

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15487

研究課題名(和文) 抗真菌薬イトラコナゾールのオフターゲット標的解析

研究課題名(英文) Analysis of off-target activities of an anti-fungal drug Itraconazole

研究代表者

大金 賢司(Ohgane, Kenji)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：30771092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：イトラコナゾールは、真菌のエルゴステロール合成を阻害する抗真菌剤として広く使用されている。本研究では、イトラコナゾールの新しい生物活性として、ニーマンピック病C型の原因となるNPC1変異体のフォールディング異常を修正する作用があることを明らかにした。またイトラコナゾールのNPC1変異体のフォールディング異常を修正する作用に着目した構造活性相関研究を通して光親和性標識プローブ化し、NPC1変異体に直接結合して変異体を安定化しているというメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性難病の原因として、特定のタンパク質に変異が入り、そのタンパク質の三次元構造(フォールディング)に異常をきたす場合があります。そのようなフォールディング異常タンパク質は、細胞により不良品として認識されて分解されてしまいます。本研究では、そのようなフォールディング異常で起こりうる疾患の一つ、ニーマンピック病C型に関して、原因となるNPC1タンパク質変異体のフォールディング異常を修正する化合物の探索を行い、既存薬の中からいくつかの候補化合物を見出し、その作用機序の解析を行いました。ただちに薬となる訳ではありませんが、これらの化合物・知見は治療薬の開発に向けた研究の進展に寄与すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：We revealed that itraconazole, a widely used antifungal that targets ergosterol synthesis in fungi, serves as a pharmacological chaperone for an NPC1 mutant responsible for Niemann-Pick type C disease. Employing photo-crosslinking approach, we demonstrated direct interaction of itraconazole and the NPC1 mutant, which leads to stabilization of the folding-defective, unstable NPC1 mutant.

研究分野：医薬化学, ケミカルバイオロジー

キーワード：イトラコナゾール オフターゲット NPC1 ファーマコロジカルシャペロン 光親和性標識

## 1. 研究開始当初の背景

たとえ薬として使われているものであっても、低分子化合物の標的タンパク質選択性は必ずしも高いものではなく、複数の標的タンパク質に結合することは多い。このようなマルチターゲット性は、場合によっては望まない副作用の原因となることから、マルチターゲット性を下げようとする修飾・改良が必要なこともあるが、他の標的タンパク質や他の用途へと適用範囲を拡張するという観点では有用な性質でもある。このような、既知の薬剤や生物活性化合物の新たな生物活性に着目し、それを利用する試みは、ドラッグリポジショニングと呼ばれる手法である。

このような手法は、既知薬など既にヒトでの安全性が一定程度担保されている化合物を使用することから、低コストで早く臨床応用につながりうるという利点がある。患者数の非常に少ない希少疾病の治療薬開発においては、採算性の確保の難しさから新薬開発が困難な場合があるが、ドラッグリポジショニングではそのような問題点を回避できることから、希少疾病の治療薬探索において期待されている手法である。

申請者らの研究グループでは、タンパク質のフォールディング異常により起こる希少疾病の治療薬候補の探索を行なっている。研究開始当時、ニーマンピック病 C 型と呼ばれる難病に関して、その原因となる NPC1 タンパク質のフォールディング異常を修正する化合物(薬理的シャペロン)としてオキシステロール誘導体を見出していたが、新規化合物であり代謝安定性や安全性が不明であるなど、治療薬としての開発は難しい状況であった [Ohgane et al. (2013) Chem. Biol. 20: 391; Ohgane et al. (2014) Bioorg. Med. Chem. Lett. 24: 3480; Fukuda et al. (2017) Bioorg. Med. Chem. Lett. 27: 2781]。そのような背景から、申請者らはドラッグリポジショニングの手法を取り入れ、既存薬の中からオキシステロール誘導体同様のシャペロン様作用を示す化合物の探索に取り組み、抗真菌薬として知られるイトラコナゾールなどいくつかの化合物を候補化合物として見出した。本来イトラコナゾールは、真菌のエルゴステロール合成を担う酵素の阻害剤であり、NPC1 変異体に対するシャペロン様作用の作用機序は明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から本研究では、イトラコナゾールの NPC1 変異体に対するシャペロン様作用というオフターゲット作用(本来の標的以外の標的を介した作用)のメカニズムの解明を目指し、イトラコナゾールのケミカルプローブ化およびそれを用いた作用機序の理解を目指した。

## 3. 研究の方法

下記のような流れで研究を進めた。

(1) NPC1 変異体に対してシャペロン作用を示す化合物として、既存薬のスクリーニングからは、イトラコナゾールとその類縁体ポサコナゾール、キナーゼ阻害剤として知られるラパチニブ、強心剤として知られるジゴキシンがヒットとして得られていた。まず最初に、これらの化合物が薬理的シャペロンであるオキシステロール誘導体と同様の作用機序を持つのか、NPC1 変異体に対する作用の多面的な評価から検討を行った。

(2) 上記(1)の検討から、ジゴキシンに関しては作用機序が推定できたが、イトラコナゾール・ポサコナゾールとラパチニブに関しては、さらなる確認が必要となったことから、両系統の化合物のケミカルプローブ化を目指した。その前段階として、これらの化合物のどの部位が生物活性に影響を与えずに修飾可能か、構造活性相関を調べた。

(3) 構造活性相関の結果に基づき、光親和性反応基と検出用官能基を複数の組み合わせで導入した光親和性標識プローブ群をデザインし、それらの合成および NPC1 変異体に対する活性評価を行った。

(4) 得られたイトラコナゾールの光親和性標識プローブを用いることで、オキシステロール誘導体と同様に、直接 NPC1 変異体に結合して作用するのか、つまり薬理的シャペロンとして作用しているのか、検証を行った。具体的には、NPC1 変異体を発現した細胞から膜画分を調製し、プローブが照射依存的に NPC1 変異体と共有結合を形成するか調べることで、直接的な相互作用を評価した。

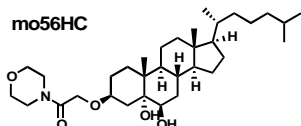
## 4. 研究成果

### (1) スクリーニングから得られた化合物の活性プロファイル

NPC1 変異体のフォールディング状態を改善する化合物のスクリーニングは、NPC1 変異体の細胞内局在をイメージングにより取得し、その画像解析による定量により行っていた。このスクリーニングは、NPC1 変異体に対する薬理的シャペロンの探索を主目的として行っているものであるが、NPC1 変異体に直接結合してフォールディング状態を改善する薬理的シャペロンのほか、フォールディング環境や細胞の品質管理機構側に作用する化合物もヒットとして得られる可能性があった。

ヒットとして得られた化合物は、全て NPC1 変異体の局在をフォールディング異常を起こしたタンパク質に特徴的な小胞体(ER)局在から、NPC1 本来の局在であるライソゾーム・後期末ソーム局在へと変化させた。また、イトラコナゾール、ポサコナゾールおよびラパチニブに関しては、以前に報告した薬理的シャペロン mo56HC と同様に、NPC1 変異体の安定化されることもフローサイトメトリーにより確認された。これらは薬理的シャペロンとして作用する可能性が高いと考えられたが、ジゴキシンに関してはむしろ NPC1 変異体を不安定化することが示唆された。細胞毒性の高さから詳細な検討は行わなかったが、他のフォールディング異常を起こした膜タンパク質(Cystic fibrosis transmembrane conductor)において、小胞体カルシウム濃度を変化させ、フォールディングの効率に影響を与えるとの報告があることから [Zhang et al. (2012) Front. Pharmacol. 3: 176]、NPC1 変異体に対しても同様の作用を示している可能性が高いと考えられる。

#### Pharmacological chaperone for NPC1-I1061T mutant



#### Hit compounds that improved folding efficiency of the NPC1 mutant

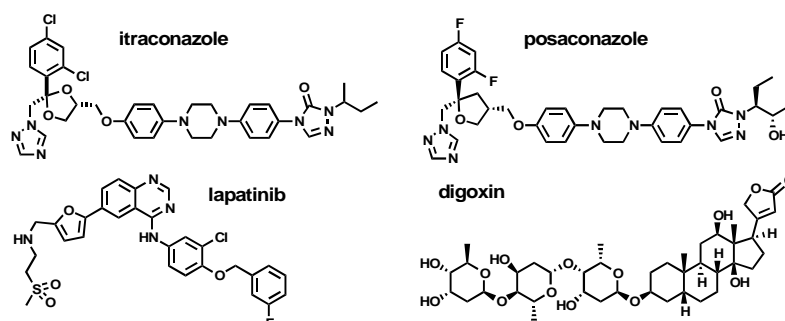


図 1: NPC1 変異体に対する薬理的シャペロン (mo56HC) の構造と、スクリーニングから得られたヒット化合物の構造

イトラコナゾール/ポサコナゾールとラパチニブに関しては、NPC1 変異体のユビキチン化状態に対する作用や、変異体の native PAGE 上での振る舞いといった観点でも評価を行ったが、薬理的シャペロン mo56HC と同様の作用が観察され、薬理的シャペロンとして作用する可能性が濃厚と判断した。

### (2) イトラコナゾール・ラパチニブの NPC1 に対するシャペロン様作用の構造活性相関

イトラコナゾールおよびポサコナゾールは、図に示したように類似した構造要素を有している。同系統の抗真菌薬であるアゾール系化合物を各種評価したところ、中央のジアリルピペラジン構造など、特定の部位の必要性が明らかとなった。さらに誘導体の合成を行い、詳細に構造活性相関を調べたところ、多くの誘導体では大きな活性の低下が見られたものの、変換が許容される部位、許容されない部位がある程度見えてきた。その情報を元に、次項の光親和性標識プローブ化を進めることとした。

一方、ラパチニブに関しては、ラパチニブそのものの活性が弱いため、初期検討において数種の誘導体を合成・活性評価したものの、全て活性は検出できなくなるという結果であり、光親和性標識プローブ化の困難さが予想された。

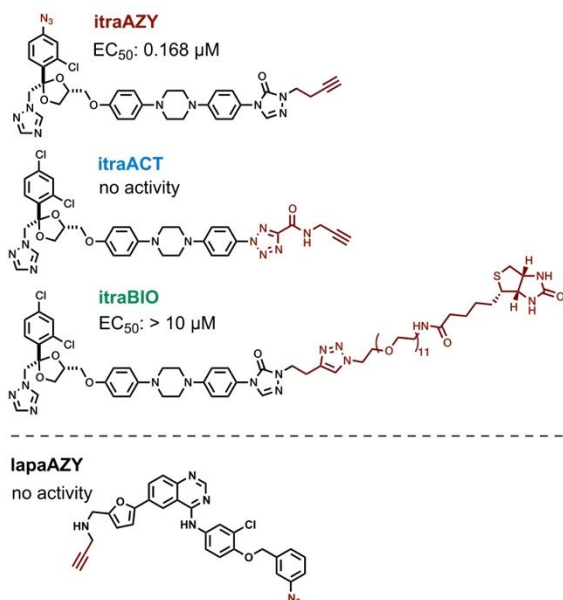
### (3) イトラコナゾール・ラパチニブのプローブ化とシャペロン様活性の評価

構造活性相関情報に基づき、光親和性官能基の種類や導入位置等を変えた数種類のイトラコナゾールプローブをデザインし、合成した。合成中間体のジアリルピペラジン構造の溶解性が非常に悪いことや酸化的条件に弱いことが影響し、合成経路の変更を余儀なくされたが、図 2 に示す光親和性標識プローブの合成に成功した。また、ラパチニブに関しても、最低限の構造変換で済むプローブをデザインし、光親和性標識プローブ化を行った。

合成したプローブのうち、ラパチニブ誘導体の lapaAZY は、活性が消失した。一方で、イトラコナゾール誘導体においては、最小限の構造変換に抑えたプローブ itraAZY が、元のイトラコ

ゾールに匹敵する活性を維持していることを見出した。光反応性基の異なる itraACT やピオチンを導入したプルダウンプローブ itraBIO は活性が大幅に低下したものの、itraAZY を用いて以降の解析を進めることとした。

### 光親和性標識プローブの構造と活性



### NPC1 変異体とイトラコナゾールの結合検証

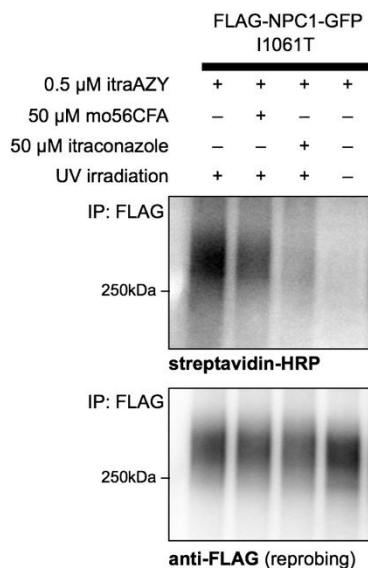


図 2: (左) イトラコナゾールおよびラパチニブを元にしたケミカルプローブの構造と NPC1 変異体に対するシャペロン様活性。(右) 光親和性標識プローブ itraAZY による NPC1 変異体との結合評価。

#### (4) NPC1 変異体とイトラコナゾールの相互作用の検証

薬理的シャペロンとして作用しているのであれば、NPC1 変異体に直接結合して作用するはずである。この点を上記の itraAZY を用いた光親和性標識法により検証した。FLAG タグで標識した NPC1-GFP の I1061T 変異体を安定発現する細胞から膜画分を調製し、脂質膜中で itraAZY が NPC1 変異体と結合するのか調べた。その結果、itraAZY は光照射依存的に NPC1 変異体と共有結合を形成することが確認され、その結合は競合剤として薬理的シャペロン mo56CFA あるいはイトラコナゾールを共存させつことで減弱することが明らかとなった。この結果から、イトラコナゾールが NPC1 変異体に直接結合することで作用することがわかった。また、ステロール型の薬理的シャペロンによっても競合がかかることから、NPC1 上の同じ部位あるいは近い結合部位にこれらの化合物が結合していることが示唆された。以上より、イトラコナゾールについては、NPC1 変異体に対して、薬理的シャペロンとして作用していることが明らかとなった。ラパチニブに関しては、直接の結合を確認できていないものの、作用プロファイルからは薬理的シャペロンとして作用する可能性が高いと考えられる。

ニーマンピック病 C 型の治療薬候補としては、NPC1 の機能が失われたことにより起こるコレステロールの細胞内への蓄積を緩和できなければならない。以前報告した薬理的シャペロン mo56HC では、このような NPC1 機能の回復が確認できたものの、イトラコナゾールやラパチニブでは機能的な回復が明確には見えないという結果が得られた。理由は明確ではないが、薬理的シャペロンとして作用する化合物の中でも、結合・解離の速度や結合部位の違いによる阻害作用の強弱がある可能性が示唆される。治療薬候補とするには、イトラコナゾールやラパチニブをもとにし、さらなる構造展開や改良が必要と考えられ、ドラッグリポジショニングの利点である「臨床で使いやすさ」は活かすことができていない。直ちに使用することはできないものの、NPC1 変異体に対する薬理的シャペロンは、申請者らの見出した化合物群のみしかいられていないことから、本研究で得られた化合物群は、今後の研究のリード化合物として有用であるとともに、光親和性標識プローブはイトラコナゾールのさらなるオフターゲット標的の解析に寄与するものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshioka Hiromasa, Coates Hudson W., Chua Ngee Kiat, Hashimoto Yuichi, Brown Andrew J., Ohgane Kenji	4. 巻 117
2. 論文標題 A key mammalian cholesterol synthesis enzyme, squalene monooxygenase, is allosterically stabilized by its substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7150 ~ 7158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1915923117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sagimori Ikuya, Yoshioka Hiromasa, Hashimoto Yuichi, Ohgane Kenji	4. 巻 28
2. 論文標題 Luciferase-based HMG-CoA reductase degradation assay for activity and selectivity profiling of oxy(lano)sterols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115298 ~ 115298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115298	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 Yamashita Hiroko, Tomoshige Shusuke, Nomura Sayaka, Ohgane Kenji, Hashimoto Yuichi, Ishikawa Minoru	4. 巻 28
2. 論文標題 Application of protein knockdown strategy targeting $\alpha$ -sheet structure to multiple disease-associated polyglutamine proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115175 ~ 115175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115175	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 Ohgane Kenji, Yoshioka Hiromasa, Hashimoto Yuichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Multiplexing fluorogenic esterase-based viability assay with luciferase assays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 2013 ~ 2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2019.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanjyo Shun, Ohgane Kenji, Yoshioka Hiromasa, Makishima Makoto, Hashimoto Yuichi, Noguchi-Yachide Tomomi	4. 巻 27
2. 論文標題 Structure-activity relationship study of estrogen receptor down-regulators with a diphenylmethane skeleton	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1952 ~ 1961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.03.042	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 Shusuke Tomoshige, Sayaka Nomura, Kenji Ohgane, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa	4. 巻 28
2. 論文標題 Degradation of huntingtin mediated by a hybrid molecule composed of IAP antagonist linked to phenyldiazenyl benzothiazole	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 707-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.01.012	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 Shusuke Tomoshige, Sayaka Nomura, Kenji Ohgane, Yuichi Hashimoto, and Minoru Ishikawa	4. 巻 56
2. 論文標題 Discovery of Small Molecules that Induce the Degradation of Huntingtin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed. Engl.	6. 最初と最後の頁 11530-11533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201706529	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 Fumika Karaki, Kenji Ohgane, Hirotaka Imai, Kennosuke Itoh, Hideaki Fujii	4. 巻 2017
2. 論文標題 Reactivity of 7-Azanorbornenes in Bioorthogonal Inverse Electron-Demand Diels-Alder Reactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur. J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 3815-3829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201700411	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 Hiromitsu Fukuda, Fumika Karaki, Kosuke Dodo, Tomomi Noguchi-Yachide, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kenji Ohgane	4. 巻 27
2. 論文標題 Phenanthridin-6-one derivatives as the first class of non-steroidal pharmacological chaperones for Niemann-Pick disease type C1 protein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2781-2787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.04.062	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 Ryuta Shioi, Yosuke Toyota, Tomomi Noguchi-Yachide, Minoru Ishikawa, Takao Yamaguchi, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, and Kenji Ohgane	4. 巻 97
2. 論文標題 Unexpected Emergence of Luciferase-Inhibitory Activity During Structural Development Study of Phenyloxadiazole-based Ppar Ligands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 854-864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(T)61	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 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大金賢司
2. 発表標題 コレステロール輸送膜タンパク質NPC1/NPC1L1を標的とした、フォールディング・局在異常を制御する小分子の探索
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromasa Yoshioka, Ngee Kiat Chua, Hudson W. Coates, Yuichi Hashimoto, Andrew J. Brown, Kenji Ohgane
2. 発表標題 Squalene as a new feedback factor of squalene epoxidase stability
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Ohgane, Hiromasa Yoshioka, Ikuya Sagimori, Yuichi Hashimoto
2. 発表標題 Chemical biology approach to understand small molecule-mediated degradation of HMG-CoA reductase
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大金 賢司, 浅沼三和子, 中尾周平, 境太希, どど孝介, 袖岡幹子
2. 発表標題 銀アセチリドの化学に基づく直接的アルキン濃縮精製法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤有輝, 塩井隆太, 吉岡広大, 谷内出友美, 石川稔, 橋本祐一, 大金賢司
2. 発表標題 イトラコナゾールのNPC1に対するシャペロン作用に着目した構造活性相関研究
3. 学会等名 第36回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大金賢司
2. 発表標題 ニーマンピック病C型に対する化学的アプローチ
3. 学会等名 理研シンポジウム 第13回有機合成化学のフロンティア (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Kenji Ohgane
2. 発表標題 identification of chaperone drugs for NPC through drug repurposing screening
3. 学会等名 Michael, Marcia and Christa Parseghian Scientific Conference for Niemann-Pick Type C Research (Ara Parseghian Medical Research Fund at Notre Dame) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大金賢司, 塩井隆太, 安藤有輝, 谷内出友美, 石川稔, どど孝介, 袖岡幹子, 橋本祐一
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングによるニーマンピック病C型に対するシャペロンドラッグの探索
3. 学会等名 第35会メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤有輝, 塩井隆太, 吉岡広大, 谷内出友美, 石川稔, 橋本祐一, 大金賢司
2. 発表標題 ItraconazoleのNPC1シャペロンとしての構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南條舜, 谷内出友美, 吉岡広大, 横島誠, 石川稔, 橋本祐一, 大金賢司
2. 発表標題 ER downregulationの母核横断的な構造活性相関
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修：津本浩平、浜窪隆雄（分担執筆著者 大金賢司 他130名）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス出版	5. 総ページ数 624
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	塩井 隆太  (Shioi Ryuta)	東京大学・大学院薬学系研究科・修士課程学生  (12601)	
研究協力者	安藤 有輝  (Ando Yuki)	東京大学・大学院薬学系研究科・修士課程学生  (12601)	