

平成25年 2月

高井知子 学位論文審査要旨

主 査 久 留 一 郎
副主査 大 野 耕 策
同 難 波 栄 二

主論文

A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis

(GM₁ガングリオシドーシスに対する新規薬理的シャペロンとして有効な二環式1-デオキシガラクトノジリマイシン誘導体)

(著者：高井知子、檜垣克美、Matilde Aguilar-Moncayo、Teresa Mena-Barragán、平野友紀、由良敬、Liang Yu、二宮治明、M. Isabel García-Moreno、榊原康文、大野耕策、難波栄二、Carmen Ortiz Mellet、José M. García Fernández、鈴木義之)

平成25年 Molecular Therapy 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis

(GM₁ガングリオシドーシスに対する新規薬理的シャペロンとして有効な二環式1-デオキシガラクトノジリマイシン誘導体)

GM₁ガングリオシドーシスは、ライソゾーム酵素β-ガラクトシダーゼの遺伝的欠損により発症するライソゾーム病の一つで、小児期に重篤な中枢神経症状を主症状とする難病である。現在、この疾患の脳障害に対する治療法は無い。これまでの研究で、GM₁ガングリオシドーシス脳障害に有効な新規治療法「ケミカルシャペロン療法」の開発を行い、ケミカルシャペロン化合物*N*-octyl-4-epi-β-valienamine (NOEV)を同定した。しかし、NOEVの効果は変異型特異性を有するため、より多くの変異型に効果を示す新規化合物の開発が必要とされていた。本研究では、新規1-デオキシガラクトノジリマイシン誘導体 5*N*, 6*S*-(*N*-butyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (6*S*-NBI-DGJ)について、試験管内、培養細胞及びモデルマウスにおける効果を検討した。

方 法

ヒトβ-ガラクトシダーゼ活性は、4-MU標識した人工基質を用いて測定した。試験管内酵素阻害活性は、正常ヒト線維芽細胞抽出液を用いて測定した。試験管内酵素安定化活性は、48°C、中性条件下で測定した。ヒトβ-ガラクトシダーゼ酵素と6*S*-NBI-DGJの結合は、インシリコ・ドッキング解析により解析した。ヒト患者由来線維芽細胞に対する酵素活性上昇効果（シャペロン効果）の検討は、培養液中に6*S*-NBI-DGJを添加し、96時間培養後、細胞抽出液中のβ-ガラクトシダーゼ活性の測定により行った。また、細胞分画は、密度勾配遠心法により行った。変異酵素に対する6*S*-NBI-DGJ効果の検討は、88種類のヒト変異β-ガラクトシダーゼcDNA発現ベクターを培養COS7細胞に一過性に導入後、6*S*-NBI-DGJを含む培地で48時間培養後の細胞抽出液中のβ-ガラクトシダーゼ活性測定により行った。モデルマウスへの投与実験では、5 mmol/lあるいは10 mmol/lの6*S*-NBI-DGJを1週間飲水投与した。脳組織ホモジェネート中の酵素活性を測定した。培養細胞抽出液及びマウス組織ホモジェネートにおける蛋白質発現解析は、ウェスタンブロット法と蛍光免疫染色を行った。基質蓄積に関しては、蛍光免疫染色によって解析した。

結 果

6S-NBI-DGJは、試験管内でヒト β -ガラクトシダーゼに対し、濃度依存的基質競合阻害活性と酵素安定化活性を示した。インシリコ・ドッキング解析により、この化合物が酵素の活性中心に結合することが分かった。患者皮膚由来線維芽細胞に対する効果では、8細胞中7細胞に有意なシャペロン効果を示し、変異酵素のライソゾームへの輸送を促進することが分かった。シャペロン効果の変異型特異性については、88種類中I51Tを含む24種類の変異型に効果を認めた。また、モデルマウス線維芽細胞における基質GM₁蓄積とオートファジー異常に対し軽減効果を示した。さらに、6S-NBI-DGJを1週間飲水投与したR201Cモデルマウス脳内では、酵素活性の上昇、基質GM₁蓄積の減少及びオートファジー関連蛋白質蓄積の減少を認めた。

考 察

本研究では、新規ケミカルシャペロン化合物6S-NBI-DGJについて、シャペロン効果の変異型特異性のプロファイリングが、NOEVとは大きく異なることを明らかにした。6S-NBI-DGJは、日本人患者で比較的発生頻度が高くNOEVが効果を示さないI51T変異など4種類のcommon変異に有効であることから、より多くの患者に対応できる可能性が示唆された。

一方、遺伝性ライソゾーム病の神経変性に至るメカニズムとして、基質蓄積から始まりオートファジー異常などが関与していることが考えられている。本研究では、培養細胞及びモデルマウス脳組織における6S-NBI-DGJの基質蓄積とオートファジー異常に対する改善効果を示した。さらに、マウスへの飲水投与により脳組織において効果が認められたことから、6S-NBI-DGJは腸管から吸収された後、血液脳関門を通過し脳病変に対して効果を示すことが示唆された。

結 論

6S-NBI-DGJは、GM₁ガングリオシドーシスの脳病態に有効な新規ケミカルシャペロンである。