

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461378

研究課題名(和文)新規中性脂肪吸収抑制薬であるSAR1B抑制PIポリアミドの開発

研究課題名(英文)Development of PI polyamide targeting Sar1b gene

研究代表者

上野 高浩(UENO, Takahiro)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：40386008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PIポリアミドは新規遺伝子発現制御技術であるが、本研究ではSar1bを抑制するPIポリアミドを高中性脂肪血症や肥満症の治療薬として開発した。ヒトおよびラットSar1bプロモーターに結合するPIポリアミドをそれぞれ2つつつデザイン合成し、ターゲット配列への結合を確認した。次いで培養小腸上皮細胞にPIポリアミドを添加しSar1b mRNA発現を抑制することを確認した。さらにラットにPIポリアミドを隔日で2週間経口投与し、小腸のSar1b発現減少、体重増加の抑制作用を確認した。Sar1b抑制PIポリアミドは経口投与により肥満、脂質異常症を治療する新しい薬物として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pyrrole-imidazole polyamides (PI polyamides) are effective inhibitors of tissue specific and general transcription factors. Sar1b play a major role in chylomicron synthesis in small intestine. We designed and synthesized PI polyamide targeting Sar1b gene to reduce intestinal chylomicron synthesis. Treatment of CaCo2 cells with 0.1 μM PI polyamide significantly reduced Sar1b mRNA expression. PI polyamide significantly decreased Sar1b mRNA in the small intestine of Wistar rats. Body weights of rats treated with PI polyamide were significantly lower compared with that in control rats at the end of the treatment. This novel therapeutic agent, PI polyamide, decreased Sar1b expression in vivo. PI polyamide targeting Sar1b gene has a possibly to be a useful tool for the new strategy for transcription regulation therapy.

研究分野：脂質代謝

キーワード：Sar1b PI polyamide カイロミクロン 肥満 脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症治療において、高 LDL 血症に対しては、スタチン製剤を中心とした治療が確立し、さらに機序の異なるエゼチミブの追加投与など、治療の選択肢も増えている。これに対し、生下時より著明な高カイロミクロン血症をきたす型高脂血症には有効な薬物療法は確立されておらず、中性脂肪の高値が持続する。さらにカイロミクロン、VLDL が増加して重篤な高中性脂肪をきたす原発性 V 型高脂血症ではフィブレート製剤を中心とした治療が一般的であるが、コントロール不良な例も多く、治療における新たな選択肢が求められている。食事由来の中性脂肪は消化管内でモノグリセライドと脂肪酸まで分解されて小腸上皮細胞に吸収され、そこで再び中性脂肪に再合成され、これを用いてカイロミクロンが合成される。その主要な過程は構造蛋白であるアポ B 48 を中心に滑面小胞体中でリン脂質に富む粒子が形成され、そこに diacylglycerol acyltransferase (DGAT) により合成された中性脂肪が MTP の作用により加わってゆく。こうして合成されたカイロミクロン前駆のリポ蛋白はゴルジに運ばれるが、この輸送に必須な蛋白が SAR1B である。SAR1B が欠損した Anderson 病の患者では血中にカイロミクロンが見られず、中性脂肪の吸収障害を認める。MTP が欠損する無リポ蛋白血症でも血中のカイロミクロンは欠損するが、肝臓で合成されるもう一つの中性脂肪に富むリポ蛋白である VLDL も欠損する。これに対し、SAR1B を欠損する Anderson 病の患者ではカイロミクロンのみが欠損し、VLDL は正常に合成される。このことより、MTP は小腸、肝臓の両者でのリポ蛋白合成に必須であるが、SAR1B は小腸におけるカイロミクロン合成にのみ必須な蛋白であり、肝臓における VLDL 合成には必須ではないと考えられる。以上の知見より、小腸における脂質吸収、合成を特異的に抑制する治療のターゲットとしては SAR1B がよりふさわしく、本研究における新しい吸収抑制薬のターゲット分子は SAR1B とした。PI ポリアミドは非核酸有機化合物でありながら、核酸が核酸配列を認識して結合するように、配列特異的に DNA に結合し、遺伝子プロモーターの転写因子結合領域においてこれと競合させると、その遺伝子の転写を抑制する新しい遺伝子発現制御技術である。我々は、これまで transforming growth factor 1、lectin-like oxidative LDL receptor 1、Fc receptor common chain、ABC transporter A1 などの発現を抑制する PI ポリアミドを開発し、その効果を報告した。PI ポリアミドは特別なデリバリー試薬無しに組織に良好に移行し、細胞の核に取り込まれ、遺伝子発現を特異的に抑制できる。また、非核酸有機化合物で

あることから生体内で核酸分解酵素に対して安定である。これらの特徴より PI ポリアミドは特に in vivo においては核酸医薬よりも優れていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は SAR1B のプロモーター領域に結合してその発現を抑制する PI ポリアミドを開発し、経口投与により小腸でのカイロミクロン合成を抑制する薬剤を開発するものである。本薬剤は経口投与することで、直接ターゲット細胞である小腸上皮細胞に到達することができ、PI ポリアミドの物性から、容易に小腸上皮細胞の核に入り、作用すると思われる。これにより、本薬剤は小腸における食事由来リポ蛋白であるカイロミクロンの合成を阻害するという新しい作用機序より、高中性脂肪血症治療薬としての作用に加え、動脈硬化病変形成に大きく関わると考えられている食後高脂血症治療薬として、また、脂質吸収を抑制することから抗肥満薬としての効果も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 転写因子結合領域解析

転写因子結合領域の解析は TFSEARCH (National Biology Research Center, Japan) を用いた。

(2) PI ポリアミドの合成

PI ポリアミドはペプチド合成機 PSSM-8 を用いて固相法で合成した。合成した PI ポリアミドは HPLC にて精製した後に真空凍結乾燥した。乾燥した PI ポリアミドは使用前に DMSO にて溶解して使用した。

(3) ゲルシフトアッセイ

ヒト及びラットプロモーターの SRE 及び PI ポリアミド結合配列を含む 20bp のセンス、アンチセンスオリゴ DNA を合成し、2本鎖 DNA としたものの等モルの PI ポリアミドをインキュベートしポリアクリルアミドゲルにて泳動した。

(4) RT-PCR

Caco-2 細胞、ICE-6 細胞より mRNA を抽出後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い、cDNA を作成、TaqMan プローブ法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて検討した。

(5) In vivo 実験プロトコール

3 週齢 Wistar ラットを普通食で飼育しつつ、2 週間 Sar1bPI ポリアミドを 7.5mg/kg にて隔日経口投与した(合計 7 回)。コントロールにはミスマッチ PI ポリアミドを 7.5mg/kg 隔日投与した。投与終了後にイソフルラン吸入麻酔(2~5% in 100%酸素)下で、体表を消毒後に腹部正中切開し下大静脈より脱血後、小腸を摘出しリアルタイム PCR 法により Sar1b mRNA の定量を行った。

4. 研究成果

Sar1bを発現抑制するPI ポリアミドをデザインするためヒト Sar1b プロモーター遺伝子配列における転写因子結合領域をデータベースを用いて解析し、ヒト Sar1b 遺伝子プロモーターにおける転写因子結合予想部位のマップを作成した。多くの転写因子結合部位が予測されたが、その中に脂質代謝調節のレギュレーターとして主要な役割を担うことがすでに明らかとなっている SREBP(Sterol Regulation Element Binding Protein)が結合するSRE配列が同定されたので、最初のPI ポリアミドはこの領域をターゲットとすることとした。PI ポリアミドをSREの上流側と下流側に2種類デザインし、ペプチド合成機で合成し、HPLCにて精製した。合成した2種類のPI ポリアミドのターゲット配列への結合をゲルシフトアッセイにて確認した。ターゲット配列への結合が確認できた2種のヒト Sar1b に対するPI ポリアミドをヒト小腸上皮細胞 Cell line であるCaCo2細胞に1 μ Mで添加しSar1b mRNA抑制効果を検討した。作成した2種類のポリアミドはともに有意にSar1b mRNAを抑制した。さらに、CaCo2細胞を継続培養して小腸上皮様に分化させ、PI ポリアミドの脂質合成への影響を評価したところ、PI ポリアミドはCaCo2細胞の脂質合成を抑制させた。さらにPI ポリアミドの効果を実験動物で評価するために、ラット Sar1b を抑制するPI ポリアミドの作成を行った。ラット Sar1b プロモーター配列をデータベースにて解析し、そのプロモーター領域に2カ所のSRE配列を同定した。その下流SREに結合する2種類のラットPI ポリアミドをデザイン、合成し、ゲルシフトアッセイにてそのターゲット配列への結合を確認した。次いで、ラット小腸上皮細胞であるICE-6を用い、2種のPI ポリアミドのSar1b mRNA抑制効果を検討した。反復して検討を行ったが、2種のPI ポリアミドともにSar1b抑制効果は確認できなかった。そのため、上流SERをターゲットとしたPI ポリアミドをさらに2種類デザイン合成し、そのターゲットへの結合をゲルシフトアッセイで確認した。この2種のPI ポリアミドのうちの1種でICE-6細胞のSar1b mRNA発現を有意に抑制することを確認できた。

ラット in vivo での研究を目指し、PI ポリアミドの小腸への取り込みを検討した。FITCラベルしたPI ポリアミドをWistarラットに経口投与し、小腸上皮細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡を用いて検討したが、取り込みを確認できなかった。

このため、ラット小腸を結紮し、 1.0×10^{-3} M, 0.1 ml のPI ポリアミド溶液を直接注入して取り込みを検討したところ、小腸上皮細胞内へのFITCラベルポリアミドの取

り込みが確認された。経口投与でFITCラベルポリアミドの取り込みが確認できなかった原因はFITCポリアミドが胃酸により変性していた可能性があると考えられる。ここまでの研究でPI ポリアミドがラット小腸上皮細胞に取り込まれることが確認できたので、ラットに対する経口投与実験を行った。3週齢のWistarラットを普通食で飼育し、2週間Sar1bPI ポリアミドを7.5mg/kgにて隔日経口投与した(合計7回)。コントロールにはミスマッチPI ポリアミドを7.5mg/kg隔日投与した。投与後の体重を比較すると、Sar1bPI ポリアミド投与群で体重は低下傾向であった。又、投与後の血清中の脂質(総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール)については有意な変化を認めなかった。投与後の上部、中部、下部小腸におけるSar1b mRNA発現をリアルタイムPCRにて比較した。空腸、回腸において、PI ポリアミド投与群で有意にSar1b mRNAの発現低下を認めた。十二指腸においてもSAR1bの発現は低下傾向であった。

本研究ではヒトおよびラットSar1b遺伝子発現を抑制するPI ポリアミドを確立した。さらにラットPI ポリアミドを経口投与してラット小腸上皮細胞におけるSar1b mRNA発現を抑制することと体重増加を抑制することが示された。以上の結果より本薬剤は経口投与により小腸において脂質吸収を抑制する新規薬剤として有用なものであると考えられる。

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 7件)

- Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M. Reduction of Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis by the Novel Gene Regulator PI Polyamide Targeting Transforming Growth Factor β 1 Gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 38(12), 2015, 1836-42
- Saito K, Fukuda N, Shinohara KI, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M.: Modulation of the EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor- β 1., *Int J Biochem Cell Biol*, 査読有, 66, 2015, 112-120
- Yoshizawa S, Fujiwara K, Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Hoshi R, Watanabe Y, Hirano T, Furuya T, Masuko T, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Nagase H:

Pyrrole-imidazole polyamide mediated silencing of KCNQ1OT1 expression induces cell death in Wilms' tumor cells., Int J Oncol, 査読有, 47(1), 2015, 115-21
Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M: Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF-β1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model., Plos One, 査読有, 10(5), 2015, e0125295, DOI:10.1371
Kojima T, Wang X, Fujiwara K, Osaka S, Yoshida Y, Osaka E, Taniguchi M, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Tokuhashi Y, Nagase H: Inhibition of the human osteosarcoma cell migration and invasion by a gene silencer, Pyrrole-Imidazole polyamide, targeting to the human MMP9 NFκB binding site. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 査読有 37(9), 2014, 1460-5
Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Kojima T, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H: Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, Pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. FEBS Open Bio, 査読有, 4, 2014, 328-334
Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M: A novel gene regulator, pyrroleimidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. Journal of Molecular Medicine, 査読有 92, 2014, 509-521

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 小林洋樹、上野高浩、福田昇、常見明子、田中翔、畑中善成、羽毛田公、相馬正義。新規脂質吸収抑制薬である SAR1B 制御 PI ポリアミドの開発。第 38 回 日本高血圧学会、愛媛県民文化会館、愛媛県松山市、2015.10.9-11.
2. 小林洋樹、上野高浩、常見明子、田中翔、畑中善成、田平和宣、羽毛田公、福田昇、相馬正義。小腸上皮細胞において SAR1B 発現を抑制する新規遺伝子発現制御薬ピロール・イミダゾール・ポリアミドの効果。第 47 回 日本動脈硬化学会、仙台国際センター、宮城県仙台市、2015.7.9-10
3. 常見明子、上野高浩、福田昇、田中翔、小林洋輝、田平和宣、畑中善成、田平和宣、

羽毛田公、松本太郎、相馬正義。アディポネクチンを増加させる新規遺伝子発現制御薬 PI ポリアミドの開発。第 47 回 日本動脈硬化学会、仙台国際センター、宮城県仙台市、2015.7.9-10

4. 齋藤孝輔、福田昇、上野高浩、相馬正義。ヒト TGF-β1 遺伝子発現抑制剤ピロール・イミダゾールポリアミドを用いた EMT/MET の制御。第 37 回 日本高血圧学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.10.17-19.

5. 五十嵐潤、福田昇、齋藤孝輔、青山隆彦、松本宜明、上野高浩、相馬正義。進行性腎障害に対する新規転写抑制薬ヒト TGF-β1 の PI ポリアミドの創薬開発。第 37 回 日本高血圧学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.10.17-19.

6. 五十嵐潤、福田昇、齋藤孝輔、上野高浩、相馬正義。ヒト TGF-β1 に対する新規バイオ医薬 PI ポリアミドの創薬開発。第 57 回 日本腎臓学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.7.4-6.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
上野 高浩 (UENO, Takahiro)
日本大学・医学部・兼任講師
研究者番号：40386008