

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461543

研究課題名(和文)ライソゾーム病におけるオートファジーの病態解明と治療薬スクリーニング法の開発研究

研究課題名(英文)Study for autophagy in lysosomal diseases and development of drug screening

研究代表者

酒井 規夫 (Sakai, Norio)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30314313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病は希少難病であるが特定疾患にも認定されており、わが国における難病医療における大きな対象疾患の一つである。しかしながら、今までの治療法は酵素補充療法、造血幹細胞移植など対象患者に限られたり、患者への侵襲の大きなものが多い。本研究ではクラッベ病、ガラクトシアリドーシス、ファブリー病などに対する低分子量の経口薬剤の開発を目指す研究を行った。それにより、細胞レベルでの病態が明らかになり、シャペロン薬剤の有効性とその原理について知見を得ることができた。

今後、この知見をもとにシャペロン薬の有効性を細胞レベルで確認したり、変異ごとの有効性の検索に応用可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal diseases are rare and intractable disease and are targets of Japanese health science. However the treatment method are limited such as enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation which might has severe adverse effect. In this study we performed basic research for Krabbe disease, galactosialidosis and Fabry disease for the screening the low molecule oral drug candidates. With this research we found several cellular pathology for lysosomal diseases and the possibility of chaperone treatment and basic mechanism of it.

With these results it is applied to check the effect of candidate drug in cellular level and the screen the drug for each mutation of the disease.

研究分野：小児科学

キーワード：Krabbe disease galactosialidosis Fabry disease autophagy chaperone

1. 研究開始当初の背景

当研究室はライソゾーム病の診断、診療を継続しており、多くの患者の診断や遺伝子解析を行ってきている。またこれらのライソゾーム病の中には酵素補充療法や造血幹細胞移植の有用性が報告され、適応と認められた患者への実施もされてきている。しかしながらこれらの治療はリスクを伴うこともあり、また継続的な通院のために患者負担も大きい。そこで、低分子量の経口薬が開発されればその意義は大きい、その開発はまだ十分ではない。

2. 研究の目的

本研究では、その低分子量薬剤の効果を見るために、細胞レベルでのモデル細胞を、種々の変異タンパクを発現させたり、患者皮膚線維芽細胞を用い、その分子病態を明らかにしながら、候補薬剤の培養上清への付加によりその効果を確認し、薬剤の有効性を検索する方法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

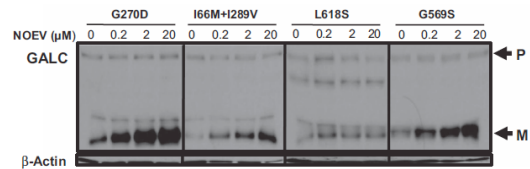
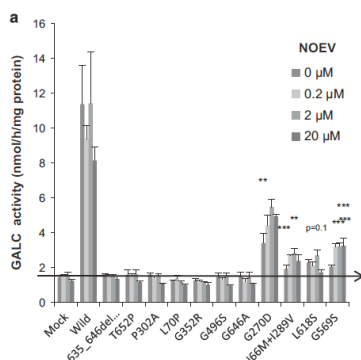
クラッペ病については種々の変異タンパクを COS 細胞に発現させ、まずは酵素活性の変化、タンパクのプロセッシング、搬送における病態を観察し、その上でシャペロン候補物質 NOEV の投与による影響を見た。また患者細胞に対しても同様の効果を観察した。

ガラクトシアリドーシスの患者細胞を用い、これにたいする NOEV 処理により β ガラクトシダーゼの酵素の安定性、酵素活性の変化を間作した。

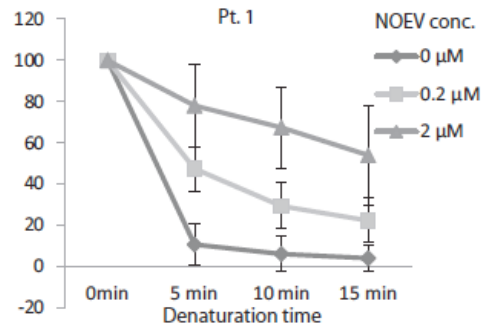
ファブリー病については不整脈の薬剤としてアミオダロンが使用されることがあるが、これは酵素の搬送に影響があるとされるため、培養上清に付加することにより、その影響を観察した。

4. 研究成果

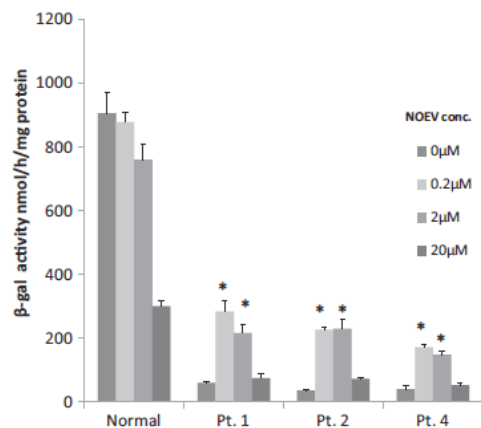
クラッペ病に対するシャペロン薬の効果については、ライソゾームへの搬送が高率となり、ライソゾームにおけるプロセッシングの効率が上昇し、最終的な内在性酵素の活性上昇を確認し、報告した。(*J Hum Genet.* 2015 Sep;60(9):539-45)



ガラクトシアリドーシスについては患者細胞を用いた NOEV 投与を行い、 β ガラクトシダーゼについてはライソゾームへの搬送



の明らかな改善を認め、これも報告してい



る。(*Brain Dev.* 2016 Feb;38(2):175-80)

ファブリー病細胞に対するアミオダロンの効果については、培養細胞で行い、細胞内での搬送のみならず、細胞外からの酵素の取り込みも阻害することなどを観察した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- 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, Shio 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., 14-3-3 ϵ 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) Takamura A, Sakai N, Shinpo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y., The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear., *Mol Genet Metab.* 2013 Nov;110(3):401-4.
- 7) 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.* 534(2):144-54, 2014
- 8) Kimura Y, Mihara M, Kawarai T, Kishima H, Sakai N, Takahashi M and Mochizuki H, Efficacy of deep brain stimulation in an adolescent patient with DYT11 myoclonus-dystonia, *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2:57-59, 2014
- 9) Narita A, Shirai K, Kubota N, Takayama N, Takahashi Y, Onuki T, Numakura C, Kato, M, Hamada Y, Sakai N, Ohno A, Asami M, Matsushita S, Hayashi A, Kumada T, Fujii T, Horino A, Inoue T, Kuki I, Asakawa K, Ishikawa H, Ohno K, Nishimura Y, Tamasaki A, Maegaki Y and Ohno K, Abnormal pupillary light reflex with chromatic pupillometry in Gaucher disease, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(2): 135-140, 2014
- 10) Hossain MA, Higaki K, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N., Chaperone therapy for Krabbe disease: potential for late-onset GALC mutations., *J Hum Genet.* 2015 Sep;60(9):539-45
- 11) Hossain MA, Higaki K, Shinpo M, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N., Chemical chaperone treatment for galactosialidosis: Effect of NOEV on β -galactosidase activities in fibroblasts., *Brain Dev.* 2016 Feb;38(2):175-80.

- 12) Shibazaki T, Hirabayashi K, Saito S, Shigemura T, Nakazawa Y, Sakashita K, Takagi M, Shiohara M, Adachi K, Nanba E, Sakai N, Koike K., Clinical and laboratory outcomes after umbilical cord blood transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis II alpha/beta., *Am J Med Genet A*. 2016 Jan 20. doi: 10.1002/ajmg.a.37563. [Epub ahead of print]
- 13) Kato S, Yabe H, Takakura H, Mugishima H, Ishige M, Tanaka A, Kato K, Yoshida N, Adachi S, Sakai N, Hashii Y, Ohashi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Tabuchi K., Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation., *Pediatr Transplant*. 2016 Jan 25. doi: 10.1111/petr.12672. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 濱田悠介、和田芳朗、近藤秀仁、山崎早苗、中野さやか、苛原 香、富永康仁、青天目信、下野九里子、酒井規夫、住田裕、大菌恵一、異なる臨床経過を辿っているプロピオン酸血症兄弟例の検討、第十回 近畿先天代謝異常症研究会、7.13.2014
- 2) 尾形侑香、村西加奈子、近藤秀仁、山崎早苗、中野さやか、濱田悠介、苛原香、富永康仁、青天目信、下野九里子、酒井規夫、大菌恵一、**当科における小児型ポンペ病4症例への酵素補**

充療法の経過、第十回 近畿先天代謝異常症研究会、7.13.2014

- 3) M A Hossain, K Higaki, M Shinpo, E Nanba, Y Suzuki, M Alfadhel, K Ozono, N Sakai, Chemical chaperone treatment for galactosialidosis: chaperone effect of NOEvoN β -galactosidase activities in galactosialidosis fibroblasts, SSIEM2014, 9.3.2014
- 4) 苛原香、ゴーシェ病2型、第2回ゴーシェ病フォーラム、9.20.2014
- 5) 酒井規夫、異染性白質ジストロフィーの診断と治療戦略、米子セミナー、10.12.2014
- 6) 近藤秀仁、新寶理子、濱田悠介、苛原香、酒井規夫、大菌恵一、異なる臨床経過を呈したゴーシェ病の兄弟例、第19回日本ライソゾーム病研究会、10.3.2014
- 7) 衛藤義勝、岩本武雄、藤崎美和、高村歩美、梅田稔子、辻嘉代子、大橋十也、井田博幸、衛藤薫、濱田悠介、新寶理子、近藤秀仁、苛原香、酒井規夫、Niemann Pick C(NPC)患者での血清オキシステロール測定 of the 診断への有用性に関して、第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 8) 田中あけみ、濱崎考史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基道、加藤剛二、小林良二、加藤俊一、ムコ多糖症II型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果とIDS遺伝子変異について、第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 9) Hideto Kondo, Michiko Shimpo, Yusuke Hamada, Kaori Irahara, Koji Tominaga, Shin Nabatame, Norio Sakai, Keiichi Ozono, The investing of pyruvate therapy for patients

- with mitochondrial disorders, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 10) Kaori Irahara, Yusuke Hamada, Sanae Yamazaki, Sayaka Nakano, Hideto Kondo, Michiko Shimpo, Norio Sakai, Keiichi Ozono, The study of developmental profile in patients with mucopolysaccharidosis type 2, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 11) Yoichi Wada, Norio Sakai, Kunihiko Aya, Shinsuke Ninomiya, Kenji Waki, Yoshio Arakaki, The late infantile form of metachromatic leukodystrophy with intrathecal enzyme replacement therapy, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 12) Michiko Simpo, Hideto Kondo, Yusuke Hamada, Kaori Irahara, Norio Sakai, Keiichi Ozono, Six cases of metachromatic leukodystrophy, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 13) 酒井規夫、ホセイン モハマッド・A、クラッペ病に対するケミカルシャペロン、シンポジウム遺伝疾患に対する低分子シャペロン療法、第59回日本人類遺伝学会、11.19-22.2014、舟掘
- 14) 田中あけみ、濱崎考史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基道、新實理子、加藤剛二、小林良二、澤田智、鈴木康之、石毛美香、麦島秀雄、矢部晋正、加藤俊一、ムコ多糖症II型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果とIDS遺伝子変異について、第59回日本人類遺伝学会、11.19-22.2014、舟掘
- 15) Norio Sakai, Lysosomal diseases; Basic pathology and treatment strategy、リエゾンラボ研究会、12.17.2014、熊本
- 16) 酒井規夫、先天型、古典型筋強直性ジストロフィーの小児期における診療のポイント 第6回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー、1.10.2015、大阪
- 17) 濱田悠介、近藤秀仁、苛原 香、香川尚己、酒井規夫、大藪恵一、水頭症の鑑別が困難であったムコ多糖症II型の兄弟例、第11回近畿先天代謝異常症研究会、2015年7月、大阪
- 18) 濱田悠介、近藤秀仁、苛原 香、馬殿洋樹、髭野亮太、三原聖子、長谷川泰浩、成田 淳、高橋邦彦、別所一彦、小垣滋豊、酒井規夫、大藪恵一、肥大型心筋症を合併し、診断・治療に難渋している糖原病の一例、第11回近畿先天代謝異常症研究会、2015年7月、大阪
- 19) 波田野希美、田辺芳美、土生舞、研谷美月、濱崎綾子、木口里菜、藤原彩子、古藤雄大、古川恵美、森瞳子、酒井規夫、永井利三郎、東日本大震災被災地域の教員から見た生徒の心理面の変化とそれに対する支援の実態について～震災から3年半後の高等学校教員へのインタビュー調査から～、第62回大阪小児保健研究会、2015年9月、大阪
- 20) 衛藤義勝、岩本武夫、藤崎美和、梅田稔子、井田博幸、高村歩美、衛藤 薫、酒井規夫、ニーマンピックC病の非侵襲性診断法:オキシステロール並びに lysoSM 測定の有用性、第57回日本先天代謝異常学会総会、2015年11月、大阪
- 21) 濱田悠介、近藤秀仁、苛原 香、

香川尚己, 酒井規夫, 大藪恵一, ムコ多糖症 II 型合併水頭症について~当院での経験~, 第 57 回日本先天代謝異常学会総会, 2015年11月, 大阪

22) 苛原 香, 大友孝信, 近藤秀仁, 濱田悠介, Hossain Mohammad Arif, 大藪恵一, 酒井規夫, Krabbe 病患者の病型は 2 つの変異の COS7 細胞での発現実験における

galactocerebrosidase 活性の総和と
相関する, 第 57 回日本先天代謝異常学会総会, 2015年11月, 大阪

23) 酒井規夫, 先天代謝異常症への酵素補充療法, 分野別シンポジウム, 第 118 回日本小児科学会学術集会, 2015年4月, 大阪

24) 酒井規夫, 治療可能な疾患, ニーマンピック病 C 型の診断と治療の実際-肝脾腫, 発達遅滞, 眼球運動障害からの気づき-, 教育セミナー, 第 118 回日本小児科学会学術集会, 2015年4月, 大阪

25) 酒井規夫, ゴーシェ病の診断と治療-新たな選択肢について, ランチョン, 第 39 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2015年5月, 千葉

26) 酒井規夫, 髄注による酵素補充療法の開発, シンポジウム, 第 57 回日本小児神経学会学術集会, 2015年5月, 大阪

27) 酒井規夫, ゴーシェ病治療の新展開-経口ゴーシェ病治療薬, ランチョンセミナー, 第 42 回小児臨床薬理学会, 2015年, 11月, 熊本

[図書] (計 3 件)

1) 酒井規夫, ライソゾーム病・ペルオキシソーム病診断の手引き, 診断と治療社, 2015年3月

2) 酒井規夫, 肝脾腫の特徴, カタブレキシー, ニーマンピック病 C 型の診

断と治療, 大野耕策編, 医薬ジャーナル, 2015年6月

3) 酒井規夫, 組織障害の軽症な時期から ERT を開始することの重要性を示唆する 1 症例, ファブリー病症例集, 衛藤義勝編, Medical Tribune, 2015年12月

[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

酒井規夫 (SAKAI, Norio)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30314313

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: