

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893258

研究課題名(和文) リードスルー作用を有するネガマイシンを基盤としたナンセンス変異疾患治療薬創製研究

研究課題名(英文) Study of medicinal chemistry of nonsense mutation disease therapeutics focused on negamycin with readthrough activity

研究代表者

田口 晃弘 (Taguchi, Akihiro)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40707311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、リードスルー作用を有するジペプチド型抗生物質(+)-ネガマイシンに着目したナンセンス変異疾患治療薬創製研究を展開し、これまでに、比較的高い活性を有する誘導体TCP-112を見出すことに成功している。そこで、TCP-112のカルボン酸に着目した誘導化により、更なる高活性誘導体の獲得を目指した。その結果、カルボン酸をメタクロロベンジルエステルへ変換した誘導体に高い活性を有することを見出した。細胞評価系および無細胞タンパク質合成評価系の評価から、当該エステル構造はTCP-112の脂溶性を向上させ、担体性プロドラッグとして細胞内への移行効率の改善に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(+)-Negamycin, a natural dipeptidic antibiotic, exhibits a readthrough activity toward the nonsense mutation. We performed a structure activity relationship study for development of nonsense mutation disease therapeutics. As a result, we successfully obtained that TCP-112 shows a higher readthrough activity than negamycin. In this study, further derivatization at the carboxylic acid part of TCP-112 demonstrates that m-chlorobenzyl ester derivative exhibits a more potent readthrough activity than TCP-112 in cell-based assay. However, in the cell-free protein expression system, the readthrough activity of m-chlorobenzyl ester derivative drastically decreases compared to that in the cell-based assay. These results suggest that benzyl ester-type derivatives enhance the hydrophobicity and function as prodrugs to produce TCP-112 in living cell systems.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リードスルー ネガマイシン デュシェンヌ型筋ジストロフィー 創薬化学 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、不治の病と言われる進行性筋萎縮症であり、幼児期より発症する最も重篤な筋ジストロフィーである。本邦における患者の約19%は、ジストロフィン遺伝子上にナンセンス変異が生じることで発症する。即ち、ジストロフィン遺伝子上にナンセンス変異により未熟終止コドン (premature termination codon; PTC) が挿入され、完全長ジストロフィンタンパク質が生成されず発症する。現在、本疾患における画期的な治療法および治療薬は確立されておらず、ステロイド投与による対症療法に留まっている。

近年、治療薬候補化合物として、PTCを読み飛ばす (リードスルー) 作用を有する低分子化合物が注目を集めている。アミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンが、本疾患モデルマウス (*mdx* マウス) において、タンパク質翻訳時にジストロフィン mRNA のナンセンス変異をリードスルーし、筋収縮能を有するジストロフィンタンパク質を生成することが明らかとなり、本疾患に対する薬物治療の可能性が示唆された。しかしながら、ゲンタマイシンは腎毒性、耳毒性発現のため長期投与は困難であると考えられる。アミノグリコシド系抗生物質誘導体 G418 は、より高い活性を有するが毒性発現も強く、臨床応用は困難である。また、PTC Therapeutics 社で見出されたリードスルー化合物 Ataluren (PTC124) は、本疾患において後期第2相臨床試験にて頓挫している。これまで、複数のリードスルー化合物が報告されているが、本疾患治療薬の実現には至っていない。

東京大学松田良一教授らは、ゲンタマイシンより比較的低毒性である放線菌 *Streptomyces purpeofuscus* 由来ジペプチド型抗生物質 (+)-ネガマイシン (1, 図1) が、リードスルー作用を有し、*mdx* マウスにおいてジストロフィンタンパク質の発現を促すことを報告した。このことから、本申請者らは、このネガマイシンに注目し、リードスルー作用に関する分子機能探索ならびにその創薬化学的研究展開を企画し、本疾患に対する新規治療薬開発を目指している。ネガマイシンは入手困難であることからネガマイシン自体の供給および誘導体合成の基盤を構築すべく、全合成経路の検討が行われた。その結果、短行程かつ効率的なネガマイシンの合成経路を達成し、誘導体合成の基盤構築に至った。一方で、多くの医薬候補化合物を輩出すべく、誘導体のリードスルー活性を効率的に評価できる培養細胞評価系を構築し、誘導体の活性評価を実施した。

ネガマイシンの5位水酸基からの誘導化により、図1に示す 3-*epi*-デオキシネガマイシン (TCP-107, 2)、ロイシル-3-*epi*-デオキシネガマイシン (TCP-126, 3) にネガマイシンよりも優れたリードスルー活性を有することを見出した。これら化合物は、1977年に放線

菌より単離されたネガマイシン天然有機化合物であり、その抗菌活性はほとんど示さず、その他の生物活性については未知とされていた。即ち、生物活性未知であったこれら化合物は、リードスルー化合物であることを初めて明らかにした。更に、TCP-107からの誘導化によりアシル炭素を1炭素短くした誘導体 (TCP-112, 4, 図1) においてより強力なリードスルー活性を有することを見出している。

遺伝的に欠損したタンパク質を発現させるには、遺伝子治療以外に有効な手段がないと一般に考えられるが、低分子化合物による化学療法の開発は、遺伝子疾患に対する全く新しい科学的アプローチを実証することになる。特にリードスルーのメカニズムに基づけば、ナンセンス変異が原因で生じる広範な疾患に対して、共通の戦略により対応できる治療薬を輩出することになる。即ち、不治の病である遺伝性疾患の有効な治療法が確立できると考えられる。

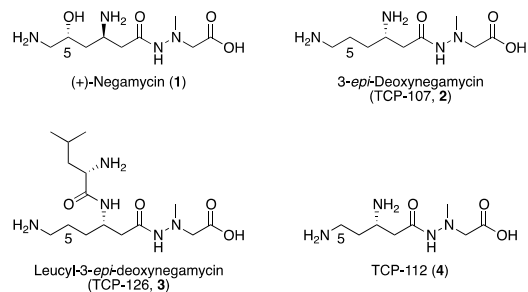


図1. リードスルー活性を有するネガマイシンおよび申請者らが見出した誘導体

2. 研究の目的

ナンセンス変異読み飛ばし作用 (リードスルー作用) を有するジペプチド型抗生物質 (+)-ネガマイシン (1) を基盤とした創薬研究を行い、未だ存在しないデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬の創製を目指す。ネガマイシンを基盤とした構造活性相関研究を実施し、リードスルー作用発現に必要な官能基、化学構造を抽出、高リードスルー活性誘導体の獲得を図る。

3. 研究の方法

(1) これまで獲得しているネガマイシン誘導体 TCP-112 (4) を基盤とした構造活性相関研究を実施することで、更なる活性を有する誘導体の創製を目指す。各官能基の重要性を精査、考察をし、活性向上に繋がる要素を探索していく。

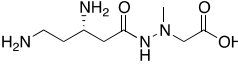
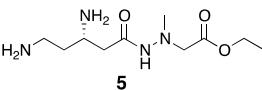
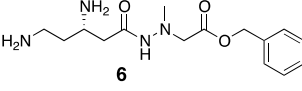
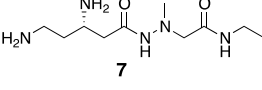
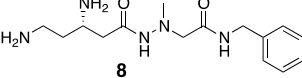
また、(2) リードスルー活性評価系の充実を図るべく細胞培養評価系に加え、無細胞タンパク質合成系構築の検討もを行い、リードスルー作用発現に真に必要な化学構造の抽出を行う。

#### 4. 研究成果

(1) TCP-112 (4) のカルボン酸における構造活性相関研究

高活性誘導体の獲得に向け、4 の C 末端カルボン酸部位にエステルまたはアミド構造を導入した。具体的にはエステル誘導体としてエチルおよびベンジルエステル 5, 6 を設計し、アミド誘導体 7, 8 を設計した。PTC として TGA 配列を有するデュアルレポータープラスミドを導入した COS-7 細胞(培養細胞評価系)にて、合成した誘導体 (200  $\mu$ M) のリードスルー活性を測定した。その結果、エチルエステル 5 の活性値は 4 の活性値と比較し、およそ半分まで減弱したが、ベンジルエステル 6 では、4 と同程度のリードスルー活性を示した。その一方で、アミド誘導体 7, 8 では、そのリードスルー活性値は大幅に低下した (表 1)。

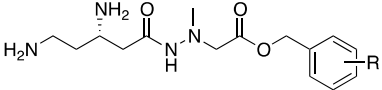
表 1. TCP-112(4)のカルボン酸に着目した誘導体のリードスルー活性値

Compound	Readthrough activity <sup>a</sup>
	4.26 $\pm$ 0.02
TCP-112 (4)	
	2.08 $\pm$ 0.11
5	
	4.04 $\pm$ 0.06
6	
	1.42 $\pm$ 0.15
7	
	0.80 $\pm$ 0.05
8	

<sup>a</sup> Cell-based readthrough activity (ratio) relative to TCP-112 (= 4.26) in COS-7 cells

このことから、活性を示した誘導体 6 のベンゼン環上の置換基についてより詳細な誘導化を実施した (表 2)。ベンゼン環上にハロゲン基、電子吸引性基または電子供与性基を導入した誘導体を検討したところ、*m*、*p* 位に塩素を導入した 9e, f (活性値; 4.90, 4.21) や *o* 位にニトロ基を導入した 9g (活性値; 4.51) は、ベンジルエステル 6 より高い活性を示すことがわかった。これはエステル構造の導入に加え、ベンゼン環上の置換基の効果により誘導体の脂溶性が改善され、細胞内移行性が向上したためと推測された。高いリードスルー活性を有するアミノグリコシド系抗生物質誘導体 G418 の活性値 (6.65) よりも低いものの、本誘導化により、活性を有する複数のエステル誘導体の獲得に至った。

表 2. 置換ベンジルエステル誘導体のリードスルー活性値



Substituted benzyl ester derivatives 9a-i

Compd.	R	Readthrough activity <sup>a</sup>
9a	<i>o</i> -Br	3.83 $\pm$ 0.56
9b	<i>m</i> -Br	3.75 $\pm$ 0.31
9c	<i>p</i> -Br	2.98 $\pm$ 0.40
9d	<i>o</i> -Cl	3.34 $\pm$ 0.15
9e	<i>m</i> -Cl	4.90 $\pm$ 0.21
9f	<i>p</i> -Cl	4.21 $\pm$ 0.16
9g	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	4.51 $\pm$ 0.07
9h	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	3.21 $\pm$ 0.13
9i	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	3.05 $\pm$ 0.16
9j	<i>o</i> -OMe	3.10 $\pm$ 0.13
9k	<i>m</i> -OMe	3.71 $\pm$ 0.19
9l	<i>p</i> -OMe	3.25 $\pm$ 0.09
G418	n, a <sup>b</sup>	6.65 $\pm$ 0.46

<sup>a</sup> Cell-based readthrough activity (ratio) relative to TCP-112 (= 4.26) in COS-7 cells; <sup>b</sup> Not applicable

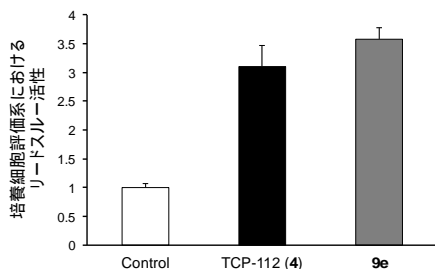
(2) 高活性ベンジルエステル誘導体の機能評価

高活性を示した誘導体はエステル構造を有していることから、培養細胞を用いた活性評価中にエステラーゼにより分解を受けるプロドラッグであることが考えられた。そこで、エステル誘導体 9e を用い、当該誘導体が活性本体であるのかを確認すべく、新たに Human cell lysate を用いた無細胞タンパク質合成系 (cell-free) を構築、TGA 配列に対するリードスルー活性の評価を試みた。培養細胞評価系では TCP-112 (4) およびエステル誘導体 (9e) は、共に高いリードスルー活性値を示したが (図 2A)、cell-free 評価系においては、エステル誘導体 9e は、陰性対照と同程度の低い活性値を示した (図 2B)。

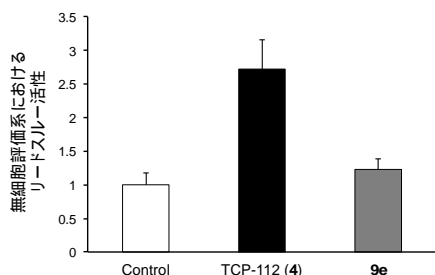
さらに、9e がプロドラッグとして機能するかを調べるため、生理的条件下 (pH 7.4) エステラーゼによる加水分解反応を行った。すなわち 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた誘導体 9e の溶液に豚肝臓由来エステラーゼを添加後、37  $^{\circ}$ C にてインキュベートし、HPLC にてその代謝物を分析した。その結果、時間経過に伴いエステル誘導体 9e は減少し、一方で TCP-112 (4) は増加することが明らかとなった。cell-free 評価系および本加水分解評価の結果から、当該エステル構造は TCP-112 の脂溶性を向上させ、担体性プロドラッグとして細胞内への移行効率の改善に寄与していることが示唆された。

以上より、TCP-112 (4) のカルボン酸に着目した構造活性相関研究により、高活性なベンジルエステル誘導体の獲得に成功した。また、新たに構築した cell-free 評価系、エステ

A)



B)



C)

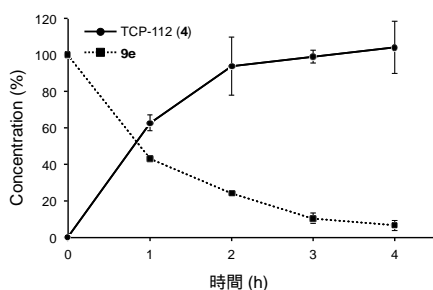


図 2.A,B) 培養細胞および無細胞評価系における TCP-112 (4) とエステル誘導体 9e のリードスルー活性; C) 豚肝臓エステラーゼによる 9e の加水分解

ラーゼによる加水分解評価によりベンジルエステル誘導体は、エステル部位が分解されてリードスルー活性を示すプロドラッグであることが示唆された。今後、更なる構造活性相関研究の実施により構造最適化を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Masaya Kotake, Masataka Shiozuka, Hidemasa Nakaminami, Thanigaimalai Pillaiyar, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Norihisa Noguchi, Takeo Usui, Ryoichi Matsuda, Yoshio Hayashi, Discovery of Natural Products Possessing Selective Eukaryotic Readthrough Activity: 3-*epi*-Deoxynegamycin and Its Leucine Adduct, ChemMedChem, 査読有, 9, 2014, 2233-2237, DOI:

10.1002/cmdc.201402208

[学会発表](計7件)

田口晃弘、濱田圭佑、小竹優也、塩塚政孝、会田 俊、生澤俊太郎、村上沙織、鈴木奈々、高山健太郎、薬師寺文華、野々村禎昭、臼井健郎、松田良一、林 良雄、「リードスルー作用を有するネガマイシン誘導体のC末端部位における構造活性相関研究」、第32回メディシナルケミストリーシンポジウム、2014年11月26-28日、神戸(ポスター)。

Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Masaya Kotake, Masataka Shiozuka, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Takeo Usui, Ryoichi Matsuda, Yoshio Hayashi, Structure Activity Relationship Study of (+)-Negamycin for Readthrough Activity at Duchenne Muscular Dystrophy, 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, 31 August 2014 to 5 September 2014, Sofia, Bulgaria (Poster)。

濱田圭佑、田口晃弘、小竹優也、生澤俊太郎、会田 俊、塩塚政孝、野々村禎昭、高山健太郎、薬師寺文華、臼井健郎、松田良一、林 良雄、「ネガマイシン誘導体におけるC末端部修飾とリードスルー活性への効果」、創薬懇話会2014、2014年7月10-11日、岐阜(ポスター)。

Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Masaya Kotake, Masataka Shiozuka, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Yoshiaki Nonomura, Ryoichi Matsuda, Yoshio Hayashi, Structure Activity Relationship Study of (+)-Negamycin for Potent Readthrough-Promoting Activity at Nonsense Mutation, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/50th Japanese Peptide Symposium, 6-8 November, 2013, Osaka (Poster)。

田口晃弘、濱田圭佑、小竹優也、塩塚政孝、高山健太郎、薬師寺文華、野々村禎昭、松田良一、林 良雄、創薬合成研究からのリードスルー活性を有する天然物の発見、第31回メディシナルケミストリーシンポジウム、2013年11月20-22日、広島(ポスター)。

[図書](計1件)

田口晃弘、濱田圭佑、林良雄、リードスルー機能に着目した遺伝性疾患治療薬の創製研究、ファルマシア(最前線)、Vol.50, No.10, 2014, 953-957

[産業財産権]

出願状況 なし  
取得状況 なし

[その他]

ホームページ等

<http://hinka-toyaku.s2.weblife.me/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 晃弘 (TAGUCHI, Akihiro)

東京薬科大学・薬学部・薬品化学教室・助教

研究者番号：40707311

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし