

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07821

研究課題名（和文）ライソゾーム病に対するアロステリックシャペロン療法による新規治療法の開発研究

研究課題名（英文）Development of novel allosteric chaperone therapy for lysosomal storage diseases

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、神経症状を示すライソゾーム病としてGM1-ガングリオシドーシスとゴーシェ病に対し、我々が見いだした阻害活性を示さない新しいタイプの薬理的シャペロン化合物を用い、試験管内試験と培養細胞試験によりその有効性を調べた。培養細胞試験で、各化合物の変異型特異的な活性上昇効果を認めた。また、ゴーシェ病化合物について、正常酵素をシャペロン化合物の同時投与による相乗効果を認めた。さらに、ゴーシェ病細胞のミトコンドリア機能異常に対する相補効果も認めた。以上の結果は、これらの化合物が新規アロステリックシャペロン薬候補化合物としての有用性を示すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性ライソゾーム病の脳病態に有効な治療法の開発が求められている現状に対し、薬理的シャペロン療法は有効な治療アプローチで、その開発研究は重要である。また、副反応の低い新しい治療法の開発は、将来的なシャペロン療法の応用のためにも有用な知見を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored the candidate chaperone compounds' effects for beta-galactosidase deficiency and Gaucher disease in in vitro and cultured cell experiments. All the compounds showed no specific substrate competitive inhibition activity in vitro. And they showed enzyme enhancement activity in mutation specific manner in cultured cells. When cell treated with both chaperone and purified human normal beta-Glucosidase, synergetic effect was observed. In addition, chaperone for Gaucher disease showed restoration of mitochondrial abnormality in mutant GBA1 expressed cells. These results provided us important insights into efficacy of these compounds as candidate for chaperone therapy in the future.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：シャペロン アロステリック ライソゾーム 低分子化合物 治療法開発 中枢神経障害

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は、ライソゾーム内に局在するライソゾーム加水分解酵素の遺伝的欠損により引き起こされる先天代謝異常症で、原因の異なる 50 種類以上の疾患からなる疾患群の総称である。ライソゾーム病の治療法は、酵素補充療法、造血幹細胞移植療法、基質合成抑制療法、薬理的シャペロン療法などが、いくつかのライソゾーム病に応用されている。一方で、ライソゾーム病の半数以上の疾患は、乳児期から小児期にかけて中枢神経症状を主症状として発症する神経難病であることから、脳病態に有効な治療法が求められている。我々は、これまで、中枢神経症状を示すライソゾーム病を標的として、薬理的シャペロン療法の開発研究を行ってきた。この療法は、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、細胞内で構造的に不安定な変異ライソゾーム酵素に結合させ安定化させることで、変異酵素活性を上昇させ、効果を与える方法である。また、低分子物質であるシャペロン化合物は経口投与が可能で、脳を含む広範な組織に対する効果を与えることが可能となる。ファブリー病に対するシャペロン薬ガラフォールドは、2018 年より本邦でも応用され、有効性が実証されてきている。一方で、これまで開発されているシャペロン化合物の大半は、標的酵素の基質と類似構造をもち、高濃度作用させると阻害活性を示す問題点が指摘されている。よって、従来の阻害型シャペロンでは、投与濃度の設定が重要となり、また、近年では、阻害活性を示さない新しいタイプのシャペロン化合物の開発も進められていた。

2. 研究の目的

我々は、試験管内で標的ライソゾーム酵素に対する安定化活性を定量的に測定することができる系を独自に開発し、この系を用いた低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、GM1-ガングリオシドーシスの欠損酵素である β -ガラクトシダーゼ、およびゴーシェ病の欠損酵素である β -グルコシダーゼに対し、試験管内安定化活性を示す一群の化合物を選別した。本研究課題では、それらの化合物の中でも、阻害活性を示さない化合物群に着目し、培養細胞系を用い、酵素安定化活性の変異特異性などの活性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・シャペロン候補化合物

ヒト β -ガラクトシダーゼに対する候補化合物として AC-GM1 と AC-GM2 を、ヒト β -グルコシダーゼに対する候補化合物として AC-GD1 を用いた。これらの化合物はいずれも分子量 300~400 の低分子化合物である。

・ライソゾーム酵素活性測定

ヒト β -ガラクトシダーゼとヒト β -グルコシダーゼの活性測定は、蛍光 4-MU 標識された特異的基質を用い、測定した。また、最終活性値は、細胞抽出液中の蛋白質量で補正した。

・試験管内基質競合阻害活性試験

化合物の試験管内基質競合阻害活性試験は、酵素蛋白質、基質および各濃度の化合物を混和後、37℃ で反応し、遊離 4-MU 蛍光量を測定した。阻害活性はコントロール活性に対する比活性で求めた。また、既存の阻害型シャペロン化合物 NOEC と NOV を陽性コントロールとして用いた。

・培養細胞に対する酵素活性上昇効果(シャペロン活性)の測定

ヒト β -ガラクトシダーゼ欠損 HAP1 細胞株 (HAP-GLB1KO 細胞) およびヒト β -グルコシダーゼ欠損 HAP1 細胞株 (HAP-GBA1KO 細胞) に対し、変異 GLB1-cDNA および変異 GBA1-cDNA 発現ベクターを一過性に発現後、化合物を含む培地で 48 時間培養し、その後、細胞内酵素活性を測定した。

・ミトコンドリア染色

細胞内ミトコンドリア活性染色は、MitoTracker-Red 試薬を用い生細胞で染色した。蛍光画像は、共焦点顕微鏡 (Nikon 社) を用い取得した。

4. 研究成果

ヒト β -ガラクトシダーゼに対する候補化合物 AC-GM1 と AC-GM2、またはヒト β -グルコシダーゼに対する候補化合物 AC-GD1 はいずれも試験管内で標的酵素に対し安定化活性を示すシャペロン候補化合物である。これらの化合物の試験管内基質競合阻害活性を調べた結果、AC-GM1 と AC-GM2 はヒト β -ガラクトシダーゼ、AC-GD1 はヒト β -グルコシダーゼに対する基質競合阻害活性を示さなかった (図 1)。これらの結果は、これらの化合物が基質結合部位でないアリストリッ

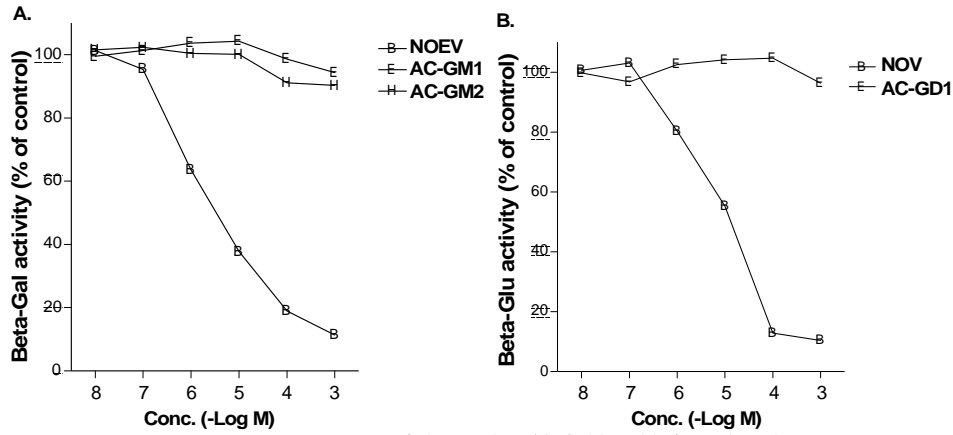


図 1. シャペロン化合物の試験管内基質競合阻害活性

A. ヒト β -ガラクトシダーゼ、B. ヒト β -グルコシダーゼ、に対する基質競合阻害活性を示す。

ク部位に結合する可能性を示した。次に、AC-GM1 の変異酵素に対するシャペロン効果を調べた。GM1-ガングリオシドーシス患者で同定された 10 種類の変異を導入した変異 GLB1-cDNA 発現ベクターを一過性に発現した細胞に対する AC-GM1 のシャペロン効果を調べた結果、p.R59H、p.G190D、p.R201C、p.R208C および p.R482H の 5 種類の変異に対し有意な効果を認めた (図 2)。同様に、ゴーシェ病の 6 種類の変異に対する AC-GD1 のシャペロン

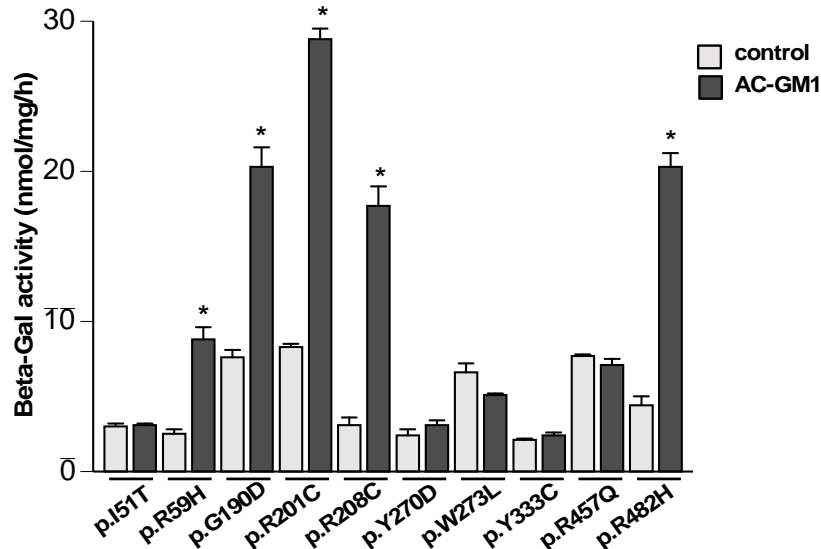


図 2. AC-GM1 化合物の変異 β -ガラクトシダーゼに対するシャペロン活性

変異 GLB1 cDNA を一過性に発現させた細胞を通常培地および AC-GM1 を含む培地で 48 時間培養後の細胞内酵素活性を示す。

効果を調べた結果、p.N188S、p.F213I、p.N370S および p.L444P の 4 種類の変異に有意な効果を認めた (図 3)。次に、ゴーシェ病の p.F213I 変異 GBA1 を発現させた細胞を用い、AC-GD1

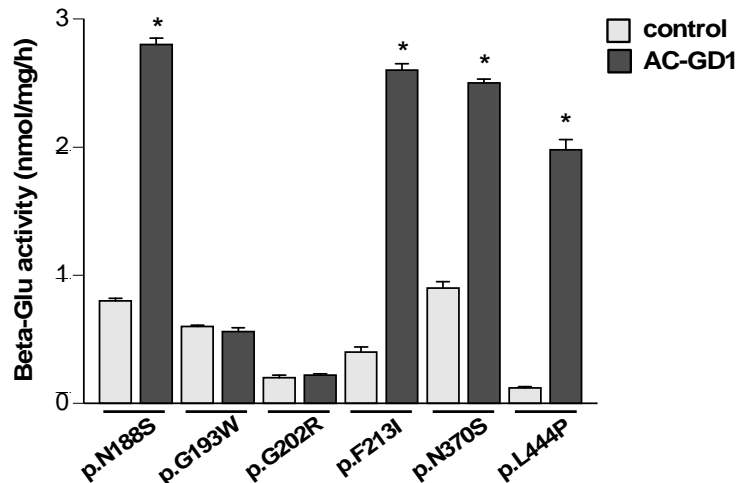


図 3. AC-GD1 化合物の変異 β -グルコシダーゼに対するシャペロン活性

変異 GBA1 cDNA を一過性に発現させた細胞を通常培地および AC-GD1 を含む培地で 48 時間培養後の細胞内酵素活性を示す。

またはヒト β -グルコシダーゼ酵素、および AC-GD1 とヒト β -グルコシダーゼ酵素の両方を投与後の細胞内酵素活性を測定した。結果、シャペロン化合物の酵素蛋白質を同時に投与することで、相乗的な活性上昇効果を認めた (図 4)。さらに、ゴーシェ病の細胞病態に対するシャペロ

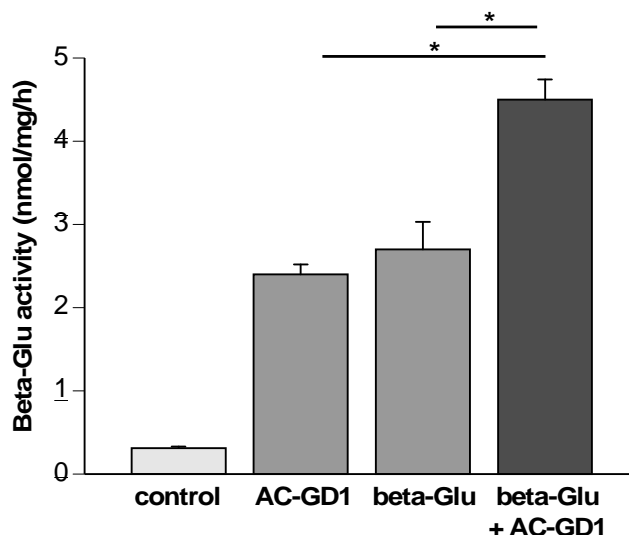


図 4. AC-GD1 化合物と β -グルコシダーゼ酵素の相乗効果

変異 GBA1 cDNA (p.F213I) を一過性に発現させた細胞を通常培地、AC-GD1、 β -グルコシダーゼ酵素および AC-GD1 と β -グルコシダーゼ酵素を含む培地で 48 時間培養後の細胞内酵素活性を示す。

ン化合物の効果を調べた。GBA1 欠損細胞では、MitoTracker の染色シグナルが野生型細胞にくらべ著しく低下を認めた。一方で、変異 GBA1 (p.F213I と p.L444P) を発現した細胞では、AC-GD1 を含む培地で培養後、MitoTracker の染色シグナルが回復することが分かった (図 5)。このことは、変異 β -グルコシダーゼの活性上昇にともなう二次的なミトコンドリア異常を正常化することを示した。

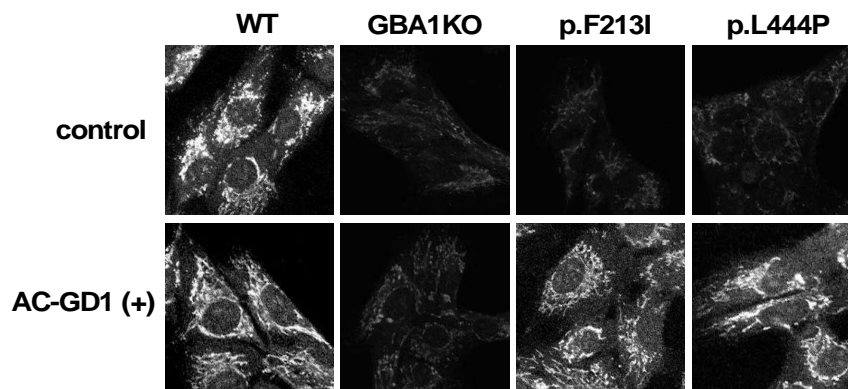


図 4. AC-GD1 化合物のミトコンドリア異常に対する効果

正常、HAP1-GBA1KO、および変異 GBA1 cDNA (p.F213I と p.L444P) を一過性に発現させた細胞を通常培地および AC-GD1 を含む培地で 48 時間培養後の MitoTracker 染色像を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gonzalez-Cuesta M, Herrera-Gonzalez I, Garcia-Moreno MI, Ashmus RA, Vocadlo DJ, Garcia Fernandez JM, Nanba E, Higaki K, Ortiz Mellet C.	4. 巻 37
2. 論文標題 sp2-Iminosugars targeting human lysosomal α -hexosaminidase as pharmacological chaperone candidates for late-onset Tay-Sachs disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Enzyme Inhib Med Chem	6. 最初と最後の頁 1364-1374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14756366.2022.2073444	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 Yamada Y, Miwa T, Nakashima M, Shirakawa A, Ishii A, Namba N, Kondo Y, Takeo T, Nakagata N, Motoyama K, Higashi T, Arima H, Kurauchi Y, Seki T, Katsuki H, Okada Y, Ichikawa A, Higaki K, Hayashi K, Minami K, Yoshikawa N, Ikeda R, Ishikawa Y, Kajii T, Tachii K, Takeda H, Orita Y, Matsuo M, Irie T, Ishitsuka Y.	4. 巻 155
2. 論文標題 Fine-tuned cholesterol solubilizer, mono-6-O- α -D-maltosyl- β -cyclodextrin, ameliorates experimental Niemann-Pick disease type C without hearing loss.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother,	6. 最初と最後の頁 113698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113698	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 Yamada Yusei, Ishitsuka Yoichi, Kondo Yuki et al	4. 巻 178
2. 論文標題 Differential mode of cholesterol inclusion with 2 hydroxypropyl β -cyclodextrins increases safety margin in treatment of Niemann Pick disease type C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 2727 ~ 2746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15464	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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------