

2014/5026A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する 新規治療法開発に関する研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 池田 華子

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
V C P 阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発に関する研究-----	2
池田華子	
II. 分担研究報告	
1. 前部虚血性視神経症および網膜中心動脈閉塞症の自然経過に関する研究-----	11
三村 治、石川裕人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))
総括研究報告書

VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発

研究代表者 池田華子 京都大学医学部附属病院 准教授

研究要旨

細胞保護作用が明らかになったVCP ATPase阻害剤であるKUS剤を用い、難治眼疾患である網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対して、第一相医師主導治験実施に向けての諸準備を実施している。平成26年度には、薬効薬理試験として網膜中心動脈閉塞モデルでのKUS剤の効果を確認し、KUS剤のGMP製造に向けた合成法改良、GMP製造準備を行った。また、GLP毒性試験として、反復投与毒性試験、局所刺激試験、遺伝毒性試験を行った。疾患レジストリ構築目的で、網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に対する急性期紹介体制を整備し、前向き自然経過臨床研究を行った。

研究分担者

吉村 長久：京都大学大学院医学研究科 教授

辻川 明孝：香川大学医学部 教授

垣塚 彰：京都大学大学院生命科学研究所 教授

清水 章：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 教授

池田 隆文：京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 講師

三村 治：兵庫医科大学医学部 教授

石川 裕人：兵庫医科大学医学部 講師

A. 研究目的

虚血性視神経症は、50歳以上の年間発症率が2-10人/10万人とされる希少疾患であり(*Am. J. Ophthalmol.*, 1997)、同様に眼虚血症候群に分類される網膜中心動脈閉塞症は、さらに発症人数が少なく、ともに網膜神経節細胞を中心とした網膜内層の変性・脱落による不可逆的な極度の視力・視野障害がおこる。両疾患ともに、詳細な発症機構は不明であり、確立した治療法が存在しない

ため、生活面での永続的な支障は大きい。

VCP(valosin-containing protein) ([Kakizuka AらJ.Biol. Chem. 2010](#)) は、細胞がストレス応答を引き起こす過程で重要な働きをする蛋白質である。京都大学ではVCPと呼ばれる細胞内の主要 ATPaseに対する阻害剤(KUS: Kyoto University Substance化合物)の開発に成功し、細胞種を超えて*in vivo*での細胞死を防御する作用、網膜の細胞を細胞死から保護する作用を有し、緑内障や網

膜変性モデルマウスへの投与実験にて、網膜神経節細胞、視細胞の変性抑制効果のみならず網膜電図での機能保持が認められることが明らかになってきた (Ikeda OHら *Sci Rep* 2014)。したがって、この薬剤は緑内障や網膜色素変性のみならず、虚血性視神経症や中心動脈閉塞症など眼難治疾患に対しても、新たな治療薬となる可能性を検証する意義が生じてきた。

本研究では、希少眼難治疾患である虚血性視神経症および網膜中心動脈閉塞症に対し、京都大学で開発されたKUS剤を用い、医師主導治験を実施していく礎として、1) 両疾患に対する非臨床薬効薬理試験をおおまかに完了させること、2) KUS剤のGMP製造検討を行い、GMP製造体制を確立すること、3) 第I相医師主導治験に必要最低限のGLP毒性試験に着手・完了を目指すこと、4) さらに、被験者リクルートの観点から疾患レジストリの構築を行うこと目的とした。本研究終了後、第I相医師主導治験準備予定である。

B. 研究方法

平成26年度は、以下を実施した。

1) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する非臨床薬効薬理試験

網膜中心動脈閉塞症モデルとしては、虚血再灌流を用いた。網膜神経節細胞が蛍光標識された、thy1-GFPラット (*Archives of Facial Plastic Surgery* 12, 315-320, 2010) の前房内に33Gカニューレを挿入し、眼圧を120mmHgまで上昇させた。眼底を観察し、網膜血管が虚脱していることを確認し、60分虚血を継続させた (図)。

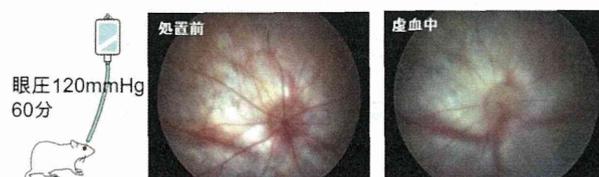


図2 網膜中心動脈閉塞モデル (虚血再灌流) ラット

KUS剤は硝子体内投与を行い、*Multiline OCT* を用いて網膜断層のSD-OCT撮影および、眼底GFP蛍光撮影を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。対照として、生理食塩水を硝子体内投与したラットを用いた。

2) KUS剤の虚血性視神経症に対する非臨床薬効薬理試験

虚血性症モデルとして、既報 (*Exp Eye Res* 87, 327, 2008) に基づき、ラット静脈にローズベンガル色素を静注し、視神経乳頭上にレーザー照射することで虚血性視神経症モデルラットを作成した。ラットは、上記同様、網膜神経節細胞が蛍光標識された、thy1-GFPラットを用いた。*Multiline OCT* を用いて網膜断層のSD-OCT撮影および、眼底GFP蛍光撮影を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測した。

3) KUS剤の受容体結合試験

副次的薬理試験として、KUS剤の受容体結合試験を行った。KUS剤は、12 μ Mの一濃度を使用し、トリチウム標識リガンドとの競合結合実験より、標識リガンドの全結合量 (TB) と非特異的結合量 (NS

B) の差を100%とし、被験物質の測定値とNSBの差を結合阻害率として算出した。

4) KUS剤の製造法検討、GLP原薬製造

KUS121剤のGMP製造に向けて、原薬の純度をあげ、安定した品質での製造が可能となるように、前年度に引き続き合成法の改良を行った。改良プロトコルにて、GLP試験用KUS121原薬製造を行った。

さらに、類縁物質測定法のバリデーション、並びに定量法のバリデーションを委託にて実施した。

5) KUS剤の製剤化検討

KUS121の治験薬製造に向けて、プレフォーミュレーションを実施した。硝子体内注射剤としての条件は、pHが弱酸性から中性、浸透圧比0.9-1.1であることが必要である。最初に蒸留水、生理食塩水、0.1% ポリソルベート 20 溶液、0.1% ポリソルベート 80 溶液、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0、7.0、6.0)、20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、5.0、4.0) について、KUS121 原薬の溶解度をHPLC法で測定した。また、溶液のpH並びに浸透圧測定を行った。ついで、添加剤検討として、トレハロース、スクロース、ブドウ糖、カルボキシメチルセルロースナトリウム、PEG-400を添加し、その溶液の原薬溶解度、pH、浸透圧を測定した。これら溶液の安定性検討の目的で、上記溶液を4週間、5℃、25℃、40℃で保存し、その安定性を検討した。

6) KUS剤の安全性試験

KUS121のfirst in human前に必要最低限と考えられる安全性試験を実施した。

6-1) 反復投与毒性試験 (GLP)

ラット尾静脈投与にて、KUS121 2週間連続投与した際の無毒性量を確定した。

臨床投与経路として、硝子体内投与をカニクイザルに3日連続で行い(3用量および陰性コントロール)、同様に、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施した。

6-2) 局所刺激試験 (GLP)

上記カニクイザルを用いて、眼科検査、光干渉断層検査、網膜電図検査を行った。

6-3) 安全性薬理試験 (GLP)

hERG導入CHO細胞を用い、カリウム電流を測定し、KUS121のhERGチャネルへの影響を検討した。局所投与で、全身暴露も極めて低いと予想されることから、本剤が生命維持に重要な影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えられるため、他の項目は、上記毒性試験中に評価することとした。

6-4) 遺伝毒性試験 (GLP)

ICH S2(R1)ガイドライン に準拠して、Ames試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、ラット小核試験を実施した。

6-5) 光毒性試験

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 432 (In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, Adopted 13 April, 2004)に準拠し、ほ乳類培養細胞 (Balb/c 3T3細胞) を用いて、非照射及び照射 (UV-A光量: 5 J/cm²) 条件下で生細胞測定を行い、光毒性の有無を評価した。

7) 疾患レジストリ作成

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神

経症に関して、1) KUS剤の投与タイミングを確定、2) 無治療コントロールとしての自然経過、を検討する目的で、自然経過観察に対する、前向き臨床研究を続行した。さらに、発症早期での患者紹介体制構築を行うため、近隣病院、眼科医院への手紙送付、およびHPでの周知を行った。

8) PMDA相談

上記結果の概要をまとめ、PMDA戦略薬事相談の事前面談を平成27年2月4日、大阪にて受けた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科動物研究のスタンダードであるARVOのガイドラインを遵守し、京都大学の「動物実験委員会」に申請し、承認を受けている (MedKyo14213)。患者臨床研究に際しては、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、京都大学の倫理委員会にて承認済である (E2047)。

C. 研究結果

1) KUS剤の網膜中心動脈閉塞症に対する非臨床薬効薬理試験

虚血再灌流ラットにおいては、2週間後に内層網膜の菲薄化が認められた。KUS剤投与群では、その菲薄化が有意に抑制されていた。また、網膜神経節細胞は、虚血再灌流後急速に減少したが、KUS剤投与群では、その減少が有意に抑制された。

2) KUS剤の虚血性視神経症に対する非臨床薬効薬理試験

既報(*Exp Eye Res* 87, 327, 2008)に基づき、ラット静脈にローズベンガル色素を静注し、

視神経乳頭上にレーザー照射を行った。SD-OCT網膜断層像で網膜内層 (神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層) 厚を計測したが、レーザー直後に網膜浮腫に起因する網膜厚の増大が認められ、その後レーザー前値へ戻った。また、GFP蛍光眼底撮影画像で、神経節細胞数を計測したが、網膜神経節細胞の有意な現象は認められなかった。

3) KUS剤の受容体結合試験

ER α 、ER β 、AR、PR、GR、RAR α 、RAR β 、RAR γ 、RXR α の各受容体に関して、KUSとの結合性は認めなかった。

4) KUS剤の製造法検討、GLP原薬製造

4工程からなる合成過程の最終工程に関して、反応時のpHを調整することにより、高純度KUS121剤の合成が可能になった。本法にてGLP試験用原薬を100g合成した。

試験項目	Lot. 6453
外観	暗赤色、粉末
純度試験	
(1) 塩化物	0.014%以下
(2) 重金属	20ppm以下
(3) ヒ素	2ppm以下
(4) 類縁物質	99.2%
(5) エタノール	0.26%
水分	2.3%

類縁物質測定法のバリデーションとして、特異性・直線性・併行精度および定量限界、検出限界に関して確認し、いずれも適合範囲内であった。

定量法のバリデーションとして、特異性・直線性・併行精度に関して、確認し、

適合範囲内であった。

5) KUS剤の製剤化検討

KUS原薬は、ほぼすべての条件で、一旦溶解するものの、5°Cでは多くの条件で析出した。原薬の析出には、カルボキシメチルセルロースナトリウムの添加が有効であることが明らかになった。浸透圧調整には、トレハロース及びスクロースを用いると良好な安定性を得ることができた。

6) KUS剤の安全性試験

KUS121のfirst in human前に必要最低限と考えられる安全性試験を実施した。

6-1) 反復投与毒性試験 (GLP)

ラット尾静脈投与にて、KUS121 (3用量および陰性コントロール) を2週間連続投与し、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施、静脈内投与での無毒性量を確定した。

臨床投与経路として、硝子体内投与を雌雄カニクイザルに3日連続で行い、同様に、一般観察、血液・尿検査、病理組織検査を実施、硝子体内投与での無毒性量を確定した。

6-2) 局所刺激試験 (GLP)

上記カニクイザルを用いて、眼科検査、光干渉断層検査、網膜電図検査を行い、眼局所毒性を確認した。

6-3) 安全性薬理試験 (GLP)

hERG導入CHO細胞を用い、カリウム電流を測定し、KUS121がhERGチャネルへの抑制効果を持たないことを確認した。

6-4) 遺伝毒性試験 (GLP)

KUS121は、Ames試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、ラット小核試験いずれにおいても陰性であることが明らかになった。

6-5) 光毒性試験

哺乳類培養細胞を用いたin vitro光毒性試験の結果、KUS121はUV照射の有無で生細胞率に変化なく、光毒性はないことが明らかになった。

7) 疾患レジストリ作成

網膜中心動脈閉塞症および虚血性視神経症に関して、1) KUS剤の投与タイミングを確定、2) 無治療コントロールとしての自然経過、を検討する目的で、自然経過観察に対する、前向き臨床研究を続行した。さらに、発症早期での患者紹介体制構築を行うため、近隣病院、眼科医院への手紙送付、およびHPでの周知を行った。

8) PMDA相談

上記結果の概要をまとめ、PMDA戦略薬事相談の事前面談を平成27年2月4日、大阪にて受けた。現段階では、非臨床パッケージには特に問題がないであろうこと、各種トランスポータ・受容体との結合試験を行うこと、光毒性の初期評価を行うことを助言され、実施可能な試験に関して追加した。

D. 考察

KUS剤の薬効薬理試験、GMP製造準備、GLP安全性試験が、順調に実施され、特に問題となる事項はなかった。医師主導治験に対する準備が整いつつある。

E. 結論

製剤化検討、原薬GMP製造を引き続き行い、医師主導治験を実施予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

査読のあるもの

- 1) Ikeda HO, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, Kakizuka A. Novel vcp modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. *Sci Rep.* 4, 5970, 2014.
- 2) Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, Kakizuka A. VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H₂O₂ Levels. *PLoS One.* 8:e56012, 2013.
- 3) Ehrlich AT, Furuyashiki T, Kitaoka S, Kakizuka A, Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 forms a complex with dopamine D1 receptor and directs D1-induced cAMP production to adenylyl cyclase 7 through mobilizing G($\beta\gamma$) subunits in human embryonic kidney 293T cells. *Mol Pharmacol.* 84:476-486, 2013.
- 4) Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Imamura H. In vivo fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. *Anal Chem.* 85:7889-7896, 2013.
- 5) Kimura Y, Fukushi J, Hori S, Matsuda N, Okatsu K, Kakiyama Y, Kawawaki J, Kakizuka A, Tanaka K. Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes Cells.* 18:1131-1143, 2013
- 6) Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ oscillations. *J Biol Chem.* 289:2205-2216, 2014.
- 7) Yasuda K, Ohyama K, Onga K, Kakizuka A, Mori N. Mdm20 stimulates polyQ aggregation via inhibiting autophagy through Akt-Ser473 phosphorylation. *PLoS One.* 8:e82523, 2013.
- 8) Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Tsukano C, Takemoto Y, Kakizuka A. Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. *PLoS One.* 9:e87185, 2014.
- 9) Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhito V. Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci Rep.* 4:6522, 2014. doi: 10.1038/srep06522.

- 10) Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, & Kakizuka A. VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast. *FEBS Lett.* 589:576-580, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.017.
- 査読の無いもの
- 1) 笹岡紀男、垣塚彰「ホップ抽出液のアルツハイマー病発症抑制効果」 *BIO INDUSTRY* 31:34-39, 2014.
- 2) 木村洋子、垣塚彰 「タンパク質の品質管理と神経変性」 *Annual Review 神経* 206-211, 2014
- 3) 垣塚彰 「神経変性疾患と細胞死」 *医学の歩み* 246:449-454, 2013
- その他、著書等
- 1) 垣塚彰 「ポリグルタミン病」 改訂第3版 *脳神経科学イラストレイテッド* 一分子・細胞から実験技術まで 327-334, 2013
- 2) 垣塚彰 「神経変性疾患と細胞死」 *細胞死 Update-基礎から臨床までを俯瞰して* (別冊・医学のあゆみ) 97-102, 2014.
2. 学会発表
- 1) Tomoko Hasegawa, Hanako O. Ikeda, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model. *World Ophthalmology Congress 2014*, 2014. 4. 2—6. Tokyo.
- 2) Masayuki Hata, Hanako O. Ikeda, Tomoko Hasegawa, Noriko Nakano, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Neuroprotective effects of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*. 2014. 5. 4—8. Orlando, Fla, USA.
- 3) 畑匡侑、池田華子、飯田悠人、吉川宗光、長谷川智子、村岡勇貴、垣塚彰、吉村長久. 「網膜虚血再灌流ラットモデルにおけるvalosin-containing protein modifierの神経保護効果の検討」 53回日本網膜硝子体学会総会、平成26年11月28日—30日、大阪国際会議場.
- 4) Tomoko Hasegawa, Hanako O Ikeda, Masayuki Hata, Yuki Muraoka, Akira Kakizuka, Nagahisa Yoshimura. Protective effect of B101, a mixture of nutrients, in a retinal degeneration mouse model. *Asia ARVO 2015*, 2016年2月16日, Yokohama JAPAN.
- 5) 田中喬、長嶋一昭、稲垣暢也、野地博行、垣塚彰、今村博臣「蛍光 ATP バイオセンサーを用いたインスリン分泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測」平成 25 年 9 月 11 日 第 86 回日本生化学会大会(ポスター) 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (横浜)
- 6) 柳沼秀幸、河合信之輔、田端和仁、富山佳祐、垣塚彰、小松崎民樹、岡田康志、野地博行、今村博臣 「定量 ATP イメージングによる単一細胞内 ATP 濃度の多様性の測定」平成 26 年 9 月 26 日 第 52 回日本生物物理学会年会 (口頭) 札幌コンベンションセンター(札幌)
- 7) 岩切竜太、垣塚彰、今村博臣「細胞外 ATP ダイナミクスの解明に向けた蛍光 ATP バイオセンサー QUEEN の反応高速化と光安定化」平成 26 年 12 月 1 2 日 日本

生体エネルギー研究会第40回討論会(ポスター) 愛媛大学 南加記念ホール(愛媛)

3. 講演

- 1) 池田華子. 「未来の神経保護治療」第25回日本緑内障学会、平成26年9月19日、大阪国際会議場.
- 2) 池田華子. 特別講演「VCP ATPase阻害剤による新規神経保護治療」第34回日本眼薬理学会、平成26年9月13日、長良川国際会議場.
- 3) 池田華子. 「網膜色素変性に対する新規神経保護治療」第62回医療相談会、平成26年12月7日、神戸勤労会館.
- 4) 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase, VCP」上原記念生命科学財団特定研究「確信的医療を創生する医学研究」シンポジウム 平成 25 年 6 月 9 日 下田セントラルホテル (静岡)
- 5) 垣塚彰「癌ってどういうもの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 平成 25 年 6 月 14 日 京都大学 (京都)
- 6) Kakizuka A “Trials for the prevention of incurable disease models by the regulation of ATP” 第 15 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 平成 25 年 7 月 5 日 京都大学芝蘭会館 (京都)
- 7) 垣塚彰「新規神経保護創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」第 22 回日本 Cell Death 学会学術集会 平成 25 年 7 月 19 日 京都大学芝蘭会館 (京都)
- 8) 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞主要 ATPase, VCP」ニューロサイエンスセミナー 平成 25 年 9 月 5 日 金沢大学医学部 (金沢)
- 9) 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase、VCP」第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (横浜)
- 10) Kakizuka A “Novel VCP modulators mitigate major pathologies in mouse models of glaucoma and retinitis pigmentosa by their neuroprotective effects.” EMBO workshop “AAA+ proteins: from mechanism and disease targets” Sept 18, 2013 Neuss (Germany)
- 11) 垣塚彰「新規神経保護創薬標的としての細胞内主要 ATPase, VCP」厚労省調査研究班ワークショップ「病態に根ざした ALS の新規治療法開発」平成 25 年 9 月 27 日 都市センターホテル(東京)
- 12) Kakizuka A “Novel VCP modulators for the treatment of incurable eye diseases“ BioJapan 2013 Oct. 11, 2013 Pacifico Yokohama (Japan)
- 13) 垣塚彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学(東京) 平成 25 年 10 月 22 日。
- 14) 垣塚彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 平成 26 年 5 月 23 日 京都大学 (京都)
- 15) Kakizuka A. “VCP, a Major ATPase in the Cells, as a Novel Drug Target for Currently Incurable Disorders” Innovative Medicine: Basic Research and Drug Development. (The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014. June 15, 2014. Hyatt Regency Tokyo (Japan)
- 16) 垣塚彰「ATP 制御による難治性疾患の新規治療戦略」第 23 回日本 Cell Death 学

- 会学術集会 平成 26 年 7 月 18 日 東京
医科歯科大学鈴木章夫記念講堂(東京)
- 17) 垣塚彰「新規創薬標的としての細胞内
主要 ATPase, VCP」ニューロサイエンス
セミナー 平成 26 年 9 月 11 日 金沢大
学医学部 (金沢)
- 18) 垣塚彰「難病への挑戦」京都大学春秋講
義 (一般向け) 平成 26 年 9 月 13 日 京
都大学時計台ホール(京都)
- 19) Kakizuka A. “VCP, a major ATPase in the
cells, as a novel drug target for currently
incurable disorders.” 7th Asian Aging Core
for Longevity conference in Jeju. Sept. 22,
2014. Jeju Haevichi Hotel, Jeju (South
Korea)
- 20) 垣塚彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬
学部特別講義 平成 26 年 10 月 28 日 東
京大学 (東京)
- 21) 垣塚彰「ATP 制御による加齢関連疾患
克服への挑戦」日本抗加齢医学会 平成
26 年 12 月 14 日 大手町サンケイホー
ル (東京)
- 22) 垣塚彰「インスリン抵抗性を改善する
新規薬剤の開発」厚生労働科学研究 平
成 26 年度研究成果発表会(研究者向け)。
平成 27 年 1 月 20 日 世界貿易センター
ビル (東京)
- 23) Kakizuka A. “Challenges for currently
incurable disorders.” The Liaison Laboratory
regular seminar/ HIGO Program cutting-
edge research seminar. Jan. 21, 2015.
Kumamoto University (Kumamoto)
- 24) 垣塚彰「加齢に伴う難治性疾患の克服
に向けた挑戦」高等研プロジェクト「老
いを考える」研究会 平成 27 年 1 月 23
日 国際高等研究所 (京都府木津川市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「虚血性眼疾患の処置およ
び/または予防用の医薬組成物」
垣塚彰、池田華子、吉村長久、畑匡侑。
出願人：国立大学法人京都大学
優先日：平成 26 年 2 月 28 日、特願 2014-
038457
PCT 出願：2015 年 2 月 26 日
PCT/JP2015/055619
- 2) 発明の名称：「レプチン抵抗性を改善す
る医薬組成物」発明者：垣塚彰、他3名。
出願人：国立大学法人京都大学
出願日：平成26年9月3日、
PCT出願：PCT/JP2014/073256
- 3) 発明の名称：「アルツハイマー病予防薬」
垣塚彰、笹岡紀男、兼森祥子、坂本めぐ
み、竹本佳司、塚野千尋。
出願人：国立大学法人京都大学 出願日：
平成 26 年 6 月 24 日 特願 2014-129478

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))
分担研究報告書

VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発
「前部虚血性視神経症および網膜中心動脈閉塞症の自然経過」

研究分担者 三村 治 兵庫医科大学医学部
石川 裕人 兵庫医科大学医学部

研究要旨 VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発にあたり、既存の方法では治療困難な前部虚血性視神経症(AION)、網膜中心動脈閉塞症(CRAO)に関して、その自然経過をみるprospective studyを行った。対象は2013年2月～2014年6月まで兵庫医科大学病院眼科を受診した、AION、CRAO患者で、半年の経過観察が可能であった症例とした。全例で視力、視野、中心フリッカ値を継時的に計測したが、経過観察中、有意に回復、増悪することはなく、初診時のデータからほぼ不変であった。

A. 研究目的

VCP阻害剤を用いた眼難治疾患に対する新規治療法開発にあたり、既存の方法では治療困難な前部虚血性視神経症(AION)、網膜中心動脈閉塞症(CRAO)に関して、その自然経過をみるprospective studyを行った。

可能匿名化されコンピュータで管理し、個人情報管理者しか知らないパスワードを設定し、コンピュータをセキュリティーの厳重な部屋に保管することにより、情報の漏洩に対する安全対策を講じる。また、試験結果の報告、発表に関しては個人を特定される情報は公開しない。

B. 研究方法

対象は2013年2月～2014年6月まで兵庫医科大学病院眼科を受診した、AION、CRAO患者で、半年の経過観察が可能であった症例とした。全例で視力、視野、中心フリッカ値を継時的に計測した。

C. 研究結果

対象となった患者はAION12例、CRAO8例の合計20例であった。初診時と6か月後において、視力、視野、中心フリッカ値に有意な変化を認めなかった。

D. 考察

(倫理面への配慮)
本試験では、世界医師会による「ヘルシンキ宣言」及び厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日全部改正)を遵守する。得られた個人情報は連結

今回の対象となった眼難治疾患20例に関しては、既存の報告と同様に視力予後が不良であり、その自然経過において有意な改善を認める症例はなく、一度増悪すれば軽快することがないことが改めて確認され

た。今後の新規治療法の確立がない限り、これらの疾患に対する治療戦略はなきに等しいと考えられる。

E. 結論

AION、CRAOに代表される眼難治疾患の自然経過観察では、既報と同じく、有意な回復は認めず、視力予後不良であった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

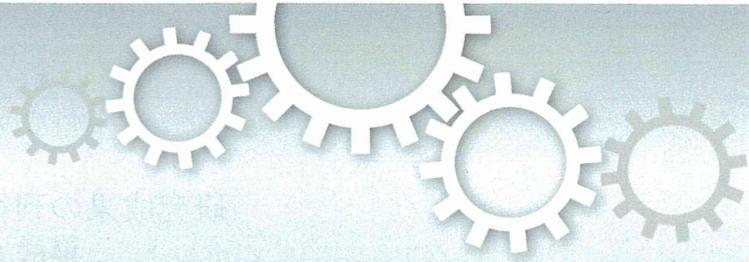
3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表
平成26年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ikeda H</u> , Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, <u>Yoshimura N</u> , <u>Kakizuka A</u> .	A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa.	Sci Rep	4	5970	2014
Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhito V, Tabata KV, Tomiyama K, <u>Kakizuka A</u> , Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, Imamura H.	Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging.	Sci Rep	4	6522	2014
Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, <u>Kakizuka A</u> .	VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast.	FEBS Lett	589	576-580	2015



OPEN

SUBJECT AREAS:
DRUG DISCOVERY
CELL DEATH

Received
30 December 2013

Accepted
18 July 2014

Published
6 August 2014

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
A.K. (kakizuka@lif.
kyoto-u.ac.jp)

Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa

Hanako Ohashi Ikeda^{1,2}, Norio Sasaoka², Masaaki Koike², Noriko Nakano¹, Yuki Muraoka¹, Yoshinobu Toda³, Tomohiro Fuchigami⁴, Toshiyuki Shudo^{1,2,4}, Ayana Iwata², Seiji Hori², Nagahisa Yoshimura¹ & Akira Kakizuka²

¹Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan, ²Laboratory of Functional Biology, Kyoto University Graduate School of Biostudies, Kyoto 606-8501, Japan, ³Center for Anatomical Studies, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan, ⁴Daito Chemix, Ishibashi-cho Fukui-city Fukui 910-3137, Japan.

Neuroprotection may prevent or forestall the progression of incurable eye diseases, such as retinitis pigmentosa, one of the major causes of adult blindness. Decreased cellular ATP levels may contribute to the pathology of this eye disease and other neurodegenerative diseases. Here we describe small compounds (Kyoto University Substances, KUSs) that were developed to inhibit the ATPase activity of VCP (valosin-containing protein), the most abundant soluble ATPase in the cell. Surprisingly, KUSs did not significantly impair reported cellular functions of VCP but nonetheless suppressed the VCP-dependent decrease of cellular ATP levels. Moreover, KUSs, as well as exogenous ATP or ATP-producing compounds, e.g. methylpyruvate, suppressed endoplasmic reticulum stress, and demonstrably protected various types of cultured cells from death, including several types of retinal neuronal cells. We then examined their *in vivo* efficacies in rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. KUSs prevented photoreceptor cell death and preserved visual function. These results reveal an unexpected, crucial role of ATP consumption by VCP in determining cell fate in this pathological context, and point to a promising new neuroprotective strategy for currently incurable retinitis pigmentosa.

Despite recent advances in the development of new drugs, there remain many incurable disorders, e.g. neurodegenerative diseases, ischemic diseases, and chronic inflammation, in which the major pathology in the affected organs is early cell death, which occurs long before the death of the individual. Indeed, currently no drug is available to prevent such early cell death *in vivo*. If such drugs were available, many of these disorders, if not all, might be prevented or delayed. In the 1990s, due to a growing, but still imperfect, understanding of the molecular bases of apoptotic cell death, caspase inhibitors were developed and were heralded as miracle drugs, but they were ineffective in preventing cell death *in vivo*. This might be explained as follows: caspases determine how cells die but are unable to affect the commitment to cell death. Thus, drugs that could delay or prevent the commitment to cell death have been actively pursued.

Retinitis pigmentosa, which is caused by a gradual degeneration and loss of photoreceptors, is another intractable eye disease, and more than 1.5 million patients suffer from progressive visual deterioration with this disorder. Clinical trials using a neurotrophic factor have been initiated¹. In retinitis pigmentosa, involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress has been proposed^{2,3}. Thus, new drugs or compounds with ER stress-reducing activities may prove to be neuroprotective, and are thus worth investigating for the treatment or prevention of retinitis pigmentosa.

We have long been working to elucidate the molecular bases of polyglutamine diseases, as informative models for neurodegeneration. We and other research groups produced several lines of evidence that implicate valosin-containing protein (VCP), an AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities)-type ATPase with ubiquitous expression, as a major player causing neurodegeneration. It is notable that VCP is highly conserved among species; its amino acid sequences are completely identical among mouse, rat, and human, and 84% identical between human and *Drosophila*⁴. We first assumed that specific cellular genes are involved in the pathogenesis of polyglutamine diseases, and thus had established *Drosophila* models of polyglutamine diseases



for genetic analyses. Mutant screening revealed that *Ter94* loss-of-function alleles mitigated polyglutamine-induced eye degeneration⁴. Conversely, overexpression of wild-type *Ter94* enhanced the polyglutamine-induced eye degeneration⁴. Since the mammalian *Ter94* ortholog is *VCP*, these results raised the possibility that *VCP* is involved in the pathogenesis of human neurodegenerative diseases⁵. Consistent with this possibility, *VCP* mutations were identified that are causative for IBMPFD (inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia)⁶, a human hereditary disease with dementia, or for rare cases of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)⁷. In our evaluation, all tested pathogenic *VCP*s possessed elevated ATPase activities, as compared with wild-type *VCP*⁸, indicating that the constitutive elevation of its ATPase activity may be pathogenic.

These lines of evidence suggested that inhibitors of the ATPase activity of *VCP* could protect neuronal cells. In addition to its ATPase activity, however, many cellular functions of *VCP* have been proposed^{9–11}, e.g., proteasome-mediated protein degradation, endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD), cell cycle control, membrane fusion, maintenance of the Golgi apparatus, protein trafficking, autophagy, genomic DNA surveillance, etc., some of which are crucial for cell survival. Indeed, *VCP* knockdown and overexpression of dominant-negative forms of *VCP* showed toxicity in cultured cells^{12,13}. DBE_Q, a recently reported *VCP* inhibitor (*in vitro* IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 1 μM)¹⁴, also showed cellular toxicity. Given that *VCP* has multiple cellular functions, some of them would require ATP hydrolysis and others would not. Thus, it is a challenge to find small compounds that can inhibit or reduce the ATPase activity of *VCP* without incurring the general toxicity caused by loss of crucial cellular functions of *VCP*.

Results

KUSs inhibited *VCP* ATPase activity but not *VCP* cellular functions. In our search for novel *VCP* ATPase inhibitors, we found that a naphthalene derivative can inhibit the ATPase activity of *VCP* with no apparent toxicity at 10 μM on cultured cells. Based on the chemical structure, about two hundred compounds were newly synthesized and named KUSs (Kyoto University substances). Some of them, e.g. KUS31, 69, 94, 121, and 187, clearly inhibited the ATPase activity of recombinant *VCP* *in vitro* with IC₅₀ values ranging from approximately 100 nM to 1 μM (Fig. 1a). These IC₅₀ values were equivalent to or much lower than that of DBE_Q¹⁴, whose reported IC₅₀ is 1 μM (Supplementary Fig. 1). It is notable that KUSs very mildly inhibited the ATPase activity of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) (Fig. 1b), whose structure is most closely related with that of *VCP*.

We then examined the effect of KUS31, 69, 94, 121, and 187 on *VCP* functions in cultured cells. We also used DBE_Q as a reference compound. As reported, DBE_Q induced accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, autophagy, and eventually cell death (Fig. 1c and d). Surprisingly, these compounds did not induce any of these phenotypes (Fig. 1c and d). These results clearly indicated that ATPase inhibition by KUS31, 69, 94, 121, and 187 (referred to as “KUSs” hereafter, for simplicity) did not interfere with reported cellular *VCP* functions (referred to as “*VCP* functions” hereafter), indicating that *VCP* functions do not necessarily require its ATPase activity (see Discussion).

KUSs protected cells under ER stress-inducing conditions. Additionally, KUSs protected cells from several cell death-inducing insults. For example, when HeLa cells were cultured under low glucose conditions (0.2 g/l of glucose), all cells died within several days (Fig. 2a). However, when KUSs were present in the media, they prevented cell death (Fig. 2a and b). Protective effects were also observed when HeLa cells were treated with tunicamycin (Tm) (Fig. 2c), or when HEK293 cells were subjected to serum-free

conditions (Fig. 2d). These protective effects of KUSs were dose-dependent, as exemplified by KUS121 (Fig. 2e). These data clearly implied that inhibition of *VCP* ATPase activity by KUSs could protect cells from several cell death-inducing insults.

Tunicamycin treatment and glucose starvation are known to cause ER stress and to lead to cell death. C/EBP-homologous protein (CHOP) is a core mediator of ER stress-induced cell death, and is upregulated during ER stress¹⁵. Indeed, KUSs suppressed the expression of CHOP in tunicamycin-treated HeLa cells (Fig. 2f). KUSs also suppressed the expression of 78 kDa glucose-regulated protein (Grp78), another ER stress marker¹⁶, in the tunicamycin-treated cells. Next, we examined Akt (serine/threonine-protein kinase) activation by examining its phosphorylation at Ser473, which has been reported to be necessary and sufficient for cell survival¹⁷. The phosphorylated Akt signal nearly disappeared in cells treated with tunicamycin, but was clearly detected in cells treated with tunicamycin and KUSs (Fig. 2f). These data indicate that KUSs could suppress ER stress and promote cell survival, which was evidenced by Akt being in an activated state.

Because *VCP* is a major ATPase in cells, we then examined the contribution of *VCP* to total ATPase activities in clarified whole cell lysates, and found that *VCP* appeared to contribute to approximately 20–40% of the total collective ATPase activity, depending on the cell types and culture conditions (an example is provided in Fig. 3a). In neuronally differentiated PC12 cells, for example, 100 nM and 1 μM KUS121, as well as KUS187, significantly lowered the total ATPase activity (approximately 20% and 40% for both concentrations, respectively) (Fig. 3a). Given that the IC₅₀ values of KUS121 and KUS187 on recombinant *VCP* were around 200 ~ 300 nM (Fig. 1a), these data implied that the ATPase activity of *VCP* contributed to as much as 40% of the total soluble ATPase activities in the cell lysate. This estimation was further supported by the observation that 1 μM KUS94 (IC₅₀ is 1 μM) also showed approximately 20% suppression of the soluble ATPase activities (Fig. 3a). Consistent with the inability of KUS11 to inhibit the ATPase of *VCP* *in vitro* (IC₅₀ is more than 100 μM), KUS11 did not show any significant inhibition of total ATPase activity in the clarified lysates (Fig. 3a).

We next examined whether KUSs altered cellular ATP levels. At 20 hours after a change to low glucose medium (0.25 g/l), glucose concentrations in the medium approached zero, and ATP levels in the cells (control cells) significantly decreased (Fig. 3b). In contrast, ATP levels in the cells with low glucose medium plus KUSs remained significantly higher than those in the control cells (Fig. 3b and Supplementary Fig. 2a). In addition, in KUS-treated cells, the ratio of ATP to ADP was higher than in the control cells (Supplementary Fig. 2b). These data indicate that KUSs suppress consumption of ATP in cells under stress conditions. Interestingly, acetyl-CoA levels in the KUS-treated cells were significantly lower than those in the control cells (Fig. 3c and Supplementary Fig. 2c), suggesting the possibility that KUSs may induce a metabolic shift from a glycolytic pathway to mitochondrial pathways to produce ATP. This possibility remains to be clarified. The low levels of acetyl-CoA might also contribute to protect cells from cell death, as reported recently¹⁸.

KUSs and exogenous ATP both prevented ER stress in cultured cells. It has long been believed that ER stress is induced by the accumulation of misfolded proteins, or protein aggregates, in the ER^{19–21}. We recently identified laminin γ1 as an aggregation-prone protein in the ER. We therefore examined laminin γ1 as an indicator of ER-stress in tunicamycin-treated cells. By immunocytochemical analyses, expression of laminin γ1 was observed in a diffuse pattern throughout the ER in normal cells (Control in Fig. 4a). When cells were treated with tunicamycin, laminin γ1 formed clear aggregates (DMSO in Fig. 4a). However, not only 50 μM KUSs (KUS69, 94, 121, and 187) but also 1 mM ATP treatments clearly prevented the aggregation of laminin γ1 (Fig. 4a). Consistent with these results,

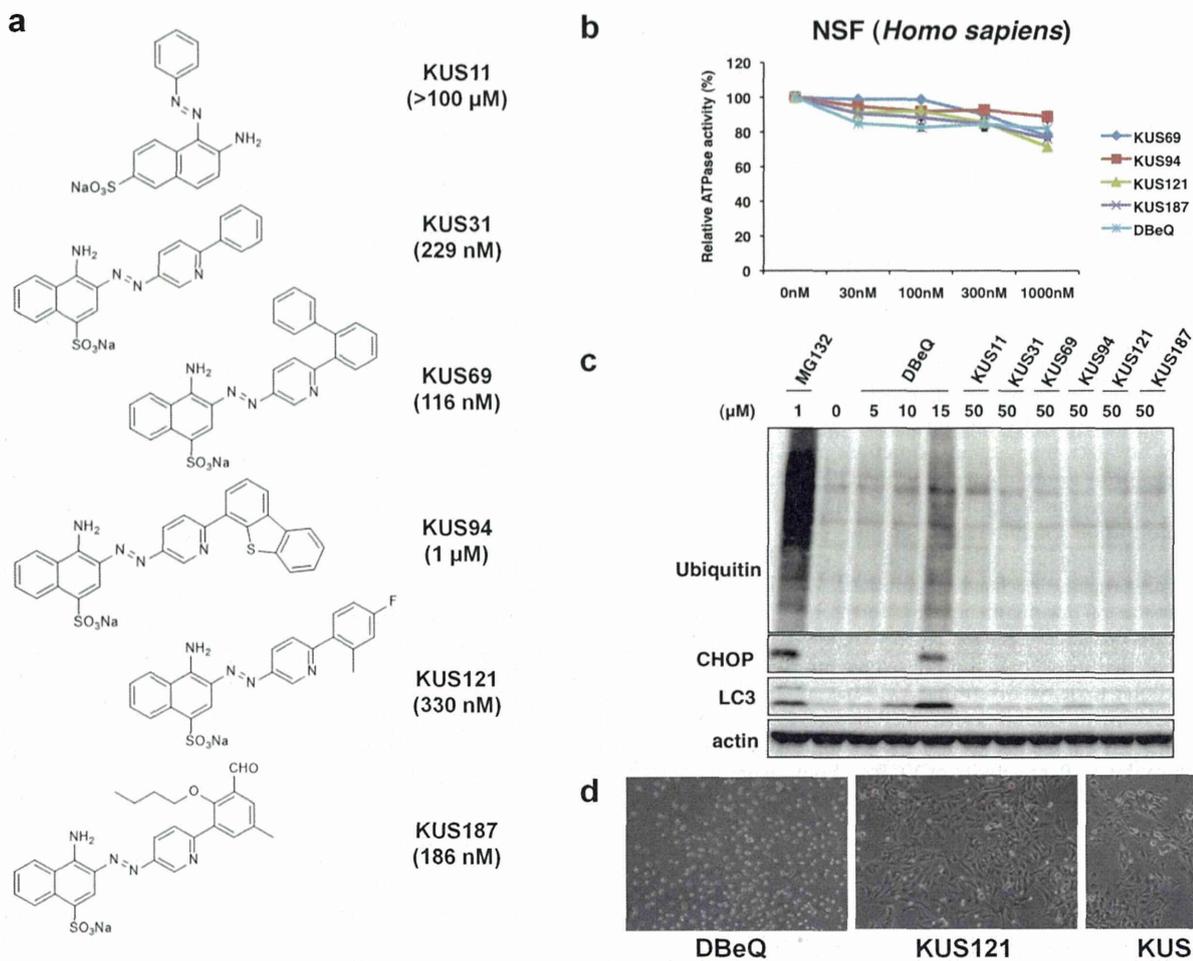


Figure 1 | Structures and characterization of KUSs, novel VCP modulators. (a) Structures and IC_{50} values of KUS11, KUS31, KUS69, KUS94, KUS121, and KUS187. Note that KUS11 did not inhibit the ATPase activity of recombinant VCP, and it did not share a common structure with the other KUSs. (b) ATPase activity assays of recombinant human NSF, comparing KUSs and DBeQ. (c) Immunoblot analysis of ubiquitinated proteins, an ER stress marker (CHOP), and an autophagy indicator (LC3), comparing KUSs and DBeQ. As a control, MG132, a proteasome inhibitor, was used for the analysis. Actin served as a loading control. Complete scans of the different blots are presented in Supplementary Fig. 7. (d) Comparison of KUSs and DBeQ for cell death-inducing activities. HeLa cells were treated with 50 μM DBeQ or KUSs for 24 hours.

KUSs and ATP treatments similarly prevented decreases of ATP levels in tunicamycin-treated cells (Fig. 4b). By contrast, KUS11, which could not inhibit VCP ATPase, was unable to prevent the tunicamycin-elicited ATP decrease (Fig. 4b). It is notable that the addition of 0.1 mM ATP or 3 to 10 mM methylpyruvate (weakly membrane-permeable pyruvate, which is converted to ATP in mitochondria) were also ineffective in preventing the aggregation of laminin $\gamma 1$ (Fig. 4a), but could nevertheless dampen the induction of ER stress, namely CHOP induction (Fig. 4c). These results indicated that the ER is more sensitive to decreases in ATP levels than to the presence of aggregates (see Discussion).

KUSs mitigated pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. As we have long been seeking a new strategy to protect retinal neuronal cells, we were intrigued by the observation that VCP was highly expressed in all types of retinal neuronal cells (Supplementary Fig. 3). Furthermore, in retinitis pigmentosa, an involvement of ER stress has been proposed^{2,3}. After confirming the neuroprotective efficacy of KUS in retinal organ culture (Supplementary Fig. 4), we then examined whether the protective effects

would be observed *in vivo* against the degeneration of photoreceptor cells. For this purpose, rd10 mice were used as a representative mouse model of retinitis pigmentosa²². Rd10 mice have a mutation in a gene encoding the rod cyclic guanosine monophosphate (cGMP) phosphodiesterase beta subunit (PDE6B)²², which is also mutated in patients with retinitis pigmentosa. The mice have been commonly used to test the efficacies of new treatments, including gene therapy, neuroprotectants, and stem cell derived retinal cells.

Starting 7 days after birth, KUS121 or KUS187 was administered daily (50 mg/kg) by intraperitoneal injection. Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) examination showed that at age 21 days, the retinas of the control rd10 mice had begun to degenerate (Supplementary Fig. 5a). To test the visual function of the mice, dark-adapted electroretinograms were recorded. The amplitude of the a-wave, which represents visual function of photoreceptors, was smaller in the control mice than in the KUS-treated mice (Supplementary Fig. 5b and c). The peak latency of the a-wave, which negatively correlates with visual function of photoreceptors, was delayed in the control mice as compared with the KUS-treated mice

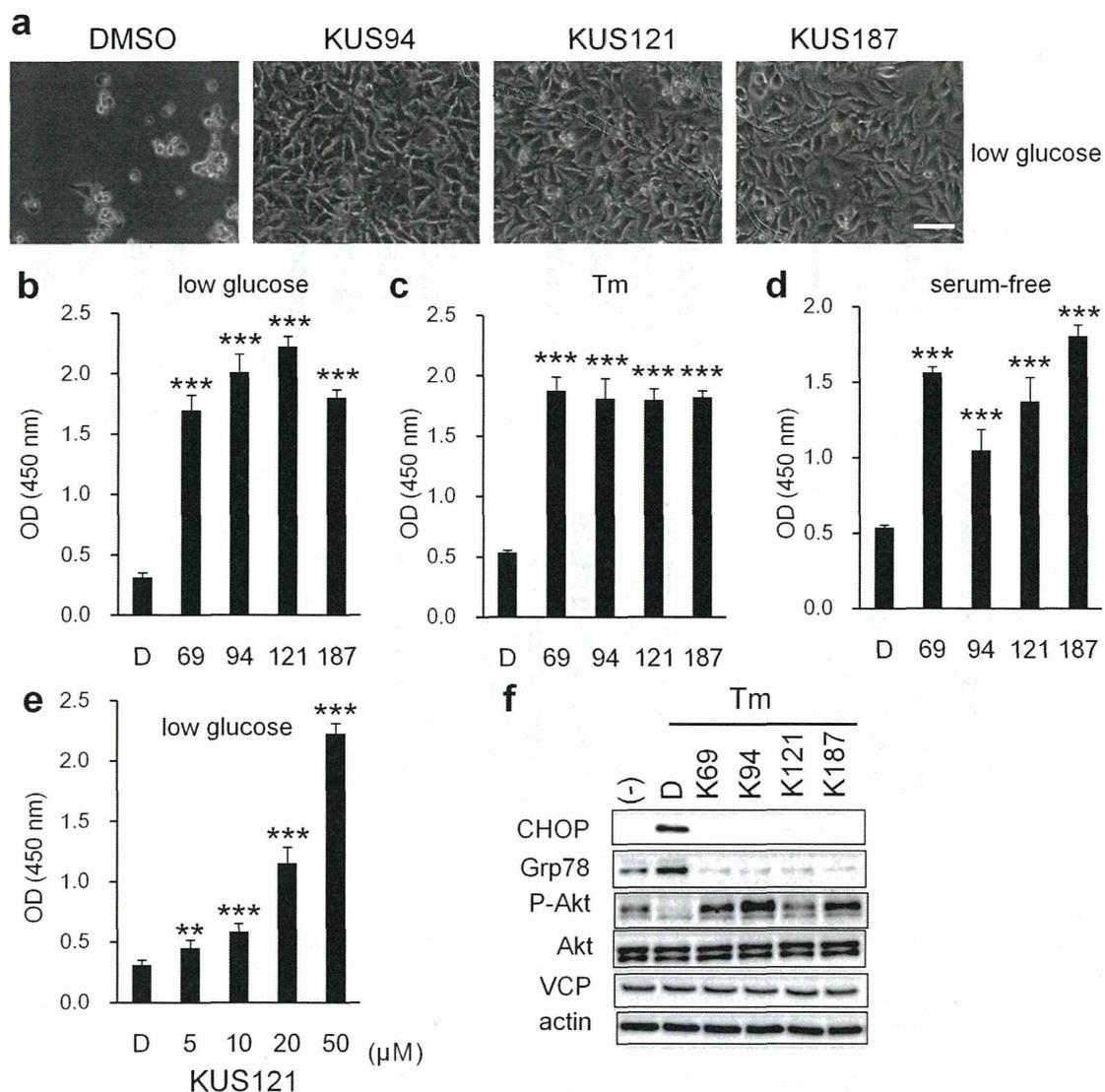


Figure 2 | Prevention of cell death and ER stress by KUSs. (a) Photographs of HeLa cells, cultured with DMSO (DMSO) or KUSs (KUS94, KUS121, and KUS187, 20 μ M each) for 41 hours in low glucose (0.2 g/l) medium. Scale bar, 100 μ m. (b–e) WST (water-soluble tetrazolium salts) values reflecting relative live cell numbers are shown, as optical density (OD) at 450 nm. Error bars indicate SD. (b) WST values of HeLa cells, cultured in low glucose (0.2 g/l) with DMSO (control) or KUSs (50 μ M for KUS121; 20 μ M for KUS69, KUS94, and KUS187, $n = 3$) for 41 hours. (c) Cell viability, indicated by WST values of HeLa cells, cultured with tunicamycin (Tm) (0.2 μ g/ml) for 41 hours with KUSs (20 μ M each, $n = 3$). (d) WST values of HEK293 cells, cultured under serum-free conditions for 65 hours with DMSO (control) or KUSs (20 μ M each, $n = 3$). *** $P < 0.001$, vs. DMSO control (Dunnett's test). (e) WST values of HeLa cells, cultured in low glucose (0.2 g/l) medium with different concentrations of KUS121 (5, 10, 20, and 50 μ M, $n = 3$) for 41 hours. ** $P = 0.008$, *** $P < 0.001$, vs. DMSO control (Dunnett's test). (f) Western blot analysis of HeLa cells, treated with tunicamycin (Tm, 0.5 μ g/ml) with DMSO (control) or KUSs (50 μ M each, KUS69, KUS94, KUS121, and KUS187) for 5 hours. Complete scans of the different blots are presented in Supplementary Fig. 8.

(Supplementary Fig. 5d). At age 25 days, the thinning of the outer nuclear layer (ONL) was clearly observed in the control mice (Fig. 5a). The outer nuclear layer and the junction line between the inner segment and outer segment (arrow heads in Fig. 5a), which is generally considered to be positively associated with visual function^{23,24}, were clearly detected in the KUS-treated but not in control mice. A very small electroretinogram response was observed in control mice, but an almost normal electroretinogram response was observed in most of the KUS-treated mice (Fig. 5b). At age 29 days, the photoreceptor layer was barely detected in SD-OCT images, and electroretinogram records were almost flat in control mice. In the age-matched KUS-treated mice, the outer nuclear layer, although thin, and an electroretinogram response were still observed (Fig. 5c

and d). By histological examination, at age 33 days, the outer nuclear layer in the control mice consisted of only 1–2 rows of cells, but there remained 5–6 rows of cells in the outer nuclear layer in the KUS-treated mice (Fig. 5e). In KUS-treated but not control mice, the outer segment of the photoreceptors was observed (Fig. 5e). The electroretinogram was non-recordable in the control mice, but small b-wave and oscillatory potentials were observed in the KUS-treated mice (Fig. 5f). Time-dependent changes in total retinal thickness measured on SD-OCT images (Fig. 5g) and in b-wave amplitudes of dark-adapted electroretinogram (Fig. 5h) showed that KUS treatments had the potential to prevent or delay the disease progression. b-wave amplitudes of dark-adapted electroretinograms in non-treated wild-type mice mostly remained unchanged or slightly

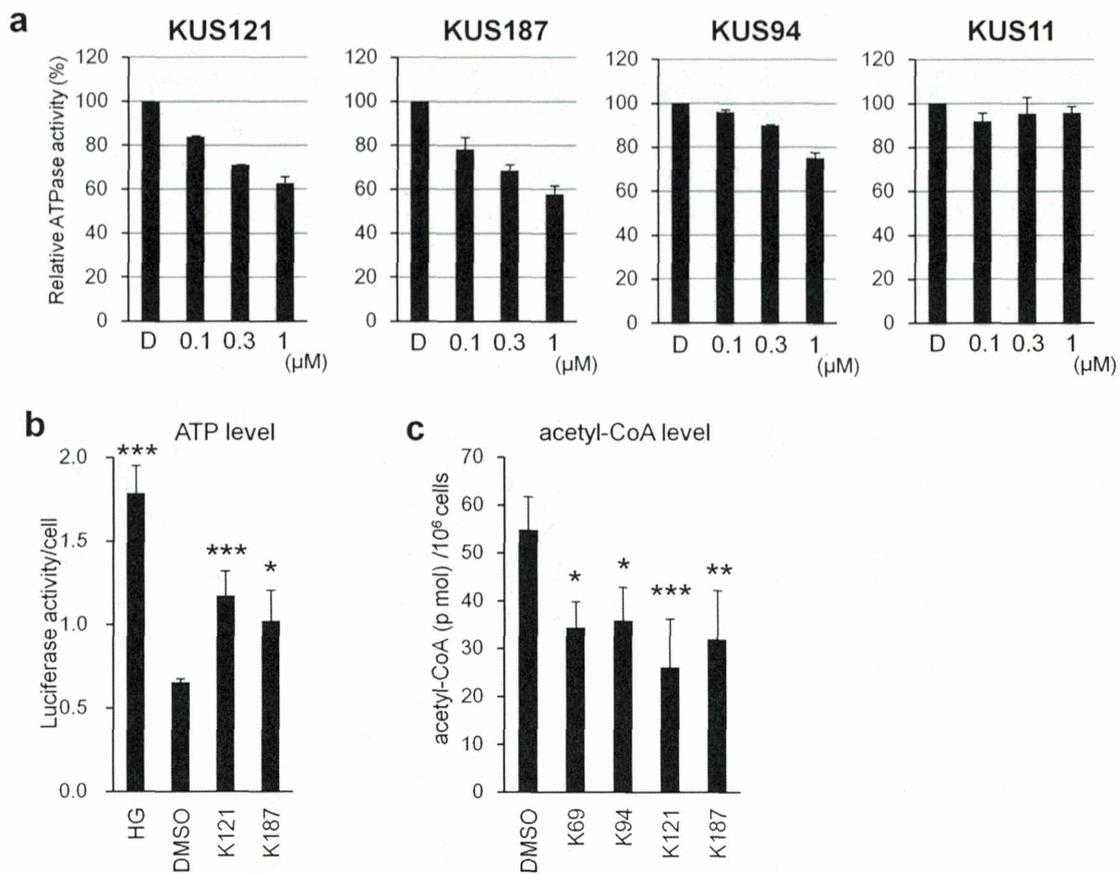


Figure 3 | Effects of KUSs on ATPase activities, ATP levels, and acetyl-CoA levels. (a) Inhibition of ATPase activity in clarified whole cell lysates by KUS121, KUS187, and KUS94, but not KUS11. Total ATPase activities in clarified whole cell lysates from differentiated PC12 cells were measured in the absence and presence of KUSs. Relative ATPase activities are shown with values in the absence of KUS (D: DMSO) set at 100%. (b) HeLa cells were cultured in medium with low glucose (0.25 g/l) for 20 hours, with or without KUSs, and ATP levels were measured with luciferase assays. (c) HeLa cells were cultured in medium with low glucose (0.25 g/l) for 20 hours, with or without KUSs, and acetyl-CoA levels were measured. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. DMSO control (Dunnett's test, $n = 3$).

increased at the age of 33 days (Supplementary Fig. 6a). Note that KUS administration in adult wild-type mice did not induce any significant change in the amplitude of a- and b-waves (Supplementary Fig. 6b and c). When examined by electron microscopy, the outer segment of the control mouse retina was mostly disarranged at the age of 21 days (Fig. 6a and c), whereas that of KUS-treated mouse retina was regularly arranged (Fig. 6b and d). In rd10 mice, KUS treatments apparently suppressed CHOP expression, as observed in cultured cells (Fig. 5i).

Discussion

We successfully developed novel ATPase inhibitors for VCP, with a naphthalene-derived structure in common, and we collectively called them KUSs (Kyoto University substances). KUSs showed IC_{50} values from 100 nM to 1 μM for the inhibition of ATPase activities of recombinant VCP *in vitro*. Totally different from known ATPase inhibitors for VCP, e.g. DBE¹⁴, NMS-873²⁵, etc., KUSs, e.g. KUS31, KUS69, KUS94, KUS121, KUS187, etc., did not manifest any apparent cellular toxicity, up to 50 μM, on essentially all tested cultured cells; nor did they elicit any aberrant phenotypes that would be expected from the inhibition of cellular VCP functions. These results demonstrated that KUSs could inhibit VCP ATPase activity without inhibiting cellular VCP functions. AAA ATPases might have additional functions that are independent of their ATPase activity. Recently, Noi et al. analyzed the natural movement of recombinant VCP by high-speed atomic force microscopy and demonstrated that

ATP-binding mutants of VCP did not display any apparent rotational movement in solution, but wild-type VCP and ATP-hydrolysis mutants of VCP were indistinguishably capable of rotational movements²⁶. These data are consistent with the idea that, for at least some VCP functions, ATP binding is essential but ATP hydrolysis is not. This idea is reminiscent of G proteins and actin, whose functions require guanosine triphosphate (GTP) and ATP binding, respectively, but not GTP and ATP hydrolysis, respectively. KUSs likely inhibit the ATPase activity of VCP, but not necessarily VCP functions related to binding of ATP. We thus categorized KUSs as “VCP modulators” rather than “VCP inhibitors”.

Surprisingly, KUSs were able to reduce by approximately 40% the total ATP consumption in whole cell soluble lysates of neuronally differentiated PC12 cells, raising the possibility that VCP accounts for approximately 40% of the ATP consumption among soluble ATPases in the non-dividing PC12 cells. This result led us to speculate that KUSs would significantly reduce ATP consumption in living cells as well. Indeed, in cultured cells, KUSs were shown to maintain ATP levels in starved conditions as well as in conditions with enhanced ATP consumption, such as in tunicamycin-induced ER stress²⁷. Consistently, and surprisingly, KUSs and ATP similarly suppressed tunicamycin-induced ER stress and eventually cell death. More surprisingly, KUSs (at 50 μM) and ATP (at 0.3 to 1 mM) similarly prevented the aggregation of laminin γ1 in tunicamycin-treated HeLa cells. It is noteworthy that a low level of ATP (at 0.1 mM) and methylpyruvate (at 3 to 10 mM) were not able to

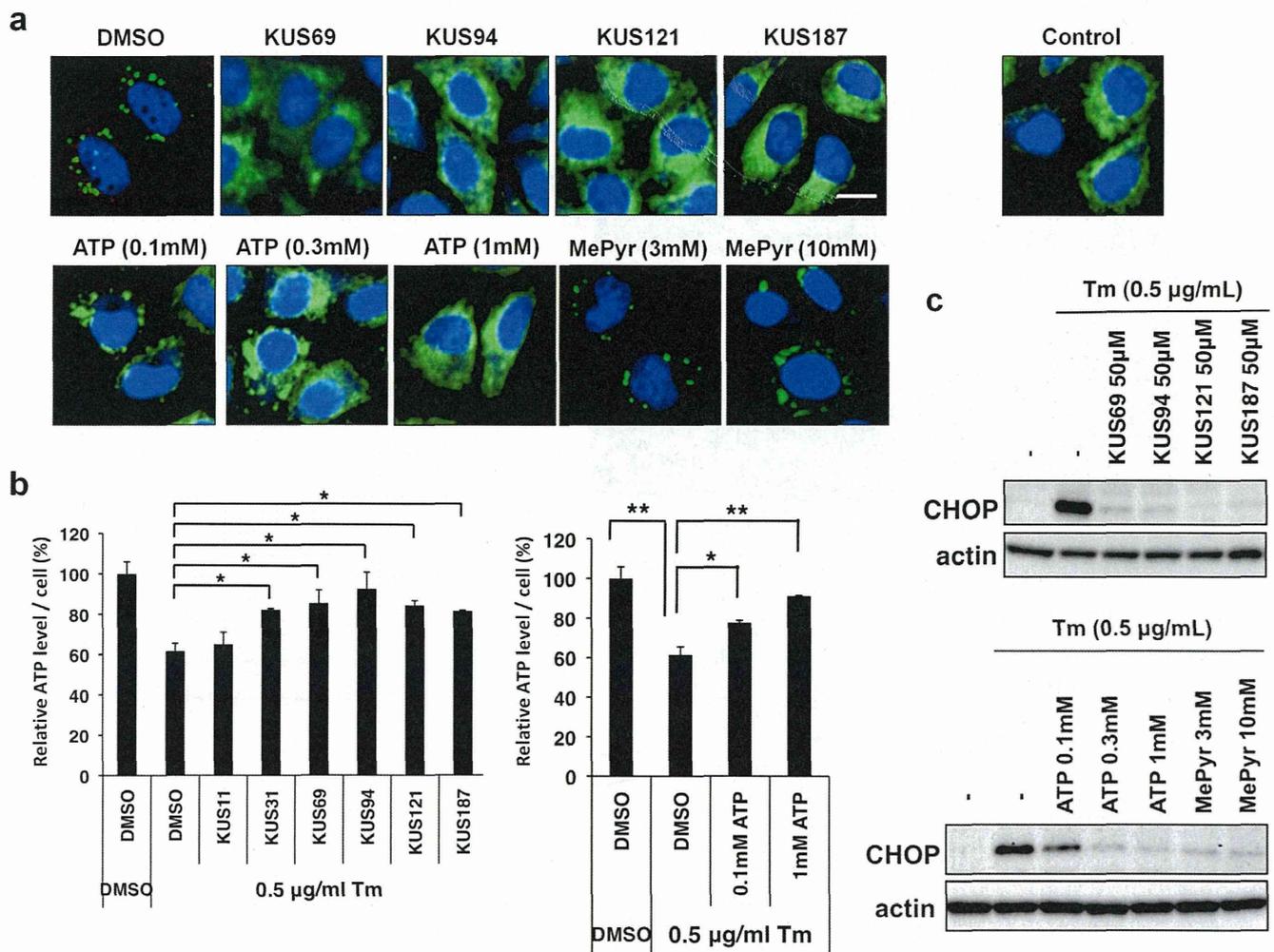


Figure 4 | KUSs and ATP each prevented a decrease of ATP levels and ameliorated ER stress in tunicamycin-treated cells. (a) Immunocytochemical analyses of HeLa cells by an anti-laminin $\gamma 1$ antibody. HeLa cells were treated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of tunicamycin (Tm) for 5 hours in the presence of KUSs (50 μM), ATP (0.1, 0.3, and 1 mM), methylpyruvate (MePyr) (3 and 10 mM), or vehicle alone (DMSO). Then, cells were fixed and subjected to immunocytochemical analyses. Normally growing HeLa cells were also analyzed (Control). Scale bar, 10 μm . (b) Measurements of the relative amounts of ATP per cell. HeLa cells were treated with tunicamycin (Tm, 0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours in the presence of KUSs (50 μM) or ATP (0.1 and 1 mM), or vehicle alone (DMSO), and were harvested. Then, ATP amounts from 1.5×10^5 cells were measured²⁷. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Error bars indicate SD. (c) Western blot analyses on CHOP. HeLa cells were treated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of tunicamycin for 5 hours in the presence of KUSs (50 μM), ATP (0.1, 0.3, and 1 mM), methylpyruvate (MePyr) (3 and 10 mM), or vehicle alone (-). Then, cells were harvested and subjected to western blot analyses. Actin served as a loading control. Complete scans of the different blots are presented in Supplementary Fig. 9.

prevent the aggregation of laminin $\gamma 1$, but were nevertheless able to reduce the induction of CHOP, a well-known ER stress marker, in tunicamycin-treated cells. This observation clearly supports the idea that ER stress is more directly elicited by a decrease of ATP than the presence of aggregated proteins in the ER. Historically, most ER chaperones were originally identified as proteins induced by glucose starvation and thus were named as GRP (glucose-regulated proteins)²⁸. Moreover, it has recently been shown that the binding of ER stress sensors, such as PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and inositol-requiring enzyme-1 (Ire1), to Grp-78 (Bip) is ATP-dependent²⁹. Thus, it is likely that a decrease in the ATP level in the ER induces the dissociation of Bip from the ER-stress sensors, leading to their self-oligomerization and subsequent activation.

The evidence that KUSs could prevent the decrease in ATP level in response to several cell death-inducing insults, and eventually cell death, led us to examine the possibility that KUSs would function as cell-protecting compounds in pathological conditions, and that the prevention of early cell death could in turn prevent or delay the

deterioration of the affected organs. For this purpose, we chose rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. Currently, it is very difficult to quantitatively measure local ATP levels, and thus we examined whether KUSs could prevent neuronal cell death in the affected retinas.

In rd10 mice, in which the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit (PDE6B)²² is mutated, KUSs significantly retarded the progress of photoreceptor cell death, and protected the photoreceptor cells morphologically as well as functionally. Reduction of ER stress would be a likely mechanism for KUS-mediated protection of photoreceptors, although our current data are not sufficient to exclude other yet-unknown possibilities. In retinitis pigmentosa, neuroprotective treatment is regarded as an important future therapeutic strategy, and several clinical trials to prolong the viability of the retinal neuronal cells have been ongoing¹. We are also planning to initiate clinical studies using KUSs in the near future.

Considering all of the data together, we posit that a reduction of ATP levels is a common condition in the affected organs of incurable