48　病態特異的タンパク質間相互作用を標的とした創薬戦略	西田　基宏

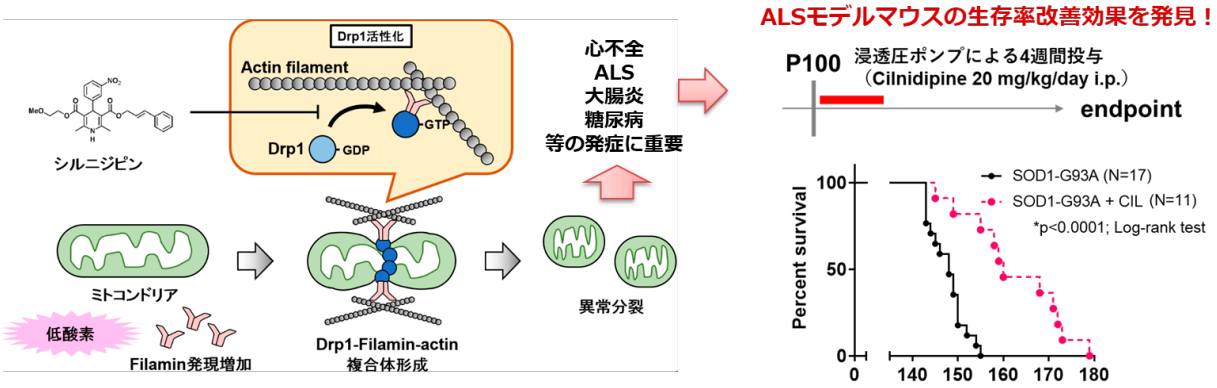
【目的】我々はこれまでに、虚血や高血糖などの負荷によって生じる病態特異的なタンパク質間相互作用（ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 Drp1－アクチン結合タンパク質（filamin）がミトコンドリアの過剰分裂を誘導し、心筋早期老化を誘導することを報告した。本研究では、病態特異的に Drp1-filamin 複合体が形成されるメカニズムの解明すること、およびミトコンドリア機能異常を伴う難治性疾患である筋萎縮性側索硬化症における Drp1-filamin 複合体形成阻害剤（既承認薬シルニジピン）の効果を検証し、その治療標的としての有効性を実証することを目的とした。

【方法】6 週令の C57BL/6J 雄マウスに低用量の有機水銀（MeHg）を暴露させた後、横行大動脈を結紮することで圧負荷モデルを作製し、圧負荷誘発性心不全の重症度を評価した。また、MeHg 曝露による心筋ストレス抵抗性減弱に Drp1-filamin 複合体形成が関与するかどうか、薬理学的手法を用いて検証した。治療標的としての Drp1-filamin 複合体形成の有効性を示すため、ストレプトゾトシン（200 mg/kg、i.p.）誘発性 I 型糖尿病、3%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性炎症性腸疾患（IBD）、筋萎縮性側索硬化症モデル（SOD1（G93A）変異）マウスにシルニジピンを投与し、その効果を調べた。

【結果】低用量MeHgを1週間曝露させたマウスに圧負荷（TAC）を施したところ、圧負荷後の急性心不全による突然死が増悪した。生き残ったマウスにおいても、心肥大の増悪が認められた。MeHg曝露マウスの心臓ではミトコンドリアが著しく分裂しており、メカニカルストレスに対して脆弱になることが細胞レベルでも示された。MeHg曝露によるミトコンドリア過剰分裂はDrp1またはFilaminのノックダウンや複合体形成阻害薬シルニジピン処置によって顕著に抑制された。さらに詳細な解析を行った結果、Drp1タンパク質のCys624-SH基がポリ硫黄鎖を形成することでDrp1活性が負に制御されており、ここがMeHgによって脱イオウ化されることでfilaminとの相互作用が促進し、結果的にミトコンドリア過剰分裂が誘発されることが明らかとなった。

マウスにストレプトゾトシンを投与すると、2週間で血糖値は最大値に達した。血糖値が最大レベルで安定してからシルニジピンを投与したところ、糖尿病治療薬のように急な作用ではなく、ゆっくりと2～3週間かけて血糖値が低下し、正常レベルまで回復することが明らかとなった。ALSモデルマウスは生後100日目から歩行障害を伴う病態を発症し、150日以降突然死を起こす。臨床適用量のシルニジピンをこのマウスに投与したところ、生存期間が3週間延長することが明らかとなった（図）。また、シルニジピン投与は、3%DSS投与マウスの大腸組織におけるインターロイキンやケモカイン類の産生を顕著に抑制し、生存期間も有意に延長させることが明らかとなった。以上より、シルニジピンはミトコンドリア機能異常を伴う疾患（ALSやIBD、I型糖尿病）の重症化を有意に抑制することがマウスで実証された。

既承認薬シルニジピンによる病態特異的タンパク質間（Drp1-filamin）相互作用の抑制を介した
ミトコンドリア品質維持と ALS 重症化の抑制



48. 病態特異的タンパク質間相互作用を標的とした創薬戦略

西田　基宏

*自然科学研究機構 生理学研究所 心循環シグナル研究部門

Key words：ミトコンドリア，品質管理，タンパク質間相互作用，エコファーマ創薬

緒　言

ミトコンドリアはエネルギー生成を担う重要なオルガネラであり、その品質は分裂・融合を繰り返すことで適切に管理されている。一方で、様々な病態・疾患においてミトコンドリアの過剰分裂や膨潤を伴う呼吸機能異常が報告されている。この原因として、ミトコンドリア分裂を促進するGTP結合タンパク質dynamin-related protein 1（Drp1）の異常活性化が指摘されているものの、Drp1 が恒常的に活性化する原因についてはよくわかっていない。我々は、細胞骨格アクチンの結合タンパク質であるフィラミンがDrp1のグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）となることを最近報告した［1］。そこで本研究では、病態時特異的に形成されるDrp1－フィラミン複合体に着目し、その分子制御機構を解明するとともに、Drp1－フィラミン複合体を標的とする創薬研究が、ミトコンドリア品質異常を原因とする様々な難治性疾患の革新的治療につながることを動物レベルで実証することを目的とした。さらに、クロスアポイントメント兼務先である九州大学大学院薬学研究院と連携し、既承認薬シルニジピンのDrp1－フィラミン複合体阻害作用を基盤に、より選択性の高い誘導体の創出を試みた。

薬の適応拡大は、臨床研究に要する莫大なコストとリスクを低減し、安全で有効な薬をいち早く患者に届ける画期的な工夫である。我々は、慢性心不全の原因と考えられる心筋細胞の早期老化現象に着目し、その前段階でミトコンドリア過剰分裂が起こることを偶然発見した。この知見を基に、低酸素ストレス誘発性の心筋ミトコンドリア分裂評価モデルを構築し、これを抑制しうる既承認薬の探索を行った結果、降圧薬シルニジピン（ジヒドロピリジン系Ca^{2+}チャネル拮抗薬）を得た（特願2016-05-26、WO2016080516A1）。この研究の過程で、シルニジピンはDrp1のGTPase活性を直接阻害しないことから、GEFとの相互作用促進の可能性が示された。Drp1と低酸素ストレス依存的に相互作用するタンパク質をプロテオーム解析で調べたところ、フィラミンが病態進行に伴って発現増加し、Drp1タンパク質と複合体を形成することを見出した。さらに、シルニジピンがDrp1－フィラミン複合体形成を特異的に阻害することで、心筋梗塞後の慢性心不全を回復させることもマウスレベルで示した［1］。Drp1 の異常活性化は、心筋症だけでなく、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、糖尿病といった様々な疾患・病態との関連が多く報告されているものの、臨床につながりそうな創薬研究成果は未だ得られていない［2］。そこで本研究では、I 型糖尿病および筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル（SOD1 変異（G93A））マウスを用いて、シルニジピンがミトコンドリア品質を保持することで病態改善効果を示すかどうか検討した。

方　法

1. 疾患モデルマウスの作製と機能評価

6週令のC57BL/6J雄マウスは3種混合麻酔薬にて麻酔を行い、人工呼吸下で開胸し、横行大動脈を結紮することで圧負荷モデルを作製した。心機能は、心エコー法（14-MHz、Nemio-XG（Toshiba））とエンドポイントにおける左心室内圧測定（Millar 1.4F、SPR 671（Millar Instruments））により評価した。薬剤誘発糖尿病はマウスにストレプトゾトシン（200 mg/kg、i.p.）を投与することで誘発し、炎症性腸疾患（IBD）モデルマウスは3%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を含む水を 1 週間自由飲水させることで誘発した。SOD1（G93A）変異マウスは、名古屋大学環境医学研究所の山中宏二教授から譲渡いただき、岡崎で研究を実施した。低用量の有機水銀

*現在の所属：九州大学 大学院薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室

（MeHg）曝露マウスは、神経機能異常を起こさない用量の MeHg（10 ppm）を含んだ自由飲水を 1 週間与えることで作製した。

2. ミトコンドリア品質維持のメカニズム解析

ラット新生児心筋細胞（NRCM）は 1～2 日齢のラット新生児の心臓を摘出し、酵素的に単離し、血清培地下でゼラチンコートディッシュ上に貼り付け、無血清培地下で初代培養を行った。siRNA は無血清培地に交換する際に lipefectamine 2000 試薬を用いて導入した。1%低酸素ストレスは培養ディッシュを低酸素用 CO_2インキュベーター内に置くことで誘導し、通常培地に交換することで再酸素化ストレスを誘発させた。細胞老化は SA-β-galactosidase assay kit を用いて評価した。Drp1 の GTP 結合活性は GTP-agarose を用いたプルダウンアッセイにより評価を行った。ミトコンドリア形態は Mitotracker Green FM でラベルした細胞を蛍光顕微鏡（BZ-700、keyence）下で観察し、部門で作製した解析プログラムを用いてミトコンドリア長を計測した。Drp1 に含まれる 9 つの Cys 残基をそれぞれ Ser に置換した CS 変異体遺伝子および Trp に置換した CW 変異体遺伝子は site-directed mutagenesis 法を用いて作製した。

結果および考察

1. MeHg曝露マウス心臓におけるDrp1-FLNa複合体形成の分子メカニズム

水俣病の原因として有名な有機水銀MeHgは、神経障害を起こさない低用量曝露によって心疾患リスクを増加させることが疫学調査により明らかにされている。そこで、低用量MeHgを1週間曝露させたマウスに圧負荷（TAC）を施したところ、圧負荷後の急性心不全による突然死が増悪した（図1）。生き残ったマウスにおいても、心肥大の増悪が認められた。MeHg曝露マウスの心臓ではミトコンドリアが著しく分裂しており、メカニカルストレスに対して脆弱になることが細胞レベルでも示された（図2）。MeHg曝露によるミトコンドリア過剰分裂はDrp1またはFilaminのノックダウンや複合体形成阻害薬シルニジピン処置によって顕著に抑制された。さらに詳細な解析を行った結果、Drp1タンパク質のCys624-SH基がポリ硫黄鎖を形成することでDrp1活性が負に制御されており、ここがMeHgによって脱イオウ化されることでfilaminとの相互作用が促進し、結果的にミトコンドリア過剰分裂が誘発されることが明らかとなった。

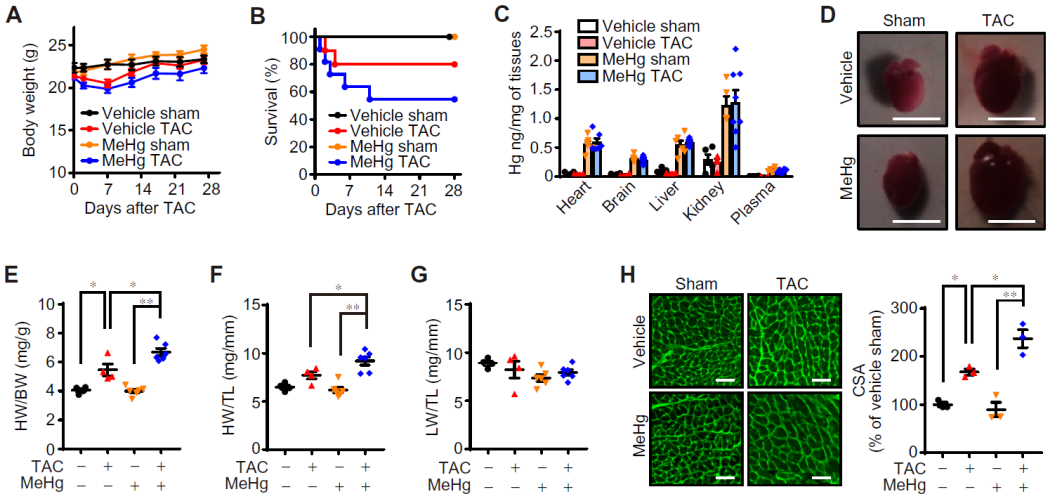


図 1. 低用量 MeHg 曝露マウスにおける心筋ストレス抵抗性の減弱

A) 低用量 MeHg 曝露（10 ppm、1 週間）によるマウス体重量変化。

B) 圧負荷（TAC）による突然死（急性心不全）の MeHg 曝露による悪化。

C) MeHg 曝露による各臓器 Hg 含量の増加。

D～H) TAC による心重量増加（心肥大）。Scale bars：1 mm（D）、200 μm（H）。

*P＜0.05、**P＜0.01、one-way ANOVA（Tukey 多重比較 post-hoc 検定）。

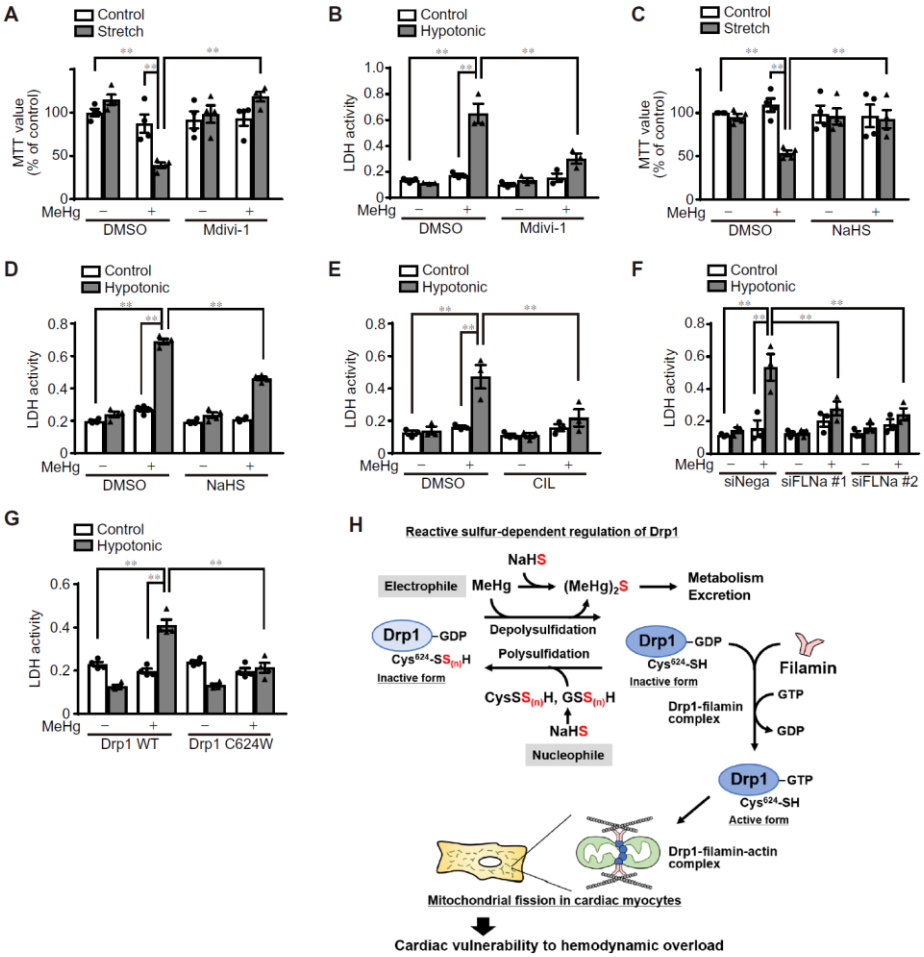


図 2. MeHg 曝露による心筋細胞のストレス抵抗性減弱における Drp1-filamin 複合体の関与

A～C） 低濃度 MeHg 曝露ラット新生児心筋細胞のメカニカルストレス（機械的伸展（A、C）、低浸透圧（B））誘発性細胞死に対する Drp1 阻害剤（Mdivi-1）（A、B）および NaHS（C）の抑制効果。

D～F） 低濃度 MeHg 曝露ヒト iPS 心筋細胞の低浸透圧ストレス誘発性細胞死に対する NaHS（D）、cilnidipine（E）、filamin siRNA（F）の抑制効果。

G） 低濃度 MeHg 曝露ラット新生児心筋細胞の低浸透圧ストレス誘発性細胞死に対する Drp1（野生型（WT）および C624W 変異体）の効果。

H） Drp1 タンパク質の Cys624 ポリ硫黄鎖の MeHg 曝露による脱イオウ化を介した Drp1-filamin 複合体形成と心筋ミトコンドリア過剰分裂。

**P < 0.01、one-way ANOVA（Tukey 多重比較 post-hoc 検定）。

2. シルニジピンの適応拡大の可能性

マウスにストレプトゾトシン（STZ）を投与すると、2 週間で血糖値は最大値に達した。血糖値が最大レベルで安定してからシルニジピンを投与したところ、糖尿病治療薬のように急な作用ではなく、ゆっくりと 2～3 週間かけて血糖値が低下し、正常レベルまで回復することが明らかとなった。ALS モデル（SOD1（G93A）変異）マウスは生後 100 日目から歩行障害を伴う病態を発症し、150 日以降突然死を起こす。臨床適用量のシルニジピンをこのマウスに投与したところ、生存期間が 3 週間延長することが明らかとなった（図 3）。また、シルニジピン投与は、3%DSS 投与マウスの大腸組織におけるインターロイキンやケモカイン類の産生を顕著に抑制し、生存期間も有意に延長させることが明らかとなった。以上より、シルニジピンはミトコンドリア機能異常を伴う疾患（ALS や IBD、I 型糖尿病）の重症化を有意に抑制することがマウスで実証された。

本研究により、病態特異的な Drp1-FLNa 複合体形成阻害が、ミトコンドリア過剰分裂を抑制することで難治性疾患（ALS や IBD）の予後悪化を抑制しうることを動物レベルで実証した。また、Drp1-FLNa 複合体形成の一つの機序として、環境化学物質による Drp1 タンパク質 Cys ポリ硫黄鎖の脱イオウ化（翻訳語修飾）が関与することも示された。今後、シルニジピン構造をベースにした Drp1-FLNa 相互作用の選択的阻害薬を創出し、革新的な治療薬の開発につなげていきたい。

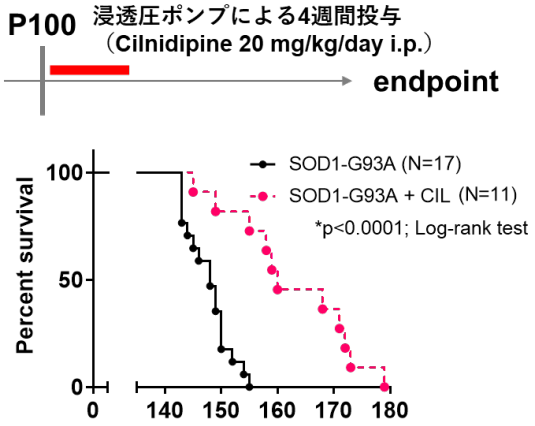


図 3. ALS モデルマウスの生存率に対するシルニジピンの延命効果

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院の王子田彰夫教授、西村明幸講師、川西英治講師、進藤直哉助教、西山和弘特任助教、島内司君（医学研究院大学院生）、自然科学研究機構生理学研究所（生命創成探究センター）心循環シグナル研究部門の田中智弘特任助教、下田翔君（総合研究大学院大学大学院生）、富田拓郎助教（現信州大学医学部准教授）、名古屋大学環境医学研究所の山中宏二教授、東北大学大学院医学研究科の赤池孝章教授、筑波大学医学部医療系の熊谷嘉人教授、国立医薬品食品衛生研究所薬理部の諫田康成部長である。

文　献

1） Nishimura A, Shimauchi T, Tanaka T, Shimoda K, Toyama T, Kitajima N, Ishikawa T, Shindo N, Numaga-Tomita T, Yasuda S, Sato Y, Kuwahara K, Kumagai Y, Akaike T, Ide T, Ojida A, Mori Y, Nishida M*. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence. Science Signal. 11, eaat5185 (2018). doi: 10.1126/scisignal.aat5185.

2） Tanaka T, Nishimura A, Nishiyama K, Goto T, Numaga-Tomita T, Nishida M*. Mitochondrial dynamics in exercise physiology. Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol. Feb 1. (2019). doi: 10.1007/s00424-019-02258-3.

3） Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishiyama K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M. Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload. Science Signal. 2019 Jun 25;12(587). pii: eaaw1920. doi: 10.1126/scisignal.aaw1920.