

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07086

研究課題名(和文) 遺伝性腎炎アルポート症候群の起因分子を標的とした治療薬開発のための分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis on drug development targeting causative molecules of genetic nephritis Alport syndrome

研究代表者

スイコ メリー・アン・ソテン (Suico, Mary Ann)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教

研究者番号：20363525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Alport症候群は、腎系球体基底膜を構成するⅣ型コラーゲンの遺伝子変異が原因で起こる難治性の遺伝性腎疾患である。本研究では、独自に開発した変異Ⅳ型コラーゲン(G1244D⁵(IV))の三量体形成・細胞外分泌を蛍光にて検出可能なHTSシステムを活用し、シクロフィリン結合性カルシニューリン抑制薬Cyclosporin Aおよびその類縁体Alisporivirが、単独でも用量依存的に変異Ⅳ型コラーゲン三量体の細胞外への輸送・分泌を促進することを明らかにした。本研究は、革新的な作用機序を有する難治性腎疾患Alport症候群の新規治療薬候補を初めて提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ASの治療は、他の慢性腎臓病と同様にRAS阻害剤による対症療法が行われるが、患者は、最終的に例外なく末期腎不全へ進行し、人工透析もしくは腎移植を余儀なくされることとなり、病気の発症機序に基づく直接的な治療法の開発が強く求められている。腎組織での原因タンパク質COL4A3/A4/A5の3量体形成と細胞外分泌を標的とした創薬が期待されており、我々は、世界で初めて、AS起因分子標的治療法となる化合物の候補として、CsAおよびALVを見出すことに成功した。これらが、真にIV型コラーゲン3量体形成・分泌促進作用を引き起こすものであることが明らかになれば、AS治療に新潮流になる。

研究成果の概要(英文)：Alport syndrome (AS) is an intractable kidney disease caused by genetic mutations in collagen type IV (COL4A3/COL4A4/COL4A5), a component of the renal glomerular basement membrane. Using this NanoLuc reporter, we performed high throughput screening (HTS) of original natural product extract library in Kumamoto University, and revealed that Cyclosporin A (CsA) and Alisporivir (ALV) promotes trimer secretion of mutant type IV collagen. Overall, this study provides a novel therapeutic candidate for AS with an innovative mechanism of action, and reveals an aspect of the intracellular regulatory mechanism of type IV collagen that has remained largely unexplored.

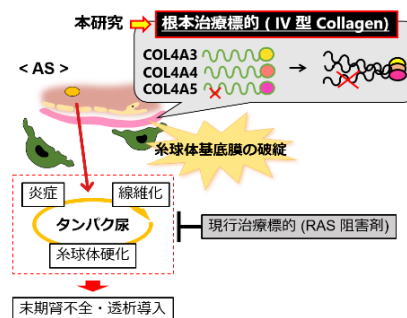
研究分野：医歯薬学

キーワード：アルポート症候群 Ⅳ型コラーゲン HTSスクリーニング アカデミア創薬

1. 研究開始当初の背景

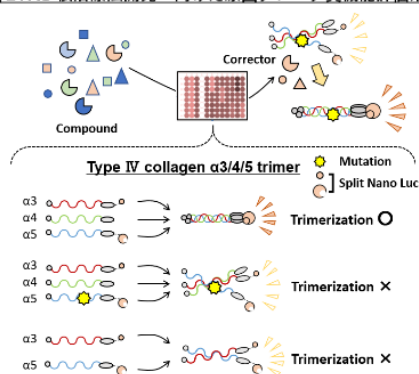
進行性遺伝性腎炎であるアルポート症候群 (AS) は、腎糸球体基底膜 (GBM) を構成する Type IV collagen (COL4A3/COL4A4/COL4A5 ; $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5(IV)$) の遺伝子変異により発症する (図1). 小児で発症し、重症例では 10 代後半から 20 代で末期腎不全への移行を余儀なくされることから、厚生労働省の指定難病にも登録される重篤な疾患である。これまで、レニンアンジオテンシン系 (RAS) 障害による腎支持療法のみが行われているが、現在の治療では末期腎不全への移行を阻止できない (Gross, et al., *Kidney Int.*, 2012).

図1. アルポート症候群の病態形成機構と本研究の治療標的



AS 原因タンパク質の Type IV collagen は、 $\alpha 3/4/5$ 三本の鎖がヘテロ三量体を形成し、細胞外へと分泌されることで腎糸球体基底膜 (GBM) を形成する。これまで臨床研究において COL4A5 ($\alpha 5(IV)$) が GBM に僅かなりとも存在する場合は軽症であること (Hashimura, et al., *Kidney Int.* 2014), 基礎研究において COL4A3 ($\alpha 3(IV)$) 欠損マウスの生後に COL4A3 を発現誘導させると病態が改善すること (Lin X, et al., *J Am Soc Nephrol.* 2014) が明らかにされている。このような研究状況から、申請者は AS の原因タンパク質である $\alpha 345(IV)$ の三量体形成・分泌の改善が AS の根治療法になり得ると考えた。そこで申請者らは、Split Nano Luciferase によるタンパク質間相互作用検出法を用いて、HTSスクリーニング可能な $\alpha 345(IV)$ 三量体形成評価系を構築した。これは $\alpha 3$, $\alpha 5$ のそれぞれにルシフェラーゼ断片 (sNanoLucシステム) を付加することによって、 $\alpha 3/4/5(IV)$ 三量体形成条件下でのみ高感度に発光を検出できるというものである (図2) (特願 2017-99497) (Omachi, et al., *Cell Chemical Biology*, 2018: 同号 Preview で紹介).

図2. AS 根治療法開発に向けた原因タンパク質機能評価系



このような背景の中、我々は $\alpha 3/4/5(IV)$ 三量体評価系の $\alpha 5(IV)$ 鎖に G1244D 変異を導入し安定発現させた細胞株において、本学で独自に収集した約 7,000 種類の天然物エキストラライブラリー (文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成事業) を用いたスクリーニングを行い、三量体形成・分泌を改善させる化合物の探索を行ったところ、Cyclosporin A (CsA) を同定した。CsA は、作用機序がユニークで、臨床で汎用される薬物の一つであるが、一方、腎毒性を示すため AS 治療薬への応用は不可能であると想定される。

2. 研究の目的

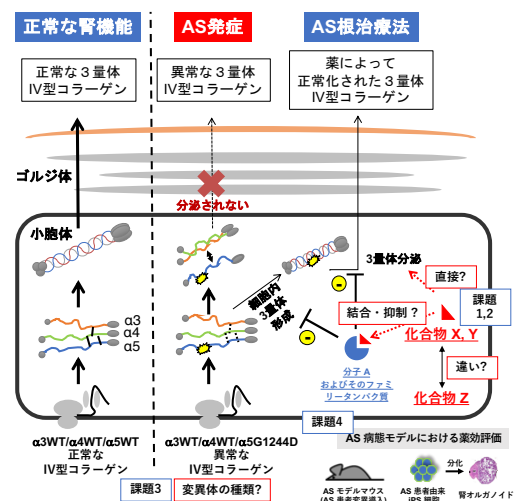
本研究では、AS の根治療法薬の開発を究極の目的とし、Cyclosporin A (CsA) または低腎毒性の各種誘導体に着目し、これらの化合物の作用機序を詳細に解明し、見出した関連因子に着目したアカデミア創薬のための分子基盤を確立することを目標とし、下記課題に対応した実験を展開することとした (図3).

課題1：Cyclosporin A (CsA)よりも低腎毒性の誘導体にも、三量体形成・分泌を改善させることが可能であるか？

課題2：CsAまたは低腎毒性のCsA各種誘導体が三量体形成・分泌を改善させるメカニズムは何か？標的タンパク質は存在するのか？

課題3：CsAまたは低腎毒性のCsA各種誘導体は、どのような変異体コラーゲンの三量体形成・分泌を改善させることができるのか？

図3. AS 根治療法開発に向けた新規治療標的



3. 研究の方法

(1) CsAよりも低腎毒性の化合物 Alispolivir (ALV) の三量体形成・分泌に関する検討

予備検討から、CsAよりも低腎毒性のAlispolivir (ALV) にも、三量体形成・分泌促進作用が認められている。本研究では、ALVの作用プロファイルをsNanoLuc評価系にて詳細に検討した。

(2) CsAまたはALVの三量体形成・分泌改善メカニズムの解明

予備検討により、CsAまたはALVに共通する作用標的であるタンパク質ファミリーのノックダウンを行ったところ、CyclophilinF (CypF) のノックダウンにより三量体形成・分泌が劇的に促進し、CsAまたはALVと併用することでその効果が増強されることを明らかにした。CypFこれまでに研究報告が少ないタンパク質であり、 $\alpha 3/4/5(IV)$ 三量体形成・分泌における詳細な役割の解明を行うことで画期的な AS 根治療法の開発が期待されることから、CypFの関与に関しての検証を行った。

(3) CsAまたはALVが作用しうるコラーゲン変異体の同定

ASを引き起こすことで知られるType IV collagenの変異体は数多く存在する。臨床報告のある $\alpha 3/4/5(IV)$ それぞれの変異体約50種類以上に対して、CsAまたはALVが効果を発揮する変異体の絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) AS治療薬候補化合物CsAまたはALVの変異 $\alpha 345(IV)$ 三量体分泌促進への影響

CsA は免疫抑制剤として広く知られ、Cyclophilin (Cyp) と Calcineurin (Cn) を作用標的としている。そこで CsA による変異 $\alpha 345(IV)$ 三量体分泌促進作用がどちらの標的を介したものであるかを明らかにすべく、Cyp, Cn に対して異なる結合能を持つCsA 誘導体 2 種 (Alisporivir : Cyp へのみ結合, Valspodar : Cyp, Cn どちらにも結合しない)とCyp には結合せず、FKBP, Cnを作用標的とする免疫抑制剤である Tacrolimus (FK506) を用いて変異 $\alpha 345(IV)$ 三量体分泌アッセイを行った。その結果、FK506と Valspodar では変異 $\alpha 345(IV)$ 分泌促進作用は確認されず、Alisporivir (ALV) を処理した場合に CsA と同じく、用量依存的な変異 $\alpha 345(IV)$ 三量体分泌促進作用が確認された。このことから、CsA及びALVの三量体分泌促進作用には共通の作用標的であるCypが関与することが示唆された。

(2) AS治療薬候補化合物CsAまたはALVの変異 $\alpha 345(IV)$ 三量体分泌促進に関わる仲介分子の同定

Cyp はPeptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (PPIase) 活性を持ち, CsA と結合するタンパク質ファミリーとして同定され, ヒトでは15種類ほどが報告されている. そこでCsA と結合することが報告されているCyp ファミリー 11 種類に対してsiRNAによる遺伝子Knock down (K.D.) を行い, その後CsA, ALV を処理し変異 α 345(IV) 三量体分泌促進作用がどのように変化するか検討した. その結果それぞれのCyp K.D. 単独で変異三量体の分泌が変化した, 中でもCypF のノックダウンで三量体分泌が顕著に増加した. さらにCsA, ALV を処理すると, CypF K.D. でのみ追加の三量体分泌促進作用は観察されなかった. このことからCsA及びALVの変異三量体分泌促進作用は主にCypFを介したものであることが示唆された. そこでCypF の過剰発現 (O/E) 並びに CsA及びALVの処理を行い, 三量体分泌アッセイを行った. その結果CypF 過剰発現により変異 α 345(IV) 三量体の細胞外分泌が阻害され, CsA, ALV の三量体分泌促進作用が減弱することが確認された.

(3) AS治療薬候補化合物CsAまたはALVが作用しうるコラーゲン変異体の同定

複数の変異IV型コラーゲン (変異 α 5(IV)) を用いた網羅的遺伝子標的解析の結果から, CsAおよびALVは広範な遺伝子変異に対して効果を示すことを明らかにした.

以上よりCsA及びALVはCypFの阻害を介して変異 α 345(IV) 三量体の分泌を促進することが示唆された. 本研究は, 革新的な作用機序を有する難治性腎疾患Alport症候群の新規治療薬候補を提示するだけでなく, これまでほとんど明らかにされていないIV型コラーゲンの細胞内制御機構の一端を明らかにするものである.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kondo Tatsuya, Miyakawa Nobukazu, Kitano Sayaka, Watanabe Takuro, Goto Rieko, Suico Mary Ann, Sato Miki, Takaki Yuki, Sakaguchi Masaji, Igata Motoyuki, Kawashima Junji, Motoshima Hiroyuki, Matsumura Takeshi, Kai Hirofumi, Araki Eiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Activation of heat shock response improves biomarkers of NAFLD in patients with metabolic diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Connections	6. 最初と最後の頁 521 ~ 533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EC-21-0084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaseda Shota, Sannomiya Yuya, Horizon Jun, Kuwazuru Jun, Suico Mary Ann, Ogi Sayaka, Sasaki Ryoko, Sunamoto Hidetoshi, Fukiya Hirohiko, Nishiyama Hayato, Kamura Misato, Niinou Saki, Koyama Yuimi, Nara Futoshi, Shuto Tsuyoshi, Onuma Kazuhiro, Kai Hirofumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel Keap1-Nrf2 Protein-protein interaction inhibitor UBE-1099 Ameliorates Progressive Phenotype in Alport Syndrome mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0004572021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omachi Kohei, Kaseda Shota, Yokota Tsubasa, Kamura Misato, Teramoto Keisuke, Kuwazuru Jun, Kojima Haruka, Nohara Hirofumi, Koyama Kosuke, Ohtsuki Sumio, Misumi Shogo, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Li Jian-Dong, Shuto Tsuyoshi, Suico Mary Ann, Miner Jeffrey H., Kai Hirofumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Metformin ameliorates the severity of experimental Alport syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86109-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sannomiya Yuya, Kaseda Shota, Kamura Misato, Yamamoto Hiroshi, Yamada Hiroyuki, Inamoto Masataka, Kuwazuru Jun, Niino Saki, Shuto Tsuyoshi, Suico Mary Ann, Kai Hirofumi	4. 巻 43
2. 論文標題 The role of discoidin domain receptor 2 in the renal dysfunction of alport syndrome mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Renal Failure	6. 最初と最後の頁 510 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/0886022X.2021.1896548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuwazuru Jun, Suico Mary Ann, Omachi Kohei, Kojima Haruka, Kamura Misato, Kaseda Shota, Kawahara Teppei, Hitora Yuki, Kato Hikaru, Tsukamoto Sachiko, Wada Mikiyo, Asano Toshifumi, Kotani Shunsuke, Nakajima Makoto, Misumi Shogo, Sannomiya Yuya, Horizono Jun, Koyama Yuimi, Owaki Aimi, Shuto Tsuyoshi, Kai Hirofumi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 CyclosporinA derivative as therapeutic candidate for Alport syndrome by inducing mutant type IV collagen secretion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0000000000000134	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堀園 潤、加世田 将大、三宮 裕也、桑水流 淳、小木 彩矢佳、佐々木 亮子、砂本 秀利、吹屋 洋彦、西山 勇人、嘉村 美里、新納 咲紀、小山 結実、Mary Ann Suico、奈良 太、首藤 剛、大沼 和弘、甲斐 広文
2. 発表標題 遺伝性糸球体腎炎 Alport 症候群モデルマウスに対する可逆的 Keap1 阻害剤の腎保護効果
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会 九州部会 オンライン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀園 潤、加世田 将大、三宮 裕也、桑水流 淳、小木 彩矢佳、佐々木 亮子、砂本 秀利、吹屋 洋彦、西山 勇人、嘉村 美里、新納 咲紀、小山 結実、Mary Ann Suico、奈良 太、首藤 剛、大沼 和弘、甲斐 広文
2. 発表標題 遺伝性糸球体腎炎 Alport 症候群モデルマウスに対する可逆的 Keap1 阻害剤の腎保護効果
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会 オンライン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加世田 将大、三宮 裕也、堀園 潤、桑水流 淳、Mary Ann Suico、小木 彩矢佳、佐々木 亮子、砂本 秀利、吹屋 洋彦、西山 勇人、嘉村 美里、奈良 太、首藤 剛、大沼 和弘、甲斐 広文
2. 発表標題 糸球体障害を呈する慢性腎臓病モデルマウスに対する Keep1-Nrf2 タンパク質間相互作用阻害薬の有効性
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宮 裕也、加世田 将大、嘉村 美里、桑水流 淳、Suico Mary Ann、首藤 剛、甲斐 広文
2. 発表標題 遺伝性腎疾患Alport症候群におけるコラーゲン受容体DDR2の阻害による腎病態への影響についての基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会 オンライン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Sannomiya, Shota Kaseda, Misato Kamura, Jun Kuwazuru, Saki, Niino, Tsuyoshi Shuto, Mary Ann Suico, Hirofumi Kai
2. 発表標題 The role of discoidin domain receptor 2 in the renal dysfunction of Alport syndrome mouse model
3. 学会等名 The 23rd Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology Online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑水流 淳、加世田 将大、三宮 裕也、新納 咲紀、堀園 潤、小山 結実、Marry Ann Suico、首藤 剛、甲斐 広文
2. 発表標題 遺伝性腎疾患Alport症候群の原因タンパク質を標的とした新規治療薬候補の同定及び薬効解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会 オンライン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑水流 淳、加世田 将大、三宮 裕也、新納 咲紀、堀園 潤、小山 結実、Marry Ann Suico、首藤 剛、甲斐 広文
2. 発表標題 遺伝性腎疾患Alport症候群に対する新規作用機序を有する薬物の同定及び薬効解析
3. 学会等名 第73回 日本薬理学会西南部会 オンライン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 首藤 剛、Marry Ann Suico、Devkota Anjana、小澤 享子、三隅 将吾、岸本 直樹、河原 哲平、人羅 勇気、塚本 佐知子、甲斐 広文、菊池 正彦
2. 発表標題 アンメットメディカルニーズの高い難治性疾患への挑戦 - ミッションに基づくアカデミア天然物創薬
3. 学会等名 第73回 日本薬理学会西南部会 オンライン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑水流 淳、加世田 将大、三宮 裕也、新納 咲紀、堀園 潤、小山 結実、Mary Ann Suico、首藤 剛、甲斐 広文
2. 発表標題 変異型コラーゲンの輸送・分泌を促進する遺伝性腎疾患Alport症候群の新規治療薬
3. 学会等名 第15回 トランスポーター研究会年会 オンライン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑水流 淳、加世田 将大、三宮 裕也、堀園 潤、津波古 遥希、小山 結実、尾脇 あいみ、佐藤 諒一、白神 正博、Mary Ann Suico、首藤 剛、甲斐 広文1
2. 発表標題 NanoLuciferase 技術を用いた HTS 評価系による新規 Alport 症候群治療薬候補化合物の同定
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 難治性遺伝性腎疾患アルポート症候群の根治療法のための薬剤	発明者 甲斐,首藤,マリ-ア,塚本,三隅,河原,人羅,加藤,小谷,荒木	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/034538	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------