

氏 名	なかがわ しんぺい 中川 進平
学 位 の 種 類	博士 (薬科学)
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 205 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程 薬科学専攻
学位論文題目	β -N-Acetylhexosaminidase を標的とした pharmacological chaperone に関する研究 (Research on pharmacological chaperone for β -N-acetylhexosaminidase)
論文審査委員	
(主査)	教 授 松谷 裕二
(副査)	教 授 酒井 秀紀
(副査)	教 授 足立 伊左雄 (指導教員)

論文内容の要旨

【目的・背景】

GM2 gangliosidosis は、 β -*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52 : Hex) の先天性異常により、GM2 ganglioside のリソソームにおける加水分解が障害され、主として神経細胞のリソソームに GM2 ganglioside が蓄積する疾患である。本疾患は、Hex A, S 活性の低下に起因する Tay-Sachs 病、Hex A, B 活性の低下に起因する Sandhoff 病の大きく 2 つに分けられる。発生頻度は、ともに数十万人に一人程度と極めて稀であり、厚生労働省難治性疾患等政策研究事業対象の稀少疾患となっている。これらは進行性の疾患であるが、根本的治療薬は未だ上市されておらず、一刻も早い治療薬の開発が望まれている。

近年、このようなリソソーム病に対して低分子化合物である pharmacological chaperone (PC) を利用した新たな治療法が提唱されている。これは、変異酵素の活性中心に対し親和性の高い PC を作用させることで、熱力学的に不安定な変異酵素の立体構造を安定化へと導き、リソソームへの酵素輸送量を増加させ、結果的に蓄積基質の分解を促す治療法である。これまでに、Fabry 病や Gaucher 病といったリソソーム病に対して有効性が示されており¹⁾、GM2 gangliosidosis においてもこの概念は応用可能であると考えられる。つまり、Hex の活性中心に対し高親和性を示す化合物は、Tay-Sachs 病、Sandhoff 病治療薬として期待できる。

Glycosidase に対して親和性を示す化合物としてイミノ糖が広く知られている。我々はこれまでに、親和性の指標として阻害活性を測定し、Hex に高親和性を示すイミノ糖の探索を行ってきた。初期段階では、基質である *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) や、*N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) 残基を模倣したピペリジン型イミノ糖である 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-glucosamine (DNJNAc)、2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galactosamine (DGJNAc) をもとに誘導体化等の影響について明らかとした²⁾。しかし、基質構造を模倣したイミノ糖に期待される強力な阻害活性は見られなかった。

そこで本研究では、GM2 gangliosidosis 治療薬への応用を目指し、基質構造にとらわれない新たな Hex 高親和性化合物を見出すとともに、治療薬への応用の可能性について多様な面から検討することとした。

【結果・考察】

1) ピロリジン型イミノ糖の構造活性相関

Hex は、 α 、 β サブユニットからなるが、モノマーではその機能を発揮できず、ダイマーでそれぞれ存在する。3 つのアイソザイムがあり、Hex A は、 α 、 β サブユニットのヘテロダイマー、Hex B は β サブユニットの、Hex S は、 α サブユニットのホモダイマーによって形成されている。 α 、 β サブユニットは、活性部位をそれぞれ一つずつ有しており、酸性基質は α によってのみ、中性基

質は α 、 β サブユニット両者によって分解を受ける。そこでまず、全 Hex に対する阻害の傾向を確認するため中性基質を用いて構造活性相関の検討を行った。

本研究では最初に、基質とは異なる母核構造を持つピロリジン型イミノ糖 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-L-arabinitol (LABNAc) の構造活性相関について検討した。その結果、LABNAc やそのジアステレオマーにピペリジン型イミノ糖を上回る活性があることを見出した³⁾。ただ、その活性上昇は僅かであり、さらなる最適化が必要であると考えられた。

これまでは、Hex の基質となる GlcNAc や GalNAc の有する特徴的な官能基 acetamido 基を有したイミノ糖を中心に研究を進めてきたが、様々なピロリジン型イミノ糖^{4,5)}について検討を行った結果、*N*-methylcarbamoyl 基を有した化合物 **1** に強力な Hex 阻害活性が見出された (Table 1)。そこで次に、この化合物 **1** の立体異性体や類縁体を用い、Hex に与える影響について詳細な解析を行った。

最初に、各置換基の配置による影響について化合物 **1** の立体異性体 15 種類を用いて比較検討した。その結果、C3 における水酸基が (*R*) に配置した化合物に共通して強力な Hex 阻害活性が見られた。さらに、(3*R*) 構造を有する化合物の中でも特に強い活性を示した化合物 **1**、**3**、**15** は、いずれも (2*S*, 3*R*) の *trans* 配置であった (Table 2)。これらのことから、Hex に対する強力な阻害活性は、(3*R*) であることが特に重要で、かつ (2*S*) の配置を有する必要があると考えられた⁶⁾。

臨床応用されているイミノ糖は、ピペリジン骨格の *N* 位に置換基を導入することで、体内における有効性が高められている。そこで、ピロリジン骨格の *N* 位に置換基を導入した化合物 **19**、**20**、**21** について検討を行った。その結果、いずれも化合物 **1** を下回る活性にとどまったものの、ある程度の活性は保持された (Table 3)。

2) GM2 gangliosidosis 治療への応用

Tay-Sachs 病は、 α サブユニットの異常に起因して Hex A, S 活性が、Sandhoff 病は β サブユニットの異常に起因して Hex A, B 活性が低下している。 α 、 β サブユニットはともに GlcNAc や GalNAc 残基を認識するため、これらに似た構造と考えられるイミノ糖は、 α 、 β サブユニットの両者に結合し得ると推測できる。PC は酵素にとって、構造的側面から見れば安定化剤として働くが、機能的側面から見ると阻害剤として働く。Tay-Sachs 病では β サブユニット、Sandhoff 病では α サブユニットに対する親和性が極端に強すぎる場合、変異サブユニットへの PC 効果を示す濃度において、機能が維持されている他方の分解活性へ影響を及ぼす可能性がある。このため、化合物が個々に有している各基質認識部位への結合能力差についても知る必要がある。

そこで、酸性基質を用いて α サブユニットへの親和性を示す Hex A, S 阻害活性を測定し、全 Hex に対する阻害効果と比較検討した (Table 2, 3)。その結果、いずれの化合物も全 Hex と比べ Hex A, S に対する阻害活性が低下した。つまり、 α サブユニットより β サブユニットへの結合能力が高いと予測された。このことから、Sandhoff 病では支障がないものの Tay-Sachs 病への応用の際、中性基質分解活性を阻害することが懸念された。しかし、化合物 **3**、**19** のように配置の変化、置換基の導入によって α サブユニットへの選択性 (Hex A, B, S IC₅₀ / Hex A, S IC₅₀) の向上が図れることも示唆された。ただ、どの程度の差で中性基質分解活性へ影響を与えるかはこれまでに明らかとされておらず、Tay-Sachs 病患者由来細胞等によって実際に検討を行う必要があると考えられた。

3) Tay-Sachs 病患者由来細胞への効果

次に、治療薬としての効果を確認するため、Tay-Sachs 病患者由来の細胞により評価を行った。被験化合物としては、 α サブユニットへの親和性が高い化合物 **1**、**3**、**19** を用いた。

まず、生細胞において Hex A, S 残存活性に与える影響を検討した。比較対象として、先行研究にて臨床試験が行われていた pyrimethamine (PMT) を用いた。PMT は、毒性の見られなかった 3 μ M 以下で効果を確認したが、コントロール群と比較した Hex A, S 活性上昇は 2 倍程度にとどまった。一方、本研究で見いだされた化合物 **1**、**3**、**19** は、100 μ M 処置でも毒性を示すことはなく、濃度依存的に Hex A, S 活性を上昇させた。100 μ M 処置において化合物 **1**、**3** は、コントロール群と比較して約 15 倍、化合物 **19** は、約 12 倍もの活性上昇を引き起こし、低濃度領域においても PMT を大きく上回る効果を示した (Figure 1)。そこで、化合物 **1**、**3** が正常細胞と比較してどの程度まで活性を回復させるかさらに確認を行った。無処置の患者由来細胞では、正常細胞に比べ Hex A, S 活性は 3 % 程度にとどまったが、化合物 **1**、**3** を 100 μ M 処置した場合には、40 % 以上まで酵素活性が回復した。これは、Tay-Sachs 病における治療水準 (正常の 10 %) を大きく超えており、十分な治療効果が期待できる結果となった。次に、各化合物の中性基質分解活性への影響についても確認を行った。その結果、化合物 **3**、**19** については影響が見られなかったものの **1** は、100 μ M 処置においてコントロール群をやや下回る活性となった (Figure 2)。ただ、その効果は限定的なものであり、化合物 **1** も治療薬として十分期待できると考えられた。最後に免疫染色法を用いて、化合物 **1**、**3** 処置群における Hex A, S のリソソーム移行性についても確認を行った。その結果、リソソームマーカーと Hex A, S の共局在が観察され、酵素のリソソームへの移行が確認された。

【まとめ】

本研究では、様々なピロリジン型イミノ糖について解析し、基質類似構造を持つ DNJNAc よりもきわめて高い Hex 親和性を示す化合物の創製に成功した。その中でも、化合物 **1**、**3** は、Tay-Sachs 病患者由来細胞において、治療水準 (正常の 10 %) を大きく上回る 40 % 以上まで Hex A, S 活性を上昇させた。また、これら化合物は α サブユニットへの低選択性が懸念されたものの、中性基質分解活性には、ほぼ影響を与えないことも確認された。以上の結果より、本研究で見出した化合物 **1**、**3** は、これまで有効な治療法の存在しなかった GM2 gangliosidosis の治療薬として十分貢献し得ると考えられた。

【公表論文】

- 1) *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2435-2441. (2014)
- 2) *Chem. Eur. J.* **18**, 9341-9359. (2012)
- 3) *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3932-3943. (2014)
- 4) *Tetrahedron Lett.* **52**, 219-223. (2011)
- 5) *J. Org. Chem.* **78**, 7380-7397. (2013)
- 6) *J. Org. Chem.* **79**, 3398-3409. (2014)

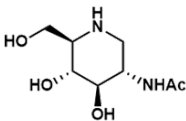
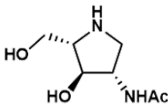
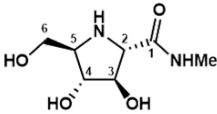
	IC ₅₀ (μM)		
			
	DNJNAc	LABNAc	1
Hex A, B, S from human placenta	7.0	6.7	0.20

Table 1. Compound 1 was a more powerful inhibitor against Hex A, B, S rather than DNJNAc and LABNAc.

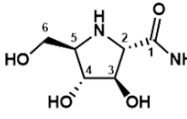
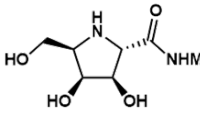
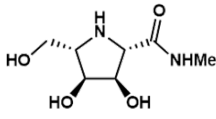
	IC ₅₀ (μM)		
			
	1	3	15
Hex A, B, S from human placenta	0.20	0.92	0.72
Hex A, S from human placenta	2.4	3.7	9.1
Hex A, B, S IC ₅₀ / Hex A, S IC ₅₀	0.083	0.25	0.079

Table 2. Inhibitory spectrum of compound 1 stereoisomers against Hex

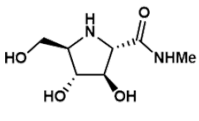
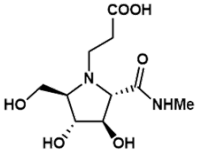
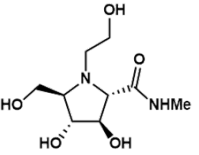
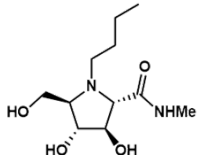
	IC ₅₀ (μM)			
				
	1	19	20	21
Hex A, B, S from human placenta	0.20	1.9	4.8	1.1
Hex A, S from human placenta	2.4	5.9	56	14
Hex A, B, S IC ₅₀ / Hex A, S IC ₅₀	0.083	0.32	0.085	0.079

Table 3. Inhibitory spectrum of compound 1 analogues against Hex

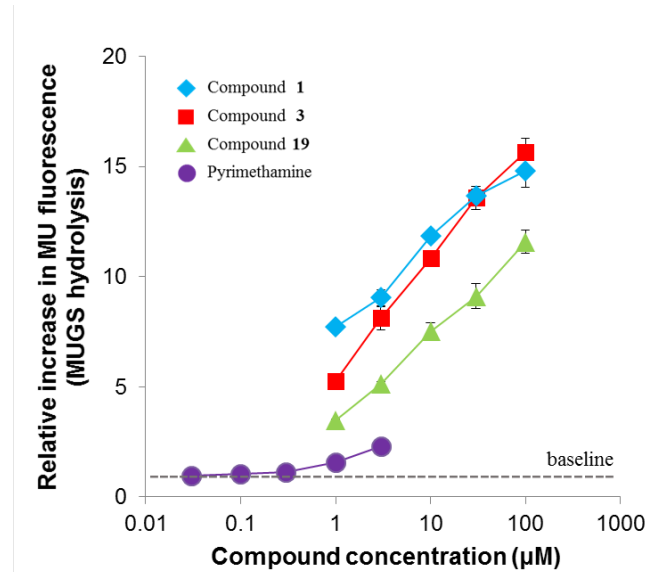


Figure 1. The effect of iminosugars and pyrimethamine on Tay-Sachs disease lymphoblasts (GM03461) Hex A, S activity
Tay-Sachs disease lymphoblasts (GM03461) were grown in media containing different concentration of iminosugars and pyrimethamine for 5 days and lysed. With the cell lysates MUGS hydrolysis activities were determined. (Means \pm SD, n = 3)

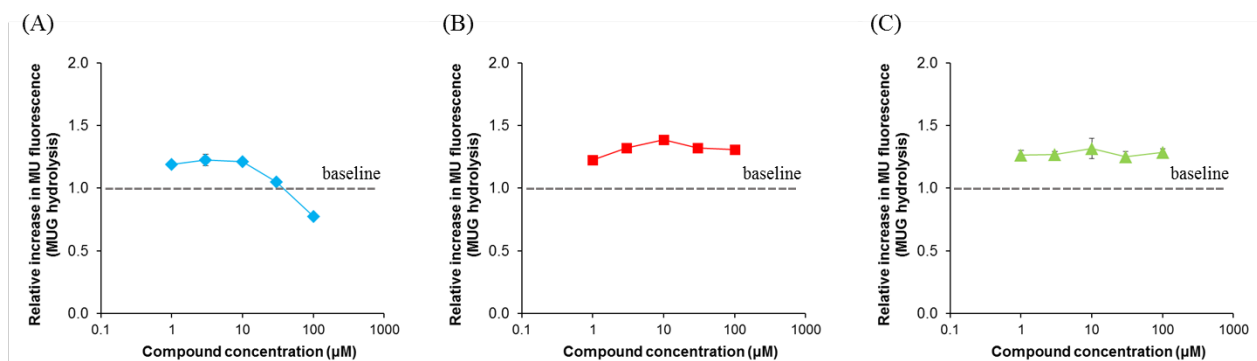


Figure 2. The effect of iminosugars on Tay-Sachs disease lymphoblasts (GM03461) Hex A, B, S activity

Tay-Sachs disease lymphoblasts (GM03461) were grown in media containing different concentration of iminosugars for 5 days and lysed. With the cell lysates MUG hydrolysis activities were determined. (Means \pm SD, n = 3)

(A) Compound 1, (B) Compound 3, (C) Compound 19

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

β -*N*-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52 : Hex) はリソソーム加水分解酵素の一種であり、糖タンパク質、糖脂質、グリコサミノグリカンなどに付加している *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) や *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) 残基の加水分解を触媒する。GM2 gangliosidosis は、Hex の先天的異常によりリソソームにおける GM2 ganglioside の加水分解が障害され、主としてリソソームに当該基質が蓄積する疾患である。本疾患は、Hex A, S 活性の低下に起因する Tay-Sachs 病、Hex A, B 活性の低下に起因する Sandhoff 病の大きく 2 つに分けられ、厚生労働省難治性疾患等政策研究事業対象の稀少疾患となっている。これらは進行性の疾患であるが、根本的治療薬は未だ上市されておらず、一刻も早い治療薬の開発が望まれている。申請者は、GM2 gangliosidosis に対する新たな治療戦略として変異酵素の構造安定性を高めリソソームへの酵素輸送量を増加させる pharmacological chaperone 療法に着目し、治療に最適な候補となり得る化合物を見いだすと共にその生物活性に関する研究を実施した。

本研究内容の骨子および審査結果は次の通りである。

1) Hex 高親和性を示すピロリジン型イミノ糖の創製と構造活性相関

一般的に変異酵素に対し高い親和性を示すシャペロン化合物をデザインする際には、基質構造と相同性が高いピペリジン型イミノ糖が用いられる。しかしながら、Hex の場合、GlcNAc や GalNAc 構造を忠実に模倣した DNJNAc や DGJNAc などのピペリジン誘導体には、期待される強力な親和性は見られないことが報告されており、基質構造にとらわれない新たな Hex 高親和性化合物の探索が求められている。申請者は、化合物スクリーニングの過程で、従来の Hex リガンドに良く見られる acetamide 基よりも、*N*-methylcarbamoyl 基を有する新規ピロリジン型イミノ糖に既存化合物を上まわる高い親和性が認められることを初めて見いだした。更に本化合物の立体異性体 15 種類を用い、Hex に与える影響について詳細な解析を行った結果、Hex に対する親和性の発現には (3*R*) 構造が必要であり、(2*S*, 3*R*) の *trans* 配置を取ることで、その親和性が飛躍的に向上することを明らかにした。さらに、窒素原子上の置換基と活性の相関についても精査し、最適化合物を見出だすに至った。

2) 新規ピロリジン型イミノ糖の Tay-Sachs 病患者由来細胞に対する効果の検証

最適化したピロリジン型イミノ糖の治療薬としての効果を確認するため、申請者は

Tay-Sachs 病患者由来の細胞を用いた評価を行った。無処置の患者由来細胞では、正常細胞に比べ Hex 活性は 3 % 程度であったのに対し、最適化した化合物 (100 μ M) を処置した場合には、40 % 以上まで酵素活性が回復することを見いだした。これは、Tay-Sachs 病における治療水準 (正常の 10 %) を大きく超えており、十分な治療効果が期待できる。更に免疫染色により、リソソームマーカーと Hex の共局在が観察され、化合物添加により変異酵素がリソソームまで移行され機能している可能性を示した。

以上申請者は、既存化合物を上まわる高い親和性を示す新規ピロリジン型イミノ糖の創製に成功した。更に構造活性相関の解析から高親和性を示す最適な置換基の配位を見いだした。これらの結果は、今後、Tay-Sachs 病や Sandhoff 病など Hex の機能不全に起因する難病に対する医薬品開発デザインを行う際の重要な指標になると考えられる。さらに、今回の研究で見いだされた最適化合物が、Tay-Sachs 病患者由来細胞において、治療水準を超えるレベルまで Hex 活性を上昇させたという結果は、これまで根本的治療薬がなかった希少疾患患者に対し、希望を与えると共に pharmacological chaperone 療法の有効性を示すものである。

主査および副査は、申請者である中川進平君に面接試験を行うと共に、論文内容を綿密に審査し、この論文が博士 (薬科学) を受けるに十分値すると判断した。

1. da Cruz, F. P.; Newberry, S.; Jenkinson, S. F.; Wormald, M. R.; Butters, T. D.; Alonzi, D. S.; **Nakagawa, S.**; Becq, F.; Norez, C.; Nash, R. J.; Kato, A.; Fleet, G. W. 4-C-Me-DAB and 4-C-Me-LAB - enantiomeric alkyl-branched pyrrolidine iminosugars - are specific and potent α -glucosidase inhibitors; acetone as the sole protecting group. *Tetrahedron Lett.* 52. 219-223, 2011.
2. Glawar, A. F.; Best, D.; Ayers, B. J.; Miyauchi, S.; **Nakagawa, S.**; Aguilar-Moncayo, M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Crabtree, E. V.; Butters, T. D.; Wilson, F. X.; Kato, A.; Fleet, G. W. Scalable syntheses of both enantiomers of DNJNAc and DGJNAc from glucuronolactone: the effect of N-alkylation on hexosaminidase inhibition. *Chem. Eur. J.* 18. 9341-9359, 2012.
3. Jenkinson, S. F.; Best, D.; Saville, A. W.; Mui, J.; Martínez, R. F.; **Nakagawa, S.**; Kunitatsu, T.; Alonzi, D. S.; Butters, T. D.; Norez, C.; Becq, F.; Blériot, Y.; Wilson, F. X.; Weymouth-Wilson, A. C.; Kato, A.; Fleet, G. W. C-branched iminosugars: α -glucosidase inhibition by enantiomers of isoDMDP, isoDGDP, and isoDAB-L-isoDMDP compared to miglitol and miglustat. *J. Org. Chem.* 78. 7380-7397, 2013.

4. Kato, A.; Nakagome, I.; **Nakagawa, S.**; Koike, Y.; Nash, R. J.; Adachi, I.; Hirono, S. Docking and SAR studies of calystegines: binding orientation and influence on pharmacological chaperone effects for Gaucher's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 22. 2435-2441, 2014.
5. Crabtree, E. V.; Martínez, R. F.; **Nakagawa, S.**; Adachi, I.; Butters, T. D.; Kato, A.; Fleet, G. W.; Glawar, A. F. Synthesis of the enantiomers of XYLNac and LYXNac: comparison of β -N-acetylhexosaminidase inhibition by the 8 stereoisomers of 2-N-acetylamino-1,2,4-trideoxy-1,4-iminopentitols. *Org. Biomol. Chem.* 12. 3932-3943, 2014.
6. 6) Ayers, B. J.; Glawar, A. F.; Martínez, R. F.; Ngo, N.; Liu, Z.; Fleet, G. W.; Butters, T. D.; Nash, R. J.; Yu, C. Y.; Wormald, M. R.; **Nakagawa, S.**; Adachi, I.; Kato, A.; Jenkinson, S. F. Nine of 16 stereoisomeric polyhydroxylated proline amides are potent β -N-acetylhexosaminidase inhibitors. *J. Org. Chem.* 79. 3398-3409, 2014.