

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15244

研究課題名（和文）総合的RyR制御ケミカルツールボックスの開発とチャネル開閉ダイナミズム解析

研究課題名（英文）Development of chemical toolbox for RyR regulator and analysis of the dynamism of RyR open/close mechanism

研究代表者

石田 良典 (Ishida, Ryosuke)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：10937684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：リアノジン受容体(RyR)は筋小胞体膜状に発現する巨大なカルシウムイオン(Ca²⁺)遊離チャネルである。小胞体に蓄積されたCa²⁺を細胞質に放出することで筋収縮を誘発する。RyR1は骨格筋を制御するため悪性高熱症(MH)の原因に、RyR2は心筋を制御するため心疾患の原因になる。MHの治療薬Dantroleneは水溶性に難があることから、既知のRyR1阻害薬の構造展開を行い溶解度が1000倍向上した誘導体の合成に成功した。また、RyR2選択的阻害剤として複数の化合物を報告し、心筋細胞のカルシウムシグナル異常をキャンセルすることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RyR異常は致死性筋疾患の原因となることが知られているが、治療薬はMHに対するDantroleneしか認可されていない。医療現場では、突発的なMH患者に対し、お湯で無理やり溶かし投与する。またRyR2も阻害するために、濃度によっては心筋への影響も考えられる。そういった状況を鑑みると、今回開発した水溶性向上RyR1選択的阻害剤は、よりよい治療候補化合物となりうる。また、RyR2選択的阻害剤は報告がなかったことから、強力な効果を有するTMDJ-035は治療薬候補化合物として非常に有望である。同時に、これら強力な選択的制御剤は、今後のRyRが関わる研究のツールとして広く利用することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Ryanodine receptor (RyR) is a calcium ion (Ca²⁺) release channel. RyRs initiate muscle contraction by releasing Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum to the cytosol. RyR1 malfunction in skeletal muscle causes malignant hyperthermia (MH) and RyR2 malfunction in heart muscle causes heart diseases. Because the current MH medication, dantrolene has an issue with low water solubility, we investigated the structure modifications of reported RyR inhibitors and developed a novel RyR1 inhibitor with 1,000-fold better water solubility. Regarding RyR2, we developed a few selective inhibitors and one of them could normalize aberrant Ca²⁺ signals in cardiomyocytes.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リアノジン受容体 筋細胞異常 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

リアノジン受容体(RyR)は、筋細胞の筋小胞体膜状に発現する4量体カルシウムイオン(Ca²⁺)遊離チャネルであり、小胞体内のCa²⁺を細胞質に放出することで筋収縮を開始する(Fig.1)。その重要な機能のために、遺伝子変異に起因するRyRの機能異常は、様々な致死性筋疾患を誘発することが知られている。例えば、アイソフォームの一種であるRyR1は骨格筋の機能制御を司っているため、悪性高熱症(MH)やセントラルコア病の原因に、RyR2は心筋を制御するため、カテコラミン誘発性多形成心室頻拍(CPVT)のような不整脈を伴う心疾患の原因となることが、コホート研究から指摘されている。そのためRyRは筋疾患の重要な薬剤標的と考えられるが、あまり開発は進んでおらず、特に心疾患の治療薬に関してはほとんど報告がない。また上梓されている唯一のRyR阻害剤、MHの治療薬Dantrolene Naにおいても、麻酔吸引がトリガーとなる突発的な病気MHの発症現場において、水溶性が低く治療溶液を調製するために時間がかかることが問題視されている。一方、この巨大なチャネル分子の構造生物学的側面に焦点を当てると、cryo-EMの出現と技術革新によって2015年ごろからその形が撮られるようになってきたものの、動的なチャネルタンパク質ゆえのはっきりした開口、閉口状態の撮影が難しく、既報の制御剤では大量投与が必要などの問題があり、機能と構造の関係性を解析していくうえでも新たな制御剤の開発が急務である。

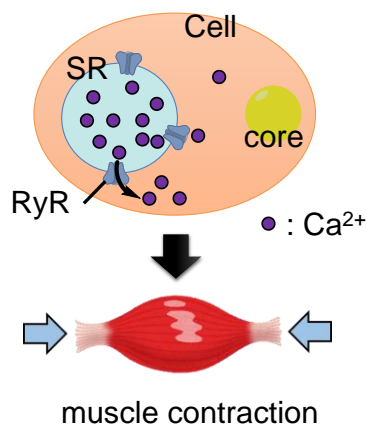


Fig.1: RyRの発現場所と機能

2. 研究の目的

以上のことから、これまでのRyR研究のネックを解決する各アイソフォーム選択的なRyR機能を制御する化合物群、すなわちケミカルツールボックスの開発によって、有望な筋疾患治療候補化合物を見出すとともに、それらを利用することで、RyRの開閉ダイナミズムの解析を行うことを目的に研究を展開した。特にメカニズム解析では、制御剤の結合位置、すなわち結合することでRyRの構造変化を惹起する重要なポケットの推定を目的に実験を進めた。

3. 研究の方法

これまでに、我々東京医科歯科大学および共同研究者の所属する順天堂大学のグループでは、RyRの機能を間接的に測定する細胞系の開発を行っている。線維芽細胞HEK293のER内に、Ca²⁺と結合することで蛍光を発するタンパク質CEPIA-1erを、各RyRをER膜上に、それぞれ発現させることで、RyRの活性に依って変化するCa²⁺濃度を、蛍光変化を測定することで間接的に評価する。化合物を投与した際、RyR阻害効果を有していれば蛍光は増加し、活性化効果を有していれば減少する。スクリーニングによって、これまでRyR1または2選択的阻害剤、活性化剤が見出されている。RyR1はMHに関わることから、報告されているRyR1選択的阻害剤とともに、既存薬Dantrolene Naの問題点である水溶性を向上させた化合物の開発、RyR2は選択的制御剤の報告がないことから、新たな制御剤の開発を行った。また、RyR1阻害剤に光親和性官能基を導入し、光照射によるタンパク質ラベリングを行うことで、ケミカルアプローチによるRyR1への結合位置の同定を考えた。

4. 研究成果

1. ケミカルツールボックスの開発

(a) 水溶性RyR1阻害剤の開発

RyR1異常活性化に起因するMHの治療薬、Dantrolene Naの問題点である水溶性を解決すべく、これまでに報告されているRyR1選択的阻害剤、cpd1の構造展開並びに溶解度試験を行った。まずcpd1の脂溶性構造であるアルキル直鎖の削減を試みたが、2炭素少ないヘキシル鎖とした段階で活性の低下が見られたため、炭素鎖の短縮は難しいことが示唆された。次に4-キノロン環の変換、具体的には置換基の変換やヘテロ環への置換を試みたところ、メトキシピリジン基の導入によって活性は維持されることが分かった。これらの情報を組み合わせ、アルキル直鎖を1炭素短いヘプチル基、4-キノロン環のベンゼン環をメトキシピリジン環とした化合物を合成したが、予想外なことにcpd1に比べ40倍以上の極端な活性の減弱が見られた。そこで、メトキシピリジン環を持ち、Dantrolene Naと同程度の活性を維持し水溶性の向上が期待できる誘導体2について、ナトリウム塩を調製し、生理食塩水への溶解度を調べた。

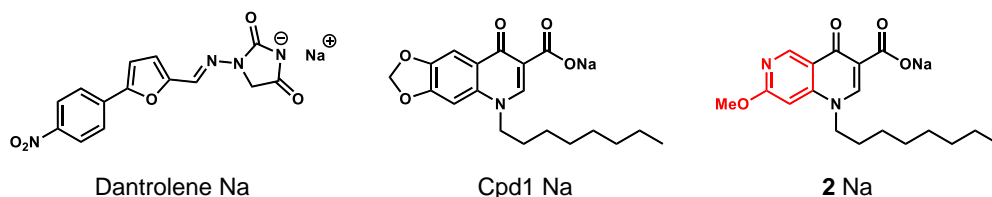


Fig.2: MH治療薬Dantrolene NaおよびRyR1阻害剤cpd1 Na、2 Naの構造

ところ、27 $\mu\text{g/mL}$ と、Dantrolene Na と比べ1,000倍以上の向上が確認された。(Fig. 2, Table 1, 2)。同化合物は今後、*in vivo*

Table 1: RyR1 阻害剤の活性

化合物	EC ₅₀ (RyR1)
Dantrolene Na	59 nM
Cpd1	12 nM
2	68 nM

Table 2: RyR1 阻害剤の水溶性

化合物	Solubility in saline
Dantrolene Na	0.026 $\mu\text{g/mL}$
Cpd1 Na	0.84 $\mu\text{g/mL}$
2 Na	27 $\mu\text{g/mL}$

検証などによって臨床現場で扱いづらい Dantrolene Na の問題点を克服した新規薬剤として展開されていくことが期待できる。また、今回の構造展開によって、ベンゼン環からメトキシピリジン環への変換が、大きく水溶性を向上させることが見出され、薬剤候補低分子の物性向上において有用な知見を得ることができた。

(b) RyR2 阻害剤の開発

RyR1 とは状況が異なり、これまで RyR2 関連疾患の治療薬として RyR2 阻害剤が認可された例はなく、また開発の報告も、アイソフォーム非選択的阻害剤 Dantrolene についての検証が行われた程度で新規阻害剤の報告は進んでいない。RyR1/2 阻害活性試験スクリーニングにて、東京大学大学院薬学研究科附属創薬機構のライブラリから RyR2 選択的な化合物の探索を行ったところ、数種類のヒット化合物を見出した。このうち、グリコール酸の両端にそれぞれエステル、アミド結合を有する化合物

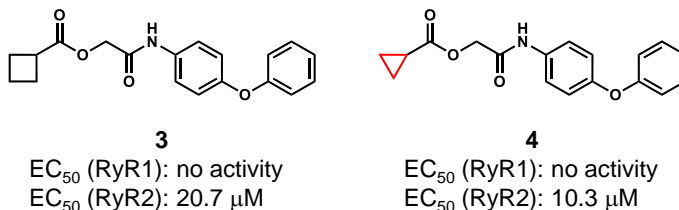


Fig. 3: RyR2 阻害剤 **3**, **4** の構造および RyR 阻害活性

3(Fig. 3)が、弱いながら RyR2 選択的阻害活性を有していたので、構造展開による活性向上を図った。合成した誘導体について、既知のアイソフォーム非選択的 RyR 阻害剤 tetracaine の 1 mM 投与による阻害を 100%として算出した 50%阻害濃度(EC₅₀)を比較すると、化合物 **4** が 2 倍ほど高い活性を示した。**4** は、**3** が有する特徴的なシクロブチル環をシクロプロピル環に置換した化合物であり、同部位の環サイズ拡大を種々試みたが、シクロペンチル環までは活性が維持されたがそれより大きなシクロヘキシル環では活性が消失した。化合物 **4** についてはさらに、コホート研究から明らかになっている CPVT の原因となる変異を有する RyR2 株に対して投与したところ、野生株に近い活性を示し、病原性 RyR2 株にも阻害効果を有することが明らかになった。

スクリーニングヒット化合物において、別の骨格を有する化合物として、中心にテトラゾール環を有する **5** が見出されている(Fig. 4)。そこで、**5** に関してもアミド窒素上の置換基変換や、フェニル基の修飾を行うことで活性の向上を目指した。その結果、アミド窒素上の置換基をエチル基からメチル基へと

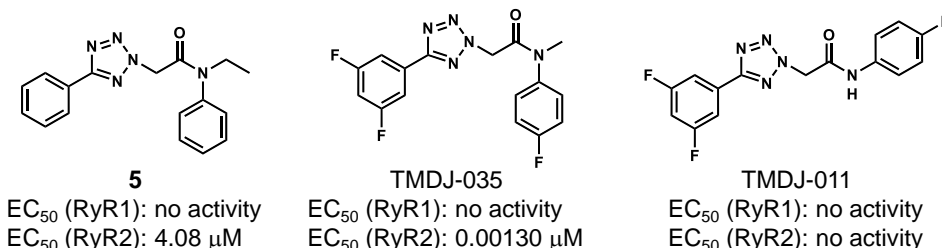


Fig. 4: RyR2 阻害剤 **5** および TMDJ-035、TMDJ-011 の構造と活性

短縮することで劇的な活性の向上が見られた一方、炭素を除いて 2 級アミドとしたところ全く活性を示さないことが明らかになった。次に 2 ヶ所あるフェニル基上の置換基変換を種々行ったところ、いずれの環においても 2 位の修飾は活性に負の影響をもたらした。一方で、3 位や 4 位へのメトキシ基やフルオロ基の導入については、ほとんどのケースで顕著な活性の向上が見られた。最終的に、3 ヶ所にフルオロ基を導入し、アミド窒素上にメチル基を有する化合物 TMDJ-035 が、ヒット化合物 **5** の 300 倍以上の RyR2 阻害活性を示し、強力な RyR2 阻害剤を開発することができた。RyR1、RyR3 に対しても TMDJ-035 の阻害活性を検証したところ、全く影響を及ぼさず、TMDJ-035 が完全なアイソフォーム選択性を有することも明らかになった。モデル細胞レベルで顕著な効果を示したことから、TMDJ-035 が実際の筋細胞でのカルシウムシグナルにどのような影響を与えるか検証すべく、RyR2 変異を有する心

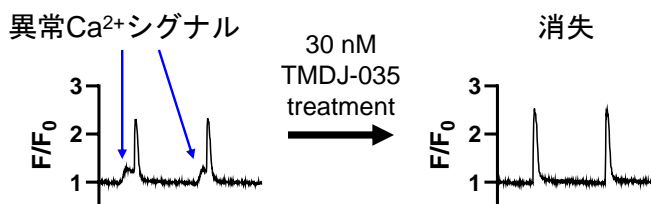


Fig. 5: TMDJ-035 による心筋細胞の Ca²⁺異常シグナルの正常化

機能異常マウスの心臓から摘出した心筋細胞に投与したところ、投与前に見られていた異常なシグナルが完全に収まり、正常化することが示された(Fig.5)。以上のことから、TMDJ-035は非常に強力かつアイソフォーム選択的なRyR2阻害剤であり、心筋細胞の異常カルシウムシグナルを治療できる新たな薬剤候補化合物として大きく期待できる。また化学的な観点でこの構造活性相関を眺めたところ、2級アミドは全く活性を持たず、3級アミドは強力な活性を持っていることがわかる。芳香環アミドの幾何異性はこれまでも多く研究されてきており、2級アミドはトランスアミド構造を、3級アミドはシスアミド構造を取りやすいことが知られている。そこで、5を始めとしたシリーズの活性発現には、このシスアミド構造が重要なのではないかと考え、TMDJ-035の構造を検証した。X線結晶構造解析を行ったところ、同化合物はシスアミド構造を有していることが示された。また、昇温¹H-NMR測定を行ったところ、TMDJ-035は0℃にてトランスアミド構造のシグナルが見えるようになったものの、25℃でははっきり見えるのはシスアミド構造のみだった(NMRのシス-トランスはNOEにて決定した)。一方で、TMDJ-035からメチル基を取り除き2級アミドとしたTMDJ-011は、¹H-NMRの分解能では0℃、25℃の両温度にてトランスアミド構造のみを示し、アミドの幾何異性が完全に異なることがわかった。RyR2阻害活性パターンから、これらアミドの幾何異性が活性発現にクリティカルな影響を与えていると考えられる。

(c) RyR 活性化剤の開発

これまで述べてきたRyR阻害剤の開発は、実際の病気の発症を導く「異常活性化」を止めるべく、そしてチャンネルの閉口状態を強制的に作り出し、チャンネルシステムの理解に貢献するべく研究が進められてきた。チャンネルというのは動的なものであり、閉口状態と開口状態を行ったり来たりすることで機能する。すなわち、チャンネルの開口を導くことも機能理解に重要である。チャンネル名の元となっているRyanodineや、caffeineが開口を誘導する活性化剤として知られているが、供給に難がある、または作用濃度が非常に高いといった問題がある。我々の使用しているRyR機能評価系は、Ca²⁺濃度を測定するため、RyRの活性化を誘導する化合物の評価にも応用でき、実際にスクリーニングにて、複数の活性化剤を見出している。これらヒット化合物について、構造展開を行うことで活性化剤の機能向上を実現しており、caffeineより強い活性化剤シリーズの構築を達成している。

2. RyRの動的開閉ダイナミクス解析に向けた、cpd1結合ポケットの同定研究

RyRの動的システムを理解するためには、閉口状態、閉口状態のそれぞれの構造の変化や、それらを誘引する重要なモチーフの推定が重要である。これまでの制御剤開発によって、RyRの閉口化、開口化を誘導することは可能になったため、それら化合物がRyRという巨大分子のどこに作用するのかを明らかにすることで、この重要因子の特定および総合的な構造変化のダイナミクス解明につなげたいと考えた。そこで、ポケットにはまり相互作用をしている阻害剤をRyRに不可逆的に結合させ、LC-MS/MS解析を行うことで、結合部位を明らかにできると考えた。阻害剤からリンカーを延ばし、先端に光親和性基を導入したところ、活性は維持していたため、RyR発現細胞に投与した。しかし、特異的な結合ペプチドは検出できず、同プローブによる結合部位同定は難しいことが明らかになった。光親和性基によるラベリングでは非特異的な結合タンパク質が大量に見られるため、精製法やラベリングタグについてより検討する必要があることが示された。

以上のように、本研究によってRyR制御剤の開発や、動的ダイナミクス解析に向けた制御剤結合位置特定に関する情報を得ることができ、今後これらを活用した薬学的展開や構造生物学、分子生物学的展開が広がっていくことが期待される。

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 1件）

1. 著者名 Ryosuke Ishida, Shuichi Mori, Takashi Murayama, Ayaka Nakamichi, Xikun Chai, Nagomi Kurebayashi, Hiroto Iinuma, Hiroyuki Kagechika	4. 巻 74
2. 論文標題 Development of a water-soluble ryanodine receptor 1 inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2022.117027	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 Takashi Murayama, Nagomi Kurebayashi, Ryosuke Ishida, Hiroyuki Kagechika	4. 巻 69
2. 論文標題 Drug development for the treatment of RyR1-related skeletal muscle diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 102356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.coph.2023.102356	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 Mai Takenaka, Masami Kodama, Takashi Murayama, Mari Ishigami-Yuasa, Shuichi Mori, Ryosuke Ishida, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Masami Sugihara, Masamitsu Iino, Aya Miura, Hajime Nishio, Sachio Morimoto, Hiroyuki Kagechika, Takashi Sakurai, and Nagomi Kurebayashi	4. 巻 104
2. 論文標題 Screening for Novel Type 2 Ryanodine Receptor Inhibitors by Endoplasmic Reticulum Ca21 Monitoring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 MOLECULAR PHARMACOLOGY	6. 最初と最後の頁 275-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.123.000720	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 Ryosuke Ishida, Nagomi Kurebayashi, Hiroto Iinuma, Xi Zeng, Shuichi Mori, Masami Kodama, Takashi Murayama, Hiroyuki Masuno, Fumi Takeda, Masatoshi Kawahata, Aya Tanatani, Aya Miura, Hajime Nishio, Takashi Sakurai, Hiroyuki Kagechika	4. 巻 262
2. 論文標題 A potent and selective cis-amide inhibitor of ryanodine receptor 2 as a candidate for cardiac arrhythmia treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmech.2023.115910	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 Ryosuke Ishida, Xi Zeng, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Shuichi Mori, Hiroyuki Kagechika	4. 巻 72
2. 論文標題 Discovery and Structure-Activity Relationship of a Ryanodine Receptor 2 Inhibitor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 399-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c24-00114	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田良典、森 修一、飯沼大翔、柴 喜坤、村山 尚、呉林なごみ、影近弘之
2. 発表標題 水溶性向上を意図した RyR1 阻害剤の構造展開 および結合位置特定のためのプローブ化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾 希、石田良典、呉林なごみ、村山 尚、山本優雅、森 修一、影近弘之
2. 発表標題 不整脈を引き起こす変異型RyR2新規阻害剤の開発
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新規2型リアノジン受容体選択的阻害剤の開発
2. 発表標題 曾 希、石田良典、呉林なごみ、村山 尚、山本優雅、森 修一、影近弘之
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田良典、曾 希、森 修一、呉林なごみ、飯沼大翔、村山 尚、影近弘之
2. 発表標題 不整脈治療への展開を指向した新規2型リアノジン受容体選択的阻害剤の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学生体材料工学研究所薬化学分野ホームページ
<https://www.tmd.ac.jp/mri/omc/>

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	呉林 なごみ (Nagomi Kurebayashi)		
研究協力者	村山 尚 (Takashi Murayama)		

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