

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03400

研究課題名（和文）ABC輸送体の機能増強による疾患治療実現に向けた創薬標的の同定法開発

研究課題名（英文）Development of methods to realize medical therapy by enhancing the function of ABC transporters

研究代表者

林 久允（Hayashi, Hisamitsu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：10451858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ABC輸送体の活性化が治療に直結すると考えられる疾患が次々と明らかにされている。本研究では、ABC輸送体の細胞膜発現量を指標とする独自の評価系を活用し、各種ライブラリーのスクリーニングを実施した。公知データを活用した数理解析により、真陽性を絞込んだ後、疾患治療の標的に資する遺伝子を同定すべく、疾患モデルマウスを用いた検証試験を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣病から希少難病に至るまで、細胞膜に発現するABC輸送体の活性化により、治療が実現すると考えられる治療法未確立の疾患が次々と明らかにされている。しかしながら、生体内でABC輸送体を活性化する方法論が未確立であるため、当該疾患群に対する医薬品開発は困難を極めている。本研究では、生体内におけるABC輸送体の活性化実現に資する遺伝子を複数同定しており、ABC輸送体関連疾患の創薬研究への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, a number of diseases have been identified in which activation of ABC transporters is thought to realize treatment. In this study, we screened various libraries using an original evaluation system based on the plasma membrane expression level of ABC transporters and found positive compounds and genes. After narrowing down the true positives by mathematical analysis using available data in public, we conducted a validation study using disease model mice to identify genes that contribute to disease treatment targets.

研究分野：医療薬学

キーワード：創薬 ハイスループットスクリーニング 大規模診療データベース

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病から希少難病に至るまで、細胞膜に発現する ABC 輸送体の活性化が治療に繋がると考えられる治療法未確立の疾患が多数明らかにされている(Theodoulou FL, Biochem Soc Trans. 2015;43(5):1033-40)。しかしながら、生体内で ABC 輸送体を活性化する方法論が未確立であるため、当該疾患群に対する医薬品開発は困難を極めている。

研究代表者は、肝実質細胞の毛細胆管側膜に発現し、胆汁酸の胆汁排泄を担う ABC 輸送体 bile salt export pump(BSEP)を対象とした創薬研究を推進している。BSEP の機能破綻は、致死性の小児希少難病である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型(PFIC2)を始めとする胆汁うっ滞性肝疾患の発症、病態進展の原因となる。研究代表者は、フェニル酪酸ナトリウム(NaPB)が、細胞膜上 BSEP の分解機構を抑制し、BSEP の細胞膜発現量、胆汁酸の胆汁排泄活性を増強することを独自に見出した(Hayashi H, Hepatology. 2007;45(6):1506-1516)。さらに NaPB が BSEP の機能破綻に起因する種々の肝疾患に対して著効する可能性を臨床試験で確認した(Naoi S, J Pediatr. 2014;164(5):1219-1227, Hayashi H, Hepatol Res. 2016;46(2):192-200)。現在、本効能の保険収載に向け、PFIC2 を対象に NaPB の有効性、安全性を検証する治験を実施中である。

本研究では、研究代表者の本成功事例に基づき、ABC 輸送体関連疾患に対する創薬標的の同定スキームを開発する。

2. 研究の目的

研究代表者は、BSEP を対象とした創薬研究から、BSEP の細胞膜を起点とする分解機構の制御が、疾患の治療に直結することを見出している。本研究では、研究代表者独自の成功事例を BSEP に留まらず、生体において ABC 輸送体を活性化する方法論として確立することを目的とする。

動脈硬化症に対しては既存の医薬品では十分な治療効果が得られない。ABCA1 は肝臓において血中 ApoA1 へのコレステロール排泄を介して未成熟 HDL を産生し、抗動脈硬化作用を示すことが、大規模 GWAS 研究、遺伝子改変動物の解析等から示されている(Teslovich TM, Nature 2010;466(7307):707-13, Singaraja RR, J Clin Invest. 2002;110(1):35-42)。そのため、ABCA1 の活性化を介した動脈硬化症治療薬の開発に向け、核内受容体アゴニストの創製など ABCA1 の遺伝子発現制御を標的とした研究が、2000 年以降国内外で精力的に進められている。しかしながら、ABCA1 の遺伝子発現は、細胞内のコレステロール量に付随して増加すること(Costet P, JBC. 2000;275(36):28240-5)、動脈硬化症は脂質異常症を伴うため、病態発症時には細胞内に脂質が蓄積していることを鑑みると、動脈硬化症の治療を要する時点では、既に ABCA1 の遺伝子発現は十分に活性化している可能性が高く、遺伝子発現の増強を標的とした医薬品の効果は不確定である。一方、研究代表者は、細胞膜に発現する ABCA1 の分解が、細胞内の脂質蓄積により促進し、ABCA1 の細胞膜発現量、機能が減弱することを見出している(Mizuno T, ATVB. 2015;35(6):1347-56)。従って、研究代表者の成功事例に根差し、「ABCA1 の細胞膜を起点とする分解機構」を創薬標的と捉えることは、病態に則した合理的な戦略である。

ABCA1 に限らず、ABC 輸送体の遺伝子発現は、細胞内における ABC 輸送体の基質濃度に付随し、病態を校正する方向に適切に制御されている(Plass JR, Hepatology. 2002;35(3):589-96)。ま

た研究代表者は、BSEP, ABCA1 に加え、ABCG1, MRP2 など他の ABC 輸送体の細胞膜発現量も、細胞膜を起点とする分解制御を受けることを見出している (Hori N, Atherosclerosis. 2011;215(2):383-91, Hayashi H, J Hepatol. 2012;56(5):1136-1144)。以上より、本研究が ABC 輸送体関連疾患全般に適用可能な創薬標的の同定スキームの創出に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜を起点とする ABCA1 の分解機構の解明

ライブラリースクリーニング

研究代表者は、ABCA1 の細胞膜発現量を高感度・低分散に検出可能な 384-well format の評価系を独自に開発している。本系を用い、off patent 医薬品(標的既知阻害剤)を収載したライブラリー、siRNA ライブラリーを対象としたスクリーニングを実施した。

スクリーニング結果と既存知見との統合解析による分解機構候補の推定

一般にハイスループットスクリーニングでは、大量のヒットから真陽性を見出す際に難儀をする。ヒットから実際に ABCA1 の細胞膜を起点とする分解機構に関与するタンパク質/遺伝子を選別することが肝要である。細胞膜上 ABCA1 の分解を直接測定することは可能であるものの、手順が煩雑で時間を要する。そこで本研究では公知データを活用した数理解析により、ヒット遺伝子・化合物群から真陽性の絞り込みを行った。

推定された分解機構の実験科学的検証

②で推定された分解機構候補の規定遺伝子の制御を介し、細胞膜上 ABCA1 の分解抑制、ABCA1 の細胞膜発現量・機能の増強が実現するかを培養細胞株を用いて検証した。

(2) 細胞膜上 ABCA1 の分解機構を標的とした動脈硬化症治療戦略の有効性の検証

遺伝子ノックアウト(KO)マウスの作出

(1) の解析で選定した遺伝子に関し、KO マウス、及び apoE 遺伝子との double KO マウスを作出した。

本治療戦略の機序に関する POC の取得

以下項目について、各遺伝子 KO マウスとコントロールマウスを比較検討し、各遺伝子が ABCA1 の細胞膜発現量、機能に及ぼす影響を個体レベルで検証した。

③疾患モデルマウスにおける本治療戦略の有効性の検証

常法に従い、各遺伝子 KO マウスとコントロールマウスを比較検討し、各遺伝子の動脈硬化病巣に対する影響を評価した。

4. 研究成果

独自に構築した ABCA1 の細胞膜発現量を指標とする評価系を活用し、各種ライブラリーのスクリーニングを完了した。スクリーニングにおいて、シグナルを増強した阻害剤/siRNA が標的とするタンパク質群/遺伝子群は、細胞膜上 ABCA1 の分解を規定するタンパク質/遺伝子を内包すると考えられる。

公知データベース、及びライブラリー付属の情報を活用し、ヒット化合物群内で統計学的に濃縮される関連タンパク質/遺伝子を見出し、化合物情報を分子情報へと変換した。次に、BioGrid 等のデータベースから種々の既知の分子ネットワークを入手し、ヒット遺伝子群を、各ネットワー

クにマッピングすることで真陽性を絞込み、関連する ABCA1 の細胞膜発現量制御機構を推定した。これらは、既存知見により関係性が保証された ABCA1 の細胞膜発現量制御分子群であり、ABCA1 の細胞膜を起点とする分解機構を内包する。複雑ネットワーク理論に基づき、サブネットワーク毎に中心性が高い分子、すなわち ABCA1 の分解機構候補の規定遺伝子を推定した。

推定された規定遺伝子が、細胞膜上 ABCA1 の分解抑制、ABCA1 の細胞膜発現量・機能の増強作用を有することを培養細胞株を用いて検証した。これらの工程を経て、ABCA1 の分解に関わる遺伝子を複数同定するに至った。各遺伝子について KO マウスを作出し、肝実質細胞の細胞膜分画における ABCA1 量、未成熟 HDL の血中濃度 (肝臓における ABCA1 の機能)、③コレステロール逆転送機能(未成熟 HDL 産生を介した ABCA1 の生理機能)を評価することで、各遺伝子のマウス個体における作用を検証した。

期待される結果が得られた遺伝子 KO マウスについては、動脈硬化症の病態解析に汎用される apolipoprotein E KO マウスとの double KO マウスを作出した。現在、常法に従い、高脂肪食を 12 週間負荷後に単離した大動脈基部、大動脈弓を顕微鏡観察し、動脈硬化病巣の傷害面積の定量解析を進めることで、当該遺伝子の抗動脈硬化作用、すなわち ABCA1 の細胞膜発現量増強作用を介した疾病治療の可能性について検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisamitsu Hayashi
2. 発表標題 Drug development of cholestatic liver diseases in children
3. 学会等名 The Korean Society of Applied Pharmacology (KSAP) 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 小児胆汁うっ滞性肝疾患を対象とした創薬研究
3. 学会等名 京都小児外科研究会セミナー2022年冬 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 小児胆汁うっ滞性肝疾患の病態分子基盤の理解に向けて
3. 学会等名 第54回武蔵野小児肝臓病懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守屋 一輝、水野 忠快、勝部 彬、楠原 洋之、林 久允
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼAIP4を介した細胞膜上ABCA1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守屋 一輝、水野 忠快、勝部 彬、楠原 洋之、林 久允
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼAIP4を介した細胞膜上ABCA1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔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	水野 忠快 (Mizuno Tadahaya) (90736050)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

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