

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293025

研究課題名(和文) 免疫プロテアソームを標的とする自己免疫疾患治療薬の天然資源からの探索

研究課題名(英文) Search for drug leads of autoimmune disease targeting the immunoproteasome

研究代表者

塚本 佐知子 (Tsukamoto, Sachiko)

熊本大学・生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：70324093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の全ての細胞に存在する構成型プロテアソームに対して、適応免疫において重要な役割を果たしているのが免疫プロテアソームである。そして、免疫プロテアソームに特異的な薬剤は、自己免疫疾患に有効であるため注目を集めている。そこで本研究では自己免疫疾患の治療薬の開発を目指し、免疫プロテアソームに対する特異的な新規阻害物質を天然資源から探索することを計画した。構成型プロテアソームよりも免疫プロテアソームをより強く阻害する天然資源抽出物をスクリーニングで選び、阻害物質の精製を行った。新規プロテアソーム阻害物質の発見には成功したが、現在のところ免疫プロテアソームに特異的な阻害物質は得られていない。

研究成果の概要(英文)：The immunoproteasome plays an important role in antigen processing and T cell generation. Recently, immunoproteasome-specific inhibitors have been proposed to have effects on diseases including immune function. In this study, we searched for selective immunoproteasome inhibitors from natural sources. In screening, we selected the extracts of natural sources that inhibited the immunoproteasome more potent than the constitutive proteasome and purified inhibitors. We succeeded in isolating new proteasome inhibitors, whereas they were found to be non-selective inhibitors.

研究分野：天然物化学

キーワード：免疫プロテアソーム 自己免疫疾患 創薬 天然資源

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS、図1)は、細胞内での選択的なタンパク質分解を司るシステムとして知られている。本システムにおいて分解される運命にある標的タンパク質は、3つの酵素(E1, E2, E3)の連続的な作用によってユビキチン修飾された後、プロテアソームにより分解される。そして近年、ユビキチン修飾系はタンパク質の分解だけでなく、多様な様式でタンパク質機能を調節することにより多彩な生命現象の制御において中核的な役割を果たすことが明らかとなりつつある。その一方で、UPSを構成する各ステップを標的とする創薬研究が活発に行われ、現在では、がんに加えて自己免疫疾患や神経変性疾患の治療薬の開発へと発展している。

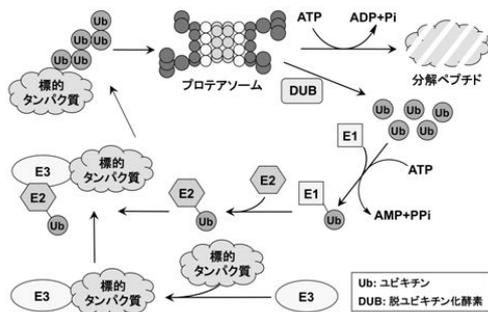


図1. ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS)

(1) プロテアソームを標的とする薬剤

プロテアソーム阻害剤である bortezomib は first-in-class の薬剤として開発され、2003年に米国 FDA により多発性骨髄腫の治療薬として認可された(Adams, *Drug Discov. Today* **8**, 307, 2003)。その後、bortezomib の示す重篤な副作用、薬剤耐性、多発性骨髄腫以外の悪性腫瘍への効果の低さ等の欠点を克服するような第二世代の薬剤の開発が活発に行われ、2012年7月には carfilzomib が認可された(Thompson, *Ann. Pharmacother.* **47**, 56, 2013)。

(2) 免疫プロテアソームを標的とする薬剤

プロテアソームを構成する多くのサブユニットのうち、触媒活性部位を有するのが $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ サブユニットである。哺乳類の全ての細胞に存在するプロテアソームは「構成型プロテアソーム」と呼ばれ、一方、MHC クラス I への抗原提示を促進し適応免疫において重要な役割を果たしているのが「免疫プロテアソーム」である。免疫プロテアソームでは、ウイルス感染時に産生される IFN- γ によって発現が誘導される $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ が入れ替わっている(図2)。Bortezomib や carfilzomib は、構成型プロテアソームだけでなく免疫プロテアソームの作用も阻害するが、その後開発された PR-957 は、免疫プロテアソームを特異的に阻害する。PR-957 は $\beta 5i$ に対する特異的阻害剤で、自己免疫疾患(関節炎、大腸炎、全身性エリテマトーデス)や多発性骨髄

腫に有効であることが明らかとなっていた。さらに、bortezomib の 10 分の 1 の量で有効であることから、bortezomib が示す副作用等が現れにくいという点が高く評価され、前臨床試験が開始された。このような背景から、 $\beta 5i$ サブユニットを特異的に阻害する薬剤の画期的な有効性が大きな注目を集めていた(Huber and Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 8708, 2012)。

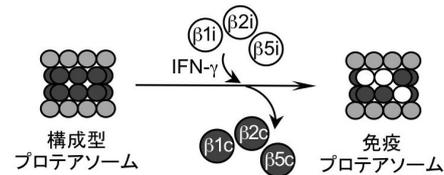


図2. 免疫プロテアソームでは IFN- γ で誘導される $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ が入れ替わっている

2. 研究の目的

Bortezomib が認可されて以来、プロテアソームだけではなく UPS の全体ががん治療の標的になると期待され、薬剤の開発が活発に行われてきた。しかし、UPS 阻害物質の開発は、化合物ライブラリーからの探索に加えて、得られたリード化合物の修飾による方法がほとんどである。そこで、本研究代表者は、構造に多様性のある天然物を対象として阻害剤を探索することは、全く新しいリード化合物の発見につながると考えた。そして、bortezomib が認可される以前から UPS が創薬の標的になりうると考え、次世代型がん治療薬の開発を目指して、海洋生物資源からの探索を行ってきた。その結果、世界に先駆けて、プロテアソームに加えて E1, E2, E3 に対する阻害物質を探索するためのアッセイ系を確立しスクリーニングを行い、各種阻害物質を発見した。発見した阻害物質の中でも、本研究代表者が単離した E2 阻害物質(Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6319, 2008)は世界初の発見例であり、また、本研究代表者が単離した E1 阻害物質(Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 191, 2005)と E3 阻害物質(Tsukamoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 6319, 2006)は、天然資源からの発見例としてはいずれも 2 例目にあたる。そして現在に至るまで、より活性の強い阻害物質の探索を続けてきた。

E1 は 1 種類が存在するのみであるが、E2 と E3 はそれぞれ 40 種類及び 600 種類存在する。そこで E2 と E3 に関しては、阻害することで p53 (がん抑制遺伝子産物) の作用を増強すると考えられる E2 (Ubc13) と E3 (Mdm2) を対象として阻害物質の探索を行ってきた。また、E1 阻害物質も p53 の作用を増強する。本研究代表者は、がん治療薬としての効果を考えると、p53 の作用を増強する薬剤の中で異なる標的に作用する薬剤を複数併用することにより相乗効果が現れ、治療効果の飛躍的な向上が期待できると考えた。そこで、E1, E2, E3 に加えて、p53 の作用を増強できる脱

ユビキチン化酵素 USP7 に対する阻害物質の探索も行っている。

以上のように、本研究代表者は、UPS に関する作用機構や臨床データを含む広汎な情報に基づき、これまで多くのステップを対象としたスクリーニングを行いながら天然資源から阻害剤を探索し、先駆的な成果をあげてきた。そこで本研究では新たに、自己免疫疾患の治療薬の開発を目指し、免疫プロテアソームの $\beta 5i$ サブユニットに対する特異的な新規阻害物質を天然資源から探索することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 薬用海洋資源の採集及び抽出液の調製

本研究代表者は、平成 18 年度からインドネシアにおいて薬用海洋資源の調査・採集を行っている。本研究では、その抽出物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、免疫プロテアソームを特異的に阻害する化合物の探索を行った。

(2) アッセイ法の構築と活性試験の遂行

本研究では、免疫プロテアソームの $\beta 5i$ サブユニットに対する特異的な阻害物質を探索するために、新たにアッセイ系を構築し、薬用海洋資源ライブラリーから新規阻害物質を単離することに重点をおいた。さらにこれまでに構築したアッセイ系を用いて、構成型プロテアソームや E1, E2, E3 および USP7 に対する阻害物質を探索し、p53 の作用を増強するがん治療薬の開発を目指した。

(2-1) $\beta 5i$ サブユニットに対する特異的な阻害物質の探索

これまで本研究代表者は、ラット肝臓から構成型プロテアソームを調製しスクリーニングを行ってきた。本研究で用いる免疫プロテアソームは、脾臓に多く含まれているので、構成型プロテアソームと同様の方法で、ラット脾臓から調製して用いた。そして、サンプル存在下に、 $\beta 5$ (構成型プロテアソーム) あるいは $\beta 5i$ (免疫プロテアソーム) サブユニットに由来するキモトリプシン様活性に対する阻害作用について、発蛍光性 MCA 基質 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) を用いてスクリーニングを行い、免疫プロテアソームをより強く阻害するサンプルを選んだ(図 3)。なお、脾臓から高収率で免疫プロテアソームを調製できない場合には、市販の免疫プロテアソーム標品を用いることにした。

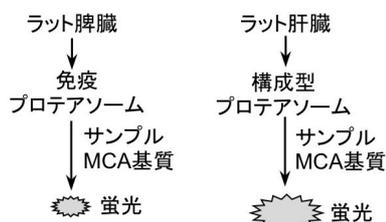


図 3. $\beta 5i$ サブユニットに対する特異的な阻害物質の探索

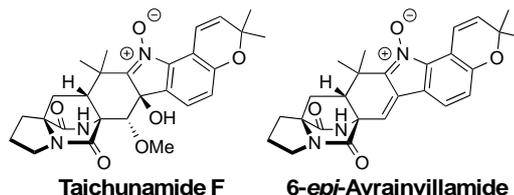
(2-2) 構成型プロテアソームや E1, E2, E3 および USP7 に対する阻害物質の探索は、既に確立したアッセイ系を用いて行った。

4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害物質

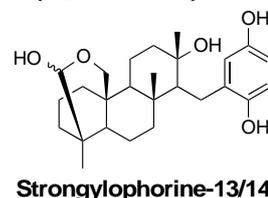
ラットの肝臓から構成型プロテアソームを調製する方法を用いて、脾臓から免疫プロテアソームの調製を行ったが、キモトリプシン様発蛍光性 MCA 基質 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) を分解しなかった。そこで、市販の免疫プロテアソームを購入し用いた。スクリーニングを行い、構成型プロテアソームよりも免疫プロテアソームを強く阻害する天然資源抽出物から、阻害物質を精製し構造決定した。そして、単離した化合物を用いて、構成型プロテアソームに対してはキモトリプシン様活性、トリプシン様活性およびカスパーゼ様活性に対する阻害活性を調べた。一方、免疫プロテアソームに対してはキモトリプシン様活性およびトリプシン様活性に対する阻害活性を調べた(免疫プロテアソームは、カスパーゼ様活性を示さない)。結果的に、免疫プロテアソームを特異的に阻害する化合物は得られなかったが、以下の化合物がプロテアソーム阻害物質として得られた。

Taichunamide F および 6-*epi*-avrainvillamide 真菌 *Aspergillus taichungensis* (IBT 19404) からプレニル化インドールアルカロイドを 21 種類単離した。それらの中で taichunamide F および 6-*epi*-avrainvillamide は、プロテアソームのキモトリプシン様活性を 10 μM で 81 および 95% 阻害した(発表論文)。



Strongylophorine 誘導体

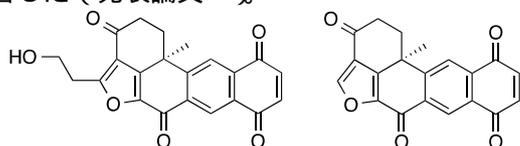
海綿 *Petrosia corticata* から 2 個の新規物質と 6 個の既知化合物を単離したが、それらの中で strongylophorine-13/-14 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性を 2.1 μM の IC_{50} 値で阻害した(発表論文)。



Halenaquinone 誘導体

Xestospongia 属海綿から、既知化合物 halenaquinone とともに新規物質として 1-hydroxyethylhalenaquinone を単離した。それら化合物は、プロテアソームのキモトリプシン様活性を 0.63 および 0.19 μM の IC_{50} 値で阻

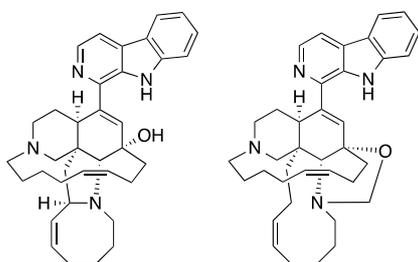
害した(発表論文)。



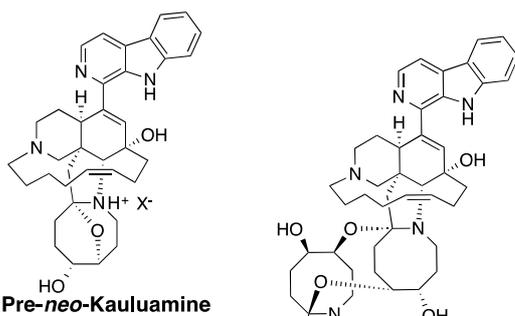
1-Hydroxyethylhalenaquinone Halenaquinone

Manzamine 誘導体

海綿 *Acanthostrongylophora ingens* から単離した manzamine A は、プロテアソームのキモトリプシン様活性を 2.0 μM の IC_{50} 値で阻害した。さらに、新規物質 acanthomanzamine D、pre-neo-kauluamine および既知化合物 neo-kauluamine は、0.63, 0.34, 0.13 μM の IC_{50} 値で阻害したが、新規物質 acantholactam は、 IC_{50} 値が 33 μM であった。このことから、manzamine 類の構造に特徴的な 8 員環の存在が活性発現に必要であると考えられる(発表論文、)。

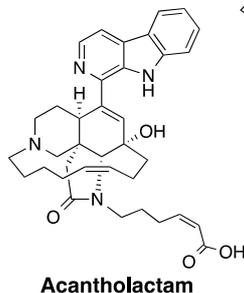


Manzamine A Acanthomanzamine D



Pre-neo-Kauluamine

neo-Kauluamine

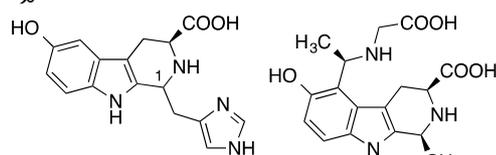


Acantholactam

(2) E1 阻害物質

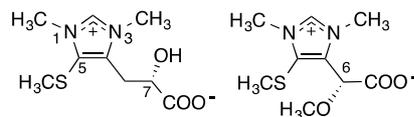
以前、海綿 *Hyrtios reticulatus* から本研究代表者らが単離した hyrtioreticulins A, B はそれぞれ 2.4, 35 μM の IC_{50} 値で E1 を阻害した (Yamanokuchi *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4437, 2012)。その後、同じ海綿から新規物質として類縁化合物 hyrtioreticulin F およびイミダゾール誘導体 reticulatins A, B を単離したが、

いずれの化合物も 200 μM の濃度でも E1 を阻害しなかった。Hyrtioreticulins A, B はイミダゾール部分を有しているが、reticulatins A, B は阻害作用を示さなかったため、hyrtioreticulins A, B のような構造の全体が、E1 阻害作用に必要であると考えられる(発表論文)。



Hyrtioreticulin A: 1R
Hyrtioreticulin B: 1S

Hyrtioreticulin F

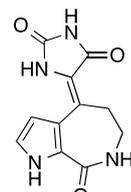


Reticulatin A

Reticulatin B

(3) USP7 阻害物質

海綿 *Stylissa massa* から既知アルカロイドである spongiacidin C を単離した。Spongiacidin C は脱ユビキチン化酵素 USP7 を 3.8 μM の IC_{50} 値で阻害した(発表論文)。USP7 阻害作用を示す合成化合物は、既に数種類が発見されていたが、spongiacidin C は天然資源から発見された初めての USP7 阻害物質であった。



Spongiacidin C

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)(全て査読有)

S. Tsukamoto (7人中7番目) .

Taichunamides: prenylated indole alkaloids from *Aspergillus taichungensis* (IBT 19404). *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 1128-1132 (2016). 10.1002/anie.201509462R1

H. Yokosawa, S. Tsukamoto (7人中7番目) Strongylophorines, meroditerpenoids from the marine sponge *Petrosia corticata*, function as proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2650-2653 (2015). 10.1016/j.bmcl.2015.04.075

H. Yokosawa, S. Tsukamoto (9人中9番目) 1-Hydroxyethylhalenaquinone: a new proteasome inhibitor from the marine sponge *Xestospongia* sp. *Heterocycles* **89**, 2605-2610 (2014). 10.3987/COM-14-13087

H. Yokosawa, S. Tsukamoto (12人中12番目) . Acanthomanzamines A–E with new manzamine frameworks from the marine

sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Org. Lett.* **16**, 3888-3891 (2014). 10.1021/o15015569
H. Yokosawa, S. Tsukamoto (11人中11番目). Acantholactam and pre-neo-kaulamine, manzamine-related alkaloids, from the Indonesian marine sponges, *Acanthostrongylophora ingens*. *J. Nat. Prod.* **77**, 1536-1540 (2014). 10.1021/np500290a
S. Tsukamoto(8人中8番目). Reticulatins A and B and hyrtioreticulin F from the marine sponge *Hyrtios reticulatus*. *Tetrahedron* **69**, 7051-7055 (2013). 10.1016/j.tet.2013.06.043
H. Yokosawa, S. Tsukamoto (10人中10番目). Spongiacidin C, a bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Stylissa massa*, functions as a USP7 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 3884-3886 (2013). 10.1016/j.bmcl.2013.04.066

[学会発表](計26件)

塚本佐知子, p53を安定化させる脱ユビキチン化酵素 USP7 阻害物質の探索. 日本薬学会第136年会シンポジウム「創薬研究における天然物化学のミッションと新潮流」、パシフィコ横浜(横浜)、2016年3月26-29日.
塚本佐知子, インドネシア産海綿から単離した4種の新規セスタテルペンの構造. 日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜(横浜)、2016.3.26-29.

橋元誠, 海生糸状菌 *Aspergillus* sp. MF275由来 himeic acid の生合成研究. 日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜(横浜)、2016.3.26-29.

Sachiko Tsukamoto, Drug discovery targeting the ubiquitin-proteasome system from marine organisms. PACIFICHEM 2015, Honolulu (USA), 2015.12.15-20.

久木田沙菜子, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 二量体の構造と生物活性. 日本生薬学会第62回年会、長良川国際会議場(岐阜)、2015.9.11-12.
加藤光, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 類縁体の構造と生物活性. 日本生薬学会第62回年会、長良川国際会議場(岐阜)、2015.9.11-12.

Sachiko Tsukamoto, Search for proteasome inhibitors from marine organisms, ISPSA2015 TOKUSHIMA, 徳島文理大学(徳島)、2015.8.30-9.2.

Sachiko Tsukamoto, Isolation of strongylophorines from the marine sponge *Petrosia corticata*, as proteasome inhibitors. ASP 2015 Annual Meeting, Copper Mountain (USA), 2015.7.25-29.

Sachiko Tsukamoto, Search for inhibitors of the ubiquitin-proteasome system from the natural sources for drug development, Organic Seminar in Colorado State

University, Fort Collins (USA), 2015.7.24.
鳥井万純, *Didemnum* 属群体ボヤ由来新規 serinolipid の構造. 日本薬学会第135年会、神戸学院大学・兵庫医療大学(神戸)、2015.3.25-28.

田之頭夏希, 海綿 *Petrosia alfiani* から得られた新規 xestoquinone 類縁体. 第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学(福岡)、2014.12.6-7.

川畑哲郎, *Xestospongia* 属海綿から得られた新規プロテアソーム阻害物質 1-hydroxyethylhalenaquinone について. 第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学(福岡)、2014.12.6-7.

加藤光, 海綿 *Petrosia corticata* に含まれるメロジテルペン strongylophorines の構造と活性. 第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学(福岡)、2014.12.6-7.

塚本佐知子, ユビキチン化を標的とする創薬. 第37回日本分子生物学会年会ワークショップ企画「ケミストリーを戦略としたシグナル伝達研究」、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25-27.

塚本佐知子, 新規 manzamine 類縁化合物の生物活性と推定生合成経路. 第20回天然物の開発と応用シンポジウム「モトりの新展開」、東京大学弥生講堂一条ホール(東京)、2014.11.5-6.

Ahmed H. Eldesoky, 海綿 *Acanthostrongylophora ingens* から得られた新規 manzamine 類縁体の構造と生物活性. 第56回天然有機化合物討論会、高知県民文化ホール(高知)、2014.10.15-17.

松尾佳苗, *Xestospongia* 属海綿由来 halenaquinone 関連化合物によるプロテアソーム阻害活性について. 日本生薬学会第61回年会、福岡大学薬学部(福岡)、2014.9.13-14.

野田愛, 海綿 *Petrosia corticata* から得られた strongylophorines の生物活性. 日本生薬学会第61回年会、福岡大学薬学部(福岡)、2014.9.13-14.

塚本佐知子, ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害剤の開発. 第19回日本病態プロテアーゼ学会 学術集会シンポジウム「ユビキチンとプロテアソーム研究の最前線」、千里ライフサイエンスセンター(大阪)、2014.8.9.

塚本佐知子, ユビキチン化を標的とする創薬研究. 日本薬学会第134年会、熊本大学(熊本)、2014.3.27-30.

②1 Sachiko Tsukamoto, Marine natural products inhibiting the ubiquitin-proteasome system. International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2013, Hotel Rubura Ohzan (Nagoya), 2013.11.24-26.

②2 塚本佐知子, 脱ユビキチン化酵素 USP7 阻害物質 spongiacidin C の海綿からの単離と活性について. 第5回食品薬学シン

ポジウム、京都大学薬学部記念講堂（京都） 2013. 11. 1-2.

- ⑳ Sachiko Tsukamoto, Search for new drug leads, which can enhance the effect of p53, from marine organisms, XIV International Symposium on Marine Natural Products, La Toja Island (Spain), 2013. 9. 15-20.
- ㉑ 坂井恵理子、海綿 *Hyrtios reticulatus* 由来 reticulatins A, B および hyrtioreticulin F の絶対立体配置の決定、日本生薬学会第 60 回年会、北海道医療大学（石狩郡当別町） 2013. 9. 7-8.
- ㉒ Sachiko Tsukamoto, Search for new inhibitors of the ubiquitin-proteasome system from natural sources for drug development: The 35nd Naito Conference on the Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles, Chateraise Gateaux Kingdom (Sapporo), 2013. 7. 9-12.
- ㉓ 塚本佐知子、海綿から得られた USP7 阻害物質 spongiacidin C、第 8 回化学生態学研究会、湯の川プリンスホテル渚亭（函館） 2013. 6. 28-29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 佐知子 (TSUKAMOTO, Sachiko)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：70324093

(2) 連携研究者

横沢 英良 (YOKOSAWA, Hideyoshi)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90012765