

論文の内容の要旨

論文題目 SOD1-Derlin-1 結合を標的とした ALS 治療薬の基盤開発

氏 名 圓谷 奈保美

【序論】

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、上位及び下位の運動神経細胞が選択的に障害される晩発性・進行性の神経変性疾患である。痙攣や筋麻痺、筋萎縮といった症状がみられ、主に呼吸筋麻痺による呼吸不全から、発症後数年で死に至る非常に重篤な疾患である。しかしながら、いまだ発症機構が十分に解明されていないことから、明確な分子基盤に基づく ALS の根本的な治療法は存在していない。

ALS の多くは孤発性であるが、全体の約 10%を家族性が占めており、その中でも高頻度に変異が認められる原因遺伝子のひとつが *Cu, Zn Superoxide dismutase (SOD1)* である。当研究室では、家族性 ALS に関連した変異型 SOD1 が、小胞体関連分解 (ER-associated degradation : ERAD) 複合体の重要な構成要素である小胞体膜タンパク質 Derlin-1 に特異的に結合し、ERAD 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を明らかにしている。加えて、2012 年当時に報告されている 122 種類の ALS 関連変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合することが明らかとなり、この Derlin-1 との結合能が変異型 SOD1 に共通の構造変化に基づくことが分かった。また、*SOD1* 遺伝子変異を持つ ALS 患者由来の細胞内で内在性の SOD1 と Derlin-1 の結合も確認され、ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性が強く示唆されている。一方、*SOD1* 遺伝子変異を持たない孤発性 ALS の患者ならびに病態モデルにおいても、野生型 SOD1 の構造変化が一部観察されることが報告されている。さらに、当研究室の最近の研究により、亜鉛枯渇条件において野生型 SOD1 が配位した亜鉛を失うことで構造変化して Derlin-1 と結合し、小胞体ストレスを誘導することを見出している。これらの事実は、*SOD1* 遺伝子変異をもたない ALS 患者の病態発症においても、野生型 SOD1 が他の遺伝子変異や環境要因などの *SOD1* 遺伝子変異以外の要因によって構造変化を起こして Derlin-1 との結合能を獲得し、SOD1-Derlin-1 結合を介した運動神経細胞死を誘導している可能性を示唆している。また当研究室では、SOD1-Derlin-1 結合阻害ペプチドを細胞内に発現させることで、変異型 SOD1 誘導性の運動神経細胞死が抑制されることを明らかにしている。以上の結果は、SOD1-Derlin-1 結合が極めて魅力的な ALS 治療標的であることを示している。

そこで私は、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を評価する新規アッセイ系を構築し、ハイスループットスクリーニングにより SOD1-Derlin-1 結合を阻害する低分子化合物の探索を行った。得られた候補化合物のさらなる絞り込みと合成展開を行い、*in vivo* での活性評価を行うことで、ALS 発症における SOD1-Derlin-1 結合を介した毒性発揮メカニズムの重要性の検討、ならびに SOD1-Derlin-1 結合を標的とする治療薬の基盤開発を目指した。

【方法・結果】

1. SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物の探索

変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する低分子化合物を探索するために、時間分解 FRET の原理を利用した結合評価系を構築した。

これより、FRET シグナルを結合の指標として、本学創薬機構が保有する約 160,000 化合物に対して 1 次スクリーニングを実施し、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する候補化合物の探索を行った。さらに、偽陽性化合物の排除や濃度依存性の検討を行った結果、77 個の候補化合物を得た。続いて、これら 77 化合物の結合阻害活性を FRET とは異なる系でも確認するために、共免疫沈降複合体に対する *in vitro* の結合阻害アッセイを行った。即ち、各タンパク質を過剰発現させた HEK293A 細胞から、免疫沈降によって精製してきた SOD1-Derlin-1 複合体に化合物を添加することで、12 化合物が結合阻害活性を示すことが明らかとなった。その中でも顕著な結合阻害がみられた化合物#56 に着目し、市販されている構造類似体の評価を行った。その結果、いくつかの#56 構造類似化合物が#56 と同様に、*in vitro* の結合阻害アッセイにおいて SOD1-Derlin-1 結合を阻害することが分かり、#56 より強い結合阻害活性を示す化合物も得られた。

SOD1 と Derlin-1 の結合に関して、当研究室ではすでにお互いの結合領域をマッピングし明らかにしている。そこで、全長同士の組み合わせに加えて、全長と結合領域のみの組み合わせ、あるいは結合領域のみ同士の組み合わせに対して化合物を加えたところ、#56 構造類似体はすべての組み合わせの SOD1-Derlin-1 結合に対して阻害活性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、#56 構造類似体による結合阻害様式は、非結合領域に対するアロステリックな阻害ではなく、結合領域を直接標的とすることが示唆された。

2. 化合物の合成展開による膜透過性付与と阻害活性の精査

細胞培養液中への化合物添加により、細胞内の SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害できるか検討したところ、スクリーニングによって得られた#56 や市販の#56 構造類似体は結合阻害活性を示さなかった。そこで、これらの化合物の構造を基にした新規化合物を合成することで、細胞レベルでも結合阻害活性を示す化合物を獲得することを目指した。共免疫沈降実験による結合評価を重ねた結果、培養液中への添加により細胞内の SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する#56 類縁化合物（#56-40、#56-59）を得ることに成功した。さらに化合物の構造展開と活性評価を行うことにより、細胞レベルで SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を示す化合物の構造上の共通点が明らかになるとともに、さらなる活性増強を目指した合成展開が可能となった。

一方、結合阻害を検討するための変異型 SOD1 として、これまで ALS 病態発症に関与する代表的な SOD1 G93A を用いていたが、前述のように、122 種類の ALS 関連変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合することが明らかになっている。そこで、得られた化合物がこれらの変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害するかを細胞レベルでの共免疫沈降実験により検討したところ、122 種類すべての変異型 SOD1 に対し結合を阻害することが明らかとなった。

また、SOD1 はホモダイマーを形成することが知られており、Derlin-1 は Derlin family 分子やその他 ERAD 複合体の構成分子と結合することが知られている。そこで、これらの

タンパク質間相互作用に対する SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物の影響を確認するために共免疫沈降実験を行ったところ、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する条件下において、SOD1 のダイマー化や Derlin-1 の複合体形成に対しては阻害活性を示さなかった。以上の結果から、得られた化合物が非特異的なタンパク質間相互作用阻害活性を持つのではなく、標的とする SOD1-Derlin-1 結合に選択性を有することも示唆された。

3. ALS モデルマウスへの化合物投与による病態改善効果の検討

最後に、ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性を検証するため、ALS モデルマウスへ結合阻害化合物を投与し、その病態改善効果の検討を行った。変異型 SOD1 (SOD1 G93A) トランスジェニックマウスに、オスモティックポンプを利用した化合物の脳室内持続投与を行い、マウスの運動機能と生存期間に影響がみられるかを検討した。その結果、化合物#56-59 投与マウスでは、DMSO 投与のコントロールマウスと比べて有意に発症時期が遅延することが明らかとなった。さらに、#56-59 投与によって、マウスの生存期間が有意に延長することも確認された。また、マウス腰随切片のニッスル染色を行い、前角における運動神経細胞を検出したところ、コントロール群と比較して#56-59 投与群では有意に運動神経細胞数が多いことが明らかとなった。以上の結果より、SOD1-Derlin-1 結合阻害化合物が *in vivo* において運動神経細胞死を抑制し、ALS 病態の改善効果を示したと考えられる。

【総括】

私は本研究において、FRET を利用した新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系を構築し、大規模化合物スクリーニングを行うことで、結合阻害活性を持つ候補化合物を得ることに成功した。これら候補化合物について合成展開、活性評価を繰り返すことで、細胞レベルで SOD1-Derlin-1 結合阻害活性を示す化合物を得た。さらには、ALS モデルマウスへの化合物投与実験を行い、化合物の ALS 病態改善効果を明らかにした。以上の結果は、ALS 発症メカニズムにおける SOD1-Derlin-1 結合の重要性を示すと同時に、新たな ALS 治療法の可能性を示すものである。