

家族性アミロイドポリニューロパチーの治療薬開発に関する基礎研究
～ Glu54 変異 TTR および EGCG-V30M TTR 複合体結晶構造を基盤として～

分子機能薬学専攻 遺伝子機能応用学分野 宮田 将徳

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、アミロイド線維が末梢神経を中心に全身の諸臓器に沈着し死に至る、常染色体優性の遺伝性難病である。FAP の原因であるアミロイド線維は、血清タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) により生じる。通常、正常型 TTR は四量体を形成し、サイロキシン (T_4) や レチノール結合タンパク質 (RBP) の輸送担体として機能するが、変異 TTR は構造安定性が低く、四量体から単量体への構造変化を容易に生じアミロイド線維を形成する。現在まで、多くの FAP 創薬研究が行われてきたにも関わらず、未だに有効な治療薬は開発されていない。これは、FAP 創薬研究の多くが、既知の TTR 四量体安定化剤の構造活性相関をベースにした、スクリーニング的な開発研究が主であったことに起因するものとも考えられる。したがって、この創薬障壁を打開するためには、今までにない大胆な発想をもとにした治療標的の設定が必要である。そこで、本研究では、第 1 に、四量体安定化剤の結合領域をより詳細に検討するため、新たな変異 TTR の立体構造を決定し、そのデータを基にした既存の TTR 四量体安定化剤の最適化を目的とし、種々の検討を行った。また、第 2 に、TTR 構造安定化とは異なり、TTR アミロイド線維形成能そのものを標的とした、新たな作用点を有する薬剤の開発を目的として、様々な観点から検討を行った。

1) TTR 四量体安定化剤の最適化を目的とし、TTR 四量体安定化剤の有効性が減弱化および無効化している Glu54 変異 (E54G, E54K) TTR に着目した。種々の生化学的解析より、Glu54 変異 TTR は四量体構造安定性の低下およびアミロイド線維形成能の亢進が認められ、実際に T_4 との結合および解離速度定数が顕著に変化することを見出した。その分子機構を明らかにするため、Glu54 変異 TTR の X 線結晶構造解析を実施した。その結果、Glu54 変異 TTR と T_4 との結合能低下は TTR 四量体安定化剤の結合領域の外部構造変化により生じることが示唆された。つまり、Glu54 は最適な長さのアミノ酸側鎖を提供することで四量体安定化剤の結合速度および親和性に寄与していることが示唆された。さらに、Glu54 変異 TTR 四量体構造安定性の低下は TTR 四量体安定性に重要である Lys15 側鎖構造の変化により生じていることが示唆された。つまり、Glu54 は Lys15 の正電荷を緩和することで TTR 四量体構造の安定性に寄与していることが示唆された。

2) TTR アミロイド線維形成能を標的とした薬剤開発を目的として、アミロイド β および α -シヌクレインに対してアミロイド線維形成抑制作用を有するエピガロカテキンガレート (EGCG) に着目した。種々の生化学的手法を用いた検討の結果、EGCG は recombinant WT および 異なる 3 種類の変異 (V30M, E54G, E54K) TTR に対して、アミロイド線維形成抑制作用を示すことが明らかになった。この際、TTR はヒト神経由来細胞に毒性を示さない oligomer を形成した。FAP 動物モデルが存在しないため、*in vivo* での応用を考慮し、哺乳類細胞を用いて 13 種類の変異 TTR に対する EGCG の作用を網羅的に解析した結果、多数の変異 TTR において、アミロイド線維形成の原因となる TTR 単量体化の抑制および神経毒性を示さない oligomer の形成が認められた。

次に、EGCG の TTR アミロイド線維形成抑制作用の分子機構を明らかにするため、EGCG-V30M TTR 複合体の X 線結晶構造解析を実施した。その結果、EGCG は既存の四量体安定化剤の結合領域とは異なる新たな結合領域に結合しており、その結合領域を介して四量体安定化作用および、oligomer 形成促進作用を示している可能性が示唆された。EGCG 結合領域へのアラニン変異導入により、EGCG はその結合領域と特異的に相互作用していることが明らかになった。さらに、EGCG は TTR 四量体安定化剤との併用により TTR アミロイド線維形成能を相乗的に抑制したことから、EGCG は TTR 四量体安定化剤とは異なり、TTR アミロイド線維形成能を標的とした新たな作用点を有することが明らかになった。

以上、本研究は、種々の生化学的および構造学的手法を用いて、TTR 四量体安定化剤の有効性が減弱化および無効化している Glu54 変異 TTR の生化学的特性および分子構造を解析し、既存の TTR 四量体安定化剤の作用減弱機構および TTR 四量体不安定化機構を明らかにした。つまり、本知見は既存の TTR 四量体安定化剤の最適化として、TTR 四量体安定化剤結合部位の開口径を考慮した化合物設計および Lys15 を標的とすることが重要であることを提唱した。また、TTR アミロイド線維形成能抑制剤の開発を企図し、他のアミロイド疾患に有効性を示す EGCG の作用機構の解析を実施し、EGCG が TTR アミロイド線維形成抑制作用および神経毒性を示さない oligomer 形成促進作用を有することを示した。その分子機構として、EGCG は TTR 四量体安定化剤とは異なる、新たな結合領域に結合することを明らかにした。さらに、EGCG は TTR 四量体安定化剤との併用により TTR アミロイド線維形成を相乗的に抑制した。したがって、本知見は緑茶カテキンの主成分 EGCG および EGCG の構造類似体が既存の TTR 四量体安定化剤とは異なる作用を介した四量体安定化作用および TTR アミロイド線維形成過程の新たな標的にも有効性を示す、FAP 治療候補薬となり得ることを提唱した。