

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15391

研究課題名(和文) 副作用のない画期的な「自己不活型新規シャペロン」の開発

研究課題名(英文) Development of new self-inactivating chaperon without side effects

研究代表者

難波 栄二 (Nanba, Eiji)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：変異酵素蛋白質結合し、構造異常を補正する化合物(シャペロン化合物)を用い、変異酵素活性を上昇させるシャペロン療法の開発を行っている。本研究では、ライソゾーム酸性環境下で構造変化し、不活性化型に変換することで標的酵素蛋白質から解離する「自己不活型新規シャペロン」の開発を行った。デオキシノジリマイシン(DGJ)化合物を元に、pHにより構造変化を起こすオルトエステル基を付加した候補化合物を合成した。これらの化合物を用い、ファブリー病とゴーシェ病を対象に試験管内および培養細胞を用いた検討を行った。その結果、当初のコンセプト通り、高濃度使用時にも酵素阻害活性を示さない、それぞれ疾患への化合物を同定できた。

研究成果の概要(英文)：We developed "self-inactivating novel chaperone" which undergoes structural change under acidic condition in lysosome and dissociates from target enzyme protein by conversion to inactive form. Based on the deoxynojirimycin (DGJ) compound, several candidate compounds were synthesized by adding an orthoester group. The structure of compounds changed by pH change. We studied the effect of these compounds for Fabry and Gaucher diseases using in vitro and cultured cells. As a result, we identified the compounds as original concept. The compounds did not show enzyme inhibition even when used at high concentrations.

研究分野：人類遺伝学 小児神経学

キーワード：シャペロン ライソゾーム病 ファブリー病 ゴーシェ病 自己不活型

1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症の一つであるライソゾーム病は、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。約 60 種類の異なる疾患からなるライソゾーム病のうち、約半数は新生児から小児期に重篤な中枢神経症状を主症状に発症する、神経難病である。患者細胞では、ライソゾーム加水分解酵素活性欠損により、未分解の基質がライソゾーム内に異常蓄積し、様々な細胞障害の原因となる。ライソゾーム病の治療法は、欠損酵素蛋白質を補う酵素補充療法が臨床応用されているが、酵素蛋白質が血液脳関門を通過しないことから、脳への効果は見られない。我々は変異酵素蛋白質に特異的に結合し、構造異常を補正することのできる化合物(シャペロン化合物)を用い、変異酵素活性を上昇させるシャペロン療法の開発に取り組んできた。この方法では、低分子化合物であるシャペロンが血液脳関門を通過し、脳への効果が見られることから、ライソゾーム病の脳病態に有効な新規治療法として開発が進んでいる。一方で、従来のシャペロン化合物は、基本的に酵素活性中心に結合する基質競合阻害剤であり、高濃度で使用すると酵素阻害活性を示す問題があることが分かり、この問題を克服する新しいコンセプトのシャペロン化合物の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究で、我々は、ライソゾーム酸性環境下で構造変化を起こすことで不活性型に変換し、酵素蛋白質から容易に解離することで副作用を示さない「自己不活型新規シャペロン」の開発を行うことを目的とした。標的酵素として、ファブリー病とゴーシェ病で欠損しているライソゾーム酵素、 α -ガラクトシダーゼ A と β -グルコシダーゼに対し、分子デザインした候補化合物から、試験管内および培養細胞に対する効果試験により、最も有効な化合物を同定し、その効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補化合物

デオキシノジリマイシン (DGJ) は、広範な糖加水分解酵素に対し阻害活性を示す化合物で、この化合物構造に、pH により構造変化を起こすオルトエステル基を付加した α -ガラクトシダーゼ A 酵素に対する候補化合物 3 個 (F1~F3) および β -グルコシダーゼに対する候補化合物 3 個 (G1~G3) 新規に有機

合成した。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。また、シャペロン化合物 DGJ と NOV は、それぞれ α -ガラクトシダーゼ A と β -グルコシダーゼに対するコントロールとして用いた。

(2) ライソゾーム酵素活性測定

ファブリー病の欠損酵素 α -ガラクトシダーゼ A とゴーシェ病の欠損酵素 β -グルコシダーゼ酵素活性は、それぞれ 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) 標識した人工基質を用い測定した。

(3) 試験管内酵素基質競合阻害活性測定

培養正常ヒト線維芽細胞ライセートを用い、各候補化合物および人工基質を混和後、37 度 30 分反応後、遊離 4-MU 蛍光量を蛍光プレートリーダーで測定した。コントロール値に対する相対活性により、基質競合阻害活性を測定した。

(4) 培養細胞試験

化合物の培養細胞に対する酵素活性上昇効果の検討は、培養液に各濃度の化合物を含む培地に交換し、4 日後に細胞内の酵素活性を測定し、行った。変異酵素への化合物の効果は、培養 COS 細胞に 17 種類の変異 GLA cDNA 発現ベクターを一過性に導入した細胞を用い、行った。また、細胞毒性試験は、化合物を投与 24 時間後の培地を用い、LDH 活性測定に行った。

(5) 免疫蛍光染色と画像取得

細胞内 Gb-3 の発現量の解析は、抗 Gb-3 を用い、免疫蛍光染色により行った。蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡を用い取得した。

4. 研究成果

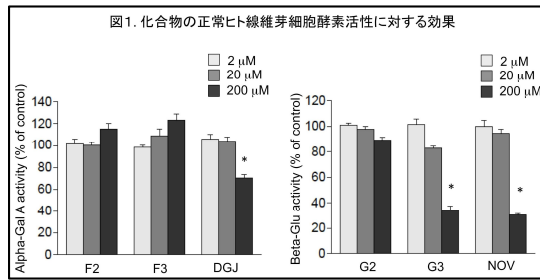
(1) 試験管内活性

中性条件下での F1~F3 化合物のヒト α -ガラクトシダーゼ A 酵素に対する IC50 値はそれぞれ、3.5、0.93、1.1 nM で、酸性条件下では阻害活性を示さなかった。また、同様に、中性条件下での G1~G3 化合物の β -グルコシダーゼ酵素に対する IC50 値はそれぞれ 32.6、0.2、0.15 nM で、酸性条件下では阻害活性を示さなかった。

(2) 培養細胞に対する酵素活性上昇効果

培養正常ヒト線維芽細胞に対する LDH 毒性試験の結果、F1 の 200 μ M および G1 の 20 と 200 μ M で有意な細胞毒性を認めた。また、正

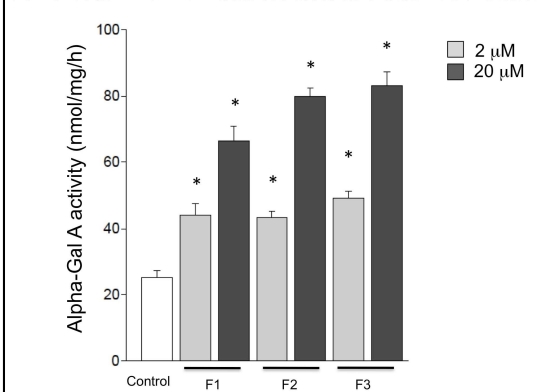
常ヒト線維芽細胞を各濃度の化合物を含む培地で4日間培養後、 α -ガラクトシダーゼAおよび β -グルコシダーゼ酵素活性を測定した。結果、 α -ガラクトシダーゼAに対し200 μ MのDGJで有意な酵素活性減少効果を認めただに対し、F2とF3では活性減少効果を認めなかった。また、 β -グルコシダーゼに対し、200 μ MのG3とNOVは有意な酵素活性減少効果を認めただに対し、G2では認めなかった(図1)。この結果から、F2とF3およびG2化合物は、当初のコンセプト通り酸性ライゾソーム内で構造変化し、阻害活性を示さない



化合物であることが示された。

次に、変異酵素活性に対する化合物の活性上昇効果について検討した。F1~F3化合物を、R301G変異をもつファブリー病皮膚線維芽細胞に4日間投与後の細胞内 α -ガラクトシダーゼA酵素活性を測定した結果、いずれの化合物でも有意な酵素活性上昇効果を認め、特

図2. 化合物のファブリー病患者皮膚線維芽細胞に対する効果

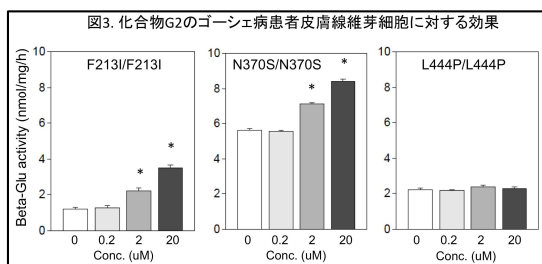


に200 μ MのF3は非投与細胞の3.3倍の活性上昇効果をもとめた(図2)。

また、3株のゴーシェ病皮膚線維芽細胞(F213I/F213I、N370S/N370S、L444P/L444P)を用い、化合物G2の変異酵素活性に対する効果を同様に調べた結果、2及び20 μ MのG2はF213IとN370S変異酵素活性を有意に上昇させる効果を示した(図3)。

(3) 細胞内基質蓄積に対する効果

R301G変異をもつファブリー病皮膚線維芽

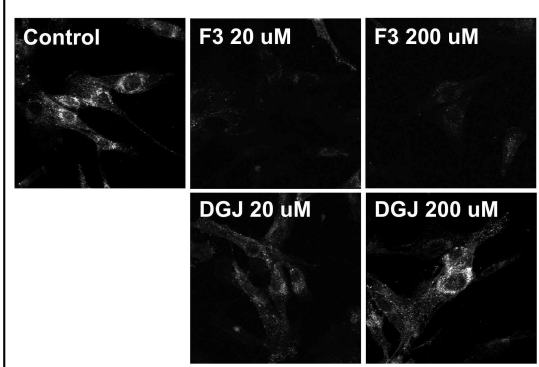


細胞に各化合物を含む培地で4日間培養後、抗Gb-3抗体免疫蛍光染色を行い、基質Gb-3蓄積に対する効果を調べた。結果、20 μ MのDGJは有意にGb-3蓄積の減少を認めたが、2200 μ Mでは蓄積が認められた。一方、化合物F3はいずれの濃度でも基質蓄積に対する減少効果を認めた(図4)。

(4) 結果まとめ

試験管内および培養細胞を用いた検討により、当初のコンセプト通り、高濃度使用時

図4. 化合物F3の基質Gb-3蓄積に対する効果



にも酵素阻害活性を示さない新規シャペロン化合物として、ファブリー病に対するF3、ゴーシェ病に対するG2化合物を同定できた。今後は、他の変異型に対するF3とG2化合物の有効性を明らかにするとともに、モデルマウス投与試験により、各病態に対する治療効果を明らかにすることで、新規シャペロン治療薬の開発につながってゆくものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Navo CD, Corzana F, Sánchez-Fernández EM, Busto JH, Avenoza A, Zurbano MM, Nanba E, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Peregrina JM.

Conformationally-locked C-glycosides: tuning aglycone interactions for optimal chaperone behaviour in Gaucher fibroblasts. *Org Biomol Chem*. 14, 1473-1484, 2016
doi: 10.1039/c5ob02281a

Mena-Barragán T, García-Moreno I, Nanba E, Higaki K, et al, Inhibitor versus chaperone behaviour of fagomine, DAB and LAB sp²-iminosugar conjugates against glycosidases: A structure-activity relationship study in Gaucher fibroblasts. *Eur J Med Chem*, 121, 880-9891, 2016
doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.038

de la Fuente A, Rísquez-Cuadro R, Verdaguer X, García Fernández JM, Nanba E,

Higaki K, Ortiz Mellet C, Riera A.
Efficient stereoselective synthesis of
2-acetamido-1,2-dideoxyallonojirimycin
(DAJNAc) and sp(2)-iminosugar conjugates:
Novel hexosaminidase inhibitors with
discrimination capabilities between the
mature and precursor forms of the enzyme.
Eur J Med Chem, 121, 926-938, 2016
doi: 10.1016/j.ejmech.2015.10.038

Narita A et al (Higaki K 19 番目, Nanba
E 20 番目), Ambroxol Chaperone Therapy for
Neuronopathic Gaucher Disease: A pilot
study. Annals of Clinical and
Translational Neurology, 3, 200-215, 2016
doi: 10.1002/acn3.292

Mena-Barragán T, Narita A, Matias D,
Tiscornia G, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y,
Higaki K, García Fernández JM, Ortiz
Mellet C. Highly pH-responsive
pharmacological chaperones for mutant
glycosidase enhancement. Angew Chem Int Ed
Engl, 54, 11696-11700, 2015
doi: 10.1002/anie.201505147

〔学会発表〕(計 2 件)

成田綾, 檜垣克美, 難波栄二、ライソゾーム病に対する pH 感受性新規シャペロン化合物の開発、第 57 回日本先天代謝異常学会、2015 年 11 月 13 日、大阪国際会議場(大阪市)

難波栄二, 檜垣克美, ライソゾーム病に対する pH 依存的に不活化する新規シャペロン化合物の開発、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 16 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 栄二 (NANBA Eiji)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

(2) 研究分担者

檜垣 克美 (HIGAKI Katsumi)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号：90294321