

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：25670053

研究課題名(和文)多重薬理作用によるC型肝炎の治療戦略

研究課題名(英文) Polypharmacological approach to hepatitis C

研究代表者

石川 稔 (Ishikawa, Minoru)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：70526839

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)：C型肝炎はHCV感染により引き起こされる疾患である。ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が1型のHCVに対して効果が高く、標準治療になっている。HCVプロテアーゼ阻害剤も最近上市されたが、HCV患者に対する新しい治療法の開発は未だ重要である。我々は多重薬理作用によるC型肝炎の新しい治療戦略の提案を目指した。今回、2つのアプローチを検討した。一つ目は、ヒト由来の複数の標的タンパク質の機能を低分子により変化させる方法であり、もう一つは低分子によりHCV由来の標的タンパク質に対して阻害作用と分解作用の両方を有する化合物である。目的とする機能性化合物の創製に向けての基盤となる一定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C is an infectious disease caused by the hepatitis C virus (HCV). Standard of care for hepatitis C, the combination therapy with peginterferon and ribavirin, is the most effective for HCV genotype 1. Recently, HCV protease inhibitors have been also approved, but it is still important to establish new regimens for HCV patients. We aimed to discover a novel strategy for the treatment of hepatitis C with polypharmacological approach. Two approaches were investigated. One was modulation of the functions of the target proteins of human origin by a small molecule, and the other was both inhibition and decrease of the target protein of HCV origin by a small molecule. As a result, we obtained lines of basic and useful information for the preparation of the target compounds.

研究分野：創薬化学

キーワード：多重薬理作用

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)に感染することにより発症し、肝がんへ移行する疾患である。HCV感染者数は世界で約1億7000万人と言われている。C型肝炎の薬物治療は、インターフェロン療法に加えて抗ウイルス薬リバビリンの併用が現在主流となっている。近年、HCV由来のプロテアーゼに対する阻害薬が承認されたが、ペグインターフェロン+リバビリン+プロテアーゼ阻害薬の3剤併用療法によっても治癒率は約70%[*J. Viral. Hepat.* 2012, 19, e134.]であり、治療満足度には改善の余地がある。

2. 研究の目的

治療満足度が不十分であるC型肝炎に対する新しい治療戦略の提案を目指し、多重薬理作用によってC型肝炎の治療薬を創製することを目指した。具体的には、抗HCV作用を示す化合物群が結合する複数の核内受容体に作用する化合物の創製、C型肝炎ウイルス(HCV)由来プロテアーゼの阻害作用とHCVプロテアーゼ分解誘導作用を併せ持つ化合物の創製、の2つを目指した。前者は、宿主側のタンパク質制御をするアプローチである。

3. 研究の方法

複数の核内受容体に対して多重薬理作用を示す化合物を創製すべく、以下の計画を立案した。

脂肪肝のHCV患者は肝臓X受容体(LXR)量が増加しており、脂肪酸合成に関与するLXRの下流遺伝子(*sterol regulatory element-binding protein (SREBP)*, *fatty acid synthase (FAS)*)や、また炎症性遺伝子(*interleukin-6 (IL-6)*, *inducible nitric oxide synthase (iNOS)*, *tumor necrosis factor (TNF)*)も増えているとの報告がある[*Clin. Sci.* 2011, 120, 239.]。これらの遺伝子の発現を抑制すれば、抗HCV作用を示すことができる可能性があると考えた。脂肪酸合成関連のSREBPとFASはLXR拮抗作用により、炎症性サイトカインIL-6、iNOSは、LXRのtransrepression作用によりそれぞれ抑制される。このことから、LXR拮抗作用とLXR transrepression作用を有する多重薬理作用を示す化合物は、HCV患者で亢進している遺伝子を抑制できることが期待された。

研究開始後に、核内受容体の1種であるレチノイン酸受容体(RAR)、レチノイドX受容体

(RXR)、LXRリガンドの幾つかがHCVの複製を阻害することが報告された(*Microbes Infect.* 2014, 16, 114)。なお、上記論文で報告された核内受容体リガンドは、例えば他核内受容体であるレチノイン酸関連オーファン受容体(ROR)などにも作用することが知られており、抗HCV作用に関与している核内受容体の特定も重要であると考えられる。また、この抗HCV作用の分子メカニズムは不明であるが、幾つかの核内受容体に作用する多重薬理作用を示す化合物は強い抗HCV作用を示す可能性に期待した。そこで、多くの核内受容体リガンドの共通骨格であるステロイド骨格の代替として当研究室が提案しているフェナンスリジノン骨格を合成展開すれば、種々核内受容体に多重薬理作用を示す化合物を効率的に創製でき、これらは抗HCV作用を示す可能性があると考えた。また、当研究室では過去に、抗HCV作用を示す化合物を見出しているが分子メカニズムは不明であった。そこで、この系統の化合物の種々核内受容体に対する作用を評価した。

HCVプロテアーゼ分解誘導作用の分子基盤には、我々の開発したタンパク質ノックダウン法[*J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 5820.]を応用することを計画した。ユビキチンリガーゼ(E3)は、不要な基質タンパク質と結合してユビキチンを付加することにより、不要なタンパク質を分解へ導く。タンパク質ノックダウン法は、基質タンパク質の代わりに、標的のタンパク質とE3からなる複合体を生理的な条件下で人工的に形成させ、標的タンパク質に特異的にユビキチンを付与し、標的タンパク質を分解する方法である。なお、E3と標的タンパク質の複合体を形成させる為に、E3の低分子リガンドと標的タンパク質のリガンドを連結させた低分子を合成・利用する。HCVプロテアーゼのリガンドであるプロテアーゼ阻害剤とE3リガンドを連結させた化合物は、プロテアーゼの阻害作用とHCVプロテアーゼ分解誘導作用を併せ持つと期待した。

4. 研究成果

LXR拮抗作用とLXR transrepression作用を有する多重薬理作用を示す化合物を創出すべく、我々が過去に見出したLXR拮抗物質のLXR transrepression作用を評価したところ、非常に活性が弱いながら、LXR拮抗作用とLXR transrepression作用の両方を有する化合物を見出した。これをリード化合物として、30以上の類縁体を合成し、構造活性相関を取

得した。なお、LXR 拮抗作用は LXR レポーター ジーン アッセイ により、LXR transrepression は、分化させた THP-1 細胞のリポ多糖(LPS)刺激により産生される IL-6 量を ELISA にて測定した。その結果、強い LXR 拮抗作用と LXR transrepression 作用を併せ持つ化合物を創製することに成功した。LXR 結合試験と LXR ノックアウト実験により、この化合物が LXR に結合し、LXR 依存的に炎症性遺伝子を抑制することも確認した。本内容を論文投稿中である。次に、LXR 拮抗作用と LXR transrepression 作用の両方の多重薬理作用を示す化合物が、抗 HCV 作用を示すか検討した。その結果、期待通り抗 HCV 作用を示すことを確認できた。今後の課題であるが、この抗 HCV 作用を示す分子基盤について、例えば LXR 拮抗作用と LXR transrepression 作用の寄与、LXR と LXR の寄与などを確認したいと考えている。加えて、主題とは異なるものの、本研究の過程で特徴的な LXR リガンドを複数見出すことにも成功した。

抗 HCV 活性を示すフェナンスリジノン系化合物の種々核内受容体に対する作用を評価したところ、ROR 逆作動作用、グルココルチコイド受容体(GR)拮抗作用、プロゲステロン受容体(PR)拮抗作用、RXR 拮抗作用などを示すことが明らかになった。そこで次に、この合成展開を実施し、各受容体に対する選択的リガンド、また多重薬理作用を示す化合物の創製を目指した。この際、これら化合物群に対して、抗 HCV 作用を含めた多重薬理作用のプロファイリングを実施した。プロファイリングを元に構造展開を実施した結果、例えば、強い活性を有する ROR 選択的逆作動薬、LXR 拮抗薬/ROR 逆作動薬、GR 選択的拮抗薬、RORs/LXR/RXR 多重阻害薬などを創製した。そしてこの化合物群の幾つかに、抗 HCV 作用を示す化合物を見いだすことができた。加えて、多重薬理作用のプロファイリングにより、抗 HCV 作用に重要な核内受容体作用についても解析を進めることができた。現在のところ、ある核内受容体拮抗作用を示す化合物が強い抗 HCV 作用を示す可能性があるデータが得られている。更なる解析を慎重に進め、抗 HCV 作用に重要な核内受容体を提案したいと考えている。

タンパク質ノックダウン法による HCV プロテアーゼ分解化合物を設計するに当たり、最初に、プロテアーゼ阻害薬のリンカー導入位置を検討した。既に報告されている複合体 X 線

結晶解析を利用して、リンカーを導入したプロテアーゼ阻害薬のドッキングスタディを実施したところ、リンカー導入化合物がプロテアーゼと結合することが予測され、リンカー導入位置の妥当性が示唆された。次に、類似プロジェクトで得られた結果から、分解誘導作用の増強を目指す方針を選択した。そして、E3 リガンドの改善、特に結合能の向上を試みた。これまでタンパク質ノックダウン法に利用していない E3 リガンドを選択し、類縁体を設計・合成した。蛍光偏向法により構造活性相関を取得したが、残念ながら元の化合物より結合能や分解誘導活性の強い化合物は得られなかった。そこで次に、タグの利用によるコンセプト確認を計画した。即ち、タグ融合標的タンパク質を減少させる技術の開発を目指した。タグリガンドと E3 リガンドを連結した数化合物を合成したところ、タグ融合標的タンパク質が特異的に減少することをウェスタンブロットングにより確認した。このタグ融合タンパク質ノックダウン法の一般性を確認して、HCV 関連タンパク質の減少研究へ移行したいと考えている。また、E3 を利用しない標的タンパク質減少技術の開発にも着手している。この方法が確立できれば、HCV 関連タンパク質の減少も検討したいと考えている。

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4件)

Keisuke Maruyama, Masaharu Nakamura, Shusuke Tomoshige, Kazuyuki Sugita, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa*, Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): Discovery of an ER -selective antagonist, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 4031-4036. (査読有) DOI: org/10.1016/j.bmcl.2013.05.067
Kaori Endo-Umeda, Kaori Yasuda, Kazuyuki Sugita, Akira Honda, Miho Ohta, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Toshiyuki Sakaki, Makoto Makishima, 7-Dehydrocholesterol metabolites produced by sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) modulate liver X receptor activity, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular*

Biology **2014**, *140*, 7-16. (査読有)
DOI: org/10.1016/j.jsmb.2013.11.010
Yuko Nishiyama, Masahiko Nakamura, Takashi Misawa, Madoka Nakagomi, Makoto Makishima, Minoru Ishikawa*, Yuichi Hashimoto, Structure-activity relationship-guided development of retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR)-selective inverse agonists with a phenanthridin-6(5H)-one skeleton from a liver X receptor ligand, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 2799-2808. (査読有)
DOI:org/10.1016/j.bmc.2014.03.007
Takashi Misawa, Kosuke Dodo, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Morihiko Sagawa, Masahiro Kizaki, Hiroshi Aoyama, Structure-Activity Relationships of Benzhydryl Derivatives Based on 1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA) and their Inhibitory Activities on Multiple Myeloma Cell Growth via Inactivation of the NF- B Pathway, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 2241-2246. (査読有)
DOI:org/10.1016/j.bmc.2015.02.039

〔学会発表〕(計 12 件)

三田裕介、どど孝介、谷内出友美、橋本祐一、石川稔、LXXLL 配列を模倣した VDR コアクチベーター相互作用阻害薬の創製、日本レチノイド研究会第 24 回学術集会(星薬科大学・東京都品川区) 2013 年 8 月 30 日
石川稔、細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP) を特異的に分解誘導する低分子の創製と新治療戦略、日本レチノイド研究会第 24 回学術集会(星薬科大学・東京都品川区) 2013 年 8 月 30 日 若手シンポジウム レチノイド研究温故知新 ～レチノイドの新たな作用点を求めて～(招待講演)
石川稔、タンパク質を特異的に分解誘導する低分子を利用した新治療戦略と低分子の標的タンパク質同定法、第 86 回日本生化学会大会(パシフィコ横浜・神奈川県横浜市) 2013 年 9 月 11 日 シンポジウム ケミカルライブラリースクリーニング再考 アカデミアで意味あるケミカルライブラリースクリーニングを

実現するために(招待講演)
西山郵子、中村政彦、榎島誠、中込まどか、石川稔、橋本祐一、核内受容体 ROR 選択的リガンドの創製、日本薬学会 134 年会(熊本大学・熊本県熊本市) 2014 年 3 月 28 日
野村さやか、石川稔、榎島誠、青山惇、橋本祐一、Transrepression 作用選択的な Liver X Receptor (LXR) リガンドの創製、日本薬学会 134 年会(熊本市総合体育館・熊本県熊本市) 2014 年 3 月 29 日
野村さやか、石川稔、青山惇、榎島誠、橋本祐一、Transrepression 作用選択的な LXR(Liver X Receptor) リガンドの創製、日本レチノイド研究会第 25 回学術集会(秋田大学・秋田県秋田市) 2014 年 10 月 11 日
野村さやか、石川稔、橋本祐一、梅田香織、榎島誠、LXR (Liver X Receptor) 選択的アゴニストの創製、第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム(神戸国際会議場・兵庫県神戸市) 2014 年 11 月 18 日
西山郵子、中村政彦、三澤隆史、青山洋史、杉田和幸、石川稔、橋本祐一、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(神戸国際会議場・兵庫県神戸市) 2014 年 11 月 18 日
梅田(遠藤)香織、安田佳織、杉田和幸、本多彰、太田美穂、石川稔、橋本祐一、榎利之、榎島誠、ステロール代謝酵素 CYP27A1 による 7-デヒドロコレステロール代謝産物の同定及び核内受容体 LXR の転写活性化能に対する影響、第 36 回胆汁酸研究会(東海大学・東京都千代田区) 2014 年 11 月 22 日
佐藤玄、大井未来、今堀龍志、滝田良、吉田健吾、石川稔、橋本祐一、村中厚哉、内山真伸、亜鉛錯体の光学特性を利用したタンパク質破壊法の開発、日本薬学会 135 年会(神戸学院大学・兵庫県神戸市) 2015 年 3 月 27 日
福田寛充、榎島誠、石川稔、藤井晋也、橋本祐一、核内受容体選択的な Coactivator Binding Inhibitor の創製研究、日本薬学会 135 年会(デザインクリエティブセンター神戸・兵庫県神戸市) 2015 年 3 月 27 日
梶田大資、中村雅陽、松本洋太郎、石川

稔、橋本祐一、藤井晋也、ケイ素と cis
オレフィンの可換性に着目した含ケイ素
PPAR アゴニストの創製、日本薬学会 135
年会 (デザインクリエイティブセンター
神戸・兵庫県神戸市) 2015年3月2
7日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔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

石川 稔 (ISHIKAWA Minoru)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号：70526839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし