

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670052

研究課題名(和文) コレステロール輸送膜タンパク質局在制御の戦略的ケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) Chemical biology of trafficking regulation of membrane cholesterol transporter protein

研究代表者

橋本 祐一 (Hashimoto, Yuichi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90164798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール輸送タンパク質であるNPC1ならびにNPC1L1は、生合成された後に蛋白質品質管理機構による3次元構造の認識を経てエンドソームや細胞膜に移行し、機能する。すなわち、正しい細胞内分布がこれらの蛋白質の生理機能に必須であり、その異常は疾病や機能不全の原因となる。NPC1については、変異による細胞内局在異常がニーマン・ピック病C型の原因となる。当該疾病の治療戦略の提案を念頭に、変異NPC1の細胞内局在異常を正常化する各種小分子を創製した。NPC1L1については、細胞内局在異常を示す人為的な変異体を作成し、当該局在異常の正常化を指標に新規コレステロール吸収阻害剤の創製を試みた。

研究成果の概要(英文)：Niemann-Pick type C1 (NPC) and NPC1-like 1 (NPC1L1) are cholesterol transporter. We discovered NPC and NPC1L1 ligands by using a novel cell-based assay that employs pharmacological chaperone effect as a readout. Those steroid derivatives bound to a site different from both the sterol-binding domain (for NPC1/NPC1L1) and the ezetimibe-binding site (for NPC1L1), implying that they may be a novel class of NPC1L1 inhibitors with a distinct mode of action. Regarding NPC1 ligands, a potent pharmacological chaperone which corrects abnormal trafficking of mutated NPC1 was created. As an extension of structure-activity relationship studies for NPC1L1 ligands, we found non-steroidal NPC1L1 ligands, which may be better candidates for clinical application than steroidal ligands, by using the same assay to screen our focused library of ligands for liver X receptor (LXR), a nuclear receptor that recognizes oxysterols as endogenous ligands.

研究分野：医薬化学

キーワード：トラフィックング コレステロール 局在異常 スクリーニング ステロイド フェナンスリジノン

1. 研究開始当初の背景

コレステロールの輸送膜タンパク質として、細胞内でのコレステロールの輸送に関わる NPC1、ならびに細胞外のコレステロールを細胞内に輸送する NPC1L1 が知られている。NPC1 の変異に基づく細胞内/膜局在の異常は、ニーマン・ピック病 C 型の原因となる。タンパク質の細胞内局在の異常を修正する機能を持つ小分子はファーマコロジカルシャペロン (PC) と呼ばれる。変異 NPC1 に対する PC は、ニーマン・ピック病 C 型の治療戦略の提案に直結する。NPC1L1 は NPC1 類似するが、変異に基づく関連疾病の報告はない。しかし、変異 NPC1 に対応する人為的変異体を作成することによって、細胞内/膜局在の異常を示す変異 NPC1L1 を作成することができる。

2. 研究の目的

本研究では、第一に、ニーマン・ピック病 C 型を念頭に、臨床例に見られる I1061T 変異 NPC1 の細胞内局在異常を良好に修正する化合物群の創製、ならびに創製した化合物を利用・応用しての NPC1 の分子解剖、すなわちコレステロールや PC の結合部位の解析、コレステロールの輸送機構の分子機構解明を目指した。そして第二に、NPC1L1 がコレステロール吸収阻害剤、エゼチミブ、の標的分子であることを念頭に、細胞内局在異常を示す人工変異 NPC1L1 に対する PC 作用を指標とした、新規コレステロール吸収阻害剤の創製を目指した。非ステロイド型 NPC1L1 リガンドに関しては、核内肝臓 X 受容体等の関連する各種標的に対する活性の分子プロファイリングによって、構造活性相関や構造要因情報の獲得を目指した。

3. 研究の方法

NPC1 については、ニーマン・ピック病 C 型の主たる原因となる I1061T 変異 NPC1 遺伝子を導入した細胞系を作成し、変異 NPC1 の示す細胞内局在異常の修正効果 (小胞体からエンドソームへの移行) ならびに細胞内コレステロール蓄積の軽減効果、を指標として化合物の探索・構造展開を遂行した。

NPC1L1 は NPC1 のホモログであることから、NPC1 と同様に、NPC1L1 についても、細胞内局在異常を示す NPC1L1 の対応する人工変異体、すなわち L1072T/L1168I 二重変異 NPC1L1、を作成し、これを導入した細胞系を構築した。本細胞系における変異 NPC1L1 の細胞内局在異常の修正を指標に、コレステロール吸収阻害剤の創製研究を行った。

4. 研究成果

NPC1 については、ステロイド骨格をスキヤホールドに設定した構造展開により、EC₅₀ 値が 86nM の PC 化合物の創製の成功した。同時に関連の構造活性相関に対して一応の解答を得ることができた (図 1)。

それらの結合部位については、従来コレステロール結合部位として知られていた N 末端ドメイン以外の、ステロイドセンシングドメイン (SSD) 近傍であることを示した。この部位こそが、コレステロールがエンドソーム膜を通過して細胞質に輸送される部位そのものであると期待でき、コレステロールの膜通過を含む輸送機構について、図 2 に示すモデルの提案に至った。

図 1. NPC1 に対するステロイド型ファーマコロジカルシャペロン (PC)

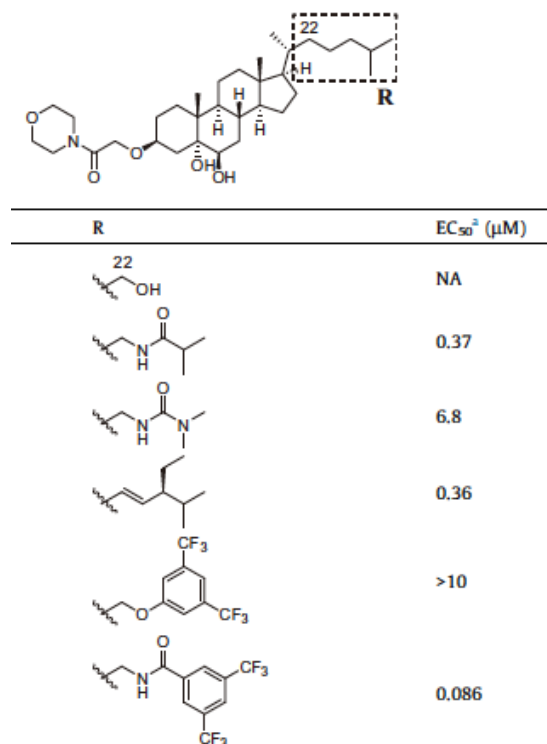
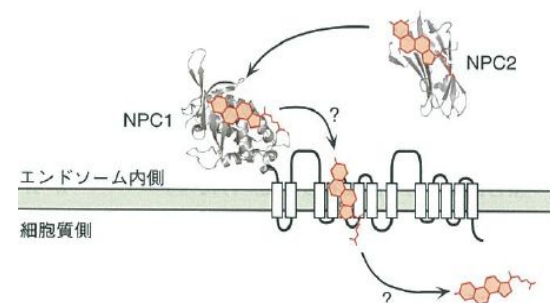
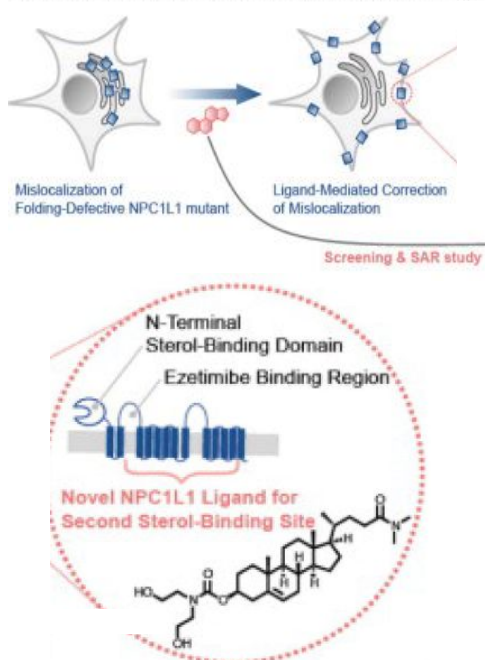


図 2. コレステロールの膜通過部位と期待される NPC1 の第二のコレステロール結合部位



NPC1L1 は NPC1 のホモログに相当する膜タンパク質であり、小腸および胆管の細胞膜上において食餌由来のコレステロールの吸収を行う。NPC1L1 については、構築した NPC1L1 の二重人工変異体を用いるスクリーニング系 (図3) が、既知のコレステロール吸収阻害剤であるエゼチミブとは分子機構 (結合部位) の異なる新規コレステロール吸収阻害剤のスクリーニングに有用であることを実験的に実証した。得られた化合物については、実際に細胞やマウスのコレステロールの吸収を有意に抑制する活性を確認した。

図3 . Ligand Screening by Pharmacological Chaperone Effect

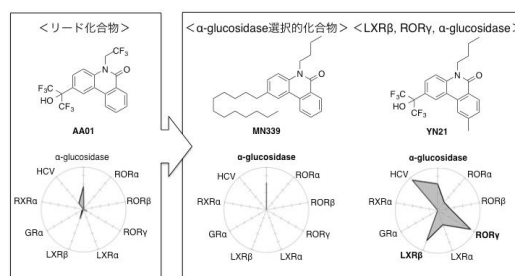


上記スクリーニングで見出した化合物を元に、新規コレステロール吸収阻害剤として、非ステロイド型の化合物を設計し、いくつかのフェナンスリジノン系化合物に良好な活性を見出した。当該化合物は、核内肝臓 X 受容体 (LXR) や関連する核内受容体のリガンド、ならびに抗 C 型肝炎ウイルス阻害活性化合物と構造的に深い関連がある。周辺の構造活性相関に関わるデータを収集・整理し、ある程度の解答を得た (図4)。

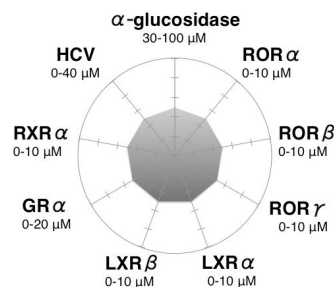
すなわち、LXR アゴニストである T0901317 の構造をもとに設計したフェナンスリジノン誘導体に抗 C 型肝炎ウイルス阻害活性を認め、フェナンスリジノン骨格は、複数の標的に対して作用するマルチテンプレートと見なすことが可能であり、適切な化学修飾を施すことによりそれぞれの標的に対する選択的化合物や多重薬理作用を示す化合物を効率的に合成できることを期待した。実際、フェナンスリジノン誘導体を様々な核内受容体 (LXR, レチノイン酸受容体関連オーファン核内受容体: ROR, グルココルチコイド

受容体: GR およびレチノイド X 受容体: RXR) や β -グルコシダーゼに対する活性を評価した。その結果、LXR, GR, RXR に対してアンタゴニスト活性、ROR に対してインバースアゴニスト活性、 β -グルコシダーゼに対して阻害活性を示す化合物が得られ、その選択性についても多様であることが明らかになった。例えば、 β -グルコシダーゼ選択的化合物 MN339 や、糖尿病に関連する β -グルコシダーゼ、ROR、LXR に対して多重薬理作用を示す YN21 が得られた。

図4 . フェナンスリジノン誘導体の活性プロファイリング例



円の中心から外側に向かって活性が強く (IC_{50} , EC_{50} 値が小さく) なることを表す



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6件)

Kenji Ohgane, Fumika Karaki, Tomomi Noguchi-Yachide, Kosuke Dodo, and Yuichi Hashimoto: Structure-activity relationships of oxysterol-derived pharmacological chaperones for Niemann-Pick type C1 protien. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 24:3480-3485 (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.064> (査読有)

Fumika Karaki, Kenji Ohgane, Hiromitsu Fukuda, Masahiko Nakamura, Kosuke Dodo, and Yuichi Hashimoto: Structure-activity relationship study of non-steroidal NPC1L1 ligands identified through cell-based assay using pharmacological

chaperone effect as a readout. **Boorg. Med. Chem.**, 22: 3587-3609 (2014).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.022> (査読有)

Fumika Karaki, Kenji Ohgane, Kosuke Dodo, and Yuichi Hashimoto:

Structure-activity relationship studies of Nieman-Pick type C1-like 1 (NPC1L1) ligands identified by screening assay monitoring pharmacological chaperone effect.

Boorg. Med. Chem., 21: 5297-5309 (2013).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.022> (査読有)

Yuko Nishiyama, Masahiko Nakamura, Takashi Misawa, Madoka Nakagomi, Makoto Makishima, Minoru Ishikawa, and Yuichi Hashimoto:

Structure-activity relationship-guided development of retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR γ)-selective inverse agonists with a

phenanthridin-6(5*H*)-one skeleton from a liver X receptor ligand. **Boorg. Med. Chem.**, 22: 2799-2808 (2014).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.007> (査読有)

大金賢司、唐木文霞、闔闔孝介、橋本祐二：タンパク質の折りたたみの異常を直すファーマコロジカルシャペロン～ニーマンピック病C型治療薬を目指した試み～ **現代化学**, No. 512, p48-54, 2013年, 11月号. <http://www.tkd-pbl.com/news/nc243.html> (査読なし)

Kenji Ohgane, Fumika Karaki, Kosuke Dodo, and Yuichi Hashimoto:

Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC-1: implication for the existence of second sterol-binding site. **Chemistry & Biology**, 20: 391-402 (2013)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.02.009> (査読有)

[学会発表](計4件)

西山郵子、中村政彦、三澤隆史、青山洋史、杉田和幸、石川稔、橋本祐二、中込まどか、榎島誠、馬場昌範：フェナンスリジノン誘導体の多重薬理学的プロファイリング．第32回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集（神戸国際会議場、神戸）2014. 11. 26～28.

福田寛充、大金賢司、唐木文霞、闔闔孝介、橋本祐二：NPC1の局在異常を修正する非ステロイド性リガンドの創製研究．日本薬学会第134年会（熊本市総合体育

館、熊本）2014. 3. 27～30.

唐木文霞、山梨義英、大金賢司、福田寛充、高田龍平、闔闔孝介、鈴木洋史、橋本祐二：変異体の局在変化を利用した新規NPC1L1阻害剤の探索．日本薬学会第134年会（熊本市総合体育館、熊本）2014. 3. 27～30.

西山郵子、中村政彦、榎島誠、中込まどか、石川稔、橋本祐二：核内受容体ROR γ 選択的リガンドの創製．日本薬学会第134年会（熊本大学、熊本）2014. 3. 27～30.

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 祐一 (HASHIMOTO, Yuichi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90164798