

審査の結果の要旨

氏名 圓谷 奈保美

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が、発症機構が十分に解明されていないために、明確な分子基盤に基づく根本的な治療法は存在していない。我々はこれまでに、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。その後、報告されている 100 種類を超える 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 患者由来の細胞において、内在性の SOD1 と Derlin-1 の結合も確認されたことから、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。さらに、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する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も示されている。これらの結果は、SOD1-Derlin-1 結合が ALS 治療標的として有望であることを示唆している。本論文は、上記 ALS 発症機構のコンセプト検証と治療薬の基盤開発を目指し、SOD1-Derlin-1 結合阻害低分子化合物の獲得を試みた研究成果を報告するものである。

具体的にはまず、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 の原理を利用した新規結合評価系の構築により、約 16 万化合物に対するスクリーニングを実施した。そして独自のカウンターアッセイによる偽陽性化合物の排除や濃度依存性の検討を行って絞り込んだ 77 個の陽性化合物に対し、その結合阻害活性を 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い、最も有力な候補化合物#56 を選出している。大規模スクリーニングを実施するに耐えうる実験系の構築を行い、さらに適切な高次アッセイを通して、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する候補化合物の絞り込みに成功した点は評価に値する。

続いて共同研究により、化合物#56 の基本骨格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の結果、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）を得ている。得られた結合阻害化合物は、以前報告している 100 種類以上の ALS 関連変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合をすべて阻害することも確認しており、SOD1 変異によるすべての ALS への適用の可能性が伺える。単独研究室内では遂行不可能なステップを含んだ研究の中で、円滑な情報交換と粘り強い活性評価実験を繰り返し行い、見事に目的の活性を示す化合物の獲得に成功している。

最後に、実際に ALS 病態における SOD1-Derlin-1 結合の重要性を *in vivo* レベルで検証するため、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対して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ている。標的となる神経細胞に対し、効果的に化合物の曝露が可能であると考えられる最善の投与方法を実践するため、これまで当研究室になかった実験技術を意欲的に取り入れて該当実験に取り組んだ。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り、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。

本論文が示した要点を以下にまとめる。

1. FRET シグナルを指標とした、ハイスループットな新規 SOD1-Derlin-1 結合評価系を確立し、約 16 万化合物を対象とした大規模な化合物スクリーニングを行った。
2. 大規模スクリーニングの陽性化合物 77 個に対し、共免疫沈降法による化合物の活性評価を行い、#56 という候補化合物を選出した。
3. 化合物の合成展開と活性評価を経て、細胞培養時に培地へ化合物を添加することで SOD1-Derlin-1 結合を阻害する新規化合物を得た。
4. 得られた結合阻害化合物は、100 種類以上の変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合すべてに対して阻害活性を示した。
5. ALS モデルマウス (SOD1 G93A トランスジェニックマウス) への結合阻害化合物投与により、ALS 病態が発症するまでの期間と生存期間に有意な延長効果がみられることを明らかにした。

このように本論文は、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する低分子化合物の獲得から SOD1-Derlin-1 結合阻害による *in vivo* レベルでの ALS 病態改善効果の実証までを達成している。低分子化合物によるタンパク質間相互作用阻害の新たな一例を提示するとともに、ALS 発症メカニズムにおける SOD1-Derlin-1 結合の重要性と、新たな ALS 治療法開発の可能性を示す研究成果であると考えられる。今後の結合阻害様式の詳細な解析と化合物の物性評価による標的指向性の向上によって、世界初の分子標的 ALS 治療薬の誕生につながることを期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。