

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	生体リズム学を基盤とした時間医薬イノベーション
研究機関・部局・職名	京都大学・薬学研究科・准教授
氏名	土居 雅夫

【研究目的】

生体時計 Biological Clock は、地球の自転にともなう昼夜の規則正しい変動に基づき形成された、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。本研究では、生体時計の異常がもたらす病態生理学的帰結を求め、その根本的治療法を開発するための科学的根拠と創薬ターゲットを同定することを目的に掲げ、「生体リズムを積極的に変更・調整するための医薬品開発」（課題 1）と「生体リズムの破綻がもたらす疾病の分子メカニズムの解明およびそのヒトへの応用」（課題 2）という研究課題に挑戦した（図 1）。

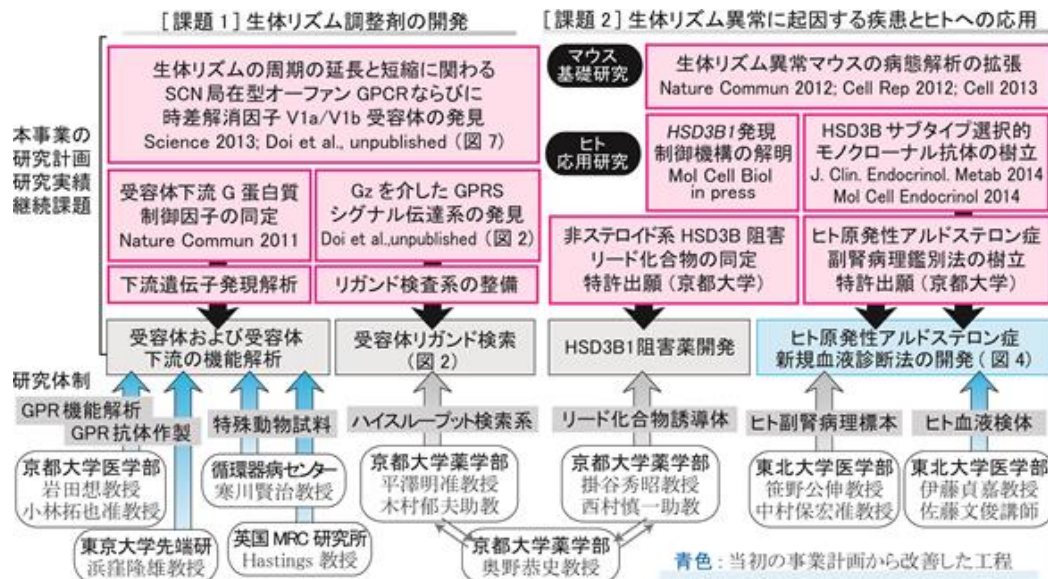


図 1. 本補助事業における研究計画ならびに研究実施体制。事業完了時における研究実績 (太枠赤ボックス) と継続課題 (細枠ボックス) を示す。青色は事業開始時の計画から改善した工程

【課題 1】 生体リズム調整薬の開発: 全身の多様な生理機能は本来ならば 24 時間リズムとして規則正しく調律されるが、その全てを統率する時計のセンターが脳内の視交叉上核 (SCN) と呼ばれる神経核にある。従って、生体リズム調整薬を開発するにはこの SCN ニューロンをいかに操るかが鍵となる。事業者はこの課題に対し、事業開始時に既に、SCN においてリズム調節能を有する新規のオーファン G 蛋白質共役受容体を 1 種類見出していた。そこで当研究では、この格好の創薬ターゲットに対

するリガンド物質の同定と本受容体の機能解析、ならびに新たな受容体もしくはそのシグナル下流の制御因子の発掘を目的に下記を計画した。

1-1) リガンド検索：生体リズムの周期の長さを規定する SCN 局在型オーファンGPCR に対するリガンド検索。

1-2) KO マウス解析：新規 GPCR およびそれに関連する G 蛋白質制御因子の発掘、並びに受容体欠損マウス SCN を用いた DNA マイクロアレイ解析による G 蛋白質シグナル下流分子の探索。

1-3) SCN 時計リズム検査：GPR シグナル欠損 *Per1* レポータートランスジェニックマウス SCN スライス培養において個々の細胞振動の時空間プロファイルを追跡し、神経ネットワークの特性と異常ニューロンの特定を行う。

【課題 2】生体リズム異常が引き起こす疾病の解明とヒトへの応用：生体リズムの異常という点、これまでは睡眠障害やそれに伴う精神疾患との関連が指摘されてきたが、事業者はそこから一歩進んで生体リズムの異常が高血圧症の発症にも関与することを見出した（リズム疾患のパラダイムシフト）。そこで本研究ではヒトへの応用を考え、当知見をヒトの病態の理解にまで昇華させることを目標とした。事業者は生体リズム異常と高血圧を結びつけるリスク分子（後述）を既にヒトとマウスにおいて同定しており（Nature Med 2010）、これを基にした「原因不明の高血圧に対する診断法」や「新しい作用機序をもった降圧薬」の開発に挑戦する下記の計画を立てた。また高血圧症以外の疾病群についてマウスを用いて生体リズム異常との関連調査を計画した。

2-1) 生体リズム異常マウス病態解析の拡張（マウス編）：高血圧以外の疾病と生体リズム異常の関係を調査。

2-2) ヒト HSD3B1 サブタイプ選択的阻害薬の開発（マウスからヒトへ編）：ヒトの HSD3B (3b 水酸化ステロイド脱水素酵素) には HSD3B1 と HSD3B2 の二種のアイソザイムがあり、副腎では HSD3B2 のみが存在するとされてきたが、本事業に先立ち我々は、ヒトの副腎皮質のアルドステロン産生細胞（球状層）においては従来の酵素とともに「分子時計によって制御される HSD3B1」が発現することを示した（Nature Med 2010）。リズム障害によって高血圧を引き起こすのはこの球状層の HSD3B1 だと考えられ、またリズム障害でなくても高アルドステロン血漿の治療目的にはこの HSD3B1 の発現の空間特異性（球状層特異的）と時間特異性（サーカディアンリズム）が副作用の少ない新しい機序の降圧剤を開発する上で有利となる。そこで HSD3B1 阻害薬の研究開発を計画した。

2-3) ヒト *HSD3B1* 遺伝子発現制御解析（マウスからヒトへ編）：ヒト副腎アルドステロン産生細胞による分子解析。

2-4) 原発性アルドステロン症副腎におけるヒト HSD3B1 発現解析（マウスからヒトへ編）：非常に興味深いことに、ヒト難治性特発アルドステロン症の患者のアルドステロン産生細胞では HSD3B 抗体に対する免疫陽性反応が亢進していることが知られていた。ところがこの HSD3B の正体を特定するには 2 種のアイソザイムの極度の構造的類似性（後述）が障害となっており、そのため実際の診断にはこれまで応用できなかった。本研究では、この問題を克服すべく、質量分析ないしは超選択的モノクローナル抗体の樹立による新たな選別法を確立し、これによって原因不明の難治性

特発アルドステロン症に対する初のバイオマーカーを世界に先駆け同定する計画を立てた。

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
<p>① 総合所見</p> <p>本事業では2つの課題に取り組んだ。課題1：生体リズムを積極的に変更・調整するための医薬品開発、課題2：生体リズムの破綻がもたらす疾病の分子メカニズムの解明およびそのヒトへの応用である。課題1に関しては、脳内の視交叉上核(SCN) (生体の時計リズムを統率する時計センター)でリズム調節能を有するオーファンG 蛋白質共役受容体の内在性リガンドをHPLC分画中に発見した。また、ノックアウトマウスの解析から、新たに周期の延長に関わるオーファン受容体 GPRL とその下流の制御分子、さらには時差ボケ解消因子の受容体を同定することに成功した。すでに発見していた GPRS とともに生体リズムの延長と短縮に関わる両者の受容体を見つけたことになり、これらのリガンドを発見できれば中枢時計を標的とした長短自在の制御が可能となる。さらに、目覚めの時刻を規定する phase-leading cells を特定することにも成功した。</p> <p>一方、課題2では、生体リズムの異常によるアルドステロン症において、アルドステロン合成に関与する3β水酸化ステロイド脱水素酵素 (HSD3B) のアイソザイムの発現パターンの違いについての発見から、これまでできなかった本症の正確な鑑別診断を可能にする新規のモノクローナル抗体の樹立に成功した。さらに、当該抗体を用いた病理診断法はすでに東北大学病院をはじめ実際の臨床の現場においてスタンダードプロトコルとして適用されつつある(東北大は全国から最も多くの原発性アルドステロン症の症例が集められ病理検査を行う機関である)。</p> <p>さらに、RNAのメチル化が体内時計のスピードを調節する新たな制御系として機能することも発見した。これはエピトランスクリプトームという新たな概念である。診断法、および診断のためのツール開発や創薬標的の発見などから3件の特許出願をした。</p> <p>このように、本事業は総合的に見て、基礎生物学・基礎医学的研究に止まらず応用研究も行い非常に質の高い研究であると評価できる。</p>

② 目的の達成状況
・ 所期の目的が (<input type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった)

課題1について、脳内の視交叉上核(SCN)でリズム調節能を有するオーファンG 蛋白質共役受容体の内在性リガンドを HPLC 分画中に発見した(まだその精製や実体については不明)。また、ノックアウトマウスの解析から、新たに周期の延長に関わるオーファン受容体 GPRL とその下流の制御分子 RGS16、さらには時差ボケ解消因子の V1a/V1b 受容体を同定することに成功した。すでに発見していた GPRS とともに GPRL はそれぞれ生体リズムの短縮と延長に関わる両者の受容体であり、これらのリガンドを発見できれば中枢時計を標的とした長短自在の制御が可能となる。さらに、目覚めの時刻を規定する phase-leading cells(寝坊の原因につながる異常ニューロン)を特定することにも成功した。

一方、課題2については、時計遺伝子欠損マウスを用いて、生体リズムの異常が夜尿症や核酸代謝異常に関連することを明らかにした。また、核酸代謝異常のメタボローム解析から RNA のメチル化が体内時計のスピードを調節する新たな制御系として機能することも発見した。これはエピトランスクリプトームという新たな概念である。さらに、ヒトアルドステロン合成系酵素アイソザイム HSD3B1 選択的阻害剤のスクリーニングを行い非ステロイド骨格を持つ阻害剤の同定に成功した(特許出願済)。In vivo 評価のための HSD3B1 欠損動物の作成に成功したがそれ以上の進展はない(これが残された課題になる)。HSD3B1 遺伝子はアンジオテンシン II によっても制御されることを明らかにした。一方、原発性アンドロステロン症は、腫瘍性(手術摘出)と特発性(薬物治療)が知られているが両者の的確な鑑別診断法がなかった。本事業で両者を鑑別する特異抗体(PCT 特許出願)を作成し、それらが臨床的に使用されるまでになっている。

しかし、計画では、これら GPCR、合成酵素を標的とする創薬を目標に HTS 系と in silico 分子設計を共同研究で実施し、化合物によるリズム制御を目指しているが、今のところ HSD3B1 阻害薬シーズを見いだして特許を出願するに留まっており、「生体リズム調節剤」という目標が予定通りには達成できなかった。平成25年度研究計画書において、課題1について GPCR の機能解析はアカゲザルまで含めた遺伝子発現制御の解析などが計画されているが、GPCR リガンド探索について内因性リガンド探索以外の具体的な展開はなかった。課題2の HSD3B1 阻害薬については、これが in vitro あるいは in vivo においていかなる作用をもつのかなど、創薬という視点で重要なポイントが欠けており今後の課題である。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

既発表の RGS16 の機能をはじめ、これから発表されるであろう GPRL および GPRS の機能、あるいは HSD3B1 および 2 アイソザイムと病態との関連など、本研究代表者でなければ進展しなかったであろう先進的な知見が得られた。

本研究課題の目的(生体リズムの調整薬の開発)達成の研究に必要な抗 GPRS 抗体

の作成に成功した。本抗体は、GPRS の内因性リガンド同定に研究に役立つと考えられる。

さらに、生体リズム周期の短縮に関わる GPRS を同定した。また、夜尿症や肝臓での核酸代謝異常と生体リズム異常との関連を明らかにしたことなどが、当初の目的の他に得られた成果である。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

生体リズムと病態との関連について本研究者は世界をリードする若手の一人であり、当該研究領域に対して新しい分子メカニズムを明らかにしたことによって関連する研究分野の進展に寄与している。特に、RNA のメチル化が体内時計のスピードを調節する新たな制御系として機能することを発見し、エピトランスクリプトームという新たな概念を作り出したことは大きい。生体リズムと疾患との関連に着目して臨床診断や創薬に結びつけようとすることは、社会的、経済的課題の解決に向けて貢献しようとする意欲がうかがえる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究目的は、脳の中枢時計の機能解明と生体リズム異常と関連するアルドステロン症に取る高血圧症の病理機構解明の2つの柱からなる。いずれの研究も、国内外の有力な研究者との共同研究が研究の遂行に役立った。以上のことから、研究マネジメントは十分に発揮したと考えられる。

本研究課題において、オーファン G 蛋白質共役型受容体 (GPR) のシグナル下流の制御因子、RGS16 の発見と生体リズムに対する調節機能の発見、及び、異なるアルドステロン症における 3β 水酸化ステロイド脱水素酵素 (HSD3B) のアイソザイムの発現パターンの違いの発見など、当初の研究計画を上回る成果が上がっている。

本研究助成により、設備に調達された実験装置は、本研究課題の進展に対して、必須の装置であり、有効に機能している設備である。そして、将来的に、研究が発展した状況においても、基本的実験設備として、汎用性の高いものであると考えられる。このような例から、助成金は、有効に使用するための努力が感じられる。

研究成果は 14 編 (査読あり、*Cell*, *Cell Rep.*, *Science*, *Nature Commun.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* など)、特許出願 3 件。国民との科学・技術対話も十分に行われた。