

メナヒドロキノン-4のミトコンドリア送達によるミトコンドリア機能の回復・強化による神経細胞機能改善剤

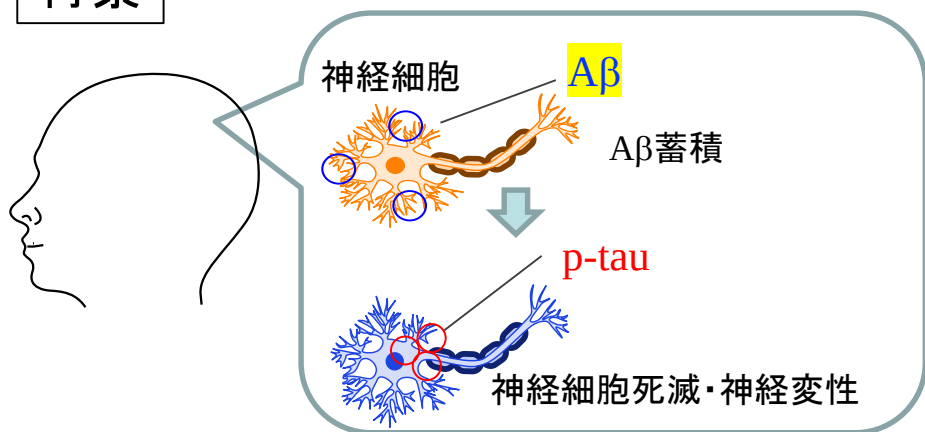
福岡大学 薬学部

教授 高田 二郎

令和2年11月26日

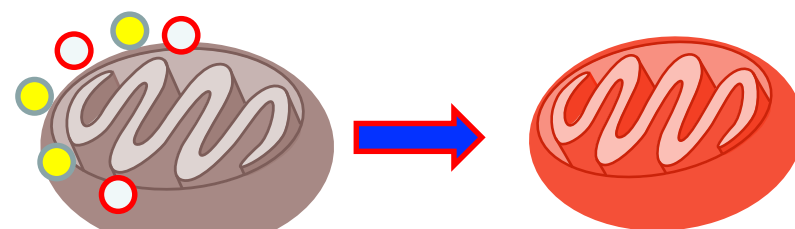
本発明でカバーされる化合物は、

- (1) メナヒドロキノン-4(MKH)のエステル型誘導体であり、MKH生合成酵素UBIAD1に依存しないでMKHを効率的に神経細胞のミトコンドリアに送達することにより、品質管理機構が破綻した機能不全ミトコンドリアの回復・強化を可能にし、アルツハイマー病(AD)やパーキンソン病(PD)などの神経変性疾患を克服する新規技術である。
- (2) 現在、AD治療にはコリンエステラーゼ阻害薬やNMDA型受容体アンタゴニストなど4種類の薬物が認可されているが、いずれも進行を遅らせるのが治療の限界である。
本発明は従来技術とは全く異なりADの特徴的病変であるアミロイド- β ペプチド(A β)の強い凝集と過剰リン酸化タウ(p-tau)を標的としたADの病状の進行を抑制できる新規技術である。
- (3) 現在、PD治療にはL-ドパとドパミンアゴニストを中心とする治療薬が用いられているが、長期使用による副作用(有害事象)が治療を困難にしており、作用機構の異なる治療薬が望まれている。
本発明は従来技術とは全く異なり、PDの病因である低下したミトコンドリア呼吸鎖複合体機能を回復させることにより、 α -シヌクレイン凝集を抑制する新規技術である。



新技術：ミトコンドリア機能障害改善薬
 UBIAD1 に依存しないMKH送達により
 機能不全ミトコンドリア回復・強化し
 Aβとp-tauを無効化

MKH 増加



新規治療標的

機能回復

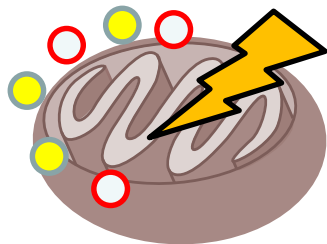
AD患者の脳では

- ・ アミロイド-βペプチド (Aβ)
- ・ 過剰リン酸化タウタンパク質 (p-tau)

正常ミトコンドリア



機能不全ミトコンドリア
(品質管理障害等)



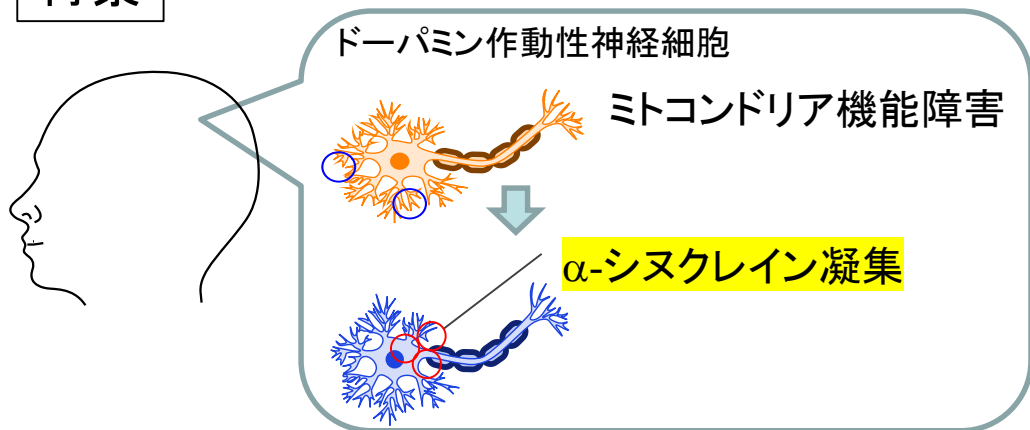
UBIAD1発現低下

MKH レベル低下

神経細胞死滅
神経変性

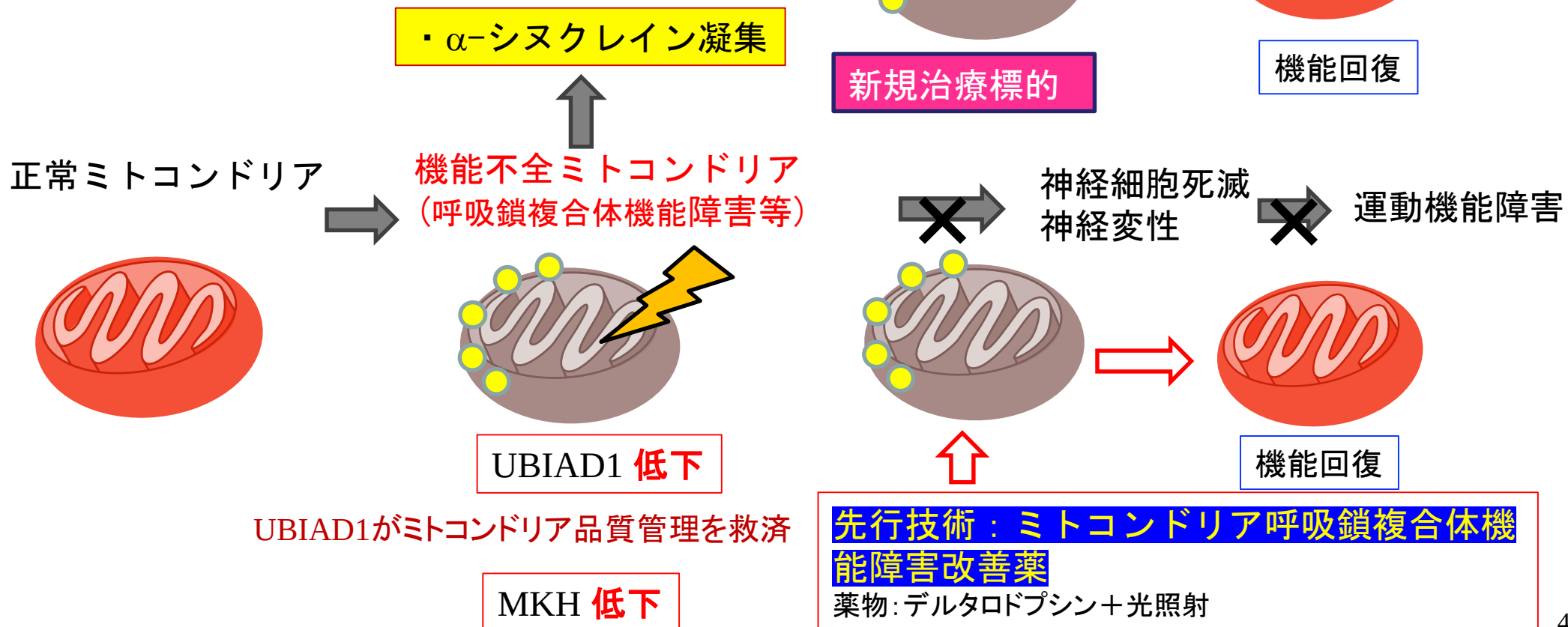
AD進行・
認知機能障害

先行技術：ミトコンドリア機能障害改善薬
 薬物：ウロリチンA (UA)、アクチノニン (AC)
 遺伝子的方法 (ヒトミトコンドリア転写因子A (hTFAM) 処理
 や活性化転写因子atfs-1の過剰発現)



新技術：ミトコンドリア機能障害改善薬
UBIAD1 に依存しないMKH送達により
ミトコンドリア呼吸鎖複合体機能の
回復・強化(α-シヌクレイン凝集を無効化)

PD患者の脳では



UBIAD1とMKH

- UBIAD1はビタミンK₃ ヒドロキノンとゲラニルゲラニルピロリン酸からMKHを生成する酵素（図1）
- MKHはヒドロキノン型（2電子還元体）でありH⁺供与体である。
- 健常人の脳にはUBIAD1が多く発現しており、MKHが多く供給されている。

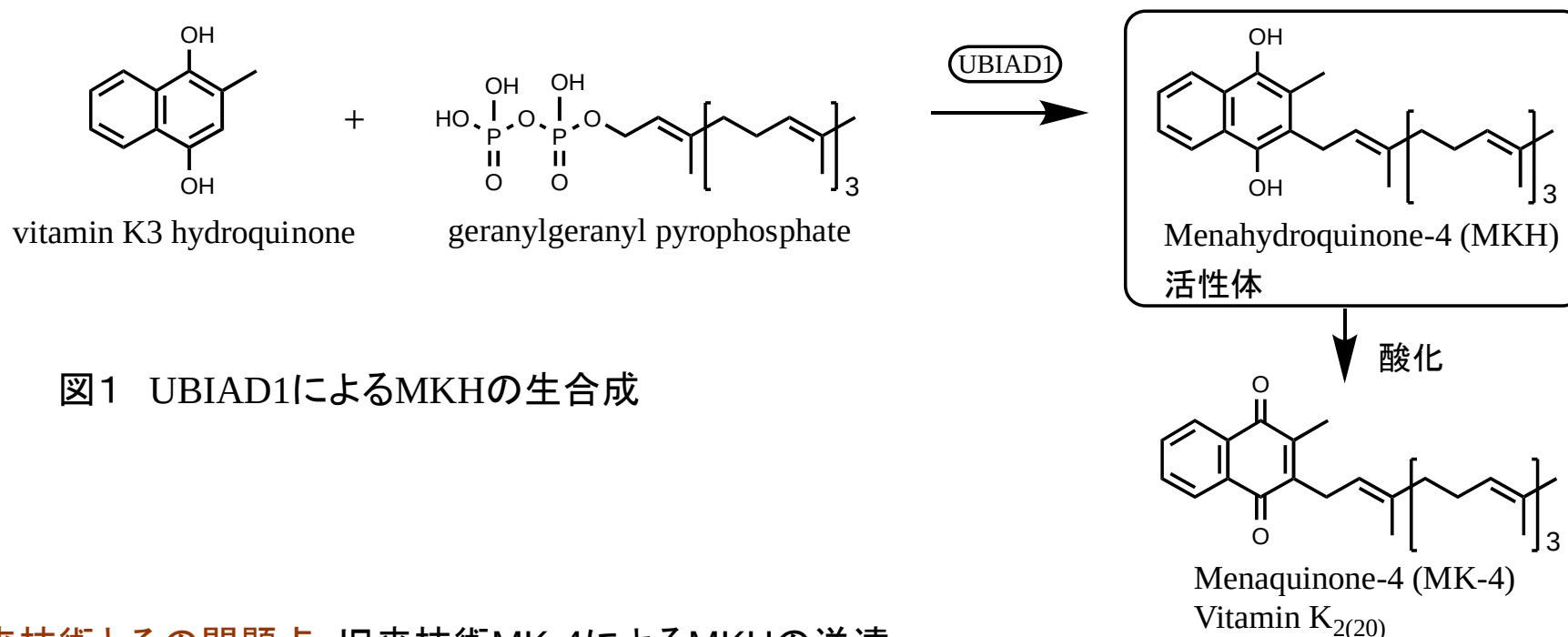
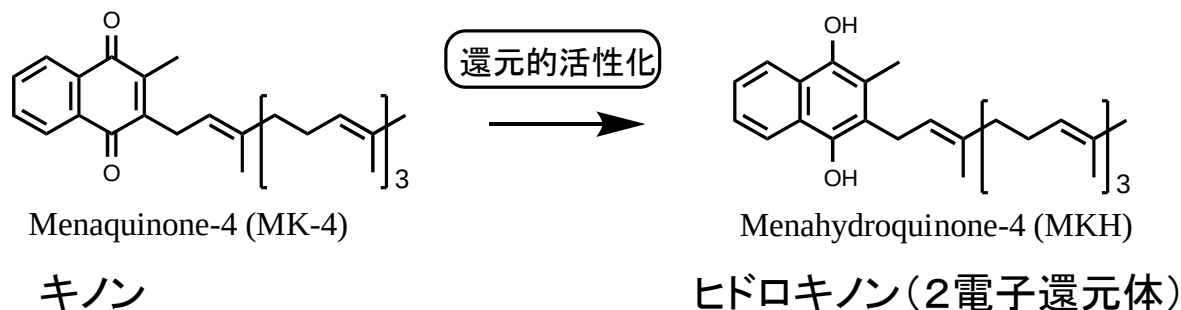


図1 UBIAD1によるMKHの生合成

従来技術とその問題点: 旧来技術MK-4によるMKHの送達

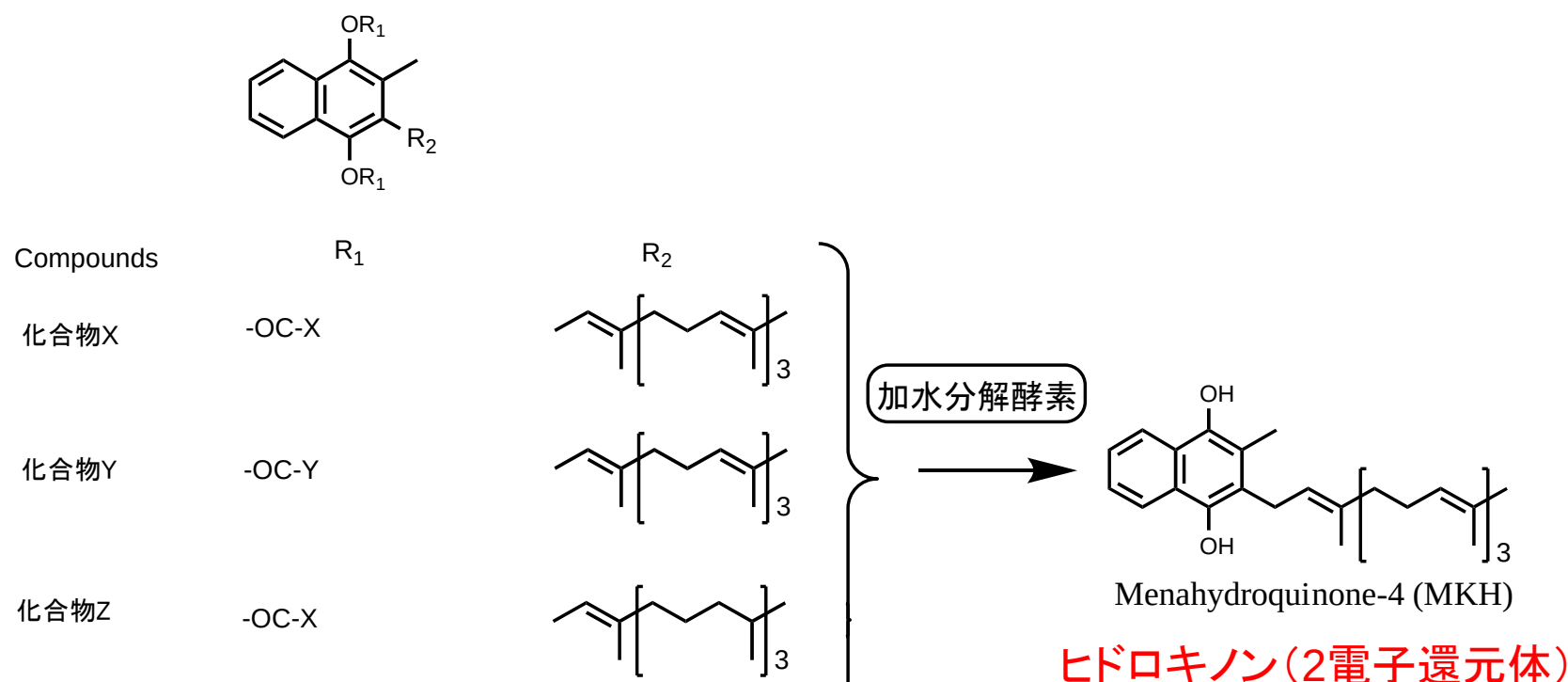
- MK-4のミトコンドリア親和性とMK-4のMKHへの還元的活性化を必要とする。



本発明が解決できる課題: UBIAD1を必要としないでMKHをミトコンドリアに送達し、機能不全ミトコンドリアを効果的に回復・強化しADやPDの神経変性疾患を克服。

新技術: MKH誘導体によるMKHの送達

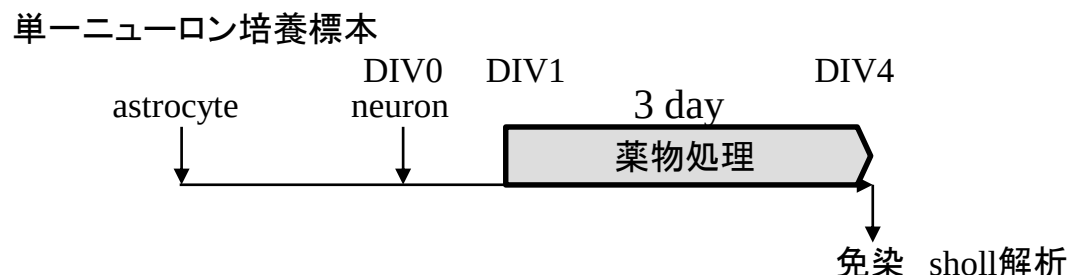
- MKH誘導体のミトコンドリア親和性と加水分解による2電子還元型MKH生成を制御できる。ミトコンドリア親和性が高いと予想されるカチオン性誘導体(化合物X)と、細胞内再変換性が高いアニオン性誘導体(化合物Y)に関して評価した。特定の構造を有するビタミンKヒドロキノン誘導体が、ミトコンドリアへの送達性に優れ、Aβ神経障害を抑制できること、ミトコンドリア機能障害を克服できることを見出し、本発明に至った。
- 特定の構造を有するビタミンKヒドロキノン誘導体が、ミトコンドリアへの送達性に優れ、PDにおけるミトコンドリア呼吸鎖複合体機能障害を克服できることを見出し、本発明に至った。



complex I, II, IIIを回避したミトコンドリア電子伝達

1) β -アミロイド($A\beta$)による神経障害に対するMKH誘導体の改善効果

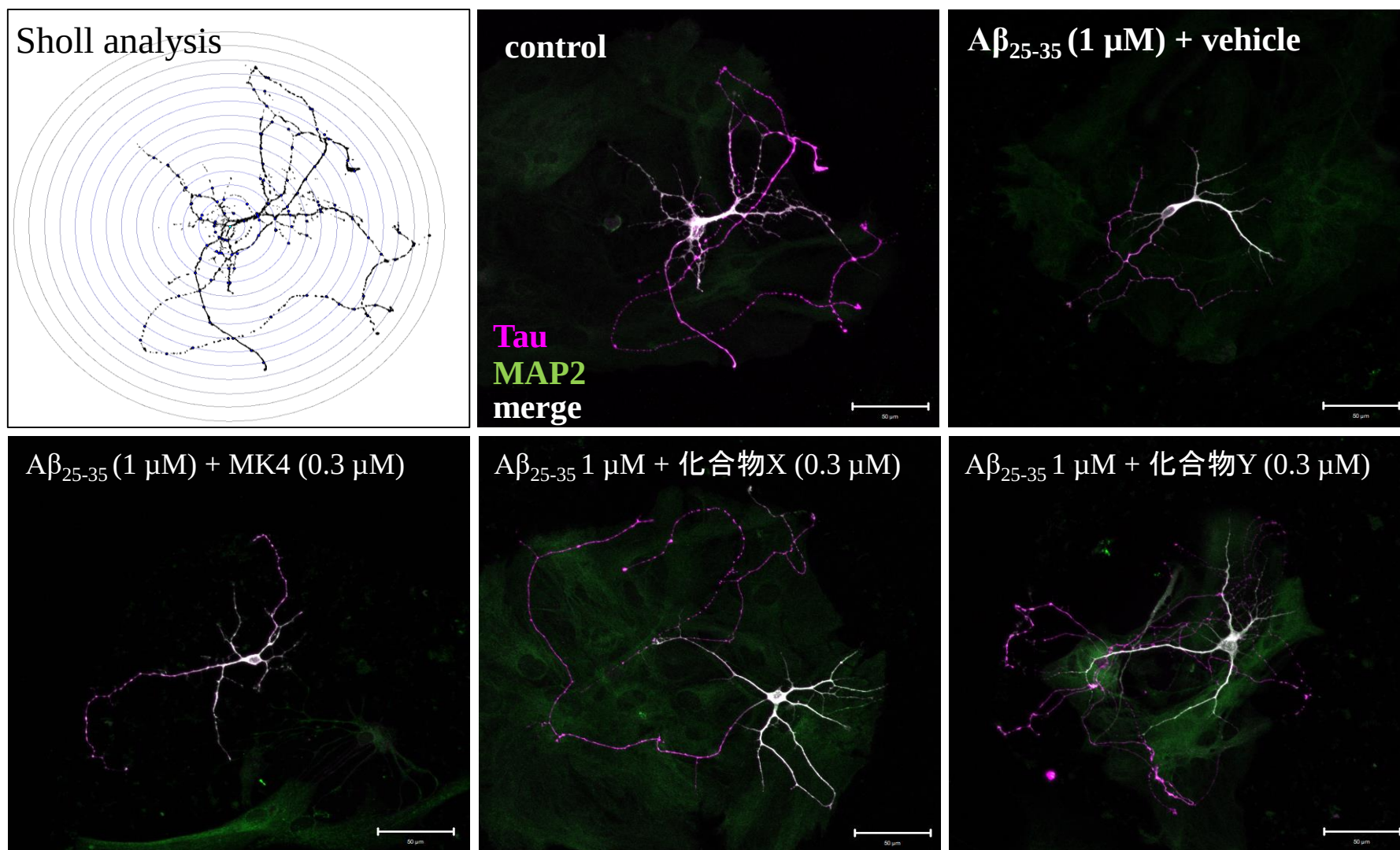
- 単一ニューロン・アストロサイト共培養標本
- 神経変性改善効果をTau(軸索神経突起)抗体で免疫染色
Map2(樹状突起)抗体で免疫染色し、同心円交差数で評価



結果

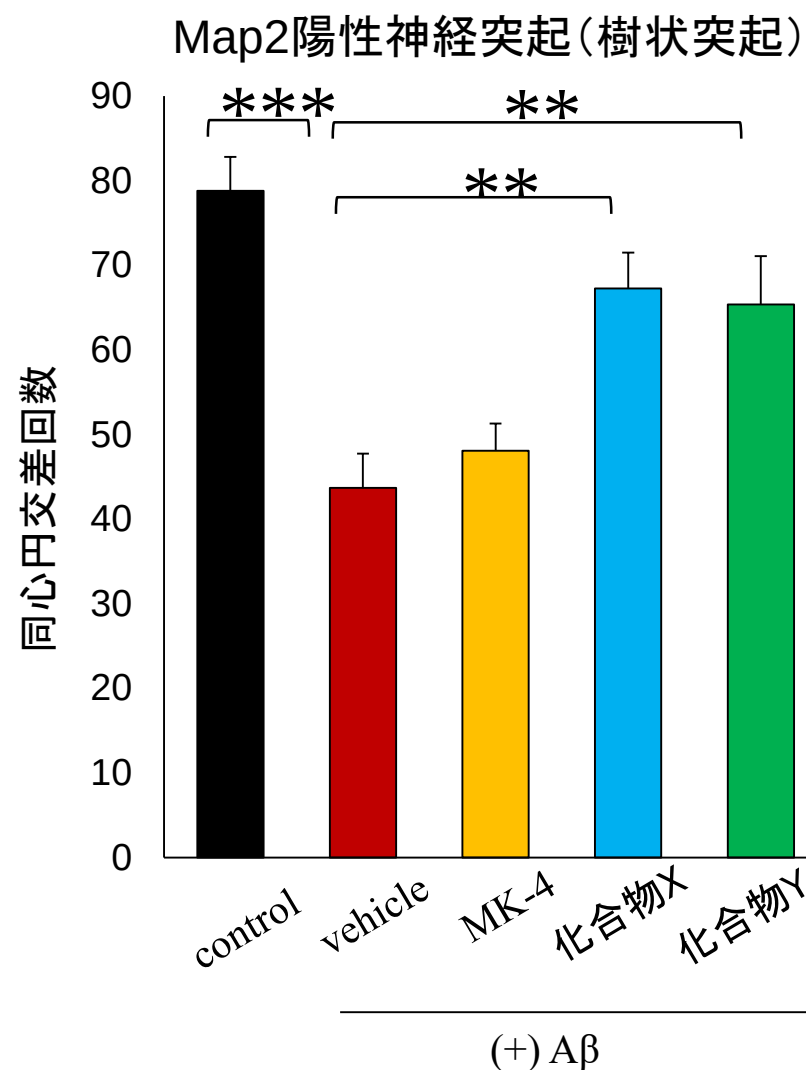
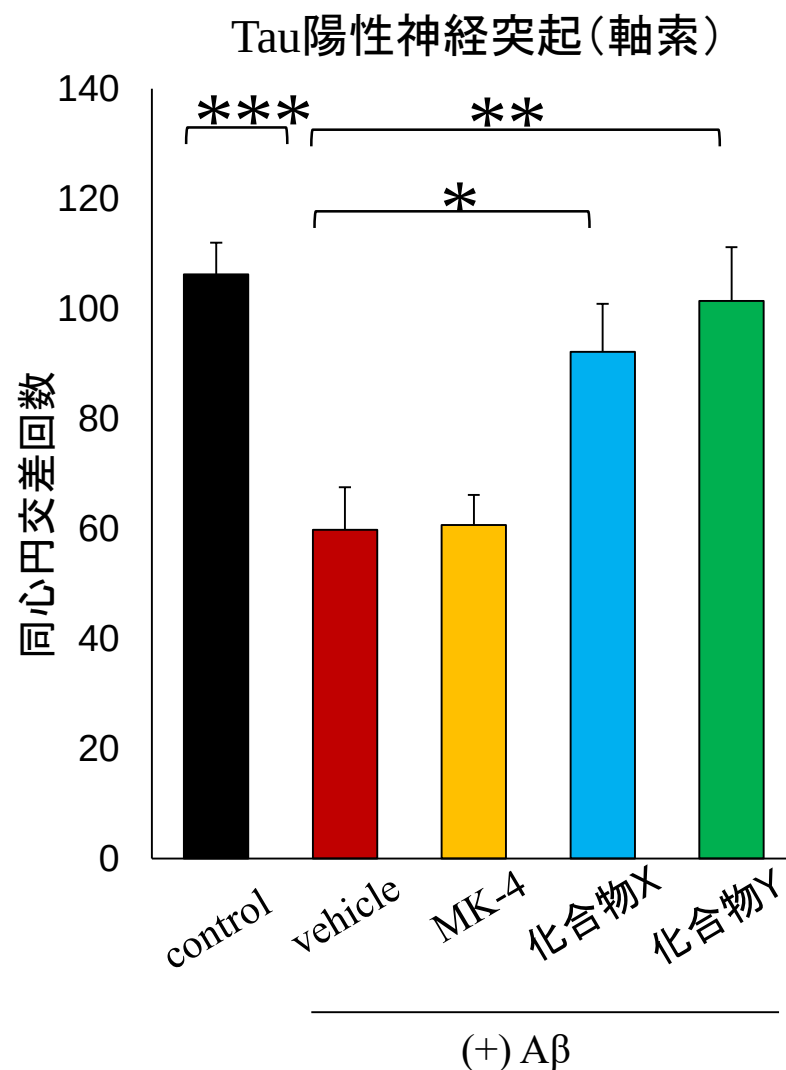
- Sholl analysis法により、樹状突起及び軸索の分岐・伸長の変化について評価した。ニューロンの染色結果を図1に示した。
- 神経軸索の分岐・伸長と神経樹状突起の分岐・伸長はどちらも $A\beta_{25-35}$ によって有意に抑制され神経障害が観察された
- MKH誘導体(化合物X)と(化合物Y)は神経軸索と神経樹状突起どちらの神経障害も有意に改善し(図1,2)、神経障害の改善効果が明らかとなった
- MK4(MK-4)はいずれの神経障害に対しても改善効果は観察されなかった
- MKH誘導体は低濃度 $0.3\mu\text{M}$ で β -アミロイド神経変性に対する改善効果を有することから、高い安全性が予想される

図1 A β による神経細胞障害に対する改善効果



単一ニューロン・アストロサイト共培養標本を用いて、A β ペプチドによる神経細胞障害におけるMKH誘導体(化合物XおよびY)の神経変性改善効果をTau(軸索神経突起)抗体およびMap2(樹状突起)抗体で免疫染色し、同心円交差数で評価した。

図2 A β による神経細胞障害に対するMKH誘導体の改善効果



- A β により神経軸索と神経樹状突起の分岐・伸長は有意に抑制された(神経細胞障害)
- MK-4(従来技術ビタミンK₂)はA β 誘発神経細胞障害を改善しない(従来技術の問題点)
- MKH誘導体(化合物XおよびY)はA β 誘発神経細胞障害を有意に改善する(新技術の特徴)
- 化合物Xおよび化合物Yは低濃度0.3 μ Mで効果を示す(高い安全性を示唆)

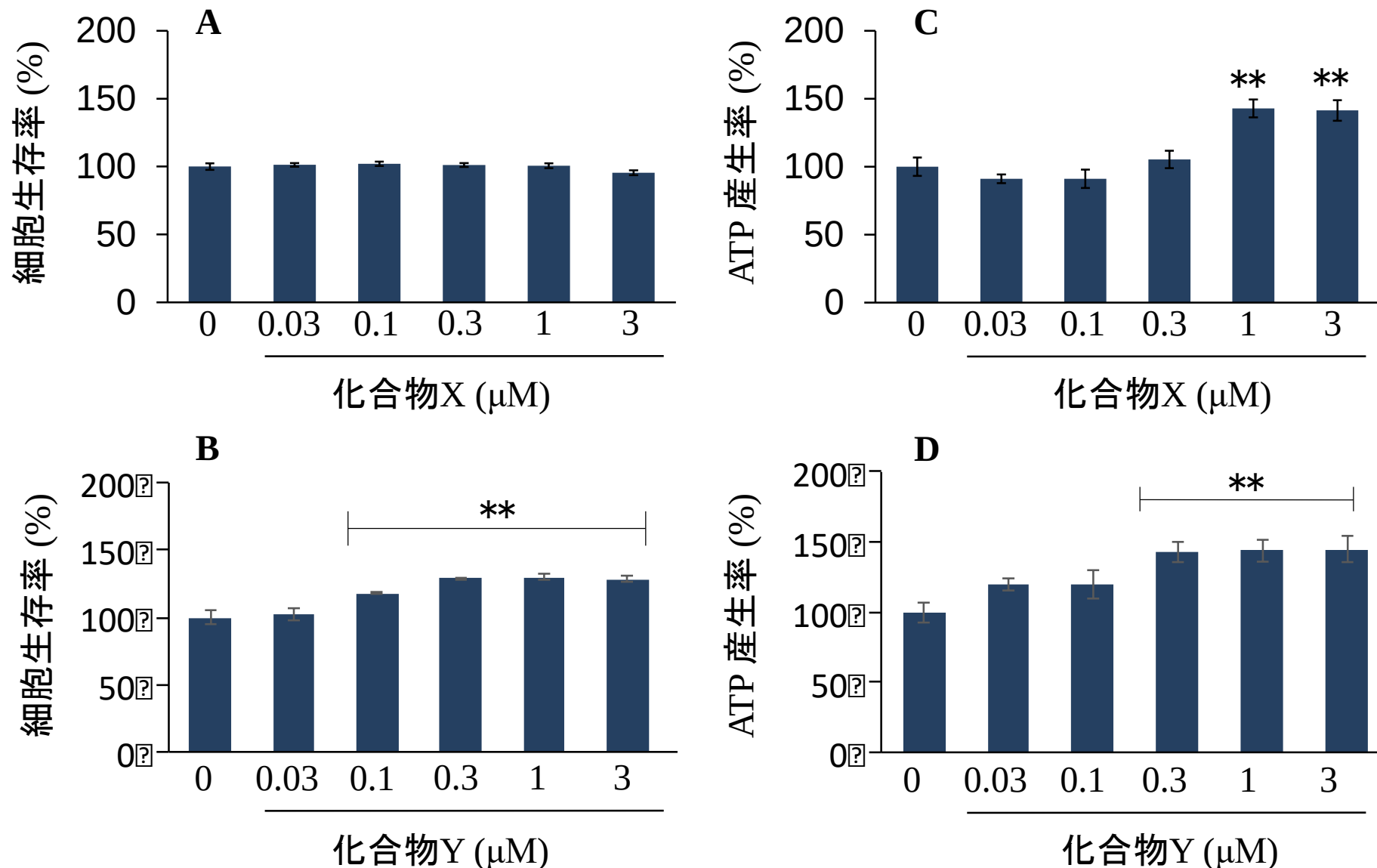
2) MKH誘導体によるミトコンドリア機能障害の改善効果

- ヒト神経芽細胞株(SH-SY5Y)において複合体I阻害剤ロテノン、複合体II阻害剤(3-ニトロプロピオン酸(3-NP)、複合体III阻害剤(アンチマイシンA)、脱分極剤(カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン, CCCP)によるミトコンドリア機能障害に対する効果を評価した
- 細胞死: cell titer blueで生存測定
- ATP産生: cell titer gloでATP測定
- 膜電位: JC-1染色 脱分極(Green), 過分極 (Red))で評価

結果

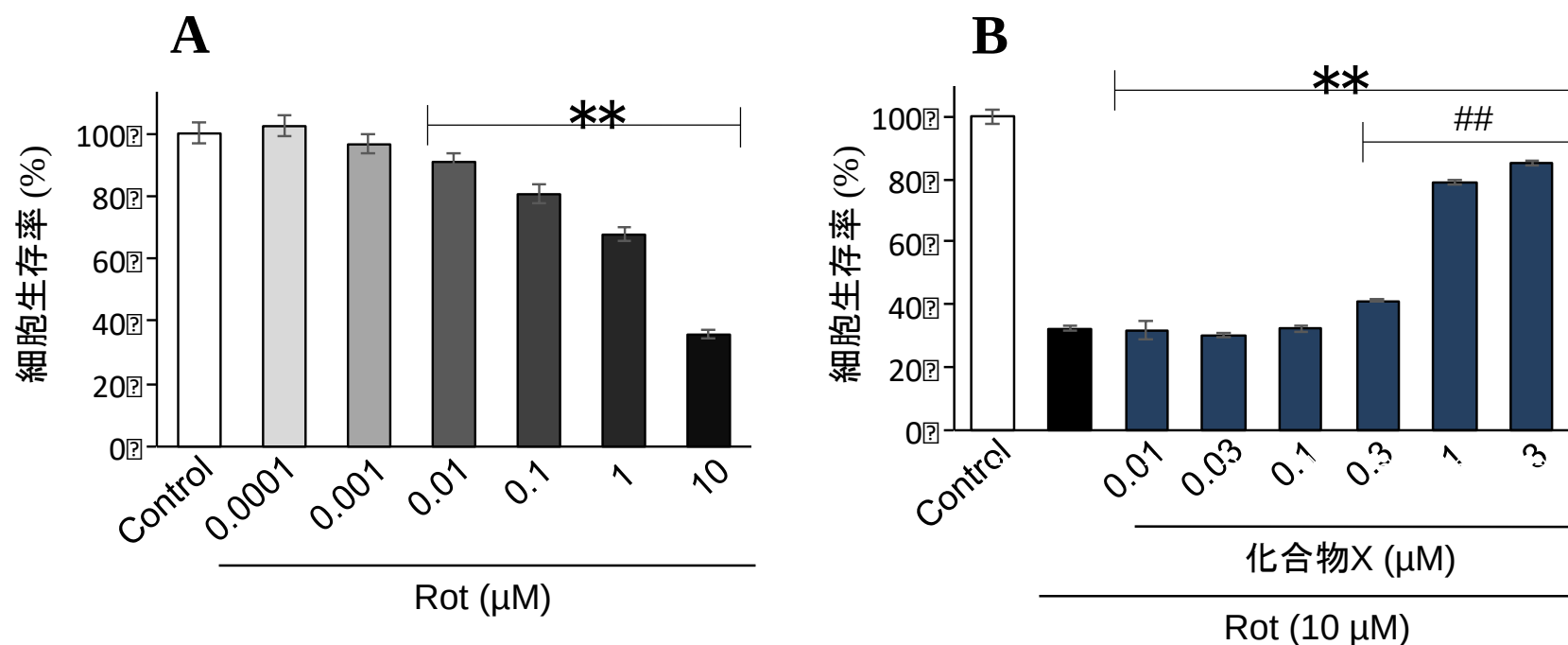
- MKH誘導体はATP産生を亢進できる(図3)。
- MKH誘導体はミトコンドリア電子伝達系複合体I 阻害剤(ロテノン)による細胞毒性を抑制できる(図4)、ATP産生抑制を改善できる(図5)、ミトコンドリア膜電位低下を改善できる(図6)、ROS生成促進を抑制できる(図7)。
- MKH誘導体はミトコンドリア電子伝達系複合体II阻害剤(3-ニトロプロピオン酸、3-NP)による細胞毒性を抑制でき、ATP産生抑制を改善でき、ミトコンドリア膜電位低下を改善できる(図8)。
- MKH誘導体はミトコンドリア電子伝達系複合体III阻害剤(アンチマイシンA)による細胞毒性を抑制でき、ATP産生抑制を改善できる(図9)
- MKH誘導体はミトコンドリア膜電位脱共役剤による細胞毒性を抑制できる(図11)。

図3 SH-SY5Y細胞生存率および細胞内ATPに対するMKH誘導体の影響



- 薬物添加24時間培養後、細胞生存率をcell titer blueで測定、細胞内ATPをcell titer gloで測定
- 細胞生存率は、化合物X、Yは、どちらも 0-3 μM において培養24時間後低下せず細胞毒性は見られなかった
- 細胞内ATPは化合物Xの1-3 μM で、化合物Yで0.3-3 μM で有意に高くなった。vs 0 μM (**=p<0.01)

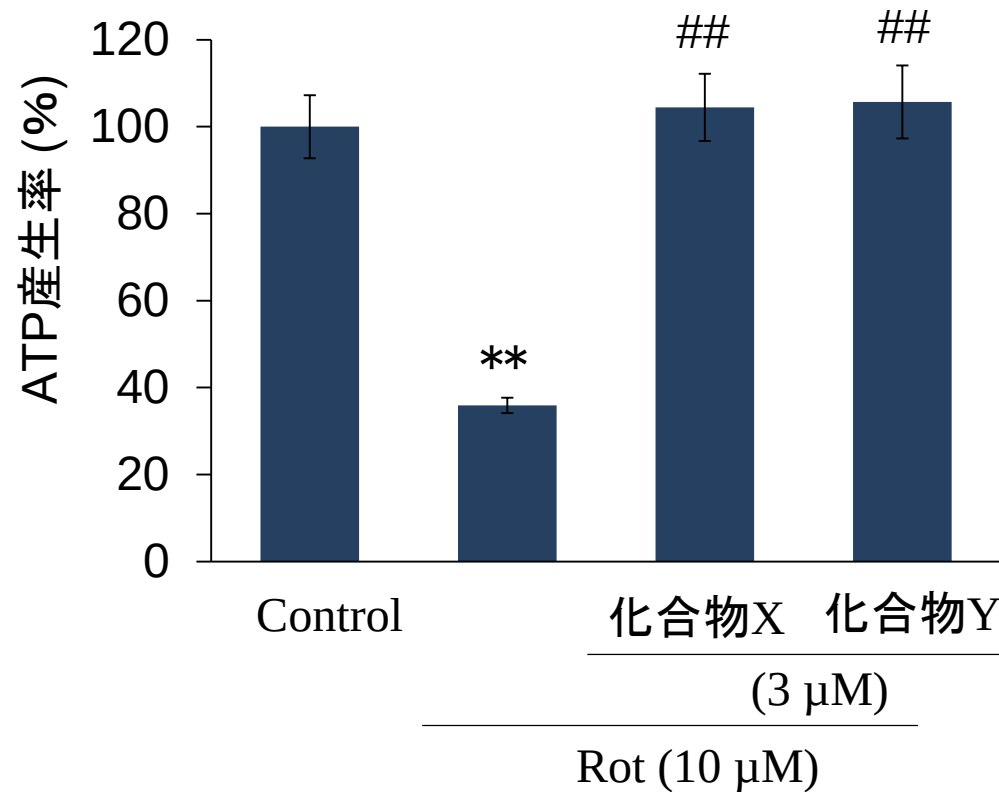
図4 ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害剤 (ロテノン)誘発性細胞毒性に対するMKH誘導体の効果 (SH-SY5Y細胞における)



- 複合体I阻害剤(ロテノン)は投与量依存的に細胞毒性を示した
- 複合体I阻害剤誘発細胞毒性は、MKH誘導体化合物Xによって投与量依存的(0.3-3μM)に抑制された。

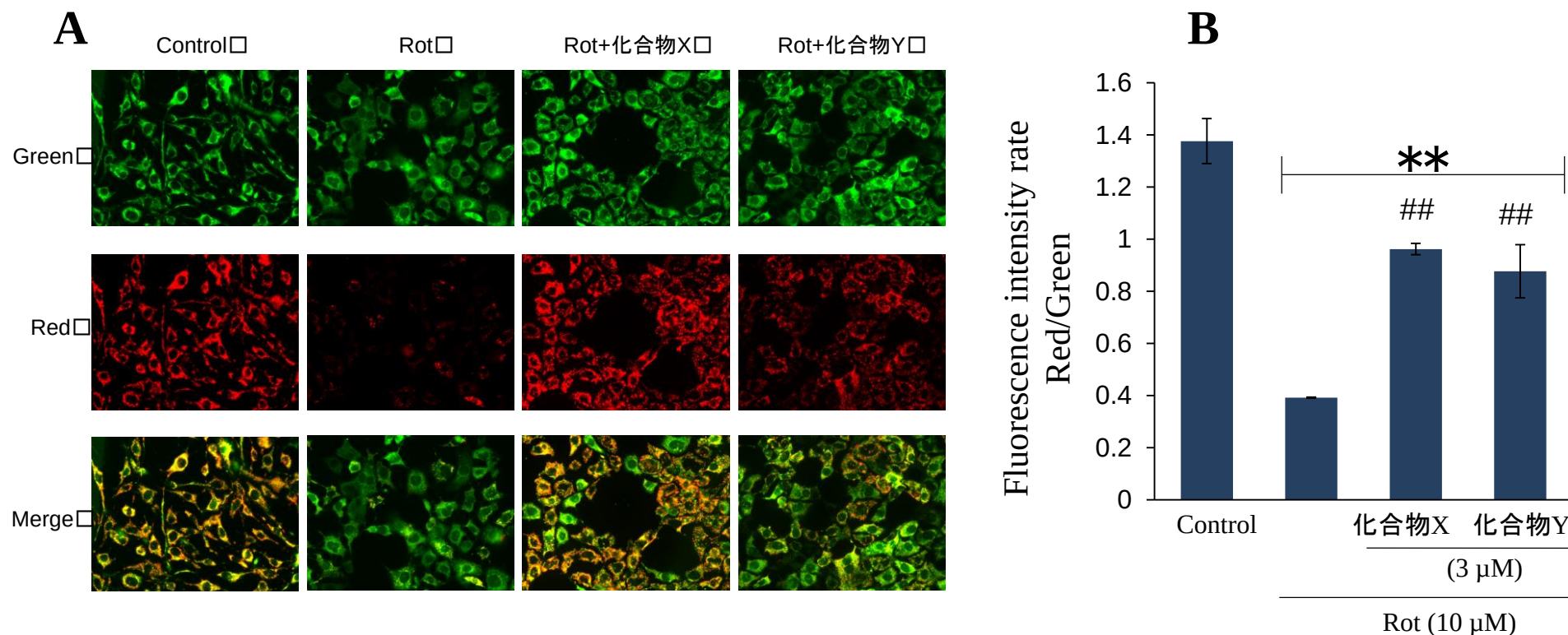
vs control (**=p<0.01), vs Rot (##=p<0.01)

図5 ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害剤 (ロテノン)誘発性細胞内ATP産生抑制に対するMKH誘導体の改善効果 (SH-SY5Y細胞における)



- 複合体I阻害剤(ロテノン)によりATP産生が抑制された。
- MKH誘導体(化合物XとY)は複合体I阻害によるATP産生抑制を有意に改善した。
vs control (**=p<0.01)、vs Rot (##=p<0.01)

図6 ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害剤 (ロテノン)誘発性ミトコンドリア膜電位低下に対するMKH誘導体の改善効果 (SH-SY5Y細胞における)

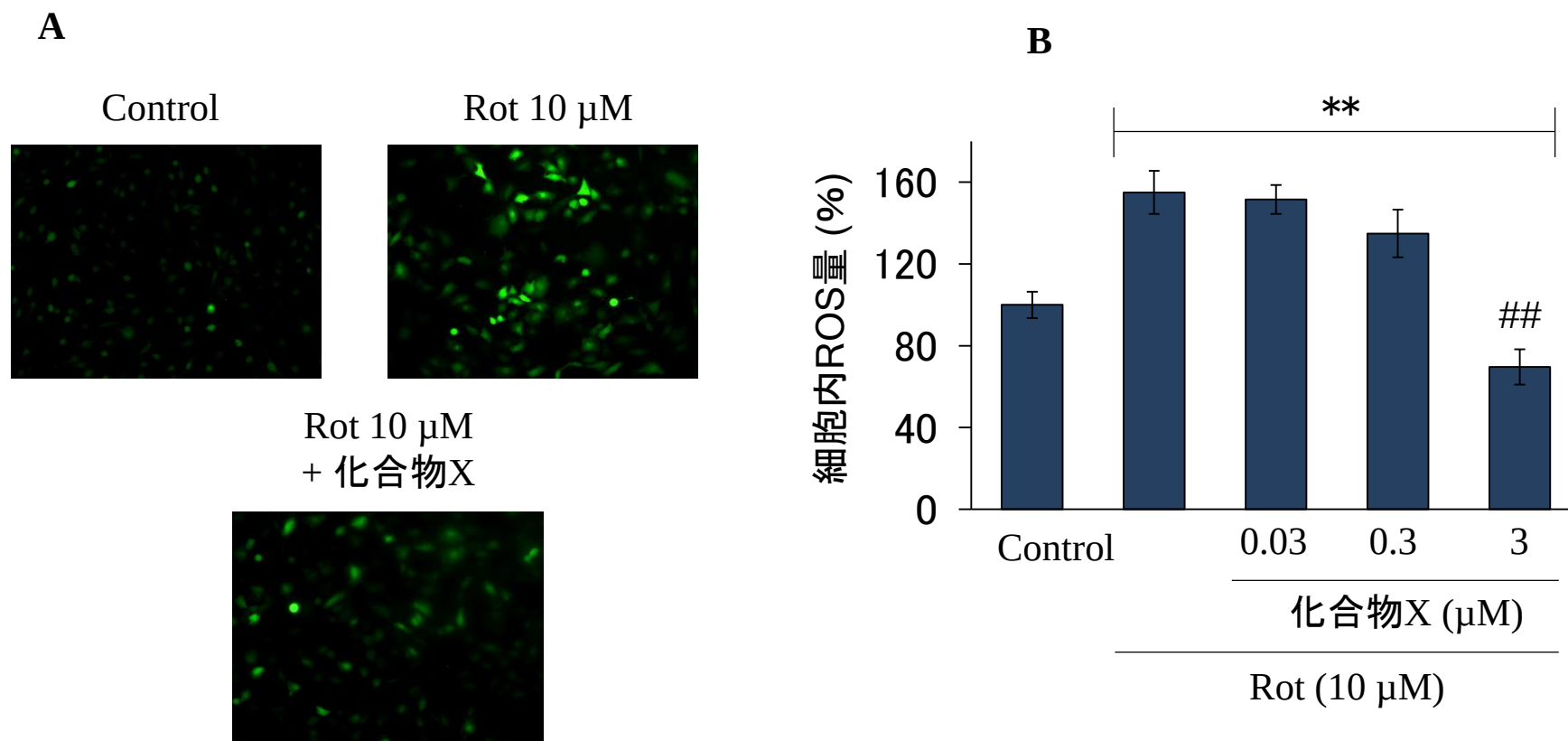


SH-SY5Yを、ロテノン (10 μ M) 単独またはMKH誘導体(3 μ M) との併用で24時間培養後、JC-1(4 μ M)を加え30分間インキュベート。コントロールには溶媒を用いた。

(A) 蛍光顕微鏡下 (x400) で撮影。(B) 蛍光プレートリーダーにてEm/EX 488 nm/540 nm (Green) およびEm/EX 561 nm/595 nm (Red) で蛍光強度を測定。

- 複合体I阻害(Rot)によりRed/Greenの蛍光強度比が低下し脱分極された。
- MKH誘導体(化合物XとY)は複合体I阻害による脱分極を有意に回復した。
vs control (**=p<0.01)。vs Rot (##=p<0.01)

図7 ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害剤 (ロテノン)誘発性ROS生成に対するMKH誘導体の抑制効果 (SH-SY5Y細胞における)



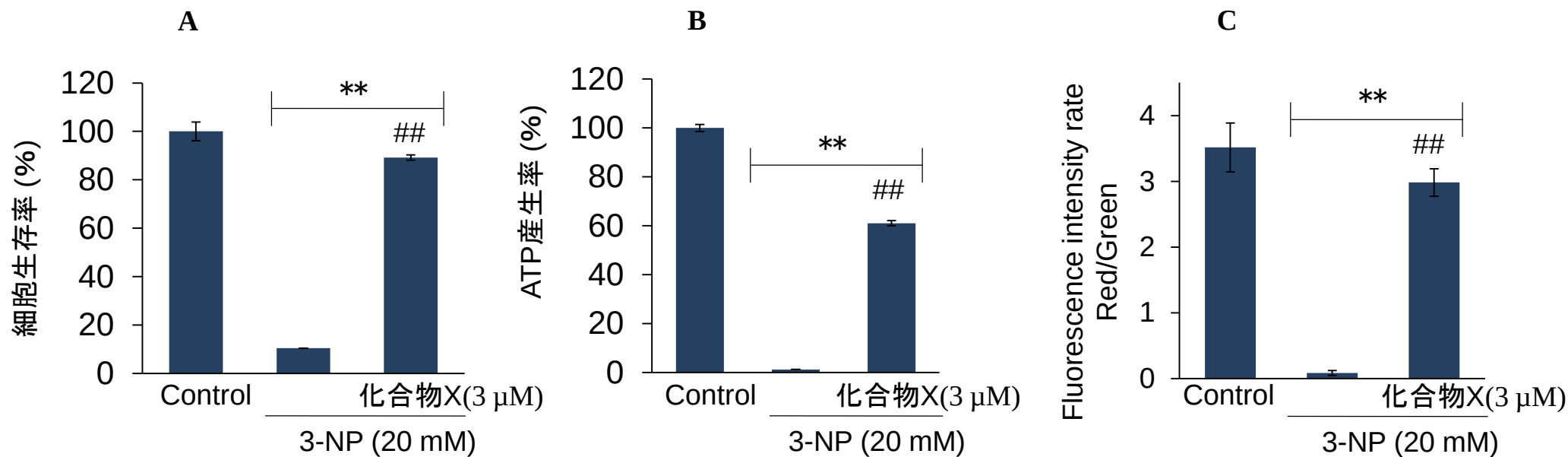
SH-SY5Yを、ロテノン (10 μ M) 単独またはMKH誘導体(0.03-3 μ M) との併用で24時間培養後、DCFH-DA (10 μ M)を加え30分間インキュベート。コントロールには溶媒を用いた。

(A) 蛍光顕微鏡下 (x200) で撮影。(B) 蛍光プレートリーダーにてEm/Ex 485 nm/530 nm で蛍光強度を測定。BCA protein assay を用いてタンパク質量当たりの蛍光量を算出。

- 複合体I阻害(Rot)により細胞内ROSが有意に高くなった。
- MKH誘導体(化合物X)は複合体I阻害によるROS生成を有意に抑制した。
- MKH誘導体はROSによる有害性を軽減する。

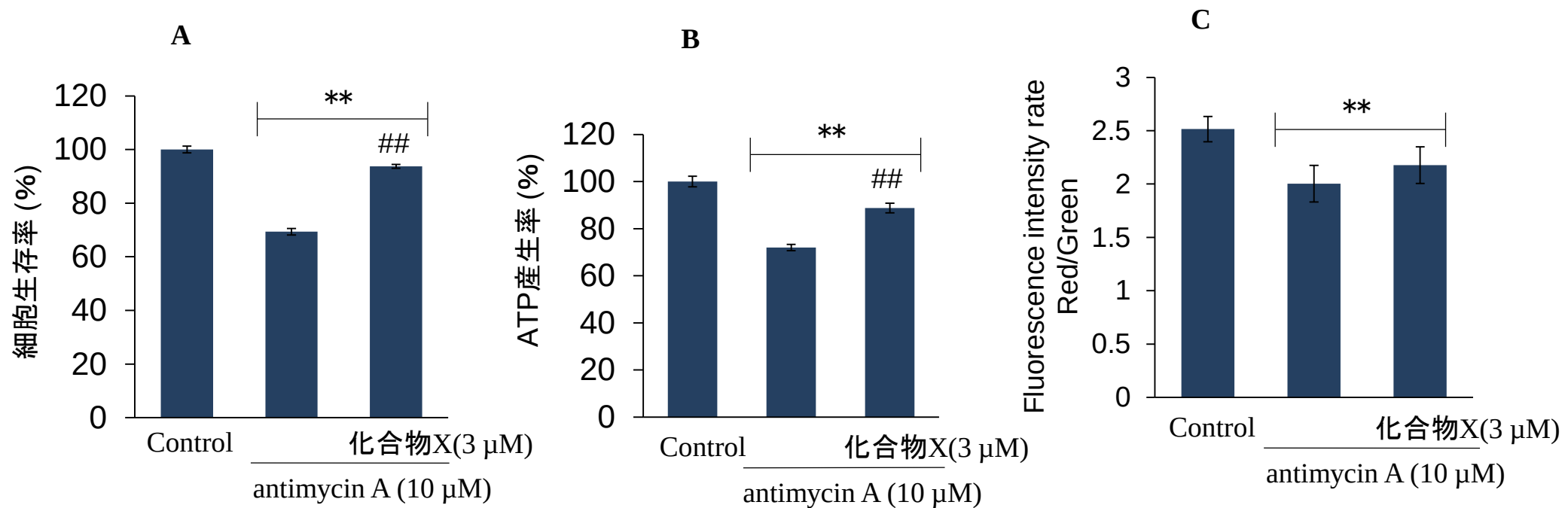
vs control (**=p<0.01)。vs Rot (###=p<0.01)

図8 ミトコンドリア呼吸鎖複合体II阻害剤(3-ニトロプロピオン酸、3-NP) による細胞死、細胞内ATPおよびミトコンドリア膜電位に対するMKH誘導体の効果 (SH-SY5Y細胞における)



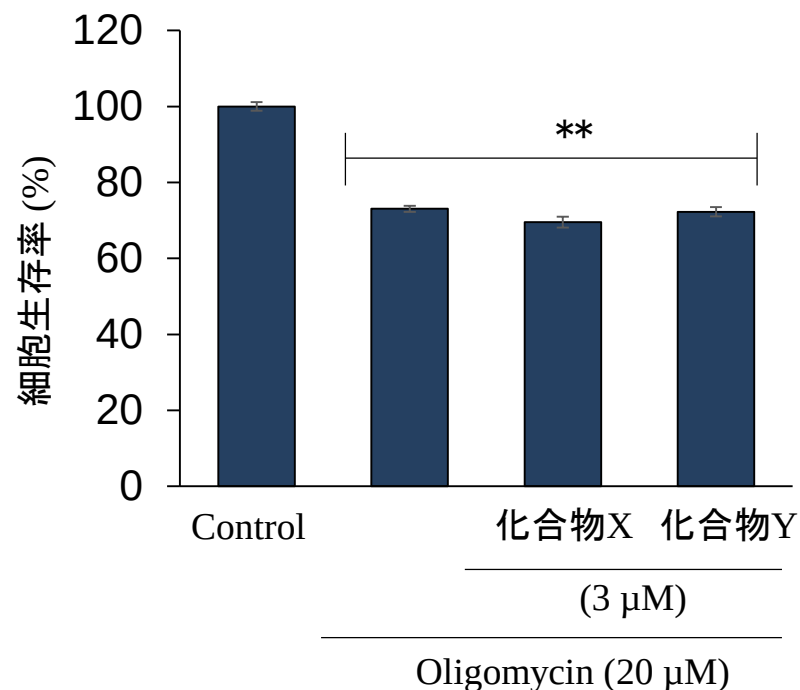
- MKH誘導体は複合体II阻害剤(3-NP)による細胞死を抑制した。
 - MKH誘導体は複合体II阻害剤(3-NP)によるATP産生低下を有意に高めた。
 - MKH誘導体は複合体阻害剤(3-NP)によるミトコンドリアの脱分極を有意に回復した。
- vs control (**=p<0.01)。vs 3-NP (##=p<0.01)

図9 ミトコンドリア呼吸鎖複合体III阻害剤(アンチマイシンA)による細胞死、細胞内ATPおよびミトコンドリア膜電位に対するMKH誘導体の効果(SH-SY5Y細胞における)



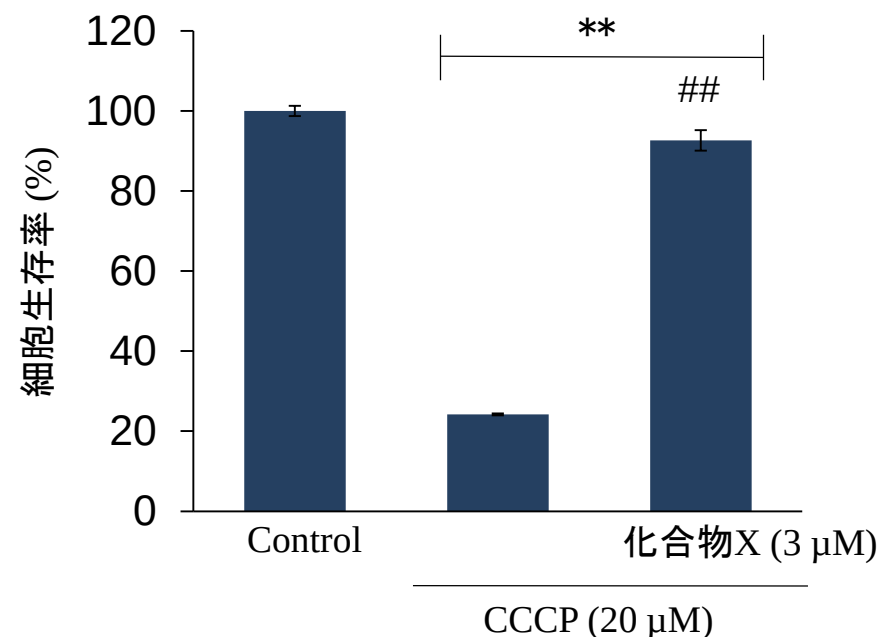
- MKH誘導体は複合体阻害剤III(アンチマイシンA)による細胞死を抑制した。
- MKH誘導体は複合体阻害剤III(アンチマイシンA)によるATP産生低下を有意に高めた。
- MKH誘導体は複合体阻害剤III(アンチマイシンA)によるミトコンドリアの脱分極を有意に回復しなかった。
vs control (**= $p<0.01$)、 vs antimycin A (##= $p<0.01$)。

図10ミトコンドリア呼吸鎖複合体V阻害剤(オリゴマイシン)による細胞死に対するMKH誘導体の効果



- 複合体V阻害による細胞死はMKH誘導体で抑制できない。
vs control (**=p<0.01)

図11 脱共役剤(カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン、CCCP)による細胞死に対するMKH誘導体の効果



- MKH誘導体は脱共役剤による細胞死を有意に抑制する。
- MKH誘導体はミトコンドリア膜電位脱共役によるH⁺勾配喪失に対応できる
vs control (**=p<0.01)、vs CCCP (##=p<0.01)

3) PD治療薬としてのMKH誘導体の可能性

- 本発明のMKH誘導体は、神経芽細胞においてミトコンドリア呼吸鎖複合体I、IIIの代わりに H^+ をくみあげることができ、 H^+ 駆動によるATPの産生と、ミトコンドリア機能不全によるROS産生の除去により、機能不全ミトコンドリアの機能を回復した。
- PDは、ドーパミン作動性ニューロンのミトコンドリアの呼吸鎖複合体機能の低下による α -シヌクレインの凝集が病因と考えられている。したがって、MKH誘導体の機能不全ミトコンドリアの機能回復効果はPDの予防・治療薬としての可能性を強く示唆している。
- MKHはUBIAD1によって体内で常時作られており、健康な状態では脳はすでにMKHにさらされている、したがって、MKH長期投与による有害作用の可能性は低いと予想される。

想定される用途

- AD治療薬に適用することでAD病変を標的とした治療が可能になり患者のメリットが大きいと考えられる。
- PD治療薬に適用することでPD病変を標的とした治療が可能になり患者メリットが大きいと考えられる。
- 他のミトコンドリア機能障害を病因とする疾患の治療薬としての用途に展開できる可能性がある。

企業への期待

- 以上のin vitroの試験に基づき、病態のiPS細胞およびiPS細胞を用いた疾患モデル動物を用いたMKHの効果の実証のために、興味ある企業に共同研究に参加いただき、研究が前進することを期待します。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ミトコンドリア機能障害改善剤
- 出願番号 : 特願2020-46864
- 出願人 : 学校法人福岡大学
- 発明者 : 高田二郎、松永和久、加留部善晴、
岩崎克典、瀬戸口修一、寺田一樹

産学連携の経歴

- ・ 平成24年度 JST A-STEP(シーズ顕在化タイプ) 採択
- ・ 平成19年度 JST 実用化のための可能性試験 採択
- ・ 平成18年度 JST シーズ発掘試験研究 採択
- ・ 平成17年度 JST シーズ育成試験 採択
- ・ 平成17年度 JST プラザ実証試験 採択

お問い合わせ先

福岡大学

研究推進部 産学官連携センター

TEL 092-871-6631

FAX 092-866-2308

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp