

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791089

研究課題名(和文) プロテアソーム阻害剤を用いたポンペ病の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of enzyme enhancement therapy for Pompe disease by using proteasome inhibitor

研究代表者

嶋田 洋太 (SHIMADA, YOHTA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20560824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポンペ病は酸性 グルコシダーゼ(GAA)の異常により生じる常染色体劣性遺伝病であり、進行性の筋病変を特徴とする。本研究は、プロテアソーム阻害剤がポンペ病の新規治療薬として有効であるかについて検討した。本研究の結果、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブは、既存の低分子化合物では機能が改善できない一部の変異型GAAについても効果を示すことが明らかとなった。また、本研究では新しいポンペ病モデルマウスを作出し、ボルテゾミブが同マウスの心臓におけるGAA機能の改善に寄与する可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We tried to evaluate the efficacy of enzyme enhancement therapy for Pompe disease by using proteasome inhibitor bortezomib. First, we analyzed the effect of bortezomib on several acid alpha-glucosidase (GAA) mutants in patient fibroblasts and transiently transfected cells. We found that bortezomib increases the activity of a part of chemical chaperone-unresponsive mutants as well as chemical chaperone-responsive mutants such as M519V. Next, to analyze the effect of bortezomib on animal model, we generated a novel model mouse expressing human GAA replaced methionine with valine at position 519 (M519V mice). We showed that bortezomib increases the GAA activity in heart from M519V mice, but not in skeletal muscle. These results suggest that bortezomib may be able to contribute to the improvement of GAA function in cardiac muscle in model mice.

研究分野：生化学

キーワード：ライソソーム病

1. 研究開始当初の背景

ポンペ病は酸性 グルコシダーゼ (GAA) の異常により生じる常染色体劣性遺伝病であり、進行性の筋病変を特徴とする。本邦においては 2007 年より酵素補充療法が実施されているが、治療効果が十分得られない臓器が存在することや、治療に伴い中和抗体が出現することなどの課題が明らかとなり、新たな治療法の開発が求められていた。また、酵素補充療法とは異なる原理の治療法として、低分子化合物を用いて変異 GAA タンパク質の機能を改善するケミカルシャペロン療法などの研究が進められていたが、既存のケミカルシャペロン候補物質では有効性を示す変異が限られていることが明らかとなっていた。

その一方で、我々は、プロテアソーム阻害剤が一部のポンペ病患者由来細胞における変異 GAA の活性改善に有用であることを見出していた。そこで、プロテアソーム阻害剤がポンペ病の新規治療薬となる可能性を着想し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

プロテアソーム阻害剤が一部のポンペ病患者由来細胞における GAA の機能改善に有効性を示すことを見出していたが、どのような変異に有効なのかについては明らかになっていなかった。また、プロテアソーム阻害剤をポンペ病の新規治療薬として検討する上で動物モデルを対象とした効果の解析は必須であり、原理上ミスセンス変異が検討対象となるが、ポンペ病のミスセンス変異型のモデル動物は存在していなかった。以上のことから、本研究は、(1) プロテアソーム阻害剤応答性変異の特徴付け、(2) ミスセンス変異型の新規ポンペ病モデルマウスの作成、(3) 同マウスを対象としたプロテアソーム阻害剤の有効性解析、という3点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテアソーム阻害剤応答性 GAA 変異の特徴付け

正常ヒト GAA の cDNA に対して、既存のケミカルシャペロン応答性、非応答性それぞれのミスセンス変異を inverse PCR 法を利用して導入した。その後、それぞれの変異型 GAA を HEK293T 細胞へ一過性に発現させた。ポンペ病患者由来細胞ならびに変異 GAA 発現 293T 細胞に対してプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブを投与し、GAA 活性、GAA タンパク質の性状、細胞内局在について解析を行った。

(2) ミスセンス変異型の新規ポンペ病モデルマウスの作成

M519V 変異を導入したヒト GAA cDNA を含むトランスジーン (hGAA-M519V) を C57BL/6 系統由来の受精卵へとインジェクションし、変

異型 GAA を発現するトランスジェニックマウスを作成した。その後、トランスジェニックマウスと GAA 欠損マウスを交配し、M519V 変異を導入したヒト GAA を発現する GAA 欠損マウス (hGAA-M519V マウス) を作成した。hGAA-M519V マウスにおける GAA の性状ならびにグリコーゲンの蓄積について解析した。

(3) ミスセンス変異型ポンペ病モデルマウスに対するプロテアソーム阻害剤の有効性解析

hGAA-M519V マウスへとボルテゾミブを投与し、心臓ならびに骨格筋における GAA への効果について解析した。

4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害剤応答性 GAA 変異の特徴付け

各種のミスセンス変異を導入した GAA を一過性に発現する細胞にボルテゾミブを投与した結果、既存のケミカルシャペロン応答性変異である M519V 変異などに加えて、ケミカルシャペロン非応答性として知られる C647W 変異についても GAA 活性の上昇が認められた。その一方で、同じくケミカルシャペロン非応答性変異である S619R 変異では GAA 活性の改善は認められなかった。一過性発現細胞と同様の結果は、同じ変異を有するポンペ病患者由来の細胞でも認められ、ボルテゾミブ応答性を示した細胞では成熟型 GAA の増加が検出されると共に、ライソゾームのマーカータンパク質である LAMP2 と GAA との共局在の増加が認められ、局在性の改善も確認された。これらの結果は、既存のケミカルシャペロンでは有効性が得られなかった変異についてもボルテゾミブは有効性を持つ可能性を示唆する。また、M519V 変異などでは比較的高い残存 GAA 活性が認められた一方で、C647W 変異では残存活性は低かったことから、ボルテゾミブは残存活性が低い変異 GAA にも有効性を示し得ることが明らかとなった。一方、ボルテゾミブが有効性を示さなかった S619R 変異については、アミノ酸置換により GAA の活性中心付近に大きな構造変化を引き起こすことが示唆されていることから、ボルテゾミブは大きな構造変化を伴うミスセンス変異には有効ではないことが推定された。

(2) ミスセンス変異型の新規ポンペ病モデルマウスの作成

hGAA-M519V を C57BL/6 系統由来の受精卵へとインジェクションした結果、4 系統のトランスジェニックマウスが得られた。これらのマウスのうち、3 系統で適切な hGAA-M519V の挿入が確認された。これらのトランスジェニックマウスを GAA 欠損マウスへと戻し交配を行い作成した hGAA-M519V マウスについて解析を行った結果、ポンペ病の主要病変部位である心臓ならびに骨格筋において未成熟な GAA タンパク質及びごく僅かな成熟型タンパ

ク質の発現が確認された。さらに、hGAA-M519V マウスの心臓及び骨格筋では、非常に低い GAA 活性が認められると共に、PAS 染色陽性のグリコーゲン顆粒の蓄積が顕著に認められた。また、ポンペ病での特徴的な病理変化として知られる骨格筋におけるオートファゴソームの異常蓄積についても、hGAA-M519V マウスにおいて観察された。以上のことから、本研究で得られた hGAA-M519V マウスはポンペ病のミスセンス変異型モデルマウスとして有用だと考えられた。

(3) ミスセンス変異型ポンペ病モデルマウスに対するプロテアソーム阻害剤の有効性解析

本研究で作成した hGAA-M519V マウスにボルテゾミブの投与を行い、心臓及び骨格筋における GAA への効果について解析を行った。その結果、心臓において未成熟型ならびに成熟型の GAA タンパク質の増加が認められ、ボルテゾミブによる酵素タンパク質の安定化及び成熟化の促進が確認された。さらに、GAA 活性についても心臓では有意な上昇が認められた。その一方で、骨格筋では心臓で得られたような GAA に対する効果は認められず、骨格筋は心臓よりもボルテゾミブに対する感受性が低いことが示唆された。また、本研究でのボルテゾミブの投与条件においては、顕著な血液毒性は認められなかった。以上の結果から、ボルテゾミブは生体内の少なくとも一部の臓器に対しては有効性を示す可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Shimada Y, Nishimura E, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Proteasome Inhibitor Bortezomib Enhances the Activity of Multiple Mutant Forms of Lysosomal α -Glucosidase in Pompe Disease. JIMD Rep., 2015;18:33-9. 査読有

[学会発表](計6件)

嶋田洋太、石井夏実、福田隆浩、保科宙生、樋口孝、小林博司、井田博幸、大橋十也 新規ポンペ病モデルマウスを用いたプロテアソーム阻害剤の治療効果の検討 第57回日本先天代謝異常学会総会 大阪 H27 11.12-14

Shimada Y, Fukuda T, Nishimura E, Hoshina H, Kobayashi H, Higuchi T, Ida H, Ohashi T Development of missense murine model of Pompe disease. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of

Metabolism Lyon Sep. 1-4 2015

Shimada Y, Nishida H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T Bortezomib enhances the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant α -glucosidases identified in Pompe disease. 3rd Asian Congress for Inborn Error of Metabolism & 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases 舞浜 Nov. 27-29 2013

Shimada Y, Nishida H, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T Proteasome inhibitor improves the function and subcellular localization of mutant lysosomal α -glucosidase in fibroblasts from patients with Pompe disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism Barcelona Sep. 3-6 2013

嶋田洋太、西山由梨佳、小林博司、樋口孝、衛藤義勝、井田博幸、大橋十也 ポンペ病におけるプロテアソーム阻害剤応答性酸性 グルコシダーゼ変異の探索 第54回日本先天代謝異常学会総会 岐阜 H24 11.15-17

Shimada Y, Nishida H, Nishiyama Y, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T Proteasome inhibitor improves the function of mutant lysosomal α -glucosidase in fibroblasts from Pompe disease patient. 2nd Asian Congress for Inborn Error of Metabolism Seoul Apr. 1-4 2012

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 洋太 (SHIMADA YOHTA)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20560824