

令和元年6月4日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21167

研究課題名(和文) ゴーシェ病に対するpH感受性新規シャペロン化合物の開発

研究課題名(英文) Development of pH-responsive pharmacological chaperones for Gaucher disease

研究代表者

成田 綾 (NARITA, Aya)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10569271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物を用いたシャペロン療法はゴーシェ病をはじめとする中枢神経症状を呈するライソゾーム病の有望な治療法である。我々は中枢移行を高める為、より高濃度の血中濃度が期待できるpH感受性新規シャペロン化合物を合成した。本化合物のシャペロン効果は他のシャペロン化合物(ABX)と比較し、より広いスペクトラムを示した。また、シャペロンと外因性酵素製剤の併用で相乗効果を認めた。また、ゴーシェ病をはじめとしたライソゾーム病の病態に関与する因子として、二次的なミトコンドリア機能異常が知られているが、本化合物の投与によりミトコンドリア機能の改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本化合物は幅広いスペクトラムのシャペロン効果を有するのみならず、酵素製剤との相乗作用や二次的なミトコンドリア機能の改善効果など、多様な作用を示すことから、現在治療法のないライソゾーム病の中枢神経に対する治療法として本化合物は有望である。

研究成果の概要(英文)：Pharmacological chaperone therapy using the small molecule compound is promising therapy for neuropathic lysosomal storage diseases including Gaucher's disease. We developed the pH-responsive pharmacological chaperones which is expected to obtain more high concentration of blood and cerebrospinal fluid. The chaperone effect of this compound showed a wider spectrum as compared with other chaperone compounds such as ambroxol. Also, combination of chaperone and exogenous enzyme showed synergic effect. Additionally, secondary mitochondrial dysfunction was improved by the administration of this compound.

研究分野：神経変性疾患 ライソゾーム病

キーワード：ライソゾーム病 ゴーシェ病 シャペロン療法

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病はライソゾーム酵素である酸性- グルコシダーゼ (GBA) の遺伝子変異により生じる先天代謝異常症である。GBA は生体膜の成分であるグルコセレブロシドをセラミドとグルコースに分解する。GBA 欠損により基質グルコセレブロシドがマクロファージなどの細網内皮系に進行性に蓄積し、肝脾腫や貧血、血小板減少、骨症状を生じる。これらに加え、神経症状を伴う症例もある。臨床的には非神経型と神経型に大別され、欧米では非神経型が 95% を占めるが、本邦をはじめとしたアジア圏では神経型が 65% を占める。外因性ヒト組み換え酵素製剤による酵素補充療法が唯一の治療法だが、血液脳関門を通過せず、神経症状には無効である。そこで我々は中枢神経治療として血液脳関門を通過しうる低分子化合物を用いたシャペロン療法開発に取り組んでおり、これまでにゴーシェ病や GM1 ガングリオシドーシスのシャペロン化合物の開発を行ってきた。現在、多くのシャペロン化合物が開発されているが、その大部分は変異酵素の競合阻害剤であるため、髄液移行濃度を高めようと高濃度投与を行った際、末梢組織における競合阻害活性が問題点の一つである。

2. 研究の目的

今回我々は、阻害活性を軽減し、より高い血中濃度および髄液中濃度が得られるようにすることを目的とし、小胞体中性環境下では活性型として変異酵素蛋白の活性中心に結合し、構造を安定化させ、ライソゾーム輸送後にライソゾーム酸性環境下で活性型から不活型に変換され、変異酵素蛋白と解離する様に設計した pH 依存的新規シャペロン化合物 (TMB65) を有機合成し、その有用性を検討する事とした。

3. 研究の方法

(1) TMB65 の細胞内薬物動態

TMB65 が設計コンセプト通り、ライソゾームで適切に失活を受けるか確認するために、患者由来培養皮膚線維芽細胞に TMB65 を投与したのち、タンデムマスを用いて TMB65 の各種代謝物を評価する。

(2) 酵素製剤とのシナジー効果の検討

基質競合阻害剤によるシャペロン療法は遺伝子変異によって効果が得られるものとそうでないものに分かれる (遺伝子変異特異性)。しかしながら、標準治療薬であるヒト組み換え酵素製剤とシャペロン化合物を一緒に投与することで、ヒト組み換え酵素製剤の安定化や細胞内取り込みの改善 (シナジー効果) が得られる場合、患者の変異酵素のシャペロン効果が得られない場合も、広く用いることが可能となる。そこで、ヒト組み換え酵素製剤と TMB65 を患者由来培養皮膚線維芽細胞に添加培養し、その酵素活性を測定し、シナジー効果の有無を評価する。

(3) ゴーシェ病における二次的なミトコンドリア機能障害の評価

ゴーシェ病をはじめとしたライソゾーム病の病態に關与する因子として、二次的なミトコンドリア機能異常の關与が推測されているが、詳細はまだ不明である。そこで種々の臨床病型ならびに遺伝子変異を有する患者由来培養皮膚線維芽細胞を用いてベースラインのミトコンドリア機能の差異と TMB65 投与による変化を評価する。

4. 研究成果

(1) TMB65 の細胞内薬物動態

TMB65 は基質競合阻害性シャペロン化合物に酸水解性官能基であるオルトエステル基を結合した化合物である。TMB65 は、中性環境である小胞体内では変異型 GBA と結合し、そのフォールディングとライソゾームへの移行を促進する一方で、酸性環境であるライソゾームに到達すると、オルトエステル基は加水分解され、変異型 GBA から離れ、競合阻害活性を示さなくなる。フォールディングされた変異型 GBA は基質であるグルコセレブロシドと結合し、グルコースとセラミドに分解することが可能になるとというのが本化合物のコンセプトである。pH7 条件下では加水分解率は 10% 未満、pH5 条件下では 90 分間で 100% 加水分解されることは既に検証していたが、それに加えて患者由来培養皮膚線維芽細胞に TMB65 を添加し、4 日間培養後に得られた細胞ライセートを用いて、TMB65 の代謝物をタンデムマスにて測定し、活性型化合物は完全に不活型に代謝されたことを確認した。

次に、シャペロン化合物の効果は遺伝子変異特異性があり、化合物によってシャペロン効果を示す遺伝子変異に差異がある。また、ナンセンス変異は残存酵素活性が極めて低いことからシャペロン効果が期待されにくい。しかし、本化合物は競合阻害活性を懸念することなく高濃度投与が可能であることから、ナンセンス変異を有するヘテロ接合体であってもシャペロン効果が期待できると想定され、その様な遺伝子変異を有する患者由来培養皮膚線維芽細胞を用いてシャペロン活性を検討したところ、従来用いられてきたシャペロン化合物 (デオキシノリジマイシン、アンプロキソール塩酸塩) ではシャペロン効果が得られなかったセルラインにおいて、

2~50 μ M の TMB65 投与で有意に GBA 活性が増加することが確認された。このことにより、従来有効性が期待されるより幅広い遺伝子変異に対して有効であることが示唆された。

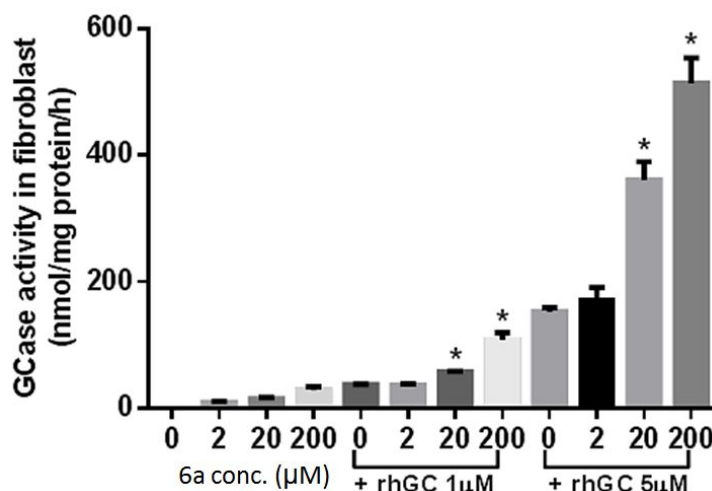
(2) 酵素製剤とのシナジー効果の検討

多くのシャペロン化合物の効果は遺伝子変異特異性があり、酵素の活性中心をコードする領域以外に変異を有する場合は効果が得られない。しかし、標準治療である酵素製剤とシャペロンの併用による相乗効果が確認されれば、遺伝子変異に関わらず広く臨床応用する事が可能となる。そこで、ヒト換え酵素製剤 (rhGC) と TMB65 を種々の濃度で患者由来培養皮膚線維芽細胞に添加し、24 時間培養し、得られたライセートおよびメディウム中の GBA 活性を測定した。

メディウム中の GBA 活性は 24 時間後には完全に失活しているのに対して、ライセート中の GBA 活性は投与酵素の濃度依存性に増加が確認された。また、20~200 μ M の TMB65 添加によって有意に酵素製剤とも相乗効果が確認された (図 1)。

シャペロンと外因性酵素製剤の相乗効果は、実臨床において実質臓器におけるより高い酵素の取り込みと、中枢神経系への効果を両立させることを示唆する重要な所見であり、今後の薬剤開発に有用な所見であった。

図 1: 酵素製剤とシャペロンの相乗効果



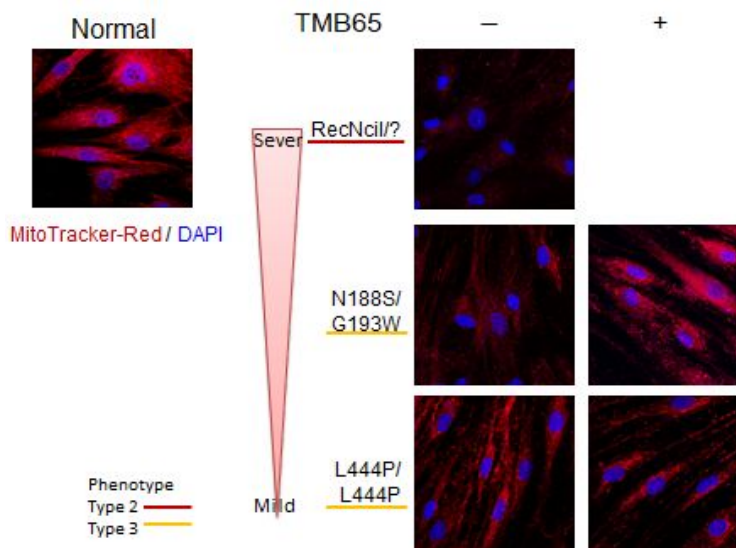
(3) ゴーシェ病における二次的なミトコンドリア機能障害の評価

ゴーシェ病をはじめとしたライソゾーム病の病態に関与する因子として、二次的なミトコンドリア機能異常の関与が推測されているが、特に神経型においてどのように病態と関連しているのか明らかではない。そこで、様々な臨床的重症度を示す神経型の患者由来培養皮膚線維芽細胞を用いてミトコンドリア機能の差異と TMB65 投与による変化を評価した。

神経型ゴーシェ病の培養皮膚線維芽細胞において、MitoTracker-Red の染色性は、臨床病型の重症度ならびに残存酵素活性の低下の程度に相関して低下しており、ミトコンドリア膜電位が低下していることが示唆された。また、これらの所見は TMB65 の投与で改善することも確認された (図 2)。現在、ミトコンドリア酸素消費量などの解析を実施中である。

神経型ゴーシェ病においてミトコンドリア膜電位の低下が臨床病型の重症度と相関性を示したことは、神経障害に二次的なミトコンドリア機能障害が重要な働きをしている事を示唆し、それがシャペロン投与により可逆性である事は、ライソゾーム病治療のひとつのアプローチとしてミトコンドリア機能の改善が重要であることが示唆された。引き続き神経系細胞での評価を実施中である。

図 2: ゴーシェ病におけるミトコンドリア機能異常



5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

- 1) Narita A, Pharmacological Chaperone Therapy for neuronopathic Gaucher disease, The 3rd Annual Congress on Rare Disease and Orphan Drugs, 2017
- 2) 成田綾, シンポジウム 16 進むオーファンドラッグ (希少疾患用医薬品) に対する創薬
ゴーシェ病に対するシャペロン療法の開発、第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。