

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

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)

## § 1 研究実施の概要

### 【研究構想・目的】

リソソーム病(リソソーム酵素欠損症)は、リソソーム性加水分解酵素及び関連因子の遺伝子変異が原因で酵素欠損と生体内基質の過剰蓄積を伴って発症する遺伝性代謝異常症である。発症頻度は数万～数十万人に1人程度の希少疾患であるが、40 種ほど存在し、小児科や内科をはじめ幅広い臨床領域で現われる重要な疾患群で、厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されている。

近年、哺乳類培養細胞遺伝子発現系で生産される組換えヒトリソソーム酵素を患者の静脈内に投与して治療を図る酵素補充療法が、一部のリソソーム病の根本治療法として実用化され、わが国でも6種の疾患への適用が認められている。この治療法は、マンノース-6-リン酸(M6P)含有N-グリコシド型糖鎖が付加され正常機能をもつリソソーム酵素が、標的細胞表面の糖鎖レセプターであるM6Pレセプター(M6PR)と結合後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソームに輸送されるという共通原理に基づくため、他のリソソーム病への臨床応用に対する社会医学的ニーズが増大している。

しかし哺乳類培養細胞発現系での組換え酵素の生産性には限界があり、患者側からの需要に応じた酵素製剤の安定供給が困難で、薬価を高める原因にもなっている。また血液脳関門の存在により患者の末梢血管内に投与された酵素が脳実質内の障害部位まで到達しないため、中枢神経症状を伴うリソソーム病に対しては酵素補充療法の有効性は認められていない。さらに酵素欠損症患者に一定量の組換え酵素を定期的に継続投与するため、中和抗体の産生等の副作用が現れるなどの問題が生じている。

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

### 【研究実施項目】

1. **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ソーム酵素の大量発現系の構築と糖鎖構造改変に基づく高機能化技術の開発**
  - 1) M6P 残基を含有し M6PR との結合能をもつ糖鎖が付加される組換えヒトリソソーム酵素を安全・安価に大量生産するための酵素遺伝子発現系を構築する目的で、糖鎖生合成に関するメタノール資化酵母 *Ogataea minuta* (*Om*) 変異株に、ヒト HexA アイソザイムを構成する  $\alpha$  及び  $\beta$  鎖を各々コードする *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子(cDNA)を *Om* 株に同時導入し、M6P 含有ヒト型様糖鎖をもつ *OmHexA* を作製し、その生産量の向上と精製法を検討した。また *OmHexA* における M6P 含有率等の糖鎖構造解析を行うとともに、 $\alpha$ -Mannosidase 処理により末端 M6P 露出型 *OmHexA* を作製し、HexA 欠損症患者由来皮膚繊維芽細胞や Sandhoff 病モデルマウス(SD マウス)及びその神経系培養細胞に対する補充効果を検討した。
  - 2) *OmHexA* の M6P 含有率を増大させる目的で Phosphomannosyltransferase の正の制御因子である *MNN4* 遺伝子を *Om* 株からクローニングし、さらに *HEXA* 及び *HEXB* 同時発現 *Om* 株に導入し *Om4* 株を樹立した。*Om4* 株から *Om4HexA* を精製し、糖鎖における M6P 含有率や患者由来皮膚繊維芽細胞及び SD マウスに対する補充効果を *OmHexA* と比較した。
2. **リソソーム病の分子病態解明とバイオインフォマティクスに基づく高機能型酵素の分子デザインと検証**
  - 1) 野生型ヒト HexA の結晶構造情報を基に、HexA 欠損症患者で同定されたミスセンス変異によるアミノ酸置換型変異酵素蛋白質の立体構造モデルを構築した。これを野生型の酵素蛋白質の構造にスーパーインポーズして、アミノ置換に基づく構造変化の程度と変異酵素の機能変化との相関を構造生物学的に解析した。

- 2) HexA 欠損症患者の酵素補充療法に必要な組換えヒト HexA を選択的に発現させ、また *in vitro* での安定性を増大させる目的で、既知のヒト HexB ( $\beta$ homodimer) 及び HexA の X 線結晶構造に基づき、HexA において  $\alpha\beta$  鎖間相互作用に関わるアミノ酸残基について、分子科学的計算手法により両者の会合を強め安定化するアミノ酸置換の組み合わせを予測して高機能型ヒト HexA を *in silico* でデザインする。徳島大の伊藤グループは *in vitro mutagenesis* に基づき予測されたアミノ酸置換変異を導入した *HEXA* 及び *HEXB* の発現実験に哺乳類 CHO 細胞株を用いて行い、アミノ酸置換型 HexA の機能を検証した。
  - 3) HexA 鎖及び  $\beta$  鎖のアミノ酸配列上の相同性と M6P 含有 N 型糖鎖の付加部位の比較から、 $\beta$  鎖の N 末端側に一箇所多い N 型糖鎖付加部位を人為的に  $\alpha$  鎖の相同位置に追加することにより、組換え HexA への M6P 含有 N 型糖鎖の追加が期待される。N 型糖鎖付加部位追加のためのアミノ酸置換型変異を導入した *HEXA* と野生型 *HEXB* の同時発現実験を哺乳類 CHO 細胞株を用いて行い、糖鎖追加型 HexA の M6P 含有率の増大と補充効果を検証した。
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
- 1) 末梢血管内投与により血液脳関門を透過して脳実質内への移行能をもつ脳標的化ペプチドをビオチン-アビジン複合体に提示させ、さらに組換えヒト 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する。人工血液脳関門モデル系における透過能や SD マウスにおける脳内移行能を解析した。
  - 2) 細胞膜透過性ペプチド (Cell penetrating peptide: CPP) を組換えヒト Hex アイソザイムに付加したコンジュゲートまたは融合モデルタンパク質を作製し、培養神経系細胞株やマウス脳室内への投与効果を検討した。
4. HexA 欠損症モデルマウス由来培養神経系構成細胞の樹立と組換え酵素補充効果の評価
- 1) 神経系構成細胞に対する野生型及び高機能型ヒト HexA の補充効果を検討する目的で、SD マウス新生仔脳由来の各種神経系細胞株 (ミクログリア、アストロサイト、シュワン細胞等)、胎児脳由来のニューロスフィア (神経幹細胞)、骨髄間葉系幹細胞及び体細胞由来核移植 ES 細胞の樹立を試みた。
  - 2) 株化または分化誘導された各神経系細胞における M6PR 等の糖鎖レセプターの発現を解析し、野生型及び高機能型ヒト HexA の補充メカニズムを解明する。
5. HexA 欠損症モデルマウス新生仔及び成体マウスを用いた脳内酵素補充効果の評価
- 1) 哺乳類 CHO 細胞株及びメタノール資化酵母株 (*Om* 及び *Om4*) 由来の、野生型及び高機能型ヒト HexA を常用量及び高用量で SD マウス新生仔の腹腔内、成体 SD マウスの尾静脈内及び脳室内に投与し、脳内欠損酵素活性の回復、蓄積基質の減少、中枢神経症状の改善を指標に生化学、病理学及び行動学的観点から補充効果を評価した。

#### 【研究成果概要】

1. **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ソーム酵素の大量発現系と精製法の確立**
  - 1) (独)産総研・糖鎖医工学研究センターの地神グループは、HexA を構成する  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖をコードする *HEXA* 及び *HEXB* をメタノール資化性酵母 *Om* の Alcohol oxidase (*AOX1*) プロモーターの下流に挿入した酵母発現用ベクターを構築し、それらを共発現し、細胞外に組換え Hex アイソザイムを分泌する発現株を樹立した。
  - 2) Hex 発現株をジャーファーメンターにより大量培養し、その培養上清から組換えヒト HexA を精製する方法を確立した。精製 HexA を構成する  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖のプロセッシングは、一部哺乳類と異なっていたが、*in vitro* での GM2 ガングリオシド (GM2) 分解能を有していた。
  - 3) 精製 HexA に付加される糖鎖のうち 14% が M6P を含む酸性糖鎖であることを明らかにし、

$\alpha$ -Mannosidase 処理により末端 M6P 残基を露出させた M6P-HexA を Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病患者由来皮膚繊維芽細胞に対して補充すると、M6PR との結合を介して細胞内に取り込まれ、欠損酵素活性の回復と蓄積 GM2 を分解することを示した。

- 4) Phosphomannosyltransferase の正の制御因子である *MNN4* 遺伝子の *Om* 株からのクローニングに成功し、*HEXA* 及び *HEXB* 同時発現 *Om* 株に導入した *Om4* 株を樹立した。この *Om4* 株で発現した HexA における酸性糖鎖 (M6P 残基を含む) の割合は 45% まで増大しており、M6P 含量が増加した HexA を欠損症患者由来皮膚繊維芽細胞に投与すると、*MNN4* 非導入株由来酵素に比べ、酵素活性回復率は 10 倍増大するとともに、培地中での安定性も増大した。

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

- 1) (財) 東京都臨床総研 (現 明治薬大) の櫻庭グループとセレスター・レキシコ・サイエンシズ社の土居グループは、ヒト HexA の結晶構造を基に、HexA 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、構造変化の大きさと臨床表現型の重症度との相関を解明した。
- 2) 土居らが *in silico* で予測した、HexA における  $\alpha\beta$  鎖間相互作用を強化するアミノ酸置換の効果、徳島大の伊藤らが CHO 細胞を用いた遺伝子発現系により解析し、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するアミノ酸置換群を同定した。
- 3) 伊藤らは、HexA 鎖上の  $\beta$  鎖との相同位置に新たに N-グリコシド型糖鎖付加部位が追加されるアミノ酸置換型変異 *HEXA* と野生型 *HEXB* との同時発現 CHO 株を樹立し、産生される組換え HexA 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が増大し、また SD マウス脳室内投与時の脳内補充効果が増大することを明らかにした。

## 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・モデルタンパク質への付加・融合と脳内酵素補充効果

- 1) 藤田保健衛生大 (現 名古屋大・環境医学研) の澤田グループは、血液脳関門を通過し脳内への移行能をもつミクログリアの研究過程で発見した、脳内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作製し、マウス脳血管内皮細胞株を用いた人工血液脳関門系で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) 徳島大の伊藤らは、京都大・化研の二木らと共同で、細胞膜透過性ペプチド (CPP) の一種であるアルギニン直列 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、リソソームに分布することが明らかになり、少なくともその一部が細胞表面に存在するヘパラン硫酸との結合を介していることが示された。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。

## 4. HexA 欠損症モデルマウス由来培養神経系構成細胞及び個体への組換え酵素補充効果

- 1) SD マウス新生仔脳由来ミクログリアとアストロサイト (徳島大伊藤ら)、脊髄後根神経節由来シュワン細胞等) と胎児脳由来のニューロスフィア (神経幹細胞) (明治薬大櫻庭ら)、成体骨髄由来間葉系幹細胞 (徳島大伊藤ら) 及び尾繊維芽細胞由来核移植 ES 細胞 (理研 発生・再生科学総合研究センター若山ら) の樹立と神経系細胞への分化誘導法を確立した。また CHO 及びメタノール資化酵母 *Om* 株由来組換えヒト HexA を投与すると、細胞毎で発現量は異なるものの、細胞表面の M6PR との結合を介して用量依存的に取り込まれ、蓄積する GM2, GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖を分解することが示された。
- 2) *Om* 株由来 M6P-HexA を高用量 (60mg/kg 体重) で SD マウス新生仔の腹腔内または成体マウスの尾静脈内に投与すると、一部は血液脳関門を透過し、野生型マウスの脳内 HexA 活性の 15% 程度まで回復したが、常用量 (1mg/kg 体重) ではほとんど脳内酵素活性の上昇は認め

られなかった。

- 3) *Om* 株及び *Om4* 株由来の M6P-HexA を常用量 (0.5mg/kg 体重) で成体 SD マウスの脳室内に単回投与すると、24 時間後に脳実質内、特に小脳を含む後部脳内の HexA 活性が各々野生型マウスの 37% 及び 45% まで回復し、また競合阻害剤としての M6P を同時投与することにより、部分的に活性増大が阻害された。また投与 7 日後に、脳内に蓄積する GM2, GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖を分解されることが、免疫組織化学及び TLC 解析により明らかになった。さらに両酵素を常用量で単回または隔週で 3 回投与した後に Rota-rod 及び Footprint test により中枢神経症状の改善を検討したところ、酵素投与群では、有意な改善効果が観察され、その効果は M6P 含量が 10 倍高い *Om4* 株由来酵素を投与した際に顕著であった。これらの結果は、M6P 含量が高い組換え HexA を用い、M6PR を分子標的とした脳室内酵素補充療法の有効性を示しており、将来の Glycoreceptor を標的とした Glycoprotein therapy の発展を示唆するものである。

## § 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

#### 1. 組換えヒトリソソーム酵素を用いたリソソーム病の酵素補充療法の実用化と問題点

リソソーム病は、リソソーム性加水分解酵素の欠損と生体内基質の過剰蓄積を伴って発症する遺伝性代謝異常症である。近年、哺乳類細胞株を用いた組換えヒトリソソーム酵素遺伝子の大量発現と酵素の糖鎖構造の修飾技術に基き、マンノース 6 リン酸レセプター (M6PR) 等の糖鎖レセプターを介した細胞内取り込みを利用した酵素補充療法が実用化され、その社会医学的需要は増大している。

しかし 1) 哺乳類培養細胞の遺伝子発現系で得られる酵素量には限度があり、欠損症患者側からの需要に見合うだけの酵素製剤の生産供給が困難であるのが現状で、薬価を高める原因にもなっている。また 2) 末梢血管内に投与された組換え酵素は血液脳関門を通過できず、脳実質内の障害部位まで到達しないため、中枢神経障害を伴うリソソーム病に対しては、酵素補充療法の有効性は認められていない。さらに 3) 酵素が欠損している患者に一定量の組換え酵素を定期的に継続投与することにより、中和抗体の出現等の副作用が生じるなどの問題点がある。本研究ではこれらの問題点を克服・改善して中枢神経症状を伴うリソソーム病にも有効で低侵襲な酵素補充療法の開発を目的として、 $\beta$ -ヘキササミニダーゼ A (HexA) の遺伝的欠損が原因で、GM2 ガングリオシドの脳内過剰蓄積を伴って発症する Sandhoff 病のモデルマウス (SD マウス) を対象に研究プロジェクトを実施した。

#### 2. ヒト型糖鎖をもつ組換えリソソーム酵素の大量発現系の構築と糖鎖の高機能化に基く酵素補充効果の改善

(独)産総研・糖鎖医工学研究センターの地神らは、糖鎖生合成に関する出芽酵母変異株を用い、M6P を含むヒト型糖鎖含有組換えリソソーム酵素の大量発現に成功していた。しかし出芽酵母では組換え酵素の生産性が低いため、本研究では、より高い生産能を持つメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* (*Om*) を用いて、組換えヒト HexA の発現株を樹立し、その生産量の向上と精製法を検討した。また研究の過程で、組換え HexA に付加される N 型糖鎖の M6P 含有率を増大させるために、*Om* の Phosphomannosyltransferase の正の制御遺伝子 (*MNN4*) をクローニングしてヒト HexA 発現株にさらに導入し、酵素タンパク質の生産能を低下させずに M6P 含有率の高い組換え HexA の大量生産を検討した。

#### 3. 脳標的化技術を利用した中枢神経症状を伴うリソソーム病の脳内酵素補充療法の開発

名古屋大の澤田らは、血液脳関門を通過して脳実質内に移行するミクログリアの研究過程で、脳内移行活性をもつペプチドを発見していた。この脳標的化ペプチドを組換えヒト HexA に連結した融合蛋白質または付加したコンジュゲートを作製して Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) の末

梢血管内に投与する際に、血液脳関門を透過して脳実質内に移行して欠損酵素活性を回復させるかを解析した。しかしこの脳標的化ペプチドと Hex とのコンジュゲートは末梢血流中からの脳内移行性を示さなかったため、徳島大の伊藤らと京都大・化研の二木らは新たに細胞膜透過性ペプチドの一種である R8 ペプチドと HexA とのコンジュゲート及び EGFP との融合タンパク質を作製し、SD マウス由来培養神経系細胞への補充や野生型マウス脳室内への R8-EGFP の投与効果と脳内分布を検討した。

#### 4. リソソーム病の分子病態の解明とバイオインフォマティクスを利用した高機能型リソソーム酵素の開発

明治薬大の櫻庭らは、セレスター社の土居らと共同で、HexA 欠損症 (Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病) 患者で同定されたアミノ酸置換型変異と、近年解明されたヒト HexA の X 線結晶構造情報を基盤に、アミノ酸置換型変異が HexA の構造に及ぼす影響を解析する。また酵素タンパク解析用プローブとしてのペプチド抗体作製のためのターゲット配列を予測する。さらに一回投与量を削減できる高機能型 HexA を開発する目的で、細胞内外での HexA の安定化を目的として、分子科学計算に基き、HexA を構成する  $\alpha\beta$  鎖間の会合部位に存在するアミノ酸を *in silico* で他種に置換し相互作用の強化を予測する。また  $\alpha\beta$  鎖間の相同性と N 型糖鎖付加部位の比較から、糖鎖追加型酵素の構造を予測し、高機能型 HexA 分子をデザインする。徳島大の伊藤らが、予測されたアミノ酸置換型変異遺伝子を構築し、CHO 細胞系で発現実験を行い、高機能化を検証する。

#### 5. リソソーム病モデルマウス個体及び培養神経系構成細胞と組換え酵素補充効果の評価

徳島大の伊藤らは、CHO 細胞で作製した組換え HexA や産総研・地神らがメタノール資化酵母で作製した組換え HexA を、SD マウスから樹立した神経系細胞に添加し、補充効果を解析する。伊藤らは、高機能型組換え HexA を SD マウス新生仔の腹腔内や成体マウスの尾静脈や脳室内に投与し、また明治薬大の櫻庭らは、組換えヒト  $\alpha$ -Galactosidase 製剤をその欠損症である Fabry 病モデルマウスの尾静脈や脳室内に投与し、脳実質内での欠損酵素活性の回復、脳内蓄積基質の減少及び行動学的試験による中枢神経症状の改善等を評価する。

各研究グループで得られた研究成果を統合するとともに相互にフィードバックし、より有効性の高い酵素分子や治療技術を開発する。この新規技術は、将来、脳内の生体分子の欠乏が原因で発症する中枢神経系疾患の分子補充療法としても応用される可能性が期待される。

### (2)実施体制

グループ名	研究代表者又は 主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
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	伊藤 孝司	国立大学法人 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・創薬生命工学分野・教授	Sandhoff 病 ( $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ $\beta$ -サブユニット欠損症) モデルマウスの中枢神経系への酵素補充効果の評価システムの構築
産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センターグループ	千葉 靖典	独立行政法人 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	メタノール資化性酵母によるリソソーム酵素の発現系の構築

明治薬科大学グループ	櫻庭 均	学校法人 明治薬科大学 分析化学教室・教授	神経難病の分子病態解明と疾患責任酵素の神経細胞への取り込みに関する検討
名古屋大学グループ	澤田 誠	国立大学法人 名古屋大学環境医学研究所脳生命科学分野・教授	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・サイエンズ株式会社グループ	土居 洋文	セレスター・レキシコ・サイエンズ株式会社・幕張 R&D センター・代表取締役社長	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機能改変酵素分子のデザイン

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 サブテーマ名1 Sandhoff 病(β-ヘキササミニダーゼ・β-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(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)研究実施内容及び成果

本研究は、現在世界的に実用化が進展しているリソソーム病の組換え酵素補充療法を、中枢神経障害を伴う疾患にも応用することを目的としている。本研究グループは、中枢神経症状を伴う代表的なリソソーム病として、β-ヘキササミニダーゼ(Hex)の遺伝的欠損が原因で、GM2 ganglioside(GM2)の脳内過剰蓄積を伴って発症するGM2 gangliosidosis(Tay-Sach 病および Sandhoff 病)を対象とする。また Sandhoff 病モデルマウス(SD マウス)を用いて、神経系構成細胞における糖鎖レセプターの発現解析や組換え Hex の末梢血液から脳実質内への補充技術の評価システムの構築と実際の評価を行う。また他の研究グループとの連携により、組換え Hex 自体の高機能化と脳内補充技術の改良を進める。

##### ① 研究実施方法

##### 1) チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞株における組換えヒト Hex アイソザイムの高発現株の樹立と精製及び Hex 欠損細胞への補充効果の検討

哺乳類型マンノース6リン酸(M6P)残基含有糖鎖が付加される CHO 細胞に、ヒト Hex $\alpha$  鎖及びβ鎖をコードする *HEXA* 及び *HEXB* を導入し、両者を同時に高発現する細胞株を樹立し、その培養上清から組換え HexA を部分精製する。また得られた HexA を Tay-Sach 病および Sandhoff 病患者または SD マウス由来培養神経系細胞株に添加し、欠損酵素活性の回復、蓄積基質の減少等を指標に補充効果を検討する。

##### 2) アミノ酸置換に基づく組換え HexA の高機能化と評価

ヒト HexA の X 線結晶構造情報を基に、セレスター社により *in silico* で予測された HexA の高機能化(細胞内発現量の増大、サブユニット間相互作用の安定化、糖鎖付加部位挿入による糖鎖追加による補充効果の向上等)のためのアミノ酸置換型遺伝子を構築し、CHO 細胞発現系で得られた高機能型 HexA の機能検証を行う。

##### 3) SD マウス脳由来の神経系構成細胞の培養モデル系及び胚性・体性幹細胞からの分化誘導

### 系の確立と糖鎖レセプターの発現・酵素補充効果の解析

新生仔マウス脳から、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアおよびこれらの前駆細胞の樹立、また骨髄間葉系幹細胞および SD マウス体細胞(尾繊維芽細胞)由来核移植 ES 細胞の樹立と神経幹細胞及び神経系細胞への分化誘導法を確立する。さらに得られた各細胞株におけるカチオン非依存性マンノース 6-リン酸レセプター (CI-M6PR) およびマンノースレセプター (MR) の発現と酵素取り込みへの関与を解析する。

#### 4) SD マウス個体への高機能型ヒト HexA の投与と脳内移行・脳室内補充効果の検討

名古屋大・澤田らが開発した脳移行性ペプチド(BT タグ)を Hex サブユニットの N 末または C 末に融合した組換え酵素遺伝子の作製と CHO 細胞で発現した組換え BT タグ融合 HexA の発現・精製を行う。また産総研で発現・精製されたメタノール資化酵母 *Om* 株及び *MNN4* 導入 *Om4* 株由来の組換えヒト HexA 及び BT タグとのコンジュゲートを SD マウス新生仔の腹腔内、成体の尾静脈及び脳室内に投与し、一定時間後の脳実質内における、人工基質を用いた酵素活性回復、免疫組織化学及び薄層クロマトグラフィーを用いた蓄積基質 (GM2, GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖) の減少、炎症性ケモカインの Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) の誘導抑制、Rota-rod と Footprint test による行動学的試験等に基づく脳内酵素補充(治療)効果を検討する。

#### ② 研究成果

##### 1) 酵素補充療法用組換えヒト HexA を恒常発現する CHO 細胞株の樹立

ヒト *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子を同時に導入した CHO 細胞株を初めて樹立し、この細胞株が野生型ヒト Hex アイソザイム (HexA, HexB 及び HexS) を高発現し、また各アイソザイム (特に HexA 及び HexB) が培養上清に分泌されることを明らかにした。また陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた組換えヒト HexA は、患者由来培養皮膚繊維芽細胞や SD マウス由来神経系細胞株に、糖鎖レセプターであるカチオン非依存性マンノース-6-リン酸レセプター (CI-M6PR) またはマンノースレセプター (MR) を介して取り込まれ、蓄積 GM2 ganglioside (GM2) や末端 GlcNAc 含有糖鎖を分解し、培養細胞系での補充効果を示した。

##### 2) 組換えヒト HexA を高発現する CHO 細胞株の分離法の確立

二種の蛍光タンパク質 (EGFP 及び DsRed) の一方と *HEXA* 及び *HEXB* 遺伝子のいずれかをシストロニックに発現するベクターを構築し、CHO 細胞に同時に導入後、蛍光タンパク質の発現量を指標に FACS (セルソーター) を用いて *HEXA* 及び *HEXB* の同時高発現株の樹立に成功し、酵素補充療法用組換えヒト HexA を高発現する CHO 細胞株の分離法として特許出願した。

##### 3) Sandhoff 病モデルマウス由来の神経系構成細胞株の樹立と分化誘導法の確立

Sandhoff 病モデルマウス (SD マウス) 新生仔の脳から、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、グリア前駆細胞株を初めて樹立した。これらの細胞株は GM2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖の蓄積を示した。また成体 SD マウスの骨髄から多分化能をもつ骨髄間葉系幹細胞の樹立と神経細胞への分化誘導条件の確立、さらに理研・若山らとの共同で、尻尾繊維芽細胞由来の核移植胚性幹 (ntES) 細胞の樹立と神経系細胞への分化誘導に成功した (図 1)。



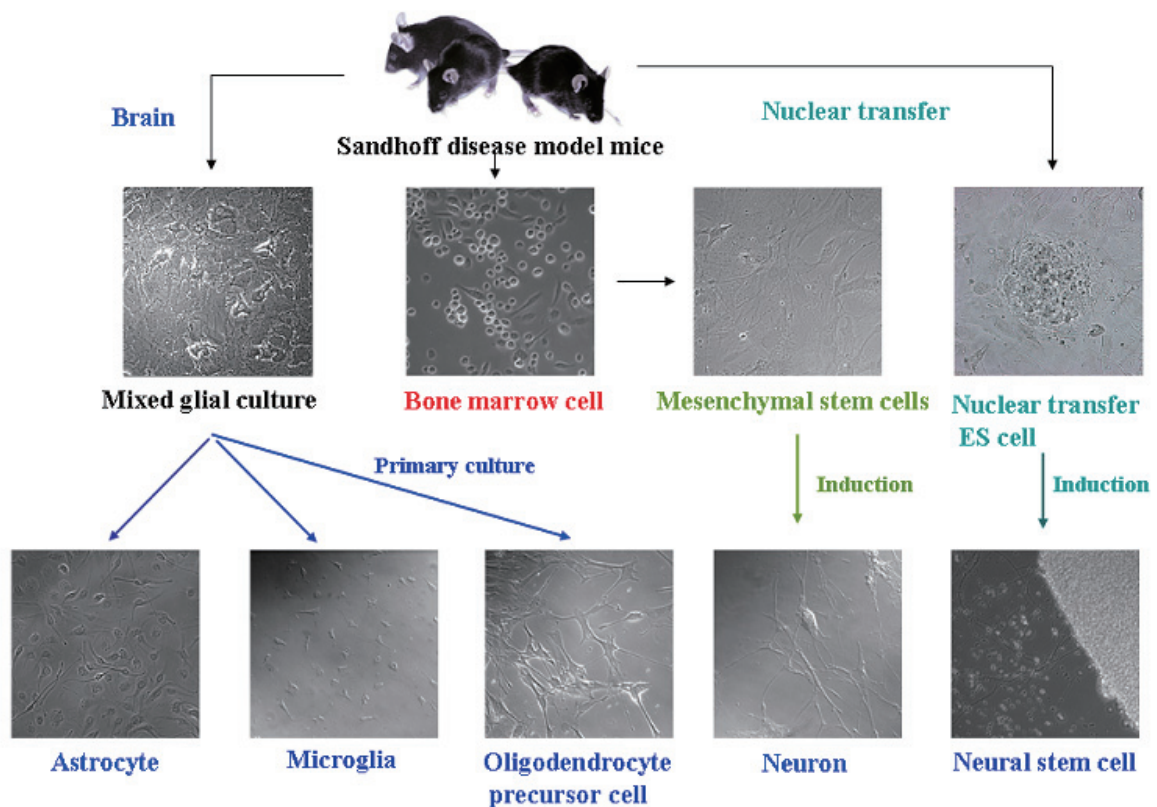


図1 SDマウス由来神経系構成細胞の樹立及び誘導

4) ヒト Hex の $\alpha\beta$ 鎖間相互作用強化に基く HexA の発現量の増大と高機能化の実証

ヒト HexA を構成する  $\alpha$  及び  $\beta$  鎖間の相互作用強化に基く HexA の発現量の増大と高機能化を目的として、セレスター社土居らが  $\alpha$  及び  $\beta$  鎖間の相互作用に関わるアミノ酸残基に対して各々他種のアミノ酸への置換を *in silico* 解析を行った。分子科学的計算から各置換型 HexA モデルにおいて HexA の安定化効果の高いと予測された一連のアミノ酸置換体をコードする変異 *HEXA* を構築し、野生型 *HEXB* と同時に CHO 細胞に導入して発現実験を行った。予測されたアミノ酸置換群うち、図2に示す B6 及び B9 の組み合わせの場合、CHO 細胞内で HexS ( $\alpha\alpha$  homodimer) の発現は観察されず、HexA の選択的発現量の増大が認められた。また平行して *in vitro* で 37°C での熱安定性の向上が観察され、8 日後の残存活性は野生型 HexA に比べ、それぞれ 1.7 倍及び 2.6 倍まで増大していた(図2、特許出願済)。

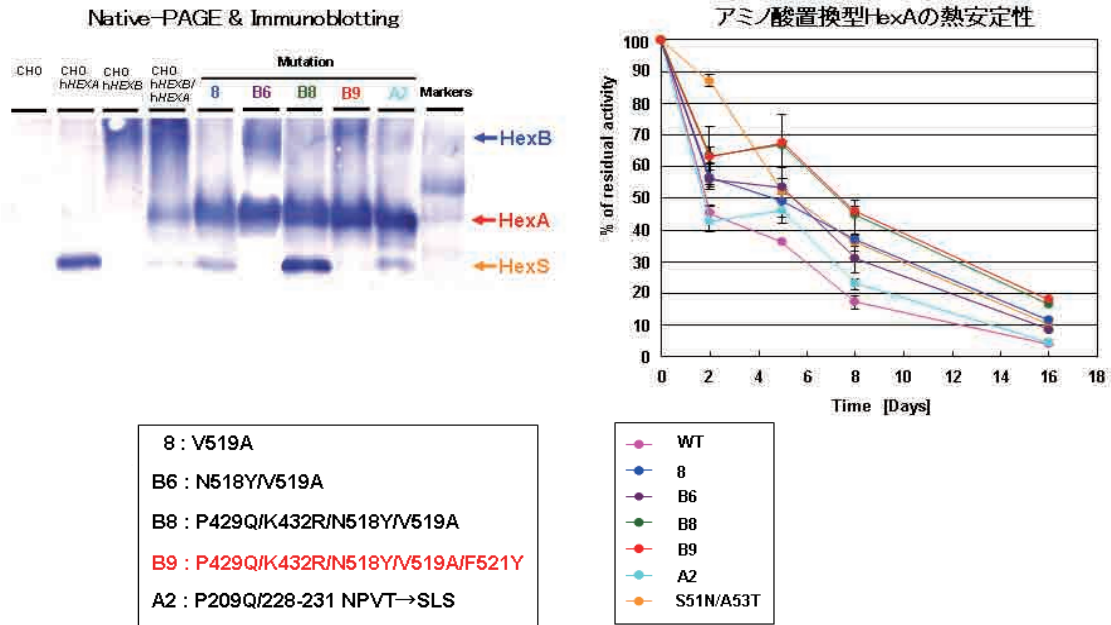


図2 HexA の選択的発現量と *in vitro* での熱安定性の増大

5) ヒト HexA のα鎖上への N-グリカン付加部位の追加に基く高機能化

ヒト HexA の X 線結晶構造情報、α と β 鎖のアミノ酸配列の相同性及び各々に付加される N-グリカンの相対位置の比較 (図3) から、α 鎖への M6P 含有 N-グリカンの人為的追加を目的とした改変 *HEXA* 遺伝子 (S51N/A53T アミノ酸置換) の、CHO 細胞における発現実験を行った。

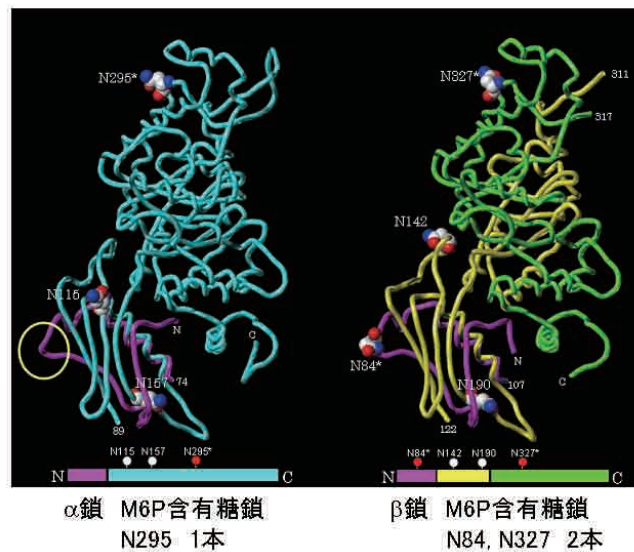


図3 ヒト Hex α鎖とβ鎖における N-グリカン結合部位の比較

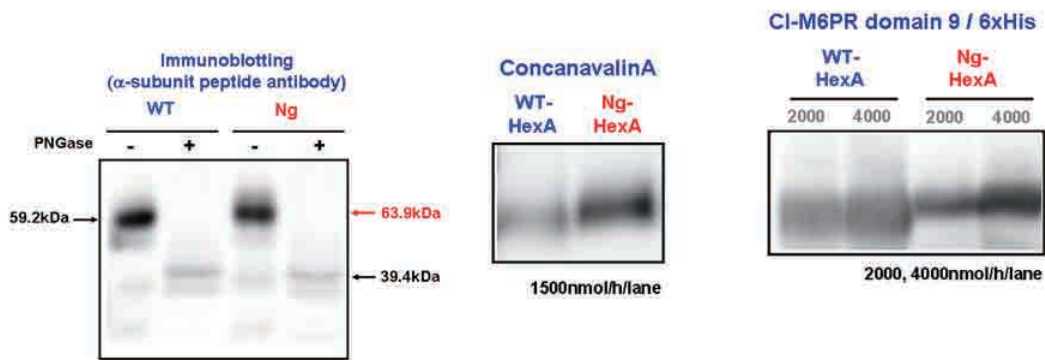


図4 N-グリカン付加配列追加によるヒト Ng-HexA への M6P 含有型糖鎖の追加

明治薬大の櫻庭らが作製した抗  $\alpha$  鎖ペプチド抗体で認識されるヒト HexA 鎖は、N-グリカンの追加に基く分子量の増大を示し、また ConA 及び CI-M6PR domain9 レクチンプローブとの反応性の増大を示した(図4)ことから、M6P 含有の高マンノース型 N-グリカンが追加されていることが検証された。また分離したヒト Ng-HexA を Sandhoff 病患者由来培養皮膚繊維芽細胞に投与したところ、時間及び用量依存的に CI-M6PR との結合を介して細胞内に取り込まれ、野生型 HexA よりも有意に高い欠損酵素活性の回復を示した(図5)。また蓄積 GM2 の分解能も向上していることが確認された。

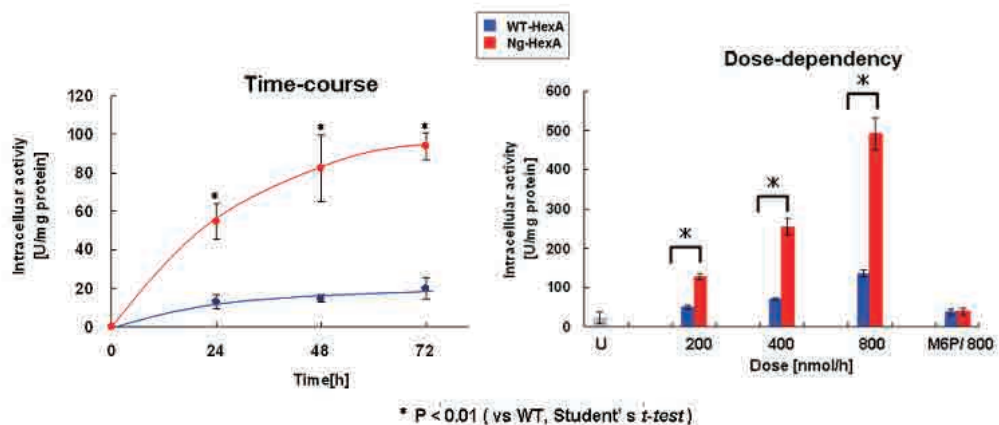


図5 Sandhoff 病患者由来繊維芽細胞株への M6P 含有糖鎖追加型ヒト Ng-HexA の補充効果

さらに、ヒト Ng-HexA を常用量(1mg/kg 体重)で Sandhoff 病モデルマウスの脳室内に投与したところ、24 時間後には脳全体(前部、中部及び後部脳)に分布し、CI-M6PR との結合を介して脳実質内に取り込まれ、野生型ヒト HexA に比べ、有意に欠損酵素活性を回復させることが明らかになった(図6)。また投与 7 日後の残存酵素活性も Ng-HexA の方が高い傾向が観察された。

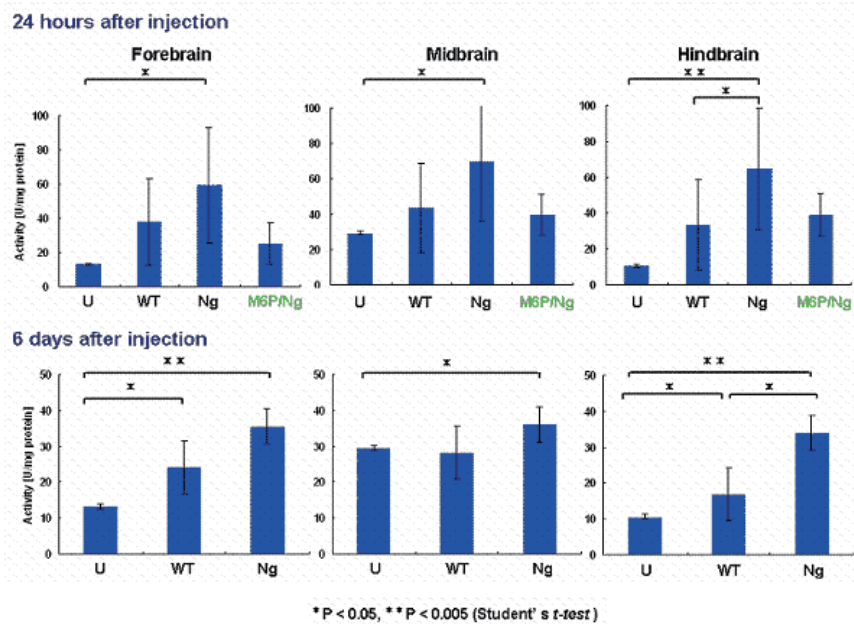


図6 M6P 含有糖鎖追加型ヒト Ng-HexA の Sandhoff 病マウス脳室内投与による活性回復

投与 7 日後の凍結脳組織切片に対して抗 GM2 モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、野生型 HexA に比べ、Ng-HexA を脳室内に投与した方が、脳実質細胞内に蓄積している GM2 の顕著な減少が観察された(図7)。

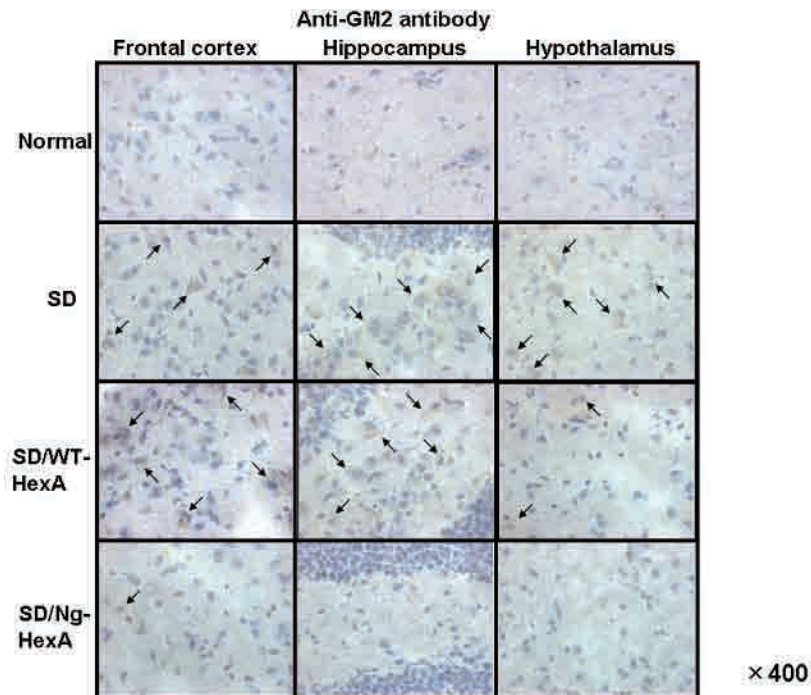


図7 M6P 含有糖鎖追加型ヒト Ng-HexA の Sandhoff 病マウス脳室内投与7日後の脳実質内 GM2 の分解促進

これらの結果は、Hexβ 鎖との相同位置に N-グリカン付加部位を α 鎖上に追加することにより、CHO 細胞で発現する HexA に M6P 含有高マンノース型糖鎖を追加することができ、その組換え Ng-HexA を Sandhoff 病患者由来皮膚繊維芽細胞やモデルマウスの脳室内に投与すること

により、CI-M6PR との結合を介して繊維芽細胞や神経系構成細胞内に取り込まれてリソソームまで輸送され、蓄積している GM2 等の基質を分解するという酵素補充効果が得られることが明らかになった。

6) メタノール資化酵母 *Ogataea minuta* (*Om*)株及び MNN4 遺伝子導入 *Om4* 株由来組換えヒト HexA の Sandhoff 病モデルマウス個体への補充効果の評価

組換えヒト HexA を、低侵襲的に末梢血管内から血液脳関門を透過して脳実質内に到達させるために、まず *Om* 株由来で  $\alpha$ -Mannosidase 処理後の精製 M6P-HexA を高用量 (60mg/kg 体重) で SD マウス新生仔の腹腔内に投与する実験を行った。

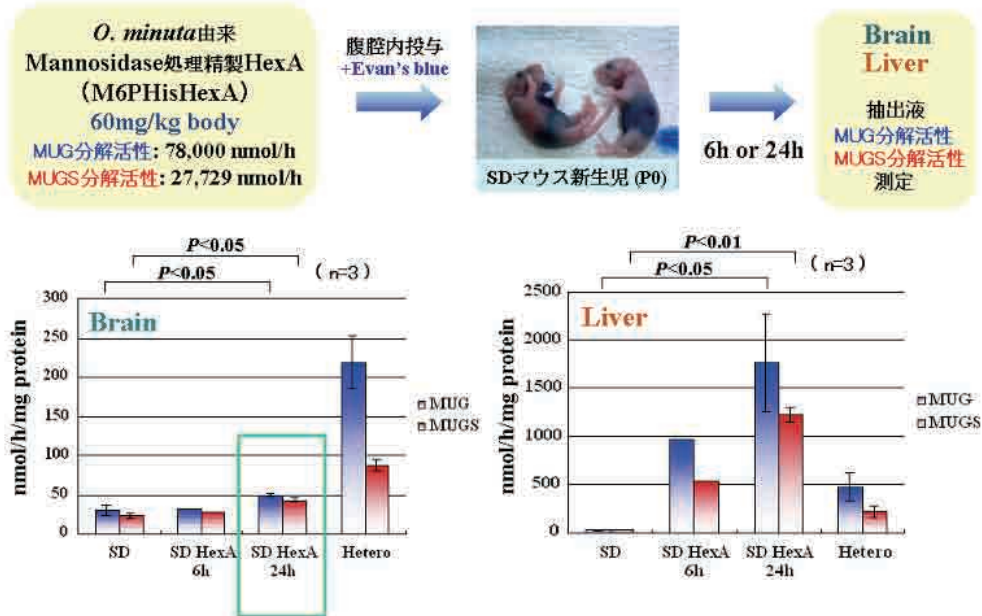


図8 Sandhoff 病モデルマウス新生仔腹腔内への *O. minuta* 由来 M6PHisHexA の投与効果

肝臓では6時間後に顕著な欠損酵素活性の回復が観察され、24時間後にはさらに増大が認められた。一方、脳の場合は、60mg/kg 体重の高用量でも、6時間で脳実質内での酵素活性の回復は観察されず、24時間後によりやく正常マウスの15%程度であるが、有意な活性回復が認められることが明らかになった(図8)。成体に比べまだ血液脳関門が強固ではない新生仔に対し、これだけ高用量の酵素を腹腔内に投与しても欠損酵素活性の回復がわずかであることから、この投与方法は臨床応用という観点からは実用的でないと考えられた。

一方、最近ムコ多糖症 I 型等に対する酵素補充療法の研究において、疾患モデル動物の脳室内や髄腔内への組換えヒト酵素の投与効果が検討されている。そこで本研究においても、発症期(10週齢以降)の成体 Sandhoff 病モデルマウス(SD マウス)の脳室内に、メタノール資化酵母 *Om* 株または MNN4 遺伝子を導入した *Om4* 株由来の精製 M6P-HisHexA (*OmHexA* 及び *Om4HexA*) を投与し、その補充効果を検討した。

まず 0.5mg, 1mg 及び 2.5mg/kg 体重で各々の酵素溶液(25 $\mu$ l)を脳室内投与し、24時間後に脳をかん流して脳実質内における欠損酵素活性を解析した。その結果、非投与群に比べ、いずれの酵素も用量依存的かつ有意に HexA 活性を回復させた。また特に小脳を含む後部脳では、M6P 含量の多い *Om4HexA* は、*OmHexA* に対し有意に活性が増大し、正常マウスの 38.0%~53.2%の回復を示した(表1)。またこの回復は、部分的ではあるが、M6P 分子を同時投与した際に抑制されたことから、少なくとも一部は M6PR を介した取り込みに基づくことが示唆された。

MUGS degradation activity		
Forebrain	nmol/h/mg protein	% of WT
SD Untreated	21.5±1.7	8.7
<i>Om</i> HexA 0.5 mg/kg	30.0±2.6	12.1 *
<i>Om</i> HexA 1.0 mg/kg	49.8±8.4	20.1 **
<i>Om4</i> HexA 0.5 mg/kg	38.5±5.6	15.5 **
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg	58.1±5.9	23.4 **
<i>Om4</i> HexA 2.5 mg/kg	85.4±36.6	34.5 **
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg + M6P	38.4±8.8	15.5 *
WT	247.7±23.8	-
Midbrain		
SD Untreated	17.8±1.3	7.3
<i>Om</i> HexA 0.5 mg/kg	29.2±0.9	12.0 **
<i>Om</i> HexA 1.0 mg/kg	75.2±10.2	31.0 *
<i>Om4</i> HexA 0.5 mg/kg	46.5±9.1	19.2 **
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg	69.8±2.3	28.8 **
<i>Om4</i> HexA 2.5 mg/kg	104.6±39.4	43.2 **
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg + M6P	50.3±26.3	20.8 *
WT	242.3±3.6	-
Hindbrain		
SD Untreated	16.8±0.8	10.7
<i>Om</i> HexA 0.5 mg/kg	34.5±7.3	22.0 *
<i>Om</i> HexA 1.0 mg/kg	56.7±5.6	36.1 **
<i>Om4</i> HexA 0.5 mg/kg	59.7±1.0	38.0 ** †
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg	73.5±7.3	46.8 ** ††
<i>Om4</i> HexA 2.5 mg/kg	83.5±42.9	53.2 *
<i>Om4</i> HexA 1.0 mg/kg + M6P	44.8±12.6	28.5 **
WT	156.9±34.4	-

Student' t-test  
\* : P<0.05 (versus SD Untreated)  
\*\* : P<0.01 (versus SD Untreated)  
† : P<0.05 (versus *MNN4* (-))  
†† : P<0.01 (versus *MNN4* (-))

表1 メタノール資化酵母 *Om* 及び *MNN4* 導入 *Om4* 株由来精製 M6P-HisHexA の Sandhoff 病モデルマウス脳室内への投与による酵素(人工基質 MUGS 分解)活性の回復

各々の酵素を 1.0 mg/kg 体重で SD マウスの脳室内投与 7 日後の凍結組織切片を、各々 GM2、GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。その結果、いずれも脳実質内に蓄積する GM2、GA2 及び末端 GlcNAc 含有糖鎖を減少させることが明らかになり、特に GA2 及び末端 GlcNAc 糖鎖の減少については、M6P 含量が高い *Om4*HexA の補充効果が顕著であった(図9)。

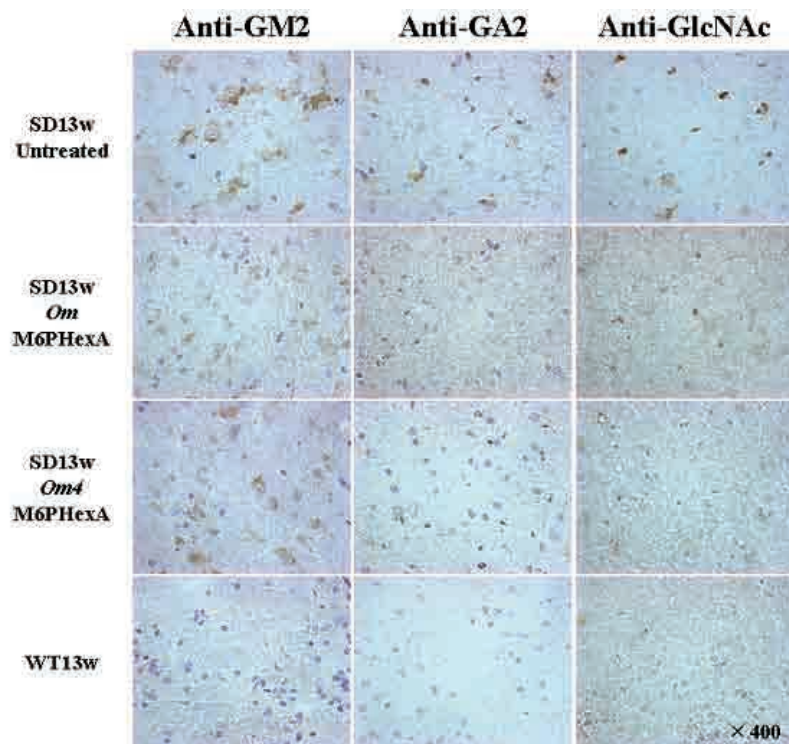


図9 メタノール資化酵母 *Om* 及び *MNN4* 導入 *Om4* 株由来精製 M6P-HisHexA の Sandhoff 病モデルマウスの脳室内投与による蓄積基質の減少

同投与実験において脳組織から糖脂質を抽出し、TLC により展開し、アルカリ処理後、オルシノール発色により、各脳領域における蓄積 GM2 及び GA2 の減少を解析した。その結果、前部、中部及び後部脳において、特に M6P 含量が多い *Om4HexA* の投与群では非投与群に比べ、GA2 の顕著な減少 (50% 程度まで) と GM2 の 13% 程度の減少が観察され、脳実質内に取り込まれた *Om4HexA* が神経系細胞内蓄積する基質を分解できることが初めて示された (図10)。

また既に徳島大の辻・伊藤らは、SD マウスの発症過程の脳内で炎症性ケモカインの一種である Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) の選択的発現誘導がミクログリアやアストロサイト等で起こり、神経炎症が中枢神経症状の進展に関与していることを明らかにしている。今回の脳室内投与実験では、特に小脳を含む後部脳で MIP-1 $\alpha$  の誘導抑制が起こることが明らかになり、酵素補充に基づく治療効果の評価に利用できることが示唆された。

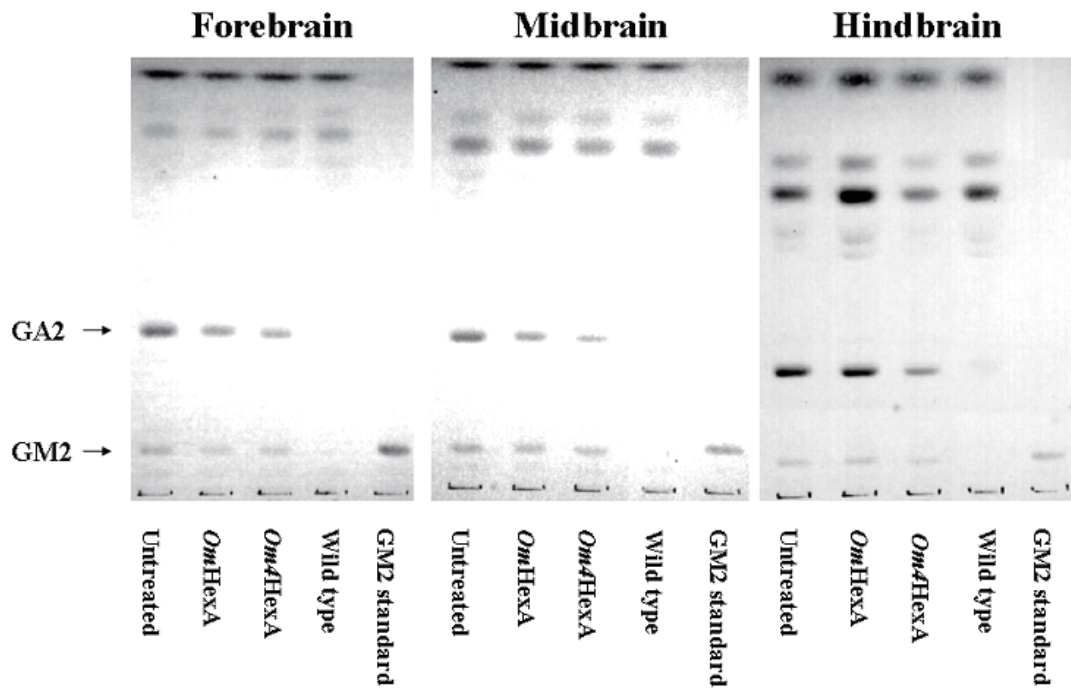


図10 Sandhoff病マウス脳室内への *OmHexA* 及び *Om4HexA* の投与により蓄積 GA2 及び GM2 の減少(TLC 解析)

中枢神経症状に対する *OmHexA* 及び *Om4HexA* の脳室内投与効果を評価するため、10 週齢のマウス(各 n=3)に常用量(0.5 mg/kg 体重)で単回または隔週で 3 回投与し、15 週齢で Rota-rod test(図11B)及び16 週齢で Footprint test を行った(図11A)。Footprint test において酵素非投与群は 16 週齢ではほとんど歩行ができなかった。*OmHexA* の単回投与では歩行能力が回復しない個体もあったが、複数回投与ではすべて歩行能力を回復した。M6P 含量が多い *Om4HexA* では単回・複数回投与のいずれの場合も歩行能力が回復していた。Rota-rod test においては、いずれの酵素投与群も、酵素非投与群に比べ有意な筋力低下の抑制が観察された。単回投与では *Om4HexA* は *OmHexA* に対して有意な改善効果を示した。

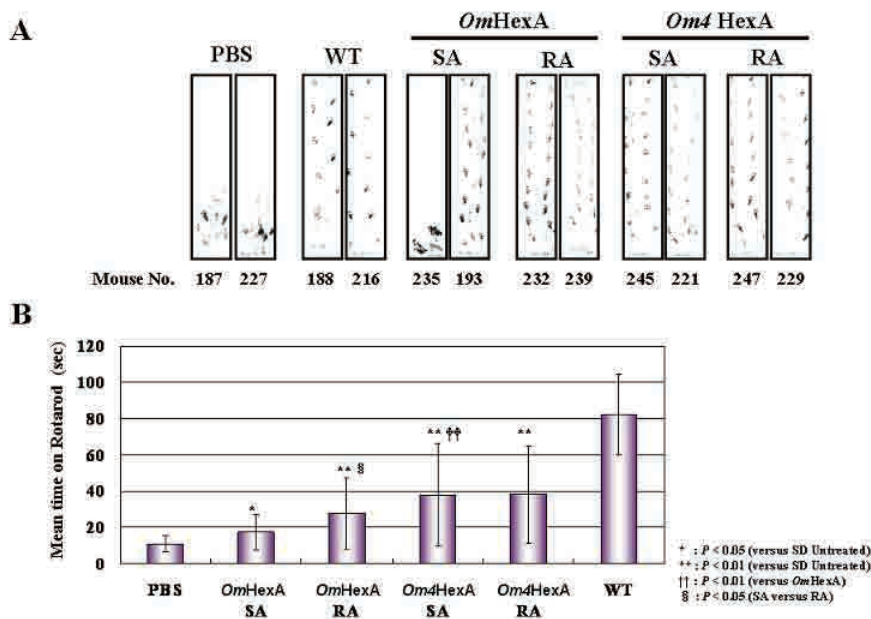


図11 Sandhoff病マウス脳室内への *OmHexA* 及び *Om4HexA* の投与に基く治療効果



#### 7) 脳移行性ペプチド(BT タグ)のヒト HexA への融合と末梢血管内からの投与と脳内への補充の試み

名古屋大・澤田らが開発した脳移行性ペプチド(BT タグ)をヒト Hex $\beta$  鎖の N 末端に融合する遺伝子を構築し、CHO 細胞に導入して恒常発現株を樹立し、BT タグ融合 Hex アイソザイム(HexA と HexB の混合物)を作製した。5 週齢の SD マウスに約 50,000 nmol/h の MUG 分解活性(0.1 mg タンパク/個体)を経頸動脈的に投与した。2 時間後にかん流を行い、脳内での Hex 活性を解析した。しかし Hex 活性の上昇は検出されなかった。

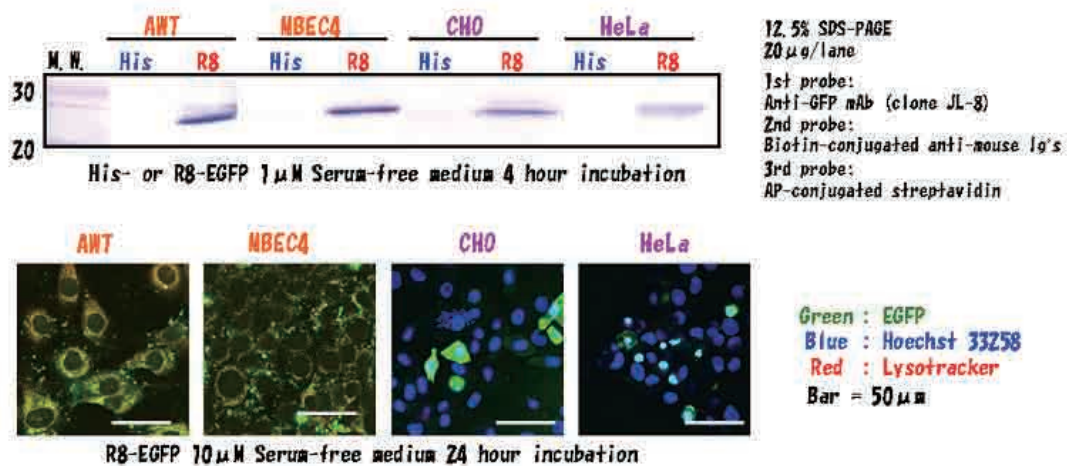
また産総研の地神らが組換えヒト Hex アイソザイムを発現するメタノール資化酵母株から分離した HexS( $\alpha\alpha$  homodimer)に対し、名古屋大の澤田らが avidin 標識と biotin 標識 BT タグとのコンジュゲート(約 60,000 nmol/h の MUGS 分解活性)を作製し、13 週齢の SD マウスの頸動脈からの投与を行った。2 時間後にかん流を行い、脳内 HexS 活性を測定したが、BT タグに依存した活性の上昇は検出されなかった。

#### 8) 細胞膜透過性ペプチド(Cell penetrating peptide: CPP)の付加・融合に基く Hex アイソザイムの脳内移行性とモデルタンパク質の脳室内補充効果

近年、HIV の Tat や Rev 遺伝子産物の部分アミノ酸配列として含まれ、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富むペプチド領域に、細胞膜透過機能があることが示されている。さらに京都大・化研の二木らは、アルギニン残基がタンデムに 7~16 個連結したオリゴアルギニンにも同様の機能があることを見出している。もし CPP の細胞膜透過機能を血液脳関門の透過や神経系細胞内のリソソームへの酵素輸送に利用できれば、従来の糖鎖レセプター以外の分子をターゲットとした新規のリソソーム酵素補充療法を開発できる可能性がある。

そこで徳島大の伊藤らは、京都大・化研の二木らと共同で、まず産総研の地神らから供給されたメタノール資化酵母由来の部分精製ヒト HexS 標品を、二木らが化学合成した架橋性 R8-ペプチドとのコンジュゲートを作製し、HexS として約 24mg/kg 体重という高用量で 3~4 週齢の野生型マウスの尾静脈から投与を行った。6 時間後にかん流後、脳を摘出して抽出液を調製し、抗ヒト Hex 抗体を用いた ELISA 法により解析し、R8 タグに依存した免疫反応性が検出された。R8 タグを利用した尾静脈内から脳実質内へのリソソーム酵素のデリバリーにもかなり高用量の酵素タンパク質が必要であると予想されるが、今後、R8-ペプチドとヒト HexA とのコンジュゲートを作製し Sandhoff 病モデルマウスの尾静脈から投与した際の脳実質内への移行を評価していく予定である。

一方、モデルタンパク質である EGFP の C 末端に R8-ペプチドを連結する融合タンパク質(EGFP-R8)の大腸菌遺伝子発現系を構築し、培養液 1L から EGFP-R8 を 5~6 mg 程度精製できる系を確立した。この精製 EGFP-R8 を種々の培養細胞株の培地に 1~10  $\mu$ M の濃度で投与すると、R8 タグ依存に EGFP-R8 が細胞内に取り込まれることが明らかになった。マウス新生仔脳由来アストロサイトや脳血管内皮細胞株では取り込まれた EGFP-R8 は主として Lysotracker 陽性のリソソームに局在した。一方、CHO 細胞やヒト HeLa 細胞では、細胞質と核への局在性を示し、その細胞内分布は細胞種や型により異なることが示唆された(図 12)。



AWT: アストロサイト、NBEC4: 脳血管内皮細胞  
 CHO: チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa: ヒト子宮頸がん細胞

図12 EGFP-R8 融合タンパクの細胞内移行と分布

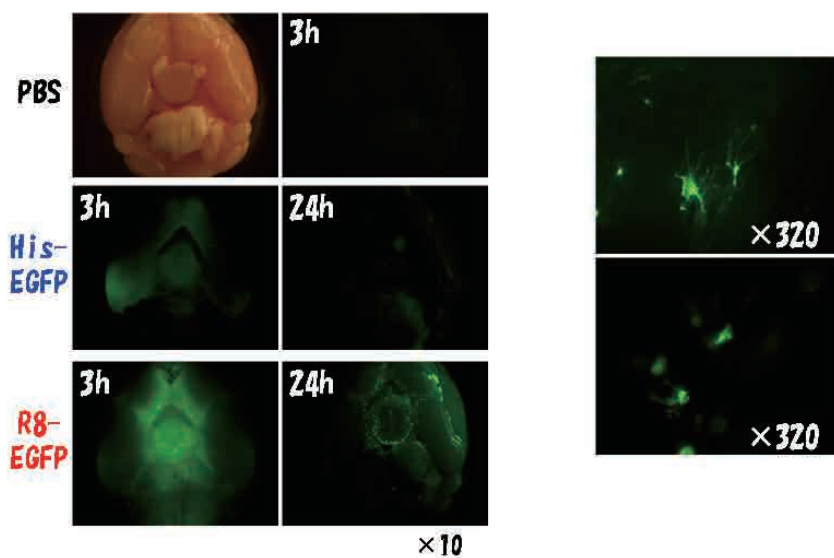


図13 EGFP-R8 を脳室内投与した後の R8 タグ特異的な脳実質内分布

さらに EGFP-R8 を 0.1 mg/個体の用量で 12~13 週齢の正常マウスの脳室内に投与すると、脳室全体に分散した後、R8 タグに依存して脳実質内に移行し、視床下部や脈絡層に存在する、神経細胞、アストロサイト及びミクログリアなどに取り込まれることが明らかになった(図13)。

組換えリソソーム酵素と R8 タグとのコンジュゲートや融合タンパク質は、神経系細胞内のリソソームへの取り込みや脳血管内皮細胞層を透過する機能が付与される可能性が示唆された。今後は、R8 と特異的に相互作用する細胞表面分子を探索・同定していく必要があるが、予備的な研究から少なくともヘパラン硫酸などの負電荷をもつグリコサミノグリカンなどが候補分子として想定される。糖鎖機能を利用する組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発にとっても興味深い知見が得られた。

(2)研究成果の今後期待される効果

1) Tay-Sachs 病と Sandhoff 病は、β-HexosaminidaseA (HexA: αβ heterodimer) のそれぞれを構成

する $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖遺伝子の変異が原因で、中枢神経症状と伴って発症するGM2 ガングリオシドーシスである。一般的に Tay-Sachs 病は十万人に1人程度で発生し、また Sandhoff 病はさらに稀な疾患である。しかし前者はユダヤ系人種では3千人に1人と発生率が極めて高く、歴史的にも中枢神経障害を伴う遺伝病の代表例といえる。もしその有効な根本治療法が確立されれば世界中のユダヤ人に対する意義は非常に大きいと考えられる。

徳島大グループは、これまで有効な治療法がない、これらの疾患に対する組換え酵素補充療法の開発を目的として、まず実用化に最も近い現行の哺乳類 CHO 細胞株を用い、3種存在するヒト Hex アイソザイムのうち、両疾患の治療を可能にする組換えヒト HexA の恒常発現株を樹立した。またこの CHO 細胞株が産生・分泌する組換え HexA は、欠損症患者由来培養細胞や疾患モデルマウスに対して有効性を示したことから、従来他のリソソーム病治療薬と同じ水準の薬効を示すことが期待される。また将来ヒト HexA の恒常発現株を維持する技術に関する特許出願を行った。

- 2) 本研究で開発した新技術として、高マンノース型糖鎖のリン酸化を促進する *MNN4* 遺伝子の導入株 (*Om4* 株)を用いることにより、実際に産生されたヒト HexA に付加される高マンノース型糖鎖のリン酸基含量は3倍以上増大していた。また *Om4* 株由来の末端 M6P 露出型 HexA の、標的細胞表面カチオン非依存性 M6P レセプター (CI-M6PR) を介した細胞内取り込みは 10 倍程度亢進していた。さらに欠損症モデルマウスの脳室内投与した際に、*Om* 株由来酵素に比べ、脳実質内の酵素活性回復、蓄積基質の減少及び中枢神経症状の改善効果に対して有意に優れた機能性を示した。

これらの成果は、糖鎖工学的観点から目的に応じた糖鎖生合成を行うメタノール資化性酵母を育種することにより、従来リソソーム病の酵素補充療法の根本原理である、リソソーム酵素に付加される M6P 含有 N 型糖鎖の高機能化に成功したことを示している。また本来哺乳類型糖鎖付加などの翻訳後修飾を特徴とする哺乳類細胞遺伝子発現系で産生される糖タンパク質よりも高機能型糖鎖をもつ糖タンパク質製剤が大量安価に生産できると考えられた。近い将来、*Om4* 株由来組換えヒトリソソーム酵素が当該リソソーム病の治療薬として実用化されることが期待される。

- 3) 本研究では、脳内移行性が期待される2種類のペプチド性タグ、1) 名古屋大の澤田らが開発した脳標的化ペプチド (Brain-targeting タグ) と 2) 細胞膜透過性ペプチド (CPP) の一種である R8 ペプチド、と組換えリソソーム酵素とのコンジュゲート及びフージョンタンパク質を作製して頸動脈や尾静脈から投与し、ペプチド性タグの機能に依存した末梢血流中から脳実質内への移行能を欠損酵素活性の回復や蓄積基質の減少を指標に検討した。後者の場合は、R8 ペプチドと組換え HexS とのコンジュゲートを 24mg/kg 体重という高用量で尾静脈から投与した場合に、一部の HexS が R8 依存した脳実質内への移行を示したがごくわずかであり、実用的ではないと考えられた。今後末梢血流中から脳実質内への酵素移行解析については、大量に利用できる組換えリソソーム酵素と CPP をはじめとする機能性ペプチドとのコンジュゲートを用いて、*in vivo* を反映した簡便なアッセイを確立していく必要がある。

- 4) EGFP の C 末端に R8 ペプチドを融合した EGFP-R8 を野生型成体マウスの脳室内に投与したところ、対照の EGFP-His は速やかに脳脊髄液から排泄されたのに対し、EGFP-R8 は視床下部や脈絡叢付近の神経細胞、アストロサイト、ミクログリア等に取り込まれることが示され、R8 タグがタンパク質の脳内分布を規定している可能性が示唆された。また R8 ペプチドのもつ正電荷と細胞表面に存在するヘパラン硫酸等との相互作用が細胞膜透過や細胞内取り込みに関与している可能性もあり、今後脳実質内における CPP 付加・融合タンパク質の挙動には興味を持たれる。また投与ルートが異なれば、同じペプチド性タグの機能も変化しうることが示唆された。

今後は、メタノール資化酵母由来の組換えヒト HexA と R8 ペプチドとのコンジュゲートの脳室内投与を行い、HexA の脳内分布における CPP の付加効果を検討することにより、本研究成果をさらに発展させ、中枢神経症状を伴うリソソーム病や他のタンパク質補充で治療が可能な神経変性疾患の治療法の開発に役立てる。

- 5) 本研究でのもう一つの大きな成果として、X 線結晶構造情報を基盤に  $\alpha\beta$  鎖間相互作用の人為的改変によるヒト HexA の高機能化予測を遺伝子発現実験により実証することができた。構造

生物学や分子科学的計算に基づくタンパク質間相互作用に関する予測に基づく研究の妥当性が示され、今後も *in silico* で予測されるアミノ酸置換に基づき、目的に応じてデザインされた高機能型酵素を臨床応用につなげていくことが可能であると考えられた。

- 6) また本研究では、神経系培養細胞をはじめ、骨髄間葉系幹細胞や核移植 ES 細胞などを Sandhoff 病モデルマウスから樹立することに成功した。今後、これらの細胞株は、リソソーム病の発症メカニズムや病態の解明に役立つだけでなく、組換え酵素に対するレセプター解析など治療法開発のための優れた評価系として応用できる。また最近のヒト iPS 細胞作製技術と組み合わせることにより、将来自己再生移植治療や *ex vivo* 遺伝子治療の開発のためのツールとしても利用できる。

### 3.2 サブテーマ名2 メタノール資化性酵母によるリソソーム酵素の発現系の構築 (産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センターグループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

本プロジェクトは、リソソーム病の1種であるGM2ガングリオシドーシスの酵素補充療法に適した組換え $\beta$ -ヘキソサミニダーゼA (HexA) を作製することを目的としている。これまでリソソーム病酵素補充療法の酵素製剤は、CHO細胞やヒト皮膚繊維芽細胞などのほ乳類由来培養細胞を宿主として生産されていたが、産総研・糖鎖医工学研究センターでは、出芽酵母を利用しマンノース-6-リン酸 (M6P) 型糖鎖を含有する糖タンパク質の生産系を構築することに成功し、リソソーム病の一種であるファブリー病の治療薬の生産が可能となった。しかしながら、出芽酵母では組換えタンパク質の生産性が低いため、まずは、より高い生産能を持つメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* に出芽酵母の系を移植し、発現量の向上の可能性を検討した。次にHexAを構成する $\alpha$ -および $\beta$ -サブユニット遺伝子の共発現株を構築し、これらの遺伝子産物より構成されるアイソザイム、ホモ二量体のHexS ( $\alpha\alpha$ )とHexB ( $\beta\beta$ )、ヘテロ二量体のHexA ( $\alpha\beta$ ) からHexAの精製法を検討した。得られた酵素については、細胞内プロセッシング、比活性測定、糖鎖構造解析などの解析を行なうと共に、都臨床研および徳島大等に供与し、Tay-Sachs病 (TS)、Sandhoff病 (SD) 患者由来の細胞やSD病態モデルマウスに投与し、治療薬としての評価を行なった。さらに細胞内への取り込み効率を向上させるため、リン酸化糖鎖の含量を増やしたHexAの生産系を構築し、実際に取り込み効率が向上することを確認した。

#### ① (実施内容)

酵素補充療法に適した組換え HexA の生産に向けて、以下の点について実験を行った。

- 1) メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を宿主に用いた組換えヒト HexA の生産
- 2) 組換え酵素の大量生産と精製、ならびに諸性質の解析
- 3) 組換え酵素の糖鎖の解析 (マンノース6リン酸 (M6P) の定性的、定量的分析)
- 4) Tay-Sachs 病 (TS) 患者、Sandhoff 病 (SD) 患者由来皮膚繊維芽細胞に対する組換え酵素の補充効果の検討
- 5) M6P 含量を増加させた HexA の生産系の構築とその評価

以下、各項目について、実施方法を述べる。

#### 1) メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を宿主に用いた組換えヒト HexA の生産

HexA を構成する  $\alpha$ -および  $\beta$ -サブユニット遺伝子 (*HEXA*, *HEXB*) をメタノール資化性酵母 *O. minuta* のアルコールオキシダーゼ (*AOXI*) プロモーターの下流に挿入した酵母発現用ベクターを構築し、それらの共発現株を HexA 発現株とした。また、簡便に精製ができるように、 $\beta$ -サブユニットの N 末端に His タグを付加したベクターも同時に作製し、 $\alpha$ -サブユニットとの共発現株を HisHexA 発現株とした。

#### 2) 組換え酵素の大量生産と精製、ならびに諸性質の解析

酵素発現株はジャーフェーマンターを用いて培養し、メタノールを炭素源として発現誘導を行い、培養上清を粗酵素液として回収した。HexAの粗酵素液は疎水性相互作用クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーに供して精製を行った。一方、HisHexAの粗酵素液は金属アフィニティーカラム (IMAC) クロマトグラフィー (HisTrapカラム) に供して精製を行った。精製した酵素は、*in vitro*条件下で人工基質に対する比活性を測定し、また界面活性剤添加によるGM2ガングリオシド分解活性を薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認した。酵素補充療法に使用する為に、マンノシダーゼ処理を施して、M6Pを露出した酵素は、M6PHexA、M6PHisHexAとした。

### 3) 組換え酵素の糖鎖の解析 (M6P 露出の確認と、M6P 含有糖鎖の定量)

組換え糖鎖におけるリン酸含有糖鎖の割合を定量した。HisHexA の糖鎖を切り出し、蛍光ラベル後、HPLC に供して電荷とサイズによる分画を行い、得られたクロマトグラムのピーク面積からリン酸含有糖鎖の割合を算出した。また、M6PHexA、M6PHisHexA が M6P レセプターに認識されることを定性的に解析するために、マンノシダーゼ処理前後の酵素を SDS-PAGE 後、膜に転写し、①抗 HexA 抗体を用いて HexA 分子の検出と、②Dom9His (M6P レセプターのリガンド結合ドメイン組換え体) を用いて M6P が露出した HexA 分子のみの検出を行った。

### 4) Tay-Sachs 病 (TS) 患者、Sandhoff 病 (SD) 患者由来皮膚繊維芽細胞に対する組換え酵素の補充効果の検討

組換え HexA を利用して、TS 患者由来皮膚繊維芽細胞に対する酵素補充療法を検討した。一定条件下で培養細胞に酵素を添加後、細胞抽出液中の 4-MU- $\beta$ -GlcNAc-sulfate (MUGS) 分解活性を測定し、取り込まれた酵素量を算出した。更に、酵素補充による細胞内の GM2 ガングリオシドの減少を蛍光抗体法で確認した。

### 5) M6P 含量を増加させた HexA の生産系の構築とその評価

出芽酵母では、マンノースリン酸転移酵素制御遺伝子 (*ScMNN4*) の構成発現株から発現した糖タンパク質は M6P 含量が高くなることが報告されている。そこでメタノール資化性酵母でも同様の効果を期待して、*O. minuta* ゲノム配列より *ScMNN4* のホモログ遺伝子を検索し、それら (*OmMNN4-1*、-2、-3、-4) を組換え HexA 発現株で構成発現させた。各 *OmMNN4* 遺伝子導入株をアルシアンブルーで染色して、細胞壁マンノプロテインのリン酸化糖鎖の量を比較した。また、各株より発現した組換え HexA の M6P 量を Native PAGE 上の移動度から比較した。リン酸含量が高いと思われた *OmMNN4-1* 導入株について、HisHexA の発現と精製を行ない、リン酸含有糖鎖量、患者由来繊維芽細胞への酵素補充効果について *OmMNN4-1* 未導入株 (mock 株) 由来の HisHexA と比較検討した。*OmMNN4-1* 導入酵素株の HisHexA は陰イオン交換カラム (HiTrapQ カラム)、HisTrap カラムに供して精製を行った。次にマンノシダーゼ処理を行い、再び HisTrap カラムに供して M6PHisHexA とした。

## ② (成果)

### 1) メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を宿主に用いた組換えヒト HexA の生産

メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* TK5-3 株 ( $\Delta$ *och1*、 $\Delta$ *ade1*、 $\Delta$ *ura3*) に *HEXA*、*HEXB* を導入し、形質転換株から 4-MU- $\beta$ -GlcNAc (MUG) および MUGS 分解活性が元株よりも高かった 1 株を選抜した。HexA には 2 つのアイソザイム HexB ( $\beta\beta$  ホモダイマー) と HexS ( $\alpha\alpha$  ホモダイマー) が存在し、HexA 発現株は 3 種のアイソザイムを混合して生産する。選抜した酵母株はジャーフェーマンターを用いて培養し、培養上清を粗酵素液として回収した結果、約 14 mg (/1L 培地) のアイソザイム混合溶液が得られた。HiTrap DEAE に供して各アソザイムを分離し、割合を MUG 分解活性値の比から算出した。その結果、HexB:HexA:HexS=1:11:35 となり、目的の HexA は、約 4 mg (/1L 培地) 発現していた。また、ほ乳類の場合と異なり、*O. minuta* 発現系では HexS が非常に多く発現する傾向が認められた。更に、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどを利用した高純度 HexA の精製を試みたが、最終的に粗酵素溶液を疎水相互作用クロマトグラフィー (HiTrap Butyl カラム)、陰イオ

ン交換クロマトグラフィー (HiTrap DEAE カラム) に供して、以下に示す量および回収率の酵素を得た。なお、M6PHexA は、粗酵素液を HiTrap Butyl カラムに供した後、マンノシダーゼ処理を行い、再び HiTrap Butyl カラム、HiTrap DEAE カラムに供して精製酵素とした。比活性と回収率は以下の通りであった。

表1 HexA、M6PHexA の回収率

	HexA	M6PHexA
MUG (比活性)	$4.6 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$ (nmol/h/mg)
(回収率)	4.5%	3.2%

酵素の回収率が低かったため、以降は、高純度の精製 HexA が簡便に得られるように His タグを  $\beta$ -サブユニットの N 末端に付加した HisHexA 発現系を構築して使用することにした。

## 2) 組換え酵素の大量生産と精製

HisHexA 発現株はジャーファーメンターを用いて培養した。HisHexA の粗酵素液は HiTrap カラムに供して精製を行った。次にマンノシダーゼ処理で M6P を露出させ、再び HiTrap カラムに供して M6PHisHexA とした。最終的に 1L 培養液から今までの約4倍量に相当する約 0.8 mg の M6PHisHexA を得た。精製した酵素は、*in vitro* 条件下で人工基質に対する比活性を測定した。各精製酵素の MUG に対する比活性と回収率は以下の通りであった。

表2 HisHexA、M6PHisHexA の比活性

	HisHexA	M6PHisHexA
MUG (比活性)	$1.4 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$ (nmol/h/mg)
(回収率)	14%	6.6%

次に、HisHexA の GM2 分解活性を *in vitro* の系で確認した。GM2 アクチベーターの代わりに界面活性剤を用いて、それぞれ 500nmol/h(MUGS 分解活性)を含む組換え HexA と CHO 由来の組換えアイソザイム溶液を添加して反応を行い、TLC で反応産物を確認した(図1)。

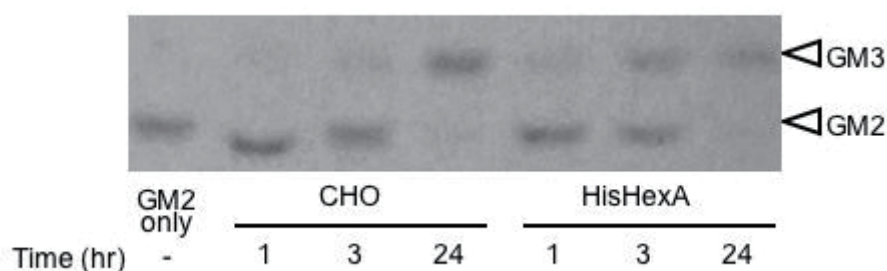


図1 GM2 分解産物の TLC

HisHexA の電気泳動とウエスタンブロッティングのパターン分析および N 末端分析から、酵母より発現した HexA はほ乳類の HexA とプロセッシングパターンが異なることが明らかになった。酵母由来  $\alpha$ -サブユニットは、ほ乳類  $\alpha$ -サブユニットのプロセッシング部位よりも数アミノ酸(1-4 残基) N 末端側でプロセッシングを受けていた。一方、 $\beta$ -サブユニットは、2カ所あるプロセッシングサイトのうち、1カ

所目はほ乳類と同様の箇所ではプロセッシングを受けていたが、2カ所目はプロセッシングされていなかった。また、 $\beta$ -サブユニットのC末端側にはダイマー形成に関わる領域の一部が存在するが、酵母組換え体ではこの部分が切れていることが示唆され、これが $\beta$ -サブユニットダイマー( $\beta\beta$ および $\alpha\beta$ )安定性の低下、つまり、HexB および HexA の生産量の低下の原因と推測された。

### 3) 組換え酵素の糖鎖の解析(M6P 露出の確認と、M6P 含有糖鎖の定量)

HisHexA と M6PHisHexA を用いて、糖鎖構造に関する知見を得るために、M6P レセプターとのレクチンブロットと糖鎖構造解析を行った。レクチンブロットの結果、HisHexA と M6PHisHexA において M6PHisHexA のみがレセプターと結合したことから、M6PHisHexA の糖鎖は M6P を露出していることを確認した。しかし抗 HexA 抗体で検出されたシグナルパターンと比較するとシグナルが少ないことから M6P 付加糖鎖量が少ないことが示唆された。(図2)

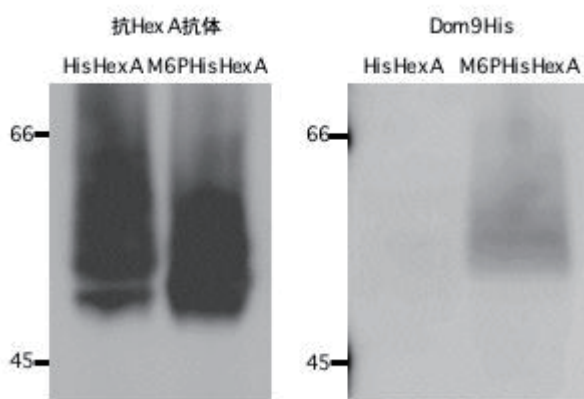


図2 精製酵素のウエスタンブロットティングと M6P レセプターブロットティング

M6P を含む糖鎖(酸性糖鎖)を定量する目的で、HisHexA の糖鎖を切り出し、HPLC を用いて電荷と分子量による分画を行い、得られたピーク画分の面積比を算出した。その結果全体の約 14% が酸性糖鎖で 80% 以上が M6P を含まない中性糖鎖であった。

### 4) Tay-Sachs 病(TS)患者、Sandhoff 病(SD)患者由来皮膚繊維芽細胞に対する組換え酵素の補充効果の検討

TS および SD 由来皮膚繊維芽細胞 M6PHisHexA を 600 nmol/hr (MUGS 分解活性値)含む培地で3日間培養して、酵素を取り込ませた。培養終了後、細胞抽出液の MUGS 分解活性を測定した。酵素未添加の細胞と比較すると、M6PHisHexA を添加した細胞の酵素活性は上昇していた。また、この取り込みは、マンノシダーゼ未処理の HisHexA (M6P が露出していない HisHexA) では認められないことと、M6P により阻害されることから M6P レセプターを介した取り込みであることを確認した。(図3)

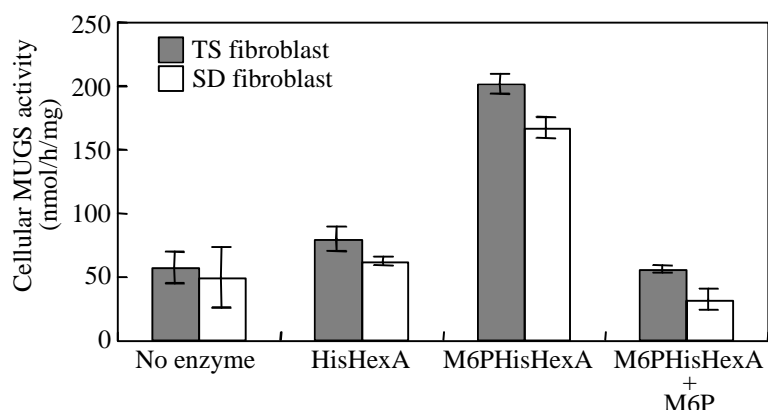


図3 TS および SD 患者由来皮膚繊維芽細胞により M6PHisHexA 取り込み効果

更に、抗 GM2 ガングリオシド抗体を用いた蛍光抗体法を用いて患者由来の細胞を観察した結果、取り込まれた酵素は蓄積している GM2 ガングリオシドを分解していることが確認された。(図4)このことから、酵母由来の HexA でも十分酵素補充療法への応用に有効であることが示唆された。

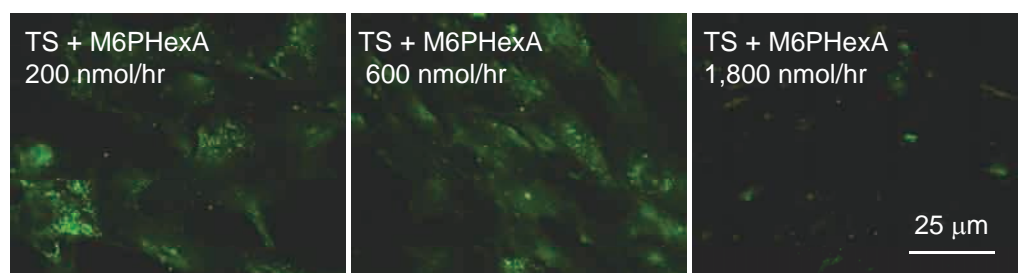


図4 TS 患者由来皮膚繊維芽細胞内の GM2 ガングリオシドの観察

#### 5) M6P 含量を増加させた HexA の生産系の構築とその評価

*O. minuta* ゲノム配列より *ScMNN4* と相同性の高い遺伝子が4つ得られた (*OmMNN4-1*、-2、-3、-4)。各遺伝子をを組換え HisHexA 発現株に導入し、HisHexA を生産、精製し、Native PAGE に供して、抗 HexA 抗体で検出した。*OmMNN4-1* 導入株由来の HisHexA は、他の HisHexA と比較して移動度が高く、分子全体の負電荷(=M6P 含量)が高いことが示唆されたため、以降は *OmMNN4-1* 導入株由来の HisHexA (*Om4*-HisHexA) を実験に用いた。

*Om4*-HisHexA 生産株をジャーファーメンターで培養した結果、酵素生産量が mock-HisHexA よりも低かったが、培養条件の改善により生産性の向上が認められた。ペプトン 6%、グリセロール 4% を含む培地で酵素生産を行い、あらかじめフラスコで前培養する酵母の量をこれまでの 100 ml から 200 ml に増やすことで、発現誘導開始時の菌体量を増やすことができ、結果として酵素生産性を上げることができた。(表3)

表3 グリセロール濃度による *Om4*-HisHexA の生産量

	MUG 分解活性(nmol/h/L broth)	誘導時間 (h)
1%グリセロール	$1.9 \times 10^7$	99 (mock 株)
1%グリセロール	$2.4 \times 10^7$	120 ( <i>Om4</i> 株)
4%グリセロール	$2.8 \times 10^7$	54 ( <i>Om4</i> 株)



培養上清の粗酵素液は、HisTrap カラムに供して精製していたが、Om4-HisHexA においては、はじめに培養上清を陰イオン交換カラム (HiTrapQ カラム) に供して粗精製後、HisTrap カラムに供することで、高純度の HisHexA が得られた (表4)。

表4 Q→HisTrap で精製後の酵素比活性

	Om4-HisHexA	Om4-M6PHisHexA
MUG (比活性)	2.8 x 10 <sup>6</sup>	4.7 x 10 <sup>6</sup> (nmol/h/mg)
(回収率)	23	13 (%)

Om4-M6PHisHexA を用いて、Dom9His とのプロットングを行った。Mock 株由来の HisHexA も併せて評価を行った結果、いずれの M6PHisHexA も Dom9His により検出され、そのシグナル強度は、Om4-HisHexA の方が強かった (図5)。

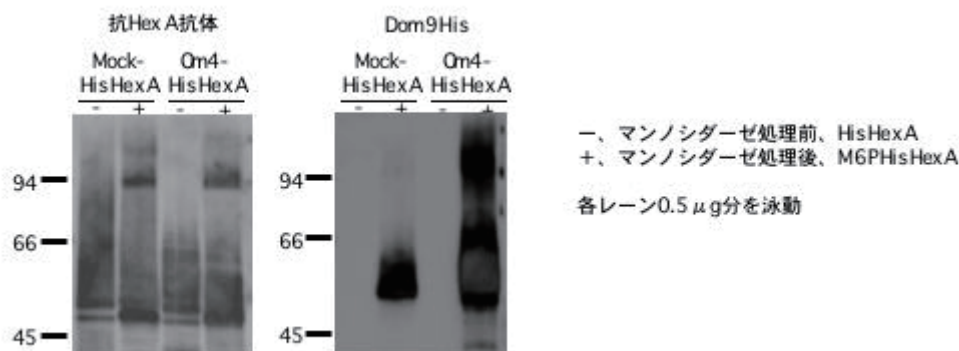


図5 Mock-, Om4-HisHexA のレセプタープロットング

HisHexA 糖鎖を HPLC で分離し、リン酸化糖鎖の定量的な解析を行った結果、Om4-HisHexA の糖鎖は M6P が約 3 倍増加することを明らかにした。特に、M6P が 2 分子付加した糖鎖の割合は約 4.3 倍増加していた (表5)。これらの結果から M6P 含有糖鎖が増えた Om4-HisHexA は、より高い治療効果が得られることが示唆された。

表5 HisHexA の M6P 型糖鎖含量 (%、100% = 全糖鎖本数)

	mock-HisHexA	Om4-HisHexA
中性糖鎖 (M6P 0分子/糖鎖)	86.0%	55.0%
酸性糖鎖 (M6P 1分子/糖鎖)	9.6%	26.1%
(M6P 2分子/糖鎖)	4.4%	19.0%

Om4-M6PHisHexA を用いて、各種培養細胞への酵素補充効果を検討した。TS 患者由来皮膚繊維芽細胞への添加実験の結果、患者由来皮膚繊維芽細胞に対する取込みは、mock-M6PHisHexA 添加時の約 10 倍の値を示した。また蓄積した GM2 を効率良く分解していた。更に、TS 細胞の培地中の残存活性も導入株由来酵素の方が未導入株より高く、酵素安定性の向上が示唆された。SD 患者由来皮膚繊維芽細胞でも同様に効果が見られた。SD モデルマウス由来

神経系の細胞であるシュワン細胞、初代アストロサイト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(図6)。

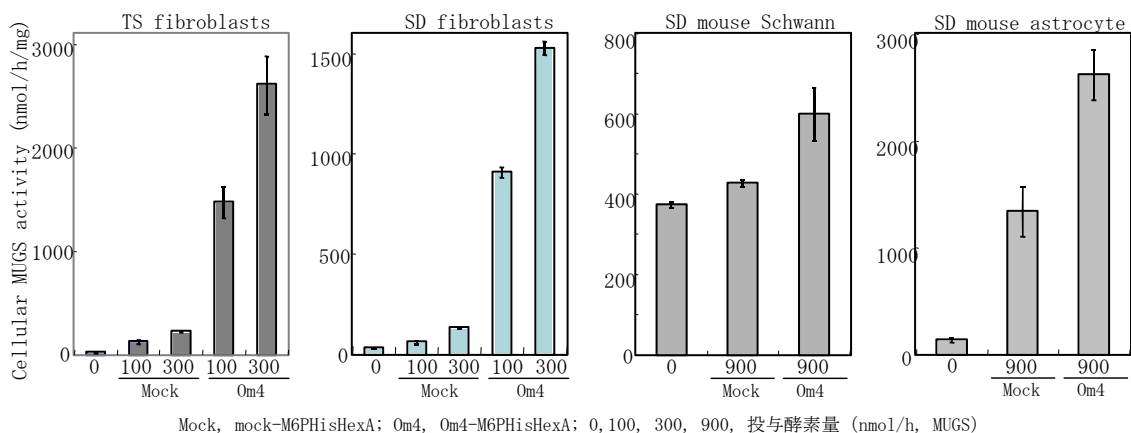


図6 各種培養細胞への M6PHisHexA 投与効果の比較

特にアストロサイトは中枢神経系の細胞であるので、中枢神経系へ強く影響を及ぼす GM2 ガングリオシドーシスのようなリソソーム病の治療において、Om4-M6PHisHexA を脳内へ移行することができれば、強い効果を示すことが示唆された。

(成果の位置づけや類似研究との比較)

酵母を用いたリソソーム病治療薬の生産系については、本研究グループ(産総研・糖鎖医工学研究センター)の他、Chenら(米国)が *Pichia pastoris* での  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの生産を検討した報告があるが、糖鎖の改変は行っていない。また Duら(米国)がマンノースレセプターをターゲットとした酸性リパーゼに関する研究を報告している。我々のプロジェクトでは、糖鎖改変と脳標的化ペプチドタグを組み合わせることで、中枢神経障害をきたすリソソーム病の酵素補充療法開発を検討しており、他の研究プロジェクトとは一線を画すものであると考えられる。さらに動物細胞等でリン酸化糖鎖を増やす方法は単純ではなく、GlcNAc リン酸転移酵素と GlcNAc 分解酵素を導入・過剰発現する方法論しかない。この2つの遺伝子は既に企業により特許化されている。MNN4 遺伝子は出芽酵母やメタノール資化性酵母に発現する種特異的な遺伝子であり、この遺伝子を過剰発現させることでリン酸化糖鎖の含量を増加させるという方法論は、酵母発現系のみで活用できる方法論であるといえる。

## (2)研究成果の今後期待される効果

メタノール資化性酵母を宿主に用いた組換えヒト HexA の生産系を構築し、リン酸化糖鎖の含量が高い酵素の生産に成功した。今後は、さらにリン酸含量を増加させるべく、MNN4 遺伝子の解析を進めると共に、酵素の大量生産のための酵母宿主の改良、培養条件の検討を進めていく必要がある。また脳内への補充方法についても、脳内移行タグの付与の他、送達デバイスの開発等、いくつかの方法が考えられるため、これらを実証していくことが必要となる。これらを組み合わせることにより、Sandhoff 病や Tay-Sachs 病などを含む中枢神経系に病態が見られるリソソーム病の治療へつながるほか、リソソーム病以外の病気についてもこの送達システムを応用できる可能性がある。また酵母を利用することにより、従来高価であった糖タンパク質製剤の薬価を下げるのが可能になると考えられ、年間数千万円ほどかかるといわれる高価な酵素製剤を安価に供給できるようになることが期待される。また、糖鎖機能を活用した糖鎖創薬分野の発展に貢献できると考えている。

一方、通常、ほ乳類細胞の系では安定に得られない HexS ( $\alpha\alpha$ ) が酵母発現系では安定に得られるという特色を利用して、HexS に GM2 ガングリオシド分解活性を付加し、これを酵素補充療法に利用することが可能と思われる。HexS が酵素補充療法に利用可能であれば、投与酵素を構成する  $\beta$ -サブユニットが抗原性を示すリスクを軽減することができるため、Sandhoff 病患者 ( $\alpha$ -サブユニットは発現するが  $\beta$ -サブユニットを正常に発現しない) への投与が期待される。

### 3.3 サブテーマ名3 遺伝性難病の分子病態解明と新規治療法の評価 (明治薬科大学グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### 1) 遺伝性難病の分子病態解明

脳障害を伴う遺伝性難病の治療法を開発するためには、当該疾患の発生機構を解明することが不可欠である。そこで、遺伝性脳疾患の代表であるテイ-サックス病の分子病態を構造生物学的に明らかにすることを試みた。本疾患の責任酵素である  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の結晶構造情報を基に、アミノ酸置換を伴う変異酵素蛋白質の立体構造モデルを構築した。さらに、これを野生型の酵素蛋白質の構造にスーパーインポーズして、当該分子を構成する原子の位置が閾値を越えて「ずれ」を生じるものを「アミノ酸置換によって影響を受ける原子」と規定して、その数を計算することで、変異酵素蛋白質における構造変化の強さを推定した。また、当該酵素蛋白質において置換が認められたアミノ酸残基の溶媒接触表面領域 (solvent-accessible surface area, ASA) の値を計算することで、分子内における構造変化の位置を推定した。本研究の結果、テイ-サックス病の症例のうち、早期発症で重症の臨床像を示すグループでは、当該酵素分子の内部において大きな構造変化が起こっており、晩期発症で比較的軽微な症状を示すグループでは分子表面に小さな構造変化が起こっていることが明らかになった。

##### 2) 遺伝性難病の疾患責任酵素に対する特異抗体の作製

遺伝性難病の病態解析、治療法の開発およびその評価においては、その疾患責任蛋白質を特異的に認識する抗体が不可欠である。しかし、それらの中には、構造学的特徴により、抗体作製が難しいものも存在する。テイ-サックス病およびザンドホッフ病における疾患責任酵素蛋白質  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の構成成分である  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットとは相同性が極めて高く、各々を特異的に認識する抗体を得ることは難しい。そこで、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の立体構造情報を基に、各々に特異的な構造を有する分子表面の領域を特定した。そして、その領域に相当するペプチドを抽出し、当該ペプチドの立体構造を *in silico* で構築した。これらのペプチドのうち、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A 分子の全体構造中の一部としての構造に比べて、変化を来さないものを抗原候補として、それに対する抗体を作製した。本法で作製した、抗ペプチド抗体は、試料中の  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の  $\alpha$  サブユニットおよび  $\beta$  サブユニットを特異的に認識した。

##### 3) ザンドホッフ病マウス由来の培養神経系細胞株の樹立とその応用

神経系障害を伴う疾患の病態解明と治療法開発には、神経系組織から樹立した培養細胞が試料として有用である。そこで、ザンドホッフ病マウスのヘテロ接合体同士のかげ合わせによる胎生 13 日目のザンドホッフ病ホモ接合体の胎仔の終脳組織を採取して、ニューロスフェアを作製した。このニューロスフェアからは、神経細胞、オリゴデンドログリアおよびアストログリアが分化することを確認した。また、ザンドホッフ病ホモ接合体マウスの後根神経節および連続する末梢神経を採取して、不死化シュワン細胞株を樹立した。これらのニューロスフェアおよびシュワン細胞を解析した所、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A 活性の低下とリソソームでの GM2 ガングリオシド蓄積がみられ、電顕で細胞内層状封入体の病理所見が認められた。これらの所見は、樹立した細胞株がザンドホッフ病としての特徴的な生化学および病理所見を備えていることを意味している。そこで、これらの細胞の培養液中に組み換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A を加えて培養を行い、同酵素の細胞内取り込みと GM2 ガングリオシド分解効果について解析した。その結果、同酵素は細胞のマンノース 6-リン酸受

容体を介して取り込まれるが、その効率は非神経系細胞のそれに比べてかなり低く、GM2 ガングリオシドの分解には大量の酵素が必要であることが明らかになった。

#### 4) 新規高機能酵素開発のための分子設計

セレスター・レキシコ・サイエンシズ研究グループの仕事を引継ぎ、細胞内取り込み効果が高く安定な新規  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の開発を行うため、*in silico* での分子設計を行った。その結果、同酵素の  $\alpha$  サブユニットの一部特定領域のアミノ酸置換を行うことにより、糖鎖の付加と  $\beta$  サブユニットとの二量体形成増強を期待出来る設計結果が得られた。

#### 5) 組み換え酵素の血管内投与による中枢神経系への効果

組み換えリソソーム酵素の血管内投与による中枢神経系への効果を調べる目的で、チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞で生産した組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (GLA) を、生後 18 日齢のファブリー病モデルマウスの尾静脈に 1mg/kg 体重および 60mg/kg 体重の量で投与した。その 6 時間後にマウスを屠殺、全身灌流し、脳と肝臓とを採取して、それぞれの組織の GLA 活性測定と GLA 蛋白質の免疫蛍光染色を行った。その結果、脳組織においては、1mg/kg 体重の量の酵素投与では、GLA 活性の増加はみられなかったが、60mg/kg 体重の投与により、欠損していた GLA 活性は、野生型マウスのその 1/3 に至るまで回復した。一方、肝臓組織においては、1mg/kg 体重および 60mg/kg 体重の量の酵素投与により、野生型マウスにおける GLA 活性のそれぞれ 5 倍および 280 倍に至る活性増加が認められた。抗 GLA 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果、1mg/kg 体重の酵素投与では、脳組織での染色性はみられなかったが、60mg/kg 体重の酵素投与により、脳血管内とその周囲の脳組織において弱い染色性が認められた。以上の実験結果から、肝臓とは異なり、脳においては、通常の治療量 (1mg/kg 体重) の酵素を用いた血管内投与では効果は認められず、少なくともその 60 倍の量の酵素投与が必要であることが明らかになった。

#### 6) 組み換え酵素の脳室内投与による中枢神経系への効果

組み換えリソソーム酵素の脳室内投与による、酵素の脳組織への移行を調べる目的で、ファブリー病モデルマウスに対して、チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞で生産した組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (GLA) を、0.1mg/kg 体重および 1.0mg/kg 体重の量で、脳室内投与した。その 1 および 6 時間後に脳を採取し、組織中の GLA 活性を測定した。その結果、0.1mg/kg 体重の量を用いた酵素の脳室内投与により、欠損していた脳の GLA 活性は、投与 1 時間後および 6 時間後には、それぞれ野生型のその約 5~60% および約 5~20% に増加した。また、1.0mg/kg 体重の量の酵素投与では、投与後 1 時間後および 6 時間後にはそれぞれ野生型のその 80~800% および 20~200% にまで GLA 活性が増加した。

### (2)研究成果の今後期待される効果

#### 1) 遺伝性難病の分子病態の解明

本研究により、テイ-サックス病の発症機構が、疾患責任蛋白質の立体構造の視点から解明されたと共に、本疾患における構造変化と臨床表現型との関係が明らかになった。この研究結果は、早期診断された本疾患患者の経過や予後を推測するのに役立つと共に、治療法の策定に推測するのに役立つと期待される。

#### 2) 遺伝性難病の疾患責任酵素に対する特異抗体の作製

酵素欠損に起因する遺伝性難病の病態解明や診断および治療法の開発においては、当該酵素蛋白質に対する特異抗体が必要である。本研究で開発した立体構造情報を利用したペプチド抗体作製法は、従来の方法では作り難かった蛋白質の特異抗体の作製においても、有力な手段を提供出来ると期待される。今回、作製した  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットに対する抗体は、その後のテイ-サックス病およびザンドホッフ病の治療法開発研究に大いに役立った。

### 3) ゼンドホッフ病マウス由来の培養神経系細胞株の樹立とその応用

神経障害を来たす遺伝性難病の治療法開発や評価には、当該疾患の特徴を備えた培養神経系細胞株が試料として必要である。本研究で得られた中枢神経系および末梢神経系由来の培養神経系細胞株は、それぞれの神経系の特徴と当該疾患における特異的性状を合わせ持っており、今回の酵素補充療法開発のための研究に大いに役立った。今後の新規治療法を目指した研究の他に、神経系難病発症機構の解明にも役立つと期待される。

### 4) 新規高機能酵素開発のための分子設計

現在、リソソーム病の酵素補充療法に用いられている組み換え酵素薬の多くは、血中で不安定であり、細胞に取り込まれ難いという欠点がある。本研究で開発した立体構造の一部を改変した新規酵素は糖鎖を付加し、二量体を形成するサブユニット同士の結合を強化することにより、その欠点を克服した。この様な構造生物学を利用した新規治療薬の開発方法は、今後、重要な武器となり得ると期待される。

### 5) 組み換え酵素の血管内投与による中枢神経系への効果

現在行われている酵素補充療法においては、分子量が大きな酵素分子は血液脳関門を通過し難いため、通常量の酵素の血管内投与では脳障害の改善は見られないと考えられている。それでは、どの程度の酵素投与量で効果が見られるのかに関しては、ほとんど情報が無い。本研究により、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼは、通常の投与量の約 60 倍の量の血管内投与で、脳内移行が見られることが示された。この基礎情報は今後の酵素補充療法の改善に役立つと考えられる。

### 6) 組み換え酵素の脳室内投与による中枢神経系への効果

本研究により、通常量(1mg/kg 体重)の酵素の脳室内投与により、当該酵素の十分な脳内取り込みが見られることが明らかになった。この投与方法は、ヒトにおいても可能であることから、さらに改善することにより、脳障害を伴うリソソーム病の治療に応用出来ると期待される。

## 3. 4 サブテーマ名4 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 (名古屋大学グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

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 : BBB)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。そこで本研究では、

- 1) 脳標的化ペプチドをフェ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  $\beta$ -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  $\beta$ -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

などにより脳標的化型  $\beta$ -Hex を作成して Sandhoff 病における脳病変の新規治療法の確立を目指す。

### 研究実施方法

### ・脳移行分子の評価システム

- 1) 培養血液脳関門モデル:MBEC4 マウス脳血管内皮細胞由来細胞株によるバリア形成
- 2) *in vivo* 脳移行性の検証:正常マウスの頸動脈注入システム

### ・脳移行型改変

- 1) ペプチドコンジュゲート:脳移行性ペプチドを化学結合により標識する
- 2) リコンビナント法:脳移行配列を遺伝子情報として組み込んだ組み換えタンパクを作製する

### ・検出法開発

- 蛍光色素による透過物質の定量
- 電子顕微鏡による形態学的検出
- Western blot による生化学的検出

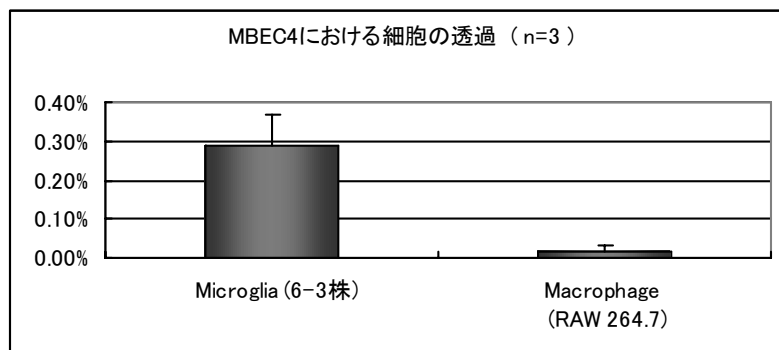
## 研究成果

目標1)については、コンジュゲートならびにリコンビナントに用いるペプチド配列について検討が完了した。そこで、産総研より提供される HexS を用いコンジュゲート体を作製し徳島大学に提供、脳移行の確認実験を行ったが、残念ながら脳移行は確認できなかった。リコンビナント技術についてはモデルタンパクとして EGFP とアザミグリーンについて脳移行型改変を行ったリコンビナントタンパクを作製してマウス頸動脈に投与し脳を回収して Western blot 解析を行ったところ脳内にリコンビナントタンパクが検出できた。

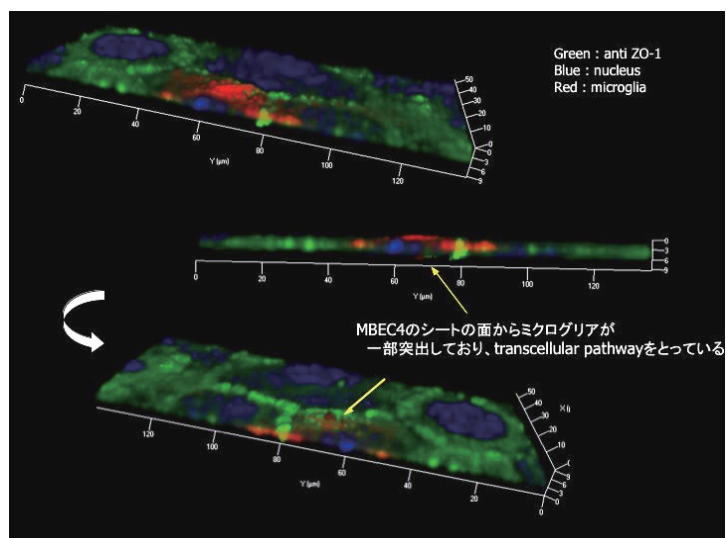
そこで、脳移行型ベクターのうち N 末に脳移行配列を組み込んだベクターを徳島大学に提供し目標 2)の実験を行った。徳島大学で Sandhoff 病モデルマウスの末梢血管に注入した限りでは、脳移行活性が検出されなかった。

今後、タンパク質あたり多くの標識ができる直接標識により脳移行ペプチドをモデルシステムとしての糖タンパク質に付加する反応およびその脳移行活性との相関を検討していく必要がある。

### 1) 脳移行性分子の評価系の確立



MBEC4を用いて、BBBの透過性を判定できるシステムを構築し有効性を検討し、ミクログリアに特異的な移行性が検証できた。また、共焦点顕微鏡でトランスマイグレーション像が確認できた。

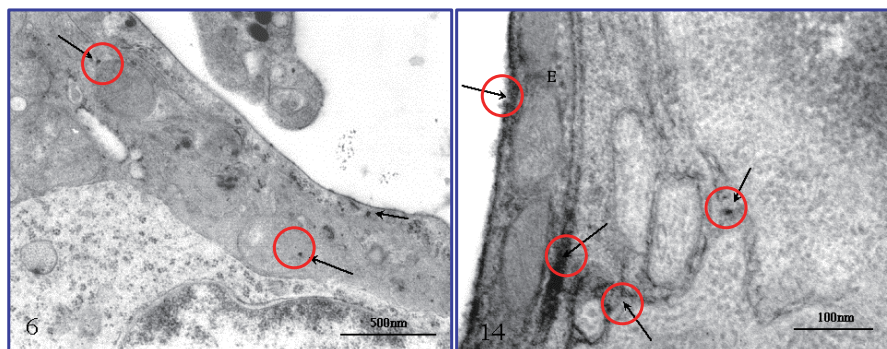


## 2) 脳移行型ペプチドコンジュゲート

脳移行ペプチドの N 末端に活性エステルを用いてビオチン分子を結合させ、あらかじめビオチン付加した脳に移行させたい物質とともにストレプトアビジンを介して複合体(コンジュゲート)を作成することにより脳移行活性を持たせる。もしくは、対象物質をストレプトアビジンに化学結合させ、ビオチン化ペプチドとコンジュゲートを形成させることにより脳移行型に変換した。この方法により金コロイドナノ粒子を結合させたものを作成し、マウス頸動脈に注入した後脳を取り出して切片を作成、電子顕微鏡で観察した。その結果、金コロイド粒子が脳血管を透過している像が観察できた。

**Biotin-T2J002**

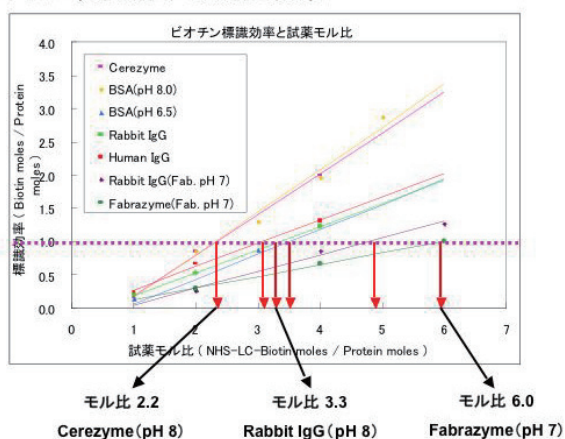
**Biotin-T2J002**



### ペプチドコンジュゲート作成の最適化

移行分子をビオチン化する場合、目的分子が複数のビオチンを持っていると分子間架橋を作り、巨大な複合体を形成して脳移行活性の低下を招く可能性がある。そこでストレプトアビジンに結合すると蛍光を発する 2,6-ANS を用いて定量する方法を確立した。この方法を利用していろいろなタンパク質に対してビオチン標識反応を行ったところ、目的分子に1分子だけビオチンを標識することは標識試薬のモル比を調整することでコントロールできることがわかった。しかし、目的分子の性質に応じて標識化試薬の最適モル比が異なることが判明した。そこで、 $\beta$ -Hex より構造が簡単である cerezyme をモデル酵素としてコンジュゲート技術を用いてその脳移行性と酵素活性の保持について検討したところ、培養血液脳関門系を用いた解析では脳移行性と酵素活性の移行性が確認できた。このコンジュゲートをマウス血管に投与したが、内在性酵素活性が高く導入酵素活性の確認ができなかった。

### ビオチン標識効率の測定結果



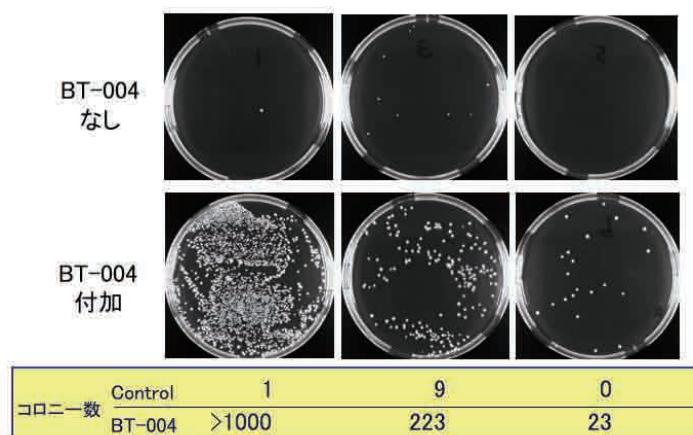
### 3) 脳標的化タグ (BT tag)

脳移行活性ペプチドの DNA 配列を任意のタンパク質 cDNA 配列の 5'-または 3'-末端に挿入してリコンビナントタンパクを合成し、脳標的化型に変換する。GFP やアザミグリーン遺伝子配列を挿入したものについてリコンビナントタンパクを発現させ、脳移行活性を判定したところ、活性が確認できた。これをマウス血中に投与したのち脳を摘出してウエスタンブロットにより脳に移行したアザミグリーンが確認できた。



酵母細胞表面に発現する Aga タンパク質を利用してペプチドディスプレイ法を作成し、脳移行配列を発現させたところ、脳移行配列依存的な酵母の BBB 透過が確認できた。

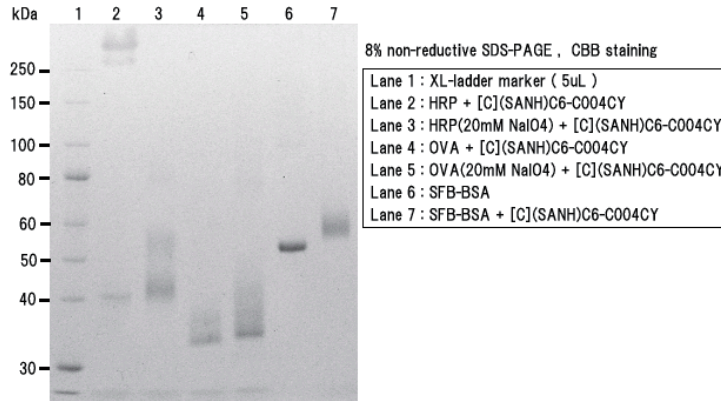
#### BT-Tagの発現で酵母がBBBを通過する



### 4) 糖タンパク質のペプチド直接付加



脳移行性ペプチドを目的タンパク質に付加する場合、直接的にペプチドを結合することが望ましい。そこで、BSA をモデルに結合反応を行ったところ、数個のペプチドが結合でき、培養血液脳関門モデルで脳移行活性が検出できた。そこで、糖タンパク質としてオボアルブミンや HRP についてペプチド付加実験を行ったところ、ペプチド付加に成功した。現時点では脳移行性の定量法が未確定であるため、今後移行性の評価とともに検討する必要がある。



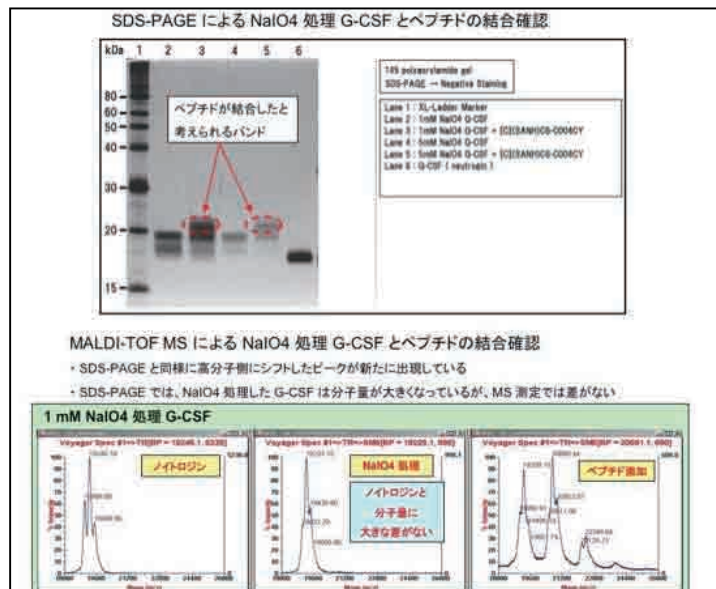
#### 5) 脳標的化分子によるリゾゾーム酵素の脳移行改変

さらに次の2点を実施してその有効性を検討した。

- ・タンパク本体へのペプチド付加以外の付加法の検討＝糖鎖への付加
- ・リゾゾーム酵素での検討＝脳標的化型リコンビナントグルコセレブロンダーゼの作成

#### G-CSF での検討

これまでに検討した糖鎖のない G-CSF へのペプチド付加を Lys 残基に行う反応では活性低下がおこってしまったため、リゾゾーム酵素など Lys 残基が活性に重要であるタンパクにはこの方法は適用できないと判断した。そこで、タンパクへのペプチド付加を別方法で検討することにした。対象としては分子量が比較的小さく手持ちの MALDI-TOF-MAS でのペプチド付加の評価が容易であり、市販薬で糖鎖のないグランと糖鎖修飾されているノイトロジンの両者が入手可能である G-CSF での脳移行性ペプチド付加条件を検討することとして両試薬を購入済みであったため、糖鎖へのペプチド付加の条件検討を G-CSF で検討した。



G-CSF には 1 本の糖鎖があり、シアル酸が 1 個、あるいは 2 個存在する。シアル酸を NaIO4 によりアルデヒドに変え、SANH で標識したペプチドと反応させる。

・ノイトロジン(Lane 6) を NaIO4 処理すると、バンドの移動度が変化する(Lane 2, 4)。これらの分子は、MALDI-TOF MS で測定すると、Lane 6 のノイトロジンと同程度の分子量になる。

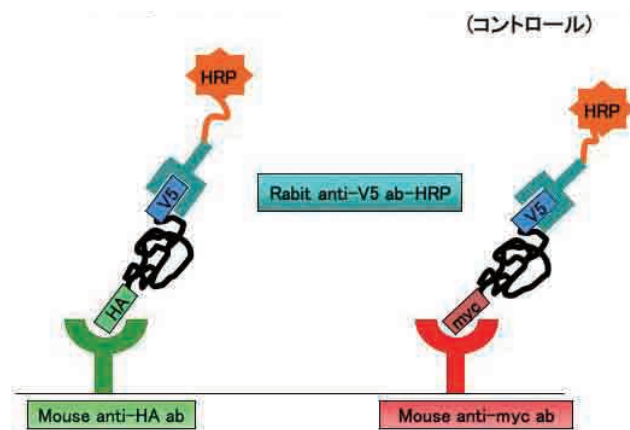
- ・ NaIO<sub>4</sub> 処理 G-CSF にペプチドを添加したサンプル (Lane 3, 5) では、高分子側に新たなバンドが出現している。これがペプチドが結合した G-CSF と考えられる。

### 脳標的化型リコンビナントグルコセブロシダーゼの作成のための遺伝子構築

以下の点を考慮してベクター構築を行った。

- ・グルコセブロシダーゼは膜表面性のタンパクであり、大量発現の際、不溶化する可能性があるため GST 融合として発現させる。
- ・大腸菌で発現させた場合活性を持たない可能性があるが、脳標的化型リゾームタンパクの脳移行性の検討手段として使用する目的であること、現在使用できるシステムが大腸菌発現のみであること、基本コンストラクトを作成すれば産総研グループのご協力酵母発現系に移行できること、などから大腸菌でのリコンビナントを作成した。
- ・活性がないことが予想されるため ELISA 検出用のタグ配列を組み込むこと、以前のアッセイ系のばらつき (培養モデルでのウェル間の誤差と動物投与した場合の個体差) を解消するために、BT タグを組み込んだものと組み込まないものの両者を同時に検出できるシステムを構築することとした。このリコンビナントタンパクが得られれば培養モデル、動物個体ともにコントロールとの同時投与及び検出が可能となる。

- 1) N 末 BT-tag、C 末 Bt-tag、コントロールの 3 種類について、BT-tag V5 HA/myc タグ配列を含む相補的な DNA オリゴを作成し、アニーリングにより 2 本鎖の塩基配列を作成、これを TOPO 反応を用いて pET101 ヘクローニング。(タグ配列の導入)



BT-Tag付のGBAにはHAを、BT-tagなしにはmycのタグを付加している。

- 2) インビトロジェンから購入したグルコセブロシダーゼ全長 cDNA 挿入ベクターから PCR にて必要部分の配列を増幅。これを pTOPO-Blunt へサブクローニング。さらにここから BglIII-XhoI で必要配列を切り出した。(フレームあわせ)
- 3) タグ配列を導入した pET101 を BamHI-XhoI で切断し、ここに切り出したグルコセブロシダーゼ cDNA をサブクローニング。(pET101-GBA タグ付 N term. BT-tag、C term. BT-tag、Control 完成)
- 4) pET101-グルコセブロシダーゼ-タグ付から PCR にて必要部分 (HA/myc、BT-Tag、V5、HIS-tag、グルコセブロシダーゼを含む部分) を増幅させ、増幅配列を BglIII-NotI で切断し、pGEX6p-1 の BamHI-NotI 部位にサブクローニング。これにより GST 融合型タグ付グルコセブロシダーゼの発現ベクターが完成した。
- 5) 現在インクレーションを作りにくい Rosetta2 と Rosetta gami2 の計 2 種類の宿主大腸菌にトランスフォーメーションを行っている。

#### (2)研究成果の今後期待される効果

- 1) 脳標的化ペプチドの末梢血管からの脳実質内へのデリバリーについては、標識プローブを用

いた評価が可能になったため、今後、PET や SPECT などの核医学分野の技術と組み合わせることにより、中枢神経疾患の診断薬や病態解析に応用することが可能である。

- 2) 脳標的化ペプチドの体内安定性は、生体内で分子修飾や共存因子により影響をうけるため、血液中のプロテアーゼなどに対する抵抗性の付与のための誘導体の開発等が必要になる。また脳標的化機能もペプチド自体の立体構造が安定に保持される必要があることがわかり、ペプチドの環状化技術を検討していく予定である。
- 3) 本研究で目標とした、組換えリソソーム酵素と脳標的化ペプチドとのコンジュゲートやフージョンタンパクを、末梢血管内から脳実質内に移行させることは実現できなかった。しかしアザミグリーンなどのモデルタンパク質との融合タンパク質の脳内移行は検出できたため、脳標的化ペプチドの種類と会合させるタンパク質との組み合わせが脳内移行を成立させるか否かの要因になると考えられる。今後はこれまで脳標的化機能をもつ複数のペプチドと当該タンパク質との組み合わせを予め検討し、至適化を行うとともに、安定した機能をもつコンジュゲートの作製法をさらに開発していく。
- 4) 当初から進めてきた、脳内侵入性ミクログリアに関する研究成果を基盤に、マウス骨髄細胞由来の脳内移行性の細胞集団を分離することに成功し、その性質について解明することができた。今後は、細胞治療法や *ex vivo* 遺伝子治療用の遺伝子キャリアーとして、低侵襲的な脳内遺伝子導入に利用でき、将来中枢神経系疾患の治療にも応用できることが期待される。

### 3.5 サブテーマ名5 3次元構造情報に基づく $\beta$ -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 (セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

- 1) Tay-Sachs 病 ( $\alpha$ -サブユニット欠損症) および Sandhoff 病 ( $\beta$ -サブユニット欠損症) の治療を目指した酵素補充療法の開発においては、GM2 ガングリオシドの分解能を示す HexA ( $\alpha\beta$ ) の酵素活性を持つ分子が必須であり、十分な酵素活性を生体内で発揮するように当該酵素を高機能化することが重要である。そこで、ヒト HexA と HexB、HexS の構造を比較・解析し、HexA の基質である GM2 ガングリオシドの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析と HexA の  $\alpha$ -subunit の二量体形成に関与するアミノ酸残基を  $\beta$ -subunit 様に置換したモデルの構築・分析を行い、HexA 組換えアイソザイムの高機能化のための構造的基盤を確立する。さらに、Tay-Sachs 病および Sandhoff 病で、これまでに同定された遺伝子変異に基づいて各変異体の構造モデルを構築し、野生型の構造モデルと比較・解析することによって、遺伝子変異に伴う酵素分子の構造変化と臨床症例、生化学的データを対応付け、疾患の原因となる遺伝子型と臨床表現型との関連を解析する。
- 2) HexA 組換えアイソザイムの高機能化に関しては、HexA の  $\alpha$ -subunit で二量体形成に関与するアミノ酸残基のうち、相当する残基が  $\beta$ -subunit と異なる残基を  $\beta$ -subunit と同じ残基に置換した  $\beta$ -subunit 様置換モデルをそれぞれ構築した。構築したモデルを野生型 HexA と比較・解析し、一残基置換で HexA ヘテロ二量体の安定化の効果が見られる置換の候補を選定した(徳島大学伊藤教授との共同研究)。
- 3) HexA の基質である GM2 ガングリオシドの基質認識に関わるアミノ酸残基を解明するには、まず計算機上で GM2 ガングリオシドの立体構造モデルを構築する必要があるため、糖鎖のモデリング方法について調査を行った。

- 4) Tay-Sachs 病および Sandhoff 病における分子病態解析に関しては、文献等より HexA、HexB のミスセンス変異を持つ症例を調べ、現在 Tay-Sachs 病で57例、Sandhoff 病で10例に関して、遺伝子型及び臨床表現型をまとめた。これらのデータに基づいて、これまでに Tay-Sachs 病の患者から同定されたミスセンス変異を  $\alpha$ -subunit に導入した変異体モデル(42種類)を構築した。同様に、Sandhoff 病においても患者から同定されたミスセンス変異を  $\beta$ -subunit に導入した変異体モデル(9種類)を構築した(東京都臨床研との共同研究)。

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞内取り込み効果が高く安定な新規  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A の開発を行うため、*in silico* での分子設計を行った。その結果、同酵素の  $\alpha$  サブユニットの一部特定領域のアミノ酸置換を行うことにより、糖鎖の付加と  $\beta$  サブユニットとの二量体形成増強を期待出来る設計結果が得られた。構造生物学や分子科学的計算に基づくタンパク質間相互作用に関する予測に基づく研究の妥当性が示されたことから、今後アミノ置換型異遺伝子の CHO 発現系で酵素タンパク質としての高機能化を検証していく。また構造情報に基づく *in silico* での酵素分子の高機能化予測を酵素補充療法や酵素増強療法等の開発に結びつける研究基盤が構築できたと考えられる。

## § 4 研究参加者

- 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(Sandhoff 病( $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ  $\beta$ -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)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	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創薬生命工学分野	教授	Sandhoff 病モデルマウスに対する酵素・細胞補充効果の検討と総括	H15.10~H21.3
*	辻 大輔	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部創薬生命工学分野	助教	Sandhoff 病モデルマウス由来中枢神経系細胞・幹細胞の樹立と治療実験	H15.10 ~ H21.3 (CREST 研究補助員 H16.1-H17.9)
*	松岡 和彦	徳島大学大学院薬科学教育部創薬生命工学分野	D2 CREST 研究補助員	アミノ酸置換型組換え酵素遺伝子の作製, 組換え酵素の発現実験	H17.4~H21.3
*	遠藤 恵美	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部創薬生命工学分野	CREST 研究補助員	研究チームにおける経理および庶務的業務	H17.4~H21.3
	二木 史朗	京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 生体機能設計化学研究領域	教授	膜透過性ペプチドの合成と供給	H20.4~H21.3
	若山 照彦	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター ゲノムリプログラミング研究チーム	チームリーダー	Sandhoff 病モデルマウスの ntES 細胞の樹立	H17.4~H21.3

	高野 正志	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	ポリクローナル抗体の作製	H19.4～H21.3
	田口 雅浩	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	アミノ酸置換に基く組換え酵 素の高機能化解析	H19.4～H21.3
	廣瀬 由記子	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	PTD 融合組換え酵素の発現 と脳移行性評価	H19.4～H21.3
	余田 英士	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	Sandhoff 病モデルマウス由来 ntES 細胞からの神経系細胞 誘導	H19.4～H21.3
	増田 由佳	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	ヒト培養細胞株からの体性幹 細胞の樹立の試み	H19.4～H21.3
	吉田 有花	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	Sandhoff 病モデルマウス由来 体性幹細胞の誘導	H19.4～H21.3
	伊藤 良和	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M1	レクチンカラムを用いたグライ コプロテオーム解析	H20.4～H21.3
	田村 友美	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M1	遺伝子改変に基く組換え酵 素の高機能化解析	H20.4～H21.3
	堀川 靖	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M1	アミノ酸置換に基く分子間相 互作用解析	H20.4～H21.3
	宮崎絵梨	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M1	マウス脳血管内皮細胞株の 樹立と酵素透過機構解析	H20.4～H21.3
	伊崎 俊介	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	レクチンパネルを用いたグライ コプロテオーム解析	H18.4～H20.3
	河下 映里	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	Sandhoff 病モデルマウス由来 中枢神経系細胞の病態解析	H18.4～H20.3
	東根 ゆかり	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	脳血管内皮細胞を用いた人 工血液脳関門モデル実験	H18.4～H20.3
	安岡 寛子	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	脳移行性ペプチド融合酵素 の発現と精製個体への投与 実験	H18.4～H20.3
	藤島 加織	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分 野	M2	高機能化サブユニット遺伝子 の作製と分子間相互作用解 析	H18.4～H20.3
*	門田 佳人	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分	D3	機能改変型組換え酵素遺伝 子の作製, サブユニット間相	H16.4～H20.3 (CREST 研究補助員 H18.4.1-H20.3)

		野		相互作用の解析	
	久我 尚寛	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	Sandhoff 病モデルマウス脳内 プロテオームの解析	H17.4~H19.3
	蔦 幸児	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	脳移行性ペプチド融合酵素 遺伝子の作製と発現	H17.4~H19.3
*	多田納 豊	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	D3	組換え酵素の精製, サブユ ニット間相互作用の解析	H16.1~H18.3 (CREST 研究補助員 H16.1-H18.3)
*	石橋 靖浩	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	組換え酵素の高発現細胞株 の樹立と FACS 解析	H16.4~H18.3 (CREST 研究補助員 H16.4-H18.3)
	竹内 直博	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	モノクローナル抗体の作製	H16.4~H18.3
	一宮 綾希子	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M1	SD マウス ntES 細胞からの組 織幹細胞株の樹立	H17.4~H18.3
*	戸村 恵実子	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイ エンス研究部 創薬生命工学分野	CREST 研 究補助員	研究チームにおける経理およ び庶務的業務	H16.1~H17.3
	大枝 由加子	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	レクチンパネルを用いた基質 分解評価	H16.4~H17.3
	黒木 綾	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	Sandhoff 病モデルマウス脳由 来細胞株の樹立と酵素補充 実験	H16.4~H17.3
	吉原 隆浩	徳島大学大学院 薬科学教育部 創薬生命工学分野	M2	脳血管内皮細胞を用いた人 工血液脳関門モデル実験	H16.4~H17.3

②産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センターグループ(メタノール資化性酵母によるリソソーム酵素の発現系の構築)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
	地神 芳文	産業技術総合研 究所・糖鎖医工 学研究センター	招聘研究 員	グループ総括	H15.10~H21.3
○	千葉 靖典	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	宿主酵母の改変のため の解析・データ評価	H15.10~H21.3
*	明星 裕美	産業技術総合研 究所・糖鎖医工 学研究センター	研究員	酵母での酵素発現・精 製・データ評価	H15.10~H20.9
	笠原 由子	産業技術総合研 究所・糖鎖医工 学研究センター	研究員	細胞培養と酵素の機能 評価	H15.10~H20.3

③明治薬科大学グループ(神経難病の分子病態解明と疾患責任酵素の神経細胞への取り込みに関する検討研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	櫻庭 均	明治薬科大学 分析化学教室	教授	神経難病の分子病態解析	H15.10~H21.3
	小谷 政晴	東京都臨床医学総合研究所	客員研究員	抗体作製と神経系細胞株の樹立	H15.10~H19.3
	田島 陽一	東京都臨床医学総合研究所	研究員	分子生物学的解析	H15.10~H21.3
	川島 育夫	東京都臨床医学総合研究所	研究員	生化学的研究	H16.4~H21.3
*	大澤 真以	東京都臨床医学総合研究所	CREST 研究員	新規治療法の評価	H16.4~H18.5
	田尾 和	東京都臨床医学総合研究所	技術員	細胞培養	H16.4~H17.3
	渡部和彦	東京都神経研	研究員	培養シュワン細胞株の樹立	H15.10~H17.3
	相川 聖一	東京都臨床医学総合研究所	特別研究員	構造解析	H18.4~H19.3
	松澤 史子	東京都臨床医学総合研究所	特別研究員	構造解析	H18.4~H19.3
	兎川 忠靖	明治薬科大学 分析化学教室	准教授	生化学的研究	H20.4~H21.3
	鈴木 俊宏	明治薬科大学 分析化学教室	助教	生化学的研究	H20.4~H21.3

④名古屋大学グループ(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機構の検討研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	澤田 誠	名古屋大学 環境医学研究所 脳生命科学分野	教授	研究グループの統括 脳移行ペプチド調製 遺伝子改変	H15.10~H20.3

	小野 健治	名古屋大学 環境医学研究 所 脳生 命科学分野	助手	MRI, PET による検討 培養細胞による検討 骨髄細胞の脳移行性	H15.10~H20.3
	鈴木 弘美	名古屋大学 環境医学研究 所 脳生 命科学分野	客員研究 員	動物への投与 組織化学的検索	H15.10~H20.3
*	木股 万由美	名古屋大学 環境医学研究 所 脳生 命科学分野	CREST 研 究補助員	培養細胞による BBB モ デルの確立、組織化学 解析、動物飼育	H16.4~H17.3
*	厚沢 季美江	名古屋大学 環境医学研究 所 脳生 命科学分野	CREST 研 究補助員	培養細胞による BBB モ デルの確立、組織化学 解析、動物飼育	H17.4~H18.3

⑤セレスター・レキシコ・サイエンシズグループ(3次元構造情報に基づく  $\beta$ -Hex サブユニット間相互作用の解析と機能改変酵素分子のデザイン)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	土居 洋文	セレスター・レ キシコ・サイエ ンシズ株式会 社 幕張 R&D センター	代表取締 役社長	研究グループの統括	H15.10~H18.3
	相川 聖一	セレスター・レ キシコ・サイエ ンシズ株式会 社 幕張 R&D センター	シニア・リ サーチャー	分子病態解析、分子間 相互作用の解析、機能 改変型酵素分子の設計	H15.10~H18.3
	松澤 史子	セレスター・レ キシコ・サイエ ンシズ株式会 社 幕張 R&D センター	シニア・リ サーチャー	分子病態解析、分子間 相互作用の解析、機能 改変型酵素分子の設計	H15.10~H18.3

## § 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

## § 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 61 件)

主論文



1. Ishiwari, K., Kotani, M., Suzuki, M., Pumbo, E., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ueno, T., Fukushige, T., Kanzaki, T., Imada, M., Itoh, K., Akioka, S., Tajima, Y., Sakuraba, H., Clinical, biochemical, and cytochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder. *J. Hum. Genet.*, 49, 656-663, 2004.
2. 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.
3. 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.
4. Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Kuroki, A., Itoh, K., Wataba, 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(9), 460-467, 2005.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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  $\beta$ -Hexosaminidase  $\beta$ -Subunit Gene Transfer to Fibroblastic Cell Line Derived from Sandhoff Disease Model Mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1564-1569, 2006.
10. Aikawa, S., Matsuzawa, F., Satoh, Y., Kadota, Y., Doi, H., Itoh, K., Prediction of the mechanism of action of omuralide (*clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone) on human cathepsin A based on a structural model of the yeast proteasome  $\beta$ 5/PRE2-subunit/omuralide complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 1372-1380, 2006.
11. 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.*, 5, 401-413, 2006.
12. 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.
13. 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.
14. Kawashima, I., Takeuchi, 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.
15. 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.
16. 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  $\beta$ -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.
17. 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  $\alpha$ -glucosidase”. *J. Hum. Genet.*, 52, 898-906, 2007.
  18. 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. *Chembiochem.*, 8, 1929-31, 2007.
  19. 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  $\alpha$ -galactosidase. *J. Hum. Genet.*, 52, 1018-1025, 2007.
  20. Saito, S., Ohno, K., Sugawara, K., Sakuraba, H., Structural and clinical implications of amino acid substitutions in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: Insight into mucopolysaccharidosis type VI. *Mol. Genet. Metab.*, 93, 419-425, 2008.
  21. Seyrantepe, V., Hinek, A., Peng, J., Fedjaev, M., Ernest, S., Kadota, Y., Canuel, M., Itoh, K., Morales, CR., Lavoie, J., Tremblay, J. and Pshezhetsky, AV., Enzymatic activity of lysosomal carboxypeptidase (cathepsin) A is required for proper elastic fibre formation and inactivation of endothelin-1. *Circulation*, 117(15), 1973-81, 2008.
  22. Yoshimizu, M., Tajima, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Iwamoto, I., Kobayashi, T., Edmunds, T., Fujishima, K., Tsuji, D., Itoh, K., Ikekita, M., Kawashima, I., Sugawara, K., Ohyanagi, N., Suzuki, T., Togawa, T., Ohno, K., Sakuraba, H., Binding parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars with a recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase (alglucosidase alfa): Insight into the complex formation mechanism. *Clin. Chim. Acta*, 391, 68-73, 2008.
  23. Sugawara, K., Saito, S., Ohno, K., Okuyama, T., Sakuraba, H., Structural study on mutant  $\alpha$ -L-iduronidase: Insight into mucopolysaccharidosis type I. *J. Hum. Genet.*, 53, 467-474, 2008.
  24. Ohno, K., Saito, S., Sugawara, K., Sakuraba, H., Structural consequences of amino acid substitutions causing Tay-Sachs disease. *Mol. Genet. Metab.*, 94, 462-468, 2008.
  25. Tatano, Y., Fujinawa, R., Kozutsumi, Y., Takahashi, T., Tsuji, D., Takeuchi, N., Tsuta, K., Takada, G., Sakuraba, H. and Itoh, K., Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372, 681-687, 2008.
  26. Sugawara, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., Structural characterization of mutant  $\alpha$ -galactosidases causing Fabry disease. *J. Hum. Genet.*, 53, 812-824, 2008.
  27. Tsukimura, T., Tajima, Y., Kawashima, I., Fukushige, T., Kanzaki, T., Kanekura, T., Ikekita, M., Sugawara, K., Suzuki, T., Togawa, T., Sakuraba, H., Uptake of a recombinant human  $\alpha$ -L-iduronidase (laronidase) by cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 1691-1695, 2008.

#### 関係論文

1. Itoh, K., Satoh, Y., Kadota, Y., Oheda, Y., Kuwahara, Y., Shimmoto, M., Sakuraba, H., Expression of lysosomal protective protein/cathepsin A in a stably transformed human neuroblastoma cell line during bi-directional differentiation into neuronal and Schwannian cells. *Neurochem. Int.*, 44, 447-457, 2004.
2. Satoh, Y., Kadota, Y., Oheda, Y., Kurwahara, J., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Doi, H., Aoyagi, T., Sakuraba, H., Itoh, K., Microbial serine carboxypeptidase inhibitors - comparative analysis of actions on homologous enzymes derived from man, yeast and wheat -. *J. Antibiot.*, 57, 316-325, 2004.
3. Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Kotani, M., Nakada, H., Fukushige, T., Kanzaki, T., Structural and immunocytochemical studies on  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *J. Hum. Genet.*, 49, 1-8, 2004.
4. Hermans, M.M.P., van Leenen, D., Kroos, M.A., Beesley, C.E., Van der Ploeg, A.T., Sakuraba, H., Wevers, R., Kleijer, W., Michelakakis, H., Kirk, E.P., Fletcher, J., Bosshard, N., Basel, L., Besley, G., Reuser, A.J.J., Twenty two novel mutations in the lysosomal  $\alpha$ -glucosidase gene

- (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum. Mut.*, 23, 47-56, 2004.
5. Kotani, M., Yamada, H., Sakuraba, H., Cytochemical and biochemical detection of intracellularly accumulated sialyl glycoconjugates in sialidosis and galactosialidosis fibroblasts with *Maackia amurensis*. *Clin. Chim. Acta*, 344, 131-135, 2004.
  6. Sato, B. S., Ishii, K., Makino, A., Iwabuchi, K., Yamaji-Hasegawa, A., Satoh, Y., Nagaoka, I., Sakuraba, H., Kobayashi, T., Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 279, 23790-23796, 2004.
  7. Motegi, A., Fujimoto, J., Kotani, M., Sakuraba, H., Yamamoto, T., ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth as revealed by an agonist anti-ALK monoclonal antibody. *J. Cell Sci.*, 117, 3319-3329, 2004.
  8. Hoshikawa, M., Kase, R., Tadokoro, M., Sakuraba, H., Sakiyama, T., Long-term expressed human  $\alpha$ -galactosidase A in tissues of H $\alpha$ G transgenic mice. *Pediatr. Int.*, 46, 673-677, 2004.
  9. Ueyama, T., Lennartz, MR., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., Saito, N., Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through beta I protein kinase C during Fc gamma R-mediated phagocytosis in microglia. *J. Immunol.*, 173(7), 4582-9, 2004.
  10. Kanekura, T., Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Hirabayashi, Y., Yoshii, N., Fukushima, 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.
  11. Adachi, K., Yimin, Y., Satake, K., Matsuyama, Y., Ishiguro, N., Sawada, M., Hirata, Y., Kiuchi, K., Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. *Neurosci. Res.*, 51(1), 73-80, 2005.
  12. Himeda, T., Ohara, Y., Asakura, K., Kontani, Y., Murakami, M., Suzuki, H., Sawada, M., A lentiviral expression system demonstrates that L (\*) protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is essential for virus growth in a murine macrophage-like cell line. *Virus Res.*, 108(1-2), 23-28, 2005.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Kanekura, T., Fukushima, 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Moriya, M., Nakatsuji, Y., Okuno, T., Hamasaki T, Sawada, M., Sakoda, S., Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.*, 170(1-2), 11-20, 2005.
  19. 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.
  20. 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.
21. Hagihara, 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.
  22. 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.
  23. 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.
  24. 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.
  25. Nagatsu, T. and Sawada, M., Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des.*, 11, 999-1016, 2005.
  26. Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Takayama-Ito, M., Yamamuro, 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.
  27. Nakamichi, K., Saiki, M., Sawada, M., Yamamuro, 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.
  28. 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  $\alpha$ -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, 51, 341-352, 2006.
  29. 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.
  30. 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.
  31. Hayashi, Y., Tomimatsu Y., Suzuki H., Yamada J., Wu Z., Yao H., Kagamiishi Y., Tateishi N., Sawada M., Nakanishi H., The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. *Neuroscience*, 142(1), 87-96, 2006.
  32. 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.
  33. Imai F., Suzuki H., Oda J., Ninomiya T., Ono K., Sano H., Sawada M., Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 27, 488-500, 2007.
  34. 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.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 54 件、国際会議 12 件)

- ② 口頭発表 (国内会議 103 件、国際会議 3 件)  
 ③ ポスター発表 (国内会議 68 件、国際会議 19 件)

招待講演 国内会議

1. 櫻庭均, リソソーム病の分子病態解明と酵母を利用した新規治療薬開発—Fabry 病をモデルとして. 産業交流展 2003, 東京, 2003.12.16.
2. 櫻庭均, 先天性代謝異常の病態解明と治療法開発—リソソーム病をモデルとして. 神奈川科学技術アカデミー, 東京, 2003.12.17.
3. 伊藤孝司, 糖鎖機能を利用したリソソーム病の治療法開発と展望 第 110 回日本薬学会中国四国支部例会 特別講演, 徳島市, 2004.1.10.
4. 櫻庭均, リソソーム病の分子病態解明と治療法開発のための戦略—ファブリー病を中心として. 鹿児島大学医学系大学院セミナー, 鹿児島, 2004.2.2.
5. 伊藤孝司, 糖鎖認識を利用したリソソーム病の診断と治療法開発 平成 16 年度産業技術総合研究所四国センター研究講演会, 高松市, 2004.5.17.
6. 櫻庭均, 遺伝性筋疾患の分子病理. 徳島大学大学院薬学系特別講演, 徳島, 2004.5.26.
7. 櫻庭均, 酵母の発現系を利用したリソソーム病治療薬の開発. 臨床研セミナー・ゲノム健康医科学とトランスレーショナル・リサーチ, 東京, 2004.7.22.
8. 櫻庭均, 先天代謝異常症の分子病態解明と治療法開発. 神奈川科学技術アカデミー, 東京, 2004.10.28.
9. 櫻庭均, 遺伝病研究の最前線—基礎から治療へ. 能代市山本群医師会講演会, 能代, 2004.12.9.
10. 伊藤孝司, 糖鎖認識に基づくリソソーム病の診断と治療法 名古屋大学大学院工学研究科招待講演, 名古屋市, 2005.2.23.
11. 櫻庭均, 進む難病対策. 酵素補充療法. NHK きょうの健康, 2005.2.28. 放送
12. 櫻庭均, 遺伝病の分子病態解明と治療法開発に向かって—ファブリー病をモデルとして. 2005 年トップフォーラム「生命科学・ゲノム科学からみた医学とオーダーメイド医療」, 東京, 2005.3.5.
13. 澤田誠, 第 27 回神経懇話会特別講演, 東京女子医大 東京, 2005.6.21.
14. 櫻庭均, 糖質と遺伝病:リソソーム病の分子病態解明と治療法開発に向かって. 東京理科大学理工学部応用生物学科特別講義, 野田, 2005.6.30.
15. 伊藤孝司, 糖鎖レセプターをターゲットとした酵素補充療法の進歩 第 6 回 長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.8.
16. 地神芳文, 酵母を利用する糖鎖改変基盤研究 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.8.
17. 櫻庭均, ファブリー病の分子病態解明と治療法開発. Cell Biology Summer Meeting, 熱海, 2005.7.15.
18. 澤田誠, 第 3 回神経科学研究会, 東京, 2005.9.17.
19. 地神芳文, 糖鎖工学研究の現状と産業化への方向——産総研での事例紹介——KAGAWA 機能糖鎖フォーラム, 第1回シンポジウム, サンメッセ香川, 2005.9.28.
20. 櫻庭均, 先天代謝異常症の分子病態解明と治療法開発. 神奈川技術アカデミー, 東京, 2005.11.1.
21. 澤田誠, 愛知県医師会特別講演会, 名古屋大学, 2006.2.4.
22. 澤田誠, 神経免疫学会 モーニングレクチャー, 2006.3.2.
23. 櫻庭均, 先天性代謝異常症の分子病態解明と診断および治療法の開発 神奈川科学技術アカデミー, 東京, 2006.6.6.
24. 櫻庭均, 糖鎖と遺伝病:リソソーム病をモデルとして. 東京理科大学理工学部応用生物学科特別講義, 野田, 2006.6.29.
25. 伊藤孝司, 糖鎖機能に基づくリソソーム病の診断・治療法の開発. KAGAWA 機能糖鎖フォーラム 第 3 回シンポジウム, 香川, 2006.7.5.

26. 櫻庭均, 神経障害を伴うリソソーム病の病態解明と治療に向けて—Sandhoff 病をモデルとして. Cell Biology Summer Meeting 2006, 箱根, 2006.7.8-9.
27. 澤田誠, よいミクログリアと悪いミクログリア. 第 29 回日本神経科学大会, 京都, 2006.7.19-21.
28. 櫻庭均, シアリドーシスの生化学的基盤. 中野総合病院 CPC, 東京, 2006.7.26.
29. 櫻庭均, 遺伝性シアル酸代謝異常症の分子遺伝学. 2006 年度東京医科歯科大学神経内科同窓会勉強会, 東京, 2006.9.9.
30. 澤田誠, ミクログリアイメージングの意義. 第 18 回日本脳循環代謝学会総会, 東京, 2006.11.
31. 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの中枢神経系へのリソソーム酵素補充効果. CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」CREST 糖鎖全体会議, 大阪, 2007.1.17.
32. 地神芳文, メタノール資化性酵母による組換えヒトリソソーム酵素の発現と機能改変 JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」糖鎖全体会議, 大阪, 2007.1.17.
33. 地神芳文, 酵母の糖鎖生物学および糖鎖工学に関する研究. 2007 年度日本農芸化学会, 東京, 2007.3.24.
34. 澤田誠, microglia の起源, 疾患との関連. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会., 大阪, 2007.3.27-29.
35. 伊藤孝司, 高機能型組換えリソソーム酵素の開発とリソソーム病の酵素補充療法への応用. 第 6 回国際バイオフィォーラム, 東京, 2007.6.21.
36. 地神芳文, 酵母の糖鎖生物学・糖鎖工学---創薬との関連---. 第 23 回・創薬セミナー(八ヶ岳) 日本薬学会・創薬セミナー委員会, 北杜市 山梨, 2007.7.26.
37. 千葉靖典, 酵母によるヒト型糖タンパク質の生産と解析. BioJapan 2007, 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO): 糖鎖の機能解明へのアプローチとその産業応用に向けて, 横浜, 2007.9.21.
38. 櫻庭均, 先天代謝異常症における治療概説. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17.
39. 澤田誠, 血液脳関門を壊さない脳標的化ドラッグデリバリー. 群馬大学生体調節研究所シンポジウム 機能性発光プローブと生体機能イメージング, 前橋, 2007.11.30.
40. 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの中枢神経系への組換えヒト $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの補充効果. JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」第二回糖鎖全体会議, 大阪, 2008.1.22.
41. 櫻庭均, 組換えリソソーム酵素補充療法の現状と次世代型治療法の開発. JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」第二回糖鎖全体会議, 大阪, 2008.1.22.
42. 小野健治, 澤田 誠, 骨髄中に微量に含まれる脳移行性細胞に関する解析. 第 3 回生理学研究所・名古屋大学環境医学研究所合同シンポジウム, 岡崎 愛知, 2008.2.13.
43. 地神芳文, 酵母の糖鎖生物学および糖鎖工学 -30 年間の研究回顧-. AIST シンポジウム「酵母の糖鎖生物学とその応用」, つくば, 2008.2.14.
44. 千葉靖典, 酵母による糖タンパク質糖鎖改変とその応用. AIST シンポジウム「酵母の糖鎖生物学とその応用」, つくば, 2008.2.15.
45. 明星裕美, メタノール資化性酵母を用いたリソソーム病治療薬の生産. AIST シンポジウム「酵母の糖鎖生物学とその応用」, つくば, 2008.2.15.
46. 伊藤孝司, 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開発. 第 1 回 KSGC シンポジウム, 高知, 2008.3.21.
47. 櫻庭均, リソソーム病の分子病態の解明—その治療に向かって—. 日本薬学会第 128 年会シンポジウム S19, 横浜, 2008.3.26-28.
48. 伊藤孝司, 辻大輔, リソソーム病に対する次世代酵素補充療法の開発. 日本薬学会 第 128 年会 シンポジウム-遺伝子組換え技術を利用したリソソーム病治療の最前線-, 横浜, 2008.3.27.
49. 千葉靖典, 糖鎖改変技術を活用した酵母によるリソソーム病補充療法用酵素の生産, 日本薬学会年会, 横浜, 2008.3.27.
50. 櫻庭均, リソソーム病の新規治療法開発: 脳障害克服を目指して. The 7th Cell Biology

Summer Meeting, 鴨川, 2008.7.5-6.

51. 千葉靖典, 糖鎖改変技術を活用した酵母によるヒト型糖タンパク質生産、第 28 回日本糖質学会年会, つくば, 2008.8.20.
52. 櫻庭均, リソソーム病の酵素補充療法製剤の特徴～ファブリー病治療薬を中心に. 第 35 回日本小児臨床薬理学会年会 ランチョンセミナー, 東京, 2008.12.5-6.
53. 地神芳文, メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* による高リン酸化型糖鎖含有リソソーム酵素の生産とリソソーム病治療薬としての可能性. JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」第三回糖鎖全体会議, 大阪, 2009.1.14.
54. 伊藤孝司, 糖鎖機能を利用した組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充療法の開発. JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」第三回糖鎖全体会議, 大阪, 2009.1.14.

#### 招待講演 国際会議

1. Sakuraba, H., Chiba, Y., Jigami, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Molecular pathology of and development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. Neuro 2004. Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Osaka, 2004.9.21-23.
2. Sawada M., Imamura K., Nagatsu T., Microglia activation and gene expression of cytokines in Parkinson's disease. Proceedings of 7<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD2005), Sorrento, Italy, 2005.3.9-13.
3. Jigami, Y., Research Activities Related to Glycomics in Research Center for Glycoscience (RCG) in AIST, Japan, 2005 KRIBB Conference - Development of new generation therapeutics based on glycomics-, Daejeon, Korea, 2005.4.12.
4. Sakuraba, H., Comparison of the effects on Fabry mice between agalsidase alfa (Replagal) and agalsidase beta (Fabrazyme). Genzyme Seminar, Framingham, USA., 2005.5.13.
5. Sakuraba, H., Molecular pathology of and development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. Genzyme Seminar, Framingham, USA., 2005.5.13.
6. Itoh, K., Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Metabolic correction in the CNS cell lines derived from Sandhoff disease model mice. GLYCO XVIII, Florence, Italy, 2005.9.4-9.
7. Itoh, K., Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Sakuraba, H., Satoh, T., Wakatsuki, S., Predicted Molecular Interaction between Human Lysosomal Sialidase (Neuraminidase 1) and Protective Protein/Cathepsin A. Sialoglycoscience 2006 (Fifth International Conference, Mishima, Japan), 2006. 8.28.
8. Sakuraba, H., Decision factors in treating patients with Fabry disease-From structural and biochemical aspects. 9th Annual Asia LSD Symposium, Makuhari, Japan, 2006.9.10-12.
9. Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Chiba, Y., Kanzaki, T., Structural basis of Fabry disease and corrective effect of yeast recombinant human alpha-galactosidase on Fabry mice. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 2006.9.12-16.
10. Jigami, Y., Yeast Glycobiology, its application for cell wall biosynthesis and sugar chain remodeling, Biotechnology Habana 2006, Habana, Cuba, 2006.11.16.
11. Jigami, Y., Yeast glycobiology, cell wall biosynthesis and its application to sugar chain remodeling. KRIBB CONFERENCE 2007, 太田, Korea, 2007.5.30.
12. Itoh, K., Matsuoka, K., Tsuji, D., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Akeboshi, H., Chiba, Y., Jigami Y., and Sakuraba, H., Molecular design of superfunctional human  $\beta$ -hexosaminidase A for enzyme replacement therapy of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. *Glyco-19*, Cairns, Australia, 2007.7.16.

#### 国内会議 口頭発表

1. 鈴木弘美, 小野健治, 澤田誠, 脳・神経系に特異的な細胞浸潤のイメージング(ミニシンポジウム). 第 30 回東海遺伝子・再生医療研究会, 愛知, 2004.2.7.
2. 小野健治, 吉原賢, 鈴木弘美, 澤田誠, 骨髄移植初期に脳内へ移行する細胞の性質に関する解析. 第 30 回東海遺伝子・再生医療研究会, 愛知, 2004.2.7.
3. 萩原英雄, 田中謙二, 中野紀和男, 澤田誠, けいれん発作後のグリア細胞の活性化と細胞

- 新生. 第 30 回東海遺伝子・再生医療研究会, 愛知, 2004.2.7.
4. 川上真紀子, 鈴木和男, F.Vilbardt, K-H Krause, 澤田誠. 脳内細胞ミクログリアの MPO(myeloperoxidase)産生. 第 30 回東海遺伝子・再生医療研究会, 愛知, 2004.2.7.
  5. 澤田浩秀, 永津俊治, 澤田誠. 神経変性モデルを用いたミクログリアの役割の解析. 第 30 回東海遺伝子・再生医療研究会, 愛知, 2004.2.7.
  6. 外山宏, 中根正人, 乾好貴, 片田和廣, 鈴木弘美, 澤田誠, 大橋正男, 増本光, 桑山喜文, 旗野健太郎, 桃崎壮太郎, 加藤隆司, 伊藤健吾. ラット脳における 11C-PK11195 と動物用 PET による活性型ミクログリア画像化の試み. 日本核医学会第 58 回中部地方会, 名古屋, 2004.2.21.
  7. 吉原賢, 小野健治, 臼田信光, 瀧井猛将, 小野寄菊夫, 澤田誠. 培養血液脳関門モデルによる脳移行性細胞の性質の検討. 日本薬学会第 125 年会, 大阪, 2004.3.29-31.
  8. 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの中枢神経系への酵素補充のための基礎的研究, JST・CREST, 「糖鎖機能を利用した組み換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発」研究班会議, 東京, 2004.4.6.
  9. 澤田誠, 鈴木弘美, ミクログリアの脳保護作用と毒性転換. 生体防御機能異常ワークショップ - 2004. 第 7 回肝臓生物学研究会合同大会, 沖縄, 2004.6.17-18.
  10. 櫻庭均, ファブリー病の発症機構に関する構造学的研究, 第 46 回小児神経学会総会, 東京, 2004.7.15-17.
  11. 小野健治, 鈴木弘美, 澤田誠, 骨髄移植後初期に脳実質中へ移行する未分化骨髄細胞の性質に関する解析. 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会, 大阪, 2004.9.21-23.
  12. 田島陽一, 宇山英一郎, 松澤史子, 相川聖一, 鈴木明身, 佐内豊, 北島健, 櫻庭均, 縁取り空胞を伴う遠位ミオパチーにおけるシアリル糖蛋白質糖鎖の異常. 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節シンポジウム, 木更津, 2004.9.26-27.
  13. 今井文博, 鈴木弘美, 二宮敬, 澤田誠, 脳親和細胞を用いた脳虚血性疾患に対する細胞治療の開発. 第 63 回日本脳神経外科学会総会, 名古屋, 2004.10.6-8.
  14. 福重智子, 神崎保, 小谷政晴, 櫻庭均, Fabry 病ノックアウトマウスに対する酵素補充療法の光顕・電顕的検索. 第 31 回日本電顕皮膚生物学会, 鹿児島, 2004.10.8-9.
  15. 出石知子, 神崎保, 櫻庭均, 田島素子, 永木茂, 電顕的検索を行ったシアリドーシスの一例. 第 31 回日本電顕皮膚生物学会, 鹿児島, 2004.10.8-9.
  16. 田島陽一, 宇山英一郎, 小谷政晴, 郷慎司, 佐藤ちひろ, 佐内豊, 北島健, 櫻庭均, 縁取り空胞型ミオパチー(DMRV)における糖鎖異常. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.13-16.
  17. 千葉靖典, 櫻庭均, 高岡友紀, 小林和男, 地神芳文, 酵母による組換え  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの機能解析. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.13-16.
  18. 福重智子, 神崎保, 小谷政晴, 櫻庭均, Fabry 病ノックアウトマウスに対する酵素補充療法の形態学的検索. 第 45 回日本組織細胞化学会, 鹿児島, 2004.10.29-30.
  19. 出石知子, 神崎保, 櫻庭均, 田島素子, 永木茂, 本邦 16 例目のシアリドーシスの臨床的・電顕的検索. 第 45 回日本組織細胞化学会, 鹿児島, 2004.10.29-30.
  20. 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 鈴木弘美, 小野健治, 澤田誠, 加藤隆司, 伊藤健吾, ラット脳における 11C-PK11195 と動物用 PET による活性型ミクログリア画像化の試み. 第 44 回日本核医学会総会, 京都, 2004.11.4-6.
  21. 鈴木弘美, 小野健治, 澤田誠, 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 加藤隆司, 伊藤健吾. 活性型ミクログリアの *In Vivo* イメージング. 第 13 回バイオイメージング学会, 京都, 2004.11.6-7.
  22. 櫻庭均, 松澤史子, 相川聖一, 土居洋文, 奥宮敏可, ファブリー病の発症機構に関する構造学的研究. 第 47 回日本先天代謝異常学会, 宇都宮, 2004.11.11-13.
  23. 櫻庭均, 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 佐内豊, 北島健, 宇山英一郎, 縁取り空胞を伴う遠位ミオパチーにおけるシアリル糖蛋白質糖鎖の異常. 第 47 回日本先天代謝異常学会, 宇



- 都宮, 2004.11.11-13.
24. 田島素子, 溝口枝里子, 立川恵美子, 永木茂, 大澤真木子, 荒木博子, 山村英司, 櫻庭均, 伊東康, ミオクローヌスで発症したシアリドーシスの一例. 第 47 回日本先天代謝異常学会, 宇都宮, 2004.11.11-13.
  25. 伊藤孝司, Sandhoff 病 ( $\beta$ -Hex $\beta$ -subunit 欠損症)モデルマウスの中樞神経系への酵素補充とその評価システムの構築, JST・CREST「糖鎖機能を利用した組み換えリソソーム酵素の新規脳内補充療法の開発」研究班会議, 東京, 2004.12.2.
  26. 小谷政晴, 櫻庭均, レクチンを利用したシアリドーシス/ガラクトシアリドーシスにおける蓄積物質の検出. 難治性疾患克服研究事業(ライソゾーム病研究班), 東京, 2004.12.9.
  27. 鈴木弘美, 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 関亦克彦, 小野健治, 加藤隆司, 伊藤健吾, 澤田誠, 活性型ミクログリアの *In Vivo* イメージング. 第 9 回ニューロイメージングカンファランス, 名古屋, 2005.2.5.
  28. 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 酵素補充療法を目的としたメタノール資化性酵母における組換えヒト  $\beta$ -ヘキシサミニダーゼの生産. 2005 年日本農芸化学会年会, 札幌, 2005.3.30.
  29. 櫻庭均, 小谷政晴, 田島陽一, 村田真以, 伊藤孝司, 山田秀雄, 永山善久, 神崎保, レクチンおよび特異抗体を用いたリソゾーム病蓄積物質の同定とその臨床への応用. 平成 16 年度都立病院共同研究成果報告会, 東京, 2005.3.18.
  30. 櫻庭均, リソゾーム病の分子病態解明と新規治療薬開発. 平成 16 年度特殊疾病(難病)に関する専門研究報告会, 東京, 2005.3.29.
  31. 門田佳人, 相川聖一, 松澤史子, 土居洋文, 桑原淳, 伊藤孝司, 分子モデリングに基づくヒトカテプシン A (セリンカルボキシペプチダーゼ)のキモスタチン感受性の遺伝的改変. 第 125 年会 日本薬学会, 東京, 2005.3.30.
  32. 辻大輔, 黒木綾, 石橋靖浩, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来ミクログリアにおける遺伝子導入効果. 第 46 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 松山, 2005.5.27.
  33. 石橋靖浩, 辻大輔, 黒木綾, 久我尚寛, 河下映里, 東根ゆかり, 安岡寛子, 伊藤孝司, Lentiviral system を用いた Sandhoff 病及び Tay-Sachs 病の治療効果の検討. 第 46 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 松山, 2005.5.27.
  34. 工藤元, 関亦克彦, 旗野健太郎, 外山宏, 鈴木弘美, 加藤隆司, 片田和廣, 澤田誠, 伊藤健吾, 末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物 PET による検討-. 核医学会中部地方会, 富山, 2005.7.3.
  35. 千葉靖典, 明星裕美, 高岡友紀, 高柴みな子, 笠原由子, 小林和男, 伊藤孝司, 櫻庭均, 地神芳文, メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を利用した糖タンパク質生産と糖鎖改変. 第 25 回日本糖質学会年会, 大津, 2005.7.20-22.
  36. 澤田誠, 三井健一, 鈴木弘美, 小野健治, Karl-Heinz Krause, 鈴木和男, HIV-Nef を導入したミクログリア細胞による神経細胞機能障害. 第 16 回日本生体防御学会, シンポジウム発表, 国立感染症研究所 東京, 2005.8.5.
  37. 小野健治, 澤田誠,  $\beta$ アドレナリン受容体を介したミクログリアの神経細胞に対する機能に関する解析. 第 9 回神経伝達物質研究会, 東京, 2005.9.10.
  38. 田島陽一, 宇山英一郎, 北島健, 松澤史子, 相川聖一, 櫻庭均, 縁取り空胞型遠位ミオパチーにおける筋糖蛋白質 O 結合型糖鎖の形成異常. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.19-22.
  39. Tsuji, D., Ishibashi, Y., Itimiya, A., Itoh, K., Induction of neuronal cells from mesenchymal stem cells derived from Sandhoff disease model mice and effect of therapeutic administration. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
  40. Tatano, Y., Takeuchi, N., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., Itoh, K., Characterization of fibroblast from Costello syndrome with impaired elastogenesis. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.21.
  41. Murata, M., Kotani, M., Tajima, Y., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Itoh, K., Watabe, K., Sakuraba, H., Corrective effect of recombinant human  $\beta$ -hexosaminidases on Sandhoff mice Schwann cells.

- 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.22.
42. 鈴木弘美, 外山宏, 工藤元, 旗野健太郎, 関亦克彦, 小野健治, 中根正人, 加藤隆司, 伊藤健吾, 澤田誠, 活性型ミクログリアの *In Vivo* イメージング. 第 14 回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京, 2005.10.26-28.
  43. 関亦克彦, 旗野健太郎, 外山宏, 鈴木弘美, 加藤隆司, 片田和廣, 澤田誠, 伊藤健吾, 末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 11C-CB148 と 11C-PK11195 の比較-動物 PET による検討-. 第 45 回日本核医学会総会, 東京, 2005.11.11-13.
  44. 櫻庭均, 村田真以, 川島育夫, 田島陽一, 千葉靖典, 高柴みな子, 地神芳文, 福重智子, 神崎保, ファブリー病患者線維芽細胞及びファブリー病マウスに対するアガルシダーゼ・アルファとベータの効果の比較. 第 48 回日本先天代謝異常学会年会, 熊本, 2005.11.18.
  45. 大澤真以, 小谷政晴, 三川浩輝, 田島陽一, 伊藤孝司, 渡部和彦, 櫻庭均, ザンドホッフ病マウス由来 Schwann 細胞の樹立と組み換えヒト・ベータ-ヘキソサミニダーゼの取り込みの解析. 第 11 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2005.12.2.
  46. 明星裕美, 笠原由子, 高岡友紀, 辻大輔, 伊藤孝司, 千葉靖典, 地神芳文, メタノール資化性酵母によるヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの発現と解析. 日本農芸化学会 2006 年年会, 京都, 2006.3.27.
  47. 小野健治, 骨髄中に微量に含まれる脳移行性細胞の性質に関する解析. 第 4 回 21 世紀 COE 若手研究フォーラム名古屋大学発のブレイクスルーをめざして プログラム・抄録 : 40, 2006 名古屋, 2006.4.28.
  48. 田北博保, 村山耕一郎, 斉藤純代, 島田佳明, 村田真衣, 櫻庭均, 米谷新, ガラクトシアリドーシスの眼所見と網膜機能. 第 110 回日本眼科学会総会, 大阪, 2006.4.13-16.
  49. 辻大輔, 久我尚寛, 奥野周蔵, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来オリゴデンドロサイト前駆細胞の単離及び蓄積糖質解析. 第 47 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 島根, 2006.5.13.
  50. 久我尚寛, 辻大輔, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの脳におけるプロテオーム解析. 第 47 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 島根 2006.5.13.
  51. 東根ゆかり, 辻大輔, 松岡和彦, 伊藤孝司, 抗 GM2 抗体を用いた Cell-ELISA 系の確立と GM2 ガングリオシドーシス由来細胞の治療効果の評価. 第 47 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 島根, 2006.5.13.
  52. 櫻庭均, 渡部和彦, ファブリー病マウス由来シュワン細胞株の樹立とその組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの取り込み効果. 第 48 回日本小児神経学会, 東京, 2006.6.1-3.
  53. 櫻庭均, ポンペ病の分子病態解明とその臨床応用. 厚生労働省ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班 班会議, 東京, 2006.7.19.
  54. 小谷政晴, 岡本土毅, 今田正人, 伊藤康一, 入 敦, 櫻庭均, 久保英夫, RANDAM-2 の発現量を指標としたマウス neurosphere 由来細胞の FACS 解析. 第 29 回日本神経科学学会大会, 京都, 2006.7.19-21.
  55. 澤田浩秀, 菱田良平, 平田洋子, 小野健治, 鈴木弘美, 村松慎一, 中野今治, 土田邦博, 永津俊治, 澤田誠, ミクログリアの活性化が MPTP 投与による黒質線条体ドーパミン神経細胞に及ぼす影響は新生児マウスと老齢マウスとは異なる. 第 29 回日本神経科学学会大会プログラム : 205, 2006, 京都, 2006.7.19-21.
  56. 辻大輔, 河下映里, 奥野周蔵, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来中枢神経系構成細胞における酵素補充効果. 第 26 回日本糖質学会年会, 仙台, 2006.8.24.
  57. 鈴木弘美, 外山宏, 旗野健太郎, 工藤元, 伊藤文隆, 小野健治, 加藤孝司, 伊藤健吾, 澤田誠, Imaging of activated microglia in brain injury. 第 49 回日本神経化学学会大会抄録号 : 132, 2006, 名古屋, 2006.9.14-16.
  58. 小野健治, 佐藤愛美, 澤田誠, Control of microglial neurotoxicity via  $\beta$ -adrenergic receptors. 第 49 回日本神経化学学会大会抄録号 : 208, 2006, 名古屋, 2006.9.14-16.
  59. 川島育夫, 大澤真以, 福重智子, 永山善久, 新井田要, 神崎保, 櫻庭均, I-cell 病患者由来の培養線維芽細胞における蓄積物質の解析. 厚生労働省難治性疾患克服事業 ライソゾー

- ム病(ファブリー病含む)に関する調査研究班公開班会議, 第 12 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2006.11.24-25.
60. 新井田要, 朝本明弘, 尾崎守, 櫻庭均, I-cell 病の出生前診断の経験. 第 27 回北陸先天異常研究会, 金沢, 2006.11.26.
  61. 明星裕美, 笠原由子, 高柴みな子, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭均, 千葉靖典, 地神芳文, メタノール資化性酵母の MNN4 遺伝子の解析と高リン酸化型糖鎖含有 HexA の生産. 2007 日本農芸化学会年会, 東京, 2007.3.26.
  62. 辻大輔, 河下映里, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスにおけるグリア細胞の活性化. 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007.3.30.
  63. 松岡和彦, 辻大輔, 相川聖一, 相川史子, 櫻庭均, 伊藤孝司, 糖鎖追加型変異導入に基づくヒトβ-Hexosaminidase の高機能化. 第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会, 高知, 2007.5.19-20.
  64. 辻大輔, 川島永子, 仲山賢一, 河下映里, 東根ゆかり, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来グリア細胞の単離・性質決定及び酵素補充効果. 第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会, 高知, 2007.5.19-20.
  65. 廣瀬由記子, 辻大輔, 安岡寛子, 伊藤孝司, PTD 融合タンパクの細胞内導入及び局在解析. 第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会, 高知, 2007.5.19-20.
  66. 伊藤文隆, 工藤元, 外山宏, 鈴木弘美, 籀野健太郎, 加藤隆司, 片田和広, 市瀬正則, 澤田誠, 伊藤健吾, 動物 PET によるラット線条体障害モデルにおけるミクログリア毒性転換の検討. 日本分子イメージング学会第 2 回総会・学術集会, 福井, 2007.6.28-29.
  67. 櫻庭均, Pompe 病の構造生化学的研究. 第 49 回日本小児神経学会, 大阪, 2007.7.5-7.
  68. 伊藤孝司, 松岡和彦, 安岡寛子, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, Tay-Sachs 病および Sandhoff 病の酵素補充療法への応用を目指した高機能化ヒトβ-ヘキソサミニダーゼの発現. 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 2007.8.2.
  69. 辻大輔, 安岡寛子, 廣瀬由記子, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 伊藤孝司, メタノール資化性酵母由来糖鎖改変酵素の Sandhoff 病モデルマウス新生仔腹腔内投与に関する補充効果. 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 2007.8.1-3.
  70. 明星裕美, 笠原由子, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭均, 千葉靖典, 地神芳文, メタノール資化性酵母 *Ogatae minuta* における高リン酸化型糖鎖含有 HexA の生産. 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 2007.8.1-3.
  71. 小野健治, 山本奈穂, 鈴木弘美, 神澤孝夫, 澤田誠, 脳損傷モデルマウスにおける脳移行性骨髄細胞と分化のイメージング. 第 50 回日本神経化学(横浜)大会, 第 30 回日本神経科学大会, 第 17 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 2007.9.10-12.
  72. 田口雅浩, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 伊藤孝司, ヒトシアリダーゼ遺伝子の相同性を利用した酵素機能改変. 第 46 回日本薬学会・日本薬剤師会 日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 高知, 2007.11.11.
  73. 辻大輔, 松岡和彦, 河下映里, 余田英士, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来グリア細胞株の樹立. 第 46 回日本薬学会・日本薬剤師会 日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 高知, 2007.11.11.
  74. 櫻庭均, 月村孝宏, 田島陽一, 川島育夫, 福重智子, 神崎保, 金蔵拓郎, ムコ多糖症 I 型患者由来の培養線維芽細胞に対するラロニダーゼの取り込み効果. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17.
  75. 櫻庭均, 吉水美智留, 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 岩本邦彦, 小林俊秀, Edmunds Tim, 伊藤孝司, 組換えヒト酸性α-グルコシダーゼとその基質アナログとの分子間相互作用. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17.
  76. 櫻庭均, 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 吉水美智留, 月村孝宏, 奥宮敏可, 辻野精一, 柴崎太, ポンペ病および pseudodeficiency と思われる症例群の分子病態の解明. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17.
  77. 櫻庭均, 川島育夫, 渡部和彦, 田島陽一, 福重智子, 神崎保, 金蔵拓郎, ファブリー病マウス

- からのシュワン細胞株樹立とその細胞への組み換え $\alpha$ -ガラクトシダーゼの取込み. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17.
78. 河下映里, 辻大輔, 川島永子, 仲山賢一, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来ミクログリアにおける MIP-1 $\alpha$  生産誘導メカニズムの解析. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.13.
  79. 小野健治, 山本奈穂, 鈴木弘美, 佐藤愛美, 神澤孝夫, 澤田誠, 脳損傷モデルマウスにおける脳移行性骨髄細胞の活性化と分化に関する解析. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  80. 松岡和彦, 辻大輔, 伊藤孝司, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 土居洋文, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, in silico デザインに基づく組換えヒト $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの高機能化. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  81. 辻大輔, 廣瀬由記子, 安岡寛子, 二木史朗, 伊藤孝司, オリゴアルギニンペプチド融合タンパクの細胞内導入機構解析. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  82. 明星裕美, 千葉靖典, 笠原由子, 八木絵美, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭均, 地神芳文, メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* による高リン酸型糖鎖含有リソソーム酵素の生産. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  83. 安岡寛子, 辻大輔, 廣瀬由記子, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 二木史朗, 櫻庭均, 伊藤孝司, Cell penetrating peptide を用いたヒト $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの細胞内補充効果の検討. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  84. 千葉靖典, 明星裕美, 笠原由子, 地神芳文, 糖鎖改変技術を活用した酵母によるリソソーム病補充療法用酵素の生産. 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008.3.27.
  85. 松岡和彦, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 伊藤孝司, 新規糖鎖付加による $\beta$ -HexosaminidaseA の高機能化. 第49回日本生化学会中国・四国支部例会, 香川, 2008.5.16.
  86. 余田英士, 辻大輔, 若山照彦, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来核移植胚性幹細胞を用いた中枢神経系モデルの構築及び病態解析. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 香川, 2008.5.17.
  87. 吉田有花, 辻大輔, 余田英士, 豊島優裕, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来骨髄細胞の性質決定. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 香川, 2008.5.17.
  88. 広瀬由記子, 辻大輔, 伊藤孝司, Cell penetrating peptide を用いた Protein Therapy に関する基礎研究. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 香川, 2008.5.17.
  89. 辻大輔, 安岡寛子, 松岡和彦, 宮崎絵梨, 広瀬由記子, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 櫻庭均, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスに対するメタノール資化性酵母由来組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 香川, 2008.5.17.
  90. 櫻庭均, テイ-サックス病:ヘキソサミニダーゼ A における構造変化と臨床表現型との関連性. 第 50 回日本小児神経学会, 東京, 2008.5.28-30.
  91. 辻大輔, 安岡寛子, 松岡和彦, 宮崎絵梨, 広瀬由記子, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 二木史朗, 櫻庭均, 伊藤孝司, GM2 ガングリオシドーシスモデルマウスに対する組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. 第 50 回日本脂質生化学会, 徳島, 2008.6.5.
  92. 伊藤孝司, 辻大輔, 松岡和彦, 宮崎絵梨, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 川島育夫, 櫻庭均, 地神芳文, Sandhoff 病モデルマウスに対する組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. 第 28 回日本糖質学会年会 (JSCR), つくば国際会議場, 2008.8.20.
  93. 明星裕美, 笠原由子, 辻大輔, 伊藤孝司, 櫻庭均, 千葉靖典, 地神芳文, メタノール資化性酵母生産系を利用したリソソーム病治療薬の生産とその評価. 第 28 回日本糖質学会年会

- (JSCR), つくば国際会議場, 2008.8.20.
94. 田口雅浩, ヒトシアリダーゼの発現と性質比較. 2008 Tokushima Bioscience Retreat, 香川県小豆島, 2008.9.18.
  95. 廣瀬由記子, Cell penetrating peptide を用いた Protein Therapy に関する基礎研究. 2008 Tokushima Bioscience Retreat, 香川県小豆島, 2008.9.19.
  96. 吉田有花, Sandhoff 病モデルマウス由来骨髄細胞に関する基礎研究. 2008 Tokushima Bioscience Retreat, 香川県小豆島, 2008.9.19.
  97. 余田英土, Sandhoff 病モデルマウス由来核移植胚性幹 (SD ntES) 細胞の分化誘導. 2008 Tokushima Bioscience Retreat, 香川県小豆島, 2008.9.19.
  98. 松岡和彦, *in silico* モデリングに基づく N-グリカン追加型ヒト  $\beta$ -Hexosaminidase A の脳内補充効果. 2008 Tokushima Bioscience Retreat, 香川県小豆島, 2008.9.19.
  99. 兎川忠靖, 鈴木俊宏, 櫻庭均, ファブリー病患者血漿中リゾCTHの測定. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会/第 7 回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11.6-8.
  100. 櫻庭均, 川島育夫, 月村考宏, 田島陽一, 芝崎太, 福重智子, 神崎保, 金蔵拓郎, リソソーム病酵素補充療法に用いる酵素の脳移行のための試み. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会/第 7 回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11.6-8.
  101. 田島陽一, 菅原佳奈子, 大野一樹, 斉藤静司, 川島育夫, 月村考宏, 芝崎太, 櫻庭均, 組み換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼとその基質アナログとの分子間相互作用と酵素増強作用の解析. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会/第 7 回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11.6-8.
  102. 櫻庭均, 月村考宏, 田島陽一, 川島育夫, 芝崎太, 基質アナログによる変異  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの安定化. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会/第 7 回アジア先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11.6-8.
  103. 辻大輔, 宮崎絵梨, 松岡和彦, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 川島育夫, 櫻庭均, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスに対するメタノール資化性酵母由来ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.

#### 国際会議 口頭発表

1. Sakuraba, H., Chiba, Y., Jigami, Y., Enzyme-replacement trials for Fabry mice and cultured human fibroblasts with recombinant alpha-galactosidase produced in yeast. 4th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. Natural course, pathophysiology and therapy, Sevilla, Spain, 2004.4.23-24.
2. Itoh, K., Kuroki, A., Mtsuzawa, F., Aikawa, S., Ishibashi, Y., Tsuji, D., Sakuraba, H. and Doi, H., Species specific interaction between human and murine lysosomal beta-hexosaminidase A subunits for GM2 ganglioside degradation. Society for Glycobiology US/Japan Glyco 2004 Honolulu, Hawaii, USA, 2004.11.20.
3. Sakuraba, H., A Japanese female patient with Fabry disease. Fabry Disease Training, Boston, USA, 2005.5.12.

#### 国内会議 ポスター発表

1. 板倉朋宏, 黒木綾, 辻大輔, 石橋靖浩, 桑原淳, 伊藤孝司, マウス神経系不死化細胞株の樹立とGM2ガングリオシドーシスの治療法開発への応用. 日本薬学会124年会, 大阪, 2004.3.29.
2. 辻大輔, 板倉朋宏, 黒木綾, 石橋靖浩, 桑原淳, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの中樞神経系におけるケモカインの異常発現. 第 45 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 徳島, 2004.5.14-15.
3. 多田納豊, 竹内直博, 桑原淳, 櫻庭均, 高橋勉, 高田五郎, 伊藤孝司,  $\beta$ -galactosidase 欠損症とコステロ症候群における 67-kDa エラスチン結合タンパク質 (EBP) の発現解析. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.14.

4. 大枝由加子, 小谷政晴, 櫻庭均, 門田佳人, 多田納豊, 桑原淳, 伊藤孝司, レクチン染色を用いたノイラミナーゼ1 欠損細胞におけるシアル酸含有糖鎖蓄積の解析. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.14.
5. 門田佳人, 佐藤百合恵, 相川聖一, 松澤史子, 土居洋文, 桑原淳, 櫻庭均, 伊藤孝司, 分子モデリングに基づくヒトカテプシン A (セリンカルボキシペプチターゼ) の微生物由来インヒビターに対する感受性の遺伝子改変. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.14.
6. 黒木綾, 辻大輔, 石橋靖浩, 板倉朋宏, 桑原淳, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来不死化中枢神経系細胞株に対する酵素補充効果. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.15.
7. 辻大輔, 板倉朋宏, 黒木綾, 石橋靖浩, 桑原淳, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス中枢神経系における MIP-1 $\alpha$  の特異的誘導. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.15-16.
8. 明星裕美, 笠原由子, 辻大輔, 多田納豊, 伊藤孝司, 櫻庭均, 千葉靖典, 地神芳文, メタノール資化性酵母における組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの精製と諸性質. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004.10.13-16.
9. 櫻庭均, リソソーム性遊離シアル酸蓄積症の構造生物学的研究. 47 回日本小児神経学会, 熊本, 2005, 5.19-21.
10. 石橋靖浩, 辻大輔, 東根ゆかり, 河下映里, 伊藤孝司,  $\beta$ -Hexosaminidase 欠損症患者由来培養皮膚繊維芽細胞に対する遺伝子治療法及びクロスコレクション効果の検討. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
11. 一宮綾希子, 辻大輔, 石橋靖浩, 東根ゆかり, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来骨髄系細胞に対する治療効果. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
12. 久我尚寛, 辻大輔, 伊藤孝司, マウス ES 細胞から神経幹細胞への新規分化誘導法の検討. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
13. 竹内直博, 多田納豊, 櫻庭均, 高橋勉, 高田五郎, 伊藤孝司, コステロ症候群患者由来皮膚繊維芽細胞におけるプロテオーム解析. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
14. 多田納豊, 竹内直博, 櫻庭均, 高橋勉, 高田五郎, 伊藤孝司, エラスチン繊維形成不全を伴うコステロ症候群の発症機構の解析. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
15. 辻大輔, 石橋靖浩, 一宮綾希子, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス骨髄間葉系幹細胞の神経細胞への分化誘導. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
16. 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 伊藤孝司, 地神芳文, メタノール資化性酵母の生産する組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの GM2 ガングリオシドーシス酵素補充療法の検討. 第 6 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2005.7.7.
17. 辻大輔, 石橋靖浩, 一宮綾希子, 久我尚寛, 黒木綾, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの中枢神経系構成細胞における蓄積基質解析. 第 25 回 日本糖質学会年会, 大津, 2005.7.22.
18. 福重智子, 永山善久, 櫻庭均, 神崎保, I-cell disease の電顕的検索. 第 32 回日本電顕皮膚生物学学会学術学会, 札幌, 2005.9.17-18.
19. 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, リソソーム性遊離シアル酸蓄積症: 乳児型シアル酸蓄積症と Salla 病の構造生物学的研究. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.19-22.
20. Tsuji, D., Ishibashi, Y., Itimiya, A., Kuga, N., Yasuoka, H., Itoh, K., Analysis of accumulated glycoconjugates in glial cells derived from Sandhoff disease model mice. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
21. Tsuji, D., Ishibashi, Y., Kawashita, E., Itimiya, A., Kuroki, A., Itoh, K., Corrective effects of gene transfer on microglia derived from Sandhoff disease model mice. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
22. Kuroki, A., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Higashine, Y., Murata, M., Sakuraba, H., Itoh, K., Gene transfer with lentiviral vector into immortalized glial precursor cell line derived from Sandhoff disease model mice. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
23. Itimiya, A., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Higashine, Y., Itoh, K., Metabolic Correction in Myeloid

- Cells derived from Sandhoff Disease Model Mice. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
24. Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Doi, H., Itoh, K., Effects of Amino Acid Substitutions on Processing of Human Cathepsin A (Serine Carboxypeptidase) Based on Homology Modeling. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.20.
  25. Takeuchi, N., Tatano, Y., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., Itoh, K., Proteome alterations in fibroblasts with Costello syndrome. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005.10.21.
  26. 相川聖一, 松澤史子, 奥宮敏可, 土居洋文, 櫻庭均, Fabry 病の分子病態解析 : ミスセンス変異が  $\alpha$ -galactosidase の立体構造に与える影響と臨床的および生化学的表現型との関連性の解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10.
  27. 松澤史子, 相川聖一, 田中あけみ, 土居洋文, 櫻庭均, GM2 ガングリオシドーシス B 異型及び O 異型におけるベータ-ヘキソサミニダーゼの構造学的解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10.
  28. 辻大輔, 石橋靖浩, 東根ゆかり, 松岡和彦, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来間葉系幹細胞の神経細胞分化誘導. 第5回 日本再生医療学会総会, 岡山, 2006.3.8.
  29. 門田佳人, 佐藤匡史, 加藤龍一, 若槻壮市, 蔦幸児, 伊藤孝司, ヒトノイラミニダーゼ-1 の酵素活性発現に対する N 末端領域の影響. 日本薬学会 第 126 年会, 仙台, 2006.3.28.
  30. 辻大輔, 河下映里, 伊藤孝司, レンチウイルスベクターによる Sandhoff 病モデルマウス由来ミクログリアに対する治療効果. 日本薬学会 第 126 年会, 仙台, 2006.3.29.
  31. 笠原由子, 明星裕美, 千葉靖典, 川島育夫, 櫻庭均, 伊藤孝司, 地神芳文, GM2 ガングリオシドーシスの酵素補充療法を目指した組換え酵素の生産と培養細胞による評価. 第 26 回日本糖質学会年会, 仙台, 2006.8.24.
  32. 辻大輔, 東根ゆかり, 余田英士, 伊藤孝司, 中枢神経系における糖鎖レセプター発現解析及び酵素補充効果. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  33. 広瀬由記子, 安岡寛子, 辻大輔, 伊藤孝司, 脳内酵素補充を目指した PTD 融合 HexA の産生・獲得. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  34. 河下映里, 辻大輔, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来株化ミクログリアの樹立と性質決定. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  35. 東根ゆかり, 辻大輔, 余田英士, 伊藤孝司, ミクログリア細胞表面における糖鎖発現解析. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  36. 藤島加織, 松澤史子, 相川聖一, 櫻庭均, 門田佳人, 伊藤孝司, 遊離シアル酸蓄積症患者由来培養 fibroblast における含シアル酸複合糖鎖の解析とヒト sialin 遺伝子導入効果の検討. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  37. 安岡寛子, 広瀬由記子, 辻大輔, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 伊藤孝司, メタノール資化性酵母由来糖鎖改変酵素のリソソーム病モデルマウス新生仔腹腔内投与による治療効果. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  38. 久我尚寛, 辻大輔, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスの脳におけるプロテオーム解析. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  39. 蔦幸児, 門田佳人, 田口雅浩, 伊藤孝司, 膜透過性ペプチド融合ノイラミニダーゼ-1 による酵素補充療法を目指した基礎研究. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  40. 門田佳人, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 蔦幸児, 伊藤孝司, ヒト保護タンパク質/カタレプシン A の分子モデリングとアミノ酸置換効果の解析. 第 7 回長井長義記念シンポジウム, 徳島, 2006.9.6-7.
  41. 安岡寛子, 辻大輔, 廣瀬由記子, 明星裕美, 千葉靖典, 地神芳文, 伊藤孝司, メタノール資化性酵母由来糖鎖改変酵素の Sandhoff 病モデルマウス新生児への補充効果の検討. 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007.3.28.
  42. 河下映里, 辻大輔, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウス由来ミクログリア細胞株の性質決定. 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007.3.28.
  43. 東根ゆかり, 辻大輔, 松岡和彦, 櫻庭均, 伊藤孝司, 抗 GM2 抗体を用いた Cell-ELISA の

- 確立と GM2 ガングリオシドーシスの治療効果の評価. 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007.3.28.
44. 松岡和彦, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 辻大輔, 伊藤孝司, 酵素補充療法への応用を目的としたヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの高機能化. 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007.3.28.
  45. 野田雅裕, 梅田陽, 山田直人, 成井研治, 石井ちぐさ, 内田寛, 河野寿夫, 志倉圭子, 難波栄二, 櫻庭均, ガラクトシアリドーシス(晩期乳児型)の1例. 第 110 回日本小児科学会, 京都, 2007.4.20-22.
  46. 鈴木弘美, 外山宏, 篠野健太郎, 工藤元, 伊藤文隆, 小野健治, 加藤隆司, 伊藤健吾, 澤田誠, 動物 PET によるラット線条体障害モデルにおけるミクログリアの毒性転換の検討. 第 16 回日本バイオイメーキング学会学術集会, 千葉, 2007.10.31-11.2.
  47. 田島陽一, 松澤史子, 相川聖一, 吉水美智留, 月村孝宏, 奥宮敏可, 辻野精一, 芝崎太, 櫻庭均, ポンペ病および pseudodeficiency と思われる症例群の分子病態の解明. 第 80 回日本生化学会, 横浜, 2007.12.11-15.
  48. 川島育夫, 田島陽一, 小谷政晴, 竹内一郎, 猪又孝元, 和泉徹, 櫻庭均, 心臓型ファブリー病と臨床及び病理学的に酷似した心臓型リン脂質蓄積症-第一例目と思われる「リソソーム性リン脂質蓄積症」症例の臨床型, 生化学的解析. 第 80 回日本生化学会, 横浜, 2007.12.11-15.
  49. 東根ゆかり, 辻大輔, 宮崎絵梨, 澤田誠, 伊藤孝司, 血液脳関門を構成する細胞由来液性因子のミクログリアに与える影響. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.12.
  50. 川島永子, 辻大輔, 伊藤孝司, 仲山賢一, GM2 ガングリオシドーシス由来アストロサイトの異常増殖メカニズムの解明. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.13.
  51. 藤島加織, 辻大輔, 田島陽一, 櫻庭均, 伊藤孝司, リソソーム病におけるシアル酸トランスポーター sialin 及び N-glycolyl 型 GM2 の発現解析. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.13.
  52. 廣瀬由記子, 辻大輔, 安岡寛子, 二木史朗, 伊藤孝司, オリゴアルギニンペプチド融合タンパクの細胞内局在解析. BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007.12.14.
  53. 明星裕美, 千葉靖典, 笠原由子, 安岡寛子, 伊藤孝司, 櫻庭均, 地神芳文, メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* による高リン酸化型糖鎖含有リソソーム酵素の生産. JST 第二回糖鎖全体会議, 大阪, 2008.1.21.
  54. 辻大輔, 安岡寛子, 松岡和彦, 廣瀬由記子, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 二木史朗, 櫻庭均, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスに対する組換えヒト $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. JST 第二回糖鎖全体会議, 大阪, 2008.1.22.
  55. 辻大輔, 廣瀬由記子, 伊藤孝司, 中枢神経系構成細胞への Cell penetrating peptide 融合タンパクに対するヘパラン硫酸プロテオグリカンの関与. 第 28 回日本糖質学会年会 (JSCR), つくば国際会議場, 2008.8.19.
  56. 松岡和彦, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 伊藤孝司, リン酸化 N-グリカン追加型組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A を用いた Sandhoff 病モデルマウスに対する効率的脳内補充. 第 28 回日本糖質学会年会 (JSCR), つくば国際会議場, 2008.8.20.
  57. 田島陽一, 吉水美智留, 大野一樹, 月村孝宏, 川島育夫, 岩本邦彦, 小林俊秀, 芝崎太, 櫻庭均, 組み換えヒト酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼとその基質アナログであるデオキシノジリマイシン誘導体との分子間相互作用・複合体形成メカニズムの解析. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.9-12.
  58. 川島育夫, 渡部和彦, 田島陽一, 芝崎太, 福重智子, 神崎保, 金蔵拓郎, 櫻庭均, ファブリー病モデルマウスからのシュワン細胞株の樹立と当該細胞株への  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの取り込み効果. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会,



- 神戸, 2008.12.9-12.
59. 川島永子, 辻大輔, 伊藤孝司, 仲山賢一, GM2 ガングリオシドーシス由来アストロサイトの異常増殖メカニズムの解明. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.10.
  60. 松岡和彦, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 櫻庭均, 伊藤孝司,  $\alpha$ 鎖へのN型糖鎖追加によるヒト  $\beta$ -HexosaminidaseA の脳内酵素補充効果の改善. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  61. 田口雅浩, 辻大輔, 相川聖一, 松澤史子, 伊藤孝司, 哺乳類シアリダーゼの発現と性質比較. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  62. 辻大輔, 宮崎絵梨, 松岡和彦, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 川島育夫, 櫻庭均, 伊藤孝司. Sandhoff病モデルマウスに対するメタノール資化性酵母由来ヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳内補充効果. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  63. 田村友美, 松岡和彦, 辻大輔, 伊藤孝司, レンチウイルスベクターを用いた高機能型ヒト beta-Hexosaminidase A 発現間葉系幹細胞の樹立と性状解析. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  64. 余田英士, 辻大輔, 伊藤孝司, 若山照彦, Sandhoff モデルマウス由来核移植胚性幹細胞から神経系への分化誘導系の確立. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  65. 吉田有花, 辻大輔, 豊島優裕, 伊藤孝司, ケモカインリガンド・レセプターシステムを介した病態マウス由来骨髄細胞の脳内移行に関する基礎研究. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.11.
  66. 堀川靖, 辻大輔, 田口雅浩, 廣瀬由記子, 二木史朗, 伊藤孝司, Cell penetrating peptide を用いたヒト保護タンパク/カテプシンAの細胞内補充効果の検討. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.12.
  67. 辻大輔, 廣瀬由記子, 中瀬生彦, 二木史朗, 伊藤孝司, Cell penetrating peptide を用いた中枢神経系疾患に対するProtein therapyに関する基礎研究. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.12.
  68. 辻大輔, 松岡和彦, 廣瀬由記子, 余田英士, 宮崎絵梨, 明星裕美, 笠原由子, 千葉靖典, 地神芳文, 二木史朗, 櫻庭均, 伊藤孝司, Sandhoff 病モデルマウスへの組換えヒト  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼの脳室内補充と治療効果. JST・CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」第三回糖鎖全体会議, 大阪, 2009.1.13-14.

国際会議 ポスター発表

1. Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itoh, K., Specific Induction of Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha in the Brain Regions of Sandhoff Disease Model Mice. Society for Glycobiology US/Japan Glyco 2004 Honolulu, Hawaii, USA, 2004.11.20.
2. Murayama, K., Shimada, Y., Takita, H., Otake, A., Murata, M., Sakuraba, H., Yoneya, S., Electrophysiological and clinical aspects of adult-form galactosialidosis. 44<sup>th</sup> Annual Symposium of International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, Fontevraud, France, 2006.6.11-16.
3. Akeboshi H., Chiba Y., Kasahara Y., Takaoka Y., Takashiba M., Itoh K., Jigami Y., Purification and characterization of recombinant human  $\beta$ -hexosaminidaseA produced in methylotrophic yeast. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.19.
4. Ishibashi, Y., Matsuoka, K., Tsuji, D., Itoh, K., Development of a novel selection method for cell lines highly expressing a glycosidase composed of two subunits. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.19.
5. Kawashita, E., Kuroki, A., Mtsuzawa, F., Aikawa, S., Tsuji, D., Matsuoka, K., Sakuraba, H.,

- Itoh, K., Functional Alteration of Human-Murine Chimeric Lysosomal  $\beta$ -Hexosaminidase A through Homology Modeling. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.19.
6. Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Sakuraba, H., Itoh, K., Effects of Amino Acid Substitutions on Intracellular Processing and Protective Function of Human Cathepsin A Revealed on Structural Modeling. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.19.
  7. Tsuji, D., Kuga, N., Murata, M., Sakuraba, H., Itoh, K., Analysis of glycoconjugates accumulated in oligodendrocyte precursor cells and Schwann cells derived from Sandhoff disease model mice. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.19.
  8. Tatano, Y., Tsuta, K., Fujinawa, R., Yamamoto, H., Kozutsumi, Y., Takeuchi, N., Murata, M., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., Itoh, K., Up-regulation of chemokine and cytokine expression in skin fibroblasts derived from a Costello syndrome case with impaired elastogenesis. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.6.20.
  9. Tajima, Y., Uyama, E., Go, S., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Kitajima, K., Sakuraba, H., Distal myopathy with rimmed vacuoles impaired O-glycan formation in muscular dystrophy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006.6.18-23.
  10. Aikawa, S., Matsuzawa, F., Sakuraba, H., Structural study of lysosomal free sialic acid storage disease, Salla disease and infantile sialic acid storage disease. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006.6.18-23.
  11. Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sakuraba, H., Molecular and structural study of GM2 gangliosidosis B and O variants. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006.6.18-23.
  12. Kadota, Y., Aikawa, S., Matsuzawa, F., Tsuta, K., Sakuraba, H. and Itoh, K., Effects of R344-Residue Substitutions on Intracellular Processing and Protective Function of Human Lysosomal Protective Protein/Cathepsin A. Sialoglycoscience 2006 (Fifth International Conference, Mishima, Japan), 2006. 8.28.
  13. Tajima, Y., Uyama, E., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Kitajima, K., Sakuraba, H., Distal myopathy with rimmed vacuoles: Impaired O-glycan formation in muscular glycoproteins. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Makuhari, Japan, 2006.9.12-16.
  14. Kawashima, I., Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Itoh, K., Watabe, K., Sakuraba, H., Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human beta-hexosaminidase a on the accumulated GM2 ganglioside. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 2006.9.12-16.
  15. Akeboshi, H., Chiba, Y., Kasahara, Y., Takashiba, M., Takaoka, Y., Ohsawa, M., Kawashima, I., Tsuji, D., Itoh, K., Sakuraba, H. and Jigami, Y., Production of recombinant  $\beta$ -hexosaminidase A that is applicable to enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis, in methylotrophic yeast. Society for Glycobiology, Los Angeles, CA, USA, 2006.11.16.
  16. Tsuji, D., Kawashita, E., Higashine, Y. and Itoh, K., Characterization of Glial Cell Lines Established from Sandhoff Disease Model Mice. Glycobiology and Sphingobiology 2007 Hakomori Commemorative Forum, Tokushima, 2007.2.28.
  17. Itoh, K., Tsuji, D., Yasuoka, H. and Matsuoka, K., Induction of Neurons from Mesenchymal Stem Cells of Sandhoff Disease Model Mice. Glycobiology and Sphingobiology 2007 Hakomori Commemorative Forum, Tokushima, 2007.3.1.
  18. Tsuji, D., Kawashita, E., Higashine, Y., Yasuoka, H., Hirose, Y., and Itoh, K., Establishment of glial cell lines derived from Sandhoff disease model mice, *Glyco-19*, Cairns, Australia, 2007.7.17.
  19. Sugawara, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., Structural study on mutant  $\alpha$ -galactosidases: Insight into Fabry disease. 8th International Symposium on Lysosomal Storage Disorders, Paris, France, 2008.4.18-19.

### (3)特許出願

#### ①国内出願 (4件)

1. 発明の名称:新規なカテプシン A 阻害剤  
発明者:伊藤 孝司, 中馬 寛, 林 良雄, 飯島 希昌子  
出願人:独立行政法人 科学技術振興機構  
出願日:平成 15 年(2003 年)11 月 12 日  
出願番号:特願 2003-382713
2. 発明の名称:脳移行活性を有するポリペプチド, およびその利用  
発明者:澤田 誠, 小野 健治  
出願人:(株)ティッシュターゲティングジャパン  
出願日:平成 16 年(2004 年)10 月 12 日  
出願番号:特願 2004-298170
3. 発明の名称: $\beta$ -ヘキソサミニダーゼとその量産方法  
発明者:伊藤 孝司  
出願人:徳島大学  
出願日:平成 17 年(2005 年)12 月 21 日  
出願番号:特願 2005-367983 特開 2007-166957
4. 発明の名称: $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A(HexA) を構成する  $\alpha$ -サブユニット, 前記  $\alpha$ -サブユニットを有する HexA, 前記  $\alpha$ -サブユニットをコードする遺伝子, ベクターおよび形質転換細胞  
発明者:伊藤 孝司, 櫻庭 均, 相川 聖一, 相川 史子  
出願人:国立大学法人徳島大学, 財団法人 東京都医学研究機構, セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社  
出願日:平成 19 年(2007 年)2 月 24 日  
出願番号:特願 2007-044790 特開 2008-206428

#### ②海外出願 (2件)

1. 発明の名称:脳移行性骨髄前駆細胞  
発明者:澤田 誠  
出願人:(株)ティッシュターゲティングジャパン  
出願日:2004/08/06 (優先日:2003/08/08)  
出願番号:PCT/JP04/11668
2. 発明の名称:金属コロイド粒子を含有する脳神経細胞内移行用キャリア  
発明者:澤田 誠, 鈴木 弘美  
出願人:(株)ティッシュターゲティングジャパン  
出願日:2005/02/07  
出願番号:PCT/JP05/01761

### (4)受賞等

#### ①受賞

1. 受賞者名 : 辻 大輔  
賞の名称 : 第 47 回 日本生化学会 中国・四国支部例会奨励賞  
授与者(団体)名 : 日本生化学会 中国・四国支部  
受賞年月 : 2006 年 5 月 13 日
2. 受賞者名 : 松岡 和彦  
賞の名称 : 第 49 回 日本生化学会 中国・四国支部例会奨励賞  
授与者(団体)名 : 日本生化学会 中国・四国支部  
受賞年月 : 2008 年 5 月 20 日

3. 受賞者名 : 松岡 和彦  
賞の名称 : 2008 Tokushima Bioscience Retreat 若手研究者奨励賞  
授与者(団体)名 : 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部長  
受賞年月 : 2008年 9月 20日

②新聞報道

なし

③その他

なし

(5)その他特記事項

(その他の出版物)

2003

1. 櫻庭均, リソソーム病—最近の酵素補充療法の開発状況. 医学のあゆみ, 204: 460-461, 2003.
2. 櫻庭均, シアリドーシスとガラクトシアリドーシス. 小児内科増刊号 小児疾患診療のための病態生理, 2: 488-493, 2003.
3. 櫻庭均, リソソーム病. 別冊・日本臨床領域別症候群シリーズ No.39 特集:精神医学症候群II, 470-475, 2003.
4. 櫻庭均, Fabry 病へテロ接合体の臨床像とその診断. 小児科, 44: 1803-1809, 2003.
5. 櫻庭均, ファブリー病の診断と最近の酵素補充療法の進歩. SRL 宝函, 27: 127-132, 2003.

2004

1. 櫻庭均, 伊藤孝司, リソソーム性ノイラミニダーゼ(ノイラミニダーゼ-1). 日本臨床 増刊「広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査(第6版)— その数値をどう読むか —」, 62:517-520, 2004.
2. 櫻庭均, ファブリー病の酵素補充療法. *Annual Review 腎臓 2004*(伊藤克己, 遠藤 均, 御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男/編), 中外医学社(東京), 231-236, 2004.
3. 櫻庭均, ファブリー病における病理生理学, 病理生化学. *Fabry 病:基礎から臨床までの最近の知見*(衛藤義勝/編), ジャパンメディアアートパブリッシング(東京), 13-20, 2004.
4. 櫻庭均, 奥宮敏可, ファブリー病における分子生物学的病態生理. *Fabry 病:基礎から臨床までの最近の知見*(衛藤義勝/編), ジャパンメディアアートパブリッシング(東京), 21-35, 2004.
5. 澤田誠, 鈴木弘美, 良いミクログリア, 悪いミクログリア, *Dementia Japan* 18:252-262, 2004.
6. 永津俊治, 澤田 誠, サイトカインおよび神経栄養因子-パーキンソン病における変化, 脳の科学 26(増刊):121-125, 2004.
7. 小野健治, 澤田誠, マイクログリアの起源および疾患との関連, *Molecular Medicine* 41(8):965-970, 2004.
8. 鈴木弘美, 澤田誠, 脳機能障害とミクログリアのかかわりおよび細胞を用いた標的化治療・診断(バイオイメージングが切り開くあらたな診断・治療評価技術), 医学のあゆみ 210(3):187-190, 2004.

2005

1. 伊藤孝司, リソソーム病の酵素補充療法に関する最近の進歩. *未来を拓く糖鎖科学*, 271-272, 2005.
2. 櫻庭均, 進む難病対策. 酵素補充療法. *NHK きょうの健康*. 5月号, 108-111, 2005.
3. 澤田誠, 血液脳関門とDDS. *医学のあゆみ*. 214(9), 2005.8

2006

1. 伊藤孝司, 辻 大輔, 櫻庭均, Sandhoff 病モデルマウスから樹立されたオリゴデンドロサイトおよびシュワン細胞株における蓄積複合糖質の解析. *生体の科学*, 57: 224-228, 2006.

2. 櫻庭均,  $\alpha$ -galactosidase A. 腎と透析, 61: 288-290, 2006.
3. 櫻庭均, Fabry 病. 今日の小児治療指針, 第14版(大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎/編), 医学書院 (東京), 171-172, 2006.
4. 地神芳文, 千葉靖典, 酵母を利用した糖タンパク質糖鎖の改変, 生化学, 78, 5-15, 2006.

2007

1. Itoh, K., Neurochemical aspects of Sandhoff disease, In *Neurochemistry of metabolic diseases-lysosomal storage diseases, phenylketonuria and Canavan disease*, Editor: Sankar Surendran, 55-82, 2007.
2. Chiba, Y. and Jigami, Y., Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 670-676, 2007.
3. Sawada, M., Ono, K. and Suzuki, H., Targeting and imaging of brain-specific cell migration, *Nippon Rinsho*, 65, 2, 213-8, 2007.
4. 辻大輔, 伊藤孝司, リソソーム病の分子病理と治療ターゲット, 生化学 第79巻 第7号 678-682, 2007.
5. 伊藤孝司, 細胞の構造とオルガネラ「リソソーム蓄積症」, 生物薬科学実験講座, 2007.
6. 櫻庭均, ファブリー病の構造的基盤とファブリー病モデルマウスに対する酵母産生組換えヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの有効性, *FD NEWS*, メディアート, 2007.
7. 澤田誠, 老年期痴呆の治療ターゲットとしてのミクログリア, 老年期痴呆研究会誌 14, 59, 2007.

2008

1. Itoh, K., Recent advances in enzyme replacement therapy for lysosomal diseases, In *Experimental Glycoscience*, Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Yukishige Ito, Hisashi Narimatsu, Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase (Eds.) Springer (New York) pp.219-221, 2008.
2. 櫻庭均, 先天代謝異常症における治療の進歩ーリソソーム病を中心として. *先天代謝異常学会雑誌*, 24: 17-19, 2008
3. 櫻庭均, Fabry 病. *小児科学*, 第3版(大関武彦, 近藤直実/総編集), 医学書院(東京), 501-503, 2008.
4. 櫻庭均, 異染性白質ジストロフィー. *小児科学*, 第3版(大関武彦, 近藤直実/総編集), 医学書院(東京), 503-504, 2008.
5. Chiba, Y. and Jigami, Y., Recent advances in the production of mammalian-type sugar chains in yeast, pp. 191-194, In *Glycoscience Lab Manual* (Taniguchi N. et al. eds.), Springer (New York), 2008.
6. 千葉靖典, 糖鎖合成技術と酵母による合成, 産総研新書籍シリーズ「きちんとわかる糖鎖工学」産総研(つくば) in press, 2008.
7. Chiba, Y. and Akeboshi, H., Glycan Engineering and Production of 'Humanized' Glycoprotein in Yeast Cells. (Review) *Biol. Pharm. Bull.* in press, 2008.

(マスコミ発表)

1. 櫻庭均, 酵母生産ファブリー病治療用酵素がモデル・マウスで有効. *日経バイオテック* 2004. 3. 15, P3, 2004, <http://biotech.Nikkeibp.co.jp>
2. 櫻庭均, ファブリー病治療薬 アガルシダーゼベータ, ラジオたんぱ SW 2004.4.5 放送, BS 2004.4.26 放送

## §7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H15.11.26～ H15.11.27	JST・CRESTプロジェクト「糖鎖機	徳島大学薬学部 多目的室(徳島)	32名	各研究グループの研究内容の紹介と

	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」チーム Kick-offミーティング			今後の共同研究打ち合わせ。
H16.4.6～ H16.4.7	JST・CRESTプロジェクト「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 <sup>nd</sup> チームミーティング	JST東京展示館 8階会議室 (財)東京都臨床医学総合研究所 1階会議室(東京)	18名	各研究グループの研究進捗状況報告・討論および研究打ち合わせ。
H16.12.2～ H16.12.3	JST・CRESTプロジェクト「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」3 <sup>rd</sup> チームミーティング	JST東京展示館 8階会議室 (財)東京都臨床医学総合研究所 臨床遺伝学研部門(東京)	17名	各研究グループの研究進捗状況報告・討論および研究打ち合わせ。
H17.4.15	JST・CRESTプロジェクト「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」谷口研究総括サイトビジット及び4 <sup>th</sup> チームミーティング	JST東京展示館 7階会議室(東京)	15名	CREST 研究報告と今後の研究計画についての会議。
H17.7.7～ H17.7.8	第6回長井長義記念シンポジウム	徳島大学長井記念ホール(徳島)	360名	創薬研究における薬剤の分子標的(ターゲット)をいかに選択するか」をメインテーマとして、薬理学分野、有機合成化学分野、糖鎖創薬分野の各シンポジストが最先端のアプローチについて講演し、ディスカッションを行った。特に糖鎖創薬関連では、JST・CRESTの「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」研究領域の関係者を中心としたシンポジウムを開催した。また関連分野の一般ポスター発表により学生を含めた若い世代を中心に情報交換を行った。
H17.11.8	JST・CRESTプロジェクト「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」5 <sup>th</sup> チームミーティング	東京上野 JST 7階会議室(東京)	17名	CREST 研究報告と今後の研究計画についての会議。
H18.5.30	JST・CREST プロ	徳島大学薬学部	14名	CREST 研究報告と

	プロジェクト「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」6 <sup>th</sup> チームミーティング	多目的室(徳島)		今後の研究計画についての会議。
H18.12.13	JST・CREST プロジェクト「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」7 <sup>th</sup> チームミーティング	JST東京展示館 7階会議室(東京)	12名	今後1年半の研究計画と成果の見通し今後の役割分担および連携の方法を決定。
H19.5.7	JST・CREST プロジェクト「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」谷口研究総括サイトビジット及び8 <sup>th</sup> チームミーティング	徳島大学薬学部 多目的室(徳島)	18名	研究総括サイトビジット報告会とチームミーティング(これまで得られた成果を基にした今後一年間の研究の見通しと相互協力が可能な共同研究項目等についてのディスカッション)。
H19.10.16	JST・CREST プロジェクト「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」9 <sup>th</sup> チームミーティング	明治薬科大学 第3会議室 本部棟3階(東京)	10名	チーム内ミーティング(これまで得られた成果を基にした今後一年間の研究の見通しと相互協力が可能な共同研究項目等についてのディスカッション)。
H20.2.14～ H20.2.15	酵母の糖鎖生物学とその応用	産業技術総合研究所(つくば)	137名	酵母の糖鎖に関する基礎研究と応用研究に関するシンポジウム。
H20.3.27	日本薬学会 第128年会 一般シンポジウム「遺伝子組換え技術を利用したリソソーム病治療の最前線」	パシフィコ横浜会議センター5F(横浜)	80名	先端治療法や組換え酵素製剤の開発に携わるシンポジストが研究の現状と問題点を紹介し、次世代型リソソーム病治療法の開発と実用化に向けた展開について討論した。

## §8 結び

本研究プロジェクトでは、近年、哺乳類細胞株を用いた組換えヒトリソソーム酵素遺伝子の大量発現と酵素の糖鎖構造の修飾技術に基き、マンノース6リン酸レセプター(M6PR)等の糖鎖レセプターを介した細胞内取り込みを利用して実用化されている酵素補充療法の問題点を改善し、さらにその応用を拡大することを目的として、

- 1)哺乳類培養細胞の遺伝子発現系に代替できる新しい組換えヒトリソソーム酵素遺伝子の大量発現系の確立
- 2)血液脳関門の問題を解決し、組換えヒトリソソーム酵素を末梢血管から投与して、低侵襲的に脳実質内の障害部位まで到達させる技術に基く、中枢神経障害を伴うリソソーム病の新規の

### 酵素補充療法の開発

3) 酵素欠損症の患者に一定量の組換え酵素を定期的に継続投与する際に生じる、中和抗体の出現等の副作用の問題を克服するための組換え酵素の高機能化

を目指し、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A (HexA) の遺伝的欠損が原因で、GM2 ガングリオシドの脳内過剰蓄積を伴って発症する Tay-Sachs 病と Sandhoff 病に対する治療法を開発すべく研究を推進した。特に Tay-Sachs 病はユダヤ系人種では3千人に1人と発生率が極めて高く、もしその有効な根本治療法が確立されれば国際的にも意義は大きいと考えられる。

本プロジェクトでは、具体的には、Sandhoff 病のモデルマウスを対象に、メタノール資化酵母変異株を用いたヒト型糖鎖含有組換え HexA の大量発現・精製、結晶構造情報に基づく高機能化 HexA のデザイン、モデルマウス由来神経系構成細胞の樹立と酵素補充効果の解析、さらに末梢血液及び脳室内から脳実質内への酵素補充技術の開発と評価を行うプロジェクトを推進した。

本チームの主たる研究成果は、

1) まず実用化に最も近い現行の哺乳類 CHO 細胞株を用い、3種存在するヒト Hex アイソザイムのうち、両疾患の治療を可能にする組換えヒト HexA の恒常発現株を徳島大グループが樹立した。またこの CHO 細胞株が産生・分泌する組換え HexA は、欠損症患者由来培養細胞や疾患モデルマウスに対して有効性を示したことから、従来他のリソソーム病治療薬と同じ水準の薬効を示すことが期待される。

2) 安全・安価に CHO 由来の組換え酵素と同等の薬効をもつヒトリソソーム酵素製剤を大量生産できる代替宿主遺伝子発現系を実現するために、(独)産総研・糖鎖医工学研究センターの地神・千葉らは、メタノール資化酵母変異株 (*Ogataea minuta*: *Om*) に高マンノース型糖鎖のリン酸化を促進する *MNN4* 遺伝子をさらに導入した *Om4* 株を新規に樹立し、組換えヒト HexA に付加される高マンノース型糖鎖のリン酸基含量を増大させることに成功した。

また *Om4* 株由来の末端 M6P 露出型 HexA は、標的細胞表面のカチオン非依存性 M6P レセプター (CI-M6PR) との結合を介して患者由来細胞内に取り込まれ、欠損酵素活性の回復と蓄積基質の減少等の補充効果を示した。

さらに常用量 (0.5 mg/kg 体重) を欠損症モデルマウスの脳室内に投与すると、顕著な脳実質内の酵素活性回復、蓄積 GM2 を含む基質の減少及び中枢神経症状の改善効果が示された。

糖鎖工学的見地からは、メタノール資化性酵母における糖鎖の生合成を制御することにより、リソソーム病の酵素補充療法に有用な、リソソーム酵素に付加される M6P 含有 N 型糖鎖の高機能化が達成されたことを示している。また哺乳類培養細胞系で産生される組換え酵素よりも高機能性の糖鎖をもつ糖タンパク質製剤を大量安価に生産できることを示唆しており、近い将来、*Om4* 株由来組換えヒトリソソーム酵素が当該リソソーム病の治療薬として実用化されることが大いに期待される。

3) 明治薬大の櫻庭とセレスター(株)の土居らは、ヒト HexA の X 線結晶構造やサブユニット間の相同性などの情報を基に *in silico* で  $\alpha\beta$  鎖間の相互作用の調節または N 型糖鎖の追加に関わるアミノ酸置換を予測し高機能化 HexA 分子をデザインした。徳島大の伊藤らはアミノ置換型異遺伝子の CHO 発現系で酵素タンパク質としての高機能化を検証し、HexA アイソザイムの選択的な発現、*in vitro* での安定性と標的細胞への補充効率の増大を実現した。本プロジェクトにおいて、構造情報に基づく *in silico* での酵素分子の高機能化予測を酵素補充療法や酵素増強療法等の開発に結びつける研究基盤が構築できたと考えられる。

4) 本プロジェクトでの大きな目標の一つであった、末梢血流中から血液脳関門を通過して脳実質内へと組換え酵素を送達させる技術開発については、名古屋大の澤田らが開発した脳標的化ペプチドまたは細胞膜透過性ペプチド (CPP) の一種である R8 ペプチドとのコンジュゲート及びフージョン技術を試みたが、残念ながらその有効性を示すことができなかった。

しかしながら、M6P 含量が多い *Om4* 株由来のヒト HexA を欠損症モデルマウスの脳室内に投与すると、M6PR を介して非常に効率よく脳構成細胞に取り込まれ、脳実質内の酵素活性回復、蓄積



基質の減少及び中枢神経症状の改善させることに成功した。

現在、薬物の脳室内投与や髄腔内投与法は、水頭症や脳腫瘍の治療に臨床的に用いられている方法であるため、今後、組換えリソソーム酵素の脳室内補充療法は実用性の高い治療法に発展していく可能性が期待される。

さらにモデルタンパク質ではあるが、CPP の一種である R8 ペプチドと EGFP との融合タンパク質を脳室内に投与すると、R8 依存に脳実質内の神経系細胞に取り込まれることを明らかにした。今後、リソソーム酵素とのコンジュゲートを脳室内に投与した場合に治療効果がさらに改善されるかを検討していく予定である。

本研究プロジェクトのテーマは、組換え医薬品の開発という比較的 Output の明確なものであり、研究材料としての組換え酵素、ペプチド性タグ、解析用プローブ、構造情報、疾患モデル培養細胞株や疾患モデルマウス等のチーム間での授受や情報の共有等に関して、目標に向かって相互に比較的バランスのとれた連携研究が実施できたのではないかとチーム代表者として考えている。

中間評価までは、組換え酵素の供給や疾患モデルマウスを用いた生物効果の評価が進まず、目標達成度が低かった。また一部の研究グループには思うように機能解析を進めてもらうことができなかった。しかし、その後は当初計画した目標の 2/3 は達成できたのではないかと考えられる。

今後は、本 CREST プロジェクトで得られた研究成果をもとに、中枢神経障害を伴うリソソーム病を治療対象として、組換えリソソーム酵素の脳内補充ルートの探索と技術開発をさらに進め、糖鎖の機能を利用した組換え医薬品の実用化につなげられる研究を推進していきたい。