

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14918

研究課題名(和文)先天性糖鎖合成異常症CDG1b治療のためのデアミノノイラミン酸セラピーの開発

研究課題名(英文)Development of the deaminoneuraminic acid therapy for treatment of congenital disorders of glycosylation Ib

研究代表者

北島 健 (Kitajima, Ken)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：80192558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：先天性糖鎖合成異常症CDG1bの新療法としてKDNセラピーの開発を目的としている。この疾病はManの欠乏が原因で細胞における糖鎖含有量が減少する。その減少抑制のために現在Manが薬剤として使用されているが、優位性のある方法によるセラピーの可能性を探究した。セラピーの評価法としての細胞表面糖鎖変化の解析法の樹立は達成できた。しかし、CDG1bモデル細胞の樹立については、様々な試行にも関わらず期間内に達成できなかった。一方、糖代謝物の生体内動態理解の一環として、KDNの細胞への取り込み機構を解析し、ピノサイトーシスとモノカルボン酸輸送体の一種が関わることを突きとめた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to development of the KDN therapy as a new drug for CDG1b patients. In this disorder, glycan amount is reduced due to a deficiency of Man. The reduced glycans are rescued by the mannose therapy; however, the development of new method would be desired, if possible. In this study, we thus try to demonstrate the effectiveness of the new method. As a result, we attained the establishment of analytical methods for metabolic products and the amount of cell surface glycan chains. On the other hand, CDG1b model cell lines could not be established within the research period, even after many efforts. Notably, we succeeded in demonstrating that KDN is incorporated into cells through ponocytosis as well as through one of monocarboxylate transporters unlike a major sialic acid species Neu5Ac.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：デアミノノイラミン酸 先天性 マンノースセラピー 代謝 糖質 治療 シアル酸 代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性糖鎖合成異常症(CDG)は糖タンパク質の糖鎖合成に関わる遺伝子群の異常によって起こる症候群であり、精神運動発達遅延、肝や消化管機能異常など多岐にわたる臨床症状をもつ難病である。原因遺伝子によって100を超えるタイプの中で、CDGタイプ1b (CDG1b)は現在唯一治療が可能なタイプである。CDG1bはフルクトース6-リン酸(Fru-6-P)をマンノース6-リン酸(Man-6-P)に変換する酵素ホスホマンノースイソメラーゼ(PMI)の遺伝子異常が原因となり、糖タンパク質糖鎖の生合成に必須なMan-6-Pの供給を激減させることで発症する(図1)。したがって、Manを摂取補充すれば、Man-6-Pが代謝的に供給されて正常化するため、実際、治療法としてMan補充療法が行われている。しかし、一日1グラム/Kg体重という大量のMan摂取が必要であり、長期的処方による副作用には問題がある。すなわち、高濃度のMan摂取は血中タンパク質の糖化(グリケーション)によって生活習慣病リスクを高める他、摂取Manのリン酸化にATPが過剰消費されて細胞死することも危惧される。したがって、QOL(生活の質)の見地からMan補充療法には改善の余地がある。

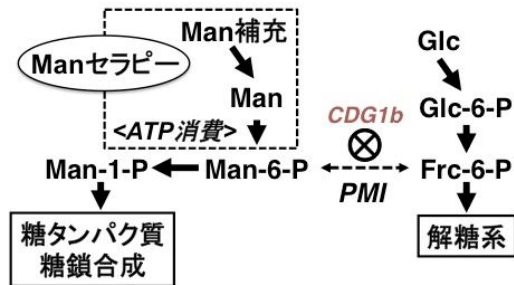


図1 CDG1bとManセラピー

(2) CDGの原因遺伝子の特定や診断法は、1980年後半以降、欧米の研究者を中心に精力的に研究されてきた(Jaekin & Matthijis 2001)。治療法については、CDG1bにおいてManを摂取補充するManセラピーがドイツで開発され(Niehues et al 1998)。同時に米国Freeze博士らによってMan動態など作用機構が解明された(Sharma et al. BBRC review 2014)。一方、治療中の患者において進行性肝障害や下痢や激しい腹痛症状が報告され、別療法の開発も急務である(Mention et al 2008; de Lonlay & Seta 2009)。日本のCDG患者の殆どが別タイプのCDG1aとされているが、今後、CDG1b患者数は増加すると予測されており、研究の重要性は衰えていない(大阪府立母子保健総合医療センターの和田芳直博士; de Lonlay & Seta 2009)。

(3) 我々は、Manが上記酵素PMIを介してGlcから供給されるだけでなく、シアル酸の

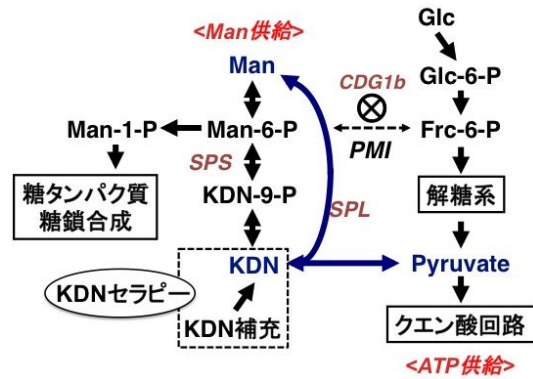


図2 CDG1bとKDNセラピー(新提案)

一種デアミノノイラミン酸(KDN)からシアル酸アルドラーゼ(SPL)の作用によっても供給されることを発見した(Go et al 2006; 図2)。しかも、KDNはManより10倍程度低い濃度でも細胞に取り込まれ、同等の細胞内Man濃度をもたらすことから、Manの代わりにKDNを摂取することによってManセラピーの効果が期待できると考えるに至った。さらにKDNは、Manより還元毒性が低く、高い細胞生存活性を示す点でも優位性がある。

2. 研究の目的

本研究はManセラピーに代わるKDNセラピーの開発のための分子基盤を確立することを目的としている。

(1) 第一に、PMI遺伝子の発現抑制細胞および動物個体を用いて、KDN摂取による糖鎖生合成の改善効果を検証する。

(2) 第二に、シアル酸代謝としてのKDN代謝とMan代謝のクロストークを解明して、KDNセラピーの分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究は先天性糖鎖合成異常症のひとつCDG1bタイプの治療法として、現在行われているManセラピーの欠点を改良する可能性のあるKDNセラピーを開発するための分子基盤を確立することを目的としている。細胞レベルおよび個体レベルでの検証実験をおこなって、ヒトへの応用する分子基盤を確立した。

(1) まず、細胞レベルにおいては、PMI遺伝子の発現抑制および欠失細胞を樹立して、KDN投与によるCDG表現型の改善効果を生化学的および細胞生物学的効果を検証することを計画した。遺伝子抑制には、siRNAおよびshRNA方法、およびゲノム編集技術としてCRISPR-Cas9法を用いた。同時に、KDNおよびMan代謝のクロストーク分子機構を関連酵素の遺伝子発現と代謝物の変化から解明することとした。遺伝子発現解析には、リアルタイムPCR法を用い、代謝物の変化については、KDNおよびManはそれぞれ特異的な蛍光標識(DMB化およびPA化)を行って、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離

定量した。

(2) 次に、個体レベルにおいては、PMI 遺伝子欠損マウスが胎生致死であるためモデル動物として利用できないことから、PMI 遺伝子抑制脳をもつマウスを作製して、脳に焦点をあてた KDN セラピー効果を調べる CDG1b モデル個体として利用できるか否かを検証する。また、正常マウスに KDN を長期投与して KDN セラピーの副作用の可能性も調査する。

4. 研究成果

先天性糖鎖合成異常症 CDG1b の新療法として KDN セラピーを開発することを目的として、項目(i) CDG1b 細胞などの確立、項目(ii) KDN および Man 代謝産物の解析法の確立、項目(iii) CDG1b 細胞への KDN 添加の効果の解析、項目(iv) CDG1b 細胞の表面糖鎖変化の解析法の樹立、に取り組んだ。

(1) 項目(i) CDG1b 細胞の確立：CDG1b の原因遺伝子である PMI (ホスホマンノイズメラーゼ) 遺伝子の発現抑制細胞株の取得が、一過性発現細胞を調製できることは証明できたものの、安定発現株の樹立において、Sh-RNA 法による樹立ができなかった。昨年度内に樹立できたと判定された細胞も培養過程で効果が減弱してしまった。合計7種類のノックダウン・プローブを単独および混合して試み、CRISPR-Cas9 法による遺伝子欠失も試みたが、いずれも抑制細胞の樹立に至らなかった。これらの過程で何が起こったのかを追及したが、これまでのところ原因の究明には至っていない。長期にわたる培養によって PMI 抑制細胞が淘汰されてしまうのかも知れない。本研究の目的に対して設定した研究項目は依然として理に適ったものであるが、これまでの結果を受けて、CDG1b モデルマウスの導入とヒト CDG1b 患者由来の細胞の利用を加速化させており、今後、KDN セラピーの効果の評価と条件設定を本格化する予定である。

(2) 項目(ii) KDN および Man 代謝産物の解析法の確立：KDN の代謝糖の微量定量を確立することができた。蛍光標識したものを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離・定量する方法で、測定試料の調製法を含めて詳細に検討し、液体窒素で急速に試料を凍結する方法が重要であることをつきとめた(日本糖質学会で発表)。HPLC 分析では測定試料数が多いため既存ポンプを拡充してポンプと検出器を1台ずつ購入した。

(3) 項目(iii) CDG1b 細胞への KDN 添加の効果の解析：項目(i)の細胞樹立が達成できておらず、実施できなかった。しかし、Man および KDN の添加細胞を回収して代謝物の量

的变化を追跡した。KDN セラピーにおける細胞の状態変化を調べた。20 mM Man 添加によって細胞増殖や生存活性が抑制される一方、同程度の高濃度の KDN 添加によっても細胞増殖や生存は影響を受けず、むしろ生細胞数がやや増えることが判明した。

(4) 項目(iv) CDG1b 細胞の表面糖鎖変化の解析法の樹立：哺乳類細胞にシアル酸の構造の一部にアルキンを導入した SiaNAI およびその前駆体 ManNAI を用いてクリックケミストリーの手法で確認する方法を当初導入する予定であったが、その前段階として、(2)で樹立した方法が、CDG 由来細胞表面のシアル酸量を定量する方法として適応可能であることを証明することができた。今後、この手法を利用すれば、より簡便に不全糖鎖の程度を評価することができる。

(5) KDN の取込機構の解明：本研究目的である KDN の生体内挙動の理解の一環として、KDN が哺乳類細胞に取り込まれる分子機構の解明を行った。マウスとヒト細胞を KDN 存在下で培養する際に、種々の物質輸送阻害剤を共存させて、KDN の取込量を測定した。その結果、ピノサイトーシス機構とモノカルボン酸輸送体の一種が関わるということが判明した。また、Neu5Ac による輸送の競合実験において Neu5Ac は効果を持たないことから、KDN はシアル酸の一種であるにも関わらず典型的な Neu5Ac とは異なる取込機構が働いているという興味深い結果が得られた。今後の KDN セラピーの樹立に向けて重要な知見である。

<引用文献>

- Jaekin J, Matthijis G. (2001) Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2:129-151.
- Niehues R et al. (1998) Carbohydrate- deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest.* 101: 1414-1420.
- Sharma V, Ichikawa M, Freeze HH. (2014) Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem Biophys Res Commun.* 453: 220-228.
- Mention K et al. (2008) Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol Genet Metab.* 93: 40-43.
- de Lonlay P, Seta N. (2009) The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta.* 1792: 841-843.
- Go S, Sato C, Furuhashi K, Kitajima K. (2006) Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid

(KDN) in mouse organs. Glycoconj J. 23: 411-21.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

岩木佑弥、宮田真路、佐藤ちひろ、北島健 .液体窒素を用いた急速凍結細胞回収法によるシアル酸代謝物定量の改良 . 第 34 回日本糖質学会年会 .2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日 . 東京大学安田講堂, 東京 .

岩木佑弥、郷慎司、佐藤ちひろ、北島健 . 哺乳類細胞におけるデアミノノイラミン酸の取込み機構の解析 . 第 35 回日本糖質学会年会; 2016 年 9 月 1~3 日; 高知市文化プラザ, 高知 .

岩木佑弥、佐藤ちひろ、北島健 . Uptake mechanism of deaminoneuraminic acid in mammalian cells . 第 13 回若手の力フォーラム; 2016 年 11 月 26 日; 岐阜大学応用生物科学部, 岐阜 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北島 健 (KITAJIMA, Ken)
名古屋大学 ・ 生物機能開発利用研究センター ・ 教授
研究者番号 : 80192558

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4)研究協力者
なし ()