

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659262

研究課題名(和文)新規リソソーム指向性トラフィック制御化合物の探索と治療法開発への応用

研究課題名(英文)Discovery of novel compounds regulating traffic to lysosomes and application for development of therapeutics

研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00184656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム性 β -Hexosaminidase (Hex) Aの遺伝的欠損に基づく脳内GM2ガングリオシド(GM2)蓄積症における細胞内トラフィック異常の解明と細胞外からの組換えHexのリソソームへの輸送促進技術の開発研究を実施した。また世界に先駆けて患者体細胞からのiPS細胞の樹立と神経細胞への分化誘導、蓄積GM2分解に基づく組換えHexの補充効果の評価に成功した。さらに人工蛍光基質Rhodol β -GlcNAcや酸性pH活性化蛍光プローブRh-PMを用い、疾患モデル細胞及びマウス脳内に補充された組換えHexのin vivoイメージング法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We studied on intracellular traffic abnormality in lysosomal beta-hexosaminidase (Hex) deficiencies including Tay-Sachs disease (TSD) and Sandhoff diseases (SD) to develop novel enzyme replacement therapy based on techniques to promote delivery of recombinant Hex to lysosomes when extracellularly administrated. We developed modified Hex with high content of mannose 6-phosphate (M6P) residues, which were efficiently incorporated by disease-model cultured cells via cell surface M6P receptors. In addition, we established an iPS cell line derived from a TSD patient, and examined conditions under which neural cells including neural stem cells (NSC) and neural progenitor cells (NPC) could be induced from the TSD iPS cells. Furthermore, we developed novel fluorescent probes including Rhodol beta-GlcNAc as an artificial substrate for intracellular Hex activity and acidic pH-activatable fluorescent Rh-PM for in vivo imaging to detect lysosomal distribution of recombinant Hex.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：リソソーム病 in vivoイメージング 酵素トラフィック 疾患特異的iPS細胞 酵素補充療法 GM2ガングリオシドーシス ドラッグデリバリー 酸性pH活性化蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

GM2 ガングリオシド (GM2) の分解代謝に関わるリソソーム酵素 β -Hexosaminidase (Hex) A ($\alpha\beta$ ヘテロ二量体) を構成する α 及び β 鎖をコードする *HEXA* 及び *HEXB* の遺伝子変異が原因で、脳内 GM2 の過剰蓄積と中枢神経症状を伴う常染色体劣性遺伝病 Tay-Sachs 病 (TSD) と Sandhoff 病 (SD) が発症する。従来、これらの GM2 蓄積症に対して有効な根本治療薬はない。しかし近年、ムコ多糖症 1 型などの末梢症状を主症状とする一部のリソソーム病 (6 種) に対し、細胞表面の Mannose 6-phosphate (M6P) レセプターをデリバリー標的として哺乳類培養細胞で生産する組換えヒト酵素を定期的に静脈内投与する酵素補充治療法などが臨床応用されている。また血液脳関門を透過できない組換え酵素を脳脊髄液内に投与する治験が中枢症状を示すリソソーム病に対して進行中である。そこで本研究では、Hex 欠損症 (TSD や SD) に対する新しい酵素補充療法と患者由来 iPS 細胞を利用する新規評価系の構築を目指し研究を進めた。

2. 研究成果の目的

(1) 現行のリソソーム病に対する酵素補充療法は、哺乳類培養細胞株で発現するリソソーム酵素に特異的に付加される末端 M6P 含有糖鎖と、患者の各組織細胞表面に存在するカチオン非依存性 M6P レセプターとの結合を介した細胞内取り込みとリソソームへの輸送原理に基いている。しかし患者細胞内ではリソソームへのトラフィック停滞などの異常や当該組換え酵素の定期・継続的な静脈内投与による中和抗体産生などの副作用が惹起される。これらの問題を克服するためには、治療用酵素の細胞内取り込み及びリソソームへの輸送効率や体内安定性を高め、一回有効投与量を減少させる必要がある。本研究では、HexA ($\alpha\beta$ ヘテロ二量体) を構成する β 鎖の一部を α 鎖型に改変し、GM2 分解能と高い熱安定性を示し、かつ TSD

患者に対しては低抗原性が期待できる改変型ヒト HexB ($\beta'\beta'$ ホモ二量体) を恒常発現する哺乳類細胞 CHO 株を樹立し、培養液中に分泌される組換え Hex の精製法を確立する。また徳島大疾患酵素学研究センターの真板との連携で、精製酵素の X 線結晶構造を解明する。

(2) 中枢神経症状を伴う GM2 蓄積症患者の脳組織を臨床検体として基礎研究に利用することは倫理的に不可能であり、また疾患モデルマウスでは糖脂質分解代謝経路が異なるなどの種差に基づく研究上の障害がある。そこで利用可能な患者由来皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、さらに神経系細胞を分化誘導して、ヒト神経系に対する組換え Hex の有効性・安全性を評価するシステムを構築する。

(3) GM2 蓄積症患者由来培養細胞や疾患モデルマウス脳内での、リソソームへのトラフィック異常メカニズムを解明し、また細胞外から投与する組換え酵素のリソソームへのデリバリーを追跡、さらに輸送効率を高める化合物のスクリーニング系の開発を目的として、連携研究者である東京大院・医学系研究科の浦野らが開発した、Hex に対する人工蛍光基質や酸性 pH 活性化蛍光プローブを用いる *in vivo* 蛍光イメージング技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト野生型 HexA ($\alpha\beta$) と HexB ($\beta\beta$ ホモ二量体) の X 線結晶構造を基に、 β 鎖のアミノ酸残基の一部を α 型に改変した *HEXB* 遺伝子を恒常発現する CHO 細胞株を樹立し、培養上清から、末端 M6P 含有糖鎖をもつ改変型ヒト HexB を、色素吸着、Phos-tag 及びイオン交換カラムクロマトグラフィー等を用いて精製し、GM2 蓄積症モデルに対する補充効果を検討する。

(2) GM2 蓄積症患者由来皮膚線維芽細胞に対し、センダイウイルスベクターを用いて 4 種のリプロ

グラミング因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* 及び *c-MYC*) を導入して iPS 細胞株の樹立を試み、未分化マーカー (*NANOG*, *SSEA-4* 等) の発現、三胚葉系細胞への分化誘導及びテラトマ形成を指標にする多分化能を評価する。また Neural rosette または Neurosphere を経由する神経系細胞への分化誘導法を構築し、GM2 等の基質蓄積や組換えヒト HexA 及び改変型 HexB の補充効果を検討する。

(3) 細胞外から取り込まれた組換え Hex のリソソームへの輸送を可視化するため、疾患モデル細胞の培養液に人工蛍光基質 Rhodol β -GlcNAc 及び酸性 pH 活性化プローブ Rh-PM で標識した組換えヒト Hex を投与し、細胞内に取り込まれ、さらに酸性 pH のリソソーム内へと輸送された Hex 活性のイメージングを行う。

4. 研究成果

(1) β 鎖の一部を α 鎖型に改変したヒト HexB を恒常発現する CHO 細胞株は、培養上清 1L 当たり約 0.1g の前駆体タンパクの産生能を有し、3段階クロマトグラフィーにより培養上清 1L から約 34mg の精製と X 線結晶構造の解明に成功した。

また患者組織内への取り込みに必要な末端 M6P 残基を含む N 型糖鎖をもつ改変型 HexB のみを精製する方法を確立し、精製酵素を患者由来培養線維芽細胞や疾患モデルマウス脳室内に一回投与したところ、標的細胞内に取り込まれリソソームまで輸送され、GM2 やアシアロ GM2 などの蓄積基質の減少、またモデルマウスの運動機能低下の遅延や寿命の延長などの有効性を示した。

(2) センダイウイルスベクターを用いて4種の山中因子を GM2 蓄積症患者由来皮膚線維芽細胞に導入し、未分化マーカーとしての内因性の *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *NANOG*, *c-MYC* 及び *SSEA4* を恒常発現し、また3胚葉系細胞への分化能、SCID マウス精巢内移植によりテラトマ形成能をもつ患者由来 iPS 細胞株の樹立に成功した

(図1)

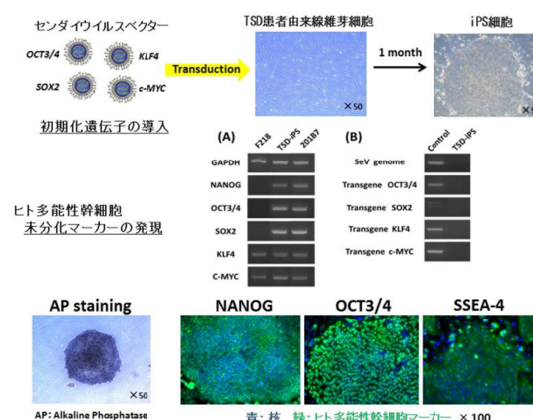


図1. TSD患者由来線維芽細胞からのiPS細胞の樹立

また同患者 iPS 細胞から、胚葉体、Neural Rosette 形成及び神経前駆細胞を経て、成熟神経細胞を誘導する分化条件を確立した。分化誘導 8 週後の患者由来神経細胞では GM2 の蓄積が顕著であったが、高 M6P 含有ヒト HexA を補充すると、神経細胞表面の M6P レセプターとの結合を介して細胞内に取り込まれ、Hex 活性の回復と蓄積 GM2 を減少させる(有効性を示す)ことが明らかになった。

(3) 健常者及びGM2蓄積症患者由来線維芽細胞の培養液に人工蛍光基質Rhodol β -GlcNAを添加し一定時間負荷することにより、正常細胞では基質分解が起こり、強い細胞内蛍光が観察された。一方、Hex活性がほぼ完全欠損するSD細胞では蛍光はほとんど検出されなかった。しかし組換え Hexを補充するとリソソーム内へ輸送され、基質分解に基づく蛍光が検出された。

また酸性pH活性化プローブRh-PMで標識した改変型ヒトHexBを投与すると、24時間以内に顆粒状蛍光が観察され、酸性pHのリソソームへのHex輸送のイメージングが可能になった。改変型 HexBをSDマウスの脳室内に投与した場合にも、脳全体へのHex活性の分布が観察された。

さらにSDマウス骨髄由来単球系細胞株における PI3 kinase (PI3K) の発現亢進とGM2分解能をもつ改変型HexBのリソソームへの輸送による正常化を明らかにし、GM2蓄積症由来単球系細胞にお

けるPI3Kシグナリングの異常と細胞外からのリソソームへのHexのトラフィッキングまたは蓄積基質分解との相関が示された。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計8件)

M.M. Rahman, S. Kitao, D. Tsuji, K. Suzuki, K. Matsuoka, F. Matsuzawa, S. Aikawa, K. Itoh. Inhibitory effects and specificity of synthetic sialyldendrimers toward recombinant human cytosolic sialidase 2 (NEU2). *Glycobiol.* (査読有) vol.23, pp.495-504, 2013. DOI: 10.1093/glycob/cws221.

K. Sato, A. Shigenaga, K. Kitakaze, K. Sakamoto, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka, Chemical synthesis of biologically active monoglycosylated GM2-activator protein analog using *N*-sulfanylethylanilide peptide, *Angew. Chem. Int. Ed.*(査読有) vol. 52, 2013, pp. 7855-7859. DOI:10.1002/anie.201303390

S. Hitaoka, Y. Shibata, H. Matoba, A. Kawano, M. Harada, M.M. Rahman, D. Tsuji, T. Hirokawa, K. Itoh, T. Yoshida, H. Chuman. Modeling of Human Neuraminidase-1 and Its Validation by LERE-Correlation Analysis. *Chem-Bio Informatics Journal*, 13, 30-44 (2013) DOI:10.1273/cbij.13.30

Y. Kikuchi, N. Yamazaki, N. Tarashima, K. Furukawa, Y. Takiguchi, K. Itoh and N. Minakawa : Gene suppression via U1 small nuclear RNA interference (U1i) machinery using oligonucleotides containing 2'-modified-4'-thionucleosides, *Bioorg. & Medicin. Chem.* (査読有) vol.21,

pp.5292-5296, 2013. DOI:

10.1016/j.bmc.2013.06.023

T. Harada, S. Ozaki, A. Oda, D. Tsuji, A. Ikegame, M. Iwasa, K. Udaka, S. Fujii, S. Nakamura, H. Miki, K. Kagawa, Y. Kuroda, S. Kawai, K. Itoh, H. Yamada-Okabe, T. Matsumoto, M. Abe (2013). Combination with a defucosylated anti-HM1.24 monoclonal antibody plus lenalidomide induces marked ADCC against myeloma cells and their progenitors. *PLoS One.*(査読有) vol.26;8(12): e83905. DOI: 10.1371/journal.pone.0083905.

【学会発表】(計49件)

K. Itoh, D. Tsuji, M. Ikuo, K. Kitakaze, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, E. Sugiyama, M. Setou, M. Yuzaki, H. Sakuraba. Molecular therapy and evaluation for neurodegenerative GM2 gangliosidoses. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014", Tokyo Medical and Dental University, Tokyo(Japan) 2014.3.16-17 (国際・ポスター)

K. Kitakaze, D. Asanuma, M. Kamiya, D. Tsuji, M. Ikuo, Y. Urano, H. Sakuraba, K. Itoh. Replacement effects of human modified lysosomal β -hexosaminidase B on Tay-Sachs and Sandhoff disease models and imaging with Novel pH-activatable fluorescent probes imaging of endocytosed lysosomal enzymes with pH-activatable fluorescent probe and evaluation of enzyme replacement effects on lysosomal storage diseases. The 10th Annual World Symposium 2014, The Grand Hyatt One Market Place, SanDiego, CA(USA)

2014.2.14-16 (国際・口頭発表)
K. Itoh, D. Tsuji, M. Ikuo, K. Kitakaze, S. Nishioka, I. Imataki, S. Yamaguchi, Y. Chiba, H. Sakuraba, I. Kobayashi, H. Sezutsu, H. Machii. Establishment of patient-derived iPS cells with neurodegenerative lysosomal storage diseases and application for evaluating lysosomal enzyme replacement effects on differentiated neural cells. The IUBMB 10th International Symposium on Cell Surface Macromolecules, Saha ainstitute of Nuclear,Kolkata(India), 2014.1.20-24. (国際・招待講演)

K. Kitakaze, M. Ikuo, E. Sugiyama, D. Asanuma, M. Kamiya, M. Setou, Y. Urano, H. Sakuraba, K. Itoh., Imaging of lysosomal enzyme replacement effects with a novel fluorescent probe and imaging mass spectrometry. International Symposium on Glyco-Neuroscience. Awaji-yumebutai, Awaji-shima, Hyougo(Japan), 2014.1.9-11 (国際・ポスター)

K. Kitakaze, D. Tsuji, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Sakuraba, K. Itoh. Evaluation of enzyme replacement effect and development of purified system to obtain recombinant lysosomal enzyme with M6P-type glycan. Gordon Research Conference (Lysosomal Diseases), Lucca, Barga(Italy) 2013.4.14 (国際・ポスター)

K. Itoh, D. Tsuji, K. Namba, S. Yamaguchi, K. Kitakaze, I. Imataki, N. Ishimaru, H. Sakuraba. Establishment of Human Neural Cell Culture Systems Induced from iPS Cells Derived from Tay-Sachs Disease

Patient for Drug Discovery. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) /The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Tokyo Bay Hotel club resoat, Chiba(Japan) 2013.11.27-29 (国際・口頭)

【図書】(計3件)

伊藤 孝司 : バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発 新規生産基材を利用した組換えリソソーム病治療薬の開発 (第4章)
株式会社シーエムシー出版 監修:山口照英
東京, 252(45,55) 2012年4月 他

【産業財産権】

出願状況(計1件)

名称:ヘキササミニダーゼBの基質特異性を交換し、かつ、プロテアーゼ抵抗性を付与した新規高機能型酵素

発明者:伊藤孝司 辻大輔 桜庭均

権利者:徳島大学

種類:特許

番号:PCT/JP2013/078179

出願年月日:2013年10月17日

国内外の別:外国

6.研究組織

(1)研究代表者

伊藤 孝司 (ITOH, Kohji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号:00184656