

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15136

研究課題名(和文) リガンド・リン脂質複合体による超長時間作用型医薬創出法

研究課題名(英文) A Versatile Strategy for Developing Long-Acting Ligands by Ligand-Phospholipid Conjugation

研究代表者

周東 智 (SHUTO, Satoshi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70241346

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)：長時間薬理活性が持続することは、多くの治療薬において利点となる。本研究では、“リン脂質を細胞膜へのアンカー素子として活用することで、長時間リガンドを細胞膜標的分子近傍へと偏在化できる”との作業仮説の下、超長時間作用持続型医薬創出法の確立することを計画した。具体的には、“リガンド-リンカー部-リン脂質”を基本構造とするリガンド・リン脂質複合体(Ligand-Phospholipid-Conjugates, LPC)を設計・合成し、作業仮説通りに薬物動態を時空間的に制御できるか否かを、in vitro及びin vivoで評価し、本作業仮説を実証するとともに、新規創薬方法論確立への端緒を開いた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that if drug localization can be restricted to a particular subcellular domain where their target proteins reside, the drugs could bind to their target proteins without being metabolized and/or excreted, which would significantly extend the half-life of the corresponding drug-target complex. Thus, we designed ligand-phospholipid conjugates, in which the ligand is conjugated with a phospholipid through a polyethylene glycol linker, to restrict the subcellular localization of the ligand in the vicinity of the lipid bilayer. Here, we present the design, synthesis, pharmacological activity, and binding mode analysis of ligand-phospholipid conjugates with muscarinic acetylcholine receptors as the target proteins. These results demonstrate that ligand-phospholipid conjugation can be a versatile strategy for developing long-acting ligands that bind to membrane proteins in drug discovery.

研究分野：創薬化学

キーワード：レジデンスタイム リン脂質 トルテロジン ムスカリン受容体

1. 研究開始当初の背景

医薬の治療効果は、医薬が標的分子に結合したことによって発現する生理学的・生化学的作用（薬力学的効果）と医薬の体内動態（薬物動態学的性質）の両者に依存する。従って、どんなに強力な薬力学的効果を有する薬物であっても、標的分子近傍に十分な時間存在できなければ、即ち薬物動態学的性質が劣悪であれば、所望の治療効果は得られない。一方、標的が存在する部位に限定して、薬力学的効果発現に好適量の医薬を必要な時間存在させることが可能であるなら、最大限の治療効果が得られ、一方、副作用は最小となる。この観点から、医薬の体内動態を標的分子近傍への時空間的制御は、薬物療法において極めて有効な手段となるが、その実現は決して容易ではない。申請者は、リン脂質の特性である強力な細胞膜親和性に基づく医薬の細胞膜近傍への長時間偏在化が可能と考え、超長時間作用持続型医薬創出法を考案した。発作等の突発的な疾患治療を別として、薬物治療は短くて数日、慢性疾患の場合には半永久的に継続される。従って、投与回数が少ない超長時間作用持続型医薬は臨床的に大きな利点となる。

申請者は従来より細胞膜受容体リガンドの創製研究に取り組んでおり（例えば、*Org. Lett.* **2013**, *15*, 1686; *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3585）、その知見をもとに本方法論の実証に適するモデルリガンドとして、ムスカリン受容体アンタゴニストであるトルテロジンを選択した。過活動膀胱症にトルテロジンは使用されているが、難治性である場合には有効ではない。超長時間作用持続型とすることで、現在有効な治療法のない難治性過活動膀胱症の治療薬となることが期待される。

一方申請者は、リン脂質の酵素/化学合成法の開発、リン脂質の消化吸收機構である脱アシル-再アシル化サイクルを利用するリンパ系への制がん剤ターゲティング法の開発等、リン脂質関連研究においての多く成果をあげている（例えば、*有合化*, **1997**, *55*, 207; *Cancer Lett.* **2001**, *162*, 49; *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 167; *Cancer Sci.*, **2008**, *99*, 1029）。これら独自のリン脂質関連の創薬化学研究にて蓄積した知見が、本課題の

着想・立案の基盤となっている。

2. 研究の目的

長時間薬理活性が持続することは、多くの治療薬において利点となる。本研究では、“グリセロリン脂質（以下リン脂質）を細胞膜へのアンカー素子として活用することで、長時間リガンドを細胞膜標的分子近傍へと偏在化できる、即ち、レジデンスタイムの長期化が図れる”との作業仮説の下（図2）、超長時間作用持続型医薬創出法の確立を目指す。具体的には、“リガンド-リンカー-リン脂質”を基本構造とするリガンド・リン脂質複合体（Ligand-Phospholipid-Conjugates, LPC, 図1）を設計・合成し、作業仮説通りに薬物動態を時空間的に制御できるか否かを、*in vitro* 及び *in vivo* で評価する。その結果として、本作業仮説の正当性を実証するとともに、新規創薬方法論確立への端緒

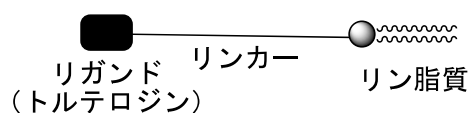


図1. LPCの基本構造

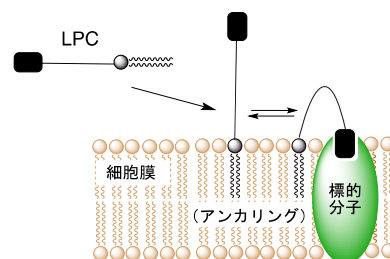


図2. リン脂質部のアンカリングによるLPCの細胞膜近傍偏在化を開く。

3. 研究の方法

本研究では、(1) LPSの一般的合成経路を確立し、(2) トルテロジンをリガンドとしてリンカー部炭素鎖長の異なるLPC 6種を少量（各 10 mg 程度）合成した後、(3) ムスカリン受容体発現膜画分を用いる *in vitro* 評価を実施した。次に、(4) *in vitro* で良好な持続活性を示したLPCを大量（100 mg 程度）合成し、(5) マウス膀胱内投与系での作用持続性を評価した。さらに、(6) 分子動力学による作業仮説解析を実地した。

4. 研究成果

(1) 合成方法の開発

先に開発した放線菌ホスホリパーゼ

(PLDP) が触媒するホスファチジル基転移反応を鍵反応として、テルトロジンをリガンドとする LPC の合成研究を実施し、効率的な合成経路を確立することに成功した。本法は大量合成にも適用可能であった。

(2) 薬理活性

ムスカリン受容体発現膜画分を用い、放射性リガンド結合に対する LPC による持続的競合阻害活性を調べた。その結果、膜画分を緩衝液で洗浄することでトルテロジンは解離するが、LPC おいて作業仮説通りにリン脂質部が細胞膜にアンカリングして、解離しないことを確認した。ただし、LPC において、その持続性はリンカー長に依存し、短いリンカーの LPC では持続性は低く、長いリンカーの LPC が優れた持続性を示した。

続いて、*in vitro* で持続性が優れる LPC (7) について *in vivo* 評価を実施した。マウス膀胱内へ LPC 及びトルテロジンを投与し、30分後及び24時間後に膀胱を摘出、その組織のホモジェネートを作成し、残存化合物のムスカリン受容体への持続的な結合を経時的に評価した。その結果、30分後には両化合物のムスカリン受容体への結合においてほとんど違いが観察されなかった。しかしながら、24時間後には、母化合物であるトルテロジンの受容体への結合がほぼ消失している一方、該当 LPC においては顕著なトルテロジン受容体結合活性が保持されていることが判明した(図3)。

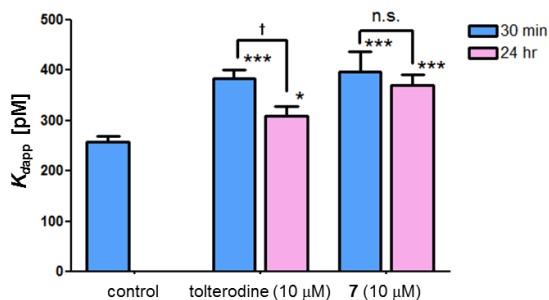


図3. マウス膀胱内投与による持続性

(3) 動力学解析

薬理活性評価において、持続性に劣るリンカーが短いLPC(2)と持続性に優れるリンカーが長いLPC(7)について、動力学解析による結合様式を検討した。その結果、図4に示すように、LPC(7)において、経時的にリン脂質部が膜へ、リガンド部が受容体結合部位

へと、“bidentate”相互作用することが示唆された。

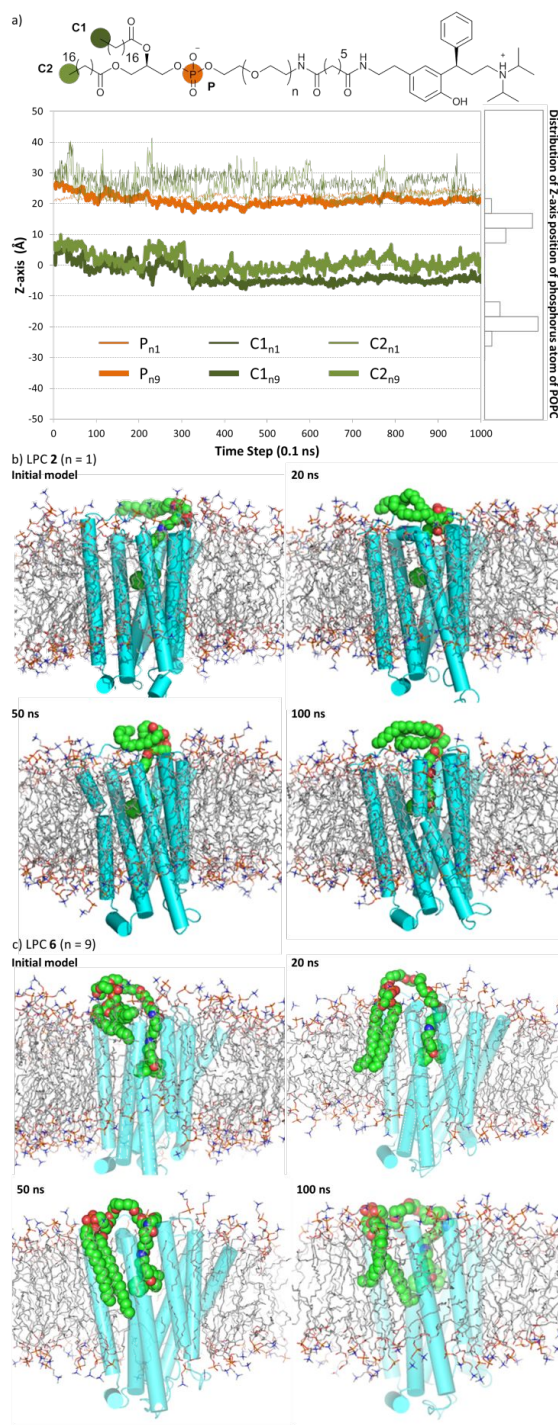


図4. LPC(2)とLPC(6)の動力学解析による細胞膜中の受容体に対する結合様式

以上のように、本研究を実施した結果、“グリセロリン脂質を細胞膜へのアンカー素子として活用することで、レジデンスタイムの長い超長時間作用持続型医薬の創出できる”との作業仮説を実験的に証明することに成功し、当初の目論見通り新規創薬

方法論確立への端緒を開くことができた。
今後は、膀胱以外の気管支などのより現実
的な投与部位への展開が可能である。

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 8 件)

S. Kawamura, Y. Ito, T. Hirokawa, E.
Hikiyama, S. Yamada, S. Shuto,
Ligand-Phospholipid Conjugation: a
Versatile Strategy for Developing
Long-Acting Ligands that Bind to Membrane
Proteins by Restricting the Subcellular
Localization of the Ligand. *J. Med. Chem.*
2018, 61, 4020-4029. DOI:
10.1021/acs.jmedchem.8b00041.
(査読有)

H. Fukuda, S. Ito, K. Watari, C. Mogi,
M. Arisawa, F. Okajima, H. Kurose, S. Shuto
Identification of a Potent and Selective
GPR4 Antagonist as a Drug Lead for the
Treatment of Myocardial Infarction. *ACS
Med. Chem. Lett.* 2016, 7, 493-497. DOI:
10.1021/acsmchemlett.6b00014. (査読有)

K. Tatani, M. Hiratochi, N. Kikuchi,
Y. Kuramochi, S. Watanabe, Y. Yamauchi, M.
Isaji, S. Shuto, Identification of Adenine
and Benzimidazole Nucleosides as Potent
Human Concentrative Nucleoside
Transporter 2 Inhibitors: Potential
Treatment for Hyperuricemia and Gout. *J.
Med. Chem.* 2016, 59, 3719-3731. DOI:
10.1021/acs.jmedchem.5b01884. (査読有)

T. Oura, K. Murata, T. Morita, A. Nezu,
M. Arisawa, S. Shuto, A. Tanimura, Highly
Sensitive Measurement of Inositol
1,4,5-Trisphosphate Using a Novel
Fluorescent Ligand and Ligand-Binding
Domain Combination. *ChemBioChem.* 2016, 17,

1509-1512. doi: 10.1002/cbic.201600096.
(査読有)

T. Sato, M. Watanabe, T. Tsuzuki, S.
Takano, T. Murayama, T. Sakurai, T. Kameda,
H. Fukuda, M. Arisawa, S. Shuto Design,
Synthesis, and Identification of
4"-Azidoethyl-Cyclic
ADP-Carbocyclic-Ribose as a Highly Potent
Analogue of Cyclic ADP-Ribose, a
Ca²⁺-mobilizing Second Messenger. *J. Med.
Chem.* 2016, 59, 7282-7286. (査読有)

M. Xiao, N. Hoshiya, K. Fujiki, T.
Honma, Y. Tamenori, S. Shuto, H. Fujioka,
M. Arisawa, Development of a
Sulfur-modified Glass-supported Pd
Nanoparticle Catalyst for the
Suzuki-Miyaura Coupling. *Chem. Pharm.
Bull.* 2016, 54, 1154-1161. (査読有)

H. Fukuda, R. Muromoto, Y. Takakura, K.
Ishimura, R. Kanada, D. Fushihara, M.
Tanabe, K. Matsubara, T. Hirao, K.
Hirashima, H. Abe, M. Arisawa, T. Matsuda,
S. Shuto, Design and synthesis of
cyclopropane congeners of resolvin E2, an
endogenous proresolving lipid mediator,
as its stable equivalents. *Org. Lett.* 2016,
18, 6224-6227. DOI:
10.1021/acs.orglett.6b02612. (査読有)

T. Bessho, T. Okada, C. Kimura, T.
Shinohara, A. Tomiyama, A. Imamura, M.
Kuwamura, K. Nishimura, K. Fujimori, S.
Shuto, O. Ishibashi, B. K. Kubata, T. Inui,
Novel Characteristics of Guanosine
5'-monophosphate 1 Reductase in
Pathogenic Protozoa *Trypanosoma brucei*
Distinct from Host Animal. *PLoS Negl. Trop.*

Dis. 2016, 10, e0004339. doi:10.1371
/journal.pntd.0004339. doi:
10.1371/journal.pntd.0004339.(査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

周東 智 (SHUTO, Satoshi)
北海道大学・薬学研究院・教授
研究者番号：70241346

(2)研究分担者

福田 隼 (FUKUDA, Hayato)
北海道大学・薬学研究院・助教
研究者番号：30434450

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()