

200935045A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立

(H20 - こころ - 一般 - 022)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木義之

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告		
ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立	・・・・・・・・・・・・・・・・	1
鈴木義之		
II. 分担研究報告		
ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発：		
ゴーシェ病ケミカルシャペロン活性の比較	・・・・・・・・・・・・・・・・	9
大野耕策		
酵素分子の計算的構造解析：ケミカルシャペロン療法の機構解明に向けた		
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ変異体の分子動力的解析	・・・・・・・・・・・・・・・・	11
榊原康文		
$\beta$ -ガラクトシダーゼに対する新規ケミカルシャペロン候補化合物に関する研究	・・・・・・・・	13
難波栄二		
ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析	・・・・・・・・・・・・・・・・	15
松田潤一郎		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・・・・・・・・・	17
IV. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	・・・・・・・・・・・・・・・・	19
V. 健康危険情報	・・・・・・・・・・・・・・・・	20
VI. 研究成果の刊行物・別刷	・・・・・・・・・・・・・・・・	21

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総括研究報告書

ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の確立

研究代表者	鈴木 義之	国際医療福祉大学大学院・教授
研究分担者	大野 耕策	鳥取大学医学部・教授
	榊原 康文	慶應義塾大学理工学部・教授
	難波 栄二	鳥取大学生命機能研究支援センター・教授
	松田潤一郎	医薬基盤研究所生物資源研究部・研究リーダー
研究協力者	一ノ宮悟史	大田原赤十字病院リハビリテーション科・理学療法士
	大久保真人	国際医療福祉大学基礎医学研究センター・教授
	小川誠一郎	慶應義塾大学理工学部・名誉教授
	黒澤美枝子	国際医療福祉大学薬学部・教授
	滝本 一広	国立感染症研究所動物管理室・研究員
	戸川 雅美	鳥取大学医学部・助教
	西村 吉雄	微生物化学研究センター・副センター長
	二宮 治明	鳥取大学医学部・教授
	欒 卓	鳥取大学大学院医学系・大学院生
	檜垣 克己	鳥取大学生命機能研究支援センター・准教授
	Jose Garcia Fernandez	セベリア化学研究所・教授
	Carmen Ortiz Mellet	セベリア大学化学部・教授

## 研究要旨

遺伝性ライソゾーム病に対するシャペロン療法開発のための分子・細胞・動物実験を行った。中枢神経障害を主徴とする  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスのモデルマウス個体にシャペロン化合物 NOEV (N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン) の水溶液を経口投与し、0.1 mM から 1 mM の濃度範囲で臨床の有効性を確認した。そしてシャペロン効果の分子機構、遺伝子変異特異性、臨床効果を多面的に解析した。細胞実験では新しく開発した二環系アザ糖を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ変異に対する効果を調べた。特に MTD118 の  $\beta$ -ガラクトシダーゼシャペロン効果を NOEV と比較した。その結果、変異遺伝子に対する効果スペクトルの違いが明らかになった。一部は相補的に働き、検討した 88 種の変異中、40 種にシャペロン効果を認めた。この中にはそれぞれの病型に存在する共通変異があり、その患者数を考慮すると、患者集団の 60-70% に有効性が期待できると予想した。分子構造計算によるシャペロンと酵素分子の動力学的反応を調べたところ、 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスとゴーシェ病について、pH の効果、変異の分子内局在が明らかになった。これらの基礎実験をもとに、数年以内に薬剤開発を確立するため、動物の非臨床試験、ヒト患者の臨床試験を目標とした体制作りを行った。

この研究は、第一に、細胞内におけるシャペロン効果という分子反応パラドックスの実験科学的理論的解析、第二に、シャペロン治療のコンセプトの理論的実験的構築、第三に、新しい神経遺伝病の新薬開発を最終目標とする多面的な科学的・臨床医学的な成果を追及するプロジェクトである。

## A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病をモデル疾患とした新しい分子治療法（ケミカルシャペロン療法）の確立を目的とする。これまでの研究対象であるバリエナミン系化合物 NOEV (N-オクチル-4-エピ- $\beta$ -バリエナミン)、NOV (N-オクチル- $\beta$ -バリエナミン) に加えて、二環系アザ糖誘導体、1-N-イミノ糖誘導体など、新しい構

造を持つシャペロン化合物の生物活性を調べ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症、 $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症に対して、よりよい治療効果を示すシャペロン化合物を探索する。これらの化合物と変異酵素蛋白質との分子反応機序を解析することにより、最大のシャペロン効果達成を図る。同時に、起こりうる毒性を可能な限り排除するための投与方法を検討する。このような基礎的デ

一タの集積後、動物毒性試験（非臨床試験）、ヒト個体への臨床試験を開始することを最終目標とする。本研究の学問的な意義は、第一に生体細胞内分子反応のパラドックスの解明、第二にその分子機構に基づく新しい分子治療法の理論的構築、第三にこの理論根拠に基づく新薬開発である。

## B. 研究方法

### 1. シャペロン化合物の合成と細胞内分子動態

これまで解析してきたバリエナミン化合物 NOEV と NOV のほかに、新しい化合物として二環系アザ糖誘導体 (Garcia Fernandez, Ortiz Mellet) の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼに対する効果を検討した (檜垣、大野、欒、二宮)。また 1-N-イミノ糖誘導体 (西村) の酵素阻害、シャペロン効果を検討した。

本年度は、動物の非臨床試験、ヒトの臨床試験に備え、バリエナミン化合物の大量供給のための技術開発を進めた。従来のグルコース由来の合成過程のほかに、デオキシイノシトールを原料とする新しい合成法を開発した (小川)。さらに、NOEV と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、NOV と  $\beta$ -グルコシダーゼの結合動態を、分子動力的シミュレーションにより計算し、細胞内での複合体形成、ライソゾームでの解離機構を理論的に解析した (榊原)。

### 2. 新規モデル動物開発

これまで用いてきた R201C 変異発現  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスマウスに加え、より効率的な実験を目指して、R457Q 変異発現マウスの開発を継続し、2 種のファウンダーを得た (松田)。

### 3. 培養細胞シャペロン実験

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子について、88 種のミスセンス変異 cDNA を酵素欠損ノックアウトマウス線維芽細胞に導入し、安定な変異発現系を確立した。そして NOEV と MTD118 のシャペロン効果を検討した (難波、檜垣)。また  $\beta$ -グルコシダーゼ欠損症 (ゴーシェ病) については、新しい二環系アザ糖その他のシャペロンを用いた活性評価実験を行った (大野、欒、二宮)。

### 4. マウス個体シャペロン治療実験

$G_{M1}$ -ガングリオシドーシスマウスに 0.1 - 1 mM 濃度の NOEV 水溶液を経口投与した。それぞれの群を神経学的に評価した。臨床評価はすでに報告した 11 項目の検査法により行ったが、これら個別項目の妥当性・必要性についても検討した。(一ノ宮、黒澤)。

(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 (一ノ宮、

黒澤、鈴木)、鳥取大学医学部実験動物委員会 (大野)、医薬基盤研究所動物実験委員会 (松田) 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. バリエナミン化合物の化学合成 (小川)

これまで、本研究に用いる NOEV と NOV はグルコースを原料として、6-スルホニル体を Ferrier 環化を経てイノソース誘導体へ変換し、不飽和化、そして Nysted 試薬を用いるメチレン化によって、共役アルカジエントリベンゾエートへ導いてきた。この化合物は、従来法のフランとアクリル酸との endo-付加体から得られる中間体に相当する合成中間化合物である。この方法をさらに検討し、今後の研究展開によって必要とされる化合物供給量に対応できるよう、大量合成操作の条件設定を行った。その結果、NOV へあと約 4 工程で到達できる合成中間体、不飽和ケトントリベンゾイル保護体 1.3 kg を確保した。この段階から目的物質 NOV への反応工程については、すでに十数グラム規模の予備操作実験を行い、実施データを蓄積した。

一方、イノシトールの生物分解によって誘導できるデオキシイノシトールを原料とする新合成法の開発も同時に進め、グルコースから得られる合成中間体に相当する不飽和ケトン体を実験室規模で製造することが可能になった。現在、NOEV は NOV の化学変換を経る初期の方法で導かれているが、原料系を新たなデオキシイノシトールへ変更することにより、両化合物をそれぞれの合成経路で並列させて製造できる可能性の検討を行っている。

### 2. シャペロン効果の分子機構解析 (榊原)

シャペロン NOV と変異  $\beta$ -グルコシダーゼの分子結合強度を調べるため、異なる pH 条件におけるシミュレーション実験を行った。この酵素の立体構造が確定しているからである。1 例として F213I と NOV との結合自由エネルギーを計算した。pH 7 での結合エネルギーは pH 5 での予測値の 2 倍程度であり、ライソゾームでの酸性条件で結合が弱くなり、複合体が解離することの理論的根拠が得られた (投稿中)。構造が確定していない  $\beta$ -ガラクトシダーゼについても予備実験を行い、同様のデータが得られた。また本年度は新たにファブリー病の変異酵素解析を行い、1-デオキシガラクトノジリマイシン (DGJ) との分子反応を調

べた。変異分子の構造変化により、結合能、結合した複合体の構造安定性にばらつきのあることが分かった。

### 3. 新規モデル動物の開発 (松田)

R457Q 変異発現マウスの遺伝子特性を2ラインの臓器について確認し、確立した。現在その個体特性を観察中である。この新しい変異種の使用が可能になったところで、新しい個体シャペロン実験を開始する。

### 4. G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの培養細胞シャペロン実験 (檜垣、難波)

88種のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子ミスセンス変異を発現するノックアウトマウス線維芽細胞系を樹立した。これらの培養液に種々の濃度のNOEVと二環系アザ糖MTD118を添加し、シャペロン効果を検討した(表1)。

表1 2種の化合物のシャペロン効果スペクトル (検査総変異数 88)

NOEV	MTD118	シャペロン効果陽性変異 (有効変異数)
+	+	G190D, R201C, R201H, V216A, H281Y, D332N, Y444C, R457Q, R590H (9)
+	-	R54N, Y83C, Y83H, E131K, L173P, Y199C, R201Y, Q255H, N318H, Y324C, D332E, N484K, G494S, R590C (14)
-	+	I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, Y316C, K347N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G, D640E (17)

NOEVのみの有効変異数は23であり、これまでの結果同様、検査対象の26%に陽性反応がみられた。この中には乳児型及び若年型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス患者の共通変異が含まれており、患者集団からみると35%程度に有効であることが期待された。これに対し、MTD118は異なったシャペロン効果スペクトルを示した。NOEVが有効であってもこのシャペロンに反応しない変異があった一方、NOEVが無効と判定された変異に対してシャペロン効果を示した例が少なかった。MTD118単独での有効率は30%程度であった。しかし重複例も含めた両者のシャペロン効果は45%であり、成人型G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの共通変異I51Tや、モルキオB病の共通変異W273Rなどを含めた共通変異の存在を考慮すると、この2つのシャペロンのみでも全患者の60-70%に有効であるこ

とが期待された。ただし細胞実験で、MTD118はNOEVに比べて10-20倍の投与量が必要である。さらなる化合物の構造修飾が必要であろう。

新規化合物SF-7とそのアセチル体(西村)は著しく強いβ-ガラクトシダーゼ活性阻害効果を示した。そして熱に不安定な変異酵素の安定化作用があった。しかし、予備実験ではR201C変異培養細胞に対するシャペロン効果を認めなかった(難波、檜垣)。

### 5. G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスマウスの短期シャペロン実験 (一ノ宮、檜垣)

R201C発現マウスに対するシャペロン効果をNOEV、MTD118、SF-7およびそのアセチル体について検討した。それぞれ1-2週間の経口投与後、臓器内酵素活性を調べた。MTD118はこの短期投与で酵素活性の上昇を誘導することができた。ただし細胞実験同様、NOEVの有効投与量の10-20倍の投与が必要であった。SF-7グループの化合物には細胞実験同様、細胞への取り込みが少なく、酵素活性の変化を認めなかった。化合物の構造修飾の問題として、今後の検討課題となった。

### 6. G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスマウスの長期シャペロン実験 (一ノ宮、黒澤)

NOEV 0.1-1mMの3段階希釈濃度水溶液を12-18カ月間経口投与し、神経学的評価を行った。これまでの検査法を踏襲し、11の検査項目スコアの合計点として表現した(図1-図3)。非線形回帰曲線に大きな差を認め(two-way ANOVA)、これまでの予備実験の結果同様、1mMでの有効性を再確認した。さらに低濃度(0.1, 0.3 mM)でも統計的有意差を認めた。

生化学的には生後2ヶ月のモデルマウスにNOEVを28週間投与し、脂質分析により脳内G<sub>M1</sub>、G<sub>A1</sub>の蓄積が減少したことを確認した(滝本)。

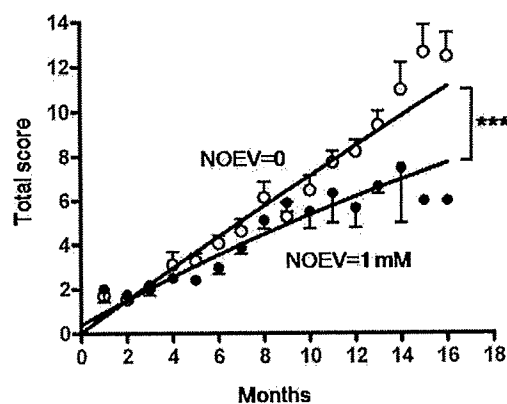


図1 NOEV経口投与の長期効果(1mM) p<0.0001 (Two-way ANOVA)

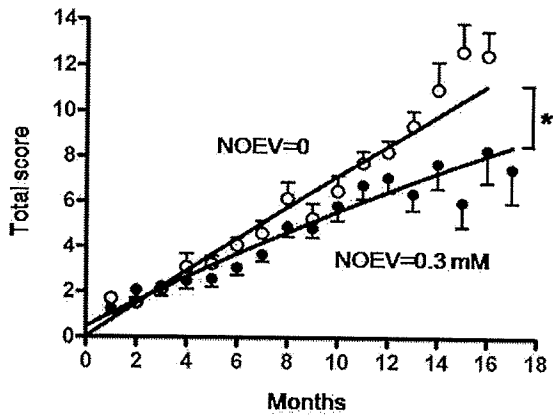


図2 NOEV 経口投与の長期効果 (0.3 mM)  
p<0.05 (Two-way ANOVA)

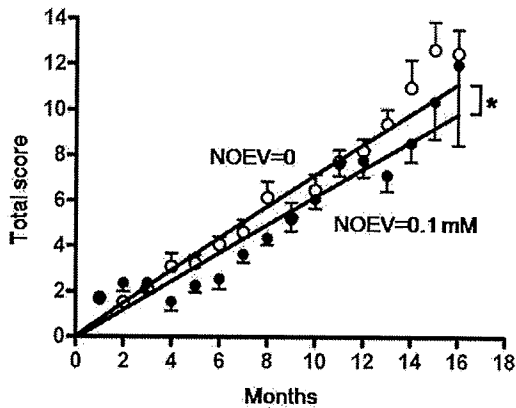


図3 NOEV 経口投与の長期効果 (0.1 mM)  
p<0.05 (Two-way ANOVA)

NOEV 投与前後のマウスに病理学的検査を行った。1 mM 水溶液の6ヶ月間までの投与で、脳、腎臓、肝臓を含む全身臓器に特異的形態的变化を認めなかった。臨床化学分析では、疾患の有無を問わず、加齢とともに GOT の上昇傾向が見られた。しかし投薬との関係はなかった。ただし 10 mM 投与では投与開始3-4ヶ月後に腎尿細管細胞の膨満、空胞化を認め、強い全身症状を示す死亡例があった。したがって NOEV を薬剤として投与するには、酵素阻害剤としての活性が発現しない低濃度で治療を試みるべきと考えた。

生存期間についての検討も行ったが、数年の実験期間中、動物飼育環境に多少の変更があり、治療効果と環境要因を完全に分けて検討することができなかったので、最終的な結論は保留することにした。

#### 7. 疾患モデルマウス検査法の再評価 (一ノ宮)

昨年度まで、マウスの臨床神経学的検査は 11 項目の異なる手技の合計スコアとして評価してきたが、今年度、個別検査データを詳細に検討した (図 4)。そ

の結果、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの R201C 変異発現マウスに対する NOEV 効果の評価には、必ずしも意味のある検査ばかりでないことが分かった。歩行および四肢運動・肢位は今回の検査対象となった R201C 変異発現トランスジェニックマウス (Tg マウス) では病末期まではっきりした異常を示さず、検査項目から除外してよいと考えた。また病末期になって初めて異常の出現する検査項目があった。酵素完全欠損を示すノックアウトマウス (KO マウス) でも、これらの項目の意義は少なく、今後の検討は、最大 8 項目の観察で十分であるとの結論を得た。これらの中で最も鋭敏な検査は尾の異常 (硬さ・動き・位置) であり、立直り、パラシュート、踏抜きなどの検査も有用であることが分かった。

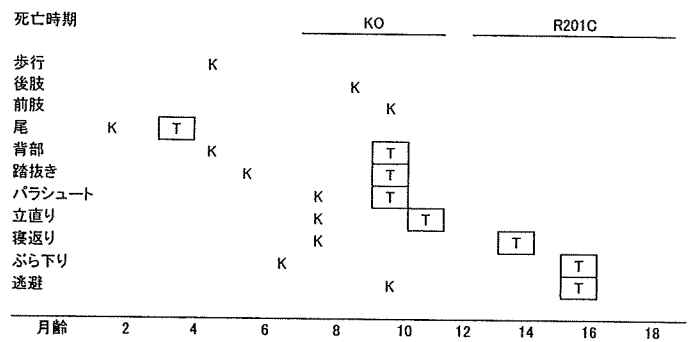


図4 個別検査項目の異常出現時期

平均スコアが1に到達した月齢をそれぞれの遺伝子型マウスについて表示した。K (KO) : ノックアウトマウス, T (Tg) : トランスジェニックマウス (本研究に使用)。歩行・前肢・後肢の項目は死亡まで異常を示さず、この動物種の検査には不要であると判断した。

#### 8. ゴーシェ病のシャペロン効果 (大野)

NOV のほかに、二環系アザ糖、イソファゴミン、アンブロキシソールなどについて、β-グルコシダーゼに対するシャペロン効果を調べた。化合物の構造、遺伝子変異の種類により異なった活性を示した。その中で、MTD47、RV21、MTD38、MG174 は 0.3 mM から 30 mM の範囲で濃度依存的に有意なシャペロン効果を示した。N370S、F213I、N188S、R120W 変異に有効であったが、L444P 変異には活性を示さなかった。

市販薬であるアンブロキシソールは脳内に移行し、小脳の酵素活性を上昇させた。ゴーシェ病の中樞神経症状に有効である可能性があると考えた。

#### D. 考察

これまでわれわれがシャペロン活性を検討してきたバリエナミン系化合物はカルバ糖と総称される化合物群のひとつであり、1990 年代に NOV のグルコセ

レプロシダーゼに対する強い阻害活性、そしてさらに NOV をガラクトシル型に変換した NOEV が  $\beta$ -ガラクトシダーゼに強力な阻害活性を持つことを見出した (小川)。現在まで、これらの化合物の化学合成過程には改良の余地があり、供給の制約があった。とくに過去 2 年間、このプロジェクトの研究協力会社の方針の見直しにより、化合物の供給が必ずしも十分でないこともあり、今年度、改めて詳細な検討を行った。その結果、反応工程数を減らし、単純化することにより、合成の時間を短縮し、生産量を高めることができた。そこでこの成果をもとに、来年度、新しい化学合成法による効率の良い化合物供給体制により、大動物の非臨床試験を行い、同時にヒト患者臨床試験の準備を進める予定とした。

化合物合成の基礎的検討とともに、今年度は特に変異  $\beta$ -ガラクトシダーゼに標的を絞り、シャペロン効果を多面的に解析した。シャペロン分子に関する情報も広く知られ、国内国外からいくつもの新しい化合物の提供を受けるとともに、世界中の患者情報が寄せられた。

シャペロン効果の細胞内分子機構の詳細は明らかでない。そこで分子動力学シミュレーションの技法を用い、シャペロンと酵素分子の反応動態を計算し、ライソゾームの酸性環境では中性環境に比べ、結合が弱いことを明らかにした。この結果は、シャペロン・酵素複合体がライソゾームに到達して、自然に解離することの理論的根拠となった。

疾患モデル動物実験においては、改めて中枢神経障害の臨床評価法の有用性を確認するとともに、詳細な分析により、当初の 11 検査項目の中で、真に意味のある 8 項目を選び出すことができた。より簡便かつ信頼性のある検査法として検討を継続する。あるいは、さらに検査項目を減らすことができるかもしれない。

この評価法を用い、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスの長期治療実験を行った。これまでは単一濃度の NOEV 投与による評価を行ってきたが、より少量の投薬でも有効である可能性も検討した。その結果、これまでの投与量の 30% から 10% でも、少なくともマウスでは臨床的な有効性を確認することができた。

中枢神経病変の進行は本質的に非可逆的な現象である。可能な限り早い時期での診断・治療が求められる。しかし現在のわれわれのマウス飼育条件と技術では、出生後すぐに直接経口投与実験を開始するのは困難であり、生後 1-2 ヶ月の離乳後、つまり尾を中心とした軽度の症状がすでに発現している時期まで経口投与を待たねばならなかった。そして、この実験条

件では症状の進行を完全に抑えることができなかった。さらに早期の治療実験を工夫することのほかに、シャペロンの化学構造、投与量・方法などの検討が必要であろう。

新しいシャペロンである二環系アザ糖化合物は、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス細胞とそのモデルマウス、そしてゴーシェ病細胞に NOEV、NOV と同等のシャペロン効果を示した。未だ実験室合成の段階であるが、大量合成の可能性も視野に入れて、検討中である。この実験において NOEV と MTD118 のシャペロン活性スペクトルに違いがあることが分かった。これまで想定してきたシャペロン効果の発現機構を一部修正する必要があるのかもしれない。このグループの化合物についてはすでにスペイン・日本共同の特許出願を行い、公開中である。

1-N-イミノ糖にも極めて強力な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ阻害剤が発見された。試験管内では変異酵素分子に結合し、安定化する。しかし細胞・個体実験では組織・細胞内への取り込み量が少なく、十分なシャペロン活性を示さなかった。今後、化学構造修飾により、我々の目的に合った化合物の開発を試みる予定である。

G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスはまれな神経遺伝病である。国内のみでは、臨床試験の対象となる患者症例数が十分でない可能性がある。来年度はこれまで我々が実施した全世界のシャペロン試験症例を含め、国際的な患者調査を行い、ヒト臨床試験に備える予定である。

## E. 結論

分子・細胞・個体のレベルでシャペロン効果の多面的な解析を行った。新しいシャペロン、新しいモデル動物の開発とともに、シャペロン治療に伴う細胞内分子動態の詳細が明らかになった。現段階の動物個体実験では、統計的に有意な臨床効果を認め、より少量の投与で有効な薬剤として開発することができる可能性を示した。さらに投与法の検討により、有効性を高める努力をしたい。

また、新しいシャペロンの開発により、この治療が可能と予想される患者数の割合が増加する可能性を示すことができた。変異蛋白質の大きな構造変化をもたらす遺伝子変異 (ナンセンス変異、欠失、挿入など) を除けば、ミスセンス変異の大多数に治療的対応ができるようになる可能性がある。

これらの成果をもとに、来年度以降、動物の非臨床試験 (毒性・安全性試験) を行い、ヒト臨床試験に進む予定である。そのために、来年度は、国際的な患者

情報の収集を開始する。

本研究が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。

最後に、この研究が、細胞内分子反応のパラドックス(シャペロン効果)解析、新しい分子治療のコンセプト提唱、そして神経遺伝病の経口薬開発という3つの学問的側面を持った研究プロジェクトであることを強調しておく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y: Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: Competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Med Chem* 3: 7-19, 2009.
  2. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncavo M, Ninomiya H, Ohno K, Garcia-Moreno I, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y: Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)-deoxynojirimycin. *ChemBioChem* 10: 2780-2792, 2009.
  3. Nishimura Y: Gem-diamine 1-N-iminosugars as versatile glycomimetics: synthesis, biological activity and therapeutic potential. *J Antibiot* 62: 407-423, 2009.
  4. Aoyama H, Ogawa S, Sato T: 5a-Carbaglycopyranoside primers: potential building blocks for biocombinatorial synthesis of glycosphingolipid analogues. *Carbohydrate Res* 344: 2088-2092, 2009.
  5. Hamada M, Inami Y, Nagai Y, Higashi T, Shoji M, Ogawa S, Umezawa K, Sugai T: Enzyme-catalyzed resolution of 3,8-deoxatrimethyl [3.2.1.0<sup>2,4</sup>] octane-6-carboxylic esters and the application to the synthesis of 3-epishikimic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* 20: 2105-2111, 2009.
  6. Ogawa S, Kanto M: Design and synthesis of 5a-carbaglycopyranosylamide glycosidase inhibitors. *Med Chem* 9: 58-75, 2009.
  7. Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y: The pharmacological chaperone effect of N-octyl-β-valienamine on human mutant acid β-glucosidases. *Blood Cell Mol Dis* 44: 48-54, 2010.
  8. Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y: The effect of N-octyl-β-valienamine on β-glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev*, in press, 2010. Jan 12. [Epub ahead of print]
  9. 鈴木義之:ケミカルシャペロン療法:神経遺伝病の新しい試み. *脳と発達* 42: 134-137, 2010.
- ##### 学会発表
1. 鈴木義之:神経遺伝病の新しい治療法—ケミカルシャペロン療法. 第51回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30.
  2. 難波栄二, 檜垣克美, 鈴木義之: GM1-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—88種類のミスセンス変異に対する NOEV の効果. 第51回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30.
  3. Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y: The effect of N-octyl-β-valienamine on the organs in normal mice. 第51回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30.
  4. Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, Suzuki Y: Chaperone activity of bicyclic SP<sup>2</sup>-azasugars for Gaucher mutations, 10th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Daegu, Korea, June 10-13, 2009.
  5. Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Screening of chemical chaperone effect for GM1-gangliosidosis. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, San Diego, CA, USA, August 29 - September 2, 2009.
  6. Suzuki Y: New Therapeutic approaches to neurogenetic diseases. International and IX Ukrainian Congress of Child Neurology, Kiev, Ukraine, September 9-12, 2009.
  7. Li L, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E: Screening for chemical chaperone therapy in β-galactosidosis. The Third International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, September 26-27, 2009.
  8. Higaki K, Takamura A, Li L, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Cellular dysfunction in murine GM1-gangliosidosis. The Third International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, September 26-27, 2009.
  9. Suzuki Y, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Sakakibara Y, Ogawa S, Iida M: Molecular basis of chaperone effect in lysosomal diseases. European Society of Child Neurology Congress 2009, Harrogate, UK, September 30-October 3, 2009.
  10. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy: A new molecular approach for brain pathology in lysosomal diseases. The 13th Asian Pacific Congress of Pediatrics and 3rd Asian Pacific Congress of Pediatric Nursing, Shanghai, October 14-18, 2009.
  11. 池端宏記, 檜垣克己, 李 林静, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二: 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療法. 第51回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11.5-7.
  12. 欒 卓, 檜垣克己, 二宮治明, 大野耕策, Carmen



Ortiz Mellet, Jose M Garcia Fernandez, 鈴木義之：ゴーシェ病患者線維芽細胞での蛍光標識した二環系糖質(SP2-azasugar)のシャペロン活性と細胞内局在. 第51回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 2009.11.5-7.

13. Suzuki Y: Molecular basis of metabolic encephalopathy – Neurogenetic diseases: From molecule to patient. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases, Taipei, Taiwan, March 26-28, 2010.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 特許出願・取得

1. 小川誠一郎、鈴木義之：カルバ糖アミン誘導体。日本特許第4057264号，2001年9月7日出願
2. 鈴木義之、大野耕策：糖脂質代謝異常症の治療薬。日本特許第4299479号，2001年9月7日出願
3. 鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎：糖脂質代謝異常症治療剤。日本特許第4299517号，2002年9月5日出願
4. PTC出願  
米国：NOEV物質（審査中）2002年9月2日出願，

10/793,8；NOEV・NOV用途（審査中）2002年9月2日出願，12/490,737

欧州：NOEV物質、NOEV・NOV用途（審査中0276296.1）2002年9月2日出願

カナダ：NOEV物質、NOEV・NOV用途（審査中2459887）2002年9月2日出願

オーストラリア：NOEV物質、NOEV・NOV用途特許登録2002328402，2002年9月2日出願

5. Jose Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, M. Isabel Garcia Moreno, Matilde Aguilar Moreno, 鈴木義之, 大野耕策：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)，スペインP0200802988，2008年10月23日出願・公開中

##### 実用新案登録

なし

##### その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

ゴーシェ病に対するケミカルシャペロン療法の開発：  
ゴーシェ病ケミカルシャペロン活性の比較

研究分担者：大野耕策 鳥取大学・医学部・教授

## 研究要旨

我々はゴーシェ病の N370S、F213I、N188S、G202R、G120W 変異を持つ  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させる低分子化合物 N-octyl- $\beta$ -valienamine (Lin H, et al. 2004; Rei, et al., 2007; Luan Z et al., 2010) および新規化合物二環系ノジリマイシン (Luan et al., 2009) を報告してきた。

我々の課題はゴーシェ病のケミカルシャペロンが中枢神経症状の治療に有効であるかどうかを確認し、より効果的なシャペロンを探し、新しい治療法とすることである。中枢神経症状に有効であることを確認する目的のために、F213I 変異を導入したマウスの作成を試みてきたが現在まで作成できていない。2009 年にアメリカのグループが市販の去痰剤の Ambroxol が N370S および F213I 変異の  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させることを報告した。これまで報告されたゴーシェ病のケミカルシャペロンの効果を比較し、市販の Ambroxol を用いて、F213I および N188S 変異を持つゴーシェ病患者に投与し、神経症状への効果を検討する予備研究を行った。

### 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 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、中枢神経症状に対しての効果は明らかではない。

我々は、これまで、変異  $\beta$ -gluco-cerebrosidase ( $\beta$ -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

(Lin H, et al., Biochem Biophys Acta 2004)、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)。さらに、スペインのセビリアで合成された新規化合物二環系ノジリマイシンが変異  $\beta$ -Glu に対してケミカルシャペロン効果を示すことを明らかにした

(Luan Z. et al., ChemBioChem 2009)。

NOV は正常マウスの脳内の  $\beta$ -Glu 活性を上昇させることから、脳内に移行し、中枢神経症状の治療薬となる可能性がある (Luan Z. et al., Brain Dev 2010)。しかし、F213I 変異を持つゴーシェ病モデルの作成が困難で、実際に、神経症状に有効であるかどうか確認ができなかった。

2009 年アメリカのグループは、市販の薬剤をスクリーニングし、去痰剤の Ambroxol が N370S および F213I 変異の  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させることを報告した (Maegawa GHB, et al., J Biol Chem 2009)。

このほか、現在までにゴーシェ病のシャペロンとして、N-nonyl-deoxynojirimycin (Sawkar AR, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2002)、Isfagomine (Steet RA, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2006) が知られている。

ケミカルシャペロンがヒトリソーム病患者に投与し、実際に有効であったことが報告されたのは、Fabry 病に Galactose を投与し、心筋障害が改善した 1 例のみである (Frustaci A, et al., New Eng J Med 2001)。新たな化合物について臨床治験を行い、適応承認を受けるためには、経済的および時間的エネルギーを必要とする。我々の課題として、ケミカルシャペロンがゴーシェ病患者の神経症状に有効であることを一刻も早く明らかにする必要がある。

今回、この目的のために、ゴーシェ病のケミカルシャペロン 5 種類を比較し、Ambroxol の人への投与量の検討を行った。

### B. 研究方法

- 1) N370S/N370S、F213I/F213I、F213I/L444P、N188S/G193W、R120W/L444P、L444P・L444P 変異を持つゴーシェ病患者細胞と正常人由来の線維芽細胞を用いた。
- 2) 阻害剤として、N-octyl- $\beta$ -valienamine (NOV)、二環系ノジリマイシン (RV21、MTD111、MTD120)、Isfagomine (IFG)、Ambroxol、N-nonyl-deoxynojirimycin (NN-DNJ) の 4 種類を用いた。
- 3) ヒト正常線維芽細胞および種々の変異を持つゴーシェ病細胞を種々濃度のシャペロン存在下で培養し、単層で生きている細胞で 4-methyl-umbelliferone- $\beta$ -D-glucoside を基質に  $\beta$ -glucosidase 活性を測定し、酵素活性の増強効果を調べた。
- 4) 正常マウスへ Ambroxol を 8 日間投与し、各臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を測定した。

### C. 研究結果

- 1) 5 種類のシャペロンは、N370S、F213I、N188S、R120W 変異を持つゴーシェ病患者細胞の  $\beta$  グ

ルコシダーゼ活性を上昇させたが、正常と L444P 変異の活性には影響しなかった。

- 2) 2 NOV と IFG は F213I および R120W 変異酵素を 4~5 倍に、N370S と F213I 変異を 2~3 倍に上昇させた。
- 3) NOV と IFG では低濃度では NOV のシャペロン活性が強いが、高濃度の NOV は細胞毒性を示した。
- 4) 二環系ノジリマイシン、Ambroxol、NN-DNJ は N370S、F213I、N188S、R120W 変異を 1.5~2 倍に上昇させるが、NN-DNJ の F213I と R120W に対する効果は弱かった。
- 5) IFG 以外のシャペロンは高濃度で細胞毒性を示した。
- 6) 正常マウスに 1 週間 Ambroxol を投与した時のマウス臓器の  $\beta$ -glucosidase 活性を測定したところ、小脳の酵素活性を有意に増強させ、Ambroxol は脳内に移行する可能性が示された。

#### D. 結論

シャペロン効果および細胞毒性に相違はあるものの 5 つのこれまでに報告された NOV、NN-DNJ、JFG、二環系ノジリマイシン、Ambroxol は、F213I、N188S、N370S、R120W 変異に対して、ケミカルシャペロンとして働き、変異酵素活性を上昇させることを明らかにした。

市販薬である Ambroxol は脳内へ移行し、小脳の  $\beta$ -glucosidase 活性を上昇させ、ゴーシェ病の中樞神経症状に有効である可能性がある。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The effect of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev.* 2010 Jan 12. [Epub ahead of print]
2. Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The pharmacological chaperone effect of N-octyl- $\beta$ -valienamine on human mutant acid beta-glucosidases. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 Oct 24. [Epub ahead of print]
3. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y. Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)deoxynojirimycin. *ChemBiochem.* 10(17):2780-92, 2009.

##### 学会発表

1. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y. Chaperone activity of bicyclic SP<sup>2</sup> azasugars for Gaucher mutations. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Nagoya. September 26-27<sup>th</sup>, 2009.
2. Yokoyama A, Togawa M, Maegaki Y, Ohno K. Late-infantile and Juvenile/ Adults forms of Niemann-Pick type C1 diasease. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases. Nagoya. September 26-27<sup>th</sup>, 2009.

#### F. 知的所有権の取得状況

1. Patent No. 02762961.7-2103-JP0208882 カルバ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
2. Patent No スペイン P200802988 および Patent No PCT/ES2009/070449. Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes、発明者：Jose Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, Yoshiyuki Suzuki, Kousaku Ohno

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

## 酵素分子の計算的構造解析

-ケミカルシャペロン療法の機構解明に向けた $\alpha$ -ガラクトシダーゼ変異体の分子動力的解析-

研究分担者 榊原康文 慶應義塾大学 教授

## 研究要旨

ファブリー病は遺伝子変異した $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ -Gal)が不活性化することで発症する。近年提唱されたケミカルシャペロン療法によると、基質アナログ化合物であるシャペロン分子の特異的結合によって変異 $\alpha$ -Galを構造的に安定化することができ、活性回復へ導くことが可能だと考えられている。しかし、シャペロン療法の効果が変異によって大きく異なるのはなぜか、未だよくわかっていない。変異体のシャペロンに対する応答性に関して、分子レベルのメカニズムが明らかになれば、新規開発における分子設計や臨床における治療方針の策定を効率化できる可能性がある。

本研究では野生型と14の変異について、シャペロン分子1-deoxygalactonojirimycin (DGJ)との複合体の分子動力的(Molecular Dynamics, MD)解析を行った。まず変異体の構造的解析を実現するため、MDシミュレーションをもちいて各変異体に固有の構造を再現することを試みた。つづいてDGJ応答性を決定づける要素を明らかにするため、統計的なアプローチ、とくに次元縮約の手法をもちいて、再現した構造の解析を行った。本解析では、教師付きの次元縮約手法である線形判別分析(Linear Discriminant Analysis, LDA)を適用した。これによって、膨大で複雑な構造変化のデータから、応答性に特異的な情報のみを抽出することができる。結論として、本解析で扱った7種類のDGJ非応答的な変異体について以下のようなメカニズムを推察した。(i)構造安定性への影響: C94S, Y207S および G271Cは二量体接触域の構造に変化をもたらし、変異体が二量体を形成できない可能性がある。また C94S, P205R, Y207S および G271Cは水素結合や疎水性コア構造に変化をもたらし、本来のフォールディングを維持できない可能性がある。(ii)基質親和性への影響: C94S, P205R および G261Dは活性残基Y207に対して、また C94S, A143P, Y207S, G271C および W287Cは活性残基D231に対して影響し、基質やDGJに対する親和性が低下する可能性がある。

## A. 研究目的

ファブリー病はリソソーム蓄積症の一つであり、遺伝子変異した $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ -Gal)が欠損もしくは不活性化することで、糖脂質が細胞内に蓄積し発症する。近年提唱されたケミカルシャペロン療法では、基質アナログ小分子(1-deoxygalactonojirimycin, DGJ)の特異的結合によって変異 $\alpha$ -Galの立体構造を安定化することができ、これによって酵素活性の回復が可能であると考えられている。シャペロン療法に関する疑問の一つに、DGJの効果が変異ごとに異なるのはなぜかという点がある。このDGJ応答性について分子レベルのメカニズムが明らかになれば、新規シャペロン開発における分子設計や臨床における治療方針の策定を効率化できる可能性がある。また、本研究結果は $\alpha$ -Galactosidaseに対するものであるが、確立した計算機手法は汎用的なものであり、立体構造が決定されれば、 $\beta$ -Galactosidaseとその変異体に対するNOEVのケミカルシャペロン効果を解析する問題に対しても適用可能である。

## B. 研究方法

はじめに、野生型および変異型の $\alpha$ -Galについて分子動力的(Molecular Dynamics, MD)解析

を行った。シャペロン存在下における変異体の分子構造を再現するために、野生型の結晶構造に対し、変異残基置換を施しDGJを挿入した状態でMDシミュレーションを実行した。なお、本実験ではDGJ応答性/非応答性の変異型についてそれぞれ8変異ずつ合計16変異の $\alpha$ -Galについて、それぞれ11ナノ秒にわたってシミュレーションした。

つづいて、再現された構造をもとにDGJ応答性を決定づける要素を推測するため、線形判別分析(Linear Discriminant Analysis, LDA)を用いた。LDAを適用するにあたって、タンパク質の骨格を記述する1176の残基間距離を変数として定義し、応答性/非応答性に関する識別能の最大化を基準として判別成分における変数の重み係数を求めた。これにより応答性に特異的な構造変化を効率良く見つけ出すことができると考えられる。

## C. 研究結果と考察

判別分析の結果、応答性識別に有用な4つの成分を得た。まず第1, 2成分では、3変異の非応答性変異(C94S, Y207S, G271C)について有意差が見られた(図1)。これらの成分で抽出された領域では、3変異に特異的な局所構造変化としてループ間水素結合の開裂が見られた(図2)。

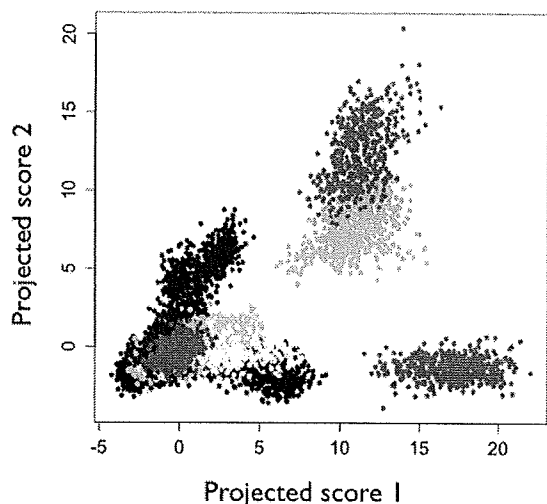


図 1: 第 1, 2 判別成分への写像. 1 点は 1 スナップショット構造を表す. 図上右の 3 変異 (緑:C94S, 青:Y207S, 茶:G271C) に有意差.

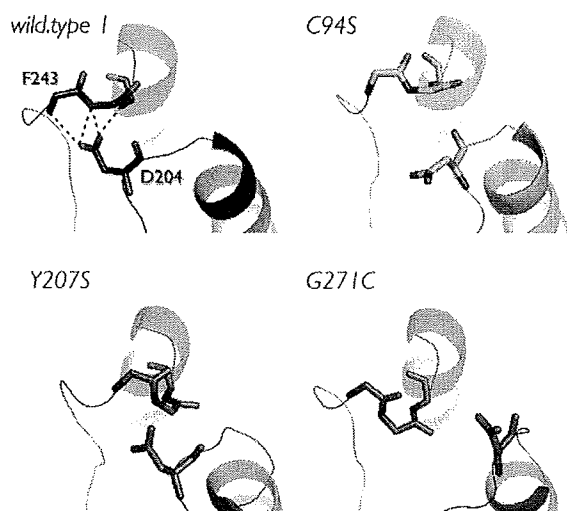


図 2: 第 1 成分で抽出された局所構造変化. 野生型 (左上)でのみ水素結合が見られる.

他に、疎水性残基コアにおける溶媒露出面積の増加や、二量体接触域における側鎖の配向変化といった特異的傾向が見られた。以上の結果から、これら 3 つの変異に関してフォールディング形成や二量体形成への影響が推測でき、 $\alpha$ -Gal の構造安定性が低下する可能性が示唆された。次に第 3 成分では 3 変異 (C94S, P205R, G261D) について、第 4 成分では 5 変異 (C94S, A143P, Y207S, G271C, W287C) についてそれぞれ有意差が見られた。第 4 成分で抽出された領域では、5 変異に特異的な局所構造変化として活性残基 D201 側鎖の配向変化が見られた (図 3)。この変化に伴って DGJ との水素結合への影響が見られた。第 3 成分では、第 4 成分と同様に、活性残基 Y207 の配向変化とそれに伴う DGJ 相互作用への影響が見られた。以上の結果から、

第 3, 4 成分に特異的な 3 変異, 5 変異の変異に関して、シャペロンもしくは基質との親和性が低下する可能性が示唆された。本解析ではさらに、上述の局所構造変化がいずれも、変異残基置換の影響に由来することを時系列解析により検証した。

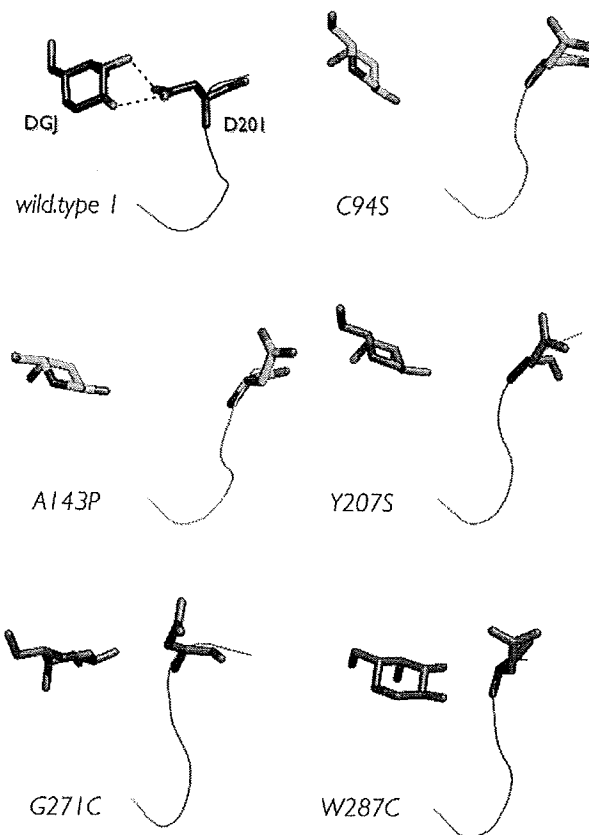


図 3: 第 4 成分で抽出された局所構造変化. 野生型 (左上)でのみ水素結合が見られる.

#### D. 結論

7 つの変異  $\alpha$ -Gal に関して、シャペロン非応答性のメカニズムを推察した。今後の展望として、(i) 変異数をさらに増やすことで、メカニズムの推測に関する信頼性向上、(ii) 複数の種類のシャペロン分子に関する解析により、分子設計に向けた新たな知見の創出が望める。

#### E. 研究発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

## β-ガラクトシダーゼに対する新規ケミカルシャペロン候補化合物に関する研究

研究分担者： 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

β-ガラクトシダーゼに対する新規ケミカルシャペロン候補化合物である 4 種類のアザ糖化合物について、試験管内酵素阻害活性、熱不安定性に対する作用、培養細胞およびマウス組織の R201C 変異酵素に対するケミカルシャペロン活性に関し検討を行い、2 種類の化合物で活性を認めた。そのうち 1 種類の化合物についてケミカルシャペロン活性の変異異性を検討した結果、I51T を含む複数の変異型で効果を認めた。

## A. 研究目的

新規ケミカルシャペロン候補化合物の探索を目的とし、4 種類のアザ糖化合物について検討を行った。

## B. 研究方法

## 1. 新規ケミカルシャペロン化合物

4 種類のアザ糖化合物 (MTD118, MTD120, MTD125, MTD128) は研究協力者の García Fernández 教授、Ortiz Mellet 教授 (セビリア大学) より供与して頂き、使用した。分子量は 260~330 で、蒸留水に溶解後、培養細胞実験にはフィルター滅菌したものを用いた。

## 2. 試験管内酵素阻害活性、熱不安定性に対する安定化作用の検討

正常および GM1-ガングリオシド-シス (R201C/R201C) 患者由来培養皮膚線維芽細胞から細胞粗抽出液を作成し、試験管内実験に使用した。また、同様の細胞抽出液と化合物の混合液を 48°C, pH 7 で 0, 10, 20, 30 分間保温後、酵素活性を測定し、熱不安定性に対する化合物の安定化作用を検討した。酵素活性の測定は 4-MU 人工基質を用いた。

## 3. 培養細胞に対するケミカルシャペロン効果の検討

ヒト患者由来培養皮膚線維芽細胞を 0~160 μM のアザ糖化合物を含む培養液で 96 時間培養後、酵素活性を測定した。また、培養 COS 細胞に 88 種類のヒト変異 GLB1 cDNA 発現ベクターを一過性に導入し、MTD118 を含む培養液で 48 時間培養後、酵素活性を測定した。

## 4. R201C モデルマウスに対する効果

3 ヶ月齢の R201C マウス (各 3 匹) に 0/2 mM の MTD118 を 1 週間飲水投与したのち、各臓器から抽出液を作成し、酵素活性を測定した。

## C. 研究結果

4 種類の化合物のうち MTD118 と MTD120 において正常β-ガラクトシダーゼ酵素に対する基質競合阻害活性を認めた。この阻害活性は R201C 変異β-ガラクトシダーゼでも同様に見られ、α-ガラクトシダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼでは見られなかった。また、MTD118、MTD120 は酵素蛋白質の試験管内熱不安定性

に対し、濃度依存的な安定化作用を示した。

培養 R201C 細胞に対するケミカルシャペロン効果は、20 μM と 80 μM の MTD118 でそれぞれ 4.8 倍、7.3 倍の活性上昇が見られた。一方、MTD120 は 20 μM で 4.6 倍の活性上昇が見られたが、40 μM 以上の濃度で明らかな細胞毒性を認めたので、その後の実験は MTD118 のみ検討した。MTD118 (2 mM) を投与したマウスの臓器における酵素活性は、非投与マウスに比べ心臓、肺において有意な酵素活性上昇を認めた。また、肝臓、腎臓、脾臓では有意差はないものの活性上昇効果を認めたが、脳では認めなかった。

β-ガラクトシダーゼ欠損症由来培養皮膚線維芽細胞に対する MTD118 の効果を調べた結果、R201C/R201C、G190D/G190D、I51T/Y316C、G438E/G438E、R201H/G481X、H281Y? の変異を持つ細胞で酵素活性上昇効果を認めた。また、一過性発現系により 88 種類の変異型に対する MTD118 の効果を調べた結果、I51T、R201C を含む 25 種類の変異型で酵素活性上昇効果を認めた。

## D. 考察

4 種類の化合物のうち MTD118 と MTD120 で見られたβ-ガラクトシダーゼに対する基質競合阻害活性は NOEV と比較すると低いが、80 μM の MTD118 は R201C 細胞に対し NOEV と同等の酵素活性上昇効果を示した。一方、今回の検討では R201C マウス臓器に対する MTD118 の効果は認められたものの、脳での活性上昇は見られなかった。今後はより高濃度の検討が必要と考える。また、変異型に対する検討結果から、MTD118 は I51T など NOEV が効かない変異型にも効果がある可能性を示唆した。MTD118 の効果に関し、今後さらに詳細な検討が必要と考える。

## E. 結論

4 種類のアザ糖化合物のβ-ガラクトシダーゼに対する効果を調べた結果、1 種類の化合物がケミカルシャペロン効果を示した。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, et al : Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev*, 31, 717-724, 2009.
2. Otomo T, Higaki K, Nanba E, et al : Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolipidosis II and III skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 98, 393-399, 2009.
4. Higaki K, Takamura A, Li L, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E : Cellular dysfunction in murine GM1-gangliosidosis. 第3回国際ライソゾーム病シンポジウム、第14回日本ライソゾーム病シンポジウム、名古屋、2009.9
5. Li L, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E : Screening for chemical chaperone therapy in beta-galactosidosis. 第3回国際ライソゾーム病シンポジウム、第14回日本ライソゾーム病シンポジウム、名古屋、2009.9

### 学会発表

1. Higaki K, Nanba E, Suzuki Y : Screening of chemical chaperone effect for GM1-gangliosidosis. 11<sup>th</sup> ICIEM, San Diego, CA, Aug 29 – Sep 2, 2009
2. 難波栄二, 檜垣克美, 鈴木義之 : GM1-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 : 88種類のミスセンス変異に対する NOEV の効果. 第51回日本小児神経学会総会、米子、2009.5
3. Li L, Higaki K, Adachi K, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E. Screening of chemical chaperone effect for human mutant

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

## ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析

研究分担者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

## 研究要旨

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物として、遺伝子改変により新規のGM1ガングリオシドーシスモデルマウス作出を目指し、ヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子導入マウス2ラインをβ-ガラクトシダーゼノックアウトマウスと交配することによって、ヒト変異酵素R457Qのみを発現するモデルマウス2ラインを樹立した。

## A. 研究目的

リソゾームは酸性で作用する加水分解酵素を多数含んでおり、高分子化合物を低分子物質に順次分解するが、これらの酵素に異常が起きると基質が蓄積し、多様な病態を示し、多くのライソゾーム酵素欠損症として知られている。発症時期や重症度はさまざまであるが、典型的には乳幼児期に発症し、多くは重症の中樞神経症状を伴い、有効な治療法がない。最近、ケミカルシャペロン療法が開発され、経口治療薬が変異酵素分子を安定化し活性を高めることが示され、中樞神経系をもターゲットとした治療法として注目されている。本研究では、ケミカルシャペロン療法の *in vivo* 治療実験モデルとして、ヒト患者の変異酵素遺伝子を導入するなどによって、ゴーシェ病および GM1 ガングリオシドーシスのモデルマウスの作製を目指している。本年度は引き続き新規 GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスの作出のため、ヒト変異酵素を発現する Tg マウスと β-ガラクトシダーゼ KO マウスとの交配を行い、ヒト変異酵素のみを発現するモデルマウス樹立を目指した。

## B. 研究方法

GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス作出のため、昨年度までに作製し、遺伝子発現及び変異酵素の発現を確認したヒト変異型 β-ガラクトシダーゼ R457Q Tg マウス (C57BL/6J の遺伝的背景を持つ) 2 ライン (#2, #3) について、β-ガラクトシダーゼ KO マウスとの交配を進め、β-ガラクトシダーゼ KO マウスの遺伝的背景にヒト変異遺伝子をもつマウスを作出した。Tg および KO の遺伝子型判定は PCR による。(鳥取大学 難波栄二先生との共同研究)

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

## C. 研究結果

ヒト変異型 β-ガラクトシダーゼ R457Q Tg マウス 2 ライン (#2, #3) と β-ガラクトシダーゼ KO マウスとの交配を行うことで、β-ガラクトシダーゼ KO マウスの遺伝的背景にヒト β-ガラクトシダーゼ変異遺伝子 R457Q をもつマウスの樹立に成功した。このマウスは内在性のマウス β-ガラクトシダーゼを発現せずにヒ

ト変異型 β-ガラクトシダーゼ R457Q 遺伝子のみを発現するヒト型 GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスであり、現在、神経症状の発現など臨床的観察を行っている。

## D. 考察

新規の GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスとして、ヒト変異型 β-ガラクトシダーゼ R457Q のみを発現する Tg/KO マウス 2 ラインを作製した。このマウスは本来のマウスが持つ内在性の β-ガラクトシダーゼ活性と比べ、脳の酵素活性が約 10%程度に低下していることが予想され、ヒトの乳児型乃至は幼児型の良いモデルとなることが期待される。現在、臨床症状の観察中であるが、既に作製されている R201C モデルマウスと比較して、発症時期、症状や重症度などに違いが見られるかなど、詳細な解析が待たれる。本マウス (R457Q マウス) は、変異 β-ガラクトシダーゼ R457Q を標的としたケミカルシャペロン療法開発のための良いモデル動物となることが期待される。

## E. 結論

ケミカルシャペロン療法の治療実験モデル動物として、遺伝子改変により新規の GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス作出を目指し、ヒト変異型 β-ガラクトシダーゼ R457Q 遺伝子導入マウス 2 ラインを β-ガラクトシダーゼノックアウトマウスと交配することによって、ヒト変異酵素 R457Q のみを発現するモデルマウス 2 ラインを樹立した。

## F. 研究発表

## 論文発表

1. Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev.* 31: 717-724, 2009.
2. Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival



- in the developing cortex. *Dev. Biol.* 331: 140-151, 2009.
3. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ. Res.* 105: 25-32, 2009.

#### 学会発表

1. 田口惇美、石井 達、濱中良志、松田潤一郎、野口洋子、古川鋼一、吉岡秀克「1-デオキシガラクトノジリマイシンはファブリー病モデルマウス組織において糖脂質の蓄積を低下させる」第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21 日 - 24 日
2. 高井知子、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とオートファジー異常」第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21 日 - 24 日

## 研究成果の刊行に関する一覧表

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 Ogawa S Sakakibara Y	Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: Competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities.	Perspect Med Chem	3	7-19	2009
Luan Z Higaki K Aguilar-Moncavo M Ninomiya H Ohno K Garcia-Moreno I Ortiz Mellet C Garcia Fernandez JM Suzuki Y	Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)-deoxynojirimycin.	ChemBioChem, published online 14 October 2009	10	2780-2792	2009
Nishimura Y	Gem-diamine 1-N-iminosugars as versatile glycomimetics: synthesis, biological activity and therapeutic potential.	J Antibiot	62	407-423	2009
Aoyama H Ogawa S Sato T	5a-Carba-glycopyranoside primers: potential building blocks for biocombinatorial synthesis of glycosphingolipid analogues.	Carbohydrate Res	344	2088-2092	2009
Hamada M Inami Y Nagai Y Higashi T Shoji M Ogawa S Umezawa K. Sugai T	Enzyme-catalyzed resolution of 3,8-deoxatricyclo [3.2.1.0 <sup>2,4</sup> ] octane-6-carboxylic esters and the application to the synthesis of 3-epishikimic acid.	Tetrahedron: Asymmetry	20	2105-2111	2009
Ogawa S Kanto M	Design and synthesis of 5a-carbaglycopyranosylamine glycosidase inhibitors.	Medicin Chem	9	58-75	2009
Sawada T Tanaka A Higaki K Takamura A Nanba E Seto T Maeda M Yamaguchi E Matsuda J Yamano T	Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis	Brain Dev	31	717-724	2009

Otomo T Higaki K Nanba E Ozono K Sakai N	Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolipidosis II and III skin fibroblasts.	Mol Genet Metab	98	393-399	2009
Okado H Ohtaka-Maruyama C Sugitani Y Fukuda Y Ishida R Hirai S Miwa A Takahashi A. Aoki K Mochida K Suzuki O Honda T Nakajima K Ogawa M Terashima T Matsuda J Kawano H Kasai M	The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex.	Dev. Biol	331	140-151	2009
Suganami T Yuan X Shimoda Y Uchio-Yamada K Nakagawa N Shirakawa I Usami T Tsukahara T Nakayama K Miyamoto Y Yasuda K Matsuda J Kamei Y Kitajima S Ogawa Y	Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue.	Circ Res	105	25-32	2009
Luan Z Li L Ninomiya H Ohno K Ogawa S Kubo T Iida M Suzuki Y	The pharmacological chaperone effect of N-octyl- $\beta$ -valienamine on human mutant acid $\beta$ -glucosidases	Blood Cell Mol Dis	44	48-54	2010
Luan Z Ninomiya H Ohno K Ogawa S Kubo T Iida M Suzuki Y	The effect of N-octyl- $\beta$ -valienamine on $\beta$ -glucosidase activity in tissues of normal mice	Brain Dev	in press Jan 12, [Epub ahead of print]		2010
鈴木義之	ケミカルシャペロン療法: 神経遺伝病の新しい試み	脳と発達	42	134-137	2010

## 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

1. 小川誠一郎、鈴木義之：カルバ糖アミン誘導体。日本特許第4057264号，2001年9月7日出願
2. 鈴木義之、大野耕策：糖脂質代謝異常症の治療薬。日本特許第4299479号，2001年9月7日出願
3. 鈴木義之、難波栄二、松田潤一郎：糖脂質代謝異常症治療剤。日本特許第4299517号，2002年9月5日出願
4. PTC出願  
米国： NOEV物質（審査中 10/793,8）2002年9月2日出願  
NOEV・NOV用途（審査中 12/490,737）2002年9月2日出願  
欧州： NOEV物質、NOEV・NOV用途（審査中 0276296.1）2002年9月2日出願  
カナダ： NOEV物質、NOEV・NOV用途（審査中 2459887）2002年9月2日出願  
オーストラリア： NOEV物質、NOEV・NOV用途。特許登録2002328402，2002年9月2日出願
5. Jose Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, M. Isabel Garcia Moreno, Matilde Aguilar Moreno, 鈴木義之、大野耕策: 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)，スペインP0200802988，2008年10月23日出願・公開中