

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07338

研究課題名（和文）ATP産生制御因子の安定化によるミトコンドリア病の新規治療薬開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental Research for the Development of Novel Therapeutic Agents for Mitochondrial Diseases by Stabilizing Regulators of ATP Production

研究代表者

加藤 久和 (Kato, Hisakazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30589312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、ATP産生制御因子GOS2のタンパク質分解を阻害することでATP産生を増強させる化合物、ATP合成酵素活性化剤を同定した。本化合物の作用機序およびミトコンドリア病の治療薬としての妥当性を検証した。本化合物がGOS2の1か所のアミノ酸に共有結合することを明らかにし、その分解阻害機序の一端を解明した。ミトコンドリア病患者細胞にGOS2が発現することを見出し、ミトコンドリア病への治療介入の可能性を見出した。構造展開によりin vivo投与可能な化合物の開発に成功し、今後は患者細胞での本化合物による治療効果および既に保有・飼育中の動物モデルへの投与を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアATP合成の低下により細胞死を引き起こし様々な臓器機能の低下を引き起こす希少疾患である。ミトコンドリア病の本質的な治療薬は未だ開発されていない。本研究で明らかにしたATP合成酵素活性化剤は、直接的に細胞内ATPを増産できる点において、画期的なミトコンドリア病の治療薬開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：We identified a compound that enhances ATP production by inhibiting the protein degradation of the ATP production regulator GOS2. In this study, we verified the mechanism of action of this compound and its validity as a therapeutic agent for mitochondrial diseases. We found that the compound covalently binds to one amino acid within GOS2, and partly elucidated the mechanism of inhibition of its degradation. We confirmed that GOS2 is expressed in cells derived from patients of mitochondrial diseases and raised the possibility of therapeutic intervention for mitochondrial diseases. We have succeeded in developing a compound that can be administered in vivo by structural optimization, and will proceed with the therapeutic effects of this compound in patient-derived cells and administration to animal models that we already possess and are breeding.

研究分野：分子心臓学

キーワード：ミトコンドリア病 ATP タンパク質分解 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア病に対する革新的治療薬の必要性

ミトコンドリア病は、ミトコンドリア ATP 合成の低下によるエネルギーバランス不全により細胞死を引き起こし様々な臓器機能の低下を引き起こす希少疾患である。現行のミトコンドリア病の治療は症状に応じたエネルギー消費の制限やビタミン剤の投与など対症療法のみであり、酸化リン酸化 (OXPHOS) 活性を直接的に上昇させるミトコンドリア病の本質的な治療薬は未だ開発されていない。一方で、OXPHOS の活性化はミトコンドリア病の病態を改善させることが報告されており (Cell Metab. 2008, 8, 249-256, Cell Metab. 2011, 14, 80-90) ATP 合成を増強させる薬剤の開発は革新的な治療薬になることが期待される。

(2) ATP 産生制御因子 G0S2 の同定と分解制御機構

我々は心筋細胞におけるエネルギー代謝の重要性を考え、蛍光プローブを用いた生細胞および生体における ATP 濃度測定系を開発した。この開発を通じて、低酸素に応答して発現誘導され、ATP 合成酵素と結合して ATP 産生を増加させることにより細胞保護的に働くタンパク質 G0S2 の同定に成功した (Kioka H, Kato H et al. PNAS 2014, 111, 273-278)。また、G0S2 の短いタンパク質寿命に着目し、G0S2 タンパク質分解に関わる新規因子や新規化合物のスクリーニングを提案し、ハイコンテンツイメージング装置を用いた細胞ベースのハイスループットスクリーニング系を構築した。このスクリーニング系を利用して、G0S2 タンパクの分解に寄与する E3 リガーゼをスクリーニングし、新たな G0S2 特異的 E3 複合体として RNF126・Bag6 を同定した (図 1, Kamikubo K, Kato H, et al., JBC 2019, 294, 14562-14573)

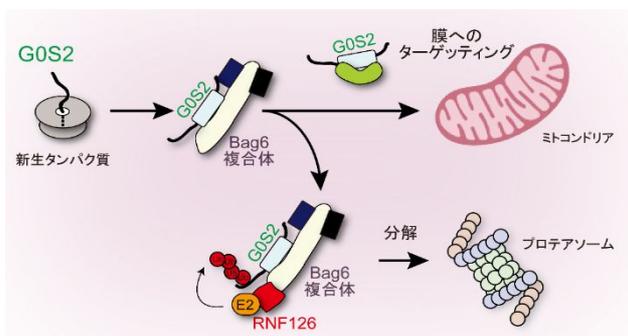


図 1 G0S2 タンパク質の分解メカニズム

(3) G0S2 タンパク質安定化による ATP 合成酵素活性化剤の開発

G0S2 の低酸素における ATP 合成酵素活性化と細胞保護的役割は、虚血性心疾患における治療戦略になり得ると考え、先述のスクリーニング系を利用して G0S2 のタンパク質分解を阻害する化合物のスクリーニングを実施し、心筋細胞の ATP 産生能を増強する複数のヒット化合物の同定に成功した。また細胞ベースのスクリーニングで同定したヒット化合物が G0S2 に直接的に結合することも明らかにした。

2. 研究の目的

これまでに得られた ATP 合成酵素活性化剤による G0S2 の安定化と ATP 産生の増強効果は、OXPHOS 機能が障害されるミトコンドリア病の新たな治療薬の開発につながることを期待される。本研究では、ATP 合成酵素活性化剤による G0S2 タンパク質安定化メカニズムの解明を目指すとともに、G0S2 の安定化がミトコンドリア病患者細胞の機能を改善させるかを検討し、ATP 合成酵素活性化剤の新規ミトコンドリア病治療薬としての妥当性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ATP 合成酵素活性化剤の G0S2 タンパク質特異的分解阻害メカニズムの解明

G0S2 が RNF126・BAG6 複合体によって分解されること、その分解を阻害する化合物は G0S2 に直接的に結合することを明らかにした。そこで、以下 2 点について検討する。

(1)-1 質量分析によって G0S2-化合物の結合部位を探索し、同定したのちに変異体を用いて詳細な検討を行う。

(1)-2 G0S2 を分解する E3 複合体の分子特異的な選別機構は未だ明らかではない。そこで、我々が特異的な結合タンパク質を同定する技術として開発してきた部位特異的細胞内光クロソリンク法を用いて、G0S2 特異的な分解メカニズムに関わる因子の同定を進め、ヒット化合物と G0S2 との結合に及ぼす影響についても検討する。

- (2) ミトコンドリア病患者細胞における G0S2 の介入の可能性検証
種々のミトコンドリア病患者細胞（線維芽細胞、筋芽細胞）における G0S2 の発現を検討し、これらの細胞への G0S2 の導入により、酸素消費量や ATP 産生量が改善できるかを検討する。
- (3) in vivo 投与を目指した ATP 合成酵素活性化剤の最適化
ヒット化合物は確かに ATP 産生を増強するが、物性・薬物動態が不十分であることが分かっている。そこでヒット化合物の合成展開およびその活性評価を行い、溶解度、薬物動態を改善し動物に投与できる物性化合物を同定する。
- (4) ミトコンドリア病患者細胞における ATP 合成酵素活性化剤の薬効評価
(2)で検討した知見をもとに、ヒット化合物および項目(3)で得られる化合物をミトコンドリア病患者細胞に処理し、酸素消費量や ATP 産生量、細胞生存率などを検討する。

4. 研究成果

- (1) ATP 合成酵素活性化剤の G0S2 タンパク質特異的分解阻害メカニズムの解明
(1)-1 化合物の G0S2 への結合部位同定
ATP 産生増強化合物の G0S2 タンパク質への結合部位を同定する目的でリコンビナントタンパク質の精製を行った。293T 細胞に FLAG-HA タグ付き G0S2 を発現させたのち化合物を添加して 4 時間後に細胞を回収し、FLAG-HA-G0S2 タンパク質を精製した。この精製物をトリプシン分解し質量分析 (LC-MS/MS) を行うことで、化合物が修飾されているアミノ酸を同定した。その結果 1 か所の進化上保存されているアミノ酸のみに共有結合していることが明らかとなった。次に、その結合部位のアミノ酸を置換した変異体 G0S2 を心筋細胞にレンチウイルスを用いて導入し、化合物を添加したところ、野生型と異なり、変異体は化合物投与下でも分解阻害による G0S2 タンパク質の蓄積を認めなかった。これらのことから、研究代表者が同定した新規ヒット化合物は G0S2 の 1 か所のアミノ酸に共有結合することで、タンパク質分解から免れていることが示唆された。

(1)-2 部位特異的光クロスリンク法を用いた G0S2 特異的分解メカニズムの解明

大阪大学薬学研究科・樋野展正講師との共同研究により開発した部位特異的光クロスリンク法を用いて、G0S2 に結合する新規タンパク質を探索し、G0S2 の分解メカニズムの解明を試みた。クロスリンクによって G0S2 に共有結合し、SDS-PAGE 上での分子量シフトを認めた複数の候補バンドを切り出して質量分析を実施した。その結果 G0S2 の新規結合タンパク質 X を同定することに成功した。タンパク質 X は既に BAG6 と結合することが報告されていたが、siRNA を用いたノックダウン実験により G0S2 タンパク質の分解阻害を認めた。このことからタンパク質 X が G0S2 特異的分解の分子機序としての役割を持つことが示唆された。

- (2) ミトコンドリア病患者細胞における G0S2 の介入の可能性検証
種々のミトコンドリア病患者細胞（線維芽細胞、筋芽細胞）および健常者から樹立した細胞を用いて、内因性 G0S2 の発現を Western Blot および RT-qPCR 法にて検討した。その結果線維芽細胞では正常、患者問わず発現が全く見られなかった。一方で筋芽細胞ではいくつかの患者細胞で G0S2 の発現を認めた。G0S2 の遺伝子導入は現在も検討中である。
- (3) in vivo 投与を目指した ATP 合成酵素活性化剤の最適化
BINDS の協力によりヒット化合物の合成展開による物性改善を進め、これまで約 100 化合物の新規合成と活性評価を終え、複数の高活性を示す化合物を得た。化合物は脂溶性・タンパク質結合率が高いものの、最適な溶媒を見出し、マウスでの良好な薬物動態を明らかにした。ミトコンドリア病モデルマウスの前段階として、野生型マウスでの化合物の薬効を検討した。野生型マウスに化合物を複数濃度で腹腔内投与し、心臓抽出サンプルの Western ブロットで G0S2 タンパク質の上昇を確認し投与化合物の G0S2 タンパク質分解阻害効果を明らかにした。

以上より、G0S2 の分解阻害により ATP 産生を促進する化合物は、G0S2 の 1 か所のアミノ酸に共有結合することを明らかにし、その分解機序の一端を解明した。ミトコンドリア病患者細胞に G0S2 が発現することを見出し、ミトコンドリア病への治療介入の可能性を見出した。構造展開により in vivo 投与可能な化合物の開発に成功しており、今後は患者細胞での本化合物による治療効果および既に保有・飼育中の動物モデルへの投与を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinomiya H, Kato Hisakazu (共責任著者), Kuramoto Y, Watanabe N, Tsuruda T, Arimura T, Miyashita Y, Miyasaka Y, Mashimo T, Takuwa A, Motooka D, Okuzaki D, Matsuoka K, Tsukamoto O, Hakui H, Yamada N, Lee JK, Kioka H, Kitakaze M, Takashima S, Sakata Y, Asano Y	4. 巻 35
2. 論文標題 Aberrant accumulation of TMEM43 accompanied by perturbed transmural gene expression in arrhythmogenic cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100800R	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 H, Kioka H, Miyashita Y, Nishimura S, Matsuoka K, Kato Hisakazu, Tsukamoto O, Kuramoto Y, Takahashi Y, Saito S, Ohta K, Asanuma H, Fu HY, Shinomiya H, Yamada N, Ohtani T, Sawa Y, Kitakaze M, Takashima S, Sakata Y, Asano Y.	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 Oya Ryohei, Tsukamoto Osamu, Hitsumoto Tatsuhiro, 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 Kamikubo Kenta, Tsukamoto Osamu, Uyama-Saito Yuki, Oya Ryohei, Tsubota Tomoya, Fujino Noboru, Asano Yoshihiro, Kato Hisakazu, Matsuoka Ken, Takashima Seiji	4. 巻 160
2. 論文標題 Non-Radioactive In Vitro Cardiac Myosin Light Chain Kinase Assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61168	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 Yashirogi Shohei, Nagao Takemasa, Nishida Yuya, Takahashi Yusuke, Qaqorh Tasneem, Yazawa Issei, Katayama Toru, Kioka Hidetaka, Matsui Tsubasa S, Saito Shigeyoshi, Masumura Yuki, Tsukamoto Osamu, Kato Hisakazu, Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Yashiro Kenta, Yamazaki Satoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 22
2. 論文標題 AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP170	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050949	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 Miyashita Y, Tsukamoto O, Matsuoka K, Kamikubo K, Kuramoto Y, Fu HY, Tsubota T, Hasuike H, Takayama T, Ito H, Hitsumoto T, Okamoto C, Kioka H, Oya R, Shinomiya H, Hakui H, Shintani Y, Kato H, Kitakaze M, Sakata Y, Asano Y, Takashima S	4. 巻 35
2. 論文標題 The CR9 element is a novel mechanical load responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002111RR	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 NishidaY, YanagisawaS, MoritaR, ShigematsuH, Shinzawa-ItoH, YukiH, OgasawaraS, ShimutaK, IwamotoT, NakabayashiC, MatsumuraW, KatoH, GopalingamC, NagaoT, QaqorhT, TakahashiY, YamazakiS, KamiyaK, HaradaR, MizunoN, TakahashiH, AkedaY, OhnishiM, IshiiY, KumasakaT, MurataT, MuramotoK, TostaT, Shiroy, HonmaT, ShigetaY, KuboM, TakashimaS, ShintaniY.	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allosteric site of mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7591
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤 久和
2. 発表標題 ATP合成酵素活性化剤による虚血性心疾患治療法の開発
3. 学会等名 WISH & SEEDs マッチング会 ~ 大学SEEDsと企業WISHをモダリティと疾病領域の2軸で結ぶ初の取組み ~ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳山 信嗣,高橋 秀和, 加藤 久和, 藤野 志季, 荻野 崇之, 三吉 範克, 植村 守, 山本 浩文, 水島 恒和, 高島 成二, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 p53活性化による新規大腸癌治療法の開発
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田響子、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 BRAF の活性化は心筋細胞の脱分化を誘導する
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田響子、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 BRAF V600EによるMAPKシグナルの活性化は心筋細胞の脱分化を誘導する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 在田 麻美、加藤 久和、高橋 秀和、関戸 悠紀、波多 豪、荻野 崇之、三吉 範克、植村 守、土岐 祐一郎、江口 英利、高島 成二
2. 発表標題 新鮮臨床検体を用いた大腸癌新規標的分子の探索
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科医化学講座
<http://medbio.sakura.ne.jp/>

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