

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10051

研究課題名(和文) ムコ多糖症の脳病態に有効な新規シャペロン化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of novel chaperones for neurodegenerative mucopolysaccharidoses

研究代表者

檜垣 克美 (HIGAKI, Katsumi)

鳥取大学・研究推進機構・准教授

研究者番号：90294321

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)：ムコ多糖症の脳病態に有効な低分子シャペロン薬候補化合物の探索を行った。試験管内試験の結果、ムコ多糖症II型およびムコ多糖症IIIB型に対する候補化合物を選別した。また、患者皮膚由来培養線維芽細胞および変異酵素cDNA発現細胞系を用いた検討の結果、候補化合物は変異型特異的な酵素活性上昇効果を認め、新規シャペロン治療薬候補化合物としての活性を認めた。今後は、薬物動態試験、in vivo薬効試験を行うことで、治療薬としての開発が進むものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムコ多糖症の脳病態に対する、新規シャペロン治療薬の候補化合物の開発は、現時点で有効な治療法の存在しない疾患に対する治療法の開発につながり、意義があるものと考えられる。また、経口投与の可能なシャペロン療法は、酵素補充療法の代替治療として、開発の意義は高い。さらに、シャペロン化合物の効果の変異特異性は、変異酵素蛋白質構造の構造異常との相関を明らかにすることで、この疾患の蛋白質病態の解明に有用な知見となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have screened novel small molecular chaperone compounds for mucopolysaccharidoses. In vitro screening identified several candidate compounds for both MPSII and MPSIIIB diseases. Cell culture testing with patients' derived fibroblasts or mutant enzyme cDNA expression have revealed that some of these compounds enhanced the residual enzyme activities in mutation specific manner. Further pharmacokinetic analyses and drug efficacy evaluations are needed to develop the compounds as novel chaperone therapies for these diseases.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：治療法開発 ムコ多糖症 脳病態 低分子化合物 酵素蛋白質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は、真核生物にある細胞内小器官の一つライソゾーム内に局在する加水分解酵素などの遺伝的欠損により引き起こされる疾患群の総称で、50種類以上の異なる疾患からなる。臨床症状は損傷を受ける細胞・組織により異なるが、肝・脾腫大や骨異常などの広範な症状を示し、また多くの疾患は新生児期から小児期に進行性の重篤な中枢神経症状を主症状として発症する。ライソゾーム病の治療法として、酵素補充療法、造血幹細胞移植療法などが広く行われているが、高分子の酵素蛋白質は血液脳関門を通過できず、脳への効果は認められない。我々は、ライソゾーム病病態に有効性を示す新規治療法として、ケミカルシャペロン療法(またはシャペロン療法)の開発を行ってきた。この方法では、標的酵素に結合できる低分子化合物(シャペロン化合物)を用い、患者細胞内で変異酵素に結合させることで、酵素蛋白質の構造異常を補正し、残存酵素活性を上昇させることで効果を発揮する。また、低分子物質であるシャペロン化合物は、血液脳関門を通過し脳への効果を示し、経口投与が可能となるなどの利点がある。これまで、我々は、GM1-ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、ファブリー病などのライソゾーム病に対する新規シャペロン化合物の開発を行ってきた、他のライソゾーム病への応用が期待されていた。

### 2. 研究の目的

ムコ多糖症は、細胞内ライソゾームにおいてムコ多糖を分解する酵素の遺伝的欠損により起こる疾患で、12の異なる酵素欠損からなるライソゾーム病である。ムコ多糖症II型(MPSIIまたはハンター病)はイズロン酸-2-スフファターゼをコードするIDS遺伝子変異により起こる。症状は特徴的顔貌、関節拘縮、椎体変形を示し、重症型では幼児期から精神運動発達障害、多動を示す。この疾患に対して、酵素補充療法が行われており、骨異常などに対する有効性は認められているが、脳への効果はなく、新規治療法の開発が求められていた。本研究課題では、MPSIIの欠損酵素であるヒトIDSに対する新規シャペロン薬候補化合物の探索を行い、試験管内および培養細胞に対する効果を検証することを目的とした。また、同様の手法を用い、ムコ多糖症IIIB型に対する新規シャペロン薬候補化合物の探索も行った。さらに、従来のシャペロン化合物は標的酵素の基質類似構造を持ち、基質結合部位に結合する阻害剤であったが、本課題では、新規に樹立したスクリーニング系を用い、阻害活性のない新しいタイプのシャペロン化合物の同定も試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵素活性測定

MPSIIの欠損酵素ヒトIDS、およびMPSIIIBの欠損酵素ヒトNAGLUの測定は、共に蛍光標識(4-MU)された人工基質を用い、測定した。

#### (2) シャペロン候補化合物のスクリーニング

低分子化合物ライブラリー(1,118化合物)を用い、試験管内酵素基質競合阻害活性を指標とし、ヒトIDS酵素、およびヒトNAGLU酵素に対し阻害活性を示す化合物のスクリーニングを行った。また、精製ヒトIDS酵素蛋白質を用い、同様の化合物ライブラリーから、酵素安定化活性を示す化合物のスクリーニングを行った。

#### (3) 試験管内阻害活性試験と試験管内酵素安定化活性試験

スクリーニングで得られた各候補化合物について、ヒトIDSまたはヒトNAGLUに対する濃度依存的な試験管内基質競合阻害活性を検討し、IC50値を算出した。また、同様に試験管内酵素安定化活性を測定した。

#### (4) 培養細胞試験を用いたシャペロン効果試験

シャペロン候補化合物について、患者由来培養皮膚線維芽細胞、ヒト変異酵素cDNA発現細胞系を用い、変異酵素に対する酵素活性上昇効果(シャペロン効果)の検討を行った。皮膚線維芽細胞については、培地中に各化合物添加4日後の細胞内酵素活性を測定した。また、変異酵素発現細胞系については、ゲノム編集でIDSノックアウトした細胞株にヒト変異IDS cDNA発現ベクターを導入後、化合物を含む培地で2日間培養後の細胞内酵素活性を測定した。

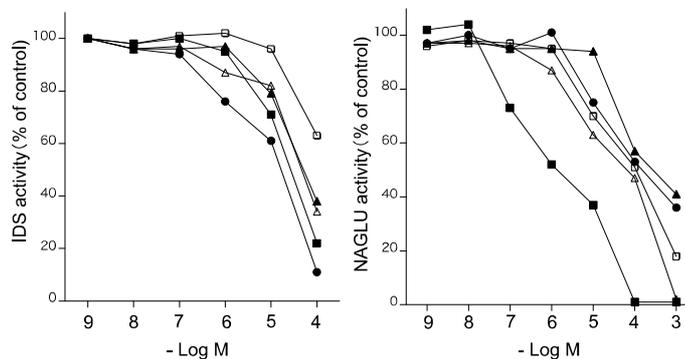
### 4. 研究成果

#### (1) 候補化合物のスクリーニングと試験管内活性

MPSIIの欠損酵素ヒトIDSに対し、阻害活性スクリーニングと酵素安定化活性スクリーニングにより、阻害剤ベースの候補化合物と阻害活性を示さない候補化合物を得た。また、MPSIIIBの欠損酵素ヒトNAGLUに対し、阻害活性スクリーニングを行い、候補化合物を複数得た。IDSとNAGLUに対する阻害活性スクリーニングにより得られた候補化合物は、いずれもそれぞれの標的酵素に対し、濃度依存的な試験管内基質競合阻害活性を認めた(図1)。一方、IDSに対する安定化活性

スクリーニングにより得られた化合物は、いずれもヒト IDS に対する阻害活性は認めなかった。

図1. 化合物の試験管内酵素阻害活性



### (2) ヒト線維芽細胞に対するシャペロン活性

異なる変異型を有する MPSII 患者由来培養皮膚線維芽細胞を用い、候補化合物の変異 IDS 活性に対する活性上昇効果（シャペロン効果）を検討した。結果、いくつかの化合物において、変異酵素活性に対するシャペロン効果を認め、化合物#103 は MPSII Patient#1 細胞において 1.8 倍の、化合物 #105 は MPSII Patient#2 細胞において 2.4 倍の活性上昇を認めた（図 2）。また、同様の検討を MPSIIIB 患者由来皮膚線維芽細胞を用いた結果、化合物 #301 は MPSIIIB Patient#1 細胞において 3.2 倍の、化合物#310 は MPSIIIB Patient#2 細胞において 5.8 倍の高い酵素活性上昇効果を認めた（図 3）。しかし、いくつかの細胞においては、いずれの化合物でも活性上昇効果を認めなかったことから、化合物のシャペロン効果の変異型特異性を示唆した。

図2. MPSII患者細胞に対する酵素活性上昇効果

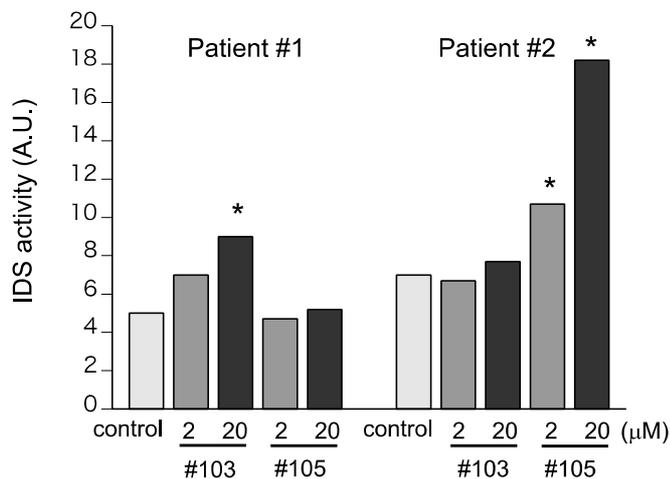
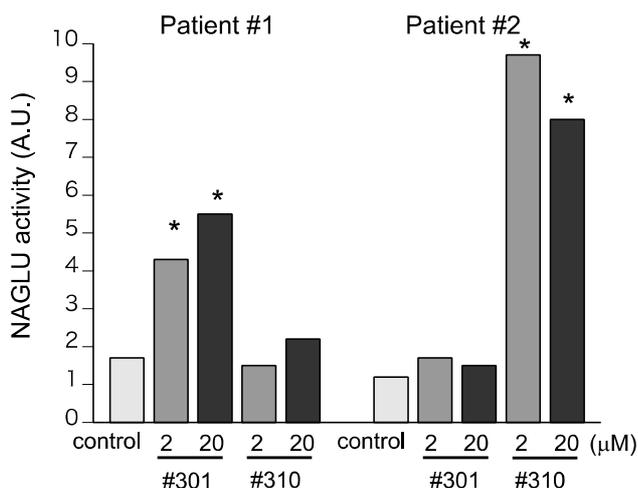


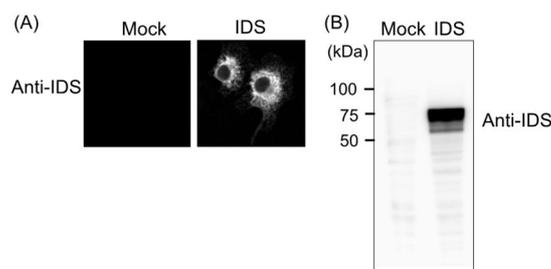
図3. MPSIIIB患者細胞に対する酵素活性上昇効果



### (3) シャペロン候補化合物のヒト変異 IDS に対する効果

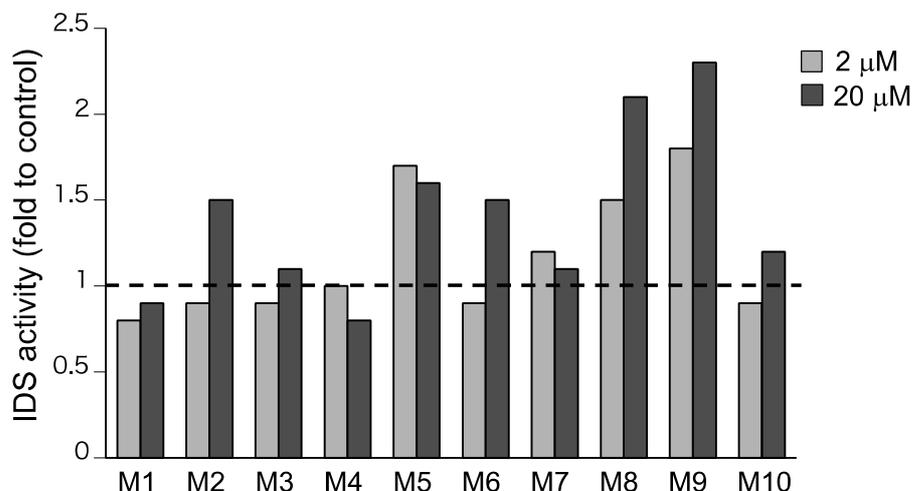
シャペロン候補化合物の変異酵素に対する効果を調べるために、ヒト変異酵素発現細胞系を構築した。まず、ヒト IDS 遺伝子をゲノム編集法により完全欠損した細胞株に、MPSII 患者で報告のある異なる変異型を導入したヒト変異 IDS cDNA 発現ベクターを一過性に導入後、抗 IDS を用い、免疫蛍光染色（図 4A）および、ウェスタンブロット法（図 4B）により、IDS 酵素蛋白質の発現を確認した。次に、同様の手法で 30 種類の変異 IDS 酵素を一過性に発現後、各化合物を

図4. ヒトIDS酵素蛋白質の発現



含む培地で培養後の細胞内 IDS 酵素活性を測定し、化合物の変異 IDS に対するシャペロン活性を測定した。図5では10変異についての結果を示すが、化合物#105は、30変異のうち約半数の変異型に対し、1.5倍以上の酵素活性上昇効果を認めた。

図5. シャペロン候補化合物の変異IDSに対する効果



以上の結果から、MPS II に対し、阻害活性を有するタイプのシャペロン候補化合物と阻害活性を示さない新しいタイプのシャペロン候補化合物をそれぞれ同定した。また、MPS III B に対し、阻害活性を有するタイプシャペロン候補化合物を同定した。また、いくつかの化合物においては、培養細胞に対し、変異酵素活性を上昇する効果を認めた。今後は、候補化合物の細胞内の GAG 含量に対する軽減効果の有無を判定することで、細胞病態に対する効果を検証する必要がある。また、阻害活性を示さない化合物は、従来の基質結合部位以外の結合部位を同定する必要がある。さらに、今回の化合物はいずれも低分子化合物であるが、薬物動態、特に脳への移行性、およびモデル動物に対する治療実験を行うことで、ムコ多糖症脳病態に有効なシャペロン薬の開発へつながるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Rocio Riquez-Cuadro R, Reimi Matsumoto, Fernando Ortega-Caballero, Eiji Nanba, Katsumi Higaki, Jose-Manuel Garcia-Fernandez, Carmen Ortiz-Mellet   | 4. 巻<br>62                |
| 2. 論文標題<br>Pharmacological Chaperones for the Treatment of $\alpha$ -Mannosidosis  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>J Med Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>5832-5843   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.jmedchem.9b0015310.1021/acs.jmedchem.9b00153   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Manuel Gonzalez-Cuesta, David Goyard, Eiji Nanba, Katsumi Higaki, Jose M Garcia-Fernandez, Olivier Renaudet, Carmen Ortiz Mellet   | 4. 巻<br>55                |
| 2. 論文標題<br>Multivalent Glycoligands With Lectin/Enzyme Dual Specificity: Self-Deliverable Glycosidase Regulators   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Chem Commun  | 6. 最初と最後の頁<br>12845-12848 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/c9cc06376e   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Mena-Barragan T, Garcia-Moreno MI, Sevsek A, Okazaki T, Nanba E, Higaki K, Martin MI, Pieters RJ, Garcia Fernandez JM, Ortiz Mellet C  | 4. 巻<br>23                |
| 2. 論文標題<br>Probing the inhibitor versus chaperone properties of sp <sup>2</sup> -iminosugars towards human $\beta$ -glucocerebrosidase: a picomolar chaperone for Gaucher disease.                               | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecules  | 6. 最初と最後の頁<br>E927        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/molecules23040927  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Front A, Biela-Banas A, Burda P, Ballhausen D, Higaki K, Caciotti A, Morrone A, Charollais-Thoenig J, Gallienne E, Demotz S, Martin OR,  | 4. 巻<br>126               |
| 2. 論文標題<br>(5aR)-5a-C-Pentyl-4-epi-isofagomine: A powerful inhibitor of lysosomal $\beta$ -galactosidase and a remarkable chaperone for mutations associated with GM1-gangliosidosis and Morquio disease type B. | 5. 発行年<br>2017年           |
| 3. 雑誌名<br>Eur J Med Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>160-179     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ejmech.2016.09.095   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Andrew B. Munkacsi, Natalie Hammond, Remy T. Schneider, Dinindu S. Senanayake, Katsumi Higaki, Kirill Lagutin, Stephen J. Bloor, Daniel S. Ory, Robert A. Maue, Fannie W. Chen, Antonio Hernandez-Ono, Nicole Dahlson, Joyce J. Repa, Henry N. Ginsberg, Yiannis A. Ioannou, and Sturley SL | 4. 巻<br>292             |
| 2. 論文標題<br>Normalization of Hepatic Homeostasis in the Npc1nmf164 Mouse Model of Niemann-Pick Type C Disease Treated with the Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat.   | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>J Biol Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>4395-4410 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1074/jbc.M116.770578   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Garcia-Moreno MI, Mata M, Sanchez-Fernandez EM, Benito JM, Diaz-Quintana A, Fustero S, Nanba E, Higaki K, Sanchez-Alcazar JA, Garcia Fernandez JM, and Mellet CO | 4. 巻<br>60              |
| 2. 論文標題<br>Fluorinated Chaperone- $\alpha$ -Cyclodextrin Formulations for $\alpha$ -Glucocerebrosidase Activity Enhancement in Neuronopathic Gaucher Disease.              | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>J Med Chem   | 6. 最初と最後の頁<br>1829-1842 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.jmedchem.6b01550   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する            |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Katsumi Higaki                                      |
| 2. 発表標題<br>Chaperone therapy for Lysosomal Storage Diseases    |
| 3. 学会等名<br>2nd Asia-Pacific Lysosomal Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>檜垣克美                 |
| 2. 発表標題<br>ライソゾーム病に対する薬理シャペロン療法 |
| 3. 学会等名<br>第90回日本生化学会 (招待講演)    |
| 4. 発表年<br>2017年                 |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>檜垣克美                   |
| 2. 発表標題<br>シャペロン療法の最新状況           |
| 3. 学会等名<br>第22回日本ライソゾーム病研究会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2017年                   |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Higaki K, Ninomiya H         | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>NOCA Science Publishers      | 5. 総ページ数<br>811 |
| 3. 書名<br>Mucopolysaccharidoses Updates |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|