

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390207

研究課題名（和文） オートファジー異常改善と脳特異的ペプチドによる新たなライソゾーム病治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel therapeutic strategies for neurodegenerative lysosomal storage diseases by ameliorating autophagic degradation and brain-specific peptides.

研究代表者

難波 栄二（NANBA EIJI）

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

研究成果の概要（和文）：遺伝性ライソゾーム病の神経細胞障害に至る分子機構の詳細は未だ不明である。本研究課題で、ライソゾーム病モデル神経細胞において、オートファジー機能異常、ミトコンドリア機能異常およびヒストン脱アセチル化酵素異常を見いだした。また、オートファジー阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の分子病態に対する効果を見いだした。将来的なライソゾーム病神経細胞障害に対する分子標的療法の開発のための重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Molecular pathophysiology of neurodegenerative lysosomal storage disease is still largely unclear. In this study, we found impairments of autophagy degradation and mitochondrial function and dysregulation of histone deacetylases in cultured neuronal model of this disease. We also examined the therapeutic effects of inhibitors for autophagy and histone deacetylase in this model cells. The obtained results gave us important insight into the development of novel molecular targeting therapy for neurodegeneration of lysosomal storage diseases in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ライソゾーム病、中枢神経疾患、先天代謝異常症、オートファジー、ユビキチン、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病の治療では、酵素補充療法が臨床的に実用化されゴーシェ病、ムコ多糖症、ポンペ病などでは画期的な成果を

あげている。しかし、酵素補充療法では中枢神経障害の治療には限界がある。そこで、我々はGM1-ガングリオシドーシスやゴーシェ病の中枢神経障害に効果のある画期的な

ケミカルシャペロン法を世界に先駆けて開発した (Matsuda et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ; Suzuki et al., Ann Neurol 2007 ; Gucev et al., Am J Med Genet 2008)。この方法は、低分子物質 (NOEVなど) を経口投与することにより、残存した変異酵素を有効に利用する方法で、我々はすでにモデルマウスの中枢神経障害の改善を報告しており、現在臨床的な応用を目指している。そして、このケミカルシャペロン療法をライソゾーム病のみならず、多くの疾患へ応用するための研究を開始している。しかし、ケミカルシャペロン療法では、酵素のまったく作られない変異などには効果がなく、さらに新たな中枢神経障害の治療法開発が大きな課題になっている。

近年ライソゾーム病ではオートファジーの異常が注目されている。オートファジーはライソゾーム病とは密接な関係があることが知られてきているが、我々は GM1-ガングリオシドーシスと I-cell 病においてのオートファジー異常を世界ではじめて明らかにした (Takamura et al., Biochem Biophys Res Commun 2008 ; Otomo et al., Mol Genet Metab 2009)。これは、オートファゴソームとライソゾームの融合障害が引き金になる。そして、オートファゴソーム内に異常蛋白が蓄積し、細胞内のシグナル伝達が異常になり、神経細胞障害を引き起こすと考えられる。我々は、GM-ガングリオシドーシス脳神経細胞において Trk 受容体がエンドソーム・ライソゾーム内に蓄積し下流シグナルに異常を来すことを示し、その結果、神経細胞膜の流動性が低下することを見いだした。

しかし、オートファジー異常によりさらに多くのシグナル伝達が異常となっていることが推測され、GM1-ガングリオシドーシスでのオートファジー異常のさらなる解明が治療法を開発するためには不可欠と考えていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ライソゾーム病神経細胞において p62 を介したオートファジー異常と蛋白質蓄積の分子機構の解明を目的とした。また、オートファジー機能異常を回復する新規治療法を開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養ライソゾーム神経細胞モデル

ラット線維芽細胞腫細胞株 B103 は 10%FBS を含む DMEM 培地で培養した。B103 にライソゾ

ーム由来コレステロール輸送蛋白質 NPC1 を阻害する U18666A、またはライソゾーム融合阻害剤クロロキンをそれぞれ 16 時間作用させた細胞をライソゾームモデル神経細胞として解析に用いた。

### (2) 蛍光染色

免疫蛍光抗体染色は、各標的の一次抗体に対し、Alexa-flour 標識二次抗体で染色した。ライソゾームとミトコンドリア機能染色は Alexa-555 標識の Lysotracker と Mitotracker を用いた。細胞内遊離型コレステロールは Filipin complex を用いて染色した。蛍光画像は Leica 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。

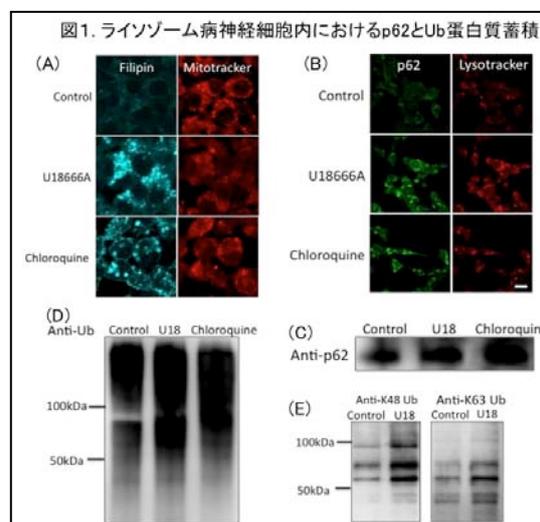
### (3) ウェスタンブロット法

培養 B103 細胞から抽出した蛋白質を SDS-PAGE で泳動、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体と HRP 標識二次抗体で反応し、ELC-Plus 発色した。ヒストン H4 シグナルの検出には、Triton X-100 を含むヒストン抽出を行い、同様に SDS-PAGE を行った。シグナルは LAS-4000 (GE ヘルスケア) により検出した。

## 4. 研究成果

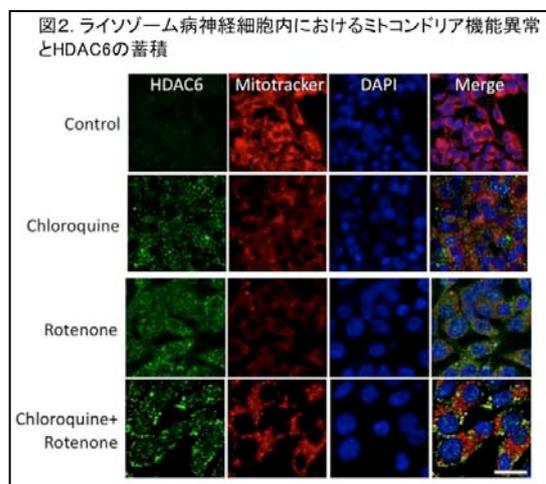
### (1) ライソゾーム病モデル神経細胞における p62 とユビキチンの蓄積とミトコンドリア機能異常

ラット神経芽細胞腫由来細胞株 B103 に U18666A またはクロロキンを作用させた細胞では、コントロールには見られないライソゾーム内コレステロールの蓄積が見られた (図 1 A)。同様の条件下でユビキチン結合蛋白質 p62 の細胞内蓄積も見られた (図 1 B)。この結果はウェスタンブロット法でも確認され (図 1 C)、また、ユビキチン化蛋白質の蓄積も認められた (図 1 D)。さらに、K48 ユビキ



チンと K63 ユビキチンの蓄積が見られ (図 1 E)、この結果は、ライソゾーム病神経細胞内で、エンドサイトーシス、オートファジー系の機能異常とともに、細胞内蛋白質品質管理機構の機能異常も示唆した。

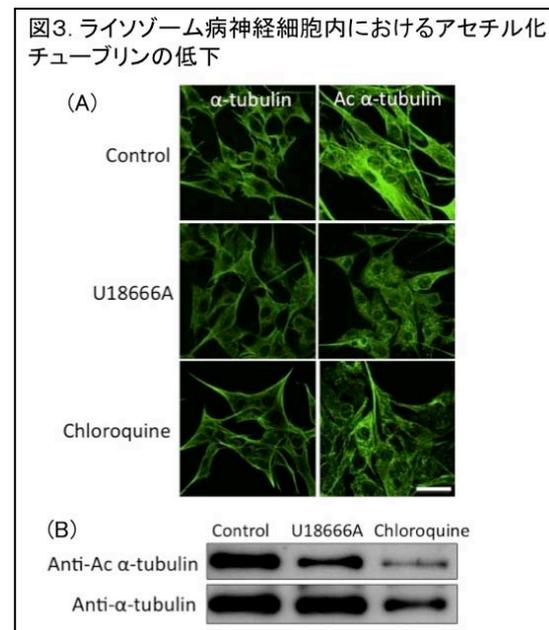
ミトコンドリアは ATP 産生を行う細胞内小器官で、その機能維持にはミトファジーと呼ばれるオートファジー・ライソゾーム系によるミトコンドリアの選択的分解系が重要な役割を担うことが明らかになってきている。ミトファジーの分子基盤には、機能異常をおこしたミトコンドリアがユビキチンリガーゼである Parkin によりユビキチン化を受けた後、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 6 と p62 によりオートファゴソームへ誘導されるモデルが提唱されている。そこで、我々はクロロキシンとミトコンドリア電子伝達系阻害作用をもつロテノンそれぞれ作用させた B103 細胞において、ミトコンドリア機能と HDAC6 の細胞内局在変化を検討した (図 2)。コントロール細胞に比べ、クロロキシンおよびロテノンを作用させた細胞では Mitotracker の染色性が著しく低下し、ミトコンドリアの機能が低下していることを示した。また、同様の細胞で、HDAC6 は細胞質に顆粒状に蓄積していた。また、クロロキシンとロテノンの両



方を作用させた細胞では、HDAC6 の細胞質蓄積が顕著にみられ、また異常な形態のミトコンドリアも細胞質に見られ、それらは一部共局在していた。この結果は、ロテノンの作用により生じた異常なミトコンドリアが HDAC6 とともにオートファゴソーム膜へ輸送された後、ライソゾームとの癒合がクロロキシンにより阻害されたためと考えられた。

## (2) ライソゾーム病神経細胞におけるアセチル化チューブリンの低下

HDAC6 はクラス II に属する HDAC で細胞質に局在し、主に微小管  $\alpha$ -チューブリンを基質とし、アセチル化を制御し微小管の安定化に関わることが最近の研究で明らかになってきた。そこで、U18666A およびクロロキシンを作用させた B103 細胞で、アセチル化  $\alpha$ -チューブリンの細胞内局在および発現を調べた結果、アセチル化  $\alpha$ -チューブリンの低下を認めた (図 3)。特に、その効果はクロロキ



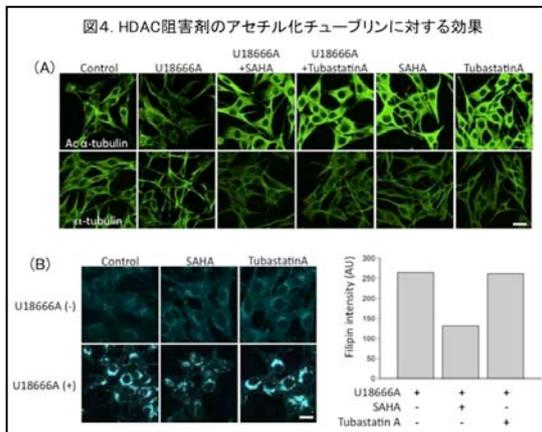
シンを作用させた細胞で顕著に認められ、細胞内で HDAC6 機能が亢進している可能性を示唆した。

## (3) ライソゾーム病神経細胞に対するHDAC阻害剤の効果

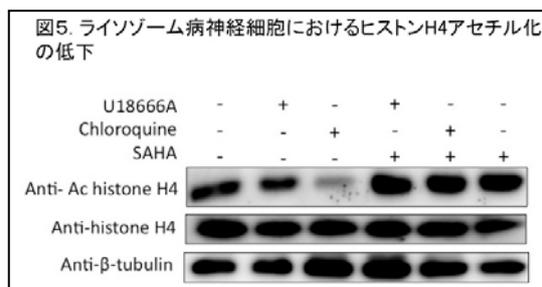
最近の成果から、HDAC は広範な細胞内機能に重要な機能を有することが分かり、HDAC 機能阻害剤は癌、神経疾患などに対する有効性が示されている。特に神経変性疾患においては、ポリグルタミンや変異蛋白質の蓄積を原因とするハンチントン病や筋萎縮性側索硬化症などに対する治療効果が動物モデルで示されている。また、最近、ライソゾーム病であるニーマン・ピック病 C 型患者皮膚線維芽細胞のコレステロール蓄積に対し、HDAC 阻害剤が蓄積を軽減することが示された。さらに、ライソゾーム病であるゴーシェ病に対する効果の報告もされているが、詳細な効果の機序は明らかでない。一方、HDAC はクロマチンと結合するヒストンや非ヒストン性の転写因子を標的とし、p53 や Rb などのがん抑制遺伝子のアセチル化、脱アセチル化の制御はあらゆる種の癌の発生に関わることから、種々の

HDAC 阻害剤が開発され、一部は新規の抗がん剤として承認されている。Suberoyl anilide bishydroxamine (SAHA; vorinostat)はクラス I とクラス II に属する HDAC に対する強力な阻害剤で、皮膚 T 細胞性リンパ腫に対する治療薬として初めて FDA に承認された HDAC 阻害剤である。

我々は、SAHA、HDAC 同様クラス I、II に対する阻害剤トリコスタチン A、および HDAC6 特異的阻害剤ツバスタチン A の 3 種類の HDAC 阻害剤の B103 細胞への効果を検討した。U18666A によるアセチル化  $\alpha$ -チューブリンの低下に対し、3 種類の阻害剤はいずれも軽減効果を示した (図 4A)。一方、U18666A 作用によるライソゾーム内コレステロール蓄積に対する効果では、SAHA とトリコスタチン A では有意な蓄積軽減効果を認めたのに対し、ツバスタチン A による HDAC6 特異的阻害では効果を認めなかった (図 4B)。この結果から



ライソゾーム細胞においては細胞質 HDAC6 以外の HDAC の関与が示唆された。最後に、核内に局在する HDAC について検討を行った。ライソゾーム阻害剤および SAHA を作用させた B103 細胞からヒストン抽出を行い、ヒストン H4 のアセチル化レベルを比較した。結果、U18666A とクロロキンではアセチル化 H4 レベルが低下し、SAHA により正常化していることが分かった (図 5)。



以上の結果からライソゾーム病神経細胞

内では、ライソゾーム内脂質蓄積を起因とした、オートファジー異常にはミトコンドリア機能異常が関連し、さらにヒストン脱アセチル化酵素が複雑に関連していることを示した。SAHA は FDA 認可薬であり、動物実験では血液脳関門を通過することが報告されていることから、脳病変に有効である可能性がある。一方で、広範な HDAC 阻害による副作用も考えられることから、今後、各 HDAC に対する特異阻害剤の効果を調べる必要があると考えられる。また、HDAC 阻害剤の脂質蓄積に対する効果については、HDAC 下流の制御遺伝子の発現が関与する可能性があり、今後これらを明らかにして行くことで、より特異的な治療法が開発できると考えられる。さらには、既存のケミカルシャペロン療法との相乗効果など、動物モデルを用いた治療効果実験を行うことで、新規治療法へと発展できると考えられた。

## 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 11 件)

- ① Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, M. García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, José M. Fernández G, Suzuki Y: A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM1- gangliosidosis. *Mol Ther*, 21, 526-532, 2013. doi: 10.1038/mt.2012.263. Epub 2013 Jan 22. 査読有
- ② Luan Z, Li Linjing, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K: The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain Dev*, 35, 3170322, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.008. Epub 2012 Jun 7. 査読有
- ③ Castilla J, Riquez R. Cruz D, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Carcia Fernandez JM, Castillon S: Conformationally-locked N-glycosides with selective  $\beta$ -glucosidase inhibitory activity: Identification of a new non-iminosugar-type pharmacological chaperone for Gaucher disease. *J Med Chem* 55:6857-65, 2012. doi: 10.1021/jm3006178. Epub 2012 Jul 18. 査読有

④ Aguilar-Moncayo M, Takai T, Higaki K, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Li L, Yu Y, Ninomiya H, García-Moreno I, Ishii S, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological chaperones for Fabry disease and GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Chem Commun* 48: 6514-6, 2012. doi: 10.1039/c2cc32065g. Epub 2012 May 23. 査読有

⑤ Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic chaperone effect of N-octyl 4-epi-β-valienamine on murine G(M1)-gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 106: 92-8, 2012. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.02.012. Epub 2012 Mar 3. 査読有

⑥ Xiong H, Higaki K, Wei C, Bao CW, Zhanf YH, Fu N, Qui J, Adachi K, Kumura Y, Ninomiya H, Nanba E, Wu XR. Genotype/phenotype of 6 Chinese cases with Niemann-Pick disease type C. *Gene*, 498, 332-335, 2012. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.026. Epub 2012 Feb 4. 査読有

⑦ Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolipidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286, 35283-35290, 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.267930. Epub 2011 Aug 16. 査読有

⑧ Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM<sub>1</sub>-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem*, 118, 399-406, 2011. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07310.x. Epub 2011 Jun 17. 査読有

⑨ Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguisson RC, 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. *Hum Mutat*, 32, 843-852, 2011.

doi: 10.1002/humu.21516. 査読有

⑩ Luan Z, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Li L, Ninomiya H, Nanba E, Ohno K, García-Moreno MI, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y. A fluorescent sp<sup>2</sup>-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: Synthesis and intracellular distribution studies. *ChemBioChem*, 11, 2453-2463, 2010. doi: 10.1002/cbic.201000323. 査読有

⑪ Li L, Higaki K, Ninomiya H, Luan Z, Iida M, Ogawa S, Suzuki Y, Ohno K, Nanba E. Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of β-galactosidase mutations. *Mol Genet Metab*, 101, 354-369, 2010. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.08.012. Epub 2010 Aug 18. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

① 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ヒトI51T変異β-ガラクトシダーゼに有効な新規ケミカルシャペロン化合物の解析. 第54回日本先天代謝異常学会、岐阜、2012.11.15-17.

② 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, Yu Yi, 大野耕策, 鈴木義之: ファブリー病ならびにGM<sub>1</sub>-ガングリオシドーシスに対する新しいシャペロン治療薬の開発. 第57回日本人類遺伝学会、東京、2012.10.24-27.

③ Yu Y, Higaki K, Takai T, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. 第17回ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.

④ Takai T, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: A novel chaperone compound for GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. 第17回日本ライソゾーム病研究会、東京、2012.10.5-6.

⑤ Yi Y, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第53回日本先天代謝異常学会総会、千葉、2011.11.24-26.

⑥ 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第53回日本先天代謝異常学会総会、千葉、

2011.11.24-26.

⑦ Higaki K., Ohno K, Suzuki Y, Nanba E.

Chemical chaperone therapy for  $\beta$ -galactosidase deficiency. 12<sup>th</sup>

International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011,10.11-15.

⑧ 檜垣克美, 高村歩美, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第16回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2011. 9.29-30.

⑨ 三浦弘子, 檜垣克美, 山内裕子, 高井知子, 難波栄二: ライソゾーム病神経変性とミトコンドリア異常. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.21-24.

⑩ 高井知子, 檜垣克美, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する新規シヤペロン化合物. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.21-24.

⑪ Takai T, Higaki K., Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in  $\beta$ -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8.4-6

⑫ Nanba E. Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8.4-6

⑬ 檜垣克美, 栞卓, 李林静, 難波栄二, 大野耕策, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández, 鈴木義之: ゴーシェ病に対する蛍光標識薬理学的シヤペロンの効果に関する検討. 第15回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010.12.10-11

⑭ 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 榊原康文, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト変異 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するシヤペロン効果. 第83回日本生化学会大会, 神戸, 2010.12.7-10.

⑮ 高井知子, 檜垣克美, 李林静, 飯田真己, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対するシヤペロン活性測定のための新規細胞系の構築. 第52回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10.21-23.

⑯ 難波栄二: ケミカルシヤペロン療法. 第52回日本先天代謝異常学会総会, 大阪, 2010.10.21-23.

⑰ 難波栄二, 檜垣克美: GM1-ガングリオシドーシス脳神経細胞内のユビキチン化蛋白

質の蓄積. 第52回日本小児神経学会総会, 福岡, 2010.5.20-22.

[図書] (計3件)

① 檜垣克美, 足立香織, 難波栄二. GM1-ガングリオシドーシス. 先天代謝異常症候群 第2版 (日本臨床社) 478-485, 2012

② 難波栄二, 檜垣克美. ガングリオシドーシス. Brain Medical (メディカルレビュー社) vol24 No3, 13-19, 2012

③ 難波栄二, 檜垣克美. ライソゾーム病の病因. 血液フロンティア (医薬ジャーナル社) Vol.21 No.4 p.539-547. 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: "UTILIZACIÓN DE DERIVADOS BICÍCLICOS DE 1-DESOXIGALACTONOJIRIMICINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON BETA-ENZIMAS GALACTOSIDASAS LISOSÓMICAS MUTANTES HUMANAS"  
発明者: José Manuel García Fernández, Carmen Ortiz Mellet, Eiji Nanba, Katsumi Higaki, Yoshiyuki Suzuki  
権利者: SPANISH NATIONAL RESEARCH COUNCIL (CSIC)

種類: 特許

番号: number 201232024 before the Spanish Patent and Trademark Office.

出願年月日: 26 December 2012

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 栄二 (NANBA EIJI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授  
研究者番号: 40237631

(2) 研究分担者

檜垣 克美 (HIGAKI KATSUMI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号: 90294321