

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03648

研究課題名(和文)ミトコンドリア病細胞死阻止機構の解明と創薬

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of mitochondrial disease cell death inhibition and drug discovery

研究代表者

小坂 仁(Osaka, Hitoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90426320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究期間に、アポモルフィン、フェロトーシス阻害作用によってBSO誘導細胞死を阻害していることを明らかにした。また、この抗フェロトーシス分子メカニズムとしては、酵素Xに結合してこれを活性化し、ミトコンドリア病に見られるNADHストレスを低減し、ミトコンドリア機能を改善する経路を見出した。さらに、アポモルフィンのフェロトーシス阻害作用は、ドパミンアゴニスト作用とは異なることを示し、ドパミン受容体への結合能を無くしたアポモルフィン誘導体を合成し探索することで、ドパミンアゴニスト活性による副作用を低減したフェロトーシス阻害剤を多数創製した。これらの研究成果を纏めて特許出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポモルフィンおよび誘導体は、ミトコンドリア機能低下にともなうATP産生能を改善し、フェロトーシス、還元ストレス上昇、炎症の指標を有意に改善させることを見出した。またその分子基盤として酵素Xの活性化にあることを見出した。アポモルフィンおよび誘導体は、ミトコンドリア病のみならず、加齢によるミトコンドリア機能低下と関連した疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病、非アルコール性脂肪性肝疾患等における有効性が期待される。実際に共同研究により、これらの疾患群への有効性を示しつつある。これらの成果により新しい機序に基づいた日本発の新薬創成が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We found that apomorphine inhibits BSO-induced cell death by inhibiting ferotosis and, as a molecular mechanism, binds to and activates the enzyme X, reducing NADH stress seen in mitochondrial diseases and improving mitochondrial function. Furthermore, since the ferotosis inhibitory effect of apomorphine is different from that of dopamine agonists, we synthesized and explored apomorphine derivatives without dopamine receptor binding ability, and created a number of ferotosis inhibitors with reduced side effects caused by dopamine agonist activity. The research results were compiled and a patent application was filed.

研究分野：小児神経学

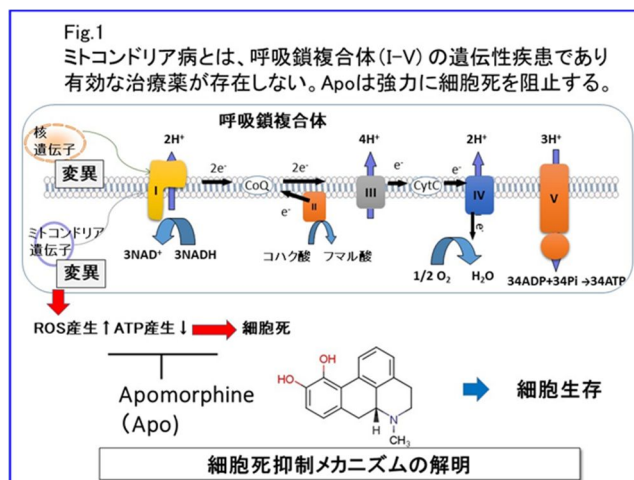
キーワード：アポモルフィン ミトコンドリア病 パーキンソン病 アルツハイマー病 非アルコール性脂肪性肝疾患

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

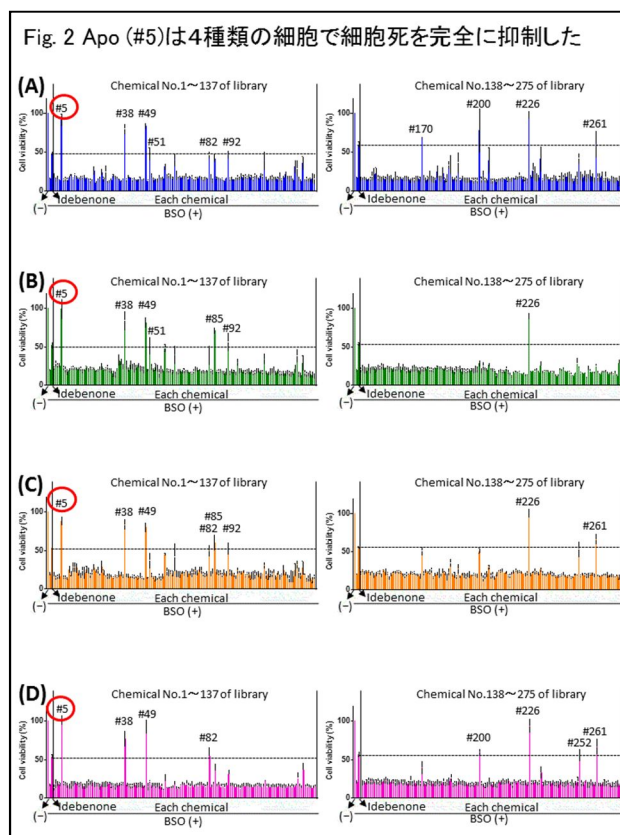
1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは生体内 ATP 産生の中心であり、ミトコンドリア呼吸鎖複合体は、好氣的代謝により、生体内が必要とする ATP の大半を産生する。ミトコンドリア病とは、主として呼吸鎖複合体の遺伝性疾患であり (Fig. 1) 約 1 万人あたり 1 人と、頻度の高い遺伝性疾患である。現在、補酵素 Q10 の類縁体である イデベノン が、レーバー遺伝性視神経炎に対する治療薬として (欧州での限定認可)、および タウリン が MELAS において、脳梗塞の再発予防として認可されているのみであり、治療薬が切望されている。我々は、中枢神経薬のライブラリーから、この 2 剤より遥かに強力に ROS による細胞死を救済し、なおかつこの 2 剤にはない、ATP 産生を上げる作用を有する薬剤、apomorphine, (Apo) を見出した(1)。



2. 研究の目的

ミトコンドリア病は全身性疾患であるため、皮膚も罹患臓器であり、診断のために使用した皮膚の細胞にも脆弱性が認められる。小児に多く、重篤な Leigh 脳症と MELAS の 4 種類の患者皮膚線維芽細胞を用い、(A) Leigh 脳症; ミトコンドリア遺伝子変異 (m.10158T>C, ND3), (B) Leigh 脳症; 核遺伝子変異 (c.55C>T, p(P19S), NDUFA1), (C) MELAS, m.3243A>G (tRNA-Leu), (D) MELAS, m.5532C>T (tRNA-Trp)) の 4 種類の細胞に ROS (L-ブチオニン-(S,R)-スルホキシミン; BSO) を付与したところ、細胞死誘導を確認しミトコンドリア病の ROS に対する脆弱性を再現することができた。次にこの系を用い、細胞死救済を指標に、中枢神経系薬剤スクリーニングを行ったところ、既存の承認薬剤イデベノンよりも遥かに低濃度で (EC50=88nM) この細胞死を強力に阻害する薬剤を見出した (1) (Fig. 2 縦軸が生存率、横軸がイデベノン添加時の生存率。丸印#5 が Apo)。更にこの薬剤は、ATP 産生を有意に上昇させることを発見した (Fig. 3; 赤印が Apo 100nM 添加時)。



細胞死救済の経路を明らかにする目的で、BSO 適応下の患者細胞を用い、Apo 投与前後でマイク

ロアレイ解析を行った。2倍以上の変動を示す遺伝子群として、発現増加が234遺伝子、発現減少が408遺伝子とみた。これら変動遺伝子のうち mTOR に関わる遺伝子群がいずれも mTOR の抑制に働いていることを見出した (Fig. 4; ピンク上昇、青網目低下)。また KEGG 解析では、炎症性サイトカインや、自然免疫に関わる分子群が発現低下している特徴的な所見を得ている (1)。

また Apo には D-R アゴニスト作用があり、現在パーキンソン病治療薬として用いられている。同様に D-R アゴニストである、Pramipexole dihydrochloride および Ropinirole hydrochloride では細胞死救済作用は確認されなかった。したがって Apo の主作用である、D-R アゴニスト作用と細胞死救済作用は直接的な関連が無いものと考えられるが、更に検証が必要である。以上、mTOR 抑制、炎症抑制、D-R 作用と、細胞保護の関係を明らかにし、Apo によるミトコンドリア病における細胞死抑制経路を行い、ミトコンドリア病特に小児に発症する重症な Leigh 脳症の治療薬を開発することが研究目標である

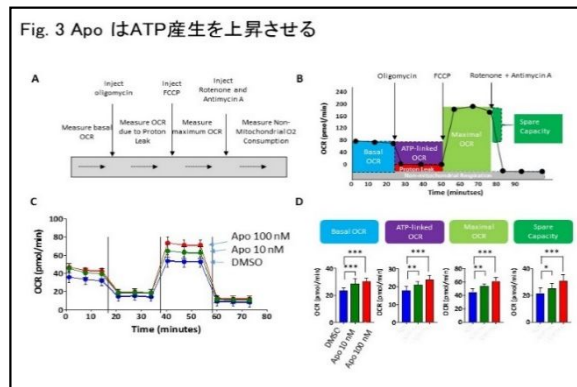


Fig. 3 Apo はATP産生を上昇させる

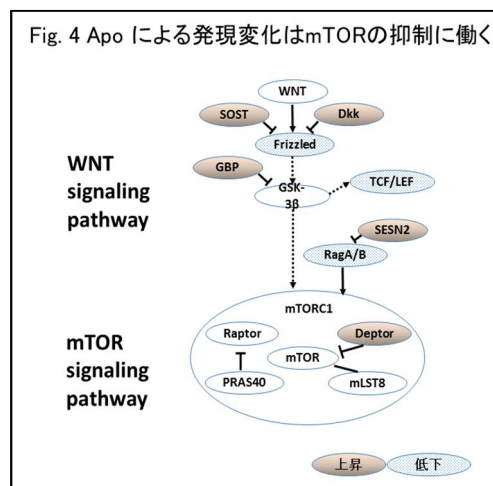


Fig. 4 Apo による発現変化はmTORの抑制に働く

### 3. 研究の方法

#### (1)アポモルフィン(Apo)の標的探索

Apo の X 位が methoxy 化された誘導体は不活性であることが示された。X 位の水酸基が薬効標的との結合に関わっていると推測し、Apo の Y 位が methoxy 化された誘導体 D31 を FG エポキシビーズに固定化し、標的候補タンパク質との結合を Apo 原体のビーズと比較を試みた。D31 は、残った Y 位の水酸基を介して FG ビーズに固定化されるはずなので、固定化後は不活性型と見做すことができる。Apo ビーズと D31 ビーズの精製により、バンドパターンの一部は異なるものの、よく似た精製結果が得られた。Apo の作用標的を探索するため、SILAC 法による比較プロテオーム解析を行なった。

#### (2)シグナルネットワークの解明

BS0 はフェロトーシス誘導剤と知られるため、フェロトーシスの面から作用機序を検討する。

#### (3)誘導体合成

東工大との共同研究により、既存の化合物ライブラリー (> 200 万) より、in vitro screening を行い Apo との構造類似性からの 24 種を同定しているので、今回 Apo の活性部位を同定する目的で、OH 基を CH3 に改変した誘導体合成をおこない活性保持に必須の官能基を保持して、誘導体を合成する。

### 4. 研究成果

(1) Apo の標的探索: KCMC10 細胞を 13C/15N (heavy) または 12C/14N (light) を含む Lys、Arg 含有培地で培養した後、各細胞から whole cell lysate を調製し、Apo ビーズと D31 ビーズを用

いてそれぞれ精製した後、両者を混合し、LC-MS/MS 解析に供した。その結果、1455 個のタンパク質が同定され、そのうち Apo/D31 比が 3 以上のものが 308 タンパク質、Apo/D31 比が 10 以上のものが 28 タンパク質見つかった。同定されたタンパク質の中で特に注目した候補蛋白 1 と酵素 X の Apo 結合ドメインの解析を行なった。候補蛋白 1 は 2549 アミノ酸のタンパク質キナーゼだが、昆虫細胞で発現させた精製組換えタンパク質が Apo ピーズに結合することを確認した後、欠損変異体を用いた解析を行なった。その結果、キナーゼドメインを含む C 末端側の 389 アミノ酸が Apo 結合に充分であることが判明した。しかしながら、候補蛋白 1 経路を抑えてもミトコンドリア病の改善効果が認められないことが判明したため、Apo 標的としての候補蛋白 1 の探索はペンディングすることとした。一方、酵素 X は大腸菌組換えタンパク質を用いた欠損変異体解析の結果、C 末端側の 188 アミノ酸が Apo 結合に充分であることが判明した。ところで、酵素 X の立体構造は解明されていないが、Alpha FoldII により確度の高い構造予測がなされている。この予測構造に基づいて Apo のドッキングシミュレーションを行なったところ、生化学的な解析結果と一致して、Apo が酵素 X の C 末端側に結合している構造モデルが得られ、Apo との結合に関わる可能性が高いアミノ酸残基が複数特定された。

## (2)シグナルネットワークの解明

フェロトーシス誘導薬 RSL3,FIN56,Artesnate,存在下では、ミトコンドリア病患者由来皮膚線維芽細胞 m.10158 T>C, p(S34P), complex I では細胞死が誘導され Apo は代表的なフェロトーシス阻害薬である、Ferrostatin-1, liproxstatin-1 と同様の細胞死阻止作用があり、Deferoxamine より高い抗フェロトーシス活性を持つことが判明した。一方ネクローシス阻害薬ではフェロトーシス阻害効果は見られなかった Apo の作用点はフェロトーシス阻害にあることが明確になった。次に不飽和脂肪酸の酸化状態として、C11-BODIPY581/591 試薬を用い、患者細胞においては酸化亢進があり、Apo により、酸化状態の阻害効果を観察した患者細胞では、負荷前でも酸化体が存在しフェロトーシス誘導薬により RSL3 によりその量は増えるが、フェロトーシス阻害薬である Ferrostatin-1 では酸化脂肪酸は減少し、Apo でも同様の結果を示した。

次に mRNA レベルでの解析を行った。フェロトーシスマーカーである PTGS2 (COX-2) の発現を評価した (Yang et al, 2014)。リアルタイム RT-PCR により RSL3 添加は、患者線維芽細胞における PTGS2 発現を上昇させ、この PTGS2 上昇は Apo 処理および Fer-1 処理によって阻害された。PTGS2 のウエスタンブロット分析では、Apo と Fer-1 処理により、患者線維芽細胞における PTGS2 タンパク質レベルが大幅に低下することが示された。

Apo の酵素 X への結合とその効果；酵素 X は NADH を NAD<sup>+</sup> に酸化し、同時に酸化型 CoQ10 を還元型 CoQ10 に還元する酸化還元酵素である。この酵素反応は消費される NADH をモニターすることにより可能である。そこで酵素 X を用いて、in vitro の酵素反応を行った。その結果 Apo は酵素 X の酵素活性値を 2 ~ 3 倍程度上昇させ得ることが分かった。

NAD<sup>+</sup>/NADH 比測定；2x10<sup>5</sup> の細胞を用い以下のプロトコールで調整したのち NADH, NAD<sup>+</sup>を測定した。測定は NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Colorimetric Kit (BioVision)を用いたその結果、Apo は 100nM のレベルで NAD<sup>+</sup>/NADH を上げることが明らかになった。一方フェロトーシス阻害薬であるフェロスタチン(Fer-1)には同様の活性を認めなかった

還元型コエンザイム Q10/酸化型コエンザイム Q10 の測定；LC-MS の系を確立したのち還元型および酸化型コエンザイム Q10 の測定を行った。患者ファイブロブラストへの Apo の添加により還元型コエンザイム Q10/酸化型コエンザイム Q10 比を上昇させることを見出した。一方では Fer-1 にはそのような作用は認めなかった。

in vitro screening と活性基の同定と誘導体化；合成可能な誘導体作成の検討を行い、16 種が合成可能であった。また、アポモルフィンの構造類似化合物 24 種と合成したアポモルフィン誘導体 16 種、合わせて 40 種の化合物についてアポモルフィンの持つ催吐作用を排除するため、ドパミン受容体結合活性を測定してアポモルフィンと同程度以上の結合活性を持つ化合物を排除するスクリーニングを実施した。

ドパミン受容体結合活性測定；上記 40 化合物のドパミン活性を測定した（D2-R を安定発現する CHO 細胞を用い、ERK1/2 のリン酸化を指標に候補薬剤のドパミン D2 受容体への結合を測定した。Apo の D2 受容体への結合の EC50 はおよそ 50nM であり、D3 (EC50; 10.4nM) および D5 (EC50; 206 nM) の 2 つの候補薬は、D2 受容体活性が高いため候補薬から除外した。

BS0 を用いた細胞死アッセイ；上記 38 薬剤について、Leigh 脳症 m.10158T>C, p (S34P), ND3 皮膚線維芽細胞を用い EC50 を測定し候補薬を抽出した。その結果、10 薬剤が抗 BS0 細胞死活性が EC50<300nM であった。

酵素 X の in vitro アッセイ；アポモルフィン誘導体のうち上記 10 薬剤について、酵素 X の in vitro アッセイを実施した。ヒト組換え酵素 X、NADH (500 μM)、酸化型 CoQ10 (200 μM) を含む反応混合液をマイクロプレートの各ウェルに分注し、所定量の試験化合物を各ウェルに添加して、所定の時間反応させた。ヒト組換え酵素 X タンパク質として、酵素 X-His タグ (Cayma 社、MW: 42.5 kDa) を用いた。ヒト組換え酵素 X タンパク質は 50% グリセロールを含む緩衝液で溶解及び希釈して用いた、反応で消費される NADH の量を 340 nm の吸光度で測定することにより、反応の進行を定量的に測定した。吸光度の測定結果に基づき、1 分間に 1 μmol の生成物を生産するために必要な酵素量を 1 U の酵素 X 活性として算出した。化合物 D6 と及び D37 は、いずれもアポモルフィンと同程度の酵素 X 活性向上効果を示した。

フレックスアナライザーによる酸素消費量測定；上記より見出した 2 種類の薬剤 (Apo-D6 および Apo-D37) を添加し、培養 24 時間後の酸素消費量；OCR を評価した。Apo-D6 に関しては、対照の DMSO (0.1%) と比べ、いずれの指標も有意な変化を示さなかった一方で、Apo-D37 では、対照の DMSO (0.1%) と比べ Basal OCR、ATP linked OCR、Maximal OCR、Spare Capacity の指標においても有意な改善を示した。この結果から、Apo-D37 が LS 患者由来の皮膚線維芽細胞に対してミトコンドリアの ATP 産生能を増加し得ることが示された。

以上のように、Apo のシグナル経路と有望なシーズ化合物を取得したので、これを基本骨格とした誘導体開発を進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato-Shirai, I. Ogawa, E. Arisaka, A. Osaka, H. Murayama, K. Kuwajima, M. Watanabe, M. Ichimoto, K. Ohtake, A. Kumada, S.	4. 巻 43
2. 論文標題 Valine-restricted diet for patients with ECHS1 deficiency: Divergent clinical outcomes in two Japanese sibilings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 308-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2020.10.003	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 -
1. 著者名 Kuwajima, M. Kojima, K. Osaka, H. Hamada, Y. Jimbo, E. Watanabe, M. Aoki, S. Sato-Shirai, I. Ichimoto, K. Fushimi, T. Murayama, K. Ohtake, A. Kohda, M. Kishita, Y. Yatsuka, Y. Uchino, S. Mimaki, M. Miyake, N. Matsumoto, N. Okazaki, Y. Ogata, T. Yamagata, T. Muramatsu, K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Valine metabolites analysis in ECHS1 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	6. 最初と最後の頁 100809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2021.100809	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 -
1. 著者名 Numata-Uematsu, Y. Uematsu, M. Yamamoto, T. Saitsu, H. Katata, Y. Oikawa, Y. Saijyo, N. Inui, T. Murayama, K. Ohtake, A. Osaka, H. Takanashi, J. I. Kure, S. Inoue, K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Leigh syndrome-like MRI changes in a patient with biallelic HPDL variants treated with ketogenic diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	6. 最初と最後の頁 100800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2021.100800	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Sato-Shirai Ikuko, Ogawa Erika, Arisaka Atsuko, Osaka Hitoshi, Murayama Kei, Kuwajima Mari, Watanabe Miyuki, Ichimoto Keiko, Ohtake Akira, Kumada Satoko	4. 巻 43
2. 論文標題 Valine-restricted diet for patients with ECHS1 deficiency: Divergent clinical outcomes in two Japanese sibilings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 308 ~ 313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2020.10.003	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 -

1. 著者名 Yamada Yuma, Somiya Kana, Miyauchi Akihiko, Osaka Hitoshi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Validation of a mitochondrial RNA therapeutic strategy using fibroblasts from a Leigh syndrome patient with a mutation in the mitochondrial ND3 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64322-8	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 宮内彰彦、渡邊知佳、小林瑞、山田直也、神保恵理子、高橋将文、山形崇倫、小坂仁
2. 発表標題 アボモルフィンのフェロトーシス制御によるミトコンドリア病治療
3. 学会等名 第20回ミトコンドリア病学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小坂 仁、宮内彰彦、
2. 発表標題 ミトコンドリア創薬
3. 学会等名 第20回ミトコンドリア病学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osaka H.
2. 発表標題 Update on clinical trials in Leigh syndrome
3. 学会等名 258th ENMC International Workshop on Leigh syndrome spectrum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osaka H
2. 発表標題 Pre-clinical trials of Apomorphine for Leigh syndrome
3. 学会等名 258th ENMC International Workshop on Leigh syndrome spectrum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑島真理、小坂仁、白井育子、濱田悠介、市本景子、村山圭、山形崇倫
2. 発表標題 ECHS1欠損症患者における尿中代謝物の解析
3. 学会等名 第123回 日本小児科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊知佳, 小坂仁, 村山圭, 大竹明, 山形崇倫
2. 発表標題 皮膚線維芽細胞を用いた原発性コエンザイムQ10欠乏症の診断方法確立
3. 学会等名 第123回 日本小児科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊知佳, 宮内 彰彦, 渡邊 美有紀, 神保 恵理子, 今澤 俊, 村山 圭, 大竹 明, 山形 崇倫, 小坂 仁
2. 発表標題 原発性 CoenzymeQ10 欠乏症の早期診断系確立と病態解析
3. 学会等名 J-mit 特別オンラインシンポジウム
4. 発表年 2021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	秋山 泰  (Akiyama Yasushi)  (30243091)	東京工業大学・情報理工学院・教授   (12608)	
研究 分担者	山口 雄輝  (Yamaguchi Yuki)  (50345360)	東京工業大学・生命理工学院・教授   (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------