

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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)

(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

ACceleration Transformative research for Medical innovation (ACT-MS)

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

研究開発担当者

所属 役職 氏名：

(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 永田和宏

(英語) Kyoto Sangyo University Institute of Protein Dynamics, Faculty of Life Science, / Director, Professor Kazuhiro Nagata

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究

開発課題名：

(日本語) Hsp47 とコラーゲンの相互作用を特異的に阻害する低分子化合物のスクリーニング法の確立

(英語) Establishment of screening method for small molecules that specifically inhibit the interaction between Hsp47 and collagen

研究開発分担者

所属 役職 氏名：

(日本語) 京都産業大学 京都産業大学 タンパク質動態研究所 研究員 伊藤進也

(英語) Kyoto Sangyo University Institute of Protein Dynamics, Postdoctoral Researcher, Shinya Ito

分担研究

開発課題名：

(日本語) すでに得ている候補化合物の誘導物展開

(英語) Evaluation of the Hsp47 inhibitor derivatives

研究開発分担者

所属 役職 氏名：

(日本語) 京都産業大学京都産業大学 タンパク質動態研究所、総合生命科学部 研究助教 潮田亮

(英語) Kyoto Sangyo University Institute of Protein Dynamics, Faculty of Life Science,  
Assistant Professor, Ryo Ushioda

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

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、非可逆的進行を特徴とする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。この方法の有効性は既実証され、臨床展開のために 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。

本研究開発では、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物の探索という基本概念に基づき、有望な化合物を高効率にスクリーニングするためのシステムの構築を第一の目標に掲げ、さらに、すでに得ている Hsp47 阻害化合物の構造情報から、新たな誘導体を合成し、さらに効率のいい化合物を見出す努力を行うことを第二の目標に掲げている。

Hsp47 はコラーゲンと相互作用することで、コラーゲンの分泌を促進し、線維化疾患の場合には増悪因子としての機能を発揮する。従来用いていた相互作用検出法である SPR 法は、大量の試料を網羅的にスクリーニングするには適していなかった。そこで 96 穴プレートにコートしたコラーゲンに阻害剤候補化合物とインキュベートした Hsp47-GFP を結合させ、Hsp47-GFP 量を検出する阻害効果の評価法の開発を試みた。精製したリコンビナント Hsp47-GFP を濃度依存的に添加し、検量線を作成した。コラーゲンに結合しない Hsp47-GFP (L353R 変異) を negative control として使い、アッセイに最適な濃度を決定した。Wash の条件も検討し、Hsp47 とコラーゲンの結合を簡便に検出する方法の構築に成功した。また、細胞レベルで化合物の阻害能を検証することは、化合物の細胞への導入効率、毒性の確認など動物実験に向けた中間評価として極めて重要であるが、現在、細胞レベルで化合物の Hsp47 阻害能をスクリーニングする方法は存在しない。Hsp47 が欠損した細胞では、コラーゲンの 3 重らせん構造が緩み、正しいコラーゲン線維が形成できないことを既に報告している。大量のスクリーニングを念頭に、放射性同位体を用いずに、正しく 3 重らせんを形成したコラーゲン分子の細胞外への分泌を検討できる新規 Hsp47 阻害能評価法の開発を試みている。H28 年度の成果として、Azidohomoalanine を用いて、トリプシン消化耐性のコラーゲンの 3 重らせんの検出に成功し、細胞内で Hsp47 の機能を評価するシステムの基盤形

成に成功した。

我々は、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 Col003 をすでに得ている。動物実験を行うには、より効率の良い化合物を探索する必要がある。Col003 の誘導物展開を行い、より効果の高い化合物の探索を進めている。現時点で、Col003 の誘導物では既存の阻害能より優れているものは見つかっていないが、新たにスクリーニングを実施した結果、CS77 という Col003 とは骨格の異なり、かつ Col003 よりも活性が高いと考えられる新規の Hsp47 阻害化合物を同定した。今後、CS77 の誘導物の活性測定も行っていく。

A fibrotic disease is characterized by abnormal accumulation of collagen in various tissues. While many patients are suffering from fibrotic diseases, such as cirrhosis, idiopathic pulmonary fibrosis and renal fibrosis, effective treatment strategies have not been so far developed. We discovered collagen-specific molecular chaperone Hsp47 that is essential for collagen biosynthesis. Hsp47 interacts with procollagen in the endoplasmic reticulum and is induced dramatically with fibrosis. We previously reported that the suppression of Hsp47 expression by RNA interfering method reduced collagen accumulation and suppressed the progression of fibrosis. Since then researches on Hsp47 and fibrosis greatly developed in the world. Sapporo Medical University and Nitto Denko Corporation developed a therapeutic method that suppresses collagen secretion by specific targeting of siRNA against Hsp47 to activated stellate cells which is involved in fibrosis. Thus, Hsp47 is a promising target for treatment of fibrotic diseases.

Our fundamental concept in this 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 binding of Hsp47 with procollagen is essential for collagen synthesis. The SPR method, which is a conventional interaction detection method, is not suitable for comprehensive screening of large amounts of compounds. Therefore, we tried to develop an evaluation method for the inhibition of Hsp47-GFP binding with collagen coated on a 96-well plate in the presence of candidate compounds. 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 finally succeeded in constructing the detection system for the interaction of 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 high throughput screening system examining whether the compound can actually inhibit the interaction of Hsp47 with procollagen within the cells. We are developing a novel evaluation method that can investigate secretion of collagen molecules correctly forming triple helix without radioisotope because in Hsp47 knocked out cells the triple helical structure of procollagen is not correctly folded. We succeeded in detecting the triple helix of collagen resistant to trypsin digestion using L-azidohomoalanine.

We have already obtained a small molecule Col003 that inhibits collagen secretion and suppresses

collagen accumulation in extracellular matrix by inhibiting the interaction Hsp47 with collagen. It is necessary to search for a more efficient compound before experiments of fibrosis model mouse. At the present time, we didn't obtain Col003 derivatives that are superior to the existing inhibitory ability, but as a result of performing a new screening, novel Hsp47 inhibitor CS77 was identified. CS77 showed Hsp47 inhibitory activity more than Col003. We are measuring the inhibitory activity of derivatives of Col003 and CS77.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1) Shinya Ito; Kazuhiro Nagata :

Biology of Hsp47 (Serpine H1), a collagen-specific molecular chaperone

***Seminars in Cell and Developmental Biology*** 62:142-151(2017)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし