

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名： フェニル酪酸ナトリウムの利胆作用に関する臨床エビデンスに立脚した難治性肝内胆汁うっ滞の新規創薬ターゲットの創出

Creation of novel drug target for refractory intrahepatic cholestasis based on clinical evidence regarding choleric action of sodium phenylbutyrate

研究開発実施期間：2017年5月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：林 久允

Hisamitsu Hayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 大学院薬学系研究科 助教

The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor

II 研究開発の概要

(1) 研究開発の目的

研究開発代表者は、尿素サイクル異常症の治療薬であるフェニル酪酸ナトリウム (NaPB) が、胆汁酸トランスporter-Bile salt export pump (BSEP) の細胞膜発現量を増強する作用を介し、利胆 (胆汁形成促進) 効果をもたらすことを独自に見出している。本薬効により、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (PFIC2; BSEP 欠損症) では十分な臨床効果が得られる可能性が明らかになった。本疾患に対する NaPB の効能追加を目的とした、「PFIC2 に対するフェニル酪酸ナトリウムの有効性・安全性を検証する治験 (UMIN000024753)」が現在実施中である。一方、他の肝内胆汁うっ滞性肝疾患を対象とした臨床試験では、肝機能検査値、臨床所見は改善したものの、薬効が弱い故に、自己肝生存期間が延長するほどの効果が認められなかった。遷延する肝内胆汁うっ滞に対しては有効な治療薬は確立しておらず、現在、肝移植が唯一の治療法である。肝移植は、極めて侵襲性の高い治療法であるとともに、経済的な負担も大きい。また、ドナー不足の問題も抱える治療法である。

以上より、本研究開発課題では、NaPB の臨床エビデンスを踏まえ、本薬剤の薬効発現機序に根差した基礎研究を実施し、難治性肝内胆汁うっ滞症の新規創薬ターゲット分子の同定、ひいては肝移植を代替する NaPB より高活性の医薬品創出の端緒を開くことを目的とする。

(2) 研究開発項目

研究開発代表者らは、NaPB が肝実質細胞の毛細胆管側膜に発現する胆汁酸トランスporter-BSEP の発

現量を増強し、利胆作用を創出することを見出している。また、本薬剤による BSEP の発現増強は、細胞膜に発現する BSEP のユビキチン(Ub)化を基点とした分解機構の阻害に起因することも確認している。本研究開発課題では、細胞膜上 BSEP の Ub 化に関わる分子群、ひいては難治性肝内胆汁うっ滞の新規創薬ターゲットを同定することを目的とする。

1) 細胞膜で生じる BSEP のユビキチン(Ub)化を担う酵素群の探索

BSEP の細胞膜発現量を指標とした評価系を用い、各種ライブラリーを対象としたスクリーニングを実施する。また近接依存性標識法、定量的プロテオミクスを応用し、マウス肝臓内で BSEP と相互作用し得るタンパク質群を網羅的に同定する。これらの解析で取得した Ub 化関連遺伝子群に関し、細胞膜に存在する BSEP の Ub 化、分解速度、発現量に及ぼす影響を評価する。作用が認められた遺伝子については、遺伝子ノックアウトマウスを作出する。

2) 難治性肝内胆汁うっ滞に対する創薬ターゲット候補分子の探索

1)にて作成した遺伝子ノックアウトマウスを解析し、BSEP の発現量、胆汁酸の胆汁排泄活性(BSEP 機能)、胆汁流量(BSEP の生理的機能)を評価する。また本マウスに種々の胆汁うっ滞誘導刺激を施し、胆汁うっ滞性肝疾患の発症、病態進展に対する当該遺伝子の影響を検証する。

(3) 研究開発の成果

1) 細胞膜で生じる BSEP の Ub 化を担う酵素群の探索

①ライブラリースクリーニング

蛍光免疫染色法を活用し、肝癌由来不死化細胞株において BSEP の細胞膜発現量を直接的に測定できる実験系(ハイコンテンツ解析法)を確立した。本解析法を high throughput 化した後、各種ライブラリーをスクリーニングし、12 の陽性遺伝子を同定した。

②インタラクトーム解析

ビオチンリガーゼを融合させた BSEP を肝実質細胞に発現するマウスを作出し、当マウスの肝実質細胞内で BSEP の近傍に存在するタンパク質群をビオチン標識した(近接依存性標識法)。次にビオチン標識タンパク質群をストレプトアビジンを用いて回収し、LC-MS/MS による定量的プロテオミクス解析を実施した。すなわち、近接依存性標識法と定量的プロテオミクス解析を応用し、マウス肝臓内で BSEP と相互作用し得るタンパク質群を網羅的に同定した。その結果、Ub 化反応に関わるタンパク質を包含する265種類のタンパク質が同定された。

③肝細胞由来培養株を用いた検証実験

①、②で見出した遺伝子群/タンパク質に関し、細胞膜に存在する BSEP の Ub 化、分解速度、発現量に及ぼす影響を肝癌由来不死化細胞株を用いて検討した。その結果、機能阻害により BSEP の細胞膜発現量、機能を増強する4遺伝子を見出した。各遺伝子のノックアウトマウスを委託作出、あるいは供与依頼により入手した。

2) 難治性肝内胆汁うっ滞症に対する創薬ターゲット候補分子の探索

1)③で見出した4遺伝子は何れも分子機能、生理学機能は未解明である。遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、機能阻害により、BSEP の細胞膜発現量、機能が増強する分子、すなわち難治性肝内胆汁

うっ滞に対する創薬ターゲットに資する分子の同定に成功した。

(4) 今後の方向性

本研究開発課題で見出した、難治性肝内胆汁うっ滞症に対する創薬ターゲットに資する分子を対象とした創薬研究を製薬企業と連携して実施する。

By drug-repositioning study, we have found that sodium phenylbutyrate (NaPB), an approved drug for urea cycle disorders, had novel pharmacological effect to facilitate bile flow formation (choleretic action). Aim of this project is to identify new drug target for refractory intrahepatic cholestasis, a condition where bile flow is severely decreased, based on our basic and clinical evidences regarding the choleretic action of NaPB, and to pave the way to develop the world's first medication for refractory intrahepatic cholestasis instead of liver transplantation (LTx). The details are described below.

There are many kinds of pediatric and adult liver diseases which could be improved by treatment of refractory intrahepatic cholestasis. However, the only therapeutic approach currently available for refractory intrahepatic cholestasis is LTx. Therefore, the development of new, less invasive medical therapy is of the highest priority. Bile salt export pump (BSEP), a transporter expressed in the canalicular membrane of hepatocytes, mediates biliary excretion of bile acids, which provides osmotic driving force for bile formation. We searched for agents to increase the cell surface expression of BSEP and identified NaPB. In the patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2), a refractory pediatric liver disease, therapy with NaPB markedly increased the abundance of BSEP in the liver and improved biochemical liver tests and liver histology. Clinical trial (UMIN000024753) to develop the drug for PFIC2 is underway. The choleretic action by NaPB is not so potent, which causes poor medication adherence due to the large amount of its effective dosage. Therefore, development of more potent choleretic agent than NaPB is indispensable to establish the comprehensive medication for liver diseases with refractory intrahepatic cholestasis.

Based on our previous finding that the choleretic action of NaPB was derived from inhibiting ubiquitination and subsequent degradation of the cell surface-resident BSEP (csBSEP), this project identifies molecules responsible for the ubiquitination of csBSEP, validates their availability for drug target for refractory intrahepatic cholestasis using genetically engineered mice, and launches new project of drug discovery targeting the molecules together with pharmaceutical company.

We developed two experimental systems, high content analysis and quantitative proteomics, to find the candidate molecules. The former is for library screening and the latter is to understand molecules that can interact with BSEP in liver. Both systems found dozens of positive molecules. After choosing potent molecules by existing information like molecular function and tissue and cellular distribution, we tested whether these genes affect ubiquitination, degradation, and expression of csBSEP in immortalized hepatocyte cell lines and identified four uncharacterized genes. Next, we constructed gene knockout mice and examined ubiquitination status, expression, and function of BSEP on the canalicular membrane of hepatocytes. Through these analyses, we have identified a potent drug target for refractory intrahepatic cholestasis. Based on this finding, collaboration project with pharmaceutical company is underway to develop the drug.