

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15006

研究課題名(和文) アミロイドーシス根治を目指した従来にないマルチターゲット型新規治療薬の創製

研究課題名(英文) Development of novel multi-target drugs for 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 難治性アミロイドーシスの発症過程は、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、各ステップに対する単独作用で臨床的に有効な治療効果を示す治療薬の開発は困難を極めている。本研究では、トランスサイレチン遺伝子の変異により発症するFAPを対象に、樹状高分子化合物 dendrimer の多機能材料としての特性を活用して、上記の3つの治療標的を同時に抑制する新規マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬(GUG- -CDE)を創製し、その治療効果の検証を行った。

研究成果の概要(英文)： Intractable amyloidoses progress through 3 critical pathological processes, 1. Overproduction or mutation of amyloid precursor proteins, 2. Amyloid fibril formation caused by conformational change, 3. Tissue deposition of amyloid fibrils. However, as of this moment, no clinically effective therapy targeting each pathological process independently is available. In this research, we utilized characteristic features of polyamidoamine starburst dendrimer as a multifunctional material and developed novel multi-target drugs (GUG- -CDE) for FAP effectively suppressing 3 pathological process in parallel.

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 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

## 1. 研究開始当初の背景

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難治性の疾患群の総称であり、国の特定疾患に指定され、その予防・治療薬の開発は喫緊の社会的課題である。本疾患は、様々な要因(ストレス、老化、遺伝子変異など)によるタンパク質の立体構造変化が発症要因となることが知られているが、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という3つのステップを経て進行する。従来の創薬研究では、上記ステップを標的とした薬剤開発が行われてきたが、それぞれの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。

申請者はこれまで、上記ステップを標的とした治療薬開発研究の中で、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)を対象に、樹状高分子化合物デンドリマーがアミロイド線維の組織沈着阻害作用を有すること、環状オリゴ糖シクロデキストリン(CyD)誘導体(GUG-β-CyD)が包接特性によりアミロイド線維化を抑制すること(*J Control Release*, 2010、*Biochem J*, 2011、*J Drug Target*, 2013、2014、特願 2008-260965)等を報告してきた。これらの薬剤は単独でも一定の治療効果を示すが、申請者は、デンドリマーの高機能材料としての特性を活用し合成したCyD/デンドリマー結合体が、遺伝子キャリアとしての高い有用性を示し、siRNAにより原因タンパク質発現を抑制しうる可能性を見出した(*Mol Pharm*, 2012)。

本剤は、各薬剤が有するアミロイド線維化・組織沈着に対する抑制作用を保持しており、高機能性遺伝子キャリアとして原因タンパク質の産生抑制効果を併せ持つことが可能となれば、アミロイドーシス発症過程で鍵となる3つのステップを同時に阻害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として、従来にない治療戦略の構築に新たな道を切り開くことは間違いない。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬の新規治療薬としての有用性の検証を目的とし、GUG-β-CyD/デンドリマー結合体(GUG-β-CDE)を創製し、その治療効果(① 原因遺伝子の発現抑制効果、② アミロイド線維化抑制効果、アミロイド線維の組織沈着阻害効果)の評価、ならびに作用機序の解明を実施する。

## 3. 研究の方法

本研究期間中に、新規マルチターゲット型アミロイドーシス治療薬(GUG-β-CDE)の有用性を検証するため、FAPを対象疾患とし、アミロイドーシス発症過程の各ステップに対する以下の～の薬効評価・作用機序の解明を行う。

原因遺伝子発現抑制効果  
アミロイド線維化抑制作用  
アミロイド線維の組織沈着阻害作用

上記の薬効評価を実施するため、本申請では、豊富な薬効評価ツール(FAP患者由来iPS細胞、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評価により、GUG-β-CDEの治療薬としての可能性を検証し、アミロイドーシス発症過程の3ステップを同時に抑制しうる治療薬による従来にない新規治療コンセプトの証明(POC: proof of conceptの取得)を目指す。

## 4. 研究成果

原因遺伝子発現抑制効果

ヒト肝癌由来細胞株(HepG2)を用いた*in vitro*の実験系において、GUG-β-CDEがsiRNA-TTR(siTTR)導入によりFAPの原因タンパク質であるTTR遺伝子発現の約60%の著明な抑制効果を示し、遺伝子キャリアとして機能することを既に明らかとなった。そこで、*in vivo*の実験系におけるTTR産生抑制効果を検証するために、GUG-β-CDE/siTTR複合体含有溶液(siTTR 20 μg、チャージ比20)をマウスの尾静脈内投与48時間後、肝臓におけるTTR mRNA発現量をリアルタイムPCR法により定量したところ、統計的に有意差は認められないものの、GUG-β-CDE/siTTR複合体投与により約10~20%のTTR産生抑制効果が観察された。この結果より、GUG-β-CDEは、弱いながらも*in vivo*においてもTTR産生を抑制する可能性が示された。

静脈内投与後、siTTRが肝臓においてRNAi効果を示すには、血中で安定に存在し、細網内皮系への取り込みや腎排泄から免れ、肝シヌソイド間隙から肝実質細胞内に効率よく取り込まれる必要がある。本剤は、肝臓特異性を有していないため、siRNA複合体の肝組織移行性は十分ではなく、RNAi効果が弱かった可能性が考えられる。今後、GUG-β-CDEへのラクトースなどの肝実質細胞標的リガンドの導入、siRNA投与量の増大、化学修飾によるsiRNAの安定化および投与方法や投与回数の最適化など、キャリア以外の要因も考慮に入れた実験プロトコルを用いて更なる検討を行う必要がある。

## アミロイド線維化抑制作用

修飾官能基の置換度の異なる GUG- $\beta$ -CDE によるアミロイド線維形成抑制効果の評価を行ったところ、各種置換度の GUG- $\beta$ -CDEs によって、アミロイド抑制効果が異なっていることが明らかとなった。さらに、GUG- $\beta$ -CDE のアミロイド線維形成抑制効果は、高い持続性を持って(6 時間以上) dendrimer と同等の効果を示すことが確認された。

次に、GUG- $\beta$ -CDE のアミロイド線維形成メカニズムを評価するため、アミロイド線維形成過程における、GUG- $\beta$ -CDE 添加時の TTR の二次構造の評価を行った。GUG- $\beta$ -CDE もしくは dendrimer 単独添加時の TTR の円二色性 (CD) スペクトル解析の結果、GUG- $\beta$ -CDE は、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たことから、 $\beta$ -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ことが示唆された。また、そのスペクトル変化は dendrimer 添加系とほぼ同様であった。さらに、TTR のトリプトファン (Trp) 残基由来の蛍光スペクトルの測定を行ったところ、GUG- $\beta$ -CDE 添加による蛍光強度の変化はみられなかった。このことから、GUG- $\beta$ -CDE は TTR の Trp 残基周辺の構造に影響を及ぼさない可能性が示された。これらの結果から、GUG- $\beta$ -CDE は dendrimer 単独と同様の機序でアミロイド線維形成抑制効果を示すことが示唆された。

## アミロイド線維の組織沈着阻害作用

申請者らのグループが開発した FAP 疾患モデル動物 (ATTR V30M Tg ラット) は、TTR アミロイドの沈着が生後 12-15 ヶ月目から認められる。そこで、GUG- $\beta$ -CDE のアミロイド線維組織沈着阻害効果を検討するため、ATTR V30M Tg ラットに本剤を投与し、TTR 沈着の確認できる臓器 (結腸) を回収し、TTR の免疫染色を行い、非投与群の TTR アミロイド沈着との比較検討により、GUG- $\beta$ -CDE の治療効果の検証を実施した。

予防的治療効果の検証を目的とした、生後 9 か月から投与開始する (3 か月投与、尾静注、週 2 回投与) GUG- $\beta$ -CDE 投与実験の結果、GUG- $\beta$ -CDE の投与により結腸における TTR 沈着の有意な減少が確認された。また、GUG- $\beta$ -CDE の約 3 カ月の投与期間中、体重変化は認められず、各種血液生化学的パラメータ値 (AST、ALT、LDH、BUN、CRE など) はコントロール群と比べて有意な変化は認められないことから、長期投与における GUG- $\beta$ -CDE の安全性も治療効果と同様に確認されている。

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 シーズ・高機能分子 dendrimer 結合体 (GUG- $\beta$ -CDE) は、~ の結果で示された治療効果を全て併せ持ち、アミロイドーシス発症過程で重要な上述の 3 つのステップを同時に抑制しうる、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が示された。今後、実用化への取り組みとして、詳細な薬効メカニズムの解明、FAP 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) を経た POC の取得を目指す。研究成果に関しては、適宜特許を取得し、製剤化 (DDS の改善、安全性試験) などの課題を克服し、将来的な FAP 患者への臨床応用を図る。

## <引用文献>

- Arima H, Yamashita S, Mori Y, Hayashi Y, Motoyama K, Hattori K, Takeuchi T, Jono H, Ando Y, Hirayama F, Uekama K. In Vitro and In Vivo Gene Delivery Mediated by Lactosylated dendrimer/ $\alpha$ -CyD Conjugates (G2) into Hepatocytes. **J Control Release**, 146: 106-17, 2010
- Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki M, Ohshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y. Cyclodextrin, a novel therapeutic tool for suppressing amyloidogenic transthyretin misfolding in transthyretin-related amyloidosis. **Biochem J**, 437: 35-42, 2011
- Hayashi Y, Mori Y, Yamashita S, Motoyama K, Higashi T, Jono H, Ando Y, Arima H. Potential use of Lactosylated Dendrimer (G3)/ $\alpha$ -CyD conjugates as hepatocyte-specific siRNA carriers for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. **Mol Pharm**, 9: 1645-53, 2012.
- Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K, Mori Y, Jono H, Ando Y, Arima H. Design and evaluation of polyamidoamine dendrimer conjugate with PEG,  $\beta$ -cyclodextrin and lactose as a novel hepatocyte-selective gene carrier in vitro and in vivo. **J Drug Target**, 5, 487-96, 2013
- Anno T, Higashi T, Hayashi Y, Motoyama K, Jono H, Ando Y, Arima H. Potential use of glucuronylglucosyl- $\beta$ -cyclodextrin/dendrimer conjugate (G2) as a siRNA carrier for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. **J Drug Target**, 22, 883-90, 2014.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hosoi A, Su Y, Torikai M, Jono H, Ishikawa D, Soejima K, Higuchi H, Guo J, Ueda M, Suenaga G, Motokawa H, Ikeda T, Senju S, Nakashima T, Ando Y. Novel Antibody for the Treatment of Transthyretin Amyloidosis. **J Biol Chem.**, 査読有、291: 25096-25105, 2016

Jono H, Su Y, Obayashi K, Tanaka Y, Ishiguro A, Nishimura H, Shinriki S, Ueda M, Ikeda K, Yamagata K, Ichihara K, Ando Y; Scientific Committee for the Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry. Sources of variation of transthyretin in healthy subjects in East and Southeast Asia: Clinical and experimental evidence for the effect of alcohol on transthyretin metabolism. **Clin Chim Acta.** 査読有、458: 5-11, 2016

Kitagawa K, Misumi Y, Ueda M, Hayashi Y, Tasaki M, Obayashi K, Yamashita T, Jono H, Arima H, Ando Y. Inhibition of insulin amyloid fibril formation by cyclodextrins. **Amyloid.** 査読有、22, 181-6, 2015

Okumura K, Yamashita T, Masuda T, Misumi Y, Ueda A, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Yamashita S, Inomata Y, Ando Y. Long-term outcome of patients with hereditary transthyretin V30M amyloidosis with Polyneuropathy after liver transplantation. **Amyloid**, 査読有、13: 1-7, 2016

Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Okada T, Fujimoto T, Ogi Y, Kitagawa K, Tasaki M, Misumi Y, Oshima T, Jono H, Obayashi K, Hirakawa K, Uchida H, Westermarck P, Ando Y, Mizuta H Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis. **Modern Pathology**, 査読有、28, 201-7, 2015.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

城野博史、田崎雅義、安東由喜雄 シンポジウム：臨床化学の進歩が変える薬物治療、「質量分析法が変える難治性アミロイドーシスの治療戦略」日本薬学会第137年会(2017年3月24-27日、仙台)

城野博史、竹下うらん、大内健太、成田泰子、磯野香織、大矢雄希、猪股裕紀洋、安東由喜雄 「家族性アミロイドポリニューロパチー患者由来 iPS 細胞を用いた病態解および創薬スクリーニングの有用性」第56回日本臨床化学会年次学術集会(2016年12月2-4日、熊本)

城野博史 「アミロイドーシス根治を目指した革新的マルチターゲット型治療薬の創製」第4回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会(2016年10月31日、福岡)

Jono H, Anno T, Hayashi Y, Motoyama K, Ueda M, Obayashi K, Arima H, Ando Y 「Therapeutic effect of polyamidoamine dendrimer on transthyretin-related amyloidosis.」V International Symposium on Amyloidosis (2016/7/3-7, Uppsala, Sweden)

城野博史 「アミロイドーシス根治を目指した革新的マルチターゲット型治療薬の創製」第3回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会(2015年8月31日、福岡)

Jono H, Inoue M, Fujisawa K, Hayashi Y, Anno T, Motoyama K, Ando Y, Arima H 「Novel cyclodextrin-based therapeutic approaches for refractory Amyloidosis」8th Asian Cyclodextrin Conference and 32nd Cyclodextrin Symposium (2015/5/14-16, Kumamoto, Japan)

### 〔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：特願 2015-117150  
(PCT/JP2016/067373)  
出願年月日：2015年6月10日  
PCT出願日：2016年6月10日  
国内外の別：JST 外国出願支援に採択されており、現在(平成29度)対応中である

取得状況(計 0 件)

### 〔その他〕

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

## 6 . 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

有馬 英俊 ( ARIMA, Hidetoshi )  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：50260964

白木 伸明 ( SHIRAKI, Nobuaki )  
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授  
研究者番号：70448520

安東 由喜雄 ( SHIRAKI, Nobuaki )  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20253742

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

James Butler