

クラッペ病のシャペロン療法の開発

分担研究者：酒井 規夫（大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座）

研究要旨

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、遺伝性白質ジストロフィーとして治療法は早期の造血細胞移植しかなく、現実には治療の適応がない症例も多い。我々はクラッペ病の病態解明を行なってきており、その分子生物学的解析を応用して、シャペロン療法の有効性について解析したので報告する。

A. 研究目的

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、進行性の脱髄疾患である。唯一の治療法が遅発型に対する造血幹細胞移植であるが、治療のリスクもあり、神経症状のごく早期に施行しないと有効性は少なく、多くの患者さんに適応できないものである。我々は同じ ガラクトシダーゼ欠損症である GM1 ガングリオシドーシスに有効であることが証明された NOEV(N-octyl-4-epi-β-valienamine) の有効性を解析し、シャペロン療法の可能性をさぐることを目的とした。

B. 研究方法

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；正常酵素の発現系における酵素溶液に対する NOEV の濃度依存性の効果をしらべた。

2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；一過性発現系を pSVL に組み込んだ正常と各種変異酵素 cDNA の発現ベクターを構成し、COSI 細胞に発現させた。その酵素を含む細胞抽出液を用いて、48 度の熱処理を 0-15 分行ない、NOEV の濃度をふ

ってその酵素活性に与える影響を調べた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用いた *in vivo* での NOEV の効果；正常と各種変異の発現ベクターを COSI 細胞に導入し、その後培養液に 0-20 μM の NOEV を添加して、5 日後の酵素活性を解析した。そして、それぞれのサンプルの Western blot を行ない、ガラクトセレブロシダーゼの解析を行ない、前駆体と成熟蛋白の量を解析した。

C. 研究結果

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白の酵素を阻害し、有効な酵素阻害剤であることが証明された。

2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白も変異タンパク質も濃度依存性に熱安定性を向上させた。その効果は正常蛋白に最も強く、次に遅発型の変異、乳児型変異にはやや弱い効果が得られた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用

いた *in vivo* での NOEV の効果；酵素活性に対する効果としては乳児型の変異に対してはその有効性は明らかでなかったが、遅発型の変異 4 つに対してはいずれも有効性が見られ、2 μ M で最大の効果を認めた。(図 1)

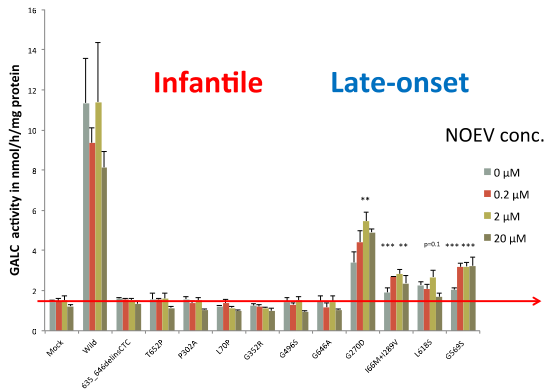


図 1

また、Western blot からは前駆体の量は変異にあまり関係ないが、ライソゾームに運搬されたあとにプロセスされて成熟すると言われている成熟タンパク質の量は、正常蛋白、遅発型変異に多く、乳児型蛋白は成熟蛋白をほとんど認めないことが判明した。(図 2)

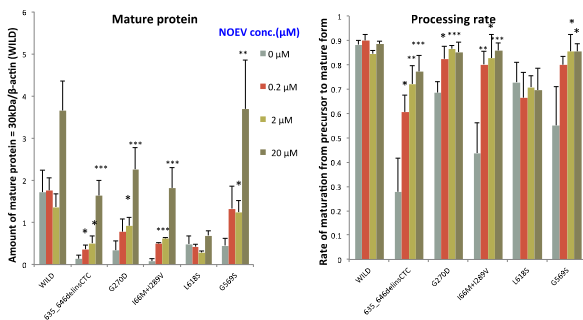


図 2 n

00

D. 考察

G_{M1} ガングリオシドーシスに有効性の証明されたケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの阻害効果も認め、その熱安定性を増大させることがわかった。*in vivo* で変異酵素の酵素活性の増大は、

遅発型の変異で明らかであり、重症な乳児型には効果は弱いと考えられた。

そして、活性の上昇する変異は成熟蛋白の増加が認められており、NOEV により ER からライソゾームへの運搬が高率良く行なわれていることが判明した。

E. 結論

ケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの高頻度の遅発型変異 4 つに対し、そのライソゾームへの運搬効率を上昇し、成熟タンパク量を増やすことによって治療効果が想定される。今後、モデル動物においてその有効性を確認したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M., An adult patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism., **Brain Dev.** 35(5):462-5, 2013
- 2) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shirota Y, Hanajima R, Terao Y, Matsumoto H, Hossain MA, Sakai N, Shiio Y., Isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease with novel mutations in the GALC gene., **Brain Dev.** 35(6):579-81, 2013
- 3) Chang B, Gorbea C, Lezin G, Li L, Shan L, Sakai N, Kogaki S, Otomo T, Okinaga T, Hamaoka A, Yu X, Hata Y, Nishida N, Yost HJ, Bowles NE, Brunelli L, Ichida F., 14-3-3ε Gene variants in a Japanese patient with left ventricular noncompaction and hypoplasia of the

- corpus callosum., **Gene**. 515(1):173-80, 2013
- 4) Kardas F, Uzak AS, Hossain A, Sakai N, Canpolat M, Yikilmaz A., A novel homozygous GALC mutation: Very early onset and rapidly progressive Krabbe disease., **Gene**. 517(1):125-7, 2013
 - 5) Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, Shinpo M, Azuma J, Tominaga K, Shimojima K, Ozono K, Osawa M, Yamamoto T., Microdeletions of 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement., **Am J Med Genet A**. 2013 Dec;161(12):3049-56.
 - 6) Hossain MA, Otomo T, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Hamada Y, Ozono K, Sakai N, Late-onset Krabbe disease is predominant in Japan and its mutant precursor protein undergoes more effective processing than the infantile-onset form., **Gene**. 2013 Nov 16. doi:pil: S0378-1119(13)01515-1. 10.1016/j.gene.2013.11.003.
- ## 2. 学会発表
- 1) 酒井規夫、神経遺伝病治療戦略セミナー、ニーマン・ピック病 C 型の診断と治療、第 55 回日本小児神経学会学術集会、2013.5
 - 2) Norio Sakai, Potential effects and obstacles for NBS of metabolic leukodystrophy, including adrenoleukodystrophy, Krabbe and metachromatic leukodystrophy, Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, 2013.5
 - 3) 新寶 理子、青天目 信、近藤 秀仁、 Mohammad Arif Hossain、濱田 悠介、酒井 規夫、大園 恵一、当科で診断した GM2 ガングリオシドーシス症例の検討、第 9 回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
 - 4) Mohammad Arif Hossain, Michiko Shinpo, Keiichi Ozono, Norio Sakai, Molecular and biochemical diagnosis for three Japanese patients of galactosialidosis, 第 9 回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
 - 5) 佐藤友紀、金川武司、酒井規夫、望月秀樹、大阪大学医学部附属病院における羊水染色体検査の現状報告、第 37 回日本遺伝カウンセリング学会、2013.6
 - 6) 酒井規夫、ファブリー病の診療；今患者がもとめるもの、神奈川酵素補充療法研究会、2013.7
 - 7) 酒井規夫、ムコ多糖症と遺伝カウンセリング、第 1 回ムコ多糖症フォーラム、2013.7
 - 8) Hossain MA¹, Higaki K², Nanba E², Suzuki Y³, Ozono K¹, Sakai N、CHAPERONE THERAPY FOR KRABBE DISEASE; JAPANESE LATE-ONSET MUTATIONS CAN BE TREATED EFFECTIVELY BY NOEV、ICIEM2013.9
 - 9) Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo¹, Mohammad Arif Hossain¹, Yusuke Hamada¹, Norio Sakai¹, Yoshihiro Asano², Takeshi Masaki², Tadayasu Togawa³, Keichi Ozono, A case report of Fabry disease with chronic heart failure treated with amiodarone, ACIMD2013.11
 - 10) Mohammad Arif Hossain¹, Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, NOEV treatment option for Japanese Krabbe disease, ACIMD2013.11
 - 11) Mohammad Arif Hossain¹, Michiko Shinpo¹ Katsumi Higaki², Eiji Nanba², Yoshiyuki Suzuki³, Keiichi Ozono¹, Norio

Sakai¹ , NOEV can stabilize β -galactosidase in galactosialidosis patients' skin fibroblasts effectively and cause normalization of its activity, ACIMD2013.11

- 12) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Kouji Tominaga, Shin Nabatame, Takeshi Okinaga, Yoshiko Hashii, Norio Sakai, Keichi Ozono, Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for three patients with metachromatic leukodystrophy , ACIMD2013.11
- 13) Yusuke Hamada¹, Hidehito Kondo¹, Michiko Shinpo ¹, Yoshiro Wada² , Norio Sakai¹, Yutaka Sumida², Kiichi Ozono¹, Different clinical course of propionic acidemia in two siblings, ACIMD2013.11
- 14) Motohiro Akagi¹, ², Mohammad Arif Hossain¹, Keiichi Ozono¹, Norio Sakai¹, Yoshinori Okumura³, Clinicogenetical features of a Japanese patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA), ACIMD2013.11
- 15) N. Sakai¹, X.F. Gu², H. Ida³ on behalf of the EDGE investigators, O. Kawaguchi⁴, Y. Xue⁵, A phase 3 study evaluating once versus twice daily dosing of eliglustat in patients with Gaucher disease type 1 (GD1): Interim results from the lead in period, ACIMD2013.11
- 16) Akemi Tanaka¹, Takashi Hamazaki¹, Motomichi Kosuga². Torayuki Okuyama², Yasuyuki Suzuki³, Norio Sakai⁴, Tomo Sawada¹, Hiromasa Yabe⁵, Mika Ishige⁶, Hideo Mugishima⁶, Shunichi Kato⁵, Efficacy of hematopoietic stem cell

transplantation versus enzyme replacement therapy on intelligence in the patients with Mucopolysaccharidosis type II, ACIMD2013.11

G . 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

特願 2011-101560 (発明の名称 : リソソーム病治療用医薬組成物) として 2011 年 4 月 28 日に出願