

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659444

研究課題名(和文) クロトー分子のグルクロン酸認識能を基盤とする副甲状腺ホルモン抑制薬の探索

研究課題名(英文) Analysis of inhibitory derivatives for parathyroid gland hormone secretion

研究代表者

伊村 明浩 (IMURA, AKIHIRO)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員

研究者番号：60362513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の腎不全透析患者は30万人で、毎年1万人ずつ増加している。半数が二次性副甲状腺機能亢進症に移行し、骨融解のため骨折、寝たきりの危険に陥る。近年Ca受容体のアゴニスト医薬シナカルセト(レグバラ)が発売され世界的に大量に処方されたことは、この病態の深刻さと患者数の多さを物語っている。応募者らはクロトー分子がPTH分泌に必須であることを発見した。加えて、クロトー分子が認識する糖構造を解明し、これを模倣する化合物を生体に投与したところ、PTH分泌が抑制されることを発見した。以上から、EGおよびデリバティブ化合物はシーズ医薬となる可能性がある。この研究により、今後の医薬開発に貴重なデータを提供する。

研究成果の概要(英文)：Over half patients with renal failure suffer hyperparathyroidism(HPT). HPT leads to severe osteoporotic state. Recently, a CaR agonist, cinacalcet has been developed to suppress parathyroid gland. In contrast, aKlotho and FGF23 are both essential for regulating PTH secretion. We addressed the principle that aKlotho contributes to PTH secretion and then surveyed the inhibitory chemicals. Screening study revealed estron glucuronide and its derivatives are candidates for suppression of PTH secretion. These data would be seeds for PTH inhibitory drugs based on aKlotho structure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 腎臓内科学

キーワード：PTH Klotho FGF23 glucuronide

1. 研究開始当初の背景

本研究では、 α クロトー分子のPTH内分泌制御機能に着目し、 α クロトーシステムが二次性副甲状腺機能亢進症の治療標的となる可能性を検証する。 α クロトーはPTH分泌に促進的に作用することから、理論的には、 α クロトー分子の作用を抑制すればPTH分泌阻害効果が期待できる。この仮説に基づいて、試験的にエストロングルクロン酸をマウス個体に投与し、低Caに対する5分間の応答性分泌特性を観察したところ、レグパラ投与や α クロトー遺伝子欠損と同様のPTH分泌抑制効果が見られた。この事実は、EGが新規原理に基づいたPTH分泌阻害薬に発展する可能性を示している副甲状腺における α クロトーの作用点は、FGF23受容体としてPTHの転写抑制に働いているポイントと、Naポンプのリクルート制御を介してPTHの応答性分泌に促進的に関与しているポイントの2カ所である。腎不全透析患者では正常人に比しFGF23が二桁以上高い血中濃度になっているにも関わらず、二次性副甲状腺機能亢進症に陥るケースが多いことから、 α クロトーがFGF23受容体としてPTH転写抑制に与える影響は支配的ではないことが考察される。従って、 α クロトーのもう一つの作用点、すなわち、Naポンプのリクルート制御を介してPTH分泌に促進的に関与するメカニズムに対し、EGが阻害的に作用すると推論できる(図1、2)。本研究では、EGが α クロトーとNaポンプの分子結合に干渉しているという仮説に焦点を当てて検証したい。そこで以下のような研究を行う。

図1 副甲状腺細胞におけるPTH分泌調節機構

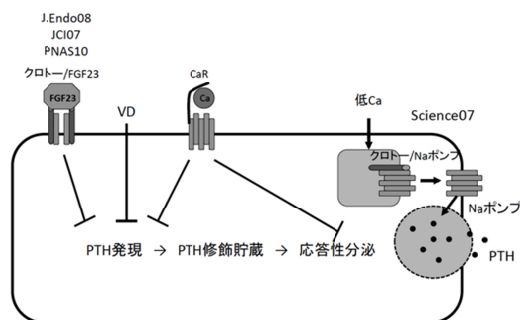
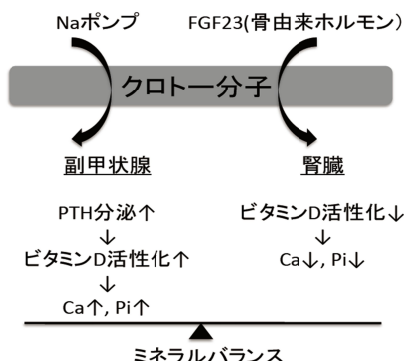


図2 クロトー分子によるミネラル代謝機構



2. 研究の目的

α クロトーの構造解析を通して、 α クロトーがグルクロン酸を認識する能力を持つことを見だし、 α クロトーの分子結合能を阻害する化合物エストロングルクロン酸(EG)を樹立した。生体では、 α クロトー分子はNa,K-ATPase(Naポンプ)への結合を介して細胞内リクルートに関与し、副甲状腺においてPTHの応答性分泌を制御している。そこでマウス個体にEGを投与したところ、低カルシウムに応答するPTH分泌を抑制することが判った。近年、PTH抑制薬としてCa受容体(CaR)に対するアゴニストであるシナカルセトが実用化されているが、今後、EGの薬理的検証を通して、新規薬剤の開発が期待される。本研究は、 α クロトー依存性PTH分泌機構におけるエストロングルクロン酸の作用メカニズムを解明し、薬剤作用原理の基礎データを取得することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、 α クロトー分子の PTH 内分泌制御機能に着目し、 α クロトーシステムが二次性副甲状腺機能亢進症の治療標的となる可能性を検証する。 α クロトーは PTH 分泌に促進的に作用することから、理論的には、 α クロトー分子の作用を抑制すれば PTH 分泌阻害効果が期待できる。この仮説に基づいて、試験的にエストロングルクロン酸をマウス個体に投与し、低 Ca に対する 5 分間の応答性分泌特性を観察したところ、レグパラ投与や α クロトー遺伝子欠損と同様の PTH 分泌抑制効果が見られた。

腎不全透析患者では正常人に比し FGF23 が二桁以上高い血中濃度になっているにも関わらず、二次性副甲状腺機能亢進症に陥るケースが多いことから、 α クロトーが FGF23 受容体として PTH 転写抑制に与える影響は支配的ではないことが考察される。従って、 α クロトーのもう一つの作用点、すなわち、Naポンプのリクルート制御を介して PTH 分泌に促進的に関与するメカニズムに対し、EG が阻害的に作用すると推論できる。

そこで、EG が α クロトーと Na ポンプの分子結合に干渉しているという仮説に焦点を当

てて EG のデリバティブを含めた候補の検索と、候補合成品の PTH 分泌阻害効果を検証する。

4. 研究成果

(i) コンピューターモデルによる EG デリバティブ化合物の設計

構造予測モデルに従って (図 4、5) クロトー分子の活性基様ポケットに入るグルクロン酸に対して、どのような修飾を付加すべきかデザインし、糖合成の専門技術を有する (株) 東京化成に発注した。クロトー分子が特異的に認識する構造の例として、FGF23 の 178 番目スレオニン残基に結合する o-結合糖鎖を解析したところ、3 位が硫酸化されていたので、現段階では硫酸基付加が効果的ではないかと考えている。

(ii) 薬剤作用原理の確定

本研究では、EG が PTH 分泌を抑制する機序として、クロトーと Na ポンプの分子結合に干渉するという仮説をたて研究を進めた。具体的には、免疫沈降ウエスタン法により、EGFP 融合 Na ポンプとクロトーが結合を証明できるので、この結合が EG によって解離するかどうか検討した。また、単離精製した EGFP 融合 Na ポンプ分子を表面プラズモン共鳴装置 (SPR) センサーチップに固相化し、クロトーの付加により得られる表面プラズモン共鳴効果に対し、EG の存在がどの程度影響を与えるかを定量評価する。この解析により、EG の PTH 分泌抑制効果の作用点が Na ポンプとの分子間相互作用であることを証明した。

(iii) 動物実験による PTH 分泌における EG デリバティブの効果検証

本研究の眼目は、「生体の副甲状腺で、EG ないし EG デリバティブがどのように、どの程度効くのか？」を評価することにある。まず慢性的影響を検討するた

めに、野生型マウスおよび副甲状腺機能亢進症モデルとしての VDR-KO マウスを用いる。これらの動物に対して、陽性コントロールをシナカルセトとして、EG を種々の用量で投与した後、副甲状腺を摘出し、PTH 貯蔵量を組織抽出液の ELISA で測定する。これにより、候補試薬群の慢性的な投与によって、PTH がどの程度影響をうけるのかを検討する。

次に、低 Ca 刺激に対して即時に起きる PTH 分泌の急性反応に対して、候補化合物がどの程度影響を持つか解析した。その結果、EG 添加による著名な PTH 分泌抑制効果が得られた。

図3 エストロングルクロン酸(EG)のPTH分泌抑制効果

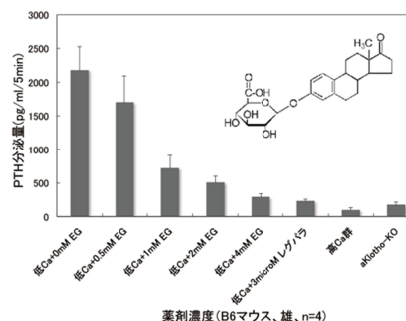


図 3 で、種々の薬剤の存在下で低 Ca 液を灌流した際の PTH 分泌特性を示した。EG はシナカルセト同様の PTH 阻害効果を発現するためには、3 オーダー高い用量が必要であった。これは、さらに化学的修飾などの改善が必要であることを意味する。さらに申請者らは、二価イオンキレートビーズの腹腔内投与により、PTH 分泌を誘導する *in vivo* 実験系を開発済みである (Science07)。今後、二価イオンキレートビーズ投与 PTH 分泌誘導マウスに対してどの程度 PTH 分泌を抑制できるのか、用量依存性特性を検討する必要がある。

図4 クロトーに結合するFGF23由来の結合型糖鎖のMS/MS解析

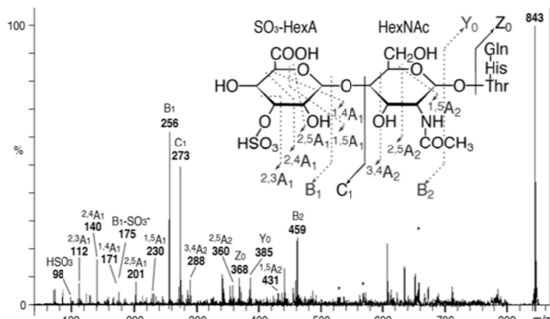
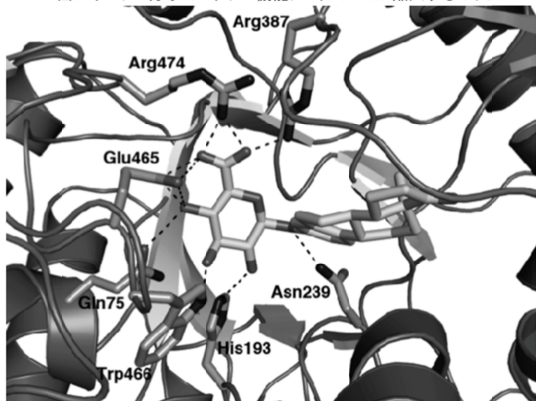


図5 クロトー分子のレクチン機能ドメインにEGが陥入するモデル



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 7件)

1. Reduced renal α -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism.

Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y, Konishi N, Saito Y.

PLoS One. 2014 Jan 23;9(1):e86301. doi: 10.1371/journal.pone.0086301.

eCollection 2014.

2. Updates on rickets and osteomalacia: various roles of Klotho and FGF23 in vivo Imura A.

Clin Calcium. 2013 Oct;23(10):1476-82. doi: CliCa131014761482. Review. Japanese.

3. Complex regulation and diverse functions of α -klotho.

Maeda R, Imura A, Nabeshima Y.

Contrib Nephrol. 2013;180:25-46. doi: 10.1159/000346777.

4. Plasma soluble α -klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters.

Siahanidou T, Garatzioti M, Lazaropoulou C, Kourlaba G, Papassotiriou I, Kino T, Imura A, Nabeshima Y, Chrousos G.

Eur J Endocrinol. 2012 Sep;167(3):433-40.

5. Serum soluble α -klotho in hemodialysis patients.

Yokoyama K, Imura A, Ohkido I, Maruyama Y, Yamazaki Y, Hasegawa H, Urae J, Sekino H, Nabeshima Y, Hosoya T.

Clin Nephrol. 2012 May;77(5):347-51.

6. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion.

Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y.

Kidney Int. 2012 Mar;81(6):539-47

7. Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood.

Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K.

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jun;96(6):E943-7.

[学会発表](計 9件)

招待講演 セミナー α Klotho as a glucuronide lectin and further studies of calcium sensing.

コペンハーゲン大学 2014年 1月(デ

ンマーク王国)

招待講演: □Klotho as a glucuronide lectin and further studies of calcium sensing

ハーバード大学医学部内分泌セミナー 2013年 9月(米国)

招待講演 セミナー alpha Klotho as a glucuronide lectin and further studies of calcium sensing.

クリーブランドクリニック 2013年 9月(米国)

シンポジスト: 抗老化学会 シンポジウム(横浜) Ca イオンの恒常性: クロトー問題からの新展開 平成24年6月23日

筑波大学医学研究科 TSM セミナー aKlotho の奇妙な構造~進化の片隅で 平成24年10月19日

The Fifteenth Lilly International Symposium(大阪) アルファクロトーの役割: 糖鎖認識が可能にする多面性 平成24年10月27日

第1回生理研研究会「細胞センサーの分子機構・相互連関・ネットワーク研究会」(岡崎) クロトーが結合モチーフとして認識する糖鎖構造 平成24年11月29日

第360回つくば分子生命科学セミナー 2012年 10月(茨城)

招待講演 ミネラル病態における クロトー関連因子 Anpep の役割

腎不全病態研究会口演 2012年 7月(東京)

招待講演「クロトー関連因子 Anpep の副甲状腺における機能の解明」

〔図書〕(計 1件)

ミネラル摂取と老化制御(共著) 建帛社

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: -Klotho/FGF23複合体形成阻害化合物

発明者: 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

権利者: 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

種類:

番号: 特願 2011-136719

出願年月日: 2011年6月20日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称: 名称: -Klotho/FGF23複合体形成阻害化合物

発明者: 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

権利者: 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

種類:

番号: 特許第4402511号公報

取得年月日: 特開2013-28541(P2013-28541A)平成25年2月7日(2013.2.7)

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

伊村明浩

研究者番号: 60362513

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

