

酵素補充によるガラクトシアリドーシ  
ス治療を目指したCHO由来組換えヒト  
CTSA前駆体の補充効果解析

2022

堀井 雄登

## 目次

本論文で用いた省略形	3
第1章 序論	5
第2章 実験材料と実験方法	10
第3章 結果	18
3-1: CTSA-6His 発現 CHO 株(CTSA-6His)培養上清からの CTSA-6His 精製	18
3-2: M6P 型糖鎖の検出	19
3-3: T1 細胞内での活性上昇	19
3-4: CTSA および NEU1 活性の経時変化と Leupeptin 添加による 活性半減期の延長	20
3-5: CTSA-6His 補充による細胞内蓄積 NEU1 基質の減少	21
3-6: GS マウスへの脳室内投与による活性上昇	23
3-7: 脳室内投与による蓄積 NEU1 基質の分解	25
3-8: 脳室内投与による脳内炎症反応の抑制	25
3-9: 静脈内複数回投与による末梢組織での蓄積基質減少	25
3-10: 静脈内複数回投与による末梢組織での炎症反応抑制	27
第4章 考察	29
参考文献	31
謝辞	36



## 本論文で用いた省略形

4-MU	4-Methylumbelliferone, 4-メチルウンベリフェロン
4-MUG	4-Methylumbelliferyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, 4-MU-N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニド
4-MU-NANA	4-Methylumbelliferyl N-acetyl neuraminic acids, 4-MU-N-アセチルノイラミン酸
4-Mu $\beta$ Gal	4-Methylumbelliferyl $\beta$ -D-galactoside, 4-MU- $\beta$ -D-ガラクトシド
CBB	Coomassie Brilliant Blue, クマシーブリリアントブルー
CHO	Chinese Hamster Ovary, チャイニーズハムスター卵巣
CI-M6PR	Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor, カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体
CMV	Cytomegalovirus, サイトメガロウイルス
CTSA	Cathepsin A, カテプシン A
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, 酵素免疫測定法
ERT	Enzyme Replacement Therapy, 酵素補充療法
FBS	Fetal Bovine Serum, ウシ胎児血清
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, グリア細胞繊維性酸性タンパク質
GLB1	$\beta$ -Galactosidase 1, $\beta$ -ガラクトシダーゼ 1
GS	Galactosialidosis, ガラクトシアリドーシス
HRP	Horseradish Peroxidase, 西洋わさびペルオキシダーゼ
Iba1	Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1, イオン化カルシウム結合アダプター分子 1
IRES	Internal Ribosome Entry Site, リボソーム内部結合配列
IVS	Intervening sequence, 介在配列
LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1, リソソーム関連膜タンパク質 1
M6P	Mannose-6-Phosphate, マンノース 6 リン酸
MAM	Maackia amurensis, [学名]イヌエンジュ
MCS	Multi-Cloning Site, マルチクローニングサイト
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$ , マクロファージ炎症性タンパク質 1 $\alpha$
MR	Mannose Receptor, マンノース受容体

NEU1	Neuraminidase 1, ノイラミニダーゼ 1
NeuN	Neuronal Nuclei, 神経細胞核
NP-40	Nonidet P-40, ノニデット P-40
One-way ANOVA	One-way Analysis of Variance, 1 元配置分散分析
PBS	Phosphate Buffered Saline, リン酸緩衝生理食塩水
PBST	0.1%(v/v) Tween 20/PBS
PCR	Polymerase Chain Reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
PFA	Paraformaldehyde, パラホルムアルデヒド
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS ポリアクリルアミド電気泳動
SPF	Specific Pathogen Free, 特定病原体不在
TBS	Tris Buffered Saline, トリス緩衝生理食塩水
TBST	0.1%(v/v) Tween 20/TBS
WT	Wild-Type, 野生型

# 第1章 序論

## リソソーム病

リソソームは、細胞内外の生体分子の分解代謝に関わるオルガネラである。リソソーム内は、pH5 前後に保たれており、酸性条件下で働く加水分解酵素（リソソーム酵素）が数多く存在している。これらの関連因子の遺伝子に変異が生じると、遺伝子産物である酵素タンパク質の発現低下や活性が欠損して、標的基質が分解されずリソソーム内に過剰蓄積する。この結果、進行性に細胞や臓器の機能障害が起こり、全身性の臨床症状を呈するリソソーム病が発症する [1]。その発症頻度は数万～数十万人に1人と低く、希少疾患の一つである。しかし、リソソーム病は約 50 種類存在するため、疾患全体の患者数は少なくなく、小児科や内科などの幅広い臨床領域で診断される重篤な疾患群である。また、リソソーム病は厚生労働省の特定疾患「難病」に指定されており、我が国においても重要な疾患群の一つである。

## Lysosomal protective protein/Cathepsin A

カテプシン A (Cathepsin A : CTSA) 遺伝子は、第 20 番染色体 (20q13.12) 上に位置しており、15 個の Exon から構成されている。CTSA は 480 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、小胞体内で約 54kDa の前駆体として合成された後、ゴルジ体で糖鎖修飾を受け、エンドソームからリソソームへ小胞輸送される間に、約 32kDa の重鎖と約 20kDa の軽鎖がジスルフィド結合で繋がった成熟体に変化し、CTSA は、成熟体となることで酸性カルボキシペプチダーゼ (CathA) 及び中性デアミダーゼなどの触媒活性を示す (Fig.1-1) [2]。CTSA は同時に、リソソーム内で糖鎖加水分解酵素の Neuraminidase 1 (NEU1) (EC 3.2.1.18) 及び  $\beta$ -Galactosidase (GLB1) (EC 3.2.1.23) と複合体を形成し、NEU1 の活性化と GLB1 をプロテアーゼによる分解から保護する作用を示す (Fig. 1-2) [2,3,4]。Galactosialidosis (GS) (MIM #256540) はこの CTSA 遺伝子の劣性変異が原因で、CathA 欠損及び二次的な NEU1 と GLB1 の活性低下が同時に起こり、NEU1 欠損に起因する末端シアル酸含有糖鎖の過剰蓄積によって中枢神経症状などを呈するリソソーム蓄積症である。[5,6]。GS では、細胞及び組織障害が引き起こされて、心不全、肝脾腫、腎障害そして中枢神経障害等の臨床症状が現れる [7-9]。本疾患の発生頻度は、出生児 10 万人に 1 人程度と推定されているが、日本人症例報告が世界の 4 割程度を占め、日本人に多い遺伝病の一つである [10,11]。また変異の種類により発症年齢や重症度が異なり、これらに従って以下の 3 つの臨床型に分類される (Table. 1-1) [10,11]。

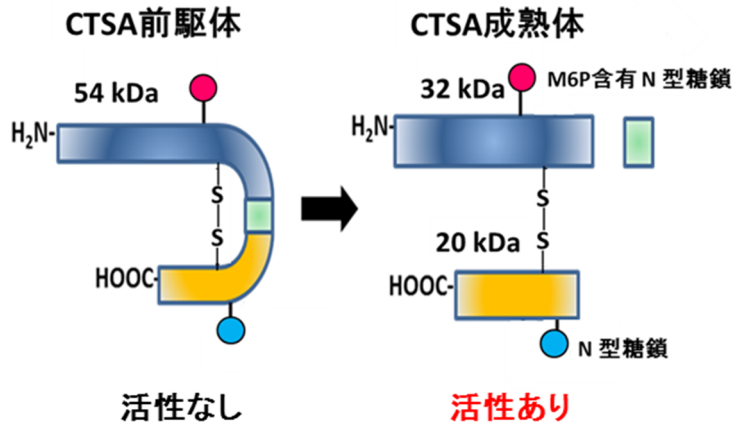


Fig. 1-1 CTSA の前駆体および成熟体の形態

Excision peptide(緑)が除去されることで、成熟体重鎖(青)と成熟体軽鎖(黄)に分離する。

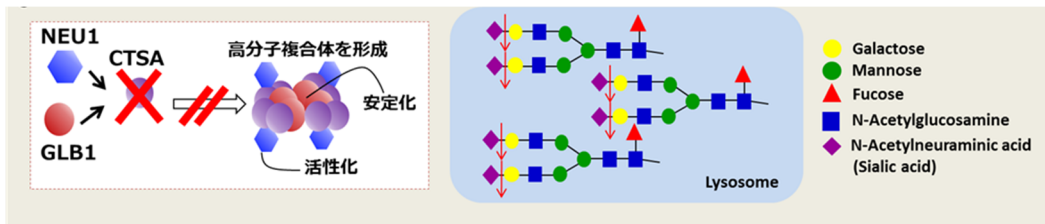


Fig. 1-2 CTSA の多酵素複合体モデル及びNEU1 による糖鎖切断部位

CTSA, NEU1, GLB1 の多酵素複合体モデル及びNEU1 の切断部位 (赤矢印)。

臨床型	Type I	Type II A	Type II B	Type III
	早期乳児型	若年型	成人型	晩期乳児型
発症年齢	新生児期	3-14歳	15-40歳	3カ月
初発症状	胎児水腫 浮腫 心不全	視力障害 聴覚障害 皮膚障害	中枢神経症状	肝脾腫
中枢症状	+++	++	+	-or+

Table. 1-1 ガラクトシアリドーシスにおける臨床型の分類

根本的治療法は 2022 年 6 月現在存在せず、後述の酵素補充療法が有効であると考えられているが、実用化には至っていない。

## 若年/成人型 (II型) GS

若年/成人型 (II型) GS は、その症例の殆どが日本人であり、90%以上の患者で少なくとも一方の対立遺伝子において *CTSA* Exon7 と Intron7 境界の 5'スプライドナーサイトに 1次病因である Intervening sequence (IVS) 7+3 a>g 変異が同定されている [10,11]。本変異により、Exon7 のコード領域がスキップするスプライシング異常が誘発され、正常な mRNA が著しく減少することで、酵素活性が正常の 10%以下まで低下することが分かっている (Fig. 1-2)。しかしながら、若年/成人型 GS では僅かに正常な mRNA が発現することで、弱いながらも酵素活性を示すため、重症化に至らないと考えられている。患者の大半は 5 歳以降あるいは 10 歳以降に発症し、臨床症状として視力障害、小脳性運動失調、ミオクローヌス、錐体外路症状などの中枢神経症状をはじめ、顔貌異常、骨・関節変形、眼底のチェリーレッドスポット、心障害などの末梢の症状を伴う [7]。現在のところ、スプライシング異常の誘導機構と臨床型との相関については不明な点が多く、詳細は明らかにされていない。

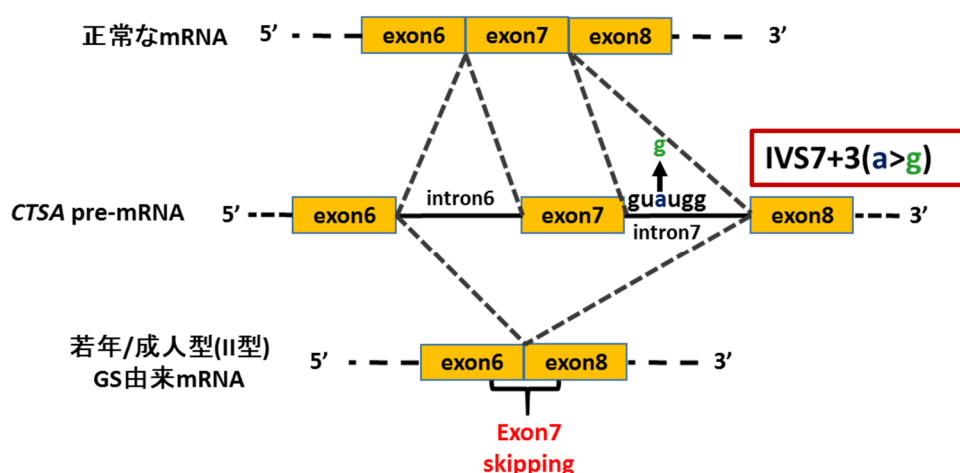
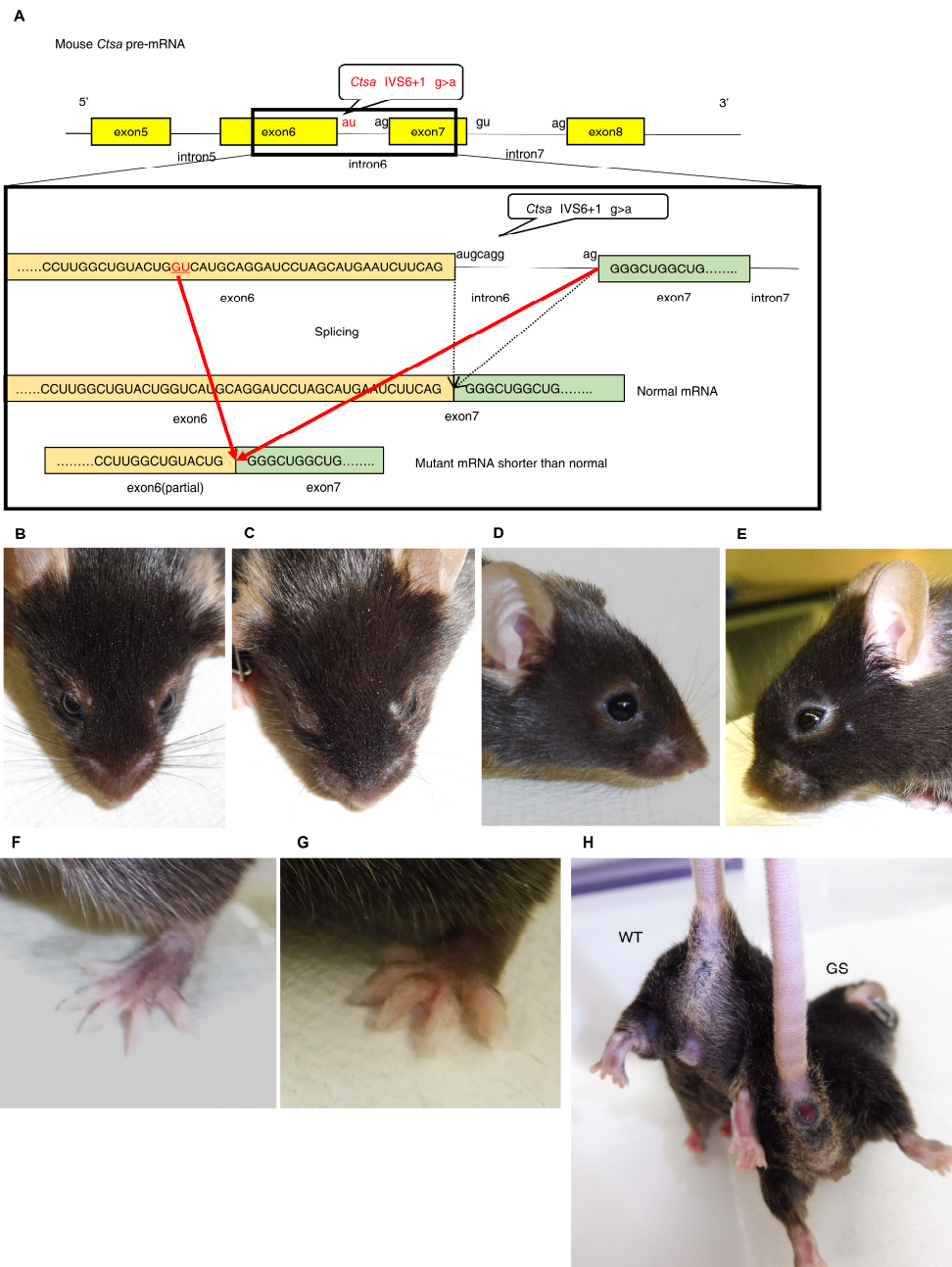


Fig. 1-2 スプライシング異常による GS 発症機構

## スプライシング異常 *Ctsa* 欠損マウス

これまでの GS の研究および治療法開発では、*CTSA* を完全にノックアウトした I 型 GS 患者様の病態を示すマウスが用いられてきた [12-16]。本研究室においては、II 型 GS の日本人症例をはじめ、スプライシング異常を惹起する遺伝子変異が検出されていることから、人為的に *Ctsa* mRNA のスプライシング異常を起こす *IVS6+1 g>a* 変異導入マウスを作製した (Fig.1-3 A)。この *Ctsa* 欠損マウスでは、スプライシング異常による部分スキップ型 mRNA の産生、*Ctsa* と *Neu1* の同時活性低下を含む酵素活性の変化がみられ、粗な顔貌 (Fig.1-3 C,E)、手足の浮腫 (Fig.1-3 G)、脱肛 (Fig.1-3 H)、しゃっくり様のミオクローヌス発作などの GS 症状を示すことが明らかにされ、これまでの知見から GS モデルとしての有用性が確かめられている。



**Fig. 1-3. *Ctsa* mutant マウス (GS マウス) の作製と表現型**

(A)Exon6 部分 Skipping の模式図 (B-H)表現型

### 酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy: ERT)

酵素補充療法 (ERT)とは、酵素欠損患者に対して、精製・製剤化された組換え酵素を点

滴静注によって補充する治療法である。リソソーム酵素欠損症(ライソゾーム病)では、治療用リソソーム酵素に付加されたマンノース-6-リン酸 (M6P)型糖鎖またはハイマンノース型糖鎖が、標的組織細胞表面に存在するカチオン非依存性 M6P 受容体 (CI-M6PR)またはマンノース受容体(MR)により認識される。その後、エンドサイトーシスを介してリソソームへ輸送され、蓄積基質の分解を促進することで治療効果が発揮する (Fig. 1-4)。現在、末梢症状を呈するリソソーム病であるゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症 (I 型、II 型、IVA 型、VI 型)および酸性リパーゼ欠損症に対する酵素製剤が国内外で承認されている [17-23]。一方で中枢神経症状を伴うリソソーム病に対しては、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にほとんど到達しないため、ERT の有効性は認められていない。しかし近年、中枢神経系に酵素を送り込む方法として、酵素の脳室内投与や髄腔内投与といった外科的な手法が注目されており、近年では中枢神経症状を伴う神経セロイドリポフスチノーシス II 型に対する治療薬は米国で承認され、臨床応用されている [24]。そのため、GS に対しても、これらの手法を応用できると考えられている [25]。

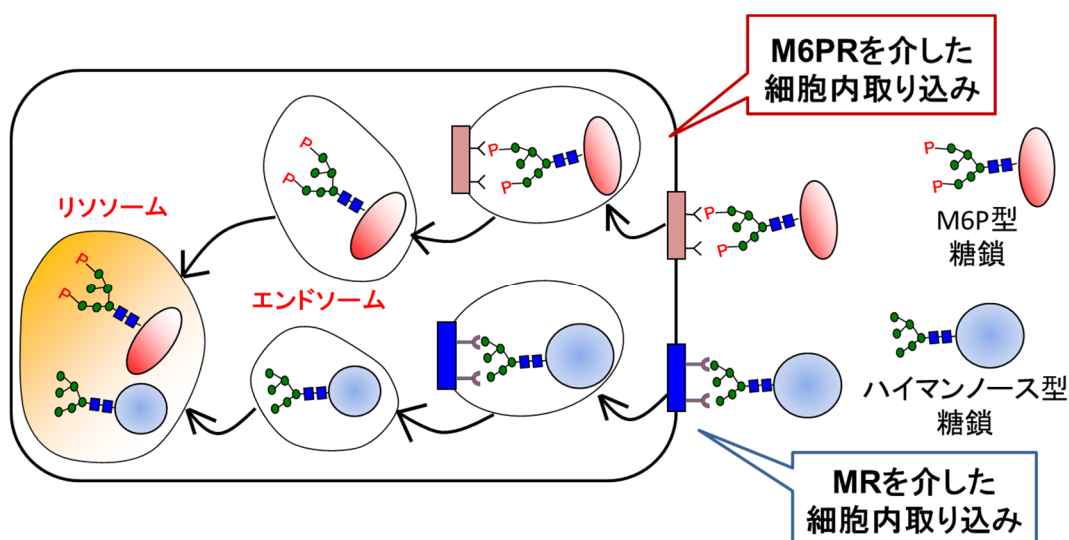


Fig. 1-4. 標的細胞へのリソソーム酵素の取り込みメカニズム

## 研究目的

以上の背景から、本研究では、GS に対する治療アプローチとして、哺乳類細胞であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に、ヒト CTSA の C 末端に 6×ヒスチジンを付加した CTSA-6His を発現させ、培養上清中の前駆体 CTSA-6His を回収・精製し、患者由来線維芽細胞および Ctsa 欠損マウスなどの GS モデルに対して酵素補充実験を行い、その治療効果を解析した。

## 第 2 章 実験材料と実験方法

### 2-1: 抗体・レクチン

Western-blotting では、ヒト CTSA を抗原とし、SIGMA-Aldrich 社に依頼・作製したウサギ抗血清を用いた。細胞免疫染色では、Operon Biotechnologies 社に依頼・作製した、抗 CTSA 抗体を発現するラットハイブリドーマの上清を希釈して用いた。

その他の抗体・レクチンについては以下の通りである。

Anti-His(5) (QIAGEN) 1 $\mu$ g/mL

Anti-FLAG M2 antibody (Sigma Aldrich, F3165)

Anti-NEU1 (ROCKLAND)

Anti-LAMP1 (Abcam, ab24170)

Anti-Sia $\alpha$ 2-3 mAb (HYB4) (Wako, 011-25171)

Anti-Neu1 mAb (F-8) (SANTA CRUZ, sc-166824)

Anti-Iba1 antibody (1022-5) (SANTA CRUZ, sc-32725)

F4/80 (D2S9R) XP $\text{\textcircled{R}}$  rabbit mAb (Cell signaling technology, 70076S)

Anti-NeuN antibody raised in rabbits (Merck Millipore, ABN78)

Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) antibody produced in rabbit IgG fraction of antiserum, buffered aqueous solution (SIGMA-Aldrich, G9269)

Anti-GFAP mAb produced in mouse (SIGMA-Aldrich, G3893)

Anti-mCD68 mAb (FA-11), eBioscience<sup>TM</sup> (Thermo fisher scientific, 14-0681-82)

Maackia amurensis [MAM], Biotin (J-ケミカル, J-210)

### 2-2: 細胞株および細胞培養

本研究では、研究対象としてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞、及び若年/成人型 GS 患者由来皮膚線維芽細胞株 ASVGS-1 (T1)[10]を使用した。これらの細胞は 10 % (v/v) FBS (Fetal bovine serum, Biosera)、100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)および 70  $\mu$ g/ml Penicillin G (Sigma-Aldrich) 含有 Ham's F-10 培地 (SIGMA) 中 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%条件下で培養した。

### 2-3: CTSA-6His 発現ベクターの構築

#### 2-3-1 CTSA-6His 遺伝子の作製

pcDNA3.1(+)-C-6His ベクター (Invitrogen) に、CTSA 遺伝子を挿入して pcDNA3.1(+)-C-6His CTSA ベクターを作製した。まず、pCXN2 CTSA ベクターを鋳型とし、CTSA 遺伝子の 5'末端から 3'末端 (終止コドンを除く) を増幅するプライマー(#1,2)を用いた PCR 法によって、5'末端に Kpn I サイト、3'末端に Apa I サイトが付加された DNA フラグメント



を得た。この DNA フラグメントと pcDNA3.1(+) C-6His ベクターを Kpn I (TOYOBO) と Apa I (TOYOBO) で処理した後、pcDNA3.1(+) C-6His ベクターと DNA Ligation Mix (Takara) を用いて連結し、pcDNA3.1(+) C-6His CTSA ベクターを作製した。

### 2-3-2 ハイグロマイシン耐性ベクター/CTSA-6His の作製

pcDNA3.1(+)C-6His CTSA ベクターを鋳型とし、CTSA 5'末端から 6×His より 3'側に 20 塩基までを増幅するプライマー(#3,4)を用いた PCR 法によって、5'末端に Bgl II サイト、3'末端に EcoR I サイトが付加された CTSA-6His DNA フラグメントを得た。この DNA フラグメント、および、CMV-promoter-MCS(マルチクローニングサイト)-IRES-Hygro(ハイグロマイシン耐性遺伝子)を含むベクターを Bgl II と EcoR I で処理した後、DNA Ligation Mix (Takara) を用いて連結し、CMV-promoter-CTSA-6His-IRES-Hygro ベクターを作製した。

得られたプラスミドの配列は、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター 先端医療研究部門でシーケンシングを行い、塩基配列を確認した。

プライマー

- #1 : 5'-TTTTGGTACCCACCATGATCCGAGCCGCGCC -3' (下線部: Kpn I 切断配列)
- #2 : 5'-TTTTGGGCCCCGTATGGCTGCTTGTTTCAG -3' (下線部: Apa I 切断配列)
- #3 : 5'-TTTTAGATCTCACCATGATCCGAGCCGCGCC -3' (下線部: Bgl II 認識配列)
- #4 : 5'-AAAAGAATTCCTGATCAGCGGGTTTATC-3' (下線部: EcoR I 認識配列)

## 2-4 : CHO 細胞での CTSA-6His 発現

発現量を上げるため、2 種の異なるベクターを用いた遺伝子導入を行った。

### 2-4-1 遺伝子導入(1回目)

Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用い、プロトコルに従って遺伝子導入を行った。セルカルチャーディッシュ 35×10 mm (FALCON) に CHO 細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells で播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%条件下で培養した。その後、Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco) 250μL に、プラスミド DNA (pcDNA3.1(+) C-6His CTSA ベクター) 2.5μg、P3000 reagent 5μL、Lipofectamine 3000 reagent を 7.5 μL を混和した。室温で 15 分間静置した後、培養細胞に添加した。24 時間後、抗生物質(G418 (InvivoGen)、最終濃度 800μg/mL) を添加した培地に置換し、7 日間培養した。

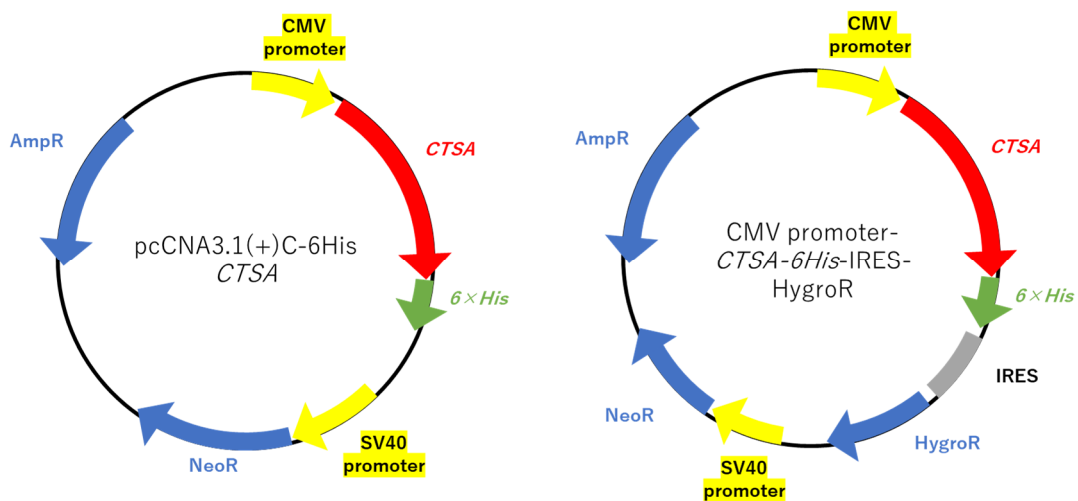


Fig. 2-1 CTSA-6His 発現ベクター模式図

(左)pcDNA3.1(+)-C-6His-CTSA

(右)ハイグロマイシン耐性ベクター/CTSA-6His  
(CMV-promoter-CTSA-6His-IRES-HygroR)

#### 2-4-2 遺伝子導入 (2 回目)

セルカルチャーディッシュ 35×10 mm に、上記 2-3-1 で遺伝子導入を行った CHO 細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells で播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% 条件下で培養した。その後、Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium 250μL に、プラスミド DNA (CMV-promoter-CTSA-6His-IRES-Hygro ベクター) 2.5μg、P3000 reagent 5μL、Lipofectamine 3000 reagent を 7.5 μL を混和した。室温で 15 分間静置した後、培養細胞に添加した。24 時間後、抗生物質(ハイグロマイシン B (Wako)、最終濃度 300μg/mL)を添加した培地に置換し、7 日間培養した。

2 回の遺伝子導入を行った細胞から CTSA-6His 高発現の株を選択した。この株を CHO/CTSA-6His と呼称する。

#### 2-5 : CHO/CTSA-6His からの培養上清獲得

夾雑タンパク質を減らし精製を簡便にするため、無血清 CHO/CTSA-6His 細胞培養上清を回収することとした。CHO/CTSA-6His を Nunc™ TripleFlask™ Treated Cell Culture Flasks (500cm<sup>2</sup> 三段フラスコ) (Thermo) に播種し、100% confluent になったところで phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、無血清培地である Ham's F-10 を 50mL/flask 添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 7 日間培養し、その上清を回収した。培養上清は、AKTA flux s タンパク質濃縮・脱塩用システム (Cytiva) を用いて 10 倍程度に濃縮を行った。

#### 2-6 : CHO/CTSA-6His 培養上清からの CTSA-6His 精製

無血清培地における発現培養上清を用いて、Ni カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。まず、培養上清に飽和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液(Sigma Aldrich)を加えて pH 7.8-8.0 とした後、Millex-GV Filter Unit 0.45 $\mu\text{m}$  (Millipore)を用いてフィルトレーションを行った。次に、ムロマック®ミニカラム S (室町ケミカル)に Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) 担体量 200 $\mu\text{L}$  を充填した。Binding Buffer (20mM リン酸 Na Buffer, pH 7.5)でカラムを平衡化した後、サンプルを添加した。Wash Buffer (20mM リン酸 Na Buffer, 20mM imidazole, pH 7.5)で洗浄後、Elution Buffer (20mM リン酸 Na Buffer, 0.5M imidazole, pH 7.5)で溶出した。溶出画分をアミコンウルトラ-4, 30kDa (Merck Millipore)に加え、4°C, 2,000 $\times$ g, 20分遠心し、PBS への Buffer 交換を行った。これを精製 CTSA-6His とした。精製度および CTSA-6His 含量は SDS-PAGE によって確認した。

## **2-7: タンパク質定量**

タンパク質濃度は DC<sup>TM</sup> protein assay (Bio-Rad)を用い、Protein standard (BSA; Sigma Aldrich)を標品として、製造者のプロトコルに従って行った。

## **2-8: SDS-PAGE**

各サンプルは、Milli-Q H<sub>2</sub>O で一定量とした後、6 $\times$ サンプルバッファー(0.3M Tris-HCl (pH6.8) /36%(v/v) Glycerol (Wako) /1.2%(v/v) 2-Mercaptoethanol (Wako) /24%(w/v) SDS (Sigma Aldrich) /0.012%(w/v) Bromophenol blue (岸田化学))を1 $\times$ となるように加え、100 °Cで3分間処理した。SDS-PAGE はゲル濃度 12.5%(w/v)のポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

CBB 染色の場合、SDS-PAGE 後のゲルを固定液 (50% MeOH、10% AcOH) に浸し室温で1h 振盪後、CBB 染色液(0.02% (w/v) CBB-R350(GE Healthcare), 0.1% (w/v)  $\text{CuSO}_4$ , 27% MeOH, 9% 酢酸)に浸し室温で一晩浸透した。ゲルを10%酢酸に置換し脱色後、ゲルの写真を撮影した。バンド強度は ImageJ を用いて算出した。

Western blotting (セミドライ)の場合、SDS-PAGE 後のゲルに対して TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad)を用いて Immobilon<sup>®</sup>-P PVDF Membrane (Merck Millipore)に 15 V、1h で転写を行った。転写した PVDF 膜を、Blocking one(ナカライテスク)と TBS(Tris buffer saline)を 1:1 で混和した Blocking one-TBS により室温で1h ブロッキング処理を行った後、各1次抗体 Blocking one-TBS で適宜希釈し、4°Cで一晩処理した。0.1%(v/v) Tween 20/TBS (TBST)で洗浄した後、HRP 標識各2次抗体を Blocking one-TBS で適宜希釈して室温で 1h 処理した。TBST で洗浄した後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus-ECL 又は Ultra (Perkin Elmer)を用いて、画像解析装置 ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ (Bio-RAD)で検出した。分子量は Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling Technology)又は Prestained SDS-PAGE Standards, broad range (Bio-Rad)より算出した。

レクチンブロットは先行文献に従って行った[26]。ブロッキング後の膜に対し、1次プローブとして Dom9-FLAG-His を 2 $\mu$ g/mL となるよう Blocking one-TBS で希釈し、室温で 1h 処理した。TBST で洗浄後、2次プローブとして Anti-FLAG M2 を Blocking one-TBS で 5,000 倍希釈して 4 $^{\circ}$ C で一晩処理した。TBST で洗浄後、3次プローブとして、HRP-anti-mouse IgG を Blocking one-TBS で 1,000 倍希釈して室温で 1h 処理した。TBST で洗浄した後、Western blotting と同様に検出した。

## **2-9 : PNGase F を用いた糖鎖切断処理**

Ni カラム精製した CTSA-6His を、ゲル CBB 染色のバンド強度から定量した濃度をもとに量を調節し、PNGase F (New England BioLabs) の製造者のプロトコルに従って、糖鎖切断処理を行った。タンパク質を 1 $\times$  Glycoprotein Denaturing Buffer (0.5% SDS, 40 mM DTT) に混和し、100 $^{\circ}$ C、10 分間で変性させた後、NP-40、GlycoBuffer および PNGase F を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応後、SDS-PAGE でバンドを確認した。

## **2-10 : 細胞への酵素補充**

Ham's F-10 に CTSA-6His を溶解し、1mL シリンジ(テルモ)と Millex-GV Filter Unit 0.22 $\mu$ m (Millipore) を用いて濾過滅菌を行った。濾過後の CTSA-6His 溶液を 35mm culture dish (FALCON) に 100% confluent になるよう播種した T1 細胞の培地中に添加した。24 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液を作製した。M6P を用いた取り込み阻害実験では、最終濃度 5mM となるよう Mannose-6-phosphate (M6P; SIGMA-Aldrich) を同様に濾過滅菌後に添加した。

経時変化を検討する際には、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、24 時間培養後、上清を除去し、PBS で洗浄を行った後、10% (v/v) FBS を含む Ham's F-10 培地に置換し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で 0-6 日培養した。プロテアーゼ阻害剤存在下での経時変化を観察する際には、置換する培地に Leupeptin (ペプチド研究所) を 10 $\mu$ M となるよう添加して培養した。回収した細胞は 5000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心後、上清を除去してペレットの状態での -30 $^{\circ}$ C 保存した。

## **2-11 : 細胞抽出液の作製**

細胞をセルスクレーパー (住友科学) で剥がし、1.5mL tube (SSIbio) に回収。5000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心後、上清を除去した。プロテアーゼ阻害剤 1 $\mu$ M Pepstatin A, 1mM EDTA を含む抽出 Buffer (50mM NaOAc Buffer, 150mM NaCl, 1%(v/v) NP-40) を 100 $\mu$ L 入れ、ピペティングにより細胞を破碎し、抽出を行った。

## **2-12 : 抽出液の酵素活性測定**

NEU1 は 4-Methylumbelliferyl N-acetyl neuraminic acids (4-MU-NANA; Biosynth Carbosynth)、 $\beta$  Hex は 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (4-MUG;

SIGMA-Aldrich)、Glb1 は 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactoside (4-Mu  $\beta$  Gal; SIGMA-Aldrich)を基質として用い、基質から解離した 4-MU の蛍光強度から活性値を算出した。pH4.5、37°Cでインキュベーションし、0.2M Glycine-NaOH (pH10.7)で反応を停止させ、励起波長：355nm 蛍光波長：460nm で蛍光強度を測定した。CTSA の酵素活性は、3mM Z-Phe-Leu を基質に用い pH5.6、室温(25°C)で反応させて L-leucine を遊離させた後、煮沸により反応を停止させた。二次反応として、L-leucine の量依存的に L-Amino acid oxidase と Peroxidase で o-Dianisidine を酸化・発色させ、6N HCl で二次反応を停止させた。OD540nm で吸光度を測定し、遊離 L-leucine 量から酵素活性値を算出した。

### 2-13: 間接蛍光抗体法による細胞の免疫染色

T1 細胞を  $5.0 \times 10^3$  cells/well となるよう 8-well chamber slide (Thermo)に播種、37°C、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。上記 2-10 のように酵素補充を行い、5% (v/v) FBS を含む Ham's F-10 培地を加えて 37°C、5%CO<sub>2</sub>で 2 日間または 7 日間培養した。培地を除き、PBS で洗浄後、4%(w/v) Paraformaldehyde (PFA; Wako)/PBS 200  $\mu$ L/well を加え、4°Cで一晩固定した。PFA を除去し、PBS で洗浄後、5%(v/v) Goat serum (Cedarlane Labs), 1%(w/v) BSA/PBS を用い、室温、1 時間ブロッキングした。一次抗体溶液を加え、4°C、一晩反応させた。0.1%(v/v) Tween 20/PBS (PBST)で洗浄後、二次抗体溶液を加え、室温で遮光し、1 時間反応させた。また同時に Hoechst33258 (Sigma Aldrich)を 5  $\mu$ g/mL で処理し、核を染色した。PBST で洗浄後、50% (v/v) Glycerol/PBS で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM-700 (Carl Zeiss)を用いて観察した。Alexa fluor 555 : Ex. 555 nm, Em. 585 nm、Alexa fluor 488 : Ex. 488 nm, Em. 518 nm、Hoechst33258 : Ex. 350nm, Em. 461nm。画像解析は ZEN2012 program (Zeiss)を用いて行った。

### 2-14: スプライシング異常誘導型コンディショナルノックインマウス

本研究で使用したスプライシング異常誘導型コンディショナルノックインマウスは、C57BL/6 の *Ctsa* 遺伝子に IVS6+1 g>a 変異を導入することで作製した。当マウスの作製は、ユニテック株式会社に委託して行い、その子孫を Specific pathogen-free (SPF) 環境下で飼育した。IVS6+1 g>a 変異遺伝子をホモで持つマウスを GS マウスと呼称する。

尚、マウスを用いた実験は徳島大学動物実験委員会から承認を受け、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター 動物資源研究部門の施設において、徳島大学動物実験指針に則って行った。

### 2-15: マウスゲノムの抽出および遺伝子型の判定

生後 3-5 週のマウスの尻尾の先端 0.5-1cm を切断し、200  $\mu$  L の溶解 Buffer (50mM Tris-HCl pH8.0、20mM EDTA、2% SDS)を浸漬し、Proteinase K (Merck) を 5 mg/ml となるように加え、55°Cで一晩放置した。4M NaCl を 1.3M になるように加えて、13,200 $\times$ g、4°C、

10 分間遠心を行い、上清を回収した。2-プロパノールを等量加えて、 $18,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心し、上清除去した。超純水に溶解させ、DNA サンプルとした。この DNA サンプルを用い、Taq DNA polymerase (Promega)のプロトコルに従って PCR 反応を行い、intron 3 から 4 の部位を増幅することで、intron 4 内 loxP 配列の有無に伴う塩基長の違いに基づいて遺伝子型を特定した。反応液組成は、 $1\times$  PCR buffer、 $1.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.2\text{mM}$  dNTPs (Promega)、各  $0.5\ \mu\text{M}$  プライマー (下記)、 $1.25\text{U}$  Taq DNA polymerase (Promega) で行った。反応条件は  $94^{\circ}\text{C}$ , 2 分 (1 サイクル)、 $98^{\circ}\text{C}$ , 15 秒、 $60^{\circ}\text{C}$ , 15 秒、 $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (30 サイクル)、 $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (1 サイクル)で行い、反応後は 3% (w/v) アガロースで電気泳動し、パターンを比較した。WT allele は 331bp、Mutant allele は 365bp に検出される。

Forward primer : 5'-AGAGGGCAGGAGACTAGTTAGAGAC -3'

Reverse primer : 5'-TTCAAGTACCCAGACATCCCTAAGA -3'

## 2-16: マウス脳室内への CTSA-6His 投与

10-12 週齢の GS マウスに対して脳室内投与を行った[28,29]。イソフルラン (Wako)で麻酔を行い、頭頂部の皮膚をはさみで切り、深度 2mm の二段針 (Hoshiseido)を用いて右側脳室内へ投与した。投与は矢状縫合と冠状縫合の接点であるブレグマを目安に、尾側へ 0.5 mm、右側へ 1 mm の位置に行った。投与量は、CTSA-6His 投与群は 3mg/体重 kg とした。解剖は投与 24 時間後または 7 日後に行った。

## 2-17: マウス組織由来抽出液の作製

マウスをイソフルランで麻酔を行い、開腹、PBS で灌流後、脳および末梢組織を摘出した。プロテアーゼ阻害剤を含む抽出用 Buffer ( $150\text{mM}$  NaCl, 1% NP-40,  $50\text{mM}$  NaOAc Buffer (pH4.5)) を、組織片の湿重量の 5 倍量(大脳・腎臓)または 10 倍量(小脳)となるように加えた。その後、超音波発生機 (TOMY) を用いて、超音波処理 (Out put 3 , Duty 40 , Time 1 秒 $\times$ 20 回)したものを組織抽出液サンプルとした。

## 2-18: マウス組織抽出液内シアル酸定量

先行論文を参考に、脳抽出液内のシアル酸を呈色した[27]。N-Acetylneuraminic acid (東京化成)を検量線として用いた。サンプル (上記 2-15、2-16 で作製したもの)  $50\ \mu\text{L}$  に対し、 $40\text{mM}$  過ヨウ素酸ナトリウム(Wako)溶液  $10\ \mu\text{L}$  と、レゾルシノール溶液 (0.6%(w/v) レゾルシノール (Wako)、16.8% (v/v) HCl、 $25\ \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ )  $125\ \mu\text{L}$  を添加し、氷上で 5 分静置した後、 $100^{\circ}\text{C}$ 、15 分熱処理した。熱処理後のサンプルに 95% tert-Butyl alcohol (Wako)  $125\ \mu\text{L}$  加え、 $13200\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、3 分遠心して沈殿を除去し、上清を OD630nm で吸光度を測定した。

## 2-19: MIP-1 $\alpha$ ELISA

上記 2-15、2-16 で作製したマウス脳抽出液を、4°C、12,000×g、15 分間遠心を行い、上清を回収後、0.5M リン酸 Na Buffer (pH 7.6) を等量混和して pH 調整を行い、ELISA 用脳抽出液サンプルとした。脳抽出液サンプル 50 $\mu$ L を使用し、Quantikine<sup>®</sup> ELISA, mouseCCL3/MIP-1 $\alpha$  (R&D Systems) のプロトコルに従い、マウス MIP-1 $\alpha$  を定量した。

## 2-20: 組織切片免疫染色・レクチン染色

凍結切片を用いた染色では、解剖した組織を O.C.T. compound (Sakura Seiki) に浸漬し、-80°C で固化させ組織ブロックを作製した。組織ブロックを CM3050 S クライオスタット (ライカ) を用いて 10 $\mu$ m に薄切し、APS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に張り付けた。染色時には、凍結保存していた脳切片を風乾させてから、染色操作を行った。

パラフィン切片を用いた染色では、まず解剖した組織を 4% PFA に浸漬し、4°C で一晩静置した。70% エタノールに置換、室温で一晩静置後、Shandon Excelsior ES<sup>®</sup> (Thermo fisher scientific) を用い、70 から 100% エタノールへの置換を経てパラフィンへの置換を行った。ミクロトーム SM2010 (Leica) を用い切片を薄切した後、全自動染色装置 オートステイナー XL (和研薬株式会社) を用い、キシレン (3 回)、100 から 70% までのエタノールで順次処理し、脱パラフィンを行った。脱パラフィンを行った切片は抗原賦活化のため HistoVTOne (ナカライテスク) で 90°C、40 分間処理を行った。

凍結切片、パラフィン切片ともに、PBS で洗浄後、染色操作を行った。5% (w/v) Goat serum (Cedarlane) を用いて室温、1 時間ブロッキングを行った。一次プローブ (抗体・レクチン) を Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で希釈し、4°C、一晩処理した。PBST で洗浄後、2 次プローブを Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution で希釈し、室温、遮光下で 1 時間処理した。また、250 倍希釈した Hoechst33258 (SIGMA-Aldrich) により核を染色した。PBST で洗浄後、50% (v/v) Glycerol/PBS で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS) を用いて観察した。Alexa fluor 555 : Ex. 555 nm, Em. 585 nm、Alexa fluor 488 : Ex. 488 nm, Em. 518 nm、Cyanine5 (Cy5): Ex. 650nm、Em. 667nm。Hoechst33258 : Ex. 350nm, Em. 461nm。画像解析は ZEN2012 program (Zeiss) を用いて行った。

## 2-21: 尾静脈からの CTSA-6His 投与

投与実験はユニテック株式会社に依頼した。マウス尾静脈から CTSA-6His を体重 1kg 当たり 3mg となるよう、1 週間に 1 回、計 4 回投与を行った。コントロール群には PBS を同様に投与した。最終投与から 1 週間後にマウスを解剖し、脳、心臓、肝臓、脾臓を回収した。組織の一部を抽出液作製用に凍結保存し、組織の一部を 4% PFA に浸漬した状態で冷蔵保存した。

## 第3章 結果

### 3-1 : CTSA-6His 発現 CHO 株(CTSA-6His)培養上清からの CTSA-6His 精製

構築したベクター(第2章 2-3 参照)を用いて遺伝子導入し、株化して作製した CHO/CTSA-6His 細胞の無血清培養上清を回収し、Ni-sepharose カラムを用いた精製を行った。各画分をタンパク質量 1 $\mu$ g/lane となるよう SDS-PAGE を行い、CBB 染色によって確かめたところ、溶出画分の 52kDa 付近にほぼ単一のバンドがみられた (Fig. 3-1 A)。Anti-CTSA および Anti-His(5)を用いた Western-blotting によって、このバンドが精製された前駆体 CTSA-6His であることが確かめられた(Fig.3-1 B)。精製によって、ImageJ を用いたバンド強度の測定から、培養上清 1L 当たり 1~2mg の CTSA-6His が回収できた。

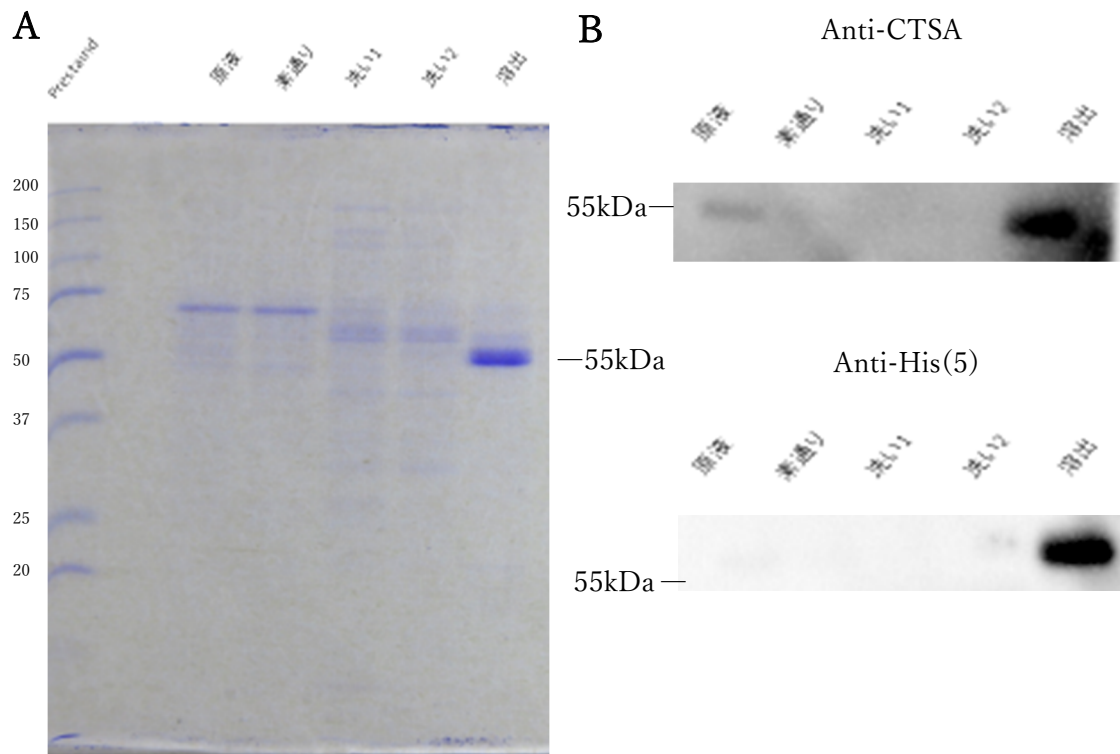


Fig.3-1 各精製画分の SDS-PAGE と Western-blotting による解析

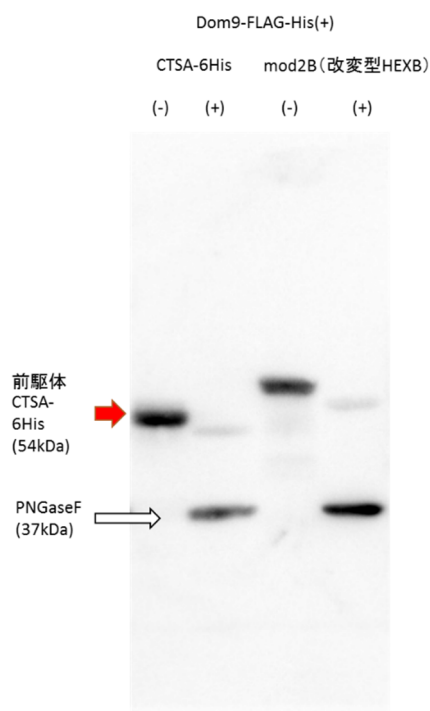
(A)CBB 染色により SDS-PAGE 後のタンパク質を染色した。1 $\mu$ g protein/lane。

(B)Western-blotting により CTSA および His-tag を検出した。0.25 $\mu$ g protein/lane。



### 3-2 : M6P 型糖鎖の検出

精製した CTSA-6His に M6P 型糖鎖が付加しているか、Dom9-FLAG-His を用いたレクチンブロットを行った。結果、PNGase F 処理を行った CTSA-6His において反応が低下した (Fig.3-2)。同じく CHO 上清由来改変型 HEXB(mod2B, M6P 型糖鎖の付加および M6PR を介した細胞内取り込みを確認している [29]) においても同様の傾向を示したことから、新たに獲得した CTSA-6His にも細胞内取り込みに必要な M6P 型糖鎖が付加していることが示された。



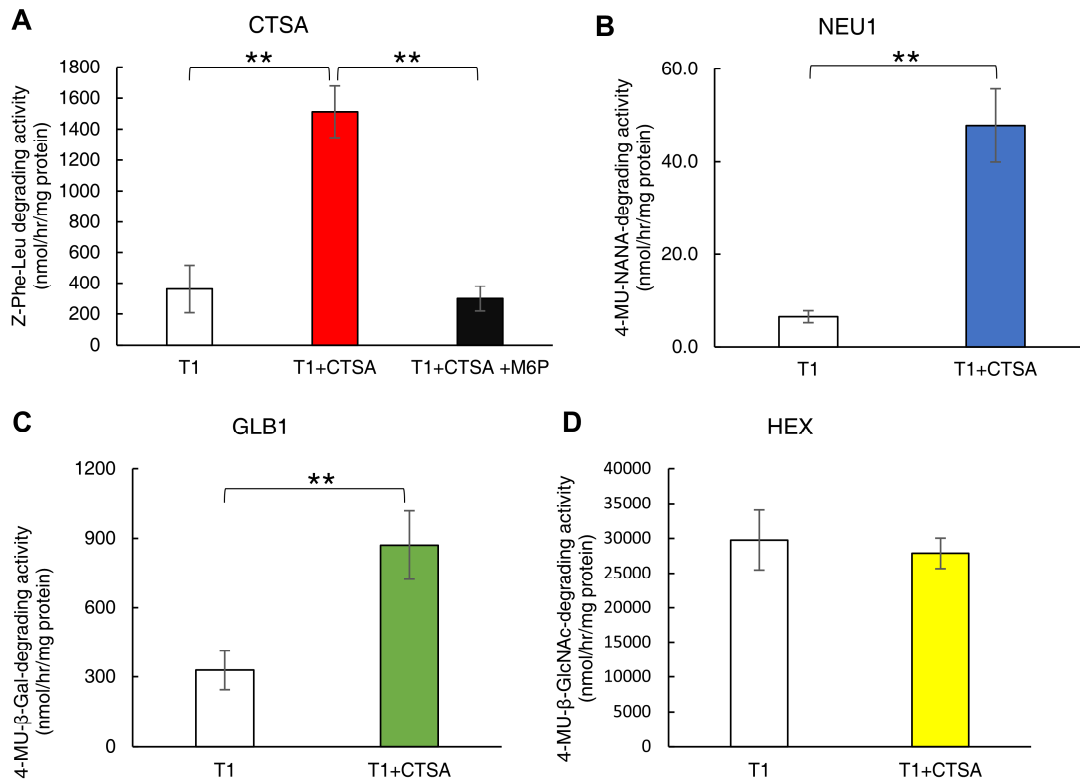
**Fig.3-2 精製 CTSA-6His に付加した M6P 型糖鎖の検出**

Dom9-FLAG-His を用いたレクチンブロットにより、M6P 型糖鎖を検出した。

(-): PNGase F 未処理、(+): PNGase F 処理

### 3-3 : T1 細胞内での活性上昇

精製 CTSA-6His を、35mm dish に播種した T1 細胞 (約  $8.0 \times 10^5$  cells) に対し  $1 \mu\text{g}$  となるよう培養上清中に添加した。24 時間後に細胞を回収し、抽出液の NEU1、CTSA、HEX, GLB1 の酵素活性測定を行った。結果、CTSA、NEU1 および GLB1 活性の上昇がみられた (Fig.3-3 A-C)。CTSA-6His を添加する際、M6P を同時に添加すると、CTSA 活性の上昇は起こらなかった (Fig.3-3 A)。このことから、培地に添加した前駆体 CTSA-6His は細胞表面の糖鎖に付加された M6P を介して細胞内に取り込まれ、カルボキシペプチダーゼ活性を示すとともに、NEU1 活性化、GLB1 安定化の機能を示すことが示された。

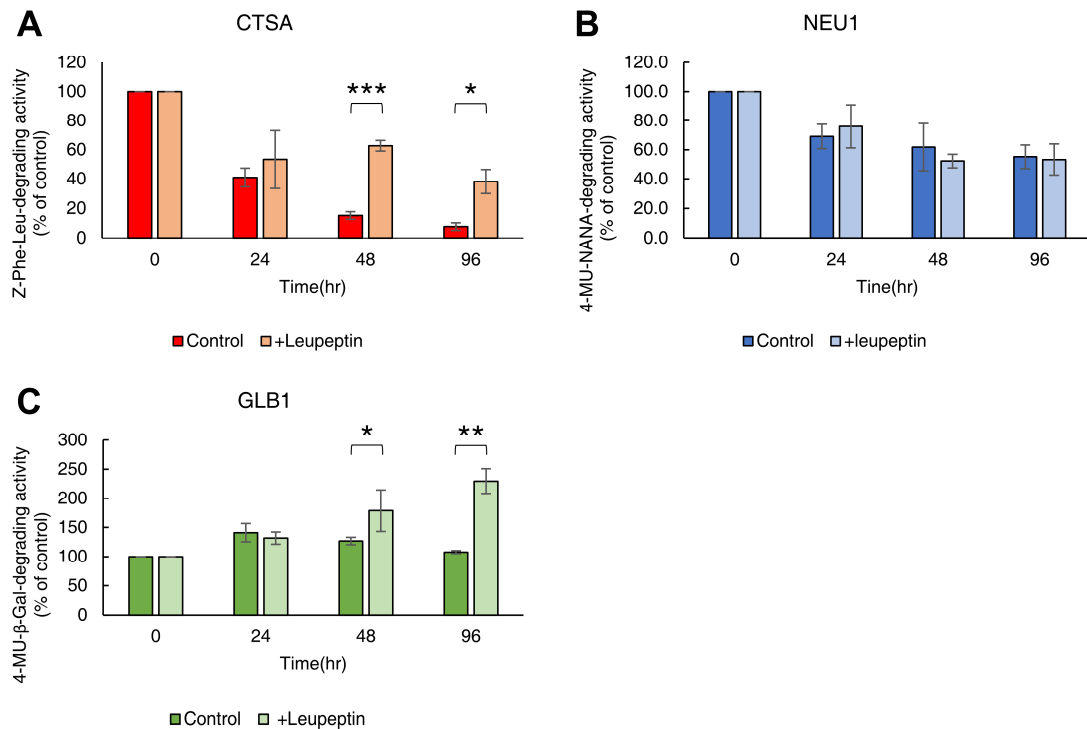


**Fig.3-3 T1 に対する CTSA-6His 補充**

CTSA-6His を T1 細胞の培養上清に添加し、24 時間後に細胞抽出液の酵素活性を測定した。基質は NEU1: 4-MU-NANA、CTSA: Z-Phe-Leu、HEX: 4-MUG、GLB1: 4-MUβ Gal n=3 Student の T 検定; \*\*P < 0.01.

### 3-4: CTSA および NEU1 活性の経時変化と Leupeptin 添加による活性半減期の延長

35mm dish の T1 に対し 1μg の CTSA-6His を補充し、24 時間後に培地交換を行い、培地交換の時点をも 0 時間とし、24-96 時間後の細胞内酵素活性の経時変化を見た。結果、CTSA 活性は指数関数的な活性の漸減が示されたが、NEU1 活性は CTSA に比べ緩やかな漸減を見せ、GLB1 活性はほとんど低下しなかった (Fig.3-4 A-C)。培地交換の際、プロテアーゼ阻害剤である Leupeptin を添加すると、CTSA 活性の漸減が非添加時と比べて緩やかになり、ImageJ の Curve Fitting 機能を用いた計算では 18.6 時間 (非添加時) から 59.0 時間 (添加時) に延長した (Fig.3-4 A) ことから、CTSA の 18.6 時間という短い活性半減期はプロテアーゼによる分解が原因であることが解明された。NEU1 活性の漸減は Leupeptin 添加時にもほとんど変化がみられなかった (Fig.3-4 B)。GLB1 活性については、Leupeptin 添加によってプロテアーゼによる分解が抑制され、活性が増大していった (Fig.3-4 C) [30]。

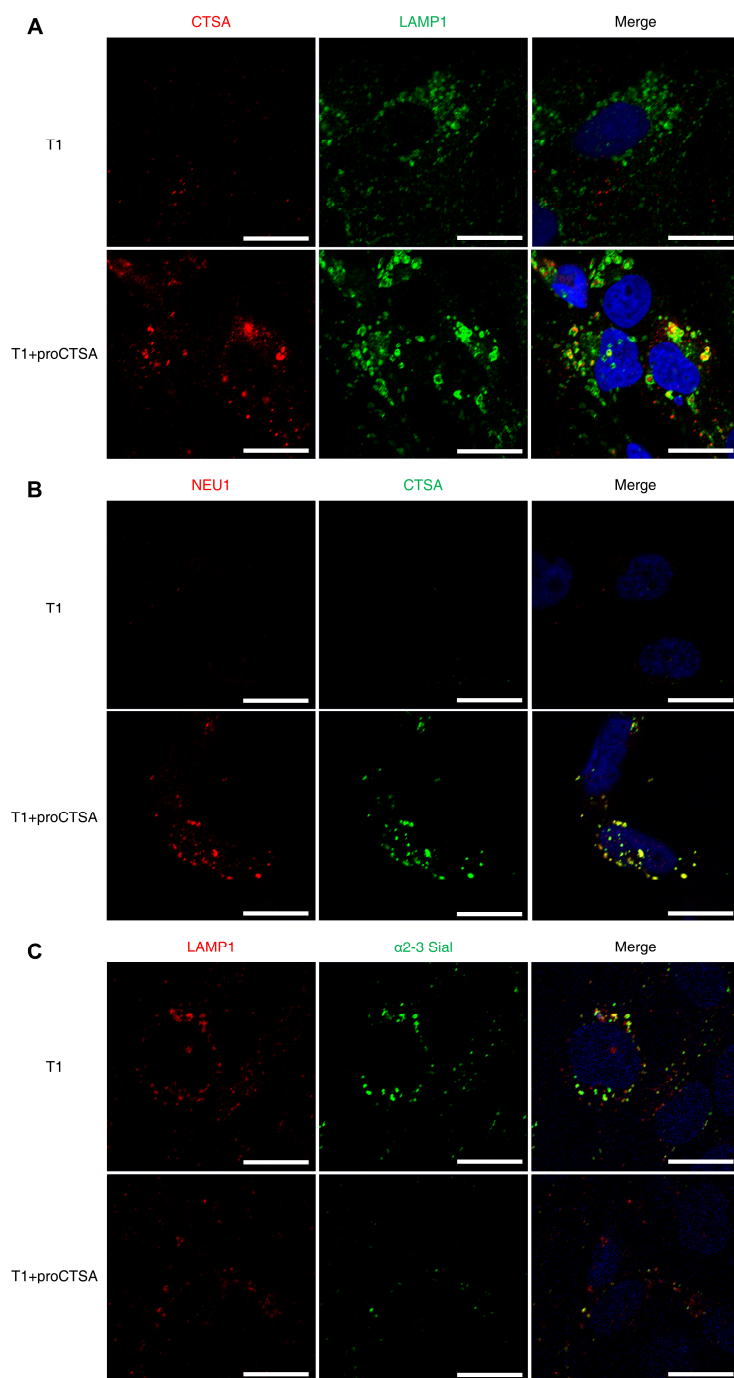


**Fig.3-4 CTSA-6His 補充後の酵素活性の推移**

CTSA-6His を取り込ませた後、Leupeptin 添加時と非添加時の各酵素活性を測定、比較した。基質は NEU1: 4-MU NANA, CTSA: Z-Phe-Leu, HEX: MUG, GLB1: 4-MUGal  
 n=3 Student の T 検定; \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P<0.001

### 3-5 : CTSA-6His 補充による細胞内蓄積 NEU1 基質の減少

8-well chamber slide に播種した T1 細胞に対し、CTSA-6His を補充後、PFA 固定して間接蛍光抗体法による免疫染色を行った。前駆体 CTSA-6His は T1 細胞内に取り込まれていることが蛍光の増大によって確かめられ、顆粒状のパターンとなってリソソームマーカーである LAMP1 と共局在がみられることから、リソソームに到達していることが示された (Fig.3-5 A)。また CTSA-6His 補充細胞において NEU1 の反応性が増大しており、細胞内で取り込まれた CTSA-6His と NEU1 とが相互作用していることが示された (Fig.3-5 B)。さらに、リソソームマーカーである LAMP1 と、NEU1 の基質となる  $\alpha$ 2-3 結合末端シアル酸含有糖鎖を共染色したところ、LAMP1 陽性領域で検出されていた  $\alpha$ 2-3 結合末端シアル酸の蛍光は補充した細胞において減弱あるいは消失していた (Fig.3-5 C)。このことから、前駆体 CTSA-6His を補充した後の NEU1 活性の上昇による基質の分解も確かめられた。



**Fig.3-5 CTSA-6His 補充繊維芽細胞に対する免疫染色**

免疫染色を行った T1 細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

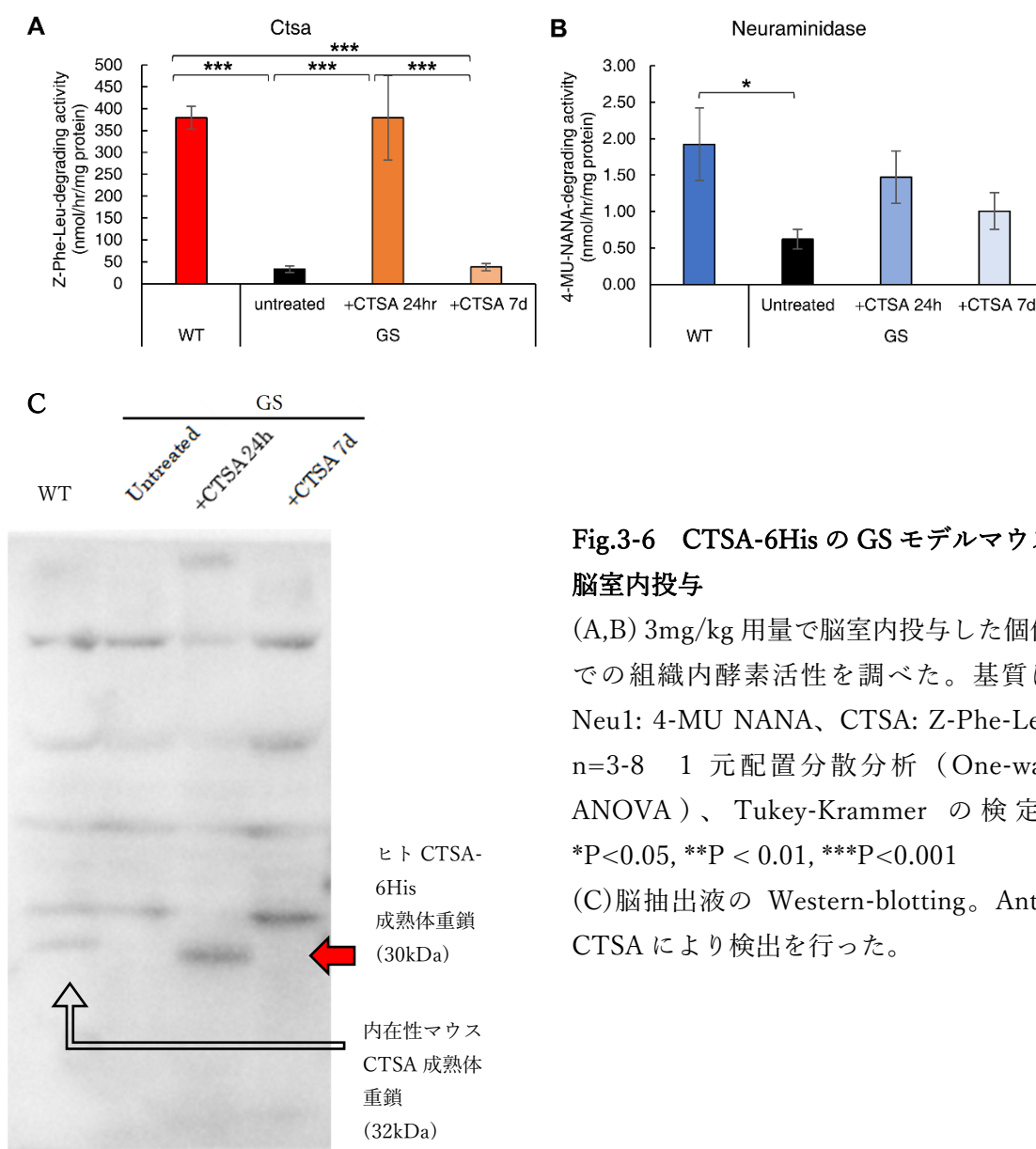
(A) Red: CTSA Green: LAMP1 Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(B) Red: NEU1 Green: CTSA Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(C) Red: LAMP1 Green: Sia  $\alpha$  -2,3 Blue: Nucleus (Hoechst33258)

### 3-6 : GS マウスへの脳室内投与による活性上昇

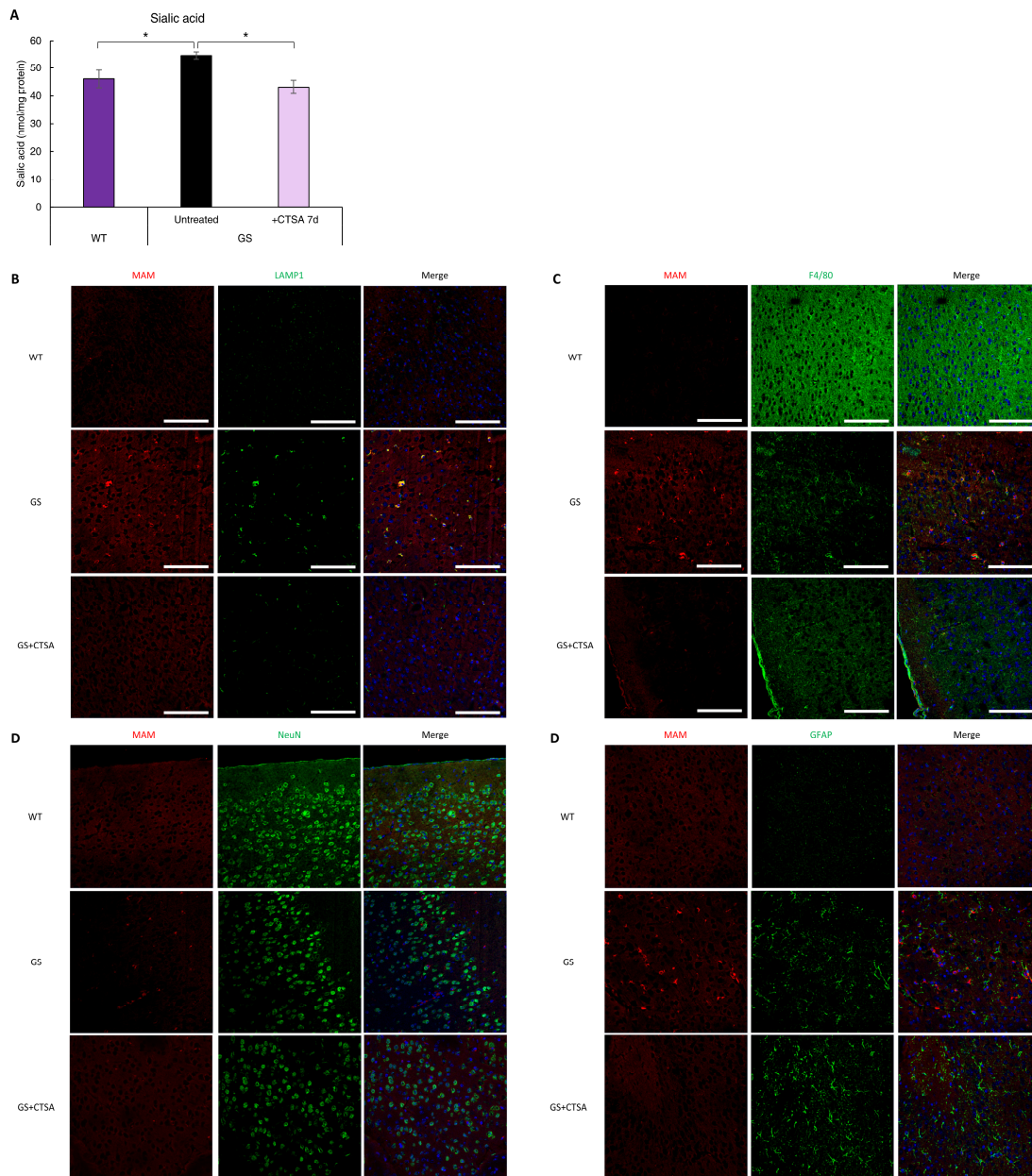
3mg/体重 kg 用量で GS マウス脳室内に前駆体 CTSA-6His の酵素補充を行った。24 時間後または 7 日後に PBS で灌流後、摘出した大脳の抽出液を作製し、Neu1 および Ctsa 活性を測定した。結果、24 時間後の脳抽出液内での Neu1 および Ctsa 活性の有意な上昇がみられ、Ctsa 活性は WT と同程度、Neu1 活性は WT を 100 としたとき約 50% の上昇がみられた (Fig.3-6 A,B)。投与後 7 日後の脳抽出液では、Ctsa 活性は投与前と同レベルまで低下していた一方、Neu1 活性は 15.5% ほどの残存がみられた。また、Anti-CTSA を用いた Blotting により、成熟化した CTSA が組織中に存在していることも確かめられた (Fig.3-6 C)。



**Fig.3-6 CTSA-6His の GS モデルマウス脳室内投与**

(A,B) 3mg/kg 用量で脳室内投与した個体での組織内酵素活性を調べた。基質は Neu1: 4-MU NANA、CTSA: Z-Phe-Leu n=3-8 1 元配置分散分析 (One-way ANOVA)、Tukey-Kramer の検定: \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P<0.001

(C)脳抽出液の Western-blotting。Anti-CTSA により検出を行った。



**Fig.3-7 CTSA-6His 補充マウス脳抽出液のシアル酸定量と脳切片レクチン蛍光染色**

(A)脳室内へ前駆体 CTSA-6His を投与したマウス脳抽出液をレゾルシノール法でシアル酸定量を行った。n=7-8 1元配置分散分析 (One-way ANOVA)、Tukey-Kramer の検定: \*P<0.05

(B-E)パラフィン切片を作製し、各種抗体および MAM レクチンを用いた蛍光染色を行った。

(A) Red: MAM Green: LAMP1 Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(B) Red: MAM Green: F4/80 (Microglia) Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(C) Red: MAM Green: NeuN (Neuron) Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(D) Red: MAM Green: GFAP (Astrocyte) Blue: Nucleus (Hoechst33258)



### 3-7:脳室内投与による蓄積 NEU1 基質の分解

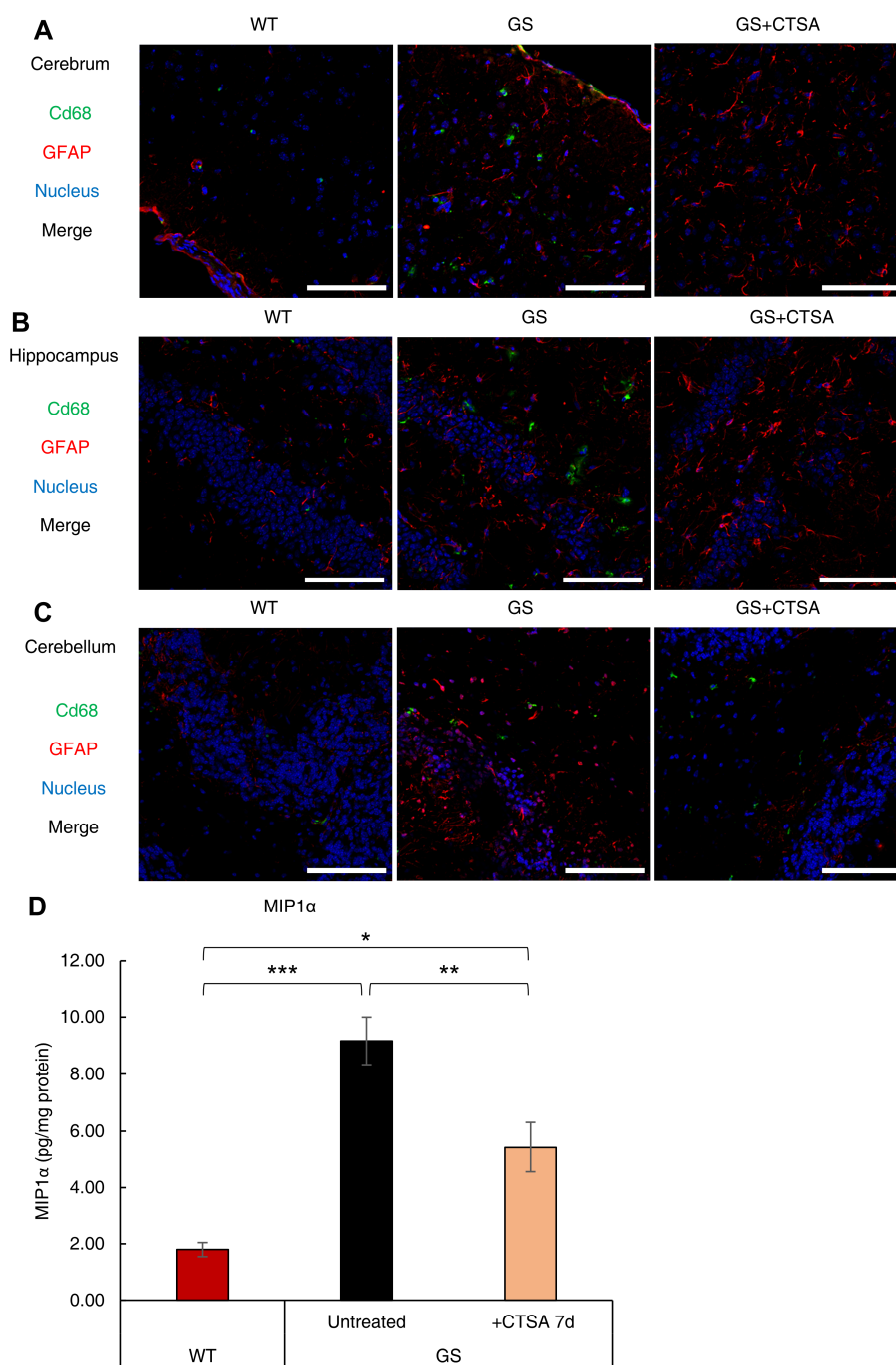
脳抽出液を用い、レゾルシノールを用いたシアル酸の定量を行った。結果、WT に比べ、GS で高くなっていた脳抽出液内シアル酸が、前駆体 CTSA-6His の補充後 1 週間で WT と同レベルまで減少していた。(Fig.3-7 A) また、脳パラフィン切片を作製し、糖鎖非還元末端  $\alpha$ -2-3 結合シアル酸を認識する MAM レクチンを用いた蛍光染色を行ったところ、GS で Lamp1 と共局在してみられた蛍光が、投与後 1 週間で減少していることが示された (Fig. 3-7 B)。各種セルタイプマーカーとの共染色を行ったところ、ミクログリアマーカー F4/80 とは共局在してみられ (Fig.3-7 C)、ニューロンマーカー NeuN やアストロサイトマーカー Gfap とはほとんど共局在しなかったことから (Fig.3-8 D,E)、前駆体 CTSA-6His の補充によってミクログリア内の蓄積 Neu1 基質の分解がなされたことが示された。

### 3-8:脳室内投与による脳内炎症反応の抑制

脳凍結切片を用い、活性化ミクログリアのマーカーである Cd68 に対する抗体を用い、免疫蛍光染色を行った。結果、GS でみられていた Cd68 陽性細胞が、前駆体 CTSA-6His 投与後 1 週間で減少していることが示された (Fig.3-8 A-C)。また、炎症性ケモカインの一種である MIP1 $\alpha$  を ELISA キットによって定量したところ、GS で WT に比べ増加していた脳内 MIP1 $\alpha$  が、CTSA 投与後 1 週間で有意に減少していることが示された (Fig.3-8 D)。酵素補充によって、脳内でのミクログリア活性化の抑制、炎症性サイトカインの減少がみられ、炎症反応の抑制に効果があることが示唆された。

### 3-9:静脈内複数回投与による末梢組織での蓄積基質減少

3mg/kg の前駆体 CTSA-6His を、週 1 回、計 4 回尾静脈から投与したマウスの心臓、肝臓、脾臓のパラフィン切片を用い、MAM および抗 LAMP1 抗体を用い蛍光染色を行った。結果、GS でみられていた Lamp1 と共局在する MAM の染色が、前駆体 CTSA-6His 投与によって減弱していることが示された (Fig.3-9 A-C)。抽出液を作製し、シアル酸定量を行ったところ、心臓や肝臓では有意な減少がみられ、脾臓でも減少傾向が見られた (Fig.3-9 D-F)。末梢への酵素補充によって、心臓や肝臓、脾臓での蓄積 Neu1 基質の分解がなされることが示された。

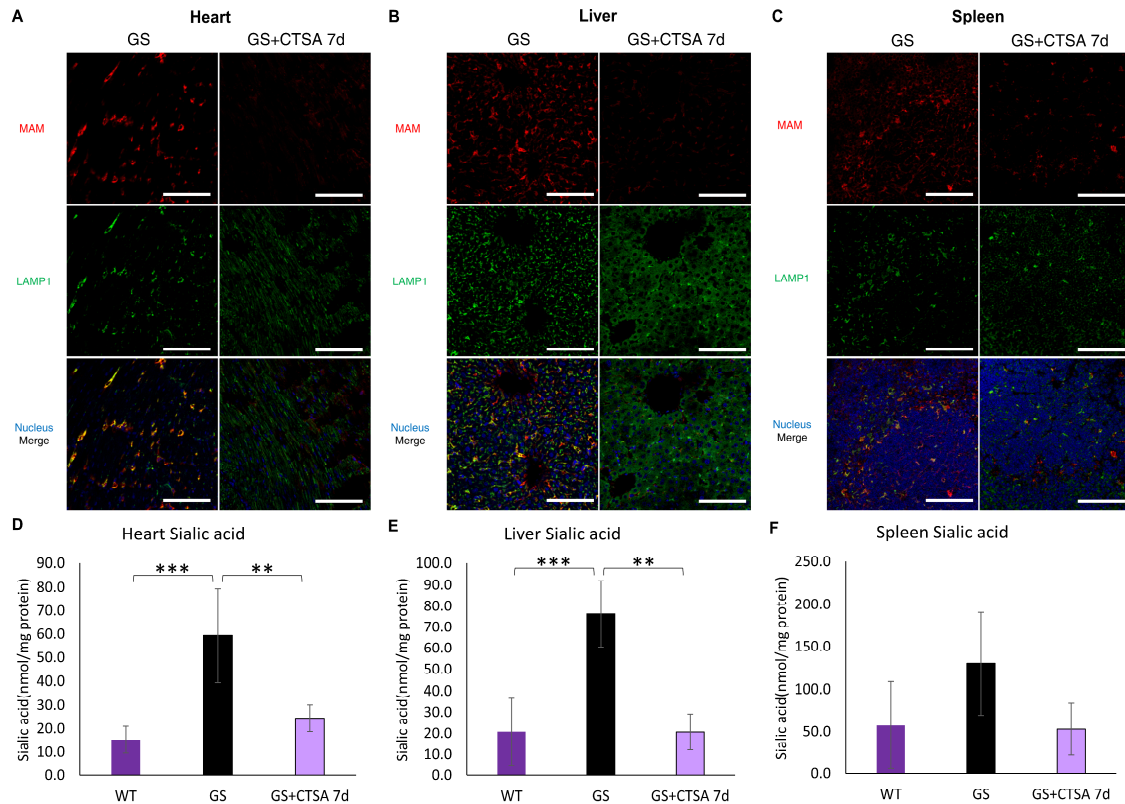


**Fig.3-8 CTSA-6His 脳室内投与後の Cd68 細胞の染色および MIP1 $\alpha$  定量**

(A-C) 脳凍結切片を用い、抗 Cd68 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。(A-C) Red: GFAP Green: Cd68 Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(D) 脳抽出液の MIP1 $\alpha$  を ELISA により定量した。n=7-8 1 元配置分散分析 (One-way ANOVA)、Tukey-Kramer の検定: \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001





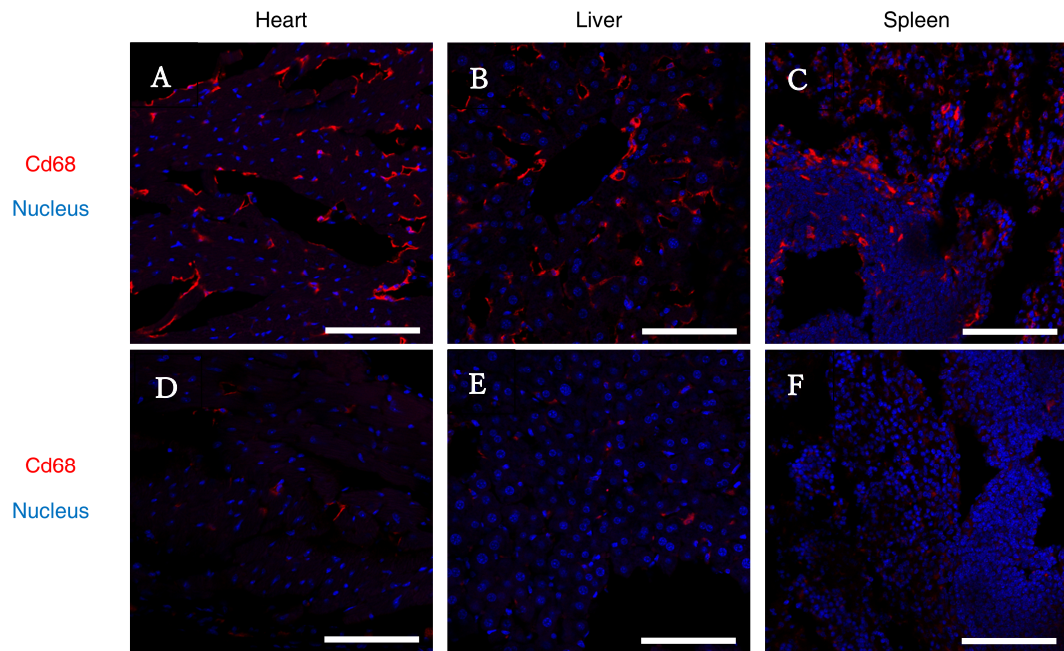
**Fig.3-9 CTSA-6His 静脈内投与後の末梢組織における蓄積基質減少**

(A-C) 免疫染色を行った心臓、肝臓、脾臓を共焦点顕微鏡で観察した。(A-C) Red: MAM Green: LAMP1 Blue: Nucleus (Hoechst33258)

(D-F) 抽出液のシアル酸定量を行った。n=3 1元配置分散分析 (One-way ANOVA)、Tukey-Kramer の検定: \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

### 3-10 :静脈内複数回投与による末梢組織での炎症反応抑制

3mg/kg の前駆体 CTSA-6His を、週 1 回、計 4 回尾静脈から投与したマウスの心臓、肝臓、脾臓の凍結切片について、抗 Cd68 抗体を用い免疫蛍光染色を行った。結果、GS でみられていた Cd68 陽性細胞が、前駆体 CTSA-6His 投与によって減少していることが示された。脳室内投与によって脳内活性化ミクログリアの減少がみられたのと同様、酵素補充によって末梢組織のマクロファージの活性化を抑制することができることが示された (Fig.3-10)。



**Fig.3-10 CTSA-6His 静脈内投与後の末梢組織切片の解析**

コントロール(A-C)および、CTSA-6His を尾静脈投与したマウス(D-F)の心臓(A,D)、肝臓(B,E)、脾臓(C,F)を抗 Cd68 抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察し

## 第4章 考察

ガラクトシアリドーシスは常染色体潜性の CTSA 遺伝子変異により、リソソームの NEU1 活性が著しく減少することで発症し、患者の神経および末梢組織ではシアル酸含有糖鎖やシアル酸含有糖ペプチドの過剰蓄積が起こる[2,3,7,31]。GS 患者では、常染色体潜性 NEU1 遺伝子変異によって引き起こされるシアリドーシスに似た全身性の症状を発症し、シアリドーシスでも中枢及び末梢組織・器官でシアル酸含有糖鎖の蓄積が確かめられている[32-36]。

本研究では、現在、根本的治療法が存在しない GS に対する新規治療アプローチとして、CHO 細胞で安定発現させた M6P 型糖鎖をもつヒト前駆体 CTSA-6His を利用し、GS モデルへの脳室内投与を行うことで、酵素補充療法の有用性を示した。前駆体 CTSA-6His は、患者由来不死化線維芽細胞である T1 細胞にカチオン非依存性 M6P 受容体を介して細胞内に取り込まれ、低下していた CTSA、NEU1、GLB1 活性を上昇させた。また、CTSA の活性半減期はリソソーム内の他のカテプシン類の分解によって 18.6 時間と短いこと、ロイペプチンによる阻害で 59.0 時間まで延長することが解明された。対照的に、NEU1 活性は長く持続し、96 時間後にも 50%以上の活性を保持していた。これまで、NEU1 の活性化には CTSA が必須であると報告されてきたが[2,37,38]、CTSA 活性が投与前と同程度まで下降しても NEU1 活性が保持されていたことから、NEU1 と CTSA の相互作用について、新たな知見が得られたといえる。

また、スプライシング異常によって Ctsa 欠損および Neu1 活性低下を引き起こす GS モデルマウスに対し、前駆体 CTSA-6His の脳室内投与を行った。3mg/kg の用量で投与したとき、Ctsa 活性は投与後 24 時間では野生型と同程度まで上昇したものの、1 週間後には未投与の GS と同程度まで戻っていた。脳室内に補充された前駆体 CTSA-6His は細胞内に取り込まれ成熟体となりカルボキシペプチダーゼ活性を示した後、速やかに分解されていると考えられる。一方で Neuraminidase 活性は、24 時間後に 49%まで上昇した後、1 週間後でも約 15.5%保持されており、細胞実験で示された結果と合致していた。リソソーム病の治療に必要な酵素活性は 15%以上と考えられていることから、十分に Neuraminidase 活性を上昇させることができたといえる。また、レゾルシノール法による定量および切片の染色によって、投与 1 週間後のマウス脳内でシアル酸含有糖鎖の減少がみられ、前駆体 CTSA-6His 補充によって Neu1 活性を回復させ、蓄積した NEU1 基質を分解されていることが示唆された。

GS モデルマウスにおいて、Cd68 および F4/80 陽性細胞が増加しており、 $\alpha$ -2-3 結合シアル酸を認識する MAM レクチンの蛍光と共染色されていた。このことから、GS モデルの中枢神経系において、Neu1 基質である末端シアル酸含有糖鎖は主にミクログリアに蓄積していることが示唆された。また、ムコ多糖症[39]、GM1/GM2 ガングリオシドーシス[40]といったリソソーム病モデルでも報告されているミクログリアの活性化と神経炎症につい

て、GS マウス脳内においても、Cd68 陽性の活性化ミクログリアの増加と、炎症性ケモカインである MIP1 $\alpha$ の増加が起こっていることも確かめられた。

前駆体 CTSA-6His を GS モデルマウスに単回、3mg/kg で脳室内投与することによって、蓄積基質の減少、ミクログリア活性化の抑制、MIP1 $\alpha$ の減少といった効果がみられた。脳室内投与された前駆体 CTSA-6His が、脳内のミクログリアに取り込まれ、ミクログリア内の Neu1 活性を上昇させることで、リソソーム内の蓄積基質を分解したことによるものと考えられる。前駆体 CTSA-6His の脳室内投与によって、脳内のミクログリア活性化に関連する神経炎症を抑制できることが示唆された。一方で、GS で増加がみられたアストロサイトマーカー GFAP の減少はほとんどみられなかったこと、脳内 MIP1 $\alpha$ 量は投与後にも WT より高値を維持していることから、アストロサイトへの効果は限定的である可能性が高い。

さらに、静脈内に前駆体 CTSA-6His を繰り返し補充することにより、末梢における蓄積基質の減少と、Cd68 陽性ミクログリアの活性化抑制といった効果も見られた。静脈内投与による効果については先行研究があり[25]、Neuraminidase 活性上昇や組織の空胞化の是正、蓄積基質の減少といった効果を示しているが、本研究では蓄積基質の減少を改めて証明するとともに、末梢でのマクロファージの活性化抑制という有効性を新たに示した。また、ミオクローヌスや小脳性運動失調といった、若年成人型 GS 患者でみられるような中枢神経症状に対しての効果は表れておらず、血液脳関門によって末梢から中枢へ酵素が移行されにくいということを示している。このことから、脳室内投与によって中枢症状の緩和を図る治療法が必要と考える。

哺乳類細胞由来の酵素製剤を脳室内に投与することで症状の緩和を図る治療法については、神経セロイドリポフスチノーシス II 型[24]やムコ多糖症 II 型[41]で臨床応用され、ムコ多糖 IIIA 型でも効果が確認されている[42]。近年、GM1 ガングリオシドーシスモデルの Gb1 ノックアウトマウスに対し、CHO で発現させたヒト組換え GLB1 を酵素補充することによって、蓄積基質の減少やグリオーシスの抑制といった効果がみられている[43]。神経セロイドリポフスチノーシス II 型では、トリペプチジルペプチダーゼ 1 (TPP1) の酵素製剤、セルリポナーゼアルファ (ブリニューラ) の反復投与によって、運動・言語機能低下を抑制する効果が見られている。神経症状を伴う他のリソソーム病にも応用可能な方法であり、GS にも適用可能と考えられる。

以上をまとめると、今回の研究によって、ヒト前駆体 CTSA を補充した際、CTSA の活性半減期が著しく短いこと、その原因がプロテアーゼによる分解であることが明らかにされ、NEU1 活性と同期しないという新たな知見が得られたと考える。また、ヒト前駆体 CTSA を用いた脳室内投与で酵素を補充することによって、ミオクローヌスや小脳失調症などの神経症状を治療するために臨床的に利用できる可能性が示され、現在根本的治療法の存在しない GS に対する新規治療法となりえると考えられる。

## 参考文献

1. Scriver CR., Beaudet AL., Sly WS. & Valle D. LYSOSOMAL DISORDERS. In: Scriver CR., Beaudet AL., Valle D., Sly WS., Childs B., Kinzler KW. & Vogelstein B., editors. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8<sup>th</sup> ed. *Volume 3*, 3811-3826. (McGraw-Hill)
2. Galjart, N.J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G.T., Verheijen, F.W., Galjaard, H., and d'Azzo, A. (1988). Expression of cDNA encoding the human “protective protein” associated with lysosomal beta-galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 54, 755–764
3. d'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.J., Robinson, D., and Galjaard, H. (1982). Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4535–4539.
4. Gorelik, A., Illes, K., Hasan, S.M.N., Nagar, B., and Mazhab-Jafari, M.T. (2021). Structure of the murine lysosomal multienzyme complex core. *Sci. Adv.* 7, eabf4155, 1-8.
5. Jackman, H.L., Tan, F.L., Tamei, H., Beurling-Harbury, C., Li, X.Y., Skidgel, R.A., and Erdös, E.G. (1990). A peptidase in human platelets that deamidates tachykinins. Probable identity with the lysosomal “protective protein”. *J. Biol. Chem.* 265, 11265–11272.
6. Itoh, K., Takiyama, N., Kase R., Kondoh K., Sano A., Oshima A., Sakuraba H., and Suzuki Y. (1993). Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 268, 1180-1186.
7. Takano, T., Shimmoto, M., Fukuhara, Y., Itoh, K., Kase, R., Takiyama, N., Kobayashi, T., Oshima, A., Sakuraba, H., and Suzuki, Y. (1991). Galactosialidosis: Clinical and molecular analysis of 19 Japanese Patients. *Brain Dysfunct* 4, 271-280.
8. d'Azzo, A., Andria, G., Strisciuglio, P., and Galjaard, H. (2011). Galactosialidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 9<sup>th</sup> ed. *Volume 3*, 3811-3826. (McGraw-Hill).
9. Sláma, T., Garbade, S.F., Kölker, S., Hoffmann, G.F., Markus, and Ries, M. (2019). Quantitative natural history characterization in a cohort of 142 published cases of patients with galactosialidosis—A cross-sectional study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 42, 295-302.
10. Shimmoto, M., Fukuhara, Y., Itoh, K., Oshima, A., Sakuraba, H., and Suzuki, Y. (1993). Protective protein gene mutations in galactosialidosis. *J. Clin. Invest.* 91, 2393-2398.
11. Caciotti, A., Catarzi, S., Tonin, R., Lugli, L., Perez, C.R., Michelakakis, H., Mavridou, I., Donati, M.A., Guerrini, R., d'Azzo, A., and Morrone, A. (2013). Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations. *Orphanet J. Rare. Dis.* 8, 114.
12. Zhou, X.Y., Morreau, H., Rottier, R., Davis, D., Bonten, E., Gillemans, N., Wenger, D., Grosveld,

- F.G., Doherty, P., Suzuki, K., et al. (1995). Mouse model for the lysosomal disorder galactosialidosis and correction of the phenotype with overexpressing erythroid precursor cells. *Genes. Dev.* 9, 2623–2634.
13. Hahn, C.N., del Pilar Martin, M., Zhou, X.Y., Mann, L.W., and d’Azzo, A. (1998). Correction of murine galactosialidosis by bone marrow-derived macrophages overexpressing human protective protein/cathepsin A under control of the colony-stimulating factor-1 receptor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14880–14885.
  14. Leimig, T., Mann, L., Martin, Mdel.P., Bonten, E., Persons, D., Knowles, J., Allay, J.A., Cunningham, J., Nienhuis, A.W., Smeyne, R., and d’Azzo, A. (2002). Functional amelioration of murine galactosialidosis by genetically modified bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 99, 3169–3178.
  15. Bonten, E.J., Wang, D., Toy, J.N., Mann, L., Mignardot, A., Yogalingam, G., and D’Azzo, A. (2004). Targeting macrophages with baculovirus-produced lysosomal enzymes: implications for enzyme replacement therapy of the glycoprotein storage disorder galactosialidosis. *FASEB J.* 18, 971–973.
  16. Hu, H., Gomero, E., Bonten, E., Gray, J.T., Allay, J., Wu, Y., Wu, J., Calabrese, C., Nienhuis, A., and d’Azzo, A. (2012). Preclinical dose-finding study with a liver-tropic, recombinant AAV-2/8 vector in the mouse model of galactosialidosis. *Mol. Ther.* 20, 267–274.
  17. Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., et al. (1991). Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1464-1470.
  18. Rombach, S.M., Smid, B.E., Linthorst, G.E., Dijkgraaf, M.G., and Hollak, C.E. (2014). Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: a systematic review and meta-analysis: effectiveness of ERT in different disease stages. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 341–352.
  19. Kishnani, P.S., Corzo, D., Nicolino, M., Byrne, B., Mandel, H., Hwu, W.L., Leslie, N., Levine, J., Spencer, C., McDonald, M., et al. (2007). Recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 68, 99-109.
  20. Kakkis, E.D., Muenzer, J., Tiller, G.E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., Phillips, J., Doroshov, R., Walot, I., et al. (2001). Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N. Engl. J. Med.* 344, 182-188.
  21. Wraith, J.E., Scarpa, M., Beck, M., Bodamer, O.A., De Meirleir, L., Guffon, N., Lund, A.M., Malm, G., Van der Ploeg, A.T., and Zeman, J. (2008). Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur. J. Pediatr.* 167, 267-277.

22. Harmatz, P., Hendriksz, C.J., Lampe, C., McGill, J.J., Parini, R., Leão-Teles, E., Valayannopoulos, V., Cole, T.J., Matousek, R., Graham, S., et al.; MPS VI Study Group (2017). The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Mol. Genet. Metab.* *122*, 107–112.
23. Burton, B.K., Balwani, M., Feillet, F., Barić, I., Burrow, T.A., Grande, C.C., Coker, M., Consuelo-Sánchez, A., Deegan, P., Rocco, M.D., et al. (2015). A phase 3 trial of sebelipase alfa in lysosomal acid lipase deficiency. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1010-1020.
24. Schulz, A., Ajayi, T., Specchio, N., de Los Reyes, E., Gissen, P., Ballon, D., Dyke, J.P., Cahan, H., Slasor, P., Jacoby, D., and Kohlschütter, A.; CLN2 Study Group (2018). Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1898–1907.
25. Cadaoas, J., Hu, H., Boyle, G., Gomero, E., Mosca, R., Jayashankar, K., Machado, M., Cullen, S., Guzman, B., van de Vlekkert, D. et al. (2021). Galactosialidosis: preclinical enzyme replacement therapy in a mouse model of the disease, a proof of concept. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *20*, 191-203.
26. Kiriya, K., and Itoh, K. (2020). Glycan Recognition and Application of P-Type Lectins. *Methods Mol. Biol.* *2132*, 267-276.
27. Jourdain, G.W., Dean, L., and Rosemans, S. The Sialic Acids: XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* *246*, 430-435.
28. Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., and Itoh, K. (2011). Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human  $\beta$ -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol. Ther.* *19*, 1017-1024.
29. Kitakaze, K., Mizutani, Y., Sugiyama, E., Tasaki, C., Tsuji, D., Maita, N., Hirokawa, T., Asanuma, D., Kamiya, M., Sato, K., Setou, M., Urano, Y., Togawa, T., Otaka, A., Sakuraba, H., Itoh, K. (2016). Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest.* *126*, 1691-703
30. Suzuki, Y., Sakuraba, H., Hayashi, K., Suzuki, K., and Imahori, K. (1981)  $\beta$ -Galactosidase-Neuraminidase Deficiency : Restoration of  $\beta$ -Galactosidase Activity by Protease Inhibitors. *J. Biochem.* *90*, 271-273
31. Sakuraba, H., Aoyagi, T., and Suzuki, Y. (1982). Galactosialidosis (beta-galactosidase-neuraminidase deficiency): a possible role of serine-thiol proteases in the degradation of beta-galactosidase molecules. *Clin. Chim. Acta* *125*, 275–283.
32. de Geest, N., Bonten, E., Mann, L., de Sousa-Hitzler, J., Hahn, C., and d'Azzo, A. (2002). Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1455–1464.

33. Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, MG., and Lowenstein, P.R. (2001). Preexisting anti-adenoviral immunity is not a barrier to efficient and stable transduction of the brain, mediated by novel high-capacity adenovirus vectors. *Hum. Gene. Ther.* *12*, 839–846.
34. Durand, P., Gatti, R., Cavalieri, S., Borrone, C., Tondeur, M., Michalski, J.C., and Strecker, G. (1977). Sialidosis (mucopolipidosis I). *Helv. Paediatr. Acta* *32*, 391-400.
35. Rapin, I., Goldfischer, S., Katzman, R., Engel, J.Jr., O'Brien, J.S. (1978). The cherry-red spot–myoclonus syndrome. *Ann. Neurol.* *3*, 234-242.
36. Thomas, G.H. Disorders of glycoprotein degradation and structure:  $\alpha$ -mannosidosis,  $\beta$ -mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 9<sup>th</sup> ed. *Volume 3*, 3507-3534. (McGraw-Hill)
37. Morreau, H., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X.Y., and d'Azzo, A. (1992). Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *267*, 17949-17956.
38. van der Spoel, A., Bonten, E., and d'Azzo, A. (1998). Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO J.* *17*, 1588-1597.
39. Martins, C., Hůlková, H., Dridi, L., Dormoy-Raclet, V., Grigoryeva, L., Choi, Y., Langford-Smith, A., Wilkinson, F.L., Ohmi, K., DiCristo, G., et al. (2015). Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. *Brain* *138*, 336-355.
40. Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., van der Spoel, A.C., d'Azzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* *126*, 974–987.
41. Seo, J.H., Kosuga, M., Hamazaki, T., Shintaku, H., and Okuyama, T. (2021). Impact of intracerebroventricular enzyme replacement therapy in patients with neuronopathic mucopolysaccharidosis type II. *Mol Ther Methods Clin Dev.* *21*, 67-75
42. . Beard, H., Luck, A.J., Hassiotis, S., King, B., Trim, P.J., Snel, M.F., Hopwood, J.J., Hemsley, K.M. (2015). Determination of the role of injection site on the efficacy of intra-CSF enzyme replacement therapy in MPS IIIA mice. *Mol. Genet. Metab.* *115*, 33–40.
43. Chen, J.C., Luu, A.R., Wise, N., Angelis, R., Agrawal, V., Mangini, L., Vincelette, J., Handyside, B., Sterling, H., Lo, M.J., et al. (2020). Intracerebroventricular enzyme



replacement therapy with b-galactosidase reverses brain pathologies due to GM1 gangliosidosis in mice. *J. Biol. Chem.* 295, 13532–13555.

44. Luu, A.R., Wong, C., Agrawal, V., Wise, N., Handyside, B., Lo, M.J., Pacheco, G., Felix, J.B., Giaramita, A., and d’Azzo, A., et al. (2020). Intermittent enzyme replacement therapy prevents Neu1 deficiency. *J. Biol. Chem.* 295, 13556-13569.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧にご指導、ご鞭撻くださいました  
徳島大学大学院薬学研究科附属 医薬創製教育研究センター  
創薬生命工学分野 教授 伊藤 孝司 先生に心より感謝いたします。

DNA シークエンシングは、徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター  
先端医療研究部門に協力して頂きました。

パラフィン切片作製にかかり、機器の利用をさせていただきました徳島大学大学院医  
歯薬学研究部 口腔分子病態学分野 石丸 直澄 先生、口腔分子病態学分野の皆様へ深く  
感謝申し上げます。

本研究は徳島大学大学院薬学研究科附属 医薬創製教育研究センター創薬生命工学  
分野にて行われたものであり、研究に際して御協力くださいました研究室の諸氏へ御礼  
申し上げます。

また、精神的・経済的支えとなり、始終暖かく見守って下さいました家族に心より感  
謝致します。

2022年7月  
堀井 雄登