

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390045

研究課題名（和文）

フォールディング病に対する新たな治療原理の確立

研究課題名（英文）

Therapeutic principles on protein misfolding diseases

研究代表者

甲斐 広文 (KAI HIROFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30194658

研究成果の概要（和文）：嚢胞性線維症(CF)および家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の治療薬の開発研究はあまり進展していない。本研究では、約70%のCF患者が有する変異タンパク質 F508 CFTR の細胞内品質管理機構を明らかにした。さらに、FAPの原因タンパク質である transthyretin (TTR)の細胞内品質管理機構に関する研究により、変異 TTR 産生抑制薬の新規の概念を提唱し、また、変異 TTR の小胞体品質管理に BiP が特異的に関わることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Drug development for cystic fibrosis and familial amyloid polyneuropathy is still in progress. We found out the intracellular protein quality control mechanisms of F508 CFTR, a major mutant of cystic fibrosis, and of transthyretin variants, resulting in proposal of new concept of drug development for familial amyloid polyneuropathy. In addition, we found that the endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬理学、タンパク質、遺伝病、cystic fibrosis、FAP、CFTR、transthyretin

1. 研究開始当初の背景

細胞の様々な機能を担うタンパク質が正しく働くためには正しく折り畳まれ（フォールディング）、さらに正しい場所に輸送されなければならない。この過程がうまくいかないと細胞機能に様々な不都合が生じる。アルツ

ハイマー病、プリオン病、ポリグルタミン病などがその代表的疾患とされ、（ミス）フォールディング病と称されている。これらの代表的なフォールディング病に対する治療薬の開発研究は国内外の多くの研究グループが精力的に取り組んでいるが、嚢胞性線維症

(CF, 平均寿命約30才)および家族性アミロイドーシスポリニューロパチー(FAP, 日本における平均寿命50才)の治療薬の開発研究は基礎研究者が少ないことから世界的に立ち後れているといっても過言ではない。

2. 研究の目的

本研究は, CFおよびFAPに関するこれまでの細胞生物学的なアプローチによる基礎研究をさらに進展させるとともに, 医薬品開発へとつながる創薬ターゲット分子の発見を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CFTRの細胞内タンパク質品質管理機構の詳細を細胞生物学的、分子生物学的な技術を駆使し、解明する。

(2) transthyretinの細胞内タンパク質品質管理機構の詳細を細胞生物学的、エックス線構造解析学的技術を駆使し、解明する。

4. 研究成果

(1) CF関連プロジェクト

約70%のCF患者は変異タンパク質 F508 CFTRを有し, この変異体は小胞体に蓄積し小胞体関連分解(ERAD)を受けやすい。本研究グループは, 小胞体分子シャペロンである calnexin (CNX)が CFTRの ERAD抑制に関与すること (*Mol. Biol. Cell*, 2004, *BBA Mol. Cell Res.*, 2008a), 小胞体分子シャペロンである calreticulin (CRT)が小胞体外で形質膜における CFTRの安定性を低下させる negative regulator であること (*J. Biol. Chem.*, 2006), 親電子性物質が CRTの発現を抑制することにより形質膜の CFTRを安定化すること (*BBRC*, 2007), CFTRが特定の遺伝子 (TLR2)のDNAメチル化レベルを制御していることを明らかにしてきた (*FASEB J.*, 2006)。さらに, Bafilomycin A1感受性経路が CFTRの成熟化に必要であるとともに (*BBA Mol. Cell Res.*, 2006), phosphatidic acid代謝が小胞体から形質膜への CFTRの輸送に重要であることを示した (*BBA Mol. Cell Res.*, 2008b)。CFTRの関連分子として, 気道においてCFの病態を左右する上皮性 Na⁺チャネル(ENaC)の発現にも CRTが関与していることを明らかにした (*Exp. Cell Res.*, 2009)。さらに, 気道炎症・免疫という観点から TLRおよび Mucinの発現制御については Dr. Li (Rochester Univ.)等の海外研究者との国際共同研究を展開し多くの成果を上げてきた (*PNAS*, 2001, *J. Biol. Chem.*, 2002abc, 2003, 2005ab, 2006, *Mol. Cell Biol.* 2008 他, 多数)。

(2) FAP関連プロジェクト

FAPの原因タンパク質である

transthyretin (TTR)の主たる産生臓器は肝臓であることから唯一の治療的アプローチは肝移植であるが, 海外での移植が禁止 (2008年5月「イスタンブール宣言」となり, 新たな治療法が開発が緊急の課題としてより一層求められてきた。本研究グループは, 安東教授らと血漿中の TTR4量体を安定化し, アミロイド形成を抑制するための研究 (*FEBS Letters*, 2005, *Amyloid*, 2008)を行ってきたが, 海外ベンチャーが新たに見いだした4量体安定化薬は, 基礎データは良好でも, 実際に臨床試験に関わった臨床医の評価は極めて低いという。そこで, 本研究グループは独自に, 肝移植と同等の効果を有する変異 TTR産生抑制薬の開発が可能であるという新規の概念を提唱した (*EMBO J.*, 2007)。さらに, 関連の知見として, 変異 TTRの小胞体品質管理に BiPが特異的に関わることも明らかにした (*J. Biol. Chem.*, 2009)。さらなる展開として, 変異 TTR産生抑制薬の分子設計のために劇症型 FAPの変異 TTRの X線構造解析を行いつつ (*Biochemistry*, 2010), TTRを無毒性のタンパク質を凝集させ, アミロイド形成抑制活性を示す天然化合物も見だし, X線構造解析により変異 TTRにおける薬物結合部位も同定している (投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

あ

[雑誌論文](計19件)

1. Miyata M, Sato T, Mizuguchi M, Nakamura T, Ikemizu S, Nabeshima Y, Susuki S, Suwa Y, Morioka H, Ando Y, Suico MA, Shuto T, Koga T, Yamagata Y, and Kai H. Role of the glutamic acid 54 residue in transthyretin stability and thyroxine binding. *Biochemistry* 49: 114-23 (2010). 査読有
2. Kondo, T., Sasaki, K., Adachi, H., Nakayama, Y., Hatemura, M., Matsuyama, R., Tsuruzoe, K., Furukawa, N., Motoshima, H., Morino, S., Yamashita Y., Miyamura N., Kai H, Araki E. Heat shock treatment with mild electrical stimulation safely reduced inflammatory markers in healthy male subjects. *Obesity Research & Clinical Practice* 4, e101-e109 (2010) 査読有
3. Manabu Taura, R. Fukuda, Mary Ann Suico,

- Ayaka Eguma, Tomoaki Koga, Tsuyoshi Shuto, Takashi Sato, Saori Koga Morino and Hirofumi Kai, TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci.* in press (2010) 査読有
4. Mariko Oba, Mary Ann Suico, Saori Morino, Shuichiro Yano, Takashi Matsuno, Tomoaki Koga, Takashi Sato, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, Modified Mild Heat Shock Modality Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Surg. Res.* in press (2010) 査読有
 5. Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Ando Y, Kai H. The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J Biol Chem.* 284: 8312-8321 (2009) 査読有
 6. Takuya Sugahara, Tomoaki Koga, Keiko Ueno-Shuto, Tsuyoshi Shuto, Eriko Watanabe, Maekawa A., Kitamura K., Tomita K., Ai Mizuno, Takashi Sato, Mary Ann Suico, and Hirofumi Kai. Calreticulin positively regulates the expression and function of epithelial sodium channel. *Exp. Cell Res.* 315: 3294-300 (2009) 査読有
 7. Hirofumi Kai, Mary Ann Suico, Saori Morino, Tatsuya Kondo, Mariko Oba, Mikiko Noguchi, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, A novel combination of mild electrical stimulation and hyperthermia: general concepts and applications (review). *Int. J. Hyperthermia* 25, 655-660 (2009) 査読有
 8. Mary Ann Suico, Atsushi Tanaka, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, The expression of antimicrobial peptide lysozyme is increased by treatment with silver nanoparticle (Atomyball S®) in mammalian epithelial cells *J. Health Sci.* 55, 456-462 (2009) 査読有
 9. Yasuaki Hashimoto, Tsukasa Okiyoneda, Kazutsune Harada, Keiko Ueno, Takuya Sugahara, Atsushi Yamashita, Tsuyoshi Shuto, Mary Ann Suico, and Hirofumi Kai Phosphatidic acid metabolism regulate the intracellular trafficking and retrotranslocation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem. Biochim. Acta* (Mol. Cell Res.) 1783, 153-162 (2008) 査読有
 10. Susuki S., Ando Y., Sato T., Nishiyama M., Miyata M., Suico MA., Shuto T., Kai H., Multi-elemental analysis of serum and amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients. *Amyloid* (The Journal of Protein Folding Disorders) 15: 108-116, (2008) 査読有
 11. Oba M., Yano S., Shuto T., Suico M.A., Eguma A., and Kai H. Interferon-gamma down-regulated Hsp27 and enhances hyperthermia-induced tumor cell death in vitro and tumor suppression in vivo. *Int. J. Oncol.* 32:1317-1324(2008) 査読有
 12. Okiyoneda T., Niibori A., Harada K., Kohno T., Michalak M., Duszyk M., Wada I., Ikawa M., Shuto T., Suico M.A., Kai H. Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DF508 CFTR. *Biochem. Biochim. Acta* (Mol. Cell Res.) 1783: 1585-94 (2008) 査読有
 13. Takashi Furuta, Tsuyoshi Shuto, Shogo Shimasaki, Yuko Ohira, Mary Ann Suico, Dieter C Gruenert and Hirofumi Kai. DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Mol Biol.* 9: 39, (2008) 査読有
 14. Manabu Taura, Ayaka Eguma, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Tomoaki Koga, Kensei Komatsu, Takefumi Komune, Takashi Sato, Hideyuki Saya, Jian-Dong Li and Hirofumi Kai, p53 regulates TLR3 expression and function in human

- epithelial cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 28: 6557-67 (2008) 査読有
15. Saori Morino, Mary Ann Suico, Tatsuya Kondo, Erika Sekimoto, Shuichiro Yano, Tomoko Matsuda, Takashi Matsuno, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, and Hirofumi Kai. Mild Electrical Stimulation Increases Ubiquitinated Proteins and Hsp72 in A549 Cells via Attenuation of Proteasomal Degredation. *J Pharmacol Sci.* 108,222-226 (2008) 査読有
 16. Saori Morino, Tatsuya Kondo, Kazunari Sasaki, Hironori Adachi, Mary Ann Suico, Erika Sekimoto, Tomoko Matsuda, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, and Hirofumi Kai. Mild Electrical Stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. Increases Ubiquitinated Proteins and Hsp72 in A549 Cells via Attenuation of Proteasomal Degradation. *PLoS ONE* 3(12):e4068 (2008) 査読有
 17. Kazutsune Harada, Tsukasa Okiyonedo, Yasuaki Hashimoto, Kimiko Oyokawa, Kimitoshi Nakamura, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai. Curucumin enhances cystic fibrosis transmembrane regulator expression by down-regulating calreticulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 351-356 (2007) 査読有
 18. Takashi Sato, Seiko Susuki, Mary Ann Suico, Masanori Miyata, Yukio Ando, Mineyuki Mizuguchi, Makoto Takeuchi, Mizuki Dobashi, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai. Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J.* 26: 2501-2512 (2007) 査読有
 19. Tsuyoshi Shuto, Takashi Furuta, Judy Cheung, Dieter C. Gruenert, Yuko Ohira, Shogo Shimasaki, Mary Ann Suico, Keizo Sato, and Hirofumi Kai. Increased responsiveness to TLR2 and TLR4 ligands during dimethylsulfoxide-

induced neutrophil-like differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 31.1721-8 (2007) 査読有

[学会発表](計16件)

1. S. Morino: Combination of heat shock and mild electrical stimulation improves insulin resistance and visceral fat accumulation, The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine (2009.10.6-9) Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan
2. S. Shimasaki: Endoplasmic reticulum stress increases the expression of toll-like receptor-2 in epithelial cells, Cell Stress Society International 2009 (2009.10.6-9) Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan
3. T. Sato: The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP. Cell Stress Society International 2009 (2009.10.6-9) Gateaux Kingdom Sapporo Hotel & Spa Resort, Sapporo, Japan
4. T. Sato: The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES, From unfolded proteins in the endoplasmic reticulum to disease (2009.6.7-12) Vermont Academy, Vermont, USA
5. M. Miyata: The role of Glu54 in transthyretin for protein stability, thyroxine binding and secretion from the cells., FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES, From unfolded proteins in the endoplasmic reticulum to

- disease (2009.6.7-12) Vermont Academy, Vermont, USA
6. A. Eguma: p53 Regulates TLR3 Expression and Function in Human Epithelial Cell Lines, The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting (2008.12.13-7) Moscon convention center, San Francisco, USA
 7. Y. Ohira: Curcumin Inhibits Peptidoglycan-Mediated Inflammatory Response in Human Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells through Inhibition of TLR2 Gene, The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference(2008.10.23-25) Orland, Florida, USA
 8. S. Shimasaki: ER RETENTION OF CFTR IS CRUCIAL FOR SP1-DEPENDENT UP-REGULATION OF TLR2 EXPRESSION IN F508-CFTR-EXPRESSING CF BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS, The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference(2008.10.23-25) Orland, Florida, USA
 9. S. Mizunoe: INCREASED SCRATCHING BEHAVIOR AND SUSCEPTIBILITY TO DERMATITIS IN MITE-INFECTED F508 CFTR MICE, The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference(2008.10.23-25) Orland, Florida, USA
 10. S. Susuki: The endoplasmic reticulum retention and degradation of transthyretin are regulated by the molecular chaperone BiP in mammalian cells, VIIth International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Ist International Workshop on Hereditary Amyloidosis (2008.9.2-5) King 's College London, London,UK
 11. T. Sato: The role of coat protein complex II machinery on the secretion, endoplasmic reticulum retention and endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin, VIIth International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Ist International Workshop on Hereditary Amyloidosis (2008.9.2-5) King 's College London, London,UK
 12. M. Miyata: Glu54 mutations in transthyretin affect thyroxine binding and tetramer stability, resulting in aggressive familial amyloid polyneuropathy, VIIth International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Ist International Workshop on Hereditary Amyloidosis (2008.9.2-5) King 's College London, London,UK
 13. S. Mizunoe : Phosphatidic Acid Metabolism Regulates the Intracellular Trafficking of CFTR. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting (2007.12.01-5) Washington Convention Center, Washington, DC., USA
 14. M. Taura :The Expression of Myelid-1-like Factor (MEF/Elf4), an ETS Transcription Factor, Is Modulated by p53. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting (2007.12.01-5) Washington Convention Center, Washington, DC., USA
 15. M. Miyata :Investigation of the Mechanism of Severe Familial Amyloidotic Polyneuropathy. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting (2007.12.01-5) Washington Convention Center, Washington, DC., USA
 16. M. Oba :Interferon-gamma Enhances the Induction of Cell Death by Heat-shock and Cisplatin through Hsp27 Down-Regulation. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting (2007.12.01-5) Washington

Convention Center, Washington, DC.,
USA

〔その他〕

ホームページ <http://www.molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 広文 (KAI HIROFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：30194658

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

首藤 剛 (SHUTO YSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：80333524

(H19: 研究分担者)

スイコ・メリー・アン・ソテン

(SUICO MARY ANN SOTEN)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20363525

(H19: 研究分担者)