

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08585

研究課題名(和文) 次世代心不全治療薬の開発：NFATc4サブタイプ選択的阻害剤の探索

研究課題名(英文) Screening for selective NFATc4 inhibitors to develop a drug of heart failure

研究代表者

熊谷 英敏 (Kumagai, Hidetoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20281008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規心不全治療薬の開発を目指し、アンジオテンシン受容体下流のシグナル伝達分子であるカルシニューリン調節性転写因子(NFAT: Nuclear factor of activated T cells)のNFATc4サブタイプ選択的阻害剤のスクリーニング系を樹立した。微生物由来の天然化合物(269種)および真菌(1270株)と放線菌(878株)の代謝産物をスクリーニングに供したところ、2株の真菌の代謝産物中にNFATc4選択的な阻害活性を見出した。今後、大量培養を行い、阻害活性物質を単離、同定する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の心不全の患者数は、100万人と推定されており、また、疫学研究によると患者数は2035年までさらに増加すると予測され、新たな治療法の実用化が急務となっている。心不全はNFATc4活性の亢進が、疾病の発症・進展に重要な分子機序と指摘されていることから、NFATc4の選択的阻害剤は、心不全の新たな薬物療法の開発候補と期待される。本研究課題は、新たにNFATサブタイプの活性を分別定量可能な培養動物細胞株を見出したことで、化合物ライブラリーからNFATc4選択的阻害剤の迅速スクリーニング方法を樹立し、新たな薬物療法開発に繋がる化合物を同定することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Our purpose of this study is to identify a selective inhibitor of NFATc4 subtype for the drug development of heart failure. We established a new screening system consisting of a human cell line that requires exogenous Nuclear factor of activated T cells (NFAT) subtypes expression under the angiotensin receptor signaling. By using this new screening system, we tested 269 natural compounds, which are microbial origin, 1270 fungus, and 878 actinomyces metabolites. As a result, we found two fungus metabolites producing selective NFATc4 inhibitory activities then, isolating and identifying the inhibitory activities through large scale cultivation.

研究分野：創薬科学

キーワード：NFAT 選択的阻害剤 ハイスループットスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会が持続している我が国では、心不全死は今後も 2035 年まで毎年増加傾向であることが指摘されている。しかしながら、未だに効果的な薬物療法は見出されておらず、新たな治療薬の開発が喫急に望まれている。心臓のアンギオテンシン II (AngII)-アンギオテンシタイプ 1 (AT1) 受容体下流で遺伝子発現応答の決定的な役割を果たすカルシニューリン調節性転写因子 Nuclear factor of activated T cells (NFAT)c4 サブタイプは、持続的な活性化により心肥大を惹起し、その後心不全に進展することから、NFATc4 は心不全治療薬の有力な標的候補分子と考えられた。実際、NFAT を阻害する免疫抑制剤であるタクロリムスを心不全モデルマウスに投与すると治療効果が得られることが示されている。しかしながら、これまでに開発されている NFAT 阻害剤は、カルシニューリンを介して作用を発揮するため、NFAT サブタイプを非選択的に阻害する薬物のみである。そこで、NFAT と直接相互作用することで阻害活性を発揮する化合物が見出されれば、NFAT サブタイプに選択性を有する薬剤が開発され、それにより副作用の低減された革新的な心不全治療薬に成り得ると考えられた。

2. 研究の目的

心臓は、NFAT サブタイプの一つである NFATc4 が特異的に発現している。NFATc4 は、AngII-AT1 受容体下流で活性化されるカルシニューリンの作用を受けて生じる脱リン酸化型 NFATc4 が、核内へ移行することで新たな遺伝子発現応答を引き起こす。この AngII-AT1 受容体-カルシニューリン-NFATc4 経路の持続的な活性化は心不全を惹起することから、最終実行因子である NFATc4 を標的とした阻害剤は、革新的な心不全治療薬の候補と成り得る。NFAT にはこれまで 5 種類のサブタイプが知られているため、NFATc4 選択的阻害剤をスクリーニングにより見出すためには、各種サブタイプの活性を特異的に評価可能なアッセイ系の構築が不可欠である。申請者はこのアッセイ系の構築に向けて、外因性に AT1 受容体を発現させた種々の細胞株から、AngII 刺激において機能的に NFAT 活性が欠損している細胞株を見出した。さらに、この細胞株に外因性に各種の NFAT サブタイプを発現させると、活性化 AT1 受容体依存的に遺伝子発現応答を回復させることが可能であった。この現象を応用して AT1 受容体刺激による個々の NFAT サブタイプ活性を定量するスクリーニング系を樹立することに成功した。本研究では、樹立したスクリーニング系を用いて、各種化合物ライブラリーをスクリーニングし、NFATc4 選択的阻害剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

スクリーニング用インディケーター細胞の作製：ネオマイシン耐性遺伝子を有する SIN (self inactivating) 型レトロウイルスベクター に NFAT 応答配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポーター遺伝子を導入した。このレトロウイルスベクターをパッケージング細胞にトランスフェクションすることでレトロウイルスを産生させた。得られたレトロウイルスをマウスレトロウイルス受容体 (カチオンアミノ酸トランスポーター) を発現させたヒト由来の動物細胞株に感染させ、翌日から細胞を G418 処理することで非感染細胞を除去した。この G418 耐性細胞をインディケーター細胞としてスクリーニングに用いた。

スクリーニング方法：インディケーター細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、AT1 受容体遺伝子および各種 NFAT 遺伝子を一過性に発現させた。細胞にサンプル (1 μ l、溶媒コントロールとして MeOH) および AngII (300nM) を添加し、6 時間培養した。培養液を除去した後、ルシフェラーゼ基質を添加し発光量を測定した。

スクリーニングサンプル：北里大学薬学部微生物薬品製造学教室で所有する微生物由来の天然化合物ライブラリー (269 種) と真菌 (1270 株) および放線菌 (878 株) の培養液をスクリーニングに供した。

4. 研究成果

(1) 微生物由来の天然化合物ライブラリー (269 種類) を用いたスクリーニング
一次スクリーニングとして、各サンプル (10 μ g/ml) を用いて NFATc4 に対する阻害活性を調べた。NFATc4 に依存した AngII 受容体活性を 50%以上阻害する条件を指標としたところ 58 化合物 (ヒット率：20%) が見出された。二次スクリーニングでは、NFATc4 に対する阻害活性の再現性とサブタイプ選択的阻害活性を示す化合物を同定するために、これらの 58 化合物を 4 種類全ての NFAT (NFATc1、NFATc2c、NFATc3 および NFATc4) の転写活性に対する影響を調べた。その結果、NFATc4 に選択的阻害活性を示す化合物は見出せなかったが、NFATc4 よりも NFATc3 をより選択的に阻害する 3 種類の化合物が見出された。これらの化合物の再現性を検討したところ、2 種類の化合物で NFATc3 に強い阻害活性の選択性を示す再現性が認められた。活性の再現した 2 種類の化合物の化学構造には類似する部分構造が見られたことから、今後、これらの化合物の構造を基に誘導体合成展開を検討する予定である。

(2) 微生物の培養代謝産物を用いたスクリーニング

真菌 (1270 株) および放線菌 (878 株) を培養し、培養液の MeOH 抽出液を用いて、一次スクリーニングを施行した。AngII 刺激による NFATc4 活性を 50%以上阻害する培養液が、真菌で 265 株、放線菌で 253 株 (計 518 株) が見出された。二次スクリーニングとして、NFATc3 依存性の受容体活性の阻害率が 50%未満である株を選択したところ、真菌で 42 株、放線菌で 90 株 (計 132 株) が

見出された。さらに、3次スクリーニングとして1次および2次スクリーニングの阻害活性を再現し、かつ NFATc1 および NFATc2 依存性の受容体阻害活性が 50%未満である株を選択したところ、真菌 2 株、放線菌 1 株（ヒット率:約 0.14%）が見出された。3次スクリーニング通過株である放線菌を再培養して阻害活性物質の産生を調べたところ、残念ながら再現性は得られなかった。今後、真菌の 2 株を再培養し、阻害活性物質産生の再現性を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takanashi Mikio, Kimura Takeshi, Li Chengcheng, Tanaka Masaki, Matsuhashi Ako, Yoshida Hiroki, Noda Akari, Xu Pengfei, Takase Satoru, Okazaki Sachiko, Iizuka Yoko, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Gotoda Takanari, Takahashi Manabu, Yagyu Hiroaki, Ishibashi Shun, Yamauchi Toshimasa, Kadowaki T., Liang G., Okazaki H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Critical Role of SREBP-1c Large-VLDL Pathway in Environment-Induced Hypertriglyceridemia of Apo AV Deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 373 ~ 386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.118.311931	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Korkutata Mustafa, Saitoh Tsuyoshi, Cherasse Yoan, Ioka Shuji, Duo Feng, Qin Rujie, Murakoshi Nobuyuki, Fujii Shinya, Zhou Xuzhao, Sugiyama Fumihiro, Chen Jiang-Fan, Kumagai Hidetoshi, Nagase Hiroshi, Lazarus Michael	4. 巻 144
2. 論文標題 Enhancing endogenous adenosine A2A receptor signaling induces slow-wave sleep without affecting body temperature and cardiovascular function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 122 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2018.10.022	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I.	4. 巻 3
2. 論文標題 Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 639 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2018.07.005	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Akimoto Shouta, Suzuki Jun-ichi, Aoyama Norio, Ikeuchi Ryota, Watanabe Hajime, Tsujimoto Hiroyuki, Wakayama Kouji, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei	4. 巻 59
2. 論文標題 A Novel Bioabsorbable Sheet That Delivers NF- B Decoy Oligonucleotide Restrains Abdominal Aortic Aneurysm Development in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1134 ~ 1141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-632	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Takeda N, Inuzuka R, Maemura S, Morita H, Nawata K, Fujita D, Taniguchi Y, Yamauchi H, Yagi H, Kato M, Nishimura H, Hirata Y, Ikeda Y, Kumagai H, Amiya E, Hara H, Fujiwara T, Akazawa H, Suzuki JI, Imai Y, Nagai R, Takamoto S, Hirata Y, Ono M, Komuro I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Pathogenic FBN1 Variant Types on the Progression of Aortic Disease in Patients With Marfan Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 e002058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.117.002058	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Hara Hironori, Morita Hiroyuki, Kishihara Jun, Inuzuka Ryo, Yagi Hiroki, Maemura Sonoko, Toko Haruhiro, Harada Mutsuo, Ikeda Yuichi, Kumagai Hidetoshi, Nomura Seitaro, Takimoto Eiki, Akazawa Hiroshi, Ako Junya, Komuro Issei	4. 巻 26
2. 論文標題 Distinct variants affecting differential splicing of TGFBR1 exon 5 cause either Loeys-Dietz syndrome or multiple self-healing squamous epithelioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1151 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-018-0127-1	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Aoyama Norio, Suzuki Jun-ichi, Kobayashi Naho, Hanatani Tomoya, Ashigaki Norihiko, Yoshida Asuka, Shiheido Yuka, Sato Hiroki, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei, Minabe Masato, Izumi Yuichi, Isobe Mitsuaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Japanese Cardiovascular Disease Patients with Diabetes Mellitus Suffer Increased Tooth Loss in Comparison to Those without Diabetes Mellitus -A Cross-sectional Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 777 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9578-17	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Aoyama Norio, Suzuki Jun-ichi, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei, Minabe Masato, Izumi Yuichi, Isobe Mitsuaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Specific periodontopathic bacterial infection affects hypertension in male cardiovascular disease patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 198 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-017-1042-z	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Aoyama Norio, Suzuki Jun-ichi, Kobayashi Naho, Hanatani Tomoya, Ashigaki Norihiko, Yoshida Asuka, Shiheido Yuka, Sato Hiroki, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei, Minabe Masato, Izumi Yuichi, Isobe Mitsuaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Detrimental effects of specific Periodontopathic bacterial infection on tachyarrhythmia compared to Bradyarrhythmia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cardiovascular Disorders	6. 最初と最後の頁 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12872-017-0703-2	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Suzuki JI, Sato H, Kaneko M, Yoshida A, Aoyama N, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I	4. 巻 40
2. 論文標題 Periodontitis and myocardial hypertrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 324-328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hr.2016.146	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M	4. 巻 7
2. 論文標題 A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 43920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43920	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 Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I	4. 巻 12
2. 論文標題 Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0174099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0174099	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 Nagata N, Iwanari H, Kumagai H, Kusano-Arai O, Ikeda Y, Aritake K, Hamakubo T, Urade Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0175452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0175452	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 Takanashi M, Taira Y, Okazaki S, Takase S, Kimura T, Li CC, Xu PF, Noda A, Sakata I, Kumagai H, Ikeda Y, Iizuka Y, Yahagi N, Shimano H, Osuga JI, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H	4. 巻 24
2. 論文標題 Role of Hormone-sensitive Lipase in Leptin-Promoted Fat Loss and Glucose Lowering	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 1105-1116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.39552	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Aoyama N, Suzuki JI, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M	4. 巻 32
2. 論文標題 Periodontitis deteriorates peripheral arterial disease in Japanese population via enhanced systemic inflammation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 1314-1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-017-1003-6	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sato Hiroki, Suzuki Jun-ichi, Aoyama Norio, Watanabe Ryo, Kaneko Makoto, Shiheido Yuka, Yoshida Asuka, Wakayama Kouji, Kumagai Hidetoshi, Ikeda Yuichi, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei, Isobe Mitsuaki, Izumi Yuichi	4. 巻 40
2. 論文標題 A Periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 35 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hr.2016.114	査読の有無 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担者	池田 祐一 (Ikeda Yuichi) (10744419)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	
研究 分担者	東口 治弘 (Toko Haruhiko) (40436358)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	