

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18790097
研究課題名（和文）コレステロール腸管吸収抑制剤を目指した NPC1L1 の機能阻害物質の探索
研究課題名（英文）Screening for Inhibitors of Intestinal Cholesterol Transporter NPC1L1
研究代表者
渡辺 匠（WATANABE TAKUMI）
財団法人微生物化学研究会・微化研センター分子構造検討 G 構造分析 U・研究員
研究者番号：80270544

研究成果の概要：NPC1L1 は食物由来コレステロールの吸収を司るトランスポーターであり、その機能を阻害する物質は高コレステロール血症の治療薬となりうる。本研究では既報の阻害剤のラベル体と NPC1L1 との結合を指標とした阻害剤探索のアッセイ系を確立し、既存薬と立体構造の類似が高い化合物の中からスクリーニングのヒット、更には医薬開発候補化合物が見出されるか確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	180,000	3,580,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：高脂血症・創薬化学・生物活性物質・有機化学

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール血症の治療を目的として開発・上市されたコレステロールの腸管吸収抑制剤 Ezetimibe の作用点は NPC1L1 とよばれるトランスポーターであることが 2004 年に報告された。Ezetimibe は単独投与ならびにコレステロール生合成阻害剤スタチン類との併用により血中コレステロール濃度を有意に降下させる。しかしながら、当薬剤は全く異なる分子標的にフォーカスした医薬化学研究の途上で偶然見出されたものであり、最初から腸管吸収のメカニズムに着目し開発されたものではない。

腸管吸収抑制とコレステロール濃度低下との間に良い相関が観察されたことに加え、

NPC1L1 には多形が観察されたこともあり、このトランスポーターをターゲットとした阻害剤の探索研究を行い、新たな臨床薬候補化合物を充実させることが望まれていた。

2. 研究の目的

(1) NPC1L1 の機能を阻害する物質を選別可能な簡便なアッセイ系の構築
(2) 上記アッセイ系を利用した阻害剤スクリーニングの実施と医薬開発へ向けたリードの提示である。

3. 研究の方法

方法はアッセイ系を構築し、スクリーニングを実施することに集約される。以下、具体

的に記す。

(1) アッセイ系の構築

Ezetimibe (図1) が NPC1L1 のトランスポーターとしての機能を阻害する際、この蛋白に結合することが報告されている。そこで、アッセイ系の原理としてはこの結合をキャンセルさせる化合物を選別するものとした。実際には、Ezetimibe の蛍光もしくは RI ラベル体を合成し、それぞれ NPC1L1 を発現している細胞やその膜画分との複合体形成を観測する方法を確立し、これに試料化合物を添加し先の結合が観察されなくなったものをヒットとすることとした。

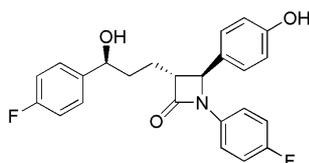


図1. Ezetimibe の構造

! HepG2 を用いた系

ヒト由来の細胞の中で肝癌由来の細胞 HepG2 は最も NPC1L1 の発現量が高いものの一つである。そこで、この細胞と Ezetimibe 蛍光ラベル体¹⁾ (図2) との結合を観察するアッセイ系の構築を試みた。

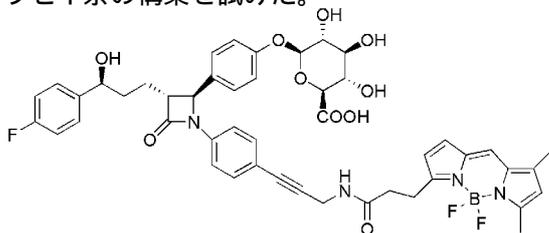


図2. Ezetimibe 蛍光誘導体の構造

まず、HepG2 細胞と大腸癌由来 RK0 細胞について市販の NPC1L1 抗体を利用して当該蛋白の発現を調べたところ、前者と後者には有意な差が見られた。ここで RK0 細胞をネガティブコントロールとして使用することとした。細胞培養用 96 穴プレートにそれぞれの細胞を播き、37 °C にて 20 時間培養する。その後、前出の蛍光 Ezetimibe 誘導体の 25 μg/mL までの PBS(-) 溶液を 5 μL 添加し更に 6 時間インキュベートする。培地を除去した後、PBS(-) にて 2 回洗浄、100 μL の PBS(-) を加えて蛍光分光光度計で蛍光強度を測定した。

また、必要に応じ、20 時間の細胞培養の後、2% の M CD を含み FBS を除いた培地に置き換え 1 時間インキュベートする段階を前出のプロトコルに加えた²⁾。阻害剤を添加する必要がある場合は、蛍光誘導体溶液に混溶させ

る方法とした。

NPC1L1 高発現 CaCo-2 細胞の利用

東京大学病院薬剤部の鈴木らは NPC1L1 を強制的に高発現させた CaCo-2 細胞の樹立に成功した³⁾。そこで、この細胞の供与を受け、アッセイ系へ利用することを試みた。全段階として、一通り HepG2 で試みた蛍光誘導体との結合観察について同じ方法論を適用したが、本細胞の増殖速度が遅いことが原因で利用が困難と判断された。

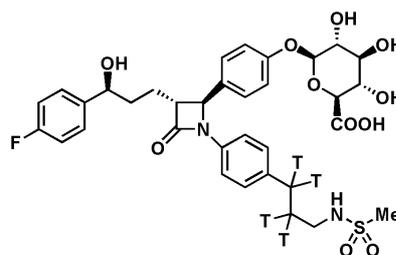


図3. Ezetimibe-RI 誘導体の構造

ここで、増殖速度や培養条件に左右されやすい細胞自体を使用したアッセイ系構築が困難を極めたため、膜画分を一旦調製し、これを利用するものの確立を目指すよう方針を転換した。結合を確認するのに用いる Ezetimibe 誘導体は図3の RI ラベル体である⁴⁾ (RI purity: 97.8%; 比放射能: 2.85 TBq/mmol; RI 濃度: 37.0 MBq/mL in EtOH)。

まず定法にて膜画分を調製する。続いて reaction buffer (5 mM Hepes, 5.5 mM glucose, 117 mM NaCl, 5.4 mM KCl; pH 7.40) と wash buffer (120 mM NaCl, 0.1% sodium cholate, 20 mM MES; pH 6.70) を準備する。膜画分を 60 μL の reaction buffer に溶解、ここに被検サンプル 30 μL を加える。非特異的結合は RI 誘導体の 1000 倍量の Ezetimibe グルコン酸抱合体をこのステップで添加することにより観測可能で、その値をバックグラウンドとする。続いて RI 誘導体溶液を 30 μL 加え、37 °C にて 2 時間インキュベートする。これを 0.5% polyethyleneimine で前処理した Unifilter-96GF/C にアプライし濾過、wash buffer で 3 回洗浄する。フィルターに残った成分の放射活性を液体シンチレータにて観測し、これを膜に結合した RI 誘導体の量とする。

必要に応じ、reaction buffer には 0.03% タウロコール酸ナトリウム、0.05% ジギトニンの界面活性剤を加えて同実験を実施した⁵⁾。

実際のアッセイには医薬化学的展開による活性改善の余地を見越して 100 μM のサンプルについて実施した。

(2) ヴァーチャルスクリーニングによるヒット候補化合物の選択

既知阻害剤 Ezetimibe との構造類似性に着目したヴァーチャルスクリーニングを行った。第一段階として緩いフィルターを採用することとし、3つの芳香環と1つの水素結合受容体（ラクタムカルボニル酸素）との重なりやすい化合物群を市販モデリングソフトウェアにて立体構造データベース Zinc より抽出した。

4. 研究成果

(1) アッセイ系の構築

HepG2 を用いた系

最初に行った実験では 4×10^4 /well と高密度の HepG2 と RKO との間に蛍光強度の有意差が観察されたケースもあったが、残念ながら再現性を得ることができなかった。

NPC1L1 の機能発現にはこのトランスポーターの膜への誘導が必要であるとの報告がある²⁾。この誘導は培地中に M シクロデキストリン (M CD) を添加しコレステロールを欠乏状態にすることで引き起こされることも知られている。そこで、M CD による NPC1L1 膜誘導のプロセスを組み込んだアッセイ系の改良を試みた。

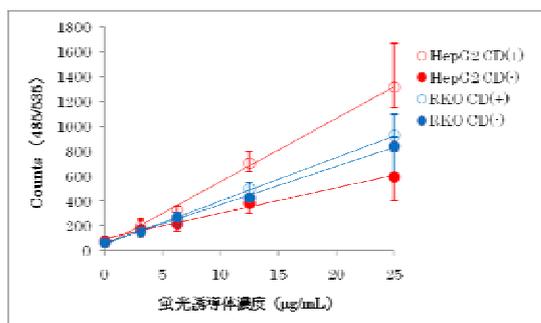


図 4. Ezetimibe 蛍光誘導体と細胞との結合 (M CD 添加の効果)

図 4 の通り、NPC1L1 を発現している HepG2 細胞では M CD 添加による蛍光誘導体の結合増加が顕著に見られた。一方、発現していない RKO 細胞ではほとんど影響を受けない。しかしながら、RKO に対する蛍光プローブの非特異的結合が多いことも観察される。これは RKO 細胞の増殖速度が HepG2 と比較し速いため、20 時間培養後の細胞数に大きな差が生じていることが原因と考えられる。

図 5 では Ezetimibe のグルクロン酸抱合体（実際に体内で Ezetimibe が薬効を示す修飾体）をトータル $0.5 \mu\text{M}$ となるように添加した場合にそれを行わなかった際に見られた蛍光がキャンセルされることもわかった。これは M CD を添加させなかった場合のグラフとほぼ一致する。非特異的結合由来のバックグラウンド値としてはこれらのいずれかを採用するのが適当であると判断された。

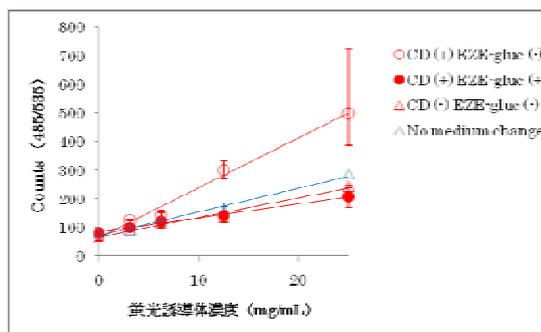


図 5. Ezetimibe 蛍光誘導体と細胞との結合 (阻害剤添加の効果)

しかしながらここでも培養条件によっては M CD の毒性が出てしまい、再現性よく上記の結果を得るには至らず、安定なアッセイ系を構築することができなかった。加えて、低感度に起因する生データのぶれの大きさ（図 5 のエラーバーを参照）貴重蛍光誘導体を高濃度使用する必要があること、更には蛍光誘導体の保存不安定性から本法のこれ以上の改善を断念することとした。

NPC1L1 高発現 CaCo-2 細胞の利用

図 6 に膜画分への RI 誘導体の結合を示した。ここで緑色の棒グラフがトータル結合量から非特異的結合の差分を取った特異的結合量となる。

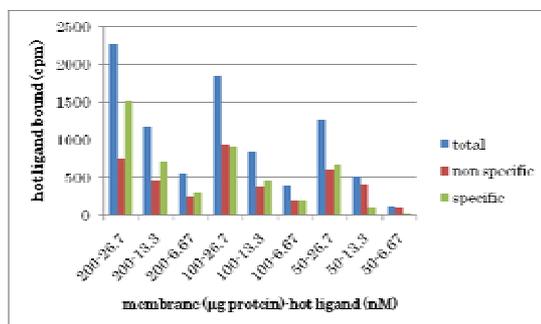


図 6. NPC1L1 高発現 CaCo-2 細胞膜画分と Ezetimibe - RI 誘導体との結合

$200 \mu\text{g}$ 蛋白量相当の大量な試料を用いれば界面活性剤非添加でも特異的結合を観測することは可能である。一方、界面活性剤は膜上で NPC1L1 が提示される様式に変化を与え、Ezetimibe に対する有効な結合領域を増加させるとの報告もある。そこで、タウロコール酸とジギトニンの効果を検証することとした。

図 7 左右各組はそれぞれ界面活性剤の有無に対応する。これを加えることで感度が約 9 倍上昇し、必要膜試料が大幅な減量への可能性が示され、実際のスクリーニングへの対応に道を拓いた。

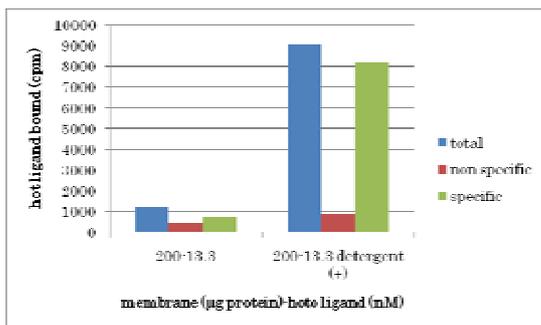


図 7. NPC1L1 高発現 CaCo-2 細胞膜画分と Ezetimibe - RI 誘導体との結合-界面活性剤添加の影響-

上記界面活性剤の感度上昇への効果に基づき、膜量の減量について更に検討した結果について図 8 に示す。

これによれば膜量は蛋白 12.5 µg 相当と、界面活性剤なしの場合と比較し 16 分の 1 に抑えることが可能となり、RI 基質も 0.83 nM あれば十分との結果になった。以降の測定はこの条件を採用することとした。

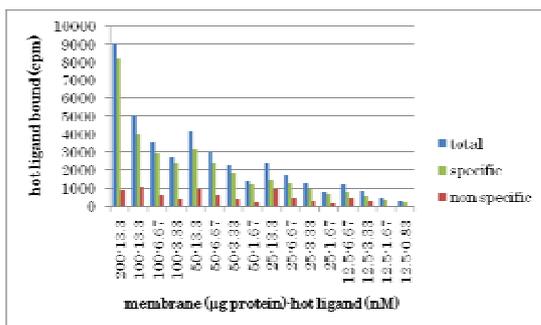


図 8. 必要膜画分量の検討

実際のサンプル測定をする前に、既知阻害剤でこのアッセイ系が妥当に機能するか検討を行った。阻害剤には Ezetimibe (図 9 グラフでは EZE と表記) とそのグルクロン酸抱合体を使用し、その濃度と RI 誘導体の結合キャンセルとの間の相関を調べた。過去の報告ではそれぞれの K_i 値 (μM) は前者が 1.59、後者が 0.66, となっている。更に活性差の大きな阻害剤との比較も今後必要と考えられるが、図 9 にはその活性の強弱と矛盾しない測定結果が示されている。

この段階でアッセイ系の確立は達成されたと判断し、(2) 項で述べるヴァーチャルスクリーニングのヒット化合物約 100 点について実際の活性確認を実施した。しかし、残念ながら現時点では活性化合物を見出すには至っていない。これはスクリーニング数を増やすこととヴァーチャルスクリーニングの精度を向上させることで解決される問題であると考えているので、助成期間が終了後も鋭意継続中である。

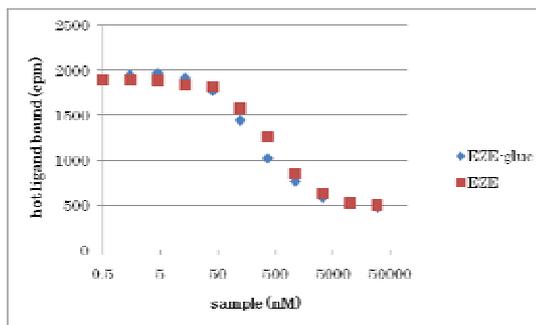


図 9. 既存阻害剤によるアッセイ系の妥当性の確認

(2) ヴァーチャルスクリーニングによるヒット候補化合物の選択

研究実施順序が前後するが、ヴァーチャルスクリーニング結果について述べる。

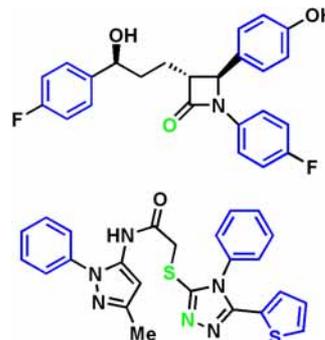


図 10. ヴァーチャルスクリーニングヒットの一例

図 10 にヴァーチャルスクリーニングによる阻害剤候補化合物の例を示す。下側の化合物が Zinc より抽出された化合物である。これは図 11 に示すような重ね合わせを評価することで選別されている。

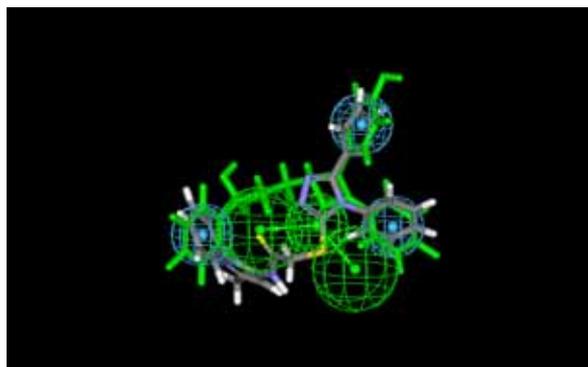


図 11. 図 10 の化合物の重ね合わせ

図 10 において青色で示した芳香環部分と緑色で示した水素結合受容体の重なりについて計算化学的に評価し、スコア化した。スコア値そのものには科学的意味がないのでここでは割愛する。上位 500 化合物のうち安

価かつ短い納期で入手可能な 100 化合物について選択し購入、アッセイに付した。

結果は前項で記述した通りである。活性化化合物が得られなかった理由としては緩すぎるフィルターの影響が考えられる。構造多様性を考慮したものだが、アリファティックな水酸基やラクタム窒素など、構造要素から除外した官能基が NPC1L1 との結合に重要な役割を果たしている可能性が高い。今後、「真のヒット化合物」を見出すためにはより構造制約の大きなヴァーチャルスクリーニングを実施して化合物を絞るとともに、構造多様性重視の自家小分子ライブラリのスクリーニングも行い、活性を左右する構造要件を詳細に考察する必要があると考えている。

参考文献

- 1) D. A. Burnett *et al.*, *Bioorg. Med., Chem. Lett.*, **12**, 315, (2002)
- 2) L. Yu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6616 (2006)
- 3) Y. Yamanashi *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 559 (2007)
- 4) A. B. Weinglass *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **73**, 1072, (2008)
- 5) B. E. Hawes *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **71**, 19, (2007)

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 1 件)

渡辺 匠、梅沢洋二、高橋良和、赤松 穰、ヴァーチャルスクリーニングによるオキシドスクアレン環化酵素阻害剤の探索、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 匠 (WATANABE TAKUMI)

財団法人微生物化学研究会・微化研センター
分子構造検討 G 構造分析 U・研究員

研究者番号：80270544

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：