

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）線維化疾患治療薬創出のための、コラーゲン分泌阻害化合物スクリーニングシステムの構築

（英語）Development of a screening system for collagen secretion inhibitory compound for the therapeutics of fibrotic diseases

研究開発実施期間：2016年10月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語） 永田 和宏

氏名：（英語） Kazuhiro Nagata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）京都産業大学 タンパク質動態研究所、総合生命科学部／所長、教授

（英語）Kyoto Sangyo University Institute for Protein Dynamics, Faculty of Life Science／Director and professor

## II 研究開発の概要

コラーゲンの異常蓄積を特徴とする線維化疾患は、効果的な治療法がなく、予後の極めて悪い病態である。肝硬変、特発性肺線維症、腎線維化など、難治性の線維化疾患は極めて多く、有効な治療戦略が求められている。我々はコラーゲン特異的分子シャペロンHsp47を発見し、コラーゲンの正常な合成には、Hsp47とプロコラーゲンの相互作用が必須であること、線維化に伴い、Hsp47が劇的に誘導されることを発見した。さらに、Hsp47の発現をRNA干渉法によって抑えると、コラーゲンの蓄積が減少し、線維化が抑制されることを報告し、これを機にHsp47と線維化に関する研究が世界的に大きく発展した。札幌医科大学と日東電工株式会社は、Hsp47に対するsiRNAを、線維化に関わる活性化星細胞特異的に取り込ませ、コラーゲンの分泌を抑制する治療法の開発に取り組んでいる。Hsp47siRNA法の有効性は既に実証され、Bristol-Myers Squibbのサポートのもと、米国でPhase II研究が実施されている。このようにHsp47を標的とした線維化疾患の治療法は極めて有望である。

Hsp47は小胞体のなかでプロコラーゲンと結合して、その三重らせん構造形成を助けるが、我々はこの結合を阻害する低分子化合物を用いれば、コラーゲンの分泌を阻害できることを実証した(Ito et al J Biol Chem)。Hsp47とコラーゲンの相互作用を阻害する低分子化合物をハイスループットでスクリーニングできる新規手法の開発と、これまでに得たHsp47への阻害活性を持つ低分子化合物をヒット化合物として、より阻害活性の強い誘導物展開をはかり、有効性を確認後、動物実験に供することを開発の目的とした。

今回、化合物評価のツールとして、新たに三つの方法を開発した。一つは*in vitro*で簡便にHsp47-コラーゲンの相互作用を検出する方法であり、これまではSPR法(Biacore)を用いて、相互作用阻害を検出していたが、ハイスループット性に難があったため、今回、Hsp47-GFPを精製し、コラーゲンをコートした96 wellプレート

上で相互作用を検出する方法を開発した。この方法は安いコストでハイスループットに阻害能を *in vitro* で検出することができる。

二つ目に、細胞におけるコラーゲンの三重らせん構造を評価する方法を開発した。細胞における化合物の評価はマウスへの投与の前段階としてきわめて重要であるが、Hsp47 阻害能の細胞における評価法はこれまで確立されていなかった。正しい三重らせん構造を形成したコラーゲンはトリプシン消化法に対し、耐性を示すが、Hsp47 欠損細胞から分泌されたコラーゲンは三重らせん構造が緩んでいるために、トリプシンにより速やかに分解される。この違いを利用し、Hsp47 阻害能を評価することができる。今回、放射性同位体を用いずに、トリプシン消化に耐性のコラーゲンの量を測定することで、コラーゲンの三重らせん形成を 1 プレート上で評価可能な方法を考案した。詳細は割愛するが、分泌されたコラーゲンをトリプシン消化し、消化されなかったコラーゲンを 100 kDa 以下の分子を透過させる膜にトラップすることを原理とした手法である。これによって微量でもコラーゲン量に応じて発光シグナルを得ることに成功し、 $\alpha, \alpha$ -dipyridyl というコラーゲンの三重らせん形成を阻害する薬剤を投与すると発光量は減少した。この系を用いて Hsp47 阻害剤添加時のコラーゲンの三重らせん形成を調べたところ、シグナルの減少が見られ、評価系として有用であることが示された。この方法による細胞から分泌されたコラーゲンの三重らせん形成の評価法は新規のものである。

三つ目が、小胞体内でのタンパク質間相互作用 (PPI) の検出システムの確立である。我々は Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物の探索を行い、*in vitro* でそれら相互作用を阻害し、細胞でコラーゲンの三重らせん構造の不安定化を引き起こす低分子化合物を得ていたが、この化合物が実際に小胞体内でコラーゲンと Hsp47 の相互作用を阻害しているかは不明であった。PPI 阻害剤の場合、細胞での PPI 阻害の検出は *in vivo* への以降前に不可欠な評価項目である。今回、化合物の添加を考慮し、光を照射しない BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) の系を構築した。用いる試薬が全て膜透過性であるため、生きた細胞内で PPI を検出できる。種々の条件検討を経て、Hsp47-コラーゲンの BRET の系を作成した。この系で、コラーゲンとの結合に重要な Hsp47 上のアミノ酸の変異により、BRET シグナルが減少し、さらに、Hsp47 はコラーゲンの三重らせん構造に結合するが、三重らせん構造形成を阻害するとシグナルが減少した。このシステムを用いて、Hsp47 阻害化合物の評価を行った。がん抑制因子 p53 は MDM2 と結合することが知られており、この PPI ペアを対照ペアとして用いた。Hsp47 阻害剤を細胞に添加すると p53-MDM2 間の BRET の値はほぼ変化しなかったが、Hsp47-コラーゲン間の BRET シグナルの減少が観察された。これらの結果より、Hsp47 阻害化合物が小胞体内で確かに Hsp47-コラーゲン相互作用を阻害していることを示した。BRET を用いて細胞内で PPI を検出する方法はこれまでもいくつかの報告があるが、小胞体内という閉ざされた細胞内領域 (オルガネラ) での相互作用を検出したのは初めてである。この方法は Hsp47-コラーゲン間のみならず、小胞体における分泌タンパク質とその結合タンパク質との相互作用の検出に適用可能であり、その波及効果はきわめて大きい。

申請者らは、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害することによって、コラーゲンの分泌を阻害し、コラーゲン線維の細胞外への蓄積を抑える低分子化合物をすでに得ていた。本化合物に治癒効果があることは確実であるが、用いるときの濃度などから、より効率の良い化合物を探索する必要がある。ヒット化合物の誘導物展開を行い、より効果の高い化合物を探索することを目的とした。まず、化合物結合部位の情報を得るために、核磁気共鳴 (NMR) 法を行った。Hsp47 の Val と Leu に安定同位体標識を行い、コラーゲンペプチド (CLP) 添加時と Hsp47 阻害ヒット化合物添加時の NMR のシグナル変化を観察したところ、CLP とヒット化合物のシグナルがオーバーラップしていたことから、Hsp47 阻害化合物はコラーゲンの結合部位付近に競合阻害的に結合していることが分かった。さらに、Hsp47 の変異体を用いて、NMR のシグナルの帰属を行い、化合物の Hsp47 への結合部位の情報を収集した。その結果、ヒット化合物が Hsp47 のコラーゲンに結合しない 1 アミノ酸置換変異体の変異部位近傍に結合してタンパク質間相互作用阻害活性を示すことを明らかにし、候補化合物の作用機序及び薬理作用の検証を進める上での重要な知見を得た。それらの情報を基に、セットアップ企業の東レ株式会社の協力のも

と、誘導体展開を行い、*in vitro*でこれまでより阻害活性が1オーダー高い化合物を得ることに成功した。さらに、東レ株式会社において、薬物代謝試験、体内動態試験を踏まえ、誘導体の構造を改善し、最終的に、少なくとも静脈内投与により線維症治療効果を疾患動物モデルで薬効発現が期待できる候補化合物を取得することに成功した。

本学、京都産業大学の永田研究室と東レ株式会社は、互いに緊密な連携を維持することによって、単独では得られなかった大きな成果を得ることに成功した。両者は、主として京都において定期的に会合を持ち、それぞれのデータを持ち寄って、それらについて議論を深め、改善策を模索しながら、お互いの役割分担にそって次の実験を策定するなど、有益な示唆を得ることができた。共同研究は、実験手技の詳細について、東レから研究者を派遣し、京都産業大学において種々の実験手技を確認し、両者の手技と制度を一定化することによって、今後のデータの信頼性を高めるところからスタートした。さらに京都産業大学において確立した、新しいスクリーニングシステムを、東レに伝達し、東レにおいてこれらの手法を用いて、東レ自身の所有している化合物ライブラリーのスクリーニングを行なえる態勢を整えた。また京都産業大学においてHsp47の阻害効果を認めている化合物の誘導体を東レ側で作成し、その活性を測るとともに、活性のある誘導体を大学側にフィードバックし、細胞レベルでの活性測定を行った。これによって、新たな化合物を得ることができ、その化合物を東レに戻すことによって、溶解度チェックのほか、薬物動態評価を行って、静注可能な化合物について、動物試験に取り掛かった。予備的データながら、線維化モデルマウスにおいてHsp47阻害化合物は線維化抑制効果を発揮しており、このプロジェクトはACT-Mに引き継がれ、臨床への応用を目指すこととなった。

以上のように、「学」において開発できた手法を「産」が利用し得る体制を構築することに成功し、そのシステムを用いて、「学」だけでは成就不可能であった、新たな誘導体の開発という大きな成果が得られたと考えている。

## 【英文研究概要】

A fibrotic disease is characterized by abnormal accumulation of collagen. Many patients are suffering from fibrotic diseases, such as cirrhosis, idiopathic pulmonary fibrosis and renal fibrosis, and an effective treatment strategy is required. We discovered collagen-specific molecular chaperone Hsp47 that is essential for collagen synthesis. Hsp47 interacts with procollagen in the endoplasmic reticulum (ER) and is induced dramatically with onset of fibrosis. We reported suppression of Hsp47 expression by RNA interfering method reduced collagen accumulation and suppressed fibrosis. Since then the research of Hsp47 on fibrosis greatly developed in the world. Sapporo Medical University and Nitto Denko Corporation developed a therapeutic method that suppresses collagen secretion by specifically incorporating siRNA against Hsp47 into activating stellate cells involved in fibrosis. Thus, Hsp47 is very promising target for treatment of fibrotic diseases.

Our fundamental concept in the ACT-MS project is searching for small molecule compound that inhibits the interaction between Hsp47 and collagen. Based on this concept the first objective is to establish a highly efficient screening system of Hsp47 inhibitors. The second objective is to find more efficient compounds from derivatives of Hsp47 inhibitor we already discovered.

The protein-protein interaction (PPI) of Hsp47 with procollagen is essential for collagen synthesis. The SPR method, which is a conventional method for detecting the PPI, is not suitable for comprehensive screening of large amounts of compounds. Therefore, we tried to develop an evaluation method of the inhibitory effect on binding Hsp47-GFP incubated with the candidate compounds to collagen-coated 96-well plate. The purified recombinant Hsp47-GFP was added on collagen coated plate in a concentration-dependent manner, and a calibration curve was prepared using a fluorescence plate reader. We also examined the wash conditions and succeeded in establishing a method for conveniently detecting the interaction between Hsp47 and collagen.

Verifying the inhibitory effects of a compound at the cellular level is extremely important as an intermediate evaluation before animal experiments. But, currently there is no way to screen the compound's ability to inhibit Hsp47 at the cellular level. We established a novel evaluation method that can investigate secretion of collagen molecules correctly forming triple helix because in Hsp47 knocked out cells the triple helical structure of procollagen is not correctly folded. We succeeded in detecting a little amount of triple helix of collagen resistant to trypsin digestion as a luminescence.

We have verified whether Hsp47 inhibitor inhibits the interaction between collagen and Hsp47 within the ER. Previous methods for detecting these interactions are irreversible, thus, correct PPI dynamics cannot be detected. Considering the use for fluorescent compounds, we applied BRET for the Hsp47-collagen interaction. After some optimizations, the BRET signal of Hsp47-collagen was reflected the state of interaction in the ER. Hsp47 inhibitor treatment reduced the BRET signal. Thus, we detected the interaction dynamics of collagen and Hsp47 in the ER for the first time and confirmed the inhibition of the interaction by the hit compounds.

To find more efficient compounds from derivatives of Hsp47 inhibiting compound we obtained the structural information using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analysis, which revealing that the compound competitively binds to the collagen-binding site of Hsp47, which could provide a basis for designing more effective therapeutic drugs for managing fibrosis. Collaborated with our set up company, TORAY, we obtained the more specific derivatives which has good in vivo mouse pharmacokinetic

parameters. Finally, this project is continued as ACT-M, those goal is to produce the drug for many patients with fibrotic diseases.