

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08014

研究課題名(和文) フォールディング異常症治療薬を目指した化学シャペロンの構造活性相関研究

研究課題名(英文) Structure-Activity Relationship and Mechanistic Studies on Sodium 4-phenylbutyrate and its derivatives

研究代表者

奥田 勝博 (OKUDA, Katsuhiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00389115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：40種類の4PBA誘導体をデザインし、購入または有機合成した後、Na塩にした。各誘導体の活性についてシャペロン活性(3種)、細胞毒性、HDAC阻害活性およびLogD値(算出)を数値化し4PBAと比較したところ、4PBAよりシャペロン活性の強いもの、細胞毒性の弱いもの、HDACを阻害しないものなど様々な特性を見出した。上記各活性および13種類の遺伝子に対するmRNA発現量間の相関係数を求めたところ、相関の強いいくつかの因子が存在した。モデルタンパク質の系で評価したシャペロン活性と関して発現が相多くなる4つの遺伝子と、HDAC阻害活性に相関して発現が多くなる3つの遺伝子を見出した。

研究成果の概要(英文)：4PBA was valued its properties by 5 kind of assays. We have determined each criteria to compare the properties with those of other derivatives. Forty 4PBA derivatives were designed then purchased or synthesized as its sodium salt. The derivatives were applied for the assays. Coefficient of correlation values were calculated between some parameters and mRNA expression amount. Four and three genes correlated highly with chaperonic activity or HDAC inhibitory activity, respectively.

研究分野：創薬化学

キーワード：化学シャペロン 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

生体内のタンパク質メンテナンス機構の障害や変異、老化などの要因により、正しい三次構造が形成されなくなった(ミスフォールド)タンパク質の生成を伴う疾患はフォールディング異常症と呼ばれている。つまり、タンパク質のミスフォールディングを効率良く減少させる1つのメカニズムを明らかにすることで、多くの疾患の予防及び治療に新たな進展をもたらすことが考えられる。

Sodium 4-phenylbutyrate (4PBA) は、弱いヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として知られていた化合物であるが、化学シャペロンとして近年注目を浴びている。これまでにパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病のモデルマウスにおいて、4PBA がその症状を軽減することが報告され、フォールディング異常症治療薬としての期待が持たれている。

2. 研究の目的

本研究では4PBAを母化合物として系統的な構造活性相関を行い、化学シャペロン活性のみならず、Fig. 1に示した考えられ得る4PBAの作用に対して簡便なスクリーニングアッセイを選択して4PBA及びその構造類似体を用いて構造活性相関を行い、作用メカニズムの解明及びそれぞれの活性発現に必須な構造的特徴(ファーマコフォア)を見出すことを目的とする。

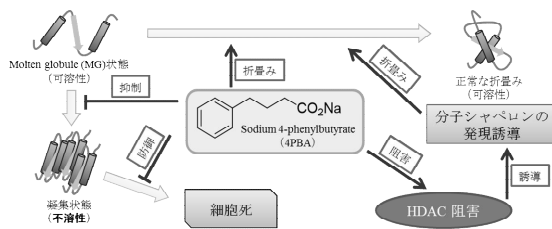


Fig. 1 メカニズム解明ストラテジー

3. 研究の方法

(1) 4PBA 誘導体のデザイン・合成

系統的な構造活性相関を行うために、4PBA 誘導体のうち市販されていない化合物を合成した。市販されている化合物に対しても水溶性確保のためにナトリウム塩化を行った。以下に挙げるポイントについて優先的に進行し、結果を踏まえながら各ポイントを組み合わせ、様々な誘導体をデザイン・合成した。

- ・ベンゼン環への置換基の導入
- ・ベンゼン環を他の環または等価体に変更
- ・側鎖の長さの変更、置換基の追加
- ・カルボン酸を他の官能基に変換

(2) モデルタンパク系での化学シャペロン活性評価

簡便なタンパク質凝集抑制活性の指標として、モデルタンパク質の凝集系を用いた。還元ラクトアルブミン(LA)と変性ウシ血清アルブミン(BSA)を混ぜ合わせることによ

って惹起されるタンパク質凝集に対する影響を評価した。具体的には、各濃度の4PBA誘導体と還元LA及び変性BSAを96穴プレート上で混合し、経時的に吸光度を測定することでタンパク質の凝集を溶液の濁りとして定量的に評価した。

(3) HDAC 阻害活性評価

In vitro における4PBA誘導体のHDAC阻害活性をENZO社のFluor-de-Lys® HDAC fluorometric activity assay kitを用いて評価した。

(4) 神経細胞毒性評価

ヒト神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞を用いて候補化合物の神経細胞毒性をWST-1法で評価し、毒性の低いものを選出した。

(5) 細胞系での化学シャペロン活性評価

SH-SY5Yに tunicamycin を添加して小胞体ストレスを誘導する条件に対し、4PBA誘導体を同時に加えて細胞生存率に与える影響を評価した。

(6) 変異タンパク強制発現細胞での化学シャペロン活性評価

野生型のセロトニントランスポーター(SERT)または変異型のSERT Δ CTを電気穿孔法によりCOS-7細胞に遺伝子導入・発現させ、更に4PBA誘導体を暴露し、³H標識セロトニンの取込みを定量化し、その取込み量を比較することで化学シャペロン活性を評価した。

(7) 転写促進遺伝子の探索

SH-SY5Y細胞を用いてHDACの阻害によりDNAのヒストンへの親和性が弱まることで転写が促進される小胞体ストレス関連遺伝子やシャペロン関連遺伝子をリアルタイムPCR法によって探索した。

(8) タンパク質発現変動の検討

上記(7)で明らかとなった転写促進遺伝子の結果を裏付けするために候補タンパク質の発現変動をウエスタンブロッティング法を用いて定量・評価した。

(9) GC/MS を用いたメタボローム解析

SH-SY5Y細胞を4PBA誘導体に暴露し、そこから得られた抽出液中の二次代謝産物の変動解析を島津社製GC/MS QP-2010およびSmart Metabolites Databaseを用いて試みた。

4. 研究成果

(1) 4PBA 誘導体のデザイン・合成

40種類の4PBA誘導体をデザインし、購入または有機合成した後、ナトリウム塩にした(Fig 2)

(2) モデルタンパク系での化学シャペロン活性評価

4PBA よりも強いシャペロン活性を有する化合物を7化合物見出した。これらの構造から、芳香環部分の脂溶性を上げることが活性に関与する可能性が示唆された。また、カルボキシル基の等価体であるテトラゾール環置換によって活性が上がる傾向があることも明らかとなった。

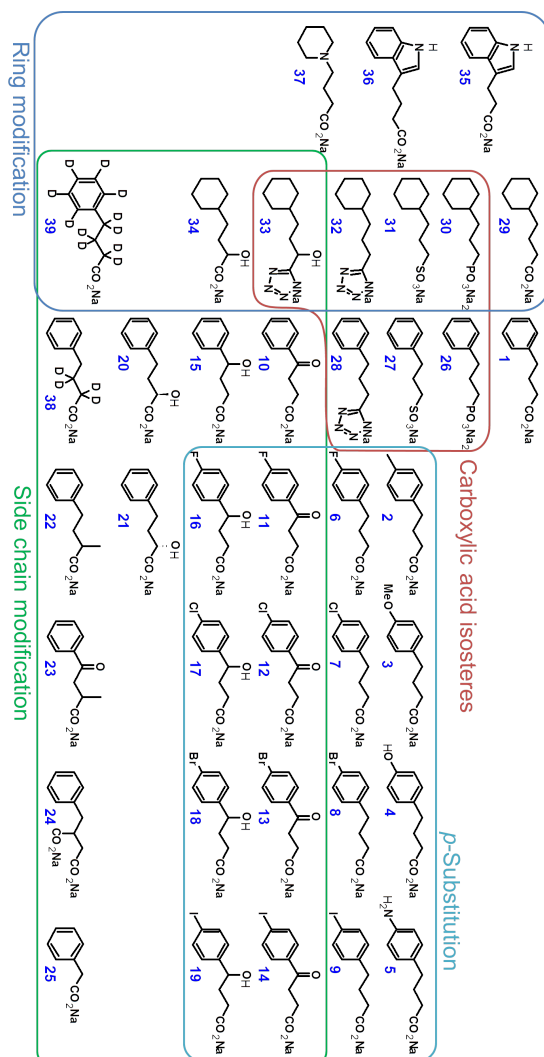


Fig. 2 Structures of 4PBA Derivatives

(3) 構造活性相関

シャペロン活性と HDAC 阻害活性、細胞毒性などにおいて 4PBA よりも活性が強く有意義な化合物をいくつか見出した。また、シャペロン活性に相関するパラメータや更なるデザインへの知見などをその構造活性相関から得た。細胞系を用いたシャペロン活性評価において、多くの 4PBA 誘導体は 4PBA と異なり、tunicamycin の小胞体ストレス誘導によって減少する細胞生存率の低下を抑制することはできなかったが、4 化合物において 4PBA よりも強力な活性を示した (Table 1)。SERT のセロトニン取り込み量を指標とした系では、いくつかの化合物が 4PBA より強い化学シャペロン活性を有していることを見出した。

Table 1. Properties of Tested Compounds

Cpd No.	Relative neuro-protective activity ^a	Relative turbidity ^b	IC ₅₀ (mM) ^c	HDAC inhibition ^d	LogD (pH 7) ^e
1	100	100	5.1	38	0.08
2	59	97	6.6	63	0.62
3	27	90	>10	73	-0.03
4	81	84	6.0	50	-0.56
5	121	117	6.2	63	-1.07
6	94	83	2.0	38	0.16
7	99	86	1.2	69	0.64
8	114	63	1.5	77	0.92
9	104	32	0.9	69	1.26
10	130	101	>10	40	-1.24
11	85	74	5.4	41	-0.79
12	78	92	3.3	60	-0.57
13	71	94	2.3	64	-0.57
14	90	15	1.7	105	-0.09
15	22	103	>10	115	-1.48
16	12	113	>10	103	-1.20
17	17	115	7.8	93	-0.73
18	21	95	4.9	110	-0.46
19	22	75	3.6	139	-0.26
20	62	79	>10	88	-2.19
21	6	97	>10	98	-2.19
22	62	94	5.9	93	0.43
23	-28	109	7.6	75	-0.85
24	26	117	>10	107	-4.02
25	54	116	>10	76	-1.32
26	11	119	>10	86	-2.09
27	0	117	8.8	101	-3.06
28	31	85	1.7	107	0.44
29	-56	42	0.7	87	1.03
30	0	95	>10	99	-
31	0	101	>10	99	-2.08
32	-51	8	0.4	100	1.39
33	-7	28	1.6	133	-
34	54	66	2.8	113	-1.22
35	47	83	6.5	94	-0.84
36	46	79	3.8	73	0.08
37	5	95	>10	105	-1.40
38	81	78	5.1	29	-
39	88	90	6.8	28	-

^aThe cell viability with 2.5 mM 4PBA and 0.5 μg/mL tunicamycin was set as control. A potent protective compound exhibits large value. ^bThe turbidity of 4PBA at 9 mM was set as control. A strong chaperonic compound exhibits small value. ^cIC₅₀ values were calculated from dose-response curves of WST-1 assay. ^dEach value represents remained HDAC activity. A potent inhibitor exhibits small value. ^elogD values were obtained from SciFinder database.

(4) 転写促進遺伝子の探索

誘導体の化学シャペロン活性の強弱と強い相関を示す遺伝子 (KDEL1, KDEL2, ERO1LB, BDNF) や HDAC 阻害活性の強弱と強い相関を示す遺伝子 (KDEL3, CSPG5, TMEM158) を見出した (Table 2)。化学シャペロン活性と HDAC 阻害活性はそれぞれ異なる遺伝子の発現変動と相関しており、別々

のメカニズムでタンパク質凝集抑制をコントロールしている可能性が示唆された。また、4PBA と同様の挙動を示し、より発現変動の強い化合物が確認された。これらの化合物は in vivo におけるフォールディング異常症治療薬の候補化合物となることが考えられる。

Table 2 Coefficient of Correlation Values between Evaluated Properties and mRNA Expressions

Compound's Properties	r	Neuro-protection	Chaperone	Cytotoxicity	HDAC
	Neuro-protection				
Chaperone	0.099				
Cytotoxicity	0.115	0.753			
HDAC	-0.607	-0.150	-0.218		
LogD	0.077	-0.625	-0.699	-0.254	
Molecular Chaperones	CANX	-0.459	-0.585	-0.510	0.300
	SERPINH1	-0.311	-0.543	-0.431	-0.022
	HSPH1	-0.428	-0.481	-0.513	0.477
	GRP78	-0.266	-0.094	-0.215	0.401
ER Stress Related Proteins	KDEL1	-0.114	-0.644	-0.679	0.144
	KDEL2	-0.168	-0.618	-0.462	0.015
	KDEL3	0.537	0.023	0.206	-0.728
	ERO1LB	-0.207	-0.640	-0.417	-0.063
Others	CSPG5	0.505	-0.121	-0.018	-0.805
	SOX4	-0.160	0.086	0.041	0.375
	BDNF	0.132	-0.649	-0.583	-0.191
	TMEM158	0.306	0.009	0.219	-0.693
	GLIPR1	0.260	-0.040	0.163	-0.162

(8) タンパク質発現変動の検討

転写促進遺伝子や変動が観察された分子シャペロンや小胞体関連遺伝子 (GRP78, GRP94, KDEL1, HSP110, calnexin, CSPG5, ERO1LB, TMEM158, p-eIF2) について、タンパク質レベルでの変動を確認した結果、検討した多くのタンパク質で小胞体ストレス誘導剤として用いた tunicamycin によって発現上昇が観察され、4PBA との同時添加でその発現上昇が抑制されず、さらなる上昇が観察された。小胞体ストレスによって細胞の防御反応としての発現上昇と 4PBA の細胞保護効果としての発現上昇が相加効果を表している可能性も考えられるが、その証明にはさらに詳細なメカニズム検討が必要である。

(9) GC/MS を用いたメタボローム解析

4PBA およびその誘導体添加時の二次代謝産物を解析し、その細胞保護効果の具体的なメカニズムを解明する目的で条件検討を行った。その結果、未処理群と比較して変動が見込まれるいくつかの化合物を見出したが、統計的に有意な変動を確認するまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

奥田 勝博, 佐々木 律枝, 保科 千里, 酒井 規雄, 太田 茂, 清水 恵子, 「化学シャペロン Sodium 4-phenylbutyrate の構造活性相関研究(2)」, 日本薬学会 第136年会, 2016年3月26~29日, パシフィコ横浜(横浜市)

Katsuhiro Okuda, Ritsue Sasaki, Chisato Hoshina, Norio Sakai, Shigeru Ohta, Keiko Shimizu, “Structure-Activity Relationship and Mechanistic Studies on Sodium 4-phenylbutyrate and its derivatives”, 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, October 18-21, 2015, Jeju, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 勝博 (OKUDA, Katsuhiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00389115

(2) 研究分担者

佐能 正剛 (SANOH, Seigo)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・助教

研究者番号: 00552267

太田 茂 (OHTA, Shigeru)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号: 60160503

酒井 規雄 (SAKAI, Norio)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号: 70263407