

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461525

研究課題名(和文) 転写因子TFEBを介したライソゾーム病細胞病態の解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) TFEB mediated therapy for lysosomal storage diseases

研究代表者

檜垣 克美 (HIGAKI, Katsumi)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号：90294321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子TFEBについて、ライソゾーム病の細胞病態との関連性、およびライソゾーム病に対する治療効果について、GM1-ガングリオシドーシスとゴーシェ病のモデル細胞系を用い検討した。ライソゾーム病細胞では、いずれもTFEBが核内に局在し、転写活性が上昇していた。また、TFEBを過剰発現させることで、変異酵素活性を上昇させる効果を示した。さらに、TFEBはシャペロン化合物と併用することで、変異酵素活性上昇効果の相乗効果を示した。以上の結果は、TFEBは変異ライソゾーム酵素の転写活性を上昇させることで、ライソゾーム病の細胞病態を改善する効果がある可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have investigated the effect of TFEB on cellular pathology of lysosomal storage diseases. In the model cells of GM1-gangliosidosis and Gaucher disease, TFEB was localized in the nucleus and was up-regulated its transcriptional activities. When cells were overexpressed with TFEB, the activities of mutant lysosomal enzymes were enhanced. Moreover, TFEB with chaperone compounds showed synergetic effects on the enhancement of mutant enzyme activities in GM1-gangliosidosis cells. These results indicates the possibility that up-regulation of TFEB activity could induce a beneficial effect on cells with lysosomal storage disease.

研究分野：神経生物学

キーワード：転写因子 ライソゾーム病 脂質代謝 病態解析 治療法開発 シャペロン

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病とは、先天代謝異常症の一つの疾患群の総称で、細胞内小器官であるライソゾームに局在する加水分解酵素の遺伝的欠損により引き起こされる。障害を受ける細胞・器官により様々な症状を示すが、約半数のライソゾーム病は新生児から小児期に中枢神経症状を主症状に発症する神経難病である。我々は、ライソゾーム病の神経症状に有効な新規治療法として、シャペロン療法を開発してきたが、一方で、ライソゾーム病の細胞病態分子機構の詳細は未だ不明な部分が多い。我々は、ライソゾーム病の一つ GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス脳組織の網羅的遺伝子発現解析により、転写因子 TFEB (Transcription factor EB) の特異的な発現亢進を同定した。TFEB はヘリックスループヘリックス、ロイシンジッパー構造を有する転写因子で、広範なライソゾーム加水分解酵素およびオートファジー関連遺伝子の転写制御を担う機能が明らかになっていた。そこで、本研究課題で、ライソゾーム病細胞病態と TFEB 発現との関連性を明らかにすること、また、TFEB 発現調整によりライソゾーム細胞病態に対する新規治療法を開発を目指した基礎的な研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、GM1-ガングリオシドーシス、ゴーシェ病などをライソゾーム病に対し、疾患モデル細胞を用い、細胞病態と TFEB 発現の関連性を分子レベルで明らかにすることを目的とした。また、TFEB 発現調整による疾患細胞病態に対する治療効果を明らかにすることを目的とした。さらに、我々が開発してきたシャペロン化合物と TFEB 発現調整の併用による相乗効果についても検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究資材

野生型 TFEB および S142A 変異 TFEB 発現ベクター、TFEB ルシフェラーゼベクターはそれぞれ Addgene より購入し、用いた。シャペロン化合物 NOEV、NOV は我々が開発した低分子化合物で、培養細胞投与試験に用いた。

### (2) ライソゾーム酵素活性測定

ファブリー病の欠損酵素  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A とゴーシェ病の欠損酵素  $\beta$ -グルコシダーゼ酵素活性は、それぞれ 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) 標識した人工基質を用い

蛍光プレートリーダー (TECAN) を用い測定した。

### (3) 培養細胞と遺伝子導入

GLB1 遺伝子ノックアウト GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス由来培養線維芽細胞株 (GLB1-KO) は、われわれの研究室で樹立したものをを用いた。また、GLB1-KO 細胞に変異 GLB1 cDNA を発現させた細胞株 (GLB1-I51T, GLB1-R201C, GLB1-R457Q) もわれわれの研究室で樹立したもので、用いた。GBA1 遺伝子をゲノム編集でノックアウトした細胞株 (GBA1-KO) は Horizon Genomics 社より入手し、用いた。また、GBA1-KO 細胞に変異 GBA1 cDNA を発現させた細胞株 (GBA1-F213I, GBA1-N370S, GBA1-L444P) を樹立し、用いた。培養細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法により行った。ルシフェラーゼアッセイは、細胞抽出液にルシフェラーゼ基質を混和後、蛍光発光プレートリーダー (TECAN) を用い測定した。

### (4) 細胞蛍光画像取得

培養細胞の蛍光画像取得は、カバーガラス上の細胞をゲルマウント剤を用いスライドガラスに包埋後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) を用い画像取得した。核染色には DAPI を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ライソゾーム病細胞における TFEB の細胞内局在と転写活性

コントロール細胞および GLB1-KO、GBA1-KO と、正常細胞に  $\beta$ -グルコシダーゼ酵素特異的阻害剤 Condurotol-B epoxide (CBE) を付加した細胞に、それぞれ TFEB 発現ベクターを一過性に発現させ、細胞内局在を調べた。結果、コントロール細胞では TFEB は細胞質

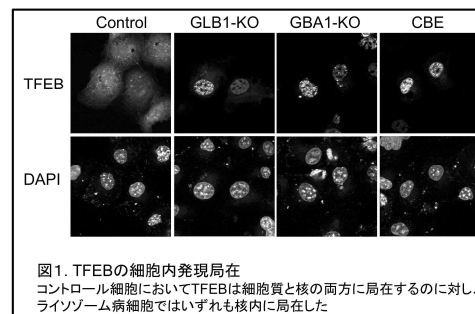
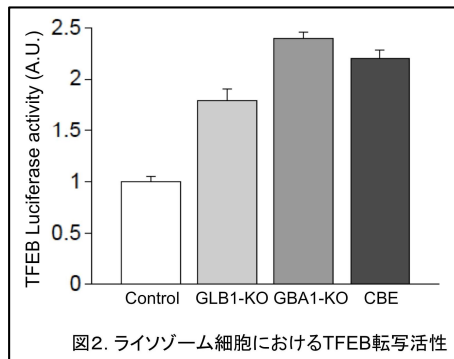


図1. TFEBの細胞内発現局在  
コントロール細胞においてTFEBは細胞質と核の両方に局在するのに対し、ライソゾーム病細胞ではいずれも核内に局在した

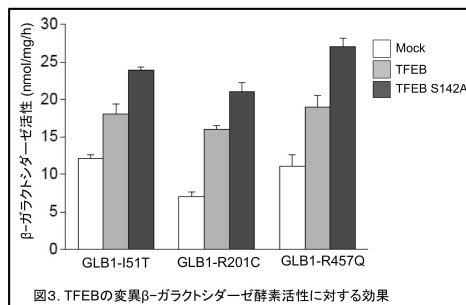
と核内に局在を示したのに対し、3種類のライソゾーム病モデル細胞ではいずれも TFEB は核に局限していた (図1)。次に、TFEB ルシフェラーゼベクターを用い、ルシフェラーゼアッセイにより TFEB 転写活性を調べた。

結果、コントロール細胞の転写活性に対し、GLB1-KO 細胞で 1.8 倍、GBA1-KO と CBE 細胞でそれぞれ 2.4 倍、2.2 倍の活性上昇を認めた (図 2)。

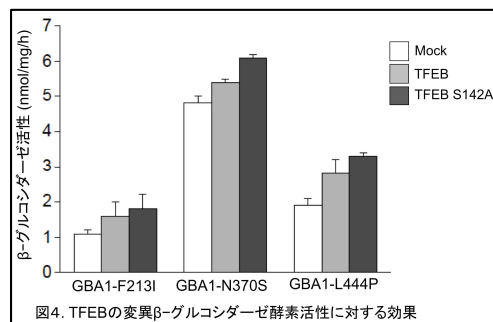


## (2) TFEB による変異ライソゾーム酵素活性上昇効果

TFEB は GLB1、GBA1 遺伝子を含む広範なライソゾーム酵素遺伝子の転写因子として転写活性を調整している。そこで、TFEB をこれらの疾患モデル細胞に過剰発現させることで、変異酵素活性に与える効果を調べた。また、野生型 TFEB とともに、リン酸化部位を欠損し、核内に局在する変異 TFEB (TFEB S142A) を用い、効果を検討した。結果、変異 GLB1 発現細胞 3 株で、いずれも TFEB およ



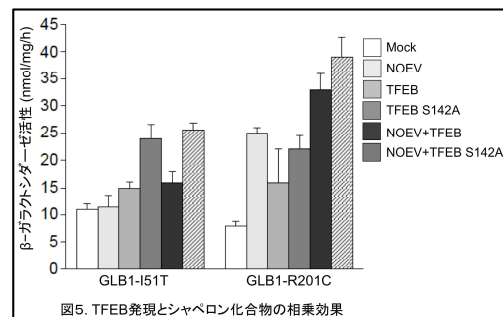
び TFEB S142A 発現による変異酵素活性の上昇効果を認めた (図 3)。変異 GBA1 発現細胞 3 株について、いずれの細胞でも同様の TFEB による活性上昇効果を検出した (図 4)。また、GLB1-KO 細胞と GBA1-KO 細胞では、TFEB



発現による効果は認めなかった (結果未提示)。

## (3) TFEB とシャペロン化合物による相乗効果

TFEB の変異酵素活性上昇は、転写活性上昇による効果で、シャペロン化合物は変異酵素蛋白質の構造補正による効果とは異なる機構であることが考えられたため、この 2 つの相乗効果について検討した。GLB1-I51T 変異酵素は NOEV の効果を示さない変異型があるが、この細胞においても、図 3 同様、TFEB 発現による活性上昇を認めた。また、GLB1-R201C 変異酵素は、NOEV により 3.1 倍の活性上昇を示し、NOEV と TFEB または NOEV と TFEB S142A により変異酵素活性はそれぞれ 4.1 倍、4.9 倍に上昇することが分かった (図 5)。



以上の結果より、ライソゾーム病細胞では、TFEB 転写活性を上昇させることで、変異酵素活性を上昇し、治療効果を示す可能性が示唆された。また、変異酵素蛋白質の構造補正を標的とするシャペロン化合物との併用により、相乗的に活性を上昇させることが分かった。さらに、シャペロン化合物が効かない変異酵素に対しても、TFEB は有効性を示すことが分かった。今後は、他のライソゾーム病細胞でも同様の効果が見られるのか調べるとともに、TFEB 転写活性を上昇させる効果をもつ低分子化合物を探索することで、新たな治療薬の開発につながる可能性があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件) すべて査読有

Navo CD, Corzana F, Sánchez-Fernández EM, Busto JH, Avenoza A, Zurbano MM, Nanba E, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Peregrina JM. Conformationally-locked C-glycosides: tuning aglycone interactions for optimal chaperone behaviour in Gaucher fibroblasts. *Org Biomol Chem.* 14, 1473-1484, 2016  
doi: 10.1039/c5ob02281a

Mena-Barragán T, García-Moreno I, Nanba E, Higaki K, et al, Inhibitor versus

chaperone behaviour of fagomine, DAB and LAB sp<sup>2</sup>-iminosugar conjugates against glycosidases: A structure-activity relationship study in Gaucher fibroblasts. *Eur J Med Chem*, 121, 880-9891, 2016  
doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.038

de la Fuente A, Rísquez-Cuadro R, Verdaguer X, García Fernández JM, Nanba E, Higaki K, Ortiz Mellet C, Riera A. Efficient stereoselective synthesis of 2-acetamido-1,2-dideoxyallonojirimycin (DAJNAc) and sp(2)-iminosugar conjugates: Novel hexosaminidase inhibitors with discrimination capabilities between the mature and precursor forms of the enzyme. *Eur J Med Chem*, 121, 926-938, 2016  
doi: 10.1016/j.ejmech.2015.10.038

Narita A et al (Higaki K 19 番目), Ambroxol Chaperone Therapy for Neuronopathic Gaucher Disease: A pilot study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3, 200-215, 2016  
doi: 10.1002/acn3.292

Mena-Barragán T, Narita A, Matias D, Tiscornia G, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Higaki K, García Fernández JM, Ortiz Mellet C. Highly pH-responsive pharmacological chaperones for mutant glycosidase enhancement. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54, 11696-11700, 2015  
doi: 10.1002/anie.201505147

Kuno S, Higaki K, Takahashi A, Nanba E, Ogawa S. Potent chemical chaperone compounds for GM1-gangliosidosis: N-substituted (+)-conduramine F-4 derivatives. *MedChemComm.*, 6, 206-210, 2015  
doi: 10.1039/c4md0027a

Castilla J, Rísquez R, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Castillion S. Conformationally -locked N-glycosidase: Exploiting long-range non-glycone interactions in the design of pharmacological chaperones for Gaucher disease. *Eur J Med Chem.*, 90, 258-266, 2015  
doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.002

Yu Y, Mena-Barragán T, Higaki K, Johnson JL, Drury JE, Lieberman RL, Nakasone N, Ninomiya H, Tsukimura T, Sakuraba H, Suzuki Y, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Molecular

basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human a-galactosidase: Pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants. *ACS Chem Biol*, 9, 1460-1469, 2014  
doi: 10.1021/cb500143h

Suzuki H, Ohto U, Higaki K, Mena-Barragan T, Aguilar-Moncayo M, Ortiz Mellet C, Nanba E, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y, Shimizu T, Structural basis of pharmacological chaperones for human b-galactosidase. *J Biol Chem*, 289, 14560-14568, 2014  
doi: 10.1074/jbc.M113.529529

[学会発表](計6件)

Katsumi Higaki, Chaperone therapy for lysosomal storage diseases. The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics. 2016年4月5日、京都国際会議場(京都市)

Katsumi Higaki, Morquio B Research: Chaperone therapy. 3<sup>rd</sup> 2015年7月19日、Annual Morquio Conference. Alfred I Dupint Children's Hospital (ウィルミントン市、デラウェア州、米国)

難波栄二, 檜垣克美, ライソゾーム病に対する pH 依存的に不活化する新規シャペロン化合物の開発、日本人類遺伝学会第60回大会、2015年10月16日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

成田綾, 檜垣克美, 難波栄二, ライソゾーム病に対する pH 感受性新規シャペロン化合物の開発、第57回日本先天代謝異常学会、2015年11月13日、大阪国際会議場(大阪市)

檜垣克美, ライソゾーム病に対する低分子シャペロン化合物の探索、日本人類遺伝学会第59回大会、2014年11月20日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

檜垣克美, Yu Yi, Raquel Lieberman, 月村孝弘, 櫻庭均, Carmen Ortiz Mellet, Jose Garcia Fernandez, 鈴木義之, 難波栄二, 大野耕策, α-ガラクトシダーゼAに対する新規シャペロン化合物の開発、第56回日本先天代謝異常学会、2014年11月14日、江陽グランドホテル(仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜垣 克美 (HIGAKI Katsumi)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号: 90294321