

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 15 年度採択研究代表者

伊藤 孝司

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

薬科学教育部附属医薬資源教育研究センター 創薬生命工学分野 教授)

「糖鎖機能を利用した組換えリソゾーム酵素の脳内補充療法の開発」

1. 研究実施の概要

リソゾーム酵素のリソゾームへの移行は、酵素に付加される特異的な糖鎖構造の認識システムにより制御されている。近年、組換え酵素の糖鎖と標的細胞表面の糖鎖レセプターとの結合・細胞内取り込みを利用したリソゾーム病（リソゾーム酵素欠損症）の酵素補充療法が実用化され、その社会医学的需要が増大している。本研究では、中枢神経障害を伴うリソゾーム病の酵素補充療法を開発すべく、メタノール資化酵母株を用いたヒト型様糖鎖含有組換えリソゾーム酵素の大量生産系の確立とバイオインフォーマティクスを基盤とした高機能化酵素のデザインを行う。また血液脳関門透過能をもつ脳標的化ペプチドタグ融合酵素やコンジュゲートあるいは当該酵素を恒常発現・分泌する脳内侵入性細胞株を作製して欠損症モデルマウスに投与し、末梢血管から脳実質内へ、また神経系構成細胞（ニューロン及びグリア等）内へと酵素を送達するための技術開発と評価を進めている。今年度までに β -ヘキソミニダーゼ（Hex）アイソザイムを恒常発現・分泌する酵母変異株の作製、脳標的化タグ融合 Hex やコンジュゲートの精製、また分子モデリングに基く Hex 機能の人為的改変を行っている。さらに Hex 欠損モデルマウス由来の各種神経系細胞株、骨髓間葉系幹細胞株及び核移植 ES 細胞株の樹立に成功している。今後は Hex 欠損モデルマウス個体及び神経系構成細胞に対する脳標的化タグ融合 Hex やコンジュゲートの脳内移行と糖鎖レセプターを介した細胞内取り込み機構を解明していく予定である。

2. 研究実施内容

【研究目的】

中枢神経症状を伴うリソゾーム病の酵素補充療法の開発を目指して、GM2-ガングリオシドーシスである Tay-Sachs 病（Hex α 欠損症）及び Sandhoff 病（Hex β 鎖欠損症）を対象疾患として、メタノール資化酵母を用いたヒト型様糖鎖含有組換え Hex アイソザイムの大量生産・精製系の確立、バイオインフォーマティクスに基く高機能化 Hex 分子のデザインと評価、血液脳関門透過性ペプチドタグ融合 Hex やコンジュゲートの作製と脳標的化

技術の開発及び Sandhoff 病モデルマウス（SD マウス）由来の神経系培養細胞株の樹立や幹細胞からの分化誘導系を用いた酵素補充及び治療効果の評価を行う。

【研究方法】

- (1) 糖鎖生合成に関するメタノール資化酵母変異株を用いてヒト型様糖鎖構造をもつ組換え HexA の大量生産を行い、生産性の向上や高回収率精製を目指した Hex サブユニット遺伝子の改変と His タグ付加酵素の作製を行う。またマンノース-6-リン酸残基の含有率等の糖鎖構造の解析と Tay-Sachs 病患者由来皮膚纖維芽細胞への組換え酵素の補充効果の検討を行う。
- (2) ヒト HexB ($\beta\beta$ ホモダイマー) の X 線結晶構造を基に構築した HexA アイソザイム ($\alpha\beta$ ヘテロダイマー) の分子モデルにおいて、 $\alpha\beta$ サブユニット間相互作用の安定化に関するアミノ酸残基を予測し、当該変異導入遺伝子の発現実験により高機能化を検討する。Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病患者で同定されたミスセンス変異体の構造モデルと臨床表現型との相関を解析する。
- (3) SD マウス由来の神経系構成細胞の培養モデル系を構築するため、新生児マウス由来の各種神経系細胞株の樹立、またニューロスフィア(神経幹細胞)、骨髄間葉系幹細胞及び体細胞由来核移植 ES 細胞の樹立を試みる。さらにマンノース-6-リン酸レセプター (M6PR) 及びマンノースレセプター (MR) の発現を解析する。
- (4) 脳標的化ペプチドをビオチン-アビジン高分子複合体上に提示させて組換え Hex アイソザイムやモデルタンパク質とのコンジュゲートを作製し、Hex 酵素等の 1 分子に付加されるタグ分子数の評価を行う。また人工血液脳関門モデル系や実験動物における脳移行性を検討し、最適化を行う。
- (5) 脳標的化ペプチド配列を融合した β -サブユニットを含む組換えヒト HexA を恒常発現・分泌する CHO 細胞株を樹立し、培養系での補充効果を検討する。
- (6) 脳移行性を示すミクログリア株細胞および骨髄由来細胞を樹立し、Hex サブユニット遺伝子を導入後、SD マウスに対する *ex vivo* 遺伝子治療を試みる。

【結果・結論】

- (1) His タグを N 末端に付加した β -サブユニットを利用し、組換えヒト HexA を高発現するメタノール資化酵母 *Ogatae minuta* 株を樹立した。ファーメンターを用いて大量培養後、マンノシダーゼ処理により末端マンノース-6-リン酸 (M6P) 基を露出させた HexA (M6PHisHexA) を培養液 1L 当たり 0.8mg 程度精製することが可能になった。また M6PHisHexA は Tay-Sachs 病患者由来纖維芽細胞に M6PR を介して取り込まれ、欠損酵素活性を回復させ、蓄積基質である GM2 ガングリオシドを分解することが示された。メタノール資化酵母発現系で得られたヒト型様糖鎖含有組換え HexA が、その欠損症の酵素補充療法に応用可能であると考えられた。

- (2) ヒト HexB の構造情報を基に HexA の分子モデルを構築し、サブユニット間相互作用に関するアミノ酸残基を予測した。また HexA を安定化すると予測されたβサブユニットのアミノ酸置換型ミスセンス変異遺伝子の発現実験により、HexA の熱安定性を増大させるアミノ酸置換が見出された。またαβサブユニット間相互作用に関してヒト-マウス間の種差の原因となるアミノ酸残基の置換により、キメラ HexA の安定性の増大が示唆された。
- (3) 定量的 PCR により SD マウス由来のシュワン細胞における M6PR mRNA の発現を解析したところ、その発現はヒト皮膚纖維芽細胞に比べ、1/15~1/40 程度であった。神経系細胞への酵素補充を強化するために、組換え酵素の糖鎖に付加される M6P 残基数の重要性が示唆された。
- (4) CHO 細胞株由来の組換えヒト HexA は、SD マウス由来の骨髓間葉系幹細胞から分化誘導された神経細胞に、M6PR を介して細胞内に取り込まれ、蓄積 GM2 及び GlcNAc-oligosaccharides を分解することが示された。
- (5) 新生児 SD マウスの脳から、新たにニューロスフィア（神經幹細胞）とオリゴデンドロサイト前駆細胞を単離した。また SD マウス体細胞由来の核移植 ES 細胞の樹立に成功した。神経系細胞をはじめ様々な組織細胞への分化誘導系を構築する基盤ができ、今後糖鎖レセプターを介した治療効果の評価に応用できると考えられた。
- (6) ビオチン-アビジン高分子複合体上に提示した脳移行性ペプチドと、モデルタンパク質（抗体分子、GFP 等）とのコンジュゲート作成に関する最適化法を確立した。脳移行性ペプチド配列を組み込んだ発現ベクターを構築してアザミグリーンとの組換え融合タンパク質を作製・精製し、正常マウスの血中に投与することにより脳移行性が示された。また脳標的化ペプチド配列を融合したβ-サブユニットを含む組換えヒト HexA を恒常発現・分泌する CHO 細胞株から精製した融合酵素が Sandhoff 病患者由来纖維芽細胞に M6PR を介して取り込まれ、治療効果が示された。
- (7) マウス脳血管内皮細胞株を用いた人工血液脳関門 (BBB) モデル系において、ミクログリア細胞がトランスマイグレーションの機構で内皮細胞層を透過することが示された。また新生児 SD マウスの脳からミクログリア株を樹立することに成功した。今後は、これらの知見を統合し、神経系培養モデル、人工血液脳関門モデルや SD マウスを利用して、大量生産・精製した脳標的化タグ融合ヒト HexA やコンジュゲートの神経系構成細胞や脳内への補充・治療効果を検討・評価するとともに、HexA の高機能化デザインを行い、組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発・改良を進めていく。

3. 研究実施体制

「徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部」 研究グループ

①研究分担グループ長：伊藤 孝司（創薬生命工学分野、教授）

②研究項目：Sandhoff 病(β-ヘキソサミニダーゼ β-サブユニット欠損症)モデルマウスの中

中枢神経系への酵素補充効果の評価システムの構築

1. CHO 細胞株由来 BT タグ融合組換えヒト HexA アイソザイムの培養細胞への酵素補充効果の解析
2. Sandhoff 病モデルマウス(SD マウス)脳からの中枢神経系構成細胞の樹立と治療効果の検討
3. SD マウスの骨髓間葉系幹細胞の神経細胞への *in vitro* 分化誘導
4. SD マウス体細胞由来核移植 ES 細胞株(ntES)の樹立
5. 分子モデルに基く組換えヒト HexA アイソザイムの高機能化解析

「産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター」 研究グループ

①研究分担グループ長：地神 芳文（産総研・糖鎖工学、センター長(兼チーム長)）

②研究項目：

1. 酵母による組換え HexA の大量生産
2. 酵母による組換え HexA の糖鎖構造解析
3. 酵母による組換え HexA の機能評価

「(財) 東京都医学研究機構」 研究グループ

①研究分担グループ長：桜庭 均（東京都臨床医学総合研究所、参事研究員）

②研究項目：

1. 培養シュワン細胞および培養線維芽細胞におけるマンノース-6-リン酸受容体含量の比較
2. マウス由来のザンドホップ病ニューロフェアの作製
3. 組み換えグルコセレブロシダーゼを認識する特異抗体の作製

「名古屋大学」 研究グループ

①研究分担グループ長：澤田 誠（名古屋大学、教授）

②研究項目：脳標的化ペプチドおよび脳特異的侵入性細胞を用いた脳への酵素導入と血液脳関門透過機構の検討

「セレスター・レキシコ・サイエンシズ」 研究グループ

①研究分担グループ長：土居 洋文（幕張 R&D センター、代表取締役社長）

②研究項目：3 次元構造情報に基づく β -Hex サブユニット間相互作用の解析と高機能化を目指した組換え酵素分子のデザイン

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 研究グループ

- **Tsuji, D.**, Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., Kuwahara, J., Yamanaka, S., **Itoh, K.**
Specific induction of macrophage inflammatory protein 1-alpha in glial cells of Sandhoff disease model mice associated with accumulation of N-acetylhexosaminyl glycoconjugates.
J. Neurochem., 92, 1497-1507, 2005.
- **Tsuji, D.**, Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., and **Itoh, K.**
Metabolic correction in microglia derived from Sandhoff disease model mice.
J. Neurochem., 94, 1631-1638, 2005.
- Murata-Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Kuroki, A., **Itoh, K.**, Watabe, K., Sango, K., Yamanaka, S., Sakuraba, H.
Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human β -hexosaminidase A on the accumulated GM2 ganglioside.
J. Hum. Genet., 50(9), 460-467, 2005.
- Oheda, Y., Kotani, M., Murata, M., Sakuraba, H., Kadota, Y., **Tatano, Y.**, Kuwahara, J. and **Itoh, K.**
Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement.
Glycobiology, 16(4):271-280, 2005.
- Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., Tajima, Y., Kotani, M., Ohshima, T., Chiba, Y., Takashiba, M., Jigami, Y., Fukushige, T., Kanzaki, T and **Itoh, K.**
Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice.
J. Hum. Genet., 51, 180-188, 2006.
- **Tatano, Y.**, Takeuchi, N., Kuwahara, J., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., **Itoh, K.**
Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal β -galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuraminidase-1 deficiencies.
J. Med. Invest., 53, 103-112, 2006.
- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and **Itoh, K.**
Molecular pathologies and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases.
Current Drug Targets - Central Nervous System and Neurological Disorders. in press(2006).

産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター 研究グループ

- Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., Tajima, Y., Kotani, M., Ohshima, T., Chiba, Y., Takashiba, M., Jigami, Y., Fukushige, T., Kanzaki, T and Itoh, K.

Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice.

J. Hum. Genet., 51, 180-188, 2006.

- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and Itoh, K. Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases.

Current Drug Targets, in press (2006).

(財) 東京都医学研究機構 研究グループ

- Kanekura,T., Sakuraba,H., Matsuzawa,F., Aikawa,S., Doi,H., Hirabayashi,Y., Yoshii,N., Fukushige,T., Kanzaki,T.
Three dimensional structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-NAGA) in alpha-NAGA deficiency (Kanzaki disease) : Different gene mutations cause peculiar structural changes in alpha-NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes.

J. Dermatol. Sci., 37, 15-20, 2005.

- Tajima, Y., Uyama,E., Go,S., Sato,C., Tao,N., Kotani,M., Hino,H., Suzuki,A., Sanai,Y., Kitajima,K., Sakuraba,H.
Distal myopathy with rimmed vacuoles : Impaired O-glycan formation in sarcolemmal glycoproteins.

Am. J. Pathol., 166, 1121-1130, 2005.

- Matsuzawa,F., Aikawa,S., Doi,H., Okumiya,T., Sakuraba,H.
Fabry disease : Correlation between structural changes in alpha-galactosidase and clinical and biochemical phenotypes.

Hum. Genet., 117, 317-328, 2005.

- Eto,Y., Ohashi,T., Utsunomiya,Y., Fujiwara,M., Mizuno,A., Inui,K., Sakai,N., Kitagawa,T., Suzuki,Y., Mochizuki,S., Kawakami,M., Hosoya,T., Owada,M., Sakuraba,H., Saito, H.
Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients : the results of a phase 2 bridging study.

J. Inher. Metab. Dis., 28, 575-583, 2005.

- Kanekura,T., Fukushige,T., Kanda,A., Tsuyama,S., Murata,F., Sakuraba,H., Kanzaki, T.
Immunoelectron microscopic detection of globotriaosylceramide accumulated in the skin of patients with Fabry disease.

Br. J. Dermatol., 153, 544-548, 2005.

- Ohsawa,M., Kotani,M., Tajima,Y., Tsuji,D., Ishibashi,Y., Kuroki,A., Itoh,K., Watabe,K., Sango,K., Yamanaka,S., Sakuraba,H.

Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of

recombinant human beta-hexosaminidase A on the accumulated GM2 ganglioside.

J. Hum. Genet., 50, 460-467, 2005.

- Lavigne,M.D., Pohlschmidt,M., Novo,F.J., Higgins,B., Alakhov,V., Lochmuller,H., Sakuraba,H.,
Goldspink,G., MacDermot, K., Gorecki, D.C.
Promoter dependence of plasmid-pluronics targeted alpha-galactosidase A expression in skeletal muscle of Fabry mice.
Mol. Ther., 12, 985-990, 2005.
- Inagaki,S., Migita,M., Hayakawa,M., Fujita,A., Yoshida,J., Ishizaki,M., Kotani,M.,
Sakuraba,H., Shimada,T., Murakami,M., Fukunaga,Y.
An asymptomatic heterozygous female with Fabry disease.
J. Nippon Med. Sch., 72, 387-390, 2005.
- Sakuraba,H., Murata-Ohsawa,M., Kawashima,I., Tajima,Y., Kotani,M., Ohshima,T., Chiba, Y., Takashiba,M., Jigami,Y., Fukushige,T., Kanzaki,T., Itoh, K.
Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice.
J. Hum. Genet., 51, 180-188, 2006.
- Tatano,Y., Takeuchi,N., Kuwahara,J., Sakuraba,H., Takahashi,T., Takada,G., Itoh,K.
Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal beta-galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuraminidase-1 deficiencies.
J. Med. Invest., 53, 103-112, 2006.
- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and Itoh, K.
Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases.
Current Drug Targets, in press (2006).

名古屋大学 研究グループ

- Moriya, M., Nakatsuji, Y., Okuno. T., Hamasaki T, Sawada, M., Sakoda, S.
Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats.
J. Neuroimmunology, 170(1-2), 11-20, 2005.
- Takatsuna, H., Morita, S., Nagatsu, T., Sawada, M., Umezawa, K.
Inhibition of inflammatory cytokine secretion from mouse microglia cells by DHMEQ, an NF-kappaB inhibitor.
Biomed. Pharmacother., 59, 318-322, 2005
- Himeda, T, Ohara, Y, Asakura, K, Kontani, Y, Sawada, M.
A lentiviral expression system demonstrates that L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) has an anti-apoptotic effect in a macrophage cell line.

Microb. Pathog., 38(5-6), 201-207, 2005.

- Hagiwara, H., Hara, M., Tsunekawa, K., Nakagawa, Y., Sawada, M. and Nakano, K.
Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice.
Brain Res. Mol. Brain Res., 139(2), 258-266, 2005.
- Imamura, K., Hishikawa, N., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M. and Hashizume, Y.
Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains.
Acta Neuropathol. (Berl), 109, 141-150, 2005.
- Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Fujii, S., Oh-Hashi, K., Kiuchi, K., Takahashi, M. and Isobe, K.
Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells.
FEBS Lett., 579, 1995-2000, 2005.
- Kaneko, Y.S., Mori, K., Nakashima, A., Sawada, M., Nagatsu, I. and Ota, A.
Peripheral injection of lipopolysaccharide enhances expression of inflammatory cytokines in murine locus coeruleus: possible role of increased norepinephrine turnover.
J. Neurochem., 94, 393-404, 2005.
- Nagatsu, T. and Sawada, M.
Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines.
Curr. Pharm. Des., 11, 999-1016, 2005.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Takayama-Ito, M., Yamamoto, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.
Rabies Virus-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF-kappaB Signaling Pathways Regulates Expression of CXC and CC Chemokine Ligands in Microglia.
J. Virol., 79, 11801-11812, 2005.
- Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Yamamoto, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.
Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways.
J. Neurochem., 95(1), 273-283, 2005.
- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and Itoh, K.
Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases.
Current Drug Targets, in press (2006).

セレスター・レキシコ・サイエンシズ 研究グループ

- Matsuzawa F., Aikawa S., Doi H., Okumiya T., Sakuraba H.
Fabry disease: correlation between structural changes in alpha-galactosidase, and clinical and biochemical phenotypes.
Hum. Genet., 117, 317-328, 2005.
- Kanekura,T., Sakuraba,H., Matsuzawa,F., Aikawa,S., Doi,H., Hirabayashi,Y., Yoshii,N., Fukushige,T., Kanzaki,T.
Three dimensional structural studies of alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-NAGA) in alpha-NAGA deficiency (Kanzaki disease) : Different gene mutations cause peculiar structural changes in alpha-NAGAs resulting in different substrate specificities and clinical phenotypes.
J. Dermatol. Sci., 37, 15-20, 2005.
- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and Itoh, K.
Molecular pathologies of and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases.
Current Drug Targets, in press (2006).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件 (CREST 研究期間累積件数：3 件)