

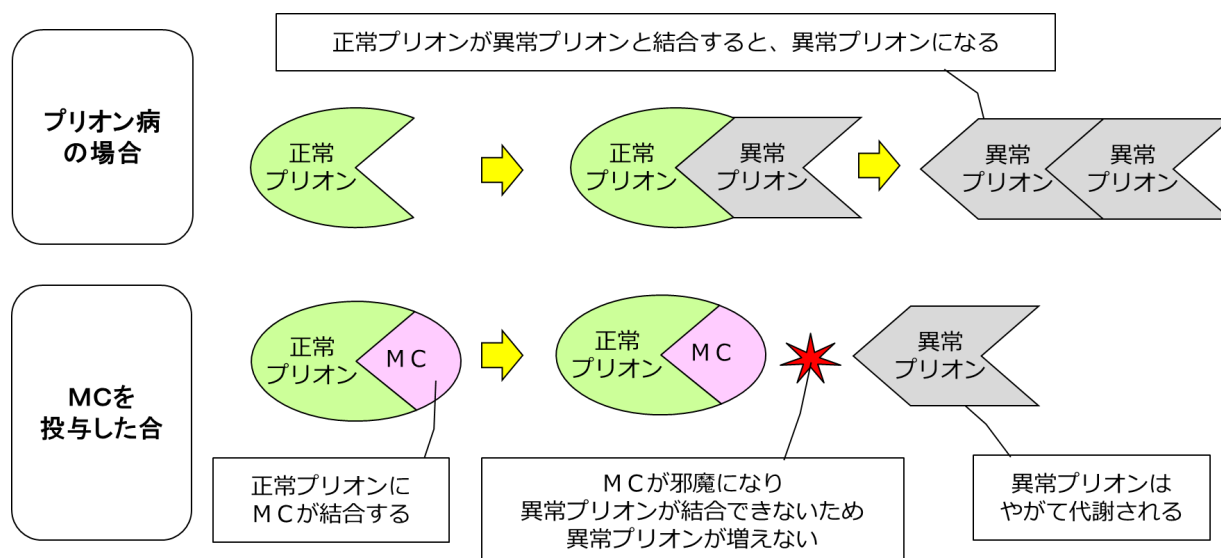
プリオン病の原因となるプリオンの異常構造化を防ぐ化合物を設計・合成 マウスとサルでプリオン病の進行遅延や症状改善を確認

研究成果が”Nature Biomedical Engineering”に掲載

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 桑田一夫シニア教授らの研究グループ

クロイツフェルト・ヤコブ病(ヤコブ病)などに代表されるプリオン病(伝達性海綿状脳症(transmissible spongiform encephalopathy, TSE))は、脳の神経細胞が破壊され、発症から約1年2カ月程度で死に至る、治療法が未確立の重篤な疾患です。その原因は、プリオンというたんぱく質が、何らかの理由で正常構造から異常構造に変化し、凝集体を形成して脳内に蓄積することだと考えられています。岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 桑田一夫シニア教授らの研究グループは、プリオンの立体構造を核磁気共鳴装置(NMR)で原子レベルで解析し、正常プリオンと結合することで異常構造への変換を防ぐ化合物 MC(molecular chaperone, 分子シャペロン)を設計・合成しました。ヒトの家族性プリオン病に感染させたマウスに MC を投与し、異常プリオンの減少や延命を確認しました。また、BSE に感染させたサル(カニクイザル)に MC を投与し、症状の進行遅延や症状改善を確認しました。この研究には、バイオハザードレベル P3 以上の環境と、800MHzの NMR が必要であり、両方が揃う施設は世界的にも珍しく、岐阜大学ならではの成果と言えます。桑田シニア教授らは今後、ヒトのヤコブ病に対する MC 療法の治験を目指します。本研究成果は2月11日付で”Nature Biomedical Engineering”に掲載されました。
(<https://www.nature.com/articles/s41551-019-0349-8>)

図 1. MC が正常プリオンの異常構造への変化を防ぐ仕組み



●プリオンの立体構造解析と異常構造化を防ぐ化合物の設計・合成

桑田シニア教授は「論理的創薬」という概念に基づく治療薬開発に取り組んでいます。これはタンパク質の立体構造から最適な分子構造を計算によって割り出し、有効な化合物を効率的・意図的に設計する方法です。プリオン病については、プリオンが病原性を持つまでの詳細なメカニズムはほとんど知られ

ていませんが、正常プリオンが異常プリオンと結合すると異常プリオンとなり、ある程度異常プリオンが増えると、発症することがわかっています。桑田シニア教授は、化合物を正常プリオンと結合させ、正常プリオンと異常プリオンとの結合を妨げれば、異常プリオンの増殖を抑止できる可能性があると考えました。なお、プリオンが化合物と結合しても体に支障はないと考えられています。

このような化合物を設計するためには、プリオンの正常構造と異常構造の立体構造を測定する必要があります。そこで、IVC-NMR(In vitro conversion NMR、図2)という装置を用いました。これは、バイオハザードレベルP3環境下のキャビネット内で、プリオンをポンプでNMR(図3)に送り、NMRでプリオンの立体構造を原子レベルで測定する装置です。プリオンには超音波を照射し、プリオンが人為的に正常構造から異常構造へと変換する過程における、その立体構造の変化を測定します。

このNMR測定結果(図4)をもとに、分子動力学シミュレーションおよび量子化学計算が統合されたソフトウェア「NAGARA」を用いて、正常プリオンの窪みに結合するMC(molecular chaperone, 分子シャペロン)を設計しました。MCを脳の治療に用いるためには、ある程度分子量が小さいことが求められます。NAGARAによってプリオンとの結合シミュレーションを行った結果、200個以上の化合物を実際に合成し、正常プリオンとの結合力が強いMCの構造(図7)を発見しました。

図2. IVC-NMRのイメージ図

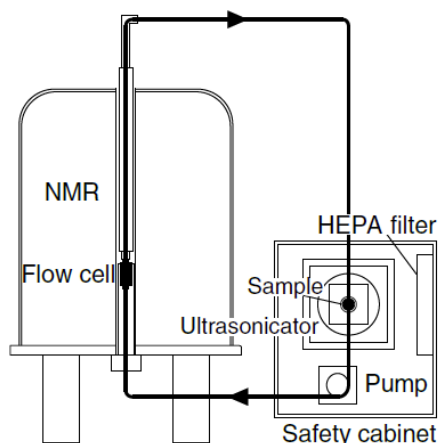


図3. 800MHzのNMRの写真



図4. IVC-NMRで測定した、プリオンが正常構造から異常構造への変換に伴う原子の動き

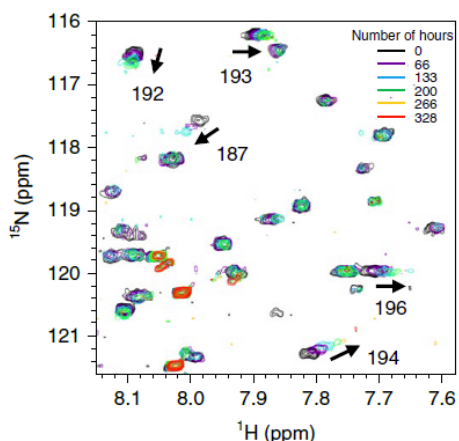
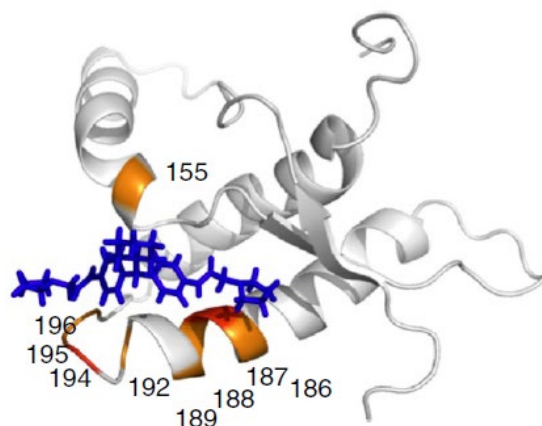


図5. NMRで測定した、プリオンとMCの合成の摂動残基マップ。MCは青色で示されている。



なお、桑田シニア教授らは 2007 年に、正常プリオンに結合することで異常プリオンへの構造変換を防ぐ分子シャペロン「GN8」(図 6)を発表^{※1}しましたが、今回設計・合成した MC は、正常プリオンとの結合力が GN8 の 2 倍以上強いものです。

図 6. GN8 の分子構造

GN8 は桑田シニア教授らが 2007 年に発表^{※1}した、正常プリオンに結合することで異常プリオンへの構造変換を防ぐ分子シャペロン。

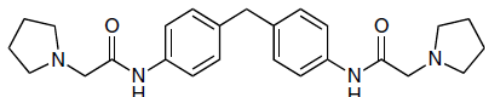


図 7. MC の分子構造

GN8 と比べて正常プリオンとの結合力が 2 倍以上高い。

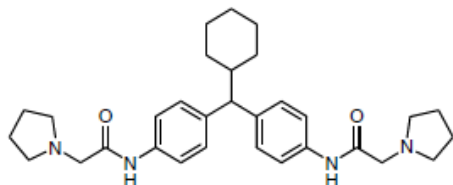
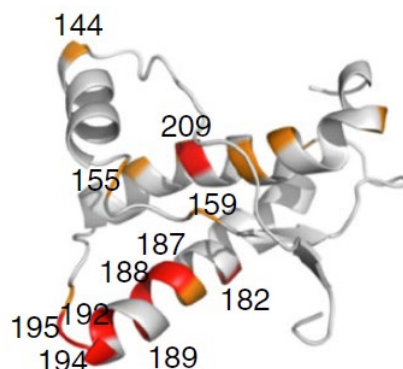


図 8. プリオンにおける摂動残基マップ

(MC がいない場合と MC が 1mM の場合との比較) 赤色が濃い部分で MC と強く結合していることが示されている。



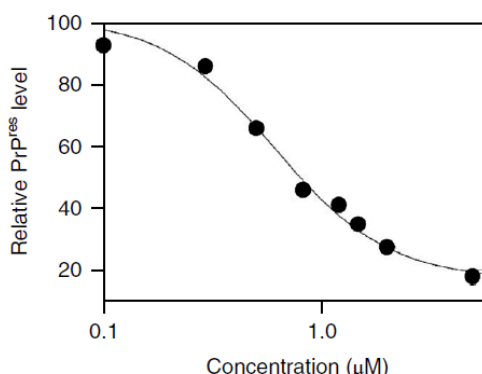
※1 Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Tomoharu Matsumoto, Yuji O. Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kota Kodama, Hironori K. Nakamura, Kiminori Kimura, Makoto Kawasaki, Yuka Takakura, Susumu Shirabe, Jiro Takata, Yasufumi Kataoka, and Shigeru Katamine "Hot spots in prion protein for pathogenic conversion." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 11921-11926, 2007

●MC が異常プリオンを減少させる効果

MC がプリオンをどの程度減少させるかを測定した結果、MC の濃度が高いほど、異常プリオンの割合が低くなることが示されました(図 9)。異常プリオンが半減する濃度(IC50)は 0.5 μM 程度です。この 4 倍の濃度の 2 μM の場合、異常プリオンの根絶も可能であることが分かりました。

図 9. MC の濃度と異常プリオンの割合

MC の濃度が高いほど異常プリオンの割合が減っている。



●ヒト伝染性海綿状細胞に感染させたマウスへの投与実験

MC のプリオン病への治療効果を確認するため、ヒトの家族性プリオン病(Fukuoka-1 株)をマウスに感染させ、MC を投与する実験を行いました。Fukuoka-1 を接種してから 28 日後から、週に 1 回、食塩水または 1mgkg⁻¹ の MC または 10mgkg⁻¹ の MC を腹腔内に投与しました(各群 n=11)。食塩水を投与したマウス(黒)は感染後 157 日しか生存しませんでした。MC を 10mgkg⁻¹ 投与したマウスでは 335 日生存したのもあり、有意に生存期間が長く、MC 投与による延命効果が確かめられました(図 10)。MC を投

与したマウス(白)は、食塩水を投与したマウス(グレー)より、脳の液胞の割合を抑えられており、MC が症状の進行を遅延させる効果が確認できました(図 11)。

図 10. プリオン病感染マウス(各群 n=11)の生存曲線
黒:食塩水、青:MC1mgkg⁻¹、赤:MC10mgkg⁻¹

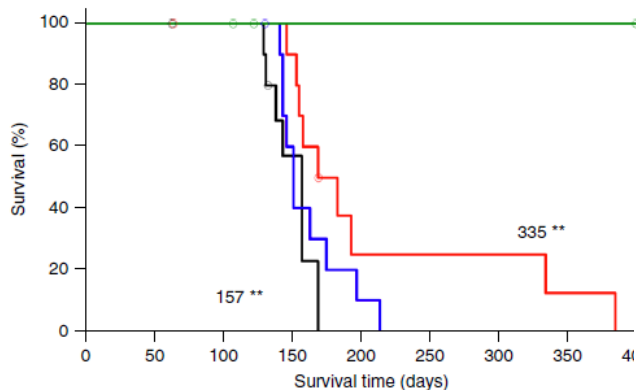
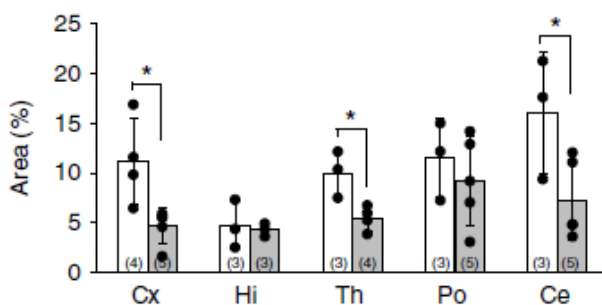


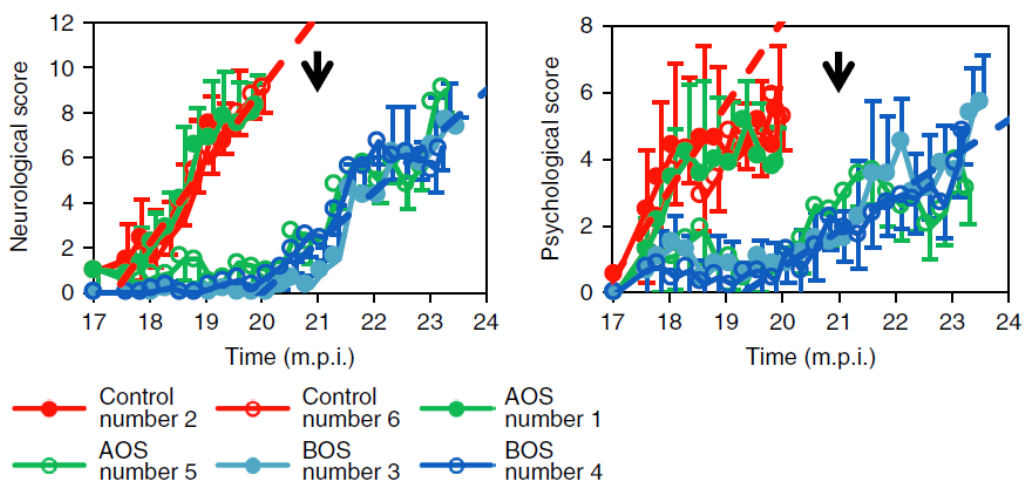
図 11. 食塩水を投与したマウス(白)と MC を投与したマウス(灰色)の脳の液胞の割合
Cx:皮質 Hi:海馬 Th:視床 Po:視床下部 Ce:小脳



●BSE に感染させたサルへの投与実験

マウスではプリオン病の症状を確認することが困難です。そこで、BSE(牛海綿状脳症)に感染させたサル(カニクイザル)に、食塩水を投与する群(赤、Control number 2 および 6)、BSE 接種後 10 カ月で BSE 発症前に MC を投与する群(青、BOS number 3 および 4)、BSE 接種後 17 カ月で BSE 発症後に MC を投与する群(緑、AOS number 1 および 5)の 3 群(各群 n=2)に分け、BSE の神経学的スコアと心理学的スコアにより、症状の変化を確認しました(図 12)。その結果、18 カ月後(BSE 投与後、以下同じ)になると Control 群と AOS 群の 4 頭のサルに、振戦と麻痺、錯乱や表情の欠如などの異常行動が徐々に目立つようになりまし。BOS の 2 例(number 3 および 4)は 21 カ月後まで BSE 症状の神経学的スコアと心理学的スコアがいずれも低く抑えられました。AOS の 1 例(number 5)は 18 か月後に一時的に症状が現れたものの、19.5 カ月後には症状が治まりました。

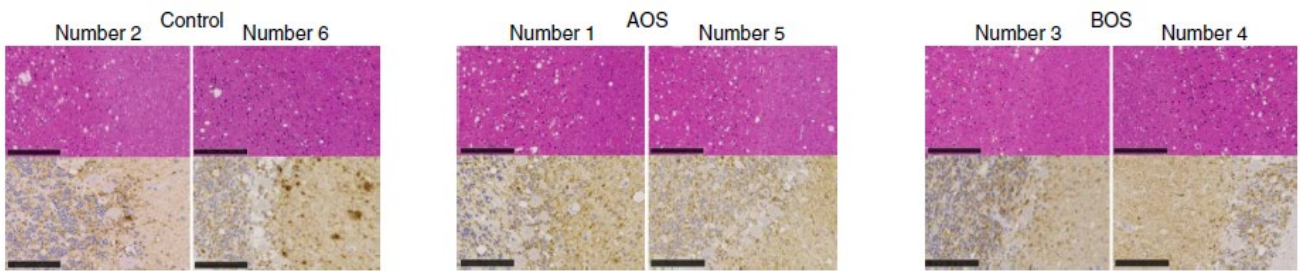
図 12. BSE に感染させたサルへの MC 投与実験
(左は神経学的スコア、右は心理学的スコア、横軸は BSE 投与後の月数を表す)



なお、21 か月後には全サンプルで MC の投与を中止しました。その後は BOS 例、AOS 例とも BSE の神経学的スコアと心理学的スコアがいずれも高くなり、BSE が進行しました。

同じサルの前頭葉の病理組織学的画像分析(図 13、上の赤紫色に染色した写真)では、Control 群と比較すると、AOS 群とBOS 群では、空胞化した白くなった領域が小さいことが確認できます。また小脳の免疫組織学的画像分析(図 13、下の茶色に染色した写真)では、Control 群と比較すると、AOS 群とBOS 群で、異常プリオンが堆積した茶色くなった部分が少ないことが確認できます。

図 13. BSE に感染したサルの前頭葉の組織病理学的画像分析(上)と小脳の免疫組織学的画像分析

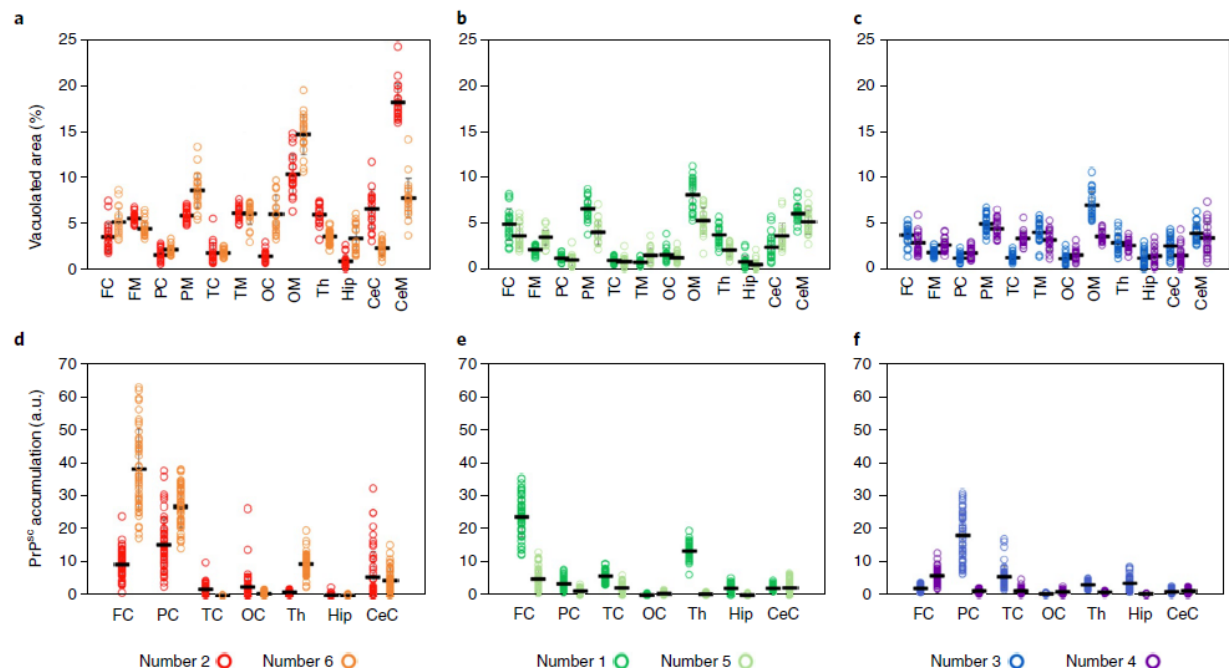


同じサルのデジタル病理分析(図 14)では、液胞になった領域の割合(上段 a,b,c)は、Control 群(赤)と比較して、AOS 群(緑)、BOS 群(青)はいずれも低いです。また、異常プリオンの蓄積(下段 d,e,f)も、Control 群と比較して、AOS 群、BOS 群はいずれも低いです。

これらの結果から、MC が異常プリオンの増加を抑え、BSE の症状の進行を遅らせたことが示されました。

図 14. BSE に感染したサルのデジタル病理分析

FC: 前頭皮質、FM: 前頭髄質、PC: 頭頂皮質、PM: 頭頂髄質、TC: 側頭皮質、TM: 側頭髄質、
OC: 後頭皮質、OM: 後頭髄質、Th: 視床、Hip: 海馬、CeC: 小脳皮質、CeM: 小脳髄質



●今後の展望

桑田シニア教授らは本研究成果をもとに、今後、ヒトのヤコブ病に対するMC療法の治験を行う準備をしており、将来的には、プリオン病の治療を可能にすることを目指しています。

さらに、アルツハイマー病を引き起こすたんぱく質が、プリオンを介して脳の神経細胞を破壊していることがわかっています。そのため、MCはプリオン病だけでなく、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患全般の治療にも進展をもたらす可能性があります。

【論文情報】

掲載媒体: Nature Biomedical Engineering (2019)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0349-8>

タイトル: A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques

(伝染性海綿状脳症に対するデザイナー分子シャペロンがマウスおよびマカクの疾患進行を遅らせる)

論文著者: Keiichi Yamaguchi, Yuji O. Kamatari, Fumiko Ono, Hiroaki Shibata, Takayuki Fuse, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Mayuko Fukuoka, Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Takeshi Ishikawa, Minoru Tobiume, Yoshinori Takeuchi, Yutaka Matsuyama, Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida & Kazuo Kuwata

責任著者: 桑田一夫(岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科)

掲載日: 2019年2月11日付(現地時間)

【代表研究者プロフィール】

桑田 一夫 岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 シニア教授

1984年 岐阜大学 医学部助手

1989年 岐阜大学 医学部附属病院併任講師

1993年～2002年 岐阜大学 医学部助教授

1999年～2000年 大阪大学 蛋白質研究所助教授(併任)

2004年～2011年 岐阜大学 人獣感染防御研究センター教授、センター長

2011年～ 岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科教授

※本プレスリリースは文部科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、本町記者会、科学記者会、岐阜県政記者クラブ、および各社科学担当に送信しております。

【本件に関する問い合わせ先】

岐阜大学総合企画部総務課広報係 担当: 佐藤、伊藤

Tel: 058-293-3377/2009

Fax: 058-293-2021

E-mail: kohositu@gifu-u.ac.jp