

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09606

研究課題名(和文) 有害免疫反応を示さない高機能酵素の開発とそのファブリー病治療への応用

研究課題名(英文) Development of new enzyme replacement therapy for Fabry disease with a high-functioning enzyme expected to escape from harmful immune reaction

研究代表者

櫻庭 均 (SAKURABA, HITOSHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60114493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： $\beta$ -ガラクトシダーゼA (GLA) 活性を持たせた改変型  $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA) をCHO細胞で大量生産した。この新酵素は、ファブリー病患者由来の培養細胞に取り込まれ、GLAよりも安定に機能した。また、若齢のファブリー病モデルマウスに継続投与した所、有害免疫反応を示さず、臓器への糖脂質の蓄積を抑制し、病理学的所見を改善した。改変型NAGAは、ファブリー病に対する新規酵素補充治療薬として有望と考えられる。

研究成果の概要(英文)：A modified  $\beta$ -N-acetylgalactosaminidase with  $\beta$ -galactosidase A-like substrate specificity was produced in Chinese hamster ovary cells. The enzyme was incorporated into cultured Fabry cells and stably functioned. Recurrent administration of the enzyme not only improved the pathological changes in the liver, kidneys and heart of a young Fabry mouse but also prevented accumulation of glycolipids in their organs and tissues. Furthermore, it did not induce any harmful immune reaction during the treatment. It is highly promising as a new and safe enzyme for enzyme replacement therapy for Fabry disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ファブリー病 酵素補充療法 改変酵素  $\beta$ -ガラクトシダーゼ A  $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A (GLA) の著しい活性低下により、体内に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) などの糖脂質が蓄積して、腎臓や心臓血管系などの臓器が障害される X 染色体性遺伝病である。本症に対する治療として、組換えヒト GLA を患者の血管内に定期的に投与する酵素補充療法 (ERT) が導入され、効果を上げている。しかし、ファブリー病男性患者においては、ERT により組換えヒト GLA に対する抗体が産生され、アナフィラキシーなどの有害免疫反応が惹起されたり、酵素薬の効果が減弱する症例があることが知られるようになった。そこで、抗体による有害免疫反応を起こし難い新規 ERT 治療薬の開発が臨床サイドから求められている。

我々は、これまでの研究で得られた分子遺伝学および構造学的解析結果を基に、GLA とよく似た構造 (アミノ酸レベルでの相同性: 75%) を持つ  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (NAGA、旧名:  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ B) に注目した。この酵素は、Gb3 や Lyso-Gb3 を分解することは出来ないが、GLA よりも安定性が高いことが知られている。ファブリー病男性患者の多くは体内に GLA を持っていないが、NAGA については生下時からこれを有している。そのため、ファブリー病男性患者に対して GLA を投与した場合には、抗 GLA 抗体が作られる可能性があるが、NAGA またはその改変体を投与した場合には抗体が産生され難いと予想される。

そこで、我々は、ヒト NAGA の基質認識部位を構成する S188 と A191 のアミノ酸 2 残基を、夫々、E と L に置換した改変型 NAGA (S188E、A191L) を設計した。そして、改変型 NAGA cDNA を CHO 細胞に導入した後、ウシ血清添加培養液を用いた付着細胞型培養系で細胞培養を行い、細胞から培養液中に分泌される改変型ヒト NAGA を精製した。精製された改変型ヒト NAGA は、GLA の人工基質である 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (MU-GAL) を分解する能力を獲得し、GLA ノックアウトマウスに投与すると、臓器中の GLA 活性が増加し、蓄積 Gb3 量が減少することが示された。

これらの予備研究の結果を基に、本研究では、ファブリー病患者に対して有害免疫反応を示さない新規の高機能酵素の開発を行う。

## 2. 研究の目的

ファブリー病患者に対して有害免疫反応を示さない新規高機能酵素を開発するため、下記の間を達成する。

- (1) 無血清培養液を用いた浮遊細胞培養系で改変型 NAGA の大量生産法を確立する。
- (2) 精製した改変型 NAGA の酵素学的性状を明らかにする。
- (3) 改変型 NAGA と GLA との間に免疫交叉性

がないことを証明する。

(4) 細胞実験により、改変型 NAGA が細胞内に取り込まれ、GLA 活性を発揮すると共に、細胞内での安定性が高いことを示す。

(5) 動物実験により、改変型 NAGA の投与で有害免疫反応が起こらず、治療効果があることを示す。

## 3. 研究の方法

### (1) 改変型 NAGA の大量生産法の確立

改変型 NAGA (S188E および A191L のアミノ酸置換を導入したヒト NAGA) の酵素ユニットコード部分に GLA のシグナルペプチド (発現タンパクの細胞外への分泌を促進するために付加したものであり、この部分は細胞外への分泌後には発現タンパクから除去される) コード部分を連結した遺伝子を遺伝子発現ベクター-pEE14.4 (Lonza Biologics) に組み込み、CHO 細胞に導入した。続いて、改変型 NAGA を発現する CHO 細胞をグルタミン合成遺伝子発現システム (Lonza Biologics) の利用と GLA 活性測定によりクローン化した。その後、29 種類の無血清培養液を用いて培養条件を検討し、高活性の改変型 NAGA を分泌する浮遊 CHO 細胞の至適培養条件の決定とクローニングを行った。次に、当該細胞株を用いて、三角フラスコや WAVE バックによる大量振盪培養を行い、細胞外に分泌された改変型 NAGA を含む細胞培養液を得た。

### (2) 改変型 NAGA の精製とその酵素学的解析

改変型 NAGA を含む CHO 細胞培養液を試料として、限外濾過した後、フェニールセファロース、SP セファロースおよび Q セファロースカラムの順でカラムクロマトグラフィーを行い、改変型 NAGA を精製した。

精製した改変型 NAGA を試料として、MU-GAL を基質に用いた蛍光法で、その GLA 活性を測定した。

### (3) 改変型 NAGA と GLA との免疫交叉性に関する解析

精製した改変型 NAGA および組換えヒト GLA と、夫々の酵素に対するウサギ抗血清を用いて、ウェスタン・ブロッティング法および表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により、互いの免疫交叉性の有無について解析した。

### (4) 改変型 NAGA の細胞内取り込みとその安定性に関する解析

GLA ノックアウトマウス由来の iPS 細胞から分化させた培養心臓組織細胞 (心筋細胞を含む) と培養線維芽細胞の培養液中に改変型 NAGA を最終濃度 1 または 10  $\mu$ g/mL になる様に加えて 2 日間培養後に細胞を摂取して、細胞内 GLA 活性を測定した。また、マンノース 6 リン酸 (M6P) 受容体を介した改変型 NAGA の細胞内取り込みを調べるため、改変型 NAGA (最終濃度 10  $\mu$ g/mL) と同時に M6P を 5mM となる様に添加した後、同様の操作を行って、細胞内 GLA 活性を測定し、M6P 無添加時の酵素活性値と比較した。

次に、改変型 NAGA の細胞内での安定性を

調べるため、ファブリー病患者由来の培養線維芽細胞の培養液中に、1 µg/mL の濃度になる様に改変型 NAGA または対照として組換え GLA を加えて 2 日間細胞培養した。その後、改変型 NAGA を含まない培養液に換えて、更に 0、3、7 および 14 日間細胞培養を行い、各時点における細胞内 GLA 活性を測定して、酵素活性の推移を解析した。

(5) ファブリー病モデル動物に対する改変型 NAGA の効果と免疫学的影響に関する解析

ファブリー病男性患者における免疫状態に似せて、GLA を欠損するがヒト NAGA は生下時から体内に存在する状態を持つ実験動物を得るため、マウス・アルブミンプロモーターの下流にヒト NAGA cDNA を連結した遺伝子を組み込んだ遺伝子発現ベクターを GLA<sup>-/-</sup>卵に導入することにより、ヒト NAGA トランスジェニック・GLA ノックアウトマウスを作成した。

このマウスおよび対照としての GLA ノックアウトマウスに対して、4 mg/kg の改変型 NAGA を尾静脈から、週 2 回の割合で、2 週間（合計 5 回）投与した後、血中の改変型 NAGA 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体価を測定した。また、同様の酵素投与を 4 週間（合計 9 回）を行い、両者の生存率を解析した。

次に生後 5 週齢のヒト NAGA トランスジェニック・GLA ノックアウトマウスに対して、2mg/kg または 4mg/kg の改変型 NAGA を尾静脈から週 2 回の割合で 6 週間（合計 11 回）投与した後、その 24 時間後に肝臓、腎臓および心臓を採取し、夫々の臓器中の Gb3 および Lyso-Gb3 含量を液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法で解析した。また、電顕による各臓器の病理学的解析を合わせて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 改変型 NAGA の大量生産

改変型 NAGA 遺伝子を導入した浮遊 CHO 細胞を、無血清培養液 Power CHO-2 を用いて振盪培養することで、最大 40mg/L 濃度の改変型 NAGA を含む細胞培養液を得た。

##### (2) 改変型 NAGA の精製とその酵素学的性状

改変型 NAGA 遺伝子を導入した CHO 細胞から分泌された発現産物を含む細胞培養液を試料として、限外濾過およびカラムクロマトグラフィーにより、改変型 NAGA を精製した。改変型 NAGA は、M6P を含む糖鎖を持つ糖タンパク質であり、MU-GAL を基質とした場合、特異活性は 0.5mmol/h/mg で、ミカエリス・メンテン式で V<sub>max</sub> 値は 1.0mmol/h/mg、K<sub>m</sub> 値は 4.8 mM と算定された。

##### (3) 改変型 NAGA と GLA との免疫交叉性

改変型 NAGA と GLA および夫々に対する抗血清を用いたウェスタン・ブロッティングおよび SPR 解析の結果、改変型 NAGA と GLA との間には、免疫交叉性がないことが示された。

##### (4) 改変型 NAGA の細胞内取り込みとその安定性

野生型および GLA ノックアウトマウス由来の iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を含む培養心臓組織細胞および培養線維芽細胞の細胞培養液中に、改変型 NAGA（単独または M6P を同時投与）を添加して 2 日間培養した後に、細胞内の GLA 活性を MU-GAL を基質として測定した結果を表 1 にまとめた。その結果、改変型 NAGA はこれらの細胞に容量依存的に取り込まれること、培養線維芽細胞に比べて、培養心臓組織細胞では取り込み効率が低く、M6P 受容体を介した取り込みの割合も低いことが明らかになった。これらの解析結果から、臓器を構成する細胞の表面に存在する M6P 受容体の数の違いにより、改変型 NAGA の細胞内取り込みに差が生ずると考えられた。

表 1. 改変型 NAGA の細胞内取り込み

	野生型マウス		GLA ノックアウトマウス		
			1	10	10
改変型 NAGA (µg/mL)	—	—	—	—	—
M6P (mM)	—	—	—	—	5
iPS 細胞から分化させた培養心臓組織細胞 [n=3]	88 ± 10	4 ± 1	45 ± 21	217 ± 122	85 ± 45
培養線維芽細胞 [n=3]	228 ± 66	4 ± 0	625 ± 51	1,356 ± 94	35 ± 1

また、ファブリー病患者由来の培養線維芽細胞に改変型 NAGA と GLA を取り込ませて 48 時間後から、細胞内 GLA 活性の推移を解析した。追跡直後の酵素活性を 100% とした場合、改変型 NAGA の 3、7 および 14 日後の酵素活性残存率は夫々、65、50 および 40% であり、GLA の場合の、夫々、20、5 および 3% に比べて酵素活性残存率が高く、細胞内での安定性が高いことが明らかになった。

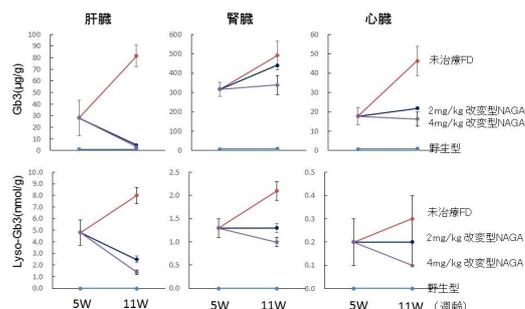
(5) 改変型 NAGA のファブリー病モデル動物に対する治療効果と免疫反応

ヒト NAGA を持たない GLA ノックアウトマウスに対して、改変型 NAGA を複数回投与した所、投与開始 14 日目（合計 5 回投与）には改変型 NAGA 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体が産生され、投与開始 21 日目（合計 7 回投与）までには 30 匹全例が死亡した。一方、ヒト NAGA トランスジェニック・GLA ノックアウトマウスに対して、改変型 NAGA を投与した場合には、同酵素に対する抗 IgG1 抗体は検出されず、抗 IgG2a 抗体も僅かに検出された程度であり、投与開始 30 日目（合計 9 回投与）以後も異常なく、30 匹全例が生存した。これらの結果、ファブリー病患者の場合と同様に生下時からヒト NAGA を持つ動物では、ヒト型の改変型 NAGA を長期間投与されても、有害免疫反応が起こり難いと考えられた。

若齢（生後 5 週齢）のヒト NAGA トランスジェニック・GLA ノックアウトマウスに対して、改変型 NAGA を週 2 回の割合で 6 週間（合計 11 回）投与した後の肝臓、腎臓および心臓への Gb3 および Lyso-Gb3 の蓄積に関して解析した結果を図 1 に示した。その結果、改

変型 NAGA は、各臓器への Gb3 および Lyso-Gb3 の蓄積を容量依存的に抑制することが明らかになった。また、電顕による病理学的解析の結果、未治療の場合、各臓器を構成する細胞内に多数の層状封入体がみられるのに対して、改変型 NAGA が投与された場合には、層状封入体の数が著明に減少することが示された。

図1. ヒトNAGAトランスジェニック・GLAノックアウトマウスに対する改変型NAGAの投与効果



## (6)まとめ

組換え GLA を用いた ERT をファブリー病男性患者に行った場合、アガルシダーゼ・アルファでは 20-56%に、またアガルシダーゼ・ベータでは 73-91%に抗 GLA 抗体が産生され、抗体陽性症例では、抗体陰性症例に比べて、有害免疫反応を呈する率が高く、予後が悪いことが報告されている。

こうした問題を解決するため、我々は改変型 NAGA を分子設計し、これを大量生産して、その効果を細胞および動物実験で解析した。その結果、改変型 NAGA は細胞内に取り込まれ、有害免疫反応を起こすことなく、臓器への糖脂質蓄積や病理学的変化の発生を抑制することが示された。改変型 NAGA は、ファブリー病に対する治療薬候補に成り得ると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sakuraba H, Togawa T, Tsukimura T, Kato H: Plasma lyso-Gb3: a biomarker for monitoring fabry patients during enzyme replacement therapy. Clin. Exp. Nephrol., 2017. DOI:10.1007/s10157-017-1525-3. 査読あり

Kodama T, Tsukimura T, Kawashima I, Sato A, Sakuraba H, Togawa T: Differences in cleavage of globotriaosylceramide and its derivatives accumulated in organs of young Fabry mice following enzyme replacement therapy. Mol. Genet. Metab., 120:116-120, 2017. DOI:10.1016/j.ymgme.2016.10.003. 査読あり

Sueoka H, Aoki M, Tsukimura T, Togawa T, Sakuraba H: Distributions of globotriaosylceramide isoforms, and globotriaosylsphingosine and its analogues in an -galactosidase A

knockout mouse, a model of Fabry disease. PLOS ONE, 10:e0144958, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0144958. 査読あり

Nakano S, Tsukimura T, Togawa T, Ohashi T, Kobayashi M, Takayama K, Kobayashi Y, Abiko H, Satou M, Nakahata T, Warnock D. G, Sakuraba H, Shibasaki F: Rapid immunochromatographic detection of serum -galactosidase A antibodies in Fabry patients after enzyme replacement therapy. PLOS ONE, 10:e0128351, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0128351. 査読あり

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. 査読あり

Sakuraba H, Tsukimura T, Tanaka T, Togawa T, Takahashi N, Mikami D, Wakai S, Akai Y: 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. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

櫻庭 均: ファブリー病: 女性の診断の難しさ. 第 12 回ファブリー病シンポジウム, 2018. 3. 3, 東京

Tsukimura T, Shigenaga M, Saito S, Togawa T, Sakuraba H: Comparison of GLA variants of unknown significance and the specific mutations causing moderate Fabry disease. 14th Annual World Symposium 2018. 2018. 2. 5-9, San Diego, USA.

Tsukimura T, Togawa T, Wakamura T, Kato H, Sakuraba H: From diagnosis to follow-up of Fabry patients receiving enzyme replacement therapy in Japan. 13th Annual World Symposium 2017. 2017.02.13-17, San Diego, USA.

櫻庭 均: 血漿 Lyso-Gb3 の測定は、ファブリー病の診断や酵素補充療法の評価に有用である. 第 21 回日本ライソゾーム病研究会, 2016. 9. 30, 東京

Sakuraba H: Fabry Disease: focus on protein structure and antibody. Chinese Medical Association-Taipei Annual Conference, 2016. 6. 18, Taipei, Taiwan.

櫻庭 均: ファブリー病早期診断の手掛かり 原因不明のその症状, もしかしたらファブリー病かもしれません. 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015. 6. 5, 名古屋

櫻庭 均: ファブリー病の病態・診断・治療アップデート そのサイン, 見逃してしま

せんか？ 第 56 回日本神経学会学術大会，  
2015. 5. 21, 新潟

櫻庭 均: ファブリー病 UPDATE 診断・治療の最新の知見. 第 118 回日本小児科学会学術集会, 2015. 4. 18, 大阪

櫻庭 均: 眼科医が遭遇する希少疾患 ファブリー病. 第 119 回日本眼科学会総会, 2015. 4. 16, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://u-lab.my-pharm.ac.jp/genetics/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻庭 均 (SAKURABA Hitoshi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 60114493

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

月村考宏 (TSUKIMURA Takahiro)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 50632783