

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02914

研究課題名（和文）酸化リン酸化酵素群の分子構造機構の解明と創薬展開に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research for elucidation of the molecular structure mechanism of oxidative phosphorylation enzymes and development of drug discovery

研究代表者

高島 成二（Takashima, Seiji）

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：90379272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：我が国では、高齢化社会の進行に伴い心不全患者が急激に増加しており、公衆衛生上の重要な課題となっている。一方で、心不全に対する有効な治療手段は限られ、治療薬の開発も進んでいない。本研究は、心不全の発症および増悪に関係する特定の因子に注目し、この因子の心不全の病態における役割を明らかにした。さらに、この因子を創薬標的とした全く新規の心不全治療薬の開発を進め、その効果の概念検証を生体内で達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本事業においては、酸化リン酸化酵素群の活性化機構を解明すると同時にタンパク質分解抑制化合物スクリーニング系の確立およびこの系を利用したFirst in Classの心不全治療薬の開発を物質特許出願まで行った。分子機構の解明は今後の生体内エネルギー代謝を考える上で学術的に重要な意義をもち、また新規で汎用性の高い薬剤アッセイ系の構築と実用実践は、我が国の新薬創生促進につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In Japan, the number of patients with heart failure is rapidly increasing as the population ages, and this has become an important public health issue. On the other hand, effective treatment methods for heart failure are limited, and the development of therapeutic drugs has not progressed. This study focused on specific factors related to the onset and exacerbation of heart failure, and clarified the role of these factors in the pathology of heart failure. Furthermore, we proceeded with the development of a completely new heart failure treatment targeting this factor, and achieved conceptual verification of its efficacy in vivo.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 エネルギー需給バランス ミトコンドリア 微小循環障害 ATP合成酵素

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はミトコンドリア内ATP産生を正確に測定可能なアッセイ系を組み立て、酸化リン酸化酵素群のアロステリック活性制御タンパク質G0s2を発見した。そして、このG0s2の作用分子機構の解明をすすめ、ミトコンドリアでのATP産生効率を上げる機能があることを明らかにした。

心不全においては、心筋内のエネルギー供給バランスの不全が病態の重症度や予後と関連することが知られている。そこで、G0S2の分解阻害剤を開発・投与すればミトコンドリアのエネルギー供給バランスを改善させることにより心不全の病態及び予後を改善させることができると仮説した。

2. 研究の目的

酸化リン酸化酵素群の調節分子を介した生体内の適応機構を解明し、これを創薬標的とした心不全治療薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) ATP合成酵素制御タンパク質G0S2のタンパク質分解阻害化合物のスクリーニング系の構築

我々はこれまで、ミトコンドリアタンパク質であるG0S2を発現誘導させた細胞ではミトコンドリアでのATP濃度の低下が抑制されること、この作用により細胞が虚血耐性を獲得することを明らかにした。そこでG0S2の分解機構の解明とこれを創薬標的とした化合物の同定を目的としてG0S2分解抑制剤の多検体スクリーニング系の確立を行い、大阪大学薬学部が所有する5万4000の化合物のスクリーニングを行った。

(2) ヒット化合物の薬効評価と合成展開

上記のスクリーニングによりヒット化合物が得られたため、その薬効評価と合成展開を進め、化合物の薬物としてのリード最適化をすすめた。また本活性化合物の薬物動態機序の解析を同時にすすめた。

(3) 生体内でのエネルギー供給バランス(W.M.I)アッセイ系の構築とリード最適化化合物の薬効評価

げっ歯類を用いて、[C11]-acetate投与後PET-CTを利用したWork Metabolic Index (W.M.I)の評価法を確立した。これを利用して上記のリード最適化化合物の薬効評価を行った。具体的には、空腹時心臓での[C11]-acetateの減衰速度(K_{mono})(図1)を測定すると同時に、収縮期血圧(SBP)、Stroke Volume Index(SVI)及び心拍数(HR)の積を計算し、 K_{mono} で除することによりW.M.Iを算出した。

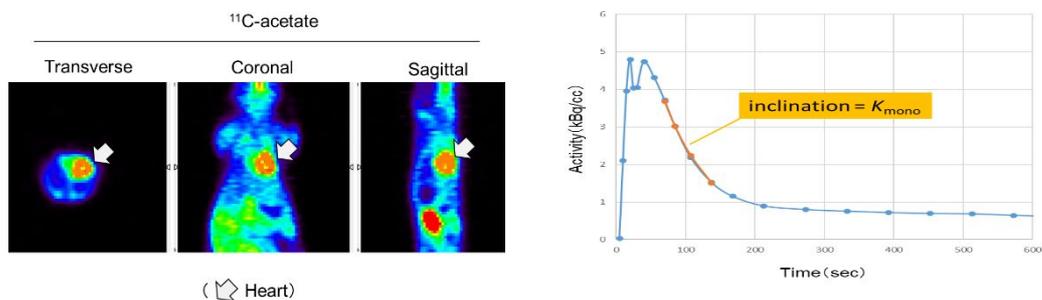


図1, [C11]-acetate PET-CT画像(左図)と心臓での放射線量減衰(右図)

4. 研究成果

ATP合成酵素制御タンパク質G0S2のタンパク質分解阻害化合物のスクリーニング系の構築を実施した。

G0s2の極端に短いタンパク質寿命に注目し、その分解抑制剤がエネルギー供給不全による臓器不全の治療薬になりうるという仮説を立てた。G0s2の分解調節経路の分子を同定し、分解抑制活性をもつ化合物の多検体スクリーニング系を独自に確立した。本スクリーニング手法は細胞エッジの正確な画像同定から発現タンパク質の定量精度をあげるように解析ソフトを改良しており、細胞アッセイ系でありながら優れた特性を持たせることに成功した(図2)。

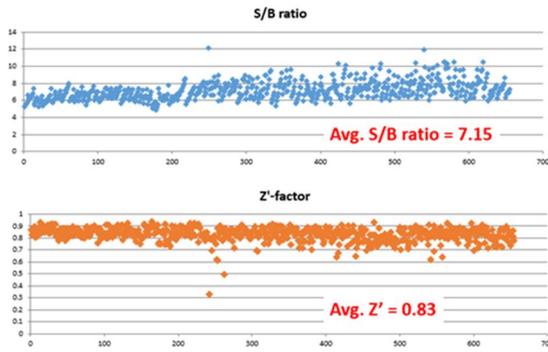


図2、G0s2 タンパク質寿命スクリーニング系のプレートごとの S/B ratio および Z

本スクリーニング系を使用し De novo で化合物 library をスクリーニングすることにより、G0s2 の分解を抑制し細胞におけるタンパク質量を上昇させる新規化合物系統の同定に成功した (図3)。

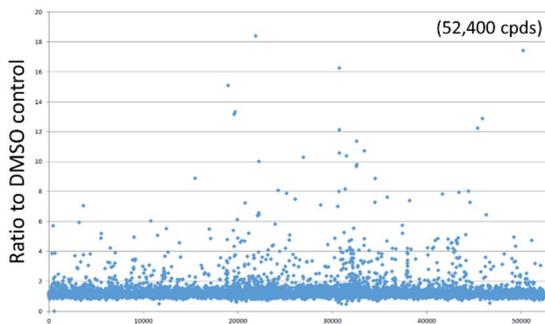


図3、G0S2 分解抑制化合物の First Screening。2 倍のタンパク質量増加を cut off とし 52400 の化合物をスクリーニングし 324 のヒット化合物を得ている。この後カウンターアッセイを組み込んで 4 次スクリーニングまで行い、現在のヒット化合物系統を同定した。

次に、本化合物を合成展開することにより生体内外でその薬効評価をすすめた。その中で活性の強い化合物は G0s2 の特定のシステイン (C47) と共有結合していることが確かめられた (図4)。

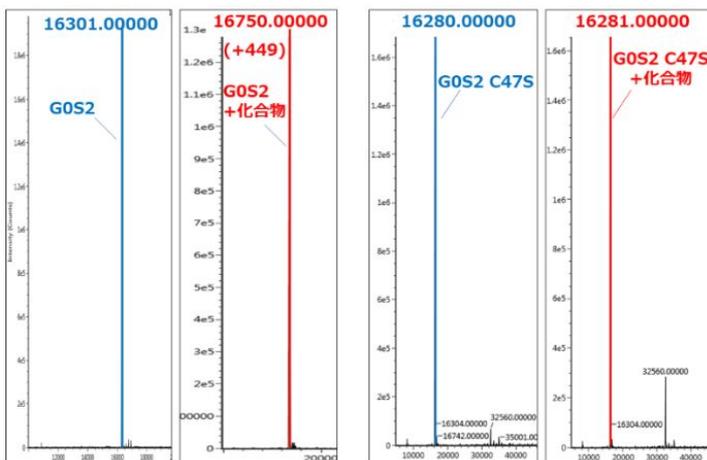


図4、MALDI-TOF MS による G0s2 C47 に対する開発化合物の 1:1 共有結合の証明。C47S 変異体では化合物が結合しないことから C47 が結合部位であることがわかる。

この C47 は、G0s2 分解過程の捕酵素である BAG5 との結合部位 (E44) の 3 アミノ酸離れた、極めて近い場所に位置している。すなわち本化合物は G0s2 の C47 に直接共有結合し分解酵素群と競合的に作用することにより G0s2 タンパク質分解を抑制することがあきらかになった (図5)。

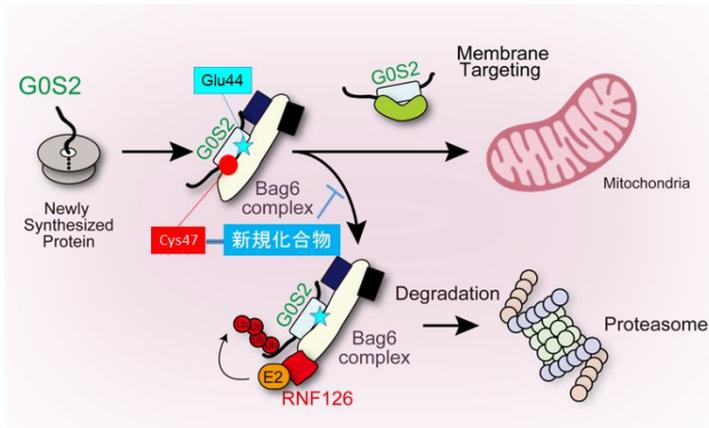


図5, 開発化合物の作用機序
G0s2 の Cys47 に共有結合することにより BAG5 との結合部位と競合し G0s2 の分解が抑制される

大阪大学薬学部 BINDS の協力でさらに、この G0s2 に共有結合する化合物系統#28 の合成展開をすすり明確な構造活性相関を認めている (図6)。

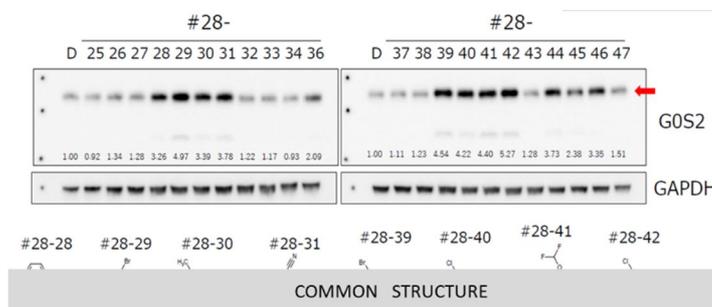


図6, #28 系統の合成展開
細胞に添加することにより G0s2 のタンパク質量を特異的に増加させる。

強い G0s2 の特異的タンパク質分解抑制活性をもつ#28 系統化合物は、ヒト及びラットの細胞において再現性良く低酸素時の ATP 産生量を増加させ、生存率を増加させたためこの試験を生体外 POC として#28 系統化合物の薬効評価に使用した (図7)。

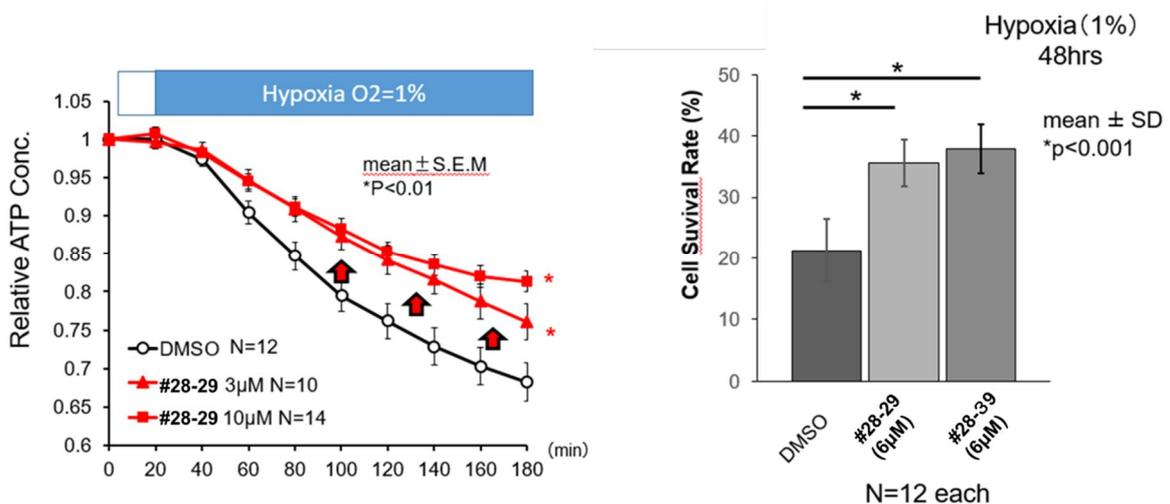


図7, ラット心筋細胞における#28 系統化合物の ATP 産生効率増加と低酸素耐性獲得効果。ラット心筋細胞に低酸素負荷をかけると細胞内 ATP 濃度が低下するが G0s2 分解抑制剤の前投与によりその低下速度が抑えられ (左) また心筋細胞の低酸素負荷時の生存率が有意に増加する (右)。

#28 系統中で最も細胞に対する薬効の強い #28-69 は、マウス生体内でも 10mg/kg の腹腔内投与により各臓器における G0s2 の強い発現上昇が確認されている。同化合物の薬物動態は共有結合化合物であるため心臓および脳における薬物濃度は比較的高く保たれており生体内 POC を得るために使用した。

生体内 POC を得る評価系としてはマウスを用いた心臓でのエネルギー産生効率測定系を新たに確立した。まず酸化的リン酸化酵素の NADH/FADH 使用速度は [11C]-acetate の心臓での減衰速

度 (Kmono) にほぼ比例すると仮定できる。ATP 消費速度は心臓では心筋仕事量 (一回拍出量 X 血圧 X 心拍数) にほぼ比例することから、心筋仕事量/Kmono を心筋細胞内ミトコンドリアにおけるエネルギー産生効率として定量化できる。事実、ミトコンドリア機能が低下した複数のマウスモデルにおいて病態に応じた本指標の低下を再現性良く観察している。開発中化合物#28-69 で本指標の有意な上昇を確認した (図 8)。

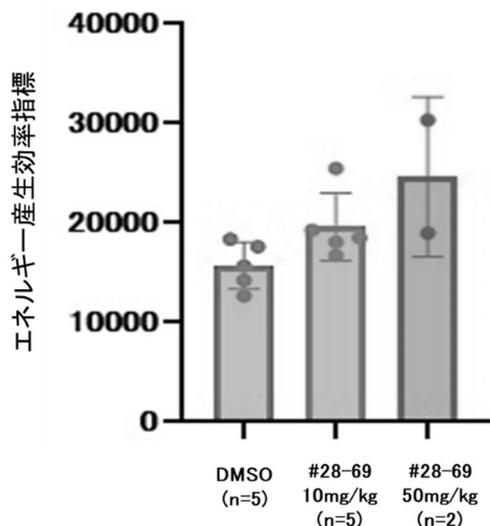


図 8, #28-69 によるエネルギー産生効率増強作用
マウスに 5 日間化合物を腹腔内連続投与し、5 日目投与の 8 時間後に、[11C]-acetate を投与し心臓での減衰速度を PET-CT により測定した (Kmono)。同時に心臓駆出インデックス (SVI) および心拍数 (HR)、血圧 (BP) を測定し心筋仕事量を計算した (SVI X HR X BP)。エネルギー産生効率は SVI X HR X BP / Kmono で算出した。

以上のように新規に同定した GOS2 分解抑制化合物は、生体内外でエネルギー需給バランス不全を改善し、心筋細胞の生存率や機能を改善させることが示された。リード最適化合物である #28-69 は GOS2 に直接結合し ADMET 指標・心臓移行性も良好であった。そこで、本事業の成果として心不全治療を用途とする #28 系統化合物の物質特許を本事業の最終年度である 2024 年 3 月に出願した。今後、本薬剤を使用した心不全の病態解明をすすめていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9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 Okamoto Chisato, Tsukamoto Osamu, Hasegawa Takuya, Matsuoka Ken, Amaki Makoto, Kanzaki Hideaki, Izumi Chisato, Takashima Seiji, Ito Shin, Kitakaze Masafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Association Between B-Type Natriuretic Peptide Deficiency and Left Ventricular Concentric Hypertrophy in Subclinical Individuals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JACC: Asia	6. 最初と最後の頁 87 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacasi.2023.10.002	査読の有無 無
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 Kameda Satoshi, Higo Shuichiro, Shiba Mikio, Kondo Takumi, Li Junjun, Liu Li, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Okuno Shota, Ogawa Shou, Kuramoto Yuki, Yasutake Hideki, Lee Jong-Kook, Takashima Seiji, Ikeda Yoshihiko, Hikoso Shungo, Miyagawa Shigeru, Sakata Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated From Female Becker Muscular Dystrophy Carrier	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 599 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2022.11.007	査読の有無 無
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 Kameda Satoshi, Higo Shuichiro, Shiba Mikio, Kondo Takumi, Li Junjun, Liu Li, Tabata Tomoka, Inoue Hiroyuki, Okuno Shota, Ogawa Shou, Kuramoto Yuki, Yasutake Hideki, Lee Jong-Kook, Takashima Seiji, Ikeda Yoshihiko, Hikoso Shungo, Miyagawa Shigeru, Sakata Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated From Female Becker Muscular Dystrophy Carrier	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 599 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2022.11.007	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 Uegaki Kaiiku, Tokunaga Yuji, Inoue Michio, Takashima Seiji, Inaba Kenji, Takeuchi Koh, Ushioda Ryo, Nagata Kazuhiro	4. 巻 42
2. 論文標題 The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112742 ~ 112742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112742	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 Hitsumoto Tatsuro et al (代表者がlast author)	4. 巻 147
2. 論文標題 Restoration of Cardiac Myosin Light Chain Kinase Ameliorates Systolic Dysfunction by Reducing Superrelaxed Myosin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1902 ~ 1918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062885	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 Nishida Yuya, et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allosteric site from mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34771-y	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 Oya Ryohei, Tsukamoto Osamu, Hitsumoto Tatsuro, Nakahara Naoya, Okamoto Chisato, Matsuoka Ken, Kato Hisakazu, Inohara Hidenori, Takashima Seiji	4. 巻 23
2. 論文標題 Gene Transfer of Skeletal Muscle-Type Myosin Light Chain Kinase via Adeno-Associated Virus 6 Improves Muscle Functions in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031747	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 Inoue Hiroyuki, Nakamura Satoki, Higo Shuichiro, Shiba Mikio, Kohama Yasuaki, Kondo Takumi, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Okuno Shota, Ikeda Yoshihiko, Li Junjun, Liu Li, Yamazaki Satoru, Takeda Maki, Ito Emiko, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 17
2. 論文標題 Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 337 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.12.016	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 Hakui Hideyuki, Kioka Hidetaka, Miyashita Yohei, Nishimura Shunsuke, Matsuoka Ken, Kato Hisakazu, Tsukamoto Osamu, Kuramoto Yuki, Takawa Ayako, Takahashi Yusuke, Saito Shigeyoshi, Ohta Kunio, Asanuma Hiroshi, Fu Hai Ying, Shinomiya Haruki, Yamada Noriaki, Ohtani Tomohito, Takashima Seiji, et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in the co-chaperone protein BAG5 cause dilated cardiomyopathy requiring heart transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eabf3274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.abf3274	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 Min Kyung-Duk, Asakura Masanori, Shirai Manabu, Yamazaki Satoru, Ito Shin, Fu Hai Ying, Asanuma Hiroshi, Asano Yoshihiro, Minamino Tetsuo, Takashima Seiji, Kitakaze Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 ASB2 is a novel E3 ligase of SMAD9 required for cardiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02390-0	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 Okamoto Chisato, Tsukamoto Osamu, Hasegawa Takuya, Hitsumoto Tatsuro, Matsuoka Ken, Takashima Seiji, Amaki Makoto, Kanzaki Hideaki, Izumi Chisato, Ito Shin, Kitakaze Masafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Lower B type natriuretic peptide levels predict left ventricular concentric remodelling and insulin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 636 ~ 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13700	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 G0S2タンパク質分解阻害剤	発明者 高島成二、加藤久和、木岡秀隆、春田純一、駒川晋輔、坂	権利者 国立大学法人 大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-042729	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	加藤 久和 (KATO HISAKAZU) (30589312)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	松岡 研 (MATSUOKA KEN) (90826190)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	

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