

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07900

研究課題名(和文) アルツハイマー型認知症の改善作用を伴った新規糖尿病治療薬のイン・シリコ分子設計

研究課題名(英文) Discovery of SHIP2 inhibitors for novel drugs against type 2 diabetes accompanying dementia of Alzheimer's type

研究代表者

合田 浩明 (GOUDA, Hiroaki)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：60276160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病と認知症にはインスリンの作用不足という共通の分子基盤がある。それ故、インスリンシグナル伝達経路の負の調節因子SHIP2に対する阻害剤は認知症合併糖尿病に対する治療薬となる可能性がある。そこで、イン・シリコスクリーニングによる候補化合物探索、蛍光偏光法に基づいた候補化合物のSHIP2阻害活性測定、及び脂肪細胞を用いた候補化合物のインスリンシグナル増強作用測定を行い、治療薬開発のシードとなる新規SHIP2阻害剤を2つ同定した。また、SHIP2との結合様式及び相互作用エネルギー解析を行い、同定した新規阻害剤が既知阻害剤より強い阻害活性を示すのは、その良好な水素結合相互作用によることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Inhibitors of SHIP2 (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2) are considered to have great potential of treating type 2 diabetes accompanying dementia of Alzheimer's type. In this study, we first identified two novel inhibitors of SHIP2 using in silico screening, in vitro assay for detecting SHIP2 inhibition, and cell based assay for evaluating effect on insulin signaling. These two inhibitors were found to possess more potent SHIP2 inhibitory activities than those of known inhibitors such as AS1949490 and CPDA. We next constructed docking models of two new inhibitors with SHIP2 and evaluated interaction energies using quantum mechanics-based method. It was suggested that these inhibitors could form more stable hydrogen bonds with SHIP2 than CPDA, which would contribute their more potent inhibitory activities.

研究分野：イン・シリコ創薬技術を用いた合理的薬物設計

キーワード：SHIP2 阻害剤 イン・シリコスクリーニング 分子ドッキング計算 相互作用エネルギー計算 糖尿病  
インスリン アルツハイマー型認知症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会に向かっている我国では、今後、アルツハイマー型認知症を合併した糖尿病患者の増加が予想されるので、その治療法の確立が急務である。最近、糖尿病と認知症には「インスリンの作用不足」という共通の分子基盤があることがわかってきている。それゆえ、インスリンシグナル伝達経路の負の調節因子であるリピッドホスファターゼ SHIP2 が、認知症合併糖尿病に対する治療薬開発のための標的蛋白質として注目されている。SHIP2 は、インスリンシグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーである PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸) の 5 位を脱リン酸化して PI(3,4)P<sub>2</sub> を産生するホスファターゼである。

(2) 研究開始当初、我々は、既知 SHIP2 阻害剤の化学構造を利用した ligand-based drug design により、新規な SHIP2 阻害剤 CPDA の創製に成功していた。また、SHIP2 の X 線結晶構造が明らかとなったため、分子動力学シミュレーション及び精密分子ドッキング計算を用いて CPDA-SHIP2 複合体モデル構造を得ていた(図 1)。

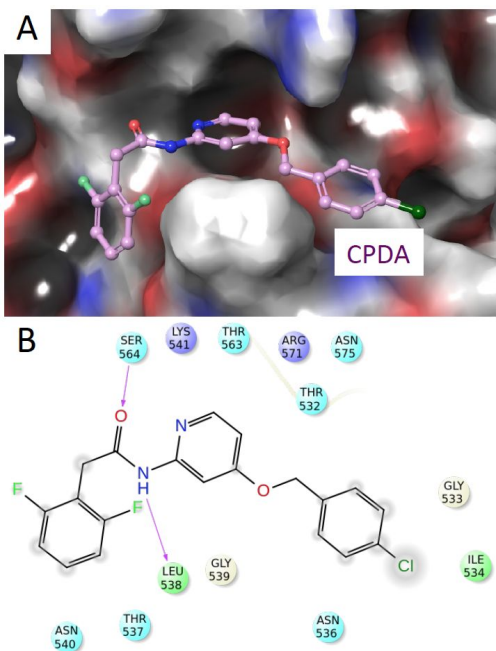


図1 A: CPDA-SHIP2複合体モデル構造、  
B: 相互作用ダイアグラム

## 2. 研究の目的

(1) 「イン・シリコスクリーニング」及び「セルベースアッセイ (インスリンシグナル増強作用の評価)」を行い、CPDA とは化学構造が異なる新規 SHIP2 阻害剤候補化合物を探索する。

(2) より基質ミミックなアナログを用いた、候補化合物の SHIP2 阻害活性評価系の構築を行う。これまで、基質アナログとして Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (図 2A) を用いる評価系を使

用していた。しかし、SHIP2 の本来の基質である PI(3,4,5)P<sub>3</sub> は、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> が持たない長鎖アシル基を有している。そのため、Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> を用いた評価系では、SHIP2 の長鎖アシル基結合部位に結合して SHIP2 阻害を引き起こす候補化合物を見落とす可能性があった。そこで、アシル基を有する基質アナログ PI(3,4,5)P<sub>3</sub> diC8 (図 2B) を用いた評価系の構築を目指す。

(3) 新たに構築した評価系により、SHIP2 阻害剤候補化合物の阻害活性を評価し、新たな SHIP2 阻害剤を同定する。

(4) 精密分子ドッキング計算により、新たに同定した阻害剤と SHIP2 の複合体モデル構造を構築する。そして、QM 計算に基づいた新たな解析手法により、その相互作用様式を詳細に解析する。

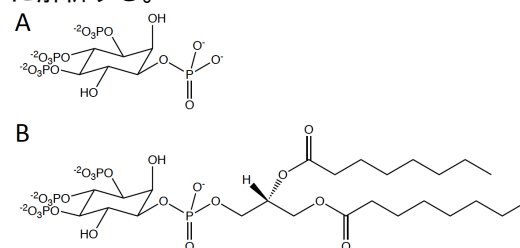


図2 A: Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>の化学構造、B: PI(3,4,5)P<sub>3</sub> diC8の化学構造

## 3. 研究の方法

(1) 「イン・シリコスクリーニング」及び「セルベースアッセイ」による新規 SHIP2 阻害剤候補化合物の探索 (1 回目)

まず、CPDA-SHIP2 複合体モデル構造(図 1)の結合様式に基づいて、SHIP2 との相互作用に重要と思われるファーマコフォアを CPDA 上に定義し、それらの立体配置までを含めた 3 次元ファーマコフォアモデルを作成する。

次に、プログラム Unity (Tripos 社) を用いて、作成した 3 次元ファーマコフォアモデルを満たす化合物を市販化合物データベースからスクリーニングし、得られた化合物の中からリード化合物ライクネスの指標である Oprea スコアを満たすものを一次候補化合物として選択する。

さらに、プログラム Glide (Schrödinger 社) を用いた分子ドッキング計算により Glide スコアが上位の化合物を選択し、選択された化合物について MM-GBSA 法を用いた結合自由エネルギー計算を行う。そして、結合自由エネルギーが上位の化合物を二次候補化合物とする。

プログラム Canvas (Schrödinger 社) を用いて、化学構造に基づいた二次候補化合物の分子類似性解析を行い、購入すべき代表二次候補化合物を決定する。

購入した代表二次候補化合物の存在下及び非存在下で、3T3-L1 脂肪細胞における Akt のリン酸化を評価する。そして、添加により

Akt のリン酸化の増強 (インスリンシグナルの増強) が観察された化合物を同定し、SHIP2 阻害剤候補化合物とする。

(2) 「イン・シリコスクリーニング」及び「セルベースアッセイ」による新規 SHIP2 阻害剤候補化合物の探索 (2 回目)

PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を基質とするリピッドホスファターゼとして、SHIP2 の他に PTEN も知られている。PTEN は癌抑制の機能を持つので、治療薬開発においては PTEN を阻害しないような SHIP2 選択的阻害剤を同定できると非常に心強い。そこで、2 回目の探索研究では、SHIP2 選択的阻害活性が期待できる候補化合物の探索を試みる。

1 回目の探索研究で、インスリンシグナル増強作用を示すヒット化合物 (ヒット) を得ることができたので、先ず、精密分子ドッキング計算によりヒット I-SHIP2 複合体モデル構造を構築する。

ヒット I-SHIP2 複合体モデル構造に基づいて、3 次元ファーマコフォアモデルを作成し、1 回目と同様に「プログラム Unity を用いた 3 次元ファーマコフォアベースのスクリーニング」及び「Oprea スコアによるフィルタリング」を行い、化合物データベースから一次候補化合物を抽出する。

プログラム Glide を用いて分子ドッキングベースのスクリーニングを行う。ここでは、SHIP2 の立体構造に加えて、PTEN の立体構造も用いる。先ず、一次候補化合物の SHIP2 の鍵穴構造に対する分子ドッキングを行い、結合親和性の指標となる Glide スコアがある閾値以上の強い値を示す化合物を抽出し、二次候補化合物とする。さらに、二次候補化合物の PTEN の鍵穴構造に対する分子ドッキングを行い、ここでは Glide スコアがある閾値以下の弱い値を示す化合物を選択し、三次候補化合物とする。

分子類似性解析による代表三次候補化合物の決定と購入、及び購入した化合物のインスリンシグナル増強作用の評価を 1 回目と同様に行い、SHIP2 選択的阻害剤候補化合物を同定する。

(3) より基質ミミックなアナログを用いた、候補化合物の SHIP2 阻害活性評価系の構築

この評価系の構築には、Echelon Biosciences Inc. の 5' PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Phosphatase Activity Fluorescence Polarization Assay Kit を利用した。このアッセイキットは、蛍光偏光 (FP) 法に基づいて SHIP2 の 5' フォスファターゼ活性を検出する。そこで、候補化合物を様々な濃度で添加し、このアッセイを行うことで、候補化合物の SHIP2 阻害活性の強さ (IC<sub>50</sub>) を評価することが可能である。具体的な手順を以下に記す。

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに緩衝液、候補化合物、及び SHIP2 を加え、室温で 10 分静置する。候補化合物の濃度は、2

倍希釈系列で最大 800 μM から最小 1.56 μM までの 10 点を用意する。

各ウェルに基質アナログ PI(3,4,5)P<sub>3</sub> diC8 を加え、25 °C で 30 分静置し、反応させる。30 分後、90 °C で 5 分間加熱することで反応を停止させる。そして、各ウェルの上澄み液を新しいマイクロプレートに移し替える。

移し替えられた上澄み液に PI(3,4)P<sub>2</sub> 検出タンパク質、及び蛍光 PI(3,4)P<sub>2</sub> プローブ分子を加え、室温で 50-60 分静置する。最後に、プレートリーダーで蛍光 PI(3,4)P<sub>2</sub> プローブ分子の分極の程度を測定する。

PI(3,4)P<sub>2</sub> 検出タンパク質の蛍光 PI(3,4)P<sub>2</sub> プローブ分子への結合は、SHIP2 の触媒作用により生成する PI(3,4)P<sub>2</sub> diC8 により阻害される。したがって、SHIP2 の触媒作用があると、PI(3,4)P<sub>2</sub> 検出タンパク質の蛍光プローブ分子への結合が減少し、観察される蛍光プローブ分子の分極が減少することになる。しかし、SHIP2 阻害剤が共存する場合は、PI(3,4)P<sub>2</sub> diC8 の生成が阻害されるので、蛍光プローブ分子の分極の減少が抑えられることになる。したがって、蛍光プローブ分子の分極の減少の程度を観察することで、候補化合物の SHIP2 阻害活性が評価できる。

(4) 精密分子ドッキング計算によるヒット化合物の結合様式解析、及び QM 計算を用いた詳細な相互作用解析

Akt のリン酸化の増強作用 (インスリンシグナルの増強作用) 及び SHIP2 阻害活性を共に示したヒット化合物については、精密分子ドッキング計算により、SHIP2 との結合様式モデルを得る。これには、プログラム Glide (Schrödinger 社) を用いる。さらに、得られた結合様式モデルに対して、新たに考案した QM 計算による相互作用解析法を適用する。この解析法によりヒット化合物と SHIP2 の相互作用を視覚的かつ定量的に捉えることができる。具体的な手順を以下に記す。

先ず、結合様式モデル構造からヒット化合物の結合配座を取り出した後、その周辺に 1 間隔のグリッド点 (GP(j)) を定義し、グリッド点にプローブ分子を配置し、リガンドとの相互作用エネルギー (E(j)) を計算する。この計算は B97XD/3-21G レベルで Gaussian 09 (Gaussian 社) を用いて行う。この計算の繰り返しにより、ヒット化合物についての分子相互作用場 (MIF) を得る。プローブ分子として複数の低分子化合物を用いてそれぞれ MIF を算出することで、ヒット化合物の周囲に形成可能な相互作用情報を相互作用相手となる化学種の特長毎に得ることができる。例えば、格子点上に配置した水分子の水素原子をヒット化合物方向に配向させて相互作用エネルギーを算出すれば、水素結合供与性の化学種によってヒット化合物周辺に形成される相互作用の相対位置と強さを得ることができる。本研究では、水素結合供与性 (HD) のプローブ分子として H<sub>2</sub>O を用い MIF を

算出する。同様に、NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, benzene を、それぞれ水素結合受容性(HA)、親油性(LP)、芳香族性(AR)のプローブ分子として用いる。各格子点のエネルギーは、E<sub>type</sub>(j)(type=HD, HA, LP, AR)で表す。

次に、SHIP2 の鍵穴側の物理化学的特性をシンプルに表現するために、鍵穴構造上に、水素結合供与性(HD)、受容性(HA)、親油性(LP)、芳香属性(AR)の4種類の特性球(S<sub>type</sub>(i), type=HD, HA, PL, AR)を配置する。

続いて、MIF を特性球表記された SHIP2 の鍵穴構造上に重ねる。MIF と SHIP2 上の MIF と同じ性質の特性球とが重なる点は、ヒット化合物と SHIP2 の相互作用点と捉えることができる。この仮定の下では、各特性球 S<sub>type</sub>(i) とヒット化合物の間の相互作用エネルギー(E<sub>type</sub>(i))は、次式で算出できる。

$$E_{type}(i) = \sum_j E_{type}(j) \delta(\mathbf{R}_{type,i} - \mathbf{R}_j), \quad type = HD, HA, LP, AR$$

ここで R<sub>type, i</sub> と R<sub>j</sub> はそれぞれ特性球とグリッド点の位置ベクトルで δ はデルタ関数である。実際の計算では、特性球 S<sub>type</sub>(i) から半径 1 以内の格子点のうち最も近い格子点 GP(j) について δ = 1 とし、それ以外では δ = 0 とする。また、相互作用エネルギー(E(i))を用いて、各化学種ごとの相互作用を次式により算出する。

$$E_{type} = \sum_i E_{type}(i), \quad type = HD, HA, LP, AR$$

これらの値を用いて、ヒット化合物と SHIP2 の間の相互作用を、次式により見積もる。

$$E_{p-l} = E_{HD} + E_{HA} + E_{LP} + E_{AR}$$

#### 4. 研究成果

(1) 「イン・シリコスクリーニング」及び「セルベースアッセイ」による新規 SHIP2 阻害剤候補化合物の探索 (1 回目)

図 3 にイン・シリコスクリーニング (1 回目) の結果を示す。

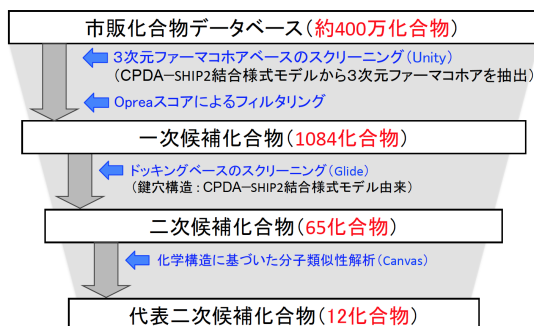


図3: イン・シリコスクリーニング(1回目)の結果

図 1 の CPDA-SHIP2 複合体モデル構造に基づき全部で 6 個の 3 次元ファーマコホア (芳香族性: 3 個、水素結合受容性: 2 個、水素結合供与性: 1 個) を定義した。そして、SHIP2 の鍵穴構造内で、これら 3 次元ファーマコホアの配置を模倣でき、かつ Oprea スコアを満たす化合物を検索したところ、1084 個の一次

候補化合物を市販化合物データベースから抽出できた。

SHIP2 の鍵穴構造に対する一次候補化合物の分子ドッキング計算を行い、MM-GBSA 法により計算された結合自由エネルギー値が -30 kcal/mol より安定な化合物を選択し、65 個の二次候補化合物を選択した。

二次候補化合物について分子類似性解析を行い、全部で 12 個の代表二次候補化合物を決定した。

代表二次候補化合物を購入し、セルベースアッセイを行ったところ、2 つの化合物について Akt のリン酸化の増強 (インスリンシグナルの増強) が観察された。この 2 つのヒット化合物 (ヒット 及び ) が SHIP2 阻害剤候補化合物となる。ヒット について、精密分子ドッキング計算により得られた結合様式モデルを図 4 に示す。

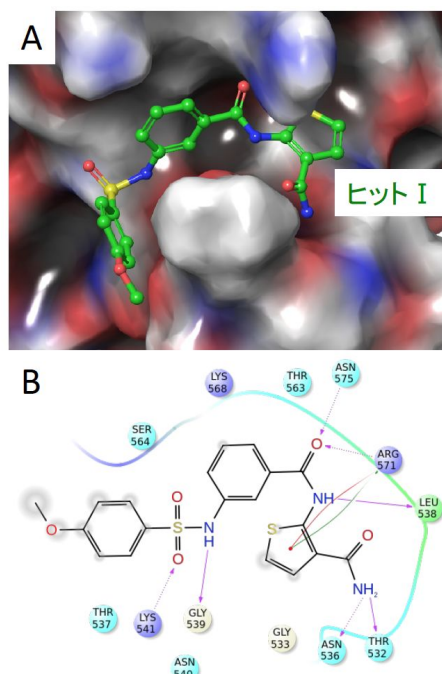


図4 A: ヒット I -SHIP2複合体モデル構造、  
B: 相互作用ダイアグラム

(2) 「イン・シリコスクリーニング」及び「セルベースアッセイ」による新規 SHIP2 阻害剤候補化合物の探索 (2 回目)

図 5 にイン・シリコスクリーニング (2 回目) の結果を示す。

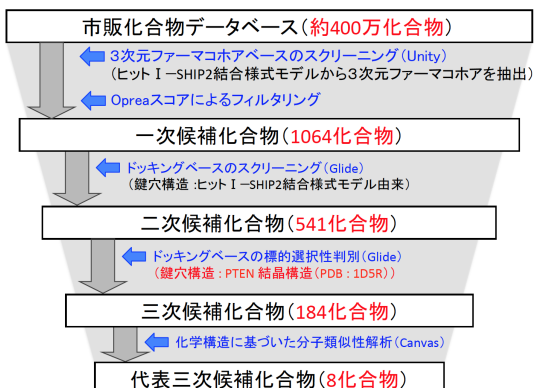


図5: イン・シリコスクリーニング(2回目)の結果



図4のヒット -SHIP2 複合体モデル構造に基づき全部で7個の3次元ファーマコホア（芳香族性：3個、水素結合受容性：1個、水素結合供与性：3個）を定義した。そして、SHIP2の鍵穴構造内で、すべての水素結合性ファーマコホアの配置、1つ以上の芳香族性ファーマコホアの配置を模倣できる化合物を化合物データベースから検索し、さらにOpreaスコアを満たす化合物を抽出したところ、1064個の一次候補化合物を得た。

ドッキングベースのスクリーニングを行う前に、SHIP2及びPTENの鍵穴構造に対するドッキング計算におけるGlideスコア（結合親和性の指標となるスコア）の閾値を設定した。まず、各タンパク質の既知阻害剤をスクリーニングに用いる鍵穴構造に対してドッキングし、得られたトップポーズのGlideスコアと $IC_{50}$ の相関を求めた。その結果、SHIP2阻害剤についてはGlideスコア：-5.5、PTEN阻害剤についてはGlideスコア：-4.5を閾値とすることで、 $IC_{50}$ が数 $\mu\text{M}$ 以下の強い阻害剤と $IC_{50}$ が数百 $\mu\text{M}$ 以上の弱い阻害剤を区別できることが明らかとなった。

SHIP2の鍵穴構造に対する一次候補化合物の分子ドッキング計算を行い、Glideスコアが-5.5より小さい化合物を選択し、既知阻害剤と同等以上のSHIP2結合親和性を有する可能性の高い二次候補化合物（541個）を選択した。

得られた二次候補化合物について、SHIP2/PTEN間の標的選択性を判別した。各化合物をPTEN鍵穴構造に対してドッキングし、Glideスコアが-4.5より大きい化合物をPTENとの結合親和性が低い選択的SHIP2阻害剤の候補化合物とした。その結果、184個の三次候補化合物が抽出できた。

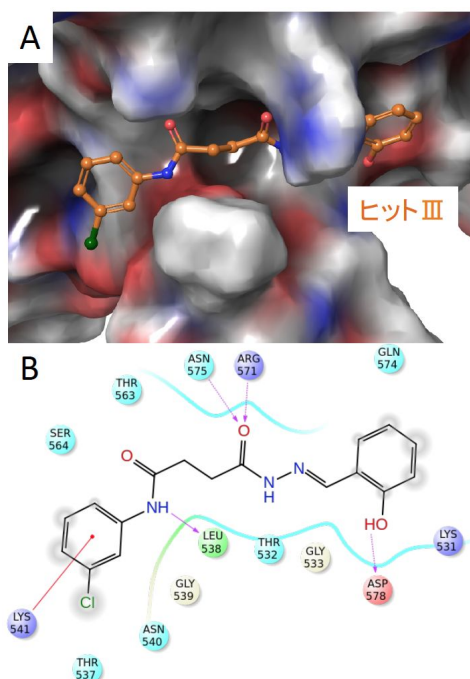


図6 A: ヒットIII-SHIP2複合体モデル構造、  
B: 相互作用ダイアグラム

最後に分子類似性解析により、184個の三次候補化合物から8個の代表三次候補化合物を決定した。

代表三次候補化合物を購入し、セルベースアッセイを行ったところ、1つの化合物についてAktのリン酸化の増強（インスリンシグナルの増強）が観察された。このヒット化合物（ヒット）は選択的SHIP2阻害剤の候補化合物となる。ヒットについて、精密分子ドッキング計算により得られた結合様式モデルを図6に示す。

(3) より基質ミミックなアナログを用いた、候補化合物のSHIP2阻害能評価系の構築  
新たに構築した評価系を用いて、代表的なSHIP2阻害剤であるAS1949490の阻害活性を評価した結果を図7に示す。きれいな濃度依存性を示すシグモイド型の阻害曲線を描くことができた。また、AS1949490に対して得られた $IC_{50}$ 値は、367.9 $\mu\text{M}$ であった。

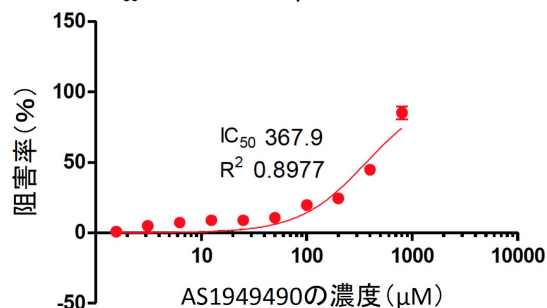


図7: 新たに構築した評価系を用いて得られた、代表的な既知SHIP2阻害剤AS1949490の阻害曲線

(4) ヒットI～IIIのSHIP2阻害活性測定  
ヒットI～IIIに対して得られた $IC_{50}$ 値を、表1に示す。ヒットI及びIIは、代表的な既知阻害剤AS1949490、及び我々が先に創製したCPDAよりも強いSHIP2阻害活性を示した。我々は、新たな化学構造を有する新規SHIP2阻害剤を2つ得ることに成功した。また、ヒットIIIは、SHIP2/PTEN間の標的選択性も考慮したイン・シリコスクリーニングから同定された化合物であるので、この化合物はSHIP2に選択的な阻害剤である可能性が非常に高い。ところで、ヒットIIIについては明白なSHIP2活性が観察されなかった。しかし、ヒットIIIはAktのリン酸化の増強作用を示す。この現象を説明する可能性の一つとして、ヒットIIIがPTEN阻害剤であることが考えられる。

表1: 各化合物のSHIP2阻害活性

化合物	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
AS1949490	367.9
CPDA	336.5
ヒットI	263.7
ヒットII	> 10,000
ヒットIII	312.0

(5) 新規 SHIP2 阻害剤と SHIP2 の複合体モデル構造の構築、及び QM 計算に基づいた相互作用解析

表2: 各化合物のSHIP2との相互作用エネルギー(kcal/mol)

相互作用エネルギーの種類	化合物		
	CPDA	ヒット I	ヒット III
$E_{HD}$ (SHIP2側の水素結合供与性(HD)原子団との相互作用エネルギー)	-23.89	-27.15	-24.69
$E_{HA}$ (SHIP2側の水素結合受容性(HA)原子団との相互作用エネルギー)	-19.00	-51.53	-56.55
$E_{LP}$ (SHIP2側の親油性(LP)原子団との相互作用エネルギー)	-1.86	-3.18	-3.46
$E_{AR}$ (SHIP2側の芳香族性(AR)原子団との相互作用エネルギー)	0.00	0.00	0.00
$E_{p-1}$ (全相互作用エネルギー)	-44.75	-81.86	-84.70

分子ドッキング計算により得られた、CPDA、ヒット 及び についての SHIP2 との複合体モデル構造は、それぞれ、図 1、4、及び 6 に示されている。これら複合体モデル構造に対して計算された相互作用エネルギー値を表 2 に示す。ヒット 及び の SHIP2 との全相互作用エネルギー値 ( $E_{p-1}$ ) は、CPDA の値より大きく安定であった。これより、ヒット 及び が CPDA より強い SHIP2 阻害活性を示すのは、SHIP2 との結合親和性が強いためであると考察できる。また、各成分の比較より、ヒット 及び の  $E_{p-1}$  が CPDA より大きく安定なのは、SHIP2 側の水素結合受容性原子団との相互作用エネルギー ( $E_{HA}$ ) について、ヒット 及び が CPDA より大きく安定であるためと理解できる。すなわち、ヒット 及び 側の水素結合供与性原子団が SHIP2 との相互作用エネルギーを大きく獲得しているといえる。これらの知見は、今後の認知症合併糖尿病に対する治療薬開発に大きく役立つものと思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

合田 浩明、コンピュータを利用したドラッグデザインの実際、昭和学会雑誌、査読有、75 巻、2015、302-311  
DOI:10.14930/jshowaunivsoc.75.302

〔学会発表〕(計 3 件)

早川 大地、渡邊 友里江、合田 浩明、ハロゲン結合や弱い水素結合を記述可能な分子相互作用場計算法の構築、日本薬学会第 138 年会、2018、金沢  
Shin-ichiro Ozawa, Hiroaki Gouda, Schuichi Hirono, In silico screening for selective inhibitors of SHIP2 as a novel therapeutic agent for diabetes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015), 2015, Honolulu, USA.  
Shin-ichiro Ozawa, Hiroaki Gouda, Schuichi Hirono, In silico screening

for selective inhibitors for SHIP2 as a novel anti-diabetic drug, The 43rd Symposium on Structural Activity Relationship 2015 & The 10th Japan-China Joint Symposium on Drug Discovery and Development, 2015, Niigata, Japan.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

合田 浩明 (GOUDA, Hiroaki)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号：6 0 2 7 6 1 6 0

(2) 連携研究者

豊岡 尚樹 (Toyooka, Naoki)  
富山大学・大学院理工学研究部・教授  
研究者番号：1 0 2 1 7 5 6 5

笹岡 利安 (SASAKA, Toshiyasu)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：0 0 2 7 2 9 0 6

(3) 研究協力者

梅田 知伸 (UMEDA, Tomonobu)  
田中 信忠 (TANAKA, Nobutada)