

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253012

研究課題名(和文) 遺伝性難病FAPに対する創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery for Familial amyloid polyneuropathy (FAP), an incurable hereditary disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランスサイレチン(TTR)アミロイドーシスは、四量体血清タンパク質であるTTRの正常体もしくは変異体が細胞外に分泌された後にアミロイド線維を形成し、体内の様々な部位に沈着する疾患である。本研究では、TTR安定化化合物の探索および変異型TTRの不安定化薬(アミロイド線維の伸長阻害または溶解促進薬、TTRタンパク質の細胞外分泌を抑制する化合物)の探索を目的に、ハイスループットスクリーニング(HTS)による化合物の選別と細胞評価系による効果の検討を行った。その結果、TTR四量体安定化薬13種類、および、TTRアミロイド溶解薬2種類、TTR分泌抑制薬1種類を新規に同定した。

研究成果の概要(英文)：Familial amyloid polyneuropathy (FAP) is one of the hereditary amyloidoses caused by a point mutation in the human plasma protein, transthyretin (TTR). Amyloid fibrils derived from TTR variants accumulate in peripheral nerves and visceral organs, leading to inflammation-associated failure of multiple organs. TTR variants are easily dissociated from tetramer to monomer, which is the first step to amyloidosis, due to the low energetic stability of TTR variant tetrameric structure in comparison with wild-type (WT) TTR. We aimed to determine novel drugs that could either stabilize extracellular TTR tetramer or inhibit TTR secretion from the cells by high-throughput screening (HTS). Here, Western blotting- and Thioflavin-based biochemical assays identified thirteen compounds that stabilize the TTR tetramer as well as two TTR amyloid-solubilizing agents, and one inhibitor of TTR secretion from the cells were identified in this study.

研究分野：薬理学

キーワード：化合物ライブラリースクリーニング 家族性アミロイドポリニューロパチー

## 1. 研究開始当初の背景

FAP は血清タンパク質である TTR の変異体 (100 種類以上報告) により形成されたアミロイド線維が神経を中心に全身諸臓器に沈着する遺伝性疾患であり、厚生労働省特定疾患にも指定される重篤な疾患である。現在、FAP の有効な治療法は肝臓移植のみであり、深刻なドナー不足や患者の精神的、肉体的負担の大きさからも、移植に頼らない新規治療法の開発が急務とされる。さらに、FAP 患者数は国内においては約 1000 人 (厚生労働省登録数)、世界では約 1 万人とされているが、患者調査の行われていない国も未だ多く存在しており (中国、アフリカ、中東、ロシア等)、今後の FAP 研究の発展は世界規模で望まれることが予想される。

これまでの FAP 治療薬開発は、原因タンパク質である変異 TTR の細胞外でのアミロイド線維形成の抑制を目的として展開されてきた。現在では、Tafamidis (Dr. Kelly らが新規開発) や diflunisal (既存の NSAIDs) が臨床応用、臨床試験に至っている。しかし、Tafamidis は一部の限られた患者にのみ有用な治療薬であり、汎用性に欠けることが課題とされる。さらに申請者は、実際に臨床試験が行われている diflunisal の作用が変異体タイプにより異なり、無効な変異体も存在することなどを明らかにしている (EMBO J. 2007)。このような現状から、新たな治療アプローチの展開が国内外の研究動向となりつつあり、近年、熊本県にて開催された「国際アミロイドーシス学会、国際トランスサイレチン学会 (申請者も組織委員)」においては、TTR 遺伝子に対するアンチセンス核酸による遺伝子治療が、肝臓からの TTR 発現を月 1 回の投与で劇的に抑制することが報告され、注目を集めていた。しかし、実際の臨床応用には課題が多く残されている。ゆえに、これまでの治療法と最新の研究動向を踏まえた上でも、既存の治療法にとらわれない新たな治療アプローチの開発が必要である。

申請者が研究拠点とする熊本県は、世界的にも大きなフォーカスを有することから、申請者らは、地域に根ざした大学研究を世界に発信することで FAP 基礎研究に貢献し、国際的にも高い評価を受けてきた。その一つとして、既存の治療アプローチにとらわれない新規治療法の開発を究極の目的とし、約 20 種類以上の変異 TTR を用いた細胞内での TTR 分泌・分解の制御機構および創薬標的の同定に成功し、以下の研究成果を得ている。

野生型 TTR は四量体、単量体ともに細胞外へ分泌されるが、変異 TTR は四量体のみ細胞外へ分泌され、アミロイド原性

を示す、全ての変異 TTR は小胞体内で単量体化すると分泌されない (EMBO J. 2007)

細胞外に分泌されず小胞体内に局在された単量体の変異 TTR (本来非糖鎖付加タンパク質) は、既知の小胞体関連分解 (ERAD) により分解・除去される。さらに、細胞は、既知の分解経路が飽和あるいは障害を受けた場合でも、ミスフォールド状態の TTR を翻訳後に N 型糖鎖修飾することにより、新たな分解経路を介して、異常タンパク質を効率的に排除する機構を有している。(Mol. Cell. 2012 表紙掲載)

分解機構の促進という観点から変異 TTR の ERAD 経路における分子メカニズムの解明を行い、小胞体分子シャペロンである BiP が TTR の ERAD を負に制御する。(J. Biol. Chem. 2009) さらに、実際の創薬を意識した X 線構造解析や FAP 患者由来の臨床サンプルを用いた検討を行い、以下の研究成果を得ている。

劇症型変異 TTR の X 線構造解析を行い、劇症化に関わる分子メカニズムを解明。(Biochemistry 2010)

細胞外で TTR の構造安定化およびアミロイド形成抑制作用を示す化合物の作用様式を X 線構造解析により解明。(Biochemistry 2010)

FAP 患者由来のアミロイド組織並びに血液中の微量元素分析を ICP-MS を用いて実施し、アミロイドに結合する元素、患者血液で減少する元素を同定。(Amyloid 2008)

3 価クロムイオンがアミロイド形成に影響する元素である可能性を示唆。(FEBS L. 2007)

## 2. 研究の目的

本研究では、既存の安定化薬の問題点を打破する新たな TTR 安定化化合物の探索および変異型 TTR の不安定化薬 (アミロイド線維の伸長阻害または溶解促進薬、TTR タンパク質の細胞外分泌を抑制する化合物) の探索が、FAP 新規治療薬候補となると考え、TTR 四量体形成に影響を与える化合物の網羅的な抽出を行い、FAP 新規治療薬候補化合物を探索・同定を行う。

## 3. 研究の方法

3-1. バーチャルスクリーニング (VS) を用

いた TTR 四量体形成に影響を与える化合物の探索

TTR の中性子モデルに基づく創薬インフォマティクス基盤を活かし、TTR の四量体形成に影響する化合物の探索を行った。リード化合物探索のアプローチとして、まず、1 次スクリーニングでは、コンピュータシミュレーションを用いた独自のドッキング計算による In silico スクリーニングを行ってヒット化合物を抽出した。続いて、2 次スクリーニングでは、細胞評価系において各ヒット化合物の TTR 分泌への影響を検討した。

3-2 .ハイスループットスクリーニング (HTS) を用いた TTR に影響を与える化合物の探索

3-2-1 . 1 次スクリーニング系の構築

単量体・四量体をモニターできるハイスループットスクリーニング (HTS) を行うために、cell free の in vitro 評価系として、recombinant V30M TTR タンパク質 (世界の FAP 患者で最も多い変異型) を用いた 384 well-base の評価方法、8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) binding assay の確立を試みた。ANS は、単独では、励起波長 380 nm において発光極大 520 nm の蛍光を呈するが、タンパク質の疎水基及び無極性の部位に結合すると、発光極大 460 nm の青色蛍光を示す蛍光試薬である。ANS は、TTR の疎水性領域である T4 結合部位に結合することが知られているため、本研究では、ANS の四量体と単量体結合時の蛍光波長の違いをモニタリングすることで簡便かつ迅速な TTR 四量体へ影響を与える化合物を評価できるのではないかと考え、種々の検討を行った。

3-2-2 . 1 次スクリーニングによる候補化合物の抽出

TTR の四量体形成阻害剤を探索するために、本試験では、東京大学創薬オープンイノベーションセンター (OCDD) から購入した化合物ライブラリー、Core Library 9600 および LOPAC 1280 (Sigma-Aldrich) を用いた。Core Library 9600 は、本来 500 万種類以上もの化合物が、生物活性が期待される化合物空間や忌避構造によるフィルタリング、物性値と部分構造によるクラスタリングにより数千から数万種類にまで濃縮されたものであり、製薬企業に比べ研究資金の調整が厳しいアカデミア創薬からの画期的な新薬創出のために創られた大変ユニークなライブラリーである。LOPAC 1280 は、薬理活性が既知の化合物を収集したもので、半数阻害濃度や致死濃度が解明されたものも多く含まれるライブラリーである。

3-3 . LOPAC 1280 より抽出した候補化合物に

対する 2 次スクリーニング

本研究では、構造式が既知であった化合物ライブラリー (LOPAC 1280) を用いたハイスループットスクリーニング (HTS) を行い、ヒット化合物 20 種類を得た。本研究では、その中で入手可能であった 19 種類の化合物について、アミロイド形成に与える影響について Thioflavin-T (ThT) Assay を行い、また、TTR 安定化作用の有無について、SDS-PAGE を用いて解析し、さらに、アミロイド線維の伸長阻害、または溶解促進作用の有無について、改変 ThT Assay (予め形成させた TTR アミロイドに対する ThT Assay) で評価した。さらに、TTR の細胞外分泌を抑制する候補化合物を見出すため、細胞系を用いた TTR 発現系に対する化合物の影響についても検討した。

4 . 研究成果

4-1 . VS を用いた TTR 四量体形成に影響を与える化合物の探索

VS で見出した候補化合物の中から、TTR 四量体安定化作用を有する 6-benzoyl-2-hydroxy-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (L6) を発見した。L6 は、Thioflavin-T による in vitro アミロイド形成も、既存の四量体安定化薬 Diflunisal の作用と同様に有意に抑制した。また、SDS-PAGE 解析より、L6 は、それ単独で、四量体安定化作用を有するのみならず、Diflunisal との共処理で、その四量体安定化作用を相加的に亢進した。さらに、ANS 競合実験および X 線構造解析の結果、L6 は TTR の T4 ポケットに結合して TTR の安定化に寄与することが示された (Yokoyama, T., et al., *J. Pharmacol. Sci.*, 2015)。

4-2 . HTS を用いた TTR に影響を与える化合物の探索

まず、ANS の最適濃度と反応持続時間および 384 well plate において測定可能な条件検討を行った。その結果、健常人の血中 TTR 濃度に近い 0.2 mg/mL (四量体で計算すると約 3.65  $\mu$ M) の recombinant V30M TTR を 25 定温下で、46 時間あらかじめ化合物と反応させ、測定直前 (2 時間~) に ANS を 40  $\mu$ M の濃度で添加し、Infinite® M1000 PRO microplate reader (TECAN) を用いて、励起波長 380 nm、蛍光波長 400-600 nm、スリット幅を、励起側 10 nm、蛍光側 20 nm で設定し、蛍光強度を測定する条件が最適であることを確認した。そこで、次に、本条件を用いて、自動分注・洗浄システムである Biomek NXP

(BECKMAN COULTER), Multidrop Combi (Thermo Scientific) と組み合わせ, 384 well plate を用いた well 間誤差の測定 (validation) を行った. ここでは, 100% control 群 (対象となる化合物を含まないサンプル) を, 0% control 群 (100% control 群から recombinant V30M TTR を除いたサンプル) を, 実際の HTS で使用する 384 well plate に分注し, 各 control 群の測定値を元に HTS 評価系確立に重要な指標, coefficient of variation (CV 値), signal-background ratio (S/B 比), signal-noise ratio (S/N 比), Z' factor を計算した. 検討の結果, heat map では顕著なバラつきは見られず, 評価指標の値に関しても, CV 値 (10%以内が推奨) が, 0% control で 7.403%, 100% control で 4.021%, S/B 比 (3 以上が推奨) は 7.715, S/N 比は 90.697, Z' factor (0.5 以上が推奨) は 0.828 と非常に良好な結果が得られた. 以上の結果より, 分注機器および測定機器を含めた本 HTS 評価系の validation により, 1 次スクリーニング評価系の構築が完了した.

次に, Core Library 9600 および LOPAC 1280 を用いて, 上記の確立した条件にて 1 次スクリーニングを行ったところ, 30%以上の抑制率を示した化合物をヒット化合物とした時, Core Library 9600 より 168 種類の化合物が抽出され, LOPAC 1280 より 20 種類の化合物が抽出された.

#### 4-3. LOPAC 1280 より抽出した候補化合物に対する 2 次スクリーニング

ヒット化合物 20 種類の中で, 入手可能であった 19 種類の化合物について, まず, 各化合物が TTR アミロイド形成に与える影響について ThT Assay により検討した. その結果, 14 種類の化合物が, アミロイド形成を有意に抑制した. 次に, この抑制効果が, (i) 化合物が TTR の四量体を安定化したことに起因するのか, (ii) 化合物がアミロイドに直接作用し, アミロイド線維の伸長阻害, または溶解を促進したことに起因するのかについて明らかにするため種々の検討を行った.

まず, (i) の観点を明らかにするために, 化合物同時添加後の TTR タンパク質の状態について SDS-PAGE を用いて解析した. その結果, 13 種類の化合物が TTR 四量体構造の安定化作用を有することが明らかになった.

次に, (ii) の観点を明らかにするために, 予め形成させた TTR アミロイドに対して各化合物を添加し, その後のアミロイド量の変動について ThT Assay で定量した. その結果, 2 種類の化合物が, TTR アミロイド量を減少

させ, アミロイド溶解作用を有することが示唆された.

最後に, TTR の細胞外分泌を抑制する候補化合物を探索したところ, 1 種類の化合物を見出した. 本化合物のメカニズムの詳細は不明であるが, 本化合物が NO ドナーであることと鑑みると, ER 内で TTR と選択的に結合する NO ドナーとして作用し, TTR の構造変化を引き起こし, 結果として, TTR 四量体形成を阻害し, その細胞外分泌を抑制することを想定している.

以上, 本研究は, TTR アミロイドーシスの新たな治療薬の候補として, TTR 四量体安定化薬 13 種類, および, TTR アミロイド溶解薬 2 種類, TTR 分泌抑制薬 1 種類を新規に同定した. 特に, TTR アミロイド溶解薬は世界的にもアミロイドブレイカーとして注目される可能性が極めて高い. 今後, これらの化合物について, その有用性について, さらに詳細な検討を実施する予定である.

#### 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)

[雑誌論文](計 9 件)

Yokoyama T, Takaki S, Chosa K, Sato T, Suico MA, Teranishi Y, Shuto T, Mizuguchi M, Kai H Structural stabilization of transthyretin by a new compound, 6-benzoyl-2-hydroxy-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione J Pharmacol Sci. 2015 Dec; 129(4): 240-243. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.006 査読あり

Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Fitrah PS, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, Nishitoh H. Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP. Cell Rep. 2015 Nov 3; 13(5):944-56. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.047. 査読あり

Koga T, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hino S, Nakao M, Kai H. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Induces Sirtuin 1 (SIRT1) Expression via the PI3K-Akt-GSK3 Signaling Pathway and Promotes Hepatocellular Injury. J Biol Chem. 2015 Dec 18; 290(51):30366-74. doi: 10.1074/jbc.M115.664169. 査読あり

Susuki-Miyata S, Miyata M, Lee BC, Xu H, Kai H, Yan C, Li JD. Cross-talk between

PKA-C and p65 mediates synergistic induction of PDE4B by roflumilast and NTHi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 7; 112(14):E1800-9. doi: 10.1073/pnas.1418716112. 査読あり

Miyata M, Lee JY, Susuki-Miyata S, Wang WY, Xu H, Kai K, Kobayashi KS, Flavell RA, Li JD. Glucocorticoids suppress inflammation via the upregulation of negative regulator IRAK-M. Nature Commun. 2015 Jan 14; 6:6062. doi:10.1038/ncomms7062 査読あり

Suzuki S, Shuto T, Sato T, Kaneko M, Takada T, Suico MA, Cyr DM, Suzuki H, Kai H Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. Sci Rep. 2014 Mar 3;4:4258. doi: 10.1038/srep04258. 査読あり

Suico MA, Fukuda R, Miyakita R, Koyama K, Taura M, Shuto T, Kai H. The transcription factor MEF/Elf4 is dually modulated by p53-MDM2 axis and MEF-MDM2 autoregulatory mechanism. J Biol Chem. 2014 Sep 19;289(38):26143-54. doi: 10.1074/jbc.M114.580209. 査読あり

Komatsu K, Lee J, Miyata M, Lim J.H, Jono H, Koga T, Xu H, Yan C, Kai H, Li J.D Inhibition of PDE4B suppresses inflammation by increasing expression of the deubiquitinase CYLD. Nat Commun. 2013;4:1684. doi: 10.1038/ncomms2674. 査読あり

Fukuda R, Suico MA, Koyama K, Omachi K, Kai Y, Matsuyama S, Mitsutake K, Taura M, Morino-Koga S, Shuto T, Kai H. Mild Electrical Stimulation at 0.1-ms Pulse Width Induces p53 Protein Phosphorylation and G2 Arrest in Human Epithelial Cells. J Biol Chem. 2013 May 31;288(22):16117-26. doi: 10.1074/jbc.M112.442442. 査読あり

#### [学会発表](計8件)

Molecular mechanism of the intracellular quality control of TTR by Hsp47

Y. Wakita, R. Yamakawa, K. Chosa, S. Takaki, Y. Teranishi, T. Sato, M.Suico, T. Shuto, H. Kai. 2015 ASCB annual meeting, 2015年12月12-16日, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

Hsp47によるTTRタンパク質の細胞内品質管理機構の解明

脇田有梨子, 山川瑠斐子, 帖佐圭佑, 高木舜, 寺西ゆり子, 佐藤卓史, SUICO Mary Ann, 首藤剛, 甲斐広文. 生体膜と薬物の相

互作用シンポジウム, 2015年11月19-20日, 熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)

バーチャルスクリーニングシステムを活用した, 家族性アミロイドポリニューロパチー原因タンパク質 TTR の四量体安定化薬の探索

高木舜, 帖佐圭佑, 横山武司, 佐藤卓史, SUICO Mary Ann, 寺西ゆり子, 首藤剛, 水口峰之, 甲斐広文. 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015年11月19-20日, 熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)

Screening of small compounds to develop endoplasmic reticulum-oriented drug for familial amyloid polyneuropathy.

K. Chosa, S. Takaki, R. Yamakawa, Y. Wakita, Y. Teranishi, T. Sato, T. Yokoyama, M. Mizuguchi, M. Suico, T. Shuto, H. Kai. 2014 ASCB annual meeting, 2014年12月6-10日, Pennsylvania Convention Center(Philadelphia, PA, USA)

Hsp47によるTTRタンパク質の細胞内品質管理機構の解明

脇田有梨子, 山川瑠斐子, 帖佐圭佑, 高木舜, 寺西ゆり子, 佐藤卓史, Mary Ann Suico, 首藤剛, 甲斐広文. BMB2015, 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

プロテインフォールディングに異常を有するヒト遺伝性疾患に対する創薬研究

首藤剛, 甲斐広文. 日本薬学会134年会, 2014年3月28-30日, 熊本大学(熊本県・熊本市)

小胞体品質管理機構を標的とした家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の新規治療薬開発

帖佐圭佑, 高木舜, 山川瑠斐子, 脇田有梨子, 寺西ゆり子, 佐藤卓史, 横山武司, 水口峰之, Mary Ann Suico, 首藤剛, 甲斐広文. 第37回日本分子生物学会年会2014年11月25-27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

バーチャルおよびハイスループットスクリーニングを用いた家族性アミロイドポリニューロパチーの新規治療薬の開発

帖佐圭佑, 高木舜, 脇田有梨子, 寺西ゆり子, 山川瑠斐子, 佐藤卓史, 横山武司, 水口峰之, Mary Ann Suico, 首藤剛, 甲斐広文. 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2014年11月15-16日, 熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)

The endoplasmic reticulum-oriented drug

development for familial amyloid polyneuropathy

K. Chosa, R. Yamakawa, T. Sato, T. Yokoyama, M. Mizuguchi, M. Suico, T. Shuto, H. Kai.  
2015 ASCB annual meeting , 2015 年 12 月 14-18 日, The New Orleans Ernest N. Morial Convention Center ( New Orleans, Louisiana, USA )

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molmed730.org/index.html>

## 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 ( 薬学系 )・教授

研究者番号 : 3 0 1 9 4 6 5 8

### (2)研究分担者

首藤 剛 ( SHUTO, Tsuyoshi )

熊本大学・大学院生命科学研究部 ( 薬学系 )・准教授

研究者番号 : 8 0 3 3 3 5 2 4

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 ( 薬学系 )・助教

研究者番号 : 2 0 3 6 3 5 2 5