

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293230

研究課題名(和文) アロステリックシャペロンを用いた小児遺伝病に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel allosteric chaperone therapy for genetic diseases.

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) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ライソゾーム病の一つ、 β -ガラクトシダーゼ欠損症に対し、アロステリックシャペロン化合物の開発を行い、候補化合物2個を同定した。また、既存の基質競合阻害型シャペロン化合物を元に、側鎖構造を変換した新規化合物を合成し、阻害活性の低い新規化合物を開発した。この化合物はいくつかの変異酵素に対し有意な酵素活性上昇効果を示す、新規シャペロン候補化合物であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have explored to develop non-inhibitory chaperone compounds for human beta-galactosidase deficiency. Screening of the compound library found two candidates, which showed stabilization activity to beta-galactosidase enzyme in vitro without substrate competitive inhibition activity. We also identified a new chaperone candidate, conduramine-F4 based on a lead compound, NOEV. This compound showed a decreased inhibitory activity and increased enzyme enhancing activity against human beta-galactosidase in vitro, indicated as a new chaperone candidate for this disease.

研究分野：小児神経学

キーワード：先天代謝異常症 ライソゾーム病 アロステリックシャペロン 脳疾患 治療法開発

1. 研究開始当初の背景

我々は、先天代謝異常症であるライソゾーム病の脳病態に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。この方法では、標的酵素の活性中心部位に結合する低分子化合物(ケミカルシャペロンまたはシャペロン化合物)を用い、患者細胞内の変異酵素を安定化することで、残存酵素活性を上昇させる。また、低分子化合物は、疾患モデルマウス投与試験の結果、血液脳関門を通過し、脳への効果を発揮した。このコンセプトにより、GM1-ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、ファブリー病などに対する化合物を開発してきた。一方で、シャペロン化合物は、基本的に標的酵素に対する基質競合阻害剤であることから、高濃度で使用すると阻害活性を発揮した。また、シャペロン効果は変異型特異的であり、有効な変異型に限りがあり、新しいタイプのシャペロン化合物の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、ライソゾーム病に対する既存の阻害剤ベースのシャペロン化合物の限界を克服するため、基質結合部位以外に結合することで阻害活性を持たず、さらに酵素安定化活性を示す、アロステリックシャペロン化合物の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、これまで多くのシャペロン化合物を開発してきた、GM1-ガングリオシドーシスを標的疾患とし、欠損酵素β-ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物の開発を行った。

3-1). 蛍光標識法を用いた試験管内蛋白質安定化アッセイ法と化合物ライブラリースクリーニング

蛋白質疎水残基に結合し、蛍光を発する蛍光物質を用い、蛋白質フォールディング状態を検出した。精製ヒトβ-ガラクトシダーゼとシャペロン候補化合物を試験管内で混和後、48℃で30分加温した。その後、PSA dye (ProFoldin)を加え、室温5分間反応後、蛍光プレートリーダー(ex. 535 nm / em. 615 nm)で蛍光強度を測定した。化合物ライブラリーの探索はFDA認可薬化合物ライブラリー(ENZO Life Sciences) 640化合物を用い、スクリーニングを行った。

3-2). ライソゾーム酵素活性即的と試験管内基質競合阻害活性試験

β-ガラクトシダーゼ酵素活性は、蛍光標識された人工基質 4-methylumbonyferyl (4-MU)-beta-D-galactoside を用い、測定した。試験管内基質競合阻害活性は、ヒトβ-ガラクトシダーゼとシャペロン候補化合物、および4-MU人工基質を混和後、37℃30分反応させ、蛍光プレートリーダー(ex. 380 nm / em. 510 nm)で測定を行った。

3-3). 培養細胞に対するシャペロン活性の測

定

培養細胞に対するシャペロン活性の測定は、GM1-ガングリオシドーシス患者由来培養皮膚線維芽細胞と、GLB1 遺伝子ノックアウトマウス由来線維芽細胞株に、変異 GLB1 cDNA を一過性発現させた細胞を用いて行った。患者皮膚線維芽細胞および変異 GLB1 cDNA 一過性発現マウス細胞株をシャペロン候補化合物を含む培地で4日間培養後、細胞抽出液を回収し、細胞内β-ガラクトシダーゼを4-MU基質で測定した。化合物非投与細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性に対し、化合物投与細胞の活性を比較することで、化合物の酵素活性上昇効果(シャペロン活性)を測定した。

4. 研究成果

ヒトβ-ガラクトシダーゼに対する安定化活性を指標に、FDA認可薬化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。結果、有意な安定化活性を示した2化合物(化合物X、化合物Y)を同定した(図1)。この2化合物のうち、化合物XはNOEVと同等の、化合物YはNOEVよりやや弱いものの、ともに有意な試験管内β-ガラクトシダーゼ酵素安定化作用を認めた(図2A)。一方で、基質競合阻害活性は、ともに示さなかった(図2B)ことから、これらの基質結合活性中心部位には結合しない、アロステリックシャペロン候補化合物である可能性を示唆した。以前のポンペ病に対するアロステリックシャペロンの解析に関する報告では、アロステリックシャペロン化合物は、基質競合阻害型シャペロン化合物とは異なる変異型に有効性を示すことが分かっている(Porto et al., Mol Ther, 2012)。今回同定した、2化合物についても、既存の基質競合阻害型シャペロン化合物であるNOEVが有効性を示す変異型(R201C, R201H, R457Qなど)をもつ培養皮膚線維芽細胞に対して、有意な酵素活性上昇効果(シャペロン効果)を認めなかった。現在、変異cDNA発現細胞系を用い、様々な変異型に対する効果を検討しており、今後、有効性を示す変異型が明らかになるものと思われる。

次に、既存の基質競合阻害型シャペロン化合物を元に、側鎖構造を改変することで、阻害活性が低い新規シャペロン化合物の開発を行った。NOEVは我々が開発してきたβ-ガラクトシダーゼに対する基質競合阻害型シャペロン化合物であるが、培養細胞試験およびモデルマウス投与試験において、高濃度使用時の阻害活性による副反応が問題となっていた。そこで、今回NOEVの側鎖構造を改変した新規化合物を複数合成し、スクリーニングを行った。その中の1化合物、N-substituted conduramine-F4(図3)を同定した。この化合物は、試験管内基質競合阻害活性において、NOEVより約35倍低い活性を示し、また、培養細胞試験において、R201C変異β-ガラクトシダーゼに対し、

NOEV よりやや高いシャペロン活性を認めた。 β -ガラクトシダーゼ欠損症培養皮膚線維芽細胞に対する効果試験の結果、conduramine-F4 は NOEV の効かない変異型 (I51T, W273L, G438E) に対し有意なシャペロン効果を認めた (図4)。以上の結果から、conduramine-F4 は阻害活性の低い基質競合阻害型新規シャペロン化合物であることが分かった。

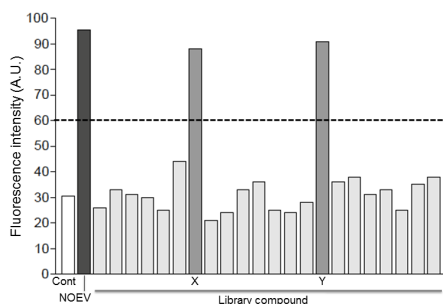


図1. β -ガラクトシダーゼ酵素安定化活性を示す化合物のスクリーニング。化合物XとYの2化合物が、ヒト β -ガラクトシダーゼに対する有意な安定化活性を示した。NOEVは陽性コントロールとして用いた。

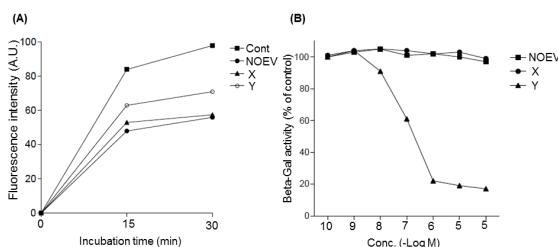


図2. β -ガラクトシダーゼに対する試験管内安定化・阻害活性。化合物XとYの2化合物は、ヒト β -ガラクトシダーゼに対し有意な酵素安定化活性を示し(A)、基質競合阻害活性は示さなかった(B)。NOEVは陽性コントロールとして用いた。

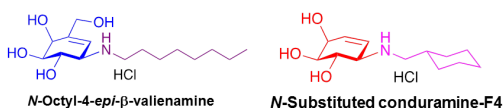


図3. β -ガラクトシダーゼに対するシャペロン化合物、NOEVとConduramine-F4の化学構造。

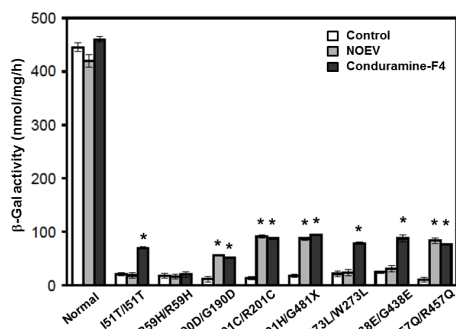


図4. β -ガラクトシダーゼ欠損症細胞に対するNOEVとConduramine-F4のシャペロン活性。Conduramine-F4はNOEVの効かない変異型 (I51T, W273L, G438E) に対し、有効な活性を示した。

今後、アロステリックシャペロン候補化合物について、分子モデリングなどにより、酵素結合部位の同定をする必要がある。また、 β -ガラクトシダーゼはライソゾーム内で

PPCA、Neuraminidase と複合体を作るが、化合物の結合状態における蛋白質複合体の様態について、詳細に調べる必要がある。一方で、conduramine-F4 について、変異 cDNA 発現細胞系を用い、広範な変異型に対する効果を明らかにする必要がある。また、モデルマウス投与試験により、血液脳関門の通過および脳への有効性を確認することで、シャペロン治療薬候補化合物としての有効性の検討を行う予定である。

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7件 全て査読あり)

Hossain M, Higaki K, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N, Chaperone therapy for Krabbe disease: potential for late-onset GALC mutations. *J Hum Genet*, 60, 539-540, 2015

Castilla J, Riquez R, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Castillion S. Conformationally locked N-glycosidase: Exploiting long-range non-glycone interactions in the design of pharmacological chaperones for Gaucher disease. *Eur J Med Chem.*, 90, 258-266, 2015

Kuno S, Higaki K, Takahashi A, Nanba E, Ogawa S. Potent chemical chaperone compounds for GM1-gangliosidosis: N-substituted (+)-conduramine F-4 derivatives. *MedChemComm.*, 6, 206-210, 2015

Yu Y, Mena-Barragan T, Higaki K, Johnson JL, Drury JE, Lieberman RL, Nakasone N, Ninomiya H, Tsukimura T, Sakuraba H, Suzuki Y, Nanba E, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Ohno K, Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human α -galactosidase: Pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants. *ACS Chem Biol*, 9, 1460-1469, 2014

Suzuki H, Ohto U, Higaki K, Mena-Barragan T, Aguilar-Moncayo M, Ortiz Mellet C, Nanba E, Garcia Fernandez JM, Suzuki Y, Shimizu T, Structural basis of pharmacological chaperones for human β -galactosidase. *J Biol Chem*, 289, 14560-14568, 2014

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

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

〔学会発表〕(計6件)

成田綾, 他, pH 依存的に不活性型に変換する新規シャペロン化合物の開発. 第56回日本先天代謝異常学会, 2014年11月14日, 江陽グランドホテル(仙台)

Yu Yi, et al., α -ガラクトシダーゼA に対する新規シャペロン化合物の開発. 第56回日本先天代謝異常学会, 2014年11月14日, 江陽グランドホテル(仙台)

Nanba E, Chaperone therapy for lysosomal diseases. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. 2013年11月27日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(浦安)

Takai T, et al., Comparison of two chaperone candidates for treatment of GM1-gangliosidosis. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease / The 55th Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease. 2013年11月27日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(浦安)

難波栄二, 他, 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, 2013年11月23日, 江陽グランドホテル(仙台)

難波栄二, ライソゾーム病に対するシャペロン療法. 第2回先天代謝異常症患者会フォーラム, 2013年8月11日, 江陽グランドホテル(仙台)

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 糖脂質代謝異常症処置剤
発明者: 久野信一, 高橋篤, 難波栄二, 檜垣克美, 小川誠一郎
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-203695(P2014-203695)
出願年月日: 平成 26 年 10 月 2 日
取得年月日: 平成 27 年 5 月 14 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

難波 栄二 (NANBA EIJI)
国立大学法人鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授(センター長)
研究者番号: 40237631

(2)研究分担者

河田 康志 (KAWATA YASUSHI)
国立大学法人鳥取大学・工学研究科・教授
研究者番号: 40177697

檜垣 克美 (HIGAKI KATSUMI)
国立大学法人鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授
研究者番号: 90294321