

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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 教授)

主たる共同研究者：

千葉 靖典((独)産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター 主任研究員)

櫻庭 均(明治薬科大学分析化学教室 教授)

澤田 誠(名古屋大学環境医学研究所 教授)(～平成19年3月)

土居 洋文(セレスター・レキシコ・サイエンシズ(株)幕張R&Dセンター

代表取締役社長)(～平成17年3月)

3. 研究内容及び成果：

近年、リソソーム酵素及び関連因子の遺伝子変異が原因で、酵素欠損と基質の過剰蓄積を伴って発症する遺伝性リソソーム病(約 40 種存在)に対する根本治療法として、組織細胞表面のマノース-6-リン酸(M6P)レセプター(M6PR)を分子標的とし、哺乳類培養細胞発現系由来の M6P 含有糖鎖付加型の組換えヒトリソソーム酵素製剤を患者の静脈内に投与する酵素補充療法が、一部の疾患(6 種類)に対して実用化されている。

しかし現行の酵素補充療法の問題点として、1)哺乳類細胞発現系による組換え酵素の大量生産の限界、患者への酵素安定供給の困難性と薬価の高騰、2)血液脳関門により末梢から脳実質内への酵素送達に困難で、中枢神経症状を伴うリソソーム病に対してほとんど無効であること、3)患者への継続投与に基づく抗体産生等の副作用の発現などがある。

本研究では、これらの問題を克服すべく、中枢神経障害を伴うリソソーム病の代表例で、 β -Hexosaminidase A(HexA, $\alpha\beta$ heterodimer)の欠損に基づき、脳内 GM2 ガングリオシド等の過剰蓄積を伴って発症する Tay-Sachs 病(Hex α 鎖欠損症)及び Sandhoff 病(Hex β 鎖欠損症)を研究対象とした「糖鎖機能を利用した脳内酵素補充療法の開発」を実施した。

【研究実施内容及び成果】

1) ヒト型糖鎖含有組換えリソソーム酵素の大量発現系の構築と糖鎖構造改変に基く高機能化技術の開発

組織細胞表面の M6PR との結合能をもつ、M6P 含有糖鎖付加型組換えヒト HexA の安全・安価な大量発現系を構築する目的で、

(1) (独)産業医技術総合研究所(以下、産総研)・糖鎖医工学研究センターの地神・千葉らは、ヒト HexA の α 及び β 鎖を各々コードする *HEXA* 及び *HEXB* の cDNA を同時導入したメタノール資化酵母 *Ogataea minuta* (*Om*) 株と、新たにクローニングした *MNN4* 遺伝子(Phosphomannosyl transferase の正の制御因子)をさらに導入した *Om4* 株を樹立した。また各株から分泌される HexA の精製法を確立し、 α -Mannosidase 処理後、末端 M6P 露出型 HexA における M6P 含有酸性糖鎖の割合が、*MNN4* 導入前後で 14%から 45%まで増大していることを明らかにした。

(2) いずれの株由来の M6P *Om*HexA も、患者由来皮膚繊維芽細胞や徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(以下、徳島大院 HBS 研)の伊藤ら及び(財)東京都臨床医学総合研究所(以下、都臨床総研)の櫻庭(現、明治薬科大学)らが Sandhoff 病モデルマウス(SD マウス)から樹立した神経系培養細胞に、M6PR との結合を介して取り込まれ、欠損酵素活性を回復させるとともに、GM2 等の蓄積基質

を分解した。また *Om4* 株由来 HexA による活性回復率は、*Om* 株由来酵素に比べ 10 倍程度増大していた。

- (3) 徳島大院 HBS 研の伊藤らは、*Om* 及び *Om4* 株由来 HexA の SD マウスの脳室内投与により、脳実質内での酵素活性回復、蓄積基質の減少及び有意な運動機能の改善を示し、特に高 M6P 含有 *Om4* 株由来 HexA の優位性を明らかにした。

2) 遺伝性神経難病の分子病態解明とバイオインフォーマティクスに基づく高機能型酵素の分子デザイン及び検証

一回の有効投与量と薬価及び副作用の低減を図るため、野生型よりも高機能化した組換えヒト HexA をデザイン・作製することを目的として、

- (1) 都臨床総研の櫻庭(現、明治薬科大学)らとセレスター・レキシコ・サイエンシズ社(以下、セレスター社)の土居らは、ヒト HexA の結晶構造に基づき、欠損症患者で同定されたアミノ酸置換型変異の立体構造に及ぼす影響を予測し、変異の種類と臨床表現型の重症度との相関を解明した。
- (2) セレスター社の土居らが *in silico* で予測した、HexA における α β 鎖間相互作用を強化し、また Hex α 鎖上の β 鎖との相同位置に新たに N 型糖鎖付加部位を追加するアミノ酸置換効果を、徳島大院 HBS 研の伊藤らが CHO 細胞を用いた改変遺伝子発現実験により、Hex アイソザイムのうち HexA の選択的発現の割合と発現産物の *in vitro* での熱安定性が増大し、また実際に M6P 含有 N 型糖鎖が追加され、欠損症患者由来培養細胞への取り込み効率と、SD マウス脳室内投与時の脳内補充効果の増大を解明した。

3) 脳標的化ペプチド及び細胞膜透過性ペプチドの組換え酵素への付加・融合を利用した脳内酵素補充技術の開発

中枢神経症状を伴うリソソーム病患者の脳内への酵素補充技術を開発する目的で、

- (1) 藤田保健衛生大の澤田(現 名古屋大学・環境医学研究所)らは、血液脳関門を通過して脳内への移行活性をもつペプチドと緑色蛍光タンパク質(EGFP)との融合タンパク質を大腸菌遺伝子発現系で作製・精製し、マウス脳血管内皮細胞株を用いた人工血液脳関門系において内皮細胞層に対する透過能をもつことを明らかにした。
- (2) 徳島大院 HBS 研の伊藤らは、京都大学・化学研究所の二木らと共同で、細胞膜透過性ペプチド(Cell penetrating peptide: CPP)の一種であるアルギニン 8 残基(R8)を EGFP の C 末端に連結した融合タンパク質を大腸菌遺伝子発現系で作製・精製した。R8-EGFP は、細胞表面に存在するヘパラン硫酸との結合を介して培養アストロサイトや脳血管内皮細胞株に取り込まれ、リソソームにまで到達することが示された。また野生型マウスの脳室内に投与すると、R8 ペプチド依存的に脳実質内に分布し、神経細胞、ミクログリア及びアストロサイト等の細胞内に取り込まれることを明らかにした。

【結論】

これらの研究成果は、高 M6P 含有組換えヒトリソソーム酵素を用い、M6PR を分子標的としたリソソーム病の脳室内酵素補充療法の有効性と、将来 Glycoreceptor を標的とした Glycoprotein therapy への発展性を示唆するものである。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究は脳内 GM2 ガングリオシドの過剰蓄積を伴い発症する Tay-Sachs 病および Sandhoff 病を対象疾患として脳内酵素補充療法の開発を目指した研究である。酵母を用いてヒト型様糖鎖含有組換えリソソ

ーム酵素の大量発現系を構築させた。また、酵素にマンノース6リン酸(M6P)を多く付加し、他のマンノースをマンノシダーゼで除去することにより、リソソームへの取り込みを格段に上昇させた。これらの酵素をSandhoff病モデルマウスの脳室内へ投与により脳内に異常蓄積したGM2を減少させ、運動機能障害を改善することに成功した。しかしながら、研究開始当初から脳血流関門を通過できるペプチドを利用して、脳内投与ではなく、抹消血管から分解酵素を投与できることが本研究の最大の注目点であった。しかし、この試みは残念ながら不成功に終わっている。

発表論文の数は問題ないが、インパクトの高い雑誌はあまり多くない。

原著論文 27件 招待講演 66件 口頭発表 106件

特許出願 国内 4件 海外 2 件

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

活性型の糖タンパク酵素をヘテロダイマー型で酵母から生産できることを確認できたことは大きな成果である。また、作製した組換えヒトHexAに付加される糖鎖のうちM6Pを含む糖鎖の割合が14%、更に改良株においては45%まで増加しており、酵素欠損患者由来皮膚繊維芽細胞の酵素活性回復率は10倍増大するなどの成果をあげている。臨床応用に進むには、国内では患者数が少ないため、海外の企業と共同研究することが不可欠と思われる。リソソーム病を酵素補充療法で治療しようとする試みは、かなり以前から米国を中心に進められている。本研究の特徴を再度、確認して進める必要がある。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究プロジェクトの推進については、研究代表者はより強いリーダーシップを必要とされ、酵素の脳血流関門通過の検討にもっと注力する必要があったと思われる。

以上