

ニーマン・ピック病 C 型の病態解明と新規治療薬の開発

千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室

中村 浩之

【背景】

ニーマン・ピック病 C 型 (Niemann-Pick disease type C; NPC) は細胞内コレステロール輸送を担う蛋白質の NPC1 または NPC2 をコードする遺伝子の変異により発症する神経変性疾患 (常染色体劣性遺伝病) である。NPC 患者の 95% は NPC1 遺伝子に、残りの 5% は NPC2 遺伝子に変異をもつ。その結果、遊離型コレステロールやスフィンゴ脂質などの脂質が細胞内の後期エンドソーム/リソソームに蓄積し、進行性の神経症状や肝脾腫などを呈する。スフィンゴ糖脂質合成の初発酵素であるグルコシルセラミド合成酵素の阻害薬であるミグルスタットはスフィンゴ糖脂質の蓄積を軽減することで治療効果を発揮する。しかしながら、ミグルスタットは遊離型コレステロールの蓄積を軽減することはできない。従って、ミグルスタットの治療効果は限定的であり、新たな治療薬の開発が望まれている。

NPC の発症とスフィンゴ脂質代謝異常との関連性がいくつか報告されている。NPC 細胞ではスフィンゴシンが蓄積しているが、このスフィンゴシンが後期エンドソーム/リソソーム内の Ca^{2+} 濃度を低下させて、遊離型コレステロールの蓄積を誘導する、というモデルが提唱されている。実際にスフィンゴシンをリン酸化してスフィンゴシン-1-リン酸を生成する酵素であるスフィンゴシンキナーゼを活性化する VEGF を NPC1 欠損マウス (*NPC1*^{-/-}マウス) に投与すると、スフィンゴシン量が低下し、遊離型コレステロールの蓄積が軽減され、マウスの生存期間が延長する。また、NPC ではスフィンゴミエリン (sphingomyelin; SM) も蓄積しており、この SM レベルの上昇が遊離型コレステロールの蓄積を誘導するというモデルも提唱されている。SM 分解酵素の 1 つである酸性スフィンゴミエリナーゼを NPC 細胞に添加すると、SM レベルが減少し、遊離型コレステロールの蓄積が軽減されることが示されている。また、私達の研究グループは、SM 合成に関与するセラミド輸送蛋白質 CERT の阻害剤 HPA-12 が、NPC 細胞において SM レベルを減少させ、遊離型コレステロールの蓄積を軽減することを報告した。このように、スフィンゴ脂質代謝の異常が、遊離型コレステロールの 2 次的な蓄積を誘導する可能性が示唆されている。

本研究では、NPC における遊離型コレステロールの蓄積とスフィンゴ脂質代謝異常との関連性について解析を行った。その結果、NPC1 を欠損した細胞やマウスにおいて、セラミド-1-リン酸 (ceramide-1-phosphate; C1P) のレベルが正常対照群に比べて高いことが明らかになった。C1P はセラミドがセラミドキナーゼ (ceramide kinase; CerK) によりリン酸化されて生成される。本研究では、NPC 細胞の CerK を阻害すると遊離型コレステロールの細胞内輸送異常が改善すること、さらに、*NPC1*^{-/-}マウスの CerK を遺伝的に欠損させるとマウスの生存期間が延長することが明らかになった。従って、CerK の阻害は NPC に対する新たな治療戦略になることが明らかになった。

【結果】

1. NPC における C1P 量の上昇

本研究では NPC のモデル細胞として、CHO 細胞の *NPC1* を遺伝的に欠損した細胞 (*NPC1*^{-/-}) および NPC 患者に由来する皮膚線維芽細胞 (*NPC1*^{*}) を用いた。どちらの細胞も、正常対照細胞に比べて細胞内に遊離型コレステロールが蓄積していることをフィリピン染色により確認した (図 1A)。これら細胞に含まれる C1P 量を LC/MS/MS により測定したところ、*NPC1*^{-/-}細胞および *NPC1*^{*}細胞ともに、正常対象細胞に比べて C1P 量が増加していた (図 1B, C)。また、NPC 患者および健康成人の血漿に含まれる C1P 量を測定したところ、健康成人に比べて NPC 患者の血漿では C1P 量が増加していた (図 1D)。次に、蛍光標識されたセラミド (BODIPY-Cer) を細胞に添加して 2 時間インキュベートし、細胞内でセラミドから産生された C1P 量を測定した。その結果、*NPC1*^{-/-}細胞および *NPC1*^{*}細胞において、正常対象細胞に比べて BODIPY-C1P の産生が促進され、この産生促進は CerK 阻害剤の NVP-231 によって抑制された (図 1E, F)。従って、NPC 細胞では CerK を介した C1P の産生が亢進していることが示唆された。

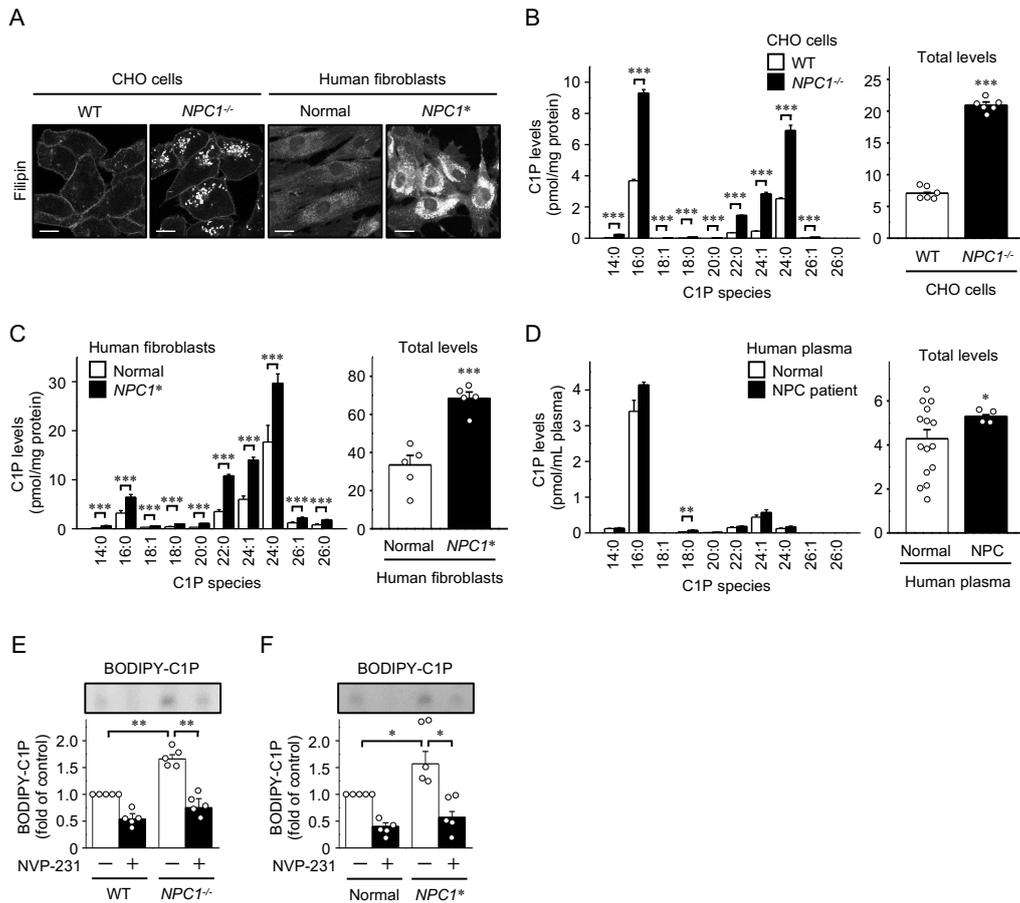


図 1

2. NPC における細胞内コレステロール蓄積と C1P の関連性

NPC における細胞内コレステロール蓄積と C1P の関連性について検討した。*NPC1*^{-/-}細胞において CerK 阻害剤の NVP-231 を処理すると、遊離型コレステロールの蓄積が軽減されることをフィリピン染色およびコレステロール量の測定により確認することができた (図 2A-C)。また、*NPC1**細胞においても同様に、NVP-231 は遊離型コレステロールの蓄積を軽減した (図 2D, E)。次に、*NPC1**細胞の CerK を siRNA によりノックダウンすることを試みた。CerK に対する siRNA を *NPC1**細胞および正常対象細胞にトランスフェクションし、48 時間培養することで、CerK の mRNA 量および C1P の産生が抑制されることを確認した (図 2F)。この時の遊離型コレステロールをフィリピンにより観察したところ、*NPC1**細胞における遊離型コレステロールの蓄積が CerK のノックダウンにより軽減されることが示された (図 2G, H)。

NPC1 を発現しない *NPC1*^{-/-}細胞においても CerK の阻害が遊離型コレステロールの蓄積を軽減したことから、CerK を阻害することにより、NPC1 に依存しないコレステロール輸送が改善される可能性を考えた。NPC 細胞では NPC1 の欠損に加えて、後期エンドソームからゴルジ体への小胞輸送の異常によりコレステロールが後期エンドソーム/リソソームに蓄積することが知られている。そこで、CerK の阻害が小胞輸送を改善させる可能性を検証した。後期エンドソームからゴルジ体への小胞輸送は低分子量 G 蛋白質の Rab9 が調節することが知られている。*NPC1*^{-/-}細胞に GFP-Rab9 を一過性発現させたところ、遊離型コレステロールの蓄積が軽減されたが、C1P を細胞に添加すると、GFP-Rab9 が発現している細胞においても遊離型コレステロールの蓄積が観察された (図 2I)。また、*NPC1*^{-/-}細胞に Rab9 の恒常活性化型変異体 (GFP-Rab9Q66A) を一過性発現させたところ、C1P を細胞に添加しても遊離型コレステロールの蓄積が軽減された。次に、*NPC1*^{-/-}細胞に Rab9 の恒常不活性化型変異体 (GFP-Rab9S21N) を一過性発現させたところ、NVP-231 を処理しても遊離型コレステロールの蓄積が軽減されなかった。これらの結果から、*NPC1*^{-/-}細胞では C1P が後期エンドソームからゴルジ体への小胞輸送を阻害することによって、遊離型コレステロールの蓄積を促進することが示唆された。

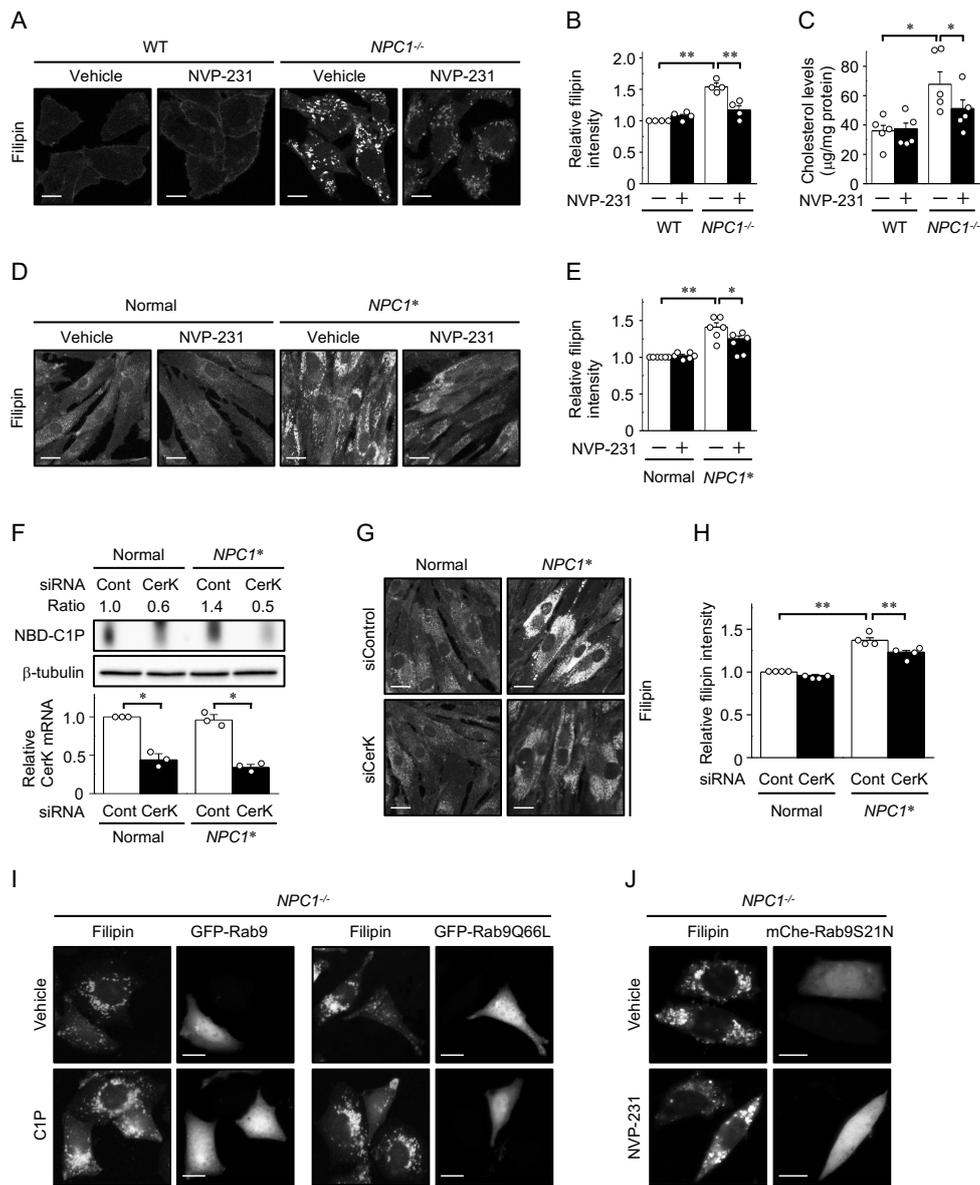


図 2

3. NPC の病態における CerK の関与

マウス (63 日齢) の脳に含まれる C1P 量を LC/MS/MS により測定したところ、*NPC1*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて C1P 量が増加していた (図 3A)。そこで、NPC の病態における CerK/C1P の関与を検証するために、*NPC1* と *CerK* を欠損した 2 重欠損マウス (DKO マウス) を作製した。これらマウス (45 日齢) の小脳組織切片における遊離型コレステロールをフィリピンにより染色したところ、*NPC1*^{-/-}マウス的小脳において遊離型コレステロールの蓄積が観察され、DKO マウスでは遊離型コレステロールの蓄積が減弱している様子が観察された (図 3B)。次に、マウス (45 日齢) の小脳プルキンエ細胞を、抗 Calbindin 抗体を用いた免疫染色により観察したところ、*NPC1*^{-/-}マウスではプルキンエ細胞の顕著な脱落が観察されたが、DKO マウスでは神経脱落が抑制されていた (図 3C)。小脳の各 lobe におけるプルキンエ細胞の数を計測したところ、*NPC1*^{-/-}マウスの lobe II, III, IV/V においてプルキンエ細胞の顕著な脱落が観察され、DKO マウスでは脱落が抑制されていた (図 3D)。NPC の脳においては、グリア細胞が活性化し、神経脱落を促進することが知られている。そこで、マウス (45 日齢) の小脳組織切片において、アストロサイト及びミクログリアを、抗 GFAP 抗体および抗 Iba-1 抗体を用いて、それぞれ免疫染色により観察した。その結果、*NPC1*^{-/-}マウスではアストロサイト及びミクログリアが活性化しており、この活性化は DKO マウスで抑制されていた (図 3E, F)。次に、*NPC1*^{-/-}マウスと DKO マウスの生存期間を比較した。その結果、DKO マウスの生存期間は *NPC1*^{-/-}マウスに比べて約 11 日間延長した (図 3G)。さらに、NPC 治療薬として承認されているミグルスタットをマウスに 25 日齢から 1 日 1 回、600 mg/kg を経口投与して生存期間を比較した。その結果、*NPC1*^{-/-}マウスにミグルスタットを投与した時の平均生存期間が 113 日であったのに対し、DKO マウスにミグルスタットを投与した時の平均生存期間が 138 日であった。これらの結果

から、CerK とグルコシルセラミド合成酵素を同時に阻害することが NPC の治療に有効である可能性が示唆された。

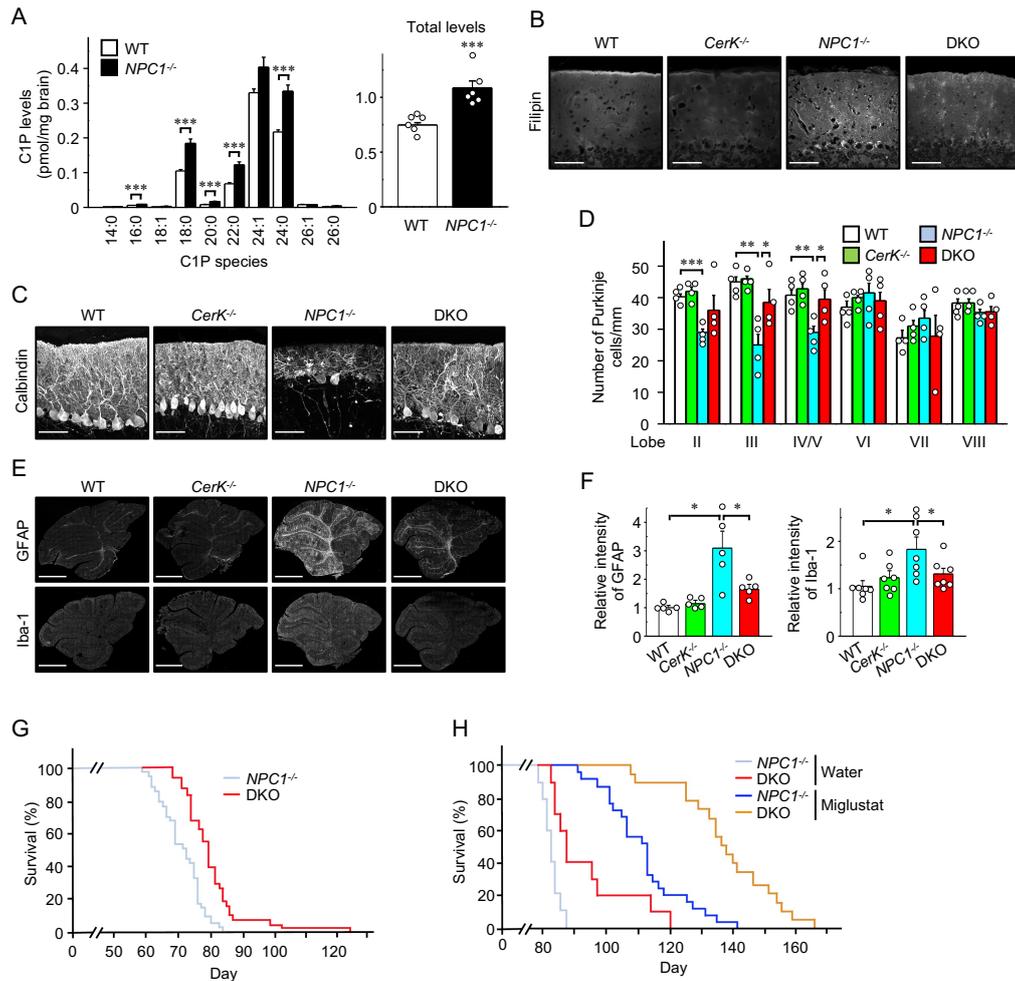


図 3

4. 新規 CerK 阻害薬の開発

千葉大学薬学部が所有する化合物ライブラリーから CerK 阻害作用を有する化合物を探索した。その結果、既存の CerK 阻害薬 NVP-231 とは構造が全く異なる化合物を発見することに成功した。本化合物の CerK に対する IC₅₀ は約 12 μM であった。本化合物をリード化合物として 40 種類の誘導体を有機合成したところ、IC₅₀ が約 16 nM の新規化合物を合成することに成功した。今後、更なる構造最適化を行い、非臨床試験を実施したいと考えている。