

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790850

研究課題名（和文） 酸素代謝をターゲットにした新規心不全治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of new heart failure therapies that target oxygen metabolism

研究代表者

武田 理宏 (TAKEDA TOSHIHIRO)

大阪大学大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：70506493

研究成果の概要（和文）：

本研究は慢性心不全の運動耐容能改善薬として、ヘモグロビン酸素親和性を下げる RSR13 を元に、より効果の高い薬剤を探索する事である。RSR13 は、その芳香環がヘモグロビンポケットにはまり込む事により、その効果を発する。RSR13 の芳香環の側鎖を大きくすると薬剤効果が大きくなるが、大きくなりすぎるとヘモグロビンは変性した。RSR13 の骨格を変更する事でも、薬剤効果が大きくなる事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to investigate the new chemicals that reduce hemoglobin-oxygen affinity and improve the exercise intolerance of the patients with chronic heart failure from RSR13. RSR13 exerts its effect by fitting its aromatic ring in hemoglobin pocket. By enlarging the side chain of the aromatic ring of RSR13, the effect of new chemicals was increased. However, hemoglobin was denatured if the side chain was too large. In addition, by changing the skeleton RSR13, the effect of new chemicals were also increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ヘモグロビン、酸素代謝、運動耐容能

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全の主症状は労作時呼吸困難であり、運動耐容能の障害が生活の質を低下させる。しかしながら、現在の心不全治療薬に予後が悪化なく運動耐容能を著明に改善するものはない。

我々はヘモグロビン酸素代謝に着目した。ヘモグロビン酸素親和性を低下させる遺伝子変異を組み込んだノックインマウスの骨髄を、心筋梗塞後に心不全を発症した野生型マウスに移植すると、野生型マウスの骨髄を移植した心不全マウスに比し、運動耐容能の改善が認められた。

臨床応用には患者骨髄を単離して変異ヘモグロビン遺伝子を導入する必要があるがこれは安全性の面から大きな問題がある。そこでヘモグロビン酸素親和性を低下する小化合物を検索したところアニリノカルボニルメチルフェノキシメチルプロピオン酸類縁体である RSR13 が存在した。RSR13 を心筋梗塞後の心不全となった野生型マウスが、予後の悪化なく、運動耐容能を改善する事を明らかとした。

2. 研究の目的

RSR13 は 150mg/kg の投与が必要であり、

よりヘモグロビン親和性の高い薬剤が必要となる。本研究の目的は RSR13 を出発点に、より有効性の高い化合物を合成し、その有効性をマウス心不全モデルにて検討する事である。

3. 研究の方法

3-1. 酸素解離曲線

ヒトヘモグロビンならびに赤血球を検体として使用した。合成した化合物を加えたヘモグロビン溶液ならびに赤血球溶液に対し、酸素分圧を連続的に高値から低値に下げた後、再度高値に上昇させる事で、ヘモグロビン酸素飽和度を測定した。

酸素化ヘモグロビン(Oxy-Hb)と非酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)、メトヘモグロビン(Met-Hb)の割合は、560nm、576nm、630nmの吸光度を測定する事により求めた。

3-2. スクリーニング系の確立

多くの薬剤へのヘモグロビン酸素親和性に対する効果を検討するために、簡易なスクリーニング系を立てる事とした。赤血球浮遊液は、赤血球による光の散乱により吸光度に測定誤差を生じることから、スクリーニングの系はヘモグロビン溶液を用いた。

スクリーニングは大気圧下で行う事が理想であるが、25°C、pH7.4の条件では、酸素分圧 100mmHg での RSR13 を加えたヘモグロビン溶液の酸素飽和度は 100%に近い値となるため、スクリーニングに適さない。そこで、薬剤投与のスクリーニングに最適な温度、pHの検討を行った結果、37°C、pH7.0での実験系とした。

4. 研究成果

ヘモグロビンと RSR-13 の立体構造情報の検討により、RSR-13 は、RSR-13 の芳香環がヘモグロビンポケットにはまり込む事により、その効果を発すると予測された。そこで、RSR-13 芳香環の置換基の構造を大きくする事でヘモグロビンとの結合が安定化し、薬剤効果が増強すると予測し、芳香環のメチル基を CF₃ に (SO1905)、CF₃ と Br に (SO1906)、Cl と Br に (SO1907) 変換した3種類の新規化合物を合成し、これらの化合物がヘモグロビン酸素親和性に与える影響の検討を行った (図 1)。

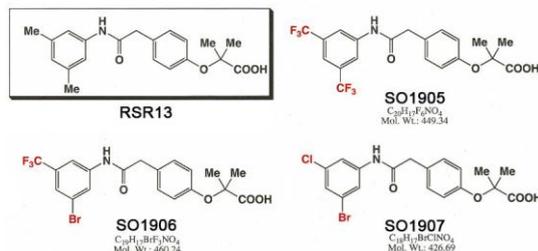


図 1. 新規合成化合物の構造 (1)

最初に直接ヘモグロビンへの影響を検討するために、25°C、pH7.4の条件下で、ヘモグロビン溶液を用いて、ヘモグロビン酸素解離曲線を求めた。図 2-A に示すように、SO1905、1906、1907 はいずれもヘモグロビン酸素解離曲線が Vehicle に比し、右方移動しており、P50 値は上昇した (P50, Vehicle: 4.6mmHg, RSR-13: 20mmHg, SO1905: 8.8mmHg, SO1906: 27mmHg, SO1907: 37mmHg)。さらに、SO1906、1907 は RSR-13 より右方移動を認め、P50 値は上昇し、RSR-13 より効果を持つ可能性が示唆された。Hill 定数は Vehicle、RSR-13、SO1905、SO1906、SO1907 でほぼ同等の値であった (Hill 定数, Vehicle: 2.9, RSR-13: 2.5, SO1905: 2.6, SO1906: 2.6, SO1907: 2.4)。

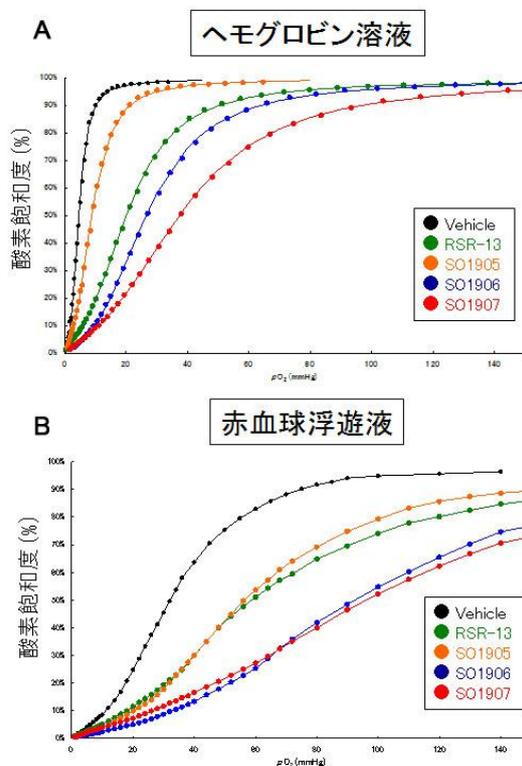


図 2. ヘモグロビン酸素解離曲線

次に新規合成薬剤の赤血球膜透過性の影響等を加味するため、赤血球浮遊液を用い、37°C、pH7.4の条件下で、同様の実験を行った。図 2-B に示すように、赤血球浮遊液でのヘモグロビン酸素解離曲線の右方移動は、SO1905 は RSR-13 とほぼ同等であり、SO1906、SO1907 は RSR-13 より、さらなる右方移動、P50 値の上昇を認めた (P50, Vehicle: 29mmHg, RSR-13: 60mmHg, SO1905: 58mmHg, SO1906: 83mmHg, SO1907: 86mmHg)。Hill 定数は Vehicle、RSR-13、SO1905、SO1906、SO1907 でほぼ同等の値であった (Hill 定数, Vehicle: 2.5,

RSR-13: 2.2, SO1905: 2.5, SO1906: 2.4, SO1907: 2.2)。

以上より、SO1906、SO1907 は RSR-13 よりヘモグロビン酸素親和性を下げる事が明らかとなった。

RSR-13 より効果の期待された SO1906、SO1907 について、その濃度依存性を検討した。ヘモグロビン酸素解離曲線は、赤血球浮遊液を用い、37°C、pH7.4 の条件下で求めた。SO1906、SO1907 共に 1mM、2mM の濃度では 1mM の RSR13 より大きな右方移動を認めたものの (P50, SO1906(2mM): 126mmHg, SO1906(1mM): 82mmHg, SO1907(2mM): 144mmHg, SO1907(1mM): 82mmHg)、700 μ M では 1mM の RSR13 と同程度の右方移動であり (P50, SO1906(700 μ M): 61mmHg, SO1907(700 μ M): 64mmHg)、100 μ M ではほとんど効果を認めなかった (P50, SO1906(100 μ M): 36mmHg, SO1907(100 μ M): 38mmHg)。

本実験系ではヘモグロビン酸素解離曲線の作成に、1 時間程度の時間がかかる。そこで、薬剤簡易スクリーニング系を確立した。スクリーニング系では、Vehicle を添加したヘモグロビン溶液 (Cont) の酸素飽和度は 88% であった。RSR-13 添加したヘモグロビン溶液の酸素飽和度は 80.6% であり、スクリーニング系で、RSR-13 がヘモグロビンの酸素親和性を下げる事を確認出来た。次に、SO1905、1906、1907 を添加したヘモグロビン溶液の酸素飽和度はそれぞれ、81.0%、69.9%、64.7% であり、先の実験で求めたヘモグロビン酸素親和性の低下とほぼ同様の傾向が得られた。

本スクリーニング系を用いて、新規薬剤のスクリーニングを行った。最初に RSR-13 芳香環の置換基の構造を変化させる事でその効果の検証を行った。YKS467、471、472、473 は RSR13 より側鎖の場所を変えたものや側鎖の大きさを小さくしたものである (図 3)。Vehicle が 89.0%、1mM の RSR-13 の酸素飽和度が 77.8% であったのに対し、新規薬剤はそれぞれ 1mM で YKS467 が 86.7%、YKS471 が 81.3%、YKS472 が 85.6%、YKS473 が 83.8% であり、いずれも RSR13 に比し効果を認めなかった。

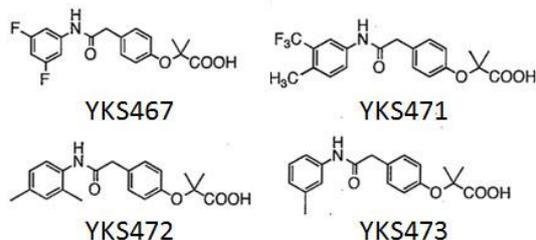


図 3.新規合成化合物の構造 (2)

次に側鎖の大きさを少し大きくした化合物を生成した (図 4)。酸素飽和度は Vehicle88.0%、RSR-13(1mM)80.6%に対し、YKS477 が 69.2%、YKS478 が 72.7%、YKS479 が 84.9% (いずれも 1mM) であった。YKS477、478 は RSR13 より効果を発したが、同条件の SO1907 は 65.5% であり、SO1907 より効果を発しなかった。薬物濃度を 0.5mM として、検討を行ったが傾向は変化しなかった。

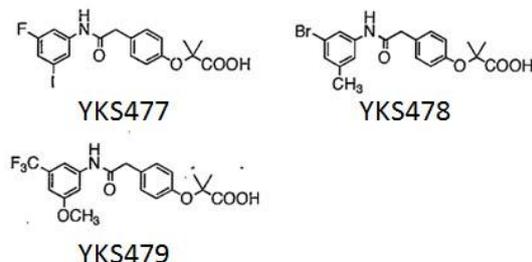


図 4.新規合成化合物の構造 (3)

さらに側鎖を大きくした薬剤を合成した (図 5)。YKS470(1mM) の酸素飽和度は 60.3% であり、同実験での SO1907(1mM) 62.0% と同等の効果が期待された。しかし、薬剤濃度が 0.5mM で効果は低下し (SO1907: 68.3%, YKS470: 68.6%)、0.1mM では SO1907 と同等に効果を認めなかった (SO1907: 84.8%, YKS470: 84.0%)。YKS487、YKS488(1mM) の酸素飽和度はそれぞれ 69.3%、65.1% であり、同実験の SO1907(1mM) 64.7% と同等であったが、薬剤濃度を下げて検討を行ったが、薬物濃度低下によりその効果は認めなくなった (0.5mM, SO1907: 73.1%, YKS487: 65.1%, YKS488: 65.5%、0.2mM, SO1907: 74.8%, YKS487: 76.8%, YKS488: 71.0%)。

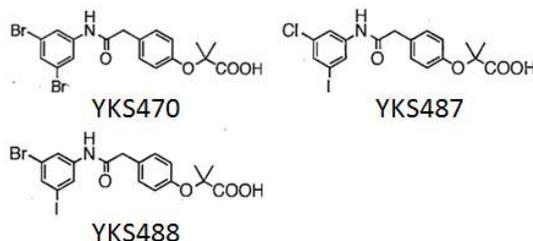


図 5.新規合成化合物の構造 (4)

次にさらに側鎖を大きくした薬剤を合成した (図 6)。これらの薬剤は 1mM ではヘモグロビンの変性を認めた。薬物濃度を下げると、YKS468 と YKS486 は変性しないものの、効果も認めなかった。これは側鎖が大きいため、薬剤がヘモグロビンのポケットにはまり込まない可能性が示唆された。YKS480 のみ、濃度を下げると変性せず、効果を認めました

が、0.2mM で酸素飽和度が 83.7%であり、SO1907 (0.2mM で 83.9%) を越えるものではなかった。

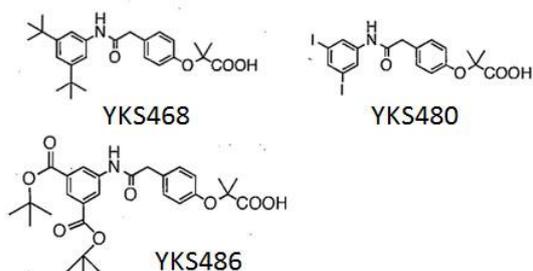


図 6. 新規合成化合物の構造 (5)

これ以上、側鎖の変更による薬剤効果の発揮は難しいと判断し、次に骨格の変更について検討を行った(図 7)。YKS469 と YKS475 の 1mM での酸素飽和度はそれぞれ 85.6%、83.3% (同実験での RSR13 は 77.8%) であり、RSR13 の薬効は失われた。YKS481、482、483 は文献的に酸素親和性の低下をみとめたものの、実用化はされなかった構造であるが、メトグロビンが著明に増加した。先行研究においてもメトグロビンの増加のために副作用が出て実用化されなかったと予想された。YKS489 の 1mM での酸素飽和度は 83.8% であり、YKS469、YKS475 と同等に RSR13 の薬効は失われた。この事より、N 基におけるヘモグロビンとの水素結合が薬剤効果発生には重要と考えられた。

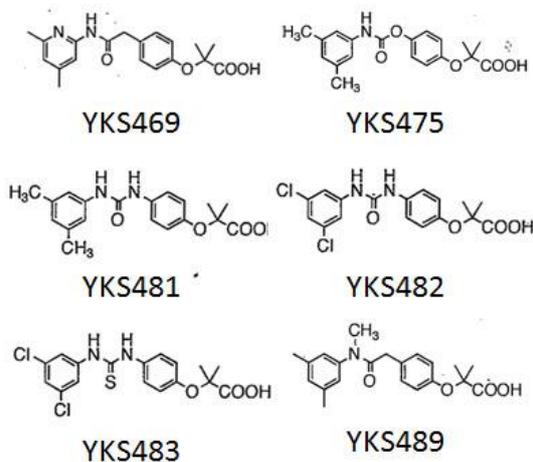


図 7. 新規合成化合物の構造 (6)

次に右側の芳香環にメチル基をつけた化合物について、検討を行った(図 8)。YKS491、YKS492 の 1mM での酸素飽和度はそれぞれ 71.7%、80.5% であり、同実験での RSR13 (1mM) の酸素飽和度 84.6% を上回った。特に YKS491 については、RSR13 よりもより効果を発する事が期待される。今後は YKS491 の構造に左の芳香環に置換基を変更する事で、さらなる効果が得られる事が期待

される。

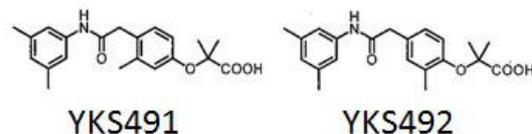


図 8. 新規合成化合物の構造 (7)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*. 10;485(7397):251-5, 2012.
- ② Taneike M, Mizote I, Morita T, Watanabe T, Hikoso S, Yamaguchi O, Takeda T, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Takeda J, Mochizuki N, Komuro I, Otsu K. Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J Biol Chem*. 16;286(37):32170-7, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 理宏 (TAKEDA TOSHIHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：70506493