

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03190

研究課題名(和文) 脂質センサー分子によるエネルギー消費と炎症制御を介したNASH治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of NASH therapeutics by regulating energy expenditure and inflammation through the lipid sensor PPAR

研究代表者

橘 敬祐 (Keisuke, TACHIBANA)

大阪大学・薬学研究科・講師

研究者番号：30432446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体PPAR及びそれを制御する因子は脂質代謝を促すことから、NASHの予防・治療標的分子として有望である。我々は、独自にPPAR活性化剤スクリーニング系を構築し、新規活性化化合物を得た。本化合物とPPARとの共結晶構造解析から、さらなる高活性化化合物の開発に成功した。これら化合物は、NASHモデルマウスの肝線維化抑制効果を示した。また、核内でPPARを制御するLPINについて解析した結果、脱リン酸化酵素PGAM5によってLPINが脱リン酸化されることで、細胞質から核内に移行することを明らかにした。本成果は、NASHの新規治療法を開発するための有用な知見であり、非常に意義深いものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の食生活や運動不足によるエネルギー過剰の状態は、体内に余剰の脂肪蓄積を促し肥満となる。それと共に脂肪肝から肝線維化を経て肝硬変、肝癌へと至る非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に罹患する患者数も急増している。本研究は、脂質センサー分子であるPPARの制御機構を解明すると共に、新たな活性化剤の開発に関する研究であり、今回得られた知見を基に新たなNASH治療法を提案できることから、非常に意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：The nuclear receptor PPAR and its regulators upregulate lipid metabolism and are promising target molecules for the prevention and treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We established a screening system for PPAR activators and obtained new PPAR ligands. Based on co-crystal structure analysis of this compound and PPAR, we developed more active compounds. These compounds exhibited inhibitory effects on liver fibrosis in NASH model mice. In addition, we revealed that LPIN, which regulates PPAR in the nucleus, is dephosphorylated by PGAM5 and translocated from the cytoplasm to the nucleus. These findings will be useful for the development of new therapeutics for NASH.

研究分野：分子代謝学

キーワード：核内受容体 NASH 分子代謝学 PPAR 立体構造解析 LPIN PGAM5

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活や運動不足によるエネルギー過剰の状態は、体内に余剰の脂肪蓄積を促し肥満となる。それと共に脂肪肝から肝線維化を経て肝硬変、肝癌へと至る非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に罹患する患者数も急増している。これら問題を解消するためには、NASH の発症メカニズムを理解し、新たな治療法の開発が喫緊の課題である。

脂質センサー分子である核内受容体 PPAR は脂肪酸等をリガンドとする転写調節因子であり、肝臓や骨格筋等で脂質代謝を調節しエネルギー消費を促す。従って、PPAR 及びそれを制御する因子は、代謝性疾患の予防・治療の標的分子として注目されている。本研究では、PPAR やその関連因子に着目し、エネルギー消費を促す仕組みを明らかにすると共に、NASH の予防・治療戦略の構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、PPAR 及び関連する脂質代謝制御分子に関して、以下のアプローチから PPAR の活性制御機構を解明すると共に、それを制御する方法を開発することで、新規 NASH 治療基盤を構築することを目的とした。

- (1) 独自のスクリーニング系を用いた新規 PPAR 活性化剤の開発と立体構造解析
- (2) 新規 PPAR 活性化剤の高度化と NASH 治療効果の評価
- (3) PPAR の制御因子 LPIN の制御機構の解明

3. 研究の方法

(1) PPAR の活性化剤をスクリーニングするために、テトラサイクリンの有無で PPAR の発現を制御できる独自に樹立した細胞株に (Tachibana et al. Nucl Recep, 2005)、PPAR の認識配列をエンハンサーとして持つレポーター遺伝子を組み込んだ安定発現細胞株を作製した。本細胞株を用いて約 12,000 化合物からなるライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングにより得られた化合物と、PPAR のリガンド結合領域、および PPAR のコアクチベーターである PGC1 α 由来ペプチドを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により共結晶化を行った。得られた結晶の X 線解析データを SPring-8 にて取得し、立体構造を解析することで、結合様式を解明した。

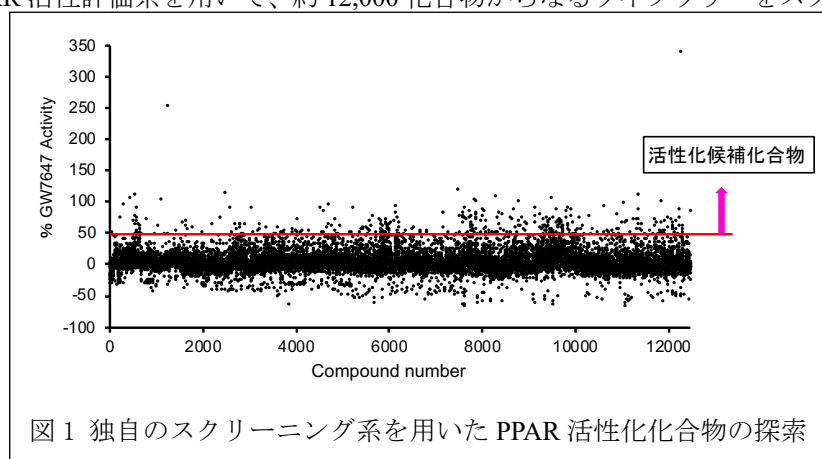
(2) 化合物の活性を増強するために、立体構造解析の結果を基に新たな化合物をデザインし、合成展開を実施した。合成した化合物を用いて *in vitro* で活性評価を行い、EC₅₀ を算出した。合わせて、サブタイプ特異的な活性評価を実施した。

以上の解析を踏まえ、*in vivo* での NASH に対する薬効を確認するための化合物を選択した。薬効評価には、臨床における用法を想定し (食事療法+治療)、特殊食を負荷して NASH を発症させた病態モデルマウスに対して、特殊食から通常食に切り替えるタイミングで化合物を投与し、肝臓の線維化の抑制効果を評価した。

(3) 脂質制御因子 LPIN は、核内において PPAR の転写を制御し脂肪酸の燃焼を促進する一方で、細胞質においては脂質の生合成を制御するユニークな機能を持つ。我々はこれまでに、LPIN の転写制御やタンパク質の分解機構を解明してきた。今回我々は、LPIN による脂質制御機構の新たなメカニズムを明らかにするために、LPIN と相互作用する因子を免疫沈降実験により探索した。LPIN を介した PPAR による脂質制御機構を解明するために、同定した相互作用因子による LPIN の機能に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 独自に構築した PPAR 活性評価系を用いて、約 12,000 化合物からなるライブラリーをスクリーニングした結果、活性を示した上位 17 個のヒット化合物のうち、9 化合物は共通の基本骨格を持つピラゾロピリジン誘導体化合物であった (図 1)。本化合物は、既存の PPAR 活性化剤であるフィブラート系あるいはチアゾリジン系化合物とは異なる基本骨格を持つことから、新たな PPAR 活性化化合物になると考えられた。



本化合物の *in vitro* における活性化効果を評価した結果、EC₅₀ は約 1 μM であり、既存の合成リガンドであるフェノフィブラート (EC₅₀ 約 20 μM) よりは高いものの、*in vivo* での薬効を得るためには、より強い活性を持つ化合物が必要であると考えた。

そこで、本化合物の活性増強を見据え、本化合物による活性化機構を詳細に調べるために、PPAR のリガンド結合領域と本化合物との複合体の結晶構造解析を実施した。得られた複合体の構造は、既知の PPAR のリガンド結合領域の構造と同様であり、活性に重要とされるリガンド毛都合領域中の 12 番目のヘリックスと化合物との間に水素結合が形成されていた (図 2)。一方、リガンド結合ポケットの内部において、本化合物は既存のリガンドとは異なる部位を占めていた。この結果から、PPAR 活性を更に向上し得る化合物の構造展開の可能性が示唆された。

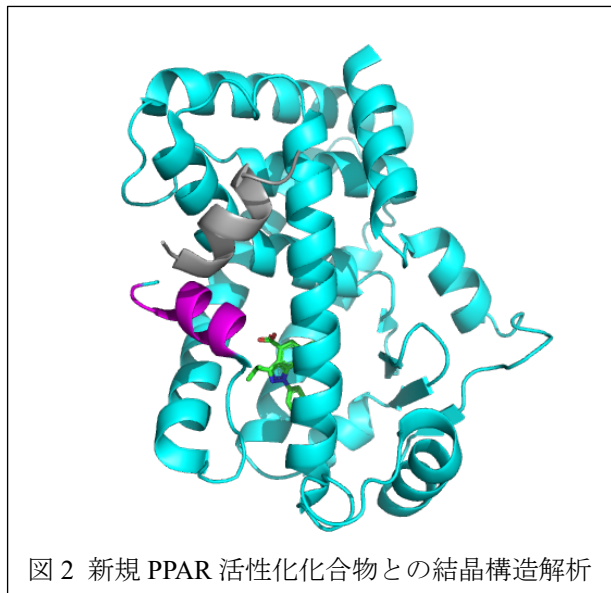


図 2 新規 PPAR 活性化化合物との結晶構造解析

(2) 上記の新規 PPAR 活性化化合物と PPAR のリガンド結合領域との複合体の結晶構造解析結果を基に、新たな活性化化合物をデザイン・合成した。これらについて、*in vitro* による PPAR 活性を評価した結果、EC₅₀ が数十 nM の高い活性を有する化合物を複数取得することに成功した (図 3)。

これら活性化化合物について、NASH 治療薬になり得るかを解析するために、NASH モデルマウスを用いた解析を行った。具体的には、臨床における用法を想定し (食事療法 + 治療)、特殊食を負荷して NASH を発症させた病態モデルマウスについて、特殊食から通常食に切り替えるタイミングで化合物を投与し、肝臓の線維化の抑制効果を評価した。その結果、肝臓において PPAR の標的遺伝子の発現誘導を促すと共に、肝線維化のパラメータであるヒドロキシプロリン量が減少する傾向が認められた。

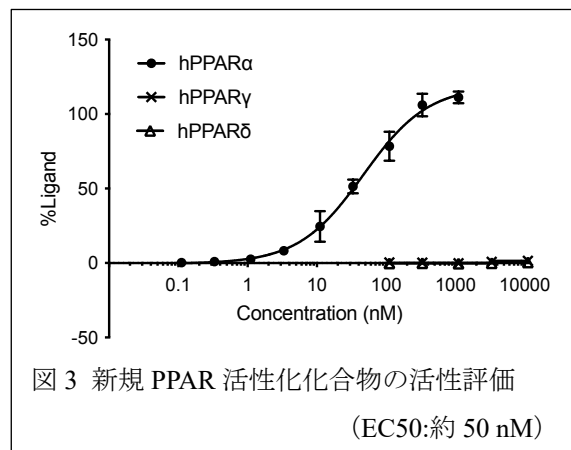


図 3 新規 PPAR 活性化化合物の活性評価

(EC₅₀:約 50 nM)

このように、立体構造情報を基に化合物をデザイン・合成することで、ヒット化合物よりも数十倍以上高い活性を有する化合物を得ることに成功すると共に、ピラゾロピリジン誘導体化合物の NASH 治療薬としての **proof of concept** (POC) を得ることに成功した。今後、開発した化合物を活用し、さらなる立体構造情報の取得を進めていくことにより、より強力な活性を持つ化合物のデザインに繋がることから、NASH に対する新規治療法を開発するための有用な情報になると考えられるため、本研究成果は意義深いものとする。

(3) これまでに我々は、核内において PPAR の転写を制御し脂肪酸の燃焼を促し、細胞質においては脂質の生合成を制御するユニークな脂質制御因子 LPIN について、転写制御やタンパク質の分解機構を解明してきた (Ishimoto et al. JBC, 2009, Ishimoto et al. BBRC, 2017)。今回、LPIN による脂肪酸の燃焼と、脂質の生合成という異なる機能を制御するメカニズムを解明するために、LPIN と相互作用する因子を解析することで、明らかにすることを試みた。

FLAG タグを融合した LPIN を細胞に発現させ、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行い相互作用因子を探索した結果、脱リン酸化酵素 PGAM5 の同定に成功した (図 4)。PGAM5 はその N 末端側にミトコンドリア膜貫通領域

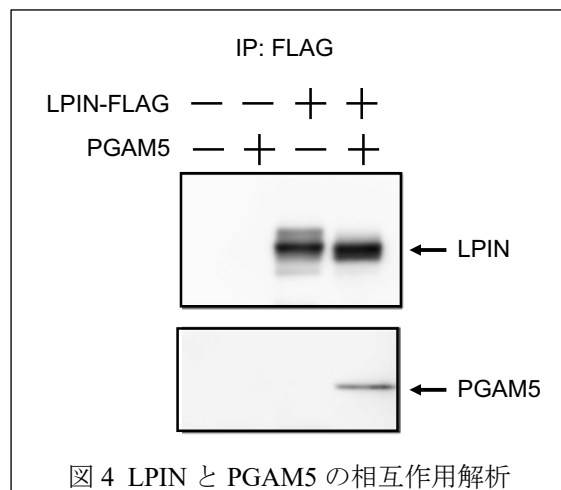
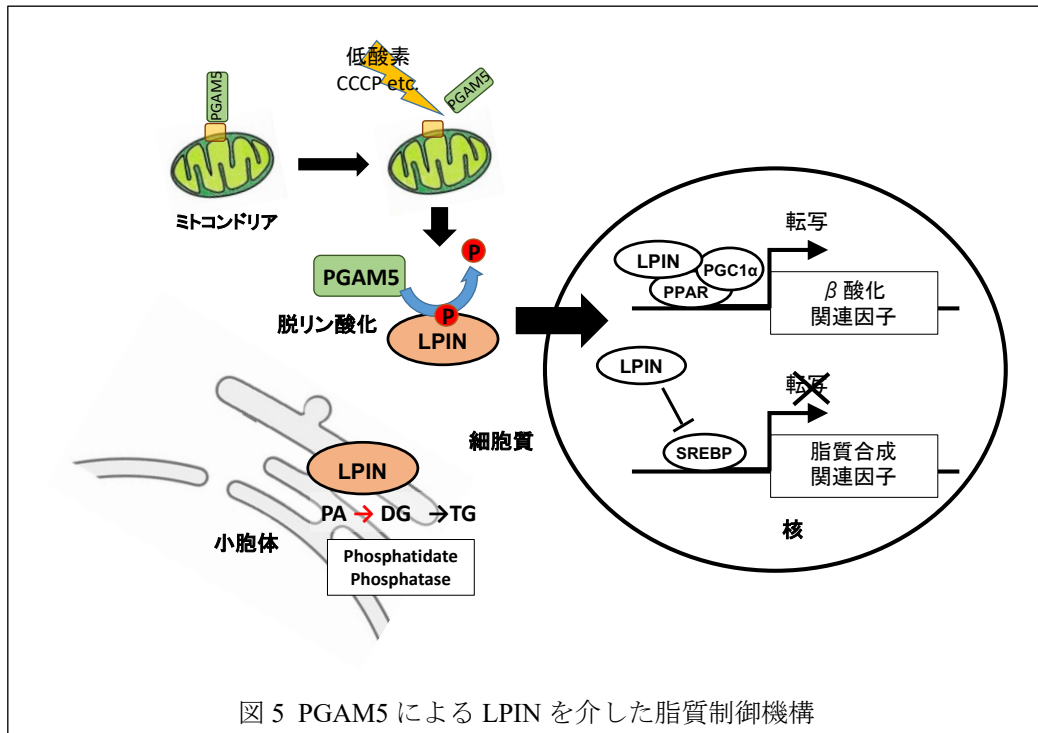


図 4 LPIN と PGAM5 の相互作用解析

を持ち、低酸素時などの膜電位の変化に反応して、C末端側が細胞質に放出される。実際、ミトコンドリア脱共役剤である CCCP で刺激することにより、リン酸化 LPIN 量が減少すること、さらに、核内の LPIN の存在量が増加することを明らかにした (図 5)。

今回得られた知見を基に LPIN の核内量を増加させることで、NASH の原因である脂肪の蓄積を改善できる可能性が考えられることから、本研究成果は意義深いものとする。



以上、本研究で得られた成果は NASH を予防・治療できる薬剤の開発に繋がる可能性があり、非常に意義深いものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida T, Oki H, Doi M, Fukuda S, Yuzuriha T, Tabata R, Ishimoto K, Kawahara K, Ohkubo T, Miyachi H, Doi T, Tachibana K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural Basis for PPAR Activation by 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine Derivatives.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64527-x.	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 Miyachi Hiroyuki, Yuzuriha Tomohiro, Tabata Ryotaro, Fukuda Syohei, Nunomura Kazuto, Lin Bangzhong, Kobayashi Tadayuki, Ishimoto Kenji, Doi Takefumi, Tachibana Keisuke	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural development of 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine-4-carboxylic acid derivatives as human peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR)-selective agonists	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2124 ~ 2128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.06.062	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 Tachibana Keisuke, Yuzuriha Tomohiro, Tabata Ryotaro, Fukuda Syohei, Maegawa Takashi, Takahashi Rika, Tanimoto Keiichi, Tsujino Hirofumi, Nunomura Kazuto, Lin Bangzhong, Matsuura Yoshiharu, Tanaka Toshiya, Hamakubo Takao, Sakai Juro, Kodama Tatsuhiko, Kobayashi Tadayuki, Ishimoto Kenji, Miyachi Hiroyuki, Doi Takefumi	4. 巻 293
2. 論文標題 Discovery of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activators with a ligand-screening system using a human PPAR -expressing cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10333 ~ 10343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002077	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 Okuno Hiroko, Okuzono Haruna, Hayase Ayaka, Kumagai Fumiko, Tanii Shohei, Hino Nobumasa, Okada Yoshiaki, Tachibana Keisuke, Doi Takefumi, Ishimoto Kenji	4. 巻 509
2. 論文標題 Lipin-1 is a novel substrate of protein phosphatase PGAM5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 886 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.031	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 Tachibana Keisuke, Ishimoto Kenji, Takahashi Rika, Kadono Hirokazu, Awaji Takuya, Yuzuriha Tomohiro, Tanaka Toshiya, Hamakubo Takao, Sakai Juro, Kodama Tatsuhiko, Aoki Shunji, Doi Takefumi	4. 巻 67
2. 論文標題 Development of a Ligand Screening Tool Using Full-Length Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Expressing Cell Lines to Ameliorate Metabolic Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 199 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00627	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 Tachibana Keisuke, Fukuda Syohei, Fukushima Jun, Ishimoto Kenji, Sakata Masahiro, Nishimori Yasutomo, Doi Takefumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Exploring compounds to be used as cosmetic agents that activate peroxisome proliferator activated receptor alpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cosmetic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ics.12767	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮地 弘幸、布村 一人、林 邦忠、土井 健史、橘 敬祐
2. 発表標題 新規PPAR 作動薬の創出とその構造展開
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橘敬祐, 土井健史
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 克服を目指した核内受容体PPAR の新規活性化剤の創製
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田昭平、橘敬祐、福島純、阪田昌弘、西森康友、土井健史
2. 発表標題 皮膚機能を改善する核内受容体PPAR 活性化成分の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Miyachi, Kazuto Nunomura, Bangzhong Lin, Takefumi Doi, Keisuke Tachibana
2. 発表標題 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine-4-carboxylic acids as human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha-selective agonists
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橘敬祐, 福田昭平, 杠智博, 田畑遼太郎, 布村一人, 林邦忠, 小林直之, 石本憲司, 宮地弘幸, 土井健史
2. 発表標題 生活習慣病治療薬開発を目指した新規PPAR alpha作動薬としてのピラゾロピリジン誘導体の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke TACHIBANA, Tomohiro YUZURIHA, Ryotaro TABATA, Syohei FUKUDA, Kazuto NUNOMURA, Bangzhong LIN, Tadayuki KOBAYASHI, Masuo KONDOH, Kenji ISHIMOTO, Hiroyuki MIYACHI, Takefumi DOI
2. 発表標題 Development Of Novel Non-fibrate Peroxisome Proliferator-activated Receptor Ligand For Treating Nonalcoholic Steatohepatitis
3. 学会等名 CRS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 P P A R 活性化剤	発明者 土井健史、橋敬祐、 福田昭平、福島純、 阪田昌弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-162499	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 P P A R 転写活性化剤およびその医薬用途	発明者 土井健史、橋敬祐、赤 井周司、吉田卓也、布 村一人、辻川和丈ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-95378	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分担者	土井 健史 (Doi Takefumi) (00211409)	大阪大学・薬学研究科・教授 (14401)	
研究 分担者	吉田 卓也 (Yoshida Takuya) (00294116)	大阪大学・薬学研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	石本 憲司 (Kenji Ishimoto) (00572984)	大阪大学・薬学研究科・特任講師(常勤) (14401)	
研究 分担者	樋野 展正 (Hino Nobumasa) (90469916)	大阪大学・薬学研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------