

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893038

研究課題名(和文)変異型ABCD1の細胞内挙動を制御する新規副腎白質ジストロフィー治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel small molecules which rescue the trafficking of mutated ABCD1 responsible for adrenoleukodystrophy

研究代表者

三澤 隆史(Misawa, Takashi)

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・研究員

研究者番号：40709820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：副腎白質ジストロフィー(ALD)は先天的な脂質代謝異常によって脱随が起こるペルオキシソーム病の一種である。有効な治療法は未だ確立されておらず、治療法や治療薬の開発が強く望まれている。近年、ALD患者に関する多くの研究から、ALD患者はABCトランスポーターの一種であるABCD1に変異を有していることが明らかとなった。本研究では、変異型ABCD1の成熟や局在を制御する小分子の発見を目指し、化合物の構造展開ならびに活性評価系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：Adrenoleukodystrophy (ALD) is one of peroxisomal diseases which is caused by disorder of peroxisomal fatty acid beta oxidation. The novel agents for the treatment of ALD are urgently needed. many studies have been performed in ALD patients, and the cause of the disease was shown to be a hereditary defect in the expression of ABCD1 (ATP-binding cassette protein D1). In this study, We performed the structural development of peroxisome proliferator-activated receptor ligands for improvement of the expression level and mature of mutated ABCD1, and tried to construct the assay systems for evaluation of effects of the synthesized compounds on mutated ABCD1.

研究分野：医薬化学

キーワード：副腎白質ジストロフィー 超長鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィー(ALD)は先天的な脂質代謝異常によって脱髄が起こるペルオキシソーム病の一種である。特定疾患として指定された難病であり、多くの発症タイプが知られている。なかでも小児で発症した場合、発症後2年程度で死亡するなど予後は不良である。有効な治療法は未だ確立されておらず、治療法や治療薬の開発が強く望まれている。近年、ALD患者に関する多くの研究から、ALD患者はABCトランスポーターの一種であるABCD1に変異を有していることが明らかとなった。これまでに多くの変異型ABCD1が報告されている。ABCD1はホモ二量体としてペルオキシソーム膜上に発現し、炭素鎖22以上の極長鎖脂肪酸の代謝に関与しているが、ALD患者は先天的にABCD1を欠損しており、そのため極長鎖脂肪酸の代謝が行えず、細胞内に極長鎖脂肪酸が蓄積する。蓄積した極長鎖脂肪酸はミエリンと呼ばれる中枢神経系の髄鞘をはぎ取り、白質に障害を与える疾患である(Figure 1)。

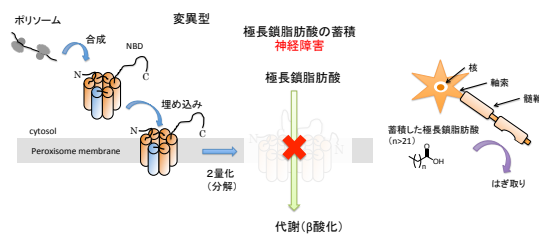


Figure 1. ALDの発症メカニズム

2. 研究の目的

各変異型ABCD1の細胞内挙動に関する研究が行われ、変異によりタンパク質の安定性が低下し、プロテアソーム依存的に分解されることや正しい細胞内局在を示すことができず、機能低下を示すことが報告された。さらに、これら変異体の低温培養による細胞内発現量や局在への効果が検討され、特定の変異体(A616T (616番目のアラニンがスレオニ

ンに変異)やR660W(660番目のアルギニンがトリプトファンに変異)などは低温培養(低温培養は変異型タンパク質の安定化作用を有する)することで、細胞内発現量が増加し、その機能も亢進することが明らかとなった。このことから、これら変異体の細胞内発現量を増加させることができれば、正常に機能することが示された。そこで、これらの問題点(発現量低下や局在異常)を修正する小分子を創製することが出来れば、新たなALD治療薬の創出に繋がると考えた。そこで本研究では、変異型ABCD1を用いて、その細胞内発現量、細胞内局在を修正する化合物の発見とその構造活性相関解析を目的とする。

3. 研究の方法

上記の活性を有する化合物発見の手がかりとするのが、ファーマコロジカルシヤペロンである。ファーマコロジカルシヤペロンとは変異型タンパク質に直接結合し、そのフォールディング、成熟、局在を低容量で特異的に修正する化合物の総称である。

本研究で着目したABCD1は極長鎖脂肪酸を基質としていることから、極長鎖脂肪酸にファーマコロジカルシヤペロンとしての可能性が示唆される。しかしながら、前述の様に極長鎖脂肪酸自体には神経細胞障害活性があるため、医薬を指向した場合、大きな問題点となりうる。そこで、申請者はPPAR(Peroxisome proliferator-activated receptor)リガンドに着目した。PPARはABCD1と同様に長鎖脂肪酸を認識することからして長鎖脂肪酸の等価体として機能することが予想される。さらにPPARリガンドであることも報告されており、PPARリガンドのALD治療薬として着目を集めている。細

胞内極長鎖脂肪酸量を減少させることが報告された。現在作用機序は不明であるが、申請者はBezafibrateが変異型 ABCD1のファーマコロジカルシャペロンとして作用し、変異型 ABCD1 変異体の細胞内発現量を増加させたと考えている。本研究課題では、ALDの原因となる変異型 ABCD1のペルオキシソーム膜上発現量の増加を目的とした超長鎖脂肪酸及び PPAR (またはその他の核内受容体) リガンドの創製を行った。

(参考文献) 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *198*, 632., 2. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1632. 3. *Biochem. J.*, **2011**, *436*, 547. 4. *FEBS Lett.* **1998**, *426*, 342.

4. 研究成果

まず、上述のリガンドが変異型 ABCD1のファーマコロジカルシャペロンとしているかを検討するため、評価系の構築を行った。購入した ABCD1 プラスミドに対し、mutagenesis キットを用いて、低温培養で修正が可能であると報告された A616T 及び R660W 変異体の作製を試みた。作製したプラスミドである野生型 ABCD1 と変異型 ABCD1 の局在変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生型 ABCD1 はペルオキシソームマーカーであるカタラーゼの局在と良く一致し、ペルオキシソームに局在していることが確認された。一方、A616T 変異型 ABCD1 の場合、ペルオキシソームと ER(endoplasmic reticulum) に局在していることが示唆され、野生型と比べ、局在異常や発現量の低下が示唆された。また、R660W では発現が認められなかった。これまで野生型、変異型の局在を検討する際、免疫染色法を行ったが、今後のアッセイの簡便化を図り、各プラスミドに

対し、EGFP 融合タンパク質の作製を試みている。現在、GFP の導入による変異型 ABCD1 の発現量が著しく低下してしまう等の問題点を解決すべく導入位置やその他の蛍光タンパク質あるいはタグの導入を検討している。

ABCD1 変異体の局在を修正する小分子のデザイン、合成を行った。在籍研究室ではこれまでに PPAR リガンドの創製を行ってきた。本研究課題ではこれらのリガンドを用いてスクリーニングを行い、変異型 ABCD1 の局在異常を修正する小分子リガンドの創製を目指した。また、ABCD1 が極長鎖脂肪酸を認識することから、これらの模倣体を目指したリガンドの設計を行った。そこで手がかりとしたのが、カンナビノイド受容体リガンドである。カンナビノイド受容体はアラキドン酸類縁体を生体内リガンドとしており、PPAR と生体内リガンドであるロイコトリエン等とも多くの類似点を有していた。そこで、スクリーニング化合物として、カンナビノイド受容体を新たにデザイン、合成を行った。

本研究課題採択期間中に研究室を移ったことも影響し、到達目標には届かなかったが、今後アッセイ系の簡略化、化合物スクリーニングを行うことで、ALD 治療を指向した、ABCD1 の局在異常を修正する新規小分子の創製を達成する予定である。

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 2 件)

Structure-activity relationships of benzhydrol derivatives based on 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) and their inhibitory activities on multiple

myeloma cell growth via inactivation of the NF- κ B pathway

Takashi Misawa, Kosuke Dodo, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Morihiko Sagawa, Masahiro Kizaki, Hiroshi Aoyama

Bioorganic Medicinal Chemistry, 2015, 23, 2241.

Structural development of stapled short helical peptides as vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction inhibitors

T. Misawa, Y. Demizu,* M. Kawamura, N. Yamagata, M. Kurihara*

Bioorganic Medicinal Chemistry, 2015, 23, 1055-1061.

〔学会発表〕（計 1 件）

カンナビノイド調節薬の設計と合成

三澤隆史、出水庸介、船田正彦、栗原正明

日本薬学会第 135 回年会

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

三澤 隆史 (MISAWA TAKASHI)

研究者番号：40709820

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし