

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790119

研究課題名(和文) タンパク質の高次構造構築制御による生体応答調節の基礎医薬基盤

研究課題名(英文) Basic medicinal chemistry based on behavioral structure-building regulation of protein

研究代表者

青山 洋史 (aoyama, hirosi)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40374699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高次標的創薬手法を確立するための基盤研究を行うことを目的とした。ここで言う高次標的とはタンパク質のフォールディング制御因子である。また具体的な病態としては梗塞治療後の再灌流による細胞障害やC型肝炎ウイルスの増殖であり、対象タンパク質はシクロスポリンである。本研究では分子シャペロンであるシクロスポリンを高次標的として、タンパク質のフォールディング誘導活性を負に制御して虚血/再灌流誘発性細胞死やC型肝炎ウイルスの増殖を抑制する化合物の開発に標的を絞り、研究を行った。その結果、虚血/再灌流誘発性細胞死の抑制効果が期待できる化合物群の開発に成功し、学術的にも興味深い知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish innovative drug development methodology by using a basic medicinal chemistry based on behavioral structure-building regulation of protein. A target of this study is folding regulatory factor, and illness to intend for both ischemia/reperfusion induced cell death and hepatitis C virus reproduction. As a result, we succeeded in development of compounds which have inhibitory effect of Ca²⁺-induced mitochondrial swelling. These compounds were considered to be capable of inhibitor for the ischemia/reperfusion induced cell death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：虚血/再灌流障害 HCV フォールディング ダントロレン

1. 研究開始当初の背景

これまでの医薬開発は、概ね原因本体の機能制御を中心とするものであった。しかし対象数は膨大で、その制御を個々の機能制御に求めるには限界がある。そこで、より高次の標的を捉えて生体応答の行動を包括的に制御する手法の開発が不可欠であると考えた。本研究ではそのような高次標的創薬手法を確立するための基盤研究を行うことを目標とする。ここで言う高次標的とはタンパク質のフォールディング制御因子である。翻訳直後の未成熟なタンパク質は、フォールディング制御因子によって正しい三次元的構造へと導かれ、機能を果たせるようになる。この現象は概ね正に制御され、必要なタンパク質が形作られることで生体機能が維持されているが、何らかの要因によって病態に関係するタンパク質の構造構築に繋がれば疾病が発症することになる。

2. 研究の目的

上述の高次標的創薬手法の基盤を確立するため、まず、タンパク質のフォールディング制御因子に着目した。翻訳直後の未成熟なタンパク質は、フォールディング制御因子によって正しい三次元的構造へと導かれ、機能を果たせるようになる。この現象は概ね正に制御されて生体機能が維持されているが、病態に関係するタンパク質の構造構築に繋がれば疾病が発症することになる。したがって、病態タンパク質の構築側に傾いたフォールディングを正常な状態へと誘う薬剤の開発を目指せば、治療法が困難とされる疾病への有効な薬剤開発に繋がると期待できる。

3. 研究の方法

研究目的を達成するための病態標的としては (1) 虚血誘発性神経細胞・心筋細胞死、(2) C型肝炎ウイルス (HCV) 誘発性肝炎とし、その分子標的としては (1) シクロフィリン D、(2) シクロフィリン A とした。分子標的 (1) (2) はともに PPIase でありそれぞれはアイソタイプの関係にある。また酵素機能や活性中心の構造も類似点が多いことから、連携させながら研究を行うこととした。以下に詳細について記す。

(1) 虚血誘発性神経細胞・心筋細胞死の抑制化合物の開発 (分子シャペロンシクロフィリン D (CypD) によるタンパク質フォールディング誘導活性の制御)

虚血とは、血流が阻害されて細胞や組織に十分な酸素・栄養が供給されない状態であり、虚血が限界を超えると、例えば心臓では心筋梗塞、脳では脳梗塞を発症する。一方、組織が一定時間虚血を受けると、虚血開放後の再灌流が引き金となる細胞死が誘発されるため、後遺症を残して介護が必要となることが多く、福祉の面でも大きな課題を伴う疾患である。

虚血による細胞死のメカニズムの一つにはミトコンドリア膜上に形成される透過性遷移孔 (mPTP) とよばれる細孔が深く関与していることが報告されている。mPTP はいくつかのタンパク質複合体として形成されているが、その一つが分子シャペロンであるシクロフィリン D である。すなわちシクロフィリン D の機能を阻害すれば虚血性細胞死の抑制につながると思われる。我々はすでに Ca^{2+} の暴露によるミトコンドリア膨潤を指標とした mPTP 機能の評価系を構築しており、今回も本評価系を用いてシクロフィリン D の阻害活性化化合物の開発を行うこととした。

一方、我々は筋弛緩薬ダントロレンが古くから虚血/再灌流時における脳神経保護作用を示すことや、ダントロレンの構造類似化合物 FD9 がシクロフィリン A 阻害効果を示すことに着目し、実際にダントロレンが Ca^{2+} 誘発性ミトコンドリア膨潤を抑制することを見出していた。そこで我々はダントロレンをリード化合物とし、シクロフィリン D の X 線結晶構造解析から得られたデータと合わせて種々の誘導体を合成し、活性評価を行うこととした。

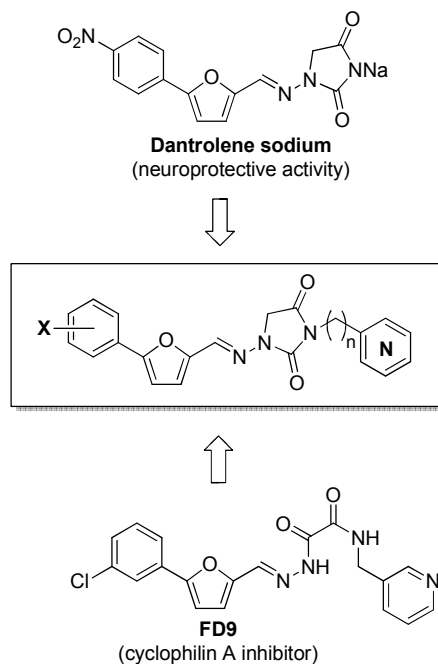


図1. ダントロレンおよび類似化合物からの化合物の分子デザイン

(2) 抗C型肝炎ウイルス (HCV) 剤の開発 (分子シャペロンシクロフィリン A (CypA) によるタンパク質フォールディング誘導活性の制御)

C型肝炎ウイルス (HCV) は感染すると高い確率で慢性肝炎を引き起し、肝硬変や肝がんへの移行リスクを高める悪性度の高いウイルスである。世界には HIV 感染者の約 5 倍に相当する 1 億 7 千万人、日本には 200 万人もの感染者が存在すると推測されており、特記すべきは日本では 1b 型の比率が高いことである。現在、HCV の治療には rivabirin と

peg-IFN- α の併用療法が一般的である。しかし副作用や治療コストの問題に加え、本邦に多い1b型などには5割程度しか効果を示さない。そのため、新規な治療法・治療薬の開発が望まれている。

我々は上記問題の解決策として、HCVの遺伝型全てが共通して認識する細胞機能を標的とすべきと考えた。そしてそのような標的として宿主保有の分子シャペロンタンパク質であるシクロフィリンAに着目した。HCVのゲノム構造の中で、非構造領域と呼ばれる領域に存在するNS5Aが分子シャペロンであるシクロフィリンAに直接結合し、NS5Aの構造変化を惹起することでウイルスの増殖に関与していることが知られている。

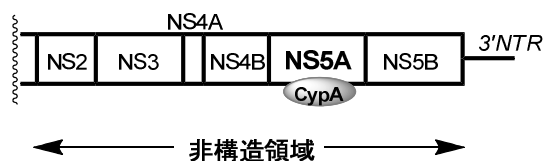


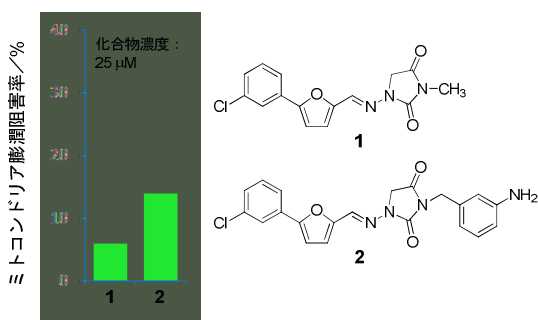
図2. C型肝炎ウイルスの非構造領域

これはHCVが宿主タンパク質であるシクロフィリンAを巧みに利用し、自己のタンパク質フォールディングを正にコントロールして増殖していると捕らえることができる。そこで我々は、シクロフィリンAが有する機能の中で、PPIase活性を抑制する抗HCV剤の開発を目的とした。抗ウイルス活性化化合物の探索としては、上述の研究テーマ(1)と関連が深いことから、テーマ(1)で開発した化合物群の活性評価を行い、そこから構造の最適化を行うこととした。また、活性はPPIaseとキモトリプシンを併用した文献既知の方法により評価することとした。

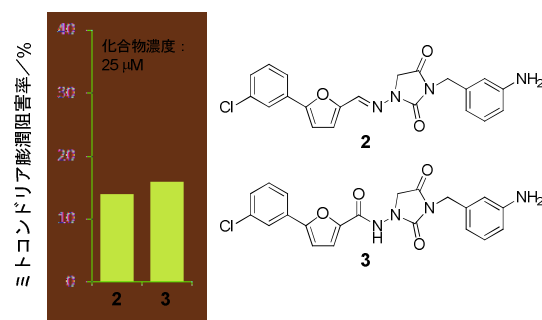
4. 研究成果

(1) 虚血誘発性神経細胞・心筋細胞死の抑制化合物の開発 (分子シャペロンシクロフィリンD (CypD) によるタンパク質フォールディング誘導活性の制御)

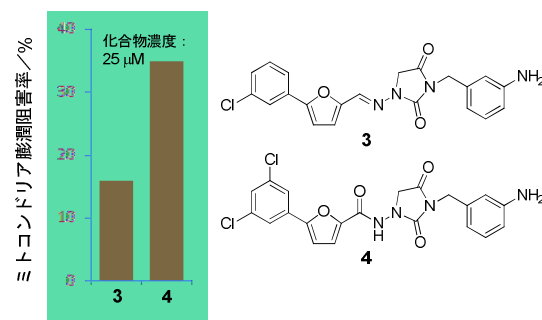
まず、3種類の部分環構造、特にフェニル基とヒダントイン部それぞれに対する構造修飾体を種々合成し、ミトコンドリア保護作用の有無の検討を行った。ヒダントイン部のイミド窒素上への置換基導入に関しては、メチル基のような単純なアルキル基の導入でも活性の向上は見られるが、芳香族性を有する官能基をアルキル基の末端に付与した方が保護活性の向上傾向にあることが分かった。



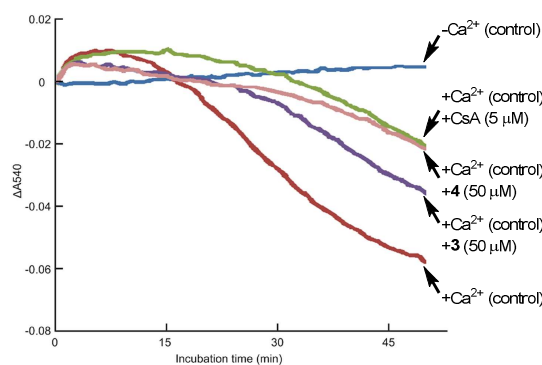
また、ヒダントイン部とフリル基をつなぐリンカー部の検討を行った結果、リード化合物のオリジナル構造であるイミン構造をアミド構造へと変換することで活性が上昇することを明らかとした。



さらにフェニル基部分への構造修飾では、ハロゲン元素の導入が活性向上に有用であることが明らかとなった。以上の部分構造の修飾から得られた知見を考慮して分子の最適化を行ったところ、数十μM程度の濃度でミトコンドリア保護作用を示す低分子化合物4の創製に成功した。



良好な活性を示す化合物を見出し、ある程度の構造の最適化を達成できたことから、すでにミトコンドリア保護作用が知られているシクロスポリンAとの活性強度の比較を行った。その結果、シクロスポリンAは数μM程度の濃度で活性を示すのに対し、今回開発した化合物が十分な活性を示すには、数十μM程度の濃度が必要であることが明らかとなった。以上の結果から、活性面ではさらに検討を重ねる必要性が残っているものの、シクロスポリンAと比べて大幅に分子量の低減に成功したことは注目できる成果と考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shinpei Murasawa, Katsuya Iuchi, Shinichi Sato, Tomomi Noguchi-Yachide, Mikiko Sodeoka, Tsutomu Yokomatsu, Kosuke Dodo, Yuichi Hashimoto, and Hiroshi Aoyama; Small-molecular Inhibitors of Ca²⁺-induced Mitochondrial Permeability Transition (MPT) Derived from Muscle Relaxant Dantrolene, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 6384–6393 (2012), DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.062, 査読有.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 洋史 (AOYAMA HIROSHI)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40374699

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし