

201027067A

別添1

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木義之

平成23（2011）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	
鈴木義之	1
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：蛍光標識したシャペロンの細胞内分布	
大野耕策	7
酵素分子の計算的構造解析	
一分子動力学シミュレーションを用いたケミカルシャペロン療法の作用機序の検証	
榑原康文	11
$\beta$ -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	
難波栄二	13
ライソゾーム病モデル動物の作製と病態解析	
松田潤一郎	15
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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
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**

<b>研究代表者</b>	鈴木 義之	国際医療福祉大学大学院・特任教授
<b>研究分担者</b>	大野 耕策 榊原 康文 難波 栄二 松田潤一郎	鳥取大学医学部・教授 慶應義塾大学理工学部・教授 鳥取大学生命機能研究支援センター・教授 医薬基盤研究所生物資源研究部・研究リーダー
<b>研究協力者</b>	小川誠一郎 Jose Garcia Fernandez Carmen Ortiz Mellet 檜垣 克己 黒澤美枝子 一ノ宮悟史 伊藤 雅之 滝本 一広	慶應義塾大学理工学部・名誉教授 セビリア化学研究所・教授 セビリア大学化学部・教授 鳥取大学生命機能研究支援センター・准教授 国際医療福祉大学薬学部・教授 大田原赤十字病院リハビリテーション科・理学療法士 国立精神・神経医療研究センター神経研究所・研究員 国立感染症研究所動物管理室・研究員

### 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を目的として分子・細胞・動物実験を行った。中枢神経障害を主徴とする GM1-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-β-バリエナミン) の水溶液を経口投与し、新しく設定した3項目臨床評価法により、0.1 mM から 1 mM の濃度範囲で臨床の有効性を検証した。1 mM 水溶液の連日投与により、投与後短期間で臨床症状の進行がほぼ完全に停止したことを確認した。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β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ変異に対する効果を調べた。特に MTD118 のβ-ガラクトシダーゼシャペロン効果を NOEV と比較し、変異遺伝子に対する効果スペクトルの違いを明らかにした。一部は相補的に働き、検討した 88 種の変異中 40 種に、いずれかまたは双方のシャペロン効果を認めた。この中には臨床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。MTD118 の 2 mM 水溶液をモデルマウスに投与したところ、全身臓器の酵素活性が上昇した。また別の新しいβ-グルコシダーゼシャペロン (6-チオ-N'-オクチル-(5N,6S)-オクチルイミノメチリデンノジリマイシン) を蛍光標識し、ヒト培養神経細胞での分布を調べ、酵素活性の増加とシャペロンがライソゾームに存在することを確認した。さらに新しいシャペロン薬開発のために、既存の市販認可薬をリパーパス (オフラベル) 使用としてシャペロン療法に応用することを考え、FDA ライブラリーから統計的手法を用いてβ-ガラクトシダーゼシャペロン薬となる可能性のある製剤を検索した。10 種の化合物が高い確率でβ-ガラクトシダーゼと類似の立体構造を持つ蛋白質に結合する可能性があることが分かった。本研究は、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、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-β-バリエナミン)、

NOV (N-オクチル-β-バリエナミン) に加えて、二環系アザ糖 (ノジリマイシン) 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、β-ガラクトシダーゼ欠損症、β-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、シャペロン効果の最大達成を図る。そしてモデル動物実験における至適効果を得るとともに、毒性発現を可能な限り除外するための投与方法を検討する。このような基礎的データの集積後、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。

## 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)。

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、ミオ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)。また新しいシャペロン薬開発のために、既存の市販認可薬をリパーバス (オフラベル) 使用としてシャペロン療法に応用することを考え、FDA ライブラリーから統計的手法を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼシャペロン薬となる可能性のある製剤を検索した (榊原)。

### 2. 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 (檜垣)。また新しい  $\beta$ -グルコシダーゼシャペロン (6-チオ-N'-オクチル-(5N,6S)-オクチルイミノメチリデンノジリマイシン) を蛍光標識し、ヒト培養神経細胞に投与し、酵素活性とシャペロンの細胞内分布を調べた (大野)。

### 3. 新規モデル動物開発

これまで用いてきた R201C 変異発現  $G_{MI}$ -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。それぞれの臨床表現型の時間経過を解析した (松田)。

### 4. モデルマウスの神経学的評価法の再検討

これまで行ってきた神経学的評価のための検査項目を可能な限り少なくするため、各項目の見直しを行った (鈴木、一ノ宮)。総スコアへの寄与の重要度を個別的に評価し、臨床経過中、スコアの上昇が少ない

検査項目を削除することにより、より明確な指標の作成を試みた。

### 5. マウス個体シャペロン治療実験

$G_{MI}$ -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。それぞれの群を上記の新しい検査項目により評価した (一ノ宮、黒澤)。また新しいシャペロン MTD118 をモデルマウスに 1 週間投与し、全身臓器の酵素活性の変化を調べた (難波、檜垣)。

(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)、鳥取大学動物実験委員会 (檜垣、難波、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。

### 6. 神経病理、蓄積蓄積

モデルマウスに対する NOEV のシャペロン効果を検証するために、シャペロン実験中に一般病理 (札幌病理研究所)、神経病理 (伊藤)、蓄積脂質の免疫組織化学 (檜垣) の半定量的な分析とともに、定量的組織分析を行った (滝本)。

## C. 研究結果

### 1. バリエナミン化合物の化学合成 (小川)

ミオイノシトールの生物分解によって製造されるクエルシトール (デオキシイノシトール) 類から出発する NOV、NOEV の新合成法を確立した。従来法に比べ、工程が短縮され、取得収率、純度等も大幅に向上した。この方法が完成したことにより、NOEV の中規模製造が可能となり、さらに、将来薬剤として製造する際の大量製造への見通しを立てることができた。本年度にこの合成法の特許出願を行った。

### 2. 新規シャペロン薬の検索 (榊原)

FDA ライブラリーから統計的手法を用いて阻害剤の探索を行った。10 種の化合物製剤と結合する蛋白質が  $\beta$ -ガラクトシダーゼと類似した立体構造を持つことが分かった。この結果から、本手法が蛋白質の立体構造を考慮した予測を行うことができると考えた。

### 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 (#2、#3) の臓器について確認し、確立した。それぞれの臨床経過を観察した。ライン #2 は生後数ヶ月から神経症状を発現したが、他のライン #3 は生後 18 ヶ月まで明

確な神経症状を発現しなかった。それぞれの臓器内酵素活性にも差があり、ライン#3は高い残余酵素活性を示していた。

#### 4. MTD118のG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスに対するシャペロン活性(難波、楡垣)

培養細胞系でのMTD118とNOEVのシャペロン活性スペクトルにかなりの違いを認めた。MTD118単独での有効率は検査変異の30%、NOEVのみの有効例は26%であった。この2種のシャペロンの有効性には重複があるが、一方のみの有効例もあり、重複例も含めた全例を集計すると45%の変異遺伝子に有効であった。ただし、個別の変異数ではなく、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%に有効であると予測した。

MTD118水溶液の短期投与(1週間)により、R201Cマウスの臓器内酵素活性の上昇を認めた。

#### 5. モデルマウスの神経学的再評価

これまでの11項目検査を一つずつ見直した。代表的な結果を図1に示す。11項目、8項目、5項目、3項目と項目数を減らしても、NOEV投与の有無による総スコア値の経過に本質的な差を認めなかった。

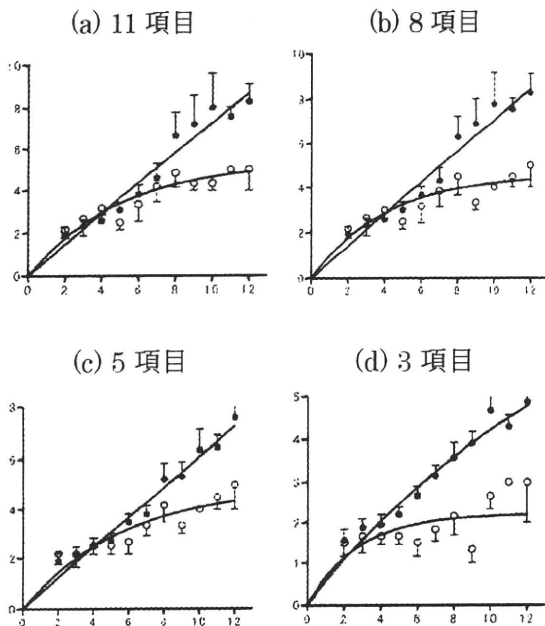
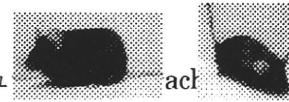


図1 検査項目数と総スコアの月齢変化

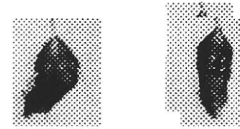
代表的な例として、NOEV1mM水溶液連日投与の結果を示す。●NOEV非投与、○NOEV1mM連日投与。縦軸：総スコア値(項目数により異なる)、横軸：月齢。

そこで最終的に以下の3項目テストを選び、今後の神経学的評価に用いることにした。

- A. 尾の強直拳上 tail posture (脊髄病変)  
スコア0: 正常、1: 軽度硬直拳上<20度、2: 高度強直拳上20-45度、3: 変形硬直・拳上持続  
写真左は正常、右は尾の硬直拳上意を示す。

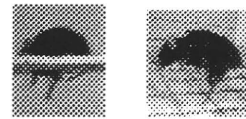


- B. パラシュ acf ex (脳幹病変)  
尾をつかみ空中逆位保持・急速下降。スコア0: 後肢進展外反>45度、1: 後肢外反<45度・後肢の間歇的伸展、2: 反応ほとんど消失・屈曲内反、3: 後肢屈曲内反位持続  
写真左は正常反応、後肢を開排し体幹を強く振る。右は異常反応、後肢を屈曲内転し胎動がなくなる。



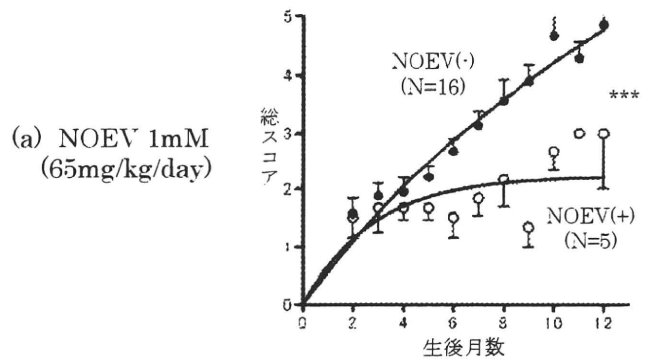
- C. 踏抜き misstep (大脳病変)

水平金網上歩行30秒。スコア0: 踏抜きなし、1: 踏抜き21-30秒、2: 踏抜き11-20秒、3: 0-10秒。正常マウスは30秒間に四肢を踏抜くことはほとんどないが、重症化に伴い網の上に乗って歩くことが困難となる。



#### 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投与実験(一ノ宮、黒澤)

NOEV 0.1-0mM 3段階希釈濃度水溶液を12-18ヶ月間経口投与し、上記の3項目評価テストを行った。



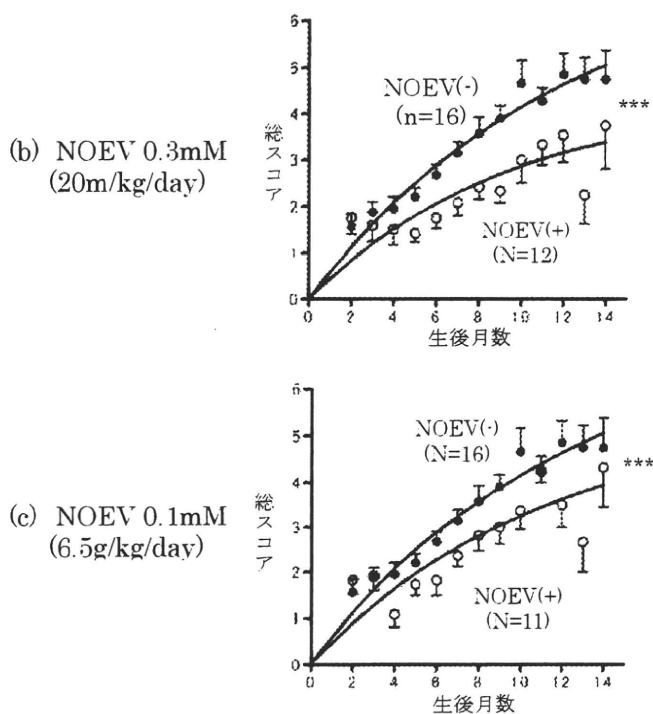


図2 NOEV投与量と臨床経過

この範囲の投与量では総スコア値の経過に有意差を認めた (2-way ANOVA: すべて  $p < 0.0001$ )。カッコ内の投与量は、1日の平均飲水量から計算した概算量である。

臨床効果とともに、寿命への効果も調べた。Kaplan-Meier 曲線について Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定を行ったところ、少数例ではあるが、1 mM 投与群には寿命延長効果は確認できなかった ( $p = 0.2102$ )。それに対して低濃度投与の2群には有意差を認めた (0.3 mM:  $p = 0.0092$ , 0.1 mM:  $p = 0.090$ )。

## 7. 病理学的検討

上記のように、臨床効果が最も著しい高濃度投与群に寿命延長効果が見られなかった理由を探るため、脳および他の腹部臓器の病理学的検査を行った (伊藤、檜垣)。1 mM 投与マウスでは中枢神経系の細胞変性、基質蓄積の抑制効果が明らかであり、臨床効果を裏付けることができた。肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、胸腺などには加齢に伴う変化を認めたが、投薬によると考えられる病変は認めなかった。ただし1例のみであるが生後2か月から 10 mM の NOEV 水溶液を2か月間投与したマウスの腎尿細管に高度の空胞変性を認めた。他の臨床観察を続けた2例は、生後4か月で死亡した。脂質分析も行ったが、病理、免疫組織化学データとの対応が不十分であり、今回は結論を出すに至らなかった。

## D. 考察

我々が生物活性を見出し、シャペロン候補として

実験に用いてきた NOEV と NOV はカルバ糖と総称される化合物群のひとつである。これらの化合物のこれまでの合成過程には改良の余地があり、供給にも制約があった。そこで最近、ミオイノシトールを原料とするデオキシイノシトールからスタートしてそれぞれの化合物を直接合成する方法を開発した。従来法に比べ、工程が短縮でき、取得収率、純度等も大幅に向上した。

その結果、NOEV の中規模製造が可能となり、さらに、将来薬剤として製造する際の大量製造への見通しを立てることができた。今後の NOEV の薬剤開発が可能になったということである。本年度、この方法についての特許を出願し、国際専門誌への論文投稿も準備中である。

また数年間スペインとの共同で開発を試みた新しいシャペロン化合物の中で、二環系アザ糖 (ノジリマイシン類似体) に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼに有効な新しいシャペロンが発見された。特に MTD118 というコード名を持つ化合物は NOEV と異なったシャペロンスペクトルをもち、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症のかなりの症例に将来治療効果が期待できる。今後は、これら複数のシャペロンの組み合わせという新しい視点からの治療の可能性も考慮すべきであろう。

これまでの分子計算によるシャペロン効果の理論的解析の成果をもとに、今年度は FDA ライブラリーの市販化合物の中から、統計的手法を用いた阻害剤の探索を行った。その結果 10 種の化合物製剤と結合する蛋白質が  $\beta$ -ガラクトシダーゼと類似した立体構造を持つことが分かった。この中には汎用の臨床薬も含まれており、全く別の作用機序に基づく中枢神経系の治療薬として、新しい適応を考えるという発想が可能になった。

数年前から我々はモデル動物の脳障害の指標となる臨床検査法を開発してきた。当初は 15 項目の異なった検査法を組み合わせていたが、評価内容の重複や運動反射現象がマウスにおいては、必ずしも正確な病的表現型の裏付けとはならないことに気付き、検査項目を徐々に削除してきた。昨年度までは 11 の検査項目を使っていたが、特にシャペロン治療の対象となるトランスジェニックマウスの臨床経過の詳細な分析をもとに、さらに検査項目を減らすことができたことが分かった。そこで今年度は病気の進行段階における各検査項目の寄与度を調べた。個別的な検討と削除を行い、3項目で十分な結果が得られることが分かった。むしろ検査項目を精選することにより、病態がより明確に表現されたといつてよい。NOEV 投薬開始後神経学的な進行が短期間でほぼ完全に停止するという驚くべき結果となった。

技術的理由から、モデルマウスには連日経口投与実験を行ってきたが、シャペロン効果の原理を考慮すると、間歇投与により投与量を減らし同じ臨床効果を達成できるはずである。そして全体として投与量を減らし、脳外組織に起こりうる副反応を除去することでできるであろう。

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する時期まで治療を開始することができない。この時期はヒト乳児型  $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスでは、明らかな脳症状が発現した生後数か月頃に相当するであろう。上記の結果からみると、個体発生の非常に早い時期に治療を開始すると、すくなくとも運動機能の評価については完全に病気を予防できる可能性がある。この結果をそのままヒト患者の治療効果予測に当てはめるわけにはゆかないが、患児の出生前（胎内）治療を考慮すべきかもしれない。

$G_{M1}$ -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数が十分でない可能性がある。今後は、我々が実施した全世界のシャペロンテスト症例を含め、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。現段階のモデル動物個体実験では、統計的に高度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。さらに投与量、投与法の検討により、有効性を高める努力をしたい。

新しいシャペロンの開発により、この治療の適応症例数が増加するであろう。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。今後も市販認可薬のリパーバス使用の可能性も含め、新しいシャペロン薬の検索を継続する。

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創造的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: Molecular basis of neurogenetic diseases. *Brain Dev.* in press. 2011.
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 Cell Mol Dis* 44: 48-54. 2010.
3. 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* 32: 805-809. 2010.
4. 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.
5. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem* 11: 2453-2464. 2010.
6. Jo H, Yugi K, Ogawa S, Suzuki Y, Sakakibara Y: Molecular basis of chemical chaperone effects of N-octyl- $\beta$ -valienamine on human  $\beta$ -glucosidase in low/neutral pH conditions. *J Proteomics Bioinform* 3: 104-112. 2010.
7. Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E: Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101: 364-369. 2010.

### 学会発表

1. Suzuki Y: Chemical chaperone therapy (Symposium Neurogenetics II). 11th International Child Neurology Congress. Cairo, Egypt. May 1-7. 2010.
2. Suzuki Y:  $G_{M1}$ -gangliosidosis and chaperone therapy. Yonago International Symposium: Chaperone Therapy Update. Yonago. July 29. 2010.
3. Ichinomiya S: Clinical assessment of murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. Yonago International

Symposium: Chaperone Therapy Update.  
Yonago. July 29. 2010.

4. Ortiz Mellet C. Aguilar-Moncayo M. Garcia-Moreno MI. Luan Z. Ohno K. Higaki K. Garcia Fernández JM. Suzuki Y: Synthesis of bicyclic sp<sup>2</sup>-iminosugars and evaluation of their chaperone activity for gaucher and g<sub>M1</sub>-gangliosidosis mutations. 25th International Carbohydrate Symposium. Makuhari. Chiba. August 1-6. 2010.
5. 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 大野耕策, 鈴木義之. 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対するケミカルシャペロン活性測定のための新規細胞系の構築. 第52回先天代謝異常学会, 大阪, 2010.10.21-23.
6. Ichinomiya S. Kurosawa M. Suzuki Y: Mouse neurology: assessment of chaperone effect in murine G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. 39th Annual Meeting of the Child Neurology Society. Providence. RI. USA. October 13-16. 2010.
7. 鈴木義之: ケミカルシャペロン療法: ヒト臨床試験に向けて. 第15回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2010.12.10-11.
8. 一ノ宮 悟史, 鈴木 義之: G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスモデルマウスにおける運動機能検査法の開発. 第15回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2010.12.10-11.
9. 檜垣克己, 栾卓 (Luan Zhuo), 李林静, 難波栄二, 大野耕策, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之: ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理学的シャペロンの効果に関する検討. 第15回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2010.12.10-11.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 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) Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. EU

(UK, Germany, France) 02762961.7 (Sept 2, 2002).

- 5) Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. Australia 2002328402 (Sept 2, 2002)
- 6) Ogawa S. Suzuki Y: Amine derivatives of carbasugars. USA 10/793.857 (Sept 2, 2002): *pending*.
- 7) Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. USA 12/490.737 (Sept 2, 2002): *pending*.
- 8) Ogawa S. Suzuki Y: Amine derivatives of carbasugars. Canada 2459887 (Sept 2, 2002): *pending*.
- 9) Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. Canada 2459887 (Sept 2, 2002): *pending*.
- 10) Garcia Fernandez J. Ortiz Mellet C. Garcia Moreno MI. Aguilar Moreno M. Suzuki Y. Ohno K: Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (Compounds enhancing mutant glycosidase activities). Spain P0200802988 (Oct 23, 2008): *pending*.
- 11) 久野信一, 小川誠一郎, 山口将憲, 北雄一, 友田明宏, 高橋篤: 新規カルバ糖前駆体とそれらの製造方法, およびそれらを用いた生理活性カルバ糖アミン誘導体の製造方法. 特願 2011-17242, 2011年1月28日出願.
- 12) 久野信一, 小川誠一郎, 山口将憲, 北雄一, 友田明宏, 高橋篤: 新規カルバ糖前駆体とそれらの製造方法, およびそれらを用いた生理活性カルバ糖アミンの製造方法. 特願 2011-17243, 2011年1月28日出願.

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
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：  
蛍光標識したシャペロンの細胞内分布

研究分担者：大野耕策 鳥取大学医学部教授

## 研究要旨

ゴーシェ病に対して酵素補充療法が行われているが、中枢神経症状には効果がない。我々は中枢神経系に移行可能で、変異酵素を活性化させる低分子化合物のスクリーニングと解析を行ってきた。これまでに、ゴーシェ病の N370S、F213I、N188S、G202R、G120W 変異を持つ  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ活性を上昇させる低分子化合物 N-オクチル  $\beta$ -バリエナミンを報告し、NOV は正常マウスへの 1 週間の大量経口投与でも、明らかな副作用なく、脳やその他組織の酵素活性を上昇させることを報告した。さらに、新規化合物二環系ノジリマイシンも N370S、F213I、N188S、G202R、G120W 変異を持つ  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ活性を上昇させることを明らかにした。今年度、蛍光標識した二環系ノジリマイシンを用いて細胞内分布を検討し、この低分子化合物は、ライソゾームに存在し、培養神経系細胞でも細胞内に入り、シャペロンとしての活性を持つことを明らかにした。

### A. 研究目的

ゴーシェ病は、ライソゾーム内の  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ ( $\beta$ -Glu) の遺伝的欠陥のため、組織にグルコシルセラミドが蓄積し、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。この疾患には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。

ファブリー病はライソゾームの  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A の欠損でおこり、鈴木義之博士らによって、ある変異はガラクトース存在下で活性が安定化されることが見出された。さらにガラクトース類似の低分子化合物が変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A を安定化し、変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼのライソゾーム内濃度をあげ、活性を上昇することが示され、低分子化合物を用いて変異酵素を安定化する物質をケミカルシャペロンと呼ばれるようになった。

我々は、過去 10 年間、ゴーシェ病の変異  $\beta$ -Glu に対する酵素活性増強効果を持つ低分子化合物をスクリーニングし、グルコース類似体である N-オクチル  $\beta$ -バリエナミン (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、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。また、NOV を正常マウスに 1 週間投与して、大量投与でも明らかな副作用なく、マウスの脳を含む臓器の  $\beta$ -Glu 活性を上昇させ、ゴーシェ病の中枢神経症状の治療薬となる可能性を明らかにした。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。また、現時点まで NOV の合成の問題から大量の NOV の入手が困難で、さらなる NOV の実験が困難であった。

新たなゴーシェ病のケミカルシャペロンの開発を目的として、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。今年度、蛍光標識した二環系ノジリマイシンを用いてシャペロンの細胞内分布を検討した。

### B. 研究方法

1. N370S/N370S、F213I/F213I、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、及び P19 マウス胚性ガン細胞株を用いた。
2. 阻害剤として、二環系ノジリマイシン 6-チオ-N' オクチル-(5N,6S)-オクチルイミノメチリデンノジリマイシン(6S-NOI-NJ)とダンシル基の導入により蛍光を発するノジリマイシン 6-チオ-(5N,6S)-[4-(N'-ダンシルアミノ)ブチルイミノメチリデンノジリマイシン(6S-NDI-NJ)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-メチルウンベリフェリル  $\beta$ -グルコシドを基質に  $\beta$ -Glu 活性を測定し、酵素活性の増強効果を調べた。
4. 正常人由来の線維芽細胞とゴーシェ病由来の患者細胞を 6S-NDI-NJ 存在下で 4 日培養後、細胞を洗浄

し、その後6日間の細胞内 $\beta$ -Glu活性を測定した。

5. 変異 $\beta$ -Gluを持つ患者細胞をpH7.0 37°Cと48°Cで培養し、酵素の失活に対する6S-NDI-NJの効果を検討した。

6. 正常およびゴーシェ病患者細胞に、蛍光標識した6S-NDI-NJを細胞に投与し、細胞内 $\beta$ -Gluの分布とライソゾームマーカー、小胞体マーカーとの分布を検討した。

7. マウスP19細胞をレチノイン酸により神経細胞に分化させ、6S-NDI-NJの細胞内分布を検討した。

### C. 研究結果

1. 6S-NDI-NJは6S-NOI-NJと同様に、N370S/N370S、F213I/F213I、L444P/L444P変異を持つゴーシェ病患者細胞のライソゾームの $\beta$ -Glu活性を上昇させたが、正常とL444P変異の活性に影響はなかった。

2. 30  $\mu$ Mの6S-NDI-NJ存在下で、N370S/N370S、F213I/F213I線維芽細胞を培養すると $\beta$ -Glu活性は時間とともに増加し、3-5日で最高の活性を示し、その後それぞれ、投与前の2.5倍、2.0倍の定常の活性状態を維持した。また4日目に6S-NDI-NJを抜くと、 $\beta$ -Glu活性1-4日で投与前のレベルに戻った。

3. 効率的なシャペロンはpHに依存した酵素の活性低下を示すことが知られている。変異 $\beta$ -Gluを持つ患者細胞をpH7.0、37°Cと48°Cで培養し、酵素の失活に対する6S-NDI-NJの効果を検討した。F213I/F213I変異は37°C60分で酵素活性が60%以下に低下するのに対し、N370S/N370S変異は37°Cでは1時間でも90%の活性を保持した。正常やL444P/L444P変異は37°Cではほとんど失活しなかった。

4. 6S-NDI-NJ存在下で培養した時の細胞内分布を明らかにするために、 $\beta$ -Glu抗体と小胞体とライソゾームのマーカーを用いて検討した。N370S/N370S、F213I/F213I、L444P/L444P線維芽細胞の $\beta$ -Glu抗体での染色性は顕著に低下していた。30  $\mu$ Mの6S-NDI-NJ存在下で4日間培養すると $\beta$ -Gluの染色性は顆粒状に増加し、6S-NDI-NJは $\beta$ -Gluと同じ場所に存在し、その顆粒はLAMP2陽性で、ライソゾームと関連する細胞内器官に存在することが明らかになった。

5. P19マウス胚性ガン細胞をMAP2陽性、 $\beta$ III-tubulin陽性の神経細胞に分化させ、神経細胞での6S-NDI-NJによる $\beta$ -Glu活性増強効果を検討したところ神経系細胞でも活性の上昇を示すことを明ら

かにした。また6S-NDI-NJは神経細胞の細胞体に存在し、分裂をしない神経細胞でも6S-NDI-NJが細胞内に取り込まれ、活性を上昇させることを明らかにした。

### D. 結論

蛍光標識した二環系ノジリマイシンを用いて細胞内でシャペロンは酵素蛋白質と同位置場所に存在し、その場所はLAMP2陽性のライソゾームであった。

分化して分裂をしない神経系細胞でも二環系ノジリマイシンは細胞内に取り込まれることから、神経系細胞の変異酵素の活性化が期待できることを明らかにした。

### 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* 32: 805-809. 2010.
2. Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E: Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101: 364-369. 2010.
3. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies. *Chembiochem* 11: 2453-2464. 2010.
4. 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* 44: 48-54. 2010.

### F. 知的所有権の取得状況

1. 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。
2. Patent No ス페인P200802988 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（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
分担研究報告書

酵素分子の計算的構造解析

—分子動力学シミュレーションを用いたケミカルシャペロン療法の作用機序の検証—

研究分担者：榊原康文 慶應義塾大学理工学部教授

## 研究要旨

$\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素が欠損するとガングリオシド  $G_{M1}$  が蓄積し、 $\beta$ -ガラクトシドーシスという疾患を引き起こす。ケミカルシャペロン療法は、ライソゾーム酵素の阻害剤を与えることによってその酵素の変異体を救済する療法である。変異体酵素が救済され、ライソゾーム内に輸送されると阻害剤の結合強度が弱くなり、本来の基質が過剰に存在するので変異体酵素が正常に働くと考えられる。ケミカルシャペロン療法として期待されるライソゾーム酵素阻害剤の一つとして、NOEVが開発された。本研究課題の最終年度では、ケミカルシャペロン療法の新たな化合物を探索するために、既存の認可薬をリバーパス（オフラベル）使用としてケミカルシャペロン療法に応用する可能性を探るため、FDAライブラリーから統計的手法を用いて阻害剤の探索を行った。

## A. 研究目的

ケミカルシャペロン療法はライソゾーム病に対する新規治療法である。ライソゾーム病はライソゾーム酵素の欠損により代謝されるべき不要物が細胞内に蓄積することで発症する。ライソゾーム酵素の欠損の原因としては、遺伝子の欠失、組換えのほか複数のライソゾーム病で多数の一残基変異が同定されている。この一残基変異体の多くは酵素としての活性を完全に失ってはいないが、中性条件では不安定なためライソゾームに輸送される前に分解されてしまう。近年、ある種の阻害剤を与えると変異酵素と結合し、その構造を安定化させ、結果としてライソゾームへの輸送までを助ける働きが確認された。シャペロン蛋白質のような働きを持つこの阻害剤をケミカルシャペロンと呼ぶ。一度ライソゾームに輸送され、酸性条件下におかれると変異酵素はもはや不安定ではなく、その残存活性を発揮する。このとき、阻害剤が存在するにも関わらず酵素が活性を発揮できる理由として、pHの変化により酵素と阻害剤の親和性が弱くなるためという仮説がある。

本研究では、既存の認可薬をリバーパス（オフラベル）使用としてケミカルシャペロン療法に応用する可能性を探るため、FDAライブラリーから統計的手法を用いて阻害剤の探索を行った。

## B. 研究方法

新薬開発の第1段階であるリード化合物探索において、情報技術を利用した候補化合物の絞り込みは新薬開発の期間と費用の削減につながる。これまで薬剤探索には多くの計算手法が開発されてきた。その手法は大きく分けて2種類に分けることができる。第一の手

法は分子モデリングと分子動力学の利用、第二の手法は統計学的手法の利用である。本研究では適用範囲の広い統計学的手法を利用して、オフラベル薬剤探索手法の開発を行った。

一般にオフラベル薬またはリバーパス使用とは、既存認可薬剤を用法が記載されていない新規の作用に対して使用される薬剤を指し、適応拡大とも呼ばれる。本研究ではすでに認可されている薬剤の中から新たな標的タンパク質に結合する薬剤を見つけ出す問題をオフラベル薬探索とする。認可済の薬剤を探索することで創薬ステップの非臨床試験などを省くことが出来るため、薬剤開発期間の短縮が期待できる。またオフラベル薬はすでに認可されているため、結合情報をはじめとする多くの知見が利用可能である。さらに、患者数が少ないゆえに新薬開発が見込まれない希少疾病に対しては、オフラベル薬は非常に有効な手段である。

本研究では、オフラベル探索を統計学の問題として明確に表現するために、1化合物とその化合物に結合する2つのタンパク質を1つの要素として扱うデータ構造を設計した。次に、この要素間の類似度を計算する新規 Kernel の提案を行った。同一化合物に結合するタンパク質は類似構造を持つと考えられるため、タンパク質類似度をこの Kernel に取り入れることで学習モデルに明示的に反映できる。さらにオフラベル薬が有効手段と考えられる希少疾病として、 $\beta$ -ガラクトシドーシスを扱う。その原因酵素である $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する薬剤探索をFDA認可化合物の中から行った。

## C. 研究結果と考察

FDA (Food and Drug Administration) に登録されている認可化合物の中から  $\beta$ -ガラクトシダーゼ結合化合物を探索した。図 1 に実験の概要を示した。

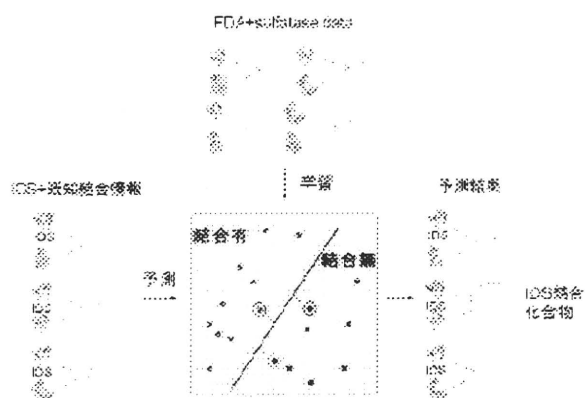


図 1: Iduronate sulfatase 結合化合物予

$\beta$ -ガラクトシダーゼ結合化合物予測を行った結果を表 1 に示す。ここに示された化合物と結合するタンパク質は  $\beta$ -ガラクトシダーゼと類似した立体構造を持つタンパク質が存在する。このことから本手法は蛋白質の立体構造を考慮した予測を行うこともできると考えられる。

表 1  $\beta$ -ガラクトシダーゼ結合予測化合物

Probability	Compound
0.949	Pindolol
0.946	Scopolamine HBr
0.912	Dolasetron
0.911	Fluocinolone acetonide
0.894	Diazoxide
0.867	Tacrine HCl
0.859	Lamotrigine
0.855	Zonisamide
0.855	Ibuprofen
0.853	Rapamycin

#### D. 結論

本手法はオフラベル薬探索という新しい探索問題を定式化して、新規手法を提案した。FDA 認可化合物からの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ結合化合物予測では、いくつかの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ結合可能性が高い化合物を探索することに成功した。このことから本手法はオフラベル薬探索において有用であると示唆された。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Jo H, Yugi K, Ogawa S, Suzuki Y, Sakakibara Y: Molecular basis of chemical chaperone effects of N-octyl- $\beta$ -valienamine on human  $\beta$ -glucosidase in low/neutral pH conditions. J Proteomics Bioinform 3: 104-112. 2010.

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
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アザ糖化合物のシャペロン効果について検討を行った。cDNA 発現系を用い、変異型に対するシャペロン効果を調べ、I51T 変異を含む 23 の変異に対する効果を認めた。また、R201C マウス投与実験により、脳幹、心臓、肺などの臓器における活性上昇効果を認めた。これらの結果は新規シャペロン化合物としての可能性を示した。

## A. 研究目的

昨年度同定した新規ケミカルシャペロン候補アザ糖化合物について、変異別シャペロン効果などを検討し、シャペロン化合物としての可能性を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 新規ケミカルシャペロン化合物

アザ糖化合物 (MTD118) (García Fernández, Ortiz Mellet) を蒸留水に溶解後、培養細胞実験にはフィルター滅菌したものを用いた。

### 2. 変異β-ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果

β-ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス由来線維芽細胞株に 88 種類のヒト 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一過性に導入後、0. 20. 80 mM の MTD118 を含む培地で 48 時間培養後、細胞抽出液中のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。

### 3. R201C モデルマウスに対する効果

国際医療福祉大学（鈴木、一ノ宮）で R201C マウス（各 3 匹）に 2 mM の MTD118 を 1 週間飲水投与後、摘出した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

88 の変異 β-ガラクトシダーゼに対する MTD118 のケミカルシャペロン効果を調べた結果、20 mM または 80 mM の MTD118 で活性上昇を示す変異として、I51T, R201C を含む 23 の変異型を同定した。また、MTD118 (2 mM) を投与した R201C マウスの臓器における酵素活性は、非投与マウスに比べ脳幹、心臓、肺において有意な酵素活性上昇を認めた。また、大脳、小脳、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。

## D. 考察

昨年度、4 種類のアザ糖化合物について、試験管内酵素阻害活性と酵素安定化作用の検討により、MTD118 を新規シャペロン候補化合物として同定した。変異β-ガラクトシダーゼに対する MTD118 のシャペロン効果は I51T や G438E など NOEV に反応しない変異型に対する効果を認めた。この結果は、NOEV と MTD118 で約 50% 変異のβ-ガラクトシダーゼに有効性を示すと計算できた。また、マウスモデルに対する検討から、飲水投与により脳組織の酵素活性の上昇を示したことから、MTD118 血液脳関門を通過し、脳組織に効果を示す可能性を示した。

## E. 結論

アザ糖化合物 MTD118 はβ-ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物としての可能性を示した。

## F. 研究発表

### 論文発表

- Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E: Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of β-galactosidase mutations. *Mol Genet Metab* 101: 364-369. 2010.
- Luan Z, Higaki K, Aquilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: A fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem* 11: 2453-2464. 2010.

### 学会発表

- 難波栄二、檜垣克美：GM1-ガングリオシドーシス脳神経細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積. 第

- 52回 日本小児神経学会総会、福岡、2010.5.20-22.
2. 難波栄二：ケミカルシャペロン療法. 第52回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10.21-23.
3. 高井知子、檜垣克美、李林静、飯田真己、大野耕策、鈴木義之、難波栄二：ベータガラクトシダーゼに対するシャペロン活性測定のための新規細胞系の構築. 第52回 日本先天代謝異常学会総会、大阪、2010.10.21-23.
4. 高井知子、檜垣克美、李林静、榊原康文、鈴木義之、難波栄二：ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するシャペロン効果. 第83回 日本生化学会大会、神戸、2010.12.7-10.
5. 檜垣克美、栗卓、李林静、難波栄二、大野耕策、Carmen Ortiz Mellet、José M. García Fernández、鈴木義之：ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理学的シャペロンの効果に関する検討. 第15回日本ライソゾーム病シンポジウム. 東京、2010. 12.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
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 難病・疾患資源研究部研究リーダー

## 研究要旨

遺伝子改変による新規の  $G_{M1}$  ガングリオシドーシスモデルマウスとして、 $\beta$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスの遺伝的背景にヒト変異型  $\beta$ -ガラクトシダーゼ R457Q 遺伝子を持ち、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、病態解析を行った。このうち 1 ラインが神経症状を呈する発症モデルであることが判明した。このマウスはケミカルシャペロン療法の治療実験のための新規発症モデル動物として期待される。

### A. 研究目的

ライ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  $G_{M1}$  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  $G_{M1}$  ガングリオシドーシスモデルマウスの作出として、 $\beta$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスの遺伝的背景にヒト変異型  $\beta$ -ガラクトシダーゼ R457Q 遺伝子を持ち、ヒト変異酵素 R457Q のみを発現するモデルマウス 2 ライン（昨年度までに樹立済み）について、病態解析を行い、モデル動物としての有用性を検討した。

### B. 研究方法

$G_{M1}$  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た、ヒト変異  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素 R457Q のみを発現するモデルマウス 2 ライン（#2 と #3、 $\beta$ -ガラクトシダーゼノックアウトマウスの遺伝的背景にヒト変異型  $\beta$ -ガラクトシダーゼ R457Q 遺伝子を持つマウス）について、神経症状などの臨床症状について観察を行った。ライン #3 のマウスについては、脳、肝臓、腎臓の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を人工基質 4-メチルウンベリフェロン  $\beta$ -ガラクトシドを用いて測定した。

（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  $\beta$ -ガラクトシダーゼのみを発現する R457Q マウス 2 ライン（#2、#3）の臨床症状の観察を行った。ライン #2 は、5～6 か月令頃から、やや尾を挙げて歩くなど軽度の歩行異常が見られ、8 か月令からは、尻尾を挙げてよるめきながら歩くようになり、ワイヤーネット上を歩かせると足を踏み抜くなどの明かな歩行障害を示し、さらに尻尾を持ってぶら下げると四肢を縮めるという特徴的な症状を示した。ライン #2 は月令が進むと重度の歩行障害、四肢麻痺が進行し、10 か月令頃には摂食困難に陥り削瘦が激しくなり、安楽殺処置を行った。一方、ライン #3 は、18 か月令での観察では、軽度の歩行異常が一部の個体で認められたが、同月令の正常個体と比較して明かな異常とは見なされなかった。ライン #3 の脳の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、正常対照マウスに比べて約 20% であり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ KO マウスの約 8 倍高かった。また、ライン #3 の肝臓と腎臓の酵素活性は、KO マウスと比較して、それぞれ約 1.6 倍、約 1.8 倍に増加していた。

### D. 考察

新規の  $G_{M1}$  ガングリオシドーシスモデルマウスとして、昨年度までに樹立したヒト変異型  $\beta$ -ガラクトシダーゼ R457Q のみを発現するマウス 2 ライン（#2、#3）の病態解析が進み、ライン #2 は挙尾、歩行異常、四肢麻痺などを呈することが判明し、神経症状を示す有用なモデル動物と考えられた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼを完全に欠損するノックアウトマウスと比較して、発症時期は 5～6 か月令とやや遅い傾向（ノックアウトの発



症時期：4～5か月令）が見られるが、重度の神経症状を呈して10か月令程度で死亡する点は、ノックアウトマウスとほぼ同様である。一方、R457Q#3ラインは、18か月令までの観察で発症は認められなかった。このマウスの脳のβ-ガラクトシダーゼ活性は正常マウスの約20%もあることから、R457Q変異β-ガラクトシダーゼが過剰に発現することで、ノックアウトマウスの正常化がもたらされたと考えられた。R457Q#2ラインについては、変異酵素の発現量が#3ラインほど多くないために、発症すると考えられた。従って、#2ラインは変異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の評価系として、臨床症状の改善を指標とできることから、非常に有用な治療実験用のモデル動物となることが期待される。

## E. 結論

遺伝子改変による新規のGM1ガングリオシドーシスモデルマウスとして、β-ガラクトシダーゼノックアウトマウスの遺伝的背景にヒト変異型β-ガラクトシダーゼR457Q遺伝子を持ち、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、病態解析を行ったところ、このうち1ラインが神経症状を呈する発症モデルであることが判明した。このマウスはケミカルシャペロン療法の治療実験のための新規発症モデル動物として期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J: Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp Anim.* in press. 2011.
2. Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S: Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human α-1.4-galactosyl-transferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem* 149: 161-170. 2011.

## 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.	Molecular basis of neurogenetic diseases	Brain Dev	in press		2011
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	32	805-809	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
Luan Z. Higaki K. Aguilar-Moncayo M. Li L. Ninomiya H. Nanba E. Ohno K. García-Moreno MI. Ortiz Mellet C. García Fernández JM. Suzuki Y.	A Fluorescent sp <sup>2</sup> -iminosugar with pharmacological chaperone activity for gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies	ChemBioChem	11	2453-2464	2010
Jo H. Yugi K. Ogawa S. Suzuki Y. Sakakibara Y.	Molecular basis of chemical chaperone effects of N-octyl- $\beta$ -valienamine on human $\beta$ -glucosidase in low/neutral pH conditions	J Proteomics Bioinform	3	104-112	2010
Li L. Higaki K. Ninomiya H. Luan Z. Iida M. Ogawa S. Suzuki Y. Ohno K. Nanba E.	Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of $\beta$ -galactosidase mutations	Mol Genet Metab	101	364-369	2010

Shiozuka C. Taguchi A. Matsuda J. Noguchi Y. Kunieda T. Uchio-Yamada K. Yoshioka H. Hamanaka R. Yano S. Yokoyama S. Mannen K. Kulkarni AB. Furukawa K. Ishii S.	Increased globo- triaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human $\alpha$ 1.4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease	J Biochem	149	161-170	2011
---	---	-----------	-----	---------	------

## 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. Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. EU (UK, Germany, France) 02762961.7 (Sept 2, 2002).
5. Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. Australia 2002328402 (Sept 2, 2002)
6. Ogawa S. Suzuki Y: Amine derivatives of carbasugars. USA 10/793.857 (Sept 2, 2002): *pending*.
7. Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. USA 12/490.737 (Sept 2, 2002): *pending*.
8. Ogawa S. Suzuki Y: Amine derivatives of carbasugars. Canada 2459887 (Sept 2, 2002): *pending*.
9. Ogawa S. Suzuki Y. Nanba E. Matsuda J. Ohno K: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active ingredient. Canada 2459887 (Sept 2, 2002): *pending*.
10. Garcia Fernandez J. Ortiz Mellet C. Garcia Moreno MI. Aguilar Moreno M. Suzuki Y. Ohno K: Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes (Compounds enhancing mutant glycosidase activities). Spain P0200802988 (Oct 23, 2008): *pending*.
11. 久野信一、小川誠一郎、山口将憲、北雄一、友田明宏、高橋篤：新規カルバ糖前駆体とそれらの製造方法、およびそれらを用いた生理活性カルバ糖アミン誘導体の製造方法。特願 2011-17242，2011 年 1 月 28 日出願。
12. 久野信一、小川誠一郎、山口将憲、北雄一、友田明宏、高橋篤：新規カルバ糖前駆体とそれらの製造方法、およびそれらを用いた生理活性カルバ糖アミンの製造方法。特願 2011-17243，2011 年 1 月 28 日出願。