

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860399

研究課題名(和文) 基質類似体同時投与による酵素製剤の増強作用

研究課題名(英文) Effect of co-administration with analogs on enzyme preparation

研究代表者

月村 考宏 (TSUKIMURA, TAKAHIRO)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50632783

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)：ファブリー病の新規治療薬候補である改変型 β -N-アセチルサミニダーゼ(NAGA)を安定化する化合物を選出した。この化合物をファブリー病患者由来の培養線維芽細胞に改変型NAGAと同時に添加した結果、改変型NAGAの取り込み効率が上昇した。しかし、この化合物と改変型NAGAをモデルマウスに同時投与した結果、改変型NAGAの取り込み効率は上昇しなかった。そこで、改変型NAGAを安定化する化合物の新たな探索方法として、サーマルシフトアッセイ法を構築し、有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We found a compound which stabilize modified β -N-acetylgalactosaminidase (NAGA). The compound enhanced the uptake of modified NAGA into cultured fibroblasts derived from Fabry patients. But the compound did not enhance the uptake of modified NAGA into organs of Fabry mice. We also constructed a new screening method using thermal shift assay.

研究分野：生化学

キーワード：酵素製剤 基質類似体 リソソーム病 ファブリー病

1. 研究開始当初の背景

リソソーム病は、リソソームに存在する酵素の活性が遺伝的に低下することで、それらの基質が分解されずに蓄積してしまう遺伝病で、障害される酵素の種類により約 40 種類が知られている。研究開発当初 7 種類 (現在 8 種類) のリソソーム病において、組換え酵素を 1-2 週間に 1 度投与する「酵素補充療法 (ERT)」が導入され、有用性が示されている。そして、現在も新たなリソソーム病に対する酵素補充療法薬の開発が行われている。しかし、本製剤は酵素製剤であるため、極めて高価であること、血中で不安定なため標的臓器への取り込みが必ずしも良好でないこと等が問題となっている。そのため、酵素製剤の投与量を減らし費用を抑えることや、血中で酵素製剤を安定化され標的臓器への取り込み効率が上昇することが期待されている。

また、新たな治療法として原因となるリソソーム酵素の基質類似体を投与するケミカルシャペロン療法が注目されており、臨床試験が行われている。ケミカルシャペロン療法は、基質類似体を内在性の変異酵素の活性部位に結合させ、変異酵素のフォールディングを改善し安定化することで酵素活性を増加させようとする治療法である。しかし、基質類似体は、活性部位に結合して阻害剤としても働くため、その投与量の決定は難しいと考えられている。

リソソーム病の一つであるファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼ A (GLA) の酵素活性が遺伝的に顕著に低下することで、基質である糖脂質グロボトリアオシルセラミド (Gb3) やグロボトリアオシルスフィンゴシン (Lyso-Gb3) が全身の細胞に蓄積する X 染色体性の遺伝病である。現在、ファブリー病に対して ERT が導入されている。しかし、欠損した GLA を患者に投与するため、GLA に対する抗体が産生され、免疫的副作用や治療効果が減少される等の問題が生じていた。そこで我々は、ファブリー病患者に投与しても抗体産生が起こらないことを期待し、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) の基質認識部位のアミノ酸 2 残基を置換し、GLA 活性を有するようにした改変型 NAGA を作製した。改変型 NAGA をファブリー病モデルマウスに投与した結果、臓器に蓄積した Gb3 が減少することが確認され、改変型 NAGA がファブリー病の新規酵素補充療法薬となる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

酵素補充療法薬を安定化する化合物 (基質類似体) と酵素補充療法薬を同時に投与することにより、酵素補充療法薬の治療効果を向上させることが可能かを検証することとした。モデルとして、ファブリー病の新規酵素補充療法候補製剤である改変型 NAGA を使用することとした。初めに改変型 NAGA を

安定化する基質類似体を探索し、続いて細胞、モデルマウスに改変型 NAGA と基質類似体を同時添加し、その取り込み効率の増強効果を解析することとした。

3. 研究の方法

(1) 改変型 NAGA を阻害する基質類似体の探索

改変型 NAGA に、GLA 及び NAGA の基質類似体を添加し酵素活性を測定することで、改変型 NAGA を阻害する基質類似体を選出した。また、強い阻害を示した化合物については、Lineweaver-Burk プロットより、それらの阻害様式と阻害定数 (K_i 値) を決定した。

(2) 改変型 NAGA を *in vitro* 条件下で安定化する基質類似体の探索

(1) で選出した基質類似体と改変型 NAGA を酸性及び中性の緩衝溶液に同時添加し、それぞれ 55 と 42 で 1 時間熱処理した。そして、この残存活性を測定することで、改変型 NAGA を安定化する基質類似体を選出した。

(3) 細胞に改変型 NAGA を同時添加して改変型 NAGA の治療効果を増強する基質類似体の探索

様々な濃度の (2) で選出した基質類似体と $1\mu\text{g/mL}$ 改変型 NAGA をファブリー病患者由来の培養線維芽細胞に同時添加し、培養した。そして、細胞内に取り込まれた改変型 NAGA の治療効果の評価として、酵素活性を測定することで酵素活性の上昇を、抗 NAGA 抗体を用いたウェスタンブロットを行うことで酵素蛋白質量の増加を解析し、改変型 NAGA 単独添加に比べて取り込み効率を上昇させた基質類似体を選出した。

(4) モデルマウスに基質類似体と改変型 NAGA を単回同時投与し、改変型 NAGA が血中・臓器中で安定化されるか検証

ファブリー病モデルマウスに 3mg/kg 体重の (3) で選出した基質類似体と 4mg/kg 体重の改変型 NAGA の混合溶液を尾静脈より単回投与した。そして、投与開始 1, 3, 6, 24, 48, 120 時間後に血液と臓器 (肝臓、腎臓、心臓) を摘出し、酵素活性を測定した。そして、改変型 NAGA 単独投与した場合と比較した。

(5) 新規スクリーニング法の開発

今回のスクリーニングで選出した化合物は、阻害活性を指標に 1 次スクリーニングを行っているため、2 次スクリーニングの安定性の解析において阻害活性をもつ化合物について酵素活性で評価していた。しかし、このスクリーニング法の問題点として、酵素活性部位以外に結合する化合物や阻害活性が極めて弱いまたは無いにも関わらず改変型 NAGA を安定化させる化合物を選出できない、阻害が極めて強い化合物は安定性の評価ができないという問題があった。そこで、

酵素活性以外を指標に1次スクリーニングとして使用できる、つまり再現性が良く、簡便で、多検体を短時間で処理できる実験系の確立が必要であると考えた。そこで、(2)で選出した化合物をポジティブコントロールとして用い、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による分子間相互作用解析とサーマルシフトアッセイ法による T_m 値の解析がスクリーニング法として有用となり得るか検討した。

4. 研究成果

(1) 改変型 NAGA を阻害する基質類似体の探索

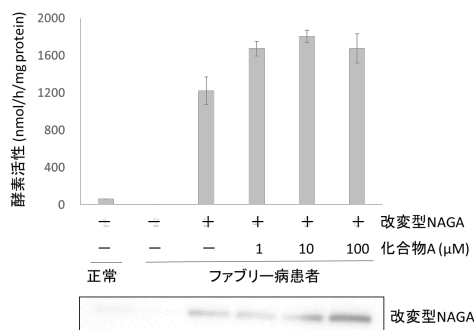
GLA と NAGA の基質類似体の中から、改変型 NAGA を阻害する化合物を選出した。その結果、2つの化合物 (A, B) が特に強い阻害を示した。そして、これら2つの化合物は競合阻害を示し、化合物 A, B の K_i 値は、それぞれ 135nM, 262nM であった。

(2) 改変型 NAGA を in vitro 条件下で安定化する基質類似体の探索

(1)で選出した2つの化合物を酸性及び中性条件下で改変型 NAGA とともに熱処理し残存酵素活性を測定した結果、化合物 A は $1\mu\text{M}$ で改変型 NAGA を酸性及び中性条件下で安定化した。一方、化合物 B は、酸性条件下では $20\mu\text{M}$ で改変型 NAGA を安定化させたが、中性条件下では安定化は確認されなかった。

(3)細胞に改変型 NAGA を同時添加して改変型 NAGA の治療効果を増強する基質類似体の探索

(2)において酸性及び中性条件下で低濃度で安定化作用を示した化合物 A と改変型 NAGA をファブリー病患者由来の培養線維芽細胞に同時添加した。その結果、 $10\mu\text{M}$ の化合物 A を同時添加することで、改変型 NAGA 単独に比べて約 1.5 倍の酵素活性の上昇が確認された。また、改変型 NAGA 蛋白質量の増加も確認された。しかし、 $100\mu\text{M}$ まで濃度を上げても、酵素活性は $10\mu\text{M}$ よりも増加はしなかった。以上のことから、化合物 A は細胞レベルで改変型 NAGA の取り込み効率を上昇させることが確認された。



(4) モデルマウスに基質類似体と改変型 NAGA を単回同時投与し、改変型 NAGA が血中・臓器中で安定化されるか検証

4mg/kg 体重の改変型 NAGA と 3mg/kg 体重の化合物 A を混合し、ファブリー病モデルマウスに尾静脈より投与し、経時的に血液及び臓器中の改変型 NAGA の酵素活性を測定した。今回の投与条件では、期待した血中での改変型 NAGA の安定化と標的臓器への取り込み効率の上昇は確認されなかった。以上のことから、今回のスクリーニングで選出した化合物は、動物レベルで改変型 NAGA の治療効果を増強させることができなかった。しかし一方、近年、組換え GLA を用いた酵素補充療法において、基質類似体と組換え GLA とファブリー病モデルマウスに同時投与することで、血中及び臓器中で GLA が安定化され、その治療効果が増強されることが報告された。このことから、改変型 NAGA に結合することで改変型 NAGA を安定化し、その治療効果を増強させる化合物を選出する方向性に問題はないと考えられた。

(5) 新規スクリーニング法の開発

SPR 法

改変型 NAGA を CM5 チップに固定し、化合物をアナライトとして流し、それらの分子間相互作用を検出することを目指した。しかし、分子間相互作用を解析するのに十分な量の改変型 NAGA をチップに固定することができなかったため、本法は断念した。

サーマルシフトアッセイ法

改変型 NAGA は、酸性条件下の方が中性条件下に比べ T_m 値が高かった。化合物 A, B はともに濃度依存的に酸性及び中性条件下で改変型 NAGA の T_m 値を上昇させたが、その程度 (T_m) は酸性条件下の方が大きかった。そして、化合物 A の方が化合物 B に比べ、 T_m が大きかった。この結果は、(2)で行った方法の結果と一致していた。さらに、(2)に比べ再現性が高く、解析が容易、操作が簡便、多検体を同時に短時間で測定できる等のメリットがあるため、1次スクリーニング法として有用であると考えられた。また、本法は、他のリソソーム病に対する酵素補充療法薬を安定化する化合物を探索する際のスクリーニング方法としても有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Sueoka H., Aoki M., **Tsukimura T.**, Togawa T., Sakuraba H. Distributions of globotriaosylceramide isoforms, and globotriaosylsphingosine and its analogues in an α -Galactosidase A knockout mouse, a model of Fabry disease. PLoS One, 10:e0144958, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0144958. eCollection 2015. (査読有)

Sakuraba H., **Tsukimura T.**, Togawa T. (他 5 名 2 番目) Clinical and biochemical

investigation of male patients exhibiting membranous cytoplasmic bodies in biopsied kidney tissues - A pitfall in diagnosis of Fabry disease. *J. Nephropathol.*, 4:91-96, 2015. DOI:10.12860/jnp.2015.17. (査読有)

Nakano S., Tsukimura T., Togawa T., Sakuraba H. (他 9 名 2 番目) Rapid immunochromatographic detection of serum anti- α -Galactosidase A antibodies in Fabry patients after enzyme replacement therapy. *PLoS One*, 10:e0128351, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0128351. eCollection 2015. (査読有)

Sueoka H., Ichihara J., Tsukimura T., Togawa T., Sakuraba H. Nano-LC-MS/MS for quantification of Lyso-Gb3 and its analogues reveals a useful biomarker for Fabry disease. *PLoS One*, 10:e0127048, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0127048. eCollection 2015. (査読有)

Takahashi N., Tsukimura T., Togawa T., Sakuraba H. (他 17 名 5 番目) A heterozygous female with Fabry disease due to a novel α -galactosidase A mutation exhibits a unique synaptopodin distribution in vacuolated podocytes. *Clin. Nephrol.*, 83:301-308, 2015. DOI:10.5414/CN108317. (査読有)

Katayama M., Kaneko S., Tsukimura T., Takamatsu K., Togawa T. Thirty-seven amino acids and three related nitrogen compounds in human seminal plasma: multivariate analyses reveal strong correlations among asparagine, glutamine, and ammonia with sperm parameters. *Indian J. App. Res.*, 5:199-203, 2015. DOI:10.15373/2249555X. (査読有)

Tsukimura T., Togawa T., Sakuraba H. (他 5 名 1 番目) Plasma mutant α -galactosidase A protein and globotriaosylsphingosine level in Fabry disease. *Mol. Genet. Metab. Rep.*, 1:288-298, 2014. DOI:10.1016/j.ymgmr.2014.07.005. (査読有)

Togawa T., Tsukimura T., Sakuraba H. (他 3 名 4 番目) Comparative study on mannose 6-phosphate residue contents of recombinant lysosomal enzymes. *Mol. Genet. Metab.*, 111:369-73, 2014. DOI:10.1016/j.ymgme.2013.12.296. (査読有)

Togawa T., Tsukimura T., Sakuraba H. (他 3 名 4 番目) Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human α -galactosidase a: pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants. *ACS Chem. Biol.*, 9:1460-9, 2014. DOI: 10.1021/cb500143h. (査読有)

Nishida M., Tsukimura T., Togawa T., Sakuraba H. (他 5 名 6 番目) A case of Fabry

nephropathy with histological features of oligonephropathy. *Eur. J. Pediatr.*, 173:1111-1114, 2014. DOI: 10.1007/s00431-013-2118-0. (査読有)

Nakano S., Togawa T., Tsukimura T., Sakuraba H., Shibasaki F. (他 4 名 6 番目) Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma. *PLoS One*. 8:e78588, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078588. eCollection 2013. (査読有)

Maita N., Tsukimura T., Sakuraba H. (他 4 名 2 番目) Human α -L-iduronidase uses its own N-glycan as a substrate-binding and catalytic module. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110:14628-14633, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1306939110. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

Tsukimura T. Anti- α -galactosidase A antibodies and serum-mediated inhibition in Fabry disease. 12th Annual Lysosomal disease network WORLD Symposium 2016, 2016.2.29-3.4, San Diego (USA).

月村 考宏. 遅発型ファブリー病の原因変異 vs 機能的多型, 第 57 回日本先天代謝異常学会 / 第 13 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2015.11.12-14, 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

Tsukimura T. High risk screening for Fabry disease in Japan. The 3rd Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening. 2015.6.19, 品川プリンスホテル(東京都港区).

月村 考宏. 新規改変酵素の免疫交差性及び iPS 細胞由来心筋細胞への取り込み ファブリー病治療への応用. 薬学会第 135 年会, 2015.3.25-28, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸).

Tsukimura T. Comprehensive study of Fabry disease: Gene mutation, GLA activity, GLA protein and globotriaosylsphingosine. 11th Annual Lysosomal disease network WORLD Symposium 2015, 2015.2.10-12, Orlando (USA).

月村 考宏. ファブリー病患者の遺伝子変異、血漿中 GLA 蛋白質濃度及び Lyso-Gb3 濃度の関係. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会 / 第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2014.11.13-15, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市).

月村 考宏. ファブリー病患者の血漿中の α -ガラクトシダーゼ A 蛋白質濃度とグロボトリアオシルスヒンゴシン濃度の相関性. 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18, 国立京都国際会館(京都府京都市).

月村 考宏. ファブリー病の分子病態研究: 遺伝子変異、変異酵素蛋白質及び蓄積糖

脂質について. 薬学会第 134 年会, 2014.3.27-30, 熊本大学(熊本県中央区).

Tsukimura T. Molecular interaction between a mutant β -galactosidase A and imino sugars. 10th Annual Lysosomal disease network WORLD Symposium 2014, 2014.2.11-13, San Diego (USA).

Tsukimura T. Comparative study on the content of mannose 6-phosphate residues of recombinant lysosomal enzymes. The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease/The 3rd Asia Congress for Inherited Metabolic Disease, 2013.11.27-29, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県浦安市).

月村 考宏. マンノース 6 リン酸残基の新規定量法の開発: 組換えヒトリソソーム酵素解析への応用. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月村 考宏 (TSUKIMURA, Takahiro)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 50632783