

キシソーム膜に挿入し、Pex19p が細胞質にリサイクリングする過程で必要なものかもしれない。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 Leu-21、Leu-22、Phe29 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) Sato Y, Shibata H, Nakano H, et al. : Characterization of the interaction between recombinant human peroxin Pex3p and Pex19p : Identification of TRP-104 in Pex3p as a critical residue for the interaction, *J Biol Chem*, 283 : 6136-6144, 2008
- 2) Morita M, Kanai M, Mizuno S, et al. : Baicalein 5, 6, 7-trimethyl ether activates peroxisomal but not mitochondrial fatty acid β -oxidation, *J Inherit Metab Dis*, 31 : 442-449, 2008
- 3) Kashiwayama Y, Seki M, Yasui A, et al. : 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH₂-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins, *Exp Cell Res*, 315 : 190-205, 2009

- 4) 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 (総説)
- 5) Cho AR, Yang KJ, Bae YS, et al. : Tissue-specific expression and subcellular localization of ALADIN, the absence of which causes human triple A syndrome, *Exp Mol Med*, 41 : 381-386, 2009

- 6) Iwashita S, Tsuchida M, Tsukuda M, et al. : Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70, *J Biochem*, in press

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
- 7) 柏山恭範, 成田琴美, 友廣岳則, 他: 光反応性脂肪酸誘導体を用いたフォトアフィニティーラベルによるペルオキシソーム脂肪酸代謝酵素及びその基質認識部位の同定. 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
- 8) 柏山恭範, 成田琴美, 友廣岳則, 他: 光反応性脂肪酸誘導体を用いたフォトアフィニティーラベルによるペルオキシソーム脂肪酸代謝酵素及びその基質認識機構の解析. 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009.3
- 9) Kashiwayama Y, Narita K, Suzumura M, et al. : Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with palmitoyl derivative. The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences : Bioactive Lipid Molecules and Transporters, Tokyo, 2009.5
- 10) Yokoyama K, Nagai T, Nishizawa C, et al. : Lipid metabolome of fibroblasts with peroxisomal diseases. The 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM 2009), Tokyo, 2009.5
- 11) Kashiwayama Y, Morita M, and Imanaka T : Importance of the NH₂-terminal hydrophobic motifs on the peroxisome selective targeting of PMP70. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 12) Kashiwayama Y, Tomohiro T, Hatanaka Y, et al. : Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with palmitoyl derivative. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 13) Shibata H, Sato Y, Nakatsu T, et al. : Structural-basis for the Pex3p-Pex19p interaction in the translocation of class I peroxisomal membrane proteins. International Meeting on Peroxisome Research, Seattle, 2009.11
- 14) 柏山恭範, 朝比奈幸太, 守田雅志, 他: ペルオキシソーム膜タンパク質局在化の分子機構: PMP70 をモデルタンパク質としての解析. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会, 福井, 2009.5.23
- 15) 横山和明, 永井 徹, 西澤千穂, 他: ペルオキシソーム病の繊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 51 回日本脂質生化学会, 名古屋, 2009.7
- 16) 西澤千穂, 永井 徹, 池田和貴, 他: ペルオキシソーム病の線維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10
- 17) 柏山恭範, 成田琴美, 友廣岳則, 他: 光反応性脂肪酸誘導体を用いたフォトアフィニティーラベルによるペルオキシソーム脂肪酸 β 酸化系酵素の基質認識部位の同定. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10
- 18) 佐藤康彦, 柴田洋之, 中津 亨, 他: ヒト由来ペルオキシソーム膜タンパク質輸送因子 Pex3p と Pex19p の構造基盤. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10
- 19) 五十嵐喜子, 柏山恭範, 平 裕幸, 他: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex16p のペルオキシソーム局在化メカニズムの解析. 日本薬学会北陸支部第 121 回例会, 富山, 2009.12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

サポシン欠損マウスを用いたライソゾーム病の神経病態解明に関する研究

分担研究者：松田 純子(東海大学 糖鎖科学研究所 准教授)

研究要旨

スフィンゴ脂質の分解に関わるスフィンゴ脂質活性化タンパク質(サポシン)欠損マウスの神経病態に関する研究を行い、以下の点について明らかにした。

新たな遺伝子改変マウスとしてサポシン C 欠損マウスの作成に成功した。サポシン C 欠損マウスはグルコシルセラミド β -グルコシダーゼ(GCase) 活性の減少を認めるが GCase の基質であるグルコシルセラミドやグルコシルスフィンゴシンの蓄積や肝脾腫を認めないこと、生後 3 カ月頃から神経症状を呈することを見出した。サポシン C 欠損マウスの神経病理学所見は小脳プルキンエ細胞および顆粒細胞の著減と神経細胞軸索変性腫大に特徴づけられ、電子顕微鏡観察によって、神経細胞軸索内には高電子密度で多重膜構造を持った構造体や、ミトコンドリア様の小器官が充満していることを明らかにした。これらの所見はサポシン C が神経細胞軸索膜の恒常性維持に重要であり、その破綻は神経変性を引き起こすことを示唆した。

サポシン D 欠損マウスの主な神経病変である小脳プルキンエ細胞死の進行の時間的、空間的なパターンがスフィンゴシンキナーゼ(SPHK)の発現パターンと関連することを明らかにした。この所見はセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1 リン酸の細胞内バランスが小脳プルキンエ細胞の生死の決定に重要であることを示唆する結果であった。

マウスプロサポシン特異抗体を作成し、野生型マウスの神経系におけるプロサポシンの発現解析を行い、海馬体 CA3 領域の錐体細胞や嗅球の僧帽細胞、小脳プルキンエ細胞における高発現を明らかにした。この所見はプロサポシン自体の神経細胞における機能を示唆する結果であった。また、サポシン D 欠損マウスではプロサポシンの発現が顕著に増加し、神経細胞の小胞体内に異常蓄積することを見出した。この所見はプロサポシンの細胞内動態にサポシン D 領域が重要であることを示唆する結果であった。

本研究で作成したサポシン特異的欠損マウスは、いまだ有効な治療法が確立していない神経型スフィンゴリポドーシスの神経病態を解析するための有用な疾患モデル動物である。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質はセラミドとよばれる脂質部分と糖鎖部分から成る両親媒性分子群であり、全ての脊椎動物の細胞に存在し、細胞の分化・増殖・接着の調節・制御に関わっていると考えられてい

る。脊椎動物の糖脂質の主要な構成単糖は 7 種だが、糖鎖構造および脂質構造の違いによって 1000 種を越す多様な分子種が知られている。糖脂質の組成は、動物種別、組織あるいは細胞の種類別の特徴があり、それらは糖脂質の生合成系と分解系

の平衡によって決められている。脊椎動物の脳神経系にはガングリオシド(シアル酸を持つ糖脂質)をはじめ特定の糖脂質が豊富に存在することから、神経系における糖脂質の機能的役割に興味を持たれている。ヒトでは、スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解障害であるスフィンゴリピドーシスが個体レベルで神経機能に重篤な障害を引き起こすことから、スフィンゴ糖脂質が神経機能発現に非常に重要であることが示唆される。

生体内のライソゾームにおいて、短い親水性の先端基をもつ疎水性のスフィンゴ脂質を、親水性の分解酵素(ライソゾーム酵素)と反応させるためには低分子量の糖タンパク質である 4 種のサポシン(saposin)：サポシン A、サポシン B、サポシン C、サポシン D が必要である。サポシンは共通の前駆体であるプロサポシン(prosaposin)の中に、A、B、C、D の順に直列に並んだドメインとして存在し、プロテアーゼによるプロセッシングを経て生成される。これらは構造的に極めて相同性が高いに

もかわらず、いくつかのオーバーラップがあるものの、それぞれが特定のライソゾーム酵素の活性化タンパク質として機能する(図 1)。サポシン B は主としてスルファチドを分解するアリールスルファターゼ A を活性化し、ヒトのサポシン B 欠損症はアリールスルファターゼ A 欠損症である異染性ロイコジストロフィー様の病像を呈する。サポシン C は主としてグルコシルセラミドを分解するグルコシルセラミドβグルコシダーゼ(GCase)を活性化し、ヒトのサポシン C 欠損症は GCase 欠損症であるゴーシェ病様の病像を呈する。ヒトの全サポシン(プロサポシン)欠損症も報告されている。

本研究において、我々は、1)サポシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析。2)小脳プルキンエ細胞死の病態解析。3)プロサポシン特異抗体の作成と野生型およびサポシン D 欠損マウスにおけるプロサポシンの発現解析の主として3つの研究課題に取り組んだ。

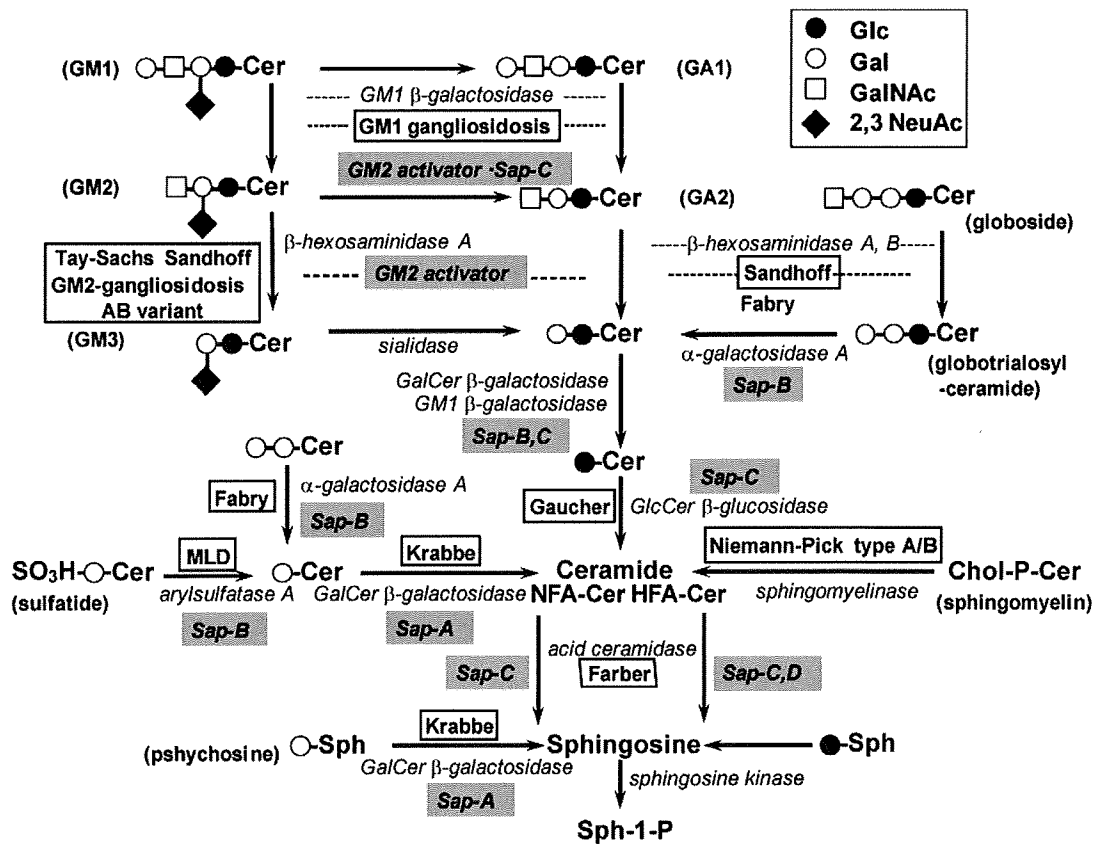


図 1 Degradative pathway of major glycosphingolipid

B. 研究方法

1) サポシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析

GCase の生体内での必須の活性化たんぱく質であるサポシン C をノックアウトすることで、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスが作成できると予測し、ゴーシェ病の神経病態の解明を目指した。マウスのスフィンゴ脂質活性化タンパク質(プロサポシン)遺伝子のサポシン C 領域に、ヒトのサポシン C 欠損症で報告されている遺伝子変異(サポシン C 領域の 5 番目のシステインのアミノ酸置換)を mimic したアミノ酸置換(5 番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異(C384S))を導入し、サポシン C 特異的欠損マウス(Sap-C^{-/-})を作成した。さらに、Sap-C^{-/-}をプロサポシンノックアウトヘテロマウス(Psa^{+/-})と交配し、Psap の一方の allele が null で他方がサポシン C 領域の missense mutation (C384S) を持つ Psap^{C384S} マウスを作成した。

2) 小脳プルキンエ細胞死の病態解析

ライソゾーム病モデルマウスの神経病理変化として高頻度に認められる小脳プルキンエ細胞死の分子メカニズムを明らかにする目的で、サポシン D 欠損マウスとニーマン-ピック病 C 型のモデルマウス(NPC1^{+/+})における小脳プルキンエ細胞死のパターンを組織免疫学的手法を用いて経時的に解析し、その脱落パターンとスフィンゴシンにリン酸基を付加しスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)を合成する酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1)の発現パターンと比較検討した。

3) プロサポシン特異抗体の作成と野生型およびサポシン D 欠損マウスにおけるプロサポシンの発現解析

プロサポシンは母乳、脳脊髄液、精液などの体液中に多く含まれることから、サポシンの前駆体タンパク質としての機能以外にも神経系や生殖器官などでの重要な生理機能が推定されている。プ

ロサポシン欠損マウスの半数近くが胎生致死であることもプロサポシン自体の生理活性を強く示す結果と言える。これまでプロサポシンの発現や組織分布は mRNA レベル、もしくはサポシン抗体を用いて解析されてきた。プロサポシン自体の細胞内動態や機能、特に神経系における生理活性を明らかにするためには、サポシンとプロサポシンを区別して解析する必要がある。本研究では、プロサポシンのみを検出するプロサポシン特異抗体を作成し、プロサポシンのマウス脳組織での分布および神経細胞内での動態を検討した。

すべての遺伝子組換え動物を用いる実験は東海大学の審査委員会による研究計画書の承認を経て、法令を遵守して行われた。

C. 研究結果

1) サポシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析

Sap-C^{-/-}は、正常に出生、発育するが、5 ヶ月齢頃より歩行異常、振戦を呈した。Psap^{C384S} マウスは、Sap-C^{-/-}マウスより早期(3 ヶ月齢頃)に同様の神経症状を発症し、その進行も速かった。生後 8 ヶ月齢までの観察では、Sap-C^{-/-}、Psap^{C384S} マウス共に肝脾腫や骨髄病変は認められなかった。Sap-C^{-/-}の各種臓器(大脳、小脳、肝臓、脾臓、腎臓)の脂質分析の結果、生後 6 ヶ月齢では GCase の基質である GlcCer、glucosylsphingosine (GlcSph) いずれの蓄積も認められなかった。Sap-C^{-/-}の肝臓では GCase の酵素活性が有意に低下していた。この結果は、サポシン C が GCase の酵素タンパク質の安定化等に関与している可能性を示唆すると考えられた。病理学的解析では、Sap-C^{-/-}、Psap^{C384S} マウス共に、8 ヶ月齢までの検討では、神経系および肝臓、脾臓にゴーシェ細胞の浸潤は認めなかったが、神経系において、3 ヶ月齢頃より小脳プルキンエ細胞の選択的かつ進行性の脱落を認めた(図 2)。

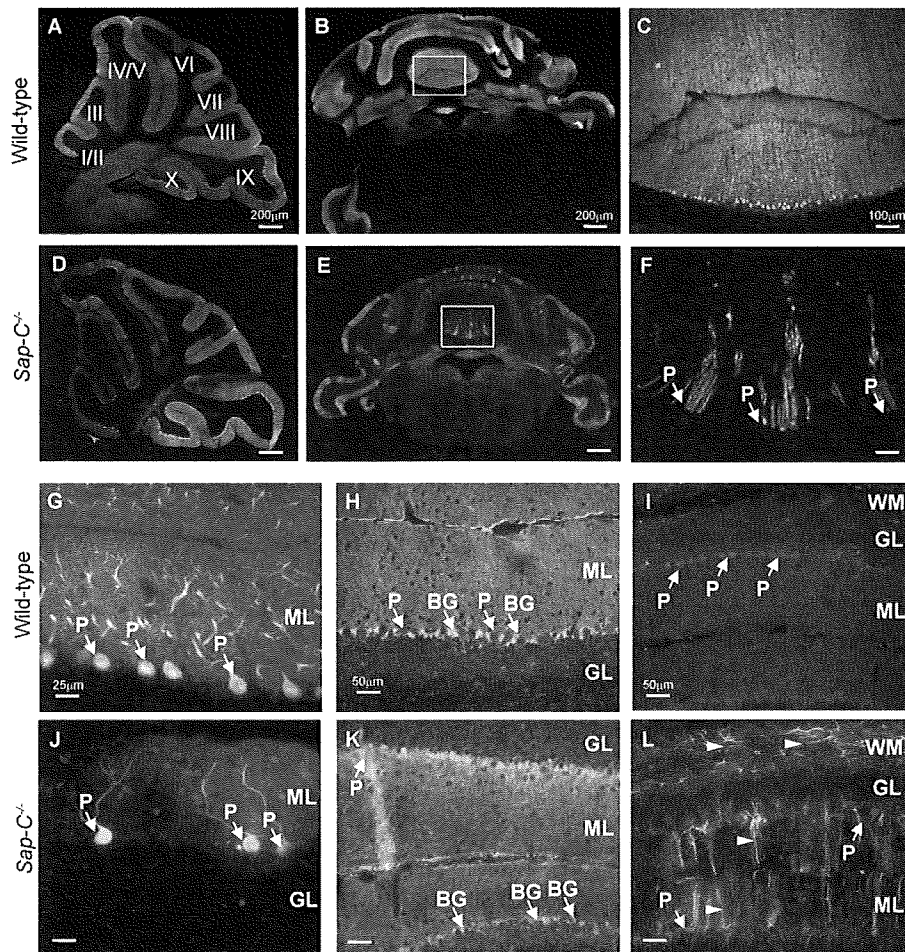


図2 Patterned and selective loss of Purkinje cells in the cerebellum of *Sap-C^{-/-}* mice (6 months old).

A–F. Multiple immunostaining with anti-calbindin D28k antibody (green), anti-parvalbumin antibody (red), and Hoechst (blue) in the cerebellum of wild-type (A–C) and *Sap-C^{-/-}* mice (D–F).

G and J are higher magnifications of C and F, respectively.

H and K Multiple immunostaining with anti-S100 β antibody (green), anti-calbindin D28k antibody (red), and Hoechst (blue) in the cerebellum of wild-type (H) and *Sap-C^{-/-}* mice (K).

In the parasagittal sections, the loss of Purkinje cells progressed from the first lobule to the ninth cerebellar lobule (D). In the coronal sections, the surviving calbindin immunopositive Purkinje cells aligned symmetrically in stripes (E).

I, L. Multiple immunostaining with anti-GFAP antibody (green), anti-calbindin D28k antibody (red), and Hoechst (blue). Arrowheads indicate activated astrocytes.

ML: molecular layer, GL: granular layer, WM: white matter, P: Purkinje cell, and BG: Bergman glia. The lines indicate each scale.

さらに神経細胞の軸索変性を反映した病理像 (axonal spheroid) が小脳、脳幹、脊髄と広範囲にわたって観察され(図 3)、小脳顆粒細胞、三叉神経節細胞、血管内皮細胞等には、脂肪蓄積を推測させる soap bubble like inclusion body を認めた。*Sap-C^{-/-}*、*Psap^{+/C384S}* マウスの神経病理所見は質的には同様であったが、*Psap^{+/C384S}* マウスがより重症であった。

2) サポシン D 欠損マウスの小脳病態解析

サポシン D 欠損マウス (*Sap-D^{-/-}*) およびニューマン-ピック病 C 型のモデルマウス (*NPC1^{+/+}*) の主な神経病変である小脳プルキンエ細胞死の進行の時間的、空間的なパターンがスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の発現パターンと関連することを明らかにした。*Sap-D^{-/-}*、*NPC1^{+/+}* 共に SPHK1 を発現しているプルキンエ細胞が、発現していない細胞に比しより病末期まで生存し、細

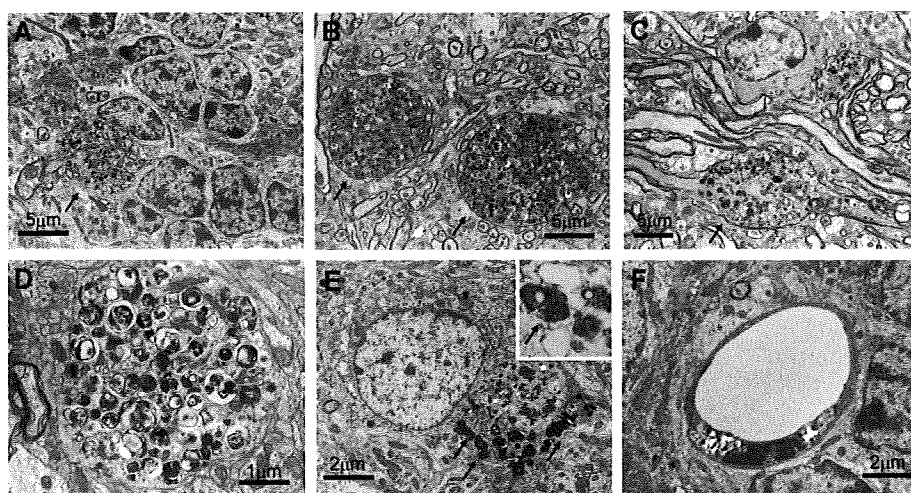


図3 Electron micrographs of the central nervous system of *Sap-C^{-/-}* and *Psap^{C384S}* mice (6 months old).

Axonal spheroids (arrows) in the cerebellar granular layer (A) and brain stem (B).

(C) Longitudinal section of axonal spheroids in the cerebellum of *Psap^{C384S}* mice. Internodal segments were focally enlarged.

(D) Axonal spheroids filled with concentric or lamellar electron-dense bodies of about 0.3–0.5 μm.

(E) Accumulation of lipofuscin-like deposits (arrows and inset) in the neuron of cerebellar nuclei.

(F) Inclusions in a vascular endothelial cell in the cerebellum. Arrows mark electron-lucent storage materials.

The lines indicate scales of 5 μm in (A–C), 1 μm in (D), and 2 μm in (E) and (F).

胞死耐性であった(図4, 5)。この傾向は *Sap-D^{-/-}* により明瞭であった。これらの所見はセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1リン酸の細胞内バランスが小脳プルキンエ細胞の生死の決定に関与していることを示唆する結果であった。

3) プロサポシン特異抗体の作成と野生型およびサポシンD欠損マウスにおけるプロサポシンの発現解析

マウスプロサポシン特異抗体を作成し(図6)、野生型マウスの神経系におけるプロサポシンの発現解析を行い、海馬体CA3領域の錐体細胞や嗅球の僧帽細胞、小脳プルキンエ細胞における高発現を明らかにした(図7)。この所見はプロサポシン自体の神経細胞における生理機能を示唆する結果であった。また、サポシンD欠損マウスではプロサポシンの発現が顕著に増加し、神経細胞の小胞体内に異常蓄積することを見出した。この所見はプロサポシンの細胞内動態にサポシンD領域が重要であることを示唆する結果であった。

D. 考察

本研究で、新たな遺伝子改変マウスとしてサポシンC欠損マウスの作成に成功した。当初、サポシンCノックアウトマウスは、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとなることを予想したが、サポシンCノックアウトマウスでは、GCaseの基質であるGlcCerやGlcSphの蓄積を認めず、ヒトとは異なる表現型し、神経型ゴーシェ病の典型的な疾患モデルマウスにはならなかった。しかしながらサポシンCノックアウトマウスではプルキンエ細胞などの特定の神経細胞が選択的に細胞死に至り、軸索腫大が特徴的に見出された。これらの所見は、サポシンCが神経細胞軸索膜の恒常性維持に重要であり、その破綻は神経変性を引き起こすことを示唆した。今後は、サポシンと軸索輸送の関わり、軸索輸送障害とライソゾーム病の神経病態の関係を明らかにする必要がある。

これまでの我々の研究成果と合わせて、すべてのサポシン欠損マウスを確立した(表1)。

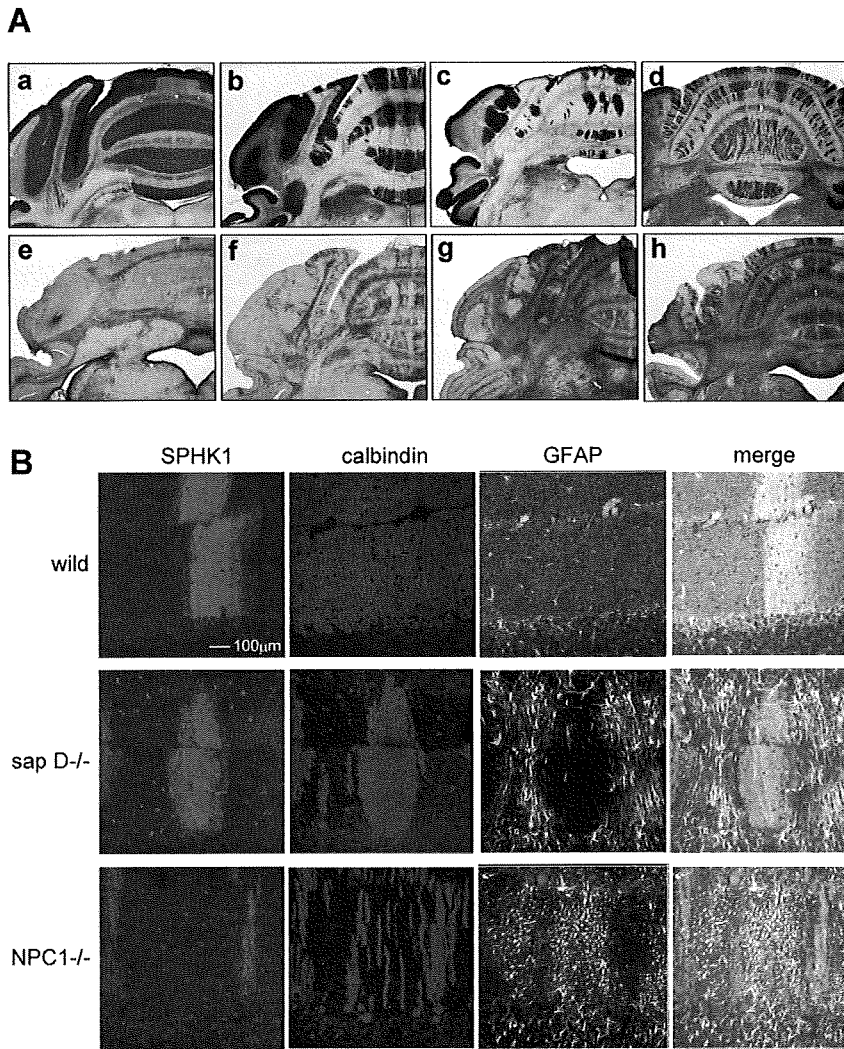


图 4 Progressive and patterned loss of PCs in Sap-D^{-/-}.

- A: Progressive loss of PCs and astroglial activation in saposin D^{-/-} mice. PCs were stained with anti-calbindin antibody (a-d) and the activation of astrocyte was assayed using anti-GFAP antibody (e-h) in wild type (6 months, a, e) and saposin D^{-/-} (8 months: b, f, 1 year: c, g) and NPC1^{-/-} (2 months, d, h) mice.
- B: Selective loss of PCs corresponding to the expression of SPHK1 in cerebellum of saposin D^{-/-} mouse. Confocal microscopic analyses using anti-SPHK1 antibody (green) and calbindin (red) and GFAP (white) and DAPI (blue) in wild type (6 months, upper panel) and saposin D^{-/-} (1 year, middle) and NPC1^{-/-} (2 months, lower).

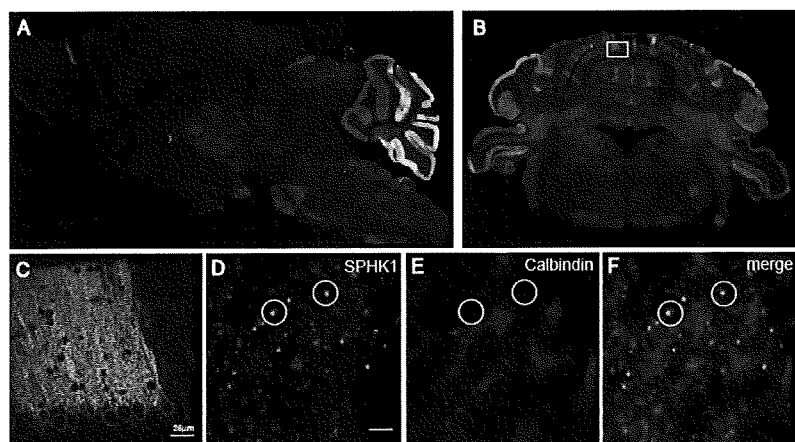


图 5 Segmental expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1) at the dendritic spines of cerebellar Purkinje cells.

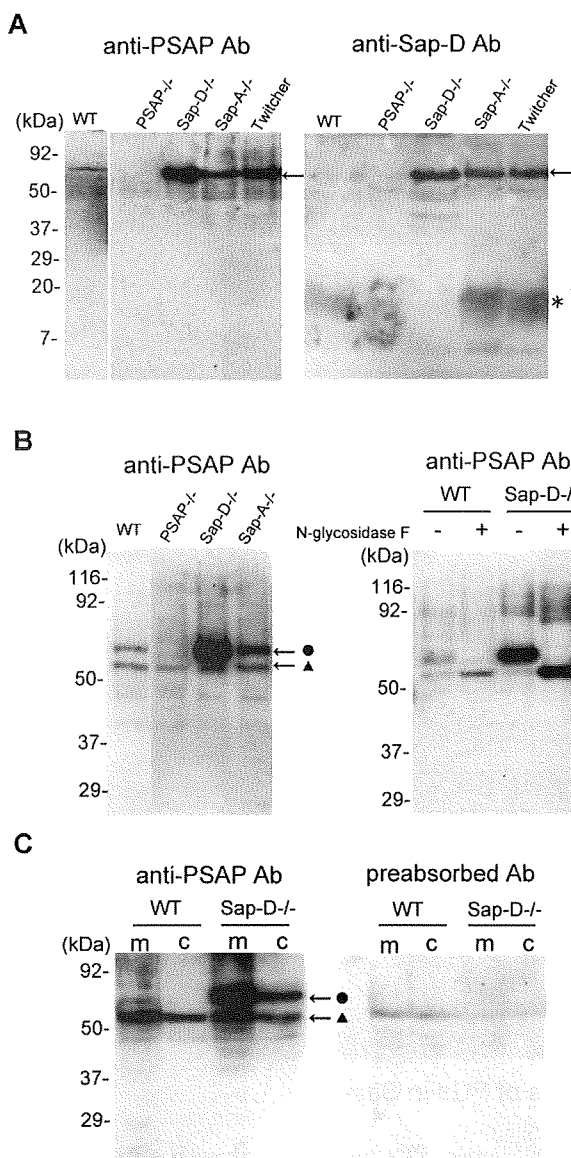


Figure 6 Immunoblot analyses of mouse brain homogenates with the anti-mouse PSAP antibody.

- A: 15% gel, B, C: 10% gel.
 A: Anti-mouse PSAP antibody recognized approximately 70 kDa band (arrow) corresponding the molecular weight of prosaposin, but no band approximately 15 kDa (asterisk), corresponding to mature saposins in wild type mouse.
 B: The intensity of 70 kDa band was dramatically increased in *Sap-D*^{-/-} mice followed by *Sap-A*^{-/-} mice. By the glycopeptidase F treatment, in both the wild-type and *Sap-D*^{-/-} mice, the majority of 70 kDa band (●) was shifted to 60 kDa (▲) band.
 C: Both 70 kDa and 60 kDa bands were significantly reduced with antibody preabsorbed by three antigen peptides.

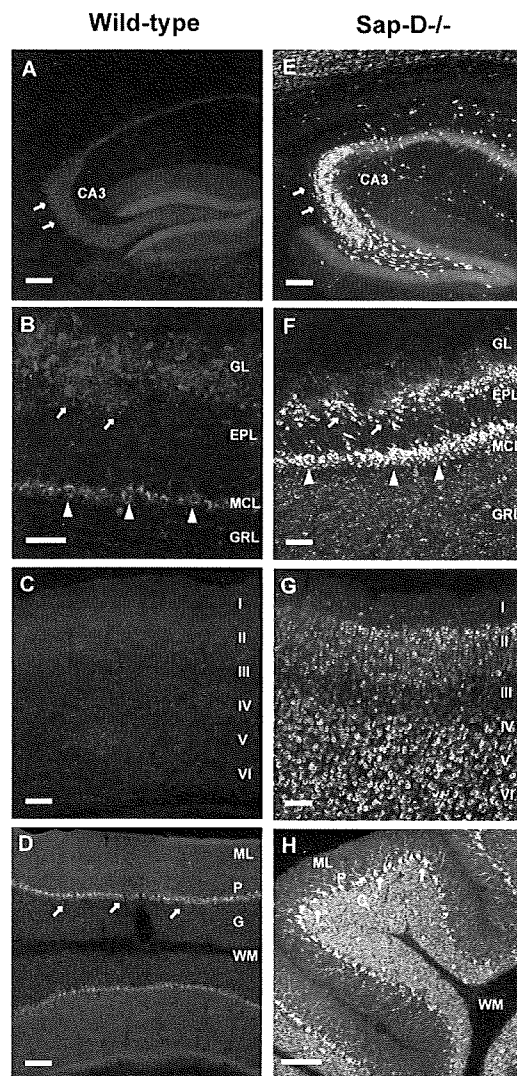


Figure 7 Immunohistochemical localization of prosaposin in the brain of wild-type and *Sap-D*^{-/-} mice.

- Confocal microscopic analyses using anti-mouse PSAP antibody (green) and calbindin (red) in wild-type (A-D) and *Sap-D*^{-/-} mice (E-H).
 A, E: In the hippocampus, the cytoplasm of pyramidal neurons in the hippocampal CA3 area (arrow) was prosaposin immunoreactive.
 B, F: In the olfactory bulb, the immunoreactivity of prosaposin was observed in tufted cells (arrow) and mitral cells (arrow head).
 C, G: In the cerebral cortex (C, G), neurons in layer II to VI were weakly prosaposin immunoreactive in wild-type mice, but the neurons of layer III and V in *Sap-D*^{-/-} mice were strongly positive.
 D, H: In the cerebellum, Purkinje cells (arrow) and granular layer were immune-positive in wild-type and *Sap-D*^{-/-} mice.
 GL: glomerular layer, MCL: mitral cell layer, GRL: granular cell layer, EPL: external plexiform layer, ML: molecular layer, P: Purkinje cell layer, G: granular cell layer. WM: white matter. The lines indicate scales of 100 μm.

表 1 Biological features of saposins and prosaposin

	Saposin A	Saposin B	Saposin C	Saposin D	Prosaposin
Subcellular site	Le, Lys	Le, Lys	Le, Lys	Le, Lys	ER, Golgi, Extracellular (body fluid)
Activating lysosomal enzyme	galactosyl-ceramidase	arylsulfatase A α -galactosidase A GM1- β -galactosidase	glucosyl-ceramidase	acid-ceramidase	?
Defect leads to major storage of	GalCer GalSph	Sulfatide Gb3Cer	GlcCer&GlcSph (human)	HFA-Cer (mouse)	Cer, many GSLs including LacCer
Human disease	Krabbe like disease	MLD like disease	Gaucher like disease	?	Severe LSD & perinatal lethality
Mouse disease Life span	Late-onset Krabbe disease ~4 months	Neuromotor deterioration ~23 months	Neurodegeneration with axonal spheroids & cerebellar PC loss ~15 months	Renal tubular & Cerebellar PC degeneration ~24 months	Severe LSD & perinatal lethality ~30 days
Stoichiometric complexes	monomer	homodimer	homodimer	homodimer	?
Direct interaction with exohydrolase	?	?	glucosyl-ceramidase	?	?
Solubilizes lipids	Yes	Yes	Yes	Yes?	?
Act as lipid antigen transfer protein to	?	CD1b (human)	CD1d (human) CD1d (mouse)	?	?

これらのマウスはライソゾーム病の神経病態を解明し、新たな治療戦略開拓に有用と考えられる。さらに、近年、サポシンはライソゾーム酵素のコファクター能に加え、脂質の輸送タンパク質として、膜脂質の再構成や NKT 細胞を活性化する CD1d 抗原への脂質抗原輸送などの新機能が注目されており、我々の作成したサポシン欠損マウスおよびプロサポシン特異抗体はサポシンおよびプロサポシンの生物学的機能を解明する上で有用なツールとなることが期待される。

E. 結 論

本研究で作成したサポシン特異的欠損マウスは、いまだ神経病変に対する有効な治療法が確立していないスフィンゴ糖脂質のライソゾーム蓄積病(スフィンゴリピドーシス)の神経病態を解析するための疾患モデル動物として有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K : The

function of sphingolipids in the nervous system : Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies, J. Neurochem, 103 : Supplement 1 : 32-38, 2007

- 2) Sun Y, Witte DP, Zamzow M, et al. : Combined saposin C and D deficiencies in mice lead to a neuronopathic phenotype, glucosylceramide and α -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking, Hum. Mol. Genet. 16 : 957-971, 2007
- 3) Miyazaki M, Yoneshige A, Matsuda J, et al. : HPTLC-MS for rapid analysis of neutral glycosphingolipids, J. AOAC Int. 2008, in press.
- 4) Matsuda J : Sphingolipid activator proteins. In Experimental Glycoscience : glycobiology, edited by Taniguchi, N. et al. 125-129, Springer, 2008
- 5) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, et al. : A

Mutation in the Saposin C Domain of the Sphingolipid Activator Protein (Prosaposin) Gene Causes Neurodegenerative Disease in Mice, *J. Neurosci. Res.* 2009, in press.

- 6) Yoneshige A, Suzuki K, Kojima N, et al. : J. Regional expression of prosaposin in the wild-type and saposin D-deficient mouse brain detected by an anti-mouse prosaposin-specific antibody, *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B*, 85 : 422-434, 2009
- 7) Yoneshige A, Sasaki A, Miyazaki M, et al. : Developmental changes in glycolipids and synchronized expression of nutrient transporters in the mouse small intestine, *J. Nutri. Biochem.* 2009.5.5

2. 学会発表

- 1) Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K : Generation of the anti-mouse prosaposin specific antibody : Regional accumulation of prosaposin in the hippocampus of saposin D knockout mouse. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA, 2007, 10.23-27
- 2) Yoneshige A, Matsuda J, Sasaki A, Suzuki K : Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. The 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA, 2007.10.23-27
- 3) 米重あづさ, 佐々木彩乃, 松田純子 : サポシン D 欠損マウスおよびニーマンピック病 C 型マウスの小脳プルキンエ細胞死とスフィンゴシンキナーゼ発現. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形市, 2007.11.15-17
- 4) Yoneshige A, Sasaki A, Suzuki K, Matsuda J : Patterned cerebellar Purkinje cell degeneration in mouse models of saposin D deficiency and Niemann-Pick type C disease is associated with selective expression of sphingosine kinase. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Tokyo, Japan, 2007.11.29-12.1
- 5) 佐々木彩乃, 米重あづさ, 松田純子 : スフィンゴリピドーシスモデルマウス組織中のスフィンゴシン 1 リン酸およびスフィンゴ糖脂質リゾ体濃度の測定. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜市, 2007.12.11-15
- 6) 松田純子, 米重あづさ, 鈴木明身 : 新生仔マウス小腸におけるスフィンゴ糖脂質組成の発達変化 : トランスポーターの発現変化との関係. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
- 7) 米重あづさ, 松田純子 : サポシン C 欠損マウスは神経変性疾患を発症する. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
- 8) 久樹晴美, 只野-有富桂子, 青山晃治, 松村暢子, 中木敏夫, 内田俊也, 松田純子, 岡崎具樹 : SaposinD 欠損多飲マウスの病態解析—飲水制限によって劇的に改善される運動障害. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008.12.9-12
- 9) 松田純子, 米重あづさ, 佐々木彩乃 : サポシン C 欠損マウスは神経変性疾患を発症する(口頭発表) 第 50 回日本先天代謝異常学会, 米子市, 鳥取県, 2008.11.15-17
- 10) Hojo H, Katayama H, Onuma Y, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Nakahara Y : Synthetic Study of Sphingolipid Activator Glycoprotein, Saposin C. 第 46 回ペプチド討

論会, 福岡, 2009.11.4-6

- 11) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 第3回国際ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009.10.26-27
- 12) 米重あづさ, 渡辺 昂, 松田純子 : サポシン C 欠損 *twitcher* マウスは重症化する. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 13) 渡辺 昂, 米重あづさ, 鈴木明身, 松田純子 : ジヒドロセラミド:スフィンガニン C4-水酸化酵素 (DES2) ノックアウトマウスは腎臓および消化管のフィトスフィンゴ脂質を欠く. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 14) 久樹晴美, 只野一有富桂子, 内田俊也, 松田純子, 岡崎具樹 : 多飲多尿を示すサポシン D 欠損マウス腎集合管ではアクアポリン発現が著明に低下する. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 15) 山本順寛, 長谷川 誠, 西村真優子, 高瀬和成, 長尾美好, 松田純子, 加柴美里, 吉村真一 : プロサポシンはコエンザイム Q10 の吸収と輸送に不可欠である. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 16) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, and Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. Neuroscience 2009 Chicago, USA. 2009.10.17-21
- 17) Yoneshige A, Suzuki K, Suzuki K, Matsuda J : Mutation in saposin C domain of sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in the mouse. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. Busan, Korea, 2009.8.23-28

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
特記事項なし

分担研究報告書

Ⅲ. 治療法の開発

ライソゾーム病に対するシャペロン療法の基礎研究

分担研究者：鈴木 義之(国際医療福祉大学教授)

研究要旨

G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する NOEV のシャペロン効果を確認した。形態・化学・臨床などの多面的な評価により、代謝動態の矯正、神経学的進行の停滞などが明らかになった。ただし、進行の完全な阻止はできておらず今後、投与量、投与方法などの検討が必要であると思われた。さらにケミカルシャペロン療法における細胞内分子動態の解析を行った。パリエナミン系化合物 NOEV, NOV とともに、それぞれ対応する酵素 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼとの相互反応が pH 依存性であることを明らかにした。粗面小胞体・ゴルジ体の中性環境でシャペロンと酵素タンパク質の結合が起こり、複合体がライソゾームに運ばれたあと、その酸性環境で結合自由エネルギーの増加により解離することが、計算上予測できた。この結果により、細胞内で起こるシャペロン効果の発生機序を説明できることがわかった。

研究協力者

大野 耕策(鳥取大学医学部教授)

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(鳥取大学研究支援センター長)

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)

NOEV 組織濃度、 β -ガラクトシダーゼ活性、G_{M1} 蓄積量、神経学的重症度などを指標として総合的に評価した。またシャペロンと酵素たんぱく質の相互作用を NOEV と NOV (N-octyl- β -valienamine) について結合自由エネルギー計算により検討した。

A. 研究目的

ライソゾーム病の新しい経口薬(シャペロン)治療を開発するための基礎研究を行う。そのためにシャペロン NOEV(N-octyl-4-epi- β -valienamine) の効果を β -ガラクトシダーゼ欠損動物個体、変異細胞、分子動態解析により解析した。

B. 研究方法

ケミカルシャペロン治療のひとつの試みとして、軽症型 G_{M1}-ガングリオシドーシス(トランスジェニック R201C 変異)モデルマウスに NOEV(1mM 水溶液)をアドリブ経口投与し、その臨床効果を、

C. 研究結果

生後 2 ヶ月までは疾患モデルマウスの神経学的スコアは正常であったが、以後徐々に異常所見が強くなった。生後 2 ヶ月から NOEV 投与を開始したところ、最初の 2 ヶ月間は野生型マウスとの間に症状の差を見なかったが、生後 5 ヶ月からは有意の進行停止が見られた。ところが生後 5 ヶ月から治療を開始したマウスはその後数ヶ月間、明らかな効果がなく、生後 11 ヶ月に初めて神経学的スコアの差が出現した。

数ヶ月治療後の病理所見は改善し、脳組織の酵素活性は正常の 30-40%に上昇、そして G_{M1} 蓄積量は未治療マウスと比較し著しく低かった。

NOEV の組織内代謝動態は早く、投与開始 3-7 日には飽和量に達し、投与中止後 3-7 日以内に測定感度以下のレベルまで減少した。投与実験中、特異的な毒性効果は見られなかった。

またシミュレーションによる結合自由エネルギー計算値は表のとおりである。NOEV、NOV とともに pH5 の条件で pH7 より結合強度が低下する(自由エネルギーが上昇する)ことが確認された。

また pH による NOV について、配座の変化と酵素との水素結合の変化が観察された。配座は、pH7 において NOV が活性ポケットにより深く入るように変化した。

表 1 結合自由エネルギー(kcal/mol)

複合体	pH7	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

D. 考 察

G_{M1}-ガングリオシドーシスに対する NOEV のシャペロン効果を確認した。形態・化学・臨床などの多面的な評価により、代謝動態の矯正、神経学的進行の停滞などが明らかになった。ただし、進行の完全な阻止はできておらず、今後、投与量、投与方法などの検討が必要であると思われた。さらにシャペロン療法の分子機構について明確な結論を得た。この新しい治療法の分子機序解明は、学術的に、そして診療への第一歩として、十分に評価されるであろう。

E. 結 論

今後は分子、細胞、動物実験データを踏まえ、臨床応用に向けて前臨床試験、臨床試験を実施し、神経遺伝病の新しい治療法確立を目指す。この新しい治療アプローチが、現在治療法のないライソゾーム病の脳病変に有効であり、近い将来診療レベルに到達することを期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y : Motor and reflex testing in G_{M1}-gangliosidosis model mice. *Brain Dev*, 29 : 210-216, 2007
- 2) Ogawa S, Kanto M, Suzuki Y : Development and medical application of unsaturated carba- glycosylamine glycosidase inhibitors. *Mini-Rev Med Chem*, 7 : 679-691, 2007
- 3) Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K, Kaneshi C, Brady RO, Suzuki Y : Enzyme enhancement activity of *N*-octyl- β -valienamine on β -glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*, 1772 : 587-596, 2007
- 4) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine G_{M1}-gangliosidosis. *Ann Neurol*, 62 : 671-675, 2007
- 5) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy for G_{M1}-gangliosidosis. *Cell Molec Life Sci*, 10 : 351-353, 2008
- 6) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G_{M1}-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 367 : 616-622, 2008
- 7) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A : β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis) : G_{M1}-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, Chap, 151 : 1-101, 2008
- 8) 鈴木義之 : ケミカルシャペロン. 有馬正高監修, 加我牧子・稲垣真澄編集 : 小児神経学. 診断と治療社, 東京, 512-514, 2008
- 9) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y : Novel β -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
- 10) 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
- 11) 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 : 2780-2982, 2009
- 12) 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
- 13) 鈴木義之 : 先天性脂質代謝異常. 小川 聡, 伊藤裕, 花房俊昭(編集) : 内科学書 5. 内分泌疾患, 代謝・栄養疾患, 改訂第7版, 中山書店, 361-364, 2009
- 14) 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
- ## 2. 学会発表
- 1) Suzuki Y : Molecular approaches to neurogenetic diseases : GM1-gangliosidosis as a model target disease. International Congress of Genetics for Pediatrics, Luxor, Egypt, 2007.1.25-26
- 2) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy : molecular mechanism and possible clinical application. International Symposium of Child Neurology, Ljubljana, Slovenia, 2007.6.1
- 3) García-Moreno MI, Aguilar M, Ortiz Mellet C, Iwasaki H, Ohno K, Suzuki Y, García Fernández JM : sp²-Azasugar glycosidase inhibitors as chemical chaperons for the treatment of lysosomal storage disorders. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Saint Petersburg, Russia, 2007.8.27-31
- 4) Takamura A, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E : Dysregulation of Trk receptor signaling in β -galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会, 横浜, 2007.9.10-12.
- 5) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Matsuda J, Iida M, Kubo T, Ogawa S : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. 7th European Paediatric Neurology Society Congress, Kusadasi, Turkey, 2007.9.26-29
- 6) 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真己, 檜垣克美,

- 鈴木義之：GM₁-ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床効果. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.10.15-17
- 7) 檜垣克美, 高村歩美, 梶卷賢哉, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二：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のマウスモデル細胞を用いた解析. 第49回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.10.15-17
- 8) Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E : Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk receptors in the neurons of GM₁-gangliosidosis mouse brain. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Maihama, Japan, 2007., 11.29-12.1
- 9) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy : a new molecular therapeutic approach to lysosomal diseases. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases., Maihama, Japan, 2007.11.29-12.1
- 10) Suzuki Y : Genetic aspects of brain dysfunction in children. Beijing Children's Hospital Teaching Seminar, Beijing, China, 2008.5.21-22
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Zhuo L, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of *N*-octyl- β -valienamine on β -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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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： β -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
- 18) 檜垣克美, 李林静, 高村歩美, 鈴木義之, 難波栄二：GM₁-ガングリオシドーシスマウス神経変性とオートファジーの異常. 日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008.11.28-29
- 19) 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
- 20) 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
- 21) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Kubo T, Iida M, Suzuki Y : The effect of 4-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

- 22) Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, Suzuki Y : Chaperone activity of bicyclic SP²-azasugars for Gaucher mutations, 10th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, Daegu, Korea, 2009.6.10-13
- 23) 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, 2009.8.29 -9.2
- 24) Suzuki Y : New Therapeutic approaches to neurogenetic diseases. International and IX Ukrainian Congress of Child Neurology, Kiev, Ukraine, 2009.9.9-12
- 25) 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, 2009.9.26-27
- 26) 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, 2009.9.26-27
- 27) 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, 2009.9.30-10.3
- 28) 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, 2009.10.14-18
- 29) 池端宏記, 檜垣克己, 李 林静, 飯田真己, 鈴木義之, 難波栄二 : ベータ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
- 30) 薬 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
- 31) Suzuki Y : Molecular basis of metabolic encephalopathy – Neurogenetic diseases : From molecule to patient. The 13th Infantile Seizure Study Group and International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases, Taipei, Taiwan, 2010.3.26-28
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
- 1) NOEV
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
- 2) NOV
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
- 3) NOEV
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
- 4) NOEV, NOV(PTC)
米国 : NOEV 物質 (審査中) 10/793,8 ; NOEV・NOV 用途 (審査中) 12/490,737
欧州 : NOEV 物質 NOEV・NOV 用途 (審査中) 0276296.1
カナダ : NOEV 物質、NOEV・NOV 用途 (審査中) 2459887
オーストラリア : NOEV 物質、NOEV・NOV 用途. 特許登録 2002328402
- 5) 二環系アザ糖 (RV21, MTD118 など)
J. Garcia Fernandez, C. Ortiz Mellet, M.I.

Garcia Moreno, M.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(公開中)

ニーマン・ピック病 C 型の調査研究とリソゾーム病の中枢神経症状に対する治療法の開発

分担研究者：大野 耕策(鳥取大学 医学部 教授)

研究要旨

我々はこれまで日本のニーマン・ピック病 C 型(NPC)の診断拠点の一つとして機能してきた。鳥取大学脳神経小児科で診断した NPC 患者の調査研究とともに、ライソゾーム病の中枢神経症状に対する有効な治療法の開発を目的としている。NPC モデルマウスを用い神経変性機構の解明と治療への展開についての研究、変異ライソゾーム酵素の安定化を行うケミカルシャペロン療法の開発の研究を行ってきた。

NPC モデルマウスの脳幹病理を検討し、モデルマウスは NPC 患者に特徴的に見られる眼球運動障害やカタプレキシーと関係する部位に病変を持つことを明らかにした。またモデルマウスの脳のグリオーシスはコレステロールが蓄積する結果シグナル伝達に異常をきたす結果であり、このシグナルを制御することにより、グリオーシスが抑制され、マウスの生存が延長することを明らかにした。

2009 年欧米で Miglustat がニーマン・ピック病 C 型の神経症状への治療薬として承認されたこと、またモデルマウスでシクロデキストリンが治療薬として有効であることが確認され、今後、日本での治療の開始を目指して、日本人患者の自然歴を明らかにすることを目指している。過去 15 年間に診断した 26 名の NPC 患者の主治医にアンケートを送り 17 名(死亡 7 名)の情報がえられ、同じ病型でも医療的ケアの導入時期に差があり、重症度にばらつきがあることが明らかになった。

研究協力者

戸川 雅美(鳥取大学医学部・助教)

齋藤 義朗(鳥取大学医学部・講師)

二宮 治明(鳥取大学医学部・准教授)

マウスを用いて研究を行い、NPC の病態解析と治療法の開発を行ってきた。

B. 研究方法 C. 研究結果 D. 考察

2007 年度

NPC 患者線維芽細胞、CHO-NPC⁺細胞の培養細胞の培地中にインターフェロン β 、IL-6、IL-8 が過剰に存在することを見いだした。培地中に過剰に分泌されたサイトカインは NPC 細胞で STAT 系のシグナルの活性化を起こしていた。これらの細胞ではコレステロールの蓄積したエンドソーム系に細菌内毒素の受容体である Toll-like 受容体 4 が増加し、細菌内毒素を添加した時の反応が過剰におこるため、サイトカインの産生の増

A. 研究目的

ライソゾーム病の大部分は進行性の中枢神経症状を呈する。ニーマン・ピック病 C 型(NPC)の原因たんぱく質はエンドソームからの脂質輸送小胞に存在する膜たんぱく質で、ライソゾーム内の加水分解酵素の欠損によるその他のライソゾーム病と異なり、酵素補充療法が期待できない。

我々は、ニーマン・ピック病患者細胞、我々が作成した CHO-NPC1⁺細胞、NPC1 欠損モデル