

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19498

研究課題名(和文) 樹状高分子デンドリマーの多機能性を変える難治性アミロイドーシスの根治治療

研究課題名(英文) Potential use of multifunctional polyamidoamine Dendrimer for curative treatments of intractable amyloidoses

研究代表者

城野 博史 (JONO, Hirofumi)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40515483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)： 難治性アミロイドーシスとは、タンパク質が立体構造の変化によりアミロイドと呼ばれる線維を形成し、生体内に沈着し臓器障害をおこす疾患群の総称である。本疾患群の発症過程は、アミロイド原因タンパク質の、産生上昇あるいは変異タンパク質の産生、立体構造変化によるアミロイド線維化、アミロイド線維の組織沈着、の3つの重要なステップを経て進行することが知られているが、本は研究では、樹状高分子化合物デンドリマーを基盤とした従来にない遺伝子導入キャリアを創製し、難治性アミロイドーシスの根治療法開発にこれまでにない新たな道を切り開くことを目的とした研究課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定疾患に指定され臨床上大きな問題となっている難治性アミロイドーシスには、アミロイド原因タンパク質の違いによって、TTR関連アミロイドーシスやアルツハイマー病など様々な疾患が含まれており、その治療薬開発は喫緊の社会的課題である。本研究により実証された、樹状高分子化合物デンドリマーの新規治療薬としての有効性・適応拡大性は、多様なアミロイドーシスへの根治療法開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Amyloidoses, specified rare and intractable diseases, are thought to result from conformational change and aggregation of precursor proteins. Accumulation of amyloid fibrils, which are produced via self-assembly of a naturally folded protein into an insoluble cross-sheet structure, is considered to be the hallmark of amyloid-related diseases. It is well-documented that amyloidoses progress through 3 critical pathological processes, such as, 1. Overproduction or mutation of amyloid precursor proteins, 2. Amyloid fibril formation caused by conformational change, 3. Tissue deposition of amyloid fibrils. In this research, we utilize characteristic features of polyamidoamine starburst dendrimer as a novel multi-functional gene transfer carrier and develop novel multi-target drugs for intractable amyloidoses.

研究分野：医療系薬学

キーワード：高機能性遺伝子キャリア RNAi 医薬 アミロイドーシス 家族性アミロイドポリニューロパチー

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

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは、様々な要因(ストレス、老化、遺伝子変異等)によるタンパク質の立体構造変化が発症要因として知られているが、本発症過程は、アミロイド原因タンパク質の、「産生上昇や変異タンパク質の産生」、「アミロイド線維化」、「アミロイド線維の組織沈着」という3つの重要なステップを経て進行する。従来の創薬研究では、上記の各ステップを単独で標的とする薬剤開発が行われてきたが、各ステップに対する単独作用で臨床上有効な治療効果を示す薬剤の開発は困難を極めている。

このような現状を打破すべく、申請者は、上記アミロイドーシス発症過程の3つのステップを同時に抑制しうる新規マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬の開発を目指し、樹状高分子化合物デンドリマーの多機能材料としての特性に着目した創薬研究を実施してきた。申請者はこれまで、トランスサイレチン(TTR) 遺伝子の変異により発症する家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)を対象とし、デンドリマーの多機能材料としての特性を最大限に活用し、アミロイド線維化・組織沈着に対する抑制効果を有し、かつ遺伝子導入キャリアとしてRNA干渉(RNAi) 医薬の高い導入効率をも併せ持つシクロデキストリン/デンドリマー結合体(GUG-β-CDE)の創製に成功し、以下の研究成果を得た。

**【研究成果1】** FAPの原因タンパク質 TTR を標的とする siRNA を用いた RNAi 医薬/GUG-β-CDE 複合体は、TTR の産生、線維化、組織沈着の全ての過程を単剤で抑制した。

**【研究成果2】** GUG-β-CDE が単独で示す、アミロイド線維化・組織沈着に対する抑制効果は、RNAi 医薬と複合体を形成することで相乗的に増強された。

**【研究成果3】** 成果 1、2 で示した RNAi 医薬/GUG-β-CDE 複合体の相乗効果は、FAP の原因タンパク質 TTR のみならず、他のアミロイド原因タンパク質に対しても発揮された。

上記研究成果は、本剤が、1. マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬として期待される特性(3ステップの同時抑制)、2. シナジー効果による高い治療効果、3. 他のアミロイドーシスへの適応拡大性、を有する可能性を強く示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、本剤(RNAi 医薬/GUG-β-CDE 複合体)を新規マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬とした従来にない治療コンセプトの実証(Proof of Concept: POC)を目指し、本剤を用いた薬効評価・作用機序の解明を実施し、難治性アミロイドーシスの根治療法開発への道を切り開く。

## 3. 研究の方法

新規 FAP 治療薬としての薬効薬理評価: 豊富な薬効評価ツール(FAP 疾患モデル動物、FAP 患者の臨床検体、siRNA-TTR、アミロイド線維評価系など)を最大限に活用した薬効薬理評価により、本剤の新規 FAP 治療薬としての有効性・安全性を検証する。

② 複合体形成によるシナジー効果メカニズムの解明: 本剤の物性評価(遺伝子導入キャリア特性、粒子径等)やアミロイド線維形成抑制効果の評価(チオフラビン T 解析など)によりシナジー効果メカニズムを解明し、治療効果を最大限に発揮できる投与条件の検討を行う。

③ 各種アミロイドーシスにおける治療効果の検証: アミロイドーシスには、原因タンパク質の違いにより、FAP を初め、アルツハイマー病などの様々な疾患が含まれており、各種アミロイド原因タンパク質を対象に本剤の治療効果を評価し適応拡大・臨床応用性を検証する。

## 4. 研究成果

### 新規 FAP 治療薬としての薬効薬理評価

FAP 疾患モデル動物(ATTR V30M Tg ラット)を用いた評価系を用い、GUG-β-CDE 投与実験を実施した結果、9 か月および 15 か月齢 ATTR V30M Tg ラットにおいて、GUG-β-CDE 投与(0.1~2 mg/kg 単独投与)の薬理効果として、消化管(結腸)の TTR 沈着が著明に抑制されることが明らかとなった。本結果を基盤とし、さらに、FAP の原因タンパク質 TTR を標的とする siRNA を用いた本剤(RNAi 医薬/GUG-β-CDE 複合体)を用いた薬効評価を行った結果、TTR の産生、アミロイド線維化、組織沈着の 3 過程を単剤で抑制し、GUG-β-CDE が単独で示していたアミロイド線維化・組織沈着への薬効が、RNAi 医薬との複合体形成により相乗的に増強されることが明らかとなった。

## ② 複合体形成によるシナジー効果メカニズムの解明

これまでの研究成果から、TTR の線維形成過程における GUG- $\beta$ -CDE の単独作用として、TTR の  $\beta$ -sheet 構造に由来する 215 nm の負のバンド強度を低下させ、 $\beta$ -sheet リッチなアミロイド中間体へのコンフォメーション変化を阻害する可能性が示されていた。そこで、本剤 (RNAi 医薬/GUG- $\beta$ -CDE 複合体) を用いた複合体形成によるコンフォメーション変化に対する影響を円二色性 (CD) スペクトル解析にて検証したところ、GUG- $\beta$ -CDE 単剤によるコンフォメーション変化は TTR を標的とする siRNA との複合体形成により著明に増強されていた。なお、GUG- $\beta$ -CDE 単剤の時と同様に、TTR の Trp 残基周辺の構造には影響を及ぼしていない可能性が示された。さらに、GUG- $\beta$ -CDE 単剤による TTR 線維溶解作用に関しても、複合体形成による相乗効果を確認することができた。

## ③ 各種アミロイドーシスにおける治療効果の検証

本剤 (RNAi 医薬/GUG- $\beta$ -CDE 複合体) の治療 (相乗) 効果を、様々なアミロイド原因タンパク質を対象とした線維形成抑制効果の評価によって検証したところ、FAP の原因タンパク質である TTR に加え、アルツハイマー病のアミロイド $\beta$  (Amyloid  $\beta$ : A $\beta$ )、AA アミロイドーシスの血清アミロイド A 蛋白 (serum amyloid A: SAA) など、様々なアミロイド原因タンパク質に対しても同様に発揮されることが明らかとなった。

以上、本研究期間に得られた ~ による治療効果の評価の成果より、今回新たに創製した RNAi 医薬/GUG- $\beta$ -CDE 複合体は、アミロイドーシス発症過程で重要な 3 つのステップを同時に抑制し、革新的マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬としての可能性を有していること示された。今後、実用化・適応拡大への取り組みとして、詳細な薬効メカニズムの解明、様々なアミロイドーシスモデル動物を用いた投与方法・有効性・安全性の確認 (in vivo 動物実験) などを実施し、本剤をマルチターゲット型アミロイドーシス治療薬とした新規治療戦略の実証 (Proof of Concept : POC) 取得を目指し、将来的には、多様な難治性アミロイドーシスへの適応拡大を通して、難治性アミロイドーシスの根治療法開発に新たな道を切り開く予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 4 件)

Inoue M, Ueda M, Higashi T, Anno T, Fujisawa K, Motoyama K, Mizuguchi M, Ando Y, Jono H\*, Arima H. Therapeutic Potential of Polyamidoamine Dendrimer for Amyloidogenic Transthyretin Amyloidosis. *ACS Chem Neurosci*. 10: 2584-2590, 2019

DOI: 10.1021/acchemneuro.9b00059

Hayashi Y, Jono H\*. Recent Advances in Oligonucleotide-Based Therapy for Transthyretin Amyloidosis: Clinical Impact and Future Prospects. *Biol Pharm Bull*. 41: 1737-1744, 2019.

DOI: 10.1248/bpb.b18-00625

Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K, Jono H, Ando Y, Arima H. In vitro and in vivo siRNA delivery to hepatocyte utilizing ternary complexation of lactosylated dendrimer/cyclodextrin conjugates, siRNA and low-molecular-weight sacran. *Int J Biol Macromol*. 107: 1113-1121, 2017.

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.085

Jono H, Ando Y. Towards targets and treatments in transthyretin amyloidosis. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 5: 691-699, 2017.

### [学会発表](計 7 件)

城野博史、齋藤秀之、安東由喜雄 シンポジウム「臨床化学的観点を活用した遺伝性 ATTR アミロイドーシスの新規治療戦略の確立」日本薬学会第 139 年会 (2019/3/21、幕張)

城野博史、安東由喜雄、齋藤秀之 シンポジウム「難治性アミロイドーシスに対する薬物治療の現状と今後の展望」第 28 回日本医療薬学会年会 (2018/11/23-25、神戸)

城野博史、田崎雅義、大林光念、安東由喜雄 シンポジウム「質量分析を活用したアミロイドーシスの病型診断」第 43 回日本医用マススペクトル学会年会 (2018/9/6 ~ 7、札幌)

Jono H, Inoue M, Hayashi Y, Ouchi K, Muta K, Higashi T, Motoyama K, Arima H, Ando Y 「Effects of Cyclodextrin/Dendrimer Conjugate/shRNA Complex as a Novel Multi-target Drug on Amyloidoses」International Symposia on Amyloidosis 2018 (2018/3/26-29、Kumamoto)

Hayashi Y, Arima H, Ando Y, Saito H, Jono H 「Therapeutic Approach for Transthyretin Amyloidosis by Targeted Delivery of siRNA Ternary Complex with Cyclodextrin/dendrimer Conjugate」 International Symposia on Amyloidosis 2018 (2018/3/26-29、Kumamoto)

Inoue M, Jono H, Higashi T, Motoyama K, Ando Y, Arima H 「Evaluation of Cyclodextrin/Dendrimer Conjugate/shRNA Complex for Treatment of Transthyretin Amyloidosis」 International Symposia on Amyloidosis 2018 (2018/3/26-29、Kumamoto)  
城野博史、安東由喜雄 シンポジウム「遺伝性 ATTR アミロイドーシスの根治を目指した抗体医薬品の創製」第10回トランスポーター研究会九州部会(2017/9/2、熊本)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：新規なアミロイド線維生成抑制剤  
発明者：城野博史、有馬英俊、安東由喜雄、本山敬一、東大志  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/067373  
出願年：PCT 出願日：2016年6月10日  
国内外の別：JP2017/523714、EP16807597.6、US15/580630

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/pharmacy/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：有馬 英俊  
ローマ字氏名：ARIMA, Hidetoshi  
所属研究機関名：熊本大学  
部局名：大学院生命科学研究部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：50260964

研究分担者氏名：安東 由喜雄  
ローマ字氏名：ANDO, Yukio  
所属研究機関名：熊本大学  
部局名：大学院生命科学研究部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：20253742

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。