

「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 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

中枢神経障害を呈するリソソーム病に対する組換え酵素補充療法の開発を目的とし、 β -ヘキサミニダーゼ(Hex)の β 鎖遺伝子変異が原因で発症する遺伝性 Sandhoff 病をモデル疾患として、脳内に蓄積する GM2 ガングリオシド(GM2)の分解能と、マンノース6リン酸(M6P)含有率の高い糖鎖や脳移行性ペプチドが付加された高機能型ヒト Hex の作製とその補充効果を検討してきた。

これまでに、メタノール酵母 *Ogataea minuta* で産生され、末端 M6P 糖鎖をもつ HexA が、患者由来培養細胞に対し補充効果を示すこと、また今年度は、モデルマウス新生児腹腔内への投与により一部が脳内に移行すること、および酵母育種による M6P 含量が高い組換え HexA の生産に成功した。さらに *in silico* で予測されたアミノ酸置換による、HexA の熱安定性や M6P 含有糖鎖追加による細胞内取り込みの増大などの高機能化にも成功した。モデルマウス由来の脳、核移植 ntES 及び体性幹細胞から培養神経系細胞株(ニューロン、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト前駆細胞等)を樹立し、各細胞における M6P レセプター等の糖鎖レセプターを介した細胞内取り込みを明らかにした。一方、Hex アイソザイムと脳移行性ペプチドとのコンジュゲートは、培養血液脳関門モデルでの透過活性を示したが、マウス個体注入における脳内移行性の増大を示さなかった。今後は、細胞膜透過性ペプチドも含め、機能性ペプチドを付加した Hex や他のモデルタンパク質の脳内移行について検討する。

2. 研究実施内容

【研究目的】

中枢神経症状を伴うリソソ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 及び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-リン酸の含有率等の糖鎖構造の解析と Tay-Sachs 病患者由来皮膚繊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わ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、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 精製することが可能になった。また M6PHisHexA は Tay-Sachs 病患者由来繊維芽細胞に M6PR を介して取り込まれ、欠損酵素活性の回復と蓄積基質である 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与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 $\alpha\beta$ 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繊維芽細胞に比べ、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 マウス由来の骨髄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（神経幹細胞）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、酵素タンパク質（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 病患者由来繊維芽細胞に 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

(1)「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研究者名

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創製教育研究センター創薬生命工学(環境生物工学)分野 教授)

②研究項目

・ Sandhoff 病 (β -ヘキソサミニダーゼ $\cdot\beta$ -サブユニット欠損症)モデルマウスの中樞神経系への

酵素補充効果の評価システムの構築

(2)「産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門」研究グループ

①研究者名

地神 芳文((独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 上席研究員)

②研究項目

- ・酵母による組換え HexA の大量生産系の構築
- ・患者由来細胞を利用した組換え HexA の評価
- ・リン酸化糖鎖の多量発現に関する遺伝子の解析
- ・マンノース-6-リン酸レセプタードメインの単離と利用

(3)「(財)東京都医学研究機構」研究グループ

①研究者名

桜庭 均((財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 参事研究員)

②研究項目

- ・神経難病の分子病態解明とザンドホッフ病モデルマウス由来培養神経系細胞株の樹立

(4)「名古屋大学」研究グループ

①研究者名

澤田 誠(名古屋大学環境医学研究所生体適応・防御研究部門脳機能分野 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

概要：これまでに、脳内に存在するグリア細胞の一種であるミクログリアが脳障害において活性化され、障害部位に集積する能力があり、さらに実験動物の末梢血管から注入されると血液脳関門(Blood Brain Barrier)を透過して非常に特異的に脳内に侵入する性質があることを見いだした。さらに脳移行性を規定する複数の脳標的化ペプチドを分離することに成功した。本研究では、

- 1) 脳標的化ペプチドをファージ粒子やビオチン-アビジン高分子複合体上で提示させ、実験動物や人工血液脳関門モデル系における脳移行性を検討し、最適化を行う。
- 2) 脳標的化ペプチドと各 β -Hex サブユニットとの融合タンパクを作製する。
- 3) リポソームなどの人工担体を当該ペプチドで標識して脳移行性に改変したものに活性型の酵素を取り込ませる、
- 4) 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に各 β -Hex サブユニット遺伝子を恒常発現させ、Sandhoff病モデルマウスの末梢血管に注入した際

の脳内発現と治療効果を検討する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Oheda, Y., Kotani, M., Murata, M., Sakuraba, H., Kadota, Y., Tatano, Y., Kuwahara, J., Itoh, K., Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology*, 16, 271-280, 2006.
- Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., Itoh, K., Molecular pathogenesis and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases. *Curr. Drug Targets – Central Nervous System and Neurological Disorders*, 5: 401-413, 2006.
- Itakura, T., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Tsuji D., Kawashita, E., Higashine, Y., Sakuraba, H., Yamanaka, S., Itoh, K., Inefficiency in GM2 Ganglioside Elimination by Human Lysosomal β -Hexosaminidase β -Subunit Gene Transfer to Fibroblastic Cell Line Derived from Sandhoff Disease Model Mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1564-1569, 2006.
- Aikawa, S., Matsuzawa, F., Satoh, Y., Kadota, Y., Doi, H., Itoh, K., Prediction of the mechanism of action of omuralide (*clasto*-lactacystin β -lactone) on human cathepsin A based on a structural model of the yeast proteasome β 5/PRE2-subunit/omuralide complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 1372-1380, 2006.
- Tatano, Y., Takahashi, T., Tsuji, D., Takeuchi, N., Tsuta, K., Takada, G., Ohsawa, M., Sakuraba, H., and Itoh, K., Significant decrease in tropoelastin gene expression in fibroblasts from a Japanese Costello syndrome patient with impaired elastogenesis and enhanced proliferation. *J. Biochem.*, 140, 193-200, 2006.
- Yoshida, T., Lepp, Z., Satoh, Y., Kadota, Y., Itoh K., and Chuman, H., Comparative Analysis of Binding Energy of Chymostatin with Human Cathepsin A and its Homologous Proteins by Molecular Orbital Calculation. *J. Chem. Inf. Model.*, 46, 2093-2103, 2006.
- Tsuji, D., Higashine, Y., Matsuoka, K., Sakuraba, H., Itoh, K., Therapeutic evaluation of GM2 gangliosidoses by ELISA using anti-GM2 ganglioside antibodies. *Clin. Chim. Acta*, 378, 38-41, 2007.
- Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Takaoka, Y., Jigami, Y., Takahashi, H., Hirai, Y., Shimada, T., Hashimoto, Y., Ishii, K., Kobayashi, T., Watabe, K., Fukushige, T., Kanzaki, T., Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human α -galactosidase with *N*-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, 51: 341-352, 2006.
- Takashiba, M., Chiba, Y., and Jigami, Y., Identification of phosphorylation sites in *N*-linked glycans by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 78, 5208-5213, 2006.

- Spada, M., Pagliardini, S., Yasuda, M., Tukul, T., Thiagarajan, G., Sakuraba, H., Ponzzone, A., Desnick, R. J., High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am. J. Hum. Genet.*, 79: 31-40, 2006.
- Kawashima, I., Takeuti, I., Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Inomata, T., Izumi, T., Sakuraba, H., Phospholipid storage in the myocardium of a unique Japanese case of idiopathic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta*, 372: 154-157, 2006.
- Kawashima, I., Ohsawa, M., Fukushige, T., Nagayama, Y., Niida, Y., Kotani, M., Tajima, Y., Kanekura, T., Kanzaki, T., Sakuraba, H., Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin. Chim. Acta*, 378: 142-146, 2007.
- Kotani, M., Okamoto, S., Imada, M., Itoh, K., Irie, H., Sakuraba, H., Kubo, H., Flow cytometric analysis of mouse neurospheres based on the expression level of RANDAM-2. *Neurosci. Lett.*, 413: 25-30, 2007.
- Hayashi Yoshinori, Tomimatsu Yoshirou, Suzuki Hiromi, Yamada Jun, Wu Ziqiang, Yao Hngping, Kagamiishi Yoshifumi, Tateishi Narito, Sawada Makoto, Nakanishi Hiroshi, The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. *Neuroscience*, 142(1): 87-96, 2006.
- Imai Fumihiro, Suzuki Hiromi, Oda Jumpei, Ninomiya Takashi, Ono Kenji, Sano Hirotohi, Sawada Makoto, Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27: 488-500, 2007.

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 3 件)