

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790079

研究課題名(和文)トランスサイレチン細胞外分泌抑制を標的としたアミロイドニューロパチー治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of drugs targeting secretory inhibition of transthyretin for familial amyloidotic polyneuropathy

研究代表者

佐藤 卓史(SATO, Takashi)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：70555755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：家族性アミロイドポリニューロパチーの新規治療薬の開発を最終目的とし、「変異トランスサイレチン(TTR)の特異的細胞外分泌抑制および細胞内クリアランスの促進」を可能にする小胞体内TTR四量体形成阻害剤の創薬シーズの探索を行った。バーチャルスクリーニングにより約250万種類の化合物から候補化合物を選別し、TTR分泌抑制能を示す2種類の化合物(うち1種類は四量体形成阻害能を示す)を同定した。また、低分子化合物ライブラリーを用いた候補化合物の探索を行うためのTTRの四量体形成能を評価するハイスループットスクリーニング系を構築した。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to develop drug for treatment of Transthyretin (TTR)-Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP). We previously identified that inhibition of TTR tetramerization in the endoplasmic reticulum that blocks secretion of mutant TTR could be a target of candidate drug for treatment of FAP. In this study, we performed in silico virtual screening of inhibitor for TTR tetramerization. Among 2.5 million compound, we selected about 20 compounds and examined the effect of selected compounds on secretion and tetramerization of mutant TTR. Finally, we identified 2 compounds that reduce secretion of mutant TTR, one of which inhibits tetramerization of mutant TTR. Moreover, to perform high-throughput screening of chemical libraries, we developed a fluorescence-based assay system that monitor TTR tetramerization in vitro and plan to use this system in future study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：トランスサイレチン アミロイド 小胞体 小胞体関連分解 化合物スクリーニング 薬理学

1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、血清タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) の変異体により形成されたアミロイド線維が神経を中心に全身諸臓器に沈着する遺伝性疾患であり、厚生労働省特定疾患にも指定される重篤な疾患である。これまでに変異 TTR の細胞外でのアミロイド線維形成を抑制する化合物の開発が行われており、2013 年に世界初の TTR-FAP 治療薬として Tafamidis (Pizer 社) が製造販売承認された。しかし、Tafamidis は一部の変異に対する有用性しか示されておらず、汎用性に欠けることが課題となっている。このような現状からアミロイド線維形成の抑制とは異なる治療アプローチの展開が国内外の研究動向になりつつあり、実際にアンチセンス核酸や small interfering RNA (siRNA) といった TTR 産生を抑制する治療法の開発が行われている。

申請者らは世界に先駆けて細胞レベルでの TTR 分泌・分解の制御機構に関する研究を行っており、変異 TTR の細胞外分泌には小胞体内での四量体形成が必須であること、単量体の変異 TTR は細胞内で小胞体関連分解 (ERAD) されることを明らかにしている (Sato et al. EMBO J. 2007, Susuki & Sato et al. JBC 2009)。この知見と一致して、四量体形成能が著しく低下した変異 TTR を有する患者は血清中に変異 TTR がほとんど存在しておらず、興味深いことに晩期発症の表現型を示す。上記背景を基に、申請者らは「小胞体内の TTR 四量体形成阻害」が変異のタイプに依存せず、変異 TTR の細胞外分泌を抑制し、細胞内クリアランスを促進する新規 FAP 治療標的となり得ると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝性難病である FAP の新規治療薬の開発を最終目的とし、申請者が開発を目指す治療法「変異トランスサイレチン (TTR) の特異的細胞外分泌抑制および細胞内クリアランスの促進」の治療薬となる小胞体内 TTR 四量体形成阻害剤の創薬シーズの創出を目指す。シーズの探索は異なる標的を対象にした以下の 2 つのスクリーニングを行う。(1) 四量体形成阻害能を有するペプチド・低分子化合物のスクリーニングを精製タンパク質を用いた四量体形成評価系および培養細胞を用いた細胞外分泌評価系により行い、四量体形成阻害剤の候補ペプチド・低分子化合物を同定する。(2) 培養細胞を用いた siRNA スクリーニングにより小胞体内での TTR 四量体形成に関わる分子群を同定し、TTR に対する特異性、ノックダウン時の細胞毒性を評価し、創薬標的となり得る分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 四量体形成阻害能を有するペプチド配

列の探索

劇症型症状を呈する変異 TTR の X 線構造解析 (Miyata et al. Biochemistry 2010) から同定した四量体形成に重要な領域の相補的ペプチドを小胞体内で発現するように設計した plasmid を作製した。作製した plasmid を変異 TTR (V30M TTR) を安定発現する HEK293 細胞に導入し、培養上清に分泌された TTR および cell lysate 中の TTR をウエスタンブロット法により検出・定量し、分泌抑制能を評価した。

(2) 四量体形成阻害能を有する低分子化合物の探索

TTR の X 線構造解析のデータを基に、TTR 単量体に結合し、四量体形成を阻害する化合物を *in silico* スクリーニングにより選別した。候補化合物の四量体形成阻害能の評価は 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) の四量体 (発光極大 470 nm) と単量体 (発光極大 520 nm) 結合時の蛍光波長の違いを利用した *in vitro* 評価系を新たに構築し、用いた。さらに、分泌抑制能の評価については上記(1)で使用した変異 TTR 発現細胞を用いてウエスタンブロット法により評価した。

(3) siRNA スクリーニングによる小胞体内での TTR 四量体形成に関わる分子群の同定

小胞体分子を標的とした siRNA カスタムライブラリーを作製し、網羅的スクリーニングにより TTR 四量体形成に関わる分子の同定を行った。細胞内での TTR 四量体形成を直接モニターする評価系の開発は困難であったため、野生型と変異型 TTR の単量体での細胞該分泌パターンの違いを利用し、TTR の細胞外分泌能をウエスタンブロット法により評価することで間接的に四量体形成に関わる分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 四量体形成阻害能を有するペプチド配列の探索

四量体形成に重要な領域の相補的ペプチドとして V16-V25, I73-L82, A81-H90, R104-P113, Y114-V122 の領域を選別した。これらペプチドが小胞体内腔に輸送されるようにシグナル配列を N 末側に付加し、小胞体内に局在させるために KDEL 配列を C 末側に付加した発現 plasmid を作製した。上記ペプチドが変異 TTR 細胞外分泌に与える影響を調べたところ、いずれのペプチドも TTR の分泌および細胞内発現量に顕著な影響を示さなかった。本結果は、ペプチドに付加した KDEL 配列が TTR 以外のタンパク質 (KDEL receptor など) への結合を高めたために生じた可能性であると考えられるため、シグナル配列のみをペプチド配列に付加した発現 plasmid を新たに作製し、同様の検討を行った。予想に反して、シグナル配列のみの付加の場合でも TTR の分泌および細胞内発現量に顕著な影響

を示すペプチドはなかった。したがって、選別したペプチド領域に問題があった可能性も挙げられるが、ペプチドによる変異 TTR の四量体形成阻害、それに伴う細胞外分泌抑制は困難であることが明らかになった。

(2) 四量体形成阻害能を有する低分子化合物の探索

バーチャルスクリーニングにより単量体に結合し、四量体形成を阻害する可能性が高い化合物をリードライク化合物から 40 種類 (200 万種類中)、フラグメント化合物から 18 種類 (50 万種類中) を選別した。入手可能な 18 種類の化合物について変異 TTR の細胞外分泌、*in vitro* での TTR 四量体形成に与える影響を評価した。その結果、変異 TTR の細胞外分泌を抑制する 2 種類の候補化合物を同定した。特に細胞外分泌抑制能が高かった化合物は、*in vitro* での TTR 四量体形成阻害能も高いことが明らかになった。したがって、本化合物は変異 TTR の細胞外分泌抑制を標的とした新規 FAP 治療薬のリード化合物となり得ると期待される。今後、化合物の最適化により細胞、個体レベルでの有効性、安全性の評価を行い、臨床応用可能な化合物の開発を行う予定である。また、本期間において四量体形成能をモニターする *in vitro* 評価系のハイスループット化に成功したことから、今後は本システムを用いて化合物ライブラリーを活用した変異 TTR の四量体形成阻害剤の網羅的探索を行う予定である。

(3) siRNA スクリーニングによる小胞体内での TTR 四量体形成に関わる分子群の同定

小胞体に発現する約 50 遺伝子の siRNA ライブラリーを作製し、変異 TTR の細胞外分泌を抑制する分子の探索を行った。その結果、変異 TTR の細胞外分泌を顕著に抑制する分子の同定には至らなかった。したがって、小胞体内での TTR 四量体形成は複数の分子が協同して行っている可能性が示唆された。

また、変異 TTR の細胞内クリアランスの分子機構の詳細な解析を行い、変異 TTR は N 型糖鎖修飾の有無に応じた 2 種類の分解経路が存在することを明らかにした (Sato et al. Mol Cell. 2012)。本来、TTR は非糖鎖付加タンパク質であるが、変異 TTR のようにミスフォールドしやすい状態のタンパク質が小胞体内に留まっていると、N 型糖鎖修飾を受け、糖鎖依存的分解経路で除去されることがわかった。この TTR への N 型糖鎖修飾は、糖タンパク質への一般的な糖鎖修飾 (翻訳と共役した機構) とは異なり、翻訳後に起こる N 型糖鎖修飾であり、触媒サブユニットに STT3B を有する糖転移酵素によって行われていることを見出した。さらに、細胞は糖鎖非依存的分解経路を主分解経路として利用し、主経路が飽和あるいは障害を受けた場合に代替の経路として糖鎖依存的分解経路を利用していることも明らかにした。したがって、四

量体形成阻害剤により分泌阻害された変異 TTR は、細胞内に蓄積することなく、上記機構により効率的にクリアランスされると考えられる。本知見は、TTR の細胞レベルでの制御機構の発見にとどまらず、長らくその生理機能が不明であった翻訳後 N 型糖鎖修飾の役割を世界で初めて明らかにしたという点で細胞生物学的にも有用な知見であると言える。

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 4 件)

Suzuki S, Shuto T, Sato T, Kaneko M, Takada T, Suico MA, Cyr DM, Suzuki H, Kai H. Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. Sci Rep. 査読有 2014 Mar 3;4:4258. doi:10.1038/srep04258.

Morino-Koga S, Yano S, Kondo T, Shimauchi Y, Matsuyama S, Okamoto Y, Suico MA, Koga T, Sato T, Shuto T, Arima H, Wada I, Araki E, Kai H. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. J Cell Physiol. 査読有 2013 Feb;228(2):439-46. doi:10.1002/jcp.24149.

Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Nishitoh H, Okiyoneda T, Kokame K, Kaneko M, Taura M, Miyata M, Chosa K, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H. STT3B-Dependent Posttranslational N-Glycosylation as a Surveillance System for Secretory Protein. Mol Cell. 査読有 2012 Jul 13;47(1):99-110. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.015.

Koga T, Kai Y, Fukuda R, Morino-Koga S, Suico MA, Koyama K, Sato T, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of Alport syndrome. PLoS One. 査読有 2012 7(8):e43852. doi:10.1371/journal.pone.0043852.

[学会発表](計 7 件)

Chosa K, Yamakawa R, Sato T, Yokoyama T, Mizuguchi M, Suico MA, Shuto T, Kai H. The endoplasmic reticulum-oriented drug development for familial amyloid polyneuropathy. ASCB Annual Meeting, 2013.12.14-18, New Orleans, USA

Chosa K, Yamakawa R, Sato T, Yokoyama T, Mizuguchi M, Suico MA, Shuto T, Kai H. The endoplasmic reticulum-oriented drug development for transthyretin familial

amyloid polyneuropathy. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, 2013.11.10-13, Rio de Janeiro, Brazil

佐藤卓史, 庄美里, スイコメリーアン, 首藤剛, 甲斐広文. 翻訳後 N 型糖鎖修飾を介した小胞体品質管理機構による家族性アミロイドーシスの発症性制御機構の解明 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3.27-30, 横浜

庄美里, 佐藤卓史, 帖佐圭佑, 山川瑠斐子, スイコメリーアン, 首藤剛, 甲斐広文. 異常な構造を持つ分泌タンパク質の新たな小胞体品質管理機構, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013.3.21-23, 福岡

庄美里, 佐藤卓史, 西頭英起, 小亀浩市, 金子雅幸, 和田郁夫, メリーアンスイコ, 首藤剛, 甲斐広文. 変異トランスサイレチンの翻訳後 N 型糖鎖修飾の意義とその制御因子の探索, 第 85 回日本生化学会大会, 2012.12.14-16, 福岡

庄美里, 佐藤卓史, スイコメリーアン, 首藤剛, 和田郁夫, 甲斐広文. 変異トランスサイレチンの翻訳後 N 型糖鎖修飾の意義とその制御因子の探索, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8-9, 熊本

Kai H, Sato T, Sho M, Sako Y, Suico MA, Shuto T. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. Quality Control From Molecules to Organelles. 2012.9.19-22, Heidelberg, Germany

〔その他〕

熊本日日新聞 医療 QQ 「特定酵素「STT3B」, 異常タンパク質を分解 熊大グループが新たな仕組み発見」 平成 24 年 7 月 20 日

<http://qq.kumanichi.com/medical/2012/07/post-1996.php>

熊本大学プレスリリース「細胞内の異常なタンパク質を取り除く, 新しいメカニズムを発見」 平成 24 年 7 月 13 日

http://www.kumamoto-u.ac.jp/daijokujouhou/kouhou/pressrelease/2012_file/release120713.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 卓史 (SATO, Takashi)

熊本大学・発生医学研究所・研究員

研究者番号: 70555755