

報道機関 各位

国立大学法人 熊本大学

小児遺伝性腎炎の治療薬開発のための
高感度・多検体分析システムの開発に成功！
～遺伝性難病アルポート症候群の治療薬開発に道筋～

【概要】

熊本大学大学院薬学教育部 遺伝子機能応用学分野の町紘平 大学院生、甲斐広文 教授らは、小児期に発症する遺伝性の腎臓病（アルポート症候群）の原因となるタンパク質（コラーゲン）の異常を高感度で検出する技術を確認し、その異常を是正できる治療薬開発を可能にしました。

これまで、アルポート症候群の患者は、原因タンパク質である 4 型コラーゲンの異常により、慢性的な腎機能の低下が引き起こされ、腎不全へと移行することが余儀なくされることが明らかになっていました。しかしながら、原因は解明されているにも関わらず、原因を正し、4 型コラーゲンの働きを機能させる（是正する）ことによる新たな治療法の開発には未だに至っていません。今回の研究では、従来法よりも、労力・時間を短縮し、高感度に 4 型コラーゲンの是正をモニターできるシステムを世界で初めて構築しました。また、このシステムを用いると、多くの医薬品候補化合物を同時に解析することが可能となり、アルポート症候群の原因にアプローチする画期的な治療薬開発に繋がることを期待されます。本研究の成果は、Cell Press の「Cell Chemical Biology」に米国東部時間の平成 30 年 3 月 8 日 12:00（日本時間：平成 30 年 3 月 9 日 2:00）に公開されました。

【研究の背景】

アルポート症候群は、遺伝性の腎臓疾患です。腎臓における尿の濾過機構を担う糸球体に存在する基底膜の構成因子である 4 型コラーゲンの異常により、糸球体濾過機能の異常と、それに伴う慢性的な腎臓の機能の低下を引き起こします。最終的には人工透析もしくは腎移植なしでは死に至る末期腎不全に陥る重篤な疾患で、我が国でも難病に指定されています。

アルポート症候群の治療には、高血圧治療に用いられるレニン・アンジオテンシン

系阻害剤が使用され、病態の進行を抑制できることがわかっています。しかしながら、レニン・アンジオテンシン系阻害剤による治療は症状を軽減させるための治療法であり、最終的な末期腎不全への移行を阻止できるものではありません。したがって、根本治療の確立にはこれまでとは全く異なる、「発症の原因に基づく治療」が必要と考えられます。そのような原因を標的とした治療戦略として、医薬品候補化合物による原因タンパク質の機能の正常化があり、他の遺伝性疾患領域では治療に大きく貢献しています。

【研究の内容】

医薬品候補化合物による原因タンパク質の機能の正常化には、原因タンパク質が本来有する失われた機能を回復させる化合物を効率よくスクリーニングし、目的の化合物を同定する必要があります。したがって、原因となるタンパク質の機能が失われた状態と化合物等により機能するようになった状態を効率的に見分けることのできる解析法（評価分析システム）が必要でした。しかしながら、アルポート症候群には、そのような薬の開発研究に有用な評価システムが存在していなかったため、本研究では、化合物の網羅的な評価（化合物スクリーニング）に応用可能な新しい評価システムの構築を目指しました。4型コラーゲンは、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ の3本のポリペプチド鎖（棒状のタンパク質）が複合体（三量体）を形成し、腎臓で尿の生成に重要な糸球体と言われる器官において、血液成分の濾過の際、血液成分の漏出に対する物理的なバリアーとなる基底膜の構成因子となります（図 1A）。アルポート症候群ではその $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖のいずれかの遺伝子に変異が生じることで、そこから産生されるポリペプチド鎖に異常が生じ、基底膜の形成不全が引き起こされることに端を発することから、遺伝子変異が生じても4型コラーゲン $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖のタンパク質の機能を補うことで、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ が三量体形成できるようにする化合物の探索が必要です。

そこで、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖の複合体（三量体）形成を評価する方法として、タンパク質－タンパク質間の相互作用解析に用いられる split Nano luciferase* (split NanoLuc® ; NanoBiT®) 技術を用いました（図 1B）。本システムでは、分割された大小2つのルシフェラーゼ分子の断片をそれぞれ $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 鎖と融合し、 $\alpha 4$ 鎖と共に細胞に発現させると、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖が三量体を形成できる条件でのみ、化学発光が検出されます（図 2、図 3A）。本システムは、これまで報告されている「 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖の決まった組み合わせで三量体を形成する」ことや、「三量体の形成に重要な機能部位を無くした $\alpha 5$ 鎖は三量体をつくれなくなる」ことなど、既知の特性を反映していることを明らかにしました。さらに、本システムは、アルポート症候群で報告のある遺伝子変異をもった $\alpha 5$ 鎖が機能しなくなることも解析可能とし（図 3B）、アルポ

ート症候群の原因となる 4 型コラーゲンが機能する状態と機能が失われた状態とを、比較的簡便で高感度に区別することができるシステムであることも証明されました(図 2)。なお、本システムは、治療薬候補化合物の網羅的な評価に応用可能であり、多検体を同時に解析することが可能です(図 2)。このことは、これまで、根治療法がない遺伝性難病アルポート症候群治療薬開発に道筋を与えるものであり、この技術は、平田機工株式会社との「天然物創薬共同研究講座」において活用されているところです。

本研究は、「Alport Syndrome Research Funding Program of the Alport Syndrome Foundation (ASF) and the Pedersen family, Kidney Foundation of Canada」、熊本大学 HIGO プログラム「独創的研究支援プログラム」、日本学術振興会「特別研究員 科学研究費助成事業」および「頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム」、文部科学省 科研費「JP26460098、JP17K08309」の支援を受けて行われました。

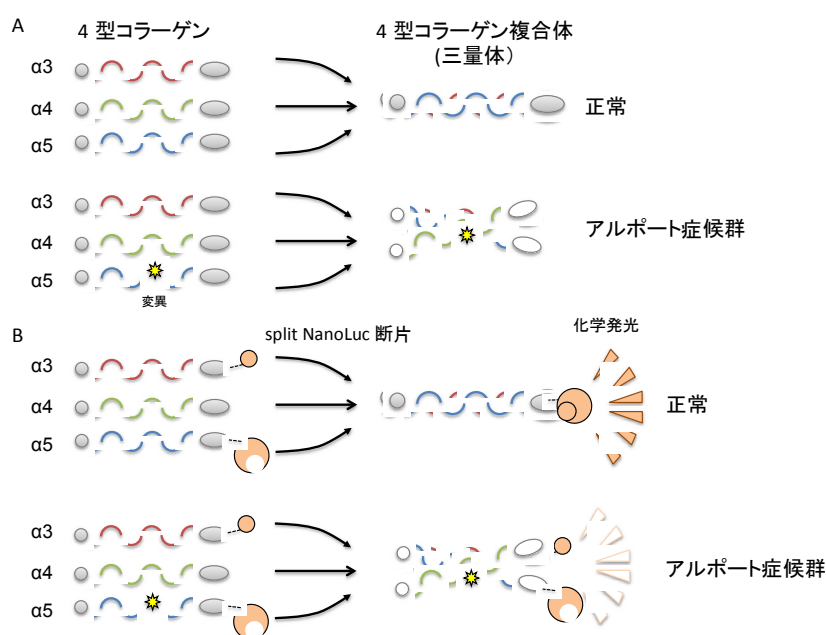


図 1. 4 型コラーゲンの複合体 (三量体) 形成とそのモニタリングシステム

(A) 4 型コラーゲンは $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ が上記のように決まった組み合わせで複合体 (三量体) を形成し、基底膜の構成成分となり、正常に機能します。

(B) Nano luciferase 断片を融合することで $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ の三量体を発光の強さで測定することができます。

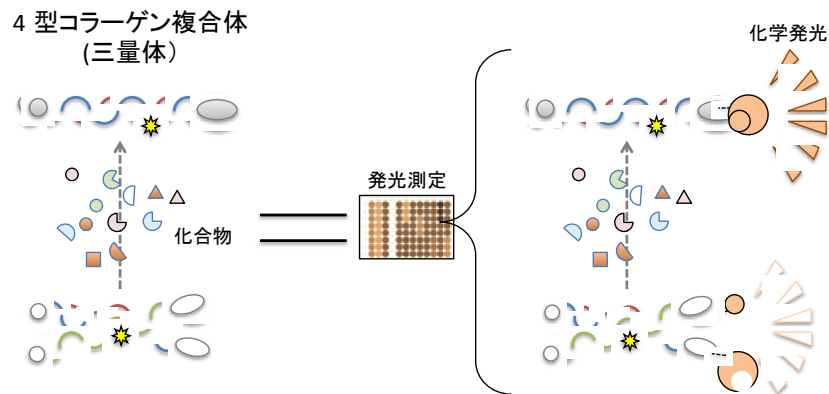


図 2. アルポート症候群の原因タンパク質を標的とした治療薬探索

アルポート症候群の 4 型コラーゲン $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ は三量体を形成することができません。そのため、三量体の形成を改善する化合物の発見により、原因を正す治療薬の開発に繋がります。本研究により、4 型コラーゲン $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ が正しく機能しているかを発光測定によって評価できるようになりました。すなわち、三量体の形成に応じて測定される発光を促進する化合物を見つけ出すことにより、4 型コラーゲン $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ の三量体形成を促進する化合物を同定することができます。

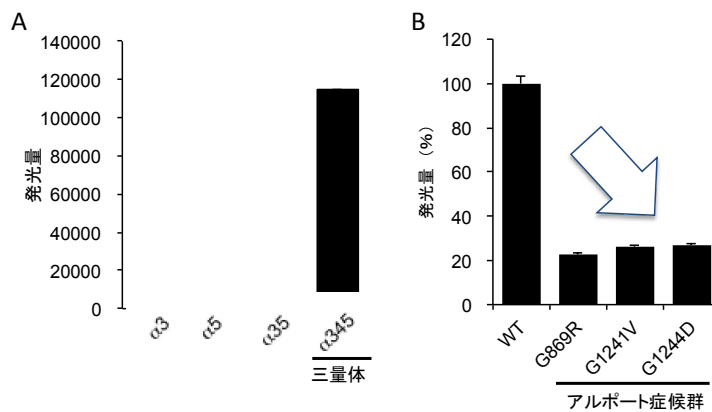


図 3. 臨床で報告のある変異 $\alpha 5$ 鎖の三量体形成の評価

- (A) 4 型コラーゲン $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ を細胞に発現させると、 $\alpha 345$ 三量体が形成される条件でのみ著しい発光を検出しました。
- (B) アルポート症候群で報告のある変異を持った $\alpha 5$ は正常型 (WT) と比べて三量体の形成量が低下しました。このことは、本評価系を用いてアルポート症候群でみられる 4 型コラーゲンの機能異常を評価できることを示唆します。

【用語解説】

* luciferase (ルシフェラーゼ) :

ホタルなどの生物発光に関わる酵素の総称。生物由来の発光を利用して、生物学や医学研究の様々な分析や評価に利用されます。Nanoluciferase は深海エビ由来の生物発光です。split Nanoluciferase では、分割された大小2つのルシフェラーゼ分子の断片 (LgBit と SmBit) をそれぞれ標的タンパク質と融合させて発現させ、タンパク質間の相互作用が起こると、分割されていたルシフェラーゼ分子の活性が復活することによって、明るい光を生じます

【論文名】

A split-luciferase-based trimer formation assay as a high-throughput screening platform for therapeutics in Alport syndrome

【著者名・所属】

Kohei Omachi,^{1,2} Misato Kamura,^{1,2} Keisuke Teramoto,^{1,2} Haruka Kojima,¹ Tsubasa Yokota,¹ Shota Kaseda,^{1,2} Jun Kuwazuru,¹ Ryosuke Fukuda,¹ Kosuke Koyama,¹ Shingo Matsuyama,¹ Keishi Motomura,¹ Tsuyoshi Shuto,¹ Mary Ann Suico,¹ and Hirofumi Kai^{1,2}

¹Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences

²Program for Leading Graduate School “HIGO (Health Life Science: Interdisciplinary and Global Oriented) Program”, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto City 862-0973, Kumamoto, Japan

【掲載雑誌】

Cell Chemical Biology

【URL】

[http://www.cell.com/cell-chemical-biology/fulltext/S2451-9456\(18\)30043-6](http://www.cell.com/cell-chemical-biology/fulltext/S2451-9456(18)30043-6)

【doi】

10.1016/j.chembiol.2018.02.003

【問い合わせ先】

熊本大学大学院生命科学研究部(薬学系)

担当: 甲斐広文

電話: 096-371-4406

e-mail: hirokai@gpo.kumamoto-u.ac.jp