

令和元年6月5日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04726

研究課題名(和文) 虚血性心疾患感受性分子群をターゲットとした創薬とその機能解析

研究課題名(英文) The innovative drug development that targeted molecules associated with coronary artery diseases and its functional analysis

研究代表者

尾崎 浩一 (OZAKI, Kouichi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・メディカルゲノムセンター・部長

研究者番号：50373288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性心疾患(CAD)や動脈硬化性疾患に対する創薬を目指した解析を進めてきた。ターゲット分子の一つとして日本人におけるCAD感受性に対する関連が最も強いことを発見しているBRAPとその結合タンパクIκB-βの相互作用に着目した。ELISAシステムにより低分子化合物ライブラリおよびこれらと構造類似性を示す化合物群をスクリーニングし評価実験を進めた。9個の低分子がこれらの分子の結合を強く抑制し、3個は40%以上の血管平滑筋細胞増殖抑制活性があることを見出した。また、最近CAD感受性分子として同定したFURIN-LDLレセプターをもう一つのターゲット分子として阻害低分子化合物の探索を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は遺伝学、分子生物学的手法により発見したCADの真の感受性分子をターゲットとした創薬に関連しており、これまでに無い革新的かつ先端的な点が学術的意義として挙げられる。また、CADは日本を含む世界における死因が上位である疾患の一つであることからその新たな予防法、革新的な治療法に繋がる成果の開発は社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have performed the discovery of low-molecular weight compound (LMWC) which interfere the interaction and function of BRAP, associated most strongly with coronary artery diseases (CAD) susceptibility in Japanese, and IκB-β a mediator of inflammation. We developed ELISA system for BRAP-IκB-β interaction and performed interfere experiments for the binding by 9,600 low molecular weight compounds as well as selected its structural analogs. Finally, we have obtained 9 LMWCs that strongly interfered the BRAP-IκB-β binding in which 3 molecules inhibited more than 40% of the proliferation of human artery smooth muscle cells. We also selected FURIN associated with CAD as another target for drug development. FURIN is a molecule with structural similarity of PCSK9, and interacts with LDL receptor. We have also developed ELISA system for FURIN-LDLR binding and have implemented LMWC screening that interfered the interaction using libraries consist of 9,600 and 22,400 molecules so far.

研究分野：ゲノム医科学、創薬

キーワード：虚血性心疾患 動脈硬化 創薬 虚血性心疾患感受性分子 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患 (coronary artery diseases; CAD) は心臓を栄養する血管に血栓ができる結果、血液が流れなくなり心臓の動きが低下あるいは無くなる動脈硬化性疾患である。また、CAD は先進国における死因の第一位になっていると共に、寝たきりを増やす原因にもなっており、QOL の点から考えても革新的な予防や治療法の確立が急務になってくる。本研究において創薬の対象としている分子群は最近、CAD との関連が遺伝統計学的、生物学的に証明されたものであり、1 番目に注目している分子は、我々が発見した CAD の最も強い危険遺伝因子である BRAP 分子である。BRAP 分子は心筋梗塞感受性分子ガレクチン-2 と結合する分子として同定し、遺伝学、分子生物学的解析により、CAD に強く関連する分子であることを証明している (Ozaki K et al. *Nature Genet.* 2009)。また、この分子は炎症の中心的なメディエーターとして知られる Nuclear Factor kappa B (NFκB) のネガティブレギュレーターとして知られている I kappa B- (IκB- = NFKB1B) と特異的に結合してこの分子を分解することを発見しており (Liao YC et al. *Molecular Medicine* 2011)、この分子との結合を阻害することにより CAD 発症に関連した NFκB の活性化シグナルを効率よく抑えることが可能であると考えられる。もう一つの分子もごく最近 CAD との関連が証明された FURIN 分子 (Konta A et al. *J. Hum. Genet.* 2016) をターゲットとした創薬を試みる。FURIN は PCSK9 分子のファミリーであり、PCSK9 モノクローナル抗体は最近、高コレステロール血症治療薬として承認を受けている。我々は FURIN 分子も LDL レセプターに結合し、その分解に関係していることを見出している。FURIN 遺伝子内の SNP は CAD に直接関係することが遺伝学的に証明されており、この遺伝子産物が LDLR の代謝に関わっているということは、この分子を制御することにより単に高脂血症を阻害するのみではなく広く動脈硬化を抑える効果が期待でき、PCSK9 同等の創薬ターゲットになる可能性が十分にある。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでにヒトゲノム、遺伝統計学および生化学、分子生物学的解析により独自に同定、解析してきた CAD 感受性分子群 (BRAP および FURIN 分子) をターゲットとしてこれらの機能に介入できる低分子化合物を探索同定、その有用性を調査することから将来的に CAD のみならず広く動脈硬化性疾患の革新的な創薬に多面的に繋げることを目的とする。また同時に、これらの CAD 感受性分子 (BRAP や FURIN 分子) の機能解明も合わせて行い、CAD や動脈硬化性疾患のこれまでに未解明であった部分を根本的に解明できる新たな知識や生体概念を発見、構築することも目的としている。

3. 研究の方法

1) 低分子化合物ライブラリ;

東京大学創薬機構より Core Library (9,600 化合物) およびその類似化合物 27 化合物、また Advanced Core Library (22,400 化合物) の提供を受け使用した。

2) BRAP-IκB- および FURIN-LDLR 結合 ELISA 系の確立;

当初これらのタンパクについて大量にリコンビナントタンパクを調整のために、大腸菌 (pET vector) およびカイコ (シスメックスに外注) における発現系の構築を試みたがいづれの方法においても目的のタンパク量や質を確保できないことが判明した。そこで pCMV FLAG vector (Shigma) および pTriEX vector (Novagen) を COS7 サル腎臓培養細胞に強制発現させ、FLAG あるいは S タグ抗体による精製を試みたところすべてのタンパクにおいて精製が可能となった。これらの精製タンパクを用いた ELISA 系は BRAP、FURIN とともに良好であり再現性も高かったが、FURIN-LDLR については大量の低分子化合物をスクリーニングするためのタンパク量を得るためには非常に多くの COS7 細胞を培養する必要があり本研究では断念した。そこで FURIN-LDLR についてはタンパクを精製することなく COS7 強制発現系の抽出物として直接 96 well ELISA plate にコーティング、添加する方法を試みたところ、精製物と同等の反応および特異性が得られたためこちらの系を採用した。BRAP-ELISA 反応系においては、96 well plate (Nunc Maxi Sorp) に BRAP (300ng/ul, 0.1M carbonate buffer) を 100ul 添加し、90 分間コーティングした後、3% BSA 300ul によりブロッキングを 60 分間行った。その後、IκB- (PBST により希釈) を 100ul および 10uM の低分子化合物を添加し、60 分間結合反応を行った。PBST 300ul/well にて 4 回洗浄し、PBST にて 5,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗 FLAG tag M2 モノクローナル抗体 (SIGMA-ALDRICH) を 100ul 添加、洗浄後 ELISA POD 基質キット (和光純薬) を用いて発色した。96well plate 内の A1-H1well をポジティブコントロール (化合物無し、溶媒の 2 倍希釈 DMSO を添加)、A12-H12 well をネガティブコントロール (タンパク無し) とした。FURIN-LDLR については、細胞抽出物の調整として、それぞれの遺伝子を強制発現した COS7 細胞 15cm シャーレ 3 枚分を 6ml の PBST (LDLR は RIPA buffer) で抽出後、PBST にて FURIN は 300 倍、LDLR は 30 倍に希釈し 100ul を用いて BRAP-IκB- 同様に ELISA 反応を施行し、吸光度を測定した (Perkin Elmer ARVO X3)。

3) XTT assay によるヒト大動脈血管平滑筋細胞の低分子化合物による増殖阻害実験;

培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞はタカラより購入しプロトコル通りに培養した。1 x 10⁴/ml の細胞 100ul を 96 well 細胞培養プレートに散布後 CO2 インキュベータにて 36 時間培養し、低分子化合物 10ul (4uM) を添加し、CO2 インキュベータにてさらに 48 時間培養した。XTT 試薬を

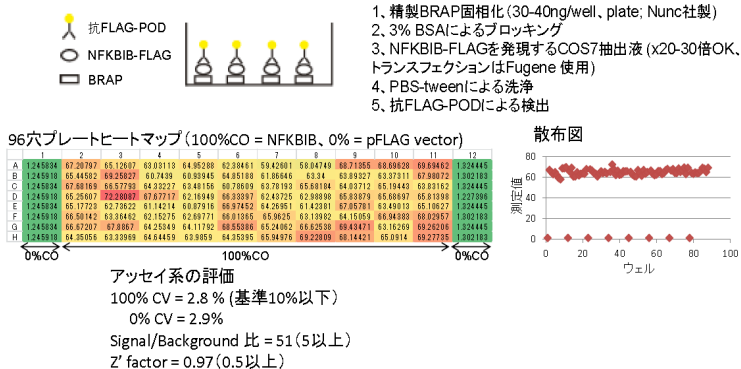
添加し CO2 インキュベータにて 4 時間放置し、Perkin Elmer ARVO X3 により吸光度を測定した。予備実験の後、実験は duplicate で行い、同様の実験を繰り返した。

4) ルシフェラーゼアッセイ; ベクターとしてプロメガ社製の pGL3 basic ベクターを使用した。このベクターに BRAPBP プロモーター領域を挿入し、その下流にそれぞれの SNP 配列領域を挿入した。細胞は血管平滑筋細胞を用いた。トランスフェクションには nucleofector system (Amaxa) を用いた。ルシフェラーゼの活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。

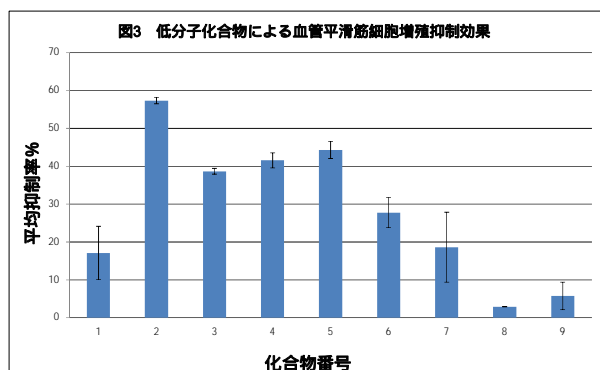
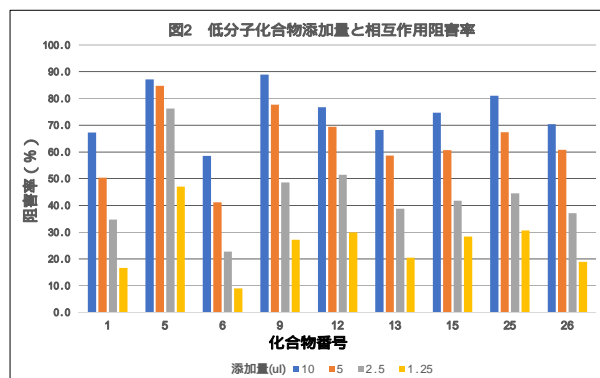
5) BRAP、BRAPBP 強制発現およびノックダウンによる NFκB 活性の変化; 強制発現ベクターは pCMV FLAG vector (Shigma) を用い、全長遺伝子をクローニングした。siRNA はインビトロゲン社よりステルス RNAi を購入して用いた。NFκB の活性は NFκB 特異的 E-selectin プロモーターを含むルシフェラーゼレポーターシステム (インビトロゲン社) を使用し、ルシフェラーゼの活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。RNA の定量には SYBR green 法 (ロッシュ) を使用し、ライトサイクラー-480 システム (ロッシュ) により定量した。

4. 研究成果

図1 虚血性心疾患感受性分子 BRAP と IκB- の結合アッセイ ELISA 系の開発



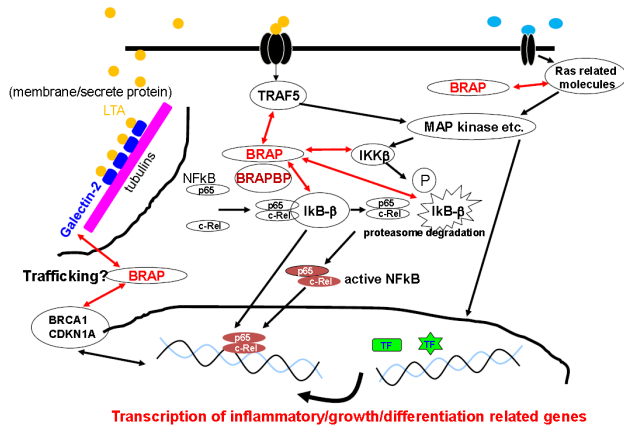
による IκB- の大量精製に成功した。これらのタンパクを用いて Enzyme linked immuno solvent assay (ELISA) 系の開発を進め、アッセイ系の評価を行ったところ、図1に示したように非常に良好なアッセイ系を確立することができた (CV < 3、シグナルバックグラウンド比 = ~50、Z' factor = 0.97)。この ELISA 系と東京大学創薬機構から提供を受けた 10,000 コアライブラリを使用して、BRAP-IκB- の阻害分子を探索し、繰り返し確認実験を行ったところ、その結合を 40-50%抑制できる 5 個の候補化合物を同定した。次に、この 5 個の低分子化合物と類似の構造を示す化合物について検討を行った。これらの 5 個の低分子化合物と類似性を示すものとして、東京大学創薬機構のデータベースより 27 個の低分子化合物を抽出することができた。これらについてこれまで同様に BRAP-IκB- ELISA



系による低分子化合物阻害スクリーニングを進めたところ、図2に示したように化合物濃度依存的に顕著な BRAP-IκB- 結合阻害活性を示す 9 個の化合物を得ることができた。この効果は初めに発見した 5 個のいずれの低分子化合物よりも強いものであり、構造類似性を基にした低分子化合物のタンパク相互作用阻害スクリーニングの妥当性を示しているものと考えられる。

次にこれらの低分子化合物について培養ヒト動脈血管平滑筋細胞の増殖抑制効果があるか否かを XTT assay により確認した。図3に示したように、9 化合物中 3 個においては 40%以上の細胞増殖抑制活性を示し、化合物 2 では 60%近く細胞増殖抑制活性を示した。BRAP は IκB- の分解を促進し、IκB- による Nuclear Factor kappa B (NFκB) の分解を制御している。NFκB は免疫、炎症に中心的なメディエータとして知られる転写因子であり、様々なサイトカインや細胞増殖因子を転写することが知られている。これまでの研究で BRAP は様々な

図4 虚血性心疾患感受性分子 BRAP の細胞内カスケード

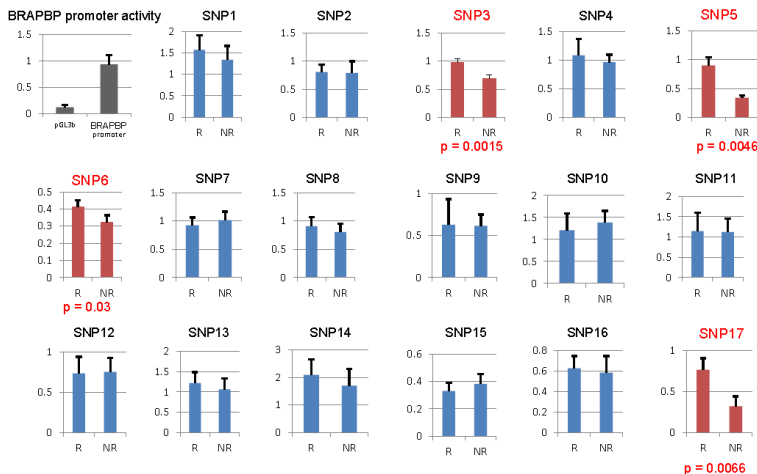


Transcription of inflammatory/growth/differentiation related genes

分子化合物の同定と解析; もう一つの創薬ターゲットである FURIN-LDLR についても現在までに BRAP- IκB- と同様の ELISA 系を確立することに成功し、東京大学創薬機構より提供を受けた 9,600 個の低分子化合物コライブラリすべてについてスクリーニングを行った。しかしながら、最初のスクリーニングでいくつかの化合物が結合阻害候補分子として選択されたが、再実験における再現性をとる段階で結果の統一性が得ることができず、最終的にはこれらのコライブラリ中には FURIN-LDLR の結合に介入できる化合物は無いと結論付けた。その結果として、コライブラリよりも網羅性の高く、96 well ELISA によるハンドリングにおいてもスクリーニング可能なアドバンスドコライブラリ (22,400 化合物) を選択し、同様に ELISA スクリーニングを進めている段階である。FURIN については、最近、その抑制抗体が高コレステロール血症の新薬として上市された PCSK9 のファミリーであり、PCSK9 同様に LDLR に結合することから、FURIN-LDLR の結合阻害低分子はまた、新規の動脈硬化阻害治療薬となる可能性は高く、さらに低分子による創薬が進めば比較的安価な薬剤に繋がる可能性は大きい。

3) BRAP に結合する新たな分子の解析; 一方で、これまでに BRAP に結合する分子を BRAP 強制発現によるプルダウン法と質量分析法を組み合わせることにより同定してきた (図 4)。これまでに結合分子としては TNF レセプター関連、NFκB 関連などの免疫、炎症関連分子が明らかとなっている。その中で、BRAP と新たに結合することを同定しており、その遺伝子領域内の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が CAD と遺伝学的に強い関連 ($P < 0.0001$ 、オッズ比 = 1.12~) を示す遺伝子について解析を進めた (未発表のためここでは BRAPBP 遺伝子として示した)。この遺伝子はユビキチンリガーゼファミリーに属している。関連のあった SNP についてはファインマッピングを行ったところ連鎖不平衡にある SNP が 17 個存在しており、すべて非転写領域であったため、それらの CAD へも関連機能として、BRAPBP のエンハンサー領域に位置し、BRAPBP の転写量に影響を与える可能性が示唆されたため、*in vitro* における各 SNP の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。図 5 に示したようにルシフェラーゼベクターに BRAPBP のプロモーター領域を挿入することにより 10 倍近くのプロモーター活性が得られた。このプロモーター活性に与える影響を 17 個の SNPs で確認したところ、4 つの SNPs で転写活性を増加させるという結果が得られた。GTEx portal (<https://gtexportal.org/home/>) による遺伝子発現の量的形質遺伝子座位 (expression Quantitative Trait Loci; eQTL) においても SNP アレルを持つ血管動脈サンプルでは遺伝子発現量が有意に増加していることが示されておりルシフェラーゼアッセイの結果と一致している。したがって、この分子の発現量の増加が CAD の発症に関連していると考えられる。BRAPBP はユビキチンリガーゼ様の構造を持っていることから、ユビキチンプロテアソーム系に関連していることが考えられ、BRAP もユビキチンリガーゼ活性を有していることから、これらの結合を介して

図5 CADに関連した17個のSNPsのルシフェラーゼアッセイの結果



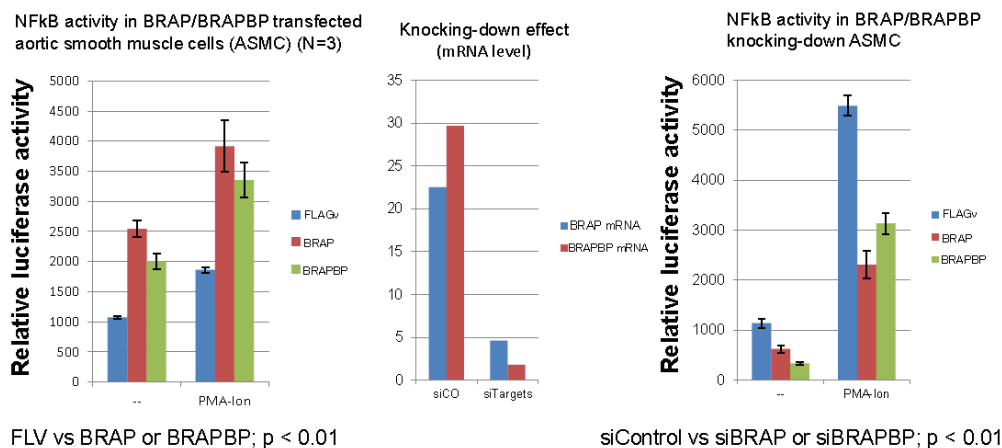
2) FURIN-LDLR をターゲットとした低

分子と相互作用することを発見しており (図 4) BRAP の機能すべてを制御することは NFκB など機能を完全に抑えてしまい、副作用の点などから現実的ではないと考えられる。ここで得られた 60% 程度の細胞増殖抑制効果は IκB- との結合を選択的に抑えることによる結果であり、ある程度期待した効果であると考えられる。今後、BRAP- IκB- の結合を阻害し、40%以上細胞増殖抑制活性が認められた 3 低分子化合物については、動脈硬化病変の形成抑制やステントによる再狭窄の抑制剤としての *in vivo* での活性確認を進めることが必要になる。

して周辺の関連分子である IκB- や NFκB といった免疫、炎症に中心的な働きを示す分子群の分解、活性調節に深く関与しているものと考えられる (図 4)。ルシフェラーゼおよび eQTL 解析の結果から BRAPBP 分子の発現量の増加が CAD の発症に関連していることから、IκB-、NFκB に関連した炎症系における CAD の関与が示唆される。BRAP についても同様に CAD に関連した SNP が BRAP 遺伝子発現を増加すること

がわかっており、BRAP/BRAPBP 分子群の増加が共に CAD 感受性であることが示唆された。一方で、BRAP 分子の細胞内量の増加は NFκB の活性を増加することをこれまでに報告してきた。BRAPBP においても同様の結果が得られるかどうかについて培養細胞系を用いた BRAPBP 分子の強制発現およびノックダウンによる実験で確認した。図 6 に示すように強制発現系では BRAP 同様に PMA-イオノマイシン刺激の有無に関わらず NFκB の活性を増加し、逆にノックダウンにおいては NFκB の活性を低下させることが判明した。これらの結果は BRAP/BRAPBP の発現量の変化が NFκB の活性に直接作用し、CAD の発症に影響を与えると考えることができ、BRAPBP もまた創薬ターゲットになりうることを示唆している。今後さらにこの BRAP を中心とした CAD 関連分子カスケードを精査することにより、CAD はもとより広く動脈硬化一般のさらなる理解に繋がり、革新的治療薬の開発への貢献が期待できる。

図 6 BRAP および BRAPBP を強制発現あるいはノックダウンした時の NFκB の活性



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, Ito M, Fujita K, Harada M, Toko H, Kobayashi Y, **Ito K**, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Komuro I. **Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure.** *Nat Commun.* 9(1): 4435 (2018). 査読有, doi: 10.1038/s41467-018-06639-7.
- 2) Tajima T, Morita H, **Ito K**, Yamazaki T, Kubo M, Komuro I, Momozawa Y. **Blood lipid-related low-frequency variants in LDLR and PCSK9 are associated with onset age and risk of myocardial infarction in Japanese.** *Sci Rep.* 8(1): 8107 (2018). 査読有, doi: 10.1038/s41598-018-26453-x.
- 3) Sudo T, Okada Y, **Ozaki K**, Urayama K, Kanai M, Kobayashi H, Gokyu M, Izumi Y, Tanaka T. **Mutations in NOD2 cause aggressive periodontitis.** *Journal of Dental Research* 96(10):1100-1105 (2017). 査読有, doi: 10.1177/0022034517715432.
- 4) **Ozaki K** Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. *eLS (Encyclopedia of Life Sciences)* review, November 2017. 査読有, doi: 10.1002/9780470015902.a0027329
- 5) **Ito K**, Patel PN, Gorham JM, McDonough B, DePalma SR, Adler EE, Lam L, MacRae CA, Mohiuddin SM, Fatkin D, Seidman CE, Seidman JG. **Identification of pathogenic gene mutations in LMNA and MYBPC3 that alter RNA splicing.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:7689-7694 (2017). 査読有, doi: 10.1073/pnas.1707741114.
- 6) Low SK, Takahashi A, Ebana Y, **Ozaki K**, Christophersen IE, Ellinor PT, AFGen Consortium, Ogishima S, Yamamoto M, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Naito M, Wakai K, Tanaka H, Furukawa T, Kubo M, **Ito K**, Kamatani Y, Tanaka T. **Identification of six novel genetic loci associated with atrial fibrillation in Japanese population.** *Nature Genetics* 49 (6), 953-958 (2017). 査読有, doi: 10.1038/ng.3842.
- 7) Ebana Y, **Ozaki K**, Liu L, Hachiya H, Hirao K, Isobe M, Kubo M, Tanaka T, Furukawa T. **Clinical utility and functional analysis of variants in atrial fibrillation-associated locus 4q25.** *Journal of Cardiology* 70 (4): 366-373 (2017). 査読有, doi: 10.1016/j.jjcc.2016.11.016.
- 8) Konta A, **Ozaki K**, Sakata Y, Takahashi A, Morizono T, Suna S, Onouchi Y, Tsunoda T, Kubo M, Komuro I, Eishi Y, Tanaka T. **A functional SNP in FLT1 increases risk of coronary artery disease in a Japanese population.** *Journal of Human Genetics* 61 (5): 435-441 (2016). 査読有, doi: 10.1038/jhg.2015.171.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) **伊藤薫 (Invited, Oral English) Special Session 7 ゲノム科学・ゲノム医療の最前線 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 第83回日本循環器学会学術集会, 2019**
- 2) **Hiroshi Matsunaga, Kaoru Ito, Masato Akiyama, Satoshi Koyama, Yoshihiro Onouchi, Kouichi Ozaki, Hiroyuki Morita, Hiroshi Akazawa, Yoichiro Kamatani, Issei Komuro** “Trans-Ethnic Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies for Coronary Artery Disease Highlights the Importance of Immune System” **AHA SCIENTIFIC SESSION, 2018**
- 3) **Ozaki K. Biological and pharmaceutical investigation of molecules associated with the risk of coronary artery disease. Genomic Medicine 2018 (Huston), 2018**
- 4) **伊藤薫 「Cutting Edge of Genomic Research:GWAS, NGS, and Others」 第64回日本不整脈心電図学会学術大会, 2017**
- 5) 松永紘、**伊藤薫** 「全ゲノムシーケンスを用いた心筋梗塞メカニズムの解明」 **Molecular Cardiovascular Metabolic Conference, 2017**
- 6) **Ozaki K, A. Konta, T Tanaka. Up-regulation of FLT1 by a novel functional SNP increases risk of coronary artery disease through an inflammatory activation. 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), 2016**

〔図書〕(計 6 件)

- 1) **尾崎浩一** 虚血性心疾患感受性遺伝子とプレジジョンメディシン プレジジョン・メディシン~ビッグデータの構築・分析から臨床応用・課題まで~ エヌ・ティー・エス(2018) 第4章 第1節
- 2) **尾崎浩一** 冠動脈疾患の遺伝学 遺伝子医学 MOOK 別冊 シリーズ 3 最新多因子遺伝性疾患研究と遺伝カウンセリング(2018) 第3章 9, p150-157.
- 3) **尾崎浩一、田中敏博** 虚血性心疾患の遺伝的背景とプレジジョン・メディシン 遺伝子解析研究の新時代 医学のあゆみ 別冊(2018) Vol. 266 No. 5. p441-448.
- 4) **尾崎浩一** 虚血性心疾患の分子遺伝学 特集 プレジジョンメディシンとアンチエイジング(伊藤 薫、尾崎浩一 編) アンチエイジング医学 (2017) Vol. 13 No. 5
- 5) **尾崎浩一、田中敏博** 虚血性心疾患の遺伝的素因 日本臨床 (2016) Vol. 74 増刊 No. 4
- 6) **Ozaki K, Tanaka T. Identification of myocardial infarction susceptible genes and their functional analyses. Krishnarao A, Genome Wide Association Studies Cambridge University Press (2016), p79-88**

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 薫

ローマ字氏名：(ITO, Kaoru)

所属研究機関名：国立研究開発法人 理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター 循環器疾患研究チーム

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁)：50375664

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉井 真由美

ローマ字氏名：(YOSHII, Mayumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。