

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505012

研究課題名(和文) マルトシル - シクロデキストリンのニーマンピックC型病治療への展開

研究課題名(英文) Development to Neiman pick C type disease treatment of Mal- α -cyclodextrin

研究代表者

岡田 安代 (Okada, Yasuyo)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：70211117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Niemann-Pick病 Type C (NPC1) は、コレステロール(Cho)のエステル化障害と輸送障害によりリソソームにChoが蓄積するライソゾーム病の一種である。6-O- α -maltosyl- α -cyclodextrin (Mal- α -CD)のNPC1治療薬としての有効性をNpc1^{-/-}細胞を用いて検討した。Mal- α -CD処理により、Npc1^{-/-}細胞の細胞Choは濃度依存的に減少し、リソソームChoも時間依存的に減少した。この減少メカニズムは、Mal- α -CDが細胞内に取り込まれ、細胞ChoとリソソームChoが水溶性のCho-CD complexを形成し細胞外に排出されたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Niemann-Pick Type C (NPC) disease is a lysosomal storage disease characterized by excess accumulation of unesterified cholesterol in the lysosomes. α -cyclodextrin derivatives (CDs) form inclusion complexes with unesterified cholesterol and are a subject of intense research in the context of treating the NPC disease. In this study, we used quantitative LC/MS/MS to demonstrate that a 6-O- α -maltosyl- α -cyclodextrin derivative (Mal- α -CD) is internalized by Npc1 KO and CHO-JP17 cells by fluid-phase endocytosis. This is followed by Mal- α -CD transport to the lysosomes, where the majority of Mal- α -CD is metabolized to Glc- α -CD. Finally, the lysosomal CDs and unesterified cholesterol are released to the extracellular fluid. We believe that our study makes a significant contribution to the literature because it not only provides insight into the intracellular fate of internalized Mal- α -CD but also may inform future treatment of the NPC disease.

研究分野：薬学

キーワード：ニーマンピックC型病 マルトシル - シクロデキストリン コレステロール リソゾーム LC/MS

1. 研究開始当初の背景

Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) は稀少難治性疾患の一つとして知られ、日本では毎年 10 人弱が発病している。NPC は、厚生労働省難治性疾患克服事業の一環として「ライソゾーム病態の解明及び治療法の開発に関する研究」(平成 13 年度より)および「ライソゾーム病に関する調査研究」(平成 16 年度より)の対象疾患であり、病態解明や治療法に関する研究が進められてきたが、現在、なお NPC の有効な治療方法は確立されていない。Niemann-Pick 病は A から D の 4 型に分類されている。その中で、C 型 (NPC) は膜蛋白質である NPC1 の欠損またはエンドゾームで NPC1 と共存する分泌性蛋白質である NPC2 の欠損が原因で、リソゾームに遊離型コレステロール (FCho) や糖脂質が蓄積することを特徴とする疾患である¹⁾。FCho の蓄積の原因としては、1) コレステロールの細胞外放出に関わる反応であるコレステロールのエステル化の抑制 2) リソゾームが仲介する細胞内輸送の欠陥などが指摘されている。NPC の原因遺伝子としては、NPC1 遺伝子と NPC2 (HE1) 遺伝子が明らかにされているが、この遺伝子産物はコレステロールの細胞内輸送に関わる事が明らかにされている。最近、FCho と包接化合物を形成するシクロデキストリン (CD) 類の一つの 2-ヒドロキシプロピル-βシクロデキストリン (2-HP-βCD) が NPC 患者²⁾や NPC 病態細胞の FCho レベルを低下することが明らかとなり³⁾、新規 NPC 治療薬として期待が高まっている。しかしながら、2-HP-βCD 投与により肺障害や聴力障害をきたすことが明らかとなり、安全性の高い CD 類の開発が望まれている

2. 研究の目的

本研究では、CD 類として低毒性の 6-O-α-maltosyl-β cyclodextrin (Mal-βCD) を使用して、NPC 病態細胞への Mal-βCD の取り込み、細胞・リソゾーム内の FCho レベルの変化、さらに FCho の細胞外排出機構について検討した。

3. 研究の方法

使用細胞

野生型 Chinese Hamster Ovary 細胞 (CHO, JP17) および retrovirus-mediated gene trap mutagenesis で *Npc1* 遺伝子を破壊した細胞 (*Npc1* KO, A101) を用いた⁴⁾。

蛍光染色

Npc1 KO 細胞、CHO 細胞を 2.5×10^5 cells/mL でガラスボトムディッシュに播種し 24 h 培養後、PBS で洗浄し、3.7%ホルムアルデヒド/PBS で固定し、FCho を Filipin で、リソゾームを Lyso sensor で蛍光染色を行った。

LC/MS

MS : Quattro premier triple-quadrupole LC/MS (Micromass)、LC : Alliance HT Waters 2795 (Waters Co.)、Ionization : ESI

FCho ; Column : FluoFix (2 × 150mm)、Eluent : CH₃CN : 5 mM CH₃COONH₄ (72 : 28)、

Flow rate : 0.4 mL/min、Mass number (SIM) : FCho m/z 369.3 [M+H - H₂O]⁺、FCho-D6 (I.S.) m/z 375.4 [M+H - H₂O]⁺

CD 類 ; Column : X Bride® Amide (4.6 × 150mm)、Eluent : CH₃CN : 5 mM HCOONH₄ (63.5 : 36.5)、Flow rate : 0.2 mL/min、Mass number (SRM) : Mal-βCD m/z 1459.7>1459.7、Glc-βCD m/z 1297.7>1297.7、αCD (I.S.) m/z 973.7>973.7
コレステロールエステル化体 (ECho) の測定

総コレステロール (TCho) をコレステロール E-テストワコー (コレステロールエステラーゼ + コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法) で、FCho を遊離コレステロール E-テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法) で測定し、ECho は TCho から FCho を差し引いた値とした。

Mal-βCD による細胞処理

Npc1 KO 細胞、CHO 細胞を 5×10^5 cells/mL で播種 (培地 ; DMEM : Ham's F12=1 : 1) し 24 h 培養後、FBS 不含培地に換え、各種濃度の Mal-βCD で 0.5 h 処理した。培地への FCho 漏出量と細胞 FCho 量、細胞内への Mal-βCD 取り込み量を LC/MS で定量した。

リソゾーム画分中の FCho と βCD 類の測定

5 mM Mal-βCD で 0.5 h、1.5 h、3 h 処理した後、リソゾーム画分を Lysosome Enrichment Kit (PIERCE) で分画した。リソゾーム画分は acid phosphatase 活性、α-glucosidase 活性で確認し、リソゾーム画分中の FCho と βCD 類を LC/MS で定量した。
Mal-βCD 処理細胞からの FCho と βCD 類の細胞外への排出

5 mM Mal-βCD で 0.5 h 処理した *Npc1* KO 細胞、CHO 細胞を洗浄後、PBS に再懸濁し、37 °C でインキュベーションし、0.5 h 後、1.5 h 後、3 h 後の PBS 中と細胞中の FCho と βCD 類を LC/MS で定量した。

4. 研究成果

(1) Mal-βCD 処理による細胞の FCho 量変化

Npc1 KO 細胞は *Npc1* 遺伝子欠損のため、リソゾームに多量の FCho を蓄積する点の特徴である。そこで、*Npc1* KO 細胞の FCho を Filipin で、リソゾームを Lyso sensor で蛍光染色したところ、CHO 細胞に比べて *Npc1* KO 細胞のリソゾームに FCho の強い蛍光が観察された。FCho の蛍光は Mal-βCD 処理 (5 mM、0.5 h) で顕著に減弱した。次に、Mal-βCD 処理による細胞 FCho の減少を詳細に調べるために、1~10 mM Mal-βCD で 0.5 h 処理し、LC/MS で細胞 FCho を定量した。*Npc1* KO 細胞の FCho 量は CHO 細胞の約 3 倍多く存在しており、Mal-βCD 処理により FCho は濃度依存的に培地中に漏出され、細胞 FCho 量は低下した。この傾向は CHO

細胞においても同様であった。続いて、Mal- β CD 処理による ECho 量の変化をコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法で調べた。CHO 細胞では、ECho は FCho の約 50% 存在しているのに対し、*Npc1* KO 細胞では、10% 以下であった。両細胞において、Mal- β CD 処理 (5 mM, 0.5 h) 前後で ECho 量に変化は見られなかった。

(2) Mal- β CD の細胞内への取り込み

CD 類の細胞内での動態については、現在ほとんど知られていない。そこで、*Npc1* KO 細胞、CHO 細胞の Mal- β CD の細胞内への取り込み量を LC/MS/MS で測定した。1~10 mM Mal- β CD で処理 (0.5 h) すると、Mal- β CD は CHO 細胞よりも *Npc1* KO 細胞に、約 2.5 倍多く取り込まれ濃度依存的な増加であった。処理による取り込み量は、0.5 h でほぼ平衡に達した。また、この取り込み量は 4 での処理、Antimycin A, Cytochalasin D の共存下で両細胞ともに著しく低下 (date not shown) したことから、Mal- β CD の細胞内への取り込みは、エネルギー依存性でアクチンの関与が示唆された。LC/MS/MS 測定により、Mal- β CD のマルトース側鎖が加水分解された 6-*O*- α -D-glucosyl- β cyclodextrin (Glc- β CD) が僅かに検出された。そこで、Acarbose (lysosomal α -グルコシダーゼ阻害剤) 共存下での Mal- β CD の取り込みを調べた結果、Glc- β CD は検出されなくなった。この結果より、Mal- β CD は細胞内でリソソームに取り込まれ α -グルコシダーゼにより一部 Glc- β CD に代謝されることが明らかとなった。

(3) Mal- β CD のリソソームへの取り込みとリソソーム FCho 量の変化

動物細胞においてコレステロールは主に 2 つの供給源から獲得される。すなわち、細胞内における生合成とリポタンパク質を介した細胞外からの取り込みである。なかでも低密度リポタンパク質 (LDL) によるコレステロールの輸送は、末梢組織へのコレステロールの供給源として重要な生理的役割を果たしている。LDL 由来コレステロールの細胞内輸送に関しては、LDL は細胞膜上に存在する LDL 受容体を介してエンドサイトーシスにより取り込まれる⁵⁾。LDL に含まれるコレステロールは FCho に比べて ECho が多い。取り込まれた ECho は、初期エンドソームにおいて酸性リパーゼにより加水分解され、FCho となる。その後、FCho は NPC 病の原因遺伝子産物である NPC1 や NPC2 が局在する後期エンドソーム/リソソームに運ばれたのち、細胞膜や小胞体、ミトコンドリア等の各オルガネラに輸送される^{6,7)}。しかしながら、NPC1 や NPC2 が欠損した細胞では、FCho が後期エンドソーム/リソソームに蓄積する。そこで、5 mM Mal- β CD 処理 (0.5 h, 1.5 h, 3 h) による *Npc1* KO 細胞のリソソームの FCho 量の変化とリソソームへの Mal- β CD 取り込みについて調べた。*Npc1*

KO 細胞のリソソームの FCho 量は、CHO 細胞に比べて約 3 倍多かったが、Mal- β CD 処理により FCho は時間依存的に減少し、3 h 後では未処理の約 1/2 に減少した。これに対して、CHO 細胞のリソソームの FCho 量は、Mal- β CD 処理でほとんど減少しなかった。Mal- β CD 処理による細胞 FCho の低下が、*Npc1* KO 細胞と CHO 細胞ではほぼ同程度であったのに対し、リソソーム FCho に対しては、*Npc1* KO 細胞の多量に蓄積した FCho のみを低下させた。一方、リソソーム中の CD 類を分析した結果、Mal- β CD の代謝物である Glc- β CD が時間依存的に増加することが分かった。*Npc1* KO 細胞と CHO 細胞における Mal- β CD の取り込みは 0.5 h でほぼ平衡に達したことから、細胞質からリソソームへの移行には時間を要すると考えられる。リソソーム中の CD 類の検出量は、*Npc1* KO 細胞の方が CHO 細胞よりも約 2 倍多かった。

(4) Mal- β CD 処理細胞からの CD 類と FCho の排出

Mal- β CD で処理すると Mal- β CD は細胞内に取り込まれ、その約 40% が時間経過とともにリソソームに移行し、リソソームの FCho を低下させることが明らかとなった。次に、細胞内に取り込まれた Mal- β CD は細胞内に滞留し続けるのか否か、またその際の FCho の動きについて調べた。Mal- β CD 処理細胞を洗浄後、PBS に再懸濁後、37 でインキュベートし、PBS に排出された CD 類と FCho を、また細胞に残存している CD 類と FCho を測定した。その結果、Mal- β CD 処理 *Npc1* KO 細胞では FCho と CD 類は時間依存的に細胞外に排出され、細胞内の FCho と CD 類の残存量は減少していった。一方、Mal- β CD 処理 CHO 細胞では、FCho は一定量が細胞から排出され、CD 類は時間依存的に排出された。両細胞における排出量を比較すると、FCho は *Npc1* KO 細胞 > CHO 細胞、CD 類は *Npc1* KO 細胞 < CHO 細胞であった。以上の結果から、Mal- β CD による細胞 FCho 量の減少は、FCho - Mal- β CD complex を形成し細胞外に排出されたと考えられる。また、Mal- β CD の排出は、FCho - Mal- β CD complex で排出される以外に Mal- β CD 単独の排出があると考えられる。CHO 細胞ではその割合が高いことから、Mal- β CD を細胞外へ排出する傾向が強く、*Npc1* KO 細胞では Mal- β CD を細胞内に滞留させる傾向が強いことが示唆された。

本研究成果は、NPC 患者にとって Mal- β CD が安全かつ有効な薬物治療に使用されるための重要な基礎資料になると考えられる。

【引用文献】

- 1) Vanier MT et al., Orphanet J. Rare Dis., 5:16, 1-18 (2010).
- 2) Matsuo M et al., Mol. Genet. Metab., 108, 76-81 (2013).
- 3) Kondo Y et al., Mol. Genet. Metab., 118,

214-219 (2016).

4) Higaki K et al., J. Biochem., 129, 875-880 (2001).

5) Brown MS et al., Science, 232, 34-47 (1986)

6) Chang TY et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 22, 129-157 (2006)

7) Ikonen E et al., Nat. Rev. Mo. Cell Biol., 9, 125-138 (2008)

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 3 件)

1. Kondo, Y., H. Tokumaru, Y. Ishitsuka, T. Matsumoto, M. Taguchi, K. Motoyama, T. Higashi, H. Arima, M. Matsuo, K. Higaki, K. Ohno, and T. Irie. In vitro evaluation of 2-hydroxyalkylated β -cyclodextrins as potential therapeutic agents for Niemann-Pick Type C disease. *Mol. Genet. Metab.* **118**: 214-219 (2016)査読あり

2. Tanaka, Y., Y. Yamada, Y. Ishitsuka, M. Matsuo, K. Shiraiishi, K. Wada, Y. Uchio, Y. Kondo, T. Takeo, N. Nakagata, T. Higashi, K. Motoyama, H. Arima, S. Mochinaga, K. Higaki, K. Ohno, and T. Irie. Efficacy of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Niemann-Pick disease type C model mice and its pharmacokinetic analysis in a patient with the disease. *Biol. Pharm. Bull.* **38**: 844-851 (2015)査読あり

3. Yasuyo Okada, Jyun-ichi Nishikawa, Masanori Semma, Atsushi Ichikawa, Role of lipid raft components and actin cytoskeleton in fibronectin-binding, surface expression, and *de novo* synthesis of integrin subunits in PGE₂- or 8-Br-cAMP-stimulated mastocytoma P-815 cells *Biochem. Pharmacol.*, **88**, 364-371 (2014)査読あり

[学会発表](計 9 件)

1. 岡田安代、上田恵梨香、木村夏美、松本渚、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、西川淳一、市川厚：Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、*Npc1* 欠損細胞の 6-O- α -maltosyl- β cyclodextrin によるコレステロールとコレステロールエステルのレベル変化；日本薬学会第 137 年会；2017 年 3 月 25 日東北大学（宮城県・仙台）

2. 山縣美月、近藤悠希、松本彩加、坂田和、石塚洋一、岡田安代、西川淳一、市川厚、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美：ニーマンピック

病 C 型モデル細胞の動態に及ぼすシクロデキストリン誘導体の影響；第 33 回日本薬学会九州支部大会；2016 年 12 月 3 日；鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島）

3. 上田恵梨香、岡田安代、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、市川厚、西川淳一：Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、*Npc1* 欠損細胞における 6-O- α -maltosyl- β cyclodextrin のリソソームへの取り込みとコレステロールレベルへの影響；第 33 回シクロデキストリンシンポジウム；2016 年 9 月 8 日；かがわ国際会議場（香川県・高松）

4. 岡田安代、上田恵梨香、古本奈津子、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、西川淳一、市川厚：6-O- α -Maltosyl- β cyclodextrin による Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、NPC1 欠損細胞のコレステロール輸送関連遺伝子の発現量変化；日本薬学会第 136 年会；2016 年 3 月 29 日；パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

5. 上田恵梨香、岡田安代、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、市川厚、西川淳一：Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、*Npc1* 欠損細胞の 6-O- α -maltosyl- β cyclodextrin によるリソソームへの取り込みとコレステロールレベルの変化；日本薬学会第 136 年会；2016 年 3 月 27 日；パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

6. 松本朋子、近藤悠希、山縣美月、石塚洋一、岡田安代、西川淳一、市川厚、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、入江徹美：Niemann-Pick 病 C 型に対する 2-Hydroxypropyl- β cyclodextrin の作用発現とエンドサイトシスの関連；第 32 回日本薬学会九州支部大会；2015 年 11 月 28 日；九州保健福祉大学（宮崎県・延岡）

7. 上田恵梨香、岡田安代、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、市川厚、西川淳一：Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、*Npc1* 欠損細胞のリソソームへの 6-O- α -maltosyl- β cyclodextrin の取り込み；第 65 回日本薬学会近畿支部大会；2015 年 10 月 17 日；大阪大谷大学薬学部（大阪府・富田林）

8. 岡田安代、上田恵梨香、古本奈津子、西川淳一、徳丸博子、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、市川厚：Niemann-Pick 病 Type C の病態モデル、*Npc1* 欠損細胞における 6-O- α -maltosyl- β

cyclodextrin の取り込みとエンドサイト シ
ス経路の解析；日本薬学会第 135 年会；2015
年 3 月 28 日；デザイン・クリエイティブセ
ンター神戸（兵庫県・神戸）

9. 徳丸博子、近藤悠希、田口真紀子、中島由
佳、松本朋子、石塚洋一、岡田安代、西川淳
二、市川厚、東大志、本山敬一、有馬英俊、
松尾宗明、大野耕策、檜垣克美、入江徹美：
Niemann-Pick 病 C 型に対する各種
Cyclodextrin 誘導体の有効性・安全性 in Vitro
評価；第 31 回日本薬学会九州支部大会；2014
年 12 月 7 日；第一薬科大学（宮崎県・延岡）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 安代 (OKADA, yasuyo)
武庫川女子大学・薬学部・講師
研究者番号：70211117

(2)研究分担者

市川 厚 (ICHIKAWA, atsusi)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号：10025695

西川 淳一 (Nisikawa, jyunichi)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号：90218131

竹山 志朱代 (TAKEYAMA, shizuyo)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号：80411982

入江 徹美 (IRIE, tetsumi)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：60150546

(3)連携研究者

馬場 健史 (BAMBA, takeshi)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：10432444

(4)研究協力者

上田 恵梨香 (UEDA, erika)