

## アガルシダーゼ・アルファとベータの血漿中および末梢リンパ球中の動態

分担研究者：田中 あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科 准教授)

### 研究要旨

アガルシダーゼ・アルファとベータの製剤をそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)としてファブリー病男性患者に投与し、血漿中および末梢リンパ球中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。血漿中および末梢リンパ球中ともにアガルシダーゼ・ベータのほうが高い活性を示したが、半減期には差がなかった。また、血漿中からリンパ球中へ酵素蛋白が移行する割合にも差がないものと推測された。

### 研究協力者

岡田志緒子(大阪市立大学大学院医学研究科・登録医)  
澤田 智(和泉市立病院・医員)

### (倫理面への配慮)

それぞれの患者に書面で説明を行い、同意書を得た。大阪市立大学の倫理委員会の承認を得て行った。

### A. 研究目的

ファブリー病の治療薬としてアガルシダーゼ・アルファとベータの2種の製剤が使用されている。両者の違いは、酵素蛋白に付加されている糖鎖にある。培養細胞系においては、マンノース6-リン酸の付加が多いベータ製剤のほうが細胞内への取り込みが多いという報告がされているが、生体内における両製剤の動態の差は明らかではない。生体内においては、マンノース6-リン酸受容体の分布に臓器差があるため、培養細胞とは異なる動態を示すものと想像される。ファブリー病患者において、投与された酵素製剤の血漿中と末梢リンパ球中での動態を比較することにより、各々の体内での動態を推測する。

### B. 研究方法

アガルシダーゼ・アルファとベータ製剤をそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)にしてファブリー病男性患者に投与し、血漿中および末梢リンパ球中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。

### C. 研究結果

血漿中においては、アルファ、ベータともに投与直後にピークを示し、その後急速に低下して約1時間後にはピーク値の半分の値となった。投与蛋白量が同じであったにもかかわらず、ベータはアルファの2倍のピーク値を示した。

リンパ球中においては、投与直後から24時間後までほぼ横這いの状態で酵素活性が上昇した。リンパ球においても、ベータはアルファの約2倍の値を示した。ともに、2週間後には正常の10%程度の活性となり、リンパ球中の半減期も血漿中と同様にアルファとベータに差はなかった。

### D. 考察

ベータ製剤はアルファ製剤よりもマンノース6-リン酸の付加量が多く、リンパ球への取り込みが多いことが推測される。しかしながら、マンノース6-リン酸受容体の分布には臓器差があるため、リンパ球中への取り込み量が即ち主な罹患臓器である心臓や腎臓への取り込み量に反映され

ているものではない。検討結果では、血漿中、リンパ球中ともにベータはアルファの2倍の活性を呈したが、血漿中とリンパ球中との活性比はほぼ同じで、半減期も同じであった。このことから、血漿中からリンパ球中への酵素蛋白の移行する割合は、アルファとベータに差がなく、ベータはアルファより単位蛋白量当たりの酵素活性が高いのではないかと推測された。

他方、腎臓のタコ足細胞など血流の届きにくい細胞への移行は、酵素の血漿中での半減期の長さや投与蛋白量とに影響されることが推測されている。アルファとベータは半減期に差はないものの、治療剤としての投与量はベータのほうが高く設定指示されているため、有利ではないと思われる。

今回の結果は、1例のみについての結果であるため、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) 岡田志緒子, 田中あけみ, 澤田 智, 岡村幹夫, 稲荷場ひろみ, 崔 吉永, 河野仁美, 寺柿政和, 根来伸夫, 山野恒一: 透析患者におけるアガルシダーゼ・アルファ(リブラガル)の血清中, およびリンパ球中の酵素活性について. 第50回日本晴天代謝異常学会, 米子, 2008
- 2) 岡田志緒子, 田中あけみ, 澤田 智, 岡村幹夫, 稲荷場ひろみ, 崔 吉永, 河野仁美, 寺柿政和, 根来伸夫, 小林郁江, 石村栄治, 西沢 良, 山野恒一: アガルシダーゼ・アルファとベータの末梢リンパ球中への移行動態. 第13回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 血中 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性および蛋白量の新規測定法の開発とその臨床応用

分担研究者：櫻庭 均(明治薬科大学分析化学)

### 研究要旨

タイタープレートを用いた血清中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性測定法と MUSTag 法を用いた濾紙血中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ蛋白量測定法を開発し、その利用を検討した。いずれの方法でも、ファブリー病ヘミ接合体患者群と健常者群の間には明確な差が認められた。前者は、その簡便性からファブリー病の診断スクリーニングに、後者は、その鋭敏性から、酵素補充療法開始時のアレルギー反応出現の可能性の予測に利用出来ると思われる。

研究協力者氏名：

兎川忠靖 (明治薬科大学分析化学)  
鈴木俊宏 (明治薬科大学分析化学)  
芝崎 太 (東京都臨床医学総合研究所)  
遠藤文夫 (熊本大学小児科)  
中村公俊 (熊本大学小児科)

### A. 研究目的

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ (GLA) は、ファブリー病の疾患責任酵素である。近年の酵素補充療法の導入により、早期診断・早期治療の実現を目指して、臨床試料を用いた簡便な GLA 活性測定法の確立が求められている。また、ファブリー病では患者の体内における GLA 蛋白質の有無により、酵素補充療法施行時のアレルギー反応の出現の程度に影響があるため、その高感度測定法の開発が望まれている。そこで、微量の血液試料を用いた GLA 活性と蛋白量の測定法を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) タイタープレートを用いた血清中の GLA 活性測定

10 名のファブリー病ヘミ接合体の男性、27 名のファブリー病ヘテロ接合体の女性(症状を有す

る者および無症状の者を含む)と 10 名の健常者由来の血清を試料とした。試料 10  $\mu$ l と基質溶液 (5mM 4-メチルウムベリフェリル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド (Calbiochem) /119mM N-アセチルガラクトサミン (Sigma-Aldrich) /0.1M クエン酸-リン酸緩衝液, pH 4.6) 60  $\mu$ l を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、反応停止液 (0.2M グリシン緩衝液, pH 10.7) を 200  $\mu$ l 加えて反応を停止させ、反応により生じた蛍光の強度を、Wallac 1420 ARVO MX Multilabel Counter (Perkin Elmer) を用いて、励起波長 355nm、測定波長 460nm で測定した。本法で測定した活性値を、2ml のエッペンドルフチューブ内で反応を行う従来法で得られた測定値と比較した。

#### 2) 乾燥濾紙血中の GLA 活性測定

10 名のファブリー病男性患者および 10 名の健常者由来の乾燥濾紙血を試料とした。直径 3mm に打ち抜いた血液濾紙をエッペンドルフチューブに入れ、25  $\mu$ l 抽出液 (0.05% Tweew20, 5mM Tris-HCl, pH 7.4) を加えて、室温で 1 時間静置した。このチューブに基質溶液 25  $\mu$ l を加えて遠沈した後、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、反応停止液を 950  $\mu$ l 加え、全体の液から 200  $\mu$ l を取り、96 穴のタイタープレートに入れ

た後、1)と同様の条件で蛍光測定を行った。既知量の精製 GLA を浸み込ませた濾紙を、同様の操作で処理し、標準とした。

### 3) MUSTag 法による乾燥濾紙血中の GLA 蛋白量測定

直径 3mm の血液濾紙試料をエッペンドルフチューブに入れ、抽出液 130 $\mu$ l を加えて、室温で 1 時間攪拌した後、スピニカラムに添加し、6,000 x g で 2 分間遠沈した。抗 GLA モノクローナル抗体を固相化した 96 穴タイタープレートに対して、遠沈上清を 50 $\mu$  l/well の量で加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。さらに、これらに対して GLA#1MUSTag(シンセラ・テクノロジーズ)25 $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応終了後、洗浄操作を行い、MUSTag に結合しているオリゴ DNA を切断して回収し、これを Real-Time PCR で定量測定した。

## C. 研究結果

### 1) タイタープレートを用いた GLA 活性測定法と従来法との比較

プレートリーダーを用いた方法で測定したファブリー病ヘミ接合体男性、ファブリー病ヘテロ接合体女性および健常者の GLA 活性値と従来の 2ml チューブを用いて測定したそれぞれの値に関して、図にまとめた。

個々のケースの活性値については、従来法で測定した値に比べて、プレートリーダー法で測定した値の方がやや低く出たが、両者はよく相関した



図 健常人とファブリー患者の血清 GLA 活性値の比較

値を示した。また、どちらの場合も、ファブリー病ヘミ接合体では GLA 活性はほぼ欠損しており、健常者群の値とは明確な違いが認められた。ファブリー病ヘテロ接合体群の場合、その平均値は、健常者群とヘミ接合体群との中間の値を示したが、個々の例についてみると、一部は健常者群と変わらない値を示した。

### 2) 濾紙血中の GLA 活性と蛋白量の比較

健常者由来の濾紙血を試料とした場合、GLA 活性測定および蛋白量測定のいずれにおいても、充分判読可能な数値が得られた。一方、ファブリー病ヘミ接合体では、いずれの測定においても欠損または著しい低値を示し、健常者群とファブリー病ヘミ接合体群との差は明らかであった(表)。

MUSTag 法で GLA 蛋白質を測定した場合、その検出限度は 0.38pg/spot であった。

## D. 考察

プレートリーダー法で測定した場合、従来法での測定値と比べて、血清中 GLA 活性値はやや低値を示したが、双方の測定法の間で励起および測定波長など測定条件に違いが存在するため、それらが測定値に影響している可能性がある。しかし、両者の値には相関性が認められ、プレートリーダー法でのファブリー病ヘミ接合体群の GLA 活性値と健常者群のそれとの間には明確な違いが認められたため、奔放でのファブリー病診断は充分可能と考えられた。プレートリーダー法は、簡便で、一度に多数の検体を処理出来るため、特に一

表 濾紙血中の GLA 活性と蛋白質

	GLA 活性* (pg/spot)	GLA 蛋白量** (pg/spot)
ファブリー病患者		
平均値	1.24	34.5
範囲	0.60-1.60	13.4-77.0
健常者		
平均値	3.00	22.5
範囲	1.80-6.47	14.3-39.2

\*MU- $\alpha$ -gal を基質として測定した。

\*\*MUSTag 法で測定した。

共に、直径 3mm の血液濾紙あたり、どの位の標準精製 GAL の量に相当するかを表した。

次スクリーニングに便利と考えられる。

MUSTag 法による濾紙血中 GLA 蛋白量の測定では、かなり微量まで測定可能であった。今回測定したファブリー病患者の血液では、いずれも GLA 蛋白量の減少がみられ、健常者群との区別が可能であった。

#### E. 結 論

プレートリーダーを用いた血清中の GLA 活性測定法は、簡便で、ファブリー病の一次スクリーニングに使用出来ると思われる。また MUSTag 法による濾紙血中の GLA 蛋白量測定法は、極めて鋭敏であり、酵素補充療法開始時のアレルギー反応出現の予測などに利用出来るかも知れない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 山田陽子, 石川雄一郎, 槇坂典子, 田島陽一, 櫻庭 均, 芝崎 太: 高感度多項目測定技術 (MUSTag) を用いた Fabry 病の新規診断法の確立. 第 80 回日本生化学会総会, 横浜, 2007.12.11-15

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ペルオキシソーム病(ALDを除く)に関する診断・病態解明に関する研究

分担研究者：下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野 教授)

研究要旨

国内唯一のペルオキシソーム病診断センターとしてペルオキシソーム病患者の正確な診断情報の提供を目的に診断パンフレットを作成して全国に配布するとともに、ホームページも公開している。平成 19、20 年の 2 年間に 200 例におよぶ国内患者の血清脂肪酸分析による診断スクリーニングを施行し、細胞・タンパク・遺伝子レベルでの正確な診断を行う一方で、海外への医療貢献としてサウジアラビア国立病院と提携し、サウジでのペルオキシソーム病診断システムの確立し、患者細胞での解析・診断を行っている。

研究協力者：

長瀬朋子 (岐阜大学・ゲノム研究分野)

荒井綾子 (岐阜大学・ゲノム研究分野)

梶原尚美 (岐阜大学・ゲノム研究分野)

A. 研究目的

リソソーム病やミトコンドリア病とともに新たな疾患概念として確立しているペルオキシソーム病国内患者の正確かつ迅速な診断を目的に、ペルオキシソーム病患者診断スクリーニングから確定診断のシステムを確立して、全国の医療機関にその情報を提供するとともに、集積した患者試料等を用いることにより、発展途上にある本疾患群の病態解明から治療法の開発を行う。

B. 研究方法

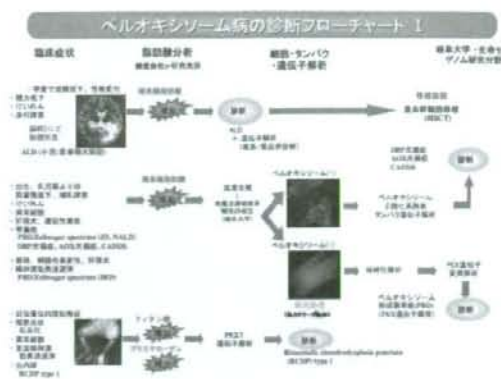
ペルオキシソーム病の診断システムは岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野において、臨床症状よりペルオキシソーム病が疑われた患者血清を用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析装置により極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラスマローゲン測定し、異常を認めた患者については皮膚生検による培養線維芽細胞の樹立か

ら細胞、タンパク、遺伝子レベルの解析を経て、確定診断を行う。その際に同意を得られた患者試料については難治性疾患である本症の病態解明から治療法の開発研究を進めて行く。

一方で、発展途上にある本疾患群の国内医療機関への更なる周知を目的に、ペルオキシソーム病に属する各疾患概要から診断フローチャート等の医療情報を掲載した「ペルオキシソーム病診断パンフレット」を作成して全国に配布している。

さらに岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野内のホームページにペルオキシソーム病に関するページを設置して(<http://www1.gifu-u.ac.jp/~lsrc/dgr/shimozawa-hp/index.html>)、最新の医療情報を更新し、全国に配信している。

またこれまでの診断、研究成果の国際貢献としてサウジアラビア国立病院とペルオキシソーム病患者の診断協力に関する協定を締結し、アラブ地域においてペルオキシソームが疑われた患者細胞が送付され、細胞レベルで診断を確定して情報の提供を行っている。



### C. 研究結果

平成 19、20 年の 2 年間に全国の医療機関より依頼された約 200 例に及ぶ血清の脂肪酸分析を行い、53 例のベルオキシソーム病患者または保因者を診断している。

さらに診断した患者の主治医に対してはパンフレット、ホームページも含めて疾患の治療情報や予後、国内患者の状況を個人情報に留意して情報提供を行っている。

サウジアラビアとのベルオキシソーム病診断提携については平成 20 年度に 8 例の患者を診断し、その取組みは新聞にも掲載されている(中日新聞 11 月 18 日朝刊総合面)。

### D. 考察および結論

ベルオキシソームはリソソームやミトコンドリアと同様、全ての真核細胞に存在する細胞内小器官で、ヒトにおいても脂質代謝をはじめ重要な生

理的機能を有している。その代謝機能に異常を来して発症するベルオキシソーム病は近年その疾患概念が確立し、未だ新たな疾患が発見されている発展途上の疾患群である。そのため既知の疾患に関しても、生存中または早期に診断がつかない症例が数多く、存在している。またほとんどの疾患においてその病態や有効な治療法が未解決な難治性の疾患である。

従って、今後、本研究班において診断システムを確立し、全国に周知して未診断の症例を減少させることにより、国内における本疾患群の実態が明らかになり、

その病態解明、治療法の開発に繋がる成果が期待される。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kuratsubo I, Suzuki Y, Shimozawa N, et al : Parents of Childhood X-linked Adrenoleukodystrophy : High Risk for Depression and Neurosis. Brain & Development, 30 : 477-482, 2008
- 2) Morita M, Kanai M, Shimozawa N, et al : Bicalein 5,6,7- trimethyl ether activates peroxisomal but not mitochondrial fatty acid beta-oxidation. J Inher Metab Dis, 31 : 442-449, 2008
- 3) Al-Dirbashi OY, Santa T, Shimozawa N, et al. : Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic and very-long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. J Lipid Res, 49 : 1855-1862, 2008
- 4) Saito M, Yamashita S, Shimozawa N, et al. : Changes in the amounts of myelin lipids and molecular species of plasmalogen PE in

the brain of an autopsy case with d-bifunctional protein deficiency. *Neuroscience Let*, 442 : 4-9, 2008

- 5) 下澤伸行:副腎白質ジストロフィーの造血幹細胞移植療法の現状と問題点—疾患の克服に向けて—. *日本先天代謝異常学会雑誌*, 24 : 20-24, 2008
- 6) 下澤伸行: Zellweger 症候群. *小児科学* 第3版, 大関武彦, 近藤直実編. 481-484, 医学書院, 東京, 2008

## 2. 学会発表

- 1) 中村和幸, 加藤光広, 松永 明, 他: ペルオキシソーム形成異常症と Sandhoff 病を合併した 1 女児例. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008

## H. 知的所有権の取得状況

なし



## ペルオキシソーム膜形成の分子病態解析

分担研究者：今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部 教授)

### 研究要旨

ペルオキシソーム膜に局在する Pex3p とペルオキシソーム膜タンパク質を輸送する分子シャペロン Pex19p との相互作用は、ペルオキシソーム膜形成に重要である。今回、リコンビナント Pex3p と Pex19p との相互作用を解析し、Pex3p の Trp-104 が Pex19p との結合に重要であることを見出した。さらに Pex3p 欠損 CHO 細胞に野生型 Pex3p ならびに変異型 Pex3p(T104A)を発現させると、野生型 Pex3p ではペルオキシソームの形成が回復したが、変異型では回復しなかった。細胞内でペルオキシソームが正常に形成されるためには、Pex3p と Pex19p との相互作用が必要であることが示唆された。

研究協力者氏名：

柏山恭範 (富山大学大学院医学薬学研究部助教)

守田雅志 (富山大学大学院医学薬学研究部助教)

### A. 研究目的

ペルオキシソーム膜形成には、ペルオキシソーム形成因子 Pex3p、Pex16p、pex19p を必要とする。Pex3p はペルオキシソーム膜に局在し、遊離型ポリソームで合成されたペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)と複合体を形成する Pex19p と相互作用し、PMP の局在化に関与すると考えられている。因に、Pex3p の欠損は Zellweger syndrome の原因となる。今回、Pex3p と Pex19p との相互作用の特性を明らかにするとともに、Pex3p 欠損細胞に野生型、変異型 Pex3p を導入することにより、Pex3p の構造とペルオキシソーム形成との関連性について検討した。

### B. 研究方法

野生型ならびに変異型ヒト Pex3p の細胞質ドメインならびにヒト Pex19p を大腸菌に発現、精製した。Pex3p の特性と Pex19p との相互作用は、

ゲル濾過、トリプトファン蛍光スペクトル、表面プラズモン共鳴、pull down assay 等により解析した。また、Pex3p によるペルオキシソーム形成能は、*pex3* CHO 細胞や *pex3* Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野性型 *PEX3* もしくは変異型 *pex3* を導入し、ペルオキシソームの形成を蛍光抗体法で解析した。

(倫理面での配慮)

Zellweger syndrome 患者線維芽細胞は、提供者が乳児のため、両親の同意を得て採取したものを、岐阜大生命科学総合研究支援センター下澤伸行教授より供与を受けた。

### C. 研究結果

#### 1. Pex3p と Pex19p との相互作用の解析

リコンビナント Pex3p は Superdex 200 column を用いたゲル濾過で約 40kDa の分子量を示し、単量体として存在することが示唆された。また Pex19p も単量体を示し、同量の Pex3p と Pex19p では 1:1 の複合体を形成することが示唆された。Pex19p 存在下で Pex3p のトリプトファン蛍光

(340 nm)が blue shift することより、Pex3p に存在する Trp-104、Trp-224 の周辺の構造が Pex19p との結合に重要である可能性が示唆された。Pex3p の野生型、変異体 W104A、W224A、W104F を用い、GSP-Pex19p との結合性を pull down assay で解析した。すると、野生型、W224A は GST-Pex19p に結合したが、W104A は結合しなかった。また W104F の結合量は野生型に比べ低下した。

次いで表面プラズモン共鳴を利用して、Pex19p に対する Pex3p の解離定数を求めると、野生型 Pex3p は 3.4nM であったが、変異体 W104A、W104F は 1080nM、66nM であった。また野生型ならびに変異体 Pex3p (W104A) の CD スペクトルに変化はなく、Trp-104 の変異が Pex3p の 3 次元構造に影響している可能性はないと推定された。

さらに Trp-104 周辺アミノ酸の Pex19p との結合に対する影響を調べるため、ヒトから酵母で保存されているアミノ酸のアラニン置換体 K100A、I103A、W104A、L107A、K108A、F112A を用いて pull down assay を行った。その結果、W104A を除くすべての変異体は Pex19p に結合した。よって、Trp-104 のみが Pex19p との結合に重要であることが示唆された。

## 2. 野生型ならびに Pex3p (W104A) によるペルオキシソーム形成回復能の解析

*pex3* CHO 細胞に野生型もしくは変異体 Pex3p を発現させ、ペルオキシソームの回復能を、ペルオキシソームマトリックスタンパク質ならびに PMP に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。その結果、野生型ならびに Pex3p (W224A) ではペルオキシソームが検出されたが、Pex3p (W104A) では検出されなかった。一方、Pex3p (W104F) は Pex19p との結合が 1/20 に低下していたが、ペルオキシソームが検出され、ペルオキシソームの形成が回復していることが示唆された。

## D. 考察

遊離型ポリソームで生合成された PMP と細胞質に存在する Pex19p とが複合体を形成し、ペルオキシソーム膜前駆体上の Pex3p と相互作用し、PMP をペルオキシソーム膜に挿入することにより、ペルオキシソーム膜が形成されていくと考えられている。我々はこれまでに、生合成された PMP70 の Pex19p との相互作用に必要な領域を明らかにするとともに、Pex19p の N 末端側の領域が Pex3p との相互作用に重要であることを報告してきた。今回、Pex3p の細胞質ドメインに存在する Trp-104 が Pex19p との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。また、細胞内で正常なペルオキシソーム膜が形成されるためには、Pex3p と Pex19p との間で nM オーダーの強い結合が必要であることが示唆された。なお、ヒト *pex3* Zellweger syndrome 線維芽細胞に野生型もしくは変異体 Pex3p (W104A) を発現させたが、CHO 細胞と同様の結果を示した。この患者線維芽細胞では、*pex3* に 97 塩基の欠失があり、C 末端側から 32 アミノ酸が欠失し、3 アミノ酸付加された変異体 Pex3p が生合成されているが、細胞内で分解されるためペルオキシソームが形成されないと推定された。今後、軽度のペルオキシソーム形成異常症の治療を考慮し、Pex3p と Pex19p との相互作用を促進もしくは安定化する化合物を検索する必要がある。

## E. 結論

ペルオキシソーム膜の形成に Pex3p と Pex19p との結合が重要であることが示唆された。またその結合には Pex3p の Trp-104 が関与し、そのインドール環が Pex19p の N 末端の疎水性アミノ酸のいずれかと相互作用している可能性が示唆された。今後、Pex19p が担う PMP のペルオキシソーム膜への挿入過程を解析するとともに、ペルオキシソーム膜形成過程のメカニズムに基づいたペルオキシソーム病治療薬開発のためのアッセイ系の確立が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kashiwayama Y, Seki M, Yasui A, et al : 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp Cell Res*, 315 : 190-205, 2009
- 2) 守田雅志, 今中常雄 : 極長鎖脂肪酸代謝と疾患. *生化学*, 80 : 434-439, 2008

### 2. 学会発表

- 1) 柏山恭範, 関みどり, 安井暁奈, 他 : ABCD 群タンパク質の細胞内局在は N 末端アミノ酸配列が制御している. 日本生化学会北陸支部第 26 回大会, 金沢, 2008.5
- 2) 柏山恭範, 関みどり, 安井暁奈, 他 : P70R (ABCD4) の細胞内局在と局在化機構の解析から明らかになる ABC サブファミリー D 群タンパク質の細胞内局在制御機構. 第 3 回トランスポーター研究会年会., 京都, 2008.6

- 3) 佐藤康彦, 柴田洋之, 中野博明, 他 : ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関する Pex3p と Pex19p の相互作用様式. 第 8 回蛋白質科学会年会, 東京, 2008.6
- 4) 柏山恭範, 関みどり, 安井暁奈, 他 : ABC タンパク質 D 群の細胞内局在は N 末端アミノ酸配列に依存する. 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 札幌, 2008.8
- 5) 平裕幸, 柏山恭範, 守田雅志, 他 : ペルオキシソーム膜形成因子 Pex16p の細胞内動態とペルオキシソーム形成における役割. 日本薬学会北陸支部第 118 回例会, 金沢, 2008.11
- 6) 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 他 : ペルオキシソーム病の線維芽細胞に検出される極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造. 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会, 神戸, 2008.12

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

なし

# 分担研究報告書

## Ⅲ. ライソゾーム病の新規治療法の開発

ゴーシェ病の中樞神経症状に対する新しい治療法の開発：  
正常マウスへ N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV) を経口投与した時の  
臓器への NOV の移行と臓器での酵素活性

分担研究者：大野 耕策(鳥取大学 医学部 教授)

研究要旨

我々はこれまで N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV) (Patent No. 02762961, 7-2103-JP0208882 カルバ糖アミン誘導体および当該物質を有効成分として含有する糖脂質代謝異常症処置剤。発明者：小川誠一郎、鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎、大野耕策)が、ゴーシェ病の原因である  $\beta$ -glucosidase の F213I 変異酵素の活性を上昇させることを見出し(Lin H, et al, 2004)、N370S, G202R, N188S 変異の活性も上昇させることを報告してきた(Lei K et al, 2007)。現在ゴーシェ病に対して酵素補充療法が行われているが、中樞神経症状には有効ではない。NOV は低分子であり、脳内移行し、中樞神経症状への治療効果が期待できる。

マウスに対し、水に溶解した NOV を 0-10mM の濃度で、飲み水から 1 週間与え、血液、尿の臨床生化学検査、血液、尿、臓器 NOV 濃度、臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を調べた。NOV の濃度は 1-10mM 投与で、血中で 0.5-2.5  $\mu$ M、尿中で 200-700  $\mu$ M で、臓器では、大脳、小脳、心、脾臓では  $\sim$ 3nmol/g、肺、肝、腎で  $\sim$ 10nmol/g で、投与量に依存して増加した。臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性は小脳、心、腎、脾臓、筋の 3-10mM 投与で有意に増加した。血液及び尿検査では、3mM  $\sim$ 10mM 投与で軽度の BUN の上昇と尿 pH の低下を認めたが、肝機能、腎機能、血糖、尿たんぱくなどには異常はなかった。

NOV は経口投与で、大きな副作用なく、脳を含めた臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させる可能性があり、ゴーシェ病の化学的シャペロン療法に有望な薬剤と考えられる。

研究協力者

薬 卓(鳥取大学大学院医学系研究科・大学院生)  
二宮 治明(鳥取大学医学部・教授)  
久保 敏明((株)生化学工業)  
飯田 雅巳((株)生化学工業)  
鈴木 義之(国際医療福祉大学・教授)

glucosylceramide が蓄積することによって、肝臓、骨、神経系の障害を起こす常染色体劣性遺伝病である。この疾患に対して、酵素補充療法が適応になり、肝腫大、骨病変に対して、有効性が確認されているが、中樞神経症状に対しての効果は明らかではない。

A. 研究目的

ゴーシェ病は、リソソーム内の  $\beta$ -glucocerebrosidase の遺伝的欠陥によって、組織に

1. 研究の背景

我々は、鈴木義之博士と共同で、変異  $\beta$ -glucocerebrosidase ( $\beta$ -glu) に対する酵素活性増強効

果)を持つ薬剤をスクリーニングし、グルコース類似体である N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV) が F213I 変異  $\beta$ -Glu に対して優れた変異酵素を活性化させる作用を持つことを見出した (Lin H, et al., *Biochem Biophys Acta* 2004)。さらに、種々の変異を持つゴーシェ病患者由来皮膚繊維芽細胞およびヒト変異  $\beta$ -Glu を持つ cDNA を導入した COS 細胞での発現系を用いて N188S, F213I, N370S, G202R の各変異に対しては有効で、G193W, L444P, D409H に対しては無効であることを明らかにした (Lei K, et al., *Biochem Biophys Acta* 2007)。

## B. 研究方法

NOV によるケミカルシャペロン療法を臨床応用するために、以下の4つの研究が必要であると考えている。

- ① NOV は正常の酵素活性も増強するため、正常マウスへ投与した時の臓器の酵素活性により、NOV の個体への投与量を決定し、NOV の安全毒性試験を行うこと
- ② ヒト F213I 変異を持つマウスと作成し、 $\beta$ -Glu ノックアウトマウスに導入し、F213I 変異を持つマウスモデルを作成し、レベルでの有効性を明らかにすること
- ③ NOV で増強される変異とされない変異を明らかにし、NOV と変異酵素との相互作用を明らかにすること
- ④ さらに低濃度で有効な化合物をスクリーニングすること

今年度、本研究班での研究は①を明らかにすることを目的とし、8週齢の雄 C57 系マウスに対し、水に溶解した NOV を 0-10mM の濃度で、飲み水から1週間与え、血液、尿の臨床生化学検査、血液、尿、臓器 NOV 濃度、臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を調べた。

## C. 研究結果

- ① NOV 投与時の飲水量と体重の変化  
10mM 投与では1日の平均飲水量は有意に低

下したが、1週間後の体重は有意には変動しなかった。

- ② 1-10mM の NOV を1週間飲ませた時の濃度は、血中で 0.5-2.5  $\mu$ M、尿中で 200-700  $\mu$ M となった。臓器では、大脳、小脳、心、脾臓では  $\sim$ 3nmol/g、肺、肝、腎で  $\sim$ 10nmol/g で、投与量に依存して有意に増加した。
- ③ 臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性は、1週間投与後、小脳、心、腎、脾臓、筋の 3-10mM 投与で有意に増加した。
- ④ 血液及び尿検査では、3mM $\sim$ 10mM 投与で軽度の BUN の上昇と尿 pH の低下を認めたが、肝機能、腎機能、血糖、尿たんぱくなどには異常はなかった。

## E. 結論

NOV は経口投与で、大きな副作用なく、脳を含めた臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させる可能性があり、ゴーシェ病の化学的シャペロン療法に有望な薬剤と考えられる。

今後研究課題②に従って F213I 変異を持つモデルマウスでの治療効果の判定を行う予定である。

## F. 研究発表

- 1) Zhuo L, Ninomiya H, Ohnom K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of N-octyl-b-valienamine on b-glucocerebrosidase activity of the organs in normal mice. 第50回日本先天代謝異常学会, 第7回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 米子市, 2008.11.6-8

## G. 論文発表

- 1) Hayashi Y, Zama K, Abe E, Okino N, Inoue T, Ohno K, Ito M : A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases. *Anal Biochem.* 2008.7.30. [Epub ahead of print]
- 2) Takano K, Shimono M, Shiota N, Kato A,

Tomioka S, Oka A, Ohno K, Sathou H :  
Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis : The  
first reported case in Japan diagnosed by  
palmitoyl-protein thioesterase enzyme  
activity deficiency. *Brain Dev*, 30(5) : 370-3,  
2008.5

- 3) 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(3) : 616-22, 2008
- 4) Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E,

Ninomiya H, Ohno K. Brainstem  
neuropathology in a mouse model of  
Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Sci*.  
268 : 108-116, 2008

#### H. 知的所有権の取得状況

- 1) Compuestos potenciadores de la actividad  
de glicosidasas mutantes (変異グリコシダー  
ゼ活性を上昇させる化合物)、発明者 : Jose  
Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz  
Mellet, Yoshiyuki Suzuki, Kousaku Ohno、ス  
ペイン P200802988

## β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究

分担研究者：難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター 教授)

### 研究要旨

2人のβ-ガラクトシダーゼ欠損症患者の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。また、皮膚線維芽細胞を用いたシャペロン試験の結果、共にケミカルシャペロン NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine) による有意な酵素活性還元効果を認めた。マウス細胞発現系を用いた48種類のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子変異に対するNOEVの効果調べた結果、15種類の変異について有意なNOEVの効果を確認した。

### A. 研究目的

ケミカルシャペロン効果は変異酵素蛋白質の構造依存的である。全β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異型について、β-ガラクトシダーゼ欠損症に対するケミカルシャペロン NOEV (N-octyl-4-epi-β-valienamine) の酵素活性還元効果を検討し、将来的なシャペロン療法の臨床応用の適応に備える。

### B. 研究方法

#### 1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とNOEV効果の検討

GM1-ガングリオシドーシス患者由来培養皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、全エクソンについてシークエンス解析を行った。NOEVの酵素活性還元効果の検討は、培養皮膚線維芽細胞を0.2、2μMのNOEVを含む培地で4日間培養後、β-ガラクトシダーゼ酵素活性を4-MU人工基質を用い測定した。

#### 2. マウス細胞発現系を用いたNOEV効果と変異型の相関についての検討

ヒト正常β-ガラクトシダーゼ cDNA 発現ベクターを鋳型として、PCR site-directed mutagenesis 法により48種類のミスセンス変異を導入した変異β-ガラクトシダーゼ cDNA 発現ベクターを製作した。正常および、変異β-ガラクトシダーゼ

cDNA 発現ベクターをリポフェクション法によりβ-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損ノックアウトマウス由来線維芽細胞株に一過性に発現後、0.2 または2μMのNOEVを含む培地で2日間培養後、β-ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。

### C. 研究結果

トルコとロシアの乳児型 GM1-ガングリオシドーシス患者の遺伝子変異解析を行った結果、トルコの検体ではG190D/G190D変異が、ロシアの検体ではH281Y/?変異が検出された。また、ロシアの検体では2つのSNPs(rs7637099, rs7614776)を検出した。また、それぞれの由来培養皮膚線維芽細胞に対するNOEV効果を調べた結果、トルコの検体では2μM NOEVで、ロシアの検体では0.2と2μM NOEVで共に有意な酵素活性還元効果を確認した。

マウス発現系を用い、48種類の遺伝子変異型に対するNOEVの酵素活性還元効果を調べた結果、15種類の変異において0.2または2μMのNOEVによる有意な酵素活性還元効果を確認した。また、0.2、2μM共に有意な効果を確認したのは3種類(L173P、G190D、R590C)であった。



## D. 考察

今回新たに2人のGM1-ガングリオシドーシスについて遺伝子変異を行い、G190D/G190D(新規変異、未発表)とH281Y/?を同定し、また共にNOEVによる酵素活性還元効果を認めた。G190D変異はマウス発現系においてもNOEVによる効果を認めたが、H281YではNOEVの有意な効果は認めなかった。このことは、ロシアの検体で未検出の変異アレルがNOEVに効果があることを示唆する。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異は私たちの解析結果を含め、現在まで119種類が見ついている。そのうち、昨年まで40種類の変異型についてマウス発現系を用い8種類の変異型において $0.2\mu\text{M}$  NOEVによる有意なシャペロン効果を認めた。今年度の結果を合わせると、遺伝子変異型で88種類中、23種類の変異(26%)でNOEVのシャペロン効果を認めた。これらの結果は、将来的なケミカルシャペロン療法の臨床応用の適応を決めるために、有用な情報を得たと考える。残りの変異については、現在検討中である。

## E. 結論

48種類の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異のうち、15種類の変異においてNOEVによる有意なケミカルシャペロン効果を認めた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto N, Gondo K, Kukita J, et al : A case of galactosialidosis with a homozygous Q49R point mutation. *Brain Dev*, 30 : 595-598, 2008
- 2) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, et al : Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am J Med Genet A*, 146A :

1736-1740, 2008

- 3) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, et al : Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev* 2008.12.30 [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

- 1) 難波栄二, 檜垣克美 : GM1-ガングリオシドーシスとオートファジー機能異常. 第50回日本小児神経学総会, 東京, 2008.5
- 2) 難波栄二, 檜垣克美, 足立香織, 李 林静, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之 : ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第53回日本人類遺伝学会, 横浜, 2008.9
- 3) 難波栄二 : ライソゾーム病の中枢神経症状の治療. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 4) 李 林静, 檜垣克美, 高村歩美, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常とTrkシグナルの亢進. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 5) 檜垣克美, 高村歩美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 6) 池端宏記, 檜垣克美, 李 林静, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 :  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 7) 檜垣克美, 李 林静, 高村歩美, 鈴木義之, 難波栄二 : ライソゾーム病神経変性とオートファジーの異常. 第13回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008.11

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 疾患モデルマウスに対するシャペロン療法の臨床評価

研究分担者：鈴木 義之(国際医療福祉大学大学院 教授)

### 研究要旨

2つの異なった表現型を示す GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価を行った。重症型は出生後早期からすべての検査項目の異常を示したが、軽症型マウスでは病像の中期以後になって初めて異常を示すことが多かった。一部の検査観察のみで早期診断が可能であると予想された。その結果をシャペロン投与実験に適用し、この検査法がシャペロン療法の臨床評価に使用できることを確認した。

研究協力者

黒澤美枝子 (国際医療福祉大学教授)

一ノ宮悟史 (国際医療福祉大学大学院生)

### A. 研究目的

われわれが提唱しているシャペロン療法の妥当性を知るために、疾患モデル動物を用い、異なった条件でシャペロン投与実験を行った。

### B. 研究方法

軽症型 GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスに特異的シャペロン NOEV 水溶液の経口投与を行った。異なった条件設定による効果の違いを検討した。神経学的検査項目の信頼性も調べた。動物実験は国際医療福祉大学動物実験委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

0.1mM、0.3mM、1mM の NOEV 溶液の経口投与を行った。低濃度での治療も有効であるとの予備的結果が得られた。NOEV の間歇投与では臨床効果を認めなかった。

臨床評価のための検査法を個別的に検討した。重症型ノックアウトマウスでは、多くの項目で病初期からの異常を認めたが、軽症型マウスでは初

期から異常を示す項目は少なく、尾の形状や前肢握力など、一部の検査項目の注意深い観察で脳障害を客観的に把握できる可能性があることが分かった。

### D. 考察

まだ最終結論を得るにいたっていないが、シャペロン治療において、少量のシャペロン投与でも効果を認める可能性、そして一部の特異的な検査項目を選ぶことにより、さらに簡便な評価ができるものと予想された。これらの点、継続して分析を行う予定である。

### E. 結論

GM1-ガングリオシドーシスに対するシャペロン治療の臨床効果をモデルマウスで検討した。その結果、投与量、投与方法の工夫により、さらに少量での治療が可能である可能性があるとの結論を得た。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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 GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 367 : 616-622, 2008

- 2) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A :  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis) : GM1-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
- 3) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y : Novel  $\beta$ -galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Amer J Med Genet* 146A : 1736-1740, 2008

## 2. 学会発表

- 1) Suzuki Y : Genetic aspects of brain dysfunction in children. Beijing Children's Hospital Teaching Seminar, Beijing, China, 2008.5.21-22
- 2) Suzuki Y : New therapeutic approaches to neurogenetic diseases in children. Beijing Children's Hospital Teaching Seminar, Beijing, China, 2008.5.21-22
- 3) Suzuki Y, Nanba E, Higaki K, Sakakibara Y, Jo H, Yugi K, Ogawa S, Iida M : Chaperone effects on molecular pathology in GM1-gangliosidosis. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism : Annual Symposium 2008, Lisbon, Portugal, 2008.9.2-5
- 4) Suzuki Y, Nanba E, Higaki K, Sakakibara Y, Ogawa S, Iida M : Chemical chaperone

therapy : magic bullet to the brain in GM1-gangliosidosis. 2nd World Congress on Magic Bullets, Commemorating the 100th Anniversary of Nobel Prize to Paul Ehrlich, Nürnberg, Germany, 2008.10.3-5

- 5) Suzuki Y : Neurodegenerative disorders. International Child Neurology Association Symposium and Peking University International Forum on Child Neurology, Beijing, China, 2008.10.9-12
- 6) Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of N-octyl- $\beta$ -valienamine on  $\beta$ -glucocerebrosidase activity of the organs in normal mice. 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-8
- 7) 鈴木義之 : ケミカルシャペロン療法(モーニングセミナー). 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-8
- 8) 李 林静, 檜垣克美, 高村歩美, 飯田真己, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常と Trk シグナルの亢進. 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-8
- 9) 檜垣克美, 高村歩美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-8
- 10) 池端宏記, 檜垣克美, 李 林静, 飯田真己, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 :  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-8

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

- 1) Jose Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, M. Isabel Garcia Moreno,, Matilde Aguilar Moreno, 鈴木義之, 大野耕策 : 二環系アザ糖の生理機能とシャペロン活性. スペイ

ン国内特許 P0200802988, 2008 年 10 月 23 日 3. その他  
出願. なし

2. 実用新案登録  
なし