

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

ALD におけるミスセンス ABCD1 をターゲットとした治療薬の開発ならびに新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症（ライソゾーム蓄積症）の分子病態解析

分担研究者：今中 常雄（富山大学大学院医学薬学研究部 教授）

研究要旨

副腎白質ジストロフィー（ALD）は、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異により起こる X 連鎖劣性遺伝子疾患である。ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA のペルオキシソームへの輸送に関与し、その異常による極長鎖脂肪酸蓄積は、ALD の原因となると考えられている。また ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 のうち、約 70% が細胞内で分解される。そこで本研究では、ABCD1 の機能改善を目指した創薬研究のため、まず ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA 輸送の分子機構を解析した。また変異 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞を用いたスクリーニングにより、変異型 ABCD1 を安定化する数種の有効化合物を見出した。さらに、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療のための予備実験を行った。一方、*ABCD4* と *LMBRD1* 遺伝子異常による新規ビタミン B₁₂ 欠乏症（ビタミン B₁₂ のライソゾーム蓄積症）に関しては、*LMBRD1* 遺伝子にコードされる LMBD1 が ABCD4 と複合体を形成し、ABCD4 を小胞体からライソゾームへ輸送するキャリアタンパク質として機能することを見出した。よって ABCD4 もしくは LMBD1 の変異により共通したフェノタイプが起こる理由が明らかになった。

研究協力者氏名

守田雅志：富山大学大学院医学薬学研究部・
准教授

川口甲介：富山大学大学院医学薬学研究部・
助教

A．研究目的

ABCD1 の機能解析

ABCD1 は極長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与すると考えられているが、その輸送機構の詳細は不明である。ABCD1 の基質輸送機構を理解

することは、ABCD1 の機能を改善する治療薬開発のために重要である。最近、植物ペルオキシソーム膜に局在する ABCD1 ホモログ CTS が極長鎖脂肪酸 CoA を加水分解し、遊離した極長鎖脂肪酸を輸送する可能性が示唆された。そこで本研究では、ヒト ABCD1 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に安定発現させ、ABCD1 の基質輸送機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

副腎白質ジストロフィー (ALD) 患者で見出されているミスセンス変異 ABCD1 の約 70% が細胞内で分解される。Zhang らは、ALD 患者由来線維芽細胞を 30 で培養することにより、いくつかの変異型 ABCD1 で機能が回復することを報告している。よって、ミスセンス変異 ABCD1 タンパク質を安定化し、正常にペルオキシソームに局在化する化合物は治療薬候補として有用である。そこで、昨年度までに構築した変異型 ABCD1-GFP 発現 CHO 細胞を用い、ミスセンス変異 ABCD1 の機能を回復させる化合物を探索することを目的とした。さらに、ALD では発病前 (発病初期) での骨髄移植が神経症状の抑制に効果があることが、そのメカニズムは分かっていない。そこで、組換えレンチウイルスベクターを作製し、マウス造血幹細胞への感染、及び骨髄移植について検討することにより、造血幹細胞移植による遺伝子治療の有効性明らかにすることを目的とした。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

ビタミン B₁₂ はエンドサイトーシスによってライソゾームに取り込まれた後、細胞質中へと排出され、補酵素型に変換され機能している。最近、ABC トランスポーター ABCD4 とライソゾーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子変異により、ライソゾームから細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送が障害されることが報告された。本研究では、ライソゾームからのビタミン B₁₂ 輸送異常の分子機構を理解するため、ABCD4 のライソゾームへの局在化における LMBD1 の協調的な役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ABCD1 の機能解析

メタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用い、ABCD1 の N 末端に His タグ付加した融合タンパク質をメタノールで強力に誘導されるアルコールオキシダーゼプロモーター支配下で発現する株を作製した。ABCD1 の細胞内局在性は、ナイコデント密度勾配遠心法により解析した。ATPase 活性はリン酸モリブデン法、acyl-CoA thioesterase 活性はエルマン法を用いて測定した。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ALD 患者で報告されているミスセンス変異 ABCD1 (R518Q、A616T など) の C 末端に GFP を融合した変異 ABCD1-GFP を安定発現する CHO 細胞を 96 well プレートで培養した。そこに既存薬 1948 種類、天然化合物 341 種類、脂質 62 種類 (東京大学創薬オープンイノベーションセンターより供与) を最終濃度 20 μ M になるように加えた。2 日間培養後、細胞の蛍光強度を測定した。変異 ABCD1-GFP の発現及び細胞内局在性は、イムノプロット法及び蛍光抗体法により確認した。

骨髄移植に関しては、野生型マウスの頸骨から骨髄細胞を採取し、9Gy の放射線照射で骨髄破壊したレシピエントの ABCD1 欠損マウスの眼窩静脈叢に注入した。5 ヶ月後、脳における ABCD1 タンパク質の発現や遺伝子発現をイムノプロット法や RT-PCR 法により解析した。造血幹細胞 (lineage 陰性, c-kit 陽性) は、マウス骨髄細胞を MACS で未分化細胞を分離した後、FACS を用いて調製した。調製し

た造血幹細胞に ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させた後、放射線照射処置を施したマウスの眼窩静脈叢に注入することで移植した。レンチウイルスベクターは東京慈恵会医科大学の小林博士より供与して頂いたものを使用した。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 と LMBD1 の C 末端に HA タグ、GFP をそれぞれ付加した融合タンパク質 ABCD4-HA、LMBD1-GFP の発現ベクターを作製した。ABCD4-HA 発現ベクターをヒト肝癌 HuH7 細胞にトランスフェクトし、ABCD4-HA の安定発現細胞を取得した。発現した ABCD4-HA、LMBD1-GFP の細胞内局在性は免疫染色法で解析した。さらに LMBD1-GFP ならびに ABCD4 の各種変異体発現ベクターを作製した。LMBD1 の ABCD4 の局在化への影響は、野生型 ABCD4 と変異型 LMBD1 を共発現させることにより解析した。ABCD4 と LMBD1 の相互作用は抗 HA 抗体を用いた pull down 法で解析した。

(倫理面での配慮)

ALD 患者線維芽細胞は、提供者が子供のため、両親の同意を得て採取したものを使用した。

C . 研究結果

ABCD1 の機能解析

His 抗体を用いたウエスタン解析、蛍光顕微鏡観察、細胞分画により、*P. pastoris* において全長 ABCD1 が発現し、ペルオキシソームに局在化していることが示された。His-ABCD1 発現株のペルオキシソーム画分では、非発現株

と比較し有意な ATPase 活性の増加が認められた。ATPase 活性は脂肪酸ならびに脂肪酸 CoA 添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大した。His-

ABCD1 を発現したペルオキシソーム画分に palmitoyl CoA を加えると、遊離した SH 基を検出できたことから、ABCD1 が ATPase 活性に加え acyl-CoA thioesterase 活性を有することが示された。また、acyl-CoA thioesterase 活性は高濃度の ATP により抑制された。さらに、149 番目のセリンをアラニンに置換した変異型 ABCD1 は、活性を失うことを明らかにした。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞ではプロテアソーム阻害剤(MG132)処理や 30 °C での培養により、ABCD1-GFP の回復が認められた。また同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞でも低温培養により内因性 ABCD1 の回復が認められた。そこで、変異 ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞を用いて蛍光強度の増加を指標した化合物スクリーニングを行った。その結果、野生型 ABCD1-GFP を発現する CHO 細胞に比べて 50%以上の蛍光強度を示す 22 種類の化合物を見出した。次にこれらの化合物について蛍光抗体法により解析を行った結果、既存薬ではアントラサイクリン系抗生物質とボルテゾミブを含む 5 種類の化合物で、天然化合物では 3 種類の化合物で、変異 ABCD1-GFP の回復とペルオキシソームへの局在化が確認された。さらに同じ変異をもつ患者由来線維芽細胞において、内因性の変異 ABCD1 タンパク質の回復を蛍光抗体法で解

析した結果、既存薬で 2 種類 (ボルテゾミブを含む)、天然化合物で 2 種類の有効化合物を見出した。

造血幹細胞移植実験では、野生型マウスの骨髄細胞を放射線照射した ABCD1 欠損マウスに移植した。5 ヶ月後、脳からペルオキシソーム画分を調製し、ABCD1 タンパク質の発現解析を行った結果、ABCD1 欠損マウスの脳に ABCD1 が発現していることが確認された。一方、ABCD1 欠損マウスの骨髄細胞から、FACS により造血幹細胞を高い純度で回収することができた。この造血幹細胞にヒト ABCD1 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ、ABCD1 の発現を確認した。現在、ABCD1 発現造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植し、飼育している。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

一過性に発現させた ABCD4-HA は小胞体に、LMBD1-GFP はリソソームに局在していた。一方、ABCD4-HA を安定過剰発現させた HuH7 細胞に LMBD1-GFP を共発現させたところ、ABCD4-HA の局在は小胞体からライソゾームへと変化し、LMBD1-GFP と共局在していた。また、両タンパク質が複合体を形成することも確認した。

ABCD4 の 6 個の膜貫通領域のうち、N 末端側の 2 個の膜貫通領域を欠損した変異型 ABCD4-HA は、LMBD1-GFP と共発現させてもライソゾームには移行しなかった。一方、LMBD1 の 11 個の膜貫通領域のうちの 6 番目以降を欠損した変異型 LMBD1-GFP を ABCD4 と共発現させると、ABCD4 と変異型

LMBD1-GFP は共局在していたが、ライソゾーム上には局在しなかった。

D . 考察

ABCD1 の機能解析

P. pastoris に ABCD1 を活性型酵素として発現させることに成功した。ABCD1 の ATPase 活性は脂肪酸添加により促進され、炭素数の増加により効果が増大したことから、より長鎖の脂肪酸に高い親和性を持つことが示唆された。さらに、CoA 体への親和性の方が高いと示唆された。ABCD1 のもつ acyl-CoA thioesterase 活性は、149 番目の Ser を Ala にさせることにより失活した。ALD 患者においても同様の変異が報告されているので、ABCD1 の acyl-CoA thioesterase 活性は、基質輸送に必須と考えられる。ABCD1 は極長鎖脂肪酸を認識し、CoA を加水分解により分離し、極長鎖脂肪酸を輸送している可能性が高い。また acyl-CoA thioesterase 活性と ATP 加水分解が協調して極長鎖脂肪酸を輸送していると推測される。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

今回見出した既存薬ボルテゾミブは、多発性骨髄腫の治療薬として認可されている。今後、機能回復に必要な濃度と細胞毒性について検討する予定である。もう一つの既存薬は細胞毒性が低く、脳代謝改善薬として用いられていた薬物であり、血液脳関門を通過する。これらの既存薬は、ALD の候補治療薬になる可能性が考えられる。一方、天然化合物で効果のあった 2 種類は類似構造をもっており、治療薬のシーズ化合物になると考えられる。今後さらに多く

の天然化合物をスクリーニングすることにより、リード化合物を見出す予定である。

骨髄移植により骨髄由来の細胞が脳や脊髄に生着していることが確認された。また、組換えレンチウイルスベクターにより造血幹細胞にヒト ABCD1 を発現させ ABCD1 欠損マウスに移植することができた。現在、順調に飼育されている。今後、移植 5~6 ヶ月後の組織を調製し、生着細胞とその分布について組織化学染色により検討する予定である。本疾患に対する造血幹細胞移植の神経症状抑制のメカニズム解明は、発症機構及び治療戦略を考える上で重要である。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 は単独で過剰発現させると、小胞体に局在したが、LMBD1 との共発現でライソゾームへ移行した。LMBD1 は単独でもライソゾームに局在することから、LMBD1 は ABCD4 をライソゾームへと移行させるキャリアタンパク質としての機能を持つことが示唆された。変異体を用いた解析から、両者の複合体形成には、ABCD4 の N 末端側の 2 つの膜貫通領域、LMBD1 の N 末端側の 5 つの膜貫通領域に重要な部位が存在する可能性が示唆された。さらに、LMBD1 の 6 番目の膜貫通領域以降にライソゾームへの移行シグナルが含まれていることも示唆された。今回、それぞれの変異により同様のフェノタイプが現れる理由が理解できた。今後、我が国においても重篤なビタミン B₁₂ 欠乏症患者から、患者を同定し治療法を確立する必要がある。

E . 結論

ABCD1 の機能解析

ヒト ABCD1 が ATPase 活性とともに acyl-CoA thioesterase 活性を有していることを明らかにした。また、acyl-CoA thioesterase 活性には 149 番目の Ser が活性中心であることも明らかにした。ABCD1 の基質輸送における thioesterase 活性の意義とともに、基質輸送メカニズムを解明することが可能になった。

変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1 の安定化に有効な既存薬 2 種類及び天然化合物 2 種類を見いだした。既存薬については今後、治療薬としての有効性を検証する。天然化合物については、さらに多くの化合物をスクリーニングし、治療薬のリード化合物を見出す。一方、ヒト ABCD1 を発現した造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植した。今後、脳や脊髄での ABCD1 タンパク質の分布や脂肪酸含量への効果について検討する予定である。

新規遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症(ライソゾーム蓄積症)の解析

ABCD4 は単独ではライソゾームへと局在しないことから、ABCD4 がビタミン B₁₂ の輸送体として機能し、LMBD1 が ABCD4 のライソゾームへの移行を補助するキャリアタンパク質として機能すると考えられる。我々は、メタノール資化性酵母を用いたヒト ABCD4 の発現と精製に成功しているため、今後、リポソームに精製 ABCD4 を組み込んだプロテオリポソームを構築することにより、ABCD4 のビタミン B₁₂ 輸送機能が明らかになると考えて

いる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Morita M, Kobayashi J, Yamazaki K, *et al.*: A novel double mutation in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. **J Inherit Metab Dis Rep** 10: 95-102, 2013
- 2) Hama K, Nagai T, Nishizawa C, *et al.*: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. **Lipids** 48: 1253-1267, 2013

2 . 学会発表

- 1) 有村洸平, 守田雅志, Kostsin DG, 山崎こず枝, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーの治療薬開発: ABCD1 タンパク質の安定化を指標としたスクリーニング系の構築患 . 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム . 東京, 2013. 6
- 2) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 第 86 回日本生化学会大会 . 横浜, 2013. 9
- 3) Kostsin DG, Morita M, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Establishment and application of fluorescence-based assay for screening of chemical compounds that stabilize

mutant ABCD1 protein responsible for adrenoleukodystrophy. 第 86 回日本生化学会大会 . 横浜, 2013. 9

- 4) 池島俊季*, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現と機能解析 . 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム . 東京, 2013. 9
- 5) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化機構の解析 . 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 . 金沢, 2013. 11
- 6) 松本隼, 守田雅志, 渡邊康春, 長井良憲, 小林博司, 高津聖志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植 . 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 . 金沢, 2013. 11
- 7) 高崎満喜子, 渡邊雄一, 深澤力也, 川口甲介, 守田雅志, 大熊芳明, 今中常雄: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索 . 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 . 金沢, 2013.11
- 8) 兵藤沙織, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: リソソーム膜タンパク質 LMBD1 の異種発現系の構築 . 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 . 金沢, 2013. 11
- 9) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化における LMBD1 の役割 . 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム . 東京, 2013. 11

- 10) Morita M, Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimosawa N, Imanaka T: Screening of chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 11) Yokoyama K, Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Nakanishi, H, Imanaka, T, Shimosawa N, Taguchi R, and Inoue K, Inoue K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013.
- 12) Okamoto T, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T: Subcellular localization of ABC transporter ABCD4 is regulated by LMBD1. 第 36 回日本分子生物学会年会 . 神戸 , 2013, 12

G . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許登録
- 2 . 実用新案登録
- 3 . その他
なし