

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390140

研究課題名(和文) タンパク質間相互作用部位をターゲットとした新規バイオ医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of neo-biologics targeted on protein-protein interaction sites

研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00184656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム内で複合体を形成するヒト・カテプシンA (CathA) とノイラミニダーゼ1 (NEU1) の遺伝的欠損症に対し、両者の相互作用部位をターゲットとする新規治療薬開発を目指して研究を進め、活性型CathAを大量発現するトランスジェニック (Tg) カイコの作製、その中部絹糸腺からの精製及びX線結晶構造の解明に成功した。また細胞膜透過性ペプチド (R8) とのコンジュゲートは、CathA欠損症患者線維芽細胞内のリソソームへの補充効果を示し、蓄積シアル酸含有糖鎖を減少させた。さらにNEU1と相同性を示す細胞質性NEU2に対し、SiastatinBが酸性pH条件下で熱安定化効果を示した。

研究成果の概要(英文)：To develop novel therapeutics for human deficiencies (lysosomal storage diseases) of lysosomal cathepsin A (CathA) and neuraminidase-1 (NEU1) based on protein-protein interaction between CathA and NEU1, we produced transgenic (Tg) silkworm strains overexpressing human CathA and NEU1 in middle silk glands, and succeeded in purification and elucidation of X-ray crystal structure of the enzymatically active CathA. The conjugates of active CathA purified from Tg silk glands and cell-penetrating peptides (R8) had replacement effects on cultured fibroblasts derived from patients with CathA deficiency (Galactosialidosis) to reduce the accumulated sialyloligosaccharides. In addition, siastatin B was found to have stabilizing effects like a chaperone compound on recombinant human cytosolic NEU2 with structural similarity to NEU1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：リソソーム酵素 酵素補充療法 ケミカルシャペロン 疾患特異的iPS細胞 酵素増強薬 リソソーム病 in silicoデザイン トランスジェニックカイコ

1. 研究開始当初の背景

リソソーム性保護タンパク質/カテプシン A (CathA) は、それ自体が酸性セリンカルボキシペプチダーゼや中性デアミダーゼ等の触媒活性を示すとともに、リソソーム内で糖鎖分解に関わるノイラミニダーゼ 1 (NEU1) 及び β -ガラクトシダーゼ (GLB1) と多酵素複合体を構成し、NEU1 の活性化や GLB1 のリソソーム内プロテアーゼによる分解からの保護作用を示す。ヒト CathA をコードする CTSA 遺伝子の劣性変異が原因で、CathA 活性のみならず、二次的に NEU1 活性の著しい低下と GLB1 活性の部分欠損、及び末端シアル酸含有糖鎖の患者組織内での過剰蓄積と中枢神経症状を含む全身症状を伴う遺伝性リソソーム病 (ガラクトシアリドーシス, Galactosialidosis, GS) が発症する。従来、GS に対して有効な根本治療薬はない。しかし近年、 β -ガラクトシダーゼ (GLA) 欠損症であるファブリー病など、末梢症状を主症状とする一部のリソソーム病 (6 種) に対し、哺乳類培養細胞株で生産する組換えヒト酵素製剤を定期的に静脈内投与する酵素補充療法が臨床応用されている。また、中枢症状を示すリソソーム病に対し、血液脳関門を透過できない酵素製剤の脳脊髄液内への投与や、酵素分子のフォールディング異常を基質アナログ (低分子化合物) により是正する薬理的シャペロン療法などの治験が進行中である。そこで本研究では、CathA と NEU1 の同時欠損症である GS に対する新規の酵素補充療法や酵素増強薬の開発を目指し研究を進めることとした。

2. 研究成果の目的

(1) 現在の酵素補充治療薬は、ヒト正常酵素遺伝子を導入した哺乳類細胞であるチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞やヒト繊維肉腫細胞 HT1080 株を用いて製造している。しかし哺乳類細胞株の高密度培養は困難で大規模プラントが必要となり、製造コストも高価になる。またヒト感染性病原体の汚染の危険性もある。一方、絹糸の効率的な生産能力をもつカイコの絹糸腺は、高分子量外来タンパクの大量生産に適している。またこれまでにヒト感染性病原体の報告がないカイコは、ヒト抗体医薬品原薬の新規生産基材としても注目されている。本研究では、(独)農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニットの小林らとの共同で、組換えヒト CathA 及び NEU1 を大量発現するトラスジェニック (Tg) カイコの作製を目的とした。

(2) 異種生物であるカイコ絹糸腺で発現するヒトリソソーム酵素では、糖鎖付加などの翻訳後修飾が異なる可能性があるため、組換え酵素の精製法を確立するとともに、糖鎖構造などの分子特性の評価を行う。また患者に対する有効性・安全性、特に神経系に対する評価を行うため、患者由来皮膚線維芽細胞から iPS 細胞株の樹立を行い、さらに神経系への分化誘導法を開発する。

(3) 結晶構造が未知の成熟型 CathA や NEU1 の構造を、徳島大学疾患酵素学研究中心の真板らとの連携で解明するとともに、(独)産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センターの広川らとの共同で、構造既知のヒト CathA 前駆体や相同性を示す細胞質性 NEU2 やその阻害剤との複合体の 3 次構造情報を基に、*in silico*

で高機能型酵素の分子デザインやケミカルシャペロンの探索を行い、新規酵素補充治療薬や酵素増強薬候補を予測し、評価する。

3. 研究の方法

(1) ヒトリソソーム酵素の大量生産基材として Tg カイコに着目し、CathA 及び NEU1 を絹糸腺で発現する Tg カイコを作製する。酵母 GAL4-UAS 遺伝子発現制御系と piggyBac ベクターを利用し、中部絹糸腺特異的セリシン 1 プロモーター下流に連結した GAL4 を導入したドライバー系統と、GAL4 の認識塩基配列である UAS の下流に連結した CTSA または NEU1cDNA を導入した各々の発現系統を樹立した。中部絹糸腺および繭中におけるヒト酵素タンパク発現を解析し、中部絹糸腺からのレクチン、疎水性及びイオン交換カラムクロマトグラフィーを用いる精製法を検討する。

(2) CathA 患者由来皮膚線維芽細胞に、センダイウイルスベクターを用い、4 種のリプログラミング因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4 及び c-MYC) を導入し、未分化マーカー (NANOG, SSEA-4 等) の発現、三胚葉系細胞への分化誘導及びテラトーマ形成を指標にする多分化能を評価した。また Neural rosette 形成を経由する神経系細胞への分化誘導系を構築し、治療薬候補の投与効果を検討する。

(3) 精製した活性型ヒト CathA の X 線結晶構造を解明する。X 線結晶構造が既知のヒト CathA 前駆体(ホモ二量体)や、NEU1 との相同性を示すヒト細胞質性 NEU2 の構造情報を基に高機能型酵素や NEU1 モデルをデザインする。また in silico スクリーニングにより NEU2/阻害剤複合体の構造から、NEU1 モデルと結合し得るシャペロン

化合物を探索する。さらに既知の NEU2 阻害剤について酸性 pH 条件下で熱安定化作用を示す化合物を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト CathA 及び NEU1 を各々中部絹糸腺で特異的に発現する Tg カイコを作製に成功した(図1)。

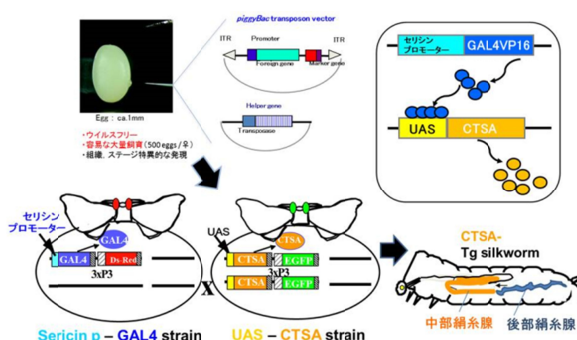


図1 中部絹糸腺でヒトCathAを高発現するTgカイコの作製

CTSA-Tg カイコの中中部絹糸腺 (1,000 頭分) の抽出液から、3 段階クロマトグラフィーにより活性型 (成熟型) ヒト CathA (16mg) の精製と X 線結晶構造の解明に成功した。なお、繭から活性型 CathA の抽出は困難であった。一方、ヒト NEU1-Tg カイコでは NEU1 は不活性な凝集体として検出された。精製した成熟型 30/20-kDaCathA を構成する各サブユニットには、パウチマンノース型及び高マンノース型の異なる N 型糖鎖が付加されていること、また昆虫特有の 2-3 フコース残基は含まれないことが明らか

にした。しかし患者組織内への取り込みに必要な末端マンノース-6-リン酸 (M6P) 残基は含まれなかった。そこで細胞膜透過性ペプチド (R8) とのコンジュゲートを作製し、患者由来培養皮膚線維芽細胞に投与したところ、細胞内に取り込まれリソソームまで輸送され、CathA 活性を回復させるとともに、蓄積する末端シアル酸残基含有糖

鎖を減少させる有効性を示した。

(2) センダイウイルスベクターを用い4種の山中因子を CathA 欠損症患者由来皮膚線維芽細胞に導入し、未分化マーカーとしての内因性の OCT3/4, SOX2, KLF4, NANOG, c-MYC 及び SSEA4 を恒常発現し、また3胚葉系細胞への分化能、SCID マウス精巣内移植によりテラトマ形成能をもつ患者由来 iPS 細胞株の樹立に成功した(図2)。

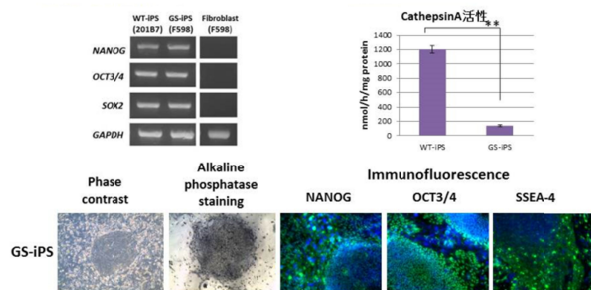


図2 CathA欠損症患者皮膚線維芽細胞からのiPS細胞株の樹立

また同患者 iPS 細胞から、胚葉体、Neural rosette 形成及び神経前駆細胞を経て、成熟神経細胞を誘導する分化条件を確立した。患者から臨床検体としては得られない神経系細胞に対する高機能型 CathA やシャペロン化合物の有効性・毒性を評価するために有用と考えられた。

(3) さらにシアリダーゼ阻害剤として報告されているバクテリア由来 SiastatinB が、ヒト細胞質性 NEU2 に対し酸性 pH 条件下で安定化作用を示すことを見出し、*in silico* での結合性予測を行った(図3)。

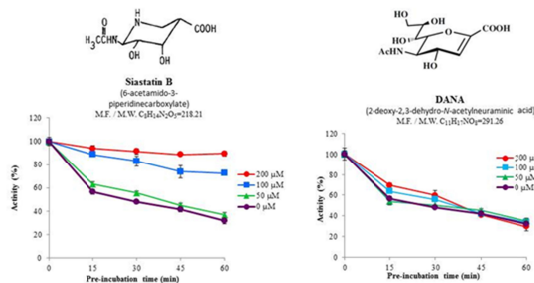


図3 酸性pH条件下でのSiastatinBによる組換えヒトNEU2の熱安定化効果

今後 NEU1 モデルに対する SiastatinB のドッキングスタディと、その誘導体の NEU1 活性に対する安定化・増強作用も検討していく。さらに哺乳類培養細胞株に発現ベクターを用いて NEU1 cDNA を導入することにより細胞内でタンパク結晶様構造が形成されることを明らかにし、その単離法を確立した。また Tg カイコ由来成熟型 CathA の共存下で NEU1 の活性化に成功した。今後、X 線自由電子ビームを用いる結晶構造解析を行い、NEU1 の3次構造と CathA との相互作用を構造生物学的に解明する。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計19件)

- M.M. Rahman, S. Kitao, D. Tsuji, K. Suzuki, K. Matsuoka, F. Matsuzawa, S. Aikawa, K. Itoh. Inhibitory effects and specificity of synthetic sialyldendrimers toward recombinant human cytosolic sialidase 2 (NEU2). *Glycobiol.*(査読有)23, 495-504 (2013). DOI: 10.1093/glycob/cws221
- K. Sato, A. Shigenaga, K. Kitakaze, K. Sakamoto, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka, Chemical synthesis of biologically active monoglycosylated GM2-activator protein analog using N-sulfanylethylanilide peptide, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有) 52, 7855-7859 (2013). DOI: 10.1002/anie.201303390
- S. Hitaoka, Y. Shibata, H. Matoba, A. Kawano, M. Harada, M.M. Rahman, D. Tsuji D, T. Hirokawa, K. Itoh, T. Yoshida, H. Chuman. Modeling of Human Neuraminidase-1 and Its Validation by LERE-Correlation

Analysis. *Chem-Bio Informatics Journal* (査読有) 13, 30-44 (2013)
DOI:10.1273/cbij.13.30

K. Matsuoka, T. Tamura, D. Tsuji, Y. Dohzono, K. Kitakaze, S. Saito, H. Sakuraba, and K. Itoh. Therapeutic potential of intracellular replacement of modified human

beta-hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis., *Mol. Ther.* (査読有) 19, 1017-1024 (2011). DOI: 10.1038/mt.2011.27.

D. Tsuji, H. Akeboshi, K. Matsuoka, H. Yasuoka, E. Miyasaki, Y. Kasahara, I. Kawashima, Y. Chiba, Y. Jigami, T. Taki, H. Sakuraba, and K. Itoh. Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann. Neurol.* (査読有) 69, 691-701 (2011). DOI: 10.1002/ana.22262.

【学会発表】(計 89 件)

K. Itoh, D. Tsuji, M. Ikuo, K. Kitakaze, S. Nishioka, I. Imataki, S. Yamaguchi, Y. Chiba, H. Sakuraba, I. Kobayashi, H. Sezutsu, H. Machii. Establishment of patient-derived iPS cells with neurodegenerative lysosomal storage diseases and application for evaluating lysosomal enzyme replacement effects on differentiated neural cells. The IUBMB 10th International Symposium on Cell Surface Macromolecules, Saha ainstitute of Nuclear, Kolkata, Kolkata(India) 2014.1.20-24. (国際・招待講演)
伊藤 孝司：ネオバイオロジクスの創製とリソソーム病治療薬開発へのアプローチ, 第 5 回全国共同利用・共同開

発「酵素学研究拠点」シンポジウム, 2013 年 11 月 23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)他

K. Itoh, D. Tsuji, S. Nishioka, S. Ikedo, T. Higashi, I. Kobayashi, H. Sezutsu, A. Ishii, K. Harazono, M. Tada, N. Kawasaki, H. Machii. Molecular properties of recombinant human lysosomal enzyme produced by transgenic silkworm and therapeutic potential for lysosomal storage disease. Gordon Research Conference (Lysosomal Diseases), Lucca, Barga(Italy) 2013.4.14(ポスター)

【図書】(計 9 件)

Tsuji, D., Itoh, K. “Molecular Therapy for Lysosomal Storage Diseases.”.. *InTech in Gene Therapy - Tools and Potential Applications, Chapter 24*, 2013, 745 (591-607)
伊藤 孝司：「ガラクトシアリドーシス」先天代謝異常ハンドブック
株式会社 中山書店 東京
456 (214-215) 2013 年 2 月 他

【産業財産権】

(出願状況 計 1 件)

名称：ベンジルアミン誘導体
発明者：辻大輔 伊藤孝司 大高章
重永章
権利者：徳島大学
種類：特許
番号：特願 2011-119668
出願年月日：2011 年 5 月 27 日
国内外の別：外国

【その他】受賞 1 件

東 哲也「リソソーム性 Neuraminidase-1
(NEU1)の in cell 結晶化」

第 54 回日本生化学会 中国・四国支部例会
学術奨励賞 (学生) 2013 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 孝司 (ITOH, Kohji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授

研究者番号 : 00184656

(2) 研究分担者

広川 貴次 (HIROKAWA, Takatsugu)

産業技術総合研究所・生命情報工学研究セ
ンター・研究チーム長

研究者番号 : 20357867