

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03999

研究課題名(和文) 多因子疾患全身性強皮症治療薬のリード創製と最適化

研究課題名(英文) Development and optimization of leads for multifactorial disease systemic sclerosis

研究代表者

大塚 雅巳(Otsuka, Masami)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・客員教授

研究者番号：40126008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：多因子疾患全身性強皮症の治療薬をめざし、細胞の形態変化を指標としたフェノタイプスクリーニングにより見出した化合物HPH-15、多彩な生理活性をもつIP6のプロドラッグ体、細胞毒性物質HNEを消去するカルノシン誘導体について検討を行った。HPH-15の誘導体を計20種類合成し、そのうち10種類が、ヒト皮膚細胞のコラーゲン産生に対する抑制効果においてHPH-15より強い活性を示した。またHPH-15の標的蛋白質を同定した。一方、IP6プロドラッグ体Pro-IP6は細胞に取り込まれ、細胞内でIP6に変換されることを立証した。カルノシン誘導体CNNによりカルノシンより優れたHNE消去活性が実現された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は皮膚や組織にコラーゲンが蓄積して硬化、線維化する自己免疫疾患である。明確な原因が不明で、対症療法のみで根治薬がなく、難病に指定されている。しばしば間質性肺炎、腎クレーゼなどの内臓線維化による重篤な疾患を併発し、死に至る場合もある。本研究ではさきに見出していた化合物HPH-15より優れた活性を示す誘導体を合成し、その標的蛋白質を同定した。さらにIP6のプロドラッグと細胞毒性アルデヒドHNEを消去するCNNを開発した。本研究では多因子疾患全身性強皮症に対して複数の標的に作用する化合物を見出したことから、全身性強皮症治療薬開発へと結びつくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming at remedy of multifactorial disease systemic sclerosis, a compound HPH-15 discovered by phenotype screening using cell morphological changes, a prodrug of IP6 that has various physiological activities, and a carnosine derivative that eliminate cytotoxic aldehyde HNE were investigated. A total of 20 HPH-15 derivatives were synthesized, and 10 of them showed stronger activity than HPH-15 in suppressing collagen production in human skin cells. We also identified the target protein of HPH-15. On the other hand, we demonstrated that the IP6 prodrug Pro-IP6 is cell-permeable and converted into IP6 in the cells. A carnosine derivative CNN showed the HNE capturing activity superior to that of carnosine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は皮膚や組織にコラーゲンが蓄積して硬化、線維化する自己免疫疾患で、難病に指定されている。皮膚硬化に加えて心臓、肺、腎臓で線維化病変を併発すると生命に関わり、10年生存率は60%前後である。本疾患にはいまだ根治薬がなく、対症療法として、皮膚硬化に副腎皮質ステロイド、間質性肺炎の併発にシクロホスファミドが用いられる。

全身性強皮症ではコラーゲン産生に直結する TGF- β /Smad 系恒常的な亢進(尹ら, Arch. Immunol. Ther. Exp., 50, 325, 2002.)。また、①TGF- β /Smad 系を抑制する転写因子 Fli-1 の発現の低下(浅野ら, Mol. Cell Biol., 29, 425, 2009.)、②TGF- β /Smad 系の活性化と同時に見られる CTGF の発現亢進を強力に抑制する KLF-5 の低下(浅野ら, Nature Communication, 5, Article 5797, 2014.) が報告されている。

上皮系細胞を TGF- β で刺激すると間葉系フェノタイプへの形質転換が起こり、コラーゲン産生が亢進して線維化細胞集塊を形成することから、研究代表者らは細胞の集塊形成を抑える化合物のスクリーニングを行い、ヒット化合物 HPH-15 を得た。HPH-15 は繊維芽細胞のコラーゲン産生を抑え(IC₅₀ 1.8 μ M)、発症につながる Smad、Fli-1、KLF-5、CTGF の全てに作用した。HPH-15 経口投与はブレオマイシン(BLM)誘導強皮症モデルマウスの皮膚肥厚を抑制し、目視では特段の毒性は観察されなかった。

しかし、マウスで皮膚肥厚を治癒するためには 100mg/kg という高用量の HPH-15 を必要とすることから活性の増強が課題であった。また、HPH-15 は細胞集塊を観察するフェノタイプスクリーニングで見出されたため、標的蛋白質が不明であった。

2. 研究の目的

全身性強皮症は、TGF- β /Smad 系だけでなく、PI3K/Akt 系、4-hydroxynonenal (HNE)・自己免疫系などの多因子が複合的に関与する疾患であることから(図1)、単一標的アプローチではなく、以下のようなマルチ標的アプローチを行うことを目的とした。

- (1) TGF- β / Smad 系に対しては、化合物 HPH-15 の活性増強を図るとともに標的解析を行う。
- (2) PI3K/Akt 系に対しては、PI3K/Akt を阻害するイノシトールヘキサキスリン酸 IP6 の細胞膜透過性誘導体を合成する。
- (3) HNE・自己免疫系に対しては、HNE を捕捉消去するカルノシン誘導体を設計合成する。

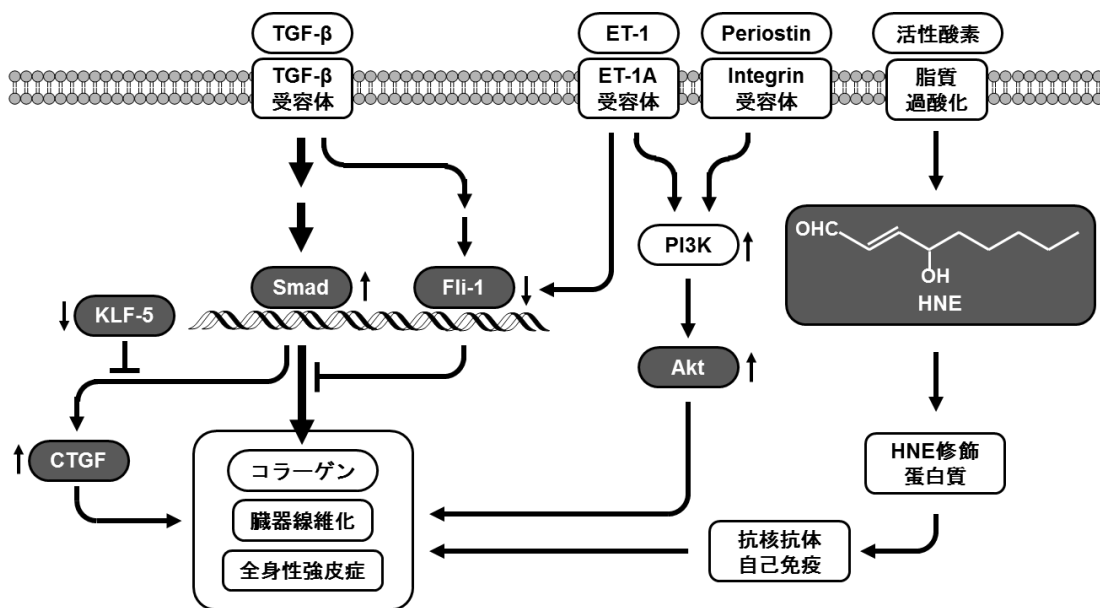


図1 全身性強皮症に複合的に関与する諸因子

3. 研究の方法

上記の3つの研究目的に対し、以下のような実験を行う。

- (1) HPH-15 に種々の置換基を導入した誘導体を合成し活性の増強を図るとともに、HPH-15 の標的蛋白質を同定する。
- (2) IP6 の細胞透過性を改善するため、リン酸基にブタノイルオキシメチル基を導入したプロドラッグを合成し、細胞膜透過と細胞内での機能を検討する。
- (3) 細胞毒性アルデヒド HNE と安定な付加物を生成するようにカルノシンの構造を改良する。

4. 研究成果

(1) HPH-15 の活性増強と標的同定

HPH-15 の構造を改変した 20 種類の誘導体を合成した。ヒト皮膚細胞を TGF- β で刺激したときのコラーゲン産生に対する抑制効果を調べたところ、20 種類の化合物のうち 10 種類の化合物において、より強い活性を示す傾向がみられた。

また HPH-15 の標的蛋白質の探索を行い、標的蛋白質の同定に成功した。

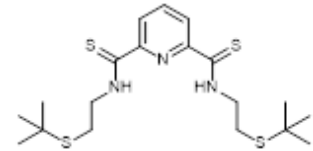


図 2 HPH-15

(2) 細胞膜透過性 IP6

IP6 の 6 個のリン酸基に 12 個のブタノイルオキシメチル基を導入したプロドラッグ Pro-IP6 を合成した (図 3)。HeLa 細胞を IP6 または Pro-IP6 とインキュベートした後に細胞を破碎し、トリメチルシリルジアゾメタンでメチル化処理を行い、LC/MS にて分析したところ、Pro-IP6 で処理した細胞破碎液のみから IP6 のメチルエステルが検出された (図 4)。この実験結果は Pro-IP6 が細胞に取り込まれ、細胞内で IP6 に変換されたことを実証したものである。さらに Jurkat 細胞を IP6 または Pro-IP6 によって処理したところ、Pro-IP6 のみが Akt のリン酸化を阻害した (図 5)。

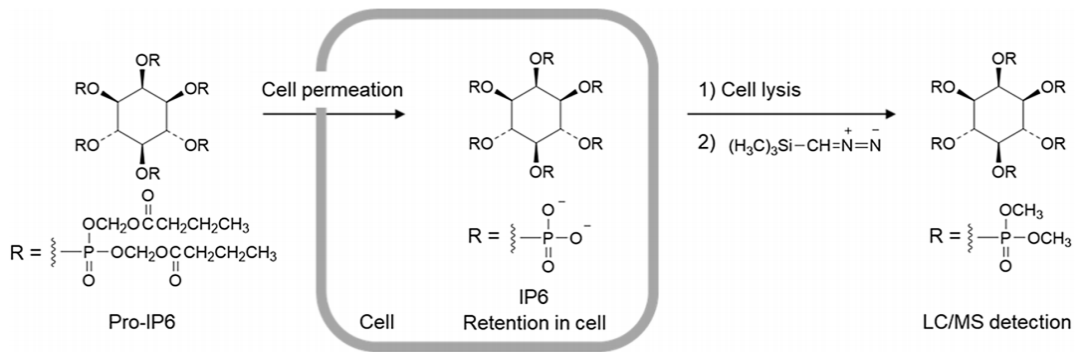


図 3 Pro-IP6 の細胞への取り込みと、細胞内での IP6 への変換

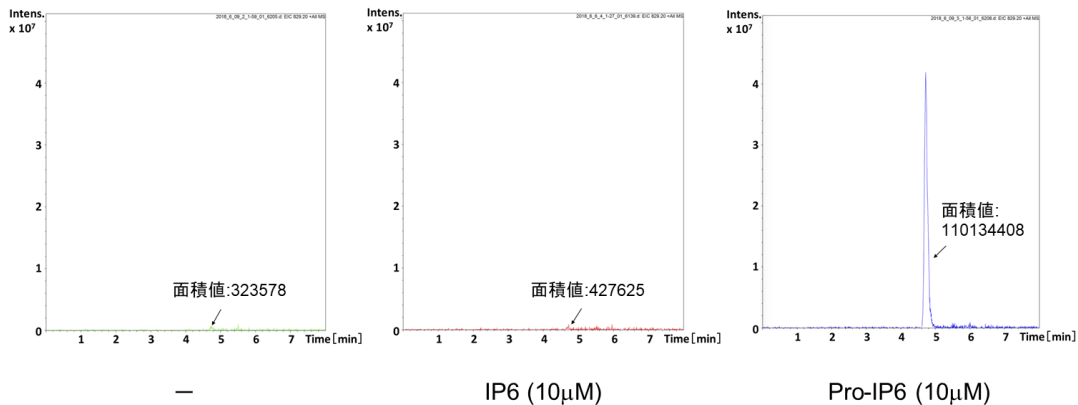


図 4 HeLa 細胞破碎液からの IP6 メチルエステルの LC/MS による検出

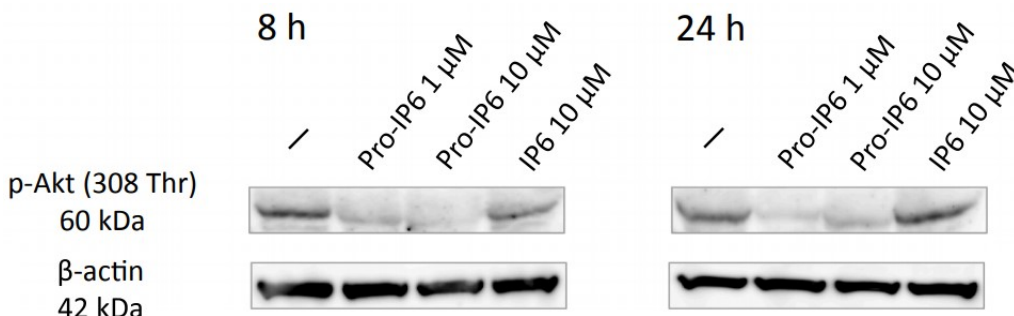


図 5 Pro-IP6 による Akt リン酸化の阻害

(3) HNE を捕捉消去するカルノシン誘導体

ω -6 不飽和脂肪酸の過酸化により細胞毒性アルデヒド 4-hydroxynonenal (HNE) が生成し、種々の疾病に関与することが知られている (図6)。

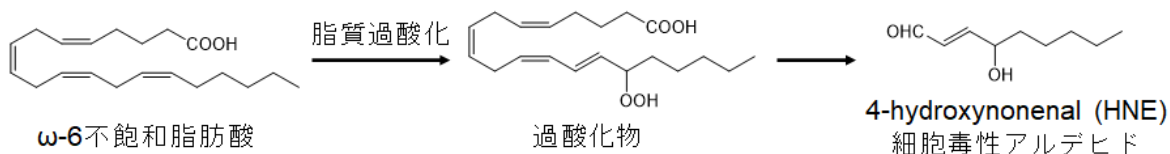


図6 ω -6 不飽和脂肪酸の過酸化による細胞毒性アルデヒド HNE の生成

β -アラニンとヒスチジンからなるジペプチド β -Alanyl-L-histidine であるカルノシン (CAR) は骨格筋や中枢神経系に分布する。CAR は HNE と反応して環化付加物を生成することが知られている。またヒスチジンヒドラジド (HH) も同様の付加物を形成することが報告されている。本研究では CAR と HH の構造的特徴を併せ持つ化合物カルノシンヒドラジド (CNN) を設計、合成した (図7)。CAR、HH、および CNN をリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 37°C にて HNE とインキュベートし、逆相 HPLC で分析したところ、CNN が最も高い HNE 消去活性を示した (図8)。

以上から、全身性強皮症を含む HNE の関与する疾病の治療薬として CNN の応用が期待される。

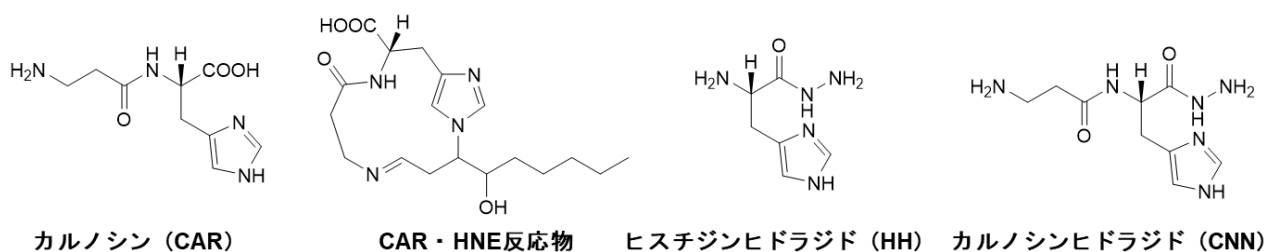


図7 CNN の分子設計

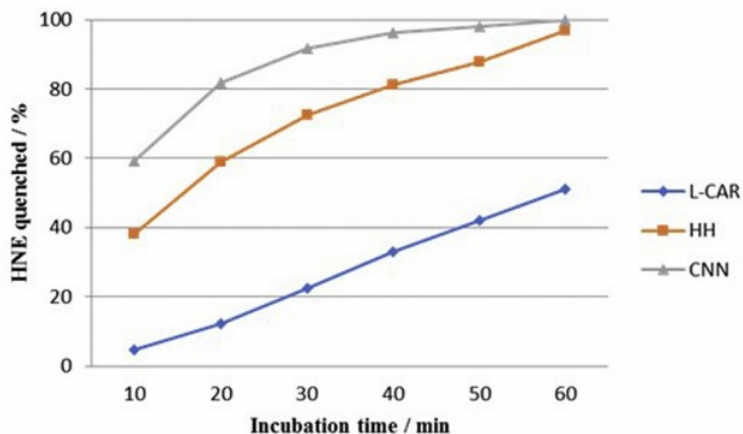


図8 CNN による HNE の消去

以上のように、本研究では多因子疾患全身性強皮症に対して複数の標的に作用する化合物を見出したことから、全身性強皮症治療薬開発へと結びつくものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計29件（うち査読付論文 29件 / うち国際共著 20件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuya Masunaga, Naoki Muraio, Hiroshi Tateishi, Ryoko Koga, Takeo Ohsugi, Masami Otsuka, Mikako Fujita.	4. 巻 163
2. 論文標題 Anti-cancer activity of the cell membrane-permeable phytic acid prodrug	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 103240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kei Noguchi, Taha Ali, Junko Miyoshi, Kimihiko Orito, Tanima Biswas, Naomi Taira, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Motohiro Morioka, Tetsuya Negoto	4. 巻 163
2. 論文標題 Neuroprotective effects of a novel carnosine-hydrazide derivative on hippocampal CA1 damage after transient ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vu Huy Luong, Takenao Chino, Noritaka Oyama, Takashi Matsushita, Yoko Sasaki, Dai Ogura, Shin-ichiro Niwa, Tanima Biswas, Akiyuki Hamasaki, Mikako Fujita, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Hironobu Ihn, Minoru Hasegawa	4. 巻 20
2. 論文標題 Blockade of TGF- β /Smad signaling by the small compound, HPH-15, ameliorates experimental skin fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 46-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s13075-018-1534-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 14件）

1. 発表者名 Masami Otsuka
2. 発表標題 Strategic Design of Drug Core Structure
3. 学会等名 Ege University-Kumamoto University-Karadeniz Technical University Collaborative Meeting at Multidisciplinary studies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Otsuka
2. 発表標題 Strategic Design of Drug Core Structure: A Bleomycin Spinout Story
3. 学会等名 The fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Otsuka
2. 発表標題 Strategic Design of Drug Core Structure -From Natural Molecules to Non-Natural Molecules-
3. 学会等名 Karadeniz Technical University-Ege University-Kumamoto University Collaborative Research on Development of Anti-cancer Gypsogenin Derivatives (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増永拓弥、立石大、村尾直樹、古賀涼子、藤田美歌子、大塚雅巳
2. 発表標題 細胞膜透過性を向上したIP6誘導体の合成と活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanima Biswas, Taha Farouk Shehata Ali, 平尚未、古賀涼子、森美晴、岡本良成、藤田美歌子、折戸公彦、野口慶、三好淳子、森岡基浩、大塚雅巳
2. 発表標題 HNEを標的とした新規脳保護薬
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masami Otsuka
2. 発表標題 Bleomycin Revisited: Man-Made Bleomycin with New Function “Surgical Operation” of a Drug Molecule
3. 学会等名 Turkish-Japanese Workshop on Bioorganic Medicinal Chemistry and Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masami Otsuka
2. 発表標題 From Natural Bleomycin to Man-Made Bleomycin
3. 学会等名 The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 フィチン酸エステル誘導体	発明者 藤田美歌子、大塚雅巳、大杉剛生、立石大、村尾直樹、増永	権利者 熊本大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-161944	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 線維症治療薬	発明者 倉原琳、尹浩信、大塚雅巳	権利者 サイエンスファーム株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2019-15226	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>熊本大学大学院生命科学研究部 サイエンスファーム生体機能化学共同研究講座 http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsigouseiHP/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----