

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293120

研究課題名(和文)ネオグライコバイオロジクスの創製とリソソーム病治療薬開発への応用

研究課題名(英文)Development of neoglycobiologics and application for drug discovery for lysosomal diseases

研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：00184656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム病に対する新規根本治療法の開発を目指し、リソソーム性 α -ヘキソサニミターゼA(HexA)の欠損に基づくGM2ガングリオシド蓄積症(テイ-サックス病)に対し、組換えヒト改変型HexBを創製・精製した。またHexA欠損モデルマウスの脳室内投与により、脳内GM2の減少、運動機能の改善及び寿命を延長させることに成功した。

ヒト α -イズロニダーゼ(IDUA)遺伝子を絹糸腺で高発現するTgカイコを作製し、絹糸腺及び繭から精製したIDUAに対し、末端マンノース6-リン酸(M6P)含有合成糖鎖を付加する技術を開発した。ネオグライコは、M6Pレセプターを介してIDUA欠損細胞に対し補充効果を示した。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel enzyme replacement therapy for Tay-Sachs disease as a lysosomal disease, caused by lysosomal beta-hexosaminidase A (HexA) associated with excessive accumulation of GM2 ganglioside (GM2) and neurological symptoms, a novel recombinant human modified HexB (mod2B) was developed and purified. The intracerebroventricularly administered mod2B had therapeutic effects on restoration of HexA activity, reduction of GM2 accumulated in brain regions, improvement of motor dysfunction and prolongation of life span of HexA-deficient model mice. We succeeded in producing transgenic silkworm strain overexpressing the human alpha-iduronidase (IDUA) gene in the silk glands, and developed a novel transglycosylation technology to attach the synthetic terminal mannose-6-phosphate (M6P)-carrying N-glycans to the IDUA purified from silk glands and cocoons. The neoglyco-IDUA was taken up by the fibroblasts with IDUA deficiency and reduced the accumulated substrates including heparan sulfates.

研究分野：病態生化学、分子治療学

キーワード：バイオ医薬品 糖タンパク製剤 リソソーム病 ドラッグデリバリー 糖鎖工学

1. 研究開始当初の背景

リソソーム病(ライソソーム病)は、細胞内外の生体分子の分解代謝に関わるリソソーム酵素の遺伝的欠損に基づき、患者の臓器内で基質が過剰に蓄積し、多様な全身症状を引き起こす先天性代謝異常症である。疾患としては40種類ほど存在し、発生頻度は1~10万人に一人程度の希少疾患であるが、厚生労働省では特定疾患「難病」に指定されている。1990年以降、哺乳動物由来培養細胞株で製造する組換えヒトリソソーム酵素製剤を、1~2週間に1回、患者の静脈内に投与する酵素補充療法(Enzyme Replacement Therapy, ERT)が実用化され、国内ではゴーシェ病やファブリー病をはじめ、8種類の疾患に対し9種類の治療薬が臨床応用されている。このリソソーム病のERTでは、組換えヒトリソソーム酵素に付加される糖鎖の末端マンノース6-リン酸(M6P)やマンノース(Man)残基が、患者の様々な臓器を構成する細胞表面に存在する、M6Pレセプター(M6PR)またはManレセプター(ManR, 主にマクロファージや白血球などに分布)と結合を介して、組換え酵素が細胞内に取り込まれてリソソームまで輸送され、蓄積基質を分解するため、治療効果が現れるのが特徴である。しかし現行のERTでは、患者1人の治療に年間3,000万円以上の高額な医療費がかかる。またリソソーム病の半数以上は中枢神経症状を示すが、静脈内投与とされた酵素は、血液脳関門があるため、血液中から脳実質内まで到達しにくく、中枢神経症状に対する治療効果は見込めない。この問題の解決に向けて酵素製剤を脳脊髄液中に投与するERTが開発され、複数の臨床試験・治験が世界で実施されている。さらに生来、当該酵素を持たない患者に治療用酵素を投与すると、異物として認識され、免疫応答やアレルギーなどの副作用が現れるため、免疫原性の低い高機能型酵素の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに治療薬がない、中枢神経症状を伴うリソソーム病である、 α -ヘキサミンダーゼ(HexA, 二量体)欠損症(テイ-サックス病、ザンドホッフ病)、カテプシンA(CTSA)欠損症(ガラクトシアリドーシス、GS)、及び β -イズロニダーゼ(IDUA)欠損症(ムコ多糖症1型)に対する新規高機能型ネオグライコバイオロジクス(人工糖タンパク質性バイオ医薬品)を開発する目的で、

(1) ヒトHexA及びHexB(二量体)のX線結晶構造情報とin silicoデザインに基づき、GM2 ガングリオシド(GM2)分解能をもつ改変型HexBを創製し、哺乳動物CHO細胞株で高発現した組換え酵素の分子特性と疾患モデルに対する有効性を評価する。

(2) 高分子量糖タンパク質バイオ医薬品の新規生産基材として、日本発のトランスジェニック(Tg)カイコに着目し、絹糸腺でヒト

CTSA及びIDUAを高発現するTgカイコを作製し、絹糸腺または繭から各酵素を精製して分子特性を解明する。

(3) N型糖鎖のコア構造を認識するエンドグリコシダーゼMなどのトランスグリコシレーション活性と、末端ManまたはM6P含有N型糖鎖を利用し、Tgカイコ絹糸腺または繭から精製したCTSAまたはIDUAに対し機能性糖鎖を付加したネオグライコ酵素を創製し、疾患モデルを用いて有効性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 徳島大学先端酵素学研究所、産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センターとの共同で、X線結晶構造解析や構造情報に基づきin silicoデザインにより、Hex鎖の機能(GM2分解能及びGM2活性化タンパク質との結合能)をもつ改変型Hex鎖をコードする遺伝子を構築し、哺乳類CHO細胞への導入株の培養上清から、組換え改変型HexBを精製した。

(2) 中枢神経症状を伴うHexA欠損症モデルとして、マウスHexbのノックアウトマウスの脳室内に改変型HexBを投与し、脳内HexA活性(人工蛍光基質分解活性)の回復と蛍光イメージング、蓄積GM2のMSイメージングに関する分布解析と減少の評価を行った。

(3) HexA欠損症の一種であるテイ-サックス病(TSD)患者由来皮膚繊維芽細胞からiPS細胞を樹立し、神経細胞への分化誘導条件を確立した。また精製改変型HexBを培養液に投与し、補充効果を検討した。

(4) 農研機構・カイコ機能改変技術開発ユニットとの共同で、2種のリソソーム病、ガラクトシアリドーシス(GS)とムコ多糖症1型(MPSI)の責任酵素である、ヒトカテプシンA(CTSA)とイズロニダーゼ(IDUA)を絹糸腺で発現するTgカイコ系統(CTSA-Tg及びIDUA-Tg)を作製した。

(5) 群馬県蚕糸技術センター及び前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合との共同で、ヒトCTSA-やIDUA-Tgカイコ(各々約1万頭)の中部絹糸腺を採取し、凍結保存した。中部絹糸腺の抽出液を、レクチン(ConA)アフィニティー、疎水性(Butyl)及び陽イオン交換体(SP)などのクロマトグラフィーを利用し、酵素活性をもつ成熟型CTSA及びIDUAを精製した。また中性緩衝液を用い、各Tgカイコの繭からCTSA前駆体及び活性型IDUAを抽出し、疎水性(Butyl)及び陽イオン交換体(SP)などのクロマトグラフィーにより精製した。

(6) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部との共同で、中部絹糸腺から精製した成熟型CTSA及び活性型IDUA、また繭から精製したCTSA前駆体及び活性型IDUAに付加されたN型糖鎖構造を解析した。

(7) 中部絹糸腺及び繭から精製した成熟型CTSA、活性型IDUA及びCTSA前駆体を蛍

株に投与すると、ManR との結合を介して取り込まれ、リソソームまで輸送されることが明らかになった。

CTSA-Tg カイコの繭から精製したヒト CTSA 前駆体タンパクを、マウス Ctsa 欠損 GS モデルマウスの脳室内に投与 (1mg/kg 体重)し、脳内ミクログリアの活性化を抑制することができた。

(3) エンドグリコシダーゼのトランスグリコシレーション作用を利用するネオグライコ酵素の創製と有効性評価

エンドグリコシダーゼ M 改変体

(endoMN175Q) と、末端 M6P 含有合成糖鎖誘導体 M5(6P2)GN2-MP を用い、IDUA-Tg カイコの中中部絹糸腺から精製した IDUA に付加されている N 型糖鎖の一部と、末端 M6P 含有合成糖鎖とをすげ替えた人工ヒト IDUA の作製に成功した。このネオグライコ IDUA を、その欠損症である MPS1 患者由来の繊維芽細胞の培養液に投与したところ、細胞表面の M6PR との結合を介して細胞内に取り込まれ、リソソームまで輸送されることを明らかにした。以上の結果から、

(4) -ヘキササミニダーゼ (HexA, 二量体) の遺伝的欠損に基づき、GM2 ガングリオシド (GM2) の脳内蓄積と中枢神経症状を伴うテイ-サックス病及びサンドホッフ病のモデル系に対し、GM2 分解能とプロテアーゼ抵抗性をもつ改変型 HexB の有効性を示し、脳室内酵素補充療法や遺伝子治療法のシーズ候補として開発できた。

(5) ヒト CTSA や IDUA 遺伝子を絹糸腺で高発現する Tg カイコを作製し、その中中部権威線や繭から、簡便に、機能を保持し、昆虫特異的な糖鎖構造をもたない CTSA (繭 50 個から 2.3mg) や IDUA (12mg/1000 頭分の絹糸腺) を精製することができた。一人のリソソーム病患者を 1 年間治療するために必要な酵素タンパク量は約 1g 程度であるが、年間 2 万頭の IDUA-Tg カイコ由来の精製酵素で賄えることができ、低コストで低免疫原性の酵素製剤の製造が可能と考えられる。

(6) Tg カイコ絹糸腺または繭由来のヒト CTSA や IDUA は、単球/マクロファージ及びミクログリア細胞表面の、マンノース受容体 (レセプター) (ManR) を介して取り込まれ、リソソームまで輸送された。従って、ManR をデリバリー標的する単球/マクロファージやミクログリアに対する補充効果が期待できる。

(7) エンドグリコシダーゼ M 改変体 (endoMN175Q) と、末端 M6P 含有合成糖鎖誘導体 M5(6P2)GN2-MP を用い、Tg カイコ由来精製ヒトリソソーム酵素に付加される N 型糖鎖を挿げ替える糖鎖工学技術を用いることにより、Tg カイコで製造される組換えヒトリソソーム酵素の有効性を拡大できると考えられる。今後、組換えヒトリソソーム酵素を含む Tg カイコの繭が、GMP グレードの医薬品原材料の基準を満たし、精製したヒト

有用タンパク質製剤の中に、ヒトに対して病原体などが含まれていないことや、カイコの絹糸腺や繭などに由来する宿主由来タンパク質などの混入が基準値以下であれば、Tg カイコを新規生産基材として製造する、抗体医薬品や組換えヒトリソソーム酵素製剤などの糖タンパク質性バイオ医薬品が実現すると期待される。

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 14 件)

1. Ogawa Y, Sano T, Irisa M, Kodama T, Saito T, Furusawa E, Kaizu K, Yanagi Y, Tsukimura T, Togawa T, Yamanaka S, Itoh K, Sakuraba H, *Oishi K. FcR γ -dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice. *Sci Rep* 7, 40518, 2017. 査読有
2. Kitakaze K, Mizutani Y, Sugiyama, Tasaki C, Tsuji D, Maita N, Hirokawa T, Asanuma D, Kamiya M, Sato K, Setou M, Urano Y, Togawa T, Otaka A, Sakuraba H, *Itoh K. Protease-resistant modified human β -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest* 126, 1691–1703, 2016. 査読有
3. Combined replacement effects of human modified β -hexosaminidase B and GM2 activator protein on GM2 gangliosidosis fibroblasts. Kitakaze K, Tasaki C, Tajima Y, Hirokawa T, Tsuji D, Sakuraba H, *Itoh K. *Biochem Biophys Rep* 7, 157-163, 2016. 査読有
4. Kawashita E, Tsuji D, Kanno Y, Tsuchida K, *Itoh K. Enhancement of uridine diphosphate-induced production of macrophage inflammatory protein-1 alpha in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J Inher Metab Dis Rep* 28, 85-93, 2016. 査読有
5. Tailored synthesis of 162-residue S-monoglycosylated GM2-activator protein (GM2AP) analogues that allows access to protein library. Nakamura T, Sato K, Naruse N, Kitakaze K, Inokuma T, Hirokawa T, Akira Shigenaga A, Itoh K, *Otaka A. *ChemBioChem* 17, 1986-1992, 2016. 査読有
6. Morisaki T, Denda M, Yamamoto Jun, Tsuji D, Itoh K, Inokuma T, Shigenaga A, *Otaka A. An N-Sulfanylethylanilide-based traceable linker for enrichment and selective labelling of target proteins.

- Chem Commun* 52, 6911–6913, 2016. 査読有
7. *Kohji Itoh, Kobayashi Isao, Nishioka So-ichiro, Sezutsu Hideki, Machii Hiroaki and Tamura Toshiki : Recent progress in development of transgenic silkworms overexpressing recombinant human proteins with therapeutic potential in silk glands, *Drug Discoveries & Therapeutics*, Vol.10, No.1, pp.34–39, Feb. 2016. 査読有
 8. Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, Itoh K, Harada T, Horikawa K, Teramachi J, Miki H, Matsumoto T, *Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation. *Oncotarget* 6, 33568-33586, 2015 査読有
 9. Rahman MM, Hirokawa T, Tsuji D, Tsukimoto J, Hitaoka S, Chuman H, *Itoh K. Novel pH-dependent regulation of human cytosolic sialidase 2 (NEU2) activities by siastatin B and structural prediction of NEU2/siastatin B complex. *Biochem Biophys Rep* 4, 234-242, 2015. 査読有
 10. Sato K, Kitakaze K, Nakamura T, Naruse N, Aihara K, Shigenaga A, Inokuma T, Tsuji D, Itoh K, *Otaka A. Total chemical synthesis of monoglycosylated GM2 ganglioside activator using a novel cysteine surrogate. *Chem Comm* 51, 9946-9948, 2015. 査読有
 11. Hiasa M, Jumpei T, Oda A, Amachi R, Harada T, Nakamura S, Miki H, Fujii S, Kagawa K, Watanabe K, Endo I, Kuroda Y, Yoneda T, Tsuji D, Nakao M, Tanaka E, Hamada K, Sano S, Itoh K, Matsumoto T, *Abe M. Pim-2 kinase is an important target of treatment for tumor progression and bone loss in myeloma. *Leukemia* 29, 207-217, 2015. 査読有
 12. Tsuda Y, Shigenaga A, Kohei T, Denda M, Sato K, Kitakaze K, Nakamura T, Inokuma T, Itoh K, *Otaka A. Development of a chemical methodology for the preparation of peptide thioesters applicable to naturally occurring peptides using a sequential quadruple acyl transfer system. *ChemistryOpen* 4, 448-452, 2015. 査読有
 13. Gallat FX, Matsugaki N, Coussens NP, Yagi KJ, Boudes M, Higashi T, Tsuji D, Tatano Y, Suzuki M, Mizohata E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Park J, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nango E, Itoh K, Coulibaly F, Tobe S, Ramaswamy S, Stay B, Iwata S, *Chavas LM. In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130497, 2014. 査読有
 14. *Fukuishi N, Murakami S, Ohno A, Yamanaka N, Matsui N, Fukutsuji K, Yamada S, Itoh K, Akagi M. Does β -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of β -hexosaminidase in mast cell granules. *J Immunol* 193,1886-1894, 2014. 査読有
- [学会発表](計15件)
1. 日高朋, 西岡宗一郎, 月本準, 田中優希, 近藤まり, 小林功, 笠嶋めぐみ, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 伊藤孝司: トランスジェニックカイコ繭由来 CTSA の有効性の検討, 日本薬学会第 137 年会, 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 2017.3.24
 2. 伊藤孝司: 組換えカイコ繭由来ライソゾーム病治療薬の開発(招待講演), 日本薬学会第 137 年会一般シンポジウム. 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 2017.3.24
 3. Kohji Itoh, Isao Kobayashi, So-ichiro Nishioka, Tomo Hidaka, Daisuke Tsuji, Hideki Sezutsu. A transgenic silkworm overexpressing human lysosomal enzyme as a novel resource for producing recombinant glycobiotics and its application to development of enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases, Platform presentation, 13TH Annual WORLD Symposium 2017TM, Manchester Grand Hyatt, San Diego, CA, USA, 2017.2.15 (招待講演とポスター)
 4. 伊藤孝司: エンドグリコシダーゼを用いるグライコエンジニアリングの進展と課題, 第 35 回日本糖質学会年会, 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 2016.9.26
 5. 伊藤孝司, 月本準, 東哲也, 辻大輔, 真板宣夫. ヒトリソゾーム性シアリダーゼ (NEU1) の in vivo 結晶化と細胞応答及び応用(招待講演), 日本生化学会フォーラム 3F10, 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 2016.9.26
 6. 伊藤孝司: 中枢神経症状を伴うライソゾーム病の治療法開発を目指して(招待講演), 日本ムコ多糖症研究会・日本ムコ多糖症患者家族の会設立 30 周年記念合同シンポジウム, 東京都墨田区, 両

- 国第一ホテル, 2016.9.17
7. 伊藤孝司: 神経難病としての糖鎖蓄積症モデル系の構築と治療法開発への応用(招待講演), 第57回日本生化学会中国・四国支部例会, 高知大学医学部, 高知県南国市, 2016.5.27
 8. 辻大輔, 山口沙恵香, 本窪田絢加, 水谷安通, 伊藤孝司: GM2 ガングリオシドーシス病患者由来 iPS 細胞を用いた神経系病態モデルの構築及び病態シグナル解析, 日本薬学会第136年会(横浜), パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2016.3.27
 9. 北風圭介, 水谷安通, 杉山栄二, 真板宣夫, 広川貴次, 瀬藤光利, 櫻庭均, 伊藤孝司: 改変型ヒト-Hexosaminidase の GM2 蓄積症モデルに対する治療効果の評価, BMB2015 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場, 兵庫県神戸市, 2015.12.1
 10. 伊藤孝司, 西岡宗一郎, 辻大輔, 東哲也, 真板宣夫, 小林功, 瀬筒秀樹, 湯本史明, 原園景, 石井明子, 川崎ナナ: 新規組換えリソソーム酵素の創製とリソソーム病治療への応用(招待講演), 第15回蛋白質科学学会年会, あわぎんホール, 徳島県徳島市, 2015.6.24.
 11. 伊藤孝司: 組換えカイコを用いるネオグライコバイオロジクスの創製(招待講演), 日本薬学会第135年会, 神戸学院大学, 兵庫県神戸市, 2015.3.26
 12. Kitakaze Keisuke, Tasaki Chikako, Mizutani Yasumichi, Sugiyama Eiji, Mariko Ikuo, kamiya Mako, Setou Mitsutoshi, Urano Yasuteru and Kohji Itoh: Development of protease-resistant modified human beta-hexosaminidase B and evaluation of intracerebroventricular replacement effects on GM2 gangliosidosis model mice. The 11th Annual World Symposium 2015, Manchester Grand Hyatt, Orland, Florida, USA, 2015.2.10
 13. 伊藤孝司: 糖タンパク医薬品の創製に向けた糖鎖改変技術(招待講演), 第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 東京医科歯科大学, 東京都文京区, 2014.12.4
 14. 西岡宗一郎, 小林功, 辻大輔, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東哲也, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: 組み換えカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシン A の分子特性とエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変, 第33回日本糖質学会年会, 名古屋大学豊田講堂, 愛知県豊田市, 2014.8.10
 15. 伊藤孝司: 中枢神経変性を伴うリソソ

ーム病に対する脳指向性治療薬と新規評価系の開発(招待講演), Biotech2014, 東京ビックサイト, 東京都江東区, 2014.5.15

〔図書〕(計 2件)

伊藤孝司: 別冊新領域別症候群シリーズ神経症候群(第2版)VI - その他の神経疾患を含めて - ガラクトシアリドーシス, 日本臨牀社, 東京, 2014年12月.(909)

伊藤孝司: 別冊新領域別症候群シリーズ神経症候群(第2版)VI - その他の神経疾患を含めて - シアリドーシス, 日本臨牀社, 東京, 2014年12月.(909)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: ヒト -ヘキササミニダーゼ B の基質特異性を変換し、且つ、プロテアーゼ抵抗性を付与した新規高機能酵素
発明者: 伊藤孝司, 櫻庭均, 辻大輔
権利者: 国立大学法人徳島大学、学校法人明治薬科大学、LSIP ファンド運営合同会社

種類: 特願・指定国移行

番号: 特願 2014-542171

出願年月日: 2013/10/17

国内外の別: WO 2014/061735、日本(特願 2014-542171)、米国(US 14/436,833)、欧州(EP 13846643.8)、カナダ(CA 2888628)、ロシア(RU 2015118580)、イスラエル(IL 238343)に移行

名称: マンノース-6-リン酸基含有糖蛋白質の製造方法、及び蛍光基結合型マンノース-6-リン酸基含有糖蛋白質の細胞内分布を検出する方法

発明者: 伊藤孝司, 西岡宗一郎, 松崎祐二, 飯野健太, 瀬筒秀樹, 小林功

権利者: 国立大学法人徳島大学, 東京化成工業株, 国立研究開発法人農業・食品総合研究機構 生物機能利用研究部門

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2017/13322

出願年月日: 2017/3/31

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・大学院歯歯薬学研究部・教授

研究者番号: 00184656

(2) 研究分担者

辻 大輔 (TSUJI, Daisuke)

徳島大学・大学院歯歯薬学研究部・助教

研究者番号: 00423400

広川 貴次 (HIROKAWA, Takatsugu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究チーム長

研究者番号: 20357867