，Pompe 病においては第 3 相臨床試験が終了しており，国際的に認可申請中である．日本では Gaucher 病，Fabry 病に対する酵素補充療法のみが厚生労働省の認可を受けている．そこで本稿ではこの 2 つの疾患を中心に記載する．表 1 に酵素補充療法の国際的な認可・試験状況をまとめる．

表 1 酵素補充療法の認可/試験の状況[#]

疾患名	前臨床試験	第 1/2 相臨床試験	第 3 相臨床試験	認可	臨床試験	
					海外	日本
Gaucher 病	→	→	→	●	●	●
Fabry 病	→	→	→	● ^{*1}	●	●
MPS I 型 ^{##}	→	→	→	● ^{*2}	●	×
MPS II 型 ^{##}	→	→	●	×	●	× ^{*3}
MPS VI 型 ^{##}	→	→	→	● ^{*2}	●	×
Pompe 病	→	→	●	×	●	× ^{*4}
Niemann-Pick 病 B 型	●	×	×	×	×	×

●：完了，×：未実施

*1 欧州では 2 剤が認可されているが，日本と米国ではファブラザイムのみが認可されている．

*2 欧米では認可されているが，日本では認可されていない．

*3 4 名の日本人が，米国での臨床試験に参加した．

*4 1 名の日本人が，英国での臨床試験に参加した．

[#] 2006 年 3 月末現在のデータ

^{##} MPS: ムコ多糖症

2

指針

1. Gaucher 病

本症は神経症状の有無とその重症度により 1 型 (非神経型)，2 型 (急性神経型)，3 型 (亜急性神経型) に分類されているが，いずれの病型においてもその臨床表現型において異質性が存

在する。日本ではどの病型に対しても酵素補充療法は健康保険適応がある。日本においては酵素製剤（商品名：セレザイム）を60単位/kg/回、2週間毎に点滴静注する方法が初期治療として推奨されている。ただし、後述するように Gaucher 病はその重症度において異質性が強いので投与酵素量および方法については議論が多い。

2. Fabry 病

本症は X 連鎖劣性遺伝病のため、原則として男性のみが発症する（ヘミ接合体）。しかし、正常 X 染色体の不活化が起こると女性でも症状を呈する（症候性ヘテロ接合体）。これら両者に対して酵素補充療法の健康保険適応がある。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて生産される酵素製剤（商品名：ファブラザイム）と遺伝子学的に操作したヒト培養皮膚線維芽細胞を用いて生産される酵素製剤（商品名：リブラガル）の2種類の酵素製剤がある。欧州ではこれら2種類の製剤が認可されているが、日本と米国ではファブラザイムのみが認可されている。ファブラザイムの投与量は1 mg/kg/回であり、2週間毎に点滴静注する。

3 エビデンス

1) Gaucher 病

本症に対する酵素補充療法については二重盲検比較による臨床治験は行われていないが、現在、全世界で約4000例の患者が治療を受けており、その有効性については多くの報告がある。また、本治療の中断により臨床症状および検査所見の悪化が報告されており、酵素補充療法の治療効果は明らかである。Gaucher 病は β -グルコシダーゼ活性低下のため、グルコセレブロシドがマクロファージに蓄積することにより貧血、血小板、肝脾腫を主症状とする。比較的多数の国際的な症例のデータを報告している Weinreb らのデータを図1に示す¹⁾。図1は脾摘をしていない1型 Gaucher 病に対する酵素補充療法の効果をヘモグロビン値、血小板値、脾容積を指標にして検討した結果である。いずれのデータも酵素補充療法によって改善しているが、2年間の治療にもかかわらず、血小板の平均値と平均脾容積においては正常化していない。この研究では投与酵素量に関する記載がなく、投与酵素量を含めた投与方法がこの結果に影響を及ぼしていると考えられる。

2) Fabry 病

本症に対する酵素補充療法については二重盲検比較による臨床治験が行われた。Fabry 病は α -ガラクトシダーゼ活性低下のためセラミドトリヘキソシド (GL-3) が血管内皮細胞、特に腎臓、心筋、皮膚に蓄積する。また、尿中に GL-3 が異常排泄されるとともに血漿中 GL-3 濃度が上昇する。以下にファブラザイムの第3相臨床試験データを示す。ファブラザイムを1 mg/kg/回、2週間毎に点滴静注した群 (29例) とプラシーボ群 (29例) において腎・皮膚・心の GL-3 沈着を病理学的に検討したところ、酵素補充療法群においてのみ改善が認められた (図2)。同様に血漿中 GL-3 の改善は酵素補充療法群においてのみに認められた²⁾。さらにプラシーボ群に対して酵素補充療法を施行し

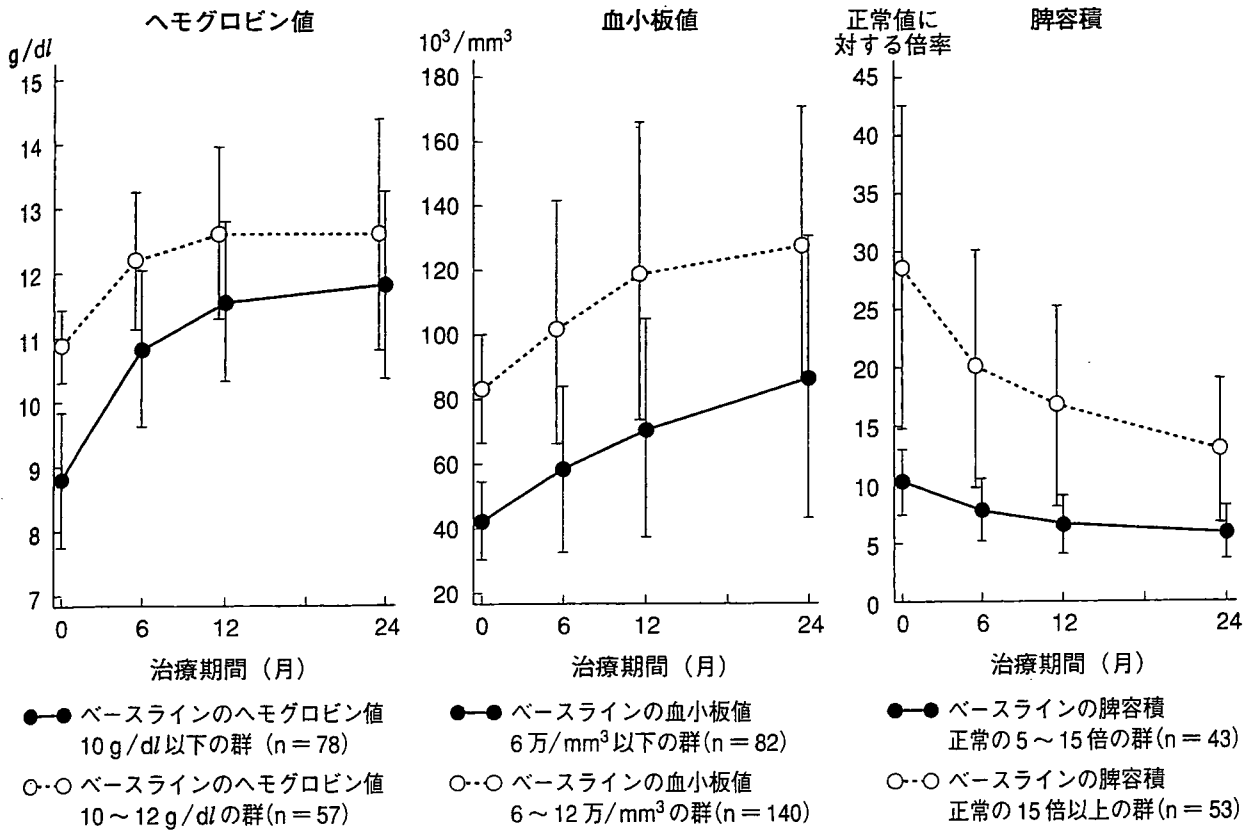
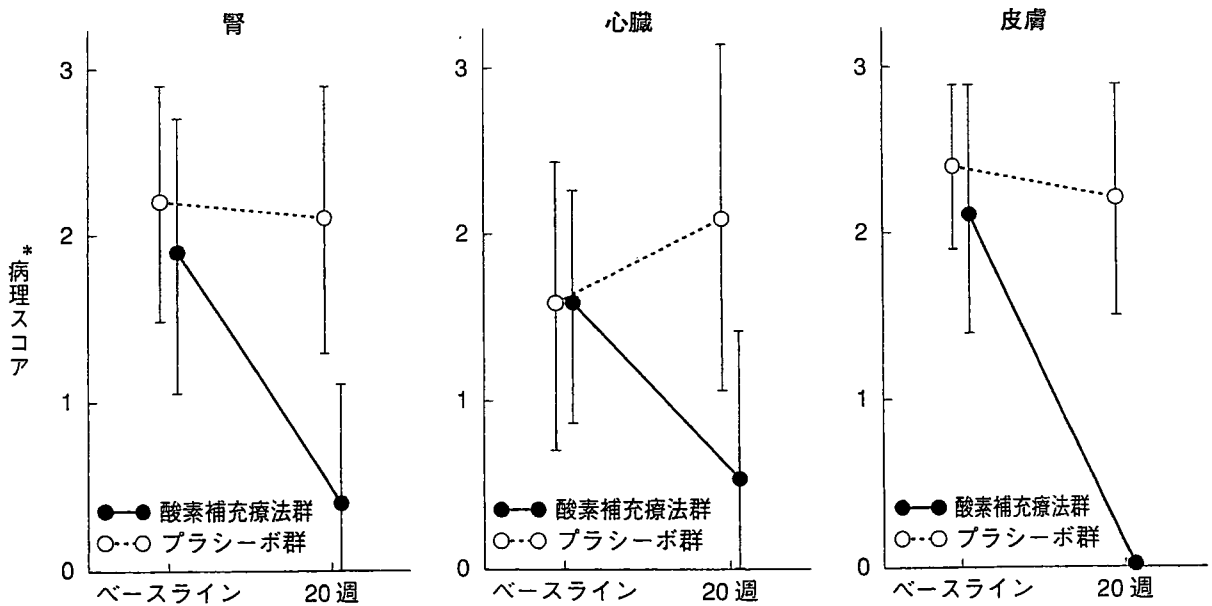


図 1 1 型 Gaucher 病の酵素補充療法の効果¹⁾



*病理スコア

スコア 0: GL-3 の蓄積がないかあってもわずか

スコア 1: 大多数の血管において単一の血管内皮に封入体があるのみ

スコア 2: 複数血管の複数の内皮に多数の封入体あり

スコア 3: 核周辺や細胞質領域に集合体をなすような多量の蓄積物質あるいは血管内腔への膨隆あり

図 2 Fabry 病の酵素補充療法による病理学的変化²⁾

たその後の研究によれば病理学的改善と GL-3 の改善が同様に認められたことから、
 ファブラザイムの臨床効果が再確認された。

紙面の関係上、その他の酵素補充療法についての効果の詳細は記載できないが、いず
 れも二重盲検比較による臨床治験が行われている。現在、報告されている酵素補充療法
 の結果について表 2 にまとめる。ムコ多糖症 I 型・II 型・VI 型、Pompe 病に対する酵素
 補充療法の効果の詳細は表 2 の文献を参考にさせていただきたい。

表 2 酵素補充療法の投与方法・投与患者数・効果

疾患名	欠損酵素	酵素製剤 の由来*	投与量/投与方法	投与 患者数#	効果	文献
Gaucher 病	β -グルコシ ダーゼ	CHO	①60 単位/kg/回 2 週間毎 ②2.3 単位/kg/回 3 回/週 ③1.15 単位/kg/回 3 回/週	約 4000 名 (日本では 約 80 名)	a) 肝脾腫の改善 b) 骨痛/骨密度の改善 c) 貧血の改善 d) 血小板の増加	1
Fabry 病	α -ガラクト シダーゼ	CHO	1 mg/kg/回 2 週間毎	約 1400 名 (日本では 約 200 名)	a) 血漿中 GL-3 の減少 b) 腎に蓄積した GL-3 減少	2
		HSF	0.2 mg/kg/回 2 週間毎			3
MPS I 型##	α -L-イズロ ニダーゼ	CHO	100 単位/kg/回 毎週	約 200 名	a) 心不全の改善 b) 関節可動域の改善 c) 6 分間歩行テストの 改善 d) 努力性肺活量の改善 e) 尿中 GAG の減少	4
MPS II 型##	イズロン酸 2-スルファ ターゼ	HSF	0.5 mg/kg/回 毎週あるいは 2 週間毎	90 名 (第 3 相 臨床治験)	a) 尿中 GAG の減少 b) 関節可動域の改善	5
MPS VI 型##	アリルスル ファターゼ B	CHO	1 mg/kg/回 毎週	39 名 (第 3 相 臨床治験)	a) 尿中 GAG の減少 b) 関節可動域の改善 c) 6 分間歩行テストの 改善	6
Pompe 病	α -グルコシ ダーゼ	CHO	10~40 mg/kg/回 毎週あるいは 2 週間毎	34 名 (第 3 相 臨床治験)	a) 生命予後の改善 b) 運動発達の改善 c) 心筋肥厚の改善 d) 筋肉中グリコーゲン の減少	7
		TR	15~40 mg/kg/回 毎週	4 名 (第 1/2 相 臨床治験)		8

2006 年 3 月末現在

MPS: ムコ多糖症

* CHO: Chinese Hamster Ovary 細胞

* HSF: 遺伝子改変を加えたヒト培養皮膚線維芽細胞 (human skin fibroblast)

* TR: トランスジェニックラビット

4 根拠となった臨床研究の問題点と限界

1. Gaucher 病

Gaucher 病においては前述したように臨床的異質性が存在する。従って、個々の症例に対しての至適投与量あるいは漸減法の設定が困難である。表 2 に示したように国際的には 60 単位/kg/回を 2 週間毎に投与する方法 (=120 単位/kg/月), 2.3 単位 kg/回を週に 3 回投与する方法 (=30 単位/kg/月), 1.15 単位 kg/回を週に 3 回投与する方法 (=15 単位/kg/月) が報告されているが、明確な結論は得られていない。また、酵素補充療法は血液学的異常、臓器症状には有効であるが、神経症状に対する効果は明らかではない。以上の問題は症例数の少なさ、臨床的異質性、投与酵素量、自然歴の不明瞭さなど複雑な要因が関係しており、明らかにすることは困難であると考えられる。

2. Fabry 病

Fabry 病に対する酵素補充療法においては生化学的・病理学的異常を改善することは明らかにされたが、主症状である痛みの改善については二重盲検比較において有意差が得られていない^{2,3)}。また、主な臨床的問題点である腎機能障害についても明確な有効性が確認されていない³⁾。これらの点が酵素補充療法の投与期間が短すぎるために生じている問題かあるいは腎障害の程度や抗体の影響かなど、今後検証する必要がある。Fabry 病においては家族内検索で発症前患者が診断されることが多く、このような対象に対する投与のタイミング・投与量あるいは腎不全を含む Fabry 病の主症状に対して酵素補充療法が発症あるいは進行を予防できるかも検証が必要である。さらに症候性ヘテロ接合体とヘミ接合体の治療方針が同一でよいか、あるいは漸減法の問題なども検討する余地がある。いずれにせよ Fabry 病は進行の緩徐な疾患であり、また検査学的・臨床所見的に顕著な所見がなく、さらに酵素補充療法も開始されて間もないためこれらを解決するためには長期経過観察と多くのデータ集積が必要であると考えられる。

5 本邦の患者に適応する際の注意点

日本人 Gaucher 病の遺伝子変異は欧米人のそれとは異なり、軽症型にリンクする N370S 変異が全く存在しない。それ故、重症型の Gaucher 病の頻度が高い。したがって、骨合併症の頻度が高く、酵素を安易に減量すると治療中にもかかわらず骨合併症を発症することが報告されている⁹⁾。また、長期間、高単位の酵素を補充しないと貧血や血小板値の十分な改善などが得られないことが報告されている¹⁰⁾。

■文献■

- 1) Weinreb NJ, et al. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: A report from the Gaucher Registry. *Am J Med.* 2002; 113: 112-9.
- 2) Eng CM, et al. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A replacement therapy in Fabry disease. *N Engl J Med.* 2001; 345: 9-16.

- 3) Schiffman R, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease. *JAMA*. 2001; 285: 2743-9.
- 4) Wraith JE, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human α -L-iduronidase (Laronidase). *J Pediatr*. 2004; 144: 581-8.
- 5) Muenzer J, et al. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome): A preliminary report. *Acta Paediatr*. 2002; 439 Suppl: 98-9.
- 6) Harmatz P, et al. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr*. 2004; 144: 574-80.
- 7) Amalfitano A, et al. Recombinant human acid α -glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: Results of phase I/II clinical trial. *Genet Med*. 2001; 3: 132-8.
- 8) Johanna MP, et al. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human α -glucosidase from milk. *Pediatr*. 2004; 113: 448-57.
- 9) Ida H, et al. Severe skeletal complication in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inher Metab Dis*. 1999; 22: 67-73.
- 10) Ida H, et al. Effects of enzyme replacement therapy in thirteen Japanese paediatric patients with Gaucher disease. *Eur J Pediatr*. 2001; 160: 21-5.

<井田博幸>

第4章 遺伝病に対する新しい治療法

1. 薬物療法

1.1 はじめに

遺伝病を治すということは、本質的にはその原因となる遺伝子を修復するということである。遺伝病の臨床的表現型は多様であるが、その遺伝子異常は全身性である。特定の臓器組織のみに遺伝子の構造異常があるわけでない。多細胞生物としてのヒトの組織の遺伝子情報を改変することは容易でない。

単一遺伝子病治療のターゲットは、すべての体細胞に存在する一つの遺伝子である。その多くは脳組織の原発性病変を発現する。現在のところ、脳障害の直接のアプローチは原理的に極めて困難である。

我々はこれまでとは違った発想で、遺伝性ライソゾーム病をモデルとして、脳の遺伝病に対する経口薬の開発を試みている。その原理は酵素基質に類似の低分子化合物をシャペロンとして投与することである。与えられたタイトルは「薬物療法」であるが、ここではシャペロン療法の解説を行うことにする。その原理が、他のカテゴリーの多くの脳の遺伝病に対する新しい治療法となり得るからである。

1.2 シャペロンとは

日本では、シャペロンという言葉は一般的でない。『広辞苑』や『世界大百科事典』など、国内の一般的な辞書、事典類にはこの項目はない。英語圏で最も権威のある『Oxford English Dictionary 第2版』(1989年)には以下の歴史的変遷が記載されている。「貴族(14世紀)、後には貴婦人(16世紀)のかぶる頭巾、帽子。ガーター勲位の装束の一部(16世紀)、棺を引く馬の前頭部につける飾り(17世紀)などの意味を経て、若い未婚女性が社交界に出るときの付き添いで、主に行儀作法を指導し監督する年配の既婚女性(18世紀)などの意味に使われた」とのことである。

現在の臨床医学では、医師とは異なった性の患者を診察するときに医師に付き添う人という意味で、主に北米大陸で使われる(Stedman's Medical Dictionary, 27th ed, 2000)。筆者も米空軍病院でのインターン時

代、女性患者を診察する際、忙しい看護師にシャペロンを頼んでもなかなか来てくれず、長く待たされたことを記憶している。

最近では生物学で分子シャペロンという言葉が使われる。生物学辞典、理化学辞典、医学辞典には「他の蛋白質や蛋白質複合体の適正な折りたたみや構築を行う別の蛋白質」という定義が記載されている。単にシャペロンともいう。細胞内で熱変性を予防し、蛋白質が正しく働くよう機能する熱ショック蛋白質が最も有名である。

この語は元来 chaperon という綴りであったが、原義が女性の持ち物あるいは女性自身を指すことが多かったことから、次第に chaperone という女性形単語として使われるようになった(『Oxford English Dictionary』)。そして現代医学辞書はほとんどすべて chaperone という見出し語になっている。筆者も chaperone と書くことにしている。

1.3 ライソゾーム病の分子病態

ライソゾームは我々の細胞内に存在し、酸性条件下で数十の加水分解酵素が多くの高分子代謝産物を順序よく消化する小胞である。それぞれの酵素は特異的な遺伝子情報により細胞内で合成される。ある一つの遺伝子に構造異常(変異)が起こると、その間違った情報により産生された酵素蛋白質の構造も変化し、活性を失い細胞の機能障害を起こす。個体としては生後ある一定の時期に全身病として発現する。このグループの病気をまとめて(遺伝性)ライソゾーム病という。多くは小児期の進行性中枢神経疾患としての病像を示す^{1,2)}。

ライソゾーム酵素は成熟赤血球以外、すべての体細胞に活性が存在する。したがって、脳の病気であっても、その病態解析には他の組織・臓器の細胞を使うことができる。診療の場では、モデル細胞として末梢白血球や皮膚由来の線維芽細胞を用いる。我々は特にβ-ガラクトシダーゼという、脳に特異的な脂質であ

るガングリオシドの分解酵素の病態を詳細に調べてきた³⁾。

1988年にこれらの病気の責任遺伝子構造を解明した後、多様な変異遺伝子の存在を確認し³⁾、それらが発現する酵素蛋白質の細胞内での動きを調べた。その結果、いわゆる「酵素欠損」の分子病態が一様でないことを知った。大きく分けると次の三つに集約できる⁴⁾。

- ①蛋白質分子が合成されない。
- ②合成された蛋白質分子に酵素としての活性がない。
- ③合成された蛋白質分子に酵素活性はあるが、不安定ですぐ不活化される。

これらの中で①②の病態では、正常な酵素蛋白質あるいは遺伝子を補給しない限り細胞の機能を正常化することは不可能である。ところが③の場合、せっかく活性のある酵素蛋白質が存在するにも関わらず、細胞がそれをうまく利用できていない。何らかの方法でこの蛋白質に適切な細胞内環境を提供すれば、働くべき場所で活性を発揮し、細胞の機能を修復することができるはずである。

我々はこの方向へのアプローチが可能であるかどうか、主に二つの疾患グループについて検討してきた。全身血管病であるファブリー病 (α -ガラクトシダーゼA欠損症)、そして古典的な神経遺伝病であるG_{M1}-ガングリオシドーシスと骨系統疾患モルキオB病 (ともに β -ガラクトシダーゼ欠損症) である。

1.4 ケミカルシャペロン療法の原理

遺伝病の変異蛋白質の中には、本来の機能を保持しているにも関わらず、立体的な折りたたみ (フォールディング) が不十分なために、細胞内での生合成の後、すみやかに分解、不活化されてしまう分子がある。基質類似化合物を細胞に投与することにより、この分子が安定化されることがある。この種の化合物は上記の分子シャペロンと本質的に同じ働きをもつので、ケミカルシャペロン (chemical chaperone) と呼ぶことにする。具体的な細胞内での分子反応のプロセスを図4.1.1の模式図に示す。

糖鎖末端を加水分解するライソゾーム酵素、例えばガラクトシダーゼはガラクトース、グルコシダーゼはグルコースを認識する。それぞれの類似化合物が基質とともに試験管内に存在すれば、競合的阻害剤として働く可能性がある。ところが細胞内では、これらの化合物が図4.1.1のような機構により変異分子を安定化し、ライソゾームに輸送する。酸性の条件下ではシャペロン分子と解離し、安定な状態で酵素としての活性

を示す。ただし、この細胞処理で変異酵素活性を正常のレベルまで上昇させることができるとは限らない。しかし酵素の基質処理能力がある程度以上になれば、理論上は病気の発症を著しく遅らせることができる。実際、酵素活性がかなり低くても保因者は発症しない。

β -ガラクトシダーゼ欠損症については、発症年齢と残存酵素活性の関係が放物線状の曲線となる⁴⁾。合成基質を用いた線維芽細胞内の酵素活性を試験管内で測定するという人工的な実験条件では、細胞内酵素活性が正常細胞の活性平均の8~10%存在すれば、発症年齢が無大になると予測できる。つまり、発症年齢が個体の寿命との競争になる。活性発現が不十分な細胞に対して、いくらかでも活性を上げることができれば、この目的が達成される可能性がある。

1.5 新しいシャペロン化合物の検索とその成果：NOEVとNOV

上述の、変異 α -ガラクトシダーゼAの詳細な分析データをもとに各種の変異細胞にガラクトースを投与してみたら、実際に活性が著しく増加した⁵⁾。しかしこの実験には、ガラクトースを人体における血液の浸透圧よりも高い濃度にする必要があった。次いで他の類似体のスクリーニングの結果、市販化合物1-デオキシガラクトノジリマイシンがより低濃度でこの酵素の変異体に働くことがわかった⁶⁾。

次に β -ガラクトシダーゼ欠損症、つまり古典的な遺伝性代謝性脳変性疾患であるG_{M1}-ガングリオシドーシスを対象とした研究を始めた。この酵素の欠損症は、単一遺伝子の異なった変異により、重症脳障害を起こ

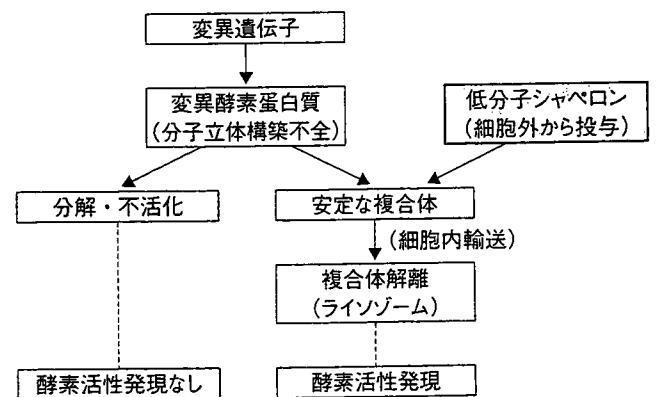


図 4.1.1 ケミカルシャペロン療法の原理 (遺伝性ライソゾーム病)

細胞外から投与された低分子競合的阻害剤は細胞内に入り、標的となる変異蛋白質と結合し、安定な立体構造を確立し、複合体がライソゾームに運ばれ、酸性条件下で解離した変異蛋白質が酵素としての活性を発現する。

す全身疾患 (G_{M1}-ガングリオシドーシス) または骨系統疾患 (モルキオ B 病) として発現する³⁾。脳をはじめとして全身臓器にガングリオシド G_{M1}、そのアシアロ体 G_{A1} の他にオリゴ糖やムコ多糖 (ケラタン硫酸) などが蓄積する。我々はまず市販のガラクトース誘導体・類似体について、この酵素の阻害活性を調べた。しかしファブリー病と違い、1-デオキシガラクトノジリマイシンの効果は β -ガラクトシダーゼに対しては α -ガラクトシダーゼ A の数十分の一であった⁷⁾。

次に生化学工業(株)中央研究所の協力により、新規合成化合物のスクリーニングを始めた。その中に N-オクタチル-4-エピ- β -バリエナミン (N-octyl-4-epi- β -valianamine ; NOEV) という化合物がヒト細胞内で β -ガラクトシダーゼ活性の強力な阻害剤として働くことがわかった⁸⁾。この物性解析の結果を図 4.1.2 に示す。この化合物はガラクトースの構造に似ているが、ガラクトースの C1 と C5 の間は O (酸素) 結合でなく C (炭素) 結合であり、かつ C1 には O (酸素) でなく N (窒素) が結合しているという違いがある。現在のところ、側鎖の炭素数 8 の化合物 (NOEV) が我々の目的に最も有効であることを確認した。

この化合物には炭化水素側鎖がついているため、水に対する親和性は高くない。しかしこのフリー体のままでも 3 ~ 5 mM までの濃度であれば容易に水に溶解

する。室温で安定である。試験管内での 50 % 酵素阻害濃度は 0.2 μ M である。この化合物をヒト β -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来の線維芽細胞培養液に添加すると、特定の変異遺伝子に対して活性化を示した。

NOEV は類似化合物 NOV (N-octyl- β -valianamine) のエピマーとして開発された化合物である。NOV も β -グルコシダーゼ阻害剤であることがわかっており、調べてみると、ゴーシェ病患者細胞の中に活性発現が誘導される変異のあることがわかった⁹⁾。

1.6 シャペロン化合物 NOEV の変異 β -ガラクトシダーゼに対する効果

1.6.1 ヒト線維芽細胞

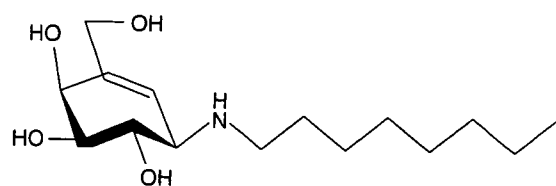
これらの予備的な結果をもとに、まず患者由来のヒト線維芽細胞への投薬実験を行った。細胞培養液に 0.2 ~ 2 mM の NOEV の存在下で 4 日間培養すると、酵素活性が著しく上昇する細胞株があった。特に R201C、R457Q 変異でその反応が大きかった。表現型として若年型症例に最も有効であり、乳児型症例にも 3 倍以上の活性上昇を示す症例があった。すべての症例を合わせて 35 % の細胞が陽性反応を示した。この実験条件下では、成人型・モルキオ B 病症例の反応は大きくなかった。

1.6.2 マウス線維芽細胞

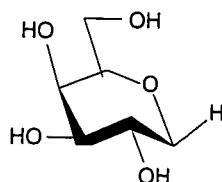
そこで、既に確立した β -ガラクトシダーゼ欠損ノックアウトマウス^{10,11)} の線維芽細胞に、ヒト β -ガラクトシダーゼ欠損患者の病型特異的な変異 cDNA を導入し、この変異を発現する細胞株を確立した⁸⁾。ヒト細胞とは多少の違いがあるが、NOEV はファブリー病に有効な 1-デオキシガラクトノジリマイシンの 1000 ~ 2000 倍の活性誘導効果を示した。R201C 変異にもっとも有効であった⁸⁾。ガングリオシド負荷後、正常遺伝子の発現細胞には基質の蓄積がみられなかったが、R201C 発現細胞ではガングリオシド G_{M1} とそのアシアロ体 G_{A1} の著しい蓄積を示した。そして NOEV 添加により基質蓄積が著しく減少した⁸⁾。

1.6.3 モデルマウスの作成と個体への NOEV 投与

動物個体実験のために、上記のノックアウトマウスにヒト β -ガラクトシダーゼ欠損症の病型特異的な変異遺伝子をトランスジーンとして導入したモデルマウスを作成した⁸⁾。正常な β -ガラクトシダーゼを発現する遺伝子 GP8 を導入したマウスは病気を発現せず、正常の個体として生存した。この遺伝子の過剰発現により遺伝子治療ができたということになる。この結果を



N-オクタチル-4-エピ- β -バリエナミン (NOEV)



ガラクトース

- | |
|-----------------------------------|
| 1. 分子量 287.40 |
| 2. 室温で安定 |
| 3. 水 (3 mM)、メタノール、DMSO に溶解 |
| 4. 試験管内：酵素活性を阻害 (競合的) |
| 5. IC ₅₀ = 0.2 μ M |
| 6. 細胞内：酵素を活性化 (低濃度) |

図 4.1.2 NOEV の構造と物性

コア構造はガラクトースに似ているが、ガラクトースの C1 側鎖基と C1-5 結合部はガラクトースと異なる。

そのままヒト個体に適用することはできないが、理論的には操作が可能である。ただしヒトのように生存期間が長い個体では、トランスジーンによる長期の酵素活性過剰発現の影響を考慮しなければならない。

次に R201C 発現マウスに NOEV の 1～3 mM 水溶液を 1 週間経口投与した。脳を含むすべての組織の酵素活性が著しく上昇し、脳組織のガングリオシド蓄積が消失した。3 mM 投与後の脳内酵素活性は、正常マウスの 30% レベルにまで上昇していた（未発表データ）。また別の実験で、3 mM NOEV 投与 2 カ月後の脳内 NOEV 濃度は肝臓内濃度の 30～45% にまで上昇していた（未発表データ）。この結果から、経口投与した NOEV が腸管から吸収され、血液脳関門を通過し中枢神経系に取り込まれ、酵素分子を安定化し活性を発現させたとの結論を得た。

これらは発症前マウス実験で得られた結果であるが、現在、発症前からの長期投与実験を進行中である。R201C 発現マウスに 3 mM の NOEV 水溶液を生後 6 カ月から経口投与した少数例実験の予備的観察によると、シャペロン投与 4 カ月後（生後 10 カ月）に非投与マウスが後肢の不全麻痺を発現したのに対し、投与群では後肢の麻痺は認められない（未発表データ）。今後さらに個体数を増やし、さらに長期の観察を続け、この結果を確認する予定である。

1.7 NOEV についてわかったこと、検討すべきこと

以上の細胞、動物個体の実験から以下のことがわかった。表 4.1.1 に主な項目をまとめた。

NOEV は長期間、室温で安定である。これは薬剤としての必須の条件である。水への溶解性については分子修飾による検討を進めている。そして経口投与後、腸管内で吸収されて血液に入り、血液脳関門を通過して脳組織に入る。投与後のマウスの血液、脳組織の濃度測定により確認した。脳組織に入った NOEV は神経細胞の中で変異蛋白質を安定化、活性化し、異常に蓄積した基質（脂質）を分解する。今後の課題は最適の投与量や投与方法である。

予備的なデータではあるが、NOEV 投与によりモデルマウスの中枢神経系の発症予防が可能であるとの結論が得られた。病初期の後肢麻痺発現が出現しない。そして経口投与 5 週間までは、体重、飲水量、血液生化学分析データに異常を認めない。マウスの嗜好性・忌避はない。さらに、長期投与における個体への影響を観察中である。

NOEV が β -ガラクトシダーゼ欠損症のシャペロン療法に最もすぐれた薬剤であるという保証はない。現在、他の新規化合物をテスト中である。なかには同程度の活性を持ち、かつ薬剤としての物性が優れた化合物もある（未発表データ）。また、変異体により効果の違いがある。シャペロン分子と変異蛋白質との分子反応を構造機能相関の観点から分析する予定である。

この新しい治療的アプローチが可能であるためには、変異遺伝子が触媒活性をもつ変異蛋白質を発現するという条件が必須である。同じ名前の病気すべての患者に様に適用できる手法ではない。しかし、現在まったく治療のない病気の一部でもこの方法で症状の軽減、予防が可能になれば、極めて大きな学問的、社会的な意味を持つ。 β -ガラクトシダーゼ変異については 30～35% 程度の患者に効果が期待される。他の類似疾患でもほぼ同じ範囲の患者に治療が可能であると予測している（未発表データ）。

1.8 他のライソゾーム病・他の遺伝病への応用

既に述べたように、この研究はファブリー病から始まった。現在の主要な研究対象は脳病変を発現する β -ガラクトシダーゼ欠損症候群、すなわち G_{M1} -ガングリオシドシスである。モルキオ B 病については効果が確認できていない。しかし原理的にこのアプローチはすべてのライソゾーム病に適用できるはずである。実際、 β -グルコシダーゼ欠損症候群（ゴーシェ病）でもグルコース類似の化合物が少なくとも培養細胞で有効であることが確認できた⁹⁾。また α -ガラクトシダーゼに有効な NOEV 類縁体も検索中である。

このように、現在のところガラクトースとグルコースの α および β 結合を認識する酵素についての分析が進行中である。今後、他のライソゾーム酵素欠損症についても順次対象を広げる予定である。

表 4.1.1 NOEV についてわかったこと

- | |
|--|
| 1. 試験管内で β -ガラクトシダーゼの阻害剤である（高濃度） |
| 2. 細胞内で変異 β -ガラクトシダーゼの活性発現を誘導する（低濃度） |
| 3. この阻害・活性化は遺伝子変異特異的である |
| 4. 個体への経口投与により、血液脳関門を通過して脳組織に到達する |
| 5. 脳組織で変異 β -ガラクトシダーゼの活性発現を誘導する |
| 6. 脳組織で蓄積基質の分解を誘導する |
| 7. 中枢神経症状の発現を予防・軽減する |
| 8. 短期投与ではマウス個体に対する副作用・毒性はない |

これまで我々はライソゾーム病という細胞内分子病態がかなり明らかにされた疾患群を対象としてきたが、他のカテゴリーの遺伝病でも、もしその分子病態、つまり変異遺伝子の発現、変異蛋白質の分子修飾、活性発現部位への細胞内移動、活性発現機構などが明らかにされれば、同じ原理の治療的アプローチが可能になるはずである。その意味でこの分子治療法、ケミカルシャペロン療法が今後多くの病気について検討され、実用化されることを期待している。

謝辞

本稿の β -ガラクトシダーゼ欠損症の研究は、国際医療福祉大学をはじめ以下の多くの施設の研究者との共同研究により進行中である。黒澤美枝子（国際医療福祉大学基礎医学研究センター）、岩崎博之、渡辺浩史（国際医療福祉大学臨床医学研究センター）、松田潤一郎（国立感染症研究所獣医科学部）、難波栄二（鳥取大学生命機能研究支援センター）、大野耕策（鳥取大学医学部）、伊藤雅之（国立精神・神経センター神経研究所）、飯田真己（生化学工業中央研究所）、小川誠一郎（慶應義塾大学理工学部）、実方利宏（株式会社エスアールエル）。以上の代表者とともに各施設の多くの研究協力者のご援助をいただいた。また α -ガラクトシダーゼ欠損症の研究には石井 達（東京都臨床医学総合研究所、現・帯広畜産大学）と樊 建強（東京都臨床医学総合研究所、現・マウントサイナイ医科大学）両氏の貢献が大きい。ここに記して感謝の意を表す。この研究は文部科学省科学研究費（13680918、14207106）ならびに厚生労働省科学研究費（10030501、14221201）の補助金を受けた。

文献

- 1) 鈴木義之：リソゾーム病総論、最新内科学大系 11。井村裕夫ほか編：ミトコンドリア病・リソゾーム病、中山書店、東京、p173-186, 1996
- 2) 鈴木義之：遺伝性ライソゾーム病。内科 87: 737-742, 2001
- 3) Suzuki Y, et al: β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1-Gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, et al (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, 3775-3809, 2001; Online Version: <http://genetics.accessmedicine.com/>, McGraw-Hill, New York, 2004
- 4) 鈴木義之：ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法。小児科 45: 2313-2320, 2004
- 5) Okumiya T, et al: Galactose stabilizes various missense mutants of α -galactosidase in Fabry disease. Biochem Biophys Res Commun 214: 1219-1224, 1995
- 6) Fan JQ, et al: Accelerating transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. Nature Med 5: 112-115, 1999
- 7) Tominaga L, et al: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human β -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. Brain Dev 23: 284-287, 2001
- 8) Matsuda J, et al: Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 15912-15917, 2003
- 9) Lin H, et al: N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. Biochim Biophys Acta 1689: 219-228, 2004
- 10) Matsuda J, et al: Neurological manifestations of knockout mice with β -galactosidase deficiency. Brain Dev 19: 19-20, 1997
- 11) Matsuda J, et al: β -Galactosidase-deficient mouse as an animal model for GM1-gangliosidosis. Glycoconjugate J 14: 729-736, 1997

(鈴木義之)

Visions & Reflections (Minireview)

Chemical chaperone therapy for G_{M1}-gangliosidosis

Y. Suzuki

International University of Health and Welfare Graduate School, 2600-1 Kita-Kanemaru, Otawara 324-8501 (Japan), Fax: +81-287-24-3229, e-mail: SuzukiY@iuhw.ac.jp

Received 10 October 2007; received after revision 31 October 2007; accepted 6 November 2007

Online First 19 January 2008

Abstract. We have proposed a chemical chaperone therapy for lysosomal diseases, based on a paradoxical phenomenon that an exogenous competitive inhibitor of low molecular weight stabilizes the target mutant molecule and restores its catalytic activity as a molecular chaperone intracellularly. After Fabry disease experiments, we investigated a new synthetic chaperone compound *N*-octyl-4-epi- β -valienamine (NOEV)

in a G_{M1}-gangliosidosis model mice. Orally administered NOEV entered the brain through the blood-brain barrier, enhanced β -galactosidase activity, reduced the substrate storage, and clinically improved neurological deterioration. We hope that chemical chaperone therapy will prove useful for some patients with G_{M1}-gangliosidosis and potentially other lysosomal storage diseases with central nervous system involvement.

Keywords. Chemical chaperone therapy, G_{M1}-gangliosidosis, β -galactosidase, *N*-octyl-4-epi- β -valienamine, neurogenetic disease.

Introduction

For more than 15 years we performed molecular analyses of two genetic diseases: G_{M1}-gangliosidosis (OMIM 230500) with generalized neurosomatic dysfunctions and Morquio B disease (OMIM 253010) with generalized skeletal dysplasias without neurological involvement [1]. Both are caused by allelic mutations of the gene *GLB1* (3p21.33) coding for lysosomal β -galactosidase (EC 3.2.1.23) catalyzing hydrolysis of ganglioside G_{M1} and related glycoconjugates. Ganglioside G_{M1} accumulates in the G_{M1}-gangliosidosis-affected brain. Oligosaccharides derived from keratan sulfate or glycoproteins are detected in visceral organs and urine from G_{M1}-gangliosidosis and Morquio B patients.

At present only symptomatic therapy is available for the brain lesion in human G_{M1}-gangliosidosis patients. Enzyme replacement therapy is not possible. In 2003, we proposed chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1}-gangliosidosis, using *N*-Octyl-4-epi-

β -valienamine (NOEV) as a potent stabilizer of mutant β -galactosidase [2].

Concept of chemical chaperone therapy

In general, molecular events in genetic diseases are affected by various molecular processes [3]. Three possible molecular abnormalities can be listed in genetic diseases: (1) biosynthetic defect; (2) deficient catalytic activity of a mutant protein; and (3) unstable mutant protein with normal or near-normal biological activity. We tested these possibilities first in Fabry disease, and found some mutant enzyme proteins were unstable at neutral pH in the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi apparatus, and rapidly degraded because of inappropriate molecular folding [4]. Galactose surprisingly induced a high expression of α -galactosidase A activity in cultured fibroblasts from Fabry patients [5]. We then found a commercially available compound 1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) for stabili-

zation of the enzyme [6]. After extensive molecular analysis we came to the following conclusion.

A competitive inhibitor, a substrate of transition state analog, binds to misfolded mutant protein as a molecular chaperone in the ER/Golgi compartment of the cell, resulting in formation of a stable molecular complex at neutral pH. The protein-chaperone complex is safely transported to the lysosome, where it dissociates under the acidic conditions, the mutant enzyme remains stabilized, and its catalytic function is expressed.

NOEV: Physicochemical and biological characteristics

After using galactose and DGJ for α -galactosidase A, I came across two synthetic compounds: β -galactosidase inhibitor *N*-octyl-4-epi- β -valienamine (NOEV) and β -glucosidase inhibitor *N*-octyl- β -valienamine (NOV). NOV was the first compound synthesized as a glucocerebrosidase inhibitor, and NOEV was subsequently synthesized by epimerization of NOV [7]. NOEV experiments moved faster than NOV simply because of more experimental data and materials for β -galactosidase and G_{M1} -gangliosidosis.

NOEV is a potent inhibitor of lysosomal β -galactosidase *in vitro*. It is stable and freely soluble in methanol or DMSO. The hydrochloride salt is freely soluble in water. Its molecular weight is 287.40, and it has an IC_{50} of 0.125 μ M toward human β -galactosidase [2].

NOEV is 50-fold more efficient than DGJ for expression of mutant β -galactosidase activity in G_{M1} -gangliosidosis. Our calculations suggest that at least 10% of normal enzyme activity is necessary for catalytic digestion of the storage substrate below the pathological level in lysosomal diseases. Theoretically the disease will not occur in patients expressing enzyme activity above this level during his or her lifetime. We anticipate that the effective NOEV concentrations in human cells and animal tissues are much lower than the IC_{50} for this agent *in vitro*. In fact, NOEV is effective at the IC_{50} concentration in the culture medium for enhancement of mutant enzyme activity [8]. Under the current experimental conditions, the NOEV content in the lysosomal compartment must be much lower than that in the extracellular environment.

NOEV effect on human and mouse fibroblasts expressing mutant human enzyme

About one-third of cultured fibroblasts from G_{M1} -gangliosidosis patients, mainly with the juvenile and some of the infantile forms, responded to NOEV. The

effect was mutation specific [8]. The R457Q mutant cells responded to NOEV maximally at 0.2 μ M, and the R201C/R201H mutant cells at 2 μ M. The knockout (KO) mouse fibroblasts expressing mutant human β -galactosidase [9] showed essentially the same results [2]. Addition of ganglioside mixture in the culture medium increased intracellular G_{M1} in the R201C cells causing juvenile G_{M1} -gangliosidosis. This storage was almost completely prevented by NOEV.

Chemical chaperone therapy on genetically engineered G_{M1} -gangliosidosis model mice

For animal studies, we developed a KO mouse strain with complete deficiency of β -galactosidase [10], and then a transgenic (Tg) strain based on KO, expressing the human R201C mutation (4% normal β -galactosidase activity in the brain). Both strains showed neurological deterioration that differed in severity. Life-span was 7–10 months for KO and 12–18 months for Tg. Neuropathology corresponded to the clinical severity [2]. Short-term oral NOEV administration resulted in significant enhancement of the enzyme activity in all the R201C mouse tissues examined, including the brain [2]. Immunohistochemistry revealed an increase in β -galactosidase activity and decrease in G_{M1} and G_{A1} storage.

An early NOEV treatment study with the R201C mouse showed an increase of the NOEV content in the brain after starting oral administration, its rapid disappearance after withdrawal, parallel increase of β -galactosidase activity, and decrease of G_{M1} storage [11]. In this study we tried a new scoring system for neurological assessment [12]. Treatment at the very early clinical stage (2 months) resulted in a positive clinical effect within a few months, although complete arrest or prevention of disease progression was not achieved under this experimental condition. The latency before a clinical effect was longer if the therapy was started in the late symptomatic stage (6 months). We concluded that NOEV treatment at the early stage of disease is mandatory for prevention of the brain damage.

This result indicated the following sequence of events in the brain (Fig. 1). After oral administration, NOEV goes directly into the bloodstream without intestinal breakdown, is delivered to the mouse brain through the blood-brain barrier, and enhances the mutant β -galactosidase activity, resulting in substrate digestion and clinical improvement. No specific adverse effects have been observed for at least 6 months of continuous oral administration.

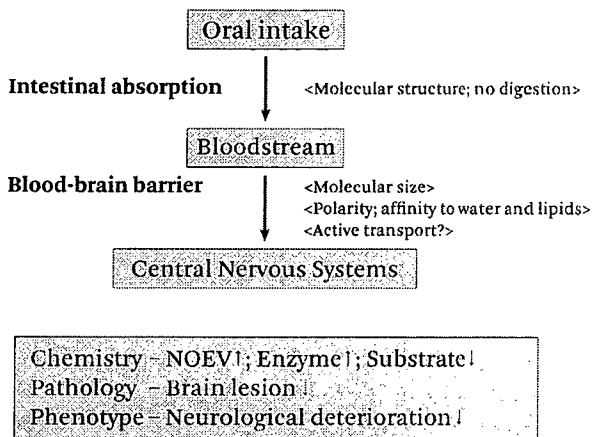


Figure 1. *N*-octyl-4-epi- β -valienamine (NOEV) goes directly from the gastrointestinal tract into the bloodstream without intestinal digestion, and into the brain through the blood-brain barrier. The catalytic activity of the mutant β -galactosidase is enhanced and the substrates are digested to improve phenotypic manifestations.

Future prospects

This new therapeutic strategy is in principle applicable to all lysosomal storage diseases if a specific compound is developed for each enzyme in question. We have already confirmed the effect in Fabry disease [5, 6], G_{M1} -gangliosidosis [2, 11], and Gaucher's disease [13, 14]. Our study started with a lysosomal disease, and is currently being expanded to a few related diseases. Further, there may be other genetic diseases that could be considered, provided that the molecular pathology in somatic cells has been studied and is understood in detail. I hope that studies in this direction will disclose a new aspect of molecular therapy for inherited metabolic diseases with central nervous system involvement in future.

Acknowledgments: This research was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports, and Technology of Japan (13680918, 14207106, 16300141), and the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (H10-No-006, H14-Kokoro-017, H17-Kokoro-019).

1 Suzuki, Y., Nanba, E., Matsuda, J. and Oshima, A. (2007) β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1} -gangliosidosis and Morquio B disease. In: *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, <http://www.ommbid.com/>, Valle, D. et al., (eds.), McGraw-Hill, New York.

- 2 Matsuda, J., Suzuki, O., Oshima, A., Yamamoto, Y., Noguchi, A., Takimoto, K., Itoh, M., Matsuzaki, Y., Yasuda, Y., Ogawa, S., Sakata, Y., Nanba, E., Higaki, K., Ogawa, Y., Tominaga, L., Ohno, K., Iwasaki, H., Watanabe, H., Brady, R. O. and Suzuki, Y. (2003) Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} -gangliosidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15912–15917.
- 3 Suzuki, Y. (2006) β -Galactosidase deficiency: An approach to chaperone therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 471–476.
- 4 Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H. and Suzuki, Y. (1993) Characterization of a mutant α -galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1585–1589.
- 5 Okumiyama, T., Ishii, S., Takenaka, T., Kase, R., Kamei, S., Sakuraba, H. and Suzuki, Y. (1995) Galactose stabilizes various missense mutants of α -galactosidase in Fabry disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 1219–1224.
- 6 Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N. and Suzuki, Y. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* 5, 112–115.
- 7 Ogawa, S., Sakata, Y., Ito, N., Watanabe, M., Kabayama, K., Itoh, M. and Korenaga, T. (2004) Convenient synthesis and evaluation of glycosidase inhibitory activity of α - and β -galactose-type valienamines, and some *N*-alkyl derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 995–1002.
- 8 Iwasaki, H., Watanabe, H., Iida, M., Ogawa, S., Tabe, M., Higaki, K., Nanba, E. and Suzuki, Y. (2006) Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. *Brain Dev.* 28, 482–486.
- 9 Tominaga, L., Ogawa, Y., Taniguchi, M., Ohno, K., Matsuda, J., Oshima, A., Suzuki, Y. and Nanba, E. (2001) Galactonojirimycin derivatives restore mutant human β -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev.* 23, 284–287.
- 10 Matsuda, J., Suzuki, O., Oshima, A., Ogura, A., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Asano, T., Takimoto, K., Sukegawa, K., Suzuki, Y. and Naiki, M. (1997) β -Galactosidase-deficient mouse as an animal model for G_{M1} -gangliosidosis. *Glycoconj. J.* 14, 729–736.
- 11 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. and Brady, R. O. (2007) Chemical chaperone therapy: Clinical effect in G_{M1} -gangliosidosis. *Ann. Neurol.* 62, 671–675.
- 12 Ichinomiya, S., Watanabe, H., Maruyama, K., Toda, H., Iwasaki, H., Kurosawa, M., Matsuda, J. and Suzuki, Y. (2006) Neurological assessment of G_{M1} -gangliosidosis model mice. *Brain Dev.* 29, 210–216.
- 13 Lin, H., Sugimoto, Y., Ohsaki, Y., Ninomiya, H., Oka, A., Taniguchi, M., Ida, H., Eto, Y., Ogawa, S., Matsuzaki, Y., Sawa, M., Inoue, T., Higaki, K., Nanba, E., Ohno, K. and Suzuki, Y. (2004) *N*-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F2131 mutant β -glucosidase in cultured cells: A potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 219–228.
- 14 Lei, K., Ninomiya, H., Suzuki, M., Inoue, T., Sawa, M., Iida, M., Ida, H., Eto, Y., Ogawa, S., Ohno, K., Kaneki, C., Brady, R. O. and Suzuki, Y. (2007) Enzyme enhancement activity of *N*-octyl- β -valienamine on β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 587–596.



Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G_{M1} -gangliosidosis

Ayumi Takamura^{a,b}, Katsumi Higaki^{a,*}, Kenya Kajimaki^{a,c}, Susumu Otsuka^{a,d},
Haruaki Ninomiya^e, Junichiro Matsuda^f, Kousaku Ohno^g, Yoshiyuki Suzuki^h, Eiji Nanba^a

^a Division of Functional Genomics, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan

^b Department of Biosignaling, School of Life Sciences, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan

^c Department of Molecular and Cellular Biology, School of Life Sciences, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan

^d Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science,

Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan

^e Department of Biological Regulation, School of Health Science, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan

^f National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-asagi, Ibaraki, 567-0085, Japan

^g Division of Child Neurology, Tottori University Faculty of Medicine, 36-1 Nishi-machi, Yonago 683-8504, Japan

^h Graduate School, International University of Health and Welfare, 2600-1 Kita-Kanemaru, Otawara 324-8501, Japan

Received 28 December 2007

Available online 9 January 2008

Abstract

G_{M1} -gangliosidosis is an autosomal recessive lysosomal lipid storage disorder, caused by mutations of the lysosomal β -galactosidase (β -gal) and results in the accumulation of G_{M1} . The underlying mechanisms of neurodegeneration are poorly understood. Here we demonstrate increased autophagy in β -gal-deficient (β -gal^{-/-}) mouse brains as evidenced by elevation of LC3-II and beclin-1 levels. Activation of autophagy in the β -gal^{-/-} brain was found to be accompanied with enhanced Akt-mTOR and Erk signaling. In addition, the mitochondrial cytochrome *c* oxidase activity was significantly decreased in brains and cultured astrocytes from β -gal^{-/-} mouse. Mitochondria isolated from β -gal^{-/-} astrocytes were morphologically abnormal and had a decreased membrane potential. These cells were more sensitive to oxidative stress than wild type cells and this sensitivity was suppressed by ATP, an autophagy inhibitor 3-methyladenine and a pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk. These results suggest activation of autophagy leading to mitochondrial dysfunction in the brain of G_{M1} -gangliosidosis.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: G_{M1} -gangliosidosis; Lysosome; Autophagy; mTOR; Mitochondria; Astrocyte; Neurodegeneration

G_{M1} -gangliosidosis (OMIM 230500) is an autosomal recessive lysosomal lipid storage disorder with progressive central nervous system dysfunction, visceromegaly, and skeletal dysplasias. It is caused by deficiency of lysosomal acid β -galactosidase (β -gal) due to mutations in the

GLB1 gene [1]. Three clinical forms (infantile, juvenile, and adult/chronic) have been distinguished according to the age of onset and severity, mainly due to different residual activities of the mutant enzymes and hence different levels of the substrate accumulation in tissues, especially in the brain. Pathologically, typical lamellar inclusions or membranous cytoplasmic bodies are found in neurons of human, mouse, and other animal models of G_{M1} -gangliosidosis [2–4]. Neurons are the primary target of storage, but astrocytes may also appear abnormally vacuolated [5]. Recently, we have developed chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} -gangliosidosis [6,7]. However,

Abbreviations: LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; LDH, lactate dehydrogenase; 3-MA, 3-methyladenine; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin.

* Corresponding author. Fax: +81 859 38 6470.

E-mail address: kh4060@grape.med.tottori-u.ac.jp (K. Higaki).

underlying biological mechanisms responsible for neurodegeneration still remain uncertain [8].

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) involves bulk degradation of complete regions of the cytosol [9]. The target regions are initially sequestered in multi-membrane vacuoles, known as autophagosome which eventually fused with lysosomes for degradation. Autophagy plays a cytoprotective role in low-nutrient conditions and disease states by catabolizing intracellular substrates for energy supply and by removing failing mitochondria and other factors that trigger cell death [10]. Dysfunction of autophagy can disrupt neuronal function and ultimately lead to neurodegeneration [11].

In this study, we demonstrate enhanced autophagy and mitochondrial alterations in the G_{M1} -gangliosidosis mouse brain, which might lead to neurodegeneration in this disease.

Materials and methods

Antibodies and reagents. Monoclonal anti- G_{M1} (GMB16) was from Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan), polyclonal anti-LC3 (PD014) was from MBL International Corp. (Woborn, MA, USA), polyclonal anti-beclin-1 (H-300) was from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) and polyclonal anti-Atk, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-mTOR, anti-phospho-mTOR (Ser2448), anti-S6 ribosomal protein (S610), and anti-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) were from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Paraquat, ATP and chloroquine were purchased from Wako (Tokyo, Japan), 3-methyladenine (3-MA), and rapamycin were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and z-VAD-fmk was from Promega (Madison, WI, USA).

Mice and tissue collection. A C57BL/6-based congenic mouse strain with β -gal-deficiency (β -gal^{-/-}) was established as reported previously [3,6]. All animal procedures were carried out following the protocols approved by the committee for animal experiments in Tottori University and β -gal^{-/-} mice was obtained by cross breeding. For tissue staining, mice were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in sodium phosphate, pH 7.4. Brains were embedded in OTC compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) and 8 μ m sections were cut using a cryostat. For protein extractions, tissues were removed and frozen in liquid nitrogen.

Primary culture of astrocytes. For astrocyte preparation, brains from postnatal day four mice were removed under anesthesia. The cerebral cortex was dissociated and cells were seeded on plastic dishes in DMEM-F12 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS). They were cultured for 7 days, trypsinized, and seeded on dishes with DMEM-F12 with 10% FBS. They were confirmed to be GFAP-positive astrocytes at 3 weeks by immunostaining with polyclonal anti-GFAP (data not shown). Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay (Wako, Tokyo, Japan) was performed following the manufacturer's instruction.

Immunoblot analysis. Mouse brains were lysed by sonication in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA plus protease inhibitor cocktail (Roche). Protein was quantified using Color-Producing Solution (Wako). Samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred on a nylon membrane (Millipore) using a semi-dry transfer blotter (BioRad). Membranes were incubated in a polyclonal antibody followed by a horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit IgG antibody (Amersham). Detection was performed using ECL (Amersham Pharmacia Biotech) and images were captured in X-ray film or a LAS-1000 plus imager (Fujifilm).

Immunofluorescence staining. Brain sections were permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature, blocked with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature, and incubated with the first

antibody at 4 °C overnight. Bind antibodies were detected with Alexa-fluor-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. Fluorescence images were obtained using confocal microscopy (Leica, TCS-SP2; Wetzler, Germany).

Mitochondrial assay. Mitochondria were isolated from the mouse brain and cultured astrocytes using mitochondrial isolation kit (BioChain Ins. Hayward, CA, USA) and the enzyme activity of cytochrome *c* oxidase was determined using mitochondrial activity kit (BioChain Ins.) following the manufacturer's instruction. For mitochondrial labeling, cultured astrocytes were seeded on sterile cover slips or glass base dishes (Iwaki, Tokyo, Japan) and incubated in Hanks' balanced salt solution containing 100 nM MitoTracker Red CMXRos or 3 μ M Mitotracker JC-1 (MolecularProbes Inc., Eugene, OR, USA) for 20 min at 37 °C. Cells were then washed with Hanks' balanced salt solution and fluorescent images were obtained using confocal microscopy.

Results

G_{M1} accumulation and sequestration of autophagosomes proteins in the β -gal^{-/-} mice brain

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), a mammalian homolog of the yeast autophagic protein Atg8, has been used as an autophagosomal marker [9]. Cleavage of LC3 in its carboxy terminal gives rise to a cytosolic soluble form LC3-I which is further modified into LC3-II, a protein that associate with autophagosomes. Brain levels of LC3 were assessed by immunoblotting. Although levels of LC3-I and LC3-II in β -gal^{-/-} mice did not significantly differ from those in wild type (WT) mice at 10-day-old, the level of LC3-II were significantly higher in mutant mice at 10 months of age (Fig. 1A). G_{M1} and LC3 double immunofluorescence showed co-localization of LC3-immunopositive-granules with G_{M1} in neurons of β -gal^{-/-} mice at 10 months (Fig. 1B). Beclin-1 is the mammalian ortholog of yeast Atg6, and is a part of the Class III phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) complex that participate in autophagosome formation [9]. The level of beclin-1 was increased in brain lysates from 10-month-old β -gal^{-/-} mice when compared to WT mice (Fig. 1C and D). The Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and the extracellular signal kinase (Erk) are two major pathways that regulate autophagy [10,12]. Phosphorylation of Akt, Erk, and mTOR were increased, whereas no obvious alteration of S6 was detected in the brain lysates of β -gal^{-/-} mice at 10 months (Fig. 2A and B).

Mitochondrial alterations in β -gal^{-/-} mice

Autophagy is a highly regulated process that is involved in the turnover of long-lived proteins and whole organelles. It can specifically target distinct organelles, such as mitochondria in mitopathy and the endoplasmic reticulum in reticulopathy [9]. We next sought to examine whether sequestration in autophagic vacuoles affects mitochondrial function in this mouse model. The level of mitochondrial cytochrome *c* oxidase activity was significantly decreased in the brain of β -gal^{-/-} mice than that of WT mice at 10 months (Fig. 3A). Similarly, cultured astrocytes from

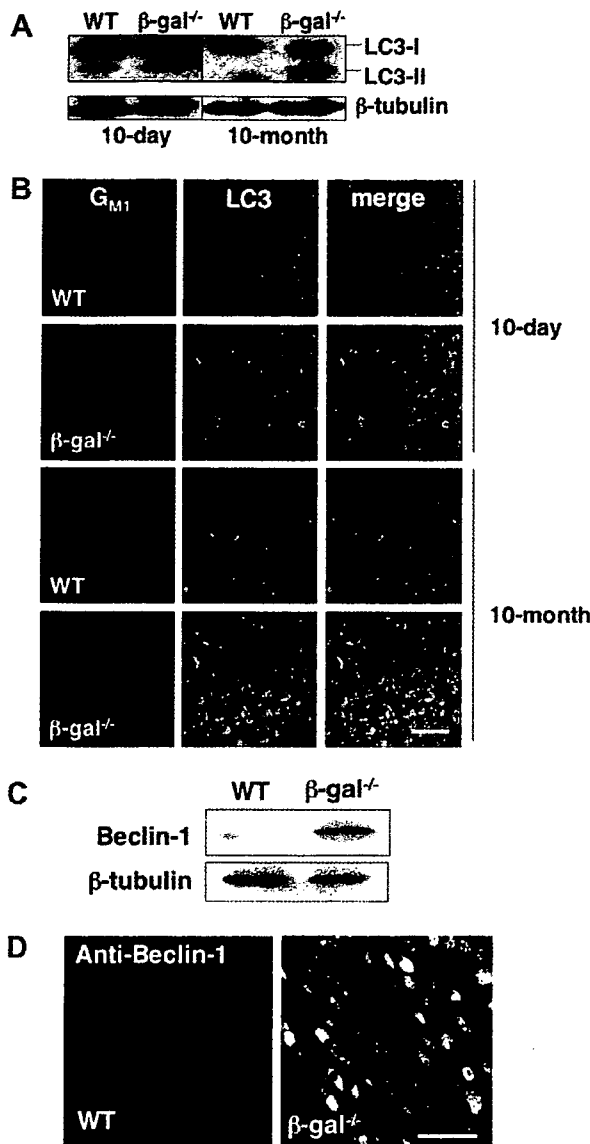


Fig. 1. Elevation of LC3-II and beclin-1 expression in β -gal^{-/-} mouse brain. Cerebellar lysates from WT and β -gal^{-/-} mice were subjected to Western blotting with anti-LC3 (A) or anti-beclin-1 (C). Immunofluorescence of cellular distribution of LC3 (B) and beclin-1 (D) proteins in the frontal cerebral cortex of WT and β -gal^{-/-} mice. Scale bar = 80 μ m.

β -gal^{-/-} mice showed lysosomal accumulation of G_{M1} and elevated LC3-II and beclin-1 levels (data not shown), and it had a decreased cytochrome *c* oxidase activity (Fig. 3A). Next, the morphology and the membrane potential of mitochondria were examined in cultured astrocytes using confocal microscopy. There were obvious differences in mitochondrial morphology between WT and β -gal^{-/-} astrocytes. In WT astrocytes, mitochondria were organized as extended tubular structures, whereas β -gal^{-/-} astrocytes contained smaller, fragmented or circulated mitochondria (Fig. 3B and C). When cells were stained with Mitotracker JC-1, a marker of the mitochondrial membrane potential,

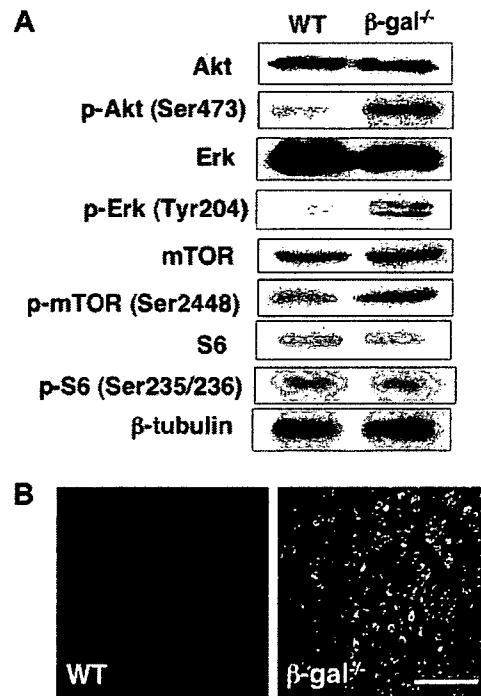


Fig. 2. Changes in Akt/mTOR and Erk signals in β -gal^{-/-} mouse brain. (A) Cerebellar lysates from postnatal of 10-month-old WT and β -gal^{-/-} mice were subjected to Western blotting with indicated antibodies. (B) Cellular distribution of p-mTOR (Ser2448) in the frontal cerebral cortex of WT and β -gal^{-/-} mice at 10 months of age. Scale bar = 80 μ m.

the intensity of red and green fluorescence was decreased in β -gal^{-/-} astrocytes compared to the WT (Fig. 3D).

Dysfunction of autophagic-lysosomal pathways and mitochondria

To examine functional relevance of mitochondrial dysfunction to cell death, we treated cultured astrocytes with oxidative stress reagent paraquat. LDH release assay revealed a significant increase of the percentage of dead cells was noted in β -gal^{-/-} astrocytes compared to that in WT cells (Fig. 4A). We also attempted to characterize the impairment in autophagy and mitochondria in β -gal^{-/-} astrocytes. LDH release in paraquat (250 μ M)-treated- β -gal^{-/-} astrocytes was significantly suppressed by addition of 0.5 mM ATP in the medium for 24 h (Fig. 4B). We next examined effects of 3-MA and rapamycin, which inhibit or induce autophagy, respectively [13], 3-MA at 10 mM reduced paraquat-induced-LDH release in β -gal^{-/-} astrocytes, whereas, rapamycin (2 μ g/ml) had no effects on cell death. We also examined a cell-permeable pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk, since autophagic cell death was partly mediated by caspase activation [10]. z-VAD-fmk (100 μ M) significantly decreased cell death in paraquat-treated- β -gal^{-/-} astrocytes. Under these conditions, none of the drugs affected LDH release in

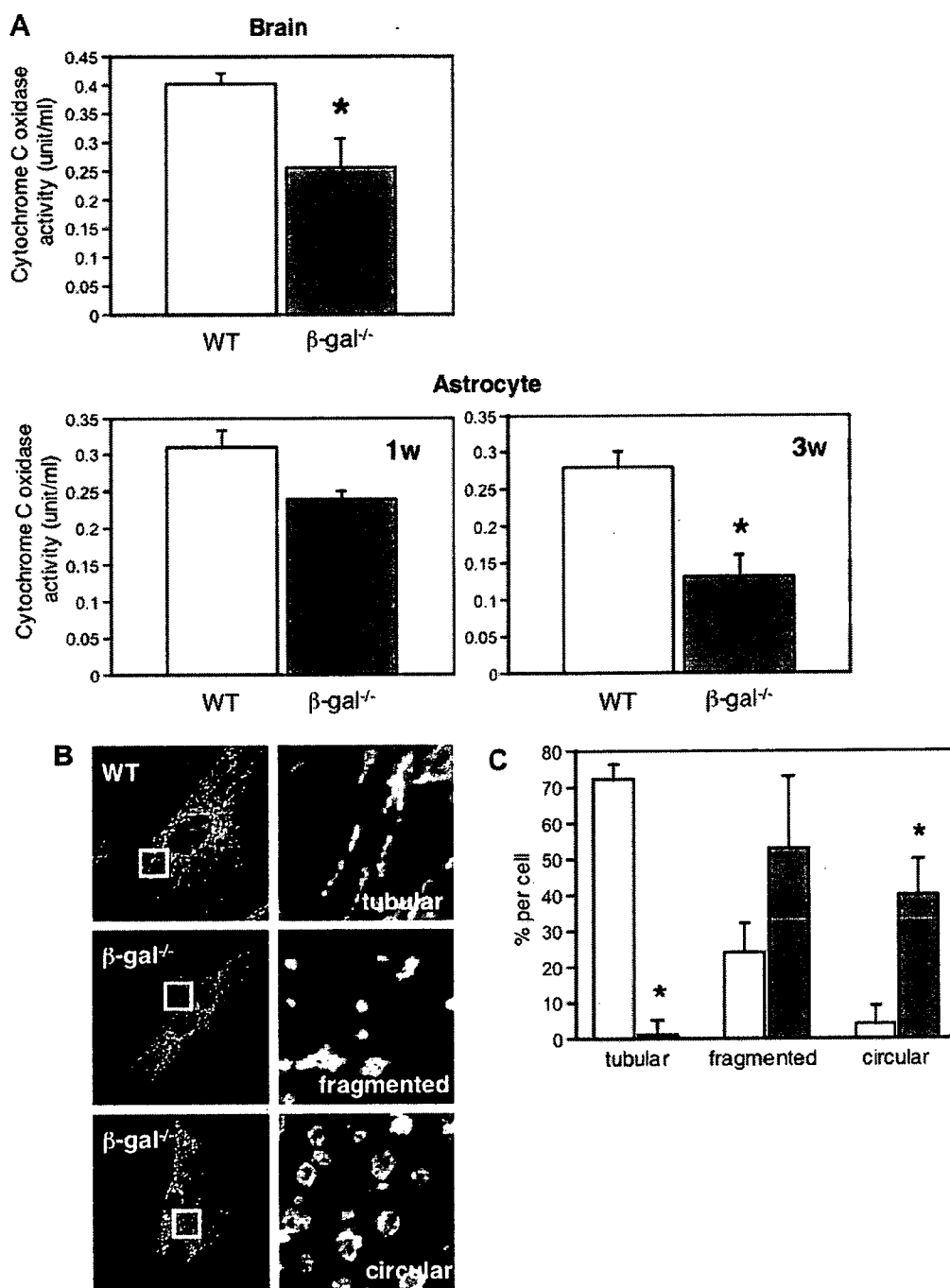


Fig. 3. Mitochondrial alteration in β -gal^{-/-} mouse brain and astrocyte. (A) Levels of cytochrome c oxidase activities in extracts from the brain and primary astrocytes of WT and β -gal^{-/-} mice. Values are means \pm SEM from three independent experiments, * p < 0.01 significantly differ from the value of WT cells. (B) Primary astrocytes from neonatal WT and β -gal^{-/-} cortex were cultured for 3 weeks and labeled with MitoTracker Red. Morphological analysis of mitochondria was obtained using confocal microscopy. (C) The number of cells with each morphology of mitochondria was computed. Values for the percent of total cell number from three independent experiments. n = 30 cells and values are means \pm SEM. (open bars: WT; dark bars: β -gal^{-/-}) (D) Primary-cultured astrocytes were labeled with JC-1. Shown are the representative images obtained by confocal microscopy using red and green channels. Scale bar = 25 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

WT astrocytes. Chloroquine, an inhibitor of autophagosome-lysosome fusion, induced cell death in WT astrocytes after treatment with paraquat, and this cell death was suppressed by ATP, 3-MA and z-VAD-fmk (Fig. 4B).

Discussion

One of the most important functions of autophagy is to maintain cellular energy subjected to nutrient deprivation



Fig. 3 (continued)

and potentially other forms of stress. Autophagy is a highly regulated process that is involved in the turnover of long-lived proteins and cytoplasmic constituents including mitochondria, endoplasmic reticulum, and ribosomes [10]. Molecular mechanisms that regulated autophagy in yeast and mammalian have recently been identified [9]. Knock-out of autophagy genes causes abnormal accumulation in ubiquitinated inclusions and neurodegeneration in mice and that implicates in mechanisms of neurodegeneration [14,15].

In the present study, we showed increased levels of autophagic proteins in the β -gal^{-/-} mice brain. Immunoblot analysis revealed an increase in levels of LC3-II, a widely used marker for autophagy, in all brain areas examined at 10 months of age. Levels were particularly high in cerebellum and brain stem, where severe neuronal death occurs in the β -gal-deficient human and mouse brain [1,3,4]. Increased autophagic stress was further confirmed by the presence of LC3-positive structures in cells with intracellular G_{M1} accumulations. This induction of autophagy was associated with increased expression of beclin-1. Beclin-1 is the mammalian ortholog of yeast Atg6, and is a part of the Class III PI3K machinery that participates in autophagosome formation [9].

Enhanced autophagy was recently reported in human skin fibroblasts and mice models of other types of lysosomal storage diseases, such as Danon disease [16], neuronal ceroid lipofuscinosis 2 [17], Pompe disease [18], mucopolisaccharidosis type IV [19] multiple sulfatase deficiency, mucopolysaccharidosis type IIA [20]. Induction of autophagy was also observed in the Niemann-Pick C1 (NPC1) mouse brain, which contained increased levels of beclin-1 [21].

The Akt-mTOR and Erk signaling pathways were also activated in β -gal^{-/-} mice. Insulin signaling stimulates phosphorylation and activity of mTOR via Akt/PBK pathway and thereby represses autophagy in response to insulin-like and other growth factor signals [9]. Activation of

these pathways is known to induce autophagy, although detailed mechanisms are still unknown. [12]. Previous studies have demonstrated localization of the active form of Erk in autophagosomes and mitochondria in degenerating brain [22], and that might happen in β -gal^{-/-} brain.

Decrease in the cytochrome *c* oxidase activity, the morphological abnormality and high sensitivity to oxidative stress in the β -gal^{-/-} astrocytes suggest mitochondrial abnormalities in this mouse. Inefficient autophagic-lysosomal fusion may cause accumulation of fragmented mitochondria. It is also possible that enhanced autophagy disrupted mitochondrial function. We showed that oxidative stress-induced cell death was suppressed by ATP, an autophagy inhibitor and a pan-caspase inhibitor in β -gal^{-/-} astrocytes as well as in chloroquine-treated WT astrocytes, supporting the idea that enhanced autophagy induces mitochondrial dysfunction that leads to cell death. Mechanisms leading to cell death in astrocytes remain unclear, since functional relationship between autophagic cell death (also known as type II cell death) and apoptotic cell death (or type I cell death) is complex [10]. Autophagy and apoptosis may be triggered by common signals.

Autophagy has emerged as the major pathway involved in a number of neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease [23], Parkinson disease [24], Huntington disease [25], and lysosomal storage diseases [16–21]. In each case, autophagic vacuoles accumulate in the affected neurons, indicating that activation of autophagy is a common feature of these diseases. However, the precise mechanisms leading to activation of autophagy remain elusive. Further investigation is warranted to clarify the mechanisms of enhanced autophagy in these disorders.

In summary, we provided evidence for abnormal activation of autophagy accompanied with mitochondrial alterations in the murine model of G_{M1} -gangliosidosis. Modulation of activity of autophagy and restoring mitochondrial functions may be of therapeutic benefit for this disease.