

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19054

研究課題名(和文) ニーマンピック病C型新規薬候補物質の作用機序解明と新たな候補物質の探索

研究課題名(英文) To elucidate the mechanism of actions of new drug candidate of Niemann-Pick disease type C and search for new candidate substance

研究代表者

曽我 美南 (SOGA, Minami)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：80768002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：2-Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin (HPGCD) の分子レベルでの作用機序を解明し、神経障害に効果的なHPGCD投薬法の開発を研究目的とした。健常者とNPC患者由来のiPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞を用いたDNAアレイ解析から、NPCで発現が変動する遺伝子群を同定し、さらにHPGCD処理によって発現が変動する遺伝子群を特定した。HPGCDの脳室内投与は皮下投与と比較して顕著に生存期間を延長し、小脳のプルキンエ細胞の脱落を抑制し、神経障害発症を遅延した。このことからHPGCDの脳室内投与が神経障害抑制において有効な投薬方法であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim to this study is to elucidate the mechanism of actions at the molecular level of 2-Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin (HPGCD), develop a new drug, and develop an HPGCD administration method effective for Neurological disorder. I used microarray analysis to characterize the NPC-derived neural progenitors (NPs). A large number of genes were differentially expressed in each NPC-derived NPs line compared with healthy donor-derived NPs. Further I identified a gene sets whose expression varied in HPGCD-treated NPs. Intraventricular administration of HPGCD significantly prolonged survival time as compared with subcutaneous administration, suppressed Purkinje cell loss, and delayed the onset of neurological disorder. These results revealed that Intraventricular administration of HPGCD is an effective dosing method for suppressing neuropathy.

研究分野：再生医学

キーワード：疾患由来iPS細胞 ニーマンピック病C型(NPC) コレステロール ライソゾーム病 代謝性疾患 神経障害 肝脾腫 シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

ニーマンピック病 C 型 (NPC) は、脂質トランスポーター遺伝子 NPC1 または NPC2 の変異によって発症する代謝性疾患で、後期エンドソームやリソソームから小胞体へのコレステロール輸送が障害され、細胞内にフリーコレステロールやスフィンゴ糖脂質が蓄積する。臨床症状として小脳プルキンエ細胞の脱落による小脳失調や肝脾腫を呈し、呼吸不全や肝障害によって多くの患者が 10 代で死亡する予後不良な進行性疾患である。現在までの NPC 治療は、根本的な治療法は確立されておらず対処療法のみである。また、既存薬の効果は限られており、さらに副作用の問題があることから、新しい治療薬の開発は NPC の優先すべき課題である。

研究代表者は NPC iPS 細胞から確立した疾患モデルを用いて 23 種類の化合物の薬剤スクリーニングを行い、NPC の将来的な治療薬となり得る新規治療薬候補物質 HPGCD を見出した。HPGCD は、NPC1 欠損細胞や NPC モデルマウスにおいてコレステロール蓄積を減少させることが報告されている HPBCD と同様に、コレステロール蓄積を減少させ、細胞機能障害を回復させた。しかしながら、HPBCD、HPGCD とともに、どのように細胞内のコレステロールを減少させているかといった分子レベルの作用機序は、現在のところ明らかにされていない。新薬候補物質を実際に臨床の治療薬として開発していくには、その候補物質が生体内でどのような標的に作用し、どのような機序で効果を発揮するかといった仕組みを明らかにすることが必要である。また、候補物質の薬効だけでなく、副作用や薬物相互作用などの有害な作用の発現機構を解明し、起こり得る危険を未然に防止する上でも作用機序の解明は必須である。

研究代表者が発見した HPGCD は、NPC モデルマウスへの皮下投与により肝障害を改善し、生存期間を延長しており、*in vivo* でも治療効果があることが証明された。この結果は、過去に報告されている HPBCD 投与の結果と同様の効果であった。しかしながら HPBCD、HPGCD の中枢神経系への効果は部分的であり、さらに投与し続けたマウスも最終的には神経障害が原因で死亡する。過去の研究により、野生型マウスと NPC モデルマウスにおいて HPBCD は血液脳関門を通過できず、中枢神経系には到達しないと証明されていた。そして HPBCD と同様に、分子量 1668 Da の HPGCD もまた、血液脳関門を通過できないと考えられる。HPGCD 皮下投与の治療効果に限界があることから、中枢神経にも効果的であり神経障害を改善でき、かつ将来的には NPC 患者へ起用できる HPGCD 投与方法の開発が求められる。研究代表者は世界で初めて NPC 由来 iPS 細胞から確立した疾患モデルを用いて薬剤スクリーニングを行い、HPGCD が NPC の新規

治療薬候補物質であることを見出し、さらに *in vivo* でも治療効果があることを証明した。以上の点から、本研究は世界の中でも独自性や独創性をもつ特異的な位置にある研究である。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が新たに見出した NPC の新規治療薬候補物質 HPGCD の分子レベルでの作用機序を解明し、標的分子をターゲットとした新薬開発、そして神経障害に効果的な HPGCD 投薬法の開発を研究目的とした。作用機序が不明な化合物の標的分子を同定することは作用機序解明に必須である。健常者と NPC 患者由来の iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を用いて網羅的な遺伝子発現を解析することにより、HPGCD がコレステロールを減少させる作用機序を分子レベルで明らかにすることが出来ると考えられる。皮下投与による HPGCD 投与は、血液脳関門を通過できず中枢神経系の神経障害に対して有効ではないと考えられる。NPC で見られる小脳プルキンエ細胞の脱落による小脳失調といった神経障害に対し、効果的な投薬方法の開発は必須である。そこで血液脳関門を通過しない HPGCD を脳の神経細胞へ作用させるために、脳室内投与によって HPGCD を投与し、生存率への影響や神経障害への効果を検証する。脳室内投与は薬剤やホルモンなどの中枢神経作用を見るために、側脳室への微量投与を行う投与方法であり、脳室に投与した物質は脳脊髄液を介して脳内各部へ移行する。この投与方法を用いることにより、血液脳関門を無視して脳内に HPGCD を入れることが可能となると予想された。

3. 研究の方法

新規薬剤候補物質 HPGCD の作用機序を同定するために、DNA アレイデータをもとに作用標的分子を探索する。健常者と NPC 患者由来 iPS 細胞から神経前駆細胞を分化誘導し、未処理・HPBCD 処理・HPGCD 処理を行い RNA を抽出、DNA マイクロアレイ解析する。健常者と NPC 患者を比較して、NPC 患者由来の細胞で発現が高い遺伝子群と低い遺伝子群を同定する。さらに HPBCD 処理と HPGCD 処理で発現が変動する遺伝子群を特定する。健常者と NPC 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した肝様細胞のアレイデータを既に所持しているため、神経前駆細胞のアレイデータを比較して共通で発現変動している遺伝子群、それぞれの細胞種でのみ発現変動する遺伝子群を調べる。

NPC の神経障害に効果的な治療薬投与方法を開発するために、最適な投与開始時期の決定・投与回数や複数回投与の間隔を検討する。最適な投与時期を決定するために、発症前と発症後に単回脳室内投与を行い、生存期間延長効果を比較する。単回投与の効果は一

時的なものと考えられるので、複数回投与を行い、生存期間延長に対する効果や、カルビンディン染色を行い小脳プルキンエ細胞の脱落抑制に対する効果を調べる。また、投与間隔を3週毎と2週毎で比較し、より効果のある投与間隔を調べる。さらに神経症状に対する効果を調べるために、行動解析を行い小脳失調に対する効果を調べる。

4. 研究成果

健常者と NPC 患者由来の iPS 細胞から神経前駆細胞を分化誘導した。健常者と NPC 患者由来の神経前駆細胞の誘導効率には差はなかった。NPC 患者由来の細胞でコレステロールが蓄積しているかを調べるために、細胞を固定後 Filipin 染色を行った。NPC 由来神経前駆細胞では顕著にコレステロールが蓄積しており、HPGCD 処理によって減少した(図1)。これらの細胞を用いて RNA を抽

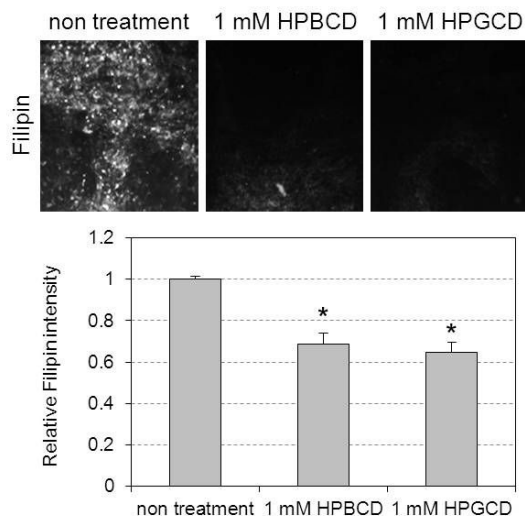


図1 NPC神経前駆細胞のFilipin染色

出し DNA アレイ解析を行ったところ、健常者由来神経前駆細胞と比較して NPC 患者由来神経前駆細胞で発現が 1.5 倍以上高い遺伝子群が 410、1.5 倍以上低い遺伝子群が 463 同定された。さらに HPGCD 処理と HPBCD 処理により発現変動する遺伝子を特定した。肝様細胞のアレイデータとも比較したところ、共通して変動する遺伝子群、それぞれの細胞種で変動する遺伝子群が見つかった。

神経障害に効果的な治療法の開発のために、発症前の生後 7 日目の NPC モデルマウスと発症後の 8 週齢の NPC モデルマウスに単回 HPGCD を脳室内投与したところ、発症前に投与したマウスで有意に生存期間が延長した。この結果より、最適な投与開始時期は発症前であることが示唆された。次に単回投与と複数回投与の効果と比較するために、生後 7 日目に単回投与するマウスと、生後 7 日目から 2 週毎に投与するマウスの生存期間を比較した。複数回投与するマウスは発症前に単回投与したマウスと比較して顕著に生存期間を延長した。小脳プルキンエ細胞の脱

落に対する効果を調べるために、8.5 週齢のマウスの小脳をカルビンディン染色したところ、HPGCD 単回投与マウスでは Saline 投与マウスと同様にプルキンエ細胞が脱落していたのに対し、複数回投与マウスは正常マウスと同程度プルキンエ細胞が存在しており、脱落が抑制されていた(図2)。また、

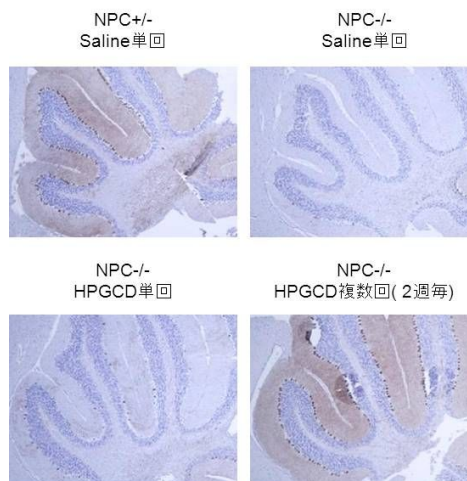


図2 小脳のカルビンディン染色

最適な投与間隔を調べるために生後 7 日目から 2 週毎または 3 週毎に脳室内投与したところ、2 週毎投与したマウスは有意に生存期間を延長した。さらに神経症状に対する効果を調べたところ、脳室内投与によって神経症状発症は遅延し、投与間隔が短い方がより発症遅延効果が見られた。これらの結果より、神経障害に効果的な投与方法は脳に直接投与する脳室内投与であり、その効果がより高い投与時期は発症前の投与であり、単回投与ではなく投与間隔が短い複数回投与がより効果的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 6 件)

Minami Soga, Evaluation of the efficacy and safety of a new drug candidate for Niemann-Pick disease type C.、KEY Forum: Stem cell traits and Developmental System. (国際学会) 2018 年 1 月 23 日、熊本市国際交流会館(熊本)

曾我美南、城戸淳、ニーマンピック病 C 型新規治療薬候補物質の有効性と安全性の評価、第 59 回日本先天代謝異常学会総会 第 15 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、2017 年 10 月 12 日、ウエスタ川越(川越)

松本志郎、曾我美南、ニーマンピック C 病に対するヒドロキシプロピル シクロデキストリンを用いた新規治療薬開発、第 59 回日本小児神経学会学術集会プログラム、2017 年 6 月 16 日、大阪国際会議場(大阪)

曾我美南、疾患由来 iPS 細胞を用いた in vivo の疾患モデル確立と薬剤開発、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 8 日、仙台国際センター（仙台）

曾我美南、ニーマンピック病 C 型の新規治療薬の開発、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 革新的医療技術創出拠点プロジェクト 平成 28 年度成果報告会、2017 年 3 月 3 日、TKP ガーデンシティ品川 ボールルーム（東京）

曾我美南、ニーマンピック病 C 型新規治療薬候補物質を用いた神経障害に効果的な投薬法の開発、第 58 回先天代謝異常学会 2016 年 10 月 27 日、新宿京王プラザホテル（東京）

〔図書〕(計 1 件)

曾我美南・江良択実、実験医学、代謝性疾患患者由来 iPS 細胞による創薬研究、2016 年、Vol.34. No.4. 529-534.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我 美南 (SOGA, Minami)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：80768002