

図1 ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の原理⁹⁾

投与した低分子シャペロン化合物は経口投与後血流に入り、血液脳関門を通過して中枢神経系でシャペロン効果を示す。細胞内小胞体・ゴルジ体の中性環境で変異蛋白質と結合してその立体構造を修復し、複合体のまま細胞内輸送システムによりライソゾームに運ばれる。ライソゾームの酸性環境で酵素分子とシャペロン分子の複合体は自動的に解離する。変異蛋白質は正常の構造を維持し、酵素としての活性を発現する。ただし、シャペロン化合物が過剰に存在すると酵素阻害剤としての効果が出現する。

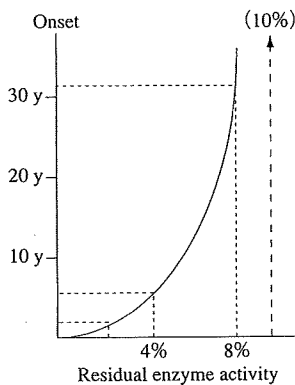


図2 G_{M1}-ガングリオシドーシスにおけるβ-ガラクトシダーゼ残余活性と発症年齢の相関⁹⁾

残余活性が低いほど発症年齢が低い。この曲線を外挿すると、正常活性の10%程度で発症年齢が無限大になる。患者細胞の酵素活性をこのレベル以上に上昇させれば、理論上、発症年齢は寿命よりも大きくなる。つまり患者の代謝回転速度が高くなり、生存中は発症しないことになる。これは培養細胞の活性データをもとにした理論曲線である。神経細胞での活性データによるものではない。

機構により、中性条件で変異分子とシャペロン分子が安定な複合体を作り、ライソゾームに輸送される⁹⁾。ライソゾームの酸性条件で蛋白質分子は自動的に解離し、安定に酵素活性を発現する。この種の化合物をケミカルシャペロンと呼ぶことにした。解離した酵素分子はそのままライソゾームで安定な構造を保ち、酵素活性を発現する。シャペロンは細胞外に排泄されるか、細胞内でリサイクルされてふたたび変異酵素

分子と結合してライソゾームに戻ってくる。この分子機構の一部はすでに実験により確認したが、詳細は明らかでない。

シャペロン化合物の投与により、細胞内酵素の基質処理能力がある閾値以上になれば病気の発症を遅らせることができる。β-ガラクトシダーゼ欠損症の場合、活性が正常の8~10%になれば、計算上発症年齢が無限大となる⁹⁾(図2)。発症と寿命との競争である。ただし、この曲線は、培養細胞を使ったデータをもとに作成したもので、神経細胞について全く同じ結果になるかどうかはわからない。したがって、我々は、酵素活性を可能な限り上昇させることを、複数のシャペロンを使って試みている。

III シャペロン化合物の検索

Fabry病には市販の化合物ガラクトースと1-デオキシガラクトノジリマイシンが細胞レベルで有効であった⁶⁾⁷⁾。次にG_{M1}-ガングリオシドーシスのβ-ガラクトシダーゼに働くシャペロン化合物の広範なスクリーニングを行い、新しい有機合成化合物であるバリエナミン誘導体NOEV(N-octyl-4-epi-β-valienamine)を見出した¹⁰⁾¹¹⁾。この化合物はG_{M1}-ガングリオシドーシス患者細胞でβ-ガラクトシダーゼ活性を著しく上昇させた。若年型の変異R201Cにもっとも有効であり、乳児型症例にも有効な変異があった⁹⁾¹⁾。検査細胞の35%が陽性反応を示した¹²⁾。ついで、すでに確立した酵素欠損ノックアウト(KO)マウス(重症型G_{M1}-ガングリオシドーシス)¹³⁾の線維芽細胞にR201C変異を導入し、ガングリオシド負荷による脂質蓄積、そしてNOEVによる酵素活性の上昇、蓄積の減少を

確認した⁹⁾。

IV 遺伝子組換えモデルマウスに対する NOEV の治療効果

上記の重症型 KO マウスに R201C 変異を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作成し⁹⁾、臨床的に軽症型 G_{M1} -ガングリオシドーシスのモデルであることを確認した。この実験動物に NOEV 水溶液を経口投与すると、NOEV は速やかに脳組織に入り、酵素活性を上昇させ、投与中止後速やかに組織から消失した⁹⁾。この実験結果から、NOEV が腸管で分解されずに吸収され、血液脳関門を通過して中枢神経系に到達し、酵素分子を安定化し、活性を発現させたとの結論を得た。

さらに NOEV の臨床効果を知るため、マウスの神経学的検査法を開発した。ヒト乳幼児の神経学的診察法をマウスに適用した。自発運動、個体各部位の姿勢肢位、原始反射、姿勢反射、平衡反応など、合計 11 項目をセットとしたスコアリングシステムとした¹⁰⁾。加齢とともに野生型マウス、軽症型マウス、重症型マウスの重症度スコアの差が明確となった¹⁰⁾。そして、発症早期からの NOEV 投与により、神経学的臨床効果を確認することができた⁹⁾。当然のことながら神経症状の軽減、進行阻止には早期治療が必須であることがわかった。

V シャペロン効果の分子機構解析

ケミカルシャペロンは立体構造異常のため細胞内で不安定な変異酵素分子の活性部位に結合し、安定な複合体としてライソゾームに運ばれる (図 1)。ライソゾームの酸性環境ではこの 2 つの分子の結合が弱くなり、自然に解離すると予想される。この分子機構の詳細は分かっていない。われわれはこの 2 種の分子の結合エネルギーを計算した⁹⁾。なお、 G_{M1} -ガングリオシドーシス患者脳細胞には過剰のガングリオシド

G_{M1} が蓄積しており、2 つの分子の酵素結合部位における競合により、NOEV が複合体から離れる可能性も否定できない。しかし、 G_{M1} の大部分は蛋白質とともに特殊な細胞内複合体としてライソゾーム内に存在し、酵素分子と接触可能な G_{M1} 分子は限られていると予想している。

まず、ヒト β -ガラクトシダーゼ分子の三次元立体構造を計算により予測した (図 3)。そして、NOEV と酵素分子の結合自由エネルギーを計算したところ、pH7 で -20.08 kcal/mol であった。そして、pH5 に低下させたところ、 -18.06 kcal/mol となった。つまり結合の自由エネルギーが大きくなる (分子結合力が弱くなる)、すなわち理論的には、より解離しやすい状態になると予測された (表 2)。NOV と β -グルコシダーゼについても同様の結果が得られた。そして、すでに構造が分かっている β -グルコシダーゼの活性部位へのシャペロンの結合様式を計算してみると、pH5 では活性部位における両者の分子間距離が大きくなるという計算結果が得られた (未発表データ)。

VI 他のライソゾーム病・他の遺伝病への応用

現在の主要な研究対象は β -ガラクトシダーゼ欠損症 (G_{M1} -ガングリオシドーシス) であるが、この新しい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。現在までのところ、Morquio B 病で有効と予測される変異は見つかっていない。NOEV はまた、Krabbe 病欠損酵素の強い競合的阻害剤でもある。しかし、欠損酵素の活性還元効果はまだ確認できていない。NOEV のバリエナミン構造異性体である NOV (N-octyl- β -valienamine) の有効性も Gaucher 病で確認した¹⁵⁾¹⁶⁾。

これまで、バリエナミン誘導体を中心としたシャペロンに

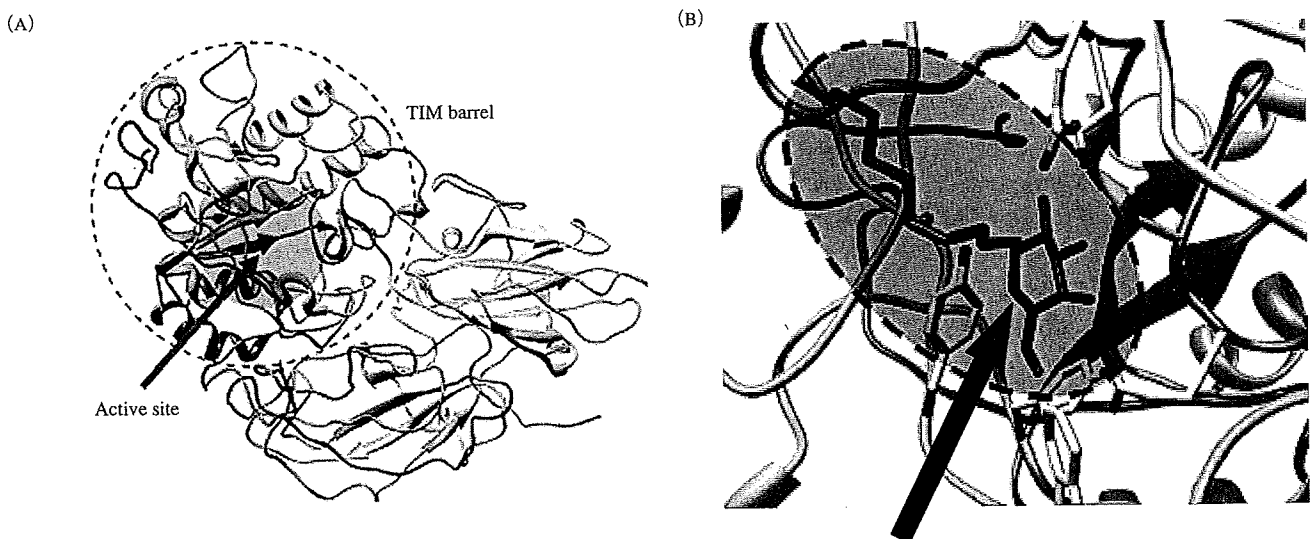


図 3 β -ガラクトシダーゼ分子の立体構造予測⁹⁾

(A) 酵素分子の活性部位。バレル構造に囲まれている。

(B) 活性部位における NOEV の結合形態。NOEV は点線で囲んだ灰色部分に構造模型として示した (矢印)。

表2 シャペロンと酵素分子の結合自由エネルギー計算値 (kcal/mol)

複合体	pH 7*	pH 5**
NOEV・ β -ガラクトシダーゼ	-20.08	-18.06
NOV・ β -グルコシダーゼ	-38.44	-17.26

*小胞体・ゴルジ体環境, **ライソゾーム環境
文献5)より引用

ついでに細胞・動物実験で、シャペロン効果を調べてきた。最近では、二環構造をもつアザ糖、N-イミノ糖化合物にも有望な競合阻害剤が見つかり、細胞、モデル動物の両面から検索を進めているところである。

われわれはライソゾーム病という、細胞内分子病態解析がかなり進んだ疾患群を対象とした研究を行ってきた。この新しい治療的アプローチはすべてのライソゾーム病について理論的に可能である。ただし、それぞれの疾患について、特異的なシャペロンの開発が必要である。さらに他のグループの遺伝病でも細胞内蛋白質動態が明らかになれば、ケミカルシャペロン療法が可能であるはずである。今後多くの種類の遺伝病についての研究が発展することを期待している。

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(H10-脳-006, H14-こころ-017, H17-こころ-019, H20-こころ-022)の補助金を受けた。

ケミカルシャペロン療法の開発は多くの共同研究者のご協力により進行中である。ここに記して感謝の意をささげる。

文 献

- 1) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A. β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): G_{M1}-Gangliosidosis and Morquio B disease. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SF, Ballabio A, eds. *The online metabolic and molecular bases of inherited disease. Part16: Lysosomal disorders*. New York: McGraw-Hill, 2008: 1-101. <<http://www.ommbid.com/>>.
- 2) Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y. Characterization of a mutant α -galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 1585-9.
- 3) Suzuki Y. β -Galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inherit Metab Dis* 2006; **29**: 471-6.
- 4) Suzuki Y. Chemical chaperone therapy for G_{M1}-gangliosidosis. *Cell Mol Life Sci* 2008; **10**: 351-3.
- 5) Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y. Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Medicin Chem* 2009; **3**: 7-19.
- 6) Okumiya T, Ishii S, Takenaka T, et al. Galactose stabilizes various missense mutants of α -galactosidase in Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **214**: 1219-24.
- 7) Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 1999; **5**: 112-5.
- 8) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, et al. Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1}-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15912-7.
- 9) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, et al. Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine G_{M1}-gangliosidosis. *Ann Neurol* 2007; **62**: 671-5.
- 10) Ogawa S, Kobayashi-Matsunaga Y, Suzuki Y. Chemical modification of the β -glucocerebrosidase inhibitor N-octyl- β -valienamine: synthesis and biological evaluation of 4-epimeric and 4-O-(β -D-galactopyranosyl) derivatives. *Bioorg Med Chem* 2002; **10**: 1967-72.
- 11) Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y. Development and medical application of unsaturated carbamoyl glycosidase inhibitors. *Mini-Rev Med Chem* 2007; **7**: 679-91.
- 12) Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, et al. Fibroblast screening for chaperone therapy in β -galactosidosis. *Brain Dev* 2006; **28**: 482-6.
- 13) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, et al. β -Galactosidase-deficient mouse as an animal model for G_{M1}-gangliosidosis. *Glycoconj J* 1997; **14**: 729-36.
- 14) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, et al. Motor and reflex testing in G_{M1}-gangliosidosis model mice. *Brain Dev* 2007; **29**: 210-6.
- 15) Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, 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* 2004; **1689**: 219-28.
- 16) Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, et al. Enzyme enhancement activity of N-octyl- β -valienamine on β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772**: 587-96.

