

59. 遺伝性難病 FAP に対する創薬研究

甲斐 広文

Key words : トランスサイレチン, 家族性アミロイドポリニューロパチー, ハイスループットスクリーニング, ANS, 4量体分泌阻害薬

熊本大学 大学院生命科学研究部
(薬学教育部)
遺伝子機能応用学分野

緒言

トランスサイレチン (TTR) アミロイドーシスは, 4量体血清タンパク質である TTR の正常体もしくは変異体が細胞外に分泌された後にアミロイド線維を形成し, 体内の様々な部位に沈着する疾患である. その中でも, 特に変異型 TTR は, 4量体構造の不安定性からアミロイド線維を形成し, 神経を中心に全身諸臓器に沈着する致死性の遺伝性疾患 (TTR-FAP) の発症に加え, 心臓を中心に沈着する Cardiomyopathy (TTR-FAC) の発症にも関与する. これまで, TTR-FAP の発症早期の限定された患者に対しては, 肝臓移植が有効であることが示されてきたが, それでも, 深刻なドナー不足や患者の心身の負担の観点, 眼アミロイドーシスに無効であることなどが問題である¹⁾. 一方, 日本でも一昨年発売が開始された, TTR の4量体構造安定化薬は, 患者の血液中 TTR の4量体構造を安定化し, ニューロパチーの進行を抑制することを示唆する知見は見出されているが, その効果も満足いくものではないという. このような背景の中, 本研究室では, 種々の変異型 TTR の細胞外分泌および細胞内における小胞体関連分解 (ERAD) を規定する「小胞体品質管理機構」が, TTR アミロイドーシス病態を左右する重要な因子となること^{2,4)}, ER 内腔で変異型 TTR 特異的に4量体形成を阻害し細胞外分泌を抑制することが新規治療法となり得ることを示唆してきた. そこで, 本研究では, 変異型 TTR 特異的な4量体形成阻害薬の探索を究極の目的に, ハイスループットスクリーニング (HTS) による化合物の選別と細胞評価系による効果の検討を行ったので報告する.

方法、結果および考察

1. ハイスループットスクリーニング (HTS) を用いた TTR 4量体形成阻害剤の探索

1) 1次スクリーニング評価系の構築

これまで TTR の4量体形成阻害剤を評価する系は開発されていないことから, 単量体・4量体をモニターできるハイスループットスクリーニング (HTS) を行うために評価系の確立が重要である. そこで本研究ではまず, cell free の *in vitro* 評価系として, recombinant V30M TTR タンパク質 (世界の FAP 患者で最も多い変異型) を用いた 384 well-base の評価方法, 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) binding assay の確立を試みた. ANS は, 単独では, 励起波長 380 nm において発光極大 520 nm の蛍光を呈するが, タンパク質の疎水基及び無極性の部位に結合すると, 発光極大 460 nm の青色蛍光を示す蛍光試薬である⁵⁾ (図 1A). ANS は, TTR の疎水性領域である T4 結合部位に結合することが知られているため⁶⁾ (図 1B), 本研究では, ANS の4量体と単量体結合時の蛍光波長の違いをモニタリングすることで簡便かつ迅速な4量体形成阻害能を評価できるのではないかと考え (図 1C), 種々の検討を行った.

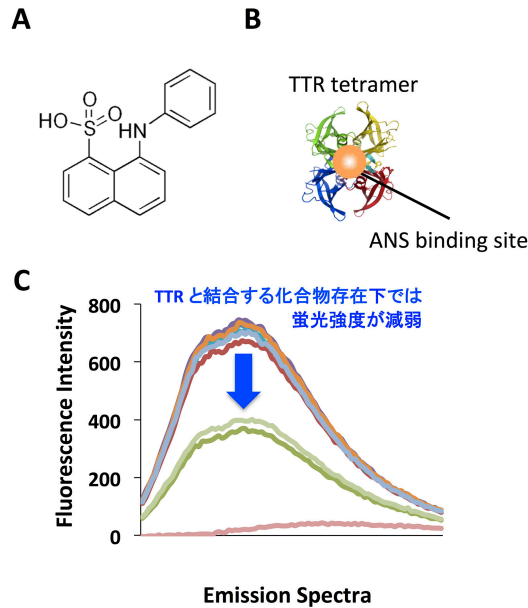


図1. 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) binding assay を用いた TTR の4量体形成阻害剤のスクリーニング。

A) 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) の化学構造, B) トランスサイレチン (TTR) 4量体への ANS 結合部位, C) 400-600 nm における蛍光値の変化の模式図. TTR の4量体存在時は, ANS が TTR 疎水性ポケットに結合し, 460 nm 付近の蛍光強度が上昇し, 4量体量が減少すると, その値は低下する.

まず, ANS の最適濃度と反応持続時間および 384 well plate において測定可能な条件検討を行った. その結果, 健康人の血中 TTR 濃度に近い 0.2 mg/mL (4量体で計算すると約 3.65 μ M) の recombinant V30M TTR を, 25°C 定温下で, 46 時間あらかじめ化合物と反応させ, 測定直前 (2時間~) に ANS を 40 μ M の濃度で添加し, Infinite[®] M1000 PRO microplate reader (TECAN) を用いて, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 400-600 nm, スリット幅を, 励起側 10 nm, 蛍光側 20 nm で設定し蛍光強度を測定する条件が最適であることを確認した (図 2A). そこで, 次に, 本条件を用いて, 自動分注・洗浄システムである Biomek NXP (BECKMAN COULTER), Multidrop Combi (Thermo Scientific) と組み合わせ, 384 well plate を用いた well 間誤差の測定 (validation) を行った. ここでは, 100% control 群 (対象となる化合物を含まないサンプル) を, 0% control 群 (100% control 群から recombinant V30M TTR を除いたサンプル) を, 実際の HTS で使用する 384 well plate に分注し, 各 control 群の測定値を元に HTS 評価系確立に重要な指標, coefficient of variation (CV 値), signal-background ratio (S/B 比), signal-noise ratio (S/N 比), Z' factor を計算した. 検討の結果, heat map では顕著なバラつきは見られず, また, CV 値 (10%以内が推奨) が, 0% control で 7.403%, 100% control で 4.021%, S/B 比 (3以上が推奨) は 7.715, S/N 比は 90.697, Z' factor (0.5以上が推奨) は 0.828 と非常に良好な結果が得られた (図 2B, C).

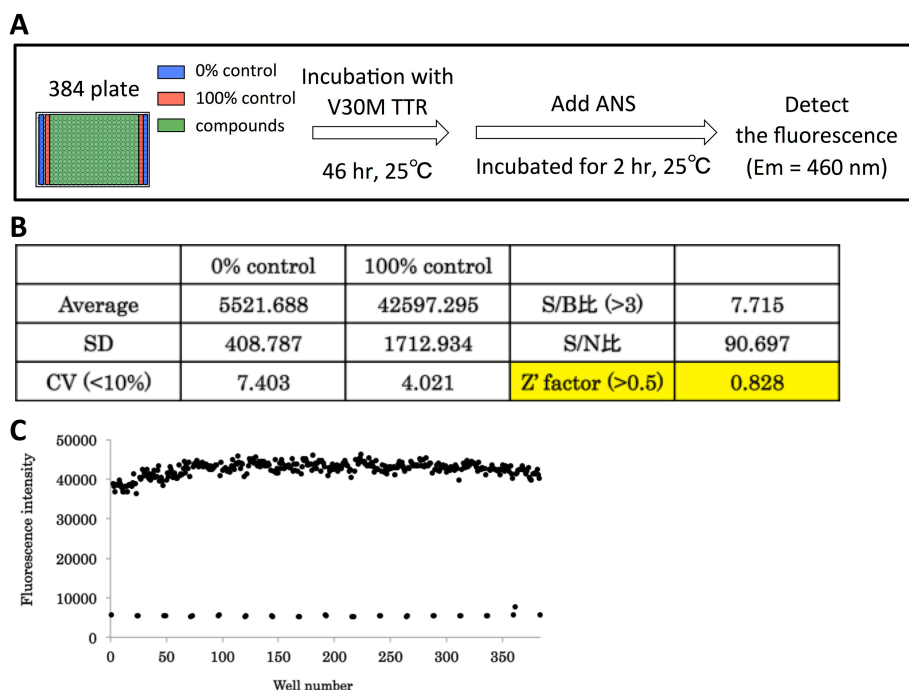


図2. 1次スクリーニング評価系の条件の最適化.

A) 1次スクリーニングの概要. B) 384 well plate を用いた well 間誤差の測定 (validation) 時の指標. coefficient of variation (CV 値): 測定値のブレを示す変動係数であり, 分注量や plate reader の測定値のブレなどの指標. signal-background ratio (S/B 比), signal-noise ratio (S/N 比): ベースのバラつきに対するシグナルの大きさを示す比率. 反応前後におけるシグナル強度の比率を示しており, 大きいほど読み取り幅が大きくなる. Z' factor: $Z' = 1 - (3SD \text{ of } 100\% \text{ control} + 3SD \text{ of } 0\% \text{ control}) / (\text{mean of } 100\% \text{ control} - \text{mean of } 0\% \text{ control})$. HTS系を確立する上で最も重要な精度を示す指標. データのバラつきやシグナル強度から計算され, assay 系の質の目安となる. C) 384 well plate の各 well の蛍光強度の生データ (Scatter plot).

2) 1次スクリーニングによる候補化合物の抽出

TTR の 4 量体形成阻害剤を探索するために, 本試験では, 東京大学創薬オープンイノベーションセンター (OCDD) から提供された化合物ライブラリー, Core Library 9600 および LOPAC 1280 (Sigma-Aldrich) を用いた. まず, Core Library 9600 から検討したところ, 100% control における 460 nm の極大波長で測定した ANS の蛍光強度の抑制率 (Inhibition ratio) を 0%とした時の, 各化合物処理における抑制率を算出した. 30%以上の抑制率を示した化合物をヒット化合物とした時, 168 種類の化合物が抽出された (図3).

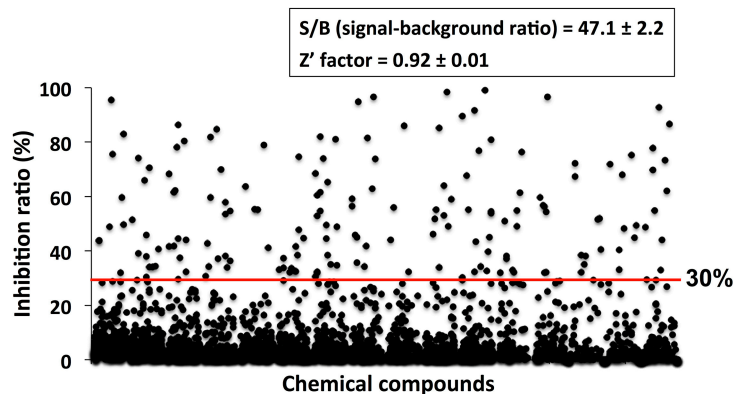


図3. Core Library 9600 を用いたスクリーニング結果.

Core Library 9600 を用いた TTR 4 量体形成抑制率 (Scatter plot). Core Library 9600 は、生物活性が期待される化合物空間や忌避構造によるフィルタリング、物性値と部分構造によるクラスタリングにより濃縮されたものであり、製薬企業に比べ研究資金の調整が厳しいアカデミア創薬からの画期的な新薬創出のために創られたライブラリー. $S/B = 47.1 \pm 2.2$; $Z' \text{ factor} = 0.92 \pm 0.01$. 30%以上抑制率を示した化合物は 168 種類.

次に、LOPAC 1280 を用いて検討したところ、100% control における 460 nm の極大波長で測定した ANS の蛍光強度の抑制率 (Inhibition ratio) を 0% とした時の、各化合物処理における抑制率を算出した. 30% 以上の抑制率を示した化合物をヒット化合物とした時、20 種類の化合物が抽出された (図 4).

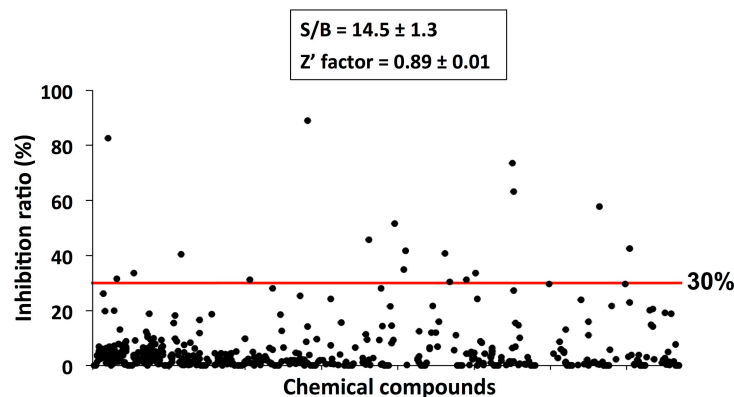


図4. LOPAC 1280 を用いたスクリーニング結果.

LOPAC 1280 を用いた TTR 4 量体形成抑制率 (Scatter plot). LOPAC 1280 は、薬理活性が既知の化合物を収集したもので、半数阻害濃度や致死濃度が解明されたものも多く含まれるライブラリー. $S/B = 14.5 \pm 1.3$ and $Z' \text{ factor} = 0.89 \pm 0.01$. 30%以上抑制率を示した化合物は 20 種類.

3) 2次スクリーニングによる候補化合物の抽出

前項では、独自に確立した HTS 評価系を用いて、2 種類の化合物ライブラリーから TTR の 4 量体形成阻害作用を持つ可能性のある化合物を 188 種類抽出した. そこで、ヒット化合物が変異型 TTR の細胞外分泌を抑制するののかという観点からの検討を行った. なお、本検討では、まず物性や構造学的観点からユニークであると思われた 7 種類の化合物を抽出し、2 次スクリーニングを行った.

まず、本研究室で作製した V30M TTR 安定発現 HEK293 細胞に、化合物ライブラリーである LOPAC 1280 から抽出されたヒット化合物の一部 (7 種類) を $10 \mu\text{M}$ または $30 \mu\text{M}$ で 24 時間処理した後、細胞内および細胞外分泌された TTR を Western blotting により検出した (図 5A). その結果、化合物 C, 化合物 F, 化合物 G 処理群で、V30M

TTRの細胞外分泌の減少が見られた(図5B, C)。このとき、化合物C、化合物G処理群では、細胞内TTR量が増加したことから、TTRの細胞外分泌抑制能を有する可能性が示唆された。一方、化合物F処理は細胞内TTR量を減少させたが、顕著な細胞死が見られたため(data not shown)、細胞毒性による分泌抑制の可能性が高いことが推察された。以上の結果より、少なくとも、化合物Cと化合物Gが有望な変異TTR分泌抑制薬であることが示唆された。

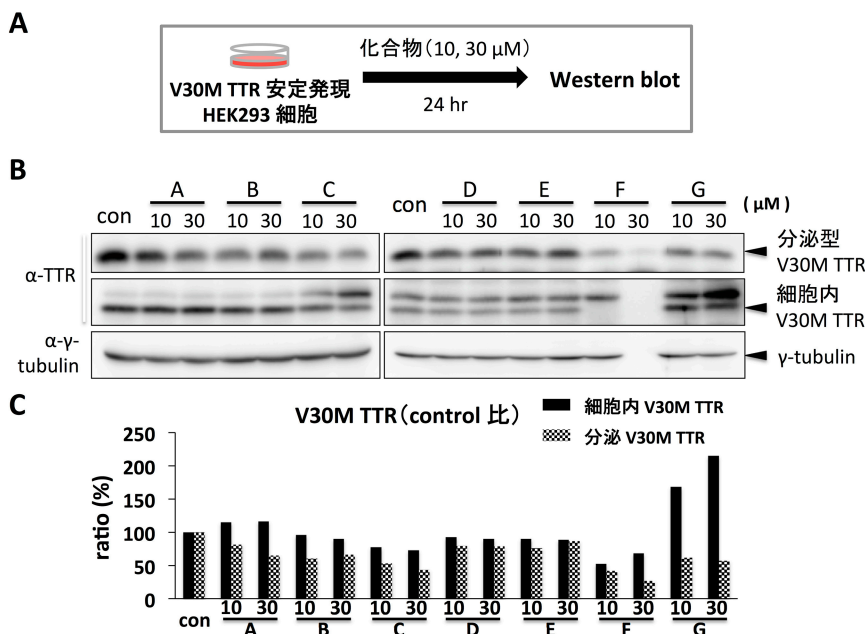


図5. V30M TTR 安定発現 HEK293 細胞を用いた2次スクリーニング。

A) 2次スクリーニングの概要, B) 分泌型および細胞内のV30M TTRタンパク質に対するWestern blottingの結果。γ-tubulinは内部標準タンパク質として検出, C) 分泌型および細胞内のV30M TTRタンパク質の定量値(% of Control)。

以上、本研究では、TTRの4量体形成をモニタリングする*in vitro*評価系を確立し、2種類の化合物ライブラリー(Core Library 9600, LOPAC 1280)を評価した。その結果、10,880種類もの化合物から188種類の化合物までの絞り込みに成功した。さらに、これらのヒット化合物がTTRの細胞外分泌を阻害するのかを検討したところ、TTRの分泌を阻害する化合物2種類を見出すことに成功した。なお、現段階では、まだ未検討の化合物も多数残っており、今後、候補化合物の数が増えると思われる。

共同研究者

本研究で用いた化合物ライブラリーは、九州大学化合物ライブラリー創薬先端研究・教育基盤センターのご協力により入手した。また、化合物の取り扱いおよびスクリーニング機器使用に関しては、同センターの山下智大先生よりご教授頂いた。さらに、富山大学薬学部の水口峰之教授には、recombinant V30M TTRタンパク質をご供与頂き、*in vitro*スクリーニング系の構築に際し多大なるアドバイスを頂いた。この場を借りて、心より感謝申しあげたい。

文献

- 1) Munar-Qués, M., Salva-Ladaria, L., Mulet-Perera, P., Solé, M., López-Andreu, F. R. & Saraiva, M. J. : Vitreous amyloidosis after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy: ocular synthesis of mutant transthyretin. *Amyloid*, **7** : 266-269, 2000.
- 2) Sato, T., Susuki, S., Suico, M. A., Miyata, M., Ando, Y., Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Dobashi, M., Shuto, T. & Kai, H. : Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J.*, **26** : 2501-2512, 2007.
- 3) Susuki, S., Sato, T., Miyata, M., Momohara, M., Suico, M. A., Shuto, T., Ando, Y. & Kai, H. : The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **284** : 8312-8321, 2009.

- 4) Sato, T., Sako, Y., Sho, M., Momohara, M., Suico, M. A., 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*, **47** : 99-110, 2012.
- 5) Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F. & Gilmanshin, R. I. : Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, **31** : 119-128, 1991.
- 6) Quintas, A., Saraiva, M. J. & Brito, R. M. : The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis. *J. Biol. Chem.*, **274** : 32943-32949, 1999.