

「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

近年、リソソーム病の根本治療法として、組換えリソソーム酵素に付加されるマンノース-6-リン酸 (M6P) 含有 N 型糖鎖とその分子標的である M6P レセプター (M6PR) との結合を利用した酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy; ERT) が実用化され、その社会的需要が増大している。本研究では、現行法では治療が困難な、中枢神経障害を呈するリソソーム病のうち、 β -ヘキササミニダーゼ (Hex) A (α β ヘテロダイマー) の遺伝的欠損に基づき、GM2 ガングリオシド (GM2) の脳内蓄積を伴って発症する Tay-Sachs 病 (α 鎖欠損症) および Sandhoff 病 (β 鎖欠損症) に対する ERT の開発を目的として研究を推進している。

これまでに、組換えヒト HexA を大量発現するメタノール資化酵母 *Ogataea minuta* (*Om*) 変異株の作製に成功した。この末端 M6P 含有ヒト型様糖鎖をもつ HexA を患者由来培養細胞に添加すると、細胞内に取り込まれ欠損していた酵素活性が回復するとともに、蓄積 GM2 が分解された。また、Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) の尾静脈内に超高用量の 60mg/kg 体重で投与すると、一部が脳内に補充されることを明らかにしてきた。

今年度は、糖鎖の M6P 含有量を増大させる *Om* MNN4-1 遺伝子をヒト HexA 発現 *Om* 株に導入し、実際に M6P 含量が高く、優れた M6PR 結合能を示し、標的細胞内に取り込まれやすい高機能型 HexA の生産に成功した。この高機能型 HexA を SD マウスの脳室内に常用量 (1.2mg/kg 体重) で 1 回投与することにより、24 時間後に野生型の 50% 程度 (十分な治療域) まで脳内酵素活性が回復した。また一週間後には脳全体でニューロンやグリア細胞に蓄積していた GM2、GA2 および末端 GlcNAc 含有糖鎖が減少し、治療効果が認められた。

SD マウス脳から樹立した培養神経系細胞株のうち、アストロサイトは細胞表面 M6PR の発現量が低いことが明らかになった。そこで HexA と膜透過性ペプチド (Cell penetrating peptide; CPP) とのコンジュゲートを作製し、SD 由来アストロサイトに投与したところ、M6PR 非依存に細胞内に取り込まれ、リソソーム内に蓄積していた GA2 が分解されることが示された。今後は、高 M6P 含有

HexA および CPP-HexA コンジュゲートを脳室内に投与する際の各神経系細胞への補充メカニズムを解明し、効率よい脳内補充が可能な次世代型組換えリソソーム酵素を開発していく予定である。

2. 研究実施内容

【研究目的】

脳内 GM2 ガングリオシドの蓄積と中枢神経症状を伴って発症する Tay-Sachs 病 (Hex α 鎖欠損症) 及び Sandhoff 病 (Hex β 鎖欠損症) に対する次世代酵素補充療法 (ERT) の開発を目的として、メタノール資化酵母を用いた高 M6P 含有 N 型糖鎖が付加される組換えヒト HexA の大量生産と精製の確立、高機能型 HexA 分子の *in silico* デザインと評価、血液脳関門を含む膜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内への補充法の開発、Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) 由来の神経系培養細胞株や幹細胞からの分化誘導系の確立と酵素補充及び治療効果の評価を行う。

【研究方法】

1. (独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門では、ヒト *HEXA* (Hex α 鎖遺伝子) と *HEXB* (Hex β 鎖遺伝子) を同時に導入した、メタノール資化酵母 *Ogataea minuta* (*Om*) 変異株を樹立している。またこの *Om* 株から分泌される、ヒト型様糖鎖が付加された組換えヒト HexA の大量生産・精製を行っている。ERT に用いる HexA としては糖鎖に付加される M6P の含有率が高いことが望ましいため、各種の *MNV4* (マンノース残基へのリン酸基の転移促進遺伝子) をさらに導入した改変酵母株を樹立し、高リン酸化糖鎖含有組換えヒト HexA の作製を検討した。
2. 明治薬科大では、他のリソソーム酵素の個体内投与による中枢神経系への補充効果を明らかにする目的で、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で生産された組換えヒト α -ガラクトシダーゼ (GLA) を、常用量 (1mg/kg 体重) または超高用量 (60mg/kg 体重) で 18 日齢のファブリー病 (GLA 欠損症) モデルマウスの尾静脈内に投与し、6 時間後に全身かん流を行い、脳内への酵素移行を肝臓の場合と比較した。また抗 GLA 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、脳組織内に取り込まれた GLA の分布を調べるとともに、電子顕微鏡を用いて脳組織における膜封入体の減少等の病理学的検討を行った。
3. 徳島大では、産総研で精製された *MNV4-1* 非導入株由来の末端 M6P 含有組換えヒト HexA を 60mg/kg 体重の超高用量で Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) の新生仔 (生後 0 日) の腹腔内に投与し、末梢から脳内への酵素移行を検討した。また *MNV4-1* 導入株由来の高 M6P 含有 HexA を 12 週齢の SD マウスの脳室内に投与し、かん流後、脳実質内の HexA 活性の回復と、GM2、GA2 および末端 GlcNAc 含有糖鎖に対する抗体を用いた免疫染色による

蓄積基質の減少を指標に脳内補充効果を検討した。また SD マウス由来アストロサイト内への HexA 取り込みに対する膜透過ペプチド(CPP)の付加効果を検討した。

4. 名古屋大では、これまでに開発した脳標的化ペプチドを糖タンパク質の糖鎖に付加する方法を確立する目的で、糖鎖修飾されている G-CSF(ノイトロジン)を用いて付加反応条件を検討した。また脳標的化ペプチドとリソソーム酵素との融合タンパク質の作製を目的として、脳標的型リコンビナントグルコセレブロシダーゼの大腸菌発現系の構築を試みた。

【結果・結論】

1. *OmMNN4-1* 導入株をジャーファーマンターで培養した結果、*MNN4-1* 非導入株と同程度の Hex 活性を培養上清中に確認できた。精製条件の改良も行い、高い回収率(23%, 13%)、比活性[2.8, 4.7mmol/h/mg (MUG)]で HexA 及び M6PHexA が得られた。*OmMNN4-1* 非導入株由来の HexA に付加されたリン酸化糖鎖は全糖鎖の約 14%であるのに対して、今回得た *OmMNN4-1* 強制発現株由来の HexA では約 45%まで増加していた。患者由来皮膚繊維芽細胞に対する取込みは、非導入株由来の M6PHexA 添加時に比べ約 10 倍増大した。更に、神経系細胞であるシュワン細胞に対しても以前より数倍高い取り込みが認められた。以上の結果から、酵母株の改変、培養と精製条件の改良を行ったことで、リン酸化糖鎖含量が高く、より ERT に有用な組換えヒト HexA を作製することに成功した。
2. 組換えヒト GLA のファブリー病マウスの尾静脈内投与実験において、1mg/kg 体重の常用量では、脳組織で欠損している GLA 活性の回復は全く見られなかったが、60mg/kg 体重の大量投与では、野生型マウスにおける活性の 1/3 までの活性増加が認められた。また大量投与時に GLA 免疫反応性は脳血管とその周辺脳領域に観察された。さらに、電顕により、モデルマウスの脳血管の周皮細胞に多数存在する層状封入体に関して、常用量投与ではほとんど減少は認められなかったが、大量投与の場合は有意な減少が観察された。したがって常用量の酵素の末梢血管内投与では酵素の脳内への有意な移行はみられず、改善効果を期待するためには、その 60 倍という大量の酵素投与が必要であることが明らかになった。
3. *OmMNN4-1* 非導入株由来の末端 M6P 含有組換えヒト HexA を 60mg/kg 体重の超高用量で SD マウス新生仔(生後 0 日)の腹腔内に投与した結果、野生型マウスにおける活性の 15%程度(治療域)まで脳内 Hex 活性が回復した。また *OmMNN4-1* 導入株由来の高 M6P 含有 HexA を SD マウスの脳室内に常用量(1.2mg/kg 体重)で 1 回投与することにより、24 時間後に野生型の 50%程度(十分な治療域)まで脳内酵素活性が回復し、その効果は非導入株由来 M6PHexA に比べ有意に高かった。また投与一週間後には脳全体でニューロンやグリア細胞に蓄積していた GM2、GA2 および末端 GlcNAc 含有糖鎖が減少し、治療効果が認められた。SD マウス脳から樹立したアストロサイトでは細胞表面 M6PR の発現量が低いことが明らかとなったが、膜透過性ペプチド CPP と HexA とのコンジュゲートは M6PR 非依存に細胞内に取り込まれ、リソソーム内に蓄積していた GA2 が分解されることが示された。
4. 糖鎖付加型 G-CSF であるノイトロジンを NaIO₄ で処理した後、脳標的化ペプチド(BT タグ)と

の架橋反応を行った。MALDI-TOF-MS により糖鎖とペプチドとの結合を介したコンジュゲートの作製条件を検討・評価した。また BT タグをヒトグルコセレブロシダーゼの N 末または C 末端に融合するタンパクの発現ベクターを構築し、大腸菌遺伝子発現系を用いて脳標的型リコンビナントグルコセレブロシダーゼの作製を試みている。

今後は、高 M6P 含有 HexA および CPP-HexA コンジュゲートを脳室内に投与する際の各中枢神経系構成細胞内への取り込み機構を解明して脳内補充技術の改良を行うとともに、*in silico* でデザインされた高機能型ヒト HexA の生物機能と治療効果を評価することにより、中枢神経障害を伴うリソソーム病に対する次世代型 ERT 酵素の開発を推進していく。

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」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)

② 研究項目

Sandhoff 病(β -ヘキサミニダーゼ・ 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. 酵母由来組換えヒト HexA のモデルマウス脳内への補充効果の検討
2. モデルマウス由来中枢神経構成細胞への酵素補充メカニズムの解析

(2)「産業技術総合研究所」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)

② 研究項目

1. 酵母による組換え HexA の大量生産系の構築
2. 患者由来細胞を利用した組換え HexA の評価
3. リン酸化糖鎖の多量発現に関する遺伝子の解析
4. 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)「明治薬科大学」グループ

① 研究者名:櫻庭 均(明治薬科大学)

② 研究項目

1. 組み換えヒト α -ガラクトシダーゼの血管内投与によるファブリー病モデルマウス脳内への酵素移行に関する検討
2. 酵素の脳室内投与技術の確立

(4)「名古屋大学」グループ

① 研究者名: 澤田 誠 (名古屋大学環境医学研究所脳生命科学分野)

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)

- Seyrantepe, V., Peng, J., Fedjaev, M., Ernest, S., Kadota, Y., Canuel, M., Itoh, K., Morales, C.R., Lavoie, J., Hinek, A., Tremblay, J., Pshezhetsky, A.V.: The Enzymatic Activity of Lysosomal Carboxypeptidase (Cathepsin) A is Required for Proper Elastic Fibre Formation and Inactivation of Endothelin-1. *Circulation*, in press.
- Kawashima, I., Ohsawa, M., Fukushige, T., Nagayama, Y., Niida, Y., Kotani, M., Tajima, Y., Kanekura, T., Kanzaki, T., and Sakuraba, H.: Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin. Chim. Acta*, 378: 142-146, 2007.
- Akeboshi, H., Chiba, Y., Kasahara, Y., Takashiba, M., Takaoka, Y., Ohsawa, M., Tajima, Y., Kawashima, I., Tsuji, D., Itoh, K., Sakuraba, H., and Jigami, Y.: Production of recombinant β -hexosaminidase A, a potential enzyme for replacement therapy for Tay-Sachs and Sandhoff diseases, in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *Appl Environ Microbiol.*, 73(15): 4805-4812, 2007.
- Tajima, Y., Matsuzawa, F., Aikawa S., Okumiya, T., Yoshimizu, M., Tsukimura, T., Ikekita, M.,

Tsujino, S., Tsuji, A., Edmunds, T., and Sakuraba, H.: Structural and biochemical studies on Pompe disease and a “pseudodeficiency of acid α -glucosidase”. *J. Hum. Genet.*, 52: 898-906, 2007.

- Shigenaga, A., Tsuji, D., Nishioka, N., Tsuda, S., Itoh, K., and Otaka, A.: Synthesis of a Stimulus-Responsive Processing Device and Its Application to a Nucleocytoplasmic Shuttle Peptide, *Chem biochem.*, 8: 1929-31, 2007.
- Kawashima, I., Watabe, K., Tajima, Y., Fukushima, T., Kanzaki, T., Kanekura, T., Sugawara, K., Ohyanagi, N., Suzuki, T., Togawa, T., and Sakuraba, H.: Establishment of immortalized Schwann cells from Fabry mice and their low uptake of recombinant α -galactosidase. *J. Hum. Genet.*, 52: 1018-1025, 2007.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0 件 (CREST 研究期間累積件数:3 件)