

# 組織損傷の分子機構の解明と それに基づく新たな治療法の開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

## 研究体制

総括 裏出 良博 [財団法人大阪バイオサイエンス研究所]

武田 伸一 [国立精神・神経センター]

※平成21年度における研究体制

## 筋ジストロフィー治療薬の開発

Project  
KeyWord  
キーワード

### デュシェンヌ型筋ジストロフィー

骨格筋細胞の構造を支持するたんぱく質・ジストロフィンの遺伝子異常による進行性筋疾患。男児3500人に1人の発症率。命を救う手立てがない重篤な難病です。安全で長期に使用可能な治療薬の開発が望まれています。

### プロスタグランジンD<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)

プロスタグランジンD<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) は、肥満細胞、Th2リンパ球やマクロファージで活発に産生される炎症性の脂溶性生理活性物質です。筋壊死や神経変性疾患、脳傷害などの疾患の2次的な組織傷害の拡大に関与します。

### たんぱく質の構造解析

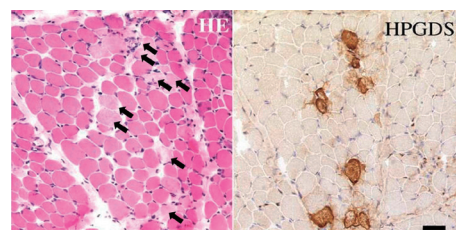
X線結晶構造解析によって、酵素たんぱく質の3次元構造がわかります。この立体構造は、反応機構の理解に役立ち、酵素たんぱく質に結合する阻害剤の分子設計を可能にし、新薬の開発に貢献します。

## 1 研究の背景・意義

### PGD<sub>2</sub>は筋壊死の拡大と修復に関与する

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、男児3500人に1人が発症する進行性の難病で、現時点で命を救う治療法がありません。私たちは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の病理標本や生検組織を用い、これらの疾患の組織傷害部位で、慢性炎症の脂質メディエーターとして知られているPGD<sub>2</sub>の産生を行う造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素 (HPGDS) の発現が亢進して、組織損傷が拡大することを見出しました。また、世界に先駆けてプロトタイプ of HPGDS阻害薬を開発し、マウス、ラットやモルモットを用いた実験で有効性を確認しました。さらに、この阻害剤とヒトHPGDSとの複合体のX線結晶構造解析に成功し、触媒部位の微細構造を明らかにしました。

これらの情報を基にすれば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや多発性筋炎などの難治性疾患に適用できる画期的な治療薬を開発することが可能です。我々の開発する治療薬は、これらの難治性疾患の病状進行を軽減または大幅に遅延させ、患者のQOL (Quality of life) を改善します。同時に、患者の自立期間を延長させて看護のための家族の負担を軽減し、何よりも、患者とその家族、医療および医薬品開発の関係者に大きな希望をあたえます。



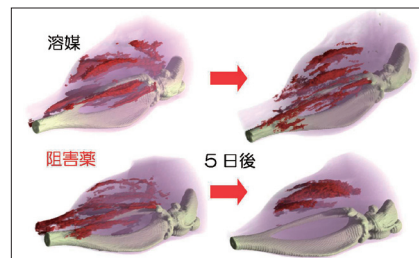
▲デュシェンヌ型筋ジストロフィーの壊死筋 (左図で薄ピンク色に抜けた筋肉繊維・矢印) では造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素の発現が亢進しています (右図で茶色に染まる)。

## 2 研究プロジェクトの目標

### 病態進行の抑制法や治療薬の開発を目指す

私たちは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、多発性筋炎、外傷性脳損傷などの治療薬として、造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素の阻害薬が有効であると考えています。これまでに本酵素のX線結晶構造解析に基づいて、世界に先駆けてプロトタイプ of 阻害薬を開発し、マウス、ラットやモルモットを用いた実験で有効性を確認しました。

この研究プロジェクトでは、本酵素と阻害薬との複合体の立体構造に基づいて、より強力な阻害薬を設計し、筋ジストロフィーのモデル動物 (*mdx*マウス) を使って、その効果を評価します。筋ジストロフィーの治療には、個々の患者の病態や遺伝的背景、副作用の状況に応じて、長期にわたり最適治療薬を選択する必要があります。そのために、様々な化学構造の治療薬を用意することが求められます。標的たんぱく質の構造に基づく医薬品の設計は、この問題を克服するためにきわめて有効です。また、阻害薬の効果を評価するために、モデル動物の壊死筋のX線CT装置を用いた撮像方法を開発し、同時に、尿中のPGD<sub>2</sub>代謝物の微量定量法を確立します。最終的に、既存の治療法と併用、あるいは代替できる新しい組織損傷の拡大防止薬の開発を目指します。

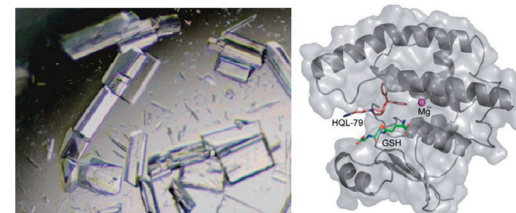


▲X線CT装置で造影した筋ジストロフィーマウスの筋壊死領域 (紅色) は、阻害剤 (HQL-79) を5日間投与すると (下図) 大幅に減少します。

## 3 研究プロジェクトの成果

### 酵素と阻害薬の複合体のX線結晶構造解析

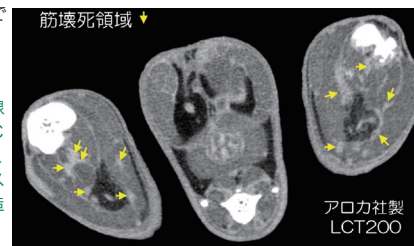
阻害剤の開発には、対象となるたんぱく質の活性中心の詳しい立体構造が必要です。そのため、国際宇宙ステーションの無重力環境を利用してヒト造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素と阻害剤との複合体の高品質の結晶を作製し、大型放射光施設 (SPring-8) を用いて高分解能の立体構造を決定しました。その結果、酵素反応部位の微細構造と阻害剤の結合様式が明らかになりました。そして、製薬企業との共同研究により、選択的かつ強力な、経口投与で有効な複数の阻害剤を作製しました。一部の阻害剤は、既に動物での急性毒性試験を終了し、長期安全性試験へと移行しています。



▲酵素と阻害剤 (HQL-79) との複合体の結晶 (左図) を用いたX線結晶構造解析により、阻害剤の結合様式 (右図) が判ります。

### X線CT撮影による非侵襲的な筋壊死測定

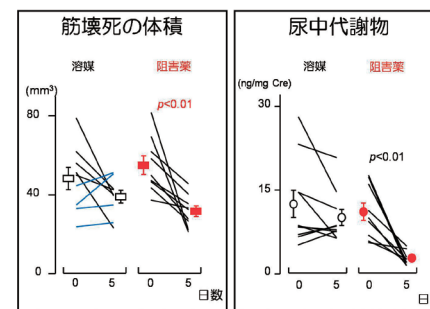
筋壊死体積の定量は、治療効果を評価するために重要です。組織化学染色や色素漏出量の定量などの従来の評価方法では、同一個体について効果の時間経過を追うことはできません。そこで、私たちはアロカ株式会社と共同で、小動物用のX線CT撮影装置を開発しました。この装置を用いると、同一個体の同じ筋肉の病変部分を、非侵襲かつ持続的に追跡できます。



▶麻酔下の動物に、X線造影剤を投与してX線CT撮影を行うことにより、筋ジストロフィーマウスの壊死領域 (矢印) を造影できます。

### 尿中PGD<sub>2</sub>代謝物は薬効を正確に反映する

PGD<sub>2</sub>は体内での半減期が短く血中半減期が1分以内なので、測定が非常に困難です。そこで、尿中に排泄されるPGD<sub>2</sub>の安定代謝物を同定し、その高感度の分析方法を確立しました。そして、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の濃度が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者や*mdx*マウスでは健康人 (動物) に比べ数倍から数百倍も高く、阻害薬を投与して筋壊死の拡大が抑制された*mdx*マウスでは、溶媒のみの投与に比べ、大幅に低下することを証明しました。この尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の量は筋壊死体積と良く相関するので、検尿で病態の進行を把握できます。

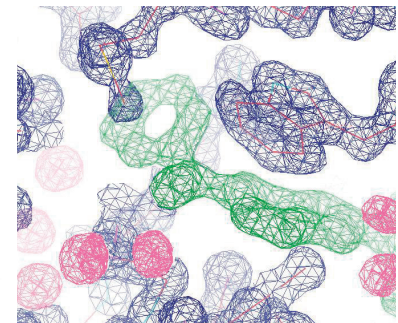


◀阻害剤の投与により、筋ジストロフィーマウスの壊死体積が減少し (左)、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物も減少します (右)。

## 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

### 構造の異なる複数の阻害薬の必要性

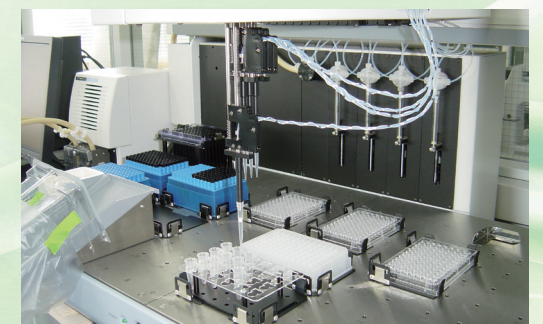
対象疾患である筋ジストロフィーの治療は長期間に及ぶため、個々の患者の病態や副作用に応じて選択できる、複数の基本骨格の異なる化合物が必要です。私たちは、既に数種類の阻害薬 (図: 緑色部分) とヒト造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素の複合体の構造を高分解能 (1 Å分解能) で決定しました。その結果、本酵素の触媒部位の揺らぎや、たんぱく質 (図: 青色部分) に強固に結合した水 (図: ピンク色部分) の分布などを詳細に決定できました。この3次元座標を鋳型として用いることで、基本骨格の異なる新しい阻害剤を *in silico* (コンピュータ上で) で迅速にスクリーニングできます。新しい構造の阻害剤は、体内での分解速度や分解経路が異なり、肝臓や腎臓に対する負荷も異なると予想されます。さらに、壊死筋の周辺において造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素の誘導に関与する分子や、本酵素の下流で機能するPGD<sub>2</sub>受容体などの分子も、筋ジストロフィーの進行軽減療法を開発するための新しい標的になります。これらの標的に対する薬を開発することで、個々の患者の遺伝的背景や副作用の状況に応じて、適当な治療薬を選択したり、いろんな治療薬を組み合わせることもできます。



◀ヒト造血管型PGD<sub>2</sub>合成酵素と阻害剤の正確な結合様式が判ったので、コンピュータ上で新しい阻害剤をスクリーニングできます。

### 臨床試験への発展

治療薬を開発するためには、健康人を使った安全性試験を行い、次に、動物実験で明らかになった治療効果を実証する必要があります。しかし、筋ジストロフィーの化学療法に対する治験の前例がないので、早急に臨床試験の体制を整える必要があります。さらに、これらの試験を問題なく進めた場合でも、認可を受けるまでに数年もの期間が必要です。その間に、患者の方々に貢献できる成果として、尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の測定による筋壊死モニターが考えられます。筋ジストロフィーの進行予防には、筋肉を鍛える運動療法が欠かせません。しかし、運動が強すぎると逆効果になります。そこで、運動療法の前後で尿中PGD<sub>2</sub>代謝物を測定することで、個々の患者の方々にあった運動メニューを決めることができます。尿中PGD<sub>2</sub>代謝物の免疫測定法の開発が既に終わっているので、全国のリハビリ施設から尿の検体を集め、測定結果を送り返すシステムを構築することができるでしょう。



▲筋ジストロフィー患者の尿中PGD<sub>2</sub>代謝物を分析ロボットを用いて測定すると、個々の患者にあった運動メニューを知ることができます。

### 参考文献

Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, Sato Y, Kamauchi S, Nagata N, Maruyama T, Taniike M, Urade Y. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. *Am J Pathol.* 174: 1735-1744 (2009)

Aritake K, Kado Y, Inoue T, Miyano M, Urade Y. Structural and functional characterization of HQL-79, an orally selective inhibitor of human hematopoietic prostaglandin D synthase. *J Biol Chem.* 281:15277-15286 (2006)

Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J, Urade Y, Taniike M. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. *Acta Neuropathol.* 104:377-384 (2002)