

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17549

研究課題名(和文) 化合物ライブラリーを利用した新規肺高血圧症治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension High-Throughput Screening of 5562 Compounds.

研究代表者

黒澤 亮 (Kurosawa, Ryo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40836384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症に対する化合物スクリーニングの基礎研究である。肺動脈性肺高血圧症の病因の一つである肺動脈の血管平滑筋細胞の異常増殖に対する抑制能を指標として東北大学化合物ライブラリー5,562種類の化合物スクリーニングを行った。その結果、細菌由来の化合物セラストラマイシンが患者由来の肺動脈平滑筋細胞の異常増殖を抑制し、さらに炎症抑制作用・酸化ストレス抑制作用・ミトコンドリア機能改善作用を介して肺高血圧モデル動物に治療効果を示すことを確認した。その分子メカニズムとして、Zinc finger protein C3H1 (ZFC3H1) という蛋白の阻害作用を通してそれらの作用を持つことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺動脈性肺高血圧症は、若い女性が稀に発症する致死性疾患であり、難病に指定されている。標準治療薬は全て肺血管拡張薬であり、その多剤併用によっても救えないこともあることから、創薬の必要性がある。そこで、化合物ライブラリーを利用して肺高血圧症の新規治療薬を開発するという着想を得た。研究の結果、肺動脈性肺高血圧症の原因の一つである平滑筋細胞の異常増殖を抑制するセラストラマイシンが、肺高血圧動物モデルで治療効果を持つことを示すことができた。臨床応用につながることであれば、薬物不応性の患者の治療に使える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We screened 5,562 compounds from original library using high-throughput screening system to discover compounds which inhibit proliferation of smooth muscle cells from patients with PAH with less inflammation and reactive oxygen species levels, and recovered mitochondrial energy metabolism. Celastramycin treatment ameliorated pulmonary hypertension in three experimental animal models. Moreover, these celastramycin-mediated effects were regulated by ZFC3H1 (zinc finger C3H1 domaincontaining protein), a binding partner of celastramycin.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 化合物スクリーニング セラストラマイシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、未治療の場合の 5 年生存率が 20% という致死性疾患である。血管拡張薬を用いた多剤併用療法は存在するが、なかでも特発性肺動脈性肺高血圧症患者 (IPAH) の多くは急速な進行を示し、高度の肺動脈リモデリングを示すため、多剤併用療法によっても右心不全のコントロールに難渋し、若くして死亡する症例も多い。そのため、従来の肺血管拡張作用を標的とした治療法以外の革新的治療法の開発が強く望まれるが、現在までのところ製薬会社を中心となって創薬事業を行っており、従来スクリーニングの基盤のなかったアカデミアによる創薬は日本では進んでいない。創薬機構は 2006 年に設立され、スクリーニング研究を担当する東北大学を含む全国 7 大学と、合成担当機関としての 9 大学から構成される。そこで東北大学に設置された創薬機構の化合物ライブラリーと創薬機器を使用し、肺高血圧症に対する新規薬剤の開発を目指した。

(2) 本研究計画提出時には既に、東北大学化合物ライブラリー 5562 種類の化合物に対して IPAH 患者由来の細胞を用いて高速大量スクリーニング (=High Throughput screening: HTS) を行い PAH の原因の一つである肺動脈平滑筋の増殖を抑制する化合物を検出した。まず一次スクリーニングで肺動脈平滑筋細胞の異常増殖能を抑制する化合物を、肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞を用いて、東北大学化合物ライブラリー 5562 種類から 80 種類選り出した。さらに二次スクリーニングでは、毒性が少なく低濃度で効果のある 5 種類を発見した。In vivo 試験では、Celastramycin を肺高血圧モデル動物に投与したところ、肺高血圧の改善を得られた。

2. 研究の目的

東北大学化合物ライブラリーから肺高血圧症に有効な化合物を発見し、将来的に企業と連携し製品化を目指す。

3. 研究の方法

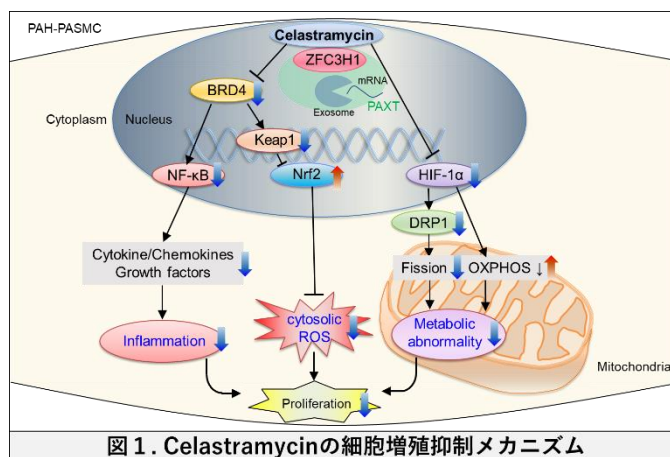
(1) 本研究では、東北大学に設置されている自動化されたロボットを用いた HTS を施行することで、時間的・経済的に最も効率の良い方法を採用する。

(2) 肺高血圧モデル動物で実際どのように作用して肺高血圧を改善しているのか、より詳細なメカニズムの追求や、また副作用はないか安全性の評価を検証していく。また Celastramycin 誘導体が 24 種類存在するため、最適化研究として最も有効な化合物を検索する。将来的には企業と連携し、臨床試験、製品化を目指す。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

Celastramycin は抗炎症作用、抗酸化作用、ミトコンドリア機能改善効果により肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞の異常細胞増殖抑制を抑制することを明らかにした。(図 1)。具体的には、セラストラマイシンは酸化ストレスに応答するタンパク質 Keap1 を抑制することで、その下流にある Nrf2 タンパク質を強力に活性化し、優れた酸化ストレス抑制効果を示すことが確認された (図 2)。さらに、Celastramycin の投与により、機能が低下していた肺高血圧症患者由来の平滑筋細胞のミトコンドリア機能が改善することが示された (図 3)。



また、Celastramycin を投与した平滑筋細胞では Nuclear Factor- κ B の濃度の低下と多くのサイトカインの抑制が示され、炎症の低下を惹起していることが示された。さらにそれらの分子メカニズムとして、Celastramycin が Zinc finger protein C3H1 (ZFC3H1) という蛋白の阻害作用を通してそれらの作用を持つことを示した。ZFC3H1 はタンパク複合体を形成し核内 RNA の分解に重要な役割を果たすことが既報で示されていたため、Celastramycin の働きの中心的な役割を果たしていることが示唆された。また実際に、3 種類の肺高血圧モデル動物に対して Celastramycin を投与したところ、それぞれ治療効果があり、肺動脈リモデリングの増悪を抑制することが示された (図 4)。ところが、Celastramycin はヒトに投与されたことがないため、

臨床応用のための投与方法の検討、構造展開の考察を進める必要があったため、ADME (薬を投与した後の、吸収、分布、代謝、排泄)の研究を薬学部、AMED 構造展開チームと共同で行い、リード化合物としてのセラストラマイシンの最適化を進めた。具体的には、セラストラマイシンの毒性、選択性、溶解性、膜透過性、血中での安定性などを明らかにした。その結果、臨床応用に向けた薬剤の最適化研究を進め、より生体内で有効に働き、副作用の少ない化合物の作成に向けて研究計画を練った。また、セラストラマイシンは酸化ストレスに応答するタンパク質 Keap1 を抑制することで、その下流にある Nrf2 タンパク質を強力に活性化し、優れた酸化ストレス抑制効果を示すことが確認された。これらセラストラマイシンの機序研究は、肺動脈性肺高血圧症の新規原因蛋白の探索にも役立ち、特に Zinc finger protein C3H1 については、まだその機能が未知であることが多いため、今後の研究対象として有望と考えられた。Nrf2 については、その活性化薬が海外にて肺動脈性肺高血圧症に対する臨床試験が進んでおり、これも有望なターゲットと考えられ、Nrf2 の阻害作用を持つ keap1 の阻害薬はまだ実用化されておらず、Celastramycin は keap1 阻害薬としても有望と考えられた。

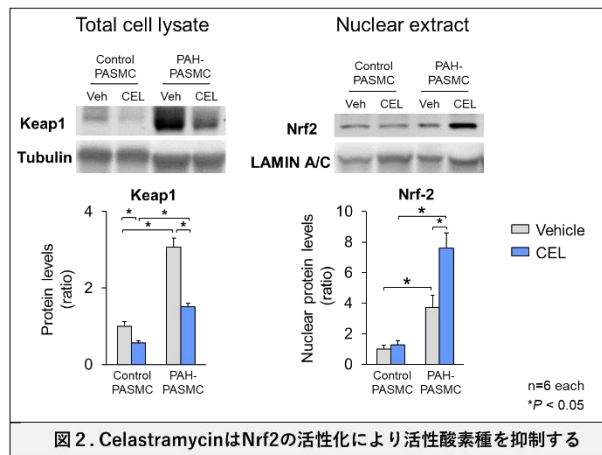


図2. CelastramycinはNrf2の活性化により活性酸素種を抑制する

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、化合物スクリーニングにより PAH 患者由来肺動脈平滑筋細胞の細胞増殖を抑制する化合物を発見し、さらに肺高血圧症モデル動物でその治療効果が得られた。化合物スクリーニングにより肺高血圧の新規治療薬を発見した研究としては世界に先駆けた内容であり、Circulation Research 誌に掲載されたことにより今後の肺高血圧の研究に新たな展望を与えた。今後、本研究に基づき、基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチを発展させ、PAH に対する新規治療薬の開発につながることを期待される。

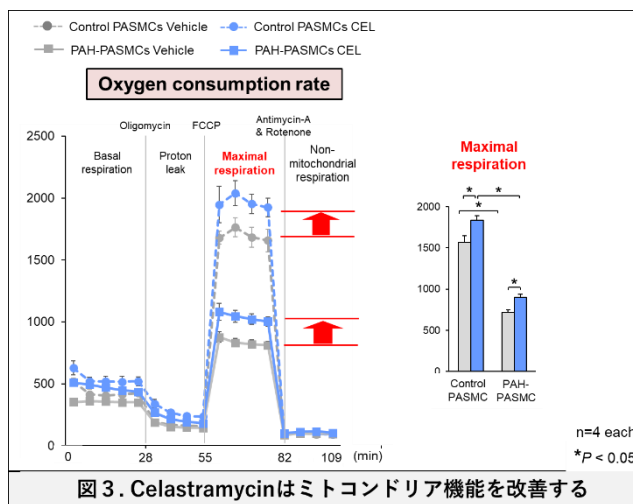


図3. Celastramycinはミトコンドリア機能を改善する

(3) 今後の展望

創薬の過程には国の定める GMP (Good Manufacturing Practice) 基準を満たす製造工程の立ち上げや、臨床試験にかかる費用など、臨床応用までの厳しい道のり、いわゆる「死の谷」と言われる事象があり、まずは本研究の臨床応用に協力してくれる企業を見つけるのが先決である。東北大学で進めている他の候補薬の治験準備とともに、Celastramycin の臨床応用のための研究費獲得を目指してきたが、臨床研究に進むために協力してくれる企業はまだ見つかることができなかつたため、今後の研究の展開としては、引き続きセラストラマイシンの最適化研究、ADME 研究、研究費獲得を続け、臨床での使用のため準備を進めていく必要がある。

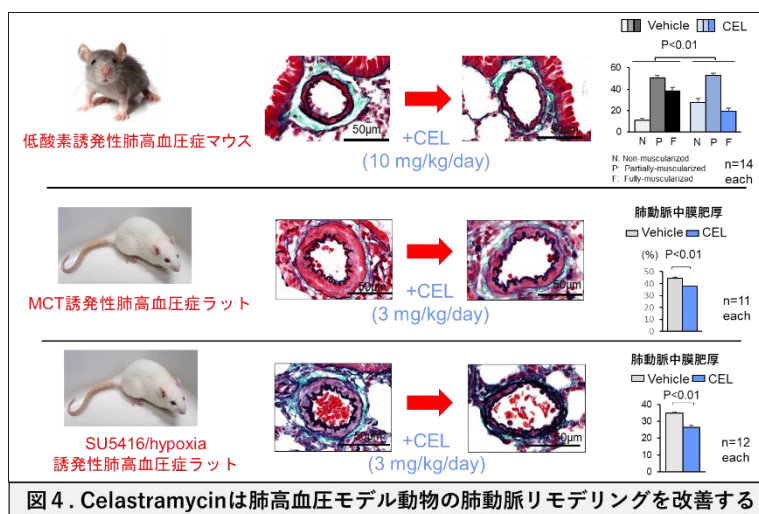


図4. Celastramycinは肺高血圧モデル動物の肺動脈リモデリングを改善する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Kurosawa, Kimio Satoh, Hiroaki Shimokawa	4. 巻 125(3)
2. 論文標題 Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension High-Throughput Screening of 5562 Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 309,327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.315229.	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 黒澤 亮, 佐藤公雄, 菊地順裕, 大村淳一, 佐藤大樹, M. A. H. Siddique, Md. E. A. Mamun, 砂村慎一郎, 野木正道, 下川宏明
2. 発表標題 化合物スクリーニングによる新規肺高血圧症治療薬の発見
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤亮, 佐藤公雄, 菊地順裕, 佐藤大樹, Mohammad A. H. Siddique, 大村淳一, 砂村慎一郎, 野木正道, 下川宏明
2. 発表標題 スクリーニングによる新規肺高血圧症治療薬Celastramycinの発見
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Kurosawa, Kimio Satoh, Nobuhiro Kikuchi, Taijyu Satoh, Junichi Omura, Masamichi Nogi, Shinichiro Sunamura, Nobuhiro Yaoita, Mohammad Abdul Hai Siddique, Elias Al-Mamun, Toru Shimizu, Hiroaki Shimokawa
2. 発表標題 Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension -High-throughput Screening of 5,562 Compounds-
3. 学会等名 欧州心臓病学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Kurosawa, Kimio Satoh, Nobuhiro Kikuchi, Taijyu Satoh, Junichi Omura, Masamichi Nogi, Shinichiro Sunamura, Nobuhiro Yaoita, Mohammad Abdul Hai Siddique, Elias Al-Mamun, Toru Shimizu, Hiroaki Shimokawa
2. 発表標題 Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension -High-throughput Screening of 5,562 Compounds-
3. 学会等名 米国心臓協会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤亮、佐藤公雄、菊地順裕、大村淳一、佐藤大樹、Mohammad Abdul Hai Siddique, Md. Elias Al-Mamun、砂村慎一郎、野木 正道、下川宏明
2. 発表標題 スクリーニングによる新規肺高血圧症治療薬Celastramycinの発見
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 黒澤亮、佐藤公雄、下川宏明	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 72
3. 書名 肺高血圧症とPRO	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------