

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006 年度～2008 年度  
 課題番号：18390008  
 研究課題名 (和文) コレステロールアシル化酵素 (ACAT) アイソザイム特異的阻害剤の開拓  
 研究課題名 (英文) Discovery and development of selectivity-defined inhibitors toward two acyl-CoA:cholesterol acyltransferase isozymes.  
 研究代表者  
 供田 洋 (TOMODA HIROSHI)  
 北里大学・薬学部・教授  
 研究者番号：70164043

## 研究成果の概要：

コレステロールアシル化酵素 (ACAT) は動脈硬化症に関連し、機能の異なる 2 種のアイソザイム ACAT1 と ACAT2 が存在する。真菌由来ボーベリオライドは ACAT1 を選択的に阻害するがその誘導体から ACAT1 選択的、ACAT2 選択的あるいは両アイソザイムを非選択的に阻害するものをつくり分けることができた。真菌由来ピリピロペン は高度に ACAT2 選択的阻害を示すが、さらに優れた ACAT2 選択性を有する誘導体の創製に成功した。これら選択性の異なる誘導体から、動脈硬化症の治療薬への発展が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,400,000	0	5,400,000
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	2,760,000	17,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・天然薬物学

キーワード：動脈硬化症、ACAT アイソザイム、脂質代謝、ケミカルバイオロジー、医療・福祉

## 1. 研究開始当初の背景

高脂血症や動脈硬化症は心筋梗塞や脳卒中など死に直結する疾患へと発展するリスクが高く、当時もこの過程を経た死は死因の上位を占め、毎年世界中で 1700 万人が心血管疾患で死亡していた。当時、動脈硬化症の予防治療薬としてはコレステロール生合成

の律速酵素の 1 つである HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) 還元酵素を特異的に阻害しコレステロールを低下させるスタチン系医薬品が主に用いられており、研究開始当初では、世界の医薬品売上高のトップ 10 にスタチン系医薬品は 3 製品も入っていた。しかし、現実には 30～

40%しか発症抑制効果が得られず、治療を受けていた患者の半数が心血管疾患等を抑制していないことが明らかになってきていた (Libby P, *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1225-1228 (2005))。その理由として動脈硬化の発症は複雑で複合的であることがあげられ、患者個々の病態や病因に合わせた治療が必要であると考えられる。以上のことから、スタチン系医薬品とは異なる新しい作用機序を有する医薬品の開発が急務であった。しかし、スタチン系医薬品に代わる医薬品の開発はほとんど進んでいなかった。30年以上前から、高脂血症や動脈硬化症の創薬の新しい標的酵素としてアシル-CoA:コレステロールアシル転移酵素 (ACAT) が注目され、非常に多くの合成阻害剤が開発されてきた。しかし副作用などの問題から創薬には結びついていなかった。そのような中、ACATには2種のアイソザイム ACAT1 (多くの細胞・組織に発現) と ACAT2 (小腸と肝臓で特異的に発現) が存在し、その機能が大きく異なることが明らかになってきていた (Parini P *et al.*, *Circulation*, **110**, 2017-2023 (2004))。しかし、既存の多数の ACAT 阻害剤についてさえ2種のアイソザイムに対する選択性に関しては十分な検討が行なわれておらず、ACAT アイソザイムに対する選択性を考慮した阻害剤の開発が急務と考えられていた。当時、従来の ACAT 阻害剤の副作用を克服したと期待され、臨床試験が進められていたアイソザイム非選択的阻害剤である avasimibe (Pfizer 社) と pactimibe (三共 (株)) も、ヒトで効果が認められないとしてそれぞれと 2004 年と 2006 年に開発が中止されたことから、アイソザイムに対する選択性が重要であると再認識されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが動脈硬化の初期病巣モデルとして構築したマクロファージ内脂肪滴蓄積過程を観察できる細胞評価系より発見し、その標的分子が ACAT であることを明らかにした真菌由来ポーベリオライド類 (13 員環デプシペプチドを基本構造とする) 及びラット肝マイクロソームを用いた *in vitro* での ACAT 阻害剤探索系より発見したピリピロペン類 (ピリジノピロンセスキテルペンを基本構造とする) をリードとした誘導

体研究を展開した。ポーベリオライド類 (Namatame I *et al.*, *J. Antibiot.* **52**, 1-6 (1999)、Namatame I *et al.*, *J. Antibiot.* **52**, 7-12 (1999)) は、マウスのマクロファージと肝臓より調製したマイクロソーム画分を酵素源とした ACAT 活性試験から ACAT1 と ACAT2 の両者に阻害活性を示し、動脈硬化発症モデルマウスでは毒性を示すことなく、その有効性が示された (Namatame I *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 737-742 (2004))。さらにコンビナトリアルケミストリーの手法を用いた誘導體合成も進めている (Nagai K *et al.*, *J. Comb. Chem.* **8**, 103-109 (2006))。またピリピロペン類は、ハムスターを用いた小腸からのコレステロール吸収を阻害した (Omura S *et al.*, *J. Antibiot.* **46**, 1168-1169 (1993))。さらに、アイソザイムに対する選択性の研究から、本化合物は ACAT2 特異的に阻害する唯一の化合物 (阻害の選択性は 10 倍以上) であることが示された (Lada AT *et al.*, *J. Lipid Res.* **45**, 378-386 (2004))。

本研究では、申請者らが発見した微生物由来ピリピロペン及びポーベリオライドを基盤に、ACAT アイソザイムに対する阻害の選択性を明確にした誘導體合成、ピリピロペン A の ACAT2 選択的阻害作用の解析、さらに、微生物資源から、選択性の明確な ACAT 阻害剤の探索を目的とした。この基礎研究が、さらに新しい動脈硬化に対する予防治療薬開発研究へ発展されることを期待するものである。

## 3. 研究の方法

(1) ACAT1、ACAT2 阻害活性の測定  
ACAT1 及び ACAT2 発現細胞 (ACAT 欠損した Chinese hamster ovary 細胞に、各々サル ACAT1 遺伝子及び ACAT2 遺伝子を安定導入した細胞) は、Prof. Rudel (Wake Forest Univ. USA) より入手している。これら細胞を用いて 1) 蛍光基質 (NBD-cholesterol)、2) [<sup>14</sup>C]基質 ([<sup>14</sup>C]オレイン酸) によりコレステリルエステル (CE) 量を定量し、ACAT1 及び ACAT2 の活性を測定する。また各細胞のマイクロソーム画分を用いて、[<sup>14</sup>C]基質 ([1-<sup>14</sup>C]oleoyl-CoA) により酵素レベルでの ACAT1 と ACAT2 の活性も測定した。

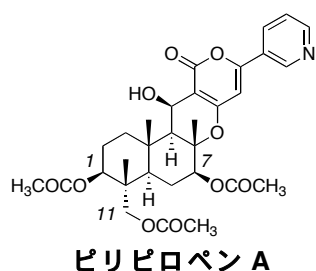
(2) マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害活性の測定 脱血死させたマウス腹腔から採取した初代培養マクロファージにホスファチジルセリンを含むリポソームを添加することで脂肪滴を蓄積させた。①その培養液に $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸を加えておくことで放射標識させた脂肪滴の主成分であるコレステリルエステルとトリアシルグリセロールの放射線量を測定し、阻害活性を算出した。②脂肪滴を oil red O で染色後、顕微鏡で観察して形態学的に評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 誘導体の合成

###### ①ピリピロペン A 誘導体の合成

過去に合成した約 200 種のピリピロペン誘導体について、ACAT2 阻害活性と選択性を調べた。その結果、天然由来のピ



ピロペン A が最も優れた ACAT2 選択性 (1,000 倍以上の差) を示すことが明らかとなった (論文 8、17)。

強力な ACAT2 特異的阻害活性を有し、さらに、薬物代謝を考慮した誘導体 (エステラーゼに安定等) の創製をめざした。肝ミクロソームを用いて代謝酵素に対する影響を *in vitro* で調べたところ、1 と 11 位が加水分解されやすく、7 位のアセチル基はほとんど代謝されないことが明らかとなった。そこで、1 と 11 位には代謝酵素に対して安定な官能基を検討し、7 位には ACAT2 選択的阻害活性を高める官能基を探索し、それぞれの導入を試みた。最終的に約 150 種の誘導体を合成した結果、代謝され難く、かつ ACAT2 選択的阻害活性が優れた誘導体を合成することができた。ピリピロペン A、そして得られた優れた誘導体については、動物実験での動脈硬化に対する効果の検定が実施されることが期待される。

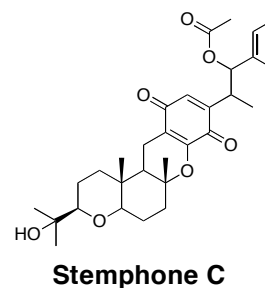
###### ② ボーベリオライド誘導体の合成

以前に確立したコンビナトリアルケミストリーの手法 (Nagai K *et al.*, *J. Comb. Chem.* **8**, 103-109 (2006)) を応用して、ボーベリオ

ライドを構成する 3 つのアミノ酸部と 1 つの脂肪酸部を種々変換することで、新規ボーベリオライド誘導体を合成した。これらの誘導体について ACAT アイソザイムに対する阻害の選択性を評価した結果、ACAT1 選択的、ACAT2 選択的、ACAT1 と ACAT2 の両方を阻害する誘導体を見いだした。アイソザイムに対する阻害活性のバランスを考慮した誘導体を提供することができた (論文 1、9、13、17)。

###### ③ Stemphone 誘導体の合成

本化合物は、カルバペネム系抗菌薬の抗菌活性を増強させる化合物として *Aspergillus* sp. FKI-2136 株より発見した。天然より得られた stemphone C を  $\text{LiAlH}_4$  で処理してアセチル基をア



ルコールに還元し、種々の無水酸と反応させることでアシル基に置換した誘導体を 29 個合成した。これらのなかで、抗菌活性増強作用を示さない誘導体がマクロファージ内脂肪滴蓄積を阻害することを見出し、作用点が ACAT であることを明らかにした。さらにその選択性を調べたところ、両アイソザイムを同程度に阻害していた (論文 7)。

###### (2) ピリピロペン A 作用部位の解析

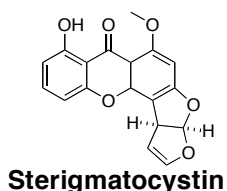
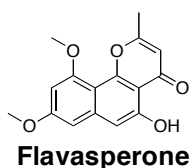
ピリピロペン A が ACAT2 のみを阻害する理由を分子レベルで解析した。すなわち、アフリカミドリザル ACAT2 の種々のドメインを ACAT1 のそれに置換した種々のキメラタンパク質を遺伝子工学の手法で作製し、ピリピロペン A 阻害活性の有無を判定した。その結果、ACAT2 の 5 番目の膜貫通領域に存在する Q492、V493、S494 のいずれかを ACAT1 のアミノ酸 (それぞれ L、L、C) に置換した時のみピリピロペン A の阻害活性は減弱 (消失) した。即ち、本化合物は膜中に存在するこの 3 つのアミノ酸部位と親和性を示し、ACAT2 を阻害していると結論した (論文 12)。

### (3) 天然資源からの ACAT 阻害剤の探索

#### ① ACAT2 選択的阻害剤の探索

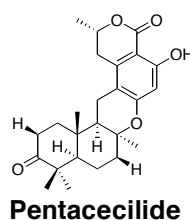
微生物培養液を対象として ACAT2 アイソザイム選択的阻害剤を探索したところ、flavasperone と sterigmatocystin を真菌

*Aspergillus* 属から発見した。両化合物とも多環性の化合物であり、その環が折れ曲がりを持つ angular 型の構造であった。さらに、ACAT1 と 2 両アイソザイムを同程度阻害する化合物として直線状の linear 型の多環構造を有する aurasperone と averufanin を発見した (論文 6)。

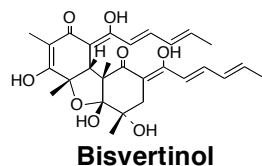
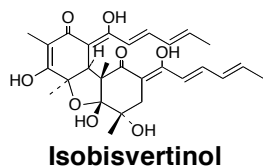


#### ② マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害作用を示す ACAT 阻害剤の探索

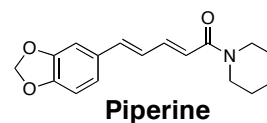
マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害活性を示す化合物として、真菌 *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1 株より新規化合物 pentacecillide 類を発見した。その作用機序を解析し、ACAT を阻害していることを明らかにした。さらに、本化合物は両アイソザイム (ACAT1 と 2) を同程度阻害することを見出した (論文 2、3)。



真菌 *Aspergillus clavatonanicus* FKI-1746 株より isobisvertinol 類を発見した。本物質は既知の bisvertinol の立体異性体で、2つの側鎖の空間的配置が異なる。Isobisvertinol は 20  $\mu\text{M}$  で泡沫化を完全に抑制するのに対し、bisvertinol は 20  $\mu\text{M}$  まで泡沫化を抑制せず、毒性を示した。その作用点を解析したところ、一つの可能性として ACAT を阻害することが示唆された。さらに、その選択性を調べた結果、両アイソザイムを阻害するものの、ACAT2 に対してより強い阻害活性を示した (論文 16)。



また、黒胡椒の主成分である piperine にもマクロファージ内脂肪滴蓄積阻害を見出し、その標的は ACAT であることを示した。さらに、本化合物は両アイソザイムを同程度に阻害することを明らかにした。黒胡椒が動脈硬化予防作用のある機能性食品として発展することが期待される (論文 10)。



以上のように、本研究では微生物資源から ACAT アイソザイムに対する選択性の異なる (ACAT1 選択的、ACAT2 選択的、そして非選択的) 阻害剤を提供することができた。

これまでの合成 ACAT 阻害剤は ACAT1 選択的またはアイソザイム非選択的な特性を持っていたと推定される。しかし、ACAT1 は様々な組織に分布し、特にマクロファージにおいては毒性に深く関与することが懸念されている。実際に avasimibe と pactimibe (非選択的阻害剤) はマクロファージにおいて毒性を示し、動脈硬化抑制効果が認められず、その開発が中止された。一方、ACAT2 選択的阻害剤は、毒性の問題は低く創薬ターゲットとして理想的と予想されるが、今日までピリピロペン類以外報告がない。従って、本研究で得られたこれら ACAT2 選択的な阻害剤が動脈硬化症の治療に有効な候補として発展することが期待される (図書 1)。

#### 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 17 件)

- (1) Ohshiro T, Matsuda D, Nagai K, Doi T, Sunazuka T, Takahashi T, Rudel LL, Omura S, Tomoda H. The selectivity of beauveriolide derivatives in inhibition toward the two isozymes of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 377-381 (2009) 査読有り
- (2) Yamazaki H, Omura S, Tomoda H. Pentacecillides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages produced by *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1: II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* **62**, 207-211 (2009) 査読有り
- (3) Yamazaki H, Kobayashi K, Matsuda D, Nonaka K, Masuma R, Omura S, Tomoda H.

- Pentacecylides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **62**, 195-200 (2009) 査読有り
- (4) Nagamitsu T, Marumoto K, Nagayasu A, Fukuda T, Arima S, Uchida R, Ohshiro T, Harigaya Y, Tomoda H, Omura S. Total synthesis of amidepsine B and revision of its absolute configuration. *J. Antibiot.* **62**, 69-74 (2009) 査読有り
- (5) Inokoshi J, Kawamoto K, Takagi Y, Matsuhama M, Omura S, Tomoda H. Expression of two human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase isozymes in yeast and selectivity of microbial inhibitors toward the isozymes. *J. Antibiot.* **62**, 51-54 (2009) 査読有り
- (6) Sakai K, Ohte S, Ohshiro T, Matsuda D, Masuma R, Rudel LL, Tomoda H. Selective inhibition of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 isozyme by flavasperone and sterigmatocystin from *Aspergillus* species. *J. Antibiot.* **61**, 568-572. (2008) 査読有り
- (7) Koyama N, Kobayashi K, Yamazaki H, Tomoda H. Inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages by stemphone derivatives. *J. Antibiot.* **61**, 509-514 (2008) 査読有り
- (8) Ohshiro T, Ohte S, Matsuda D, Ohtawa M, Nagamitsu T, Sunazuka T, Harigaya Y, Rudel LL, Omura S, Tomoda H. Selectivity of pyripyropene derivatives in inhibition toward acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 isozyme. *J. Antibiot.* **61**, 503-508 (2008) 査読有り
- (9) Nagai K, Doi T, Ohshiro T, Sunazuka T, Tomoda H, Takahashi T, Omura S. Synthesis and biological evaluation of a focused library of beauveriolides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4397-4400 (2008) 査読有り
- (10) Matsuda D, Ohte S, Ohshiro T, Jiang W, Rudel L, Hong B, Si S, Tomoda H. Molecular target of piperine in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1063-1066 (2008) 査読有り
- (11) Parini P, Gustafsson U, Davis MA, Larsson L, Einarsson C, Wilson M, Rudling M, Tomoda H, Omura S, Sahlin S, Angelin B, Rudel LL, Eriksson M. Cholesterol synthesis inhibition elicits an integrated molecular response in human livers including decreased ACAT2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1200-1206 (2008) 査読有り
- (12) Das A, Davis MA, Tomoda H, Omura S, Rudel LL. Identification of the interaction site within acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 for the isoform-specific inhibitor pyripyropene A. *J. Biol. Chem.* **18**, 10453-10460. (2008) 査読有り
- (13) Tomoda H, Doi T. Discovery and combinatorial synthesis of fungal metabolites beauveriolides, novel antiatherosclerotic agents. *Acc. Chem. Res.* **41**, 32-39 (2008) 査読有り
- (14) Matsuda D, Tomoda H. DGAT inhibitors for obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **8**, 836-841 (2007) 査読有り
- (15) Tomoda H, Omura S. Potential therapeutics for obesity and atherosclerosis: inhibitors of neutral lipid metabolism from microorganisms. *Pharmacol. Ther.* **115**, 375-389 (2007) 査読有り
- (16) Koyama N, Ohshiro T, Tomoda H, Omura S. Fungal isobisvertional, a new inhibitor of lipid droplet accumulation in mouse macrophages. *Org. Lett.*, **9**, 425-428 (2007) 査読有り
- (17) Ohshiro T, Rudel LL, Omura S, Tomoda H. Selectivity of microbial acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitors toward isozymes. *J. Antibiot.* **60**, 43-51 (2007) 査読有り
- [学会発表] (計 17 件)
- (1) 大場未央、松田大介、大城太一、土井隆行、高橋孝志、大村智、供田洋：真菌由来 beauveriolide III の ACAT1 選択的阻害活性に関する研究、日本薬学会第 129 年回年会、2009 年 3 月 28 日、京都
- (2) 供田洋：アイソザイム選択的阻害剤の開拓、日本薬学会第 129 年回年会、2009 年 3 月 27 日、京都
- (3) 大多和正樹、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義弘、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、日本薬学会第 129 年回年会、2009 年 3 月 27 日、京都
- (4) 坂井謙斗、大城太一、松田大介、野牛宏晃、Lawrence Rudel、大村智、石橋俊、

- 供田洋：ACAT2 選択的阻害剤ピリピロペン A の抗動脈硬化作用、日本薬学会第 129 年回年会、2009 年 3 月 27 日、京都
- (5) 松田大介、大城太一、土井隆行、大場未央、高橋孝志、大村智、供田洋：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害剤 beauveriolide の標的分子の解析、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
- (6) 大多和正樹、山崎寛之、松田大介、大城太一、針谷義宏、長光亨、大村智、供田洋：ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の誘導体合成と構造活性相関、第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008 年 11 月 26 日、大阪
- (7) 伊牟田聡、広木康洋、土黒一郎、高橋孝志、土井隆行、大城太一、山崎寛之、松田大介、大村智、供田洋：ACAT 阻害剤 beauveriolide III の誘導体合成と構造活性相関、第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008 年 11 月 26 日、大阪
- (8) 供田洋：ACAT 阻害剤の復活をめざして、北里大学薬学部特別公開シンポジウム、2008 年 10 月 8 日、東京
- (9) 供田洋：天然資源からの新しい抗動脈硬化薬の開拓研究、動脈硬化 Update2008、2008 年 9 月 6 日、東京
- (10) 松田大介、小林翔、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋：マクロファージ内脂肪滴蓄積阻害活性を示すツルリンドウ由来成分の作用機序の解析、第 21 回バイオサイエンスフォーラム、2008 年 8 月 1 日、相模原
- (11) 小山信裕、井上勇佑、野中健一、山口裕一、増間碌郎、大村智、供田洋：海洋由来真菌 *Aspergillus clavatonanicus* FKI-1746 株の生産する新規マクロファージ脂肪滴蓄積阻害物質第 11 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2008 年 5 月 24 日、京都
- (12) D. Matsuda, S. Ohte, T. Ohshiro, W. Jiang, L. L. Rudel, B. Hong, S. Si, H. Tomoda: Suppression of lipid droplet accumulation in mouse peritoneal macrophages by piperine. The 4<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules, 21 May 2008, Kinugawa, Tochigi, Japan
- (13) Tomoda H. : Microbial products inhibiting neutral lipid synthesis. The 12th Japan-Korea Joint Symposium Drug Design and Development, 16 May 2008, Sendai, Japan
- (14) 松田大介、大城太一、司書毅、供田洋：黒胡椒成分 piperine によるマクロファージ内脂肪滴蓄積阻害作用、第 128 回日本薬学会年会、2008 年 3 月 26 日、横浜
- (15) H. Tomoda, D. Matsuda: Bioactive products from marine-derived microorganism as probes in chemical biology. VI<sup>TM</sup> US-Japan seminar: frontiers in marine natural products research, 6 Jul 2007, Park city, Utah, USA
- (16) 松田大介、供田洋：海洋由来脂質代謝阻害剤を用いたケミカルバイオロジー、第 10 回マリンバイオテクノロジー学会、2007 年 5 月 27 日、山形
- (17) 高木陽一、猪腰淳嗣、内田龍児、増間碌郎、大村智、供田洋：真菌 FO-2942 株の生産する新しい amidepsine 成分に関する研究、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、横浜
- [図書] (計 1 件)
- (1) 供田洋 (分担執筆)、動脈硬化 Update2008、ライフサイエンス出版、5-12 (2009)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

供田 洋 (TOMODA HIROSHI)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：70164043

### (2) 研究分担者

猪腰 淳嗣 (INOKOSHI JUNJI)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：30151640

長光 亨 (NAGAMITSU TOHRU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：90900756

砂塚 敏明 (SUNAZUKA TOSHIAKI)

北里大学・北里生命科学研究所・教授

研究者番号：30226592

### (3) 連携研究者

石橋 俊 (ISHIBASHI SHUN)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90212919