

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650028

研究課題名(和文) ALS治療薬の開発に向けた変異型SOD1とDerlin-1の結合阻害化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of chemical compounds inhibiting SOD1-Derlin-1 interaction for ALS treatment

研究代表者

本間 謙吾 (Homma, Kengo)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60708171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ALSは運動神経が特異的に侵される神経変性疾患である。本研究は、ALSの原因となる変異型SOD1と小胞体膜タンパク質Derlin-1の結合を介した小胞体ストレス誘導メカニズムの新知見に基づき、SOD1-Derlin-1結合を阻害するタンパク質間相互作用阻害低分子化合物の創出によって、ALSの病態発症機構の解明と治療薬の開発に繋げることを目的としている。

およそ16万化合物をスクリーニングした結果、SOD1-Derlin-1結合阻害化合物の獲得に成功した。さらに、この化合物をALSモデルマウスに脳室内持続投与したところ、ALS病態の改善が確認できた。

研究成果の概要(英文)：ALS is a devastating neurodegenerative disease characterized by the selective motoneuron death. We have previously reported that more than 100 different SOD1 mutants specifically interact with Derlin-1, a component of ERAD machinery. This interaction cause ER stress, leading to the motoneuron death. Motoneuron death induced by SOD1 mutants was significantly attenuated by coexpression of a SOD1-Derlin-1 interaction inhibitory peptide, suggesting that this interaction plays an important role in the pathogenesis of ALS. Therefore, the low molecular weight compounds inhibiting SOD1-Derlin-1 interaction can be used as the novel therapeutic approach for ALS.

Here we screened about 160,000 chemical compounds. Continuous intraventricular administration of one prominent inhibitor has ameliorated disease in a mouse model of ALS, delayed onset significantly and prolonged survival. Our results show the possibilities to establish ALS treatment based on the molecular mechanism.

研究分野：生化学

キーワード：ALS SOD1 低分子化合物 PPI阻害

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、運動神経が選択的に侵される晩発性の神経変性疾患である。Cu, Zn Superoxide dismutase (SOD1) は家族性の筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の原因遺伝子として知られており、130 種類を超える SOD1 の遺伝子変異が報告されている。しかし、SOD1 の抗酸化酵素活性と ALS 病態の間に相関はみられず、様々な変異型 SOD1 が細胞毒性を発揮する共通のメカニズムは未解明であり、ALS の病態メカニズムに基づく根本的な治療法はない。我々は以前、変異型 SOD1 が小胞体品質管理機構を破綻させ、小胞体ストレスを誘導することを報告した (Nishitoh et al., Genes Dev. 2008)。小胞体ストレスは小胞体内腔に不良タンパク質が蓄積することで生じる。家族性 ALS に関連した変異型 SOD1 は、小胞体の品質管理を担う膜タンパク質 Derlin-1 に結合し、Derlin-1 の機能を阻害することで、小胞体ストレスを介した運動神経細胞死を誘導することが分かった。さらに最近、Derlin-1 との結合がほぼ全ての ALS 関連変異型 SOD1 に共通する現象であることを見出した (Fujisawa et al., Ann. Neurol. 2012)。つまり、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合が SOD1 変異による ALS の共通の分子機構であると考えられる。さらに、亜鉛欠乏という環境要因が野生型の SOD1 を変異型様の構造に変化させることも明らかとなり (Homma et al., Mol. Cell 2013)、環境要因により構造変化した SOD1 と Derlin-1 の結合が家族性のみならず、孤発性の ALS にも関わっている可能性が存在する。

2. 研究の目的

培養細胞の実験で、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害するペプチドの発現によって、変異型 SOD1 依存的な運動神経細胞死が抑制された。このことから、SOD1-Derlin-1 結合が変異型 SOD1 による ALS の治療標的となる可能性が強く考えられる。そこで本研究では SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する低分子化合物を取得し、ALS 発症機構の解明と ALS 治療薬の開発に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 候補化合物の取得

FRET の原理を利用したハイスループットな SOD1-Derlin-1 結合評価系を構築し、本学創薬機構の有する約 16 万化合物について結合阻害効果を評価した。再現性、非特異的な結合阻害やエネルギー移動阻害を起こす偽陽性化合物の排除、濃度依存性の評価により、SOD1-Derlin-1 結合阻害低分子化合物の候補化合物を絞り込んだ。

(2) 細胞内で結合阻害活性を有する化合物の

取得

(1) では in vitro で阻害活性を評価した。実際に ALS の治療を目指すためには、細胞内の SOD1-Derlin-1 結合を阻害することが望まれる。そこで、細胞内で結合阻害活性を発揮する化合物の取得を目指し、構造的に有望な 1 つの化合物に注目し、構造展開を行った。合成された化合物を培養細胞の培養液中に添加し、SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を共免疫沈降法により評価した。

(3) ALS モデルマウスの病態改善効果の検討
ALS モデルマウスである変異型 SOD1 (SOD1 G93A) トランスジェニックマウスに ALS 病態発症以前より、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物を脳室内持続投与し、ロータロッド試験により定義した発症 (onset) 時期と寿命に与える影響を解析した。また、化合物投与群とコントロール群のマウスの脊髄切片を用いニッスル染色を行うことで、結合阻害化合物が運動神経細胞数に与える影響を評価した。

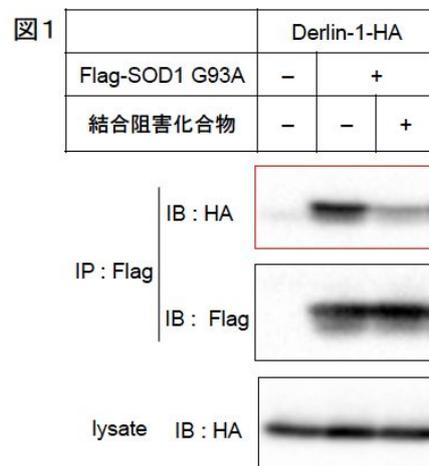
4. 研究成果

(1) 候補化合物の取得

FRET を利用したアッセイ系により、約 16 万化合物の SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を評価し、得られた陽性化合物に対して偽陽性化合物の排除など更なる絞り込みを行った。さらに FRET とは異なる in vitro な共免疫沈降実験による絞り込みを行った結果、顕著な阻害活性を示す 12 化合物を得た。構造的に有望な 1 つの化合物について、構造類自体を購入し、活性に重要な構造を明らかにすると共に、より阻害活性の高い化合物を獲得した。

(2) 細胞内で結合阻害活性を有する化合物の取得

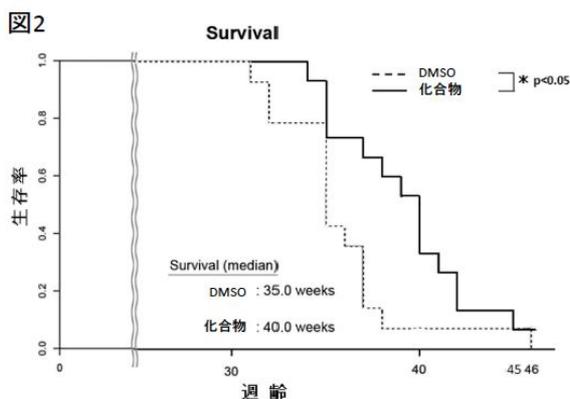
膜透過性をもち、細胞内 SOD1-Derlin-1 結合を阻害する化合物の取得を目指し、上記化合物の構造展開を行った。その結果、毒性を発揮することなく安定的に結合を阻害する化合物を獲得した (図 1)。



本化合物は特定の変の結合に対してのみ阻害活性を発揮するのではなく、これまでに Derlin-1 との結合が確認されている 122 種類の変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を全て阻害した (Fujisawa et al., *Ann. Neurol.* 2012)。一方で、SOD1 のホモダイマー形成や、Derlin-1 の ERAD 複合体形成には影響を与えなかった。以上のことから、本化合物は SOD1-Derlin-1 結合を、選択性を持って阻害していることがわかった。

(3) ALS モデルマウスの病態改善効果の検討
細胞内で結合阻害活性を有する化合物が ALS 病態改善効果を示すか検討することで、ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性を示すと共に、根本的な ALS 治療薬としての可能性と検証した。発症前の ALS モデルマウスに本化合物を脳室内持続投与したところ、onset の遅延と寿命の延長が確認された (図 2)。また、脊髄中の運動神経数も化合物を投与したマウス群では、非投与群に比較して多かった。このことから、化合物の投与は SOD1-Derlin-1 結合を阻害することで運動神経細胞死を抑制し、ALS 病態を改善したと考えられる。

本研究では、SOD1-Derlin-1 結合阻害低分子化合物の獲得に成功すると共に、SOD1-Derlin-1 結合阻害により ALS 病態を改善できることが示された。本研究成果は ALS の根本的な治療法につながると考えられ、学会ならびに、論文発表を行う予定である。



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 5 件)

1. Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. and Ichijo, H.

The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

Hum. Mol. Genet., 51, 81-89 (2016).

(査読有)

2. Tsubota, A., Ichijo, H., Homma, K. Mislocalization, aggregation formation and defect in proteolysis in ALS.

AIMS Molecular Science, (review article), 3(2): 246-268 (2016)

(査読有)

3. Hayashi, Y., Homma, K. and Ichijo, H. SOD1 in Neurotoxicity and its controversial roles in *SOD1*

mutation-negative ALS

Adv. Biol. Regul., (review article), 60, 95-104 (2016).

(査読有)

4. Fujisawa, T., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Tsukamoto, Y., Tsuburaya, N., Tsubota, A., Takahashi, H., Naguro, I., Takahashi, Y., Goto, J., Tsuji, S., Nishitoh, H., Homma, K. and Ichijo, H. A systematic immunoprecipitation approach reinforces the concept of common conformational alterations in amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants.

Neurobiol. Dis., 82, 478-486 (2015).

(査読有)

5. Zhai, J., Zhang, L., Mojsilovic-Petrovic, J., Jian, X., Thomas, J., Homma, K., Schmitz, A., Famulok, M., Ichijo, H., Argon, Y., Randazzo, P., and Kalb, R.

Inhibition of cytohesins protects against genetic models of motor neuron disease.

J. Neurosci., 35, 9086-9105 (2015).

(査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. 圓谷奈保美、本間謙吾、一條秀憲:
SOD1-Derlin-1 結合を標的とした ALS 治療薬の基盤開発
第 89 回日本生化学会大会
2016 年 9 月 25 日~27 日
仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス(仙台)(予定)
2. 本間謙吾、圓谷奈保美、一條秀憲:
SOD1-Derlin-1 結合を標的とした ALS 治療薬の基盤開発
第 68 回日本細胞生物学会
2016 年 6 月 17 日
京都テレサ(京都)(予定)
3. Ichijo Hidenori:
ER stress-dependent motorneuron toxicity and PPI-targeted drug screening in ALS
6th Cisbio HTRF Symposium
2015 年 9 月 14 日
Cape Cod, USA

[その他]

ホームページ等

東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本間 謙吾 (Homma Kengo)

東京大学大学院薬学系研究科

細胞情報学教室

特任助教

研究者番号 : 60708171