

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390297

研究課題名 (和文) ゴーシェ病モデルマウスを用いたケミカルシャペロン療法の開発に関する研究

研究課題名 (英文) Basic research for clinical treatment of neuropathic Gaucher disease by chemical chaperones

研究代表者

大野 耕策 (OHNO KOUSAKU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70112109

研究成果の概要 (和文)：

Gaucher 病の中中枢神経症状に有効な治療法はない。Gaucher 病の原因酵素 GBA の F213I 変異は低分子化合物 N-octyl- β -valienamine (NOV) によって活性化されることを見出し、中枢神経症状の治療のためのケミカルシャペロン療法の樹立を目指している。F213I 変異を持つマウスの作成し、中枢神経系の治療実験を行うことを目指したが、F213I 蛋白質を発現するマウスを得ることが出来なかった。正常マウスへの NOV の経口投与実験を行い、NOV は安全で、脳を含む臓器の GBA 活性を上昇させることを確認した。

研究成果の概要 (英文)：

There are no effective treatment for neurological manifestations in Gaucher disease. We found N-octyl- β -valienamine (NOV) could increase the protein level and enzyme activity of F213I mutant GBA in culture cells. We have tried to establish a model mouse expressing F213I protein, but failed to establish the mice. The NOV effects on normal mice were evaluated. No adverse effect was observed and GBA activity increased with increasing NOV dose in tissues. We also found new compounds, bicyclic nojirimycin analogues, show a chemical chaperone activity on mutant GBAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：小児神経学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ゴーシェ病、シャペロン、経口治療薬、モデルマウス、リソゾーム

1. 研究開始当初の背景

Gaucher 病はライソゾーム内の加水分解酵素 β -グルコセレブロシダーゼ (GBA) の欠損でおこる遺伝性疾患で、現在日本国内の患者は 100 名以下のまれな疾患である。肝脾腫と骨病変を特徴とする 1 型、乳児期に急激な中枢神経障害を示す 2 型、幼児期から小児期に進行性の中枢神経障害を示す 3 型に分類されている。治療として欠損する酵素を補充する酵素補充療法がおこなわれているが中枢神経症状には効果がほとんど見られない。

我々は Gaucher 病の中枢神経症状の治療を目的として、変異 GBA 酵素を活性化する低分子のスクリーニングを行い、2004 年に N-octyl- β -valienamine (NOV) が、培養細胞レベルで、F213I 変異の GBA を安定化し、細胞内の酵素蛋白質を増加させ、ライソゾームへの移動を促進し、蓄積するグリコセレブロシドを減少させることを明らかにした。

また、2007 年には NOV は F213I へにだけでなく、N188S、G202R、N370S の変異を活性化することを明らかにし、GBA の基質が結合する活性化ドメインの変異が NOV により活性化される可能性を推察した。

低分子化合物が個体レベルで中枢神経系の変異酵素を活性化し、中枢神経系の治療薬となりえるかどうかは課題であった。

2. 研究の目的

我々が見出した変異 GBA を活性化する NOV が F213I 変異を持つモデルマウスの脳内 GBA 活性を活性化し、中枢神経系の治療効果が得られるかどうかを確認することが本研究の第 1 の目的である。

また F213I 変異をモデルマウスが作成できなかった場合、NOV が脳内に移行し、中枢神経系の酵素活性を上昇させるか明らかにすることが第 2 の目的である。

第 3 の目的は、NOV 以外の低分子化合物をスクリーニングすることである。

3. 研究の方法

ヒト F213I 変異を持つ cDNA を作成し、F213IGBA トランスジーン (TG) マウスを作成する。GBA ノックアウト (KO) マウスをジャクソン研究所から購入し、F213IGBA を GBA-KO マウスに導入して、F213IGBA を発現するマウスを作成する。

正常マウスの飲料水に NOV 溶解して投与し、1 週間投与後、血液尿での造血系、管腎機能障害の有無、各臓器の GBA 活性を検討する。

スペイン・セビリア大学で合成された新規化合物二環型ノジリマイシンのシャペロン活性を種々の濃度存在下で、患者細胞および種々変異を導入した COS 細胞を 4 日間培養し、GBA 活性を測定し、細胞レベルでのシャペロン活性を検討する。

4. 研究成果

(1) F213I 変異を発現する Gaucher 病モデルマウスの作成

F213I 変異を持った人 cDNA を作成した。この cDNA を基盤研究所松田潤一郎博士に送り、マウス受精卵に導入し、F213I-TG マウスを作成した。このマウスと GBA-KO マウスを Jackson 研究所から購入し、GBA-KO/F213IGBA-TG マウスを作成した。しかし、このマウスでは確かに F213I cDNA の導入は確認できたが、F213I タンパク質の発現は確認できなかった。F213I cDNA を発現させたマウス細胞では F213I タンパク質が小胞体からゴルジ体に輸送されないことがわかった。 β -グルコセレブロシダーゼ (GBA) タンパク質は、通常ライソゾーム酵素がマンノース-6 燐酸受容体を介してライソゾームに運ばれるのに対し、LIMP-2 によって運ばれることが 2007 年に明らかにされており、ヒト F213I 変異蛋白質はマウス細胞内でマウス LIMP-2 によってうまく運ばれない可能性もあり、現在、変異 GBA と LIMP-2 との相互作用について検討している。

(2) 正常マウスへの NOV の投与と臓器の GBA 活性

正常マウスに種々濃度の NOV を含む飲料水を ad libitum 飲ませて 7 日間飼育し、血液、尿検査による臓器障害の有無、臓器の GBA 活性を測定した。高濃度 (10mM) の NOV 投与では飲水量が少なくなり、脱水をおこし体重が減少し、腎機能が低下するが、低濃度では明らかな異常所見を認めなかった。血中濃度は飲水中組織の NOV の濃度依存的に増加し、1mM で $0.5 \mu\text{M}$ 、3mM で $1.5 \mu\text{M}$ 、10mM で $2.5 \mu\text{M}$ に増加した。臓器の濃度は、肺、肝、腎に高く、大脳、小脳、心、脾、筋で低かった。また臓器の GBA 活性は肝臓、脾、小脳、心、筋で有意に増加し、NOV は正常の GBA タンパク質も安定化し、脳内へも移行することを明らかにした。

(Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The effect of N-octyl- β -valienamine on β -glucosidase activity in tissues of normal mice. Brain Dev 32(10):805-9, 2010)

(3) 二環型ノジリマイシンは新たな GBA に対するシャペロンとなる

我々は、二環型 SP2 アザ糖の構造を持つ二環型ノジリマイシンが β -グルコセレブロンダーゼ (GBA) の選択的阻害剤となることを見出した。複数の二環型ノジリマイシンを用いて、種々変異を持つ Gaucher 病患者線維芽細胞、種々変異を導入したヒト GBA cDNA を一過性に発現させた COS 細胞を用いて、変異酵素の安定化を検討した。二環型 SP2 アザ糖の中で、5-N, 6-O-(N'-octyliminomethylidene-NJ (NOI-NJ)、その 6-thio および 6-amino-6deoxy 誘導体 (6S-NOI-NJ, 6N-NOI-NJ)、およびそれらのガラクトノジリマイシン誘導体 (NOI-GNJ, 6S-NOI-GNJ, 6N-NOI-GNJ) について検討し、これらの誘導体は、N188S, G2020R, F213I, T369M, N370S 変異を活性することを明らかにした。またその活性増強作用は、アメリカのグループにより報告された N-(n-nonyl)-1deoxynojirimycin より強作用があることを明らかにした。

(Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, Garcia-Moreno MI, Ortiz Mellet C, Garcia Fernández JM, Suzuki Y. Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl) deoxynojirimycin. *Chembiochem*. 10(17):2780-92, 2009)

さらに蛍光標識した 6-thio-(5N, 6S)-4-([N'-dansylamino]butyliminomethylidene)nojirimycin(6S-NDI-NJ)を合成し、この化合物もシャペロン効果を持ち、さらに GBA の濃度と比例してライゾゾームにはいること、また神経細胞内にも取り込まれることを明らかにし、神経系の治療に有効である可能性を示した。

(Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, Garcia-Moreno M, Mellet CO, Fernandez JMG, Suzuki Y. A fluorescent SP2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Cellular uptake and intracellular distribution studies. *ChemBioChem* 11(17):2453-64, 2010)

(4) NOV が活性化する GBA 変異の特異性

我々が 2004 年に始めて GBA のシャペロン効果を持つと報告した N-octyl- β -valienamine (NOV) が活性化する変異の特異性を検討するために、種々の変異を持つ GBA cDNA を作成し、COS 細胞に発現させた。その結果、ドメイン III に存在する変異のみが活

性化されることを明らかにした。2007 年に考えた様に、変異がドメイン III にあることが NOV によって活性化される必要条件であることを明らかにした。

(Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The pharmacological chaperone effect of N-octyl-beta-valienamine on human mutant acid beta-glucosidases. *Blood Cells Mol Dis*. 44(1):48-54, 2010)

以上から、F213I 変異を持つモデルマウスの作成は出来なかったが、日本で新規に合成された N-octyl- β -valienamine (NOV) で活性化される β -Glu はドメイン III に変異を持つことが必要条件であることを明らかにした。また NOV はマウス個体に安全に投与でき脳内の β -Glu の活性を上げることができる可能性を示した。

さらに、二環型ノジリマイシンは Gaucher 病の 5 番目のケミカルシャペロンであることを報告し、分化して分裂をしない神経系細胞でも二環型ノジリマイシンは細胞内に取り込まれることから、神経系細胞の変異酵素の活性化が期待できることを明らかにした。

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 9 件)

1. Higaki K, Li L, Udin Bahrudin, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Rubigilda C. Paraguison, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. *Human Mutation*. 2011, in press 査読有
2. Luan Z, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The effect of N-octyl- β -valienamine on β -glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev* 32(10):805-9, 2010 査読有
3. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, Garcia-Moreno M, Mellet CO, Fernandez JMG, Suzuki Y. A fluorescent SP2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher

disease: Cellular uptake and intracellular distribution studies. ChemBioChem 11(17):2453-64, 2010 査読有

4. Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Nanba E, Ohno K. Chemical chaperone therapy: Luciferase assay for screening of b-galactosidase mutations. Mol Genet Metab 101(4) : 364-369, 2010 査読有
5. Luan Z, Li L, Ninomiya H, Ohno K, Ogawa S, Kubo T, Iida M, Suzuki Y. The pharmacological chaperone effect of N-octyl-beta-valienamine on human mutant acid beta-glucosidases. Blood Cells Mol Dis. 44(1):48-54, 2010 査読有
6. 大野耕策 ライソゾーム病の治療 シャペロン療法 血液フロンティア 20 (4) : 69-77, 2010 査読無
7. Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Ninomiya H, Ohno K, Garcia-Moreno MI, Ortiz Mellet C, Garcia Fernández JM, Suzuki Y. Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with N-(n-nonyl)deoxynojirimycin. Chembiochem. 10(17):2780-92, 2009 査読有
8. Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E, Ninomiya H, Ohno K. Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. J Neurol Sci. 268(1-2) : 108-116, 2008 査読有
9. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. Biochem Biophys Res Commun. 367(3):616-22, 2008 査読有

[学会発表] (計9件)

1. 大野耕策 遺伝性小児神経疾患の治療について 第1回由布院・児湯小児神経学研究会 平成23年3月18日 大分
2. 大野耕策 ライソゾーム病の新しい低分子治療薬の開発 第15回日本ライソ

ゾーム病研究会 平成22年12月11日 東京

3. 大野耕策 医師とともに治療する薬剤業務—遺伝性ライソゾーム病に対する新しい治療と薬剤部との連携— 第49回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 平成22年11月6日 米子
4. 大野耕策 神経変性疾患と先天代謝異常症 第52回日本先天代謝異常学会 平成22年10月23日 大阪
5. 大野耕策 Molecular pathology: Gaucher disease シャペロン療法国際シンポジウム 平成22年7月29日 米子
6. 大野耕策 Chemical chaperone for Gaucher disease 第1回アジア先天代謝異常学会議 (The 1st ACIMD) 平成22年3月9日 福岡
7. 大野耕策 リソゾーム病の新しい治療を中心に 第4回成育代謝異常症研究会 平成21年12月4日 東京
8. 大野耕策 ゴーシェ病へのケミカルシャペロン療法 第1回カプアセミナー 平成21年8月22日 千葉
9. 大野耕策 遺伝性神経疾患の神経変性機構の解明と治療法の開発 第51回日本小児神経学会総会 会長講演 平成21年5月28日 米子

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称: Carba-sugar amine derivative and glycolipid metabolic disorder treating agent containing the same as active agent
発明者: Ogawa S, Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Ohno K
権利者: 生化学工業
種類: Rule143(1)EPC
番号 10158635.2-1211
取得年月日: 2010年5月25日
国内外の別: 国外

名称: Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes
発明者: Jose Manuel Garcia Fernandez, Carmen Ortiz Mellet, Yoshiyuki Suzuki,

Kousaku Ohno

権利者：鳥取大学、国際医療福祉大学、スペイン・セビリヤ大学

種類：PCT

番号：PCT/ES2009/070449

取得年月日：2009年11月5日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 耕策 (OHNO KOUSAKU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70112109

(3) 連携研究者

杉浦 千登勢 (SUGIURA TITOSE)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90325027

(H20→H21)

井上 岳彦 (INOUE TAKEHIKO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80346361

(H20)