

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591498

研究課題名(和文)ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン療法の細胞内分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of chemical chaperone effect on lysosomal storage diseases

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン化合物の効果について、細胞内分子機構の解明を行った。化合物と標的酵素の結合結晶構造解析により、 α -ガラクトシダーゼ酵素に対するシャペロン効果に重要な水素結合を同定した。また、小胞体ストレス応答阻害剤の一つがシャペロン効果との相乗効果を示した。さらに、培養線維芽細胞で、シャペロン化合物と酵素蛋白質の結合・解離の酵素活性と基質蓄積に及ぼす影響を明らかにした。これらの結果より、今後の新規シャペロン化合物の開発に有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：I investigated the intracellular molecular mechanisms of chemical chaperone compounds to the lysosomal storage diseases. Co-crystal structural analysis of chaperone compound with lysosomal enzyme protein identified a potent hydrogen bond in human α -galactosidase A protein. I also investigated the synergistic effect of the proteostasis regulator with the chaperone compound. Cultured fibroblasts analyses also found that the effect of treatment or washout of chaperone compounds on α -galactosidase enzyme activities as well as substrate accumulation. These results provided us important insights applicable to develop new chaperone compounds for other lysosomal diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ライソゾーム病 脂質代謝異常 脳疾患 治療法開発 シャペロン 蛋白質分解 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム蓄積症とは先天代謝異常症の一つの疾患群で、細胞内小器官ライソゾームの加水分解酵素やその補酵素などの遺伝的欠損により、細胞内に未分解の基質が蓄積することによって引き起こされ、多くは新生児期から小児期に重篤な中枢神経症状を主症状に発症する。ライソゾーム病の治療法として、欠損酵素を補充する酵素補充療法と造血幹細胞移植療法があるが、いずれも中枢神経障害に対する効果が乏しく、新規治療法の開発が望まれている。

私は、ライソゾーム蓄積症の中枢神経障害に対する有効な新規治療法としてケミカルシャペロン療法を開発してきた。この方法は、欠損酵素に結合能をもつ酵素基質類似低分子化合物を用い、細胞内で変異酵素に結合させることで、小胞体で変異酵素を安定化し、分解を逃れさせることで、ライソゾームへの輸送を促進し、変異酵素活性を上昇させることが可能となる。これまで、GM1-ガングリオシドーシスとゴーシェ病に有効性を示すシャペロン化合物を同定し、試験管内、培養細胞およびモデルマウスに対する効果を検証してきた。この解析結果より、化合物のシャペロン効果は変異酵素蛋白質構造に依存적であり、変異型特異的であることが分かった。また、試験管内では標的酵素に対する強い阻害活性を示すが、培養細胞に対する効果を認めないなどの問題点が明らかになり、この効果の詳細な細胞内分子機構の解明が必須の課題となっていた。

2. 研究の目的

ライソゾーム病に対するケミカルシャペロン効果に関する細胞内分子機構の解明を行うことを目的とした。具体的には、1) 化合物の細胞内取り込みに関する分子機構、2) 小胞体におけるシャペロン化合物と酵素蛋白質の相互作用、3) シャペロン化合物と変異酵素複合体のライソゾーム輸送およびライソゾームでの解離に関する分子機構、に関し、試験管内および培養細胞実験系により解析を行った。

3. 研究の方法

ライソゾーム病である GM1-ガングリオシドーシスとファブリー病を対象とし、既存 (NOEV, DGJ) および新規のシャペロン化合物 (6S-NBI-DGJ, DGJ-ArTs) を用い、解析を行った。

(1) シャペロン化合物

GM1-ガングリオシドーシスとファブリー病に対するシャペロン化合物は、既存シャペロン化合物 (NOEV, DGJ) および共同研究者の Ortiz Mellet 教授、Garcia Fernandez 教授 (セビリア大学、スペイン) らにより新規に有機合成したシャペロン化合物 (6S-NBI-DGJ, DGJ-ArTs) を DMSO に溶解して用いた。

(2) 培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は各濃度のシャペロン化合物を含む培地で4日間培養後、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を4-MU人工基質を用い測定し行った。基質蓄積に対するシャペロン効果の検討は、ファブリー病細胞内の蓄積基質である Gb3-に対する抗体を用い、免疫蛍光染色を行い、蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡により取得し、蛍光強度を測定することにより行った。

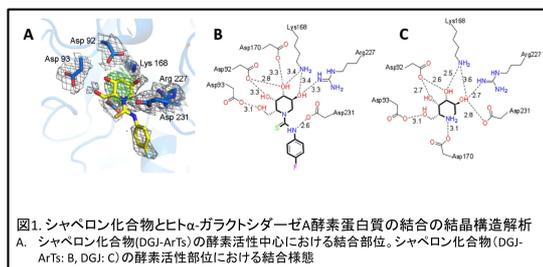
4. 研究成果

(1) 化合物の細胞内取り込みに関する分子機構に関する検討

GM1-ガングリオシドーシスおよびファブリー病皮膚線維芽細胞に対し、シャペロン化合物 (NOEV および DGJ) と共に、α-, β-, γ-シクロデキストリンとそのヒドロキシプロピル体をそれぞれ同時に培養液中に添加し、シャペロン効果に対する効果を調べた。α- および β-シクロデキストリンは、それぞれ細胞膜のリン脂質とコレステロール量を軽減させ、細胞膜流動性を変化させることで、シャペロン化合物の細胞内取り込みを促進させる効果の可能性を調べた。しかし、今回の検討した条件では、いずれのシクロデキストリンにおいても、シャペロン効果に対する有意な相乗効果を認めなかった (結果未提示)。今後は細胞膜機能に直接関連する脂質ラフトに局在する蛋白質と、シャペロン化合物の細胞内取り込みとの関連性の有無を調べる必要があると考えた。

(2) 小胞体におけるシャペロン化合物と酵素蛋白質の相互作用に関する検討

ファブリー病原因酵素 β-ガラクトシダーゼ A とシャペロン化合物 (DGJ, DGJ-ArTs) の結合様態について、共同研究により結晶構造解析を行った (Lieberman 教授、ジョージア工科大、米国)。結果、新規シャペロン化合物 DGJ-ArTs と DGJ の比較により、活性中心の Asp231 の水素結合がシャペロン効果に重要な役割を果たしていることが分かった (図1)。



一方で、小胞体蛋白質恒常性の調節に関わる化合物とシャペロン化合物の併用に関する検討を行った。結果、抗酸化・炎症剤であり、Hsp90の阻害活性を示す Celastrol では有意な効果を認めなかったが、小胞体ストレ

スに対する抑制効果を有する 4-フェニル酪酸 (4-PBA) はシャペロン化合物 DGK-ArTs との併用により、変異 α -ガラクトシダーゼ A 酵素活性上昇の相乗効果を認めた (図 2)。

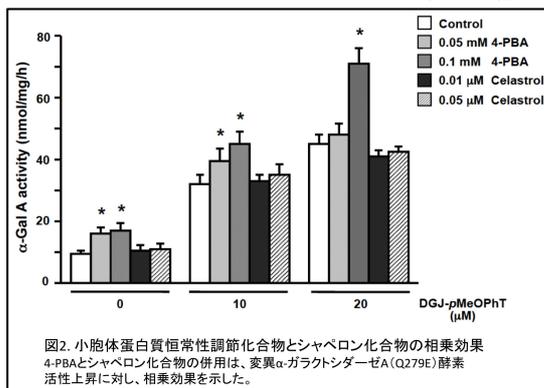


図2. 小胞体蛋白質恒常性調節化合物とシャペロン化合物の相乗効果
4-PBAとシャペロン化合物の併用は、変異 α -ガラクトシダーゼA(Q279E)酵素活性上昇に対し、相乗効果を示した。

(3) シャペロン化合物と変異酵素複合体のライソゾーム輸送およびライソゾームでの解離に関する分子機構に関する検討

シャペロン化合物は標的酵素の活性中心部位に結合する、基質競合阻害剤である。小胞体で酵素蛋白質に結合した化合物はライソゾームへ輸送後、解離することにより、本来の基質に対する加水分解活性を示すことができる。今回用いた化合物は、試験管内試験により、中性条件下で酸性条件下より強い結合を示す化合物であった (結果未提示)。また、培養ファブリー病線維芽細胞を用い、化合物添加の変異 α -ガラクトシダーゼ A 酵素活性と基質 Gb3 のレベルを調べた。結果、添加後 4 日で酵素活性の上昇と Gb3 レベルの減少を認めた。その後、化合物を含まない培地に置き換えると、活性は 1 日後に速やかに減少し、Gb3 レベルは 3 日後より上昇することが分かった (図 3)。

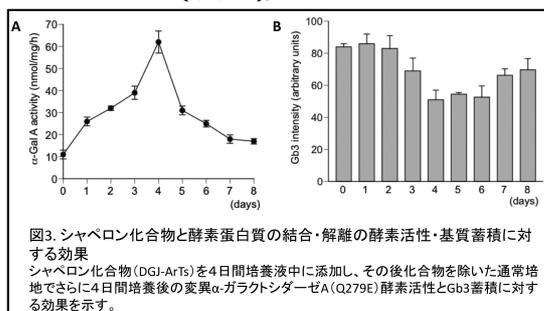


図3. シャペロン化合物と酵素蛋白質の結合・解離の酵素活性・基質蓄積に対する効果
シャペロン化合物 (DGJ-ArTs) を 4 日間培養液中に添加し、その後化合物を除いた通常培地でさらに 4 日間培養後の変異 α -ガラクトシダーゼA(Q279E)酵素活性とGb3蓄積に対する効果を示す。

以上より、本研究により、1) 小胞体におけるシャペロン化合物と酵素蛋白質の結合構造に関する新たな知見が得られた、2) 小胞体環境を調節することにより、シャペロン効果を増強できる可能性が示された、3) 阻害活性を有するシャペロン化合物のライソゾーム内での酵素蛋白質との解離と、酵素活性及び基質蓄積との関連性が示された、という成果が得られた。化合物の結合様態は、今後の新規シャペロン化合物の探索に応用される有用な知見となる。4-PBA は欧米では尿素サイクル異常症に対する治療薬として臨床

に使われており、今後、ファブリー病に対するシャペロン療法開発との併用療法の可能性を示す。また、化合物添加・除去の効果は、今後のモデル動物およびヒト個体に対する投与に際し有用な知見となる。

一方で、シャペロン化合物の細胞内取り込みに関して有用な知見が得られなかったが、今回用いた DGJ-ArTs は既存の DGJ に比べ両親媒性を示すことから、細胞膜の通過に優れることが分かった。今後は、既存シャペロン化合物の構造改変が、薬としてより適した化合物の開発のために重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 11 件)(すべて査読有)

- 1) Higaki K, Ninomiya H, Suzuki Y, Nanba E. Two candidate molecules for chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Future Med Chem*, 5, 1551-1558, 2013
- 2) Rodriguez-Lavado J, de la Mata M, Jimenez-Blanco J, Garcia-Moreno MI, Benito JM, Diaz-Quintana A, Sanchez-Alcazar JA, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Targeted delivery of pharmacological chaperones for Gaucher disease to macrophages by a mannosylated cyclodextrin carrier. *Org Biomol Chem*, 12, 2289-2301, 2014
- 3) Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, Garcia-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM1 gangliosidosis. *Mol Ther*, 21, 526-532, 2013
- 4) Luan Z, Li L, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on GD cells and normal mice. *Brain Dev*, 35, 317-322, 2013
- 5) Castella J, Risquez R, Cruz D, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Castellon S, Conformationally-Locked N-Glycosides with Selective β -Glycosidase Inhibitory Activity: Identification of a New Non-Iminosugar-Type Pharmacological Chaperone for Gaucher Disease. *J Med Chem*, 55, 6857-6865, 2012
- 6) Aguilar-Moncayo M, Takai T, Higaki K, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Li L, Yu Y, Ninomiya H, Garcia-Moreno MI, Ishii S, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y, Tuning glycosidase inhibition

- through aglycone interactions:
Pharmacological chaperones for Fabry disease and GM₁ gangliosidosis. *Chem Commun*, 48, 6514-6516, 2012
- 7) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda D, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Therapeutic chaperone effect of N-octyl-4-epi- β -valienamine on murine GM₁-gangliosidosis. *Mol Genet Metab*, 106, 92-98, 2012
 - 8) Munkacsi AB, Chen FW, Brinkman MA, Higaki K, Gutiérrez GD, Chaudhari J, Layer JV, Tong A, Bard M, Boone C, Ioannou YA, Sturley SL. An “exacerbate-reverse” strategy in yeast identifies histone deacetylase inhibition as a correction for cholesterol and sphingolipid transport defects in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem*, 286, 23842-23851, 2011
 - 9) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM₁-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem*, 118, 399-406, 2011
 - 10) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolipidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286, 35283-35290, 2011
 - 11) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. *Hum Mutat*, 32, 843-852, 2011
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- 1) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, 由良敬, 榊原康文, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之. β -ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン治療薬の開発. 第 58 回日本人類遺伝学会. 仙台, 2013.11.21.
 - 2) Takai T, Higaki K, Suzuki Y, Nanba E. Comparison of two Chaperone candidates for treatment of GM₁-gangliosidosis. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 2013.11.29.
 - 3) Hossain MA, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N. NOEV treatment option for Japanese late-onset Krabbe disease. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 2013.11.29.
 - 4) Takai T, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: A novel chaperone compound for GM₁-gangliosidosis. 第 17 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2012.10.6.
 - 5) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, Yu Yi, 大野耕策, 鈴木義之: ファブリー病ならびに GM₁-ガングリオシドーシスに対する新しいシャペロン治療薬の開発. 第 57 回日本人類遺伝学会, 東京, 2012.10.26.
 - 6) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト I51T 変異 β -ガラクトシダーゼに有効な新規ケミカルシャペロン化合物の解析. 第 54 回日本先天代謝異常学会, 岐阜, 2012.11.16.
 - 7) 檜垣克美, ライソゾーム病に対するシャペロン化合物の開発. 第 1 回日本シャペロン療法研究会, 東京, 2012. 11.11
 - 8) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8.5.
 - 9) 高井知子, 檜垣克美, 鈴木義之, 難波栄二: ヒト変異 β -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物. 第 84 回 日本生化学会大会, 京都, 2011.9.22.
 - 10) 檜垣克美, 高村歩美, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: GM₁ ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第 16 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010. 9.29.
 - 11) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy for β -galactosidase deficiency. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011,10.13.
 - 12) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11.25.
 - 13) Yi Y, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11.25.
 - 14) 檜垣克美, シャペロン療法の開発戦略. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会 シンポジウム 3 シャペロン療法, 千葉,

2011.11.26.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし