

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17746

研究課題名(和文)アロステリックPHD阻害による選択的HIF活性化：新規慢性腎疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Selective HIF activation by allosteric PHD inhibition: a novel therapeutic compound for chronic kidney disease

研究代表者

川口 真一 (Kawaguchi, Shin-ichi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：00722894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、虚血症状を统一的に改善できる分子標的HIF(低酸素誘導因子)に注目して、経口虚血治療薬の開発を進めてきた。HIFを分解に導くタンパク質であるPHDを阻害することでHIFを活性化させ、虚血症状を统一的に改善することが可能となる。本研究ではPHDを阻害する低分子化合物である化合物Aを見出し、合成法も開発してきた。さらに薬物動態パラメータの改善を試み、誘導体を合成し、約30種類の新規化合物を合成してきた。薬物動態パラメータを改善させた化合物の細胞を使ったルシフェラーゼアッセイのHIF活性化の試験では化合物Aより約50倍の低い濃度で同様の活性化を示した化合物を見いだすことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎疾患は初期症状を含めると約1,300万人が罹患している(日本腎臓学会)。疾患が進行すると虚血症状が現れる。本研究によって見いだした分子は経口虚血治療薬として、利用可能であり設計から、本研究による新規化合物は、2-OGの構造を持たず、副作用の少ない虚血治療薬となりうる。これは、患者の経済的負担とQOL(quality of life)の向上に大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have focused on the molecular target HIF (hypoxia-inducible factor), which can uniquely improve ischemic symptoms, and have been developing oral ischemic therapeutic agents. In this study, we have discovered a small molecule compound, PyrZA, which inhibits PHD, and have also developed a synthetic method. We have also attempted to improve pharmacokinetic parameters, synthesized derivatives, and synthesized about 30 new compounds. In a study of HIF activation in a luciferase assay using cells of compounds with improved pharmacokinetic parameters, we found a compound that showed similar activation at a concentration about 50-fold lower than that of PyrZA. The results were similar to those of PyrZA, but at concentrations about 50-fold lower than PyrZA.

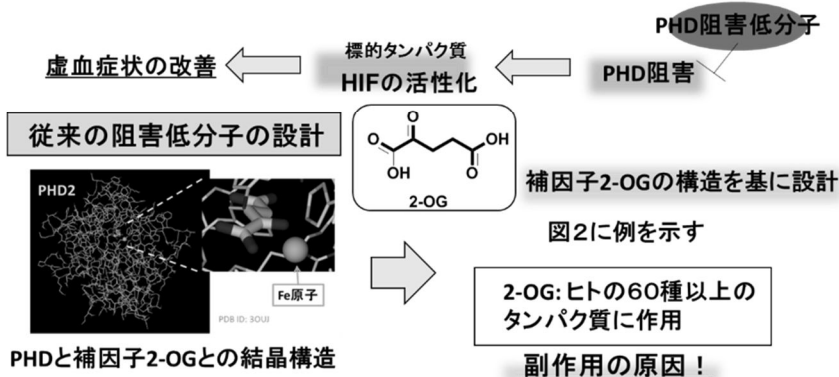
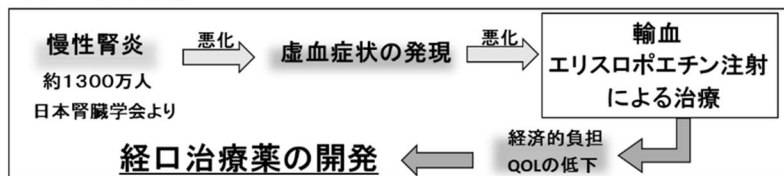
研究分野：創薬化学

キーワード：HIF活性化 PHD阻害

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の主たるきっかけは糖尿病、高血圧、動脈硬化などの生活習慣病に長期罹患して発症するとされるが、現在でも原因は不明である。初期症状を含めると約1,300万人が罹患している(日本腎臓学会)。慢性腎疾患の進行により透析治療が導入されるが、保険医療費の圧迫が問題となり、透析導入を食い止める方策の確立が求められている。現在は輸血やエリスロポエチン注射によって貧血症状の改善が計られるが、これらも患者の経済的負担とQOL

図1. 研究背景



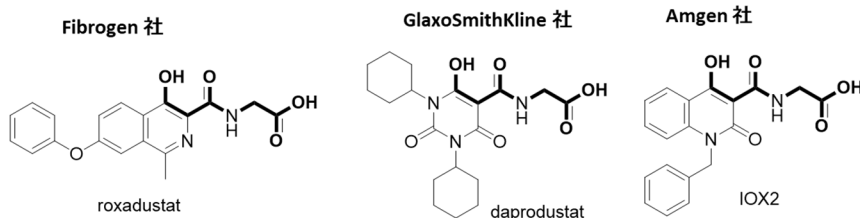
2-OG骨格を持たない新しいHIF活性化分子の研究

(quality of life) の低下をもたらす。慢性腎疾患には尿毒素の解毒と貧血改善の2大疾患標的がある。尿毒素改善には、Nrf2 活性剤、Bardoxylone-methyl の経口投与が奏功し、本邦では第3相試験が進行中である。しかし、貧血症状を改善する経口治療薬は皆無である。HIF (Hypoxia Inducible Factor: 低酸素誘導因子) は貧血を劇的に改善させる分子標的として注目され、薬理的な HIF 活性化が試されている。HIF タンパク質は通常ユビキチン化を受け、速やかにプロテアソームで分解されているため、細胞内にはほとんど存在しない。HIF タンパク質は低酸素刺激などによって酸素濃度が低下すると、分解制御を逃れて安定化、核へ移行して、低酸素応答遺伝子配列に結合することで赤血球増加、エリスロポエチン増加、血管新生など、虚血症状を統一的に改善するタンパク質の発現を誘導する。HIF は酸素センサーである PHD により不活性化されているため、PHD の機能阻害により HIF が安定化できる。すでに企業および大学の研究者が PHD 阻害分子の開発に取り組んでいる(参照: 川口真一、宮田敏男ほか、酸素センサー-PHD を標的とした低分子阻害薬の開発、細胞、2013, 45, 427.)。申請時点では、多くの化合物が副作用のため開発段階で候補から脱落し、未だ上市された化合物はない。そこで、研究代表者は合成化学者の観点から、これまでになかった母骨格を持ち、PHD を阻害することができる副作用の少ない HIF 活性化分子の創出に挑戦してきた。

2. 研究の目的

製薬企業各社から開発された慢性腎疾患治療薬の分子構造を図2に示す。いずれの分子も分子内の骨格に 2-oxoglutarate (2-OG) を有する特徴を認めた(2-OG 部位は太く示している)

図2. 各社が開発中のPHD阻害分子(現在は上市済み)



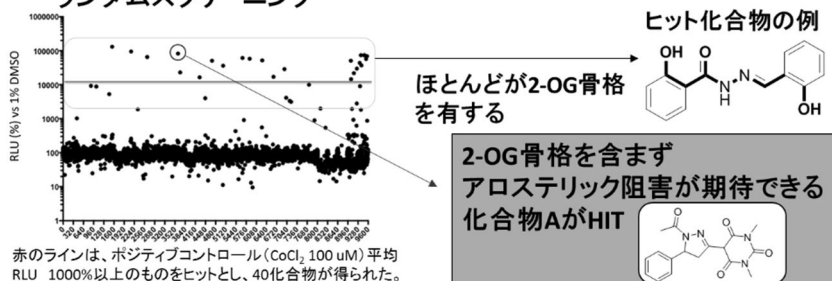
2-OG は PHD の活性中心部に配位する補因子であり、図2に示した化合物は HIF と拮抗して阻害活性を示す。2-OG を補因子として要求するタンパク質はヒトで約60種以上存在するため(Yeh, T. et al. Chemical Science 2017, 8, 7651)、既存 PHD 阻害分子は副作用を示し、高い基質選択性を達成するのは困難であると予想された。このような理由から、研究代表者は 2-OG 骨格を持たないアロステリック部位で作用する PHD 阻害分子であれば、選択性が高く副作用の少ない阻害剤になると着想し、大規模化合物ライブラリーから探索を進めてきた。

3. 研究の方法

(1)スクリーニング

研究代表者らは、最も低酸素に鋭敏に反応するヒト神経芽細胞腫 (SK-N-BE2-(C)) にヒト VEGF の HRE 制御領域下で分泌型ルシフェラーゼを発現するレポーター構築を安定的に導入して化合物スクリーニングを独自に開発し (Tsujita, T.; Kawaguchi, S-i. et al.

図3.樹立した高感度ルシフェラーゼアッセイ系を用いた1万化合物のランダムスクリーニング



Tohoku J. Exp. Med. 2015, 235, 151.)、約1万化合物のランダムスクリーニングを実施して、約40のヒット化合物を得た(図3)。これらのヒット化合物のほとんどが2-OG骨格を有していたが、2-OG骨格を持たず、PHDの主たる活性中心に作用しないと予想された低分子化合物Aが得られた。化合物Aは文献等で合成法および機能性が全く明らかにされていない化合物であり、我々が独自に発見した化合物である。

(2)化合物合成法の確立

化合物Aは合成法が確立されておらず、安定的に供給できる状況にない。そこで、容易に入手可能な出発原料から効率的に化合物Aおよびその誘導体の合成法を確立する。

(3)化合物の評価

申請者が構築した細胞評価系でHIFの活性化を評価し、構造活性相関を明らかにすることで細胞および動物個体で作用するTrue Hit化合物の創出を目指す。

タンパク質やmRNAの定量ルシフェラーゼアッセイ系で活性が高い化合物について選抜し、数種類の細胞株(ヒト肝臓細胞株(Hep3B)、ヒト神経芽細胞腫(SK-N-BE(2)c)等)に対し、化合物の添加によってイムノプロットングで実際にHIFタンパク質が安定化されていることを明らかにする。また、HIFに制御されているエリスロポエチンなどの虚血状態を緩和する働きを持つ遺伝子発現が亢進することをリアルタイムPCRを用いて確認する。

ドッキングシミュレーションを利用して作用部位の予測を行う。

4. 研究成果

(1)スクリーニングによって得られた化合物は合成法が確立していなかった。そこで、様々な合成ルートを検討し、図1のような合成ルートで目的の化合物の合成法を確立した。目的の化合物は出発物質から計算して3ステップで54%の高収率で得られることが明らかとなった。

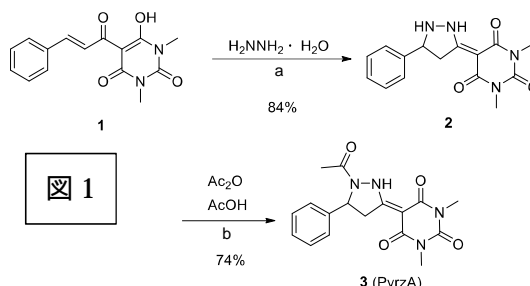


図1

(2)得られた化合物Aを研究代表者の研究グループではPyrzA(ピルズA、(5-(1-acetyl-5-phenylpyrazolidin-3-ylidene)-1,3-

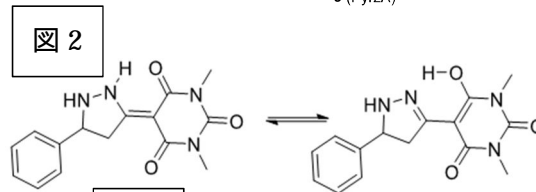
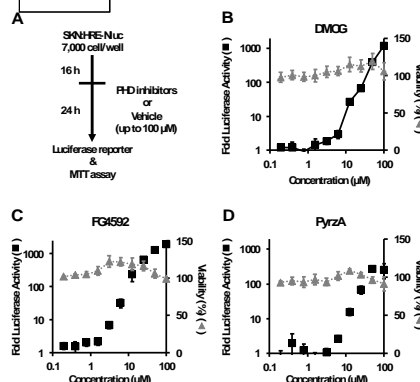


図2

dimethylbarbituric acid)と名付けた。しかしながら、当化合物は合成当初、構造が確定していなかった。すなわち、図2に示すようにケト型エノール型の2通りの構造の可能性が考えられた。ケト型エノール型の違いで化合物のプロトンアクセプター性がプロトンドナー性が変わるので対応するたんぱく質(PHDs)に与える影響は著しく大きいために重要である。1H NMRおよび13C NMRを詳細に解析することにより構造を決定した。PyrzAはケト型であることが示唆された。

(3)得られた化合物得を前述したルシフェラーゼアッセイによりHIFの転写活性を評価した。ポジティブコントロールにHIFを活性化されることでよく知られるDMOGおよびFG4592を用いた。ネガティブコントロールの値に対するHIFの転写活性を表に示している。(図3)PyrzAはDMOGおよびFG4592とほぼ同等のHIF転写活性を示した。



(4)図4ではPyrzAのイムノプロットング法を用いたHIFの安定化を測定した。3種の細胞種SKNBE2C、HeLa、Hep3BについてPyrzAは濃度依存的にHIF1 α およびHIF2 α を安定化することを示した。

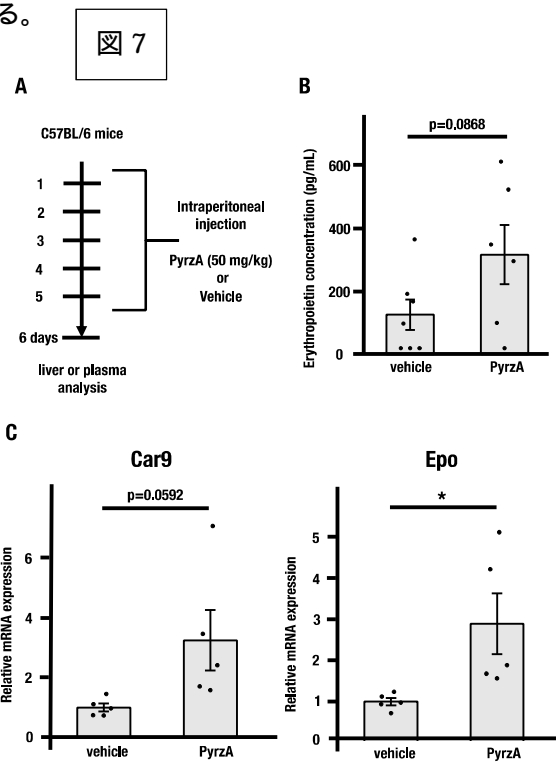
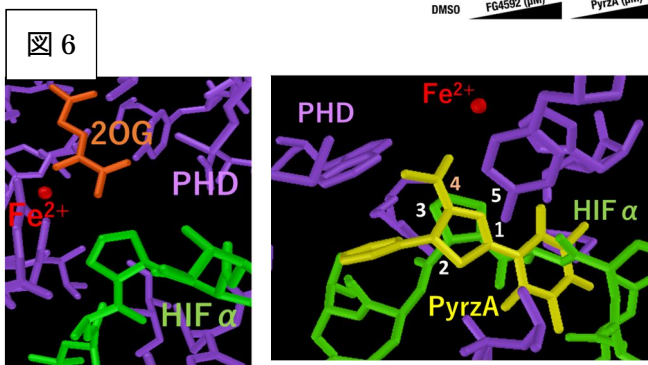
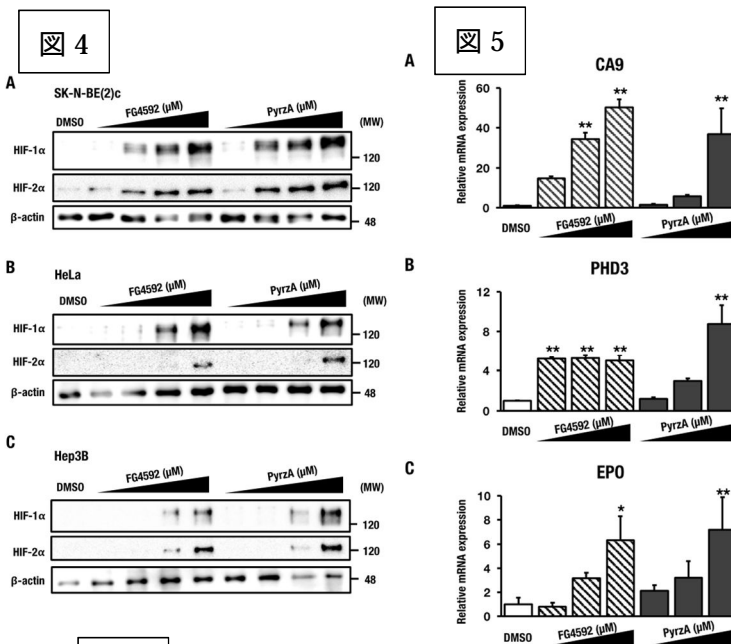
(5)さらに HIF の下流遺伝子である CA9、PHD3、EPO の遺伝子の発現量が上昇していることをリアルタイムPCR法で確認した。エリスロポエチン遺伝子が増加したことから慢性腎疾患治療についてのコンセプトに利用可能であることを示した。

(6) 2-OG 骨格を持たない PyrZA が一体どこで PHD を阻害しているのか考察するために、PHD と PyrZA のドッキングシミュレーションを行った(図6) 図6左は、PHD たんぱく質と HIF たんぱく質の共結晶であり、HIF による水酸化の作用点近くを示している。

この作用点付近に対し、PyrZA のドッキングシミュレーションを行うと、PyrZA は HIF たんぱく質と非常に良い重なりを示した。このことから、PyrZA は HIF の拮抗阻害として働いていると予想される。今まで開発されてきた PHD 阻害剤の中で HIF との拮抗阻害を示唆したものではなく、本研究は初めての例だと言える。HIF との拮抗阻害であれば、HIF ファミリーの選択性も出せる可能性があり、今後期待できる結果であると言える。

(7) 最後に PyrZA の In vivo での効果について評価した。すなわちマウスに PyrZA を投与し、エリスロポエチンタンパク質の増加量、マーカーである CA9 の mRNA の増加量、エリスロポエチンの mRNA の増加量を測定した。エリスロポエチンタンパク質の増加量は増加傾向にあることが観測された。また、mRNA の増加量は有意に増加していることが明らかとなった。PyrZA はマウスで効果があることが示された。今後は他の動物に対しての検討していく必要がある。

(8) さらに誘導体を合成し、約 30 種類の新規化合物を合成してきた。薬物動態パラメータを改善させた化合物の細胞を使ったルシフェラーゼアッセイの HIF 活性化の試験では化合物 A より約 50 倍の低い濃度で同様の活性化を示した化合物を見いだすことができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto, Y.; Kawaguchi, S-i.*; Nishimura, M.; Sato, Y.; Shimada, Y.; Tabuchi, A.; Nomoto, A.; Ogawa, A.;	4. 巻 85
2. 論文標題 Phosphorus-recycling Wittig reaction: Design and facile synthesis of a fluoros phosphine and its reusable process in the wittig reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 14684-14696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01926	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 Yamamoto, Y.; Tanaka, R.; Ota, M.; Nishimura, M.a, Tran, C.C.; Kawaguchi, S.-I.; Kodama, S; Nomoto, A.; Ogawa, A.	4. 巻 85
2. 論文標題 Photoinduced syntheses and reactivities of phosphorus-containing interelement compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 14708-14719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c02014	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 Tran, C. C.; Kawaguchi, S-i.*; Sato, F.; Nomoto, A.; Ogawa, A.	4. 巻 85
2. 論文標題 Photoinduced Cyclizations of o-Diisocyanoarenes with Organic Diselenides and Thiols that Afford Chalcogenated Quinoxalines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 7258-7266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c00647	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 Tran Cong Chi, Kawaguchi Shin-ichi, Kobiki Yohsuke, Matsubara Hitomi, Tran Dat Phuc, Kodama Shintaro, Nomoto Akihiro, Ogawa Akiya	4. 巻 84
2. 論文標題 Palladium-Catalyzed Diarylation of Isocyanides with Tetraarylleads for the Selective Synthesis of Imines and -Diimines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11741 ~ 11751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b01639	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 Kento Sonoda, Sudarma Bogahawaththa, Akito Katayama, Saki Ujike, Sae Kuroki, Naho Kitagawa, Kohichi Hirotsuru, Norio Suzuki, Toshio Miyata, Shin-ichi Kawaguchi, and Tadayuki Tsujita	4. 巻 5
2. 論文標題 Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitor Not Harboring a 2-Oxoglutarate Scaffold Protects against Hypoxic Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Pharmacology & Translational Science	6. 最初と最後の頁 362-372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acptsci.2c00002	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 園田健登・川口真一・辻田忠志
2. 発表標題 既存HIF活性化剤と基本骨格が異なる新規ピラゾリジン系化合物の機能性評価
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 氏家沙綺・片山彰人・黒木紗英・川口 真一・辻田忠志
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIF活性化分子PyrzAとその誘導体の合成と活性評価
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 新規な含窒素環状化合物及びその用途	発明者 川口真一、辻田忠志	権利者 佐賀大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-174971	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------