

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15317

研究課題名(和文) 蛋白-蛋白相互作用(PPI)阻害剤による神経疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for neurological disorders by protein-protein interaction inhibitor

研究代表者

佐々木 勉(SASAKI, Tsutomu)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20534879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血、神経変性疾患にても、原因蛋白質や病因は色々と明らかにされたが、臨床的に神経保護効果を有する治療薬は非常に少ない。本研究では、特定のタンパク質間相互作用(Protein-Protein Interaction; PPI)を標的としたPPI阻害剤による創薬を目指した。癌抑制遺伝子p53は中枢神経系にても多くの細胞死に関与する。そこでp53に関するPPI阻害剤など、特にp53とMDM2, MDMXの相互作用を阻害剤する薬剤の新規合成を施行。p53-MDM2/MDMX阻害剤は脳梗塞モデルにても神経保護効果を確認した。又、パーキンソン病モデルマウスにおける黒質における神経保護効果も確認できた。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interactions (PPI) are fundamental to cell biological processes and are often dysregulated in various neurological disorders. PPI hence represent a huge class of therapeutic targets and modulation of PPI with small molecules has becoming increasingly important in drug discovery. To screen for novel neuroprotective small-molecule PPI inhibitors in in vitro and in vivo Parkinson's disease (PD) and stroke. PPI inhibitors, with protective effects against MPP<sup>+</sup>-induced neuronal death in in vitro model were identified. Furthermore, oral administration of PPI inhibitors before MPTP mitigated MPTP-induced loss of dopaminergic neurons in substantia nigra, compared with saline-treated control mice. Also, PPI inhibitors mitigated ischemic stroke, resulting in enhanced functional outcome. The discovery of these small-molecule p53/negative regulator-interaction inhibitors with neuroprotective properties may pave the way to new therapeutic strategies for PD or stroke treatment.

研究分野：神経内科学

キーワード：PPI阻害剤 p53 MDM2 MDMX 神経細胞 血管内皮

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害における脳保護剤には臨床的効果は殆ど認められず、パーキンソン病やALSなどの神経変性疾患では根治療法が未だない。近年、異常折りたたみ蛋白(misfolded protein)の凝集、異常蛋白質が個体間、細胞間で伝播するpropagation仮説が注目されている。申請者は、蛋白質間相互作用(Protein-Protein Interaction; PPI)阻害剤ライブラリーから、神経疾患モデル系で、神経保護を示す複数の低分子性PPI阻害剤(分子量300以下)を見出すことに成功した。

従来のPPI阻害剤は、両蛋白の結合面に挟まるように結合して、拮抗的に結合を阻害するため、分子量が1000前後と大きなものになるが、蛋白質の3次構造を標的とした我々のPPI阻害剤は分子量300前後と非常に小さく、BBB透過性が十分に期待される。我々は、新規PPI阻害剤についての神経細胞死抑制効果をPD、脳虚血モデルで確認している(特許出願済み)。中枢神経系で、以上のような作用機序で治療効果を示す低分子化合物はいまだ報告はなく、これら低分子PPI阻害剤及び、関連化合物は画期的な中枢神経系治療薬の開発につながるものと期待される。神経疾患においては、未だ、認知症を含む神経変性疾患において有用なPPI阻害剤は報告されていない。しかし、脊髄損傷モデルにおいてp53-MDM2阻害剤であるNutlin-3が軸索再生に有効であること、特にMDM2-p53-IGF-1経路の重要性が報告された(Joshi Y et al. Brain 2015)。現在抗がん剤として、Nutlin-3は治験中である。我々が見出している、新規のPPI阻害剤は、蛋白質のシステインとジスルフィド結合を形成し、低分子ながら特定のPPI阻害効果を示すことが判明。本研究はこれらPPI阻害剤の標的タンパク質複合体を特定して神経保護効果の分子機構を解明、動物モデルにおいて有効性を確認し、臨床的preclinicalな状態で神経疾患予防に繋がる、革新的脳神経保護薬の創製に道を拓くことが想定される。

## 2. 研究の目的

特に癌抑制遺伝子p53は、神経系においても、アポトーシスに加えて、ネクローシス、オートファジーなど多様な細胞死に関与する。脳虚血、神経変性疾患、またはこれらの発症の基盤となる老化において、p53抑制が神経保護、老化抑制に繋がることを報告されている。我々はp53、TCFなどを標的とした独自の蛋白質間相互作用(Protein-Protein Interaction; PPI)阻害剤ライブラリーを有しており、その中から、神経疾患モデル系で、神経保護を示す複数の低分子性PPI阻害剤(分子量300以下)を見出すことに成功している。本研究はこれらPPI阻害剤の標的タンパク質

複合体を特定して神経保護効果の分子機構を解明し、細胞、動物モデルにおいて有効性を確認する。p53を中心とするPPI阻害剤による神経細胞死抑制薬の開発を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 神経細胞にて、p53欠損は脳虚血後アポトーシス抑制による神経保護(JCBF&Metab. 2006)に加え、ミトコンドリアにおけるp53-cyclophilin D複合体がmitochondrial permeability transition poreを開き、虚血後ネクローシスにて重要な役割を果たすこと(Cell, 2012 Jun 22;149(7))、DAPK1-p53 Interactionがネクローシス、アポトーシスにおいて重要であることが報告(J Neurosci, 2014 May)。又オートファジーは、細胞死、細胞生存の両者に寄与するが、このオートファジーの役割がp53に依存すること(Nature, 2013 504;7494)が報告された。p53は、全ての細胞死に関与し、その役割は極めて広範である。我々の独自のPPI阻害剤ライブラリーについて、p53とcomplexを形成し細胞死を導きうる経路を遮断するPPI阻害剤のスクリーニング(TR-FRET、改変ELISA法)を施行する。抽出化合物については、共免疫沈降法、生体分子間相互作用解析装置(Biacore T200)を用いて、両蛋白の結合様式を確認し、実際にどの経路を遮断することにより、細胞死を抑制するかを検証する。

### (2) PPI阻害剤の脳梗塞モデルでの検討

p53関連のPPI阻害剤の中から、in vitroレベルで、初代神経細胞培養系において、in vitro ischemia(Oxygen Glucose deprivation)負荷に対する神経細胞保護効果を認める新規PPI阻害剤を探索し、この新規PPI阻害剤の神経保護効果のメカニズム(p53依存性経路、並びにp53非依存性経路)の解明とともに、マウス中大脳動脈閉塞モデル(60分間のMCAO)を用いて、in vivoにおいても神経細胞死抑制効果、神経機能改善、脳血流に与える影響の有無につき検討する。

### (3) パーキンソン病(PD)モデルにおけるPPI阻害剤の検討

パーキンソン病細胞モデル(MPP+負荷)などにおいて、新規PPI阻害剤の神経保護効果を検討し、保護効果がある場合は、in vivoのMPTPモデルにおいて黒質、線条体における神経保護効果があるか検討する。急性期脳虚血モデルと、MPTPパーキンソン病モデルにおいては、その細胞死の形態が大きく異なるため、新規PPI阻害剤が、異なる細胞死、異なる神経病態において有効であるかどうか比較検討を行う。

### (4) p53と結合するp53 positive regulator及び神経保護メカニズムの探索(MS等)

53蛋白との結合蛋白、結合様式を免疫沈降

法、質量分析 (MS)、Biacore T-200 などを用いて、病態における詳細な解析を施行する。本課題においては、細胞レベル或いは、in vivo の病態下(脳虚血、パーキンソン)における、両群の脳、採血サンプルをとり、その神経保護メカニズムを検討する。細胞内の PPI 現象については nano-BRET 法或は、Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) 法を用い、実際に細胞内においても、PPI 阻害剤として作用するかの検証を行う。

#### 4. 研究成果

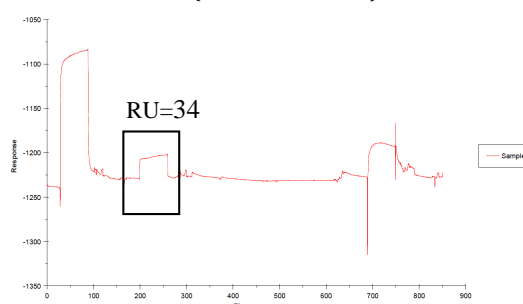
(1) PPI 阻害剤を神経保護剤として開発するために、従来の中分子並びに高分子を主とする PPI 阻害剤では脳内移行性が低いと判断し、脳内移行性が期待できる低分子化合物からなる独自で開発した低分子化合物からなる PPI 阻害剤における検討を中心に施行した。初年度においては、まず独自の低分子化合物よりなる蛋白-蛋白相互作用阻害剤ライブラリーの p53 を中心とした阻害作用、各化合物の構造、in vivo 投与時の体重変動、アポトーシスへの効果などにつき論文報告した (Bioorg Med Chem. 2016) (文献 1)。我々の独自の PPI 阻害剤ライブラリーに加え、Nutlin-3、MDMX 阻害剤である SJ-172550、MDM2/MDMX Dual Inhibitor, RO-5963 などを対照化合物として、改変 ELISA 法並びに、TF-FRET にて、p53-MDM2、p53-MDMX などの相互作用を検討した。これらの化合物において、p53-MDM2、p53-MDMX の阻害作用を有するものについては、生体分子間相互作用解析装置(Biacore T200)を用いて、両蛋白の結合様式を確認した。p53-MDM2 阻害剤である Nutlin-3 は現在抗がん剤として、臨床治験中であるが、p53-MDM2 相互作用阻害剤が多く報告、治験なども進められているのに対して、p53-MDMX 相互作用阻害剤の報告は少なく、特に、p53-MDMX 相互作用阻害効果の有するものを、独自の PPI ライブラリーから複数抽出した。その中の化合物で、特に MDMX 上昇作用を有するものを複数見つけた。特に MDMX4 上昇作用を有する化合物のうち、K-181 が最も MDMX4 上昇作用が強く、in vivo における検討を進めた (論文投稿中)。

(2) まず、我々独自の PPI 阻害剤ライブラリー化合物、SJ-172550、RO-5963 など初代神経細胞における in vitro ischemia(Oxygen Glucose deprivation)負荷にて、神経保護効果が強い化合物を探索した。その結果、MDM2 よりも MDMX を上昇させる化合物と神経保護効果に相関関係があることが示唆された。その中で、K-181 の神経保護効果が強いので、マウス中大脳動脈閉塞モデル(60分間)に対して、K-181 の経口投与による神経保護効果を検討した。その結果、K-181 は、脳梗塞サイズの有意な縮小と、神経機能改善をもたらした。虚血中は、K-181 は脳血流に有意な影

響を与えなかった (論文投稿中)。

(3) 次に、パーキンソン病細胞モデル (MPP+負荷) に対して、同様の PPI 阻害剤ライブラリー化合物を投与したところ、上記 K-181 とは異なる、複数の化合物で、神経保護効果が認められた。それら in vitro で強い保護効果を有する化合物の中で、in vivo の MPTP モデルにおいて黒質、線条体における神経保護効果を検討したところ、特に Compound X が黒質において有意な細胞死抑制効果並びに、21 日後において有意な機能回復を認めた。これらのことから、急性脳障害の代表である脳梗塞と慢性的な細胞死を誘発するパーキンソン病モデルマウスにおいて、異なる化合物が有用であったことは、細胞死の過程において p53 の関与が異なること、異なった PPI 阻害剤が有用であることが示唆された。

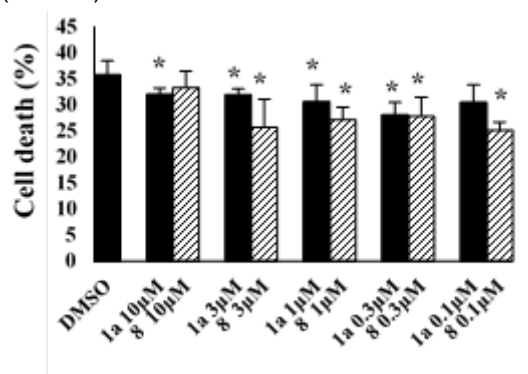
Biacore T200 (K-181 投与時)



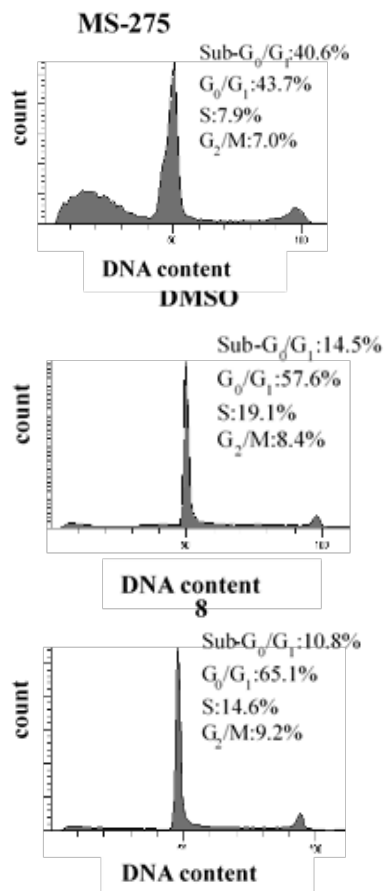
(4) 我々独自の PPI 阻害剤ライブラリー化合物につき、メカニズムを検討していく中で、一部の化合物がヒストン脱アセチル化酵素 Histone Deacetylase(HDAC)阻害作用を有することが分かった。K-181 も isoform 選択的な HDAC 阻害活性を有していた (論文投稿中)。このように K-181 は、HDAC に対する PPI 阻害活性も有する可能性も示唆された。そのような知見が得られる中で、HDAC 阻害剤は抗がん剤として FDA から認可されているが、これらは汎 HDAC 阻害剤であり、isoform 選択的 HDAC 阻害剤ではない。そこで、isoform 選択的 HDAC 阻害剤の神経保護効果も併せて検討した。

従来より、我々独自の PPI 阻害剤ライブラリーとともに、独自の isoform 選択性を有する HDAC 阻害剤ライブラリーも構築してきた。近年、アポトーシス抑制がオートファジーの活性化に繋がることも報告されている。また HDAC1,2 が autophagy を制御するという報告もなされている (Moresi V et.al.PNAS, 2012)。そこでオートファジーにおける HDAC の関わりを検討するために、対照細胞として、ヒト結腸腺癌細胞 HCT116 での検討を加えた。独自の HDAC ライブラリーについては HDAC1,2 選択的阻害剤である K560 が神経保護効果を有することをパーキンソン病モデルで証明している (Choong CJ, **Sasaki T.**

et al. NBA 2016)。HCT116 細胞においては、K560 投与により、LC-3B complex2/1 比上昇、p62 分解促進、p-mTOR(Ser2481), beclin-1 の上昇を認め、これらは PI3-Kinase 阻害剤 LY294002 で抑制された(文献 3)。このことから K-560 をリード化合物として、神経保護作用に対して構造活性相関を明らかにした(文献 7)。特に選択的 HDAC 阻害活性に加えて、側鎖にジケトピペラジン基を 2,3 位或は、2,5 位に有する化合物(K-856)に、濃度依存的に、神経保護効果をもたらすことが示された。(文献 7)



また、K-856 は、乳癌に対する治療薬として FDA で認可され、上市されている MS-275 よりもはるかに神経毒性が低いことが SH-SY5Y を用いた細胞より示唆された。Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>: apoptosis 分画を示唆する所見(文献 7 より改変)



これらのことより、我々の PPI 阻害剤は蛋白の S-S 結合を含めた高次構造を標的として設計されたものであるが、更に側鎖基などの修飾により、合成展開により神経保護効果を齎す化合物の合成が今後の課題である。

## 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)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Uesato S, Matsuura Y, Matsue S, Sumiyoshi T, Hirata Y, Takemoto S, Kawaratani Y, Yamai Y, Ishida K, Sasaki T, Enari M. Discovery of new low-molecular-weight p53-Mdmx disruptors and their anti-cancer activities. *Bioorg Med Chem*. 2016 Apr 15;24(8):1919-26.
2. Watanabe A, Sasaki T, Kanki H, Yukami T, Takemori H, Sakaguchi M, Kitagawa K, Mochizuki H. Serine racemase inhibition induced nitric oxide-mediated neurovascular protection during cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2016 Sep 28. pii: S0306-4522(16)30483-3
3. Uesato S, Hirata Y, Sasaki T. Potential Application of 5-Aryl-Substituted 2-Aminobenzamide Type of HDAC1/2-Selective Inhibitors to Pharmaceuticals. *Curr Pharm Des*. 2017;23(40):6149-6159.
4. Y. Hirata, M. Tatsu, C. Amano, Y. Kawaratani, M. Hirata, Y. Ohmomo, Y. Nagaoka, M. Shibano, T. Sasaki, S. Uesato, M. Taniguchi. Synergistic Antitumor Effect of Genitinib (Iressa®) with Flavonoids from the Scutellaria baicalensis Root on the Non-Small Cell Lung Cells. *The Open Plant Science Journal*, 2017, 10: 62-69
5. Honorat JA, Nakatsuji Y, Sasaki T et.al. Febuxostat ameliorates secondary progressive EAE by restoring mitochondrial energy production in a GOT2-dependent manner. *PLoS One*. 2017 Nov 6;12(11):e0187215
6. Gon Y, Sakaguchi M, Sasaki T et.al. Plasma D-dimer levels and ischaemic lesions in multiple vascular regions can predict occult cancer in patients with cryptogenic stroke. *Eur J Neurol*. 2017 Mar;24(3):503-508.
7. Hirata Y, Sasaki T Uesato S et.al. New 5-Aryl-Substituted 2-Aminobenzamide-Type HDAC Inhibitors with a Diketopiperazine Group and Their Ameliorating Effects on Ischemia-Induced Neuronal Cell Death. *Sci Rep*. 2018 Jan 23;8(1):1400.

[学会発表](計 7 件)

1. Sasaki T, Kanki H, Choong CJ, Baba K, Hirata Y, Sakaguchi M, Uesato S and Mochizuki H. The mechanisms of

neuroprotective effects of isoform selective HDAC inhibitors for brain ischemia. The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017) (Kyoto, 16-21, September, 2017)

2. Choong CJ, **Sasaki T**, Baba K, Hirata Y, Uesato S and Mochizuki H. Screening for small-molecule inhibitors of protein-protein interaction (PPI) with neuroprotective effect in experimental PD. The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017)
3. Chi-Jing Choong, **Tsutomu Sasaki**, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, **Yoshiyuki Hirata**, Shinichi Uesato, and Hideki Mochizuki. Small-molecule p53/negative regulator-interaction inhibitors confer neuroprotection against MPP+/MPTP-induced neurotoxicity in experimental PD. Suzhou Basic Scientists Summer School 2017
4. Kanki H, **Sasaki T**, Sakaguchi M, Mochizuki H. CRTC2 enhanced angiogenesis and endothelial function. The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017)
5. **佐々木勉**, 神吉秀明, 松村成暢ら 脳虚血時における分泌型 Lynx1 の動態の検討、日本総卒中学会総会 (福岡、平成 30 年 3 月 15 - 18 日) (STROKE 2018)
6. Kanki H, **Sasaki T**, Sakaguchi M, Mochizuki H. CRTC2 played important role for ischemic stroke. 第 59 回日本神経学会学術大会. 2018
7. **Sasaki T**, Kanki H, Hirata Y, Yen H, Kawano T1, Sakaguchi M, Uesato S and Mochizuki H. New Type HDAC Inhibitors with a Diketopiperazine Group and Ameliorating Effects on Ischemic Injury. 第 59 回日本神経学会学術大会. 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：アシルアミノフェニル基を有する化合物及びその用途

発明者：佐々木 勉、望月秀樹、Choong Chi-Jing、上里新一、住吉孝之、平田佳之  
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学

番号：PCT/JP2015/083139

出願年月日：平成 27 年 11 月 25 日

国内外の別：国際

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
佐々木 勉 (SASAKI Tsutomu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：20534879

(2) 研究分担者  
平田 佳之 (HIRATA Yoshiyuki)  
大阪薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：00745854

(3) 研究分担者  
長岡 康夫 (NAGAOKA Yasuo)  
関西大学・工学部・教授  
研究者番号：90243039

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )