

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08362

研究課題名(和文) テイ-サックス病治療に最適な高親和性シャペロン化合物の創製

研究課題名(英文) Analyses of essential interactions of iminosugars with the Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay-Sachs disease

研究代表者

加藤 敦 (KATO, Atsushi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：60303236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：テイ-サックス病のうち残存活性を有する患者に対し、適切な三次元構造の形成を手助けするシャペロン療法の確立を目指し、本療法に最適な高親和性シャペロン化合物の創製を行った。親和性に必要なリガンド-アミノ酸の相互作用について解析を行った結果、高親和性を得るためにはArg178、Asp322、Tyr421、Glu462と水素結合を形成すると共にTrp460とcation-相互作用が必要である事を初めて見いだした。最終的にデザインしたDMDP amideは濃度依存的に患者由来G269S変異細胞の $\alpha$ -hexosaminidase A (HexA)を上昇させ、正常細胞の43%まで酵素活性を回復させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tay-Sachs病はHex Aの活性低下に起因する疾患であり、厚生労働省難治性疾患等政策研究事業対象の稀少疾患に指定されている。従来用いられてきた酵素補充療法は、抗体の産生や副作用の問題など克服すべき点が多くあった。本研究では患者自身が持つ不安定な変異酵素を安定化させる化合物を創製し、有効性及び安全性に優れた薬剤の創製を目指した。我々がデザインし合成した化合物は濃度依存的に患者由来G269S変異細胞のHex Aを上昇させ、正常細胞の43%まで酵素活性を回復させた。以上の結果から、本化合物は、最初のTay-Sachs病に対する実用的なシャペロンとして期待される。

研究成果の概要(英文)：The affinity of a series of iminosugar-based inhibitors exhibiting various ring sizes toward Hex A and their essential interactions with the enzyme active site were investigated. All the Hex A-inhibiting iminosugars tested formed hydrogen bonds with Arg178, Asp322, Tyr421 and Glu462 and had the favorable cation- interaction with Trp460. Among them, DMDP amide proved to be the most potent competitive inhibitor with  $K_i$  value of 0.041  $\mu$ M. DMDP amide dose-dependently increased intracellular Hex A activity in the G269S mutant cells and restored Hex A activity up to approximately 43% of the wild type level; this effect clearly exceeded the border line treatment for Tay-Sachs disease, which is regarded as 10-15% of wild type level. This is a significantly greater effect than that of pyrimethamine, which is currently in Phase 2 clinical trials. DMDP amide.

研究分野：糖質生化学

キーワード：リソソーム病 グリコシダーゼ イミノ糖 シャペロン フォールディング テイ-サックス病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) GM2 ガングリオシドーシスは、 $\beta$ -hexosaminidase (EC 3.2.1.52 : Hex) の先天的異常により、役割を終えた GM2 ガングリオシド末端の *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) 残基や、*N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) 残基の加水分解が障害され、主として神経細胞のリソソームに GM2 ガングリオシドが蓄積する疾患である。本疾患は、Hex A, S 活性の低下に起因するテイ-サックス病、Hex A, B 活性の低下に起因するサンドホフ病の大きく 2 つに分けられる。発生頻度は、ともに数十万人に一人程度と極めて稀であり、厚生労働省難治性疾患等政策研究事業対象の稀少疾患となっている。これらは進行性の疾患であるが、根本的治療薬は未だ上市されておらず、一刻も早い治療薬の開発が望まれている。

(2) Hex A 酵素活性が低下することに起因するテイ-サックス病は、多様な民族で確認されているが、特にアシュケナージ系ユダヤ人に多いことが知られている。その割合は、一般的な民族が 112,000 出生児に 1 人であるのに対し、アシュケナージ系ユダヤ人では 4,000 出生児に 1 人程度とかなり高頻度である。

(3) これまでのところ GM2 ガングリオシドーシスに対する治療薬はなく対症療法に限定されている。様々な治療薬の開発研究が試みられているが、その一つに酵素補充療法 (Enzyme Replacement Therapy : ERT) がある。酵素補充療法は、ゴーシェ病やポンペ病、ファブリー病、ムコ多糖症 I 型といった一部の LSD については実現され末梢症状の改善効果が認められているが、従来行われている点滴静注では薬剤が血液脳関門を通過できないことから神経症状には効果が認められていない。そのため、神経症状を主症状とする GM2 ガングリオシドーシスについては、酵素補充療法は効果が期待できない。

(4) 近年、リソソーム病に対して低分子化合物であるファーマコロジカル・シャペロンを利用した新たな治療法が提唱されている。これは、変異酵素の活性中心に対し親和性の高いファーマコロジカル・シャペロンを作用させることで、熱力学的に不安定な変異酵素の立体構造を安定化へと導き、リソソームへの酵素輸送量を増加させ、結果的に蓄積基質の分解を促す治療法である。これまでに、ファブリー病やゴーシェ病といったリソソーム病に対して有効性が示されており、GM2 ガングリオシドーシスにおいてもこの概念は応用可能であると考えられる。つまり、Hex の活性中心に対し高親和性を示す化合物は、テイ-サックス病、サンドホフ病治療薬として期待できる。

### 2. 研究の目的

(1) ファブリー病に対する変異酵素安定化剤として Galafold™ (migalastat) が上市され、ファーマコロジカル・シャペロン療法がリソソーム病に対する有効な治療法である事が実証された。その一方で、ゴーシェ病、ポンペ病、テイ-サックス病など他のリソソーム病では酵素の安定性を高めることができる実用的なシャペロン化合物が十分に見いだされていない。本研究課題では、テイ-サックス病の治療に最適なイミノ糖のデザインを行う上で、高親和性を生み出すために必要な条件の探索を目的とした。

(2) テイ-サックス病に対するファーマコロジカル・シャペロン化合物の候補としてピリメタミンが臨床試験に入っているが、その効果は十分であるとは言えない。本研究課題では患者由来 G269S 変異細胞を用いた酵素活性の上昇を測定することにより、候補化合物の有用性や実用性をする。

### 3. 研究の方法

(1) 申請者が所有するイミノ糖ライブラリーを活用し、イミノ糖の母核を 4 員環から 7 員環まで変化させ環サイズの変化が Hex A との親和性に与える影響を調べると共に親和性に必要なリガンド-アミノ酸の相互作用について解析を行った。

(2) 標的酵素である Hex A に対する結合親和性を指標としたスクリーニングを行った。候補化合物については更に、熱安定性に及ぼす効果、患者由来 G269S 変異細胞を用いたシャペロン効果の評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) イミノ糖の母核を変化させ環サイズによる親和性の変化を調べると共にそれぞれの条件下におけるリガンド-アミノ酸の相互作用について解析を行った。その結果、Hex A と親和性を示した化合物はいずれも Arg178, Asp322, Tyr421 and Glu462 と水素結合を形成すると共に Trp460 と cation- 相互作用を有していることが明らかになった。このうち DMDP amide は Hex A に対し  $K_i$  値が 0.041 micro M とこれまで報告されているシャペロンの中で最も高い親和性を示した。そこで、今回見いだした DMDP amide と、既存の基質類似型シャペロン DNJNAc を選択し、水

溶液中における動的構造を分子動力学(MD)シミュレーションにより解析した。その結果、Asp322と3位OH間およびGlu323と6位OH間の相互作用距離がHex Aとの安定的相互作用に重要であり、DMDP amideはこれら両相互作用の形成により活性中心の可塑性や揺らぎを軽減させていることが明らかになった。更に実用性の面でもDMDP amideは濃度依存的に患者由来G269S変異細胞のHex Aを上昇させ、正常細胞の43%まで酵素活性を回復させた。本研究成果はその実用性等が高く評価されOrg. Biomol. Chem誌の「2017 Hot Articles in Organic and Biomolecular Chemistry」に選定された。

(2)テューサクス病は、サブユニットの異常に起因してHex A, S活性が、サンドホフ病はサブユニットの異常に起因してHex A, B活性が低下している。 、 サブユニットはともにN-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)残基や、N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)残基を認識するため、これらに似た構造と考えられるイミノ糖は、 、 サブユニットの両者に結合し得ると推測できる。ファーマコロジカル・シャペロンは酵素にとって、構造的側面から見れば安定化剤として働くものの、その一方で酵素阻害としての面も併せ持つ。テューサクス病ではサブユニット、サンドホフ病ではサブユニットに対する親和性が強い場合、変異サブユニットにおいてシャペロン効果を示す濃度において、機能が維持されている他方の分解活性へ影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、本研究から導かれた候補化合物について酸性基質を使用することによりHex A, Sに対する選択性を測定した。その結果、本化合物群はtotal Hexと比べHex A, Sに対する阻害活性が低下し、サブユニットよりβサブユニットに対する結合親和性が高いことが予測された。

(3)水素結合およびcation-相互作用以外に親和性を上昇させる新たな要因を探ったところ、Hex Aタンパクの活性中心にアルキル鎖を許容する脂溶性ポケットが存在している可能性を示唆する結果が得られた。そこで、DMDPamideのNHAc部位およびピペリジン環のNH部位にブチル基を導入し親和性の変化を調べた。その結果、親化合物であるDMDPamideでは、Hex Aに対しIC50値が0.041 μMと強い親和性を示したのに対し、NHAc部位にブチル基を導入した化合物ではIC50値が19 μMと著しい親和性の低下が認められた。一方、ピペリジン環のNH部位にブチル基を導入した化合物ではIC50値が0.15 μMとNHAc部位への導入と比べ親和性が維持される傾向が認められた。本領域で汎用される-glucosidaseを用いた従来の研究では、親和性向上の手段としてN-アルキル基を付加する手法がとられ、実際に-glucosidaseの代表的な高親和性化合物である1-deoxynojirimycin (DNJ)にN-ブチル基を導入したN-butyl-DNJでは親和性が高まる傾向を示すことが知られている。今回Hex Aで見られたアルキル鎖に対する認識性の違いは、これらとは明らかに異なっており、このリガンドに対する認識の違いが新たなデザインのヒントに繋がると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Narayana, C., Kumari, P., Ide, D., Hoshino, M., Kato, A., Sagar, M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Design and synthesis of N-acetylglucosamine derived 5a-carbasugar analogues as glycosidase inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 1957-1964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.02.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Eias-Rodriguez, P., Pingitore, V., Carmona, A., Moreno-Vargas, A., Ide, D., Miyawaki, S., Kato, A., Alvarez, E., Robina, I.	4. 巻 83
2. 論文標題 Discovery of a potent $\alpha$ -galactosidase inhibitor by in situ analysis of a library of pyrrolizidine-(thio)urea hybrid molecules generated via click chemistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 8863-8873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.8b01073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hedberg, C., Knudsen, I. M. B., Ladefoged, L. K., Ide, D., Brinko, A., Eikeland, E. Z., Kato, A., Jensen, H. H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Divergent synthesis of new $\alpha$ -glucosidase inhibitors obtained through a vinyl Grignard-mediated carbocyclization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 6250-6261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB01433G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fontelle, N., Yamamoto, Arda, A., Jimenez-Barbero, J., Kato, A., Desire, J., Bleriot,	4. 巻 40
2. 論文標題 2-Acetamido-2-deoxy-L-imosugar C-alkyl and C-aryl glycosides: synthesis and glycosidase inhibition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur. J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 5477-5488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201800678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakagom, I., Kato, A., Yamaotsu, N., Yoshida, T., Ozawa, S., Adachi, I., Hirono, S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Design of a new -1-C-alkyl-DAB derivative acting as a pharmacological chaperone for -glucocerebrosidase using ligand docking and molecular dynamics simulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2683-2693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23102683.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bouquet, J., King, D. T., Vadlamani, G., Benzie, G. R., Iorga, B., Ide, D., Adachi, I., Kato, A., Vocadlo, D. J., Mark, B. L., Bleriot Y., Desire, J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Selective trihydroxylated azepane inhibitors of NagZ, a glycosidase involved in Pseudomonas aeruginosa resistance to -lactam antibiotics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4609 ~ 4619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7OB00838D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Alvarez-Dorta D., King D. T., Legigan T., Ide D., Adachi I., Deniaud D., Desire J., Kato A., Vocadlo D., Gouin S. G., Bleriot Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Multivalency To Inhibit and Discriminate Hexosaminidases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 9022 ~ 9025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201701756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato, A., Nakagome, I., Nakagawa, S., Kinami, K., Adachi, I., Jenkinson, S. F., Desire, J., Bleriot, Y., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Hirono, S.	4. 巻 15
2. 論文標題 In silico analyses of essential interactions of iminosugars with the Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay?Sachs disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 9297 ~ 9304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7OB02281F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 敦、中込 泉、久保萌美、今枝秀貴、足立伊佐雄、広野修一
2. 発表標題 Hex A高親和性リガンドの創製とTay-Sachs病に対するファーマコロジカルシャペロン効果の検証
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 敦、中込 泉、中川 進平、島立 優奈、足立 伊佐雄、広野 修一
2. 発表標題 Hex A高親和性リガンドのin silico解析とTay-Sachs病に対するファーマコロジカルシャペロン効果の検証
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島立 優奈、加藤 敦、久保萌美、井出大介、足立伊佐雄
2. 発表標題 新規ピロリジン型イミノ糖誘導体のデザインとゴーシェ病に対するシャペロン効果について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中込 泉、加藤 敦、山乙教之、広野修一
2. 発表標題 MDシミュレーションによる $\alpha$ -glucocerebrosidase-ケミカルシャペロン $\alpha$ -1-C-tridecyl-DAB複合体の構造安定性解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石井 達  (ISHII Satoshi)  (00222935)	大分大学・医学部・客員研究員   (17501)	
研究分担者	広野 修一  (HIRONO Shuichi)  (30146328)	北里大学・薬学部・教授   (32607)	
研究分担者	足立 伊左雄  (ADACHI Isao)  (30151070)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授   (13201)	
研究分担者	名取 良浩  (NATORI Yoshihiro)  (50584455)	東北医科薬科大学・薬学部・助教   (31305)	